# 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. № 0088-2021-0017

Рег. № НИОКТР АААА-А21-121011490126-4

УТВЕРЖДАЮ

Директор ИБР РАН

доктор биологических наук,

улен-корреспондент РАН

А.В. Васильев

« 28» дека

абря 🗸 2021

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

(промежуточный)

Руководитель НИР, заведующий лабораторией, кандидат биологических наук Ю.В. Маркитантова

подпись, дата

### СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель, главный научный Ю.В. Маркитантова, сотрудник, кандидат биологических наук (раздел 1,3) подпись, дата 28-12.2021 Исполнители: Э.Н. Григорян Главный научный сотрудник, доктор (раздел 1,3) биологических наук подпись, дата 28,12.2021 Старший научный сотрудник, кандидат В.Н. Симирский биологических наук (раздел 1) подпись, дата 28.12.2021 Старший научный сотрудник, кандидат А.С. Микаелян (раздел 2) биологических наук подпись, дата 28.12.2021 Научный сотрудник, кандидат Е.А. Радугина (раздел 3) биологических наук подгись, дата 28.12.2021 Главный научный сотрудник, доктор М.А. Александрова биологических наук (раздел 4) подпись, дата 28.12.2021 Научный сотрудник, кандидат К.К. Сухинич биологических наук (раздел 4) подпись, дата 28.12.2021 Нормоконтроль, руководитель Е.Б. Абрамова информационно-аналитического отдела, подпись, дата кандидат биологических наук

#### РЕФЕРАТ

Отчет 109 с., 23 рисунка, 3 таблицы, 194 источника, 14 отчетных публикаций. РЕГЕНЕРАЦИЯ И ПАТОЛОГИЯ, ТКАНИ И ОРГАНЫ, КЛЕТКИ-ИСТОЧНИКИ РЕГЕНЕРАЦИИ СЕТЧАТКИ И СТРУКТУР НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ, СТРАТЕГИИ РЕГЕНЕРАТИВНОГО ОТВЕТА, ТРАНСДИФФЕРЕНЦИРОВКА, ПРОЛИФЕРАЦИЯ, ЭПИТЕЛИО-МЕЗЕНХИМНАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ, МОРФОГЕНЕЗ ТКАНЕЙ ГЛАЗА, НЕЙРОГЕНЕЗ, СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ, РЕГУЛЯТОРНЫЕ ФАКТОРЫ, СТРАТЕГИИ РЕКРУТИРОВАНИЯ ЭНДОГЕННОГО РЕГЕНЕРАЦИОННОГО ПОТЕНЦИАЛА И НЕЙРОПРОТЕКЦИИ

Исследования выполнены на традиционных, оригинальных и уникальных моделях *in vivo* и *in vitro*. Цель исследований – изучение молекулярно-генетических механизмов дифференцировки, де- и трансдифференцировки клеток и морфогенетических механизмов развития тканей, образующихся *de novo* у позвоночных при регенерации; стратегий регенерационного ответа; роли факторов микроокружения в поддержании гомеостаза ткани; поиск способов регуляции восстановительных процессов, предусматривающих использование эндогенных ресурсов и экзогенного клеточного потенциала для регенерации.

Проведен анализ результатов, раскрывающих явление трансдифференцировки, на примере конверсии клеток ретинального пигментного эпителия глаза у амфибий и млекопитающих *in vivo* и *in vitro*. Выявлены общие закономерности в механизмах клеточных и молекулярных событий при нарушении связи клеток ретинального пигментного эпителия и нейральной сетчатки.

Проведен анализ условий выбора клетками ретинального пигментного эпителия разных молекулярных стратегий для конверсии — в нейральном направлении у хвостатых амфибий и мезенхимном — у млекопитающих. Отмечена двойственная роль ключевых компонентов эндогенных регуляторных систем (пуринергической сигнальной системы) в контроле пролиферации, дифференцировки клеток, нейродегенерации и нейропротекции.

Разработан и применен способ внутриартериальной трансплантации нейральных прогениторов и МСК человека крысам с моделью инсульта для изучения регенеративного потенциала мозга; на модели продемонстрировано уменьшение объема зоны повреждения мозга.

Доказано, что фармакологические препараты этоксазол, бупрофезин, трифлумурон могут служить новым источником для разработки ингибиторов гиалуронансинтазы, вовлеченной в развитие воспалительного процесса и эпителио-мезенхимного перехода.

Данные получены на модели эксперментально индуцируемого эпителио-мезенхимного перехода клеток печени мыши с использованием биоинформационного и ингибиторного анализа.

Результаты проведенных исследований важны для разработки стратегий поддержания гомеостаза, коррекции патологических изменений и стимуляции восстановительных процессов в тканях и органах (ретинальный пигментный эпителий, сетчатка глаза, мозг, печень И др.), выявления биомаркеров мишеней фармакологических препаратов молекулярно-нацеленного действия.

### СОДЕРЖАНИЕ

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ7
ОБЩЕЕ ВВЕДЕНИЕ9
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ11
РАЗДЕЛ 1 КЛЕТОЧНЫЕ, МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ
МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ И РЕГЕНЕРАЦИИ ТКАНЕЙ ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ
И ЧЕЛОВЕКА11
Подраздел 1.1 Молекулярные стратегии трансдифференцировки клеток ретинального
пигментного эпителия у амфибий и млекопитающих <i>in vivo</i>
Подраздел 1.2 Малые некодирующие РНК в регуляции дифференцировки ретинального
пигментного эпителия позвоночных. Изучение механизмов эпителио-мезенхимного
перехода
Подраздел 1.3 Изучение действия компонентов секретома из кондиционированных сред
регенератов тканей глаза Urodela на фенотип и экспрессию генов в клетках пигментного
эпителия сетчатки человека <i>in vitro</i>
Подраздел 1.4 Эндогенные регуляторные системы в контроле клеточных процессов,
гомеостаза и патогенеза сетчатки глаза позвоночных
РАЗДЕЛ 2 МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ КАНЦЕРОГЕНЕЗА И РЕГЕНЕРАЦИИ
ПЕЧЕНИ74
Подраздел 2.1 Ингибирование отложения гиалуронана новыми соединениями кумарина и
ингибиторами синтеза хитина
РАЗДЕЛ 3 МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИЗМЕНЕНИЙ РЕГЕНЕРАЦИОННЫХ
ПРОЦЕССОВ У ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ ПОД ВЛИЯНИЕМ ФАКТОРОВ
ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ87
Подраздел 3.1. Исследование состояния естественной ювенильности и способности к
регенерации у хвостатых амфибий. Перспектива приложения полученных результатов в
биомедицине
РАЗДЕЛ 4 МЕХАНИЗМЫ ПЛАСТИЧНОСТИ СТВОЛОВЫХ И ПРОГЕНИТОРНЫХ
КЛЕТОК В ПРОЦЕССАХ РЕГЕНЕРАЦИИ РАЗЛИЧНЫХ СТРУКТУР НЕРВНОЙ
СИСТЕМЫ
Подраздел 4.1 Разработка подходов к моделированию развития и регенерации ЦНС
млекопитающих с использованием трансплантации стволовых/прогениторных клеток
разного генеза

ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ	104
ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ЗА 2021 ГОД	108

#### ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

В настоящем отчете о НИР применяют следующие сокращения и обозначения:

АФК – активные формы кислорода

ВЯС – внутренний ядерный слой

ВКМ – внеклеточный матрикс

ВМД – возрастная макулярная дегенерация сетчатки

ГАМК – гамма-аминомасляная кислота

ГК – гиалуроновая кислота

ГФКБ – глиальный фибриллярный кислый белок

ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

ИЦХ – иммуноцитохимия

кПЦР – количественная полимеразная цепная реакция

КС – кондиционированная среда

ЛП – латентные прогениторы

МикроРНК – miRNAs

МГ – глия Мюллера

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

НП – нейральные прогениторы

НС – нейральная сетчатка

НСПК – нейральные стволовые прогениторные клетки

НЯС – наружный ядерный слой

ОТ-ПЦР – обратная транскрипция, полимеразная цепная реакция

ОС – окислительный стресс

ПСС – пуринергическая сигнальная система

ПВР – пролиферативная витреоратинопатия

РС – регенерат сетчатки

РПЭ – ретинальный пигментный эпителий

СК – стволовые клетки

ТФ – транскрипционные факторы

ЦМЗ – цилиарно-маргинальная зона

ЦКП – центр коллективного пользования

ЭМП – эпителио-мезенхимный переход

ЭМ – эпиретинальная мембрана

ARPE-19 – линия клеток РПЭ глаза человека

α-SMA – Гладкомышечный актин альфа

BDNF (brain-derived neurotrophic factor) нейротрофический фактор мозга

ВМР – костный морфогенетический белок

C57Bl – инбредный штамм лабораторной мыши

CC14- тетрахлорметан

CRALBP – клеточный ретинальдегид связывающий белок

CV – центральная вена

DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндол

ENTPD эктонуклеозидтрифосфатдифосфогидролаза

ERK- extracellular signal-regulated kinase

FGF2 – фактор роста фибробластов 2

5'-СрG-фрагменты – динуклеотиды, мишени метилирования в ДНК

НАВР – гиалуронан связывающий белок

IC50 – расчетная ингибирующая концентрация

IntDen – интенсивность флуоресцентного сигнала

LRAT – лецитинретинолацилтрансфераза

LV – латеральный желудочек

МАРК - митоген-активируемые протеинкиназы

MD5HAS – домен амфифильной цитоплазмы

МТТ- дифенилбромид тетразолия

4MU – кумарин-4-метилумбеллиферон

NIH/3T3 – линия эмбриональных фибробластов мыши

NGF – nerve growth factor – фактор роста нервов

PCNA – proliferating cell nuclear antigen – ядерный антиген пролиферирующих клеток

PKC – protein kinase C – протеин киназа С

PLC – phospholipase C – фосфолипаза-С

PEDF – пигментный фактор эпителиального происхождения

QI – количественный индекс интенсивности флуоресценции

RPE65 – Retinal pigment epithelium-specific 65 kDa protein Asma – гладкомышечный актин

siRNAs – Малые интерферирующие РНК

5TMSER – alpha Ligand-binding Domain

UDP-GlcNAc – субстрат для хитинсинтаз и гиалуронансинтаз

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов

#### ОБЩЕЕ ВВЕДЕНИЕ

Изучение регенерации и патологии тканей и органов, возможностей регуляции этими процессами, является приоритетным направлением современной биологии развития и регенеративной медицины, опирающейся на достижения фундаментальной науки. Ключевые вопросы лежат в русле изучения механизмов дифференцировки, де- и трансдифференцировки клеток, фенотипической пластичности стволовых прогениторных клеток, при регенерации сетчатки глаза и различных структур нервной системы; поиска факторов инициации регенерации; выявления стратегий регенерационных ответов: дедифференцировка клеток и/или активация клеток со свойствами стволовых, пролиферация прогениторных клеток, выявлением общности и различий в поведении одноименных клеток на начальных этапах регенерации, ведущих к полноценной регенерации, или эпителио-мезенхимной трансформации клеток при травмах и/или патологических состояниях.

К настоящему времени накоплена обширная информация о клетках-источниках, представляющих эндогенный или экзогенный потенциал для регенерации тканей глаза у позвоночных, ограничениях и перспективах применения клеток-источников при нейродегенеративных патологиях глаза человека, роли ключевых сигнальных белков, транскрипционных факторов, нейротрансмиттеров. Клетки-источники регенерации сетчатки представлены: стволовыми, малодифференцированными, также специализированными предшественниками латентными прогениторами  $(\Pi\Pi)$ . Приоритетными направлениями в области регенерации остаются: исследование молекулярно-генетического профиля клеток-источников, изучение механизмов клеточной пластичности, рекрутирования и стимуляции эндогенного резерва для регенерации у млекопитающих, разработка эндогенных регенеративных технологий по созданию благоприятной ниши для мобилизации (хоминга) резидентных СК. С учетом имеющихся к настоящему времени сведений проводятся исследования роли ключевых компонентов эндогенных регуляторных систем, локальных и системных организменных факторов (сигнальных путей, факторов ниш стволовых и прогениторных клеток), а также факторов, способных регулировать поведение клеток-источников. внеклеточных Современный уровень развития и применение геномных технологий, секвенирования транскриптомов изолированных клеток, клеточных технологий изучении фундаментальных вопросов регенерации подводит к пониманию ключевых основ многих регенерационных процессов, их сходства и различий, в контексте работы генных сетей (сигнальных путей, факторов транскрипции, трансмиттеров), эпигенетических условий, блокирующих или способствующих восстановлению тканей и поддержанию гомеостаза.

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 объектами исследования служат низшие и высшие позвоночные, традиционные модели in vivo и in vitro, в том числе оригинальные, разработанные в лаборатории. В рамках разделов темы решались частные вопросы с использованием следующих моделей: эпиморфная регенерация сетчатки из ретинального пигментного эпителия (РПЭ) глаза у низших позвоночных, хвостатых амфибий (Urodela) в системе *in vivo*; органотипическое культивирование тканей заднего сектора глаза Urodela в системе 3D-in vitro-like-in vivo; клеточная культура ретинального пигментного эпителия (линия ARPE-19) человека; модели эксперментально индуцируемого ЭМП и фиброза клеток печени взрослых мышей; моделях нейрогенеза. Регенеративный потенциал мозга изучался с применением оригинального метода внутриартериальных трансплантаций нейральных прогениторных и мезенхимальных стволовых клеток человека крысам с экспериментально моделируемым инсультом. Исследования выполнены 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.

подходы Разносторонние на моделях in vivo, клеточных, тканевых, органотипических моделях in vitro, 3D-in vitro-like-in vivo позволили выявить как общие для позвоночных животных и человека закономерности молекулярно-генетического контроля дифференцировки клеток при регенерации одноименных тканей и органов, так и таксономические особенности; идентифицировать новые биомаркеры – мишени молекулярно-нацеленного действия. Разрабатываемые в лаборатории оригинальные подходы направлены на поддержание гомеостаза и восстановление ткани и ее функции и находят практическое приложение в различных отраслях медицины, в частности, в оптимизации методов трансплантологии и таргетной терапии.

#### ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

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

Подраздел 1.1 Молекулярные стратегии трансдифференцировки клеток ретинального пигментного эпителия у амфибий и млекопитающих *in vivo* 

#### 1.1.1. Введение

В нормальных не патологических для тканей организма условиях клетки взрослых позвоночных сохраняют стабильность дифференцировки, которая достигается посредством эпигенетической регуляции В совокупности c экспрессией транскрипционных факторов (ТФ). И то и другое диктуется клеточным микроокружением и общеорганизменными регуляторными факторами. Противоположными состоянию стабильности являются де- и трансдифференцировка клеток. У взрослых рыб и амфибий процессы клеточных де- и трансдифференцировки лежат в основе регенерации утраченных или поврежденных тканей и органов [1].

Ярчайшими, ставшими классическими примерами регенерации путем трансдифференцировки является восстановление сетчатки и хрусталика из клеток пигментированных эпителиев глаза Urodela. Эти модели на протяжении многих лет многосторонне исследовались для того, чтобы выявить внутри- и внеклеточные механизмы, лежащие в основе тканевой и органной регенерации у позвоночных животных.

В лабораториях ИБР РАН, благодаря профессорам Строевой О.Г. и Миташову В.И., создавшим и обогатившим направление исследований развития и регенерации тканей глаза в норме и патологии, особое внимание уделялось модели регенерации сетчатки за счет клеток РПЭ у Urodela [2]. Зарубежные исследователи активно изучали молекулярные механизмы процессов пролиферации и конверсии клеток РПЭ в мезенхимном направлении, приводящие к развитию пролиферативной витреоретинопатии (ПВР) и других заболеваний глаз, обусловленных пролиферацией и приобретением клетками РПЭ мезенхимной дифференцировки [3].

В работе проведено обобщение большого объема информации, раскрывающего явление трансдифференцировки на примере конверсии клеток РПЭ глаза у амфибий и млекопитающих *in vivo*, полученного как в лаборатории, так и при анализе данных научной литературы. Две различающиеся стратегии изменений дифференцировки РПЭ – в

нейральном направлении у амфибий и мезенхимном у млекопитающих находятся под многоуровневым регуляторным контролем, освещенном в данной работе. Особое внимание уделено анализу времени и условий выбора клетками РПЭ молекулярных стратегий для конверсии в столь разных направлениях, а также данным о генетическом и эпигенетическом состоянии клеток РПЭ на ключевом этапе трансдифференцировки – при входе клеток в пролиферативный цикл и фазу репрограммирования генома.

#### 1.1.2 Материал и методы

Обобщена информация о молекулярно-генетических, эпигенетических и поведенческих свойствах клеток РПЭ животных разных классов и человека. Проанализированы их сходства и отличия, в частности, на различных этапах конверсии — от инициации до морфогенеза новой сетчатки у амфибий и развития фиброзной ткани при патологии глаза у млекопитающих, в том числе, человека. Подробно освещены механизмы регуляции конверсии клеток РПЭ со стороны клеточного микроокружения и систем организма, их сходства и отличия у низших и высших позвоночных и человека. Аналитическая работа опиралась на совокупность результатов, в том числе, полученных на протяжении длительного времени в лаборатории проблем регенерации, а также сведения электронных ресурсов PubMed, Science Direct, Research Gate, NCBI. На основании проведенного анализа опубликована статья, включающая 238 источников [4].

#### 1.1.3. Результаты и обсуждение

В начале работы дается подробная характеристика ткани – РПЭ, его строения, функции, обсуждается значительное сходство ткани у всех позвоночных животных. За этим следует анализ процессов де- и трансдифференцировки, присущих ряду тканей *in vivo* у разных классов животных и у человека. Трансдифференцировка является глубокой реорганизацией клетки на всех уровнях – от транскрипционного до морфогенетического (при формировании *de novo* ткани из претерпевших конверсию клеток). Несомненно, что внеклеточные сигналы, регулирующие процесс трансдифференцировки, должны работать координировано, носить четкий пространственно-временной характер. Многие из регулирующих факторов известны, однако, картина их динамической сети *in vivo* еще далека от завершения. В настоящее время предполагается, что работа ТФ и регулируемый эпигенетический ландшафт, способные активировать или подавлять ту или иную программу экспрессии генов, лежат в центре событий трансдифференцировки [5]. В последнее время стало возможным изучение геномов и транскриптомов представителей Urodela – основных объектов исследования трансдифференцировки; получило развитие

изучение эпигенома клеток глаза позвоночных. На этапе морфологических исследований трансдифференцировки еще не было арсенала современных подходов и методов, однако, именно тогда О.Г. Строевой и В.И. Миташовым в основу направления работы было заложено представление о «переключении работы генов», как основополагающем событии конверсии клеточного типа. Это позволило со временем вывести решение проблемы трансдифференцировки на уровень изучения ее молекулярных механизмов и регуляции *in vivo* как у нас в стране, так и за рубежом.

Трансдифференцировка клеток РПЭ у взрослых амфибий и млекопитающих іп vivo. РПЭ хвостатых амфибий обладает способностью к регенерации сетчатки и дает яркий пример естественной конверсии в ретинальные клетки іп vivo. После повреждений глаза (отслойки сетчатки, ее удаления, перерезки зрительного нерва) РПЭ становится источником воспроизводства новой сетчатки (рисунок 1.1.1 А). Основными событиями процесса трансдифференцировки являются: выход клеток из слоя РПЭ, потеря исходных черт и свойств (дедифференцировка), амплификация, формирование промежуточной популяции пролиферирующих нейробластов, выход их из цикла репродукции и дифференцировка ретинальных клеточных типов (рисунок 1.1.1 А).

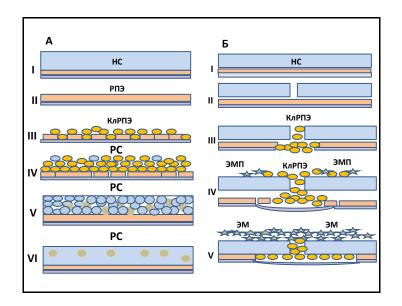


Рисунок 1.1.1 - Последовательные стадии регенерации сетчатки у амфибий (A) и развития пролиферативной ретинопатии у млекопитающих (Б)

HC — нейральная сетчатка;  $P\Pi$  — ретинальный пигментный эпителий; Kл $P\Pi$  — трансдифференцирующиеся клетки  $P\Pi$  Э; PC — регенерат сетчатки;  $P\Pi$  — эпителиомезенхимный переход;  $P\Pi$  — эпиретинальная мембрана.

У человека, как и у амфибий, в ответ на повреждение сетчатки клетки РПЭ теряют свои эпителиальные характеристики, вымещаются из слоя, мигрируют и пролиферируют, трансдифференцируясь при этом в мезенхимные клетки, подобные миофибробластам; при

движении за пределы сетчатки они избегают клеточной гибели и синтезируют компоненты ВКМ, участвуя в формировании эпиретинальной мембраны (ЭМ) (рисунок 1.1.1 Б). Образование ЭМ в ответ на повреждение нейральной сетчатки (НС) приводит к сокращению ЭМ вместе с НС, что значительно снижает зрение. Описаны этапы процесса и их регуляция. Превращения клеток РПЭ млекопитающих *in vivo* при ЭМП подпадает под определение «трансдифференцировка», хотя встречаются и другие определения, например, «дисфункция РПЭ» [3].

Инициация процесса клеточной конверсии в РПЭ амфибий и млекопитающих. Установлено, что триггером трансдифференцировки является разобщение НС и РПЭ, в частности разрушение интерфоторецепторного матрикса (IPM), обеспечивающего взаимодействие между двумя тканями сетчатки и их жизнеспособность. Дезинтеграция в свою очередь является триггером событий, суммированных в таблице 1.1.

Таблица 1.1 - Сходство основных событий и их клеточных и молекулярных последствий при нарушении связи клеток ретинального пигментного эпителия и нейральной сетчатки

Основные события при нарушении связи РПЭ и НС	Клеточные и молекулярные последствия инициации трансдифференцировки РПЭ in vivo у амфибий	Клеточные и молекулярные последствия инициации трансдифференцировки РПЭ при отслойке сетчатки у человека
Разрушение связи апикальных отростков РПЭ и фоторецепторов	Разрушение ИФМ, ослабление и потеря контактов между клетками РПЭ и связи с мембраной Бруха, выход клеток из слоя, потеря эпителиальной морфологии, вход в S-фазу клеточного цикла	Разрушение ИФМ, ослабление и потеря контактов между клетками РПЭ и связи с мембраной Бруха, выход клеток из слоя, потеря эпителиальной морфологии, вход в S-фазу клеточного цикла
Нарушение зрительного цикла, апоптоз части клеток в РПЭ и НС	Прекращение синтеза меланина, down-регуляция белков зрительного цикла и специфических белков РПЭ	Прекращение синтеза меланина, down-регуляция белков зрительного цикла и специфических белков РПЭ
Изменения в кровеносной и иммунной системах в задней стенке глаза	Активация фибринолитических компонентов крови (TF, thrombin) и системы комплемента (C3, C5)	Активация фибринолитических компонентов крови (tPA), белков и клеток воспаления
Активация ростовых факторов и сигнальных путей	FGF2, IGF1, TGFβ, MEK-ERK	PEDF, VEGF, FGF1,2, CNTF, BDNF, IGF1, TGFβ, MAPK-ERK
Up-регуляция экспрессии HSPs и генов раннего peaгирования (immediate-early response genes)	HSPs 70, 90; <i>c-Myc</i>	HSPs, c-Fos,c-Jun, AP1-complex
Ремоделирование внеклеточного матрикса и цитоскелета РПЭ	Участие фибронектина, ламинина, тенасцина, и N-CAM Ингибирование цитокератинов и начало экспрессии белков нейрофиламентов (NF-200)	приментина и Стнар инципиания

SMA)

Изменение цитоскелета, контактов и компонентов BKMходе трансдифференцировки клеток РПЭ амфибий и млекопитающих. Цитоскелет клеток РПЭ является отражением его эпителиальной и функциональной специализации, а также фенотипической пластичности. Мы исследовали состояние цитоскелета клеток РПЭ тритона Pl. waltlii в норме и в начале конверсии. Индукция к репрограммированию РПЭ путем изоляции НС (удаление, отслойка) приводила к ингибированию экспрессии цитокератинов в клетках, находящихся еще в слое РПЭ. То же наблюдалось при изоляции и диссоциации клеток РПЭ тритона, что было вызвано меняющимися условиями: потерей контактов клеток друг с другом, выстилающей РПЭ мембраной Бруха и фоторецепторами НС, т.е. с утерей трехмерного окружения. В то же время, во-первых, в выселяющихся из слоя и меняющих фенотип клетках РПЭ инициировалась экспрессия пан-нейрального белка NF-200 при наличии в цитоплазме пигментных гранул. Данные свидетельствует о том, что замещение специфических белков цитоскелета РПЭ (цитокератинов на паннейральные белки) в данном случае входит в программу трансдифференцировки. Наши предварительные данные о локализации белков ZO (zonula occludens), ассоциированных с плотными контактами РПЭ, показали увеличение экспрессии ZO-1 и перераспределение клеточным поверхностям РПЭ. В стабилизации и пластичности клеточной дифференцировки существенную роль играет ВКМ. Нами отмечены динамические изменения в локализации и экспрессии фибронектина, тенасцина и N-CAM в случае микрохирургической отслойки сетчатки Ha тритона. раннем этапе трансдифференцировки РПЭ тритона, обнаружена также ядерная транслокация бетакатенина (β-catenin) одновременно со снижением иммунореактивности N-Cad (Nкадгерина), что служит входу клеток в S-фазу [6].

Состояние межклеточных контактов и ВКМ во многом определяют судьбу клеток РПЭ при пролиферативных заболеваниях сетчатки млекопитающих. Существенная роль в конверсии клеток РПЭ при PVR принадлежит полипептиду ZO-1 и E-Cad, присутствующих в сайтах межклеточной адгезии. Внутриклеточным белком – маркером эпителио-мезенхимной дифференцировки является сократительный белок гладкомышечный актин альфа (α-SMA), обеспечивающий клеточную подвижность РПЭ. Кроме того, присутствует виментин (Vim), играющий важную роль в стабилизации структуры мигрирующих клеток. Продуцируемый клетками фибронектин (FN) является маркерным белком фиброза при формировании ЭМ, необходимым для депонирования микрофибрилл [3]. В результате перестройки межклеточных контактов, подвергающийся

ЭМП РПЭ приобретает мезенхимоподобный фенотип, характеризующийся усиленной экспрессией белков цитоскелета (Vim, a-SMA), повышенным отложением белков ВКМ, включая коллаген и фибронектин. Процесс сопровождается также сменой паттерна экспрессии цитокератинов. Фенотипические изменения РПЭ при ЭМП и миграции включают снижение экспрессии эпителиальных маркеров ZO-1 и E-Cad, и увеличение экспрессии мезенхимных маркеров - α-SMA, Vim, и FN, а также ТФ ZONAB.

Пролиферация, как составляющая процесса конверсии клеток РПЭ у амфибий и млекопитающих, имеет долгую историю изучения, в частности, в лаборатории проблем регенерации. Пролиферация клеток нативного РПЭ характеризуется длинным Sпериодом и крайне редкими митозами. Есть данные, свидетельствующие о присутствии пролиферирующих клеток в РПЭ не только у амфибий, где они составляют не более 3%, но и млекопитающих, обычно на периферии слоя. В ходе инициации и прогресса пролиферации, вызванного разрушением связи РПЭ и НС, для клеток РПЭ показаны уменьшение времени клеточного цикла и изменения его параметров: сокращение  $G_1$  и увеличение S-фазы [2]. Позже выявлен молекулярный механизм входа клеток РПЭ в Sфазу клеточного цикла, у тритонов активация сигнального MEK-ERK пути была обнаружена через 30 мин п/оп. Данные свидетельствуют о том, что клетки РПЭ тритона обладают механизмом быстрого запуска индуцирующего пролиферацию сигнального каскада и о поддержании его в активированной форме еще в течение 7-10 дней. Вопрос пролиферативной активности РПЭ млекопитающих и человека подробно рассмотрен [7]. У человека индукция пролиферации *in vivo* чаще всего сопровождается ЭМП и возникновением мезенхимных клеток. При возраст-зависимой макулярной дегенерации, пролиферация – нечастое событие, которое не приводит к восполнению слоя РПЭ после гибели части его клеток [7].

