

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

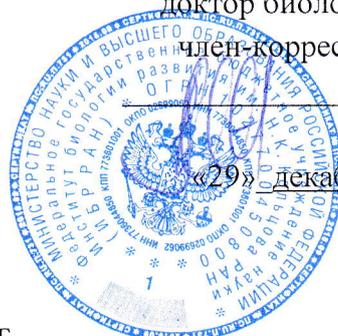
УДК 576.5

Рег. № ГЗ 0108-2019-0005

Рег. № НИОКТР АААА-А19-119040290079-0

УТВЕРЖДАЮ

Врио директора ИБР РАН  
доктор биологических наук,  
член-корреспондент РАН  
\_\_\_\_\_ А.В. Васильев



«29» декабря 2020 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)

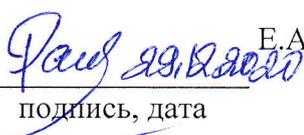
Руководитель НИР,  
главный научный сотрудник,  
кандидат биологических наук

Ю.В. Маркитантова

29.12.2020  
подпись, дата

Москва 2020

## СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель, главный научный сотрудник, кандидат биологических наук	 <u>29.12.2020</u> подпись, дата	Ю.В. Маркитантова, (раздел 1,3)
Исполнители: главный научный сотрудник, доктор биологических наук	 <u>29.12.2020</u> подпись, дата	Э.Н. Григорян (раздел 1,3)
Ведущий научный сотрудник, доктор биологических наук	<u>Панова 29.12.2020 г.</u> подпись, дата	И.Г. Панова (раздел 1)
Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук	 <u>29.12.2020</u> подпись, дата	В.Н. Сими́рский (раздел 1)
Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук	 <u>29.12.2020</u> подпись, дата	А.С. Микаелян (раздел 2)
Научный сотрудник, кандидат биологических наук	 <u>29.12.2020</u> подпись, дата	Е.А. Радугина (раздел 3)
Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук	 <u>29.12.2020</u> подпись, дата	О.В. Подгорный (раздел 4)
Нормоконтроль, руководитель информационно-аналитического отдела, кандидат биологических наук	 <u>29.12.2020</u> подпись, дата	Е.Б. Абрамова

## РЕФЕРАТ

Отчет 114 с., 24 рисунка, 244 используемых источников, 10 публикаций по теме, 2 отчетные публикации

РЕГЕНЕРАЦИЯ И ПАТОЛОГИЯ, ТКАНИ И ОРГАНЫ, КЛЕТКИ-ИСТОЧНИКИ РЕГЕНЕРАЦИИ СЕТЧАТКИ, СТРАТЕГИИ РЕГЕНЕРАТИВНОГО ОТВЕТА, ТРАНСДИФФЕРЕНЦИРОВКА, ПРОЛИФЕРАЦИЯ, ЭПИТЕЛИО-МЕЗЕНХИМНАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ, МОРФОГЕНЕЗ ТКАНЕЙ ГЛАЗА, НЕЙРОГЕНЕЗ, ГОМЕОБОКССОДЕРЖАЩИЕ ГЕНЫ, РЕГУЛЯТОРНЫЕ ФАКТОРЫ

Исследования выполнены на традиционных, оригинальных и уникальных моделях *in vivo* и *in vitro*. Цель работы – изучение молекулярно-генетических механизмов дифференцировки клеток и морфогенеза тканей и органов позвоночных, в развитии, регенерации, патологиях; пластичности клеток и роли факторов микроокружения, стратегий регенерационного ответа и поиск способов регуляции клеточными процессами. Обобщены сведения о биологии клеток-источников регенерации сетчатки (КИРС) глаза у позвоночных, факторах ниши, стимулирующих/блокирующих регенеративные ответы. Систематизированы результаты исследований связи ключевых гомеобокс-содержащих генов (ГМБ) с развитием патологий, затрагивающих сетчатку и ретинальный пигментный эпителий (РПЭ) глаза. Проведен анализ связи нарушений редокс-гомеостаза, при разобщении сетчатки и РПЭ с проявлением реакций раннего клеточного ответа на стресс. Приведены экспериментально полученные и биоинформационные данные, объясняющие сходство и особенности поведения клеток РПЭ у видов с различным регенерационным потенциалом. Обнаружено влияние коктейля факторов «секретома» из регенерирующих тканей глаза тритона на фенотипическую пластичность и экспрессию регуляторных генов в клетках линии ARPE-19 человека. Получены данные о развитии под действием направленного избыточного освещения патологических изменений и процессов старения РПЭ у крыс-альбиносов, за счет усиленного накопления в клетках липофусцина, в отсутствие меланина – компонента системы антиоксидантной защиты. Получены важные в диагностике сведения о динамике билирубина и некоторых Toll-рецепторов, вовлеченных в работу антиоксидантной и иммунной систем, в процессе гистогенеза тканей глаза человека, в нормальном пренатальном развитии и патологии. На модели экспериментально индуцируемой эпителио-мезенхимной трансформации клеток печени мыши, с помощью ингибиторного и биоинформационного анализа, идентифицирована новая мишень - гиалуронансинтаза - фармакологических ингибиторов (этоксазол, бупрофезин, трифлумурон) синтеза хитинсинтазы, маркеров развития воспаления и

фиброза. С помощью метода тройного мечения, впервые описан феномен активации нейрогенеза в гиппокампе при моделировании нейропатологии у мыши, вызванной введением блокатора ГАМК-рецепторов пентилентетразола.

Результаты исследований способствуют пониманию механизмов дифференцировки и регуляции пластичности клеток, в развитии, регенерации и при патологии, и лежат в основе разработки фармакологических подходов для поддержания гомеостаза, коррекции патологических изменений, стимуляции восстановительных процессов в тканях и органах человека.

## СОДЕРЖАНИЕ

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ.....	6
ОБЩЕЕ ВВЕДЕНИЕ.....	9
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	11
РАЗДЕЛ 1 КЛЕТОЧНЫЕ, МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ И РЕГЕНЕРАЦИИ ТКАНЕЙ ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА.....	11
Подраздел 1.1 Особенности регенеративного ответа в сетчатке и ретинальном пигментном эпителии у позвоночных. Исследование роли гомеобокс-содержащих генов в регенерации и патологии этих тканей.....	11
Подраздел 1.2 Исследование соотношения прогениторных свойств и специализации клеток – потенциальных внутренних источников регенерации сетчатки глаза позвоночных животных и человека.....	26
Подраздел 1.3 Органотипическое культивирование как способ изучения восстановительных возможностей сетчатки глаза позвоночных животных и человека.....	38
Подраздел 1.4 Изучение действия компонентов секрета из кондиционированных сред регенератов тканей глаза <i>urodele</i> на клетки пигментного эпителия сетчатки человека <i>in</i> <i>vitro</i> .....	49
Подраздел 1.5 Исследование морфогенеза и дифференцировки тканей глаза человека в раннем пренатальном развитии.....	68
РАЗДЕЛ 2 МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ КАНЦЕРОГЕНЕЗА И РЕГЕНЕРАЦИИ ПЕЧЕНИ.....	81
Подраздел 2.1 Ингибирование отложения гиалуронана новыми соединениями кумарина и ингибиторами синтеза хитина.....	81
РАЗДЕЛ 3 МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИЗМЕНЕНИЙ РЕГЕНЕРАЦИОННЫХ ПРОЦЕССОВ У ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ ПОД ВЛИЯНИЕМ ФАКТОРОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ.....	88
Подраздел 3.1 Исследование появления ранних обусловленных иллюминацией признаков старения в ретинальном пигментном эпителии у молодых крыс альбиносов.....	88
РАЗДЕЛ 4 ПРОЛИФЕРАТИВНЫЙ КАСКАД В НИШЕ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЗУБЧАТОЙ ИЗВИЛИНЫ ГИППОКАМПА.....	96
ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	108
ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ЗА 2020 ГОД .....	113

## ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

В настоящем отчете о НИР применяют следующие сокращения и обозначения:

- АЛТ – Аланинаминотрансфераза
- АСТ – Аспартатаминотрансфераза
- АФК – активные формы кислорода
- АФП – альфафетопротеин
- БрдУ – 5-бромо-2'-деоксиуридин
- ВЯС – внутренний ядерный слой
- ВКМ – внеклеточный матрикс
- ВМД – возрастная макулярная дегенерация сетчатки
- ГАМК – гамма-аминомасляная кислота
- ГМБ – гомеобоксодержащие гены
- ГК – гиалуроновая кислота
- ГФКБ – глиальный фибриллярный кислый белок
- ГЦК – гепатоцеллюлярная карцинома
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки
- иРНК – информационная РНК
- ИЦХ – иммуноцитохимия
- КИРС – клетки-источники регенерации сетчатки
- кПЦР – количественная полимеразная цепная реакция
- КС – кондиционированная среда
- ЛП – латентные прогениторы
- ЛФ – липофусцин
- МГ – глия Мюллера
- МСК – мезенхимные стволовые клетки
- мкМ – микромоль
- мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота
- НП – нейральные прогениторы
- НС – нейральная сетчатка
- НСК – нейральные стволовые клетки
- НСПК – нейральные стволовые прогениторные клетки
- НЯС – наружный ядерный слой

ОТ-ПЦР – обратная транскрипция, полимеразная цепная реакция  
ОС – окислительный стресс  
ПТЗ – пентилентетразол  
РПЭ – ретинальный пигментный эпителий  
СК – стволовые клетки  
СТ – стекловидное тело  
ТФ – транскрипционные факторы  
УНУ – уникальная научная установка  
ЦМЗ – цилиарно-маргинальная зона  
ЦТ – цилиарное тело  
ЦКП – центр коллективного пользования  
ЭМП – эпителио-мезенхимный переход  
ЭСК – эмбриональные стволовые клетки  
ЭтдУ – 5-этинил-2'-деоксиуридин  
ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка  
ARPE-19 – линия клеток РПЭ глаза человека  
ВМР – костный морфогенетический белок  
C57Bl – инбредный штамм лабораторной мыши  
СС14 – тетрахлорметан  
CRALBP – клеточный ретинальдегид связывающий белок  
CV – центральная вена  
ДАВСО – триэтилендиамин  
DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндол  
ERK – extracellular signal-regulated kinase  
FGF2 – фактор роста фибробластов 2  
GFP – зеленый флуоресцентный белок  
5'-CpG-фрагменты – динуклеотиды, мишени метилирования в ДНК  
НАВР – гиалуронан связывающий белок  
IC50 – расчетная ингибирующая концентрация  
IntDen – интенсивность флуоресцентного сигнала  
LRAT – лецитинретинолацилтрансфераза  
МАРК – митоген-активируемые протеинкиназы  
MD5HAS – домен амфифильной цитоплазмы  
МТТ – дифенилбромид тетразолия  
4MU – кумарин-4-метилумбеллиферон

NIH/3T3) – линия эмбриональных фибробластов мыши  
PCNA – ядерный антиген пролиферирующих клеток  
PEDF – пигментный фактор эпителиального происхождения  
QI – количественный индекс интенсивности флуоресценции  
RPE65 – Retinal pigment epithelium-specific 65 kDa protein  
 $\alpha$ SMA – гладкомышечный актин  
TIR – TIR домен внутриклеточного адаптерного белка  
TIRAP – toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein  
внутриклеточный адаптерный белок  
TLRs – Толл-подобные рецепторы  
TRIF – адаптерный белок  
5TMSER – alpha Ligand-binding Domain  
TUNEL – terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling - метод обнаружения  
фрагментации ДНК путем маркировки 3'-гидроксильных концов в двухцепочечных  
разрывах ДНК  
UDP-GlcNAc – субстрат для хитинсинтаз и гиалуронансинтаз  
VEGF – фактор роста эндотелия сосудов

## ОБЩЕЕ ВВЕДЕНИЕ

Изучение механизмов клеточной дифференцировки в развитии, пластичности, регуляции этими процессами при регенерации и патологии тканей и органов, является приоритетным направлением современной биологии развития, а полученные фундаментальные знания лежат в основе разработки новых биомедицинских подходов регенеративной медицины. Ключевые вопросы в этой области тесно связаны с изучением стратегий регенерационных ответов: дедифференцировка клеток и/или активация клеток со свойствами стволовых, пролиферация прогениторных клеток, эпителио-мезенхимная трансформация клеток при травмах, патологических состояниях, выявлением общности и различий в поведении одноименных клеток на начальных этапах регенерации и развития патологий тканей у человека.

К настоящему времени накоплена обширная информация о способах поддержания и активации клеток, являющихся потенциальными источниками для регенерации тканей глаза у позвоночных, роли ряда сигнальных белков и регуляторных факторов. Клетки-источники регенерации сетчатки представлены: стволовыми, малодифференцированными, а также специализированными предшественниками – латентными прогениторами (ЛП). Молекулярно-генетический профиль клеток-источников в разной степени отражает таковой в развитии по экспрессии набора гомеобоксодержащих генов (ГМБ), кодирующих транскрипционные факторы (ТФ), участвующих в контроле развития тканей глаза позвоночных (семейств факторов Pax6, Chx, Rx, Six, Sox, Chx, Prox, Pitx и др.), а также ТФ из числа индукторов плюрипотентности (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-мус и др.). Наряду с этим, малодифференцированные клетки, а также дифференцированные предшественники (ЛП) характеризуются экспрессией генов, обеспечивающих их специализацию и функционирование.

Современный уровень развития геномных технологий, секвенирования транскриптомов изолированных клеток, клеточных технологий, их применение в изучении фундаментальных основ регенерации, подводит к пониманию ключевых основ многих регенерационных процессов, их сходства и различий в контексте работы генных сетей (сигнальных путей, экспрессии факторов транскрипции) и эпигенетических условий для восстановления тканей. Основными направлениями остаются исследование поведения и молекулярно-генетического профиля клеток-источников, поиск и стимуляция эндогенного резерва для регенерации у млекопитающих. С учетом этих данных проводится исследование роли системных организменных и локальных факторов (сигнальных путей, факторов ниш стволовых и прогениторных клеток), способных регулировать поведение клеток - источников регенерации.

Целью работы является определение ключевых сигнальных и регуляторных факторов клеточной дифференцировки и ее пластичности, на моделях развития, регенерации и патологии тканей и органов. В отчет по теме «Клеточные и молекулярные механизмы развития и регенерации тканей и органов у низших и высших позвоночных. Поиск способов регуляции восстановительных процессов», вошли исследования, в которых в качестве объектов используются низшие и высшие позвоночные, модели *in vivo* и *in vitro*, в том числе разработанные в лаборатории. Для выяснения частных вопросов, в рамках задач темы, использовали следующие модели: эпиморфная регенерация сетчатки из клеток ретинального пигментного эпителия (РПЭ) глаза у низших позвоночных животных (Urodela) *in vivo*; органотипическое *3D-in vitro-like-in vivo* культивирование тканей заднего сектора глаза низших позвоночных (тритоны); клеточная система культивирования ретинального пигментного эпителия человека *in vitro* (линия ARPE-19); ткани глаза (сетчатка, хрусталик, стекловидное тело) плодов человека; моделирование процессов старения клеток РПЭ при направленном действии избыточного света; модели фиброза печени мыши; модель нейрогенеза гиппокампа мыши. Работа выполнена с соблюдением международных принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным; правил, одобренных комиссиями по биоэтике РАН и Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН.

Разносторонние исследования на моделях *in vivo*, клеточных, тканевых, органотипических моделях *in vitro*, *3D-in vitro-like-in vivo*, позволяют выявлять как особенности, так и общие закономерности молекулярно-генетических аспектов дифференцировки и регуляции развития и регенерации органов и тканей, а также решать частные вопросы, которые находят практическое приложение в различных отраслях медицины.

## ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

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

#### Подраздел 1.1 Особенности регенеративного ответа в сетчатке и ретинальном пигментном эпителии у позвоночных. Исследование роли гомеобоксодержащих генов в регенерации и патологии этих тканей.

##### 1.1.1 Введение

Исследования механизмов дифференцировки клеток в развитии, регенерации, а также поддержания гомеостаза нейральных тканей глаза, представляют значительный научный и практический интерес. Восстановление функции нейральной ткани глаза и сохранение в целом зрения, находится в числе приоритетных проблем биомедицины и офтальмологии. Сетчатка глаза позвоночных животных – сложный сенсорный орган, для поддержания гомеостаза и выполнения функций которого необходимы взаимодействия с ретинальным пигментным эпителием (РПЭ) и сосудистой оболочкой (хороид) глаза [1]. Ряд нарушений, затрагивающих РПЭ и сетчатку, генетически обусловлены и связаны с мутациями и сбоями в работе гомеобоксодержащих генов (ГМБ), ассоциированы с возрастом и/или системными заболеваниями организма, а также могут быть вызваны регматогенной отслойкой нейральной сетчатки [2]. У млекопитающих, в том числе человека, разобщение взаимодействий сетчатки с РПЭ, приводит к нарушению редокс-гомеостаза, развитию окислительного стресса, дистрофическим и дегенеративным изменениям в РПЭ и нейральной сетчатке (НС), а в конечном итоге – к потере зрения. При нарушении функциональных взаимодействий РПЭ и сетчатки, развитии патологических состояний, в результате повреждения, отслойки сетчатки, ранние клеточные и молекулярно-генетические процессы, в которые вовлечены гомеобоксодержащие гены, во многом схожи. Эти процессы направлены, прежде всего, на защиту клеток от стресса, воспаления и дегенеративных изменений, однако финальный результат у разных видов не равнозначен. В данном подразделе темы представлено детальное описание этих процессов, продемонстрирована роль ГМБ в поддержании гомеостаза и развитии наследственных патологий сетчатки и РПЭ, дано обоснование таксоно-специфических различий в стратегиях регенерационного ответа, на локальном и системном уровне регуляции [2,3].

### 1.1.2 Материалы и методы

Проведен подробный анализ биоинформационных данных (<https://eyeintegration.nei.nih.gov>; <http://49.4.93.68:30004/>, и др.), электронных ресурсов Pubmed NCBI, Science Direct, Research Gate и др.; полученных в лаборатории и опубликованных результатов исследований механизмов регенерации сетчатки у низших позвоночных (хвостатых амфибий) и регенерационных ответов клеток-источников восстановления сетчатки человека. Использована также информация из доступных баз белковых и нуклеотидных последовательностей: UniProt, NCBI, OMIM и др. Проанализирована связь ключевых эволюционно консервативных ГМБ с развитием наследственных патологий, затрагивающих сетчатку и РПЭ глаза человека; роль ГМБ в развитии и функционировании этих тканей у модельных позвоночных, на основе данных транскриптомов единичных клеток (нейронов и глии) сетчатки. Результаты представлены в обзоре, включающем 398 цитируемых научных источников [2]. Проведен широкий анализ накопленных к настоящему времени сведений о роли редокс-гомеостаза в развитии реакций раннего клеточного ответа, при разобщении сетчатки и РПЭ у хвостатых амфибий и млекопитающих, в том числе человека [3]. Выявление сходства и особенностей в механизмах регенерационного ответа у видов с различным регенерационным потенциалом, лежит в основе разработки адекватных подходов к восстановлению и поддержанию функции сетчатки и РПЭ у человека.

### 1.1.3 Результаты и обсуждение

В нашей работе проанализирован большой объем электронных ресурсов, экспериментальных данных (398), высвечивающих роль ключевых гомеобокс-содержащих генов, из числа регуляторов развития глаза, в поддержании функций сетчатки и РПЭ, и развитии наследственных патологий, затрагивающих данные ткани глаза [2]. Суммированы сведения о хромосомной локализации, транскриптах, уровне экспрессии и клеточных функциях различных классов гомеобокс-содержащих генов в клетках нейральной сетчатки и РПЭ млекопитающих. Дана оценка состояния на текущий момент проблемы в области исследований наследственных патологий сетчатки и РПЭ, ассоциированных с мутациями ГМБ, а также предлагаемых подходов к терапии наследственных патологий сетчатки и РПЭ.

Сетчатка позвоночных представлена однослойным ретинальным эпителием (РПЭ) и радиальными слоями нейральной сетчатки, в которой выделяют шесть типов нейронов (фоторецепторы, биполярные клетки, горизонтальные клетки, амакриновые клетки, ганглиозные клетки, интерплексиформные нейроны) и четыре типа глии (клетки Мюллера, астроциты, микроглия, олигодендроциты) (рисунок 1.1.1). Основные типы

клеток НС включают ряд подтипов, нейронов и глии, организованных в сложный ансамбль, где взаимодействие осуществляется благодаря большому числу нейральных и межклеточных связей [1]. Специализация клеток сетчатки осуществляется под контролем генных сетей, в которых важное место занимают гомеобокс-содержащие гены (ГМБ) (рисунок 1.1.1). ГМБ играют большую роль в эмбриогенезе сетчатки и поддержании ее гомеостаза у взрослых животных [4, 5]. ГМБ кодируют факторы транскрипции, которые имеют эволюционно консервативный гомеодомен и обладают способностью специфически связываться сДНК, регулируя экспрессию ряда генов, и других факторов транскрипции.

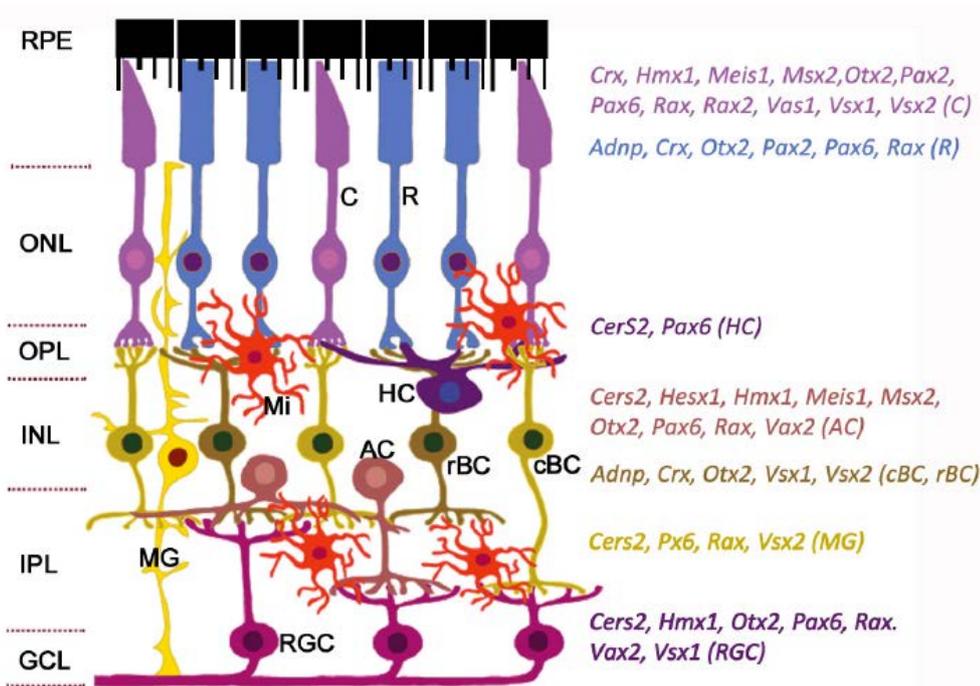


Рисунок 1.1.1 - Схема распределения экспрессии гомеобокс-содержащих генов в нейронах сетчатки глаза мыши (по данным анализа транскриптомов единичных клеток <https://eyeintegration.nei.nih.gov>), ассоциированных с аномалиями развития и функционирования сетчатки и РПЭ глаза человека

Детальное описание хромосомной локализации, экспрессии анализируемых ГМБ, связи их мутаций с патологиями этих тканей глаза приведено в статье [2]. RPE – ретикулярный пигментный эпителий; ONL и INL – наружный и внутренний ядерные слои; OPL и IPL – наружный и внутренний сетчатые слои; GCL – слой ганглиозных клеток; фоторецепторы: С – колбочки; R – палочки; HC – горизонтальные и AC – амакриновые нейроны; BCr и BCc – биполяры; MG – глиа Мюллера; Mi – микроглия.

Мутации и нарушения функционирования этих генов ассоциированы с рядом моногенных врожденных заболеваний глаза у человека, которые затрагивают сетчатку и РПЭ [2]. Диагностика этих заболеваний затруднена, в силу того, что гомеобокс-содержащие гены часто оказывают плеiotропное действие на сетчатку. Для

ГМБ, которые экспрессируются не только в сетчатке, но и в других тканях и органах, патологические изменения в сетчатке являются вторичными, как, например, в случае диабетической ретинопатии или дегенерации сетчатки при глаукоме [6].

Дополнительные трудности в диагностике наследственных заболеваний сетчатки возникают в связи с тем, что мутации разных ГМБ могут вызывать сходные фенотипические изменения сетчатки (микрофтальмия, пигментный ретинит) [7, 8]. Эксперименты на лабораторных животных по нокауту ГМБ позволили, с одной стороны, смоделировать многие наследственные патологии сетчатки человека и разработать терапевтические подходы для их лечения [9]. С другой стороны, они позволили выявить видоспецифичность функций ГМБ в нормальном развитии и патогенезе сетчатки.

Экспериментальные подходы к терапии патологий сетчатки, связанных с нарушениями функционирования регуляторных генов, быстро развиваются. Разработка методов высокоэффективного секвенирования, анализа транскриптомов отдельных клеток технологий редактирования генома (CRISPR-Cas9), позволила углубить знания о сигнальных путях, в которых участвуют ГМБ, найти надежные маркеры для диагностики наследственных нарушений сетчатки и РПЭ и выявить мишени для коррекции этих патологий [10, 11]. Описание транскриптомов клеточных типов сетчатки и РПЭ, позволяет наметить стратегию борьбы с рядом генетических наследственных заболеваний сетчатки человека, выявляемых в ранних прогениторных, фетальных клетках. Данные о транскриптомах индивидуальных клеток (single-cell RNA sequencing), позволили получить информацию о специфических клеточных «транскриптомных ландшафтах». Эти сведения вносят вклад в пространственно-временную характеристику, динамику появления и начала функционирования специализированных типов клеток сетчатки и РПЭ позвоночных, в выявление, как сходства, так и отличий. Сравнение тканеспецифического профиля экспрессии генов, проведенное, в том числе, и с известными данными для сетчатки плодов макаки и мыши, позволило обнаружить большее сходство в транскриптомах фетальных клеточных типов сетчатки человека и мыши, чем человека и обезьяны [12].

В числе перспективных стоят подходы клеточной терапии, такие как использование органотипичных 3D-культур, органоидов, и репрограммирование эмбриональных стволовых клеток [13, 14]. Внедрению этих методов в клинику способствует внедрение новых невирусных векторов тканеспецифичной доставки генетического материала и оптимизация методов трансплантации, а также использование аутентичных линий ИПСК для персонализированной терапии [15, 16]. Наиболее многообещающими в экспериментальной и клинической работе являются стратегии

нейропротекции, направленные на мобилизацию эндогенного клеточного резерва и поддержание функций сетчатки и РПЭ глаза у человека [17].

Нами дано детальное описание клеточных процессов, развивающихся в результате нарушения взаимодействий после разобщения связи между НС и РПЭ в ответ на стресс у разных позвоночных. Ранние реакции клеточного ответа связаны с нарушениями редокс-гомеостаза, развитием окислительного стресса (ОС), запускающими в сетчатке воспалительную реакцию и иммунный ответ [3] (рисунок 1.1.2).

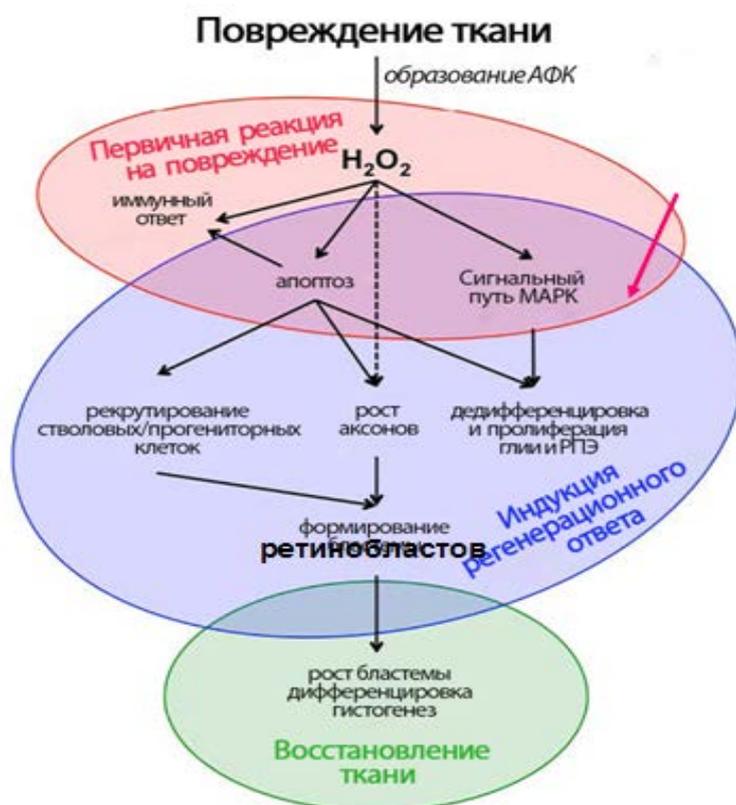


Рисунок 1.1.2 - Этапы (модули) регенерационного ответа сетчатки на повреждение [3]

В зоне повреждения запускается каскад защитных реакций, медиаторами которых выступают ионы кальция, аденозинтрифосфат (АТФ) и активные формы кислорода (АФК), высвобождающиеся в межклеточное пространство из поврежденных клеток [18]. Контроль воспалительных и восстановительных процессов в сетчатке осуществляется как на локальном уровне (тканевой, внутриклеточный, генетический) – клеточное, молекулярное микроокружение, резидентные клетки кровеносной и иммунной системы, так и на системном уровне (органный, организменный), который включает иммунную, нейроэндокринную, нейромедиаторные сигнальные системы. Помимо активации иммунокомпетентных клеток на локальном уровне, параллельно происходит

инфильтрация сетчатки клетками иммунной системы из крови (моноциты/макрофаги и др.), вследствие нарушения проницаемости гематоретинального барьера, которые также секретируют факторы воспаления, цитокины, а также факторы защиты клеток [19]. Ключевые реакции: высвобождение АТФ, ионов кальция и АФК во внеклеточное пространство, привлечение клеток иммунной системы, активация макро- и микроглии, апоптоз нейронов ранних процессов при нарушении связи НС и РПЭ у разных позвоночных, универсальны и консервативны [3, 20]. Первые события, связанные с нарушением взаимоотношений этих тканей у позвоночных, в том числе человека, затрагивают не только РПЭ и фоторецепторы, но и пограничные ткани (мембрану Бруха и хороид). Эти процессы приводят к изменениям фенотипа клеток РПЭ, частичному выходу клеток за пределы слоя и инициации пролиферации. Разобщение сетчатки из РПЭ у хвостатых амфибий приводит через этап репрограммирования *in situ* клеток РПЭ в нейроны и глию сетчатки, к полноценному структурному и функциональному восстановлению сетчатки и слоя клеток РПЭ [21, 22]. Эти процессы ведут к массовой гибели клеток, глиозу и фиброзу перерождению клеток сетчатки. Взаимодействия РПЭ с фоторецепторами ответственны за степень проявления реактивного глиоза у млекопитающих – реакции глии Мюллера (МГ) на структурные и метаболические нарушения в сетчатке [23]. У млекопитающих (человека), нарушение связи РПЭ с НС активирует пролиферацию и конверсию клеток РПЭ по пути эпителиально-мезенхимной дифференцировки, что лежит в основе развития фиброзных изменений в сетчатке и РПЭ, как, например, в случае пролиферативной витреоретинопатии. В конечном итоге в этих тканях *in vivo* развиваются дегенеративные процессы, что может приводить к утрате зрения [24, 25].

Вторично развивающиеся дегенеративные процессы в сетчатке млекопитающих связаны с изменениями, затрагивающими функционирование клеток во внутреннем отделе нейральной сетчатки (интернейроны, глиа Мюллера, ганглиозные клетки). Сетчатке млекопитающих свойственна усиленная пролиферация МГ, увеличение числа их отростков (реактивный глиоз), как ответ на повреждение, при патологии [23]. Если на ранних этапах развития патологий сетчатки (дисплазия, ретинопатия) связанных с нарушением функций клеток, изменения в сетчатке еще носят обратимый характер, то для поздних этапов характерна массовая гибель специализированных нейронов и/или глии.

На фоне ОС процессы фагоцитоза, апоптоза, аутофагия, глиоза, происходящие в сетчатке в норме, резко усиливаются [26]. С одной стороны, апоптоз приводит к активации каспаз, под действием которых гибнущие клетки секретируют факторы роста и простагландины и активируют процесс компенсаторной пролиферации (“путь

возрождения феникса”, “Phoenix Rising” pathway). С другой - апоптоз может быть направлен на элиминирование клеток, которые поддерживают клеточный гомеостаз ткани путем ограничения пролиферации [27]. Клетки РПЭ обладают фагоцитарной активностью, участвуя в утилизации “отработанных” дисков фоторецепторов в сетчатке в норме, а в условиях ОС активность клеток РПЭ возрастает, и они могут фагоцитировать и апоптотические фрагменты других типов клеток. Погибшие клетки высвобождают во внеклеточную среду АТФ и АФК, а макрофаги секретируют провоспалительные цитокины – фактор некроза опухоли TNF-alpha и интерлейкин II IL-1b. Эти факторы способны стимулировать активность эндогенной микроглии сетчатки. TNF-alpha обеспечивает дальнейшее усиление ОС, запуская экспрессию индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS) и НАДФН-оксидазы в микроглии и МГ [28]. Микроглия сетчатки также способна в условиях ОС к повышенной секреции провоспалительных цитокинов, которые вызывают гибель ганглиозных клеток [29]. Под действием провоспалительных цитокинов TNF $\alpha$  и IL-1b как у амфибий, так и у млекопитающих, в РПЭ происходит раннее блокирование экспрессии генов-маркеров зрительного цикла (Rpe65, Lrat, Rdh5, Rdh10, Rbp1) [30]. Секретируемые иммунными клетками сетчатки и РПЭ провоспалительные цитокины также вызывают усиленное производство АФК и каспаз, и развитие апоптоза клеток в РПЭ человека. Большинство наследственных заболеваний сетчатки связано именно с повышением внеклеточного уровня АТФ, что приводит к апоптозу фоторецепторов [31]. Повреждение нейральных тканей, сопровождаемое ОС, в совокупности с факторами воспаления, активирует ряд регуляторных факторов [32]. После отслойки сетчатки или повреждения зрительного нерва у хвостатых амфибий и млекопитающих, прослеживается сходство ответа клеток сетчатки на стресс, которое касается ремоделирования внеклеточного матрикса, активации ТФ – маркеров воспаления и клеточного стресса, в частности, белков теплового шока (HSPs), протоонкогенов c-fos, c-myc, c-jun и AP-1 [33-35].

Среди сигнальных белков, опосредующих ранний клеточный ответ на повреждение (пролиферация, фенотипические изменения) – продуцируемые клетками сосудистой сети и РПЭ факторы роста FGF2, PEDF и VEGF, соотношение которых важно для нормального функционирования сосудистой сети, регуляции дифференцировки РПЭ, поддержания пролиферации клеток-предшественников при регенерации сетчатки амфибий, а также поддержания дифференцировки клеток РПЭ млекопитающих. У последних, вскоре после отслойки нейральной части сетчатки от РПЭ, также усиливается экспрессия гена *FGF2* и соответствующих рецепторов FGFR. FGF2, как и IGF-1, ускоряют пролиферацию и проявление пронеуральной дифференцировки в клетках РПЭ амфибий [36]. РПЭ играет

при этом двоякую роль: с одной стороны, он секретирует экзосомы, которые содержат ангиогенный фактор VEGFR с другой стороны, в его клетках формируются инфламмосомы, принимающие участие в иммунной защите сетчатки [37]. Предполагается участие факторов врожденной иммунной защитной системы, в частности, Толл-подобных рецепторов (Toll-like receptors, TLRs) и АФК в репрограммировании и трансдифференцировке клеток при заживлении раны [38]. В целом, скоординированная работа регуляторных и сигнальных факторов, усиленно продуцирующихся в клетках при нарушении контактов, повреждении, направлена на восстановление клеточного и метаболического гомеостаза сетчатки [39]. Первичная реакция сетчатки при нарушении ее целостности сменяется этапом репарации ткани, в ходе которого происходят пролиферативные и фиброзные процессы или полноценное восстановление ткани. В одних случаях эти процессы способствуют активации клеток-источников регенерации и успешной регенерации, как у хвостатых амфибий (РПЭ), рыб (МГ), в других наблюдается фиброзное перерождение РПЭ и реактивная активация глии, что служит причиной офтальмопатологии (человек) [24, 25].

В качестве потенциальных клеточных источников для регенерации сетчатки у позвоночных рассматриваются резидентные стволовые/прогениторные клетки или дифференцированные клетки – латентные прогениторы (ЛП), такие как РПЭ и МГ [40, 41]. В первом случае происходит активация пролиферации недифференцированных клеток с их последующей дифференцировкой. Во втором случае, когда источником регенерации служат РПЭ или МГ, пролиферации предшествует этап дедифференцировки – потеря клетками специализированных внутриклеточных структур и приобретение ими плюрипотентности (рисунок 1.1.2). Дедифференцировка, пролиферация и приобретение плюрипотентности - ключевые процессы, обеспечивающие второй этап - инициацию регенерации сетчатки, тогда как ее успешное завершение (третий этап) требует наличия дополнительных факторов, обеспечивающих программирование (в случае стволовых/прогениторных клеток) или репрограммирование пролиферирующих клеток (как РПЭ у тритона *in vivo*) и их дифференцировку с восстановлением нормальной морфологической структуры сетчатки.

