

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ

ФГБУН «ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ ИМ. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН»

УДК 577.24

№ НИОКР 01201351272

№ ИС ГЗ 0108-2014-0006



УТВЕРЖДАЮ
Директор ИБР РАН
Член-корреспондент РАН
_____ А.В. Васильев

«27» января 2017 г.

ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

ТЕМА 6. МЕХАНИЗМЫ РЕГЕНЕРАЦИИ И ТРАНСПЛАНТАЦИИ ТКАНЕЙ И
ОРГАНОВ У ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ. ТРАНСДИФФЕРЕНЦИРОВКА
(заключительный отчет)

Руководитель тем
д.б.н., зав. лаб. проблем регенерации

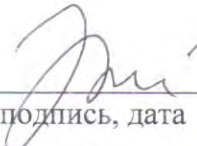
Э.Н. Григорян

подпись, дата


Москва, 2017

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

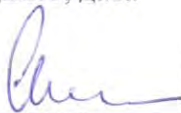
Руководитель темы, д-р
биологических наук


Э.Н. Григорян (введение, раздел 5
заключение)
подпись, дата

Ведущие исполнители темы:
Доктор биол. наук, профессор


Р.Д. Зиновьева (раздел 1)
подпись, дата


Доктор биол. наук


М.А. Александрова (раздел 2)
подпись, дата

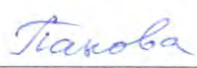
Доктор биол. наук


М.А. Александрова (раздел 3)
подпись, дата


Кандидат биол. наук


Ю.В. Маркитантова (раздел 4)
подпись, дата


Доктор биол. наук


И.Г. Панова (раздел 6)
подпись, дата

Кандидат биол. наук


А.С. Микаелян (раздел 7)
подпись, дата

Доктор биол. наук


И.В. Урываева (раздел 8)
подпись, дата

УДК 577.24

ОГЛАВЛЕНИЕ

Реферат	4
Введение	6
Раздел 1. Де- и трансдифференцировка мультипотентных клеток пигментного эпителия глаза взрослого человека в нейральном направлении <i>in vitro</i> : молекулярно-биологический анализ направленной дифференцировки	10
Раздел 2. Дифференцировка и клеточные взаимодействия суспензионных и тканевых трансплантатов неокортекса GFP мышей разных стадий эмбрионального развития с тканью мозга взрослых мышей	15
Раздел 3. Анализ динамики деления стволовых клеток в зубчатой извилине гиппокампа	17
Публикации по разделам 1-3	19
Раздел 4. Клеточные и молекулярные механизмы развития и регенерации тканей глаза у низших и высших позвоночных животных	24
Публикации по разделу 4	31
Раздел 5. Влияние факторов космического полета на регенерацию у низших позвоночных	35
Публикации по разделу 5	39
Раздел 6. Молекулярно-биологические аспекты развития стекловидного тела и окружающих его тканей глаза позвоночных	41
Публикации по разделу 6	49
Раздел 7. Молекулярные механизмы регенерации и канцерогенеза печени млекопитающих и человека	51
Раздел 8. Регуляторные механизмы клеточного цикла гепатоцитов при регенерации печени.	59
Публикации по разделам 7-8	63
Заключение	66

Реферат

Отчет 66 с., 8 разделов, 23 рис., 2 табл., 117 публикаций.

Ключевые слова: тритон, мышь, человек, регенерация тканей, гистогенез, сетчатка, хрусталик, стекловидное тело, трансплантация, неокортекс, зубчатая извилина гиппокампа, стволовые клетки, нейральные прогениторы, гепатоциты, регенерация печени, канцерогенез печени, факторы космического полета, гравитация, тепловой шок, сигнальные пути, транскрипционные факторы.

Исследована роль сигнальных путей TGF β /BMPs, WNT, Notch и FGF при трансдифференцировке клеток в первичной и линейной ARPE-19 культуре РПЭ глаза взрослого человека; установлено, что развитие и дифференцировка нейральных клеток в тканевых трансплантатах опережает развитие клеток суспензии. Установлено, что бег не изменяет число делящихся стволовых клеток мозга и не влияет на жизнеспособность новых предшественников в зубчатой извилине гиппокампа. Охарактеризован молекулярный профиль и обнаружены регуляторные гены *Wnt2*, *Bmp4*, *Sox2*, *Rx*, *Pax6*, *Prox1* и их продукты в клетках краевой зоны сетчатки – источнике роста и регенерации сетчатки у тритона. Некоторые из указанных генов определены в развитии сетчатки тритона того же вида. Выявлена экспрессия гена нуклеостемина (Ns) в РПЭ и других тканях глаза тритона, определена структура гена, обнаружен белок GNL3, описана его локализация в ядрах клеток. Изучено ремоделирование сетчатки у видов, способных (тритон) и неспособных (крыса) мобилизовать для восстановления эндогенные клеточные источники после облучения сетчатки; данные по различным типам нокаута гена β 1-интегрин указывают, что β 1-интегрин играет важную роль в морфогенезе хрусталика и дифференцировке его клеток. Установлено, что различные физические факторы влияют на морфогенез при регенерации хвоста тритона через систему экспрессии генов и белков теплового шока. Выявлено, что условия длительного космического полета вызывают гипо- и атрофию мышц бедра *Quadriceps*, наряду с продолжающейся, но неполноценной регенерацией. Содержание сывороточного альбумина в стекловидном теле глаза кролика при экспериментальном увеите возрастает в 3000 раз. Зонд СКК может быть успешно использован для анализа лекарственного воздействия на различных моделях увеитов; изучено содержание альбумина, альфа-фетопротеина и лютеина в стекловидном теле глаза человека в раннем пренатальном развитии. Соотношение экспрессии генов *Cdh1*, *Cdh2* и *Ctnnb1* в клональных культурах ГЦК отражает гетерогенность клеточной популяции исходной опухоли по степени выраженности злокачественной трансформации; выявлена корреляция экспрессии *Ki67* с синтезом ДНК, а также с экспрессией циклина D1 на всех фазах клеточного цикла, в том числе и G1 периоде.