Молекулярно-генетические события, происходящие при репрограммировании РПЭ in vivo у хвостатых амфибий. Основное направление исследований лаборатории связано с регуляторных поиском изучением экспрессии генов, кодирующих белки, взаимодействия которых могут запускать и контролировать трансдифференцировку РПЭ, последующую пролиферацию нейробластов и дифференцировку клеток, что приводит к восстановлению НС. Наши данные продемонстрировали участие ряда генов, экспрессия которых характерна для периода развития (Pax6, Six3, Prox1, Pitx1, Pitx2, Hes1), а также участвующих в специфическом молекулярном контексте при контроле дифференцировки РПЭ в эмбриогенезе (RPE65, Otx2, Mitf, Pitx1, Pitx2) [8,9]. Полученные результаты позволили сделать вывод о том, что после ретинэктомии в клетках РПЭ глаза тритона одновременно репрессируются гены, определяющие их исходный фенотип, и

экспрессируются новые регуляторные гены, перепрограммирующие РПЭ для приобретения ими свойств, присущих стволовым клеткам [9]. Важным стало определение времени, когда происходит репрограммирование клеток РПЭ тритона, когда реализуется решение пойти по иному пути дифференцировки. С помощью количественной ПЦР на изолированных клетках удалось выяснить, что первые дочерние клетки РПЭ на 10-й день после ретинэктомии инициируют работу генов плюрипотентности *с-Мус, Klf4* и *Sox2*, а также *Mitf и Pax6*. По времени это совпадает со входом клеток в пролиферативную фазу и экспрессией маркера нейральных стволовых клеток Musashi-1, а также пан-нейрального маркера NF. Совокупность полученных нами и коллегами сведений свидетельствует о частичном сохранении РПЭ хвостатых амфибий клеточного, молекулярно-генетического и эпигенетического профилей, характерных для ювенильных состояний, наряду с экспрессией признаков функциональной специализации [10].

Итак, существенным достижением в исследованиях молекулярных механизмов регенерации сетчатки у хвостатых амфибий стало обнаружение сходства основной сети регуляторных генов, контролирующей процессы развития и регенерации сетчатки, сходство молекулярных механизмов процессов клеточной дифференцировки после образования слоя нейробластов в развитии и при регенерации. Однако, существуют и различия. Они связаны с основным отличием клеточных источников формирования НС: в ходе эмбрионального развития источником служат клетки внутреннего слоя глазного бокала, а в процессе регенерации сетчатки клетки РПЭ.

Молекулярно-генетические события, происходящие при репрограммировании РПЭ in vivo у млекопитающих и человека. Молекулярные основы ЭМП в РПЭ, включая изменения в экспрессии и регуляции генов, изучены недостаточно. Они включают изменения в экспрессии функционально значимых генов под контролем специфических ТФ в генетической сети, в контексте паттернов скоординированной регуляции в РПЭ в норме и в процессе ЭМП. Один из аспектов этой регуляции предполагает упомянутое выше переключение экспрессии подтипов кадгериновых белков. Процесс ЭМП в РПЭ сопровождается подавлением экспрессии ТФ, индуцирующих ЭМП (ЭМП-ТФ), таких как Snail, Slug, ZEB1/2, TWIST, GSC и других, вызывающих классический ЭМП при фиброзной и онкотрансформации. Взаимодействия с этими ТФ играют центральную роль в механизмах репрессии Е-кадгерина в мезенхимальных клетках, которая является одним из важных условий для возврата РПЭ в эпителиальное состояние.

Методами компьютерного моделирования, биоинформационного и биохимического анализа обнаружены биологически значимые ТФ, способные регулировать фенотип клеток РПЭ [11]. В промоторах ряда генов идентифицированы

специфические элементы, отвечающие за транскрипцию (ТКЕ) при связывании с ТФ кандидатами на роль главных «узлов» в транскрипционной сети, регулирующей ЭМП в РПЭ. Среди предсказанных мишеней действия ТФ, рассматриваемых также в качестве потенциальных терапевтических мишеней в профилактике и лечении пролиферативных заболеваний сетчатки и РПЭ человека находятся: Oct-1, ядерный фактор гепатоцитов 1 (HNF-1), ядерный фактор транскрипции GATA-1, SMAD3, фактор транскрипции Е (TFE), фактор регуляции интерферона-1 (IRF), HNF3alpha, E2F, CDP, SP3, гомеобокссодержащий ген NKX3A, связывающий регуляторный элемент стерола белок-1 (SREBP-1), факторусилитель лимфоцитов-1 (LEF-1), а также N- и R- кадгеринов. Дифференциальная и скоординированная экспрессия функциональных кластеров регуляторных генов во время ЭМП РПЭ подтверждена ПЦР с обратной транскрипцией [11]. Важную роль в определении эпителиальной судьбы РПЭ играет ТФ – протоонкоген FOXM1. Сверхэкспрессия FOXM1 приводит к усилению свойств эпителиального фенотипа, предполагается, что это достигается за счет непосредственной регуляции пролиферации РПЭ. Механизм ЭМП включает также участие ТФ FOXM1 в модуляции экспрессии сигнальных белков BMP7 и Wnt5B, последние действуя реципрокно, обеспечивают поддержание эпителиального фенотипа.

В наших работах, а также коллегами из Японии были выявлены некоторые особенности экспрессии ряда генов, кодирующих ТФ, в том числе Pax6, Otx2, Fgf2 при регенерации сетчатки у хвостатых амфибий в отличие от моделей повреждения сетчатки у млекопитающих. Дополнительным подтверждением выдвинутой нами гипотезы о клеточных и молекулярных особенностях РПЭ Urodela, позволяющих этим клеткам естественное репрограммирование (natural reprogramming) в нейроны сетчатки, являются результаты, полученные японскими исследователями [12]. У хвостатых амфибий ключевой фактор транскрипции Рах6 отвечает за репрограммирование клеток РПЭ в клетки HC при ее регенерации in vivo. Оказалось, что отсутствие экспрессии этого мастергена блокирует регенерацию НС у взрослых тритонов и индуцирует в клетках РПЭ тритона выход в мезенхимную дифференцировку, как известно, обусловливающую PVR у человека. Кроме консервативных функций, установленных для ТФ, и, в частности, для Рах 6, существуют различия в стратегиях поведения и трансдифференцировки клеток РПЭ у эволюционно отдаленных видов позвоночных, объясняемые особенностями в регуляции клеточными процессами, как на локальном, эпигенетическом, так и организменном уровнях [13]. Следовательно, для рассматриваемой нами системы трансдифференцировки клеток РПЭ в нейральную ткань сетчатки у взрослых амфибий и при ЭМП клеток РПЭ у

млекопитающих, напрашивается заключение, что в обоих случаях имеет место близкая молекулярная основа, но содержащая модификации работы ключевых генов.

Молекулярные механизмы регуляции coстороны микроокружения трансдифференцировки РПЭ при регенерации у амфибий. Проанализированная информация свидетельствует о том, что в регуляционных факторах микроокружения и в малоизученном пока паттерне их экспрессии для двух изучаемых стратегий конверсии РПЭ у амфибий и млекопитающих есть большие отличия. Среди изучаемых сигнальных белков, которые вовлечены в контроль регенерации сетчатки у амфибий, внимание приковано к участникам молекулярных каскадов Fgf, Bmp, Wnt, Shh, HSP, Notch. В наибольшей степени нами изучена роль сигнального пути FGF2, являющегося ключевым в регенерации сетчатки у тритона. Согласно данным у тритона после операции Fgf2 не является первичным, индуцирующим процесс конверсии клеток РПЭ, а выполняет эволюционно консервативную функцию митогена позже, в популяции возникших из РПЭ нейробластов [14]. Прослежена также динамика экспрессии Notch-1, возрастающей по мере развития регенерата НС и снижающаяся при выходе клеток в дифференцировку. Введение блокатора DAPT приводит к преждевременному созреванию нейронов в бластеме НС. Выяснено также, что клетки РПЭ тритона в ходе регенерации НС дифференциально экспрессируют сигнальные молекулы Hes-1, neurogenin-1 и Delta. В целом факторы микроокружения работают локально и короткодистантно, и в экспрессии обнаруживают сходство с активностью в период гистогенеза сетчатки глаза. Эти события в иерархии системы надклеточного сигнализирования находятся ниже системных, общеорганизменных факторов. К таким факторам, также в достаточной степени изученным, относятся гормоны, факторы иммунной системы и крови. Так, в областях регенерации хрусталика, конечности и сетчатки у тритона была выявлена экспрессия индуцирующих регенерацию факторов иммунной системы комплемента СЗ и С5. Показана роль тиреоидного гормона.

Молекулярные механизмы регуляции процесса трансдифференцировки РПЭ со стороны микроокружения при ПВР у млекопитающих. В качестве основного регулятора стабилизации эпителиального фенотипа РПЭ, кадгерин-зависимой межклеточной адгезии и пигментации клеток у млекопитающих рассматривается сигнальный путь Wnt/β-catenin [15]. В ходе ЭМП клетки РПЭ теряют черты специализации, межклеточные контакты и адгезию, приобретают характеристики мигрирующих мезенхимных клеток. Эти события происходят под контролем ростовых факторов и резидентных клеток воспаления, находящихся в циркулирующей крови и стекловидном теле глаза. Существующие представления о патогенезе ПВР включают изменение локальных концентраций не только

цитокинов (в работе рассмотренных независимо), но и ряда ростовых факторов, управляющих процессами трансдифференцировки, миграции, пролиферации формирования ВКМ. В первую очередь к ним относится трансформирующий фактор роста бета (TGFβ), а также фактор роста гепатоцитов (HGF), фактор роста, выделенный из тромбоцитов (PDGF), сигнальные пути Notch, Wnt/β-catenin, и сигнальный путь Hippo [7]. ТСБВ обнаруживается в глазах пациентов с ПВР на уровне экспрессии, положительно коррелирующей с развитием патологии. Запуск ТСБВ активирует р38 МАРК сигнальный путь, а при его ингибировании происходит подавление синтеза коллагена I типа. Обнаружено, что наряду с TGF вактивируется и TNF а, то есть имеет место влияющее на прогресс ЭМП комбинаторное действие этих факторов. Роль ТСБ выявлена в активации многих сигнальных каскадов при ЭМП клеток РПЭ, чтодает ключи к лечению ПВР. Продемонстрирована также важная роль сигнального пути Smad. Основной фактор роста FGF2 также включен в ранний ответ РПЭ на отслойку НС наряду с AP-1, как и при конверсии РПЭ у тритона.

Таким образом, регуляторные события, происходящие при конверсии клеток РПЭ млекопитающих в мезенхимном направлении, как и в случае конверсии РПЭ в нейральном направлении дифференцировки у амфибий, разнообразны, имеют незначительное сходство, но существенные отличия, однако картины регуляторных сетей микроокружения до сих пор до конца не определены. Это делает сопоставление затруднительным, однако, очевидно, что регуляторные сети при выборе разных стратегий трансдифференцировки имеют для амфибий и млекопитающих свои специфические динамические паттерны.

Изменение эпигенетического ландшафта в ходе трансдиффренцировки РПЭ у амфибий и патологии сетчатки у млекопитающих. Этот аспект исследований трансдифференцировки клеток РПЭ находится в начале разработки как в лаборатории, так и за рубежом. Мы предприняли попытку охарактеризовать состояние хроматина в начале конверсии РПЭ тритона при разобщении РПЭ и НС, вызванном облучением сетчатки ярким светом или механической отслойкой. Описанные с помощью программ компьютера изменения хроматина по своему характеру не предусматривают активной транскрипции, но, напротив, свидетельствуют о репрессии этого процесса. Мы предполагаем, что обнаруженные нами изменения хроматина и ядерной мембраны в репрограммируемых клетках РПЭ тритонов связаны с ответом на клеточный стресс, уходом от клеточной гибели и подготовкой к пролиферации. Обнаруженная нами работа гена Ns в ткани РПЭ тритона также является эпигенетическим маркером высокой пластичности их дифференцировки при регенерации in vivo. Не исключено также, что у тритонов, исходно

обладающих ювенильными свойствами, понижение уровня дифференцировки в ходе репрограммирования, не требует масштабных модификаций работы генов, при одновременном наличии пермиссивного для быстрого переключения программ эпигенома. Подтверждением этого предположения может быть, упомянутая выше, обнаруженная нами в нативных клетках РПЭ тритонов совместная работа генов, кодирующих признаки как исходной, так и новой дифференцировок [10].

Для млекопитающих и человека накоплена информация об эпигенетических изменениях и их связи с  $T\Phi$  и о последствиях этой связи в ходе  $ЭМ\Pi$ . Однако, внимание в основном уделено случаям ЭМП при развитии опухолей. Если опираться на эту информацию в совокупности с полученной на моделях РПЭ-зависимой патологии НС, становится ясно, что программа конверсии РПЭ при ЭМП в ходе развития PVR регулируется как ТФ, так и эпигенетическими изменениями. Последними являются – метилирование ДНК, модификации гистонов, а также микроРНК, способные ингибировать трансляцию ряда генов. В патогенезе PVR выявлена важная роль miR-29b, осуществляющей негативную регуляцию Akt2 сигнального пути, определена роль ингибитора деацетилазы гистонов (HDACi) – трихостатина, ингибирующего канонический сигнальный путь Smad и сигнальные пути Jagged/Notch, PI3K/Akt, и MAPK/ ERK1/2. Ингибитор устранял ТGFβ-индуцированные морфологические изменения клеток РПЭ человека в мезенхимном направлении и предотвращал ир-регуляцию α-SMA, FN, коллагена I и IV типов. Fuchs et al. [16] использовали miR-302d и miR-93, способные регулировать сигнальный путь TGFβ, тем самым направляли TGFβ-зависимую конверсию клеток РПЭ в мезенхимном направлении вспять. Предполагается, что данный подход в дальнейшем может быть использован при лечении ПВР. Поиск молекулярных регуляторов детерминации эпителиальной судьбы РПЭ и ее переключения на путь мезенхимной или ретинальной дифференцировки продолжается с использованием современных методов анализа транскриптома, генома, протеома, что лежит в основе разработки перспективных подходов для регенерации и клеточной терапии для поддержания стабильности и жизнеспособности РПЭ и НС. Среди эффективных стратегий, направленных на подавление сигнальных путей, вовлеченных в патологию РПЭ, рассматривается модуляция передачи сигналов RhoA/Rho-kinase, Smad или MAPK. Другие подходы предполагают блокирование экспрессии ALK5, что эффективно подавляет развитие фиброза, ингибирование ключевых факторов ангиогенеза и деацетилазы гистонов [17].

При подведении итогов анализа в работе констатировано, что РПЭ низших и высших позвоночных животных обладает высокой степенью пластичности,

проявляющейся в способности к смене клеточного типа – трансдифференцировке. При наблюдении за этим процессом in vivo, мы обнаруживаем различия в поведении клеток РПЭ: конверсию в нейрональном и глиальном направлении при регенерации сетчатки у хвостатых амфибий. И в мезенхимном направлении при патологии сетчатки у млекопитающих и человека. В условиях *in vitro*, под влиянием сигнальных белков, РПЭ млекопитающих раздвигает рамки этих возможностей, демонстрируя конверсию в фенотипы, несущие пронейральные признаки. В основе механизмов конверсии *in vivo* в обеих стратегиях можно обнаружить сходство, например, в инициации процесса и сопряженных с нею изменений цитоскелета и ВКМ, в пролиферативной активности, способности к миграции клеток РПЭ. Однако имеет место ряд существенных отличий, прежде всего, в молекулярно-генетических регуляционных механизмах: работе ТФ, ростовых факторов и цитокинов, компонентов сигнальных путей, а также в отличающемся эпигенетическом ландшафте. Все три ключевые системы регуляции находятся в динамическом взаимодействии. В этой связи, опора на одну из перечисленных систем вряд ли может помочь в понимании того, каким образом можно экспериментально менять стратегии конверсии РПЭ. В этой связи дальнейшие исследования биологии клеток РПЭ, трансдифференцировки РПЭ, И связи ключевых регулирующих разноуровневых событий, необходимы.

#### 1.1.4. Заключение

Ретинальный пигментный эпителий (РПЭ) является клеточным источником регенерации сетчатки у амфибий *in vivo* и развития заболеваний сетчатки у млекопитающих и человека. В основе обоих процессов лежит трансдифференцировка клеток РПЭ – превращение в клетки иных фенотипов: в первом случае нейральные, во втором – мезенхимные. В работе проведен детальный анализ основных этапов трансдифференцировки клеток РПЭ: инициация процесса, миграция и пролиферация клеток, дедифференцировка, репрограммирование и специализация клеток в новых направлениях. Собрана и проанализирована информация о молекулярно-генетических механизмах, обеспечивающих прохождение клетками всех этих этапов. Выявлены молекулярные участники регуляции трансдифференцировки со стороны целого организма, локального клеточного микроокружения (ростовых факторов, сигнальных каскадов), экспрессии ТФ, а также регуляции со стороны эпигенома. Определены сходства и отличия в молекулярно-генетических механизмах реализации различающихся стратегий трансдифференцировки РПЭ у амфибий и млекопитающих. Обнаружение молекулярных ключевых участников этого выбора служит не только развитию теории клеточного репрограммирования, но и разработке подходов для лечения пролиферативных заболеваний сетчатки человека, ассоциированных с патологиями РПЭ.

По данному подразделу опубликована 1 работа, 2-ая находится в печати

**Григорян Э.Н.**, **Маркитантова Ю.В**. Молекулярные стратегии трансдифференцировки клеток ретинального пигментного эпителия у амфибий и млекопитающих *in vivo* // Онтогенез. — 2021. — Т. 52. — № 4. — С. 260—286. (Grigoryan E.N., Markitantova Yu.V. Molecular Strategies for Transdifferentiation of Retinal Pigment Epithelial Cells in Amphibians and Mammals In Vivo // Russian Journal of Developmental Biology. — 2021. — Vol. 52. — No. 4. P. 220—243. DOI: 10.1134/S1062360421040032).

**Grigoryan E.N.** Pigment epithelia of the eye: cell-type conversion in regeneration and disease // BioMed Research International. -2021. -Q2 (in press).

#### 1.1.5. Список использованных источников

- 1. Jopling C., Boue S., Ispizua B.J.C. Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: three routes to regeneration // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. -2011. Vol. 12. P. 79–89.
- 2. Stroeva O.G., Mitashov V.I. Retinal pigment epithelium: proliferation and differentiation during development and regeneration // Int. Rev. Cytol. 1983. Vol. 83. P. 221–293.
- 3. Zou H., Shan C., Ma L., et al. Polarity and epithelial-mesenchymal transition of retinal pigment epithelial cells in proliferative vitreoretinopathy // PeerJ. 2020. Vol. 8:e10136.
- 4. **Григорян Э.Н.**, **Маркитантова Ю.В.** Молекулярные стратегии трансдифференцировки клеток ретинального пигментного эпителия у амфибий и млекопитающих in vivo // Онтогенез. -2021. Т. 52. № 4. С. 260–286.
- 5. Merell A.J., Stanger B.Z. Adult Cell Plasticity In Vivo: Transdifferentiation is Back in Style // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2016. Vol. 17. No.7. P. 413–425.
- 6. Yasumuro H., Sakurai K., Toyama F., et al. Implications of a Multi-Step Trigger of Retinal Regeneration in the Adult Newt // Biomedicines. 2017. V. 5. No. 2. P. 25
- 7. Stern J., Temple S. Retinal pigment epithelial cell proliferation // Exp. Biol. Med. (Maywood). 2015. Vol. 240. No. 8. P. 1079–1086.
- 8. Маркитантова Ю.В., Макарьев Е.О., Смирнова Ю.А., и др. Исследование паттерна экспрессии регуляторных генов Рах6, Prox1 и Six3 в ходе регенерации структур глаза тритона // Известия РАН. Сер. биол. 2004. № 5. С. 522–531.

- 9. 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 Ch., ed.), Research Signpost, Kerala, India. 2007.- P. 15–33
- 10. 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. P. 10–28.
- 11. Pratt C.H., Vadigepalli R., Chakravarthula P., et al. Transcriptional regulatory network analysis during epithelial-mesenchymal transformation of retinal pigment epithelium // Mol Vis. 2008. Vol.14. P. 1414–1428.
- 12. 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
- 13. Markitantova Yu.V., Simirskii V.N. Inherited retinal diseases through the eyes of homeobox genes // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. No. 5. P. 1602.
- 14. Маркитантова Ю.В., Авдонин П.П., Григорян Э.Н. Компоненты сигнального пути FGF2 в тканях заднего сектора у взрослых тритонов Pleurodeles waltl // Изв. РАН. Сер. биол. 2014. № 4. С. 297–305.
- 15. Burke J.M.Epithelial phenotype and the RPE: Is the answer blowing in the Wnt? // Prog. Retin. Eye Res. 2008. Vol. 27. No.6. P. 579–595.
- 16. Fuchs H.R., Meister P., Lotke R., Framme C. The microRNAs miR-302d and miR-93 inhibit TGFB-mediated EMT and VEGFA secretion from ARPE-19 cells // Exp. Eye Res. 2020. Vol. 201. P. 108258.
- 17. Grigoryan E.N. Pigment epithelia of the eye: cell-type conversion in regeneration and disease // BioMed Research International. 2021. Q2 (in press).

## Подраздел 1.2 Малые некодирующие РНК в регуляции дифференцировки ретинального пигментного эпителия позвоночных. Исследование механизмов эпителио-мезенхимного перехода

#### 1.2.1. Введение

Дедифференцировка и эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) клеток ретинального пигментного эпителия (РПЭ) человека, а также участие клеток в неоваскуляризации сетчатки и хориоидеи лежит в основе развития различных офтальмологических заболеваний, которые приводят к серьезной потере зрения. Понимание клеточно-молекулярных механизмов, участвующих в регуляции дифференцировки клеток РПЭ, а также выявление роли клеток РПЭ в ангиогенезе глаз, поможет определить новые терапевтические мишени для лечения офтальмопатологии.

Открытие того, что короткие некодирующие РНК – малые интерферирующие РНК (siRNAs) и микроРНК (miRNAs) – участвуют в регуляции генов, способствовало появлению исследований, направленных на изучение роли siRNAs в ингибировании экспрессии генов в клетках РПЭ, задействованных в ангиогенезе глаз, а также выявления роли miRNAs в регуляции дифференцировки и ЭМП клеток РПЭ. Возможность локальной доставки коротких некодирующих РНК непосредственно в глаз может быть полезным в качестве новых классов терапевтических агентов для лечения широкого спектра офтальмологических заболеваний.

Клаудины представляют собой суперсемейство трансмембранных оптимальная экспрессия и локализация которых важна для поддержания нормальной физиологической функции эпителия, и любой дисбаланс может иметь патологические последствия. Не только недостаточная, но и избыточная продукция клаудинов в раковых клетках, а также их аберрантная локализация, равным образом манифестируют возникновение патологии (злокачественного фенотипа). Многие работы отличаются противоречивостью данных, демонстрируя действие одних и тех же клаудинов, как в роли супрессоров, так и в роли промоутеров опухолевого роста при одних и тех же видах рака. Среди вероятных причин существенных расхождений результатов исследований стоит значительная вариабельность выборок и отсутствие общепринятых критериев оценки иммунореактивности клаудинов и дифференциального анализа субклеточной локализации этих белков. В совокупности, это затрудняет иммуногистохимическую оценку связи клаудинов с прогрессированием опухоли, а зачастую делает ее некорректной и, на сегодняшний день не достигает диагностической ценности. В частности, неоднозначность данных по экспрессии клаудинов среди подтипов рака молочной железы, выявляемых на уровне иммуногистохимического анализа разными авторами, не только не облегчает

идентификацию клаудинов низкомолекулярного подтипа, а скорее осложняет такие усилия. Многолетние исследования роли клаудинов в канцерогенезе, подтверждают потенциальную ценность этого класса белков, как значимых биомаркеров при некоторых видах рака, диагностика, основанная на иммуногистохимической оценке, имеет ограничения. В работе проведен анализ данных клинических исследований, в которых белки семейства клаудинов были использованы в качестве прогностических маркеров эпителио-мезенхимной трансформации клеток эпителиальной природы.

#### 1.2.2. Материалы и методы

Проведен анализ статей, посвященных участию siRNAs в подавлении проангиогенных факторов в клетках РПЭ, роли miRNAs в регуляции дифференцировки и ЭМП клеток РПЭ и патогенезе дегенеративных заболеваний сетчатки. По результатам опубликована 1 обзорная статья [1]. Проведен анализ публикаций, по характеристике экспрессии в клетках эпителиального фенотипа клаудинов, участию белков этого суперсемейства в поддержании жизнеспособности и патологической дедифференцировке клеток; результатов клинических исследований, посвященные исследованиям экспрессии различных видов клаудинов при ЭМТ, злокачественных опухолях человека, с применением методов иммуногистохимии [2]. Обзор включает 146 научных источников. Использовали базы данных PubMed, MEDLINE, Web of Science до 09 февраля 2021 г.

Критерии включения и исключения. Критерии включения были следующими: (1) объектом исследования были животные или клеточные линии РПЭ человека (в т.ч. ARPE-19; клетки РПЭ, полученные из ESCs или iPSCs); (2) в исследовании был проведен анализ для идентификации целевых генов из базы данных miRNA (miRDB) и баз данных TargetScan; (3) содержание исследования представляло собой взаимосвязь между подавлением целевого гена (например, VEGF) с помощью siRNA или miRNA и изменением в пролиферации или дифференцировке клеток РПЭ; (4) описывалась siRNAs И miRNAs; (5) структура результат исследования дифференцировка/дедифференцировка клеток РПЭ [1, 2]. Исследования были исключены, если они (1) были дублирующими публикациями или частично совпадающими исследованиями; (2) объектом исследования были пациенты с заболеваниями сетчатки; или (3) были отчеты о случаях, отчеты конференций, рефераты, книги или письма.

Изучены работы по клиническим исследованиям, в которых клаудины применялись в качестве биологических маркеров ЭМП и в качестве диагностического инструмента для характеристики злокачественности клеток эпителиальной природы.

Приведено описание структуры клаудинов; обсуждается использование антител различных производителей; возможности применения иммуногистохимических подходов.

Критерии включения были следующими: (1) объектом исследования были пациенты с злокачественным новообразованием; (2) в исследовании использовалась иммуногистохимический анализ; (3) содержание исследования представляло собой взаимосвязь между экспрессией клаудина(ов) и выживаемостью; (4) описывалась структура клаудинов; и (4) результат исследования - выживаемость при злокачественном новообразовании. Исследования были исключены, если они (1) были дублирующими публикациями или частично совпадающими исследованиями; (2) использовались исключительно животные или клеточные линии; (3) были отчеты о случаях, отчеты конференций, рефераты, книги или письма; или (4) недостаточно данных для оценки корреляции между клаудином(ами) и результатами выживания.

#### 1.2.3. Результаты и обсуждение

Проведен анализ данных научной литературы, относящихся к участию siRNAs в подавлении проангиогенных факторов в клетках РПЭ, роли miRNAs в регуляции дифференцировки и ЭМП клеток РПЭ и в патогенезе дегенеративных заболеваний сетчатки [1]. В качестве примера на представлено схематическое изображение перекрестной передачи сигналов между активированными каноническим NF-кВ и неканоническим TGF-β путями во время развития хориоидальной неоваскуляризации (CNV) при возрастной макулярной дегенерации (BMД) (рисунок 1.2.1).

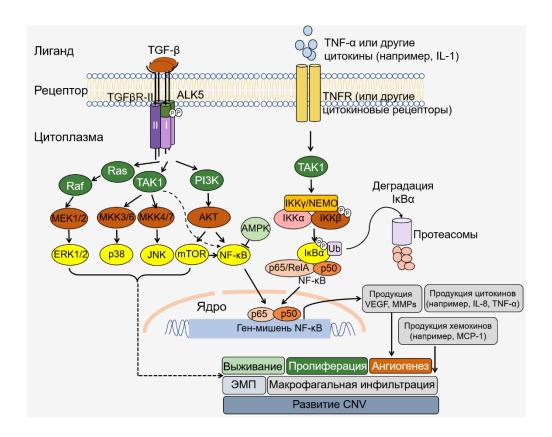


Рисунок 1.2.1 - Схематическое изображение перекрестной передачи сигналов между активированными каноническим NF-кВ и неканоническими TGF-β путями во время развития хориоидальной неоваскуляризации (CNV) при возрастной макулярной дегенерации (ВМД)

В отсутствии сигнала димеры NF-кВ (например, p65/RelA-p50), связанные ІкВа (ингибитор NF-кBalpha, англ. NF-кBinhibitor, alpha), располагаются в цитоплазме клеток РПЭ. При воздействии различных сигнальных молекул (например, TNF-α, TGF-β) происходит активация члена семейства MAPK киназ-киназ –TGF-β-активированной киназы 1 (TAK1, англ. TGF-β-activatedkinase 1, другие названия: MAPK kinase-kinase 7, МАРЗК7), что приводит к активации киназного комплекса ІКК (киназаІкВ, англ. ІкВ kinase). Комплекс ІКК, состоящий из двух каталитических субъединиц (ІККа, ІККВ) и одной регуляторной (ΙΚΚγ/ΝΕΜΟ), фосфорилирует ІкВа по двум Ν-концевым остаткам серина, после чего они подвергаются убиквитинированию и протеосомальной деградации. Димеры NF-кВ высвобождаются и перемещаются в ядро клетки, где они регулируют транскрипцию генов-мишеней. ALK5 – активин рецептор-подобная киназа 5 (англ. Activin receptor-like kinase 5, другое название – TGF- $\beta$  рецептор I типа, англ. TGF $\beta$ R-I – TGF- $\beta$ receptor I);  $AMPK - 5'AM\Phi$ -активируемая протеинкиназа (англ. AMP activated protein kinase) – клеточная протеинкиназа, контролирующая энергетический баланс клетки; JNK – c-Jun N-терминальная киназа (англ. c-Jun N-terminal kinase, другое название – связанная со стрессом протеинкиназа, англ. SAPK – stress-activated protein kinase); MCP-1 – моноцитарный хемоаттрактантный белок-1 (англ. Monocyte chemoattractant protein-1, другое название – CCL2, C-C motifligand 2); МЕК или МКК – другие названия МАРК kinase; PI3K – фосфоинозитид-3-киназа (англ. phosphoinositide 3-kinases); NEMO – основной модулятор NF-кВ (англ. NF-кВ essential modulator). Р указывает на фосфорилирование, Ub – убиквитирование. См. текст для других сокращений.