Клетки РПЭ и МГ сетчатки взрослого человека, проявляют свойства ЛП, в системе *in vitro* экспрессируют гомеобокс-содержащие гены факторов транскрипции, характерных для ретинальных прогениторных клеток PAX6, SOX2, CHX10, NOTCH, гены-маркеры плюрипотентного статуса, а также белок цитоскелета нестин [42, 43].

С использованием методов клеточных технологий предпринимаются попытки экспериментального репрограммирования клеток-источников (малодифференцированных

клеток, эмбриональных стволовых, эмбриональных прогениторных клеток сетчатки, ИПСК, получения на их основе органоидов и разработки способов трансплантаций [14, 44-46]. Разрабатываемые подходы к регуляции пролиферации и активации программы нейрогенеза в клетках МГ, основаны на стимуляции пролиферации экзогенными факторами из числа сигнальных белков Wnt, Notch, Hedgehog [47], стратегиях редактирования генома с помощью CRISPR/Cas9 или за счет активации внутриклеточных факторов транскрипции [48]. Проблемы использования для регенерации сетчатки у млекопитающих, в том числе человека, латентных экзогенных клеток со свойствами «стволовости» все еще далеки от разрешения, что обусловлено сложностью высокоорганизованной структуры сетчатки, устойчивой тенденцией к формированию рубца (пролиферативная витриоретинопатия), неизученностью механизмов взаимодействий клеток, необходимых для восстановления ткани. Следует подчеркнуть, что трансплантация экзогенных клеток-источников, с последующими терапевтическими воздействиями, способны, после нарушения взаимодействий РПЭ и сетчатки, в течение какого-то времени к поддержанию жизнеспособности клеток сетчатки реципиента, тем самым отсрочив их гибель. Однако, не позволяют восстановить структуру сетчатки взрослых млекопитающих и человека *in vivo* [14, 16, 45].

Существующие в офтальмологии стратегии нейропротекции основаны на активации потенциальных эндогенных защитных механизмов, за счет использования фармакологических препаратов, нейротрансмиттеров, блокаторов пуринергических P2X рецепторов или их агонистов (рецепторов аденозина A3R). В основе одного из таких подходов лежит блокирование поступления кальция в клетки, поскольку избыток (дисбаланс) внутриклеточного кальция является одной из причин усиленного образования АФК. Блокада рецептора аденозина A2A микроглии подавляет воспаление, вызванное повышенным внутриглазным давлением, ОС, и гибелью клеток сетчатки [49].

Основные направления исследований возможностей регенерации сетчатки у высших позвоночных (человека) состоят в изучении экзогенных и эндогенных клеточных источников для восполнения клеток сетчатки, влияния микроокружения, поиске фармакологических препаратов для лечения/восстановления сетчатки (нейропротекции), в тех ситуациях, когда это может быть осуществимо.

Стратегии регенерационных ответов, эндогенной защиты клеток сетчатки у позвоночных могут находить объяснение в особенностях регуляции на уровне транскриптома, генома, метаболома, эпигенетики [29, 50-53]. Так, выявлены таксоно-специфические функции ТФ, кодируемого ГМБ Рах6, помимо его эволюционно консервативных функций, состоящих в контроле дифференцировке нейронов сетчатки

позвоночных. В этой работе с помощью технологии Cre-lox показано, что нокаут гена *Rax6* в РПЭ тритона, является причиной нарушений регенерации сетчатки и возникновения структур мезенхимного типа, аналогичных при повреждении сетчатки и последующем развитии витреопролиферативной патологии у человека *in vivo* [50]. Существуют также различия на уровне эпигенетической регуляции генов, кодирующих факторы транскрипции, задействованных в активации/блокировании ответов клеток нейральных тканей глаза на стресс и при патологии у разных видов позвоночных [29]. Так, при моделировании ВМД сетчатки у мыши были обнаружены специфические паттерны экспрессии большого числа генов в РПЭ мыши, и развитии ВМД у человека, которые обусловлены различиями в работе сигнальных путей, вовлеченных в патогенез этого заболевания [51]. В проявление регенерационных ответов нейральной ткани глаза объектов с неравноценными регенеративными способностями, как например, хвостатые амфибии и млекопитающие, могут также вносить вклад различия в механизмах эндогенных систем защиты.

#### 1.1.4 Заключение

В настоящее время появляется все больше данных в пользу точки зрения о том, что помимо сходства и универсальности ранних клеточных реакций, участия сигнальных путей, действие которых направленно на защиту клетки от стресса, существуют эволюционно закрепленные функциональные особенности в стратегиях использования регенеративного потенциала сетчатки. Проведенный нами анализ результатов мировых исследований, в том числе результатов, полученных в лаборатории, позволил сделать вывод о том, что поведение клеток-источников регенерации сетчатки во многом объясняется различиями в структурной организации генома и его регуляции [2,3]. Показано, В частности, эти различия лежат в основе эпителио-мезенхимной трансформации (ЭМТ) клеток РПЭ при его разобщении с НС у млекопитающих *in vivo*, а также *in vitro*, в отличие от естественного репрограммирования РПЭ тритона по нейральному пути дифференцировки, приводящему *in vivo* к восстановлению структуры сетчатки и ее функций. Идентификация общих и специфических звеньев в системах эндогенного контроля ответа клеток при нарушениях взаимодействий НС и РПЭ у разных позвоночных, и при патологиях этих тканей глаза у человека, лежит в основе понимания ключевых клеточных и молекулярных мишеней и выбора стратегий нейропротекции. Дальнейшие исследования роли ГМБ и ТФ в регуляции функций сетчатки в норме патологии, способствуют более глубокому пониманию молекулярно-генетических механизмов, лежащих в основе поддержания тканевого гомеостаза.

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП по биологии развития ИБР РАН.

#### 1.1.5 Список использованных источников

1. Hoon M., Okawa H., Della Santina L., Wong R.O. Functional architecture of the retina: Development and disease // *Prog.Retin. Eye Res.* – 2014. – Vol. 42. – P. 44–84.
2. Markitantova Yu.V., Simirskii V.N. Inherited retinal diseases through the eyes of homeobox genes//*Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol. 21. – No 5. – P. 1602. DOI: 10.3390/ijms21051602.– Q1 – отчетная публикация
3. Маркитантова Ю.В., Сими́рский В.Н. Роль редокс-системы в инициации регенерационного ответа нейральных тканей глаза позвоночных // *Онтогенез.* – 2020. – Т. 51. - No 1. – С. 19-34.
4. Zagozewski J.L., Zhang Q., Eisenstat D.D. Genetic regulation of vertebrate eye development // *Clin.Genet.* – 2014. - Vol. 86. – P. 453–460.
5. Stanescu D.; Iseli, H.P.; Schwerdtfeger, K.; Ittner, L.M.; Remé, C.E.; Hafezi, F. Continuous expression of the homeobox gene Pax6 in the ageing human retina. // *Eye (Lond)* – 2007. - Vol. 21. – P. 90–93.
6. Roy S., Amin S., Roy S. Retinal fibrosis in diabetic retinopathy // *Exp. Eye. Res.* – 2016. – Vol. 142. - P. 71–75.
7. Dias M.F., Joo K., Kemp J.A., Fialho S.L., Da Silva Cunha A., Woo S.J., Kwon Y.J. Molecular genetics and emerging therapies for retinitis pigmentosa: Basic research and clinical perspectives // *Prog.Retin. Eye Res.* – 2018. – Vol. 63. – P. 107–131.
8. Harding P., Moosajee M. The Molecular Basis of Human Anophthalmia and Microphthalmia // *J. Dev. Biol.* – 2019. – Vol. 7. – P. 16.
9. Cacheiro P., Haendel M.A., Smedley D. International Mouse Phenotyping Consortium and the Monarch Initiative. New models for human disease from the International Mouse Phenotyping Consortium // *Mamm.Genome.* – 2019. – Vol. 30. – P. 143–150.
10. Lukowski S.W., Lo C.Y., Sharov A.A., Nguyen Q., Fang L., Hung S.S., Zhu L., Zhang T., Grünert U., Nguyen T., et al. A single-cell transcriptome atlas of the adult human retina // *EMBO J.* – 2019. 38, e100811.
11. Vázquez-Domínguez I., Garanto A., Collin R.W.J. Molecular Therapies for Inherited Retinal Diseases-Current Standing, Opportunities and Challenges // *Genes.* – 2019. – Vol. 10. – P. 654.
12. Hu Y., Wang X., Hu B., Mao Y., Chen Y., Yan L., Yong J., Dong J., Wei Y., Wang W., et al. Dissecting the transcriptome landscape of the human fetal neural retina and

retinal pigment epithelium by single-cell RNA-seq analysis // *PLoS Biol.* – 2019. – Vol. 17. e3000365.

13. Welby E., Lakowski J., Di Foggia, V., Budinger D., Gonzalez-Cordero A., Lun A.T.L., Epstein M., Patel A., Cuevas E., Kruczek K.; et al. Isolation and Comparative Transcriptome Analysis of Human Fetal and iPSC-Derived Cone Photoreceptor Cells // *Stem Cell Rep.* – 2017. – Vol. 9. – P. 1898–1915.

14. Singh R., Cuzzani O., Binette F., Sternberg H., West M.D., Nasonkin I.O. Pluripotent Stem Cells for Retinal Tissue Engineering: Current Status and Future Prospects // *Stem Cell Rev. Rep.* – 2018. – Vol. 14. – P. 463–483.

15. Chen F.K., McLenachan S., Edel M., Da Cruz L., Coey P.J., Mackey D.A. iPSC Cells for Modelling and Treatment of Retinal Diseases // *J. Clin Med.* – 2014. – Vol. 3. – P. 1511–1541.

16. Gasparini S.J., Llonch S., Borsch O., Ader M. Transplantation of photoreceptors into the degenerative retina: Current state and future perspectives // *Prog. Retin. Eye Res.* – 2019. Vol. 69. – P. 1–37.

17. Pardue M.T., Allen R.S. Neuroprotective strategies for retinal disease // *Prog. Retin. Eye Res.* – 2018. – Vol. 65. – P. 50–76.

18. Cordeiro J.V., Jacinto A. The role of transcription-independent damage signals in the initiation of epithelial wound healing // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* - 2013. - Vol. 14. - № 4. - P. 249-262.

19. Ma W., Zhang Y., Gao C. et al. Monocyte infiltration and proliferation reestablish myeloid cell homeostasis in the mouse retina following retinal pigment epithelial cell injury // *Sci. Rep.* - 2017. - Vol. 7. - № 1. 8433. - P. 1-18.

20. Neves J., Zhu J., Sousa-Victor P. et al. Immune modulation by MANF promotes tissue repair and regenerative success in the retina // *Science.* - 2016. - Vol. 353. № 6294. aaf3646.

21. Chiba C., Mitashov V.I. Cellular and molecular events in the adult newt retinal regeneration // *The strategies for retinal tissue repair and regeneration in vertebrates: from fish to human* / Ed. Chiba C. Kerala, India: Res. Signpost. - 2007. - P. 15–33.

22. Grigoryan E.N., Markitantova Y.V. Cellular and Molecular Preconditions for Retinal Pigment Epithelium (RPE) Natural Reprogramming during Retinal Regeneration in Urodela // *Biomedicines.* - 2016. - Vol. 4. - № 4. – P. E28. P.1-18.

23. de Hoz R., Rojas B., Ramírez A.I. et al. Retinal Macrogial Responses in Health and Disease // *Biomed. Res. Int.* - 2016. Article ID 2954721. - P. 1-13.

24. Salero E., Blenkinsop T.A., Corneo B. et al. Adult Human RPE Can Be Activated into a Multipotent Stem Cell that Produces Mesenchymal Derivatives // *Stem Cell*. - 2012. - T. 10. № 1. - P. 88–95.
25. Chiba C. The retinal pigment epithelium: an important player of retinal disorders and regeneration // *Exp. Eye Res.* - 2014. - Vol. 123. - P. 107-114.
26. Nakanishi-Ueda T., Majima H.J., Watanabe K. et al. Blue LED light exposure develops intracellular reactive oxygen species, lipid peroxidation, and subsequent cellular injuries in cultured bovine retinal pigment epithelial cells // *Free Radic. Res.* - 2013. - Vol. 47. - № 10. - P. 774–780.
27. Vríz S., Reiter S., Galliot B. Cell death: a program to regenerate // *Curr. Top. Dev. Biol.* - 2014. - Vol. 108. - P. 121-151.
28. Stevenson L., Matesanz N., Colhoun L. et al. Reduced nitro-oxidative stress and neural cell death suggests a protective role for microglial cells in TNFalpha-/- mice in ischemic retinopathy // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* - 2010. - Vol. 51. - № 6. - P. 3291-3299.
29. Dvorianchikova G., Seemungal R.J., Ivanov D. The epigenetic basis for the impaired ability of adult murine retinal pigment epithelium cells to regenerate retinal tissue // *Sci. Rep.* - 2019. - Vol. 9. - № 1. 3860. - P. 1-13.
30. Kang M.K., Lee E.J., Kim Y.H. et al. Chrysin Ameliorates Malfunction of Retinoid Visual Cycle through Blocking Activation of AGE-RAGE-ER Stress in Glucose-Stimulated Retinal Pigment Epithelial Cells and Diabetic Eyes // *Nutrients*. - 2018. - Vol. 10. - № 8. – P.: E1046.
31. Ma W., Zhang Y., Gao C. et al. Monocyte infiltration and proliferation reestablish myeloid cell homeostasis in the mouse retina following retinal pigment epithelial cell injury // *Sci. Rep.* - 2017. - Vol. 7. - № 1. 8433. - P. 1-18.
32. Erler P., Monaghan J.R. The link between injury-induced stress and regenerative phenomena: A cellular and genetic synopsis // *Biochim. Biophys. Acta.* - 2015. - Vol. 1849. - № 4. - P. 454-461.
33. Grigoryan E.N. Shared triggering mechanisms of retinal regeneration in lower vertebrates and retinal rescue in higher ones. In *Tissue Regeneration—From Basic Biology to Clinical Application* // In Tech: Rijeka, Croatia, 2012. Davies J. Ed. - P. 145–164.
34. Nagashima M., Fujikawa C., Mawatari K. et al. HSP70, the earliest-induced gene in the zebrafish retina during optic nerve regeneration: its role in cell survival // *Neurochem. Int.* - 2011. - Vol. 58. - № 8. - P. 888-895.
35. Mitra S., Sharma P., Kaur S. et al. Dual regulation of lin28a by Myc is necessary during zebrafish retina regeneration // *J. Cell Biol.* - 2019. - Vol. 218. - № 2. - P. 489-507.

36. Bringmann A., Iandiev I., Pannicke T. et al. Cellular signaling and factors involved in Muller cell gliosis: neuroprotective and detrimental effects // *Prog. Retin. Eye Res.* - 2009. - Vol. 28. - № 6. - P. 423-451.
37. Atienzar-Aroca S., Flores-Bellver M., Serrano-Heras G. et al. Oxidative stress in retinal pigment epithelium cells increases exosome secretion and promotes angiogenesis in endothelial cells // *J. Cell Mol. Med.* - 2016. - Vol. 20. - № 8. - P. 1457–1466.
38. Zhou G., Meng S., Li Y. et al. Optimal ROS signaling is critical for nuclear reprogramming // *Cell Rep.* - 2016. - Vol. 15. - № 5. - P. 919-925.
39. Cuenca N., Fernandez-Sanchez L., Campello L. et al. Cellular responses following retinal injuries and therapeutic approaches for neurodegenerative diseases // *Prog. Retin. Eye Res.* - 2014. - Vol. 43. - P. 17–75.
40. Barbosa-Sabanero K., Hoffmann A., Judge C. et al. Lens and retina regeneration: new perspectives from model organisms // *Biochem. J.* - 2012. - Vol. 447. - № 3. - P. 321-334.
41. Ail D., Perron M. Retinal Degeneration and Regeneration-Lessons From Fishes and Amphibians // *Curr. Pathobiol Rep.* - 2017. - Vol. 5. - № 1. - P. 67-78.
42. Bhatia B., Singhal S., Jayaram H. et al. Adult retinal stem cells revisited // *Open Ophthalmol. J.* - 2010. - Vol. 4. - P. 30-38.
43. Kuznetsova A.V., Kurinov A.M., Aleksandrova M.A. Cell models to study regulation of cell transformation in pathologies of retinal pigment epithelium // *J. Ophthalmol.* - 2014. 801787.
44. DiStefano T., Chen H.Y., Panebianco C. et al. Accelerated and Improved Differentiation of Retinal Organoids from Pluripotent Stem Cells in Rotating-Wall Vessel Bioreactors // *Stem Cell Reports.* - 2018. - Vol. 10. - № 1. - P. 300-313.
45. Llonch et al., 2018; Llonch S., Carido M., Ader M. Organoid technology for retinal repair // *Dev. Biol.* - 2018. – Vol. 433. - № 2. - P. 132–143.
46. Chen H.Y., Kaya K.D., Dong L. et al. Three-dimensional retinal organoids from mouse pluripotent stem cells mimic in vivo development with enhanced stratification and rod photoreceptor differentiation // *Mol. Vis.* - 2016. - Vol. 22. - P. 1077–1094.
47. Hamon A., Roger J.E., Yang X.J. et al. Muller glial cell-dependent regeneration of the neural retina: An overview across vertebrate model systems // *Dev. Dyn.* - 2016. - Vol. 245. - № 7. - P. 727-738.
48. Campbell L.J., Hyde D.R. Opportunities for CRISPR/Cas9 gene editing in retinal regeneration research // *Front Cell Dev. Biol.* - 2017. - Vol. 5. Article 99. - P. 1–8.
49. Aires I. Dinis., Boia R., Rodrigues-Neves A.C., Madeira M.H., Marques C., Ambrósio A.F., Santiago A.R. Blockade of microglial adenosine A2A receptor suppresses

elevated pressure-induced inflammation, oxidative stress, and cell death in retinal cells // *Glia*. – 2019. – P. 1–19. DOI: 10.1002/glia.23579

50. Casco-Robles M.M., Islam M.R., Inami W. et al. Turning the fate of reprogramming cells from retinal disorder to regeneration by Pax6 in newts // *Sci. Rep.* - 2016. - Vol. 6. – P. 33761.

51. Bennis A., Gorgels T.G., Ten Brink J.B. et al. Comparison of mouse and human retinal pigment epithelium gene expression profiles: potential implications for age-related macular degeneration // *PLoS One*. - 2015. - Vol. 10. - № 10. e0141597.

52. Chung J.W. Spot the difference: Solving the puzzle of hidden pictures in the lizard genome for identification of regeneration factors // *BMB Rep.* - 2016. - Vol. 49. - № 5. - P. 249-254.

53. Sato K., Saigusa D., Saito R. et al. Metabolomic changes in the mouse retina after optic nerve injury // *Sci. Rep.* - 2018. - Vol. 8. - № 1. – P.11930.

## **Подраздел 1.2 Исследование соотношения прогениторных свойств и специализации клеток – потенциальных внутренних источников регенерации сетчатки глаза позвоночных животных и человека**

### **1.2.1 Введение**

Структурные нарушения в сетчатке, обусловленные травмой, возрастом, заболеваниями, приводят к частичной или полной потере зрения. Эти проблемы затрагивают большую популяцию людей в современном мире, где имеет место, как увеличение средней продолжительности жизни, так и нагрузки на зрительную функцию. Особый интерес представляют внутренние клетки-источники регенерации сетчатки (КИРС), понимание биологии которых, помимо знания локальных и системных факторов, способных поддержать и активировать проявление регенераторных потенциалов КИРС, необходимо для поиска биомедицинских подходов к восстановлению сетчатки. Многочисленные работы посвящены изучению роли факторов клеточного микроокружения, стимулирующих, или, напротив, блокирующих регенеративные ответы КИРС [1-4]. Наряду с этим, очевидна необходимость понимания собственно состояния эндогенных КИРС, с тем чтобы определить их вклад в регенерацию сетчатки. В этой связи достижения в выявлении эндогенных клеток-источников регенерации этой ткани, и способов регуляции поведением этих клеток, открывают широкие перспективы для регенеративной биологии и медицины. Эти возможности должны быть использованы и для восстановления сетчатки, имеющей ту или иную патологию.

### **1.2.2 Материалы и методы**

При использовании большого объема электронных ресурсов Pubmed, Science Direct, Research Gate и др., а также опубликованных результатов многолетних работ лаборатории, в том числе, полученных в последние годы, обобщена информация по вопросу природы клеточных источников регенерации в сетчатке глаза у разных видов животных и человека. Проведенный анализ представлен в виде опубликованного обзора (включающего 184 источника), с подробным описанием биологии всех известных к настоящему времени КИРС, в отношении глубины их дифференцировки, специализации и присутствия признаков прогениторных клеток, определяющих регенерацию сетчатки [5].

### **1.2.3 Результаты и обсуждение**

Эндогенные КИРС могут быть как стволовыми и малодифференцированными, так и дифференцированными предшественниками, латентными прогениторами (ЛП). К настоящему времени описаны несколько популяций клеток, претендующих на роль КИРС [6,7]. Эти клеточные популяции, выявленные в разных моделях на животных, обнаружены не только и не столько морфологически, сколько в результате изучения

профилей экспрессии генов и по маркерным генам и белкам. Зачастую молекулярно-генетический профиль КИРС отражает свойственный (хотя и в различной степени) клеткам глазного зачатка и сетчатки в развитии. Помимо этого, для некоторых популяций КИРС выявлена экспрессия транскрипционных факторов (ТФ) индукции клеточной плюрипотентности (*Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-myc*). Наряду с этим латентные, но дифференцированные КИРС, а к ним относятся ретинальный пигментный эпителий (РПЭ), радужка, цилиарное тело (ЦТ) и глия Мюллера (МГ), демонстрируют экспрессию генов, обеспечивающих их специализацию и функционирование в сетчатке. При изучении КИРС, обладающих особым «молодым» фенотипом, и являющихся мишенями факторов, активирующих регенераторные ответы, следует учитывать возраст, вид животных, эпигенетические особенности этих клеток.

*Клетки цилиарной зоны глаза.* КИРС этой категории расположены на крайней периферии сетчатки, в так называемом углу глаза. Клетки цилиарной зоны составляют гетерогенную популяцию, имеют молекулярно-генетические черты «стволовости» и ранних прогениторов, выраженные в разной степени. Эта область различается у позвоночных и по объемам клеточной популяции, сокращающихся в ряду от рыб до млекопитающих. У взрослых низших позвоночных (рыбы, амфибии) клетки этой области не имеют специализации и об их малодифференцированном статусе хорошо известно. У рыб и амфибий цилиарная, краевая или маргинальная зона (ЦМЗ) сетчатки, дает вклад клеток в растущую сетчатку в течение жизни животных и представлена как стволовымитак и малодифференцированными клетками. У изученных видов взрослых рыб и амфибий, а также у зародышей птиц, в этой области имеет место персистентный нейрогенез, обеспечивающий рост сетчатки с периферии в развитии и при регенерации. В последнее десятилетие клетки ЦМЗ низших позвоночных интенсивно изучались в отношении генетического профиля, и ассоциированной с нейрогенезом экспрессии ТФ. Выяснено, что спектр этих ТФ кодируется гомеобоксными генами *Pax6*, *Rx*, *Six3*, *Lhx*. Список может быть дополнен генами *Chx10* (*vsx2* у рыб) и *Crx*, также работающими на ранних этапах развития глаза. Результаты исследований в нашей лаборатории, посвященные экспрессии генов в клетках ЦМЗ хвостатых амфибий, продемонстрировали прогениторный статус клеток этой зоны. В ростовой зоне глаза, как и в первых нейробластах регенерирующей сетчатки тритона *P.waltl*, обнаружена экспрессия ТФ, таких как: *Pax6*, *Prox1*, *Six3*, *Otx2*, *Pitx1,2*, а также *c-myc* [8-10]. При насыщении клеток ЦМЗ взрослых тритонов маркером пролиферации BrdU, нам удалось показать, что через 1 мес после отслойки сетчатки 15-20% клеток ЦМЗ находятся в фазе синтеза ДНК. Вклад краевой зоны сетчатки в ее рост и регенерацию, а также размеры этой клеточной

популяции в эволюционном ряду сокращаются. У рептилий, птиц и млекопитающих эта область редуцирована, однако ее клетки сохраняют отдельные признаки низкого уровня дифференцировки и способность к пролиферации. У рептилий в клетках ЦМЗ были выявлены гены развития глаза и сетчатки – маркеры пролиферации *Pax6*, *Vsx2*, *Rx1*, и *Hes1* (на уровне мРНК), а также *Sox9* и *Sox2* (на уровне белка). Область ЦМЗ глаза цыпленка подобна таковой у рыб и амфибий, однако формируется до вылупления и ее вклад в рост сетчатки незначителен. Тем не менее, на поздних стадиях развития на периферии сетчатки можно обнаружить медленно созревающие клетки, экспрессирующие ранние маркеры ретинальной дифференцировки. Тщательное исследование клеток краевой зоны сетчатки в эмбриональном развитии мышей, указало на наличие у этих животных ограниченного нейрогенеза, с формированием ганглиозных клеток. Недавно появились сведения, касающиеся особенностей эпигенетического статуса клеток в ЦМЗ глаза рыб. Согласно результатам можно полагать, что деметилаза *dnmt1* (катализатор процесса) – связанная эпигенетическая модификация вероятно ответственна за поддержание стволовых и прогениторных свойств в клеточной популяции ЦМЗ в сетчатке рыб [11]. Это один из большого и не изученного пока многообразия эпигенетических механизмов, отвечающих за прогениторный статус клеток ЦМЗ.

*Цилиарное тело глаза млекопитающих.* В отличие от низших позвоночных у взрослых млекопитающих область сетчатки, клетки которой способны к производству новых нейронов в течение жизни, т.е. область, сходная с ЦМЗ, отсутствует и регенераторные потенции клеток “угла глаза” млекопитающих крайне ограничены. Область, гомологичная ЦМЗ по локализации, у взрослых млекопитающих и человека представлена ЦТ (рисунок 1.2.1.). В отношении специализации клеток, ЦТ высших позвоночных является структурой, отвечающей за продукцию компонентов стекловидной жидкости и участие в зрительной аккомодации, осуществляемой посредством изменения формы хрусталика, за счет поддерживаемой ЦТ радужки. С учетом специализации ЦТ и его функции, проведено масс-спектрометрическое исследование протеомного профиля ткани ЦТ человека, выявившее широкий спектр белков, представляющихся специфичными для ЦТ и отражающих его функцию [12].

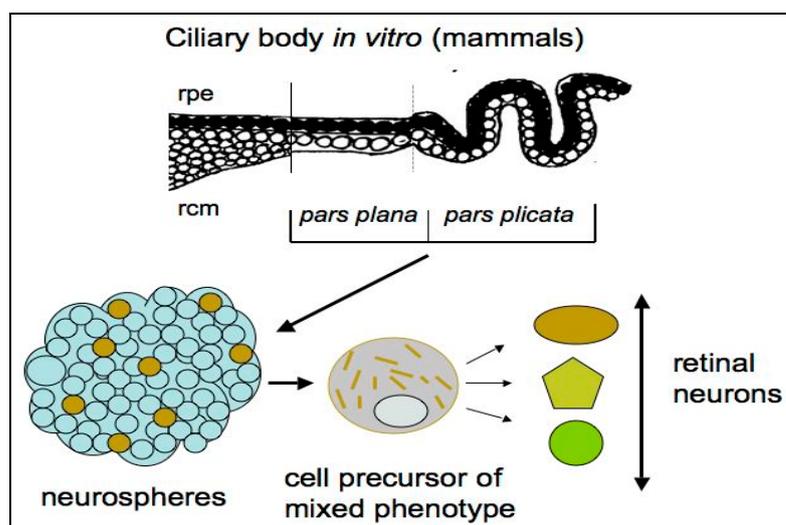


Рисунок 1.2.1 - Потенции клеток цилиарного эпителия млекопитающих, продуцирующего нейросферы *in vitro*, и способные дифференцироваться в ретинальные нейроны RPE – ретинальный пигментный эпителий; RCM – клетки ретинальной периферии [5].

После выделения и в перmissive условиях *in vitro* клетки ЦТ млекопитающих не только активируются для входа в S-фазу, но и к реализации потенциала к нейрогенезу. После изоляции и формирования нейросфер *in vitro* клетки ЦТ делятся, экспрессируют нестин и ТФ Рах6. Однако помимо этих маркеров прогениторных свойств обнаруживается маркер эпителиальных клеток Claudin-1, т.е. сферы содержат клетки смешанного - эпителиального и нейропрогениторного фенотипа. В исследовании потенциалов и биологии клеток ЦТ предприняты усилия по определению эпигенетических регуляторов их дифференцировки в ретинальном направлении. Проанализировано метилирование ДНК в клетках ЦТ в кадаверных глазах человека [13]. Обнаружено, что промотеры ряда генов, отвечающих за плюрипотентное состояние, в популяции дифференцированных клеток высоко метилированы, но обнаружены и бивалентные модификации, участвующие в процессе дифференцировки в нейральные и глиальные клетки выделенной из ЦТ клеточной линии [14]. Таким образом, описанные молекулярно-генетические и эпигенетические свойства клеток ЦМЗ низших позвоночных и гомологичной ей по локализации цилиарной области (ЦТ) глаза млекопитающих в качестве реальных (для ЦМЗ) и потенциальных (для ЦТ) КИРС позволили нам сделать ряд заключений. В эволюционном ряду позвоночных животных не только сокращается число клеток этой области глаза, но и углубляется их дифференцировка - от стволовых и низкодифференцированных клеток в ЦМЗ у рыб и амфибий, до специализированных клеток в ЦТ у млекопитающих. Последние при этом сохраняют отдельные признаки прогениторов. Однако, эти признаки проявляются только *in vitro* в перmissive, специально подобранных условиях, на фоне сохранения некоторых признаков исходного

дифференцированного эпителиального фенотипа клеток ЦТ. Внутренняя эпигенетическая и внешняя регуляция со стороны микроокружения, определяют фенотипическую пластичность (в разной мере) клеток цилиарной зоны глаза, различные регенераторные потенции этой категории КИРС у животных разных классов.

*Ретинальный пигментный эпителий.* РПЭ – монослой гексагональных, поляризованных и высокоспециализированных клеток. Наряду со специализацией, клетки РПЭ низших и высших позвоночных и человека, обладают способностью репрограммирования в мультипотентные клетки-предшественники и нейроны сетчатки. Для РПЭ млекопитающих и человека эти превращения возможны в условиях *in vitro*. Клетки РПЭ человека, как выделенные, так и их линии, могут быть переведены на нейтральный путь развития (рисунок 1.2.2.). В перmissive условиях *in vitro* клетки РПЭ взрослого человека снижают экспрессию специфического белка RPE65 и up-регулируют экспрессию прогениторных маркеров – ТФ Oct4, Nanog, Prox1, Musashi1 и Pax6, а позже маркеры дифференцировки нейронов – TH и NF. При определенных условиях *in vitro* РПЭ глаза человека, помимо нейтральных предшественников способны также дать остео-, хондро- и адипо- линии мезенхимных предшественников.

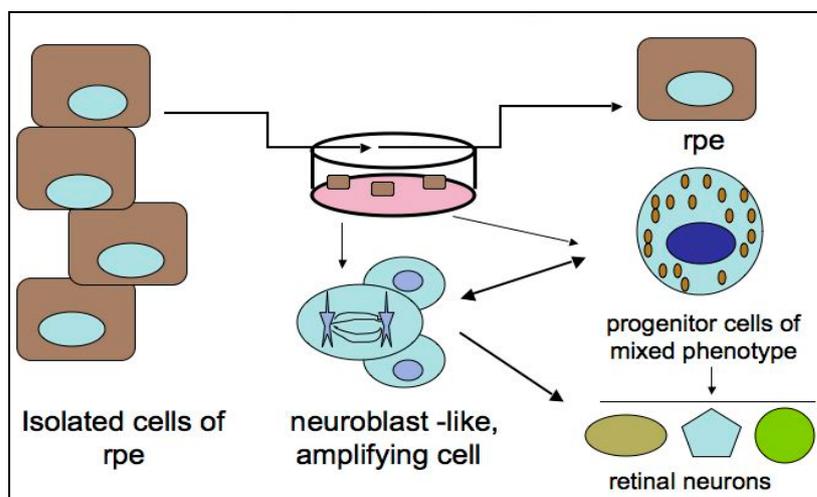


Рисунок 1.2.2 - Фенотипическая пластичность клеток ретинального пигментного эпителия млекопитающих *in vitro*

Наблюдаются различные уровни и типы дифференцировки, зависящие от факторов культивирования [5]

Наряду с этим клетки РПЭ как низших, так и высших позвоночных животных обладают всеми атрибутами специализации – экспрессируют маркеры фагоцитоза, базальной и апикальных поверхностей клеток и зрительного цикла, включая RPE65, LRAT и CRALBP. Протеомный анализ РПЭ человека продемонстрировал широкий спектр

белков, отражающих специализацию этой ткани, а именно содержание белков – участников зрительного цикла, меланогенеза, аутофагии и др. *In vivo* способность клеток РПЭ репрограммироваться в клетки сетчатки в совершенной степени присуща хвостатым амфибиям – тритонам. Основными событиями на пути такого превращения являются: выход клеток из слоя РПЭ, пролиферация с потерей исходных фенотипических черт, формирование популяции нейробластов и их нейральная дифференцировка с восстановлением клеток функционирующей сетчатки. Ранние этапы репрограммирования РПЭ глаза тритона описаны нами и японскими исследователями с позиций изменений морфологии и экспрессии генов [15-18]. С учетом исследованного нами профиля экспрессии ряда генов и белков, клетки РПЭ тритонов могут быть отнесены к категории клеток с “молодым” фенотипом. Это означает, что в них поддерживается экспрессия ТФ раннего развития глаза (*Rax6*, *Pitx1*, *Hes1*), характерных для ретинальных прогениторов, наряду с экспрессией генов, специфичных для дифференцировки РПЭ (*RPE65*, *Otx2*, *Mitf*) [15, 16]. На модели регенерации сетчатки у цыпленка [19] в еще не начавших пролиферацию клетках РПЭ обнаружены факторы плюрипотентности (*Sox2*, *c-myc* и *Klf4*), наряду с *Rax6*. Однако для осуществления репрограммирования РПЭ и регенерации сетчатки у цыпленка дополнительно требуется связывающийся с РНК белок *Lin-28* в качестве мишени для *FGF2*. Полученные данные говорят о том, что для обретения клетками РПЭ способности конвертирования в нейроны сетчатки *in vivo* необходимы условия работы генома, позволяющие экспрессию генов, ассоциированных с ранним развитием глаза, при ингибировании экспрессии генов и белков, отвечающих за специализацию клеток. При этом в генетическом профиле РПЭ возможны этапы особого состояния – совокупного присутствия исходных свойств клеток РПЭ и прогениторных признаков. Данные изучения эпигенетических механизмов феномена, свидетельствуют о том, что клетки РПЭ взрослой мыши сходны с прогениторными [20]. Однако реализация этих свойств, для репрограммирования в нейральном направлении, заблокирована с помощью механизмов, включающих метилирование и необходимость включения работы пионерских ТФ [20, 21]. Таким образом, РПЭ глаза у всех изученных моделях позвоночных животных от рыб до млекопитающих и глаза человека, несмотря на морфологическую и функциональную специализацию, в основе которой лежит специфический профиль экспрессии генов, проявляет способность к репрограммированию. В основе этого феномена у низших позвоночных лежит сохранение прогениторных свойств, выявляемых на уровне экспрессии соответствующих генов у взрослых амфибий, а также у эмбрионов птиц, позволяющих регенерацию сетчатки у этих животных *in vivo*. Связь между экзогенными факторами, способными стимулировать

репрограммирование РПЭ *in vitro*, и изменением при этом эпигенетических свойств клеток РПЭ изучена мало. Между тем, изучение этого аспекта важно для поиска путей стимуляции регенераторных ответов РПЭ в качестве КИРС у высших позвоночных и человека *in vivo*.

*Радужная оболочка (радужка) глаза.* Пигментный эпителий радужки имеет общее происхождение с РПЭ и во многих отношениях демонстрирует сходство с этой тканью: обладает полярностью, наличием пигмента в цитоплазме, плотных контактов между клетками. С учетом результатов экспериментов *in vitro*, клетки радужки млекопитающих также принято рассматривать в качестве КИРС. В условиях культивирования они демонстрируют отдельные свойства стволовых клеток и ранних прогениторов. Изолированные клетки радужки цыпленка, культивируемые в перmissive условиях *in vitro* способны формировать нейросферы, где клетки пролиферируют и экспрессируют белки - маркеры ретинальных прогениторов. После помещения нейросфер на ламинин *in vitro*, в их клетках синтезируются ранние маркерные белки, характерные для сетчатки. Эти данные свидетельствуют о скрытом нейрогенном потенциале клеток радужки и способности их к репрограммированию фенотипа. При изоляции и культивировании клеток радужки глаза взрослой свиньи также выявлена их уникальная способность репрограммироваться в прогениторы, в свою очередь обладающие способностью дифференцироваться в нейрональные клетки, в том числе подобные фоторецепторам. В условиях *in vivo* процесс репрограммирования радужки взрослого глаза позвоночных в клетки сетчатки не наблюдается.