Обозначения и сокращения:

Hsp70 и Hsp90 - белки теплового шока

ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография

м-РНК – матричная рибонуклеиновая кислота

ПЦР - полимеразная цепная реакция

РПЭ – ретинальный пигментный эпителий

СКК - скварилиевый краситель

СОД - супероксиддисмутаза

СТ – стекловидное тело

СК - стволовые клетки

НП - нейральные прогениторы

ГЦК – гепатоцеллюлярная карцинома

Введение

Исследования молекулярно-генетических механизмов развития, регенерации и канцерогенеза являются наиболее актуальными направлениями биологии развития, поскольку непосредственно транслируются в биомедицину. Изучение развития и регенерации тканей у высших и низших позвоночных животных основано на использовании методов морфологии, ПЦР и иммунохимии, а также применения условий как *in vivo*, так и *in vitro*. В качестве моделей исследования используются ткани развивающегося глаза тритона, глаза на ранних этапах регенерации сетчатки и хрусталика, а также глаза и ткани высших позвоночных, мышцы и человека. Ранее нами была исследована экспрессия лиганда FGF2 и его рецепторов, а также генов и белков теплового шока (HSP70, HSP90), в норме была выявлена имеющая сложный паттерн конститутивная экспрессия изучаемых регуляторных молекул, а при регенерации их up-регуляция и коррелирующие изменения. Есть основания считать, что FGF2-сигналинг и HSPs в норме поддерживают жизнеспособность тканей глаза, а при регенерации участвуют как в ее запуске, так и прогрессе. Данные по экспрессии белков FGF2-сигнального пути и HSPs в другой модели - регенерации хвоста - также свидетельствуют об участии этих «молекул спасения» на ранних (две недели) этапах восстановления мышц, позвоночника и спинного мозга. Необходимость продолжения этой работы была обусловлена недостатком информации об иных регуляторных молекулах, в частности генов нуклеостемина и Prox1,2. В условиях 3D культивирования, позволяющего выявлять скрытые клеточные источники регенерации сетчатки и описывать характер ее моделирования, было дано подробное описание всех клеточных участников восстановительных процессов в сетчатке низших (тритон) и высших (крыса). Данные, полученные *in vitro* в условиях повреждения сетчатки светом, свидетельствуют об определенном характере компенсаторного процесса ремоделирования сетчатки после травмы. Работа была продолжена в 2014-2016 г.г. и даны сравнительные характеристики ремоделирования сетчатки у низших и высших позвоночных после облучения ярким светом и в условиях органотипического культивирования. Была сделана попытка определить свойства нативного ретинального пигментного эпителия амфибий, определяющие его компетенцию к репрограммированию в нейральном направлении *in vivo* и *in vitro*. Было высказано обоснованное соображение о том, что в основе этого явления лежит сочетание «развитийного» и «молекулярного» профилей экспрессии генов и эпигенетические особенности этих клеток.

Нами впервые было изучено формирование сетчатки у тритона *P. waltl* в ходе развития. Обнаружено, что дифференцировка клеток сетчатки распространяется центробежно на фоне снижения числа клеток в S-фазе по градиенту от центра к периферии, где пролиферирующие клетки сохраняются и у взрослых животных. А в процессе нейрогенеза сетчатки с помощью

метода TUNEL описана динамика апоптоза - постепенное снижение программируемой клеточной гибели. В клетках - предшественниках нейронов эмбриональной сетчатки выявлена работа транскрипционных факторов «глазного поля» Pax6, Prox1, Otx2. Позже, в созревающих нейронах обнаружена и описана их дифференциальная экспрессия. В дифференцирующемся ПЭ локализованы транскрипционные факторы Otx2, Mitf, участвующие в регуляции меланогенеза. В ростовой области глаза взрослого тритона – месте перманентной локализации малодифференцированных предшественников - обнаружены продукты регуляторных генов Wnt2, Vmp4, Sox2, Rx, Pax6, Prox1. Все эти аналитические данные существенно дополнили информацию о механизмах развития сетчатки глаза позвоночных, о характеристике клеток предшественников в краевой зоне сетчатки – потенциальном источнике восстановления сетчатки всех позвоночных.

Молекулярно-биологические аспекты развития стекловидного тела и окружающих его тканей глаза позвоночных с использованием спектроскопии поглощения и флуоресценции позволило разработать использование в качестве спектрально-флуоресцентного зонда на альбумины разных позвоночных один из скварилиевых красителей (СКК). Методами УФ-спектрофотометрии и ВЭЖХ обнаружено присутствие каротиноидов (лютеина) в стекловидном теле (СТ) плодов человека и показано, что возрастная динамика содержания каротиноидов совпадает с динамикой альбумина. Впервые выявлено присутствие окисленных форм лютеина в тканях глаза человека в пренатальном развитии. Параллельно с исследованием СТ изучена морфология окружающих СТ тканей глаза плодов человека в развитии и описана динамика экспрессии ряда белков, специфичных для клеточных типов сетчатки позвоночных, и сигнальных молекул. Полученные ранее и в рамках данного периода результаты изучения СТ имеют непосредственное отношение к развитию технологий по коррекции развития глаза человека, в частности ретинопатий. В связи с не меньшей важностью для биомедицины является исследование роли определенных генов в развитии хрусталика глаза. Начатые ранее и продолженные на данном этапе результаты, полученные с помощью нокаутирования генов семейства интегринов у мышей, позволяют определить их частный вклад в проявление аномалий развития хрусталика у млекопитающих.

Активно исследуется влияние условий измененного гравитационного вектора на регенерацию у амфибий. В лабораторных условиях впервые найдена и разработана модель, позволяющая изучать изменения морфогенеза при регенерации хвоста, в том числе спинного мозга и позвоночника, в зависимости от дозы гравитации. Определены клеточные механизмы явления, а также роль белков теплового шока (HSPs) и Shh-сигнального пути в этом процессе. В настоящее время обнаружено, что регуляция воздействия некоторых физических факторов

внешней среды (гравитационные нагрузки, тепловой шок) может использовать сходный механизм, опосредованный HSPs. В отчете представлены также данные по действию длительного космического полета на регенерацию мышц у мышей, демонстрирующие возможность активации восстановительного процесса, но невозможность его завершения из-за отсутствия Ig нагрузки.