В таблице 1.2 суммированы данные, касающиеся изменений, происходящих в клетках РПЭ, при подавлении или увеличении в них экспрессии miRNAs.

Таблица 1.2 - Проявления в клетках РПЭ при регуляции экспрессии miRNA.

miRNA	Мишень miRNA	Проявления в клетках РПЭ	Источник
	Полавле	ение экспрессии miRNA	
miR-204	TGFβ-RII, SNAIL2	Снижение экспрессии	[3]
	(SLUG), Kir7.1	клаудинов 10, 16 и 19	[-]
miR-204/211	НД	Снижение экспрессии MITF	[4]
miR-let7c	НД	Активация NF-кВ	[5]
		сигнального пути	
miR-29b	AKT2	ЭМП: активация αSMA,	[6]
		подавлением Е-кадгерина и	
		ZO-1, повышение	
		миграционной активности	
		клетокARPE-19	
miR-124	RHOG	ЭМП: увеличение	[7]
		мезенхимальных и снижение	
		эпителиальных маркеров в	
		клетках ARPE-19	
miR-34a	c-Met, CDK2,	Пролиферация и миграция	[8]
	CDK4, CDK6,	клеток ARPE-19	
	E2F1, p-Cdc2		
miR-182	c-Met	Пролиферация и миграция	[9]
		первичных клеток РПЭ	
miR-21	НД	Подавление пролиферации и	[10]
		миграции клетокARPE-19	
miR-184	EZR	Снижение уровня белка	[11]
		LAMP-1 в первичной	
		культуре РПЭ человека (у	
15.44	_	пациентов с ВМД)	54.03
miR-23a	Fas	Увеличение апоптоза клеток	[12]
15.44	GT 64	ARPE-19	5-73
miR-23a	GLS1	Восстановление	[5]
		метаболизма глутамина,	
		увеличение выживаемости	
	<b>1</b> 7	клеток ARPE-19	
:D 124		ение экспрессии miRNA	[7]
miR-124	RHOG	Увеличение уровня ZO-1 и	[7]
		окклюдина, подавление	
		уровней фибронектина, аSMA и виментина,	
		озма и виментина, подавление ТGF-β1-	
		подавление ТОГ-р1-	
		_	
		сокращения коллагенового геля клетками ARPE-19	
miR-194	НД	Ингибирование TGF-β1-	[13]
1111111-174	11/4	индуцированного ЭМП	[13]
		ппдуцированного Эмпт	<u> </u>

		клеток ARPE-19, снижение	
		экспрессия генов,	
		регулируемых ZEB1	
miR-93	TGFβR-II	Снижение секреции VEGF-	[14]
miR-302d	TGFβR-II, Smad2	A, ингибирование TGF-β-	
	и Smad3	индуцированного ЭМП	
		клеток ARPE-19	

НД – нет данных

По результатам исследования, опубликован обзор, в котором суммированы сведения научной литературы, относящиеся к структурно-функциональной роли клаудинов в плотных контактах, нарушениям экспрессии и локализации клаудинов при раке, их возможной прогностической роли, и связи с клинико-патологическими параметрами. Особое внимание сфокусировано на иммуногистохимических подходах к оценке клаудинов и использованию их как потенциальных биомаркеров в дифференциальной диагностике и типировании опухолей [2].

Клаудины – основные структурные компоненты плотных контактов, сегодняшний день описано 27 членов суперсемейства клаудинов у млекопитающих [15, небольшие трансмембранные белки 20–34 кДа, имеющие сходную аминокислотную последовательность и общую структуру. Все клаудины имеют четыре трансмембранных домена, две внеклеточных петли, длинную и короткую, одну внутриклеточную петлю и обращенные в цитоплазму короткий N-конец и длинный Сконец [17] (рисунок 1.2.2). Внеклеточные петли необходимы для поддержания функции плотных контактов и целостности эпителиального барьера [18]. Вариации строения длинной внеклеточной петли, содержащей заряженные аминокислоты, у различных членов семейства клаудинов определяют различия ионной селективности парацеллюлярного барьера в различных эпителиях [19-21]. Вторая, короткая, внеклеточная петля участвует в образовании димеров с клаудинами на клеточных мембранах соседних клеток [22, 23]. Большинство эпителиев и эндотелий экспрессируют множественную смесь разных членов семейства клаудинов, при этом в одной клетке всегда коэкспрессируются более двух разных молекул клаудина [17, 24-27]».

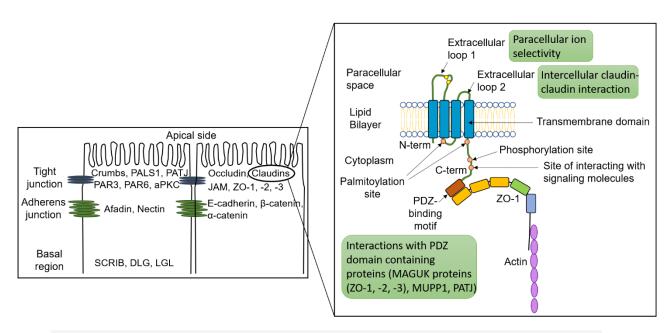


Рисунок 1.2.2 - Схематическое изображение расположения плотных контактов в поляризованных эпителиальных клетках (слева) и структурной организации белков клаудина (справа)

Плотные соединения состоят из двух интегральных мембранных белков окклюдина и клаудина, а также белков семейства MAGUK ZO-1, ZO-2 и ZO-3. Также в плотных контактах находится соединительная адгезионная молекула (JAM, белок семейства иммуноглобулинов), которая образует комплекс с ZO-1 и комплексом Par, состоящим из белков PAR3, PAR6 и атипичной протеинкиназы С (aPKC). Три белковых комплекса, комплекс Par, комплекс Crumbs, состоящий из белков CRB и белков PALS1 и PATJ, и комплекс Scribble, состоящий из белков SCRIB, DLG и LGL, участвуют в установлении апикобазальной полярности. Основными компонентами адгезивных соединений являются трансмембранный белок Е-кадгерин, α-катенин и β-катенин. Второй комплекс, локализованный на стыках адгезивов, состоит из иммуноглобулиноподобного белка нектина и белка, содержащего домен PDZ, афадина.

#### 1.2.4. Заключение

Малые некодирующие РНК рассматриваются в качестве новых классов терапевтических агентов для лечения широкого спектра офтальмологических заболеваний. Многочисленные функции мнРНК, а также возможность их локальной доставки в глаз являются предметом пристального изучения, однако, имеющиеся в настоящее время результаты в этой области нуждаются в уточнении и снятии противоречий. Тем не менее, очевидно, что дальнейшие исследования miRNAs дифференциально экспрессирующихся в сетчатке и РПЭ расширяют спектр биомаркеров пролиферативных, дегенеративных и онкологических заболеваний (ретинобластома), способствуют уточнению потенциальных мишеней для таргеттной терапии препаратами на основе miRNAs.

С момента относительно недавнего открытия семейства клаудинов и описания их существенной роли в организации трансэпителиального барьера в составе плотных

контактов, определение специфической функции белков этого класса стало заметным направлением исследований в области канцерогенеза и клеточной биологии. На основании сведений из литературных источников, очевидно, что определенный уровень экспрессии и характер локализации клаудинов играют роль в поддержании нормальной физиологической функции эпителия, и любой дисбаланс может иметь патологические последствия. Не только недостаточная, но и избыточная продукция разных клаудинов, а также их аберрантная локализация, манифестируют формирование злокачественного фенотипа.

С одной стороны, исследования подтвердили существование сложных белковых взаимодействий на основе клаудинов, и продемонстрировали, что изменения в субклеточной локализации могут влиять на партнерство с сигнальными белками и на усиление проонкогенных путей, сопровождающихся эпителио-меанхимным переходом (ЭМП). С другой стороны, информации о регуляторных механизмах делокализации клаудинов, недостаточно, и пока неясно, в какой мере измененные экспрессионные профили и аберрантная локализация клаудинов могут модулировать злокачественные характеристики раковых клеток, и в какой мере сами клаудины являются регулируемыми промежуточными звеньями сложных сигнальных путей. Многие работы отличаются противоречивостью данных, демонстрирующих действие одних и тех же клаудинов, как в роли супрессоров, так и в роли промоторов опухолевого роста при одних и тех же видах рака. Возможными причинами расхождений в данных являются значительная вариабельность выборок и отсутствие единообразного подхода, как к оценке иммунореактивности клаудинов, так и к дифференциальному анализу их субклеточной локализации. В совокупности, эти недостатки затрудняют иммуногистохимическую оценку связи клаудинов с прогрессированием опухоли.

Продолжающиеся исследования вклада клаудинов в канцерогенез, подтверждают потенциальную ценность этого класса белков, как значимых биомаркеров при некоторых видах рака, однако иммуногистохимический подход к оценке клаудинов имеет существенные ограничения, и нуждается в стандартизации. Возможно, дальнейшие исследования роли клаудинов в онкогенезе, с привлечением методов геномного анализа, предложат новые идеи и подходы для дифференциальной диагностики патологической дедифференцировки клеток эпителиальной природы, прогностической оценки онкогенеза. Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП по биологии развития ИБР РАН.

По теме раздела опубликовано 2 статьи

**Кузнецова А.В.**, **Ржанова Л.А.**, **Александрова М.А**. Малые некодирующие РНК в регуляции дифференцировки ретинального пигментного эпителия // Онтогенез. 2021. Т. 52. № 4. С. 305–314. DOI: 10.31857/S0475145021030058 (Kuznetsova A.V., Rzhanova L.A., Aleksandrova M.A. Small noncoding RNA in regulation of differentiation of retinal pigment epithelium//Russian Journal of Developmental Biology. – 2021. – Vol. 52. – № 4. – P. 305–314. DOI: 10.1134/S106236042103005X). – Q4

Popova O.P., **Kuznetsova A.V.**, Bogomazova S.Y., Ivanov A.A. Claudins as biomarkers of differential diagnosis and prognosis of tumors // Journal of Cancer Research and Clinical Oncology. – 2021. – Vol. 147. – № 10. – P. 2803-2817. DOI: 10.1007/s00432-021-03725-0. – Q2

#### 1.2.5. Список использованных источников

- 1. **Кузнецова А.В.**, **Ржанова Л.А.**, **Александрова М.А**. Малые некодирующие РНК в регуляции дифференцировки ретинального пигментного эпителия // Онтогенез. 2021. Т. 52. № 4. С. 305—314. DOI: 10.31857/S0475145021030058 (Kuznetsova A.V., Rzhanova L.A., Aleksandrova M.A. Small noncoding RNA in regulation of differentiation of retinal pigment epithelium//Russian Journal of Developmental Biology. 2021. Vol. 52. № 4. P. 305—314. DOI: 10.1134/S106236042103005X). Q4
- 2. Popova O.P., **Kuznetsova A.V.,** Bogomazova S.Y., Ivanov A.A. Claudins as biomarkers of differential diagnosis and prognosis of tumors // Journal of Cancer Research and Clinical Oncology. − 2021. − Vol. 147. − № 10. − P. 2803-2817. DOI: 10.1007/s00432-021-03725-0. − Q2
- 3. Wang L., Dong F., Reinach P. S., He D., Zhao X., Chen X., et al. MicroRNA-182 suppresses HGF/SF-induced increases in retinal pigment epithelial cell proliferation and migration through targeting C-met // PLoS One. 2016. Vol. 11. doi:10.1371/journal.pone.0167684
- 4. Adijanto J., Castorino J. J., Wang Z. X., Maminishkis A., Grunwald G. B., and Philp N. J.. Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) promotes differentiation of human retinal pigment epithelium (RPE) by regulating microRNAs-204/211 expression. J. Biol. Chem. 2012. Vol. 287. P. 20491–20503. doi:10.1074/jbc.M112.354761
- 5. Deji Q. Z., Yan F., Zhaba W. D., Liu Y. J., Yin J., and Huang Z. P. Cross-talk between microRNA-let7c and transforming growth factor-β2 during epithelial-to-mesenchymal transition of retinal pigment epithelial cells // Int. J. Ophthalmol. 2020. Vol. 13. P. 693–700. doi:10.18240/ijo.2020.05.01

- 6. Li M., Li H., Liu X., Xu D., and Wang F. MicroRNA-29b regulates TGF-β1-mediated epithelial–mesenchymal transition of retinal pigment epithelial cells by targeting AKT2 // Exp. Cell Res. 2016b. Vol. 345. P. 115–124. doi:10.1016/j.yexcr.2014.09.026
- 7. Hou Q., Tang J., Wang Z., Wang C., Chen X., Hou L., et al. Inhibitory effect of microRNA-34a on retinal pigment epithelial cell proliferation and migration // Investig. Ophthalmol. Vis. Sci. 2013. Vol. 54. P. 6481–6488. doi:10.1167/iovs.13-11873
- 8. Wang L., Dong F., Reinach P. S., He D., Zhao X., Chen X., et al. MicroRNA-182 suppresses HGF/SF-induced increases in retinal pigment epithelial cell proliferation and migration through targeting C-met // PLoS One. 2016. Vol. 11. doi:10.1371/journal.pone. 0167684
- 9. Usui-Ouchi A., Ouchi Y., Kiyokawa M., Sakuma T., Ito R., and Ebihara N. Upregulation of mir-21 levels in the vitreous humor is associated with development of proliferative vitreoretinal disease // PLoS One. 2016. Vol. 11. doi:10.1371/journal.pone.0158043
- 10. Murad N., Kokkinaki M., Gunawardena N., Gunawan M. S., Hathout Y., Janczura K. J., et al. MiR-184 regulates ezrin, LAMP-1 expression, affects phagocytosis in human retinal pigment epithelium and is downregulated in age-related macular degeneration // FEBS J. 2014. Vol. 281. P. 5251–5264. doi:10.1111/febs.13066
- 11. Lin H., Qian J., Castillo A. C., Long B., Keyes K. T., Chen G., et al. Effect of miR-23 on oxidant-induced injury in human retinal pigment epithelial cells // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2011. Vol. 52. P. 6308–6314. doi:10.1167/iovs.10-6632
- 12. Li D. dan, Zhong B. wu, Zhang H. xia, Zhou H. yan, Luo J., Liu Y., et al. Inhibition of the oxidative stress-induced miR-23a protects the human retinal pigment epithelium (RPE) cells from apoptosis through the upregulation of glutaminase and glutamine uptake // Mol. Biol. Rep. 2016a. Vol. 43. P. 1079–1087. doi:10.1007/s11033-016-4041-8
- 13. Cui L., Lyu Y., Jin X., Wang Y., Li X., Wang J., et al. miR-194 suppresses epithelial-mesenchymal transition of retinal pigment epithelial cells by directly targeting ZEB1 // Ann. Transl. Med. 2019. Vol. 7. P. 751. doi:10.21037/atm.2019.11.90
- 14. Fuchs H. R., Meister R., Lotke R., and Framme C. The microRNAs miR-302d and miR-93 inhibit TGFB-mediated EMT and VEGFA secretion from ARPE-19 cells // Exp. Eye Res. 2020. Vol. 201. doi:10.1016/j.exer.2020.108258
- 15. Wu J., Helftenbein G., Koslowski M., Sahin U., and Tureci Ö. Identification of new claudin family members by a novel PSI-BLAST based approach with enhanced specificity // Proteins Struct. Funct. Genet. 2006. Vol. 65. P. 808–815. doi:10.1002/prot.21218

- 16. Mineta K., Yamamoto Y., Yamazaki Y., Tanaka H., Tada Y., Saito K., et al. Predicted expansion of the claudin multigene family // FEBS Lett. 2011. Vol. 585. P. 606–612. doi:10.1016/j.febslet.2011.01.028
- 17. Morita K., Furuse M., Fujimoto K., and Tsukita S. Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1999. Vol. 96. P. 511–516. doi:10.1073/pnas.96.2.511
- 18. Mrsny R. J., Brown G. T., Gerner-Smidt K., Buret A. G., Meddings J. B., Quan C., et al. A key claudin extracellular loop domain is critical for epithelial barrier integrity // Am. J. Pathol. 2008. Vol. 172. P. 905–915. doi:10.2353/ajpath.2008.070698
- 19. Colegio O. R., Itallie C. M. Van, McCrea H. J., Rahner C., and Anderson J. M. Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells // Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2002. Vol. 283. P. 142-147. doi:10.1152/ajpcell.00038.2002
- 20. Amasheh S., Meiri N., Gitter A. H., Schöneberg T., Mankertz J., Schulzke J. D., et al. Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells // J. Cell Sci. 2002. Vol. 115. P. 4969–4976. doi:10.1242/jcs.00165
- 21. Angelow S., Ahlstrom R., and Yu A. S. L. Biology of claudins // Am. J. Physiol. Ren. Physiol. 2008. Vol. 295. P. F867. doi:10.1152/ajprenal.90264.2008
- 22. Piorntek J., Winkler L., Wolburg H., Müller S. L., Zuleger N., Piehl C., et al. Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction between classic claudins // FASEB J. 2008. Vol. 22. P. 146–158. doi:10.1096/fj.07-8319com.
- 23. Balda M. S., and Matter K. Tight junctions at a glance // J. Cell Sci. 2008. Vol. 121.- P. 3677–3682. doi:10.1242/jcs.023887
- 24. Furuse M., Sasaki H., and Tsukita S. Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands // J. Cell Biol. 1999. Vol. 147. P. 891–903. doi:10.1083/jcb.147.4.891
- 25. Jakab C., Halász J., Szász A. M., Batmunkh E., Kiss A., Schaff Z., et al. Expression and localisation of claudin-1, -2, -3, -4, -5, -7 and -10 proteins in the normal canine mammary gland // Acta Vet. Hung. 2008. Vol. 56. P. 341–352. doi:10.1556/AVet.56.2008.3.8
- 26. Koval M. Claudin heterogeneity and control of lung tight junctions // Annu. Rev. Physiol. 2013. Vol. 75. P. 551–567. doi:10.1146/annurev-physiol-030212-183809
- 27. Berndt P., Winkler L., Cording J., Breitkreuz-Korff O., Rex A., Dithmer S., et al. Tight junction proteins at the blood–brain barrier: far more than claudin-5 // Cell. Mol. Life Sci. 2019. Vol. 76. P. 1987–2002. doi:10.1007/s00018-019-03030-7

## Подраздел 1.3 Изучение действия компонентов секретома из кондиционированных сред регенератов тканей глаза Urodela на фенотип и экспрессию генов в клетках пигментного эпителия сетчатки человека *in vitro*

В последнее десятилетие в регенеративной медицине развиваются технологии, основанные на бесклеточной терапии. Так, использование технологии мобилизации СК для стимуляции эндогенных резервов для заживления тканей является новой концепцией, которую называют эндогенной регенеративной медициной (ERM). Использование бесклеточных средств (децеллюляризированный внеклеточный матрикс (ВКМ), факторы везикулы, микроРНК (miRNAs)), роста, внеклеточные приводящих К CK, рекрутированию/хомингу эндогенных имеет преимущества В преодолении ограничений и рисков, связанных с применением клеточной терапии [1]. Регенерация амфибий происходит тканей и органов у хвостатых за счет стволовых специализированных проявляющих клеток, высокую степень пластичности дифференцировки. Эта группа животных, а также некоторые виды рыб, способные к регенерации отдельных тканей, могут стать продуцентами факторов, индуцирующих дестабилизацию, понижение уровня дифференцировкипотенциальных клеток источников для восстановления тканей у высших позвоночных [2]. Среди немногочисленных исследований в этом направлении известна работа, связанная с изучением действия конечностей экстрактов, выделенных ИЗ регенератов тритона состояние дифференцированных клеток млекопитающих. С ипользованием данного подхода продемонстрирована возможность с помощью экстрактов регенератов конечности тритона вывести дедиффференцировку имеющие мышечную специализацию C2C12 миотрубочки мыши in vitro [3]. При этом удалось подавить исходную дифференцировку C2C12 мышечных трубочек, которые оказались способными затем пролиферирующие одноядерные клетки, служащие источником для регенерации мышц in vivo. Немногим ранее с этой целью были применены сыворотка крови, тромбин и его отдельные фракции, либо смесь тромбина и сыворотки. Эти вещества могли стимулировать вход миоядрер трубочек в клеточный цикл, однако продукция отдельных происходила. мононуклеарных клеток не По наблюдению авторов стимулирующий эффект оказывали факторы белковой природы, находящиеся в растворимой фракции экстракта, теплоустойчивые и ингибируемые трипсином [3]. 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 мышиным 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 [4]. Приведенные примеры указывают на возможность проявления регенерационных млекопитающих ответов клеток ПОД влиянием веществ, экстрагируемых 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 BKM рыб обладал про-пролиферативным и хемоатрактантным эффектами на клеточную популяцию клетокпрогениторов мышечной ткани сердца человека [4]. В одной из недавних работ в регенерирующей ткани хвостового плавника zebrafish во внеклеточном пространстве были визуализированы везикулы, содержащие слущивающиеся 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 [5].

Регенерационные ответы сетчатки тритона в условиях органотипического культивирования после выделения, частичной гибели фоторецепторного слоя, перерезки зрительного нерва, нами описаны ранее [6, 7]. Нами были проведены первые эксперименты на линии клеток РПЭ глаза человека ARPE-19 *in vitro* при добавлении сред, кондиционированных регенерирующей сетчаткой взрослого тритона [8].

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. Ранее показано, что сетчатка глаза тритона является индуктором регенерации хрусталика [9, 10] и продуцентом факторов, в частности семейства фактора роста фибробластов (FGF), способных индуцировать и стимулировать регенерацию хрусталика из пигментированных клеток радужки глаза этих животных [11]. Наряду с другими тканями задней стенки глаза сетчатка тритонов является источником ряда факторов, в том числе, FGF2 – ключевого

фактора, запускающего сигнальные пути, ответственные за де- и трансдифференцировку клеток РПЭ [12-16]. 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.

## 1.3.2. 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, хороидальной и склеральной оболочек). Образцы 2-х сетчаток помещали в стеклянные флаконы (рисунок 1.3.1) 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 HEPES, 80 мг/л сульфата гентамицина и 10% ЭТС.

Образцы культивировали в темноте при температуре 22–24°С в мини-роллере RM-1 (Еlmi, Латвия) при скорости вращения (60 х 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°С.

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° С и 5% СО<sub>2</sub> 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 CKX31" (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.

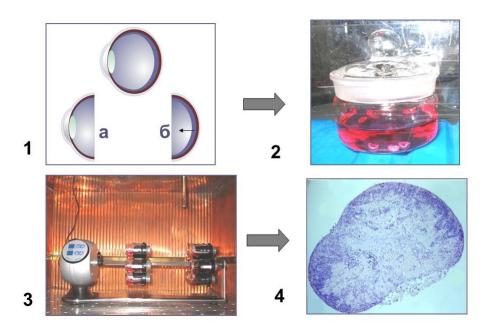


Рисунок 1.3.1 - Этапы органотипического ротационного культивирования сетчатки глаза 1 — микрохирургическое выделение сетчатки: а — изоляция переднего сектора глаза, б — сетчатка в составе задней стенки глаза и ее изоляция (стрелка); 2 — помещение образцов в холодную среду культивирования; 3 — экспозиция изолированных сетчаток в среде при постоянном вращении; 4 — замкнутая сфера сетчатки крысы по окончании экспозиции [8].

Морфометрический анализ. Для оценки морфологических изменений клетки ARPE-19 высаживали в культуральные флаконы для адгезивных культур Т-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 суммарную 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 х 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 двуядерные 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 ×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 ×100.

Оценку пролиферативной активности клеток РПЭ проводили с помощью МТТ-теста по стандартной методике. Клетки высаживали на поверхность 96-луночных планшетов в концентрации 1х10<sup>4</sup>/см<sup>2</sup> и культивировали в течение 24 ч в отсутствии (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. Каждый экспермент проводили дважды, по 16 повторов 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 отсутствии (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° С до ИЦХ окрашивания. Дифференцировку проведения клеток оценивали ПО иммунофлуоресценции, используя первичные антитела к коннексину 43 (Сх43, С6219, кроличьи, 1:200, Sigma-Aldrich, США), цитокератину 8 (СК8, Mob 054-05, мышиные, 1:40, Diagnostic BioSystems, США), OTX2 (AV32439, 1:100, кроличьи, Sigma-Aldrich, США), ВІІІ-тубулину (ab7751, мышиные, 1:200, Abcam, Великобритания), нейрофиламентам средней и тяжёлой фракции (N2912, мышиные, 1:400, Sigma-Aldrich, США), β-катенину (ab32572, кроличьи, 1:200, Abcam, Великобритания), фибронектину (ab23750, кроличьи, 1:100, Авсат, Великобритания), виментину (ав8978, мышиные, 1:100, Авсат, Великобритания), коллагену типа I (аb34710, 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 Keyence BZ-9000E микроскопа (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, 18]. Для маркерных белков Сх43, ОТХ2, фибронектин, коллаген I типа и ВІІІ-тубулин вычисляли количественный индекс (QI) интенсивности флуоресценции по отношению средних значений интенсивности флуоресцентного сигнала (IntDen, в пикселях) к количеству клеток (ядер) ARPE-19. Подсчитывали долю положительно окрашенных клеток, используя программу Cells Count11f (Россия). Для каждого срока анализировали от 400 до 900 клеток, используя 8— 12 микрофотографий независимых полей зрения с масштабным увеличением ×200. В случае β-катенина, локализующегося по цитоплазматической мембране и в цитоплазме, подсчитывали клетки, имеющие цитоплазматическое распределение гранул в-катенина, используя ту же программу. Для каждого срока анализировали от 300 до 700 клеток, используя 4—7 микрофотографий независимых полей зрения с масштабным увеличением ×200. Определяли число клеток, не содержащих гранул β-катенина и содержащих единичные или множество гранул этого белка.

Количественная ПЩР в реальном времени (кПЩР). Подготовку проб, а также выделение тотальной РНК из культур клеток и кПЩР проводили по методике, описанной нами ранее [17,18]. Методом кПЩР оценивали изменения уровня экспрессии мРНК следующих генов транскрипционных факторов, сигнальных белков и маркеров дифференцировки: ОСТ4, NANOG, PAX6, ОТХ2, МІТF, КЯТ18, ВІІІ-тубулин (ТИВВЗ), СОL1A1, СТNNВ1, GSK3B, КLF4, SPP1, RUNX2, FGF2, FGFR1, SMAD4, SMAD5, IGFR1 (праймеры и зонды ДНК Синтез, Россия), NES, ВМР2, ВМР4, ССND1 (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 Сt для повторных точек в эксперименте, расчет значений относительной экспрессии

исследуемых генов методом  $\Delta\Delta$ Сt для каждого образца с использованием значения Сt по гену *GAPDH* в качестве нормирующего.

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.

#### 1.3.3. Результаты и обсуждение

Исследования действия экстрактов регенерирующей сетчатки тритона на клетки линии ARPE-19 человека *in vitro* [8] 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 течение 120 ч культивирования после воздействия КС регенератов сетчаток тритонов (рисунок 1.3.2).

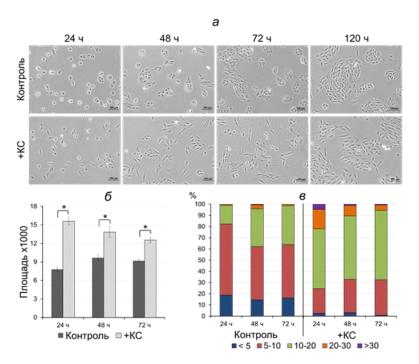


Рисунок 1.3.2 - Изменение морфологии (a) и морфологических параметров (b, b) клеток ARPE-19 в различные временные промежутки после добавления в среду культивирования КС регенератов сетчаток тритонов [8]

a — фазовый контраст;  $\delta$  — 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;  $\epsilon$  — распределение клеток по размеру площади в пикселях х1000, в %.

По данным литературы известно, что по мере увеличения размера клеток увеличивается содержание рибосом и скорость синтеза белка [14-16]. 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 Сх43 (рисунок 1.3.3) и перераспределение β-катенина (рисунок 1.3.4) по сравнению с контролем.