*Глия Мюллера.* Помимо рассмотренных выше клеток РПЭ, ЦТ, а также радужки глаза позвоночных, латентными дифференцированными КИРС являются широко изучаемые в настоящее время клетки мюллеровской глии (МГ) [22] (рисунок 1.2.3.). Экспериментальные данные, полученные в разных моделях на животных, свидетельствуют о том, что МГ может вести себя как популяция нейтральных клеток предшественников. Такое поведение клеток МГ сопровождается многими патологическими состояниями сетчатки. После повреждения сетчатки некоторые ТФ, характерные для прогениторных клеток сетчатки и незрелой МГ (Six3, Pax6, Rx1, Olig2, Vsx2), реэкспрессируются в зрелых клетках МГ, демонстрируя процесс понижения уровня дифференцировки. У рыб при росте глаза в течение жизни клетки МГ поддерживает линию фоторецепторов (палочек), а при регенерации дает популяцию предшественников для фоторецепторов и ганглиозных клеток. У птиц после вылупления можно также наблюдать регенеративные ответы МГ- пролиферацию и экспрессию «развитийных» ТФ, но для этого необходимо воздействие сигнальных молекул IGF, FGF2. Клетки МГ у

постнатальных млекопитающих и делящиеся прогениторы сетчатки в развитии демонстрируют высокую степень перекрытия транскриптов. Так, после первой постнатальной недели у мышей 68% генов, специфично экспрессирующихся в клетках МГ, совпадают с таковыми пролиферирующих прогениторов. *In vivo* дифференцированным клеткам МГ сетчатки мыши присуща экспрессия генов, необходимых для деления, а под влиянием со стороны экзогенно добавленных компонентов сигнальных путей EGF, FGF, Notch, Wnt и Shh, клетки МГ сетчатки млекопитающих могут быть спровоцированы к входу в S-фазу и демонстрации свойств ретинальных прогениторов. Обнаруженный на различных моделях [1, 23-25] «развитийный» профиль генетической экспрессии, а также способность к пролиферации и лежат в основе репрограммирования МГ в пермиссивных условиях окружения в пролиферирующие прогениторы, а в последующем и в нейроны сетчатки. Наряду с этим, профиль экспрессии генов в дифференцированных клетках МГ отражает их специализацию, к таким генам можно отнести *ApoE*, *Glul*, *Kcnj10*, *GFAP*. Таким образом, при рассмотрении клеток МГ в качестве КИРС в профиле экспрессии генов имеет место определенное сочетание работы генов, ассоциированных как с прогениторными клетками сетчатки, так и со специализацией собственно МГ. Несмотря на то, что роль эпигенетических изменений связанных с репрограммированием МГ, изучена недостаточно, уже получены сведения для некоторых объектов [26, 27, 28]. Эпигенетические изменения в клетках МГ сетчатки рыб в процессе конверсии в малодифференцированные нейрональные предшественники, предполагают изменения в паттерне метилирования/деметилирования ДНК. С помощью создания адекватных эпигенетических условий и обеспечения сверхэкспрессии гена *Ascl1* в разрушенной нейротоксином сетчатке взрослых мышей *in situ* удалось индуцировать нейрогенез в популяции МГ на том этапе развития животных, когда в норме нейрогенный потенциал исчерпан [27]. Недавно другими авторами проведена работа [28], помогающая понять характер эпигенетической пластичности клеток МГ, позволяющей им в пермиссивных условиях репрограммироваться и дифференцироваться в ретинальные нейроны. При изучении транскриптома МГ установлено, что в развитии, в процессе дифференцировки эмбриональных прогениторов в глию МГ существенные изменения экспрессии претерпевает только небольшая группа генов, кодирующих пронейральные маркерные белки, и генов, экспрессия которых ассоциирована с клеточным циклом. С учетом фактической неизменности экспрессии других генов, была констатирована схожесть зрелых клеток МГ и поздних прогениторов сетчатки мышей [28]. Предполагается, что клетки МГ заведомо не имеют эпигенетических барьеров на пути репрограммирования в

фенотипы прогениторов и поздно созревающих нейронов сетчатки, а препятствия для регенерации сетчатки за счет клеток МГ у млекопитающих могут объясняться репрессированным состоянием ряда генов, ответственных за поздние этапы репрограммирования – этапы специализации созревающих нейронов.

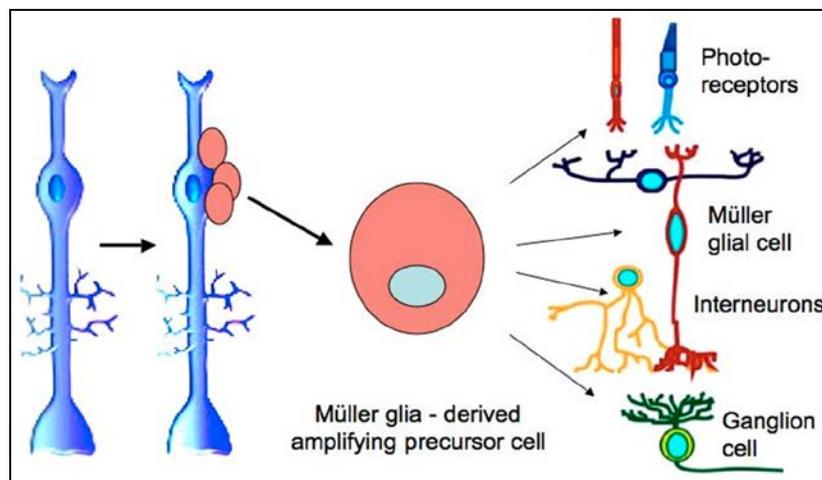


Рисунок 1.2.3 - Схематическое изображение, демонстрирующее основные этапы на пути продукции клетками мюллеровской глии ретинальных нейронов *in vivo*. Данные, полученные в разных моделях на животных [5].

Полученные сведения позволяют характеризовать клетки МГ в качестве КИРС, готовых не только к инициации пролиферации в условиях патологии сетчатки, но и репрограммированию в нейроны сетчатки для восполнения клеточных потерь. Эта «готовность» выражается как в экспрессии ряда генов, ассоциированных с ретинальными прогениторами, так и в эпигенетическом ландшафте, напоминающем таковой для клеток предшественников. При этом речь идет о специализированных клетках с полным набором генов, экспрессия которых необходима для выполнения широкого ряда функций МГ.

#### 1.2.4 Заключение

Заболевания сетчатки приводят к нарушению или потере зрительной функции. В настоящее время известны популяции клеток, претендующих на роль внутреннего источника восстановления клеточных потерь в сетчатке. Ими являются клетки цилиарной зоны периферии глаза, пигментный эпителий сетчатки и радужки, а также клетки МГ. Известны факторы, активирующие регенеративные ответы этих клеток: вход в клеточный цикл, репрограммирование и дифференцировку в нейральном направлении. Обобщены и проанализированы современные сведения, касающиеся соотношения присущих этим клеточным популяциям прогениторных свойств, с одной стороны, и свойств,

определяющих дифференцировку и специализацию – с другой. Показано, что, несмотря на различия, связанные с типом клеток, возрастом и видом животных моделей, клетки указанных популяций, будучи специализированными, «подготовлены» к реализации пластичности. Открытость к осуществлению репрограммирования в фоторецепторные и другие типы нейронов сетчатки обусловлена особенностями экспрессии генов и эпигенетического ландшафта. Экспрессия генов в развитии сетчатки предопределена ходом становления той или иной популяции в гистогенезе глаза, а контролирующая организация хроматина эпигенетические особенности – внутри- и надклеточной регуляцией. Генетическая и эпигенетическая готовность к репрограммированию реализуется у низших позвоночных *in vivo*, а у высших и человека – *in vitro*, в условиях пермиссивного внеклеточного сигнализирования со стороны факторов среды культивирования. Исследование природы и биологии КИРС помогает поиску экспериментальных подходов для замещения погибших клеток сетчатки позвоночных и человека, за счет рекрутирования ее внутреннего клеточного ресурса.

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП по биологии развития ИБР РАН.

#### 1.2.5 Список использованных источников

1. Hamon A., Roger J.E., Yang X.J., Perron M. Muller glial cell dependent regeneration of the neural retina: An overview across vertebrate model systems // *Dev. Dyn.* – 2016. – Vol. 245. – P. 727–738.
2. Nabeshima A., Nishibayashi C., Ueda Y., Ogino H., Araki M. Loss of cell-extracellular matrix interaction triggers retinal regeneration accompanied by Rax and Pax6 activation // *Genesis.* - 2013. - Vol. 51. – P. 410–419.
3. Григорян Э.Н. Молекулярные факторы поддержания и активации «молодого фенотипа» клеток-источников регенерации тканей глаза // *Биохимия.* - 2018. - Т. 83. - № 11. - С. 1627-1642. 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. 1627-1642. Doi: 10.1134/S0006297918110032.
4. Ahmad I., Teotia P., Erickson H., Xia X. Recapitulating developmental mechanisms for retinal regeneration // *Prog. Ret. Eye Res.* – 2020. – Vol. 76. – P. 100824. Doi: org/10.1016/j.preteyeres.2019.100824
5. Grigoryan E.N. Potential Endogenous Cell Sources for Retinal Regeneration in Vertebrates and Humans: Progenitor Traits and Specialization // *Biomedines* – 2020. – Vol. 8. – P. 208. DOI: 0.3390/biomedines8070208. – Q1 - отчетная публикация

6. Yu H., Vu T.H.K., Cho K.-S., Guo C., Chen D.F. Mobilizing endogenous stem cells for retinal repair // *Transl. Res.* - 2014. - Vol. 163. - P. 387-398. Doi.org/10.1016/j.trsl.2013.11.011
7. Григорян Э.Н. Эндогенные клеточные источники регенерации сетчатки глаза позвоночных животных и человека // *Онтогенез.* - 2019. - Т. 50. - № 1. - P. 13-27. Grigoryan E.N. Endogenous cell sources for eye retina regeneration in vertebrate animals and human // *Russian Journal of Developmental Biology.* - 2018. - Vol. 49. №6. - P. 1-13. Doi: 10.1134/S106236041901003X
8. Маркитантова Ю.В., Макарьев Е.О., Смирнова Ю.А., Зиновьева Р.Д., Миташов В.И. Исследование паттерна экспрессии регуляторных генов *Rax6*, *Prox1* и *Six3* в ходе регенерации структур глаза тритона // *Известия РАН. Сер. биол.* - 2004. - № 5. - С. 522–531.
9. Авдонин П.П., Григорян Э.Н., Маркитантова Ю.В. Транскрипционный фактор *Pitx2*: локализация при регенерации сетчатки тритона // *Изв. РАН. Сер. биол.* - 2010. - Т. 435. - № 3. - С. 283–288.
10. Markitantova Y.V., Avdonin P.P., Grigoryan E.N., Zinov'eva R.D. Identification of the *Pitx1* embryogenesis regulatory gene in a regenerating newt retina // *Dokl. Biol. Sci.* - 2010. - 435. - P. 421–424.
11. Angileri K.M., Gross J.M. *dnmt1* function is required to maintain retinal stem cells within the ciliary marginal zone of the zebrafish eye. *bioRxiv* - 2020.
12. Goel R., Krishna R., Murthy K.R., Srikanth S.M., Pinto S.M., Bhattacharjee M., Kelkar D.S., Madugundu A.K., Dey G., Mohan S.S. et al. Characterizing the normal proteome of human ciliary body // *Clin. Proteom.* - 2013. - Vol. 10. - P. 9.
13. Jasty S., Krishnakumar S. Profiling of DNA and histone methylation reveals epigenetic-based regulation of gene expression during retinal differentiation of stem/progenitor cells isolated from the ciliary pigment epithelium of human cadaveric eyes // *Brain Res.* - 2016. 165115. - P.1–10.
14. Ueno K., Iwagawa T., Ochiai G., Koso H., Nakauchi H., Nagasaki M., Suzuki Y., Watanabe S. Analysis of Müller glia specific genes and their histone modification using *Hes1*-promoter driven EGFP expressing mouse // *Sci. Rep.* - 2017. - Vol. 7. - P. 3578.
15. Chiba C., Mitashov V.I. Cellular and molecular events in the adult newt retinal regeneration. In *Strategies for Retinal Tissue Repair and Regeneration in Vertebrates: From Fish to Human*; Chiba, C. // Ed.; Research Signpost: Kerala. India. - 2007. - P. 15–33.

16. Grigoryan, E.N. Shared triggering mechanisms of retinal regeneration in lower vertebrates and retinal rescue in higher ones // In *Tissue Regeneration— from Basic Biology to Clinical Application*, Davies, J., Ed.; In Tech: Croatia, 2012, pp.145–164.
17. Chiba, 2014. The retinal pigment epithelium: an important player of retinal disorders and regeneration // *Exp. Eye Res.*- 2014.- V.123. – P.107–114.
18. Grigoryan E.N., MarkitantovaYu.V. Cellular and molecular preconditions for retinal pigment epithelium (RPE) natural reprogramming during retinal regeneration in Urodela // *Biomedicines*. - 2016. - Vol. 4. – N4 - P. 28. DOI: 10.3390/biomedicines4040028.
19. Luz-Madrigal A., Gradjales-Esquivel E., McCorkle A. et al. Reprogramming of the chick retinal pigmented epithelium after retinal injury // *BMC Biol.* – 2014. – V.12. – P.28.
20. Dvorianchikova G., Seemungal R.J., Ivanov D. The epigenetic basis for the impaired ability of adult murine retinal pigment epithelium cells to regenerate retinal tissue // *Sci. Rep.* – 2019. – Vol. 9. - P.3860. Doi: 10.1038/s41598-019-40262-w.
21. Iwafuchi-Doi M., Zaret K.S. Pioneer transcription factors in cell reprogramming // *Genes Dev.* – 2014. – 28. – P. 2679–2692.
22. García-García D., Locker M.; Perron M. Update on Müller glia regenerative potential for retinal repair // *Curr. Opin. Genetic & Development.* - 2020. – Vol. 64. – P. 52-59. Doi: org/10.1016/j.gde.2020.05.025.
23. Roesch K., Jadhav A.P., Trimarchi J.M., Stadler M.B., Roska B., Sun B.B., Cepko C.L. The transcriptome of retinal Müller glial cells // *J. Comp. Neurol.* – 2008. – Vol. 509. – P. 225–238.
24. Goldman D. Muller glial cell reprogramming and retina regeneration // *Nat. Rev. Neurosci.* - 2014. – V. 15. – P. 431–442.
25. Zhang, J.; Jiao, J. Molecular biomarkers for embryonic and adult neural stem cell and neurogenesis // *Biomed. Res. Int.* – 2015. - 727542.
26. Powell C., Grant A.R., Cornblath, E., Goldman D. Analysis of DNA methylation reveals a partial reprogramming of the Müller glia genome during retina regeneration // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 2013. – V. 110. – P. 19814–19819.
27. Jorstad. N.L., Wilken M.S., Grimes W.N., Wohl S.G., VandenBosch L.S., Yoshimatsu T., Wong R.O., Rieke F., Reh T.A. Stimulation of functional neuronal regeneration from Müller glia in adult mice // *Nature.* – 2017. – V. 548. – P. 103–107.
28. Dvorianchikova G., Seemungal R.J., Ivanov D. Development and epigenetic plasticity of murine Müller glia // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 2019. - V. 1866. P.1584–1594.

### **Подраздел 1.3 Органотипическое культивирование как способ изучения восстановительных возможностей сетчатки глаза позвоночных животных и человека**

#### **1.3.1 Введение**

Поиск внутренних скрытых возможностей регенерации сетчатки и их стимуляция является актуальным предметом изучения в современной науке. Для этого широко применяются различные методы, в том числе клеточные культуры *in vitro*. Они являются важным инструментом в исследованиях отдельно взятых клеточных популяций в условиях их изоляции, и существенным дополнением к экспериментам, проводимым *in vivo*. Клеточные культуры являются также инструментом накопления популяций стволовых или малодифференцированных клеток для различных нужд современной биомедицины. Несмотря на все преимущества клеточного культивирования, изолированные, высаженные *in vitro* клетки, лишены привычного окружения и влияний со стороны прилежащих тканей. Это, как известно, является определенным препятствием для экстраполяции получаемых сведений при сравнении процессов *in situ*. В этой связи, в последние два десятилетия, уделяется большое внимание органотипическому культивированию, условия которого приближены к таковым в организме, поэтому в литературе эта технология расценивается как “*in vivo-like in vitro technology*” [1], а культивируемая ткань обозначают как “*in vivo-like in vitro model*” [2]. Органотипическое культивирование является незаменимым инструментом в исследованиях клеточных источников регенерации сетчатки [3], составляющих регенерацию процессов – клеточной пролиферации, миграции, дифференцировки, а также морфогенеза. Подход органотипического культивирования успешно применяется для исследования молекулярных механизмов гибели клеток, выявления роли регуляторных факторов, факторов защиты сетчатки от оксидативного стресса, и других нейропротекторов [4-7].

#### **1.3.2 Материалы и методы**

Проведен анализ накопленного к настоящему времени большого объёма данных литературных источников и многолетнего опыта исследований в лаборатории, касающихся методов органотипического культивирования и изучения восстановительных возможностей сетчатки, опубликованных в виде обзора [6]. Рассмотрены преимущества, ограничения, перспективы дальнейшего развития технологий органного культивирования, в исследованиях различных аспектов процессов регенерации и морфогенеза нейральных тканей глаза. Для разделов, касающихся описания работ лаборатории по культивированию сетчатки глаза тритона и крысы материалы и методы включали следующие основные этапы. 1) микрохирургическое выделение нейральной сетчатки и ретинального

пигментного эпителия глаза взрослых тритонов (получены из аквариальной ИБР РАН), а также сетчатки крыс альбиносов Wistar (получены из вивария ИБР РАН). 2). Органотипическое культивирование образцов сетчатки глаз тритонов и крысы в условиях бокса, но при различных температурных режимах (22<sup>0</sup>С для сетчатки тритонов и 35,5<sup>0</sup>С – для сетчатки крысы) и в разных культуральных средах. Время культивирования в первом случае было в пределах 30 дней, во втором – 10 дней. В ряде случаев в среду культивирования однократно добавляли предшественник синтеза ДНК – БрДУ и фактор роста FGF2. Затем следовала фиксация материала в растворах, соответствующих последующим морфологическому и морфометрическому, иммуногистохимическому и молекулярно-биологическому исследованиям. Изучали экспрессию специфических белков клеточных типов сетчатки (NF, TH, GFAP), клеточной жизнеспособности (PCNA, TUNEL), пролиферации (БрДУ) со стороны ненеурональных клеток, а также экспрессию ряда генов с помощью PCR-анализа (*Rho*, *Ns*, *Fgf2* и др.). По всем обозначенным параметрам, как правило, проводился анализ состояния сетчатки, возможности пролиферативной активности со стороны ненеурональных клеток, а также способов восстановления и реконструкции сетчатки.

### 1.3.3 Результаты и их обсуждение

Органотипическое культивирование сетчатки широко применяется для моделей глаза всех основных групп позвоночных животных и позволяет проследить основные тенденции и различия в процессах восстановления сетчатки глаза позвоночных животных.

*Культивирование сетчатки низших позвоночных животных.* В исследованиях, применявших органотипическое культивирование сетчаток низших позвоночных, в качестве объектов использовали рыб, хвостатых и бесхвостых амфибий. Эти исследования вносят существенный вклад в изучение восстановительных возможностей сетчатки у разных видов.

Культивирование сетчатки взрослых костистых рыб позволило обнаружить, что *in vitro* сохраняются не только основные морфологические свойства ткани, в частности стратификация, но и присущие нормальной сетчатке основные, выявляемые иммунохимически, клеточные типы. Более того, были обнаружены признаки регенерации сетчатки – рост клеток ЦМЗ с периферии, а также пополнение фоторецепторного слоя за счет клеток предшественников, локализующихся во ВЯС, глиальных клеток Мюллера. На эксплантатах сетчатки золотой рыбки (*Carassius auratus*), находящихся *in vitro* в течение 5 сут, протестировано действие на рост аксонов ганглиозных клеток (являющегося важным механизмом восстановления сетчатки) таурина и серотонина. Выявлено увеличение скорости процесса при добавлении таурина, и его снижение в присутствии в среде

культивирования серотонина [8]. Примеров органотипического культивирования сетчатки бесхвостых амфибий немного. При использовании в культуре сетчатки шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*, удалось установить, что после разобщения нейральной сетчатки и РПЭ в течение 3 часов происходит возвращение утраченных при выделении ткани взаимодействий фоторецепторных и клеток РПЭ. Это происходило благодаря быстрому восстановлению, имеющих место *in situ* нативных свойств РПЭ, в частности адгезивных, ключевых при взаимодействии апикальных отростков РПЭ с наружными сегментами фоторецепторов. Органотипическое культивирование сетчатки *Xenopus laevis* в составе задней стенки глаза, позволило подтвердить пригодность этой модели для анализа процесса восстановления взаимодействия клеток РПЭ и фоторецепторов [9].

Лаборатория проблем регенерации ведет многолетние исследования регенерации сетчатки, с использованием обсуждаемого в разделе способа культивирования тканей глаза как низших, так и высших позвоночных животных. В частности, мы проводили органотипическое роллерное культивирование сетчатки тритона *Pleurodeles waltl* (Urodela) [6]. Исследование было направлено на выяснение способов регенерации и участие в ней внутренних источников сетчатки у этих животных в отсутствие РПЭ. Как оказалось, условия длительного культивирования (в пределах 1 мес), индуцируют пролиферацию и миграцию клеток-источников регенерации сетчатки (клетки ЦМЗ, биполярно-подобные клетки, возможно, глия Мюллера) [3], а также рост нейральных отростков жизнеспособных нейронов.

Недавно нами было проведено исследование регенерационных ответов клеток РПЭ и изолированной от РПЭ сетчатки wholeamount под влиянием экзогенного коммерческого основного фактора роста фибробластов Fgf2, добавленного в среду культивирования [7]. Было обнаружено, что Fgf2 способен увеличивать пролиферативную активность клеток РПЭ, а также их дочерних пролиферирующих дедифференцирующихся клеток, с формированием этими клетками дополнительного ряда. Нейральная сетчатка, изолированная от РПЭ, демонстрировала высокую жизнеспособность, потенции к самовосстановлению за счет пролиферации малодифференцированных клеток крайней периферии сетчатки. В образцах нейральной сетчатки мы обнаружили up-регуляцию экспрессии генов *fgf2* и нуклеостемина (*Ns*) – маркера клеточной стволовости. В клетках РПЭ, несмотря на низкий уровень экспрессии *fgf2*, наблюдалась аналогично нейральной сетчатке up-регуляция гена *Ns*. В целом результаты свидетельствовали о роли как эндогенного фактора, так и экзогенного Fgf2 в процессе восстановления сетчатки и ее РПЭ в условиях реконструкции и восстановления, а также о возможности участия *Ns* в работе регуляционной сети, контролирующей процессы регенерации сетчатки.

С использованием органотипического культивирования изучена роль взаимодействия РПЭ с подлежащими тканями - хороидальной и склеральной оболочками, входящими в состав задней стенки глаза, в регенерации нейральной сетчатки не из внутреннего резерва, а из клеток РПЭ у тритонов *Synops pyrrhogaster*. Обнаружено, что хороидальная (сосудистая) оболочка необходима для осуществления процесса регенерации, поскольку изолированный от хороида РПЭ не пролиферировал. Однако, в его присутствии сосудистой оболочке, даже будучи отделенным от нее мембранным фильтром, в РПЭ выявлялась пролиферация и способность к трансдифференцировке в клетки сетчатки. Исследование роли ростовых факторов, источником которых мог быть хороид, указало на ведущую роль Fgf2, а Igf1 воздействовал на инициацию и прогресс регенерации сетчатки из РПЭ только совместно с Fgf2 [10]. По данным ПЦР в реальном времени, имело место увеличение экспрессии в тканях задней стенки глаза генов, кодирующих оба этих фактора, вскоре после удаления сетчатки.

В наших экспериментах при действии экзогенного фактора роста фибробластов Fgf2 в изолированной сетчатке тритона происходило самовосстановление, частичное восполнение клеточных популяций за счет низкодифференцированных клеток, расположенных на периферии. Эти клетки, а также глия Мюллера дополнительно продемонстрировали способность к миграции, возрастанию митотической активности и продукции нейробластов для восстановления сетчатки.

*Культивирование сетчатки птиц.* Модели органотипического культивирования сетчатки птиц были применены для решения вопросов, связанных с изучением механизмов развития этой ткани и дифференцировки нейронов и глии сетчатки. Широкая серия работ была проведена на реагрегационных культурах сетчатки (формирующиеся из клеточной суспензии) эмбрионов кур с целью выявления закономерностей развития и восстановления сетчатки, а также влияния на этот процесс различных факторов [11]. Прицельное исследование роли ростовых факторов в развитии сетчатки цыпленка было проведено с помощью использования специфического блокатора сурамина (suramin). В присутствии сурамина (50-200 мкМ) происходило подавление пролиферации, клеточная дезинтеграция и нарушение формирования наружной пограничной мембраны. Проявление эффекта сурамина оказалось дозозависимым и могло быть нивелировано добавлением в среду FGF-2, что подтвердило ведущую роль этого ростового фактора в развитии сетчатки позвоночных. В этой работе была установлена существенная роль хороидальной оболочки в стимуляции роста отростков нейральных клеток при культивировании диссоциированных клеток эксплантатов сетчатки цыпленка аналогично тому, как это происходит у хвостатых амфибий. Действие экстракта хороида глаза цыпленка (E18)

сравнивали с действием хорошо известного цилиарного нейротрофического фактора CNTF. Для обоих факторов был обнаружен как стимулирующий эффект, так и дозовая зависимость роста аксонов от концентраций факторов в среде [12]. Это дало основание предполагать, что сосудистая оболочка обладает широким набором факторов, имеющих сигнальное и трофическое значение при регенерации и развитии сетчатки глаза как у амфибий, так и у птиц.

*Органотипическое культивирование сетчатки млекопитающих.* Для млекопитающих инструмент органотипического культивирования оказался не менее эффективным для выяснения вопросов, связанных с изучением механизмов развития и регенерации сетчатки [13]. Было показано, что сетчатка рождающихся слепыми мышей, находящаяся в состоянии гистотипического развития, не только успешно переживает условия эксплантации и культивирования, но и демонстрирует завершение формирования слоев и клеточных типов, аналогично сформированным *in vivo*. Интересно, что для развития фоторецепторов в наружном ядерном слое и наружной пограничной мембраны оказался необходим РПЭ, наличие которого, однако, не было критично для правильного развития внутренней сетчатки, дифференцировки ее клеток, роста отростков нейронов и синаптогенеза [14]. Известны также наблюдения, свидетельствующие о том, что развитие сетчатки неонатальных мышей может успешно происходить и в бессывороточной среде. Что касается культивирования сетчатки постнатальных мышей, то в этом случае в среде без сыворотки не только сохраняется ее, уже в основном сформированная структура, но и наблюдается продолжающийся рост нейральных отростков и формирование новых фоторецепторов [14], хотя и происходят потери в популяции клеток наружного ядерного слоя.

Органотипическое длительное (до 2-3-х нед) культивирования развивающейся сетчатки грызунов представляется в настоящее время удобной моделью для проведения ретровирусной трансфекции. Главным направлением этих исследований являются попытки переноса генов в ретинальные прогениторные клетки для понимания роли регуляторных ТФ в дифференцировке и последовательности созревания определенных специфических клеточных типов сетчатки [15]. Существуют примеры успешного органотипического культивирования сетчаток не только эмбрионов или постнатальных мышей, но и полученных от взрослых особей. Так в работе, проведенной с использованием иммунохимии и ПЦР анализа, удалось показать, что условия *in vitro* способны поддерживать ткань минимум в течение 10 дней. Обнаружилось, что в первые 4

дня культивирования имеют место характерные изменения, в частности, активация МГ, изменения нейритов фоторецепторных клеток, а также биполяров [16, 17].

Ранее мы предприняли попытку ротационного органотипического культивирования изолированной (без РПЭ) нейральной сетчатки взрослой (2 мес) крысы в течение 10 суток. Подробно процедуры выделения, культивирования и последующего анализа описаны нами ранее [4]. К концу культивирования сетчатка крысы сохраняла жизнеспособность, инициировались реорганизация в ткани и клеточные ответы, свидетельствующие о реконструкции, а именно клеточная миграция / ядерная транслокация с замещением клеток наружного ядерного слоя за счет смещающихся клеток внутреннего ядерного слоя, биполяров возможно пролиферирующих клеток МГ. Пролиферативной активностью обладали две клеточные популяции: крупные макрофагальные клетки и отдельные мелкие клетки, принадлежащие внутреннему ядерному слою. Последние представляли собой с высокой вероятностью активированные клетки МГ, популяции - потенциального источника регенерации клеток сетчатки. Таким образом, данные, полученные с помощью органотипического культивирования сетчатки взрослых крыс, свидетельствуют о возможности структурных изменений и активации регенерационных ответов в переживающей *in vitro* ткани сетчатки. Механизмы, используемые при этом – транслокация клеток внутреннего ядерного слоя (ВЯС) наружу на фоне частичной гибели клеток наружного ядерного слоя (НЯС), смещение тел фоторецепторов вовнутрь, реакция со стороны макроглии, а также относительная устойчивость послойной организации и ограниченная пролиферация не нейрональных клеток [4, 18]. С использованием органотипического культивирования выявлено действие на клетки сетчатки крысы ряда нейропротекторных факторов, после индукции повреждения сетчатки. Добавление CNTF, после действия гентамицина с токсичной концентрацией, вызывающей оксидативный стресс, приводило к значительному (хоть и неполному) устранению негативных последствий в популяции ганглиозных клеток и их отростков, формирующих зрительный нерв [19]. В другом исследовании, на модели глаза свиньи (комплекс: хороид-РПЭ-нейральная сетчатка) были созданы условия для сохранения комплекса «wholamount». В результате оценки клеточной пролиферации, жизнеспособности, роста отростков, а также иммунофенотипов фоторецепторных и глиальных клеток показано, что модель может быть применена для тестирования офтальмологических препаратов [20].

*Органотипическое культивирование сетчатки человека.* Органотипическое культивирование эксплантированной сетчатки человека служит хорошим инструментом для моделирования заболеваний и патологий сетчатки, доклинических испытаний препаратов и токсикологических тестов, что позволяет сократить число исследований на

животных *in vivo*. Однако в литературе имеется только малое число работ, проведенных с использованием эксплантатов сетчатки человека. В этих работах были предприняты попытки моделирования хронической дегенерации клеток сетчатки, тестирования нейропротекторных факторов сетчатки человека (например, из мезенхимных стволовых клеток (МСК) человека, PDGF) [21]. Эксплантаты сетчатки человека *in vitro* традиционно используются в исследованиях ее регенерационных потенциалов. Так, еще в работах раннего периода было выяснено, что клетки - потенциальные источники восстановления, называемые авторами нейральными предшественниками, способны в сетчатке человека *in vitro* менять свой фенотип и дифференцироваться в различные типы нейронов [22]. Результаты этих работ продемонстрировали возможность использования данной модели в исследованиях регенерационных возможностей зрелой сетчатки человека в условиях органотипического культивирования для терапевтических целей. Тем не менее, несмотря на всю привлекательность модели эксплантированной сетчатки человека *in vivo* и ее культивирования для исследований развития и регенерации, моделирования патологий, а также токсикологических тестов и доклинических исследований, для широкого использования такого подхода существует большое число ограничений. Прежде всего, это – проблемы получения кадаверного материала сетчатки доноров, отсутствие информации о состоянии сетчатки (наличия у донора тех или иных заболеваний), которые могут также затрагивать сетчатку глаза, невозможность получения контрольных образцов нормальной функционирующей ткани здоровой сетчатки человека. Следует отметить также, что при выделении сетчатки неизбежна отмеченная выше в ряде работ аксотомия, которая сопровождается ретроградной гибелью отростков, а затем и тел ганглиозных клеток. При выделении ткани имеет место клеточный стресс, а также метаболические изменения, которые усиливаются в условиях изоляции сетчатки от окружающих ее тканей глаза [22]. Работы по органотипическому культивированию сетчатки глаза эмбрионов и взрослых животных разных классов позвоночных, включая человека, опирающиеся на достижения в области исследований стволовых и прогениторных клеток, легли в основу разработки еще одного метода культивирования. Этот метод заключается в получении так называемых органоидов сетчатки, в условиях биореакторов, позволяющих увеличивать и регулировать время культивирования сетчатки, осуществлять строгий мониторинг условий *in vitro*, таких как температура, уровень рН, кислорода и т.д. оказывающих влияние на процессы, происходящие в сетчатке [23].

Технологии создания органоидов сетчатки для 3D-культивирования в биореакторах постоянно совершенствуются, для применения с целью трансплантации в случаях

клеточных потерь при заболеваниях или повреждениях сетчатки млекопитающих и человека (рисунок 1.3.1).

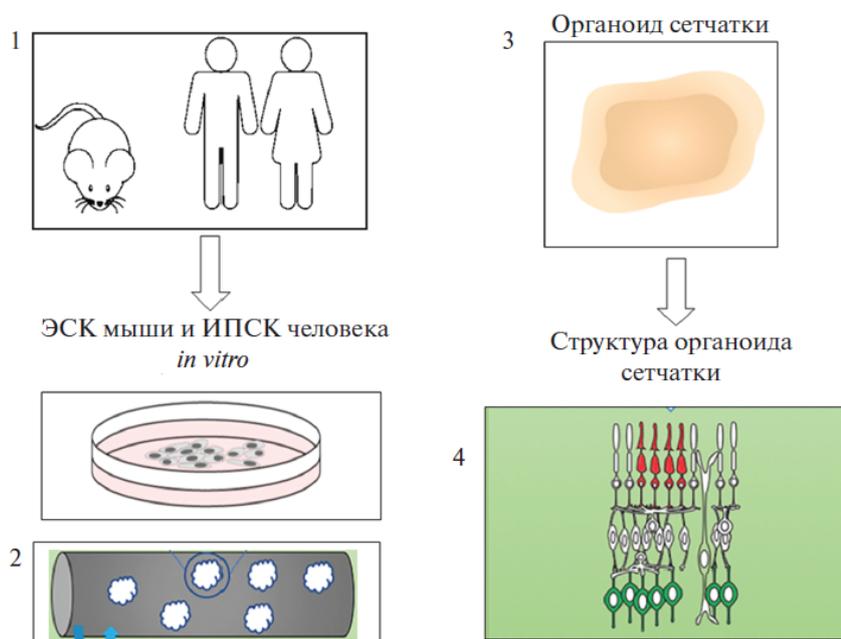


Рисунок 1.3.1 - Этапы получения органоидов сетчатки

1 – выделение стволовых клеток (ЭСК и ИПСК), 2 – культивирование стволовых клеток и перенесение во вращающиеся биореакторы, 3 – формирующиеся органоиды, 4 – внутренняя структура органоида [6].

Эти достижения имеют хорошие перспективы для проведения процедур геномодификации, получения дифференцированных клеток сетчатки, в частности, для трансплантации наиболее часто погибающих фоторецепторов, клеток РПЭ, тестирования офтальмологических препаратов.

#### 1.3.4 Заключение

Проведен анализ собственных результатов и данных литературы по применению органотипического культивирования сетчатки позвоночных животных и человека. Метод позволяет поддерживать структуру и жизнеспособность сетчатки, моделировать ряд ее патологических состояний, наблюдать за клеточными процессами регенерации, реконструкции, морфогенеза, изучать роль и механизм действия регуляторных факторов, защитных/повреждающих агентов в строго заданных концентрациях и контролируемых условиях. Особое внимание уделено поведению основных клеточных популяций, таких как, ретинальный пигментный эпителий, фоторецепторы, глия Мюллера, ганглиозные клетки, которые затрагиваются в случаях развития различных патологических состояний сетчатки.

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП по биологии развития ИБР РАН.