Стволовые клетки играют важнейшую роль в процессах регенерации органов и тканей. У взрослых млекопитающих в головном, спинном мозге и в сетчатке глаза процессы регенерации практически полностью подавлены. Однако стволовые клетки, обнаруженные в ЦНС, открыли новые пути для решения проблемы восстановления нервной ткани. В рамках темы исследуются фундаментальные вопросы активации пролиферации и клеточный цикл эндогенных стволовых клеток мозга. Решается проблема интеграции экзогенных стволовых и прогениторных клеток при их трансплантации в нормальный и поврежденный мозг. Изучаются свойства стволовых клеток сетчатки глаза человека *in vitro* в частности, клеток ретинального пигментного эпителия глаза (РПЭ). Фундаментальный и практический интерес представляет репрограммирование стволовых клеток РПЭ в нейрональную дифференцировку: в этом содержится перспектива реконструкции поврежденной сетчатки. В рамках темы исследуются фундаментальные вопросы активации пролиферации и клеточный цикл эндогенных стволовых клеток мозга. Экспериментально исследуются способы интеграции экзогенных стволовых и прогениторных клеток при их трансплантации в нормальный и поврежденный мозг. Кроме этого, изучаются стволовые свойства клеток сетчатки глаза человека *in vitro*, в частности клеток РПЭ. Культуры клеток РПЭ глаза взрослого человека, полученные в ходе исследования, дают возможность изучать мультипотентные свойства этих клеток; использовать их для изучения внутриклеточных механизмов пролиферативной ретинопатии и макулярной дистрофии глаза; для поиска и новых биологически активных веществ и скрининга лекарственных препаратов.

Гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК) является одним из наиболее распространенных онкологических заболеваний человека, на долю которой ежегодно приходится более половины миллиона смертей во всем мире. Гепатоканцерогенез является сложным многоступенчатым процессом, который обусловлен нарушениями в молекулярных сигнальных каскадах, в результате чего происходит потеря контроля над дифференцировкой, пролиферацией, апоптозом и адгезионными функциями клеток. Изучались инсулиноподобные факторы роста (IGF1 и IGF2), которые играют важную роль в регуляции клеточного роста и дифференцировки. Печень является основным поставщиком инсулиноподобных факторов роста для всего организма. Мыши с полным нокаутом по гену IGF1 погибают сразу после рождения. Показано, что при развитии некоторых опухолей (опухоли мозга, простаты и рака молочной железы) повышается уровень IGF1 в крови,

однако уровень IGF1 в крови у больных раком печени понижен. Рецептор IGF1 является одной из мишеней для таргетной терапии рака. Исследования в рамках темы были направлены на изучение механизмов регуляции IGF сигнального пути в гепатоцеллюлярной карциноме (ГЦК). Было показано, что имеет место дифференциальная экспрессия ряда рецепторов к данному фактору, зависящая от степени развития опухоли и от локализации по отношению к сайту опухолевого роста. На последнем этапе работы велись на линиях клеток ГЦК, и было выяснено, что клональные культуры ГЦК во многом сохраняют молекулярный паттерн, характерный для опухоли *in vivo* и отражают ее гетерогенность. В дополнение к исследованию было проведено прицельное иммунохимическое и ПЦР изучение генов и белков, участвующих в регуляции пролиферации клеток печени после повреждения, в частности белка Ki67 и циклинов. Эта детализация необходима для понимания способов управления пролиферативными процессами при регенерации ткани после повреждения и в ходе канцерогенеза.

Раздел 1. Де- и трансдифференцировка мультипотентных клеток пигментного эпителия глаза взрослого человека в *in vitro*: молекулярно-биологический анализ направленной дифференцировки

Введение.

Стволовые клетки играют важнейшую роль в процессах регенерации органов и тканей. У взрослых млекопитающих в головном, спинном мозге и в сетчатке глаза процессы регенерации практически полностью подавлены. Однако стволовые клетки, обнаруженные в ЦНС, открыли новые пути для решения проблемы восстановления нервной ткани. В рамках темы исследуются фундаментальные вопросы активации пролиферации и клеточный цикл эндогенных стволовых клеток мозга. Решается проблема интеграции экзогенных стволовых и прогениторных клеток при их трансплантации в нормальный и поврежденный мозг. Изучаются свойства стволовых клеток сетчатки глаза человека *in vitro* в частности, клеток ретинального пигментного эпителия глаза (РПЭ). На полученных нами культурах клеток РПЭ человека ведется поиск молекулярно-биологических и лекарственных средств для регулирования работы сигнальных путей и генов, ответственных за поведение и дифференцировку клеток в норме и при патологии (пролиферативной ретинопатии и макулярной дистрофии глаза). Фундаментальный и практический интерес представляет репрограммирование стволовых клеток РПЭ в нейрональную дифференцировку: в этом содержится перспектива реконструкции поврежденной сетчатки. Выявление фундаментальных основ биологии нейральных стволовых клеток, возможность управления их пролиферацией и дифференцировкой, создание на этой базе новых клеточных технологий и последующий их перенос для нужд клеточной терапии представляется перспективным для современной регенеративной медицины.

Материал и методы.

При проведении работы по данному разделу применяли методы культивирования клеток ретинального пигментного эпителия *in vitro*, иммуноцитохимические методы по выявлению транскрипционных факторов и компонентов сигнальных путей, воздействие ростовыми факторами, МТТ – тест, BrdU эссей.

Результаты.

За отчетный период установлено, что в процессе культивирования клетки РПЭ взрослого человека теряют маркеры исходной специфической дифференцировки (RPE65, CRALBP), но сохраняют специфичную секрецию PEDF. *In vitro* первичные клетки РПЭ дедифференцируются и

экспрессируют *Oct4*, *Nanog*, *Musashi 1* и *Pax6*. Вплоть до 4 пассажа клетки экспрессируют пронеуральные гены *Musashi 1*, *Pax6*, β -тубулин III, и белки-маркеры нейральных клеток β -тубулина III, нестина, нейрофиламентов, тирозингидроксилазы и глиальных маркеров GFAP, CNPase. Дифференцировку клеток РПЭ человека *in vitro* в нейральном направлении, стимулировали нейротрофическими и ростовыми факторами BDNF, GDNF, CNTF и bFGF, необходимыми для развития нервных клеток сетчатки. По МТТ- тесту показали, что все факторы снижали пролиферацию, те способствовали дифференцировке, кроме bFGF, который, главным образом, поддерживал пролиферацию. Количественный анализ выявил, что большее число пронеуральных β -тубулин III позитивных клеток наблюдается под влиянием BDNF совместно с bFGF, в то время как тирозингидроксилазные клетки выходят в дифференцировку под влиянием GDNF и CNTF. Установлено, что клетки РПЭ человека *in vitro* можно успешно трансфецировать GFP с использованием липофектамина. Подобраны концентрации для трансфекции.