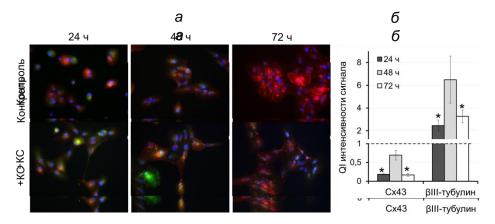


Рисунок 1.3.3 - Анализ изменения Сх43 и  $\beta$ III-тубулина в клетках ARPE-19 [8] Через 24, 48 и 72 ч после воздействия КС: a — двойное иммунофлуоресцентное окрашивание на Сх43 (красное свечение) и  $\beta$ III-тубулин (зеленое свечение). Ядра окрашены DAPI (синее свечение). Об.: 40х.  $\delta$  — количественный индекс (QI) интенсивности флуоресцентных сигналов. Вертикальные отрезки — ошибки среднего, \*p < 0.05.

Так, во временном отрезке 24-48 ч отмечалось увеличение доли клеток, имеющих внутриклеточную локализацию β-катенина. Поскольку β-катенин является не только центральным медиатором канонического Wnt-сигнального пути [18], но и белком адгезионных контактов [19], данное наблюдение совместно с результатами окраски на Сх43 говорит об ослаблении межклеточной адгезии и объясняет появление «рыхлых» колоний под действием КС.

Снижение экспрессии *ОТХ2*, маркера предшественников РПЭ, и *ВМР4*, участвующего в определении ранней специализации клеток РПЭ из нейроэпителия [20], через 24 ч после воздействия КС (рисунок 1.3.5) наряду с ослаблением межклеточных контактов свидетельствует о частичной потере эпителиальной дифференцировки на данном сроке.

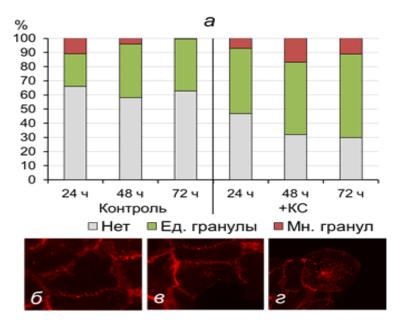


Рисунок 1.3.4 - Количественный анализ клеток ARPE-19 на цитоплазматическое распределение гранул β-катенина (*a*) и примеры иммунофлуорисцентного окрашивания на β-катенин (*красное свечение*), демонстрирующие отсутствие (*б*), единичные (*в*) и множество гранул (*г*) в цитоплазме [8]

a — 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 %.

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 1.3.5). В отсутствии Wnt сигнализации GSK3 $\beta$  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 [21].

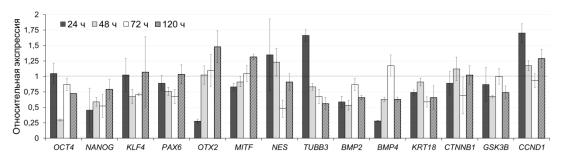


Рисунок 1.3.5 - Изменение профиля экспрессии генов *OCT4*, *NANOG*, *KLF4*, *PAX6*, *OTX2*, *MITF*, *NES*, *TUBB3*, *BMP2*, *BMP4*, *KRT18*, *CTNNB1*, *GSK3B*, *CCND1* в клетках ARPE-19 под действием КС регенератов сетчаток тритонов в различные промежутки времени

# относительно соответствующего контроля (в отсутствии КС), принятого за единицу (*штриховая линия*) [8]

В клетках ARPE-19, как уже было сказано выше, под действием КС наблюдалось увеличение экспрессии гена коллагена I типа COLIA1, 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/βкатенинового пути показана при эмбриональном развитии и регенерации [22, 23]. Нарушение межклеточных контактов и перестроение цитоскелета, о чем свидетельствуют изменения в морфологии клеток и появление «рыхлых колоний», являются одними из событий ранних ЭМП [24]. 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 [25-27]. 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 [28]. Кроме того, виментин экспрессируется в регенерирующих после повреждения тканях. Часто процесс регенерации связан с возвращением клеток к менее дифференцированному фенотипу [29].

Для исключения остеогенной дифференцировки под влиянием КС\_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 1.3.6).

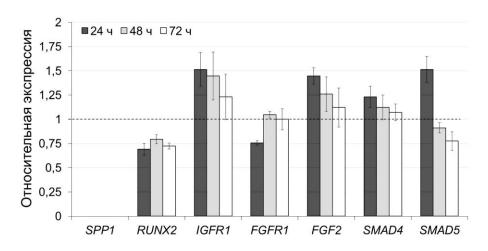


Рисунок 1.3.6 - Изменение профиля экспрессии генов SPP1, RUNX2, IGFR1, FGFR1, FGF2, SMAD4, SMAD5 в клетках ARPE-19 под действием КС регенератов сетчаток тритонов в различные промежутки времени относительно соответствующего контроля (в отсутствии КС), принятого за единицу (штриховая линия) [8]

Как и РПЭ у низших позвоночных, РПЭ человека может быть репрограммирован в нейрального фенотипа [20, 31] наряду c 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 [30, 31]. У млекопитающих признаки ЭМП проявляются в клетках РПЭ как при различных патологиях глаз, так и при восстановлении РПЭ после воздействия лазера [23, 25]. 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 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 1.3.7).

В пользу попытки клеток выйти в нейральную дифференцировку свидетельствуют повышение уровня экспрессии гена *TUBB3*, усиление иммуноокрашивания на белок βШ-тубулин на фоне понижения экспрессии *BMP2* и *BMP4* (рисунок 1.3.5). Ингибирование передачи сигналов BMP играет центральную роль во время нейральной индукции у млекопитающих [32].

Однако затем, ввиду краткосрочного воздействия КС, во временном промежутке 72-120 ч наблюдалось снижение транскрипции маркеров нейрональной дифференцировки (*TUBB3*, *NES*, *PAX6*) и увеличение транскрипции маркеров предшественников РПЭ (*OTX2*, *MITF*), что, вероятно, связано с возвратом клеток к исходной дифференцировке (рисунок 1.3.5).

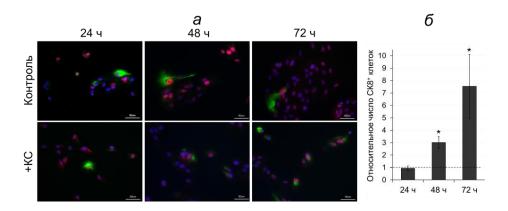


Рисунок 1.3.7 - Анализ изменения ОТХ2 и СК8 в клетках ARPE-19 через 24, 48 и 72 ч после воздействия КС [8]

a — двойное иммунофлуоресцентное окрашивание на ОТХ2 (*красное свечение*) и СК8 (*зеленое свечение*). Ядра окрашены DAPI (*синее свечение*). Об.:  $40 \times .6$  — изменение количества СК8<sup>+</sup>-положительных клеток по отношению к контролю, принятому за единицу. *Вертикальные отрезки* — ошибки среднего, \*p< 0.

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 1.3.2 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 [3], 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 мыши в экстракте регенерирующих конечностей тритона, исследователи [3] показали его белковую природу. Данные о составе секретома 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 [33]. FGF2— член FGF-сигнального пути, функционирует на самых ранних стадиях эмбрионального развития [34], в том числе развития глаза, способствуя специализации нейроэпителия в сетчатку [35]. Основными молекулами, стимулирующими трансдифференцировку РПЭ в клетки сетчатки при регенерации у тритона являются факторы FGF2 и IGF-1.

Самостоятельно IGF-1 не способен вызвать изменения в РПЭ, скорее всего он участвует в повышении эффективности передачи сигнала FGF2 [36]. В нашем исследовании мы наблюдали увеличение уровней экспрессии мРНК IGFR1 и FGF2 в клетках ARPE-19 под действием КС (рисунок 1.3.6), 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 [37, 38]. В нашем исследовании ингибирование экспрессии гена KLF4 положительно коррелировало снижением экспрессии генов-маркеров co дифференцировки РПЭ (ОТХ2, ВМР4, КRТ18) через 24-72 ч после воздействия КС (рисунок 1.3.5). Кроме того, на этом же сроке мы наблюдали снижение пролиферативной активности клеток ARPE-19 по сравнению с контролем (рисунок 1.3.8).

Рисунок 1.3.8 - Среднее число клеток ARPE-19 Тролиферативная активность, станов в с (a) - на микрофотографиях независимых пожей зрения (Cells Count 11f) в разные промежутки времени после добавления в среду КС (серые столбики) по сравнению контролем (черные столбики) и их ошибку (вертикальные отрезки), а также (б) пролиферативная активность клеток (МТТ-тебт) в % через 24 ч после добавлен КС (серый столбик) по сравнению с кон $\frac{1}{2}$ рол $\frac{1}{2}$ м (черный столбик), \*p< 0.0 ß]<u>.</u> Снижение пролиферации совпадало с снижением уровня экспресси наших предыдущих исследованиях показана связь между повышение KLl кспресс усилением пролиферации после воздействия FGF24 как в и інной [ так рртализ неиммортализованных культурах клеток РПЭ [14]. У<mark>с</mark>ил<mark>ен</mark>і пролиф ции 19 и повышение уровня экспрессии *KLF4* наблюдалос 24 через 248 ч после 7воздейстьия 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 [39]. По всей видимости, в зависимости от контекста ТФ KLF4 может регулировать клеточный цикл либо негативно [37,40], либо позитивно [41]. Ещё один белок, контекст-зависимо влияющий на пролиферативный ответ и дифференцировку – ВМР2 [42, 43]. Если сопоставлять результаты падения пролиферативной активности клеток ARPE-19 человека и данные кПЦР, показавшие снижение уровня экспрессии мРНК ВМР2 в интервале 24-72 ч (рисунок 1.3.5), TO онжом отметить ИХ прямую корреляцию. Отсутствие

пролиферативного эффекта, отмеченное ранее при использовании КС и экстрактов из регенерирующих конечностей тритона в работах [44-46], 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.

#### 1.3.4. Заключение

В основе данной работы лежит идея о том, что компонеты «секретома» из регенерирующей сетчатки взрослого тритона могут оказать влияние на возможность дифференцировки клеток ретинального пигментного эпителия человека по нейрональному пути в системе *in vitro*. Проведенное нами исследование является первым в попытке оценить действие КС, полученных из регенерирующих сетчаток тритона, на клетки ARPE-19 человека на морфологическом и генном уровне [47].

Проведенный впервые эксперимент на клеточной модели ретинального пигментного эпителия глаза человека in vitro продемонстрировал интересные результаты, поставив ряд 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 пронейральных маркеров, требуют дальнейшего изучения, как и определение активных, действующих в этом направлении компонентов «секретома». Полученные нами предварительные результаты дают основания для продолжения исследований механизмов, блокирующих последующую дифференцировку ретинальные клетки, способствующих активации дифференцировки И 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.

По подразделу опубликованы 2 статьи

Ivanov A.A., **Kuznetsova A.V.,** Popova O.P., Danilova T.I., Yanushevich O.O. Modern approaches to acellular therapy in bone and dental regeneration // Int. J. Mol. Sci. – 2021. – Vol. 21. Is. 24. Art. No 13454. DOI: 10.3390/ijms222413454 – Q1.

Shafei E.V., Rzhanova L.A., Novikova Y.P., Kurinov A.M., Grigoryan E.N., Aleksandrova M.A., Kuznetsova A.V. Response of human retinal pigment epithelial cells to the effect of the conditioned media of newt retinal regenerates // Cell and Tissue Biology. -2021. - Vol. 15. - N 2. - P. 135-149. DOI: <math>10.1134/S1990519X21020085.

#### 1.3.5. Список использованных источников

- 1. Ivanov A.A., **Kuznetsova A.V.,** Popova O.P., Danilova T.I., Yanushevich O.O. Modern approaches to acellular therapy in bone and dental regeneration // Int. J. Mol. Sci. 2021. Vol. 21. Is. 24. Art. No 13454. DOI: 10.3390/ijms222413454.
- 2. 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.
- 3. 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.
- 4. Kim H.-J., Archer E., Escobedo N., et al. Inhibition of Mammalian Muscle Differentiation by Regeneration Blastema Extract of Sternopygusmacrurus // Dev Dyn. 2008. Vol. 237 (10). P. 2830–2843.doi: 10.1002/dvdy.21702.
- 5. 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
- 6. 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 invitro // Известия РАН. Сер. биол. 2010. № 4. С. 389–402. (NovikovaYu.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
- 7. 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
- 8. 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. T.62. № 9. DOI: 10.31857/S0041377120090060.
- 9. 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.
- 10. Eguchi G. Cellular and molecular background of wolffian lens regeneration // Cell Differ. Dev. 1988. Vol.25 Suppl. P. 147–158.
- 11. 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.
- 12. 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.
- 13. 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.
- 14. Mueller R.L. Genome biology and the evolution of cell-size diversity // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2015. N 11. Vol.7.
- 15. 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.
- 16. 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.

- 17. 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.
- 18. 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.
- 19. 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.
- 20. Nelson W.J., Nusse R. Convergence of Wnt, β-Catenin, and Cadherin pathways // Science. 2004. Vol.303. N 5663. P. 1483–1487.
- 21. 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.
- 22. Cadigan K.M. TCFs and Wnt/β-catenin Signaling. More than One Way to Throw the Switch // K.M. Cadigan, 1- Ed., Elsevier Inc. 2012. P. 1–34.
- 23. Bosada F.M., Devasthali V., Jones K.A., Stankunas K. Wnt/β-catenin signaling enables developmental transitions during valvulogenesis // Dev. 2016. Vol.143. N 6. P. 1041–1054.
- 24. Han J.W., Lyu J., Park Y.J., Jang S.Y., Park T.K. Wnt/β-catenin signaling mediates regeneration of retinal pigment epithelium after laser photocoagulation in mouse eye // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2015. Vol.56. N 13.- P. 8314–8324.
- 25. 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.
- 26. 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.
- 27. 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.
- 28. 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.

- 29. 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.
- 30. 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.
- 31. 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.
- 32. 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.
- 33. 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 // Dev. 2007. Vol.134. N 18. P. 3359–3369.
- 34. 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 Ophtalmol. 2020. Vol.12. P. 1–9.
- 35. Dorey K., Amaya E. FGF signalling: diverse roles during early vertebrate embryogenesis 2013. Vol.137. N 22. P. 3731–3742.
- 36. 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.
- 37. 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.
- 38. 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.
- 39. 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.
- 40. Alge C.S., Hauck S.M., Priglinger S.G., Kampik A., Ueffing M. Differential protein profiling of primary versus imortalized human RPE cells identifies expression patterns

- associated with cytoskeletal remodeling and cell survival // J. Proteome Res. 2006. Vol.5. N 4. P. 862–878.
- 41. 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.
- 42. 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.
- 43. 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.
- 44. 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.
- 45. 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.
- 46. 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.
- 47. Shafei E.V., Rzhanova L.A., Novikova Y.P., Kurinov A.M., Grigoryan E.N., Aleksandrova M.A., Kuznetsova A.V. Response of human retinal pigment epithelial cells to the effect of the conditioned media of newt retinal regenerates // Cell and Tissue Biology. 2021. Vol. 15, № 2. P. 135-149. DOI: 10.1134/S1990519X21020085.

# Подраздел 1.4 Эндогенные регуляторные системы в контроле дифференцировки клеток, гомеостаза и патогенеза сетчатки глаза позвоночных

#### 1.4.1 Введение

Сетчатка всех позвоночных имеет общий план строения. В сетчатке выделяют основные типы нейронов (фоторецепторы, биполярные, горизонтальные, амакриновые и ганглиозные клетки), формирующих ее радиальные слои, и четыре типа клеток глии: макроглия (глия Мюллера и астроциты), микроглия, олигодендроциты (локализованные преимущественно вдоль зрительного нерва). Тела нейронов формируют три ядерных слоя, которые разделены двумя сетчатыми (синаптическими) слоями волокон (аксоны и дендриты нейронов). Наружный ядерный слой сетчатки представлен ядрами светочувствительных фоторецепторов – палочек и колбочек, наружные сегменты которых находятся в тесном контакте с клетками РПЭ, формирующими однорядный слой [1]. Восстановление функции нейральной ткани глаза и сохранение в целом зрения, находится в числе приоритетных проблем биомедицины и офтальмологии. Особое место в регуляции клеточных процессов, поддержании гомеостаза сетчатки глаза позвоночных занимает пуринергическая сигнальная система (ПСС). ПСС является частью более обширной системы, называемой пуриномом, которая объединяет множество белков,

утилизирующих, связывающих и транспортирующих пурины (пуринорецепторы, G-белки, AТФазы, протеинкиназы, дегидрогеназы, эктонуклеотидазы, транспортеры) и кофакторы [2, 3]. ПСС играет важную роль в обеспечении межклеточных взаимодействий между клетками сетчатки и клетками пограничных тканей: фоторецепторами, ретинальным пигментным эпителием (РПЭ), клетками сосудов и глии, что является условием нормального функционирования сетчатки [4]. Взаимодействия перицитов эндотелия капилляров сетчатки и клеток РПЭ, мембраны Бруха, хориокапилляров, а также глии, обеспечивают целостность гематоретинального барьера и поддержание микросреды клеток сетчатки. Взаимодействия между нейронами и клетками глии сетчатки, в контексте ПСС, при метаболических нарушениях, сопровождающихся нейродегенеративными процессами, отражены в ряде обзоров [5-9].

Представления о тканеспецифическом распределении и роли компонентов ПСС, их связи с сигнальными путями и генами-мишенями в нейральных тканях глаза в ходе онтогенеза позвоночных постоянно обогащаются. В настоящем разделе обсуждается роль ПСС в регуляции клеточных процессов (пролиферации, дифференцировки) и гомеостаза сетчатки клеток глаза позвоночных, на базе анализа данных, полученных с использованием современных подходов и модельных объектов *in vivo* и *in vitro*.

# 1.4.2 Материалы и методы

Проведен подробный анализ имеющихся к настоящему времени и опубликованных данных по экспрессии и локализации ключевых компонентов пуринергической системы пуринорецепторов. Пуринорецепторы изучаются на уровне мРНК и/или белка в клеточных типах сетчатки позвоночных, с помошью широкого спектра методов: нозернблот; ОТ-ПЦР; гибридизация in situ, иммуногистохимия, вестерн-блот гибридизация, анализ физиологической и фармакологической активности, авторадиография / связывание лигандов. Использовались электронные ресурсы Pubmed NCBI, Science Direct, Research Gate и др., а также информация из доступных баз белковых и нуклеотидных последовательностей: UniProt, NCBI, OMIM и др. Рассмотрены современные стратегии фармакологической нейропротекции, основанные на использовании компонентов пуринергической сигнальной системы (ПСС), которые нашли применение при лечении патологий сопровождающихся нейродегенерацией. Проведенный глаза, представлен в виде опубликованного обзора, включающего 167 цитируемых научных источников [10].

### 1.4.3 Результаты и обсуждение

Распределение пуринорецепторов в клетках сетчатки млекопитающих. Пуринорецепторы в сетчатке позвоночных представлены семью подтипами трансмембранных лиганд-управляемых ионных каналов (P2XR), восемью подтипами G-связанных рецепторов (P2YR), и характеризуются специфичным для клеток паттерном экспрессии [10] (рисунок 1.4.1).

В ганглиозных клетках сетчатки выявлена экспрессия всех подтипов аденозиновых рецепторов AR, все подтипы рецепторов P2XR (за исключением P2X6R), большинство P2Y-рецепторов P2YR (P2Y1R, P2Y2R, P2Y4R, P2Y6R, P2Y12R). В горизонтальных клетках выявлена экспрессия пуринорецепторов P2X3R, P2X4R, P2X7R; в амакриновых клетках –A1R; P2X1R, P2X2R, P2X3R, P2X4R, P2X5R, P2X7R; P2Y1R, P2Y4R. Биполяры экспрессируют все 3 подтипа пуринорецепторов: A1R; P2X2R, P2X3R, P2X4R, P2X5R, P2X7R; P2Y1R, P2Y2R, P2Y4R, P2Y6R, P2X2R, P2X3R, P2X7R колокализуются с ГАМК. В фоторецепторах (палочки, колбочки) идентифицированы A1R, A2R, A2AR, A2AR, A2BR, A3R; P2X2R, P2X7R, P2Y1R, P2Y2R, P2Y4R, P2Y4R, P2Y6R. В сетчатых слоях сетчатки (наружный и внутренний) - P2X7R; P2X1R, P2X2, P2X4R и P2X7R, P2Y2, P2Y4. В клетках глии Мюллера идентифицированы: A1R, A2AR, A2BR; P2X3R, P2X4R, P2X5R, P2X7R; P2Y1R, P2Y4R, P2Y6R. В микроглии экспрессируются A2AR; P2X4R, P2X7R; P2Y1R, P2Y4R, P2Y4R; астроцитах — P2X4R, P2X7R; P2Y2R; олигодендроцитах — A3R, P2X7, P2Y1. В РПЭ выявлено большинство пуринорецепторов всех трех подтипов: P1 — ARA1, ARA2B, ARA2A, ARA3, P2: P2Y1, P2Y2; P2X7 [10].

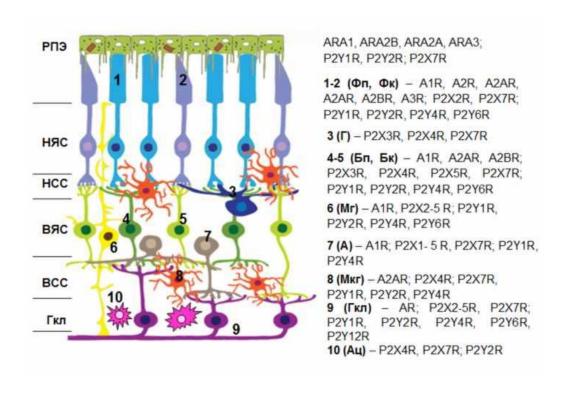


Рисунок 1.4.1 - Распределение основных подтипов пуринергических рецепторов в клетках сетчатки и РПЭ позвоночных

Модифицировано по: [11]. Общий план организации сетчатки позвоночных: РПЭ – ретинальный пигментный эпителий; НЯС – наружный ядерный слой; ВЯС – внутренний ядерный слой; НСС – наружный сетчатый слой; ВСС – внутренний сетчатый слой; Гкл – слой ганглиозных клеток. 1 – фоторецепторы палочки (Фп), 2 – фоторецепторы колбочки (Фк), 3 – горизонтальные клетки (Г), 4 – палочковые биполяры (Бп), 5 – колбочковые биполяры (Бк), 6 – глия Мюллера (Мг), 7 – амакриновые клетки (А), 8 – микроглия (Мкг), 9 – ганглиозные клетки (Гкл), 10 – астроциты [10].

Следует отметить, что сведения по характеристике и распределению разных пуринорецепторов были получены на разных моделях с использованием различных методов, что объясняет отсутствие полной картины о характере экспрессии пуринорецепторов, и некоторые противоречия данных. Рецепторы Р2Х7К были обнаружены в биполярных клетках у крыс с помощью иммунофлуоресценции, и не были обнаружены методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Напротив, рецепторы P2Y6R были обнаружены в этих клетках с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), но не детектировались с помощью иммунофлуоресценции. Иммунохимически рецепторы P2X7R выявлены в микроглии сетчатки обезьян, но не обнаружены в клетках микроглии у мышей Рецепторы P2X2R не детектировались в фоторецепторных нейронах сетчатки крысы, а - P2Y1R, P2Y2R, P2Y4R, P2Y6R - в фоторецепторах кролика, крысы и макаки. Эти различия могут объясняться специфичностью использованных антител и праймеров для ПЦР, и/или различной чувствительностью методов. Другим объяснением может быть то, что, спектр пуринорецепторов и их изоформ, характер экспрессии в одноименном типе клеток может варьировать у разных видов животных [10].

Участие ПСС в регуляции пролиферации, дифференцировки, апоптоза клеток сетчатки в эмбриогенезе. Видовые различия гистогенеза сетчатки у разных позвоночных проявляются в специфичности подтипов клеток сетчатки, гетерохронности клеточных процессов гистогенеза, связанных с различной продолжительностью эмбрионального и постнатального развития, особенностями генетической и эпигенетической регуляции дифференцировки клеток сетчатки [12]. В сетчатке позвоночных в процессе эмбриогенеза возникают многочисленные типы нейронов и глии сетчатки, которые формируют упорядоченные слои в строго координируемой последовательности. Порядок созревания основных клеточных типов сетчатки перекрывается на отдельных этапах гистогенеза и различается во времени у разных видов. Так, у млекопитающих созревание нейронов сетчатки продолжается и в постнатальный период. Кроме того, имеется достаточно много сведений о существовании многочисленных подтипов основных классов нейронов у

разных позвоночных [13]. Нейротрансмиттеры и нейромодуляторы разных классов в кооперации с трофическими факторами, продуцируемыми клеточным микроокружением, вносят вклад в афферентный контроль апоптоза нейронов сетчатки [14].

Различия функционально-морфологической организации сетчатки позвоночных при сходстве основных компонентов ПСС, нейромедиаторов и консервативного регуляторного генного каскада тесно связаны с физиологическими адаптационными особенностями путей передачи зрительного сигнала между нейронами. К примеру в сетчатке низших позвоночных (амфибии, рептилии, рыбы) в отличие от млекопитающих, палочковые биполяры связаны напрямую с ганглиозными клетками [15]. В совокупности, весь присущий определенному типу клеток набор нейромедиаторов, определяет характер взаимодействий между нейронами, их морфологические особенности, а также взаимодействия между нейронами и глией [14]. Сигнальные системы нейротрансмиттеров и нейромедиаторов, включающие АТФ, ацетилхолин, ГАМК (гамма-аминомасляную кислоту) глутамат, участвовуют контроле пролиферации, В процессов дифференцировки, апоптоза, формирования синаптических связей и поддержания жизнеспособности клеток, используя разнообразные механизмы высвобождения из клеток, путем как везикулярного, так и невезикулярного транспорта [16]. Действие пуриновых нейротрансмиттеров, главным образом, реализуется за счет активации одного из двух семейств мембраносвязанных рецепторов: ионотропных и метаботропных связанных с G-белком. АТФ, продуцируемый клетками РПЭ, способен паракринным образом активировать рецепторы Р2-типа, локализованные на клеточной мембране нейронов сетчатки: фоторецепторов, амакриновых и ганглиозных клеток, клеток микроглии. В клетках-предшественниках формирующейся сетчатки высвобождение нейротрансмиттеров было отмечено ДО начала синаптогенеза, ПО механизму везикулярного транспорта, диффузии через плазматическую мембрану клетки, с использованием невезикулярных белков-транспортеров, а также обратного захвата, например, аденозина, фосфатов, ГАМК, глутамата [17, 18]. В формирующейся, как и в зрелой сетчатке, нейротрансмиттеры могут действовать как по Ca<sup>2+</sup>-независимому механизму, так и по Ca<sup>2+</sup>-зависимому механизму, вызывая изменения уровня внутриклеточного Ca<sup>2+</sup> и модулируя активность ферментных систем [19].

Связывание АТФ с метаботропными рецепторами приводит к активации G-белка, который в зависимости от его типа запускает работу одной из нескольких эффекторных систем: фосфолипазы C, втричного мессенджера инозитол-1,4,5-трифосфата (IP3), аденилатциклазы или цАМФ. Активация рецепторов P2YR и P2XR, в ответ на действие нуклеотидов, приводит к мобилизации из внутриклеточных депо ионов Ca<sup>2+</sup>, продукции

инозитол-1,4,5-трифосфата, фосфолипазы A2, возрастанию активности аденилатциклазы и киназ PLC, PKC, запуску MAPK каскада. Показано, что ингибирование сигнального пути PI3K/Akt в сетчатке эмбрионов кур приводит к нарушению продвижения клеток-предшественников сетчатки через G2/M фазы клеточного цикла. В отличие от связанных с G-белком рецепторов P2YR, лиганд-активируемые ионотропные рецепторы P2XR стимулируют быстрый приток ионов Ca<sup>2+</sup> и Na<sup>+</sup> и отток ионов K<sup>+</sup>. Это приводит к деполяризации плазматической мембраны и значительному увеличению концентрации ионов Ca<sup>2+</sup> в цитозоле. Очевидно, что резкое изменение внутриклеточного гомеостаза ионов служит причиной активации нескольких вторичных мессенджеров и ферментативных каскадов, которые задействованы в стимуляции MAPK [20].