### 1.3.5 Список использованных источников

1. Schutgens F., Verhaar M.C., Rookmaaker M.B. Pluripotent stem cell-derived kidney organoids: An in vivo-like in vitro technology // *Eur. J. Pharmacol.* - 2016. - Vol. 790. – P. 12–20.
2. Cho H.J., Verbridge S.S., Davalos R.V., Lee Y.W. Development of an in vitro 3D brain tissue model mimicking in vivo-like pro-inflammatory and pro-oxidative responses // *Ann. Biomed. Eng.* - 2018. - Vol. 46. - P. 877–887. DOI: 10.1007/s10439-018-2004-z
3. Григорян Э.Н. Эндогенные клеточные источники для регенерации сетчатки у позвоночных животных и человека // *Онтогенез.* - 2019. - Т. 50. № 1. - С. 12–26. (Grigoryan E.N. Endogenous cell sources for eye retina regeneration in vertebrate animals and humans // *Russian Journal of Developmental Biology (Ontogenez).* - 2018. - Vol. 49. № 6. - P. 1–13. DOI: 10.3390/biomedicines8070208
4. Новикова Ю.П., Алейникова К.С., Краснов М.С., Поплинская В.А., Григорян Э.Н. Сетчатка глаза взрослых тритона и крысы в условиях органотипического культивирования in vitro // *Известия РАН. Сер. биол.* - 2010. № 4. - С. 389–402. (Novikova Yu.P., Aleynikova K.S., Krasnov M.S., Poplinskaya V.A., Grygoryan E.N. In vitro organotypic cultivation of adult newt and rat retinas // *Biology Bulletin (Izvestiya RAN).* - 2010. - Vol. 37. № 4. - P. 327–338). <https://doi.org/10.1134/S1062359010040011>
5. Hurst J., Kuehn S., Jashari A., Tsai T., Bartz-Schmidt K.U., Schnichels S., Joachim S.C. A novel porcine ex vivo retina culture model for oxidative stress induced by H<sub>2</sub> O<sub>2</sub> // *Altern. Lab. Anim.* - 2017. - Vol. 45. - P. 11–25.
6. Новикова Ю.П., Поплинская В.А., Григорян Э.Н. Органотипическое культивирование как способ изучения восстановительных возможностей сетчатки глаза позвоночных животных и человека. // *Онтогенез.* - 2020. - Т. 51. № 1. - С. 35-50. (Novikova Y.P., Poplinskaya V.A, Grigoryan E.N. Organotypic Culturing as a Way to Study Recovery Opportunities of the Eye Retina in Vertebrates and Humans. // *Russian Journal of Developmental Biology (Ontogenez).* - 2020. - Vol. 51. - № 1. - P. 31–44. DOI: 10.1134/S1062360420010063
7. Markitantova Y.V., Novikova Y.P., Poplinskaya V.A., Grigoryan E.N. Expression of FGF2 and Nucleostemin in Models of Retinal Regeneration in the Newt Under Conditions of 3D Organotypic Culture In vitro // *EC Ophthalmology.* – 2020. – Vol. 11.1. – P. 01-09. DOI:10.31080/ecop.2020.11.00580.

8. Lahne M., Gorsuch R.A., Nelson C.M., Hyde D.R. Culture of adult transgenic zebrafish retinal explants for live-cell imaging by multiphoton microscopy // *J. Vis. Exp.* - 2017. - Vol. 120. - P. 55335. doi: 10.3791/55335
9. Defoe D.M., Easterling K.C. Reattachment of retinas to cultured pigment epithelial monolayers from *Xenopus laevis* // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* - 1994. - Vol. 35. - P. 2466-2476.
10. Mitsuda S., Yoshii C., Ikegami Y., Araki M. Tissue interaction between the retinal pigment epithelium and the choroid triggers retinal regeneration of the newt *Cynops pyrrhogaster* // *Dev. Biol.* - 2005. - Vol. 280. - P. 122–132. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.01.009.
11. Layer P.G., Willbold E. Embryonic chicken retinal cells can regenerate all cell layers in vitro, but ciliary pigmented cells induce their correct polarity // *Cell Tissue Res.* - 1989. - Vol. 258. - P. 233-242 doi: 10.1007/BF00239443.
12. Liu L., Cheng S.H., Jiang L.Z., Hansmann G., Layer P.G. 1988. The pigmented epithelium sustains cell growth and tissue differentiation of chicken retinal explants in vitro // *Exp. Eye Res.* - 1988. - Vol. 46. - P. 801–812.
13. Pinzón-Duarte G., Kohler K., Arango-González B., Guenther E. Cell differentiation, synaptogenesis, and influence of the retinal pigment epithelium in a rat neonatal organotypic retina culture // *Vision Res.* - 2000. - Vol. 40. - P. 3455–3465. doi: 10.1016/s0042-6989(00)00185-1
14. Bandyopadhyay M., Rohrer B. Photoreceptor structure and function is maintained in organotypic cultures of mouse retinas // *Mol. Vis.* - 2010. - Vol. 16. - P. 1178–1185.
15. Moritoh S., Tanaka K.F., Jouhou H., Ikenaka K., Koizumi A. Organotypic tissue culture of adult rodent retina followed by particle-mediated acute gene transfer in vitro // *PLoS One.* - 2010. - Vol. 5 : e12917.
16. Franze K., Grosche J., Skatchkov S.N., Schinkinger S., Foja C., Schild D., Uckermann O., Travis K., Reichenbach A., Guck J. Muller cells are living optical fibers in the vertebrate retina // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* - 2007. - Vol. 104. - P. 8287–8292.
17. Jorstad N.L., Wilken M.S., Grimes W.N., Wohl S.G., VandenBosch L.S., Yoshimatsu T., Wong R. O., Rieke F., Reh T.A. Stimulation of functional neuronal regeneration from Müller glia in adult mice // *Nature.* - 2017. - Vol. 548. - P. 103–107.
18. Grigoryan E.N., Poplinskaya V.A., Novikova Y.P. Retinal remodeling under conditions of organotypic 3D culturing in vitro and after damage in vivo in lower and higher vertebrates // *NewFront. Ophthalmol.* - 2016. - Vol. 2. - P. 66–76. DOI: 10.15761/NFO.1000118

19. Smedowski A., Pietrucha-Dutczak M., Maniar R., Ajeleti M., Matuszek I., Lewin-Kowalik J. FluoroGold-labeled organotypic retinal explant culture for neurotoxicity screening studies // *Oxid. Med. Cell Longev.* - 2018. - Vol. 13. - P. 2487473. doi: 10.1155/2018/2487473
20. Osborne A., Sanderson J., Martin K. R. Neuroprotective effects of human mesenchymal stem cells and platelet-derived growth factor on human retinal ganglion cells // *Stem cells (Dayton, Ohio)*. - 2018. - Vol. 36. - P. 65–78. doi: 10.1002/stem.2722.
21. Mayer E.J., Carter D.A., Ren Y., Hughes E.H., Rice C.M., Halfpenny C.A., Scolding N.J., Dick A. D. 2005. Neural progenitor cells from postmortem adult human retina // *Br. J. Ophthalmol.* - 2005. - Vol. 89. - P. 102–106. DOI: 10.1136/bjo.2004.057687
22. Murali A., Ramlogan-Steel C. A., Andrzejewski S., Steel J.C., Layton C.J. Retinal explant culture: A platform to investigate human neuro-retina // *Clin Exp Ophthalmol.* - 2019 . - Vol. 47(2). - P. 274-285. doi: 10.1111/ceo.13434.
23. Llonch S., Carido M., Ader M. Organoid technology for retinal repair // *Dev. Biol.* - 2018. - Vol. 433. - P. 132–143.

## **Подраздел 1.4 Изучение действия компонентов секрета из кондиционированных сред регенератов тканей глаза *urodela* на клетки пигментного эпителия сетчатки человека *in vitro***

### **1.4.1 Введение**

Регенерация тканей и органов у хвостатых амфибий происходит за счет стволовых, а также специализированных клеток, проявляющих высокую степень пластичности дифференцировки. Эта группа животных, а также некоторые, способные к регенерации отдельных тканей виды рыб, могут стать продуцентами факторов, индуцирующих дестабилизацию, понижение уровня дифференцировки потенциальных клеток источников для восстановления тканей у высших позвоночных [1]. Среди немногочисленных исследований в этом направлении, известна работа, связанная с изучением действия экстрактов, выделенных из регенератов конечностей тритона на состояние дифференцированных клеток млекопитающих. С использованием данного подхода, продемонстрирована возможность с помощью экстрактов регенератов конечности тритона вывести в дедифференцировку имеющие мышечную специализацию C2C12 миотрубочки мыши *in vitro* [2]. При этом удалось подавить исходную дифференцировку C2C12 мышечных трубочек, которые затем оказались способными дать пролиферирующие одноядерные клетки, служащие источником для регенерации мышц *in vivo*. Немного ранее с этой целью были применены сыворотка крови, тромбин и его отдельные фракции, либо смесь тромбина и сыворотки. Эти вещества могли стимулировать вход миоядер трубочек в клеточный цикл, однако продукция отдельных мононуклеарных клеток не происходила. По наблюдению авторов работы, стимулирующий эффект оказывали факторы белковой природы, находящиеся в растворимой фракции экстракта, теплоустойчивые и ингибируемые трипсином [2]. Есть примеры понижения уровня дифференцировки клеток млекопитающих с помощью белковых экстрактов тканей рыб. Использование экстракта бластемы регенерирующего хвоста костистой рыбы *Sternopygus macrurus* также приводило к эффекту по отношению к мышечным клеткам линии C2C12 *in vitro*. Обработка экстрактом не индуцировала вход миоядер в клеточный цикл, но приводила к вычленению миобластов из состава миоволокон и ингибированию их дифференцировки, что в последующем, однако, приводило к пролиферации вычленившихся миобластов и слиянию их в миотрубочки *de novo* [3]. Приведенные примеры указывают на возможность проявления регенерационных ответов клеток млекопитающих под влиянием веществ, экстрагируемых из регенерирующих тканей тритонов и рыб. Обнаружено, что индуцировать регенерацию сердца у млекопитающих способен внеклеточный матрикс (ВКМ) ткани сердца рыбки

полосатика. ВКМ получали от интактных рыб и рыб на 3 день после ампутации фрагмента желудочка сердца. Эффективность действия ВКМ оценивали, как *in vitro* по отношению к культивированным человеческим клеткам предшественникам, так и *in vivo* при инъекциях его мышам после экспериментально вызванного инфаркта. Однократное введение мышам полученного от рыб ВКМ ткани сердца не только индуцировало регенерацию сердца после инфаркта, но и восстанавливало его функцию. В условиях *in vitro* ВКМ рыб обладал про-пролиферативным и хемоаттрактантным эффектами на клеточную популяцию клеток-прогениторов мышечной ткани сердца человека [3]. В одной из недавних работ в регенерирующей ткани хвостового плавника zebrafish во внеклеточном пространстве были визуализированы везикулы, содержащие сливающиеся с клеточной поверхности и окруженные двойной мембраной микровезикулы, экзосомы. Внеклеточные везикулы способны передавать содержимое (иРНК, микроРНК, пептиды и липиды) соседним клеткам, являясь компонентом межклеточной коммуникации [4].

Регенерационные ответы сетчатки тритона в условиях органотипического культивирования после выделения, частичной гибели фоторецепторного слоя, перерезки зрительного нерва, нами описаны ранее [5]. Нами проведены эксперименты на линии клеток РПЭ глаза человека ARPE-19 *in vitro*, при добавлении сред, кондиционированных регенерирующей сетчаткой взрослого тритона [6].

В отличие от клеток РПЭ тритонов, клетки РПЭ человека, после этапов дедифференцировки, пролиферируют и трансформируются в фибробластоподобные клетки, которые участвуют в образовании фиброзных неоваскулярных мембран, приводящих к тракционной отслойке сетчатки и к нарушению зрения [7]. Ранее показано, что сетчатка глаза тритона является индуктором регенерации хрусталика [8,9] и продуцентом факторов, в частности семейства фактора роста фибробластов (FGF), способных индуцировать и стимулировать регенерацию хрусталика из пигментированных клеток радужки глаза этих животных [10]. Наряду с другими тканями задней стенки глаза сетчатка тритонов является источником FGF2 – ключевого фактора, запускающего сигнальные пути, ответственные за де- и трансдифференцировку клеток РПЭ [11,12]. В связи с этими данными о роли Fgf2, в том, числе полученными нами ранее, было высказано предположение о том, что сигнальные факторы, выделяемые регенератами сетчаток тритонов, могут участвовать в стимуляции регенерационного ответа клеток РПЭ человека. Цель работы состояла в изучении морфологических и молекулярных изменений в клетках РПЭ человека *in vitro* под влиянием сред, кондиционированных регенерирующими в условиях органотипического культивирования сетчатками взрослых тритонов.

#### 1.4.2 Материал и методы

Для получения кондиционированных регенерирующими тканями сред, использовали ткани глаза взрослых половозрелых тритонов *Pleurodeles waltl* в возрасте от 6 мес до 1 года, разводимых в аквариальной ИБР РАН. Тритонов наркотизировали в растворе MS-222 (1:1000; Sigma-Aldrich, США) в течение 10–15 мин до полной иммобилизации животного. Выделение глаз проводили в стерильных условиях с помощью микрохирургических инструментов. С помощью бинокулярной лупы выделяли сетчатку, полностью свободную от других тканей задней стенки глаза (пигментного эпителия, хориоидальной и склеральной оболочек).

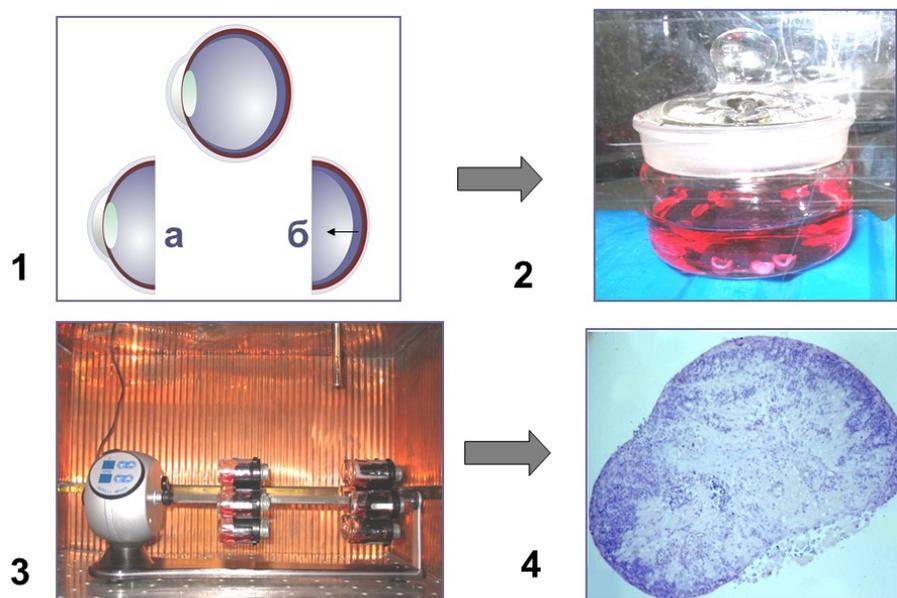


Рисунок 1.4.1 - Этапы органотипического ротационного культивирования сетчатки глаза  
1 – микрохирургическое выделение сетчатки: а – изоляция переднего сектора глаза, б – сетчатка в составе задней стенки глаза и ее изоляция (стрелка); 2 – помещение образцов в холодную среду культивирования; 3 – экспозиция изолированных сетчаток в среде при постоянном вращении; 4 – замкнутая сфера сетчатки крысы по окончании экспозиции [6].

Образцы 2-х сетчаток помещали в стеклянные флаконы (рисунок 1.4.1) с 5 мл ростовой среды, состоящей из культуральной среды 199 (Биолот, Россия) и стерильной бидистиллированной воды в соотношении 70% среды 199 и 30% воды, 1 М буфера НЕРЕС, 80 мг/л сульфата гентамицина и 10% ЭТС. Образцы культивировали в темноте при температуре 22–24°C в мини-роллере RM-1 (Elmi, Латвия) при скорости вращения (60 x g / мин). Через 120 ч культивирования меняли среду на ростовую среду того же состава, но без эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) и культивировали еще 48 ч. Далее

полученную кондиционированную среду (КС) стерилизовали через фильтры с диаметром пор 0.22 мкм (Millipore, США), аликвотировали и хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$ .

*Культивирование клеток.* В работе использовали линию клеток РПЭ взрослого человека ARPE-19, депонированную в УНУ "Коллекция клеточных культур для биотехнологических и биомедицинских исследований (общебиологического и биомедицинского направления)" ИБР РАН. Клетки культивировали при  $37^{\circ}\text{C}$  и 5%  $\text{CO}_2$  в ростовой среде, состоящей из культуральной среды DMEM/F12 (Sigma-Aldrich, США), L-глутамина (2 мМ; Sigma-Aldrich, США), 100 Ед/мл пенициллина и 100мкг/мл стрептомицина (PanBiotech, Германия), ЭТС (Gibco, США) и КС регенератов сетчаток тритонов. КС добавляли к ростовой среде в соотношении 1:1 с конечной концентрацией 1% ЭТС (Gibco, США). В качестве контроля использовали клетки, культивированные без добавления КС, но с 1% ЭТС. Изменения морфологии клеток изучали с помощью инвертированного микроскопа "Olympus СКХ31" (Япония) через 24, 48, 72 и 120 ч после посадки клеток. В течение всего срока культивирования среду не меняли. Фотографии получали с помощью микроскопа "Olympus" с цифровой камерой DP70.

*Морфометрический анализ.* Для оценки морфологических изменений клетки ARPE-19 высаживали в культуральные флаконы для адгезивных культур T-25 Greiner CELLSTAR® (GreinerBio-OneGmbH, Германия). После культивирования в течение 24, 48, 72 и 120 ч в присутствии КС или без нее (контроль) клетки фотографировали с помощью микроскопа Olympus (Япония) с цифровой камерой DP70 (Olympus, Япония). Затем из клеток выделяли тотальную РНК (см. ниже). Поскольку через 120 ч клетки достигали конфлюэнтного монослоя, что затрудняло проведение адекватного морфометрического исследования, оценку морфологии клеток ARPE-19 проводили на сроках 24, 48 и 72 ч по изображениям случайных полей зрения (формат JPEG, размер изображения 1360 x 1024 пикселей). С помощью графического планшета и стилуса в программе ImageJ1.51j8 (Wayne Rasband, National Institute of Health, США) на изображениях вручную обводили каждую клетку, исключая двудерные клетки и те, края которых соприкасались с границами изображения. Для каждого срока анализировали от 150 до 300 клеток, используя 4-16 микрофотографий независимых полей зрения с масштабным увеличением  $\times 200$ . Программа автоматически рассчитывала площади проекций клетки на подложке (далее площадь клетки). Площади клеток были рассчитаны в пикселях без перевода в метрические единицы измерения, поскольку для анализа были важны не абсолютные значения, а относительные. Дополнительно в программе CellsCount11f (Россия) проводили подсчет клеток. Для каждого срока анализировали от 1000 до 2000 клеток,

используя 10-20 микрофотографий независимых полей зрения с масштабным увеличением  $\times 100$ .

*Оценку пролиферативной активности клеток РПЭ* проводили с помощью МТТ-теста по стандартной методике. Клетки высаживали на поверхность 96-луночных планшетов в концентрации  $1 \times 10^4 / \text{см}^2$  и культивировали в течение 24 ч в отсутствие (контроль) и в присутствии КС. Анализ оптической плотности окрашенного раствора проводили на планшетном анализаторе “StatFax 2100” (Awareness Technology Inc, США) при 545 нм и корректирующем фильтре 630 нм. Исследования проведены в двух повторах по 16 повторностей на одно разведение вещества или контрольную группу. Для вычисления средних значений оптической плотности окрашенных растворов и стандартных отклонений применяли программное обеспечение Excel 2013 (Microsoft Corporation, США). Пролиферативную активность клеток (%) оценивали по изменению средних значений оптической плотности растворов по отношению к контролю, принятому за 100%.

*Иммуноцитохимическое исследование (ИЦХ).* Клетки высаживали на круглые покровные стекла (CellStar, Германия) в 24-луночные планшеты (Greiner Bio-One GmbH, Германия) и после культивирования в отсутствие (контроль) или в присутствии КС через 24, 48, 72 ч фиксировали в течение 6 мин 4% раствором параформальдегида (Sigma-Aldrich, США). Препараты хранили в смеси глицерина и этиленгликоля при  $-20^\circ \text{C}$  до проведения ИЦХ окрашивания. Дифференцировку клеток оценивали по иммунофлуоресценции, используя первичные антитела к коннексину 43 (Cx43, C6219, кроличьи, 1:200, Sigma-Aldrich, США), цитокератину 8 (CK8, Mob 054-05, мышинные, 1:40, Diagnostic BioSystems, США), OTX2 (AV32439, 1:100, кроличьи, Sigma-Aldrich, США),  $\beta$ III-тубулину (ab7751, мышинные, 1:200, Abcam, Великобритания), нейрофиламентам средней и тяжёлой фракции (N2912, мышинные, 1:400, Sigma-Aldrich, США),  $\beta$ -катенину (ab32572, кроличьи, 1:200, Abcam, Великобритания), фибронектину (ab23750, кроличьи, 1:100, Abcam, Великобритания), виментину (ab8978, мышинные, 1:100, Abcam, Великобритания), коллагену типа I (ab34710, кроличьи, 1:100, Abcam, Великобритания), разведенные в 0.1% растворе БСА (Sigma-Aldrich, США). Препараты экспериментальной и контрольной групп клеток ARPE-19 обрабатывали параллельно для последующего проведения сравнительного анализа. ИЦХ-окрашивание проводили по стандартной методике с использованием вторичных антител, меченных флуорохромами AlexaFluor 488 или 594 (1:300; Molecular Probes, США). Фотографирование клеток проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Keyence BZ-9000E (Япония). Интенсивность флуоресцентного сигнала и число клеток (ядер) оценивали с помощью программы ImageJ

на цифровых изображениях препаратов (RGB, формат TIFF) с разрешением 1360×1024 пикселей по методике, описанной нами ранее [17]. Для маркерных белков Сх43, OTX2, фибронектин, коллаген I типа и  $\beta$ III-тубулин вычисляли количественный индекс (QI) интенсивности флуоресценции по отношению средних значений интенсивности флуоресцентного сигнала (IntDen, в пикселях) к количеству клеток (ядер) ARPE-19 [35]. Подсчитывали долю положительно окрашенных клеток, используя программу CellsCount11f (Россия). Для каждого срока анализировали от 400 до 900 клеток, используя 8—12 микрофотографий независимых полей зрения с масштабным увеличением  $\times 200$ . В случае  $\beta$ -катенина, локализующегося по цитоплазматической мембране и в цитоплазме, подсчитывали клетки, имеющие цитоплазматическое распределение гранул  $\beta$ -катенина, используя ту же программу. Для каждого срока анализировали от 300 до 700 клеток, используя 4—7 микрофотографий независимых полей зрения с масштабным увеличением  $\times 200$ . Определяли число клеток, не содержащих гранул  $\beta$ -катенина и содержащих единичные или множество гранул этого белка.

*Количественная ПЦР в реальном времени (кПЦР).* Подготовку проб, а также выделение тотальной РНК из культур клеток и кПЦР проводили по методике, описанной нами ранее [13-15]. Методом кПЦР оценивали изменения уровня экспрессии мРНК следующих генов транскрипционных факторов, сигнальных белков и маркеров дифференцировки: *OCT4*, *NANOG*, *PAX6*, *OTX2*, *MITF*, *KRT18*,  $\beta$ III-тубулин (*TUBB3*), *COL1A1*, *CTNNB1*, *GSK3B*, *KLF4*, *SPPI*, *RUNX2*, *FGF2*, *FGFR1*, *SMAD4*, *SMAD5*, *IGFR1* (праймеры и зонды ДНК Синтез, Россия), *NES*, *BMP2*, *BMP4*, *CCND1* (циклин D1) (Applied Biosystems, США). В качестве эндогенного контроля использовали ген «домашнего хозяйства» *GAPDH* (праймеры и зонд ДНК Синтез, Россия). Пороговый цикл определяли, применяя программное обеспечение “LightCycler® 96 Application Software Version 1.1” (Roche, Швейцария). Количество мРНК каждого исследованного гена в образцах оценивали в 3-х повторностях. Обработка данных кПЦР включала усреднение значений  $C_t$  для повторных точек в эксперименте, расчет значений относительной экспрессии исследуемых генов методом  $\Delta\Delta C_t$  для каждого образца с использованием значения  $C_t$  по гену *GAPDH* в качестве нормирующего.

*Статистический анализ.* Статистическую обработку полученных показателей, вычисление средних значений и ошибки среднего проводили с помощью программы Excel 2013 (Microsoft Corporation, США). Достоверность различий средних величин устанавливали с помощью *t*-критерия Стьюдента при уровне значимости  $P < 0.01$  или  $P < 0.05$ .

### 1.4.3 Результаты и обсуждение

Исследования действия экстрактов регенерирующей сетчатки тритона на клетки линии ARPE-19 человека *in vitro* [6] дали интересную информацию, требующую дальнейшего изучения. Результаты морфологического и морфометрического исследований показали изменения в морфологии клеток ARPE-19, проявляющиеся в изменении формы и увеличении их размеров в течении 120 ч культивирования после воздействия КС регенератов сетчаток тритонов (рисунок 1.4.2).

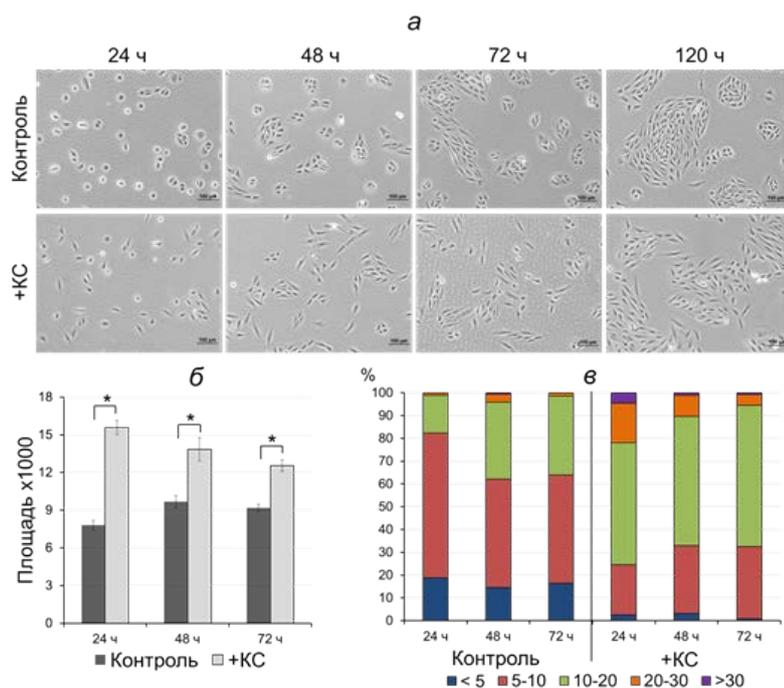


Рисунок 1.4.2 - Изменение морфологии (а) и морфологических параметров (б, в) клеток ARPE-19 в различные временные промежутки после добавления в среду культивирования КС регенератов сетчаток тритонов [7]

а – фазовый контраст; б – средние значения площади клеток в отсутствие (контроль, черные столбики) и в присутствии КС (серые столбики) в пикселях и их ошибки (вертикальные отрезки), \* $p < 0.01$ ; в – распределение клеток по размеру площади в пикселях  $\times 1000$ , в %.

По данным литературы известно, что по мере увеличения размера клеток увеличивается содержание рибосом и скорость синтеза белка [16]. Забегая вперед, следует отметить, что об увеличении синтетической активности клеток ARPE-19 на сроке 24-48 ч после воздействия КС свидетельствуют увеличение экспрессии гена коллагена I типа *COL1A1* и усиление иммуноокрашивания на белок внеклеточного матрикса фибронектин.

Кроме этого, результаты ИЦХ исследования показали снижение интенсивности окрашивания клеток на белок щелевых контактов РПЭ Sx43 (рисунок 1.4.3) и перераспределение  $\beta$ -катенина (рисунок 1.4.4) по сравнению с контролем.

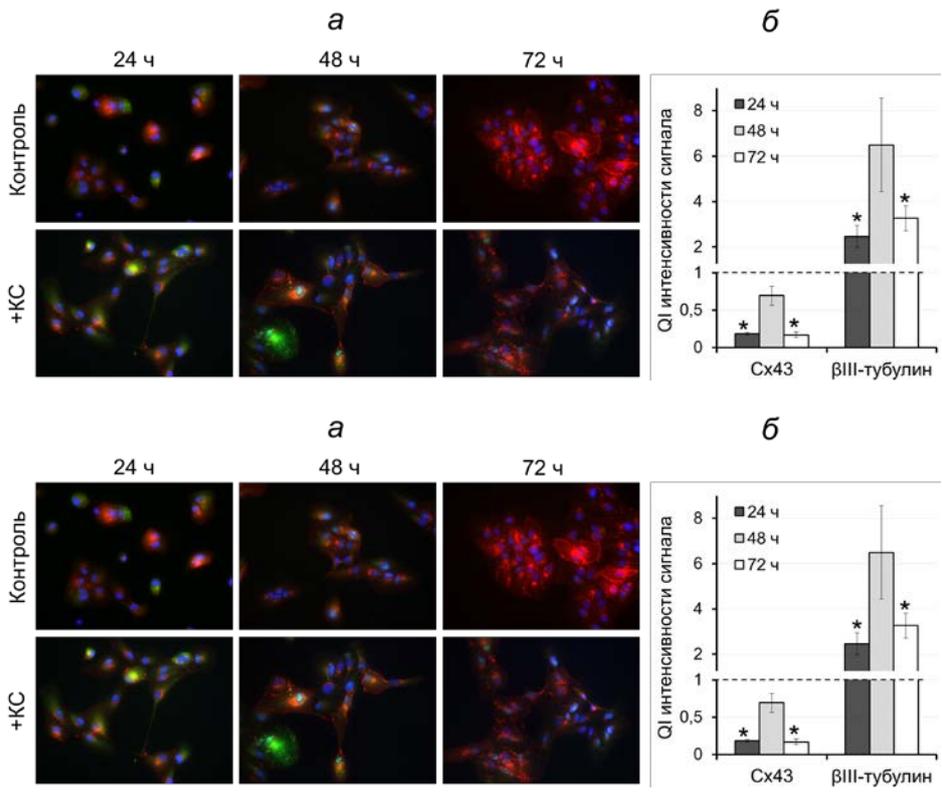


Рисунок 1.4.3 - Анализ изменения Sx43 и βIII-тубулина в клетках ARPE-19 [7] Через 24, 48 и 72 ч после воздействия КС: *а* – двойное иммунофлуоресцентное окрашивание на Sx43 (красное свечение) и βIII-тубулин (зеленое свечение). Ядра окрашены DAPI (синее свечение). Об.: 40х. *б* – количественный индекс (QI) интенсивности флуоресцентных сигналов. Вертикальные отрезки – ошибки среднего, \**p* < 0.05.

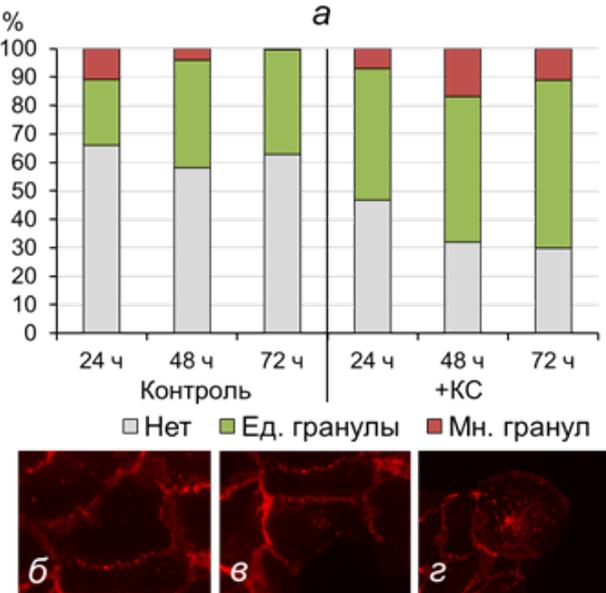


Рисунок 1.4.4 - Количественный анализ клеток ARPE-19 на цитоплазматическое распределение гранул β-катенина (*а*) и примеры иммунофлуоресцентного окрашивания на β-катенин (*красное свечение*), демонстрирующие отсутствие (*б*), единичные (*в*) и множество гранул (*г*) в цитоплазме [7] *а* – число клеток, не содержащих гранул (Нет, *серый цвет*) и содержащих единичные (Ед., *зеленый цвет*) или множество (Мн., *красный цвет*) гранул через 24, 48 и 72 ч после добавления в среду КС по сравнению с контролем, в %.

Так, во временном отрезке 24-48 ч отмечалось увеличение доли клеток, имеющих внутриклеточную локализацию  $\beta$ -катенина. Поскольку  $\beta$ -катенин является не только центральным медиатором канонического Wnt-сигнального пути [17], но и белком адгезионных контактов [18], данное наблюдение совместно с результатами окраски на Сх43 говорит об ослаблении межклеточной адгезии и объясняет появление «рыхлых» колоний под действием КС.

Снижение экспрессии *OTX2*, маркера предшественников РПЭ, и *BMP4*, участвующего в определении ранней специализации клеток РПЭ из нейроэпителия [19], через 24 ч после воздействия КС (рисунок 1.4.5) наряду с ослаблением межклеточных контактов свидетельствует о частичной потере эпителиальной дифференцировки на данном сроке.

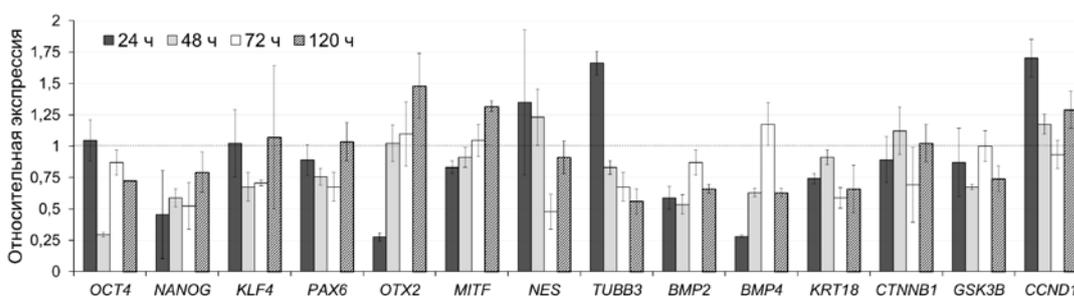


Рисунок 1.4.5 - Изменение профиля экспрессии генов *OCT4*, *NANOG*, *KLF4*, *PAX6*, *OTX2*, *MITF*, *NES*, *TUBB3*, *BMP2*, *BMP4*, *KRT18*, *CTNNB1*, *GSK3B*, *CCND1* в клетках ARPE-19 под действием КС регенератов сетчаток тритонов в различные промежутки времени относительно соответствующего контроля (в отсутствии КС), принятого за единицу (штриховая линия) [7]

Снижение интенсивности окрашивания на  $\beta$ -катенин по цитоплазматической мембране в клетках ARPE-19 сопровождалось сохранением уровня экспрессии его гена (*CTNNB1*) одновременно со снижением уровня экспрессии *GSK3B* (рисунок 1.4.5). В отсутствие Wnt сигнализации *GSK3B* препятствует стабилизации и накоплению  $\beta$ -катенина в цитоплазме. При активации Wnt сигнального пути накопленный  $\beta$ -катенин транслоцируется в ядро, где взаимодействует с мишенями Wnt, регулирующими экспрессию многих генов [20].

В клетках ARPE-19, как уже было сказано выше, под действием КС наблюдалось увеличение экспрессии гена коллагена I типа *COL1A1*, но усиления синтеза белка при ИЦХ окрашивании не выявлено. Однако отмечено усиление иммуноокрашивания на фибронектин. Рассматриваемые вместе эти изменения указывают на возможную активацию эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) клеток РПЭ и активацию канонического Wnt сигнального пути. Связь между ЭМП и активацией Wnt/ $\beta$ -

катенинового пути показана при эмбриональном развитии и регенерации [21, 22]. Нарушение межклеточных контактов и перестроение цитоскелета, о чем свидетельствуют изменения в морфологии клеток и появление «рыхлых колоний», являются одними из ранних событий ЭМП [23]. Клетки, подвергшиеся ЭМП, приобретают мезенхимоподобный фенотип, характеризующийся экспрессией соответствующих белков цитоскелета (в частности виментина) и повышенным отложением белков внеклеточного матрикса, включая коллаген I типа и фибронектин [24-26]. ИЦХ окрашивание на виментин не выявило значимых различий между контрольной и экспериментальной группой. Однако виментин не является надёжным показателем для выявления ЭМП в культуре РПЭ, поскольку различные виды эпителия экспрессируют его в культуре [27]. Кроме того, виментин экспрессируется в регенерирующих после повреждения тканей. Часто процесс регенерации связан с возвращением клеток к менее дифференцированному фенотипу [28].

Для исключения остеогенной дифференцировки под влиянием КС<sub>2</sub> мы исследовали кПЦР экспрессию генов *SPP1*, *RUNX2* и показали отсутствие транскрипции *SPP1* в клетках ARPE-19 в контроле и под воздействием КС, и снижение уровня экспрессии мРНК *RUNX2* под воздействием КС (рисунок 1.4.6).