Важные роли как в офтальмопатологии, так и в регуляции направления клеток со стволовыми свойствами по нейральному пути играют сигнальные пути BMP и Notch. Показано, что при инкубировании клеток РПЭ-68 (аббревиатура нашей культуры РПЭ) с hrJagged1 (активирующим Notch белки) изменений в пролиферативной активности клеток не происходит. При воздействии DAPT (блокирующего Notch) в концентрации 100 мкМ отмечено ингибирующее действие на пролиферацию РПЭ. В обоих случаях (обработка hrJagged1 или DAPT) морфологических изменений клеток не наблюдается. Исследование с антителами к ядерным белкам Hes1, Hes5 и Hey1 (мишеням Notch) выявило Hes5 и Hey1 – позитивные клетки во всех пассажах. Поскольку Hes5 и Hey1 подавляют транскрипцию ряда пронеуральных генов, мы предположили, что дифференцировка клеток РПЭ в нейральном направлении может быть блокирована сигнальным путем Notch. Изучение сигнального пути TGF- β /BMP в трансдифференцировке клеток РПЭ человека показало, что BMP1, 2 и 7 активно экспрессируются в клетках. Следовательно, BMP1, BMP2 и BMP7 могут быть белками мишенями в дальнейшем исследовании.

Добавление в среду культивирования клеток РПЭ B27 и RA приводит к снижению пролиферации и эпителиальной дифференцировке, в то время как N2 и bFGF способствуют проявлению нейрального фенотипа. Показано также, что наибольшее число III β -тубулин позитивных нейральных клеток наблюдается при действии факторов роста BDNF, bFGF или CNTF, в то время как положительные по тирозингидроксилазе клетки выходят в меланогенную дифференцировку под влиянием GDNF и CNTF.

Впервые показано, что лиганд *Wnt7a* оказывает плеiotропное, контекст-зависимое влияние на дедифференцированные клетки ретинального пигментного эпителия человека, усиливая в одних процессы нейральной дифференцировки, в других - эпителизацию за счет модуляции Notch- и BMPs-сигнальных путей. Для поиска механизмов регуляции процесса трансдифференцировки клеток ретинального пигментного эпителия (РПЭ) исследовали роль сигнальных путей TGFb/BMPs, WNT, Notch и FGF. Изучение влияние лиганда *Wnt7a* на трансдифференцировку клеток в первичной и линейной ARPE-19 культуре взрослого человека показало, что *Wnt7a* может быть активным участником трансформации клеток РПЭ.

Исследовали механизмы трансдифференцировки клеток РПЭ взрослого человека на модели *in vitro*. Сравнительный анализ образцов нативного РПЭ (ткань), на 3-пассаже (контроль) *in vitro* и при воздействии *Wnt* (лиганд *Wnt7a*) показали следующие результаты. В РПЭ ткань выявлены мРНК генов *RPE65*, *MITF*, *Pax6* и *OTX2* специфичных для РПЭ; мРНК генов кодирующих белки BMP (BMP4, BMP2) и Notch (*Jagged1*, *Hey1* и *Hes1*) сигнальных путей, но не обнаружена экспрессия мРНК нейральных генов (*Nestin*, *TUBB3*). В клетках РПЭ (помещенных в культуру - контроль) обнаружено драматическое падение уровней мРНК генов-маркеров РПЭ *RPE65*, *MITF*, *OTX2* и *Pax6*, и снижение мРНК генов кодирующих белки BMP и Notch сигнальных путей (Рис.1).

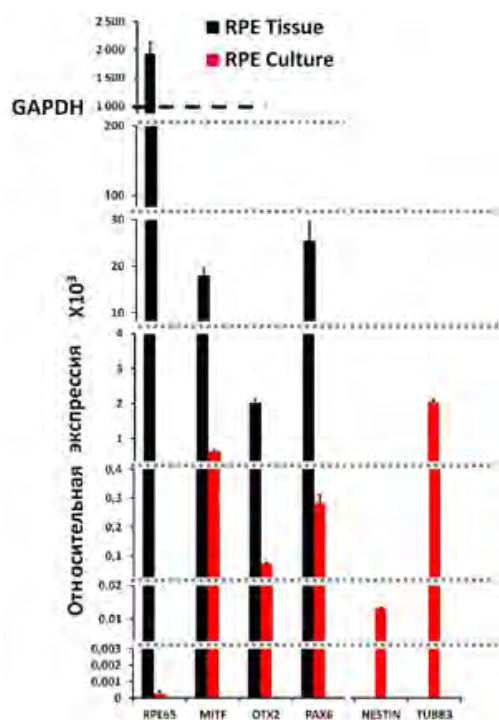


Рис.1. кПЦР экспрессии мРНК генов РПЭ и нейральных клеток в свежесыведенном РПЭ (RPE Tissue) и клетках первичной культуры.

При инкубировании клеток с Wnt7a выявлялись морфологические различия, и через 24 ч увеличивалась доля распластанных клеток и статистически значимо подавлялась пролиферация клеток по сравнению с контролем. Иммуноцитохимический анализ показал изменение локализации и усиление окрашивания на E-кадгерин, BMP2, BMP7 и нейтральный маркер Synapsin I, усиление окрашивания на β -катенин и снижение окрашивания на BMP4 и нейтральные белки MAP1B и TUBB3. Отдельные группы клеток окрашивались на Nestin, маркер нейтральных стволовых клеток, и маркеры нейронов NF 68 and 200 kDa. Количественный ПЦР в реальном времени подтвердил результаты иммуноцитохимического анализа и показал значимое усиление экспрессии мРНК генов *Nestin*, *BMP2* и *BMP2* в клетках инкубированных с Wnt7a. Через 24 ч после воздействия Wnt7a отмечено значимое увеличение уровней мРНК генов *RPE65*, *MITF*, *OTX2* и *Pax6*. Wnt7a усиливал экспрессию мРНК гена *Jagged1*, лиганда Notch сигнального пути, почти в 4 раза по сравнению с контролем, но не влиял на уровень экспрессии мРНК целевых генов Notch сигнального пути *HEY1* и *HES1* (Рис.2). Через 48 ч после воздействия Wnt7a на клетки РПЭ выявлено снижение уровней экспрессии мРНК исследованных генов и к 48-72 ч они были статистически не различимы от контроля. Кроме того, в клетках РПЭ через 72 ч отмечено нивелирование эффекта Wnt7a на распределение E-кадгерина и β -катенина.