Сигнальные пути с участием пуриновых нуклеотидов контролируют продвижение клеток по клеточному циклу и ассоциированы с интеркинетической ядерной миграцией в слое нейробластов сетчатки. В сетчатке мыши действие эндогенного АТФ через рецепторы P2Y1R стимулирует вход клеток-предшественников в цикл пролиферации в результате увеличения уровня экспрессии циклина D1 и снижения экспрессии p27kip1 [21]. В ростовой ЦМЗ сетчатки рыб за счет гидролиза АТФ эктонуклеотидазами происходит поддержание определенной концентрации внеклеточных пуриновых нуклеотидов, что является условием успешной пролиферации клеток. Выявлена роль АДФ как паракринного сигнала в индукции входа клеток цилиарно-маргинальной зоны (ЦМЗ) в S-фазу клеточного цикла в сетчатке низших позвоночных [22]. Известно, что пролиферативная активность клеток ЦМЗ у представителей низших позвоночных (амфибий и некоторых видов рыб) поддерживает постоянный рост сетчатки в течение всего онтогенеза [23, 24]. Снижение уровня внеклеточного АДФ, или блокирование рецепторов P2Y1R, приводит к уменьшению числа клеток ЦМЗ сетчатки, походящих S-фазу клеточного цикла [25].

Роль ПСС в гомеостазе и развитии патологии в сетчатке. Стабильное функционирование зрелой сетчатки достигается за счет сложной сети взаимодействий эндогенных регуляторных систем, что обеспечивает клеточный и метаболический гомеостаз в сетчатке [7, 8, 26]. В норме баланс метаболитов и сигнальных молекул (в частности, компонентов ПСС) постоянно восстанавливается в результате взаимодействия клеток нейронов и глии сетчатки, и взаимодействия клеток сетчатки с пограничными тканями [8]. Передача пуринергических сигналов через рецепторы P2Y1R-типа глии и нейронов сетчатки обеспечивает поддержание жизнеспособности фоторецепторов, а при ишемии сетчатки вовлечена в процесс гибели холинергических амакриновых клеток в результате увеличения цитотоксического влияния кальция. Специфический набор

пуринорецепторов на поверхности глии Мюллера взаимодействует с АТФ и продуктами метаболизма АДФ и АМФ, высвобождаемыми нейронами сетчатки. Благодаря активации рецепторов P2Y1R и P2Y2R, нейроны сетчатки реагируют на действие внеклеточного АТФ повышением содержания внутриклеточного кальция [27], осуществляется абсорбция избытка жидкости во внеклеточном пространстве, необходимая для поддержания гомеостаза РПЭ и пограничных с ним тканей – фоторецепторов сетчатки и сосудистой оболочки [7]. В сетчатке рыбок Danio rerio, у которых клетки глии являются источником для восстановления нейронов [24], активация пуринорецепторов P2Y1R под действием АТФ играет защитную роль для внутренних нейронов сетчатки после цитотоксического повреждения [28]. Длительное нарушение гомеостаза РПЭ и сетчатки, вызванное генетическими факторами, в большинстве случаев необратимо, и приводит к патологическим процессам (апоптоз, воспаление) а, в конечном итоге, к гибели тех или иных клеток сетчатки и потере зрения [29-31]. Дегенеративные заболевания сетчатки характеризуются избыточным уровнем внеклеточного АТФ, что способствует инициации апоптоза клеток РПЭ, фоторецепторов, ганглиозных клеток, гипертрофией глии Мюллера [32]. Процессы массовой гибели нейронов сетчатки сопровождаются формированием новых хаотических синаптических связей, так называемых микронейром, не способных поддерживать нормальный процесс передачи зрительных сигналов, что приводит к ухудшению зрения. Если на ранней стадии удается затормозить процесс гибели нейронов сетчатки, то на поздних стадиях эти процессы приобретают необратимый характер.

В условиях патологии, клетки глии (микроглии, глии Мюллера) сетчатки млекопитающих продуцируют избыточное количество ΑТФ во внеклеточное пространство с помощью экзоцитоза в ответ на осмотическую или механическую стимуляцию, например, при отслойке сетчатки, локальной травме или повреждении светом [33]. Избыточная продукция клетками АТФ во внеклеточное пространство служит эндогенным "сигналом опасности" при окислительном и осмотическом стрессе, воспалении, нарушениях метаболизма, гипоксии, ишемии, повреждении зрительного нерва [32]. В зоне повреждения ткани сетчатки запускается каскад защитных реакций, медиаторами которых выступают ионы  $Ca^{2+}$ ,  $AT\Phi$  и активные формы кислорода ( $A\Phi K$ ), высвобождающиеся из гибнущих клеток в межклеточное пространство. Пуринергические сигналы, под действием избытка АТФ, в которых задействованы рецепторы Р2Х7R, являются центральным звеном в индукции гибели РПЭ, нейронов сетчатки, клеток сосудов при возрастной макулярной дегенерации сетчатки (ВМД), диабетической ретинопатии, пигментном ретините, глаукоме. Ранние молекулярные события глиоза, связанные с выбросом избытка АТФ, стимулируют возрастание уровня перекиси водорода, возрастание концентрации Р2-опосредованного внутриклеточного Са<sup>2+</sup> и гиперактивации P2X7R. Описанные реакции служат сигналом, инициирующим процессы эндогенной защиты и репарации сетчатки. Общим для всех перечисленных нейродегенеративных заболеваний является метаболический стресс, при котором происходит выброс АТФ, стимулирующий клеточную нейротоксичность, опосредованную рецепторами P2X7R [6]. Рецепторы P2X7R представляют собой катионные каналы, активируемые высокими концентрациями АТФ. При длительной активации эти каналы объединяются с мембранными белками, образуя широкие поры, что и приводит к увеличению высвобождения АТФ во внеклеточную среду и последующей гибели клеток [34]. Высокая концентрация внеклеточного АТФ является пусковым звеном в механизмах гибели перицитов микроциркуляторного русла и снижению кровотока в сосудах сетчатки, опосредованных активацией Р2Х7R. Развивающийся при ВМД (возрастная макулярная дистрофия сетчатки) метаболический стресс, связанный со продукции NO клетками эндотелия сосудов сетчатки, снижением деполяризацию клеток, летальный для клеток приток кальция через потенциалуправляемые кальциевые каналы, дегенерацию клеток микроциркуляторного русла. Показано, что NO в микрососудах сетчатки участвует в подавлении избыточной патологической активности кальциевых каналов в результате активации рецепторов P2Y4R, что предотвращает образование пор рецепторами P2X7R и усиленное высвобождение АТФ во внеклеточную среду [35].

Критическим событием в инициации гибели клеток РПЭ и клеток сетчатки является длительная перегрузка цитозоля и митохондрий ионами Ca<sup>2+</sup> вследствие избыточной активности ионотропных рецепторов к глутамату и пуринам потенциалуправляемых кальциевых каналов. В развитие цитотоксической перегрузки кальцием в клетках РПЭ, как и в нейральной сетчатке вносит вклад гиперстимуляция рецепторов Р2ХR, которые служат непосредственными проводниками кальция, и, вызывая деполяризацию клеточных мембран, стимулируют активность потенциал-управляемых кальциевых каналов, что инициирует активность каспаз. Так, активация Р2Х7R в клетках РПЭ при ВМД вызывает подщелачивание лизосом и нарушает их функции, что приводит к повышенному окислению липидов, накоплению избыточного количества липофусцина в наружных сегментах фоторецепторов, подвергающихся фагоцитозу, возникновению акумулирующих липопротеины друз, характерных для РПЭ при патологиях. Важным звеном в механизмах гибели клеток РПЭ, при хориоидальной форме ВМД, географической атрофии (возрастной дегенерации желтого пятна) является Р2Х7R-опосредованная активация инфламмасом NLRP3 и каспаз, на фоне возрастания продукции

АФК. Гибель микроглии, вызванная длительной стимуляцией Р2Х7R также опосредована активностью каспаз 1, 3 и 8. Высвобождаемые из микроглии мыши АТФ и метаболиты, индуцируют фосфорилирование СREB, экспрессию цАМФ. Активация рецепторов Р2У1R и Р2Х7R в микроглии ведет к повышению экспрессии фосфолипаз А2 и D, усилению фосфорилирования тирозина, запуску МАРК-каскада, синтезу провоспалительных цитокинов, факторов транскрипции NF-kB, CREB и AP-1 [4]. Перечисленные факторы регуляции транскрипции запускают экспрессию генов воспалительного ответа — индуцибельной синтазы NO iNOS, продуцируемой в ганглиозных клетках и клетках внутреннего ядерного слоя сетчатки (амакриновые и горизонтальные клетки), и COX-2 [36]. Возрастание уровня экспрессии iNOS в бессосудистой части сетчатки *in vivo* является пусковым механизмом в развитии неоваскулярных и дегенеративных процессов в этой ткани, при пролиферативной витреоретинопатии, гипоксии. В связи с этим iNOS рассматривается в качестве одной из фармакологических мишеней для улучшения кровоснабжения сетчатки и ее защиты от дегенерации [8, 36].

Показано, что активация рецепторов P2YR микроглии вовлечена в патогенез возрастной макулярной дегенерации сетчатки (ВМД) и диабетической ретинопатии. Отмечена вовлеченность рецепторов образующегося при гидролизе АТФ аденозина – A2AR, A2BR, A3 в передачу сигналов, провоцирующих развитие неоваскуляризации сетчатки человека при ВМД [37]. При этом действие аденозина на рецепторы AR3 имеет защитный эффект, останавливающий возрастание внутриклеточной концентрации кальция. Переход глии Мюллера и микроглии к реактивному фенотипу при патологии сетчатки инициирует сигнальные каскады, которые не только участвуют в контроле гибели нейронов сетчатки, но также выполняют функцию нейропротекции [33]. При этом активация пуринорецепторов P2Y1R также может проявлять двойственный эффект: с одной стороны – усиливать пролиферацию и гипертрофию клеток Мюллера и астроцитов, а с другой – снижать апоптотическую гибель клеток сетчатки, индуцируемую гипоксией. При глаукоме нейропротекторный эффект глии Мюллера на ганглиозные клетки сетчатки состоит в их защите от дальнейшего повреждения за счет продукции нейротрофических факторов, антиоксидантов и нейротрансмиттеров, а микроглии – в макрофагальной активности и секреции факторов роста [38]. Патологические изменения, затрагивающие сетчатку, прогрессируют достаточно быстро. В виду неоднозначного ответа глии на стресс исследование механизмов участия ПСС в активации клеток Мюллера и астроцитов приобретает первостепенное значение для разработки стратегий, направленных на "спасение" нейронов сетчатки [4]. С одной стороны, эти исследования тесно связаны с изучением клеточных источников – резервов для восстановления и поддержания гомеостаза сетчатки [22], с другой – с поиском эффективных молекулярных мишеней в терапии нейродегенеративных заболеваний [9, 39].

Применение компонентов ПСС в нейропротекции. В основе биомедицинских подходов терапии патологий сетчатки лежат достижения клеточных и геномных технологий, разрабатываемых на животных моделях vitro-like-in [40-42], базирующиеся на применении антиоксидантов [43]. Наиболее эффективными являются стратегии нейропротекции, направленные на восстановление гомеостаза сетчатки, как клеточного, так и метаболического (рисунок 1.4.2). Фармакологические подходы предусматривают уменьшение степени воспаления в сетчатке глаза, за счет блокирования избыточной активности микроглии и снижения реактивного глиоза [6]. Ключевые компоненты пуринома: нуклеотиды, нуклеозиды, пуринорецепторы, традиционно стоят в ряду основных мишеней для генотерапевтического воздействия и разработки способов доставки фармакологических препаратов в клетки [44], особенно в отношении тканей заднего сектора глаза, характеризующихся низкой биологической доступностью. При большая часть исследований сосредоточена вокруг выяснения пуринорецепторов в механизмах нейродегенерации, поиска селективных агонистов и блокаторов, клеточных и молекулярных мишеней [45-47].



Рисунок 1.4.2 - Стратегии нейропротекции при дегенеративных заболеваниях сетчатки Модифицировано по [48, 49]. Эндогенные системы защиты (пуринергическая и др.) обеспечивают поддержание гомеостаза и функционирование сетчатки. Экстремальные воздействия, сопровождающиеся нарушениями и гибелью клеток сетчатки, перечислены в красных квадратах справа, а стратегии, применяемые для восстановления гомеостаза сетчатки и предотвращения дегенерации ее клеток — в зеленых квадратах слева. Красная

стрелка на схеме сетчатки указывает на участок, в котором отсутствуют фоторецепторы и клетки пигментного эпителия. 1 — фоторецепторы палочки (Фп), 2 — фоторецепторы колбочки (Фк), 3 — горизонтальные клетки ( $\Gamma$ ), 4 — палочковые биполяры (Бп), 5 — колбочковые биполяры (Бк), 6 — глия Мюллера (Мг), 7 — амакриновые клетки ( $\Lambda$ ), 8 — микроглия (Мкг), 9 — ганглиозные клетки ( $\Gamma$ кл), 10 — астроциты [10].

Существуют фармакологические подходы терапии нейродегенеративных заболеваний глаза, основанные на использовании молекулярных компонентов ПСС и подконтрольных сигнальных каскадов. Для изучения роли регуляторных сигнальных путей в клетках сетчатки, тестирования лекарственных препаратов, используются имитирующие ткань *in vivo* системы – органоиды, в которых обнаружены метаболические характеристики клеток сетчатки: экспрессия компонентов ПСС, нейротрансмиттеров, транспортеров, ферментов, ответственных за метаболизм аспартата и глутамата. Однако данный подход имеет ограничения, которые, прежде всего, связаны с нарушениями взаимодействий между пограничными тканями. Это проявляется в неполной структурной организации сетчатки (отсутствие ганглиозного слоя, нарушения синаптогенеза и васкулогенеза), что затрудняет моделирование молекулярных и метаболических процессов, свойственных этой ткани *in vivo*.

Лечению глазных заболеваний пуринергическими препаратами посвящен ряд обзоров, поскольку пуринорецепторы остаются В ряду перспективного фармакологического потенциала в терапии заболеваний сетчатки и стимуляции заживления при повреждении ткани [2, 5, 6, 19]. Применение антагонистов Р2Х7R показало свою эффективность для терапии глаукомы, сопровождаемой прогрессирующей гибелью ганглиозных клеток и атрофией зрительного нерва. Стратегия деактивации P2X7R может быть использована для лечения хориоидальной формы ВМД, возрастной дегенерации желтого пятна (географической атрофии) сетчатки. Для лечения этих патологий также была предложена стратегия использования ингибиров обратной транскриптазы нуклеозидов, которая направлена на блокирование активности каспазы-1, ключевого эффектора инфламмасом NLRP3, индуцированной Alu PHK. Все больший интерес в качестве потенциальных исходных терапевтических мишеней и биомаркеров заболеваний приобретают микроРНК, модулирующие работу ПСС [50].

В настоящее время в клинической практике известно несколько примеров применения фармакологических препаратов на основе пуринов, их производных, компонентов, вовлеченных в метаболизм пуринов, агонистов и антагонистов, для лечения патологий глаза, затрагивающих сетчатку и РПЭ [51-53]. Диаденозин тетрафосфат (Ар4А), являющийся ингибитором пуринорецепторов Р2У1 и Р2У12, был заявлен как

эффективное химическое соединение для лечения глаукомы [51]. Агонист P2Y2R – INS37217, усиливает реабсорбцию субретинальной жидкости, и стоит в ряду перспективных фармакологических средств, которые могут быть направлены на терапию отслоения сетчатки. Антагонист P2X7R и агонисты рецепторов A3R применяются в лечении диабетической ретинопатии [6], дегенерации фоторецепторов сетчатки, антагонист P2Y12R клопидогрел – в терапии развития тромбоза сосудов сетчатки. Агонисты A2AR используются для лечения нейродегенеративных патологий, и, возможно, вскоре найдут более широкое применение [34]. Несмотря на длительную исследований пуринов, клинические вмешательства с использованием компонентов ПСС для лечения широкого спектра заболеваний сетчатки сопряжены с рядом трудностей. В виду широкой представленности пуринорецепторов и их изоформ в разных тканях организма, проблема избирательного фармакологического воздействия на нерешенной. определенные типы клеток остается Отсутствие устоявшихся пуринергических методов лечения связано с относительно небольшим количеством и антагонистов, характеризующихся избирательностью пуринорецепторов, и которые были бы не только эффективными, но и стабильными іп vivo. Многообещающим в офтальмологии является поиск новых блокаторов P2X7R для лечения воспалительных заболеваний, однако, наличие полиморфных вариантов этих рецепторов затрудняет разработку селективных антагонистов для конкретной патологии. Продолжают разрабатываться терапевтические подходы, предусматривающие применение компонентов ППС, стабильных  $in\ vivo$ : эктонуклеотидаз для нормализации баланса АТФ и аденозина, а также ингибиторов избыточного высвобождения из клеток АТФ [34]. Накопление сведений об участии АТФ-связывающих кассетных транспортеров АВС в нормальном метаболизме и при его нарушениях способствует развитию стратегий безопасного интравитреального введения фармакологических препаратов (в частности, новорожденным и взрослым пациентам с сосудистыми заболеваниями глаз), поскольку системное применение некоторых лекарственных препаратов остается небезопасным и малоэффективным [53].

#### 1.1.4. Заключение

Клеточные процессы в развитии и функционировании сетчатки позвоночных динамичны, осуществляются за счет согласованной работы специализированных нейронов и глии и взаимодействия с пограничными тканями — РПЭ и сосудистой оболочкой. ПСС вовлечена в регуляцию пролиферации клеток-предшественников, дифференцировки, гибели и поддержании гомеостаза клеток сетчатки [4, 9]. В

функционировании ПСС в сетчатке, помимо общих закономерностей, проявляются таксоноспецифические различия, генетически и метаболически обусловленные. Сигнальные каскады с участием компонентов ПСС могут выполнять в сетчатке двойственную роль: оказывая как повреждающее, так и защитное действие, что во многом определяется условиями клеточного микроокружения и молекулярного контекста. Выявление ключевых звеньев в работе ПСС, связывающих ее с другими эндогенными регуляторными системами, создает предпосылки для выбора клеточных и молекулярных мишеней для нейропротекции при патологиях сетчатки глаза у человека.

Сигнальные каскады, опосредованные рецепторами Р2У-типа, могут оказывать как нейротоксическое, так и нейропротекторное действие в сетчатке в онтогенезе, при патологиях и повреждении ткани. Один и тот же подтип пуринергических рецепторов P2Y1R в разных сигнальных каскадах может участвовать в процессах дегенерации в одних нейронах сетчатки (ганглиозные, фоторецепторы), и выполнять функцию нейропротекции в других (амакриновые, горизонтальные) [28]. ПСС оказывает модулирующее влияние на характер экспрессии в РПЭ и сетчатке генов принадлежащих к разным функциональным группам, индуцируя или репрессируя их работу [22]. При общности некоторых важных звеньев клеточных и молекулярных процессов, существуют эволюционно закрепленные функциональные различия клеточного ответа в сетчатке [54, 55]. В ответ на действие пуринов в сетчатке возможны проявления вариабельности клеточного ответа (скорость и степень пролиферации и гибели клеток, функциональная состоятельность ткани, полнота восстановительных процессов). Один и тот же общий стимул может приводить к активации пуринергических рецепторов разного типа (изоформ), что может находить отражение в разнообразии используемых сигнальных путей, механизмов и проявляемых эффектов их воздействия на клетки сетчатки. С одной стороны, внеклеточный АТФ и его метаболиты (аденозин) стимулируют секрецию факторов стресса, а с другой – принимают участие в индукции эндогенных систем, работа которых направлена на защиту клеток сетчатки от гибели и поддержание их жизнеспособности. Следует подчеркнуть существование различий в генных сетях, контролирующих клеточные процессы и гомеостаз тканей глаза у позвоночных в онтогенезе и в ответ на разные виды стресса. Различия носят таксоноспецифичный характер и связаны со спецификой работы сигнальных путей в норме и при развитии патологических процессов в сетчатке.

В виду того, что работа ПСС связана с другими эндогенными системами, проявляемые в сетчатке эффекты не всегда равнозначны. С одной стороны, избыточная активация пуринергических сигналов сопровождает хроническое воспаление при

патологиях сетчатки. С другой, нуклеотиды, будучи вовлеченными в механизмы инициации апоптоза, могут предотвращать вторичное развитие воспалительных реакций и некроза в поврежденной ткани сетчатки. Существование тканеспецифического набора мембрано-связанных ионотропных и метаботропных пуринорецепторов во многом объясняет разнообразие эффектов действия пуриновых нуклеотидов. Двойственная роль пуринов в клетках сетчатки млекопитающих, направленная на защиту или повреждение, зависит от физиологического состояния ткани и ее ответа на действие экстремальных факторов (окислительный стресс, воспаление, механическое повреждение). Эффекты пуриновых нуклеотидов в сетчатке во многом определяются их концентрацией, продолжительностью стимуляции пуринорецепторов И ИХ изоформ. также молекулярным контекстом. Отличия находят отражение во взаимодействиях компонентов ПСС и гомеобокссодержащих генов у низших и высших позвоночных. Изучение роли компонентов ПСС в клеточных процессах сетчатки и РПЭ тесно связано с характеристикой молекулярно-генетического портрета клеток и сигнальных путей, поиском факторов ниш, обеспечивающих специализацию и поддержание гомеостаза этих тканей глаза. Разнообразие проявлений действия пуринов в одноименной ткани обуславливает необходимость сравнительного анализа моделей сетчатки in vivo и in vitro, выявления таксоноспецифичных особенностей экспрессии компонентов вовлеченных в пуринергические регуляторные каскады.

Работа проводилась с использованием оборудования ЦКП ИБР им Н.К. Кольцова РАН. По разделу темы опубликовано:

**Маркитантова Ю.В.¹, Симирский В.Н.¹** Роль пуринергической сигнальной системы в контроле гистогенеза, гомеостаза и патогенеза сетчатки глаза позвоночных // Онтогенез. 2021. Т. 52. № 6. С. 485-504. DOI: 10.31857/S0475145021060082 (**Markitantova Yu.V., Simirskii V.N**. The Role of the Purinergic Signaling System in the Control of Histogenesis, Homeostasis, and Pathogenesis of the Vertebrate Retina // Russian Journal of Developmental Biology. — 2021. — Vol. 52. — No.6. — P. 440–458. DOI: 10.1134/S1062360421060084)

Панова И.Г., Сухова Ю.В., Татиколов А.С., Левин П.П., Иванец Т.Ю. Антиоксиданты в стекловидном теле глаза плодов человека // Известия РАН. Серия биологическая. -2021. -№ 6. -С. 588-593. DOI: 10.31857/S1026347021050115.

Ryabtseva A.A., Akberova S.I., Ali-Zade G.K., Babayev H.F., **Markitantova Y.V**. The protective effect of para-aminobenzoic acid in hypoxia-induced apoptosis of conjunctiva and cornea cells *in vivo* // Ophthalmologiya. – 2021. – Vol. 18. – Is.2. – P. 317-324. DOI: 10.18008/1816-5095-2021-2-317-324.

#### 1.4.5. Список использованных источников

- 1. Tsukamoto Y. Morphological survey from neurons to circuits of the mouse retina // Meth. Mol. Biol. 2018. Vol.1753. P. 3–25.
- 2. Sanderson J., Dartt D.A., Trinkaus-Randall V. et al. Purines in the eye: recent evidence for the physiological and pathological role of purines in the RPE, retinal neurons, astrocytes, Müller cells, lens, trabecular meshwork, cornea and lacrimal gland // Exp. Eye Res. 2014. Vol.127. P. 270–279.
- 3. Giuliani A.L., Sarti A.C., Di Virgilio F. Extracellular nucleotides and nucleosides as signalling molecules // Immunol. Lett. 2019. Vol.205. P. 16–24.
- 4. Ventura A.L.M., Santos-Rodrigues A.D., Mitchell C.H. et al. Purinergic signaling in the retina: From development to disease // Brain Res. Bull. 2019. Vol.151. P. 92–108
- 5. Guzman-Aranguez A., Gasull X., Diebold Y. et al. Purinergic receptors in ocular inflammation // Mediators Inflamm. 2014. Vol. 2014. Article No. 320906.
- 6. Reichenbach A., Bringmann A. Purinergic signaling in retinal degeneration and regeneration // Neuropharmacology. 2016. Vol. 104. P. 194–211.
- 7. Sinha T., Naash M.I., Al-Ubaidi M.R. The Symbiotic Relationship between the Neural Retina and Retinal Pigment Epithelium Is Supported by Utilizing Differential Metabolic Pathways // iScience. − 2020a. − Vol. 23. − № 4. Article No. 101004.
- 8. Sinha T., Naash M.I., Al-Ubaidi M.R. Flavins act as a critical liaison between metabolic Homeostasis and oxidative stress in the retina // Front. Cell Dev. Biol. − 2020b. − Vol.27. − № 8. Article No. 861.
- 9. Burnstock G., Ulrich H. Purinergic signalling in embryonic and stem cell development // Cell Mol. Life Sci. 2011. Vol. 68. № 8. P. 1369–1394.
- 10. **Markitantova Yu. V., Simirskii V. N.** The Role of the Purinergic Signaling System in the Control of Histogenesis, Homeostasis, and Pathogenesis of the Vertebrate // Retina Russian Journal of Developmental Biology. 2021. Vol.52. No. 6. P. 440–458.
- 11. Li F., Jiang D., Samuel M.A. Microglia in the developing retina // Neural Dev. 2019. № 14. P.12.
- 12. Cvekl A., Mitton K.P. Epigenetic regulatory mechanisms in vertebrate eye development and disease // Heredity (Edinb). − 2010. − Vol.105. − № 1. − P. 135–151.
- 13. Alvarez-Hernan G., de Mera-Rodríguez J.A., Ganan Y. et al. Development and postnatal neurogenesis in the retina: a comparison between altricial and precocial bird species // Neural Regen. Res. 2021. Vol. 16. № 1. P.16-20. doi: 10.4103/1673-5374.286947.

- 14. Linden R., Martins R., Silveira M.S. Control of programmed cell death by neurotransmitters and neuropeptides in the developing mammalian retina // Prog. Ret. Eye Res. -2005. Vol. 24. N 24. P. 457-491.
- 15. Voelgyi B., Deans M.R., Paul D.L. et al. Convergence and segregation of the multiple rod pathways in mammalian retina // J. Neurosci. − 2004. − Vol. 24. − № 49. − P. 11182–11192.
- 16. Voigt J., Grosche A., Vogler S. et al. Nonvesicular Release of ATP from Rat Retinal Glial (Müller) Cells is Differentially Mediated in Response to Osmotic Stress and Glutamate // Neurochem. Res. − 2015. − Vol. 40. − № 4. − P. 651–660.
- 17. Zimmermann H., Zebisch M., Sträter N. Cellular function and molecular structure of ectonucleotidases // Purinergic Signal. − 2012. − Vol. 8. − № 3. − P. 437–502.
- 18. Nascimento J.L., Sawada L.A., Oliveira K.R.M. et al. GABA and glutamate transporters: new events and function in the vertebrate retina // Psychol. Neurosci. -2013. Vol.  $6. N_{\odot} 2. P. 145-150$ .
- 19. Beckel J.M., Lu W., Civan M.M. et al. Treatment of retinal disorders with purinergic drugs: beyond receptors // J. Ocul. Pharmacol. Ther. 2016. Vol.32. P. 488–489.
- 20. Ornelas I.M., Silva T.M., Fragel-Madeira L. et al. Inhibition of PI3K/Akt Pathway Impairs G2/M Transition of Cell Cycle in Late Developing Progenitors of the Avian Embryo Retina // PLoS One. − 2013. − Vol.8. − № 1. Article No. e53517.
- 21. Sholl-Franco A., Fragel-Madeira L., Macama A.C. et al. ATP controls cell cycle and induces proliferation in the mouse developing retina // Int. J. Dev. Neurosci. -2010. Vol.  $28. N_{\odot} 1. P. 63-73$ .
- 22. Ricatti M.J., Battista A.G., Zorrilla Z.M. et al. Purinergic signals regulate daily S-phase cell activity in the ciliary marginal zone of the zebrafish retina // J. Biol. Rhythms. -2011.  $N_{\odot} 2. P. 107-117$ .
- 23. Миташов В. И. Характеристика митотических циклов клеток пигментного эпителия и зачатка сетчатки у взрослых тритонов (Triturus cristatus, Triturus taeniatus) // Докл. АН СССР. 1969. Т. 189. №. 3. С. 666–669.
- 24. Raymond P.A., Barthel L.K., Bernardos R.L. et al. Molecular characterization of retinal stem cells and their niches in adult zebrafish // BMC Dev. Biol. 2006. Vol.6. Article No. 36.
- 25. Franca G.R., Freitas R.C., Ventura A.L. ATP-induced proliferation of developing retinal cells: regulation by factors released from postmitotic cells in culture // Int. J. Dev. Neurosci. -2007. -Vol. 25.  $-\text{N}_{2}$  5. -P. 283-291.