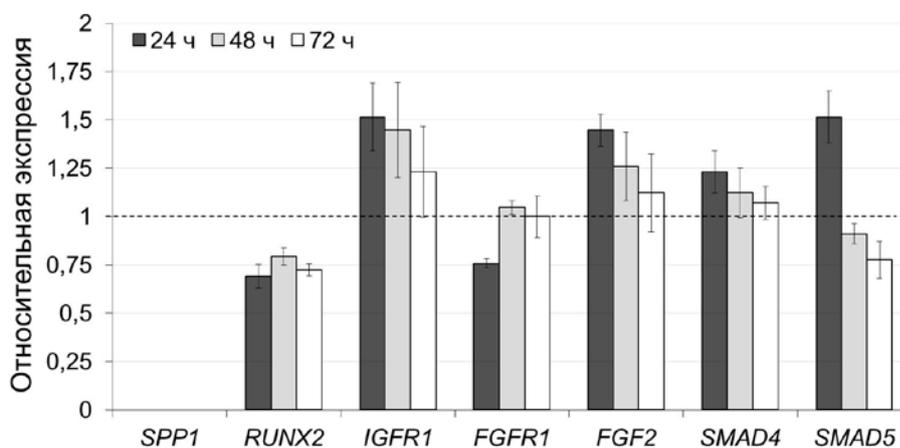


Рисунок 1.4.6 - Изменение профиля экспрессии генов *SPP1*, *RUNX2*, *IGFR1*, *FGFR1*, *FGF2*, *SMAD4*, *SMAD5* в клетках ARPE-19 под действием КС регенератов сетчаток тритонов в различные промежутки времени относительно соответствующего контроля (в отсутствии КС), принятого за единицу (*штриховая линия*) [7]

Как и РПЭ у низших позвоночных, РПЭ человека может быть репрограммирован в сторону нейрального фенотипа [20, 31], наряду с другими направлениями дифференцировки клеток. Однако для этого требуются дополнительные манипуляции, в то время, как у низших позвоночных трансдифференцировка РПЭ является естественным

процессом. У низших позвоночных трансдифференцировка происходит через стадию специфических мультипотентных клеток, сохраняющих некоторые свойства РПЭ. В процессе трансдифференцировки клетки РПЭ низших позвоночных демонстрируют признаки ЭМП – теряют пигментацию, в них снижается экспрессия маркеров РПЭ, увеличивается подвижность и пролиферация [29, 30]. У млекопитающих признаки ЭМП проявляются в клетках РПЭ как при различных патологиях глаз, так и при восстановлении РПЭ после воздействия лазера [22, 24]. Таким образом, наблюдаемые нами эффекты КС на клетки ARPE-19 могут свидетельствовать о начале ЭМП, который, однако, не имеет завершенного характера из-за однократного воздействия КС. По мере снижения концентрации КС клетки возвращаются к исходному состоянию. Одновременно с событиями ЭМП в культуре наблюдались признаки, характерные для нейральной и эпителиальной дифференцировок, что, вероятно, связано с выделением двух субпопуляций. Увеличение доли СК8-положительных клеток после воздействия КС на фоне общего снижения эпителиальных маркеров говорит о поддержании небольшого пула клеток ARPE-19 в исходном состоянии (рисунок 1.4.7).

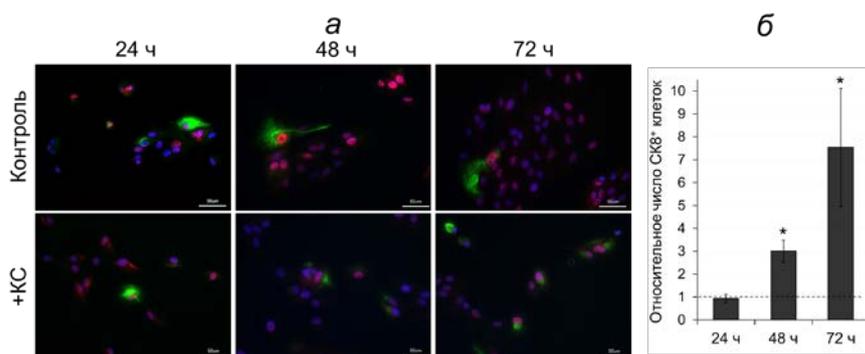


Рисунок 1.4.7 - Анализ изменения OTX2 и СК8 в клетках ARPE-19 через 24, 48 и 72 ч после воздействия КС [7]

*а* – двойное иммунофлуоресцентное окрашивание на OTX2 (красное свечение) и СК8 (зеленое свечение). Ядра окрашены DAPI (синее свечение). Об.: 40×. *б* – изменение количества СК8<sup>+</sup>-положительных клеток по отношению к контролю, принятому за единицу. Вертикальные отрезки – ошибки среднего, \* $p < 0.05$

В пользу попытки клеток выйти в нейральную дифференцировку свидетельствуют повышение уровня экспрессии гена *TUBB3*, усиление иммуноокрашивания на белок  $\beta$ III-тубулин на фоне понижения экспрессии *BMP2* и *BMP4* (рисунок 1.4.5). Ингибирование передачи сигналов BMP играет центральную роль во время нейральной индукции у млекопитающих [31]. Однако затем, ввиду краткосрочного воздействия КС, во временном промежутке 72—120 ч наблюдалось снижение транскрипции маркеров нейральной

дифференцировки (*TUBB3*, *NES*, *PAX6*) и увеличение транскрипции маркеров предшественников РПЭ (*OTX2*, *MITF*), что, вероятно, связано с возвратом клеток к исходной дифференцировке (рисунок 1.4.5). Изменений в иммуноокрашивании против нейрофиламентов не наблюдалось вероятно из-за короткого времени воздействия дифференцировочного фактора. О попытке изменения дифференцировки на раннем сроке после воздействия КС и возврате к исходной говорит и характер изменения размера клеток по сравнению с контролем. Максимальные различия в площади клеток наблюдались на сроке 24 ч, которые постепенно уменьшались с течением времени культивирования (рисунок 1.4.2 б, в).

Тот факт, что клетки ARPE-19 под действием КС подвергаются ЭМП и совершают попытку выйти в нейральную дифференцировку, предполагает, что фактор(ы), присутствующий(ие) в КС регенератов сетчаток тритонов, способны обеспечить триггер для инициирования этих процессов. Подобные факторы, по мнению [2], могут принадлежать ряду различных типов биомолекул, включая белки, липиды, нуклеиновые кислоты и полисахариды. Проведя ряд экспериментов по выявлению природы дедифференцировочного сигнала по отношению к кардиомиоцитам мышцы в экстракте регенерирующих конечностей тритона, исследователи [2] показали его белковую природу. Данные о составе секрета регенерирующей *in vitro* сетчатки глаза тритона пока отсутствуют. Однако нам известно, что на первой неделе органотипического культивирования *in vitro* изолированных тотальных сетчаток тритона в них по данным ПЦР происходит значительное возрастание экспрессии мРНК гена *Fgf2* [32]. FGF2 – член FGF-сигнального пути, функционирует на самых ранних стадиях эмбрионального развития [33], в том числе развития глаза, способствуя специализации нейроэпителлия в сетчатку [34]. Основными молекулами, стимулирующими трансдифференцировку РПЭ в клетки сетчатки при регенерации у тритона являются FGF2 и IGF-1. Самостоятельно IGF-1 не способен вызвать изменения в РПЭ, скорее всего он участвует в повышении эффективности передачи сигнала FGF2 [35]. В нашем исследовании мы наблюдали увеличение уровней экспрессии мРНК *IGF1* и *FGF2* в клетках ARPE-19 под действием КС (рисунок 1.4.6), что свидетельствует о консервативности механизмов трансдифференцировки РПЭ у позвоночных и возможном присутствии IGF-1 и FGF2 в КС.

Важным участником контроля пролиферации и дифференцировки клеток является ТФ KLF4, его значение показано при спецификации эпителиальных клеток и созревании нейронов [36, 37]. В нашем исследовании ингибирование экспрессии гена *KLF4* положительно коррелировало со снижением экспрессии генов-маркеров

дифференцировки РПЭ (*OTX2*, *BMP4*, *KRT18*) через 24-72 ч после воздействия КС (рисунок 1.4.5). Кроме того, на этом же сроке мы наблюдали снижение пролиферативной активности клеток ARPE-19 по сравнению с контролем (рисунок 1.4.8).

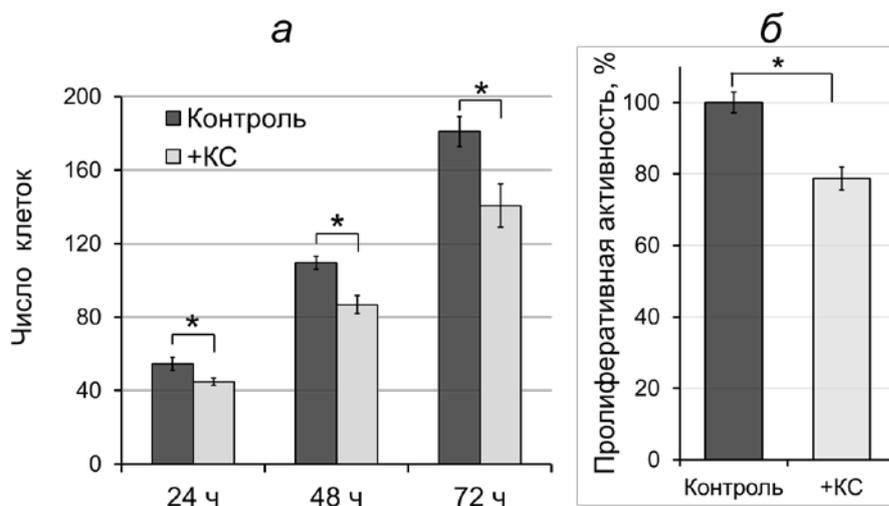


Рисунок 1.4.8 - Среднее число клеток ARPE-19

(а) - на микрофотографиях независимых полей зрения (CellsCount11f) в разные промежутки времени после добавления в среду КС (серые столбики) по сравнению с контролем (черные столбики) и их ошибки (вертикальные отрезки), а также (б) - пролиферативная активность клеток (МТТ-тест) в % через 24 ч после добавления в среду КС (серый столбик) по сравнению с контролем (черный столбик), \* $p < 0.01$ . [7]

Снижение пролиферации совпадало со снижением уровня экспрессии *KLF4*. В наших предыдущих исследованиях показана связь между повышением экспрессии *KLF4* и усилением пролиферации после воздействия FGF2 как в иммортализованной [15], так и в неиммортализованных культурах клеток РПЭ [13]. Усиление пролиферации клеток ARPE-19 и повышение уровня экспрессии *KLF4* наблюдалось через 24 ч после воздействия FGF2, в то время как в первичных клетках РПЭ в первые 48 ч пролиферативная активность была снижена при неизменном уровне *KLF4*, а повышение уровня пролиферации и экспрессии *KLF4* происходило только через 72 ч после воздействия FGF2. Такое различие, вероятно, связано с разной чувствительностью линейных и первичных клеток на одинаковую концентрацию фактора [38]. По всей видимости, в зависимости от контекста ТФ *KLF4* может регулировать клеточный цикл либо негативно [36,39], либо позитивно [40]. Ещё один белок, контекст-зависимо влияющий на пролиферативный ответ и дифференцировку – *BMP2* [41,42]. Если сопоставлять результаты падения пролиферативной активности клеток ARPE-19 человека и данные кПЦР, показавшие снижение уровня экспрессии мРНК *BMP2* в интервале 24-72 ч

(рисунок 1.4.5), то можно отметить их прямую корреляцию. Отсутствие пролиферативного эффекта, отмеченное ранее при использовании КС и экстрактов из регенерирующих конечностей тритона в работах [43, 44], и подтвержденное в нашем исследовании, может быть связано с тем, что для активации пролиферации требуется больше времени, и работа дополнительных факторов.

В качестве основного фактора, влияющего на клетки РПЭ человека, мы предполагаем участие FGF2. Однако в КС могут присутствовать и другие активные регуляторные факторы, кроме того, концентрация FGF2 может быть недостаточна для того, чтобы стимулировать пролиферативный ответ.

#### 1.4.4 Заключение

Данная работа является первой в попытке тестировать действие КС, полученных из регенерирующих сетчаток тритона, на клетки ARPE-19 человека с целью обнаружить изменения дифференцировки этих клеток, в частности, в сторону нейронального пути.

Проведенный впервые эксперимент на клеточной модели ретинального пигментного эпителия глаза человека *in vitro* дал первые интересные результаты, поставив при этом много новых вопросов. Известно, что у амфибий факторы, включенные в «управление» процессами регенерации, строго регулируются для недопущения «неконтролируемых» дестабилизации клеточной дифференцировки и проявления пластичности клеточного фенотипа. Неизвестно, каким образом те же факторы поведут себя в отношении тканей млекопитающих. Неизвестно, в какие взаимоотношения вступят факторы, продуцируемые тканями эволюционно далеких видов с собственным сигнальным окружением клеток млекопитающих *in vivo*, будут ли они обладать специфичностью действия. Данные о возможности с помощью КС уже в первые сутки культивирования индукции экспрессии пронеуральных маркеров, требуют дальнейшего изучения, как и определение активных, действующих в этом направлении компонентов «секретомы». Полученные нами предварительные результаты дают основания для продолжения исследований механизмов, блокирующих последующую дифференцировку в ретинальные клетки, и способствующих активации дифференцировки в фибробластоподобные клетки. Продолжение начатых исследований с применением органотипического культивирования регенерирующих тканей амфибий для использования их кондиционированных сред может помочь ответить вопросы о сходстве и различиях в механизмах, лежащие в основе различных регенерационных ответов в нейральных тканях глаза у низших и высших позвоночных.

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП по биологии развития ИБР РАН.

#### 1.4.5 Список использованных источников

1. Chen W.C., Wang Z., Missinato M.A. Decellularized zebrafish cardiac extracellular matrix induces mammalian heart regeneration. – *Sci Adv.* – 2016. 2:e1600844. doi:10.1126/sciadv.1600844.
2. McGann C.J., Odelberg S.J., Keating M.T. Mammalian myotube dedifferentiation induced by newt regeneration extract // *Proc Natl Acad Sci.* – 2001. – Vol. 20. 98 (24). – P. 13699-704. doi: 10.1073/pnas.221297398.
3. Kim H.-J., Archer E., Escobedo N., et al. Inhibition of Mammalian Muscle Differentiation by Regeneration Blastema Extract of *Sternopygus macrurus* // *Dev Dyn.* – 2008. – Vol. 237 (10). – P. 2830–2843. doi: 10.1002/dvdy.21702.
4. Ohgo Sh., Sakamoto T., Nakajima W., Matsunaga S., Wada N. Visualization of extracellular vesicles in the regenerating caudal fin blastema of zebrafish using in vivo electroporation // *BiochemBiophys Res Commun.* – 2020. – Vol. 533. – I.4. – P. 1371-1377. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.10.024>
5. Новикова Ю.П., Алейникова К.С., Краснов М.С., Поплинская В.А., Григорян Э.Н. Сетчатка глаза взрослых тритона и крысы в условиях органотипического культивирования *in vitro* // *Известия РАН. Сер. биол.* - 2010. - № 4. - С. 389–402. (Novikova Yu.P., Aleynikova K.S., Krasnov M.S., Poplinskaya V.A., Grygoryan E.N. In vitro organotypic cultivation of adult newt and rat retinas // *Biology Bulletin.* - 2010. - Vol. 37. - № 4. - P. 327–338). <https://doi.org/10.1134/S1062359010040011>
6. Новикова Ю.П., Поплинская В.А., Григорян Э.Н. Органотипическое культивирование как способ изучения восстановительных возможностей сетчатки глаза позвоночных животных и человека. // *Онтогенез.* - 2020. - Т. 51. № 1. - С. 35-50. (Novikova Y.P., Poplinskaya V.A, Grigoryan E.N. Organotypic Culturing as a Way to Study Recovery Opportunities of the Eye Retina in Vertebrates and Humans. // *Russian Journal of Developmental Biology (Ontogenez).* - 2020. - Vol. 51. - № 1. - P. 31–44. DOI: 10.1134/S1062360420010063
7. Shafei E.V., Rzhanova L.A., Novikova Yu.P., Kurinov A.M., Grigoryan E.N., Aleksandrova M.A., Kuznetsova A.V. Response of human pigment epithelial cells to the effect of the media conditioned of newt retinal regenerates // *Cell and Tissue Biology (Цитология).* - 2020. - Т.62. - № 9. DOI: 10.31857/S0041377120090060.
8. Sparrow J.R., Hicks D., Hamel C.P. The retinal pigment epithelium in health and disease // *Curr. Mol. Med.* - 2010. - Vol. 10. - N 9. - P. 802–823.
9. Eguchi G. Cellular and molecular background of wolffian lens regeneration // *Cell Differ. Dev.* - 1988. - Vol. 25 Suppl. - P. 147–158.

10. Gulati A.K., Reyer R.W. Role of neural retina and vitreous body during lens regeneration: Transplantation and autoradiography // *J. Exp. Zool.* - 1980. - N 1. - Vol. 214. - P. 109–118.
11. Rio-Tsonis K. Del, Jung J.C., Chiu I.-M., Tsonis P.A. Conservation of fibroblast growth factor function in lens regeneration // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 1997. - N 25. - Vol. 94. - P. 13701–13706.
12. Walsh N., Valter K., Stone J. Cellular and subcellular patterns of expression of bFGF and CNTF in the normal and light stressed adult rat retina // *Exp. Eye Res.* - 2001. - N 5. - Vol. 72. - P. 495–501.
13. Yafai Y., Iandiev I., Lange J., Yang X.M., Wiedemann P., Bringmann A., Eichler W. Basic fibroblast growth factor contributes to a shift in the angioregulatory activity of retinal glial (müller) cells // *PLoS One.* - 2013. - N 7. - Vol. 8. - P. e68773.
14. Kuznetsova A. V., Kurinov A.M., Rzhanova L.A., Aleksandrova M.A. Mechanisms of dedifferentiation of adult human retinal pigment epithelial cells in vitro. Morphological and molecular genetic analysis // *Cell tissue biol.* - 2019. - N 2. - Vol. 13. - P. 107–119.
15. Kuznetsova A. V., Rzhanova L.A., Kurinov A.M., Aleksandrova M.A. Effect of basic fibroblast growth factor on signaling pathways in adult human retinal pigment epithelial cells // *Cell tissue biol.* - 2019. - N 4. - Vol. 13. - P. 292–304.
16. Shafei E. V., Kurinov A.M., Kuznetsova A. V., Aleksandrova M.A. Reprogramming of human retinal pigment epithelial cells under the effect of bFGF in vitro // *Bull. Exp. Biol. Med.* - 2017. - N 4. - Vol. 163. - P. 574–582.
17. Mueller R.L. Genome biology and the evolution of cell-size diversity // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* - 2015. - N 11. - Vol. 7.
18. Katoh M., Katoh M. Cross-talk of WNT and FGF signaling pathways at GSK3beta to regulate beta-catenin and SNAIL signaling cascades // *Cancer Biol. Ther.* - 2006. - Vol. 5. - N 9. - P. 1059–1064.
19. Nelson W.J., Nusse R. Convergence of Wnt,  $\beta$ -Catenin, and Cadherin pathways // *Science.* - 2004. - Vol. 303. - N 5663. - P. 1483–1487.
20. Wordinger R.J., Clark A.F. Bone morphogenetic proteins and their receptors in the eye // *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 2007. N 8. Vol. 232. P. 979–992.
21. Cadigan K.M. TCFs and Wnt/ $\beta$ -catenin Signaling. More than One Way to Throw the Switch / K.M. Cadigan, 1- Ed., Elsevier Inc. - 2012. – P. 1–34.

22. Bosada F.M., Devasthali V., Jones K.A., Stankunas K. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling enables developmental transitions during valvulogenesis // *Dev.* - 2016. - Vol. 143. - N 6. - P. 1041–1054.
23. Han J.W., Lyu J., Park Y.J., Jang S.Y., Park T.K. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling mediates regeneration of retinal pigment epithelium after laser photocoagulation in mouse eye // *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* - 2015. - Vol. 56. - N 13. - P. 8314–8324.
24. Miyazono K. Transforming growth factor- $\beta$  signaling in epithelial-mesenchymal transition and progression of cancer // *Proc. Japan Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* - 2009. - Vol. 85. - N 8. - P. 314–323.
25. Che D., Zhou T., Lan Y., Xie J., Gong H., Li C., Feng J., Hong H., Qi W., Ma C., Wu Q., Yang X., Gao G. High glucose-induced epithelial-mesenchymal transition contributes to the upregulation of fibrogenic factors in retinal pigment epithelial cells // *Int. J. Mol. Med.* - 2016. - Vol. 38. - N 6. - P. 1815–1822.
26. Feist R.M., King J.L., Morris R., Witherspoon C.D., Guidry C. Myofibroblast and extracellular matrix origins in proliferative vitreoretinopathy // *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* - 2014. - Vol. 252. - N 2. - P. 347–357.
27. Lee S.C., Kwon O.W., Seong G.J., Kim S.H., Ahn J.E., Kay E.D.P. Epitheliomesenchymal transdifferentiation of cultured RPE cells // *Ophthalmic Res.* - 2001. - Vol. 33. - N 2. - P. 80–86.
28. Pieper F.R., Klundert F.A. Van de, Raats J.M., Henderik J.B., Schaart G., Ra, aekers F.C., Bloemendal H. Regulation of vimentin expression in cultured epithelial cells // *Eur. J. Biochem.* - 1992. - Vol. 210. - N 2. - P. 509–519.
29. Witzgall R., Brown D., Schwarz C., Bonventre J. V. Localization of proliferating cell nuclear antigen, vimentin, c-Fos, and clusterin in the postischemic kidney. Evidence for a heterogenous genetic response among nephron segments, and a large pool of mitotically active and dedifferentiated cells // *J. Clin. Invest.* - 1994. - Vol. 93. - N 5. - P. 2175–2188.
30. Grigoryan E.N., Markitantova Y. V. Cellular and molecular preconditions for retinal pigment epithelium (RPE) natural reprogramming during retinal regeneration in Urodela // *Biomedicines.* - 2016. – Vol. 4. - N 4. - P. 28.
31. Yasumuro H., Sakurai K., Toyama F., Maruo F., Chiba C. Implications of a multi-step trigger of retinal regeneration in the adult newt // 2017. - Vol.5. - N 2. - P. 25.
32. Di-Gregorio A., Sancho M., Stuckey D.W., Crompton L.A., Godwin J., Mishina Y., Rodriguez T.A. BMP signalling inhibits premature neural differentiation in the mouse embryo // 2007. - Vol. 134. - N 18. - P. 3359–3369.

33. Markitantova Y.V., Novikova Y.P., Poplinskaya V.A., Grigoryan E.N. Expression of FGF2 and Nucleostemin in models of retinal regeneration in the newt under conditions of 3D organotypic culture // *EC Ophthalmol.* - 2020. - Vol. 12. - P. 1–9.
34. Dorey K., Amaya E. FGF signalling: diverse roles during early vertebrate embryogenesis - 2013. - Vol. 137. - N 22. - P. 3731–3742.
35. Bharti K., Nguyen M.-T.T., Skuntz S., Bertuzzi S., Arnheiter H. The other pigment cell: specification and development of the pigmented epithelium of the vertebrate eye // *Pigment Cell Res.* - 2006. - Vol. 19. - N 5. - P. 380–394.
36. Mitsuda S., Yoshii C., Ikegami Y., Araki M. Tissue interaction between the retinal pigment epithelium and the choroid triggers retinal regeneration of the newt *Cynops pyrrhogaster* // *Dev. Biol.* - 2005. - Vol. 280. - N 1. - P. 122–132.
37. Li J., Zheng H., Yu F., Yu T., Liu C., Huang S., Wang T.C., Ai W. Deficiency of the Kruppel-like factor KLF4 correlates with increased cell proliferation and enhanced skin tumorigenesis // *Carcinogenesis.* - 2012. - Vol. 33. - N 6. - P. 1239–1246.
38. Qin S., Zhang C.-L. Role of Kruppel-like factor 4 in neurogenesis and radial neuronal migration in the developing cerebral cortex // *Mol. Cell. Biol.* - 2012. - Vol. 32. - N 21. - P. 4297–4305.
39. Alge C.S., Hauck S.M., Priglinger S.G., Kampik A., Ueffing M. Differential protein profiling of primary versus immortalized human RPE cells identifies expression patterns associated with cytoskeletal remodeling and cell survival // *J. Proteome Res.* - 2006. - Vol.5. - N 4. - P. 862–878.
40. Li J., Zheng H., Yu F., Yu T., Liu C., Huang S., Wang T.C., Ai W. Deficiency of the Kruppel-like factor KLF4 correlates with increased cell proliferation and enhanced skin tumorigenesis // *Carcinogenesis.* - 2012. - Vol. 33. - N 6. - P. 1239–1246.
41. Tien Y.T., Chang M.H., Chu P.Y., Lin C.S., Liu C.H., Liao A.T. Downregulation of the KLF4 transcription factor inhibits the proliferation and migration of canine mammary tumor cells // *Vet. J.* - 2015. - Vol. 205. - N 2. - P. 244–253.
42. Shu B., Zhang M., Xie R., Wang M., Jin H., Hou W., Tang D., Harris S.E., Mishina Y., O’Keefe R.J., Hilton M.J., Wang Y., Chen D. BMP2, but not BMP4, is crucial for chondrocyte proliferation and maturation during endochondral bone development // *J. Cell Sci.* - 2011. - Vol.124. - N 20. - P. 3428–3440.
43. Wang M.H., Zhou X.M., Zhang M.Y., Shi L., Xiao R.W., Zeng L.S., Yang X.Z., Zheng X.F.S., Wang H.Y., Mai S.J. BMP2 promotes proliferation and invasion of nasopharyngeal carcinoma cells via mTORC1 pathway // *Aging (Albany. NY).* -2017. -Vol.9. - N 4. - P. 1326–1340.

44. Kawesa S., Vanstone J., Tsilfidis C. A differential response to newt regeneration extract by C2C12 and primary mammalian muscle cells // *Skelet. Muscle.* - 2015. - Vol.5. P. - N 1. – P. 19.

45. Middleton R.C., Rogers R.G., Couto G. De, Tseliou E., Luther K., Holewinski R., Soetkamp D., Eyk J.E. Van, Antes T.J., Marbán E. Newt cells secrete extracellular vesicles with therapeutic bioactivity in mammalian cardiomyocytes // *J. Extracell. Vesicles.* - 2018. -Vol.7. - N 1. - P. 1456888.

## **Подраздел 1.5 Исследование морфогенеза и дифференцировки тканей глаза человека в раннем пренатальном развитии**

### **1.5.1 Введение**

В 2020 г. было продолжено исследование развития глаза в раннем пренатальном развитии человека. Важную роль в раннем развитии глаза играет стекловидное тело. Оно определяет правильную дифференцировку и стабилизацию окружающих его тканей – сетчатки и хрусталика: создает необходимое внутриглазное давление развивающемуся глазу, является проводящей системой сигнальных молекул между сетчаткой и хрусталиком. Присутствие полиненасыщенных жирных кислот в плазматических мембранах клеток сетчатки и хрусталика, а также близость кровеносных сосудов, создают опасность перекисного окисления липидов.

Ранее в тканях глаза (стекловидном теле, сетчатке и хрусталике) человека в пренатальном развитии нами было показано присутствие лютеина [7], альбумина и альфа-фетопротейна [37], молекул, обладающих свойствами антиоксидантов. Стекловидное тело продолжает быть объектом исследования нами молекул, обладающих антиоксидантными свойствами. В 2019 -2020 годах были получены данные о присутствии в стекловидном теле билирубина, обладающего антиоксидантными свойствами. Полученные данные были систематизированы и оформлены в статью. Билирубин является одним из важных эндогенных антиоксидантов сыворотки крови. К биологическим функциям билирубина относятся антиоксидантные, противовоспалительные, иммуномодуляторные, цитопротективные и нейропротективные свойства [1-3].

Однако высокий уровень билирубина приводит к серьёзному заболеванию - желтухе. При желтухе было показано присутствие билирубина в тканях глаза, в том числе в стекловидном теле, хотя в норме у взрослого человека билирубин в стекловидном теле не обнаруживается [4].

Желтуха часто встречается у доношенных и недоношенных новорождённых, когда высокий уровень билирубина может приводить к повреждению мозга и неблагоприятным неврологическим исходам [5]. При желтухе ткани глаза приобретают желтизну в результате отложения в них билирубина. Так, у мертворождённых или недоношенных младенцев с желтухой или гипербилирубинемией билирубин был найден в стекловидном теле. Эти данные были описаны для III триместра внутриутробного развития [6].

Ранее при исследовании стекловидного тела в пренатальном развитии человека мы обнаружили, что с 14-й по 22-ю неделю (триместр II) оно имеет желтизну. Мы предположили, что жёлтый цвет может быть обусловлен присутствием лютеина [7], однако желтизна стекловидного тела также может быть вызвана билирубином, который

имеет сходный с лютеином спектр поглощения. Мы не обнаружили данных литературы о присутствии билирубина в стекловидном теле плодов человека во II триместре беременности.

Толл-подобные рецепторы (TLRs) – трансмембранные белковые молекулы I типа. Они распознают консервативные структуры микроорганизмов (бактерий, вирусов, грибов) и являются сигнальными рецепторами врожденного иммунитета [8-10]. TLRs экспрессируются на гемопоэтических клетках, клетках лимфоидного и миелоидного ряда (моноцитах/макрофагах, нейтрофилах, дендритных, тучных клетках, лимфоцитах). Экспрессия TLRs присутствует в эндотелии сосудов, клетках эпителиального и мезенхимального происхождения. В зависимости от типа рецептора они локализуются либо на поверхности, либо в цитоплазме клеток [11-17]. Так, рецепторы TLR2, TLR4 располагаются на клеточной мембране и при инфицировании распознают бактериальные лиганды. Такие рецепторы как TLR7 и TLR9 экспрессируются в цитоплазматических органеллах, преимущественно в эндосомах, лизосомах, эндолизосомах и эндоплазматическом ретикулуме. TLR7 распознают собственную и вирусную одноцепочную РНК, а TLR9 является детектором метилированных участков CpG фрагментов ДНК бактериальной природы [18, 19].

Однако функции TLRs не ограничиваются участием в иммунном ответе организма при попадании инфекционного агента. Показана важная роль TLRs в асептическом воспалении, при травматическом повреждении тканей и процессах репарации [20]. Появляется все больше сведений, где показана экспрессия TLRs в различных органах и тканях вне инфицирования, как во взрослом организме, так и в процессе его развития. Это подтверждает, что TLRs могут функционировать не только как защитный механизм организма от инфекций [21], но и участвовать в процессах эмбрионального развития органов и тканей, где им отводится роль регуляторов фундаментальных клеточных процессов, таких как миграция, пролиферация, дифференцировка и апоптоз [21-25].

Рецептор TLR4 является уникальным среди других TLRs тем, что он может вовлекать два сигнальных пути: MyD88 посредством адаптерной молекулы TIRAP и MyD88-независимый путь посредством адаптерной молекулы TRIF, приводящих к активации фактора NF-κB и запуску синтеза провоспалительных цитокинов. Помимо активации воспаления, TLRs также регулируют апоптоз, пролиферацию и выживание клеток, что свидетельствует о свойствах иммунных клеток и их участии в интеграции воспалительных реакций и в процессах восстановления тканей. В этой связи важными ключевыми сигнальными молекулами TLR являются митогенактивируемые протеинкиназы (MAPK) [23, 25, 26]

Имеются данные, свидетельствующие о том, что TLRs и их адаптерные белки связаны с различными аспектами нейрогенеза и синаптогенеза в развитии мозга позвоночных и с пластичностью нервных клеток [27-32]. В предшествующем исследовании с применением метода иммунохимии нами впервые была показана динамика локализации TLR2 и TLR4 в сетчатке в пренатальном развитии человека, указывающая на то, что эти рецепторы играют важную роль в нормальном развитии сетчатки: нейрогенезе, аксоногенезе и формировании сосудов [33]. Сведений об экспрессии генов Толл-подобных рецепторов в тканях глаза человека в период пренатального развития к настоящему времени нами найдено не было.

Цель данной работы - 1) исследовать стекловидное тело на присутствие в нем билирубина в раннем пренатальном развитии человека (в отсутствии признаков развития желтухи), 2) проанализировать экспрессию мРНК генов *TLR2*, *TLR4*, *TLR7* и *TLR9* в сетчатке, хрусталике и стекловидном теле в процессе нормального развития глаза плодов человека.

### 1.5.2 Материалы и методы

Объектом исследования служил материал глаз, полученный на аутопсии при вскрытии мёртвых плодов, нежизнеспособных после преждевременных родов на 17-31-й неделе гестации (из НИИ Акушерства, гинекологии, перинатологии им. Кулакова). Энуклеированные глаза очищали от окружающих тканей и отмывали в нескольких сменах 0.9% NaCl. Под бинокулярной лупой МБС-9 отрезали по лимбу роговицу и вынимали стекловидное тело вместе с хрусталиком, после чего удаляли хрусталик и очищали стекловидное тело от остатков сетчатки. Полученные образцы стекловидного тела центрифугировали при 12 500 x g /мин, 4°C, 30 мин (центрифуга Eppendorf 5417R). Определение концентрации билирубина в супернатантах проводили на автоматическом биохимическом анализаторе ВА-400 (BioSystems S.A.), с применением набора реагентов для работы *in vitro* (21510 Bilirubin total BioSystems S.A.). В виду малого количества проб ( $n=9$ ), в работе представлены показатели измерений концентрации билирубина для каждого образца.

Экспрессию генов TLRs исследовали в стекловидном теле, сетчатке и хрусталике от 3-х плодов 13, 17 и 19 нед гестации. Стекловидное тело центрифугировали (Eppendorf centrifuge 5417R) при 12500 об/мин, 4°C в течение 30 мин. После центрифугирования надосадочную жидкость удаляли. Образцы стекловидного тела, сетчатку и хрусталик использовали для исследования уровня экспрессии мРНК генов TLRs: *TLR2*, *TLR4*, *TLR7*, *TLR9* методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени (реактивы и амплификаторы

производства ООО «ДНК-Технология», Россия). Выделение тотальной РНК проводили с использованием набора «Проба-НК». Принцип метода основан на лизисе клеток гуанидинтиоцианатом (лизирующий раствор из набора «Проба-НК»), осаждении РНК изопропанолом в присутствии соосадителя, последующих отмывках и элюции РНК. В реакции использовали олигонуклеотиды, высокоспецифичные в отношении транскриптов генов и не отжигающиеся на матрице геномной ДНК. Поэтому обработку образцов ДНК-азой не проводили. Реакцию обратной транскрипции ставили при температуре 40°C в течение 30 мин, с последующей инактивацией обратной транскриптазы в течение 5 мин при температуре 95°C. В реакции обратной транскрипции использовалась смесь специфических олигонуклеотидов всех исследуемых генов. Амплификация осуществлялась в режиме реального времени с измерением уровня флуоресценции по каналу FAM на каждом цикле при температуре отжига праймеров 64°C. Реализацию «горячего старта» обеспечивали использованием Taq-полимеразы, активность которой блокирована антителами и восстанавливается при прогреве. Реакцию проводили в двух повторностях для каждой точки. Уровень экспрессии мРНК измеряли в относительных единицах, нормировку уровня экспрессии мРНК исследуемых генов проводили методом сравнения пороговых циклов (метод  $\Delta\Delta C_q$ ) относительно референсных генов *B2M*, *TBP*, *GUSB*, *HPRT1* и образца с минимальным уровнем экспрессии исследуемого гена.

### 1.5.3 Результаты и обсуждение

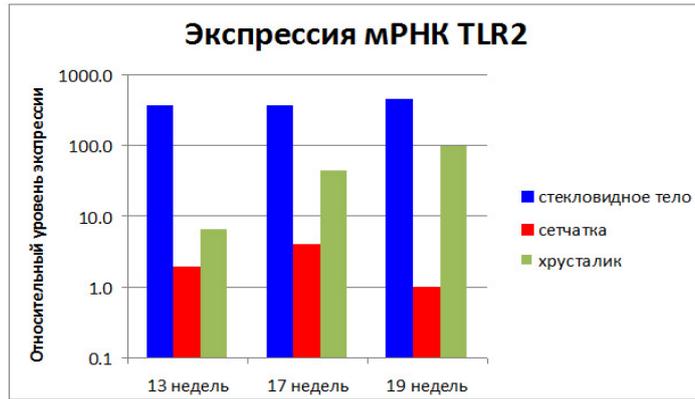
Присутствие билирубина в стекловидном теле было обнаружено во всех образцах, полученных на разных стадиях внутриутробного развития с 17-й по 31-ю неделю. На более ранних стадиях (с 17-й по 19-ю неделю гестации;  $n=3$ ) концентрация билирубина составила 9.1, 6.8 и 10.3 мкмоль/л (в среднем 8.67 мкмоль/л). С 20-й по 31-ю неделю ( $n=6$ ) концентрация билирубина снижалась — 0.3-3.0 мкмоль/л (в среднем 1.37 мкмоль/л). Таким образом, средняя концентрация билирубина с 17-й по 19-ю неделю была в 6.3 раза выше, чем с 20-й по 31-ю неделю гестации [34]. Согласно данным [35], концентрация билирубина в сыворотке крови у плодов человека с 20-й по 38-ю неделю составляет в среднем  $1.4 \pm 0.3$  мг/100 мл, т.е. 23.9 мкмоль/л. Следовательно, средняя концентрация билирубина в стекловидном теле с 20-й по 31-ю неделю приблизительно в 17.4 раза меньше, чем в сыворотке крови.