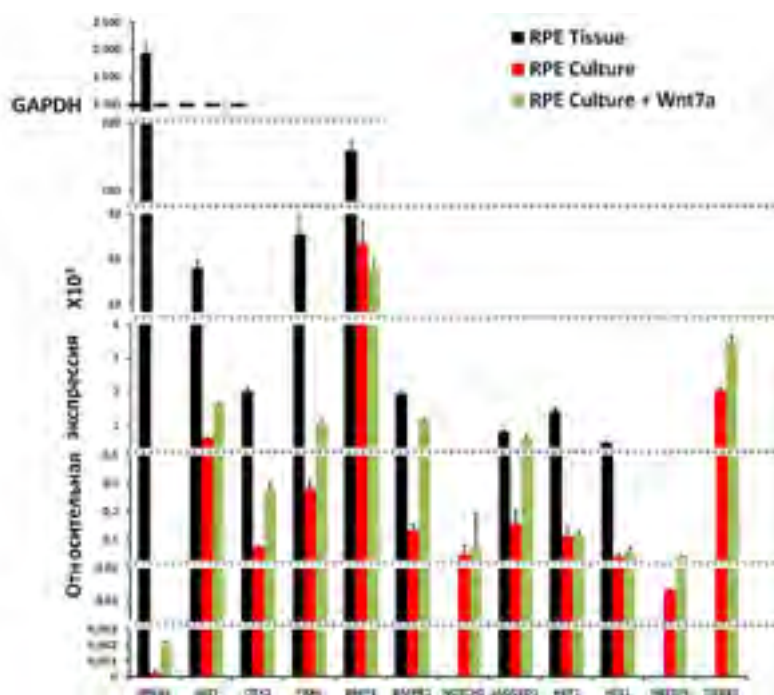


Рис.2. кПЦР анализ влияния Wnt7a на экспрессию мРНК генов маркеров РПЭ, нейронов и сигнальных путей.

Следовательно, усиление сигнального пути Wnt (лигандом Wnt7a) в дедифференцированных *in vitro* клетках РПЭ взрослого человека активирует нейтральную и РПЭ дифференцировки. В клетках повышается экспрессия мРНК генов *RPE65*, *MITF*, *OTX2* и *Pax6*, что,

совместно с усилением окрашивания на Е-кадгерин, свидетельствует о возможности редифференцировки клеток в РПЭ. Одновременно продвигается дифференцировка нейральных клеток, где экспрессируются белки Synapsin I и NF 68 and 200 kDa (Рис. 3).

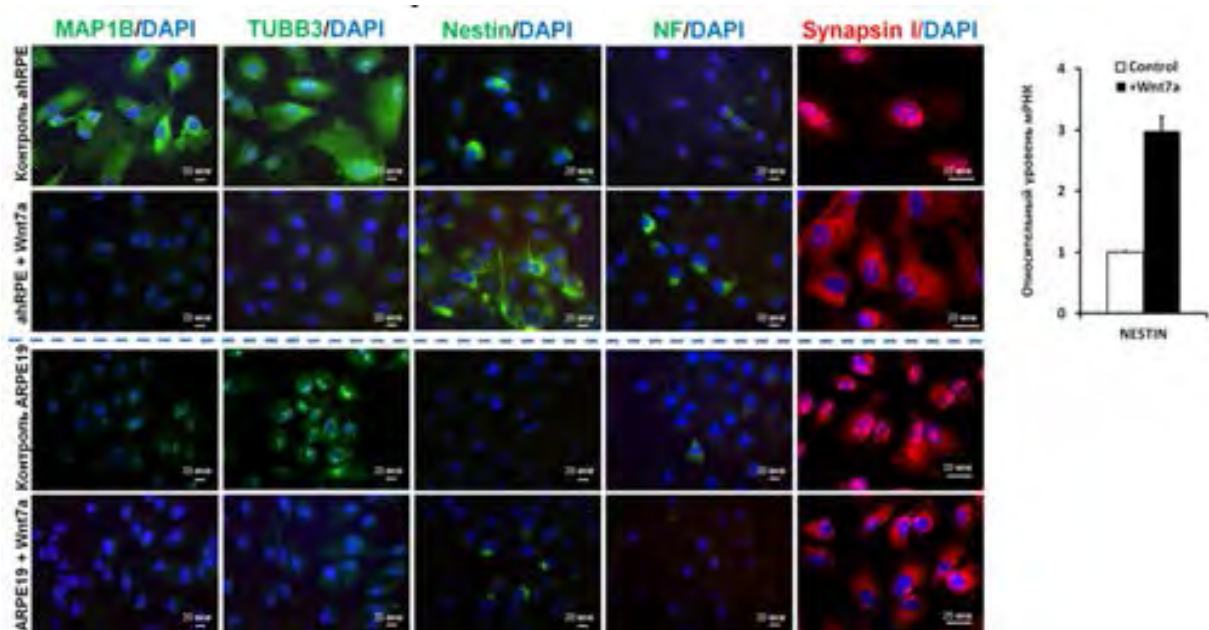


Рис.3. Влияние Wnt7a на характер экспрессии нейральных маркеров в клетках первичной культуры и линейных ARPE-19.

На клетках ARPE19 изучены механизмы влияния FGF2 на экспрессию мРНК генов OTX2, MITF, Nanog, Pax6, Oct4, b-Tubulin III. Установлено, что FGF2 подавляет экспрессию OTX2, MITF, Nanog, Pax6 в течение 24 часов и одновременно активирует экспрессию b-Tubulin III, которая достигает пика через 120 часов после воздействия. Следовательно, основной фактор роста фибробластов активирует нейральную дифференцировку в ARPE19 при подавлении мРНК специфичных генов РПЭ.

Раздел 2. Дифференцировка и клеточные взаимодействия суспензионных и тканевых трансплантатов неокортекса GFP мышей разных стадий эмбрионального развития с тканью мозга взрослых мышей.

Отв. исполнители: К. К. Сухинич и М.А. Александрова

Материал и методы.

В качестве материала исследования использовали ткань мозга мышей, взятую на разных стадиях развития. Методы включали хирургию, трансплантацию, морфологическое, иммунохимическое исследования.

Результаты.