- 26. Ramachandra R.S., Fliesler S.J. Cholesterol homeostasis in the vertebrate retina: biology and pathobiology // J. Lipid Res. 2021. Vol. 62. Article No. 100057.
- 27. Metea M.R., Newman E.A. Glial cells dilate and constrict blood vessels: a mechanism of neurovascular coupling // J. Neurosci. 2006. Vol. 26. P. 2862–2870.
- 28. Battista A.G., Ricatti M.J., Pafundo D.E. et al. Extracellular ADP regulates lesion-induced in vivo cell proliferation and death in the zebrafish retina // J. Neurochem. 2009. Vol. 111. N 2. P. 600--613.
- 29. Markitantova Y.V., Simirskii V.N. The Role of the Redox System in Initiation of Neural Eye Tissues Regenerative Response in Vertebrates // Rus. J. Dev. Biol. 2020 a. Vol. 51. P.16–30.
- 30. Pirvu A.S., Andrei A.M., Stanciulescu A.C. NAD+ metabolism and retinal degeneration // Exp. Ther. Med. 2021. Vol.22. № 1. Article No. 670.
- 31. Zhang X., Alhasani R.H., Zhou X. et al. Oxysterols and retinal degeneration // Br. J. Pharmacol. 2021. Jan 27. [Online ahead of print].https://doi.org/10.1111/bph.15391.
- 32. Notomi S., Hisatomi T., Murakami Y. et al. Dynamic increase in extracellular ATP accelerates photoreceptor cell apoptosis via ligation of P2RX7 in subretinal hemorrhage // PloS One. 2013. Vol.8. Article No. e53338.
- 33. Vecino E., Rodriguez F.D., Ruzafa N. et al. Glia–neuron interactions in the mammalian retina // Prog. Ret Eye Res. 2016. Vol.51. P.1-40.
- 34. Andrejew R., Oliveira-Giacomelli A., Ribeiro D.E. et al. The P2X7 Receptor: Central Hub of Brain Diseases // Front. Mol. Neurosci. 2020. Vol.13. Article No. 124.
- 35. Bhutto I.A., Baba T., Merges C. et al. Low Nitric Oxide Synthases (NOS) in Eyes with Age-related Macular Degeneration (AMD) // Exp. Eye Res. 2010. Vol. 90. № 1. P. 155–167.
- 36. Ghosh M., Aguirre V., Wai K. et al. The Interplay between Cyclic AMP, MAPK, and NF- $\kappa$ BP at hways in Response to Proinflammatory Signalsin Microglia // Biomed. Res. Int. -2015.-Vol.2015. Article No. 308461.
- 37. Zhang S., Li H., Li B. et al. Adenosine A1 receptors selectively modulate oxygen-induced retinopathy at the Hyperoxic and hypoxic phases by distinct cellular mechanisms // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. − 2015. − Vol. 56. − № 13. − P. 8108–8119.
- 38. Liu Y., Wang C., Su G. Cellular Signaling in Müller Glia: Progenitor Cells for Regenerative and Neuroprotective Responses in Pharmacological Models of Retinal Degeneration // J. Ophthalmol. 2019. Article No. 5743109.
- 39. Illes P., Rubini P. Regulation of neural stem/progenitor cell functions by P2X and P2Y receptors // Neural Regen. Res. 2017. Vol.12. P. 395–396.

- 40. Grigoryan E.N., Novikova Y.P., Gancharova O.S. et al. New antioxidant SkQ1 is an effective protector of rat eye retinal pigment epithelium and choroid under conditions of long term organotypic cultivation // Adv. Aging Res. 2012. Vol.1. P. 31–37.
- 41. Capowski E.E., Samimi K., Mayer S.J. et al. Reproducibility and staging of 3D human retinal organoids across multiple pluripotent stem cell lines // Development. 2019. Vol. 146. № 1. Article No. dev171686.
- 42. Dopper H., Menges J., Bozet M. et al. Differentiation Protocol for 3D Retinal Organoids, Immunostaining and Signal Quantitation // Curr. Protocols. − 2020. − Vol. 55. − № 1. Article No. e120.
- 43. **Панова И.Г**.<sup>1</sup>, Сухова Ю.В., Татиколов А.С., Левин П.П., Иванец Т.Ю. Антиоксиданты в стекловидном теле глаза плодов человека // Известия РАН. Серия биологическая. 2021. № 6. С. 588-593. DOI: 10.31857/S1026347021050115.
- 44. Spinozzi E., Baldassarri C., Acquaticci L. et al. Adenosine receptors as promising targets for the management of ocular diseases // Med. Chem. Res. 2021. -Vol. 30. P. 353–370.
- 45. Eltzschig H.K., Sitkovsky M.V., Robson S.C. Purinergic signaling during inflammation // N. Engl. J. Med. 2012. Vol. 367. № 24. P. 2322–2333.
- 46. Mac Nair C.E., Schlamp C.L., Montgomery A.D. et al. Retinal glial responses to optic nerve crush are attenuated in *Bax*-deficient mice and modulated by purinergic signaling pathways // J. Neuroinflammation. 2016. Vol. 13. Article No. 93.
- 47. Boia R., Ruzafa N., Aires I.D. et al. Neuroprotective strategies for retinal ganglion cell degeneration: Current status and challenges ahead // Int. J. Mol. Sci. − 2020. − Vol. 21. − № 7. Article No.2262.
- 48. Chirco K.R., Potempa L.A. C-Reactive Protein As a Mediator of Complement Activation and Inflammatory Signaling in Age-Related Macular Degeneration // Front Immunol. 2018. Vol. 9. Article No. 539.
- 49. Maneu V., Lax P., Cuenca N. Current and future therapeutic strategies for the treatment of retinal neurodegenerative diseases // Neural Regen. Res. − 2022. − Vol. 17. − № 1. − P. 103-104.
- 50. Ferrari D., Bianchi N., Eltzschig H.K. et al. MicroRNAs modulate the purinergic signaling network // Trends Mol. Med. 2016. Vol. 22. P. 905–918.
- 51. Ryabtseva A.A., Akberova S.I., Ali-Zade G.K., Babayev H.F., **Markitantova Y.V**. The protective effect of para-aminobenzoic acid in hypoxia-induced apoptosis of conjunctiva and cornea cells *in vivo* // Ophthalmologiya. 2021. Vol. 18. Is. 2. P. 317-324. DOI: 10.18008/1816-5095-2021-2-317-324.

- 52. Fonseca B., Martinez-Aguila A., De Lara M.J.P. et al. Diadenosine tetraphosphate as a potential therapeutic nucleotide to treat glaucoma // Purinergic Signal. 2017. Vol. 13. P. 171–177.
- 53. Liu L., Liu X. Roles of Drug Transporters in Blood-Retinal Barrier // Adv. Exp. Med. Biol. 2019. Vol. 1141. P. 467–504.
- 54. 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.
- 55. Gampe K., Haverkamp S., Robson S.C. et al. NTPDase2 and the P2Y1 receptor are not required for mammalian eye formation // Purinergic Signal. -2015. Vol. 11. P. 155-160.

### 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

Экспериментальные данные свидетельствуют, что гиалуронансинтаза 2 (HAS2) является важной лекарственной мишенью при фиброзе [1], раке [2] и метаболическом синдроме [3]. Наиболее широко используемым ингибитором биосинтеза гиалуроновой кислоты (ГК) является 4-метилумбеллиферон (4MU) [4]. Существуют ряд других соединения, которые ингибируют секрецию ГК в клеточных линиях, включая аналоги нестероидных агонистов рецепторов эстрадиола [5-7], но ни одно из этих соединений не является прямым ингибитором HAS. Общепризнано, что 4MU может оказывать комплексное влияние на производство ГК, также 4MU является субстратом для UDPглюкуронилтрансфераз. Было высказано предположение, что исчерпание доступности субстрата HAS UDP-GLCUA в присутствии 4MU может частично объяснять ингибирование синтеза HA в клетках млекопитающих. Кроме того, 4MU может регулировать выработку ГК на транскрипционном уровне, подавляя экспрессию HAS2 [8, 9]. Важно, что экспрессия HAS2 регулируется ядерными рецепторами, в частности, глюкокортикоидными рецепторами (GR). Было показано, что глюкокортикоиды индуцируют быстрое и длительное, почти полное подавление уровня мРНК HAS2, опосредованное снижением как скорости транскрипции, так и периода полураспада [10]. Таким образом можно предположить, что 4MU может взаимодействовать с GR и подавлять экспрессию HAS2.

НАЅІ млекопитающих, НАЅ2 и НАЅ3, относятся к гиалуронансинтазам класса I с удлинением цепи от редуцирующего конца [11]. Структура белков имеет высокую гомологию не только друг с другом, но и с хитинсинтазами. Гиалуронансинтазы млекопитающих действительно обладают активностью хитинсинтазы, которая была тщательно исследована Вайгелем [11, 12]. Можно предположить, что множество соединений — ингибиторов хитинсинтаз могут обладать также и ингибирующими свойствами к ферменту НАЅ2. Таким образом, характеристика ингибиторов продукции ГК, непосредственно взаимодействующих с НАЅ, имеет важное значение для перспективы разработки лекарственных средств.

Мы были синтезировали несколько аналогов 4MU с целью дальнейшего изучения структурно-функциональных взаимосвязей в анализе продукции гиалуроновой кислоты в клеточной культуре, а также были выбраны несколько известных и коммерчески

доступных ингибиторов хитинсинтазы для определения их возможной ингибирующей активности гиалуронансинтаз.

#### 2.1.2 Материалы и методы

*Культура клеток*. В работе использовалась мышиная клеточная линия NIH3T3 (ATCC® CRL-1658 <sup>тм</sup>). 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 помощью набора DuoSetHyaluronan (DY3614, R&DSystem). 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/с 8-недельного возраста вызывали внутрибрющинным введением СС14 в оливковом масле в концентрации 500 мг/кг. Ингибиторы Этоксазол и 4МU вводили перорально через желудочный зонд в концентрации 600 мг/кг в день. По окончанию 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-моделирования 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 GraphPadPrism 8.

#### 2.1.3 Результаты и обсуждение

В работе использовали 9 соединений кумаринов и три коммерческих ингибитора синтеза хитина (рисунок 2.1.1). Протестированы новые соединения кумарина и коммерческих ингибиторов синтеза хитина на предмет ингибирования продукции ГК и цитотоксичности в тесте на культуре клеток (рисунок 2.1.2 A, Б). Производное кумарина 10'-метил-6'-фенил-3'H-спиро [пиперидин-4,2'-пирано [3,2-g] хромен] -4', 8'-дион подавлял осаждение ГК клетками NIH3T3 с ингибирующей концентрацией IC50 = 1,69 ± 0,75 мкМ.

Этоксазол, бупрофезин, трифлумурон, ингибиторы синтеза хитина, снижали отложение ГК с IC50 4,21  $\pm$  3,82 мкМ, 1,24  $\pm$  0,87 мкМ и 1,48  $\pm$  1,44 мкМ, соответственно.

4MU derivatives				
OH  I. Molecular Weight: 162.14	MeO O O O Me II. Molecular Weight: 190.20	Me HO O O N(Et) <sub>2</sub> Me III. Molecular Weight: 275.34		
N(Et) <sub>2</sub> Ph  IV. Molecular weight: 337.41	Me HO O Ph V. Molecular Weight: 294.30	Me O Ph VI. Molecular Weight: 374.43		
HN O Me O Ph VII. Molecular Weight: 375.42	Me HO O O O Me VIII. Molecular Weight: 232.23	Me O Me IX. Molecular Weight: 312.36		
VII. Molecular Weight: 375.42   VIII. Molecular Weight: 232.23   IX. Molecular Weight: 312.36   4-methylumbelliferone				
HO CH <sub>3</sub> Molecular Weight 176.17				
Chitin synthase inhibitors				
H <sub>3</sub> C CH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	O CH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> H <sub>3</sub> C CH <sub>3</sub>	O F F F		
Etoxazole (Eto) Molecular Weight: 359.417	Buprofezin (Bup) Molecular Weight: 305.44	Triflumuron (Trif) Molecular Weight: 358.70		

Рисунок 2.1.1 - Список протестированных производных кумарина и ингибиторов хитинсинтазы

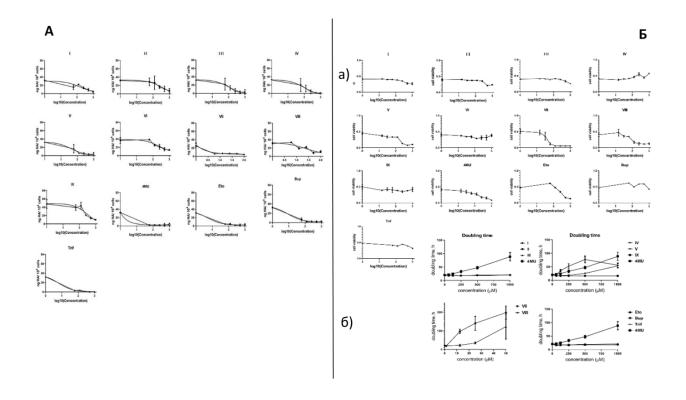


Рисунок 2.1.2 – Влияния тестируемых ингибиторов на клетки NIH3T3 А – Ингибирование отложения ГК в клеточной культуре NIH3T3, обработанных различными концентрациями соединений кумарина и ингибиторов синтеза хитина; Б - а) МТТ-анализа для соединений I–IX, Eto, Bup. и Trif., n = 3. б) время удвоения клеток после воздействия ингибиторами. Данные представлены в среднем  $\pm$  SD, n = 3.

Осаждение ГК клетками NIH3T3 с полумаксимальной ингибирующей концентрацией (IC50) =  $1,69 \pm 0,75$  мкМ оказалось выше, чем 4MU (IC50 =  $8,68 \pm 1,6$  мкМ). Этоксазол, бупрофезин, трифлумурон, ингибиторы синтеза хитина, снижали отложение ГК с IC50  $4,21 \pm 3,82$  мкСм,  $1,24 \pm 0,87$  мкСм и  $1,48 \pm 1,44$  мкл, соответственно (рисунок 2.1.2. А; таблица 2.1.1).

Таблица 2.1.1 IC50 для ингибирования отложения гиалуроновой кислоты в клеточных культуральных средах соединениями кумарина и ингибиторами синтеза хитина

Compound	$IC_{50}$ (Mean $\pm$ SD)	Compound	$IC_{50}$ (Mean $\pm$ SD)
I	$145.6\pm92.4~\mu M$	VIII	$17.74\pm10.55~\mu M$
II	$223.1\pm140~\mu M$	IX	$362.5 \pm 154.6 \ \mu M$
III	$100.3 \pm 61.98~\mu M$	4MU	$8.68 \pm 1.6~\mu M$
IV	$100\pm65.88~\mu M$	Eto	$4.21\pm3.82~\mu M$
V	$42.52 \pm 21.28 \ \mu M$	Bup	$1.24\pm0.87~\mu M$
VI	$250 \pm 164.4~\mu M$	Trif	$1.48\pm1.44~\mu\text{M}$
VII	$1.69\pm0.75~\mu M$		

Нами также был проведен количественный иммунофлуоресцентный анализ связанной с клетками фракции гиалуроновой кислоты на клеточной культуре NIH3T3.

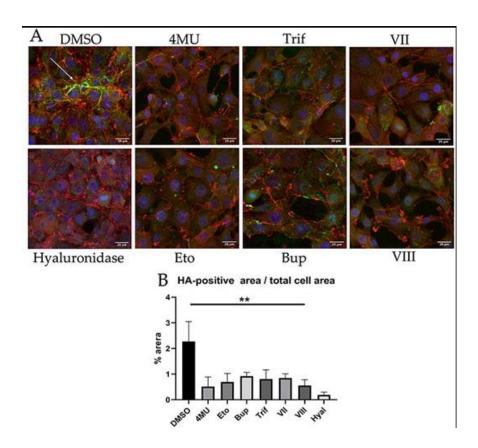


Рисунок 2.1.3 - Количественный иммунофлуоресцентный анализ гиалуроновой кислоты, связанной с клетками NIH3T3, после обработки соединениями кумарина и ингибиторами синтеза хитина

А - флуоресцентное окрашивание НАВР после 72-часового роста в присутствии ингибиторов (10 мкм). Гиалуроновая кислота зеленого цвета; F-актин красного цвета; ДНК синего цвета; стрелки — нити НА. Шкала шкалы — 20 мкм. Б - относительная положительная площадь гиалуроновой кислоты в процентах к общей площади клетки. Данные представлены в виде среднего  $\pm$  SD, n = 3; \*\* — P <0,01 по сравнению с контролем. В качестве отрицательного контроля использовали клетки, обработанные гиалуронидазой (1 мг/мл в PBS, 30 мин +37°C).

Для проверки влияния ингибиторов на клетки, связанные с ГК, клетки инкубировали с пятью различными ингибиторами в концентрации 10 мкм в течение 3 дней, а затем фиксировали и окрашивали гиалуроносвязывающим белком (НАВР) — специфическим для ГК. Диметилсульфоксид использовался в качестве положительного контроля, а расщепление гиалуронидазой ГК служило отрицательным контролем (рисунок 2.1.3 А и Б). В положительных контрольных клетках НА образует спутанные волокна на поверхности клеток в областях с высокой плотностью (рисунок 2.1.3 А). Обработка 10 мкм 4МU, ингибиторами синтеза соединений VII, VIII и хитина, уменьшает процент НА-

положительной области по меньшей мере в 3 раза (рисунок 2.1.3 Б), в то время как обработка гиалуронидазой элиминирует окрашивание НАВР. Волокна ГК были редкими или отсутствовали после воздействия ингибиторами. Небольшое количество положительных структур, которые все еще присутствовали, были тоньше и короче по сравнению с положительным контролем. Мы также оценили влияние 4МU и этаксозола на уровень экспрессии HAS2, HAS3, Hyal1 и 2 (рисунок 2.1.4).

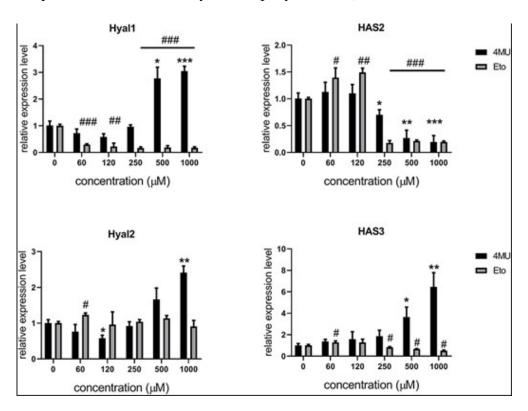


Рисунок 2.1.4 - Влияние этоксазола и 4MU на экспрессию HAS2, HAS3, Hyal1 и Hyal2 в клетках NIH3T3 Данные представлены в виде среднего  $\pm$  SD, n = 3, \*\*\*—P < 0,001 (односторонний ANOVA).

4МU значительно ингибировал экспрессию HAS2 и повышал экспрессию Hyal1 с IC50 ~250 мкМ и активировал экспрессию HAS3 в концентрации более 500 мкМ (рисунок 2.1.4). Экспрессия Hyal2 не влияла на 4МU в концентрациях до 1 мМ. Этоксазол в концентрации 120 мкМ повышал экспрессию HAS2 почти в 1,5 раза, но более высокие дозы подавляли ее до 80%. Он также ингибировал экспрессию HAS3 в концентрациях выше 250 мкМ. Уровень Hyal1 значительно снизился при всех испытанных концентрациях, в то время как уровень Hyal2 не был изменен.

Для экспериментов *in vivo* были выбраны 4MU и ингибитор хитинсинтаз этоксазол. Мы проверили действие этоксазола на мышиной модели фиброза печени, вызванного CCl4 (рисунок 2.1.5 A, Б).

Измерение уровней аспартатаминотрансферазы (АСТ) и аланинаминотрансферазы (АЛТ) в крови экспериментальных животных показало, что 4МU или этоксазол не предотвращали начальное повреждение гепатоцитов, вызванное производными СС14 (рисунок 2.1.5 А). Только этоксазол и 4МU не проявляли гепатотоксичности при суточной дозе 600  $M\Gamma/K\Gamma$ . Гистологический иммунногистологический анализ показал, что этоксазол уменьшал продукцию ГК и предотвращал образование коллагеновых волокон в модели фиброза печени ССІ4 у мышей (рисунки 2.1.5 Б (a), 2.1.6). Вестерн-блот анализ на маркер фиброза αSMA также показал достоверное снижение маркера при лечении фиброза мышей этоксазолом (рисунок 2.1.5 Б (б)).

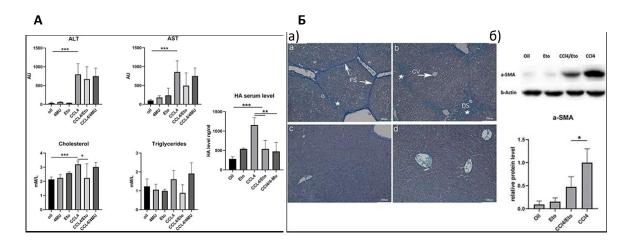


Рисунок 2.1.5 – Действие 4MU и этоксазола на мышиной модели фиброза печени, вызванного CC14

А - уровни АЛТ и АСТ - маркеров повреждения клеток печени. Концентрация ГК и концентрации липидов в плазме мышей с CCl4-индуцированным фиброзом, обработанных 4MU и этоксазолом. \*\*\*—P < 0.001 односторонний ANOVA, n = 8, данные представлены в виде среднего  $\pm$  SD. E = 80. Трихромное окрашивание по Мэллори фиброза печени. Экспериментальные группы: E = 81. E = 82. E = 83. E = 84. E = 84. E = 85. E = 85. E = 86. E = 86. E = 86. E = 87. E = 88. E = 89. E = 89.

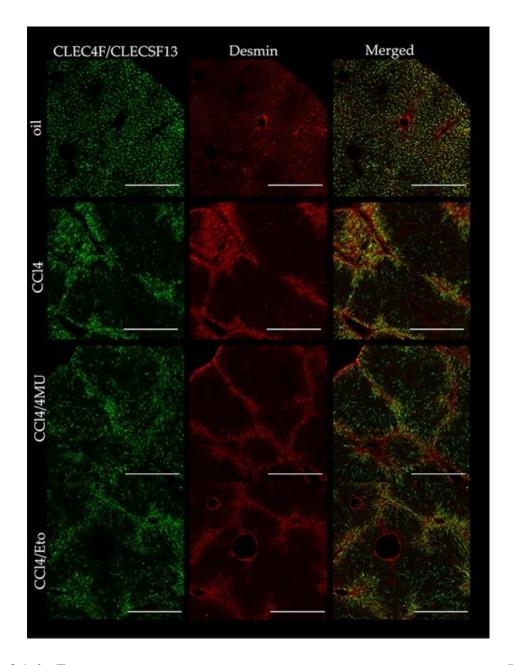


Рисунок 2.1.6 - Локализация активированных звездчатых клеток печени и клеток Купфера в фиброзной печени ССl4 мышей, получавших 4MU и этоксазол Срезы окрашивали abs на десмин (маркер для HSCs) и CLEC4F/CLECSF13 (маркер для клеток Купфера). Шкала — 500 мкм. Данные изображения были использованы для получения коэффициентов колокализации Мандерса (МСС) для клеток КСS и HSCs.

Для объяснения возможных механизмов ингибирующего действия этоксазола был проведен биоинформационный анализ, который выявил гомологию между хитинсинтазами и ферментами гиалуронансинтазами в поро-образующем домене, содержащем предполагаемый сайт связывания этоксазола (рисунок 2.1.7).

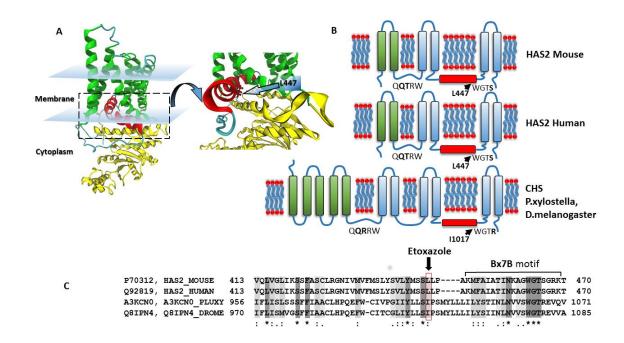


Рисунок 2.1.7 - Сравнение доменной организации гиалуронансинтаз мыши и человека и хитинсинтазы *P. xylostella*, *D. melanogaster* 

А - Прогнозируемая трехмерная структура HAS2. В — схематическое сравнение HAS2 и хитинсинтаз — N-концевые трансмембранные домены окрашены в зеленый цвет, С-концевые трансмембранные домены — в синий цвет. Каталитический центр HAS и CHS содержал 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 Ile-1017 хитинсинтазы. (\*) — консервативный остаток, (:) — оценка> 0,5, (.) — оценка  $\leq$  0,5.

Таким образом, литературные данные свидетельствуют об обоснованности терапевтического применения специфических ингибиторов синтеза гиалуронана. В данной работе мы представляем кривую дозы-эффекта для 4МU ингибирования отложения ГК в культуре клеток при низком микромолярном диапазоне. Расчетная IC50 для 4МU составила 8,68 ± 1,6 мкМ. Наши данные хорошо согласуются с опубликованными ранее низкими микромолярными эффектами 4МU [13, 14]. 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-МU важна, и ее метилирование почти полностью отменяет ингибирующую активность 4-МU. Целлюлоза, хитин и гиалуронан – три самых распространенных линейных углеводных полимера на Земле [15]. 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 ингибировать активность HAS. В настоящей работе мы впервые продемонстровали, что ингибиторы хитинсинтазы, этоксазол, бупрофезин и трифлумурон в диапазоне низких концентраций µМ снижают секрецию ГК фибробластами NIH3T3. Все эти ингибиторы не проявляли токсичность в исследуемом диапазоне концентраций от 1 мкМ до 1 мМ. Гиалуронансинтазы типа І представляют собой трансмембранные белки [16], которые имеют несколько общих аминокислотных последовательностей (QRRRW, САТМWHXT, QXFEYи WGTRE) с хитинсинтазой [17], целлюлозосинтазами [18] и Nактелиглюкозаминилтрансферазами, такими как белок NodC [19]. 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.

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП по биологии развития ИБР РАН По разделу 2 опубликована 1 статья [20].

#### 2.1.4 Заключение

Биоинформационный анализ выявил гомологию между хитинсинтазами и ферментами HAS, в большей степени в порообразующем 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.

#### 2.1.5 Список использованных источников

1. Yang Y.M., Noureddin M., Liu C., Ohashi K., Kim S.Y., Ramnath D., Powell E.E., Sweet M.J., Roh Y.S., Hsin I.-F., et al. Hyaluronan synthase 2-mediated hyaluronan production mediates Notch1 activation and liver fibrosis // Sci Transl Med. – 2019. – Vol. 11. – No 496.

- 2. Sato N., Cheng X.-B., Kohi S., Koga A., Hirata K. Targeting hyaluronan for the treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma // Acta Pharm Sin B. -2016. Vol. 6. No 2. 101-105.
- 3. Grandoch M., Flögel U., Virtue S., Maier J.K., Jelenik T., Kohlmorgen C., Feldmann K., Ostendorf Y., Castañeda T.R., Zhou Z., et al. 4-Methylumbelliferone improves the thermogenic capacity of brown adipose tissue // Nat Metab. 2019. Vol.1. No 5. P. 546–559.
- 4. Nagy N., Kuipers H.F., Frymoyer A.R., Ishak H.D., Bollyky J.B., Wight T.N., Bollyky P.L. 4-Methylumbelliferone treatment and hyaluronan inhibition as a therapeutic strategy in inflammation, autoimmunity, and cancer // Front Immunol. 2015. Vol. 6:123
- 5. Mason R.M., Lineham J.D., Phillipson M.A., Black C.M. Selective inhibition of proteoglycan and hyaluronate synthesis in chondrocyte cultures by cyclofenil diphenol, a non-steroidal weak oestrogen // Biochem J. 1984. Vol. 223. No 2. P. 401–412.
- 6. Ueki N., Taguchi T., Takahashi M., Adachi M., Ohkawa T., Amuro Y., Hada T., Higashino K. Inhibition of hyaluronan synthesis by vesnarinone in cultured human myofibroblasts // Biochim Biophys Acta (BBA) Mol Cell Res. 2000. Vol.1495. No 2. P. 160–167.
- 7. Kakizaki I., Kojima K., Takagaki K., Endo M., Kannagi R., Ito M., Maruo Y., Sato H., Yasuda T., Mita S., et al. A novel mechanism for the inhibition of hyaluronan biosynthesis by 4-methylumbelliferone // J Biol Chem. 2004. Vol. 279. No 32. P. 33281–33289.
- 8. Kakizaki I., Takagaki K., Endo Y., Kudo D., Ikeya H., Miyoshi T., Baggenstoss B.A., Tlapak-Simmons V.L., Kumari K., Nakane A., et al. Inhibition of hyaluronan synthesis in Streptococcus equi FM100 by 4-methylumbelliferone // Eur J Biochem. 2002. Vol. 269. No 20. P. 5066–5075.
- 9. 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.
- 10. 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.