Свободный билирубин токсичен, поэтому в сыворотке крови плода человека он циркулирует в связанном с альбумином и альфафетопротеем (АФП) состоянии [36]. В стекловидном теле, где ранее нами было показано присутствие альбумина и АФП [37], билирубин, вероятно, связан с этими молекулами. Одним из источников поступления билирубина в стекловидное тело могут быть гиалоидные сосуды. Из стекловидного тела

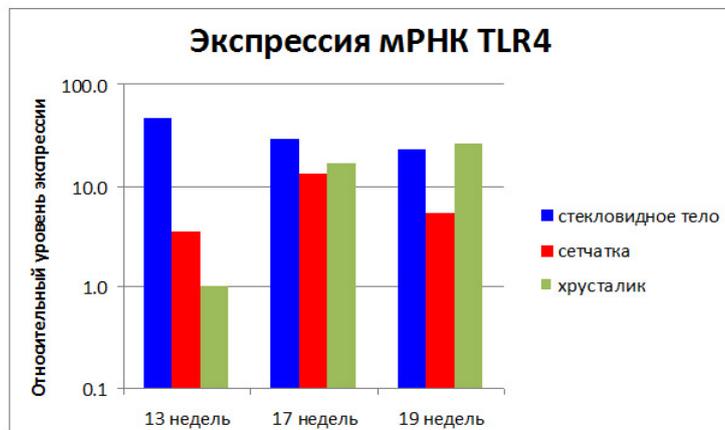
билирубин путём диффузии может поступать в сетчатку и хрусталик. Билирубин и обнаруженные нами ранее в стекловидном теле альбумин, АФП и лютеин [6, 37], также обладающие антиоксидантными свойствами, вносят вклад в антиоксидантный статус стекловидного тела глаза в раннем пренатальном развитии человека. Обнаруженная нами высокая концентрация билирубина на 17-19 нед пренатального развития, вероятно, необходима для продолжающихся активных процессов роста и развития сетчатки: дифференцировки нейронов, роста аксонов, формирования синаптических связей, прорастания ретинальных сосудов. В хрусталике в этот период продолжают дифференцироваться новые волокна. Продолжается формирование вторичного стекловидного тела и регрессия гиалоидных сосудов. Все эти процессы требуют антиоксидантной защиты, которую отчасти может обеспечивать сравнительно высокая концентрация билирубина в стекловидном теле. Вероятно, билирубин, как эндогенный антиоксидант, участвует в предохранении развивающихся сетчатки и хрусталика от процессов перекисного окисления липидов, которыми богаты нейроны сетчатки и волокна хрусталика. На 20-й неделе процессы роста и развития в тканях глаза близки к завершению: все слои сетчатки практически сформированы и по морфологической картине она соответствует взрослой сетчатке. При этом в стекловидном теле резко снижается концентрация билирубина. Исходя из этого, можно сделать вывод о том, что содержание билирубина в стекловидном теле находится под регулирующим влиянием окружающих его тканей. Роль билирубина, вероятно, заключается в антиоксидантной защите развивающихся тканей глаза.

В настоящей работе нами проведен анализ экспрессии мРНК генов *TLR2*, *TLR4*, *TLR7*, *TLR9* в сетчатке, хрусталике и стекловидном теле глаза плодов человека на 13, 17 и 19 нед пренатального развития [38]. Во всех образцах была обнаружена экспрессия мРНК исследуемых генов. Относительные уровни экспрессии мРНК этих генов графически отражены на рисунке 1.5.1. Относительный уровень экспрессии мРНК гена *TLR2* в стекловидном теле на всех сроках исследования практически одинаков и имеет более высокий уровень по сравнению с хрусталиком и сетчаткой. В хрусталике уровень экспрессии мРНК гена *TLR2* ниже, чем в стекловидном теле, но при этом отмечается тенденция увеличения экспрессии этого гена с 13 по 19 недели. В сетчатке уровень экспрессии мРНК гена *TLR2* меньше, чем в стекловидном теле и хрусталиках на всех сроках исследования (рисунок 1.5.1 а).

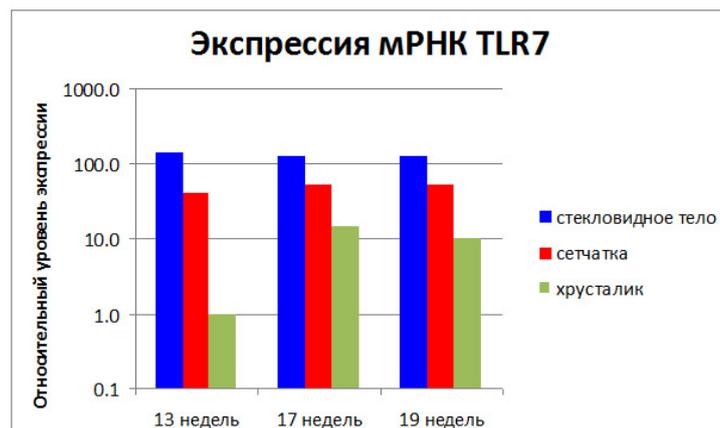
(а)



(б)



(в)



(г)

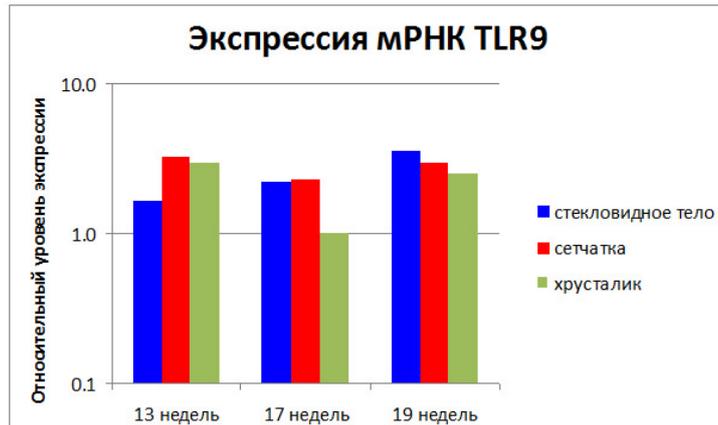


Рисунок 1.5.1 - Относительные уровни экспрессии мРНК генов Толл-подобных рецепторов (TLRs) в тканях глаза в пренатальном развитии человека а – TLR 2, б – TLR 4, в – TLR 7, г – TLR 9 [38].

Уровень экспрессии мРНК гена *TLR4* в стекловидном теле на 13 нед выше по сравнению с сетчаткой и хрусталиком. На 17 и 19 нед наблюдается тенденция снижения экспрессии мРНК гена *TLR4* в стекловидном теле. В сетчатке на 17 нед экспрессия мРНК гена *TLR4* выше, чем на 13 и 19 неделях. В хрусталике отмечена тенденция увеличения экспрессии мРНК гена *TLR4* с возрастом плода (рисунок 1.5.1 б).

Уровень экспрессии мРНК гена *TLR7* в стекловидном теле на всех сроках исследования практически одинаков, но выше по сравнению с хрусталиком и сетчаткой. В сетчатке экспрессия этого гена также примерно одинакова на исследованных стадиях и при этом выше, чем в хрусталике. В хрусталике отмечена тенденция к увеличению экспрессии этого гена на 17 и 19 неделях (рисунок 1.5.1 в). Уровень экспрессии мРНК гена *TLR9* в стекловидном теле несколько возрастает с 13 по 19 нед. В сетчатке наблюдается незначительное снижение экспрессии мРНК гена *TLR9* на 17 нед по сравнению с 13 и 19 нед. В хрусталике также отмечается снижение уровня экспрессии этого гена на 17 нед по сравнению с 13 и 19 нед (рисунок 1.5.1 г). Следует отметить, что относительный уровень экспрессии мРНК гена *TLR9* во всех анализируемых тканях значительно ниже, чем экспрессия мРНК генов *TLR-2*, *4* и *7*. В настоящей работе показано, что трансмембранные рецепторы *TLR2*, *TLR4* и внутриклеточные рецепторы *TLR7* и *TLR9* экспрессируются во всех исследованных нами тканях глаза плодов человека, способствуя становлению иммунитета, что важно в случае возможного инфицирования глаза [8, 9].

Как известно, экспрессия генов этих рецепторов играет важную роль в развитии млекопитающих, регулируя клеточные процессы в развивающихся органах и тканях [32], включая и глазное яблоко. Ранее методом иммуногистохимии нами была продемонстрирована динамика локализации TLR2 и TLR4 при развитии сетчатки глаза плодов человека [33], и это согласуется с экспрессией мРНК этих генов в сетчатке, показанной в настоящей работе. Иммунохимически TLR2, TLR4 также были выявлены в эндотелии сосудов развивающейся сетчатки.

Хрусталик является производным покровной эктодермы, которая утолщается и дает начало хрусталиковой плакоде. В результате инвагинации хрусталиковой плакоды и смыкания ее краев образуется хрусталиковый пузырек. Клетки передней части хрусталикового пузырька дают начало переднему эпителию хрусталика, а клетки задней части – волокнам хрусталика, которые формируют ядро и кортикальные слои хрусталика. Рост хрусталика связан с постоянным образованием новых волокон за счет пролиферации малодифференцированных клеток эпителия в герминативной зоне. После деления клетки смещаются к экватору, где происходит их удлинение и начало дифференцировки волокон. В процессе образования новых волокон происходит увеличение объема и плотности ядра хрусталика, к которому продолжают добавляться все новые и новые кортикальные слои. Одним из признаков дифференцировки волокон хрусталика (помимо синтеза кристаллинов) является постепенное исчезновение в них всех мембрано-окруженных органелл и ядра (незавершенный апоптоз) [39, 40]. В процессах пролиферации, дифференцировки и незавершенного апоптоза в хрусталике участвует MAPK сигнальный путь, при этом TLRs являются рецепторами, индуцирующими активацию митоген-активируемых протеинкиназ ERK1 и ERK2 [41]. Показанная в настоящем исследовании экспрессия мРНК генов *TLR 2, 4, 7* в хрусталике, имеющая тенденцию увеличения с возрастом плода, а также экспрессия мРНК гена *TLR9*, указывают на участие этих генов в контроле пролиферации, дифференцировки и незавершенного апоптоза при формировании хрусталиковых волокон [38].

В эмбриональном развитии в стекловидном теле транзиторно присутствуют гиалоидные сосуды, которые подвергаются регрессии по механизму апоптоза. Помимо гиалоидных сосудов постоянными клетками стекловидного тела являются гиалоциты, которым свойственна функция макрофагов, а также способность синтезировать гиалуроновую кислоту и коллаген II типа [42-44]. Исходя из данных литературы, на сроках проведенного нами исследования гиалоидные сосуды стекловидного тела начинают редуцироваться на 13 неделе, и этот процесс продолжается на стадиях 17 и 19 недель пренатального развития. При этом гиалоциты, присутствующие в стекловидном

теле, выполняют роль макрофагов, фагоцитирующих гибнущие клетки [43, 44]. Очевидно, экспрессия мРНК генов *TLRs*, обнаруженная нами в образцах стекловидного тела, связана с экспрессией этих генов в гиалоцитах, эндотелиальных клетках гиалоидных сосудов и с регуляцией апоптоза клеток стенки гиалоидных сосудов. Это согласуется с данными, полученными на мышах, где было показано, что эмбриональные макрофаги экспрессируют *TLRs* 1, 2, 4, 6, 7, 8 и 9 [45].

Исследование функциональной значимости экспрессии *TLRs* является стратегически важным для понимания механизмов, лежащих в основе ряда заболеваний глаза раннего детского возраста, таких как ретинопатия недоношенных, врожденные катаракта, глаукома, заболевания переднего отрезка глаза.

#### 1.5.4 Заключение

Результаты настоящей работы детализируют роль отдельных молекул в биологических системах в развитии глаза. Полученные данные вносят вклад в понимание общих закономерностей пренатального развития глаза человека, и, кроме того, могут найти практическое применение, для диагностики некоторых патологий тканей глаза (билирубин, *TLRs*).

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП по биологии развития ИБР РАН.

#### 1.5.5 Список использованных источников

1. Doré S., Takahashi M., Ferris C.D., Zakhary R., Hester L.D., Guastella D., Snyder S.H. Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* - 1999. - Vol. 96. N 5. - P. 2445-2450.
2. Liu Y., Li P., Lu J., Xiong W., Oger J., Tetzlaff W., Cynader M. Bilirubin possesses powerful immunomodulatory activity and suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis // *J. Immunol.* - 2008. - Vol. 181. N 3. - P. 1887-1897.
3. Sedlak T.W., Snyder S.H. Bilirubin benefits: cellular protection by a biliverdin reductase antioxidant cycle // *Pediatrics.* - 2004. - Vol. 113, N 6. - P. 1776-1782.
4. Naumann H.N., Young J.M. Comparative bilirubin levels in vitreous body, synovial fluid, cerebrospinal fluid and serum after death // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* - 1960. - Vol. 105. - P. 70-72.
5. Usman F., Diala U.M., Shapiro S.M., Le Pichon J.B., Slusher T.M. Acute bilirubin encephalopathy and its progression to kernicterus: current perspectives // *Res. Reports Neonatology.* - 2018. - Vol. 8. - P. 33-44. doi: 10.2147/RRN.S125758
6. Kurzel R.B., Henrikson R.L. On the presence of bilirubin in the ocular humors of premature infants // *Invest. Ophthalmol.* - 1976. - Vol. 15. N 6. - P. 509-512. Le Goff M.M.,

Bishop P.N. Adult vitreous structure and postnatal changes // *Eye (Lond)*. - 2008. - Vol. 22. N 10. - P. 1214-1222. doi: 10.1038/eye.2008.21

7. 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 // *Exp. Eye Res.* - 2017. - Vol. 160. - P. 31-37. doi: 10.1016/j.exer.2017.04.008

8. Хаитов Р.М., Пащенко М.В., Пинегин Б.В. Роль паттерн-распознающих рецепторов во врожденном и адаптивном иммунитете // *Иммунология*. - 2009. - №1. - С.66-76.

9. Kannaki T.R., Reddy M.R., Shanmugam M., et al. Chicken Toll-like receptors and their role in immunity. 2010. <https://www.researchgate.net/publication/231968721>

10. Flier A., Krediet T.G. Innate Immunity: Toll-Like Receptors and Some More // *Neonatology*. - 2007. - Vol. 92. - P. 145–157.

11. Akira S., Uematsu S., Takeuchi O. Pathogen Recognition and Innate Immunity // *Cell*. 2006. V. 124. P. 783–801.

12. Brito B.E., Zamora D.O., Bonnah R.A., Pan Y., Planck S.R., Rosenbaum J.T. Toll-like receptor 4 and CD14 expression in human ciliary body and TLR-4 in human iris endothelial cells // *Exp. Eye Res.* - 2004. - Vol. 79. - P. 203–208.

13. Iwasaki A., Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system // *Science*. - 2010. - Vol. 327(5963). - P. 291-295.

14. Iwasaki A., Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system // *Nature immunology*. - 2015. - Vol. 16(4). - P. 343-353.

15. Luger R., Valookaran S., Knapp N., et al. Toll-Like Receptor 4 Engagement Drives Differentiation of Human and Murine Dendritic Cells from a Pro- into an Anti-Inflammatory Mode // *PLoS ONE*. - 2013. - Vol. 8. - No. 2. e54879. doi:10.1371/journal.pone.0054879

16. Kulikova G.V., Nizyaeva N.V., Nagovitsina M.N., Lyapin V.M., Loginova N.S., Kan N.E., Tyutyunnik V.L., Tyutyunnik N.V., Schegolev A.I. Specific features of TLR4 expression in structural elements of placenta in patients with preeclampsia // *Bull. Exp. Biol. Med.* - 2016. - Vol. 160. - № 5. - P. 718–721. doi 10.1007/s10517-016-3259-8

17. Sriram G., Natu V.P., Islam I., et al. Innate Immune Response of Human Embryonic Stem Cell-Derived Fibroblasts and Mesenchymal Stem Cells to Periodontopathogens // *Stem Cells International*. - 2016. - Vol. Article ID 8905365, 15 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/8905365>

18. Pandey S., Kawai T., Akira S. Microbial sensing by toll-like receptors and intracellular nucleic acid sensors // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* - 2014. - Vol. 7(1). - P. a016246. DOI: 10.1101/cshperspect.a016246
19. Breen K., Brown A., Burd I., Chai J., Friedman A., Elovitz M.A. TLR-4-Dependent and –Independent Mechanisms of Fetal Brain Injury in the Setting of Preterm Birth reproductive // *Sciences.* -2012. - Vol. 19. No. 8. - P. 839-850. DOI: 10.1177/1933719112438439http://rs.sagepub.com.
20. Kannaki TR, Reddy MR, Verma PC, Shanmugam M. Differential Toll-like receptor (TLR) mRNA expression. Patterns during chicken embryological development // *Anim Biotechnol.* - 2015. - Vol. 26 (2). - P. 130-135. doi: 10.1080/10495398.2014.939658.
21. Krysko D.V., Kaczmarek A., Krysko O., Heyndrickx L., Woznicki J., Bogaert P., Cauwels A., Takahashi N., Magez S., Bachert C., Vandenabeele P. TLR-2 and TLR-9 are sensors of apoptosis in a mouse model of doxorubicin-induced acute inflammation // *Cell Death and Differentiation.* - 2011. - Vol.18 (8). - P. 1316–1325. doi: 10.1038/cdd.2011.4. Epub 2011 Feb 11.
22. Li X., Jiang S., Tapping R.I. Toll-like receptor signaling in cell proliferation and survival // *Cytokine.* - 2010. - Vol. 49 (1). – P. 1–9. doi:10.1016/j.cyto.2009.08.010
23. Harju K., Glumoff V., Hallman M. Ontogeny of Toll-Like Receptors Tlr2 and Tlr4 in Mice // *Pediatr Res.* - 2001. - Vol. 49. - P. 81–83.
24. 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.
25. Muzio M., Natoli G., Saccani S., et al. 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.
26. Amirchaghmaghi E, Taghavi SA, Shapouri F, et al. The role of Toll like receptors in pregnancy // *Int J Fertil Steril.* - 2013. - Vol. 7. No. 3. - P. 147-154.
27. Rolls A., Shechter R., London A., Ziv Y., Ronen A., Levy R., Schwartz M. Toll-like receptors modulate adult hippocampal neurogenesis // *Nat. Cell Biol.* - 2007. - Vol. 9. - P. 1081 – 1088.
28. Okun E., Griffioen K.J., Mattson M.P. Toll-like receptor Signaling in Neural Plasticity and Disease // *Trends Neurosci.* - 2011. - Vol. 34. No. 5. - P. 269–281.
29. Kaul D., Habbal P., Derkow K., et al. Expression of Toll-Like Receptors in the Developing Brain // *PLoS ONE.* - 2012. - Vol. 7. No. 5. e37767.doi:10.1371/journal.pone.0037767.

30. 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.
31. 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
32. Anthony N., Foldi I., Hidalgo A. Toll and Toll-like receptor signalling in development // *Development*. - 2018. - Vol. 145. dev156018. doi:10.1242/dev.156018
33. 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. - Vol. 49. No. 6. - P. 328–332.
34. Панова И.Г., Сухова Ю.В., Татиколов А.С., Иванец Т.Ю. Билирубин в стекловидном теле глаза плодов человека // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2020. Т.170. № 7. С. 118-120. Panova I.G., Sukhova Y.V., Tatikolov A.S., Ivanets T.Yu. Bilirubin in the Vitreous Body of the Eye of Human Fetuses // *Bull Exp Biol Med*. 2020. V. 170. No. 1. P. 98-100. (WoS, Scopus. Q4). DOI: 10.1007/s10517-020-05012-3
35. Weiner C.P. Human fetal bilirubin levels and fetal hemolytic disease // *Am. J. Obstet. Gynecol.* - 1992. - Vol. 166. N 5. - P. 1449-1454.
36. Vitek L., Ostrow J.D. Bilirubin chemistry and metabolism; harmful and protective aspects // *Current Pharmaceutical Design*. 2009. Vol. 15. P. 2869-2883.
37. Panova I.G., Tatikolov A.S. Investigation of the content of alpha-fetoprotein and serum albumin in the vitreous body of the eye of human embryos // *Biol. Bull.* - 2011. - Vol. 38. N 2. - P. 191-194. doi: 10.1134/S1062359011020105
38. Бурменская О.В., Полтавцева Р.А., Панова И.Г. мРНК генов Toll-подобных рецепторов экспрессируются в тканях глаза плодов человека // *Онтогенез*. - 2020. - Т. 51. - № 5. - С. 363-368. DOI: 10.31857/S0475145020050031. Burmenskaya O.V., Poltavtseva R. A., Panova I.G. mRNAs of genes of toll-like receptors are expressed in human fetal eye tissues // *Russian Journal of Developmental Biology*. - 2020. V. 51. - No. 5. - P. 304–308. (WoS, Scopus. Q4). DOI: 10.1134/S1062360420050033
39. Lovicu F.J., McAvoy J.W. Growth factor regulation of lens development // *Dev. Biol.* - 2005. - Vol. 280. N 1. - P. 1-14. doi:10.1016/j.ydbio.2005.01.020
40. Cvekl A., Ashery-Padan R. The cellular and molecular mechanisms of vertebrate lens development // *Development*. - 2014. - Vol. 141. - P. 4432-4447. doi:10.1242/dev.107953
41. Li D.W., Liu J.P., Wang J., Mao Y.W., Hou L.H. Expression and activity of the signaling molecules for mitogen-activated protein kinase pathways in human, bovine, and rat lenses // *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* - 2003. - Vol. 44. - P. 5277–5286.

42. Balazs E.A., Toth L.Z., Ozanics V. Cytological studies on the developing vitreous as related to the hyaloid vessel system // Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. - 1980. - Vol. 213. No. 2. - P. 71-85.
43. Zhu M., Provis J.M., Penfold P.L. The human hyaloid system: cellular phenotypes and inter-relationships // Exp. Eye Res. - 1999. - Vol. 68(5). - P. 553-563.
44. Zhu M., Madigan M.C., van Driel D., Maslim J., Billson F.A., Provis J.M., Penfold P.L. The human hyaloid system: cell death and vascular regression // Exp. Eye Res. - 2000. - Vol. 70. N 6. - P. 767-776.
45. Balounov'a J., T.Vavrochov'a T., Bene'sov'a M., Ballek O., Kol'a'r M., Filipp D. Toll-like receptors expressed on embryonic macrophages couple inflammatory signals to iron metabolism during early ontogenesis // Eur. J. Immunol. - 2014. - Vol. 44. - P. 1491–1502. DOI: 10.1002/eji.201344040

## РАЗДЕЛ 2 МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ КАНЦЕРОГЕНЕЗА И РЕГЕНЕРАЦИИ ПЕЧЕНИ

### Подраздел 2.1 Ингибирование отложения гиалуронана новыми соединениями кумарина и ингибиторами синтеза хитина

#### 2.1.1 Введение

Повышенный уровень гиалуроновой кислоты (ГК) в плазме крови является маркером ряда воспалительных процессов, в том числе развития фиброза печени. Ингибирование синтеза ГК с помощью кумарин-4-метилумбеллиферона (4MU) оказывает протекторное действие при фиброзе, воспалении, раке и метаболическом синдроме печени на модельных животных. Для увеличения протекторных свойств и специфичности воздействия на фиброз печени за счет ингибирования продукции ГК, в настоящей работе мы провели тестирование соединений кумаринов, синтезированных “*de novo*”, а также коммерческих ингибиторов синтеза хитинсинтаз.

#### 2.1.2 Материалы и методы

*Культура клеток.* В работе использовалась мышьяная клеточная линия NIH3T3 (ATCC® CRL-1658™). Скорость пролиферации клеток определяли с помощью МТТ-теста, в 96 луночных планшетах, по стандартным протоколам.

Определение концентрации гиалуронана в среде проводили в 96 луночных планшетах после 72 ч инкубации клеток с ингибиторами, с использованием набора DuoSetHyaluronan (DY3614, R&DSsystem). Оценку содержания гиалуронана в обработанной культуре клеток проводили с помощью конфокальной микроскопии, с использованием антител НАВР.

*Эксперименты на животных.* Фиброз печени у самок мышей Balb/c 8-недельного возраста вызывали внутрибрюшинным введением СС14 в оливковом масле в концентрации 500 мг/кг. Ингибиторы Этоксазол и 4MU вводили перорально через желудочный зонд в концентрации 600 мг/кг в день. По окончании эксперимента животные подвергались эвтаназии с последующим забором ткани и крови для дальнейшего анализа.

В сыворотки крови экспериментальных и контрольных групп животных проводили измерение АЛТ/АСТ, холестерина и триглицеридов. Для ткани печени проводили: гистологический, иммунохимический анализ, Вестерн-блот и ПЦР в реальном времени.

*Биоинформационный анализ* проводили с использованием открытых баз белковых и нуклеотидных последовательностей UniProt, NCBI и т.п. Для 3D-моделирование структуры белка использовали программы I-TASSER и VMD.

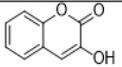
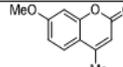
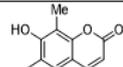
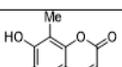
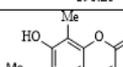
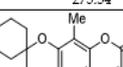
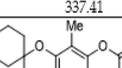
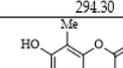
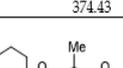
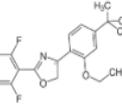
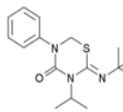
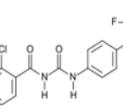
*Статистический анализ* проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа и критерия Колмогорова-Смирнова для ранжирования, с использованием программного обеспечения Graph Pad Prism 8.

### 2.1.3 Результаты и обсуждение

В работе использовали 9 соединений кумаринов и три коммерческих ингибитора синтеза хитина (рисунок 2.1.1 А). Протестированы новые соединения кумарина и коммерческих ингибиторов синтеза хитина на предмет ингибирования продукции ГК в тесте на культуре клеток. Производное кумарина 10'-метил-6'-фенил-3'Н-спиро [пиперидин-4,2'-пирано [3,2-g] хромен] -4 ', 8'-дионподавлял осаждение ГК клетками НИНЗТЗ с ингибирующей концентрацией  $IC_{50} = 1,69 \pm 0,75$  мкМ. Этоксазол, бупрофезин, трифлумурон, ингибиторы синтеза хитина, снижали отложение ГК с  $IC_{50}$   $4,21 \pm 3,82$  мкМ,  $1,24 \pm 0,87$  мкМ и  $1,48 \pm 1,44$  мкМ соответственно. Этоксазол уменьшал продукцию ГК и предотвращал образование коллагеновых волокон в модели фиброза печени СС14 у мышей. Биоинформационный анализ выявил гомологию между хитинсинтазами и ферментами гиалуронан-синтазами в поро-образующем домене, содержащем предполагаемый сайт связывания этоксазола.

A

Б

4MU derivatives		
 I. Molecular Weight: 162.14	 II. Molecular Weight: 190.20	 III. Molecular Weight: 275.34
 IV. Molecular weight: 337.41	 V. Molecular Weight: 294.30	 VI. Molecular Weight: 374.43
 VII. Molecular Weight: 375.42	 VIII. Molecular Weight: 232.23	 IX. Molecular Weight: 312.36
Chitin synthase inhibitors		
 Etovazole (Eto) Molecular Weight: 359.417	 Buprofezin (Bup) Molecular Weight: 305.44	 Triflumuron (Trif) Molecular Weight: 358.70

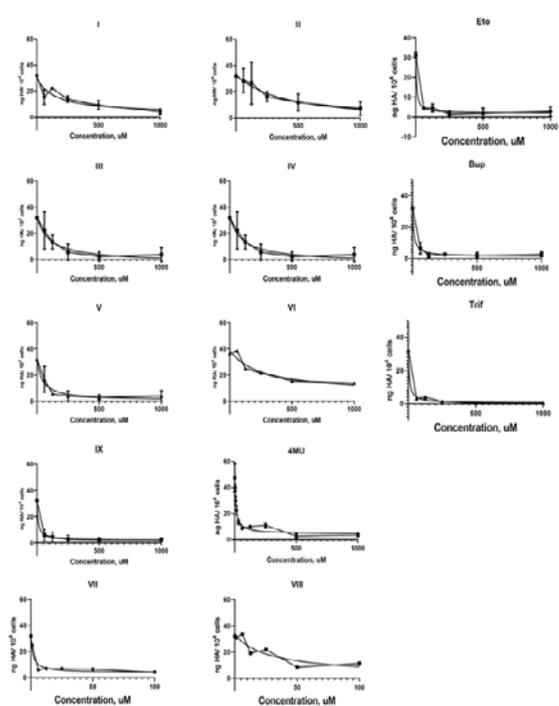


Рисунок 2.1.1. - А - Список протестированных производных кумарина и ингибиторов хитинсинтазы. Б - Подавление уровня ГК в культуральной жидкости клеток NIN3T3, обработанных различными соединениями; IC50

Данные представлены средним значением ± стандартное отклонение, n = 3.

Осаждение ГК клетками NIN3T3 с полумаксимальной ингибирующей концентрацией (IC50) = 1,69 ± 0,75 мкМ оказалось выше, чем 4MU (IC50 = 8,68 ± 1,6 мкМ). Этоксазол, бупрофезин, трифлумурон, ингибиторы синтеза хитина, снижали отложение ГК с IC50 4,21 ± 3,82 мкСм, 1,24 ± 0,87 мкСм и 1,48 ± 1,44 мкМ соответственно (рисунок 2.1.2. Б).

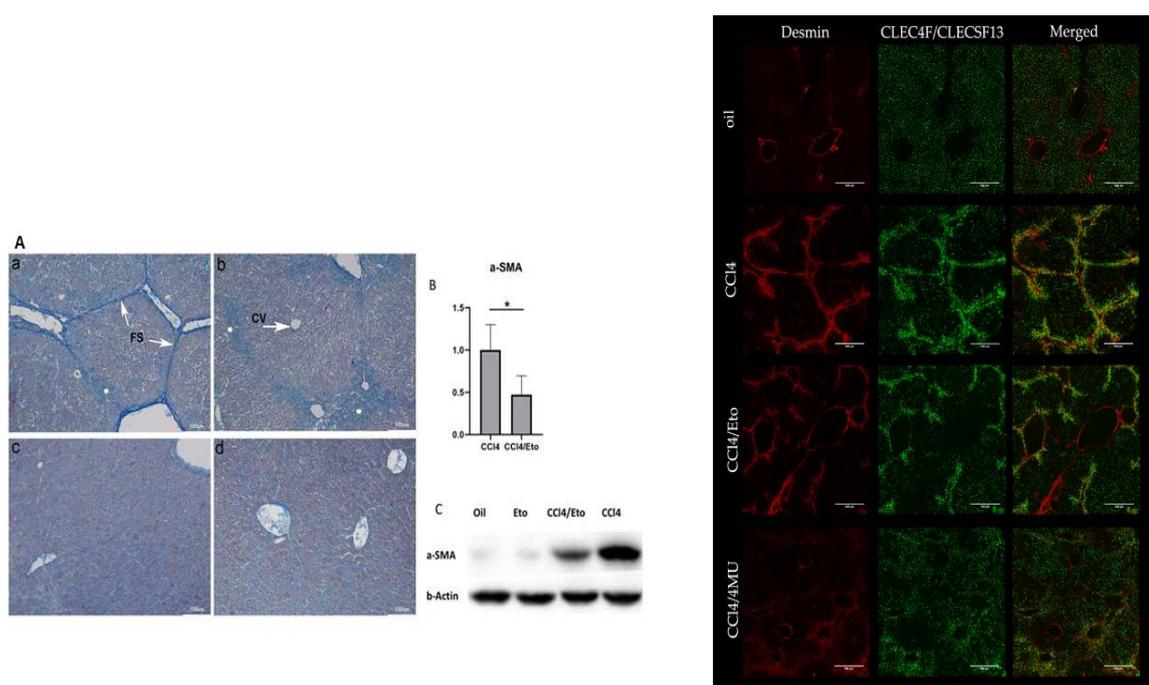


Рисунок 2.1.2 - А - Трихромное окрашивание по Мэллори фиброза печени  
 Экспериментальные группы: а - CCl<sub>4</sub>, б - CCl<sub>4</sub> / Eto, в - масло, г - этоксазол. ФС -  
 фиброзный рубец на фото а, CV - центральная вена, \* - клетки, окрашенные анилиновым  
 синим. В - Относительная количественная оценка уровня αSMA \* p < 0,05, t-тест, С -  
 вестерн-блоттинг αSMA. С - Флуоресцентная микроскопия фиброзной печени CCl<sub>4</sub> у  
 мышей, получавших 4MU и этоксазол. Срезы, окрашенные антителами для Desmin (HSC)  
 и CLEC4F / CLECSF13 (клетки Купфера). Данные изображения были использованы для  
 получения коэффициентов колокализации Мандерса для клеток МСС и HSC.

Этоксазол уменьшал продукцию ГК и предотвращал образование коллагеновых  
 волокон в модели фиброза печени CCl<sub>4</sub> у мышей, аналогично 4MU (рисунок 2.1.2).

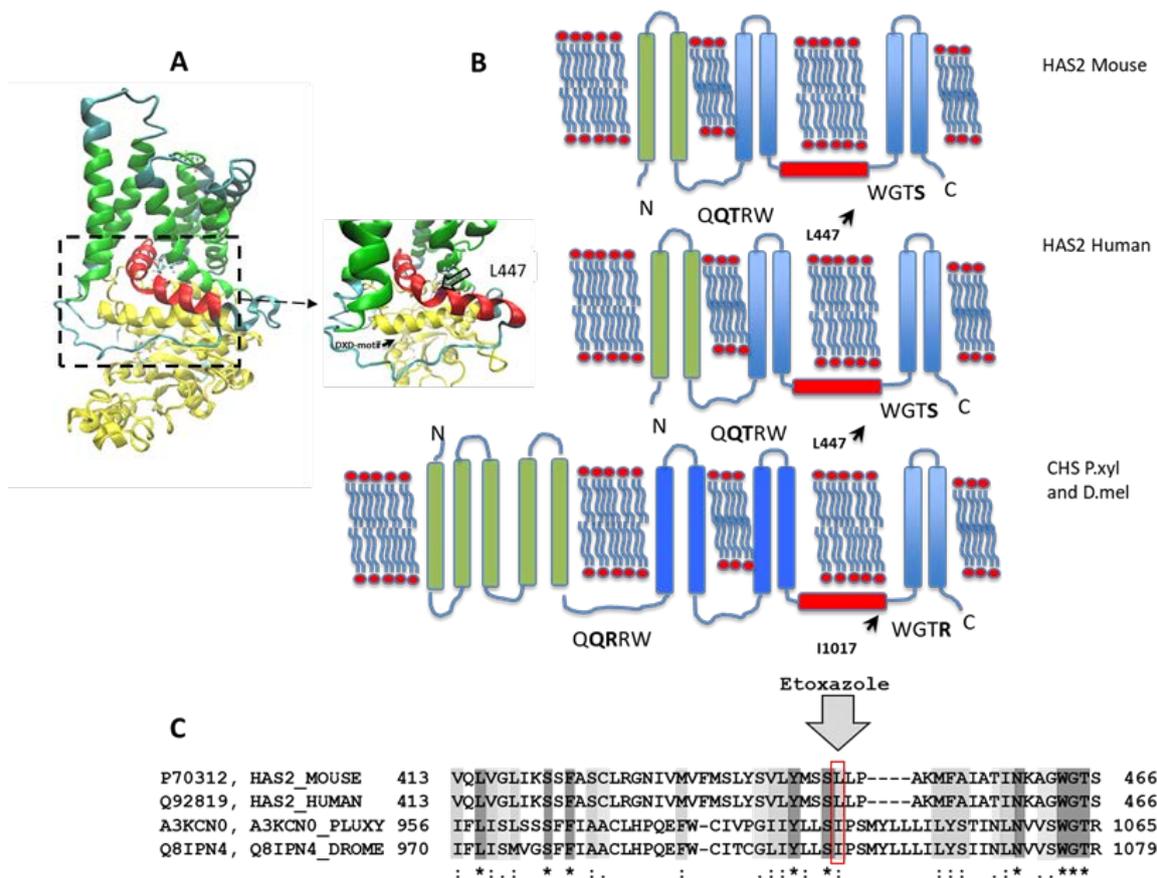


Рисунок 2.1.3 - Сравнение доменной организации гиалуронансинтазы мыши и человека и хитинсинтазы *P.xylostella*, *D.melanogaster*

А - Прогнозируемая трехмерная структура HAS2. В - схематическое сравнение HAS2 и хитинсинтазы - N-концевые трансмембранные домены окрашены в зеленый цвет, C-концевые трансмембранные домены - в синий цвет. Каталитический центр HAS и CHS содержит консервативный мотив Q\*\*RW. А-спираль MD5HAS2 и 5TMSхитинсинтазы с предполагаемым сайтом связывания этоксазола красным цветом. С - Выравнивание аминокислотных последовательностей HAS и CHS показало консервативный мотив WGT (S/R) и возможный сайт связывания этоксазола с аминокислотой Leu-447 для последовательностей HAS и Pe-1017 хитинсинтазы. (\*) - консервативный остаток, (:) - оценка > 0,5, (.) - оценка ≤ 0,5.