В результате в рамках одной работы проведен сравнительный анализ развития суспензионных и 3D-тканевых трансплантатов неокортекса разных стадий генерации нейронов (от эмбрионов мышей стадий Э12.5, Э14,5, Э19.5). Выделенный 3D-фрагмент нативной ткани является системой, в которой сохранена citoархитектоника, связи клеток, внеклеточный матрикс и микроокружение клеток. В суспензионном трансплантате клетки теряют связи друг с другом, отсутствует или изменяется внеклеточный матрикс и соответствующее микроокружение. В отличие от большинства используемых в настоящее время моделей, работа проводилась на исходно неповрежденном (интактном) мозге реципиента, что является крайне важным, поскольку повреждение мозга приводит к преждевременному выделению факторов, стимулирующих регенерацию. Фрагменты ткани и суспензии клеток не подвергались предварительному культивированию перед трансплантацией. В работе использовался стандартизованный комплекс современных методов описания ткани и идентификации клеток донора и реципиента, включая применение трансгенных животных, в нервных клетках которых синтезируется зеленый флуоресцентный белок (GFP); специфическое иммунохимическое маркирование нейронов разной степени зрелости и глиальных клеток; 2D-и 3D-визуализация с использованием конфокального микроскопа и цифрового флуоресцентного микроскопа. Комплекс примененных методик позволил установить судьбу трансплантированной ткани с разрешением до единичных клеток и их отростков (Рис. 4).

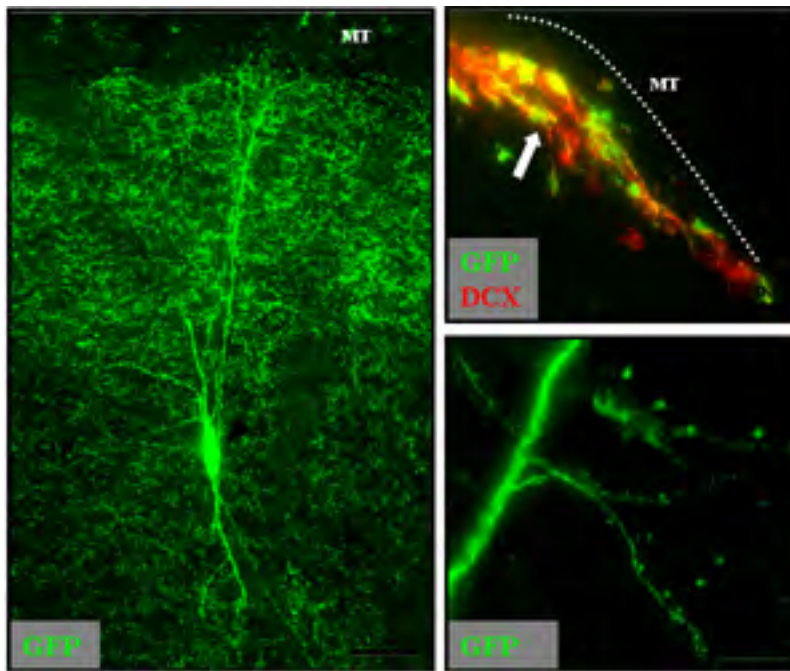


Рис.4. Клетка трансплантата, формирующая множество отростков в ткани мозга реципиента (слева). Клетки трансплантата развиваются в нейроны (справа сверху). На трансплантированных нейронах формируются шипики, что указывает на межнейронные связи (справа внизу)

На основе полученных данных выявлены оптимальные сроки для тканей донора, при которых пересаженная ткань остается жизнеспособной в исходно не поврежденном мозге реципиента не менее 2-х месяцев, в ней поддерживается пролиферативная активность, клетки способны дифференцироваться в нейрональном и глиальном направлениях. При этом клетки донора формируют плотную сеть отростков в ткани мозга реципиента и не препятствуют вращанию волокон нервной ткани реципиента в трансплантат. Обнаружено, что при идентичных условиях трансплантации процесс интеграции цельных 3D-фрагментов ткани эмбрионального неокортекса в мозг реципиента происходит быстрее, чем полученной из аналогичной области суспензии клеток.

Полученные фундаментальные данные имеют значение для дальнейшего развития методов восстановительной и регенеративной медицины. Так, на основе результатов данной работы станет возможным индивидуально подбирать материал для трансплантации. Клеточные и тканевые трансплантаты первичной эмбриональной нервной ткани могут служить в качестве определенного стандарта при анализе результатов трансплантации модифицированных клеток (например, клеток не нейрального происхождения, подвергшихся культивированию и репрограммированию).

Раздел 3. Оценка длительности S-фазы клеточного цикла нейтральных стволовых клеток и клеток-предшественников в зубчатой извилине гиппокампа престарелых nestin-GFP мышей.

Отв. исполнитель Подгорный О.В.

Материал и методы.

В качестве объекта исследования использовали GFP-nestin мышей. Для анализа в конфокальной микроскопии разработан протокол иммуногистохимического высокоизбирательного *двойного* мечения аналогами тимина BrdU и EdU, который позволят оценивать длительность S-фазы и длительность всего клеточного цикла. Разработан также протокол мечения *тремя* аналогами тимидина (5-хлоро-2'-деоксиуридином, 5-йодо-2'-деоксиуридином и 5-этинил-2'-деоксиуридином) делящихся клеток в зубчатой извилине гиппокампа взрослых мышей. В дальнейшем использовался метод иммуноцитохимии при двойном и тройном мечении маркерами пролиферации.

Результаты.

С использованием разработанного оригинального протокола, была произведена оценка длительности S-фазы клеточного цикла стволовых и прогениторных клеток в гиппокампе стареющих мышей (1 год) линии nestin-GFP. Работа выполнялась с целью проверки гипотезы о том, что длительность S-фазы и длительность всего клеточного цикла не меняются с возрастом. В целом исследование подтвердило нашу гипотезу и показало, что возрастное снижение нейрогенеза связано исключительно со снижением числа молчащих стволовых клеток, а не с увеличением длительности клеточного цикла.