- 11. 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.
- 12. 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.
- 13. 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.
- 14. 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.
- 15. 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.
- 16. Pummill P.E., Achyuthan A.M., DeAngelis P.L. Enzymological characterization of recombinant xenopusDG42, a vertebrate hyaluronan Synthase // J. Biol. Chem. 1998. Vol. 273. P. 4976–4981, doi:10.1074/jbc.273.9.4976.
- 17. 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.
- 18. 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.
- 19. 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.
- 20. **Tsitrina A.A.**, Krasylov I.V., Maltsev D.I., Andreichenko I.N., Moskvina V.S., Ivankov D.N., **Bulgakova E.V.**, Nesterchuk M., Shashkovskaya V., **Dashenkova N.O.**, Khilya V.P., **Mikaelyan A.**, Kotelevtsev Y. Inhibition of Hyaluronan Secretion by Novel coumarin compounds and chitin synthesis inhibitors // Glycobiology. 2021. Vol. 31. Is. 8. –P. 959 9741. DOI: 10.1093/glycob/cwab038. Q2

# РАЗДЕЛ З МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИЗМЕНЕНИЙ РЕГЕНЕРАЦИОННЫХ ПРОЦЕССОВ У ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ ПОД ВЛИЯНИЕМ ФАКТОРОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ

Подраздел 3.1 Исследование состояния естественной ювенильности и способности к регенерации у хвостатых амфибий. Перспектива приложения полученных результатов в биомедицине

#### 3.1.1 Введение

Ключевым вопросом биологии и медицины является молекулярно-генетическая и клеточная основа способности животных и человека к регенерации органов и тканей. Основное заключение, базирующееся на многолетних исследованиях, это – падение регенерационной способности у животных по мере старения и в эволюционном ряду. Несмотря на наличие многих исключений и межвидовые различия в проявлении способности к регенерации, а также в использовании животными различных механизмов утерянную/поврежденную регенерировать ткань, это правило остается основополагающим: чем проще и моложе организм, тем успешнее он осуществляет восстановление утраченного или поврежденного. Наряду с этим известны тетраподы, которые в период половозрелой жизни обладают способностью к регенерации, не теряя ее с годами и старением. Ими являются половозрелые хвостатые амфибии (Urodela или Caudata). Эти животные дают в руки исследователей модели органной и тканевой регенерации, помогающие понять клеточные и молекулярные ее основы. Наличие регенерационных способностей, возникших под влиянием факторов внешней среды и эволюционно закрепленных у Urodela, находит различные объяснения. Основное из них – понимание клеточных и молекулярных механизмов регенерации у этих животных. Много меньше внимания уделено фундаментальным чертам и особенностям организма, таким как размеры тела, возраст или стадии жизненного цикла, особенности генома и его работы и т.д., значительно влияющих и определяющих регенерационную способность. В работе изучены и проанализированы способствующие регенерации особенности развитийного статуса хвостатых амфибий, нашедшие отражение в свойствах работы генома, в структуре тканей и клеточном поведении. Помимо разностороннего анализа внешней и внутренней регуляции клеточных и молекулярных механизмов регенерации у Urodela, в работе детально освещены данные экспериментального использования регенерирующих тканей низших позвоночных и Urodela, в частности, в качестве источника экзогенных факторов, способных стимулировать восстановительные процессы в тканях высших позвоночных.

#### 3.1.2 Материал 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 вопросам молекулярных, клеточных, организменных и онтогенетических свойств низших позвоночных группы (Urodela) — животных, обладающих наивысшими среди тетрапод способностями к регенерации тканей и органов. Проанализированы особенности генома, а также экспрессии ряда генов, ассоциированных с пластичностью некоторых клеточных фенотипов. На примере сетчатки и мозга половозрелых Urodela показана упрощенность строения тканей, а для иммунной системы — ее условная «примитивность». В развитии этих животных, как основополагающая его особенность, проанализирован педоморфоз. Собраны примеры различных экспериментов с целью реювенилизации клеток млекопитающих, в том числе, использования секретомов, полученных из регенерирующих тканей хвостатых амфибий и рыб, для индукции регенерационных ответов клеток высших позвоночных. Проведенный анализ представлен в виде опубликованного обзора, включающего 135 источников [1].

#### 3.1.3 Результаты и обсуждение

Особенности иммунной системы, геном и клеточная пластичность у Urodela amphibians. Хвостатые амфибии обладают наибольшими среди позвоночных возможностями не только тканевой, но и органной регенерации [2]. Древняя и весьма консервативная иммунная система способна регулировать, не только непосредственно участвовать в регенерации тканей у животных, в том числе у хвостатых амфибий. Согласно обобщенной информации врожденная и адаптивная составляющие иммунной системы Urodela выявляются на критических стадиях регенерации многих тканей [1, 3]. Успех регенерации при этом определяется комплексом взаимодействий между клетками источниками регенерации с одной стороны и клетками, а также факторами иммунной системы – с другой. Предполагается обратная связь между зрелостью иммунной системы и способностью к регенерации. Возможно, что иммунный надзор, имеющий место у амфибий при регенерации, является таксон-специфичным: в случае Urodela - стимулирующим, а у бесхвостых амфибий (Anura) – подавляющим регенерацию.

Другие объяснения высокой регенерационной способности Urodela основаны на изучении свойств дифференцировки клеток - источников регенерации, а точнее ее пластичности, выявленной для многих клеточных типов этих животных. Классическими примерами является превращение клеток радужки и ретинального пигментного эпителия -

в клетки хрусталика и сетчатки, соответственно. Эта особенность (высокая мера клеточной пластичности) утрачивается по мере развития у птиц и млекопитающих [4]. Существуют различные эпигенетические механизмы: метилирование ДНК, модификации гистонов и др., участвующие, как в становлении, так и изменении клеточного фенотипа посредством увеличения, снижения или блокирования активности генов. Данные об эпигенетическом статусе и его изменениях в клетках – источниках регенерации у Urodela, способные пролить свет на молекулярную природу как фенотипического омоложения, так и, напротив, на стабилизацию исходной или вновь приобретенной дифференцировки клеток, пока крайне малочисленны. Предполагается, что регуляция *TriMeH3K27* (trimethylated histone H3 lysine 27), может лежать в основе модификаций хроматина в ходе дедифференцировки клеток у тритона [5]. Помимо приведенных объяснений регенерации у Urodela, предполагается также, что ее успех был определен в ходе микроэволюционного пути. Однако не все авторы разделяют точку зрения о прямой связи успешной регенерации с присутствием таксон-специфических «тенов регенерации» у низших позвоночных.

На модели эпиморфной регенерации конечности у Urodela в качестве определяющей восстановление рассмотрена совокупность базовых свойств этих животных: размеры тела, особенности старения и роста. Особое внимание уделено свойству некоторых низших позвоночных реагировать на «развитийные» гормоны, циркулирующие в крови этих животных поздно в онтогенезе.

Педоморфоз, геном и размеры клеток у Urodela. Приведенные выше объяснения высокой регенерационной способности Urodela имеют в своей основе фило- и онтогенетические причины, в свою очередь определяемые влиянием внешней среды. У Urodela идентифицирован педоморфоз в формах прогенеза и неотении, регулируемых тиреоидным гормоном [6]. Существуют теории, объясняющие недоразвитие и упрощение некоторых органов и тканей у саламандр, в свою очередь облегчающих регенерацию, не только педоморфозом, но и размерами генома. Известно, что саламандры (также легочные рыбы) имеют самые большие геномы, что обусловлено высоким числом повторов последовательностей ДНК и очень длинными интронами [7].

Большие размеры генома и высокое содержание ДНК объясняют ряд обнаруженных особенностей на клеточном уровне у Urodela. Прежде всего — это увеличение размеров клеток по сравнению с клетками других позвоночных. Наряду с этим отмечены низкая скорость метаболизма, сниженные частота клеточных делений и скорость клеточной дифференцировки в развитии (рисунок 3.1.1).

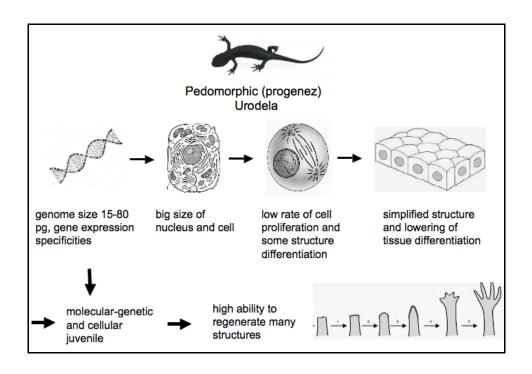


Рисунок 3.1.1 - Особенности Urodela, ассоциированные с их высокой регенерационной способностью

Вопросам особенностей ткани мозга и глаза, а также их регенерации у Urodela в работе отведен большой раздел. В нем рассмотрены главным образом многолетние и современные исследования лаборатории «проблем регенерации» и ряда зарубежных коллективов. На их основе постулируется, что способность нейральной ткани у Urodela связана с наличием в клетках-источниках регенерации сочетания молекулярногенетических свойств, характерных как для специализированных клеток РПЭ, так и их эмбриональных прогениторов [8]. В отношении ЦНС отмечено, что морфологическая ее дифференцировка у саламандр находится в обратной корреляции с размерами генома. Менее выраженная дифференцировка мозга у Urodela рассматривается эволюционистами как пример вторичного упрощения мозга. Исследования на генетическом уровне ткани мозга саламандр также указывают на его ювенильные черты. Молекулярно-генетические особенности клеток радужки глаза тритона лежат в основе способности Urodelak многократной регенерации хрусталика [9]. Спинной мозг Urodela также отличается чертами упрощения при сравнении с таковым у Anura или высших позвоночных. В спинном мозге Urodela обнаружены клетки, экспрессирующие транскрипционные факторы (ТФ) Рах6 и Рах7, ключевые молекулы регуляции развития эктодермальных структур позвоночных. Эти данные оказались сходными с результатами изучения экспрессии ТФ семейства Рах у неотенических амбистом. Саламандры обладают способностью компенсировать клеточные потери в различных областях головного мозга даже в половозрелом состоянии [10]. В активации резидентных стволовых клеток в мозге

этих животных участвуют сигнальные молекулы (Hh, BMP, RA, FGF, Notch) и некоторые нейротрансмиттеры, экспрессия которых характерна для периода развития мозга.

Можно ли использовать эти знания для «наведения» ювенильности, омоложения клеток высших позвоночных с целью увеличения их регенерационной активности? В отношении потенциальных эндогенных клеточных источников регенерации млекопитающих для этого видятся два способа. Первый - использование уже известных и работающих у Urodela вне- и внутриклеточных факторов, составляющих у этих животных регуляторную, сходную с развитийной сеть; второй - осуществление молекулярногенетической и эпигенетической модификаций, в соответствии с присущими хвостатым амфибиям особенностями экспрессии генов и эпигенетического ландшафта. Можно теоретически предположить и сочетание этих двух подходов. Еще одним подходом, приводящим к клеточному омоложению, является создание необходимых условий клеточного окружения [11]. Для этого ведется разработка способов выделения и использования секретомов и экзосом, полученных от клеток низших позвоночных, в том числе, Urodela.

Ткани животных, обладающих высокими регенераторными способностями, как источник соединений для стимуляции регенерации у высших позвоночных. В настоящее время есть примеры исследований с применением данного подхода. Например, сделана попытка с помощью грубых экстрактов регенератов конечности тритона вывести в дедиффференцировку имеющие мышечную дифференцировку C2C12 myotubes мыши in vitro [12]. Работа стала демонстрацией дедифференцировки in vitro клеток млекопитающих с формированием бластных клеток аналогично тому, как это происходит при образовании бластемы конечности у тритона in vivo. Известно, что во внеклеточном пространстве присутствуют везикулы. Они содержат слущивающиеся с клеточной поверхности и окруженные двойной мембраной микровезикулы, а также имеющие эндосомальное происхождение экзосомы. Внеклеточные везикулы способны передавать содержимое (иРНК, микроРНК, функциональные белки и липиды) соседним клеткам, являясь компонентом межклеточной коммуникации. Недавно внеклеточные везикулы были получены из кондиционированной среды после культивирования в ней клеток бластемы регенерирующей конечности тритона, визуализированы и изучены [13]. Структуры по многим свойствам, таким как размеры ( $\sim 100-150$  nm), содержимое, экспрессии антигенов поверхности и др., напоминали экзосомы млекопитающих. Это свидетельствовало о сходстве механизмов биогенеза и секреции внеклеточных везикул у высших и низших позвоночных. Интересно, что в содержимом внеклеточных везикул тритона, в целом, как выяснилось, более богатом РНК и белками, по сравнению с экзосомами млекопитающих, обнаружены mRNA транскрипционных факторов (HOXC6, FOXQ1 and SOX1) — регуляторов раннего развития и гистогенеза нервной системы. Выявлено также большое количество мРНК, кодирующей ядерные рецепторы и мембранные лиганды [13]. Недавно нами были проведены эксперименты на линии клеток пигментного эпителия сетчатки глаза человека ARPE-19 *in vitro*, при добавлении сред, кондиционированных клетками регенерирующей сетчатки тритона. Результаты работы подробно изложены в разделе 1.

#### 3.1.4 Заключение

Эволюционный путь развития Urodela, под влиянием внешних факторов, привел к приобретению этими животными наивысших среди позвоночных способностей к регенерации. Присущие их развитию гетерохрония и педоморфоз обусловили ряд особенностей, проявляющихся на всех уровнях организации, от организменного – до молекулярного. Исходя из проделанной аналитической работы, можно вывести предварительно основные причины, обусловливающие снижение регенерационных способностей с возрастом и в эволюционном ряду позвоночных. Они связаны у млекопитающих: 1) с молекулярно-генетической сигнатурой; 2) со стабилизирующим дифференцировку клеточным окружением, не пермессивным для регенерационных ответов; 3) эпигенетическими модификациями, накладывающими запрет на экспрессию ответственных за дедифференцировку и репрограммирование генов, Обнаруженная связь способности к регенерации с феноменом естественной ювенильности у хвостатых амфибий, может служить для получения информации о факторах, поддержания у специализированных необходимых ДЛЯ клеток и популяций малодифференцированных клеток-предшественников взрослых животных свойства пластичности, а также факторов регуляции дифференцировки. Продуцентами таких факторов могут быть как интактные, так и регенерирующие ткани хвостатых амфибий и некоторых видов рыб. Выявление и изучение роли этих факторов имеет определенную перспективу в направлении возможного экспериментального «омоложения» клеток высших позвоночных для их участия в процессах регенерации.

По теме раздела 3 опубликована 1 статья

**Grigoryan E.N**. Study of natural long life juvenility and tissue regeneration in caudate amphibians and potential application of resulting data in biomedicine // Journal of Developmental Biology. – 2021. – Vol. 9. – P. 2–20. https://doi.org/10.3390/jdb9010002

#### 3.1.5 Список использованной литературы

- 1. **Grigoryan E.N.** Study of natural long life juvenility and tissue regeneration in caudate amphibians and potential application of resulting data in biomedicine // Journal of Developmental Biology. 2021. Vol. 9. P. 2–20. https://doi.org/10.3390/jdb9010002
- 2. Sanchez Alvarado A., Tsonis P.A. Bridging the regeneration gap: Genetic insights from diverse animal models // Nat. Rev. Genet. 2006. Vol. 7. P. 873–884.
- 3. Bolanos Castro L.A., Walters H.E., Vazquez R.O.G., Yun M.H. Immunity in salamander regeneration: Where are we standing and where are we headed? // Dev. Dynam. 2020. P. 1–15.
- 4. Odelberg S.J. Cellular plasticity in vertebrate regeneration // Anat. Rec. Part B. New Anat. 2005. Vol. 287. P. 25–35.
- 5. Maki N., Tsonis P.A., Agata K. Changes in global histone modifications during dedifferentiation in newt lens regeneration // Mol. Vis. 2010. Vol. 16. P.1893–1897.
- 6. Denoël M., Joly P. Neoteny and progenesis as two heterochronic processes involved in paedomorphosis in Triturus alpestris (Amphibia: Caudata) // Proc. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci. 2000. Vol. 267. P. 1481–1485.
- 7. Nowoshilow S., Schloissnig S., Fei J.F., et al. The axolotl genome and the evolution ofkey tissue formation regulators // Nature. 2018. Vol. 554. P. 50–55.
- 8. 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 P. 28–36.
- 9. Eguchi Y., Nakamura K. Regenerative capacity in newts is not altered by repeated regeneration and ageing // Nat. Commun. 2011. Vol. 2. P. 1–5.
- 10. Tanaka E.M., Ferretti P. Considering the evolution of regeneration in the central nervoussystem // Nat. Rev. Neurosci. 2009. Vol.10. P. 713–723.
- 11. Grigoryan E.N. Molecular factors of the maintenance and activation of the juvenile phenotype of cellular sources for eye tissue regeneration // Biochemistry. 2018. Vol.83. P. 1627–1642.
- 12. McGann C.J., Odelberg S.J., Keating M.T. Mammalian myotube dedifferentiation inducedbynewtregenerationextract // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. Vol. 98. P. 13699–13704.
- 13. Middleton R.C., Rogers R.G., De Couto G., et al. Newt cells secrete extracellular vesicles with therapeutic bioactivity in mammalian cardiomyocytes // J. Extracell. Vesicles.-2018. Vol. 7. P. 1456888.

## РАЗДЕЛ 4 МЕХАНИЗМЫ ПЛАСТИЧНОСТИ СТВОЛОВЫХ И ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК В ПРОЦЕССАХ РЕГЕНЕРАЦИИ РАЗЛИЧНЫХ СТРУКТУР НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

Подраздел 4.1 Разработка подходов к моделированию развития и регенерации ЦНС млекопитающих с использованием трансплантации стволовых/прогениторных клеток разного генеза

#### 4.1.1 Введение

Отсутствие способности к регенерации ЦНС взрослых млекопитающих и человека приводит к тяжелым последствиям при различных травмах мозга и нейродегенеративных заболеваниях. Ключ к пониманию причин ограниченности регенеративного потенциала ЦНС может скрываться в фундаментальных основах развития мозга. Так исследование транскриптома клеток спинного мозга после нанесения травмы показало, что в клетках происходит возврат к эмбриональному статусу транскрипции, поддерживать трансплантированные нейральные стволовые клетки [1]. Существуют несколько подходов для моделирования и исследования развития мозга млекопитающих и человека in vitro, которые, главным образом, базируются на использовании нейральных стволовых клеток, полученных из эмбриональных (ЭСК) или индуцированных плюрипортентных стволовых клеток (ИПСК) [2]. Основным подходом является применение классических 2D-культур клеток [3]. Однако при 2D-культивировании не формируются трехмерная организация нервных и глиальных клеток и специфические пространственные межклеточные взаимодействия, характерные для развивающегося мозга [4]. Для решения этих проблем не так давно удалось создать и вырастить в условиях чашки Петри трехмерные культуры клеток (3D-органоиды), которые при первом приближении воспроизводят архитектонику развивающегося головного мозга [5]. Церебральные органоиды являются самоорганизующимися трехмерными клеточными агрегатами, которые сформированы из специфичных для мозга типов клеток, возникших из ЭСК или ИПСК, подвергнутых нейральной дифференцировке [6]. Несмотря на значительные успехи, технология получения органоидов связана с рядом пока не решенных задач. Процесс культивирования клеток сложный и многоэтапный, кроме того, в органоидах отсутствует васкуляризация и некоторые типы клеток, специфичные для мозга, что ограничивает их развитие. Мы попытались получить церебральные агрегаты, подобные органоидам, в модели in vivo, где обеспечивается рост сосудов и кровоснабжение ткани, для чего трансплантировали суспензию клеток из неокортекса эмбриона мыши в боковые желудочки мозга взрослых мышей, где средой для культивирования клеток служила спинномозговая жидкость, циркулирующая в желудочках, которые играли роль биореактора. Результаты показали возможность самоорганизации суспензированных клеток неокортекса в 3D-структуры, напоминающие кортикальные церебральные органоиды. Эти структуры были васкуляризованы и имели оформленную морфологию, включающую в себя, как пограничную глиальную мембрану и маргинальный слой, так и дифференцированные нейроны.

Важным прикладным связующим звеном между исследованиями по развитию и самоорганизации нейральных стволовых/прогениторных клеток является их использование в качестве активаторов регенерации при клеточной терапии на моделях различных заболеваний, в частности, при инсульте [7, 8]. Для изучения регенеративного потенциала мозга были проведены внутриартериальные трансплантации нейральных прогениторных и мезенхимальных стволовых клеток человека крысам с моделью инсульта. Результаты показали положительный терапевтический эффект, выраженный в уменьшении объема зоны повреждения мозга и улучшении поведенческих реакций животных, который, вероятно, обеспечивается паракринным влиянием клеток.

#### 4.1.2 Материалы и методы

Животные. Трансгенных гетерозиготных мышей линии C57BL/6-Tg(ACTB-EGFP)10sb/J (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) и мышей линии C57Bl/6 использовали для получения датированной беременности и трансплантации. На сроках развития Э14.5 (n=4) и Э19.5 (n=4) из эмбрионов трансгенных мышей EGFP выделяли ткань фронтальной части неокортекса. Для моделирования инсульта использовались самцы крыс линии Вистар (n=70).

Клетки для трансплантации. При приготовлении суспензии клеток для трансплантации ткань неокортекса, полученную от мышей Э14.5 (число эмбрионов, n = 4), диссоциировали с использованием раствора Аккутазы (Sigma-Aldrich, США) и промывали в растворе Хэнкса (Gibco). Объем каждого трансплантата составлял 1.5 мкл и содержал 300000 клеток. Образцы ткани плаценты человека тщательно измельчали ножницами, промывали холодным раствором Хэнкса и инкубировали в течение 2 ч при 37°С в растворе Хэнкса в присутствии 0,1% коллагеназы типа I (Gibco). Затем коллагеназу инактивировали 10% FBS и суспензию центрифугировали при 400 × g в течение 4 мин при 25°С. Супернатант убирали и осадок ресуспендировали в полной культуральной среде, содержащей DMEM-F12, 2 мМ L-глутамин, 100 Ед / мл пенициллина, 0,1 мг / мл стрептомицина и 10% фетальную бычью сыворотку (Gibco).

*Мечение клеток.* Флюоресцентное мечение проводили с использованием суперпарамагнитных микрочастиц оксида железа (SPIO, MC03F Bangs Laboratories, средний диаметр 0.50 мкм), несущих флюоресцентный краситель Dragon Green ( $l_{ex}$ =480 нм,  $l_{em}$ =520 нм) и мембранного липофильного красителя PKH26 (Sigma-Aldrich;  $l_{ex}$ =551 нм,  $l_{em}$ =567 нм).

*Трансплантация.* Взрослых мышей С57ВІ/6 (n = 9) анестезировали изофлураном. Операционная поверхность была выбрита, кожа между ушами разрезана, кости черепа истончены. Суспензию фронтального неокортекса вводили стереотаксически шприцем Гамильтона. Инъекции выполнялись в следующих координатах относительно Брегмы:  $+0.3\,$  мм (антериопостериально),  $1\,$  мм (латерально),  $1.5\,$  мм (дорсовентрально). Иммуносупрессия не проводилась. Трансплантация МСК ( $5\,\times\,10^5$ ) и нейрональных прогениторов ( $7\,\times\,10^5$ ) проводилась путем введения клеток во внутреннюю сонную артерию через катетер.

Оценка терапевтического эффекта. Для оценки терапевтического эффекта была использована шкала тяжести неврологической симптоматики (mNSS, modified neurological severity score). В каждом тесте за неудачу начислялся один балл. Двигательная функция у послеоперационных крыс оценивалась по способности двигать головой, конечностями и передвигаться по прямой линии. Тестирование зрительной и тактильной функции также проводилось.

*MPT*. Магнитная резонансная томография проводилась с использованием системы 7T ClinScan для мелких животных. Приводилась MPT оценка объема инфаркта и геморрагическая трансформация, непосредственно перед внутриартериальной трансплантацией, через 7 и 14 суток. Также проводилась оценка динамики распределения трансплантированных клеток в реальном времени. Использовались следующие режимы: T2\*, режим изображений, взвешенных по магнитной восприимчивости SWI (Susceptibility weighted imaging), диффузно-взвешенное изображение DWI (Diffusion weighted imaging).

Гистологическое исследование. На 5-й, 30-й и 90-й дни после трансплантации выполняли транскардиальную перфузию с использованием фосфатно-солевого буфера (Phosphate buffered saline, PBS) и 4% параформальдегида. Каждый мозг был извлечен из черепа и инкубирован в течение ночи в том же фиксаторе. Затем мозг промывали в PBS и переносили в 30% сахарозу на PBS. Коронарные срезы получали с помощью криостата (Leica CM1900), толщина срезов составляла 40 мкм. Аналогичный протокол применялся и для крыс после внутриартериальной трансплантации, но перфузия выполнялась через 1 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч, 7 дней и 14 дней. Выбор серийных срезов головного мозга крыс осуществлялся на основе распределения клеток по данным MPT исследования [9]. Для

иммуногистохимического выявления антигенов применялся следующий протокол. Предметные стекла со срезами инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре в блокирующем растворе: смеси 5% нормальной козьей сыворотки (Sigma-Aldrich), 0.3% Triton X-100 (Triton) и 0.01 M PBS (рН 7.4). После этого инкубировали в течение ночи при 4°C в смеси блокирующего раствора и первичных антител. Были использованы следующие антитела: кроличьи антитела против NeuN (Abcam, ab104225, 1 : 500); кроличьи антитела против GFAP (Abcam, ab7260, 1 : 800); куриные антитела против GFP (MolecularProbes, 1:500), кроличьи антитела против Sox2 (Abcam, 1:500); кроличьи антитела против DCX (Abcam, 1:800); кроличьи антитела против Pax6 (Abcam, 1:500); кроличьи антитела против beta-III tubulin (Abcam, , 1: 500); кроличьи антитела против Synaptophysin (Abcam,, 1:600). Затем срезы промывали и инкубировали в течение 2 ч в смеси 0.3% Triton X-100 (Triton), 0.01 M PBS (рН 7.4) и следующих вторичных антител: козьи антитела против IgY цыпленка (Abcam, AlexaFluor 488, 1:600), и козьи антитела против IgG кролика (Abcam, AlexaFluor 594, 1:600). Для визуализации сосудов срезы окрашивали лектином (Lycopersicon Esculentum) меченым флуорохромом DyLight® 594 (Vector Laboratories, DL-1177-1). Затем срезы промывали в PBS и ядра окрашивали раствором DAPI (2 мкг/мл, Sigma). В случае срезов после мозга против внутриартериального введения использовали мышиные антитела Endothelial barrier antigen (Biolegend, 1:100) и против Mitochondria (Abcam, 1:100). Гистологические изображения получали с помощью флуоресцентного микроскопа ВZ-9000E и лазерного сканирующего конфокального микроскопа Nikon A1R MP +.

ОТ-ПЦР. Выделение РНК проводили согласно протоколу к коммерческому набору компании "Qiagen" RNeasy Kit (Qiagen, #74004) с использованием "Qiagen" DNase Kit (Qiagen, #79254) для удаления остатков геномной ДНК. Лизис образцов неокортекса проводили без предварительной гомогенизации органа. Для получения первой цепи кДНК на матрице выделенной РНК использовали коммерческий набор компании "Евроген" MMLV RT kit (Evrogen, #SK021). Для одной реакции брали 1 мкг РНК. Для проведения ОТ-ПЦР в реальном времени были подобраны праймеры с помощью онлайн ресурса NCBIPrimer-BLAST. ПЦР В реальном времени проводили c использованием CFX96 Touch (Bio-Rad). Для ОТ-ПЦР амплификатора использовали готовую коммерческую смесь qPCRmix-HSSYBR компании "Евроген" (Evrogen, #PK147L). Оценку экспрессии проводили по методу 2 $\Delta$ Ct, где в качестве контрольного образца использовалась культура иммортализированных мышиных фибробластов 3Т3-NIH. Нормализацию результатов проводили по экспрессии генов домашнего хозяйства GAPDH и АСТВ.

#### 4.1.3 Результаты и обсуждение

В настоящей экспериментальной работе были подобраны адекватные условия для выращивания церебральных 3D-агрегатов in vivo. Для этого были проведены трансплантации суспензий стволовых/прогениторых клеток эмбрионального неокортекса мышей в латеральные желудочки мозга взрослых мышей, где циркулирует биологически активная спинномозговая жидкость и возможно кровоснабжение со стороны мозга реципиента. Малодифференцированные клетки неокортекса эмбрионов (Э14.5) GFP мышей находились на стадии нейроногенеза и, в отличие от некоммитированных ЭСК и ИПСК, были не способны формировать тератомы [10]. Сначала методом ОТ-ПЦР в реальном времени были получены характеристики дифференцировки клеток в неокортексе эмбрионов стадий Э14.5 и Э19.5. По экспрессии мРНК генов стволовых Pax6. Sox2. Nes: малодифференцированных нейронов клеток дифференцированных нейронов NeuN; астроцитов GFAP и синаптофизина Syp (начинает экспрессироваться в недифференцированных нейронах) было определено, что для трансплантации предпочтительнее низкодифференцированные клетки коры Э14.5. Их характеризует высокой уровень экспрессии маркеров стволовых клеток, отсутствие дифференцированные нейроны и глиальных клеток.