Литературные данные свидетельствуют об обоснованности терапевтического применения специфических ингибиторов синтеза гиалуронана. В данной работе мы представляем кривую дозы-эффекта для 4MU ингибирования отложения ГК в культуре клеток при низком микромолярном диапазоне. Расчетная IC50 для 4MU составила 8,68 ± 1,6 мкМ. Наши данные хорошо согласуются с опубликованными ранее низкими микромолярными эффектами 4MU [1-4]. Мы провели тестирования 9 производных умбеллиферона и 3 ингибиторов хитинсинтазы на их способность ингибировать внеклеточное отложение ГК клеточной линией фибробластов мыши NIH3T3. Наши данные подтверждают предыдущие результаты, показывающие, что свободная 7-

гидроксильная группа 4-MU важна, и ее метилирование почти полностью отменяет ингибирующую активность 4-MU. Целлюлоза, хитин и гиалуронан - три самых распространенных линейных углеводных полимера на Земле [5]. UDP-GlcNAc является общим субстратом как для хитинсинтаз, так и для гиалуронансинтаз. Возникло предположение о том, что субстратные аналоги хитинсинтаз насекомых и грибов, пептидилнуклеозидные антибиотики, такие как полиоксины и никкомицины, будут способны ингибировать активность HAS. В настоящей работе мы впервые продемонстрировали, что ингибиторы хитинсинтазы, этоксазол, бупрофезин и трифлумурон в диапазоне низких концентраций  $\mu\text{M}$  снижают секрецию ГК фибробластами NIH3T3. Все эти ингибиторы не проявляли токсичность в исследуемом диапазоне концентраций от 1  $\mu\text{M}$  до 1  $\text{mM}$ . Гиалуронансинтазы типа I представляют собой трансмембранные белки [6–8], которые имеют несколько общих аминокислотных последовательностей (QRRRW, CATMWNHT, QXFEY и WGTRE) с хитинсинтазой [9], целлюлозосинтазами [10] и N-актелиглюкозаминилтрансферазами, такими как белок NodC [11]. Молекулярный механизм действия ингибиторов синтеза хитина позволяет предположить, что снижение продукции ГК клетками NIH3T3 в присутствии соединений этоксазола и бупрофезина может быть объяснено их прямым взаимодействием с областью, непосредственно следующей за доменом амфифильной цитоплазмы MD5HAS. Данные структуры и генетического анализа подтверждают нашу гипотезу о том, что этоксазол ингибирует как хитинсинтазу, так и гиалуронансинтазу путем прямого взаимодействия с доменом 5TMS (MD5), частью поры, через которую вытесняется хитин или ГК.

#### 2.4 Заключение

Биоинформационный анализ выявил гомологию между хитинсинтазами и ферментами HAS, в большей степени в поро-образующем домене, содержащем предполагаемый сайт связывания этоксазола. Полученные экспериментальные данные, вместе с анализом гомологии доменов между гиалуронансинтазой и хитинсинтазой, указывают на то, что ингибиторы хитинсинтазы служат новым источником для разработки ингибиторов гиалуронансинтазы.

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП по биологии развития ИБР РАН

#### 2.5 Список используемых источников

1. Morohashi H., Kon A., Nakai M., Yamaguchi M., Kakizaki I., Yoshihara S., Sasaki M., Takagaki K. Study of hyaluronan synthase inhibitor, 4-methylumbelliferone derivatives on human pancreatic cancer cell (KP1-NL) // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2006. – Vol. 345. – P. 1454–1459, doi:10.1016/j.bbrc.2006.05.037.

2. Nagy N., Freudenberger T., Melchior-Becker A., Röck K., terBraak M., Jastrow H., Kinzig M., Lucke S., Suvorava T., Kojda G. et al. Inhibition of Hyaluronan Synthesis Accelerates Murine Atherosclerosis: Novel Insights Into the Role of Hyaluronan Synthesis // *Circulation*. – 2010. – Vol. 122. – P. 2313–2322, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.972653.
3. Nagy N., Gurevich I., Kuipers H.F., Ruppert S.M., Marshall P.L., Xie B.J., Sun W., Malkovskiy A.V., Rajadas J., Grandoch M. et al. 4-Methylumbelliferyl glucuronide contributes to hyaluronan synthesis inhibition // *J. Biol. Chem.* – 2019. jbc.RA118.006166, doi:10.1074/jbc.RA118.006166.
4. Kuipers H.F., Nagy N., Ruppert S.M., Sunkari V.G., Marshall P.L., Gebe J.A., Ishak H.D., Keswani S.G., Bollyky J., Frymoyer A.R. et al. The pharmacokinetics and dosing of oral 4- methylumbelliferone for inhibition of hyaluronan synthesis in mice // *Clin Exp Immunol.* – 2016. – Vol. 185. – P. 372–381, doi:10.1111/cei.12815.
5. Spicer A.P., McDonald J.A. Characterization and molecular evolution of a vertebrate hyaluronan synthase gene family // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 273. – P. 1923–1932.
6. Rosa F., Sargent T.D., Rebbert M.L., Michaels G.S., Jamrich M., Grunz H., Jonas E., Winkles J.A., Dawid I.B. Accumulation and decay of DG42 gene products follow a gradient pattern during *Xenopus* embryogenesis // *Dev. Biol.* – 1988. – Vol. 129. – P. 114–123, doi:10.1016/0012-1606(88)90166-2.
7. DeAngelis P.L., Yang N., Weigel P.H. The *Streptococcus pyogenes* hyaluronan synthase: sequence comparison and conservation among various group A strains // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1994. – Vol. 199. – P. 1–10, doi:10.1006/bbrc.1994.1184.
8. Pummill P.E., Achyuthan A.M., DeAngelis P.L. Enzymological characterization of recombinant *xenopus*DG42, a vertebrate hyaluronan Synthase // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 273. - P. 4976–4981, doi:10.1074/jbc.273.9.4976.
9. Merzendorfer H., Zimoch L. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases // *J. Exp. Biol.* – 2003. – Vol. 206. – P. 4393–4412. doi:10.1242/jeb.00709.
10. Saxena I.M., Brown R.M., Dandekar T. Structure--function characterization of cellulose synthase: relationship to other glycosyltransferases // *Phytochemistry.* – 2001. – Vol. 57. – P. 1135–1148, doi:10.1016/s0031-9422(01)00048-6.
11. Geremia R.A., Mergaert P., Geelen, D., Van Montagu M., Holsters M. The NodC protein of *Azorhizobiumcaulinodans* is an N-acetylglucosaminyltransferase // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1994. – Vol. 91. – P. 2669–2673. doi:10.1073/pnas.91.7.2669.

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

**Подраздел 3.1 Исследование появления ранних обусловленных иллюминацией  
признаков старения в ретинальном пигментном эпителии у молодых крыс  
альбиносов**

**3.1.1 Введение**

Ткани глаза, развитие и регенерация которых традиционно изучаются в лаборатории, подвержены процессам старения, обусловленным в значительной степени внутриклеточными процессами, и, в частности, перекислением, происходящим при избыточном свете. Ранее нами получены свидетельства появления патологических структурных и физиологических изменений в сетчатке крыс альбиносов при направленной сверхиллюминации [1]. При избыточной или долговременной экспозиции животных в условиях светооблучения высокой интенсивности страдает не только нейральная часть сетчатки, но и РПЭ. РПЭ - монослой пигментированных эпителиальных клеток, расположенных между нейральной сетчаткой и ее васкулярным слоем. Помимо переноса веществ по базально-апикальному градиенту клеток, РПЭ выполняет ряд важных функций, основной из которых является фагоцитоз слущивающихся наружных сегментов фоторецепторов сетчатки, а затем их переваривание с помощью лизосом. Это позволяет фоторецепторам синтезировать новые отростки для световосприятия, обеспечивает жизнеспособность клеток и метаболизм ретиноидов. Однако осуществить полное переваривание фоторецепторных наружных отростков с помощью лизосомальных ферментов и их деградацию клеткам РПЭ не удается, что постепенно и неуклонно с возрастом приводит к аккумуляции липофусцина (ЛФ). Наружные сегменты фоторецепторных клеток богаты полиненасыщенными жирными кислотами, подверженными воздействию свободных радикалов, находящихся в больших количествах в клетках сетчатки глаза, функционирующей в условиях постоянного облучения светом. Полиненасыщенные жирные кислоты в результате перекисления, катализируемого в лизосомах ионами металлов, трансформируются во флуорофоры - обладающие аутофлуоресценцией компоненты ЛФ [2]. В то же время известно, что зрелые клетки РПЭ обладают пролиферативной активностью на очень низком уровне. По этой причине весь аккумуляруемый ЛФ остается в цитоплазме, и количество его в клетках РПЭ не только не снижается, но, напротив, возрастает. Последствиями накопления ЛФ являются дегенерация клеток РПЭ и нарушение функции фоторецепторных отростков, а также исключение внутриклеточной регенерации в сетчатке.

К связанным с возрастом процессам в РПЭ имеет отношение и возрастание относительного числа многоядерных клеток на фоне снижения общей их численности. Наличие в слое РПЭ одноядерных и полиплоидных, в основном двуядерных клеток является обычным явлением для грызунов. Предполагается, что важную роль в обретении слоем РПЭ многоядерных клеток играет возрастающая, связанная с ростом глаза фагоцитарная нагрузка, нарушающая цитокинез клеток. Многоядерность клеток РПЭ - защитный механизм для сохранения структуры и функции эпителиального слоя.

Пигмент меланин является полимером высокого молекулярного веса, он синтезируется и накапливается в РПЭ в процессе развития и роста глаза. Важной функцией меланина, находящегося в высокой концентрации в апикальной цитоплазме и апикальных отростках клеток РПЭ, является защита фоторецепторов от избыточного света. Предполагается, что фотозащитная роль меланина в клетках РПЭ обусловлена его способностью к связыванию редокс-активных ионов металлов [3]. В количественной конкуренции с меланином находится ЛФ – чем больше меланина в клетках РПЭ, тем меньше гранул ЛФ и наоборот. Альбинизм характеризуется разрушением меланосом и/или процесса синтеза меланина. В то же время РПЭ и нейральная сетчатка грызунов альбиносов широко используются *in vivo* и *in vitro* в качестве модели для изучения развития и регенерации сетчатки глаза и зависимых от возраста, приводящих к дегенерации сетчатки, процессов. Для проведения такого рода исследований нам было необходимо получить дополнительные характеристики РПЭ грызунов альбиносов, в частности в отношении наличия и накопления ЛФ, а также развития многоядерности клеток в слое РПЭ, как еще одного зависимого от возраста, подверженного действию света процесса. В данной работе мы использовали препараты слоя (whole mount) РПЭ крыс альбиносов для изучения этих признаков в возрастном диапазоне от двух недель до двух месяцев после рождения.

### 3.1.2 Материалы и методы

*Объект исследования и выделение РПЭ.* Работа проведена на РПЭ крыс альбиносов Wistar в возрасте 2 нед, 1 мес и 2 мес после рождения. После анестезии глаза крыс альбиносов в возрасте 2 нед, 1 мес и 2 мес были энуклеированы. Для исследования слоя РПЭ использовали (с модификациями) метод его выделения whole mount с применением диссоциирующих сред [4]. Материал фиксировали в растворе Буэна и в 4% формалина. У крыс двухмесячного возраста дополнительно были выделены фрагменты подстилающей РПЭ сосудистой оболочки, которые фиксировали тем же способом. Препараты РПЭ крыс альбиносов разного возраста использовали для дальнейшей гистологической обработки, предусматривающей окрашивание Н-Е, окраски по методу Шморля, а также (минуя

гистологическую обработку) для анализа аутофлуоресценции гранул ЛФ на тотальных препаратах РПЭ.

*Окрашивание по методу Шморля.* После депарафинирования срезы, взятые из экваториальных и центральных областей задней стенки глаза, а также фиксированные фрагменты пластов РПЭ крыс разного возраста трижды промывали в дистиллированной воде. Затем их помещали в свежеприготовленную среду, содержащую 1%-ый хлорид железа (30 мл), гексацианоферрат калия (4 мл) и дистиллированную воду (6 мл). После этого препараты тщательно промывали в проточной воде, обезвоживали, и заключали в канадский бальзам под покровные стекла.

*Анализ флуоресценции липофусциновых гранул.* Для анализа флуоресценции ЛФ препараты РПЭ через сут после фиксации тщательно отмывали и заключали в глицерин с добавлением DABCO (Sigma, США). Наличие гранул ЛФ проводили методом регистрации их флуоресценции с помощью флуоресцентного микроскопа AxioVert 200M (Carl Zeiss Jena, Germany). Изображения получали в коротковолновом диапазоне света (488 нм) аргонового лазера (барьерный фильтр 570 нм) и при тождественных других параметрах работы микроскопа. Полученные изображения регистрировали с помощью цифровой камеры и компьютера, оснащенного программой AxioVision LE Rel.4.3. Количественный анализ содержания ЛФ в РПЭ крыс альбиносов через 2 нед, 1 мес и 2 мес после рождения проводили с помощью визуального подсчета числа клеток, содержащих обилие ярко флуоресцирующих гранул относительно общего числа клеток, на 20 полях визуального обзора размером 16x104 px на изображениях пластов РПЭ, полученных при 1000-кратных увеличениях микроскопа. Подсчеты проводили на черно-белых изображениях препаратов РПЭ, полученных от обоих глаз крыс для каждого срока их развития. Статистическую обработку осуществляли с помощью программы Excel. Были рассчитаны средние значения показателя для каждого возраста, среднеквадратичное отклонение и дисперсионный анализ выборок.

*Определение соотношения одноядерных и двуядерных клеток в слое РПЭ.* Для этой цели использовали фиксированные парами формалина и окрашенные Н-Е препараты whole amount РПЭ глаз крыс в возрасте 2 нед, 1 мес и 2 мес. В подсчетах учитывали экваториальную область слоя РПЭ по всей окружности. Для проведения подсчета клеток препараты РПЭ после фиксации и заключения помещали на микроскоп Olympus AN-3 с установленной цифровой камерой. Для каждого препарата делали серию снимков. На каждом из снимков выбирали прямоугольную площадку для подсчета клеток. На ней проводили подсчет сначала двуядерных, потом одноядерных клеток при помощи программы Image J. Для статистической обработки данных использовали программу

Excel. Был сделан расчет средних значений показателей для каждого возраста, среднеквадратичных отклонений и дисперсионный анализ выборок для определения достоверности отличий в выборках.

### 3.1.3 Результаты и обсуждение

РПЭ нормального глаза взрослой крысы альбиноса 2-х месячного возраста представляет собой однорядный слой шестигранных клеток, плотно прилежащих друг к другу. Клетки РПЭ являются двоядерными, реже одноядерными, а их соотношение зависит от возраста животного [5]. Большинство клеток РПЭ крыс в возрасте 1 мес и более имеет два равных по размерам ядра, содержащих 1-2 ядрышка. Помимо двоядерных клеток, в небольшом относительном числе присутствуют одноядерные клетки, размер ядер которых зачастую больше, чем у двоядерных клеток. Цитоплазма клеток РПЭ у крыс альбиносов не содержит меланиновых гранул и имеет равномерное гомогенное светлое окрашивание. При сравнении с пигментированным РПЭ мышей C57Bl, взятого нами в качестве дополнительного образца, это отличие очевидно. Известно, что основной отличительной чертой РПЭ альбиносов в развитии является не только отсутствие пигмента, но и компонентов его синтеза, участвующих также в регуляции клеточных циклов в сетчатке. Отсутствие гранул меланина (или, возможно, крайне низкое их число), имеющее место в использованной нами модели, позволяет достаточно точно определить включения ЛФ в цитоплазме клеток, накапливаемые в процессе фагоцитирования. Сосудистая оболочка у крыс имеет развитую неоднородную структуру – сосудистую сеть, состоящую из кровеносных сосудов разного калибра. Клеточными элементами сосудистой оболочки являются также клетки эндотелия сосудов и не содержащие пигмента «меланофоры», фибробласты, тучные клетки, резидентные макрофаги. ЛФ гранулы являются обладающими аутофлуоресценцией, электронноплотными, гетерогенными, полимерными субстанциями, накапливаемыми внутри лизосомального вакуолярного аппарата (во вторичных лизосомах) клеток. Накопление происходит в течение всей жизни в линейной от возраста зависимости и является биомаркером старения. Проведенное с помощью флуоресцентного микроскопа выявление ЛФ и последующий количественный анализ относительного числа клеток, обладающих значительными количествами ЛФ, позволил судить о накоплении ЛФ в клетках РПЭ крыс альбиносов на отрезке времени от 2 нед до 2 мес после рождения. Результаты представлены на рисунках (рисунок 3.1.1) и (рисунок 3.1.2).

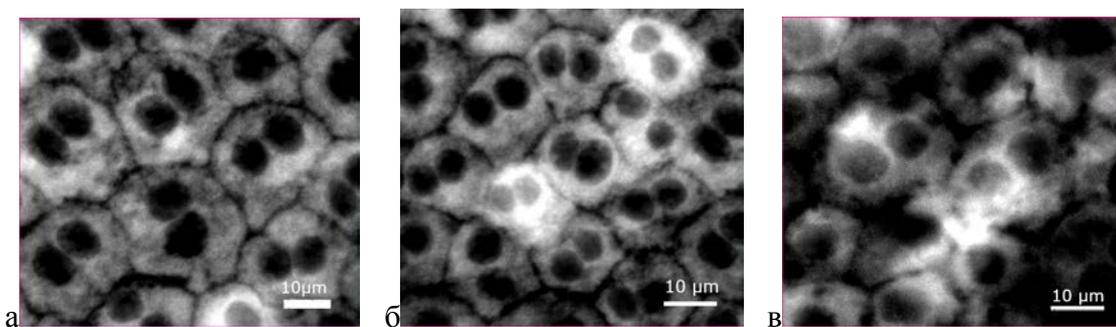


Рисунок 3.1.1 - Аутофлуоресценция в клетках ретинального пигментного эпителия крыс альбиносов

В возрасте: (а) – 2 нед., (б) – 1 мес., (в) – 2 мес. после рождения [8]

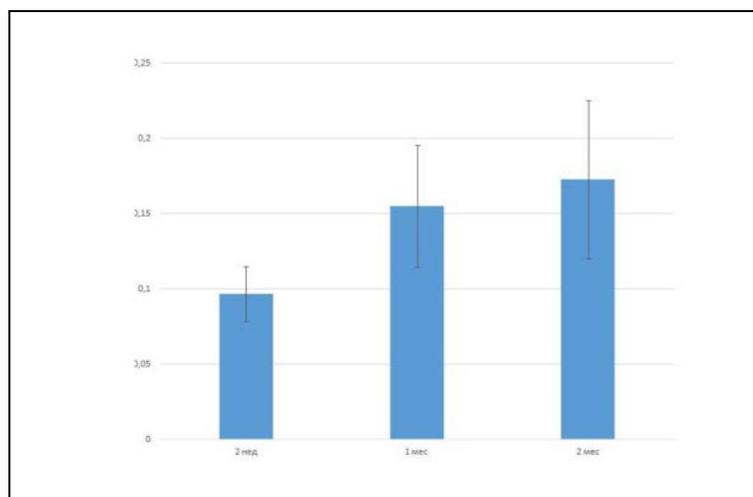


Рисунок 3.1.2 – Увеличение числа клеток, обладающих высоким уровнем ЛФ флуоресценции в РПЭ крыс альбиносов в раннем развитии

По оси ординат среднее относительное число клеток с высоким уровнем флуоресценции к числу всех клеток на анализируемом поле изображения слоя РПЭ [8].

При этом стало возможным выявить определенные закономерности. Первая - это то, что уже в 2 нед постнатального развития у крыс альбиносов в экваториальной зоне РПЭ выявляются ЛФ<sup>+</sup> клетки, относительное содержание которых, однако, не превышает 10%. Флуоресценция ЛФ при этом чаще всего носит диффузный характер. Клетки с флуоресцирующей цитоплазмой могут быть обнаружены как в группах, так и отдельных клетках. Позже, к 1 мес развития число таких клеток значительно увеличивается и 2 мес достигает 17 – 20% (рисунок 3.1.2). По мере возрастания относительного числа ЛФ – содержащих клеток, увеличивается и разброс этого показателя в образцах. Причина столь быстрого появления данного признака связано с существованием обратной связи наличия меланина (меланосом) с накоплением ЛФ в клетках РПЭ. В работе [6] исследовали РПЭ кролика и быка в условиях *in vitro* и оксидативного стресса, вызванного добавлением к клеткам РПЭ препарата наружных сегментов фоторецепторных клеток. При сравнении

РПЭ нормальных кроликов и альбиносов, а также клеток РПЭ быка, богатых и обедненных меланиновыми гранулами выяснилось, что клетки РПЭ кроликов альбиносов и РПЭ быка с низким содержанием меланина аккумулировали значительно большие количества ЛФ. Работа свидетельствовала также о том, что меланин является эффективным антиоксидантом, что, в свою очередь, обусловлено связью меланина с процессом переноса металлов. Полученные препараты РПЭ крыс альбиносов, окрашенные по методу Шморля для выявления ЛФ дали дополнительную информацию. Метод позволил обнаружить окрашенные включения как на поперечных срезах задней стенки глаза крыс, так и на пластах - препаратах РПЭ wholemount. На поперечных срезах окрашенные включения локализовались в наибольшей концентрации в клетках РПЭ на границе с фоторецепторами сетчатки, а также (в меньшей концентрации) в сосудистой оболочке. Такая локализация ЛФ в сайтах наибольшей засветки была наиболее очевидной у крыс в возрасте 2 мес. В целом эти результаты соответствовали данным, полученным при оценке накопления ЛФ с помощью флуоресцентного микроскопа. Недавно накопление с возрастом ЛФ как результат перекисления липидов было описано в кровеносных сосудах сетчатки глаза человека [7], что подчеркивает важность данных на исследуемой нами модели для медицины.

Определение соотношения, в котором находятся одноядерные и двуядерные клетки в экваториальной области слоя РПЭ крыс разного возраста дало результаты, представленные на рисунке 3 (рисунок 3.1.3).

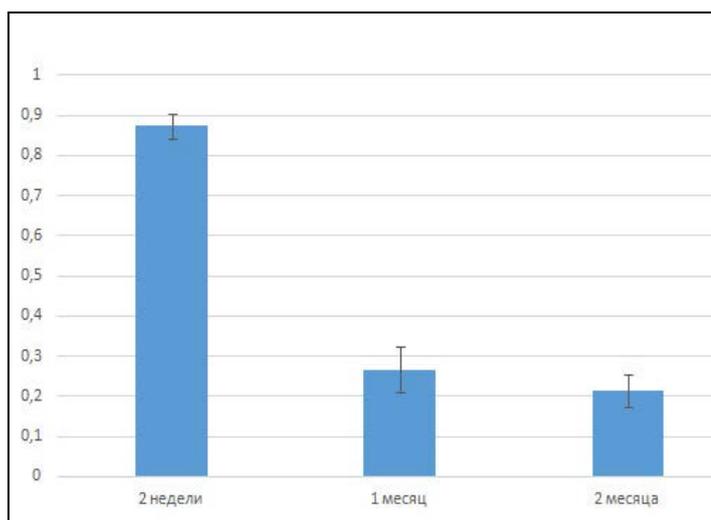


Рисунок 3.1.3 - Изменение соотношения одноядерных и двуядерных клеток в ретинальном пигментном эпителии крыс альбиносов в раннем возрасте

По оси ординат – отношение числа одноядерных клеток к числу двуядерных клеток на анализируемом поле изображении слоя РПЭ [8].

Из данных гистограммы следует, что через 2 нед постнатального развития крыс альбиносов в экваториальной зоне РПЭ присутствует еще значительное число одноядерных клеток, но уже к 1 мес постнатального развития их содержание значительно снижается, и позже эта тенденция сохраняется.

Интересен вопрос связи накопления ЛФ клетками РПЭ и развитие в нем многоядерности. Согласно нашим наблюдениям накопление ЛФ происходит как в двуядерных, так и одноядерных клетках, но поскольку число одноядерных клеток на всех сроках наблюдения невелико, то вопрос о связи скорости накопления ЛФ и нарушения цитокинеза, приводящего к многоядерности, пока остается открытым. Однако при сравнении количественных результатов, представленных на рисунках 2 и 3, можно выявить положительную корреляцию между этими двумя событиями.

#### 1.3.4 Заключение

В результате отсутствия у крыс альбиносов пигмента меланина, защищающего клетки сетчатки от переокисления при высокой иллюминации в условиях вивария, РПЭ уже на ранних стадиях постнатального развития животных приобретает признаки старения [8]. Это выражается в накоплении клетками гранул липофусцина, а также увеличении относительного содержания двуядерных клеток в слое. В первые две недели постнатального развития крыс альбиносов эти признаки выражены незначительно, однако, уже к месяцу становятся очевидны. Полученные сведения дополняют информацию о состоянии РПЭ *in situ* у крыс альбиносов, широко используемых в экспериментах *in vivo* и *in vitro* в качестве модели при изучении развития, регенерации, а также развития патологии сетчатки глаза позвоночных.

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП по биологии развития ИБР РАН

#### 1.3.4 Список использованных источников

1. Новикова Ю.П., Ганчарова О.С., Эйхлер О.В., Филиппов П.П., Григорян Э.Н. Профилактическое и лечебное действие SkQ1-содержащих глазных капель визомитин при фотоиндуцируемых повреждениях сетчатки глаза // Биохимия. 2014. - Т. 79. - № 10. – С. 1355-1366. (Yu. P. Novikova, O.S. Gancharova, O.V. Eichler, P.P. Philippov, E.N. Grigoryan. Preventive and Therapeutic Effects of SkQ1-Containing Visomitin Eye Drops against Light. Biochemistry (Moscow).- 2014. Vol. - 79. - N.10.- P. 1101-1110). Doi: 10.1134/S0006297914100113.

2. Smith R.T., Farsiu S., Allingham M. Understanding RPE Lipofuscin // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. - 2016. - Vol. 57. - N15. - P. 6766–6772.
3. Sarna T. New trends in photobiology: Properties and function of ocular melanin—a photophysical view // J. Photochem. Photobiol. Biol. B. - 1992. - Vol.12. - P. 215–258. Doi: org/10.1016/1011-1344(92)85027-R.
4. Wang N., Koutz CA., Anderson RE. A method for the isolation of retinal pigment epithelial cells from adult rats // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. - 1993. - Vol. 34. N1. P. 101–107.
5. Chen M., Rajapakse D., Fraczek M., et al. Retinal pigment epithelial cell multinucleation in the aging eye – a mechanism to repair damage and maintain homeostasis // Aging Cell. - 2016. - Vol. 15. - P. 436–445. Doi:10.1111/accel.12447.
6. Sundelin S.P., Nilsson S.E.G., Brunk U.T. Lipofuscin formation in cultured retinal pigment epithelial cells is related to the melanin content // Free Radical Biology & Medicine. - 2001. - Vol. 30.- N.1. - P. 74–81. Doi: .org/10.1016/S0891-5849(00)00444-5
7. Nag T.C., Maurya M., Sankar Roy T. Age-related changes of the human retinal vessels: Possible involvement of lipid peroxidation // Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger. - 2019. - Vol. 226. - P. 35–47. Doi: doi.org/10.1016/j.aanat.2019.06.007.
8. Новикова Ю.П., Григорян Э.Н. Раннее появление признаков старения в ретинальном пигментном эпителии у молодых крыс альбиносов // Онтогенез. 2020. - Т. 51 - № 6. - С. 1–11. (Yu.P. Novikova, E.N.Grigoryan. Early Appearance of Aging Signs in the Retinal Pigment Epithelium in Young Albino Rats // Russian Journal of Developmental Biology. - 2020. - Vol. 51. - No. 6. – P. 377-386. DOI: 10.31857/S0475145020060063.

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

### 4.1 Введение

Рождение и интеграция новых нервных клеток в нервную сеть зубчатой извилины гиппокампа играет важную роль в формировании памяти и поддержании эмоционального состояния. Этот процесс, называемый нейрогенезом, является особой, свойственной именно гиппокампу формой пластичности нервной ткани и поддерживается пулом специализированных стволовых клеток [1-4]. Особенностью этих стволовых клеток является длительное пребывание в состоянии покоя и ограничение в количестве генерируемых потомков [5-8]. В результате чего, родившись с определенным запасом стволовых клеток, мы их постепенно расходуем в течение жизни. Это приводит к возрастному падению продукции новых нейронов и, как следствие, снижению пластичности гиппокампальной нервной сети, что отчасти объясняет когнитивный дефицит при старении [9, 10].

Нейрогенез восприимчив к разнообразным физиологическим и патологическим стимулам [11–18]. Хотя на сегодняшний день клинические наблюдения не позволили идентифицировать какое-либо заболевание мозга, связанное с изолированным нарушением продукции новых нейронов в гиппокампе, исследования на модельных животных, а также изучение аутопсийных образцов мозга человека показали, что многие патологические состояния мозга сопровождаются измененным нейрогенезом [1]. Более того, при тех заболеваниях, которые не затрагивают изначально гиппокамп, также наблюдается нарушение нейрогенеза, которое в дальнейшем становится частью патологического процесса, усугубляя проявление того или иного заболевания мозга. Нарушения нейрогенеза при различных патологиях мозга имеют разнообразные проявления такие, как падение или повышение уровня пролиферации стволовых транзиторно-амплифицирующихся клеток, снижение выживаемости новорожденных нервных клеток, аномальная локализация и aberrантные связи новорожденных нейронов, измененный паттерн дифференцировки новорожденных клеток.

Одним из ключевых вопросов здесь является вопрос о том, каков патогенетический механизм нарушения гиппокампального нейрогенеза при том, или ином, заболевании мозга. Ответ на этот вопрос позволит, во-первых, понять, каковы долгосрочные последствия нарушения нейрогенеза в целом для мозга и является ли нарушение нейрогенеза обратимым, а, во-вторых, разработать стратегии для предотвращения или компенсации дефицита пластичности гиппокампа из-за измененного нейрогенеза.

Ряд последних исследований показывает, что на различных моделях вызванных эпилептических приступов наблюдается временное усиление пролиферации клеток, с последующим падением уровня нейрогенеза в оставшийся период жизни [19–23]. Эти наблюдаемые эффекты исследователи связывают с тем, что нейрональная гиперактивация вызывает избыточный выход стволовых клеток из состояния покоя, что в конечном счете приводит к истощению их пула. Для того, чтобы подтвердить эту гипотезу мы использовали недавно разработанный нами метод для детекции *de novo* делящихся стволовых клеток на модели эпилептического приступа, вызванного введением блокатора ГАМК-рецепторов пентилентетразола. Этот метод комбинирует непрерывную продолжительную доставку одного аналога тимидина (Метка 1) с импульсным маркированием вторым аналогом тимидина (Метка 2), позволяя нам дискриминировать те клетки, которые впервые вошли в клеточный цикл, от тех, которые уже повергались нескольким раундам делений.

#### 4.2 Материалы и методы

В работе были использованы самцы мышей линии C57Bl/6 и трансгенной линии nestin-GFP [24] в возрасте 2 месяца. Все процедуры с животными проводились в соответствии с протоколом по содержанию и использованию лабораторных животных. Животные содержались в группах не более 4 особей в клетке с циклом день/ночь 12 ч.

В первой экспериментальной серии мы определяли оптимальное время для детекции эффекта индуцированного эпилептического приступа на деление стволовых клеток (рисунок 4.1 а). Для этого экспериментальным животным (группа ПТЗ, мыши C57Bl/6, n=9) внутрибрюшинно вводили пентилентетразол (ПТЗ) в дозе 70 мг. В течение 10 минут после введения ПТЗ у животных развивался эпилептический приступ. Уровень эпилептического приступа оценивали по шкале Racine [25]. Все животные в экспериментальной группе показали 4-ый уровень эпилептического приступа по шкале Racine, который характеризуется клоническими судорогами передних конечностей, потерей позы и падением. Контрольным животным (группа Контроль, мыши C57Bl/6, n=7) вводили физиологический раствор. Через 10 часов после введения ПТЗ или физиологического раствора все животные получали внутрибрюшинную инъекцию 5-бromo-2'-деоксиуридина (БрДУ) в дозе 150 мг/кг. Еще через 62 часа (72 часа после введения ПТЗ или физиологического раствора) животным вводили 5-этинил-2'-деоксиуридин (ЭтДУ) в дозе 123 мг/кг. Через 2 часа после введения ЭтДУ животные усыплялись летальной дозой хлоралгидратного наркоза. После этого проводили транскардиальную перфузию сначала раствором фосфатно-солевого буфера (PBS), а затем раствором параформальдегида для фиксации тканей. Извлеченный мозг дополнительно

фиксируют при 4°C в течение ночи. После фиксации, мозг отмывают в растворе PBS. Затем готовят на вибраторе сагиттальные срезы толщиной 50 мкм, собирают их последовательно в шесть лунок 24-луночной плашки таким образом, чтобы каждая лунка содержала целое полушарие, составленное из каждого 6-го среза [26].

По одной такой лунке от каждой мыши в эксперименте было взято для проведения окрашивания на БрДУ по стандартной методике [27]. Для этого срезы подвергали денатурированию ДНК в 1N растворе соляной кислоты. Нейтрализацию кислоты проводили 1M раствором борной кислоты. Срезы затем инкубировали в растворе первичных мышечных моноклональных антител против БрДУ. После отмывок проводили окрашивание вторичными антителами, помеченными флуорохромом Алекса-488. Срезы после окрашивания наносили на предметные стекла «мокрым» способом и заключали в специальную среду для флуоресцентной микроскопии под покровное стекло. Готовые препараты затем кодировали для подсчета вслепую. Подсчет клеток в субгранулярной зоне зубчатой извилины гиппокампа осуществлялся вручную на флуоресцентном микроскопе. Количественные данные аппроксимировали на целый мозг по ранее разработанному алгоритму [24, 28]. Количественные данные представляли в виде среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего.

В следующем эксперименте мы использовали разработанную нами схему маркирования делящихся клеток для выявления тех стволовых клеток, которые впервые вошли в клеточный цикл в определенный момент времени (рисунок 4.2 а). Для этого мы подготавливали осмотические мини-насосы (тип 1007D, ALZET® OsmoticPumps) для долгосрочной доставки БрДУ. БрДУ растворялся в диметилсульфоксиде в концентрации примерно 98 мг/мл. С помощью шприца с затупленной иглой мини-насосы заполнялись раствором. Заполненные насосы подвергались инициализации путем их инкубации в PBS в течение 4 часов. Затем инициализированные мини-насосы имплантировали подкожно самцам мышей трансгенной линии nestin-GFP. Для этого животным под действием газовой анестезии (3% и 1.5% изофлуран для индукции и поддержания анестезии, соответственно) делали разрез кожи на спине длиной не более 1 см. Затем с помощью пинцета делали карман для размещения мини-насоса, после чего мини-насос вводили в разрез. Разрез закрывали с помощью специальной металлической клипсы. Имплантированные мини-насосы обеспечивали непрерывную доставку БрДУ на протяжении 7-ми дней в дозе 50 мг/кг в день. За 36 часов до изъятия насоса экспериментальным животным (группа ПТЗ) внутрибрюшинно вводили ПТЗ в дозе 70 мг/кг (рисунок 4.2 а) и оценивали уровень эпилептического приступа по шкале Racine [25]. Десять мышей в экспериментальной группе показали 4-ый уровень эпилептического

приступа по шкале Racine. Две мыши продемонстрировали 3-ий уровень эпилептического приступа, который характеризуется подъемом и клоническими судорогами передних конечностей. Контрольным мышам (группа Контроль) мы вводили физиологический раствор. Изъятие минасоса осуществляли под действием газовой анестезии (3% и 1.5% изофлуран для индукции и поддержания анестезии, соответственно). Металлическая клипса удалялась с помощью специального пинцета, ранее сформированный разрез кожи снова раскрывался, и минасос вынимался. Изъятие минасоса приводило к прекращению доставки метки в кровоток. Рана закрывалась путем установки новой металлической клипсы. Через 14 часов после изъятия мини насосов всем животным внутрибрюшинно вводилась вторая метка ЭДУ, а затем еще через 2 часа животным проводилась эвтаназия (рисунок 4.2 а). Животные, усыпленные высокой дозой хлоралгидрата, подвергались транскардиальной перфузии сначала PBS, а затем раствором параформальдегида. Далее извлеченный мозг дополнительно фиксировали в течение ночи и приготавливали серийные срезы по методике, описанной выше.

По одной такой лунке от каждой мыши в эксперименте мы взяли на четырехцветное окрашивание для выявления одновременно ЭДУ, БрдУ, nestin-GFP и ГФКБ (глиальный фибриллярный кислый белок – маркер астроцитов). ЭДУ выявляли с помощью клик реакции, а остальные антигены – путем обработки соответствующими антителами по методике, ранее описанной в [29]. Окрашенные срезы наносили на предметные стекла «мокрым» способом. Готовые препараты сагиттальных срезов сканировали на конфокальном микроскопе NikonA1. Проводили фенотипирование и подсчет клеток включающих тимидин, на полученных изображениях срезов. Затем аппроксимировали полученные данные, на изображения целого мозга, по ранее предложенному алгоритму [24, 26]. Подсчет клеток осуществляли вслепую. Количественные данные представляли в виде среднего  $\pm$  стандартная ошибка среднего.