Разработанный протокол выявления использованных аналогов тимидина (5-хлоро-2'-деоксиуридином, 5-йодо-2'-деоксиуридином и 5-этинил-2'-деоксиуридином) с помощью антител и, так называемой, клик-реакции позволяет высокоизбирательно визуализировать все три аналога одновременно. Установлено, что данный протокол пригоден для определения числа клеток, включивших одну, две или три метки. Были проведены эксперименты, в которых аналоги тимидина вводили последовательно с периодом, равным длительности клеточного цикла. Полученные результаты показали, что количество стволовых клеток с тройной меткой (т.е. клеток, осуществивших три последовательных деления) меньше, чем ожидалось. Данный факт противоречит предыдущим представлениям о динамике деления стволовых клеток в зубчатой извилине и требует дополнительной проверки.

Известно, что физическая нагрузка (бег) стимулирует нейрогенез в зубчатой извилине гиппокампа. Этот процесс состоит из нескольких этапов: ассиметричное деление стволовых

клеток покинувших состояние покоя; симметричное деление нейральных клеток-предшественников, гибель новообразованных и дифференцировка выживших клеток-предшественников в нейробласты, а затем в нейроны. Ранее было неизвестно, на какой именно из этапов нейрогенеза влияет бег. Наши данные получены при количественном анализе клеток, находящихся на разных этапах нейрогенеза, у мышей линии nestin-GFP, имевших свободный доступ к беговому колесу, и у контрольных животных. В специальных тестах установлено, что бег не изменяет число делящихся стволовых клеток и не влияет на жизнеспособность новых нейральных клеток-предшественников. В то же время, достоверно увеличивается число делящихся клеток-предшественников, что свидетельствует о влиянии бега именно на пролиферацию этой популяции клеток в зубчатой извилине гиппокампа.

Публикации по разделам1-3:

1. Podgorny O.V. Live cell isolation by laser microdissection with gravity transfer, *Journal of Biomedical Optics*, 2013, 18(5), 055002
2. Kharlampieva D.D., Manuvera V.A., Podgorny O.V., Kovalchuk S.I., Pobeguts O.V., Altukhov I.A., Alexeev D.G., Lazarev V.N., Govorun VM. Purification and characterisation of recombinant *Bacteroides fragilis* toxin-2, *Biochimie*, 2013, 95(11), pp. 2123-2131.
3. Verdiev BI, Milyushina LA, Podgornyi OV, Poltavtseva RA, Zinov'eva RD, Sukhikh GT, Aleksandrova MA. Comparative analysis of the expression of neural stem cell-associated genes during neocortex and retina development in human. *Bull Exp Biol Med*. 2013. V. 154(4). P.529-536.
4. Medvedev SP, Smetanina MA, Shevchenko AI, Zakharova IS, Malakhova AA, Grigor'eva EV, Dementyeva EV, Aleksandrova MA, Poltavtseva RA, Veriasov VN, Filipenko ML, Sukhikh GT, Pokushalov EA, Zakian SM. Characteristics of induced human pluripotent stem cells using DNA microarray technology. *Bull Exp Biol Med*. 2013. V. 155(1):122-128.
5. Милюшина Л.А., Кузнецова А.В., Александрова М.А. Экспериментальные модели дегенеративно-дистрофических заболеваний сетчатки человека: генетические модели // *Вестн. офтальмол.* 2013. Т.129, №2. С.76-80.
6. Милюшина Л.А., Кузнецова А.В., Александрова М.А. Экспериментальные модели дегенеративно-дистрофических заболеваний сетчатки человека: индуцированные модели // *Вестн. офтальмологии.* 2013. Т.129, №3. С.94-97.
7. Kuznetsova A.V., Kurinov A.M., Aleksandrova M.A. Cell models to study regulation of cell transformation in pathologies of retinal pigment epithelium // *J. Ophthalmol.* Volume 2014 (2014).
8. Александрова М.А., Кузнецова А.В., Вердиев Б.И., Милюшина-Ржанова Л.А., Сухинич К.К. Влияние трансплантатов клеточных культур ретинального пигментного эпителия глаза взрослого человека на дегенеративные процессы в головном мозге крыс с моделью острой гипоксии // *Клет. техн. биол. мед.* 2014. № 1. С. 10-18.
9. Кузнецова А.В., Куринов А.М., Ченцова Е.В., Макаров П.В., Александрова М.А. Изучение влияния Wnt белков на поведение клеток ретинального пигментного эпителия // *Российский общенациональный офтальмологический форум, 7-й: Сб. науч. тр. / Под ред. В.В. Нероева. – М.: Изд-во «Апрель», 2014. Т. 2. С. 436-440.*

10. Podgorny O.V., Polina N.F., Babenko V.V., Karpova I.Y., Kostryukova E.S., Govorun .VM., Lazarev V.N. Isolation of single Chlamydia-infected cells using laser microdissection // *J Microbiol Methods*. 2015 Feb;109:123-8. doi: 10.1016/j.mimet.2014.12.018. Epub 2014 Dec 26. PMID:25546842
11. Кузнецова А.В., Куринов А.М., Ченцова Е.В., Макаров П.В., Александрова М.А. Влияние HRWNT7A на клетки ретинального пигментного эпителия человека *in vitro*// Клеточные технологии в биологии и медицине. 2015.№2. С.78-84
12. Александрова М.А., Марей М.В. Стволовые клетки в мозгу млекопитающих и человека: фундаментальные и прикладные аспекты // *Журнал высшей нервной деятельности*.2015. Т. 65. №3. С. 271-305
13. Сухинич К.К., Косых А.В., Александрова М.А. Дифференцировка и межклеточные взаимодействия нейральных прогениторных клеток, трансплатированных во взрослый интактный мозг.// *Клеточные технологии в биологии и медицине*. 2015. №3.Стр. 139-148.
14. Кузнецова А.В., Куринов А.М., Ченцова Е.В., Макаров П.В., Александрова М.А.Участие *wnt7a* в регуляции пластичности клеток ретинального пигментного эпителия человека *in vitro*. VIII Российский Общенациональный офтальмологический форум. Научно практическая конференция с международным участием. Москва, 22-24 сентября 2015 г. Сборник научных трудов. Стр. 824-828.
15. Kuznetsova Alla V., Aleksandrova Maria A., Kurinov Alexander M., Chentsova Ekaterina V., Makarov Pavel V. Plasticity of adult human retinal pigment epithelial cells // *Int. J. Clin. Exp. Med*. 2016. V9. N11. P.20892-20906
16. Podgorny O.V.¹, [Lazarev V.N.](#)². Laser microdissection: A promising tool for exploring microorganisms and their interactions with hosts. // [J Microbiol Methods](#). 2016 Jan 13. pii: S0167-7012(16)30001-X.
17. Александрова М. А., Полтавцева Р.А., Марей М.В., Сухих Г.Т. Анализ нейральных стволовых клеток из кортикальных структур мозга человека *in vitro*// *Клеточные технологии в биологии и медицине*. 2016. №1, стр. 65-73
18. Кузнецова А.В., Александрова М.А. Гетерогенность клеток ретинального пигментного эпителия глаза взрослого человека в различных системах культивирования // *Клеточные технологии в биологии и медицине* 2016. № 4. с. 260-269.