Эксперименты показали, что для успешного развития 3D кортикальных агрегатов в желудочках мозга после трансплантации суспензии клеток неокортекса Э14.5 необходим длительный срок, 90 суток. Согласно данным литературы для развития церебральных органоидов в системе *in vitro* также требуется длительный срок, около 60 сут [11]. Нами было установлено, что к 90 сут в клетках 3D церебрального трансплантата экспрессируется маркер зрелых нейронов NeuN+. Цитоархитектоника трансплантатов выглядела следующим образом: дифференцированные нейроны располагались только в центральной части, а на периферии выявлялась зона без клеток, что напоминало маргинальную зону или первый слой неокортекса [12]. Данный факт не наблюдался ранее и не был описан в научной литературе. На периферии трансплантата формировалась зона пограничной мембраны, которая, как и в нормальном мозге, была сформирована GFAP+ астроцитами (рисунок 4.1.1 A).

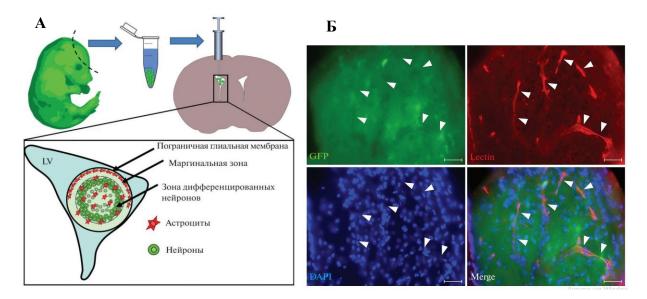


Рисунок 4.1.1 — Развитие 3D-церебральных агрегатов в желудочках мозга мышей. А—особенности самоорганизации суспензированных клеток эмбрионального неокортекса в 3D-структуры (напоминающие кортикальные церебральные органоиды), после трансплантации в желудочек мозга. LV — латеральный желудочек. Б— трансплантат из клеток эмбрионального неокортекса мышей (Э14.5) в желудочке мозга реципиента через 90 сут после операции. Васкуляризация трансплантата, выявленная с помощью лектина с флуоресцентной меткой. Сосуды отмечены стрелками. Масштабный отрезок: 40 мкм.

Глиального рубца между тканями донора и реципиента не возникало, что было показано и другими авторами [13]. В нашем исследовании в трансплантате был выявлен маркер синаптических визикул — синаптофизин. По литературным данным [13], в подобных трансплантатах наличие зрелых синапсов на клетках подтверждалось с помощью электронной микроскопии. В дополнение к архитектонической организации 3D церебральных агрегатов, мы также обнаружили их васкуляризацию со стороны мозга реципиента (рисунок 4.1.1 Б). Интересно, что согласно литературным данным, церебральные органоиды, полученные *in vitro* и трансплантированные в паренхиму мозга грызунов также васкуляризируются [14].

В работе, посвященной внутриартериальной трансплантации нейральных прогениторов и МСК в мозг крысам с моделью инсульта, мы не наблюдали трансмиграцию клеток через гематоэнцефалический барьер в паренхиму головного мозга [15]. Введенные клетки временно находились внутри церебральных кровеносных сосудов, плотно прилипая к их стенкам, но задерживались не более чем на 2–3 дня после введения (рисунок 4.1.2). При этом наблюдался положительный терапевтический эффект, выраженный в уменьшении объема зоны повреждения мозга и улучшении поведенческих реакций животных.

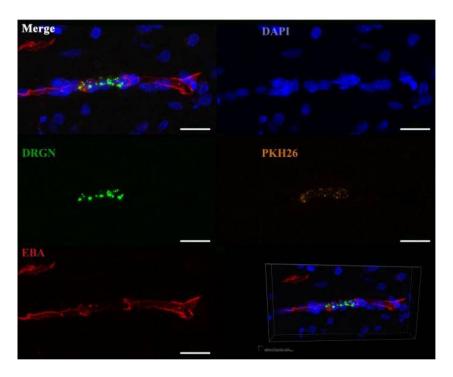


Рисунок. 4.1.2 - Трансплантация МСК в мозг крыс после инсульта. МСК с двойной меткой (SPIO и РКН26) находятся внутри сосудов, выявленных иммуногистохимически (EBA)

#### 4.1.4 Заключение

Таким образом, эксперименты показали возможность *in vivo* самоорганизации малодифференцированных суспензированных клеток неокортекса в 3D-структуры, кортикальные церебральные органоиды. напоминающие Эти структуры оформленную морфологию, васкуляризованы, имели включающую глиальную мембрану и маргинальный слой, и дифференцированные нейроны. Очевидно, клетки что нейральные стволовые/прогениторные несут себе программу самоорганизации, которая включается в благоприятных условиях. В экспериментах по внутриартериальной трансплантации клеток после инсульта положительный терапевтический эффект нейральных прогениторов и МСК был связан с их паракринным влиянием. Клетки обнаруживались в сосудах в течение нескольких суток после трансплантации, чего было достаточно для активации регенеративных способностей реципиента, улучшения морфологии мозга И поведения животных. Данные свидетельствует о том, что взрослый мозг высоко пластичная структура, способная, с одной стороны, поддерживать развитие стволовых/прогениторных клеток и, с другой, отвечать на их паракринные сигналы активацией регенерации.

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

По теме раздела 4 опубликованы статьи:

- 1. **Сухинич К.К**., Шакирова К.М., Дашинимаев Э.Б., Александрова М.А. Развитие 3Dцеребральных агрегатов в желудочках мозга взрослых мышей // Онтогенез. 2021. Т. 52. № 3. С. 195—207. DOI: 10.31857/S047514502103006X. R. (Sukhinich K.K., Shakirova K.M., Dashinimaev E.B., Aleksandrova M.A. Development of 3D Cerebral Aggregates in the Brain Ventricles of Adult Mice // Russian Journal of Developmental Biology. 2021. Vol. 52. Is. 3. P. 164—175. DOI: 10.1134/S1062360421030061). Q4.
- 2. Namestnikova D.D., Gubskiy I.L., Revkova V.A., **Sukhinich K.K.**, Melnikov P.A., Gabashvili A.N., Cherkashova E.A., Vishnevskiy D.A., Kurilo V.V., Burunova V.V., Semkina A.S., Abakumov M.A., Gubsky L.V., Chekhonin V.P., Ahlfors J.-E., Baklaushev V.P., Yarygin K.N. Intra-Arterial Stem Cell Transplantation in Experimental Stroke in Rats: Real-Time MR Visualization of Transplanted Cells Starting With Their First Pass Through the Brain With Regard to the Therapeutic Action // Frontiers in Neuroscience. 2021. Vol. 15. Art. No 641970. DOI: 10.3389/fnins.2021.641970. Q2.
- 3. Yarygin K.N., Namestnikova D.D., **Sukhinich K.K.**, Gubskiy I.L., Majouga A.G., Kholodenko I.V. Cell therapy of stroke: Do the intra-arterially transplanted mesenchymal stem cells cross the blood–brain barrier? // Cells. 2021. Vol. 10. Is. 11. Art.no 2997. DOI: 10.3390/cells10112997. Q2.
- 4. Губский И.Л., Наместникова Д.Д., Сухинич К.К., Ревкова В.А., Мельников П.А., Губский Л.В., Чехонин В.П., Ярыгин К.Н. Построение 3D-модели распределения внутриартериально трансплантированных клеток в головном мозге крысы по данным МРТ, верифицированным гистологическим исследованием // Клеточные технологии в биологии и медицине. − 2021. − № 2. − С. 90−96. DOI: 10.47056/1814-3490-2021-2-90-96. (Gubskiy I.L., Namestnikova D.D., Sukhinich K.K., Revkova V.A., Melnikov P.A., Gubsky L.V., Chekhonin V.P., Yarygin K.N. MRI-Based and Histologically Verified 3D Modeling of Spatial Distribution of Intra-Arterially Transplanted Cells in Rat Brain // Bull Exp Biol Med. − 2021. − Vol. 171. − P. 517−522. DOI: 10.1007/s10517-021-05263-8). − Q4.

#### Опубликованные тезисы:

- 1. Gubskiy I., Namestnikova D., **Sukhinich K.**, Revkova V., Melnikov P., Gubskiy L., Yarygin K. Selective intra-arterial perfusion for prediction of stem cells distribution after intra-arterial transplantation // International Journal of Stroke. 2021. Vol. 16 (2S). P.132. DOI: 10.1177/17474930211041949
- 2. Namestnikova D., Cherkashova E., Gubskiy I., Revkova V., **Sukhinich K.**, Melnikov P., Gubskiy L., Yarygin K. Real-time mri of mesenchymal stem cell distribution in rat brain

after intra-arterial and intravenous transplantation in experimental stroke // International Journal of Stroke. – 2021. – Vol. 16 (2S). – P. 26. DOI: 10.1177/17474930211041949

#### 4.1.5 Список использованных источников

- 1. Poplawski G.H.D., Kawaguchi R., Niekerk E.V. et al. Injured adult neurons regress to an embryonic transcriptional growth state // Nature. 2020. Vol. 581. P. 77–82.
- 2. Kirwan P., Turner-Bridger B., Peter M., et al. Development and function of human cerebral cortex neural networks from pluripotent stem cells in vitro // Development. 2015. Vol.142. №18. P. 3178–3187.
- 3. Edri R. Yaffe Y. Ziller M.J. et al. Analysing human neural stem cell ontogeny by consecutive isolation of Notch active neural progenitors // Nat Commun. 2015. Vol. 6. P.6500.
- 4. Pacitti D., Privolizzi R., Bax B.E. Organs to cells and cells to organoids: The evolution of in vitro central nervous system modelling // Front. Cell. Neurosci. 2019. Apr. 9. Vol. 13. №129.
- 5. Lancaster M.A., Renner M., Martin C.A. et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly // Nature. − 2013. − Vol.501. − № 7467. − P.373–379.
- 6. Qian X., Song H., Ming G.L. Brain organoids: advances, applications and challenges // Development. -2019. Vol. 146.  $N_{2}$  8.
- 7. Thrift A. G., Thayabaranathan T., Howard G., et al. Global stroke statistics // Int. J. Stroke.  $-2017.-Vol.\ 12.-Nel.-P.\ 13-32.$
- 8. Yarygin K.N., Namestnikova D.D., **Sukhinich K.K.**, Gubskiy I.L., Majouga A.G., Kholodenko I.V. Cell therapy of stroke: Do the intra-arterially transplanted mesenchymal stem cells cross the blood–brain barrier? // Cells. 2021. Vol. 10. Is. 11. Art.no 2997. DOI: 10.3390/cells10112997.
- 9. Губский И.Л., Наместникова Д.Д., Сухинич К.К., Ревкова В.А., Мельников П.А., Губский Л.В., Чехонин В.П., Ярыгин К.Н., Построение 3D-модели распределения внутриартериально трансплантированных клеток в головном мозге крысы по данным МРТ, верифицированным гистологическим исследованием // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2021. № 2. С. 90—96. (Gubskiy I.L., Namestnikova D.D., Sukhinich K.K., Revkova V.A., Melnikov P.A., Gubsky L.V., Chekhonin V.P., Yarygin K.N. MRI-Based and Histologically Verified 3D Modeling of Spatial Distribution of Intra-Arterially Transplanted Cells in Rat Brain // Bull Exp Biol Med. 2021. Vol. 171. P. 517—522. DOI: 10.1007/s10517-021-05263-8)

- 10. Gutierrez-Aranda I., Ramos-Mejia V., Bueno C. et al. Human induced pluripotent stem cells develop teratoma more efficiently and faster than human embryonic stem cells regardless the site of injection // Stem. Cells. − 2010. − Vol. 28. − № 9. − P. 1568–1570.
- 11. Fan W., SunY., Shi Z. et al. Mouse induced pluripotent stem cells derived Alzheimer's disease cerebral organoid culture and neural differentiation disorders // Neurosci. Lett. 2019. Vol. 711. № 134433.
- 12. Pothayee N., Maric D., Sharer K. et al. Neural precursor cells form integrated brain-like tissue when implanted into rat cerebrospinal fluid // Commun. Biol. -2018. Vol. 1.  $N_2$  114.
- 13. **Sukhinich K.K.**, Shakirova K.M., Dashinimaev E.B., **Aleksandrova M.A.** Development of 3D Cerebral Aggregates in the Brain Ventricles of Adult Mice // Russian Journal of Developmental Biology. 2021. Vol. 52. Is. 3. P. 164–175. DOI: 10.1134/S1062360421030061
- 14. Mansour A.A., Gonçalves J.T., Bloyd C.W. et al. An in vivo model of functional and vascularized human brain organoids // Nat. Biotechnol. 2018. Vol. 36. № 5. P. 432–441.
- 15. Namestnikova D.D., Gubskiy I.L., Revkova V.A., **Sukhinich K.K.**, Melnikov P.A., Gabashvili A.N., Cherkashova E.A., Vishnevskiy D.A., Kurilo V.V., Burunova V.V., Semkina A.S., Abakumov M.A., Gubsky L.V., Chekhonin V.P., Ahlfors J.-E., Baklaushev V.P., Yarygin K.N. Intra-Arterial Stem Cell Transplantation in Experimental Stroke in Rats: Real-Time MR Visualization of Transplanted Cells Starting With Their First Pass Through the Brain With Regard to the Therapeutic Action // Frontiers in Neuroscience. 2021. Vol. 15. Art. No 641970. DOI: 10.3389/fnins.2021.641970.

#### ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В отчет вошли результаты исследований, включающие различные аспекты регенерации, пластичности клеточного фенотипа — ключевого механизма, лежащего в основе регенерации многих тканей и развития патологических процессов в тканях и органах, ее регуляции, имеющие, несомненно, фундаментальное значение для биологии развития, а также результаты, которые могут найти приложение в биомедицине и фармакологии. Для решения научных задач разделов темы помимо традиционных методов были применены оригинальные, разработанные в лаборатории методы клеточного и органотипического культивирования *in vitro* и *3D in vitro*, метод внутриартериальной трансплантации нейральных прогениторных и мезенхимальных стволовых клеток в мозг крысы, исследования на модели экспериментального инсульта.

Ведущими направлениями в изучении регенерации являются репрограммирование клеток в заданном направлении, поиск экзогенного потенциала и активация эндогенных ресурсов для регенерации. Проведена большая аналитическая и экспериментальная работа, которая позволила оценить уровень изучения вопросов в этой области биологии развития. По-прежнему актуальными остаются исследования механизмов регенерации на различных уровнях организации животных; стратегий регенеративного ответа клеток при повреждении и патологиях тканей и органов (нейральные ткани глаза и структуры мозга, печень и др.); использования перспективных клеточных источников для восстановления и поддержания гомеостаза нейральных тканей; молекулярных мишеней направленного действия при ЭМП и фиброзе.

Проведенный анализ экспериментальных данных, полученных с использованием новейших – геномных, транскриптомных, гено-инженерных и клеточных технологий – позволил углубить знания о сходстве и различиях регенерационного ответа клеток РПЭ у позвоночных различным регенерационным потенциалом. Полученные эспериментальные результаты позволяют сделать вывод как о сходстве, так и таксоноспецифических различиях в развитии регенеративного ответа клеток РПЭ позвоночных. Различия в регенерационных способностях проявляются на всех уровнях организации, от организменного до молекулярного. Разнообразие стратегий регенерации в тканях разных позвоночных объясняется особенностями структурной организации и экспрессии консервативных факторов транскрипции; функционирования эндогенных регуляторных систем (пуринергической сигнальной системы и др.), эпигенетическим влиянием со стороны клеточного микроокружения; регуляции, как на локальном уровне, так и на уровне интегративных систем (нервная, эндокринная, иммунная). Основываясь на проведенном анализе большого массива данных, можно предположительно назвать причины, обусловливающие снижение регенерационных способностей с возрастом и в эволюционном ряду позвоночных. У млекопитающих это: 1) молекулярно-генетические особенности; 2) стабилизирующее дифференцировку клеточное окружение; эпигенетические модификации, блокирующие экспрессию генов, ответственных за дедифференцировку И репрограммирование клеток. Обнаруженная корреляция способности к регенерации с феноменом естественной ювенильности у хвостатых амфибий может служить основой для проведения исследований факторов, которые необходимы для поддержания пластичности у специализированных клеток и популяций малодифференцированных клеток-предшественников взрослых животных. Выявление и изучение роли этих факторов, нацелено на возможное практическое приложение для активации процесса регенерации. Исследования клеточного ответа клеток РПЭ линии ARPE-19 человека in vitro и предполагаемой активации по нейрональному пути развития позволили обнаружить влияние на фенотип РПЭ «секретома» экстрагируемого из регенерирующей сетчатки глаза тритона коктейля факторов. Обнаружено, морфологические изменения клеток ARPE-19 сопровождаются модуляцией экспрессии ряда регуляторных генов, кодирующих факторы транскрипции, сигнальные белки, тканеспецифические гены-маркеры дифференцировки, как нейронального, так и мезенхимального фенотипа. Экстракты регенерирующих сетчаток тритона были получены оригинального применением метода органотипического культивирования. Эксперименты по индукции экспрессии пронейральных маркеров на фоне сохраняющейся эпителио-мезенхимной трансформации клеток РПЭ, которая проявляется уже на ранних сроках культивирования, под действием кондиционированных сред (КС) требуют дальнейшего изучения, как и определение активных, действующих в этом направлении компонентов «секретома». Полученные результаты дают основания для продолжения исследований по выявлению факторов ниши, способствующих дедифференцировке РПЭ, блокирующих последующую дифференцировку в ретинальные клетки (нейроны и глию), и способствующих дифференцировке в фибробластоподобные клетки.

Различия в молекулярно-генетических механизмах, лежащих в основе эпителиомезенхимной транформации РПЭ, проявляющейся при разобщении с нейральной сетчаткой у человека при патологии *in vivo*, подтверждают точку зрения, согласно которой наиболее многообещающими в экспериментальной и клинической работе являются стратегии нейропротекции, которые направлены на мобилизацию эндогенных ресурсов, поддержание гомеостаза тканей заднего сектора глаза. Эти стратегии, среди многих, предусматривают использование компонентов ПСС в качестве целевых молекулярных мишеней фармакологического воздействия, а двойственная роль ПСС (как повреждающая, так и защитная) является предметом интенсивных исследований.

Показана возможность *in vivo* самоорганизации малодифференцированных суспензированных клеток неокортекса в 3D-структуры, напоминающие кортикальные церебральные органоиды. Важным прикладным связующим звеном между исследованиями способности нейральных стволовых/прогениторных клеток самоорганизации является возможность их применения в качестве активаторов регенерации, при клеточной терапии на моделях различных заболеваний. Для изучения регенеративного потенциала мозга использовали разработанный в лаборатории метод, с помощью которого были проведены внутриартериальные трансплантации нейральных прогениторных и мезенхимальных стволовых клеток человека крысам с экпериментально вызванным инсультом. Результаты продемонстрировали терапевтическую эффективность подхода, что нашло отражение в уменьшении объема зоны повреждения, улучшении как морфологии поврежденной области мозга, так и поведенческих реакций животных. Данные свидетельствует о том, что мозг высших позвоночных, являясь высокопластичной структурой, с одной стороны, способен поддерживать развитие стволовых/прогениторных клеток, а с другой, отвечать на их паракринные сигналы активацией регенерации.

В исследованиях участия факторов, участвующих в эпителио-мезенхимном переходе (ЭМП) клеток, на модели экспериментально индуцируемого фиброза печени мыши выявлена роль гиалуронана, ферментов его синтеза и деградации (хитинсинтазы, гиалуронансинтазы и др.), вовлеченных в сигнальные пути, контролирующие процессы воспаления и эпителио-мезанхимной трансформации клеток. Скрининг с помощью биоинформационного и ингибиторного анализа предполагаемых мишеней действия фармакологических ингибиторов (этоксазола, бупрофезина, трифлумурона), подавляющих синтез фермента хитинсинтазы, позволил идентифицировать еще одну мишень действия этих препаратов — фермент гиалуронансинтазу. Экспериментальные данные в совокупности с анализом гомологии доменов между гиалуронансинтазой и хитинсинтазой указывают на то, что ингибиторы хитинсинтазы служат новым источником для разработки ингибиторов гиалуронансинтазы.

Полученные на разных экспериментальных моделях результаты открывают новые возможности в решении проблем тканевой, регенеративной медицины, создают предпосылки для развития биомедицинских и фармакологических подходов, к регуляции регенерационными процессами и способов коррекции патологических процессов. Результаты проведенных исследований позволили углубить знания о некоторых

компонентах клеточного микроокружения (ниши), информация о которых может быть также полезна для диагностики патологий тканей.

#### ОТЧЕТНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ГЗ

- **1. Григорян** Э.Н., **Маркитантова Ю.В**. Молекулярные стратегии трансдифференцировки клеток ретинального пигментного эпителия у амфибий и млекопитающих invivo // Онтогенез. 2021. Т. 52. № 4. С. 260–286. (**Grigoryan E.N., Markitantova Yu.V.** Molecular Strategies for Transdifferentiation of Retinal Pigment Epithelial Cells in Amphibians and Mammals In Vivo // Russian Journal of Developmental Biology. 2021. Vol. 52. No. 4. P. 220–243. DOI: 10.1134/S1062360421040032). Q4
- **2. Кузнецова А.В., Ржанова Л.А., Александрова М.А.** Малые некодирующие РНК в регуляции дифференцировки ретинального пигментного эпителия // Онтогенез. 2021. Т. 52. № 4. С. 305–314. DOI: 10.31857/S0475145021030058 (**Kuznetsova A.V., Rzhanova L.A., Aleksandrova M.A.** Small noncoding RNA in regulation of differentiation of retinal pigment epithelium//Russian Journal of Developmental Biology. 2021. Vol. 52. № 4. Р. 305–314. DOI: 10.1134/S106236042103005X). Q4
- **3.** Popova O.P., **Kuznetsova A.V.,** Bogomazova S.Y., Ivanov A.A. Claudins as biomarkers of differential diagnosis and prognosis of tumors // Journal of Cancer Research and Clinical Oncology. − 2021. − Vol. 147. − № 10. − P. 2803–2817. DOI: 10.1007/s00432-021-03725-0. − Q2
- **4.** Ivanov A.A., **Kuznetsova A.V.,** Popova O.P., Danilova T.I., Yanushevich O.O. Modern approaches to acellular therapy in bone and dental regeneration // Int. J. Mol. Sci. 2021. Vol. 21. Is. 24. Art. No 13454. DOI: 10.3390/ijms222413454 Q1.
- **5. Маркитантова Ю.В., Симирский В.Н.** Роль пуринергической сигнальной системы в контроле гистогенеза, гомеостаза и патогенеза сетчатки глаза позвоночных // Онтогенез. 2021. Т. 52. № 6. С. 485—504. DOI: 10.31857/S0475145021060082 (**Markitantova Yu.V., Simirskii V.N.** The Role of the Purinergic Signaling System in the Control of Histogenesis, Homeostasis, and Pathogenesis of the Vertebrate Retina // Russian Journal of Developmental Biology. 2021. Vol. 52. No. 6. Р. 440—458. DOI: 10.1134/S1062360421060084) Q4
- **6. Grigoryan E.N.** Study of natural long life juvenility and tissue regeneration in caudate amphibians and potential application of resulting data in biomedicine // Journal of Developmental Biology. 2021. Vol. 9. P. 2–20. https://doi.org/10.3390/jdb9010002. Q
- **7.** Сухинич К.К., Шакирова К.М., Дашинимаев Э.Б., Александрова М.А. Развитие 3D церебральных агрегатов в желудочках мозга взрослых мышей // Онтогенез. 2021. Т. 52. № 3. С. 195–207. DOI: 10.31857/S047514502103006X. (Sukhinich K.K., Shakirova K.M., Dashinimaev E.B., Aleksandrova M.A. Development of 3D Cerebral

- Aggregates in the Brain Ventricles of Adult Mice // Russian Journal of Developmental Biology. 2021. Vol. 52. Is. 3. P. 164–175. DOI: 10.1134/S1062360421030061) Q4
- **8.** Namestnikova D.D., Gubskiy I.L., Revkova V.A., **Sukhinich K.K.,** Melnikov P.A., Gabashvili A.N., Cherkashova E.A., Vishnevskiy D.A., Kurilo V.V., Burunova V.V., Semkina A.S., Abakumov M.A., Gubsky L.V., Chekhonin V.P., Ahlfors J.-E., Baklaushev V.P., Yarygin K.N. Intra-Arterial Stem Cell Transplantation in Experimental Stroke in Rats: Real-Time MR Visualization of Transplanted Cells Starting With Their First Pass Through the Brain With Regard to the Therapeutic Action//Frontiers in Neuroscience. 2021. Vol. 15. Art. No 641970. DOI: 10.3389/fnins.2021.641970. Q2.
- **9.** Yarygin K.N., Namestnikova D.D., **Sukhinich K.K.**, Gubskiy I.L., Majouga A.G., Kholodenko I.V. Cell therapy of stroke: Do the intra-arterially transplanted mesenchymal stem cells cross the blood–brain barrier? // Cells. 2021. Vol. 10. Is. 11. Art.no 2997. DOI: 10.3390/cells10112997. Q2.
- 10. Губский И.Л., Наместникова Д.Д., Сухинич К.К., Ревкова В.А., Мельников П.А., Губский Л.В., Чехонин В.П., Ярыгин К.Н. Построение 3D-модели распределения внутриартериально трансплантированных клеток в головном мозге крысы по данным МРТ, верифицированным гистологическим исследованием // Клеточные технологии в биологии и медицине. − 2021. − № 2. − С. 90−96. DOI: 10.47056/1814-3490-2021-2-90-96. − Gubskiy, I.L., Namestnikova, D.D., Sukhinich K.K., Revkova V.A., Melnikov P.A., Gubsky L.V., Chekhonin V.P., Yarygin K.N. MRI-Based and Histologically Verified 3D Modeling of Spatial Distribution of Intra-Arterially Transplanted Cells in Rat Brain // Bull Exp Biol Med. − 2021. − Vol. 171. − P. 517−522. <a href="https://link.springer.com/article/10.1007/s10517-021-05263-8">https://link.springer.com/article/10.1007/s10517-021-05263-8</a>> DOI: 10.1007/s10517-021-05263-8. − Q4
- 11. Tsitrina A.A., Krasylov I.V., Maltsev D.I.1, Andreichenko I.N., Moskvina V.S., Ivankov D.N., Bulgakova E.V., Nesterchuk M., Shashkovskaya V., Dashenkova N.O., Khilya V.P., Mikaelyan A., Kotelevtsev Y. Inhibition of Hyaluronan Secretion by Novel coumarin compounds and chitin synthesis inhibitors // Glycobiology. 2021. Vol. 31. Is. 8. P. 959–974. DOI: 10.1093/glycob/cwab038. Q2
- 12. Shafei E.V., Rzhanova L.A., Novikova Y.P., Kurinov A.M., Grigoryan E.N., Aleksandrova M.A., Kuznetsova A.V. Response of human retinal pigment epithelial cells to the effect of the conditioned media of newt retinal regenerates // Cell and Tissue Biology.  $-2021. \text{Vol.} \ 15. \cancel{N}_2 \ 2. \text{P.} \ 135-149.$  DOI: 10.1134/S1990519X21020085. S
- 13. Рябцева А.А., Акберова С.И., Али-заде Г.Х., Бабаев Х.Ф., Маркитантова Ю.В. Защитный эффект парааминобензойной кислоты при гипоксия-индуцированном апоптозе клеток конъюнктивы и роговицы in vivo // Офтальмология. 2021. Т. 18. № 2.

- C. 317–324. DOI: 10.18008/1816-5095-2021-2-317-324. Ryabtseva A.A., Akberova S.I., Ali-Zade G.K., Babayev H.F., **Markitantova Y.V.** The protective effect of para-aminobenzoic acid in hypoxia- induced apoptosis of conjunctiva and cornea cells in vivo // Ophthalmologiya. 2021. Vol. 18. Is. 2. P. 317–324. DOI: 10.18008/1816-5095-2021-2-317-324. -S
- **14.** Панова И.Г.1, Сухова Ю.В., Татиколов А.С., Левин П.П., Иванец Т.Ю. Антиоксиданты в стекловидном теле глаза плодов человека//Известия РАН. Серия биологическая. 2021. № 6. С. 588-593. DOI: 10.31857/S1026347021050115. R **Panova I.G.1**, Sukhova Y.V., Tatikolov A.S., Levin P.P., Ivanets T.Y. Antioxidants in the Vitreous Body of the Eye of Human Fetuses//Biology Bulletin. 2021. Vol. 48. Is. 6. P. 662–666. DOI: 10.1134/S1062359021050113. Q4

Отчет утвержден на заседании Ученого совета, протокол № 10 от 28 декабря 2021 г.