Статистическую обработку проводили с использованием парных критериев Стьюдента и Уэлша в зависимости от того, удовлетворяют или нет выборки условиям нормальности и равенства дисперсий.

#### 4.3 Результаты и обсуждение

В первой экспериментальной серии мы определяли оптимальное время для детектирования *de novo* делений стволовых клеток, после эпилептического приступа, вызванного введением ПТЗ. Мы проверили, когда в результате эпилептического приступа становится заметным эффект активации пролиферативной активности, основываясь на результатах ранних наблюдений [30]. Для этого мы импульсно поместили делящиеся клетки с помощью двух аналогов тимидина БрдУ и ЭДУ, введенных внутрибрюшинно

через 10 и 72 часа после индукции эпилептического приступа, вызванного ПТЗ (рисунок 4.1 А).

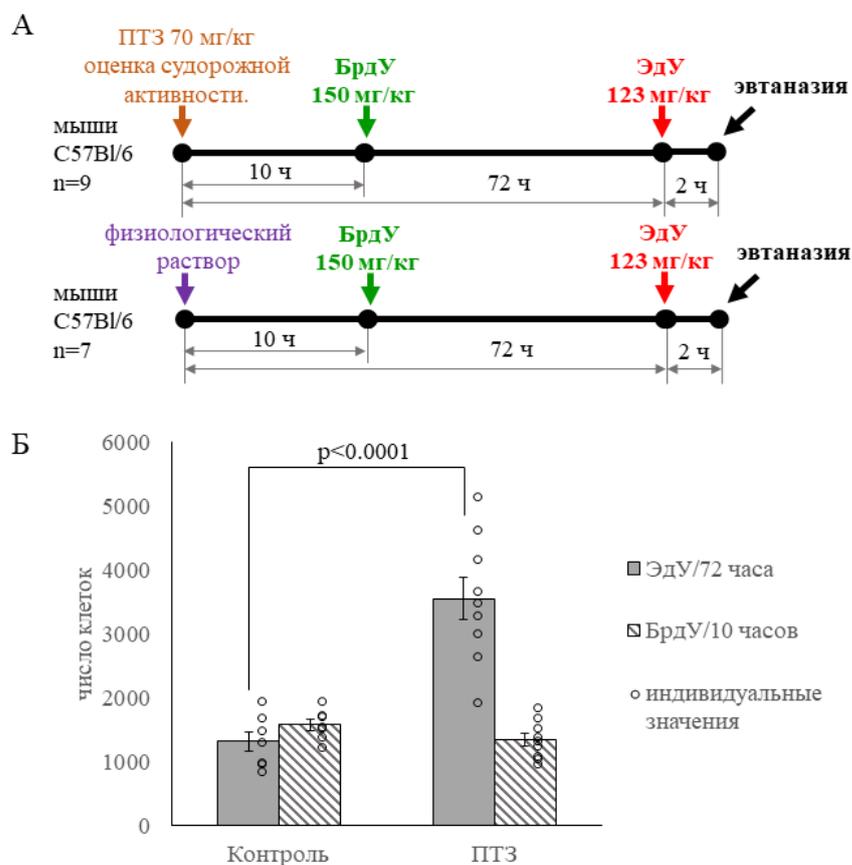


Рисунок 4.1 - Определение оптимального времени для изучения влияния эпилептического приступа, вызванного введением ПТЗ, на деление покоящихся стволовых клеток  
 А - схема эксперимента с импульсным маркированием делящихся клеток БрдУ через 10 часов и ЭдУ через 72 часа после индукции эпилептического приступа. Б - эффект эпилептического приступа, вызванного ПТЗ, на деление клеток в зубчатой извилине гиппокампа включивших метки БрдУ через 10 часов и ЭдУ через 72 после индукции эпилептического приступа. Статистическая достоверность между группами Контроль и ПТЗ определялась по критерию Уэлша.

Выбор этих времен обусловлен следующими соображениями. Интервал времени в 10 ч соответствует примерно длительности S-фазы клеточного цикла стволовых и прогениторных клеток в зубчатой извилине гиппокампа [28, 29]. Поэтому, если существуют клетки, которые входят в клеточный цикл сразу после эпилептического приступа, первая метка позволит детектировать такие клетки. Следующая временная точка, 72 ч, соответствует максимальному числу клеток, которые включают метку после индукции эпилептического приступа по литературным данным [30]. Анализ числа клеток в этом эксперименте показал, что достоверной разницы между группами ПТЗ и Контроль

по первой метке БрдУ, введенной через 10 ч после эпилептического приступа, нет. Этот результат показывает отсутствие быстрого ответа со стороны нейrogenного каскада на индуцированную нейрональную гиперактивность (рисунок 4.1 Б). В то же время, в соответствии с литературными данными [30], мы наблюдали значительное увеличение (примерно в 2.5 раза) пролиферативной активности в зубчатой извилине гиппокампа по второй метке ЭдУ, введенной через 72 часа после эпилептического приступа (рисунок 4.1 Б). Поскольку эффект на 72 ч считается максимальным, то следует ожидать, что покоящиеся стволовые клетки активируются в результате нейрональной гиперактивности в промежуток времени между 10 и 72 часами. В этой связи для дальнейших исследований мы выбрали 50-часовой временной промежуток между индукцией эпилептического приступа и анализом деления стволовых клеток.

Во второй экспериментальной серии мы проверяли гипотезу о том, вызывает или нет эпилептический приступ, индуцированный введением ПТЗ, активацию *de novo* делений стволовых клеток. Для этого мы использовали новую, разработанную нами схему маркирования клеток, которые входят в клеточный цикл в определенный момент времени (рисунок 4.2 А). В этой схеме маркирования длительная доставка на протяжении 7-ми дней аналога тимидина БрдУ с помощью осмотического микроасоса позволяет пометить все те клетки, которые подвергаются регулярным делениям. После изъятия микроасоса прекращается встраивание метки БрдУ в реплицирующуюся ДНК делящихся клеток. Поэтому клетки, которые впервые входят в S-фазу клеточного цикла в промежуток времени между изъятием микроасоса и введением второй метки ЭдУ, будут промаркированы только этой второй меткой, и не будут промаркированы меткой БрдУ. Такой способ в сочетании с фенотипированием клеток по наличию трансгена *nestin-GFP*, ГФКБ и апикального отростка позволяет напрямую идентифицировать *de novo* делящиеся стволовые клетки (рисунок 4.2 А).

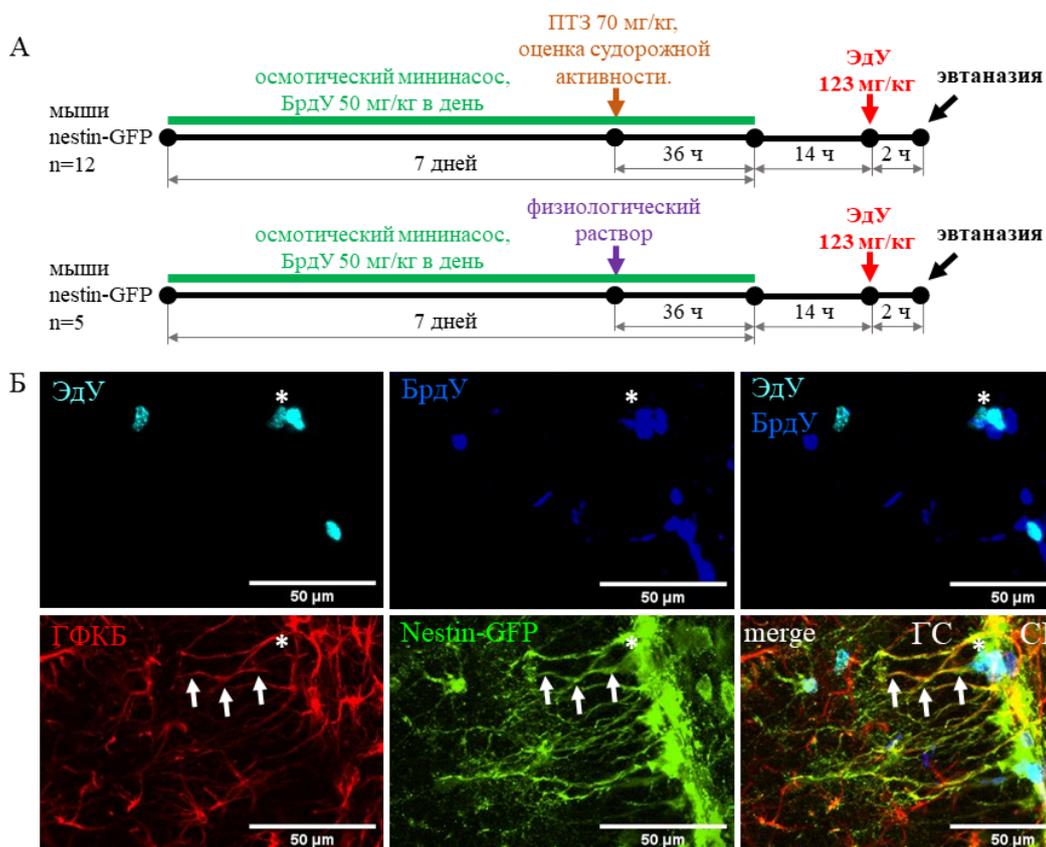


Рисунок 4.2 - Детекция *de novo* делящихся клеток на модели эпилептического приступа, вызванного введением ПТЗ

(А) - Схема эксперимента. (Б) - Идентификация *de novo* делящихся стволовых клеток в препаратах мозга трансгенных мышей *nestin-GFP*. Окраска: ЭдУ (клик реакция с флуоресцентным азидом), БрдУ (мышинные моноклональные антитела против БрдУ), *nestin-GFP* (куриные поликлональные антитела против GFP), ГФКБ (кроличьи поликлональные антитела против ГФКБ). Символом «\*» обозначено ядро стволовой клетки, которая включила ЭдУ, но при этом не была помечена БрдУ. Стрелками обозначен ее апикальный отросток. Эта стволовая клетка впервые вошла в клеточный цикл в промежуток между изъятием осмотического мининасоса и введением метки БрдУ. ГС – гранулярный слой зубчатой извилины, СГЗ – субгранулярная зона зубчатой извилины.

Анализ числа делящихся клеток по окраске на ЭдУ выявил двукратное увеличение пролиферативной активности (рисунок 4.3 А) в зубчатой извилине после индукции эпилептического приступа введением ПТЗ. Дальнейший анализ конфокальных изображений зубчатой извилины проводился путем идентификации клеток, ядра которых окрашены ЭдУ, но не БрдУ, с фенотипированием. Результаты анализа показали, что у животных, у которых был вызван эпилептический приступ, число *de novo* делящихся стволовых клеток в три раза выше по сравнению с контрольными животными (рисунок 4.3 Б). Таким образом, экспериментальные данные подтверждают гипотезу о том, что нейрогенез в зубчатой извилине гиппокампа повышается в результате активации *de novo* делений покоящихся стволовых клеток.

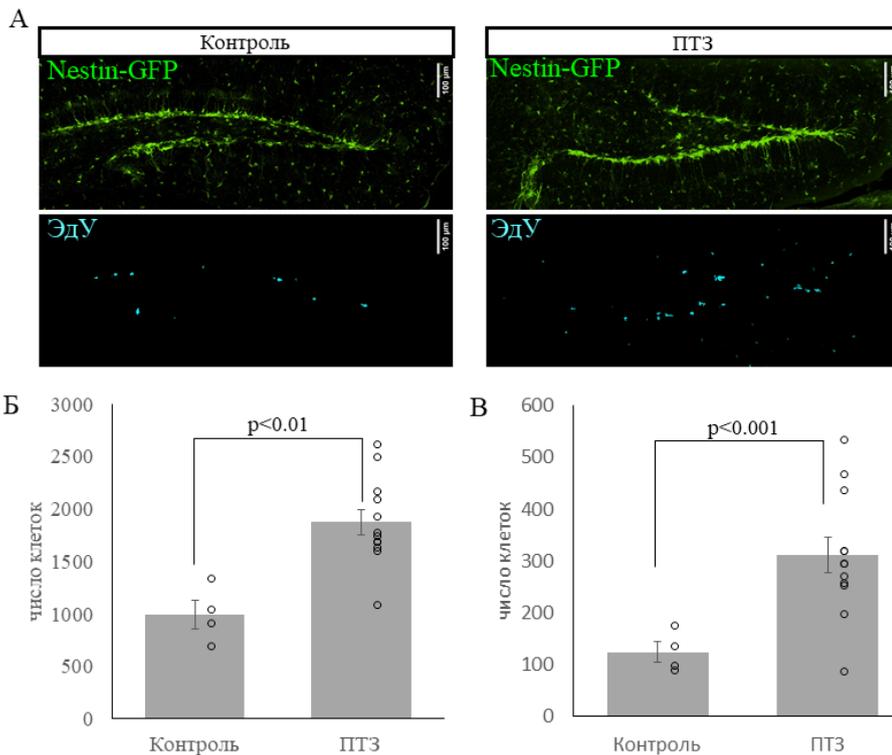


Рисунок 4.3 - Эпилептический приступ, вызванный введением ПТЗ, увеличивает пролиферацию в зубчатой извилине гиппокампа путем активации деления покоящихся стволовых клеток

А - Репрезентативные микрофотографии препаратов мозга мышей nestin-GFP в группах Контроль и ПТЗ. Б - Общее число клеток, включивших метку ЭдУ. Этот параметр отражает общую пролиферативную активность в зубчатой извилине гиппокампа. В - Число стволовых клеток, которые впервые вошли в S-фазу клеточного цикла после индукции эпилептического приступа введением ПТЗ. Статистическая достоверность между группами Контроль и ПТЗ определялась по t-критерию Стьюдента.

Полученный нами результат имеет важное значение, поскольку он раскрывает один из возможных механизмов патогенеза когнитивных нарушений при эпилепсии. Он также хорошо согласуется с рядом последних исследований, изучавших изменения нейрогенеза и жизненного цикла стволовых клеток на других моделях эпилепсии, и позволяет объяснить преждевременное истощение пула стволовых клеток, которое наблюдалось в этих работах, избыточной активацией *de novo* делений покоящихся стволовых клеток [19, 20, 31]. Кроме того, проведенное исследование валидирует разработанную нами схему маркирования с использованием аналогов тимидина для выявления *de novo* делящихся клеток. Эта схема может применяться не только изучения стволовых клеток зубчатой извилины гиппокампа, но и вообще для исследования любых стволовых клеток организма. Возможность идентификации клеток, которые редко делятся, открывает новые

перспективы для изучения клеточных механизмов самообновления тканей взрослого организма.

#### 4.4 Заключение

В своей работе мы с использованием разработанного ранее метода, позволяющего выявлять *de novo* делящиеся клетки, показываем клеточный механизм активации гиппокампального нейрогенеза при эпилептическом приступе. Гиперактивность возбуждающих нейронов при эпилептическом приступе вызывает активацию деления покоящихся стволовых клеток. Обнаруженная нами избыточная активация покоящихся стволовых клеток, вероятно, приводит к ускоренному расходу стволовых клеток и, соответственно, к преждевременному истощению их пула. Это, в конечном счете, выражается в отложенном во времени критическом снижении базального уровня гиппокампального нейрогенеза на поздних стадиях жизни. Поэтому обнаруженный нами эффект индуцированного эпилептического приступа на покоящиеся стволовые клетки гиппокампа может рассматриваться как один из патогенетических механизмов снижения когнитивных функций при эпилепсии.

Работа выполняется как совместный проект ИБР РАН, лаборатории профессора Г.Н. Ениколопова в Университете Стони Брук, г. Стони Брук, шт. Нью-Йорк, США, и лаборатории функциональной биохимии нервной системы ИВНД РАН (руководитель профессор Н.В. Гуляева). Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП по биологии развития ИБР РАН.

#### 4.5. Список используемых источников

1. Gonçalves, J.T.; Schafer, S.T.; Gage, F.H. Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior // *Cell*. - 2016. - Vol. 167. - P. 897–914, doi: 10.1016/j.cell.2016.10.021.
2. Toda, T.; Parylak, S.L.; Linker, S.B.; Gage, F.H. The role of adult hippocampal neurogenesis in brain health and disease // *Mol Psychiatry*. - 2019. - Vol. 24. - P. 67–87. doi: 10.1038/s41380-018-0036-2.
3. Anacker, C.; Hen, R. Adult hippocampal neurogenesis and cognitive flexibility — linking memory and mood // *Nat Rev Neurosci*. - 2017. - Vol. 18. - P. 335–346. doi: 10.1038/nrn.2017.45.
4. Braun, S.M.G.; Jessberger, S. Adult neurogenesis: mechanisms and functional significance // *Development*. - 2014. - Vol. 141. - P. 1983–1986. doi: 10.1242/dev.104596.
5. 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. doi: 10.1016/j.stem.2011.03.010.
6. Seri, B.; García-Verdugo, J.M.; McEwen, B.S.; Alvarez-Buylla, A. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus // *J. Neurosci*. - 2001. - Vol. 21. - P. 7153–7160.
  7. Bonaguidi, M.A.; Wheeler, M.A.; Shapiro, J.S.; Stadel, R.P.; Sun, G.J.; Ming, G.; Song, H. In vivo clonal analysis reveals self-renewing and multipotent adult neural stem cell characteristics // *Cell*. - 2011. - Vol. 145. - P. 1142–1155. doi: 10.1016/j.cell.2011.05.024.
  8. Suh, H.; Consiglio, A.; Ray, J.; Sawai, T.; D'Amour, K.A.; Gage, F.H. In Vivo Fate Analysis Reveals the Multipotent and Self-Renewal Capacities of Sox2+ Neural Stem Cells in the Adult Hippocampus // *Cell Stem Cell*. - 2007. - Vol. 1. - P. 515–528. doi: 10.1016/j.stem.2007.09.002.
  9. Kuhn, H.G.; Dickinson-Anson, H.; Gage, F.H. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation // *J. Neurosci*. - 1996. - Vol. 16. - P. 2027–2033.
  10. Spalding, K.L.; Bergmann, O.; Alkass, K.; Bernard, S.; Salehpour, M.; Huttner, H.B.; Boström, E.; Westerlund, I.; Vial, C.; Buchholz, B.A.; et al. Dynamics of Hippocampal Neurogenesis in Adult Humans // *Cell*. - 2013. - Vol. 153. - P. 1219–1227. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.002.
  11. Gould, E.; Beylin, A.; Tanapat, P.; Reeves, A.; Shors, T.J. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation // *Nat Neurosci*. - 1999. - Vol. 2. P. 260–265. doi: 10.1038/6365.
  12. van Praag, H.; Christie, B.R.; Sejnowski, T.J.; Gage, F.H. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. - 1999. - Vol. 96. - P.13427–13431. doi: 10.1073/pnas.96.23.13427.
  13. Anderson, M.L.; Sisti, H.M.; Curlik, D.M.; Shors, T.J. Associative learning increases adult neurogenesis during a critical period // *Eur J Neurosci*. - 2011. - 33. - P. 175–181. doi: 10.1111/j.1460-9568.2010.07486.x.
  14. Cameron, H.A.; Gould, E. Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus // *Neuroscience*. - 1994. - Vol. 61. - P. 203–209. doi: 10.1016/0306-4522(94)90224-0.
  15. Gould, E.; McEwen, B.S.; Tanapat, P.; Galea, L.A.; Fuchs, E. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation // *J Neurosci*. - 1997. - Vol. 17. - P. 2492–2498.

16. Kang, E.; Wen, Z.; Song, H.; Christian, K.M.; Ming, G.-L. Adult Neurogenesis and Psychiatric Disorders // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* - 2016. - Vol. 8. doi: 10.1101/cshperspect.a019026.
17. Marxreiter, F.; Regensburger, M.; Winkler, J. Adult neurogenesis in Parkinson's disease // *Cell. Mol. Life Sci.* - 2013. - Vol. 70. - P. 459–473. doi: 10.1007/s00018-012-1062-x.
18. Berger, T.; Lee, H.; Young, A.H.; Aarsland, D.; Thuret, S. Adult Hippocampal Neurogenesis in Major Depressive Disorder and Alzheimer's Disease // *Trends in Molecular Medicine.* - 2020. S1471491420301003, doi:10.1016/j.molmed.2020.03.010.
19. Fu, C.-H.; Iascone, D.M.; Petrof, I.; Hazra, A.; Zhang, X.; Pyfer, M.S.; Tosi, U.; Corbett, B.F.; Cai, J.; Lee, J.; et al. Early Seizure Activity Accelerates Depletion of Hippocampal Neural Stem Cells and Impairs Spatial Discrimination in an Alzheimer's Disease Model // *Cell Rep.* - 2019. - Vol. 27. - P. 3741-3751.e4, doi:10.1016/j.celrep.2019.05.101.
20. 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.; et al. Neuronal hyperactivity accelerates depletion of neural stem cells and impairs hippocampal neurogenesis // *Cell Stem Cell.* - 2015. - Vol. 16. - P. 488–503, doi:10.1016/j.stem.2015.04.003.
21. Scharfman, H.E.; Gray, W.P. Relevance of seizure-induced neurogenesis in animal models of epilepsy to the etiology of temporal lobe epilepsy // *Epilepsia.* - 2007. - Vol. 48. Suppl 2, 33–41, doi:10.1111/j.1528-1167.2007.01065.x.
22. Jessberger, S.; Parent, J.M. Epilepsy and Adult Neurogenesis // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* - 2015. a020677, doi:10.1101/cshperspect.a020677.
23. Hattiangady, B.; Rao, M.; Shetty, A. Chronic temporal lobe epilepsy is associated with severely declined dentate neurogenesis in the adult hippocampus // *Neurobiology of Disease.* - 2004. - Vol. 17. P. 473–490. doi:10.1016/j.nbd.2004.08.008.
24. Mignone, J.L.; Kukekov, V.; Chiang, A.-S.; Steindler, D.; Enikolopov, G. Neural stem and progenitor cells in nestin-GFP transgenic mice // *J Comp Neurol.* - 2004. - Vol. 469. - P. 311–324, doi:10.1002/cne.10964.
25. Racine, R.J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure Electroencephalogr // *Clin Neurophysiol.* - 1972. - Vol. 32. - P. 281–294, doi:10.1016/0013-4694(72)90177-0.
26. Encinas, J.M.; Enikolopov, G. Identifying and quantitating neural stem and progenitor cells in the adult brain // *Methods Cell Biol.* - 2008. - Vol. 85. - P. 243–272, doi:10.1016/S0091-679X(08)85011-X.

27. Kuhn, H.G.; Dickinson-Anson, H.; Gage, F.H. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation // *J Neurosci.* - 1996. - Vol. 16. - P. 2027–2033.
28. 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. doi:10.1016/j.stem.2011.03.010.
29. Podgorny, O.; Peunova, N.; Park, J.-H.; Enikolopov, G. Triple S-Phase Labeling of Dividing Stem Cells // *Stem Cell Reports.* - 2018. - Vol. 10. P. 615–626. doi:10.1016/j.stemcr.2017.12.020.
30. Jiang, W.; Wan, Q.; Zhang, Z.-J.; Wang, W.-D.; Huang, Y.-G.; Rao, Z.-R.; Zhang, X. Dentate granule cell neurogenesis after seizures induced by pentylenetrazol in rats // *Brain Res.* - 2003. - Vol. 977. - P. 141–148, doi:10.1016/s0006-8993(03)02438-7.
31. Мальцев Д.И., Подгорный О.В. Молекулярно-клеточные механизмы регуляции состояния покоя и деления стволовых клеток гиппокампа // *Нейрохимия.* – 2020. – Т. 37. – № 4. – С. 291-310. DOI: 10.31857/S1027813320040056.

## ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В отчет вошли все основные результаты исследований по актуальным проблемам биологии развития, выполненные в рамках общей темы, и включающие различные аспекты регенерации, развития, морфогенеза, патологических процессов и их регуляции в тканях и органах. Для решения научных задач разделов темы, были применены как традиционные методы, так и оригинальные методические разработки: молекулярно-генетические, биоинформационные, цитологический, гистологический, ингибиторный анализ, методы флуоресцентной иммунохимии и микроскопии, клеточного и органотипического культивирования (*in vitro* и *3D in vitro*), оригинальный метод тройного маркирования делящихся клеток. С использованием традиционных, оригинальных и уникальных моделей развития, регенерации и патологии *in vivo* и *in vitro* проведены разносторонние исследования механизмов дифференцировки клеток, их пластичности, развития регенерационных ответов и патологических процессов, возможностей регуляции поведением клеток под действием экзогенных факторов у широкого ряда позвоночных, получены важные перспективные результаты.

Проведена большая аналитическая и экспериментальная работа, которая позволила оценить мировое состояние проблемы на текущий момент в области изучения механизмов развития, регенерации и патологии тканей глаза позвоночных, и предлагаемые пути решения вопросов, касающихся работы регуляторных генов, эндогенных систем защиты, использования клеток-источников для восстановления и поддержания гомеостаза нейральных тканей глаза. Проведен широкий анализ данных по локализации на хромосоме эволюционно консервативных гомеобокс-содержащих генов (ГМБ) из ключевого набора, управляющих развитием глаза, экспрессии и функциях этих генов в клеточных типах сетчатки (нейронах и глии) и РПЭ в развитии и взрослом организме, с использованием электронных ресурсов, данных по экспериментальному нокауту генов, транскриптомов клеток сетчатки. Работы, выполненные, в том числе в лаборатории, на модели глаза позвоночных, демонстрируют участие изучаемых регуляторных генов не только в контроле дифференцировки и гистогенеза сетчатки и РПЭ, но также в поддержании гомеостаза этих тканей. Систематизирована информация о связи мутаций изучаемых гомеобокс-содержащих генов с нарушениями дифференцировки клеток и развитием наследственных патологий, затрагивающих сетчатку и РПЭ глаза человека. Проведенный анализ накопленных к настоящему времени экспериментальных данных, с использованием геномных, транскриптомных, геноинженерных и клеточных технологий, позволил углубить знания о сходстве и различиях регенерационного ответа клеток РПЭ у позвоночных с различным регенерационным потенциалом. Очевидно, что несмотря на

универсальность реакций раннего клеточного ответа, итог процессов при повреждении сетчатки у видов с разными регенерационными потенциальностями не равнозначен: так, у хвостатых амфибий происходит полноценное восстановление сетчатки, а у человека – эпителио-мезенхимная трансформация клеток РПЭ и развитие патологии *in vivo*. Разнообразие регенерационных ответов в тканях разных видов животных связано с особенностями структурной организации и регуляции экспрессии консервативных факторов транскрипции со стороны клеточного микроокружения, на локальном уровне, а также на уровне системной регуляции.

Исследования молекулярно-генетических механизмов клеточных ответов сетчатки неразрывны с характеристикой возможных клеток-источников для восстановления этой ткани. Проведен анализ обширного объема информации, в том числе, полученной в лаборатории, по вопросу биологии и природы клеточных источников регенерации сетчатки (КИРС) глаза у низших и высших позвоночных. Обобщены современные сведения, с одной стороны, характеризующие прогениторные свойства, присущие КИРС, с другой стороны, определяющие их дифференцировку и специализацию. Проанализировано соотношение этих свойств, которые зависят от вида и возраста животных, разнообразие способов восстановления сетчатки, при некотором сходстве экспрессии генов. Внутренний ресурс для регенерации сетчатки позвоночных включает клетки цилиарной области глаза, популяции специализированных клеток (РПЭ, глия Мюллера), принадлежащие к основным клеточным популяциям, функционирование которых нарушается в случаях развития патологических состояний глаза, сопровождающихся дегенеративными изменениями в сетчатке. Дана характеристика особенностей перечисленных клеточных популяций, которые состоят в их «готовности» к репрограммированию в нейроны в силу особого паттерна экспрессии генов и эпигенетического ландшафта, напоминающих таковые в развитии. «Готовность» к репрограммированию клеток-источников по нейрональному и глиальному пути обеспечивается сочетанием молекулярно-генетических и эпигенетических свойств прогениторов сетчатки в раннем эмбриональном развитии, и определяющих их специализацию. Эта возможность реализуется у низших позвоночных *in vivo*, а у высших – *in vitro* в перmissive условиях микроокружения.

С целью изучения роли микроокружения на проявление клеточного ответа, разработан способ получения экстрактов регенерирующей сетчатки тритона (после органотипического культивирования) для дальнейшего исследования роли факторов ниши, стимулирующих/блокирующих регенеративные ответы клеток-источников. В исследованиях возможности индукции регенеративного ответа клеток РПЭ линии ARPE-

19 человека *in vitro*, обнаружено влияние «секретом» экстрагируемого из регенерирующих тканей глаза тритона коктейля факторов, на фенотипическую пластичность клеток. Анализ морфологии и морфометрии выявил фенотипические изменения клеток ARPE-19, которые также сопровождаются модуляцией экспрессии ряда регуляторных генов и тканеспецифических генов-маркеров. Эксперименты по индукции экспрессии пронеуральных маркеров (на фоне сохраняющейся эпителио-мезенхимной трансформации клеток РПЭ) под действием кондиционированных сред (КС), которая проявляется уже в первые сутки культивирования, требуют дальнейшего изучения, как и определение активных, действующих в этом направлении компонентов «секретом». Полученные предварительные результаты также дают основания для продолжения исследований по выявлению регуляторных факторов, активирующих дедифференцировку РПЭ, блокирующих последующую дифференцировку в ретинальные клетки (нейроны и глию), и способствующих дифференцировке в фибробластоподобные клетки.

В совокупности, полученные экспериментальные результаты, а также детальный анализ имеющихся в научной литературе данных в этой области исследований, позволяют сделать вывод, как о сходстве, так и таксоно специфических различиях в развитии регенеративного ответа клеток РПЭ позвоночных, на клеточном, геном и эпигенетическом уровне. Различия затрагивают работу ряда сигнальных путей, и регуляторных генов из числа гомеобоксодержащих. Различия в молекулярно-генетических механизмах, лежащих в основе эпителио-мезенхимной трансформации РПЭ, проявляющейся при разобщении с нейральной сетчаткой у человека при патологии, так и *in vitro*, подтверждают точку зрения, согласно которой наиболее многообещающими в экспериментальной и клинической работе являются стратегии нейропротекции, направленные на мобилизацию эндогенных защитных систем, поддержание гомеостаза сетчатки и РПЭ.

В отчетной работе получили развитие исследования влияния внешних факторов, в частности, направленного избыточного освещения на развитие патологических структурных изменений и процессов старения клеток РПЭ *in situ*, на модели глаза крыс-альбиносов. Получены важные результаты, указывающие на то, что раннее развитие патологических процессов в РПЭ (от 2 нед до 2 мес постнатального развития) сопровождается увеличением относительного содержания двуядерных клеток и накоплением липофусцина. Очевидно, что в основе механизмов быстрого прогрессирования этих изменений лежат интенсивно протекающие под действием избыточной иллюминации, реакции перекисного окисления липидов и накопления

липофусцина, в виду отсутствия в клетках РПЭ меланина – ключевого участника системы антиоксидантной защиты клеток.

В исследованиях компонентов эндогенных регуляторных систем в тканях глаза человека в пренатальном развитии (сетчатке, хрусталике и стекловидном теле 13, 17 и 19 недельных плодов человека) изучена динамика экспрессии TLRs: обнаружена корреляция экспрессии мРНК *TLR2*, *TLR4*, *TLR7*, *TLR9* с локализацией соответствующих белков. В стекловидном теле глаза плодов человека в период с 17-31 нед гестации, определено снижение содержания билирубина, выполняющего функцию антиоксиданта в тканях глаза, и участвующего в реакциях врожденного иммунитета. Результаты наших исследований, в совокупности с данными литературы, дают основание для заключения о том, что билирубин, помимо роли в дифференцировке клеток глаза, вовлечен в работу систем защиты сетчатки и хрусталика от процессов перекисного окисления липидов, высокое содержание которых свойственно этим тканям глаза.

На модели экспериментально индуцируемой ЭМТ клеток печени мыши, обнаружена новая мишень – гиалуронансинтаза, для фармакологических ингибиторов (этоксазол, бупрофезин, трифлумурон) синтеза хитинсинтазы. Проведенный биоинформационный анализ гомологии хитинсинтазы и гиалуронансинтазы, являющихся маркерами развития воспаления и фиброза, подтвердил возможность применения изучаемых препаратов для эффективного ингибирования избыточной активности гиалуронансинтазы.

Выявлен клеточный механизм активации нейрогенеза, на модели нейропатологии гиппокампа мыши, с использованием разработанного ранее метода тройного мечения, позволяющего детектировать *de novo* делящиеся клетки. Обнаружено, что при экспериментально индуцируемой эпилепсии, гиперактивность возбуждающих нейронов стимулирует избыточное деление покоящихся стволовых клеток. Высказано предположение о том, что ускоренное расхождение стволовых клеток является причиной преждевременного истощения их пула, и отложенному во времени критическому снижению базального уровня нейрогенеза в гиппокампе в поздние периоды жизни. Обнаруженный эффект важен для развития представлений о механизмах снижения когнитивных функций при нарушении нейрогенеза при нейропатологиях, поиска способов нейропротекции.

Результаты, полученные с использованием широкого круга экспериментальных моделей, способствуют пониманию механизмов дифференцировки клеток в развитии и регенерации; пластичности клеток при регенерации и патологии; стратегий регенерационных ответов и возможностей их использования у человека; работы эндогенных защитных систем в поддержании гомеостаза тканей, создают предпосылки

для развития биомедицинских подходов к регуляции этими процессами. Результаты проведенных исследований позволили углубить знания о некоторых клеточных и молекулярных мишенях, компонентах клеточного микроокружения (ниши), информация о которых может быть также полезна для диагностики патологий тканей и разработки способов их коррекции.

## ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ГЗ 0108-2020-0005

### \*отчетные публикации

1. **\*Markitantova Yu.V., Simirskii V.N.** Inherited retinal diseases through the eyes of homeobox genes // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. Т. 21. No 5. – P. 1602. DOI: 10.3390/ijms21051602. (WoS, Scopus) – Q1
2. **\*Grigoryan E.N.** Potential Endogenous Cell Sources for Retinal Regeneration in Vertebrates and Humans: Progenitor Traits and Specialization // *Biomedicines.* – 2020. – Vol. 8. – P. 208. DOI: 10.3390/biomedicines8070208. (WoS, Scopus) – Q1
3. **Markitantova Yu.V., Simirskii V.N.** Role of the Redox System in Initiation of a Regenerative Response of Neural Eye Tissues in Vertebrates// *Russian Journal of Developmental Biology.* – 2020. – Vol. 51. – Is. 1. – P. 16-30. DOI: 10.1134/S106236042001004X. (WoS, Scopus) – Q4
4. **Novikova Yu.P., Poplinskaya V.A., Grigoryan E.N.** Organotypic Culturing as a Way to Study Recovery Opportunities of the Eye Retina in Vertebrates and Humans//*Russian Journal of Developmental Biology.* – 2020. – Vol. 51. – Is. 1. – P. 31-44. DOI: 10.1134/S1062360420010063. (WoS, Scopus) – Q4
5. **Markitantova Y.V.1, Novikova Y.P.1, Poplinskaya V.A.1, Grigoryan E.N.1** Expression of FGF2 and Nucleostemin in Models of Retinal Regeneration in the Newt Under Conditions of 3D Organotypic Culture In vitro // *EC Ophthalmology.* – 2020. – Vol. 11.1. – P. 01-09. DOI:10.31080/ecop.2020.11.00580. – RSCI
6. **Shafei E.V., Rzhanova L.A., Novikova Yu.P., Kurinov A.M., Grigoryan E.N., Aleksandrova M.A., Kuznetsova A.V.** Response of human pigment epithelial cells to the effect of the media conditioned of newt retinal regenerates // *Cell and Tissue Biology (Цитология).* - 2020. - Т. 62. - № 9. DOI: 10.31857/S0041377120090060 – Q4
7. **Панова И.Г.1, Сухова Ю.В., Татиколов А.С., Иванец Т.Ю.** Билирубин в стекловидном теле глаза плодов человека // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* - 2020. - Т.170. - № 7. - С. 118-120. – RSCI
8. **Burmenskaya O.V., Poltavtseva R.A., Panova I.G.** mRNAs of Genes of Toll-Like Receptors are Expressed in Human Fetal Eye Tissues // *Russian Journal of Developmental Biology.* - 2020. - Vol. 51. - No. 5. - P. 304-308. DOI: 10.1134/S1062360420050033. – Q4
9. **Новикова Ю.П., Григорян Э.Н.** Раннее появление признаков старения в ретиальном пигментном эпителии у молодых крыс альбиносов // *Онтогенез.* – 2020. – Т. 51. – № 6. – С. 440-449. DOI: 10.31857/S0475145020060063. – Q4

**10.** Мальцев Д.И., Подгорный О.В. Молекулярно-клеточные механизмы регуляции состояния покоя и деления стволовых клеток гиппокампа // Нейрохимия. – 2020. – Т. 37. – № 4. – С. 291-310. DOI: 10.31857/S1027813320040056.

Отчет утвержден на заседании Ученого совета, протокол № 10 от 29 декабря 2020 г.