Тезисы по разделам 1-3.

1. Александрова М.А., Кузнецова А.В., Ржанова Л.А. «Неканонические нейральные стволовые/прогениторные клетки человека». V Всероссийская научно-практическая конференция "Стволовые клетки и регенеративная медицина". Медицинский научно-образовательный центр

МГУ имени М.В.Ломоносова, Москва, РФ. 18-21 ноября 2013 г. Сборник тезисов. М. Макс-Пресс. ISBN 978-5-317-04609-5. Стр. 3.

2. Лосева Е.В., Александрова М.А. Стволовые клетки для коррекции заболеваний центральной нервной системы. IX Международный Междисциплинарный Конгресс «Нейронаука для медицины и психологии». – Судак, Крым, Украина . 3-13 июня 2013. – С.208-210

3. Александрова М.А., Кузнецова А.В., Милюшина-Ржанова Л.А., Вердиев Б.И. «Влияние клеток пигментного эпителия сетчатки глаза взрослого человека, трансдифференцированных *in vitro* в нейральном направлении, на дегенеративные процессы в головном мозге крыс с моделью острой гипоксии». IX Международный Междисциплинарный Конгресс «Нейронаука для медицины и психологии» – Судак, Крым, Украина . 3-13 июня 2013. С. 51-53

4. Сухинич К.К. «Дифференцировка клеток тканевых и суспензионных нейротрансплантатов». Ломоносов – 2013: XX международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых: Секция «Биология»; 8-13 апреля 2013 г., Москва, МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет: Тезисы докладов / Отв. ред. Е.Н. Темерова. Сост. Г.В. Кочетова. – М.: МАКС Пресс, 2013. – с. 20

5. Сухинич К.К., Подгорный О.В., Александрова М.А. «Развитие трансплантатов эмбрионального неокортекса в мозге взрослых мышей» IX Международный Междисциплинарный Конгресс Нейронаука для медицины и психологии Судак, Крым, Украина, 3-13 июня 2013 года С. 320

6. Сухинич К. К. «Анализ развития клеточных и тканевых нейротрансплантатов» Тезисы докладов XVI школы – конференции «Актуальные проблемы биологии развития» 28 октября – 1 ноября 2013г. и IX конференции молодых ученых Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН 5 – 6 декабря 2013 г. Москва 2013 с. 57 – 58

7. Александрова М.А. Роль нейральных стволовых клеток в регенерации нервной ткани. Симпозиум «Новейшие методы клеточных технологий в медицине». Новосибирск. 2-4 сентября 2014 г. С. 14.

8. Кузнецова А.В., Ржанова Л.А., Александрова М.А. Иммуноморфологические особенности клеток ретинального пигментного эпителия взрослого человека *in vitro*. Международная научная конференция «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии». Москва. 16-17 апреля 2014 г. С. 148-150.

9. Кузнецова А.В., Александрова М.А. Клетки ретинального пигментного эпителия человека: пронеуральная дифференцировка *in vitro*. Международная научная конференция «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии». Москва. 16-17 апреля 2014 г. С. 7-8.

10. Александрова М.А., Кузнецова А.В., Ржанова Л.А. Мультипотентные свойства клеток ретинального пигментного эпителия человека. X Международный Междисциплинарный конгресс «Нейронаука для медицины и психологии». Судак, Крым. Россия. 2-12 июня 2014. С.51.
11. Сухинич К.К. «Глиальная и нейрональная дифференцировка клеток тканевых и суспензионных нейротрансплантатов в мозге взрослого реципиента» Ломоносов – 2014: XXI международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых: Секция «Биология»; 7-11 апреля 2014 г., Москва, МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет: Тезисы докладов / Сост. Е.В. Ворцепнева. – М.: Издательство Московского университета, 2014. С. 14.
12. Сухинич К.К. «Клеточные взаимодействия и дифференцировка тканевых и суспензионных нейротрансплантатов» Сборник научных трудов международной научной конференции «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии». Москва. 16-17 апреля 2014 г. С.268–270.
13. Сухинич К.К. «Рост волокон от тканевых и суспензионных нейротрансплантатов в мозге реципиента» X Международный Междисциплинарный Конгресс Нейронаука для медицины и психологии. Судак, Крым, Россия. 2-12 июня 2014 г. С. 324
14. Косых А.В., Сухинич К.К, Воротеляк Е.А., Александрова М.А. Конфокальная микроскопия срезов мозга мыши после трансплантации клеток нервного гребня. XXV Российская конференция по электронной микроскопии и 2-я Школа молодых ученых «Современные методы электронной и зондовой микроскопии в исследованиях наноструктур и наноматериалов». Черноголовка 2014. С. 594-595
15. Кузнецова А.В., Куринов А.М., Александрова М.А. Блокада Notch сигнального пути ингибирует пролиферацию и способствует пронеуральной дифференцировке клеток ретинального пигментного эпителия глаза взрослого человека *in vitro* // XI Международный междисциплинарный конгресс. Нейронаука для медицины и психологии. 2015. Судак. Крым. 2-12 июня. Стр. 235-236.
16. Кузнецова А.В., Куринов А.М., Александрова М.А. WNT1 как регулятор NOTCH и BMP сигнальных путей в пронеуральной дифференцировке клеток ретинального пигментного эпителия глаза взрослого человека *in vitro* // XI Международный междисциплинарный конгресс. Нейронаука для медицины и психологии. 2015. Судак. Крым. 2-12 июня. Стр. 234-235.
17. А.В. Кузнецова, А.М. Куринов, Е.В. Ченцова, П.В. Макаров, М.А. Александрова. Wnt7a как регулятор bmp и notch сигнальных путей при пластических изменениях в клетках ретинального пигментного эпителия человека *in vitro* // II всероссийская конференция: "Внутриклеточная

сигнализация, транспорт, цитоскелет" 20-23 октября 2015 Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург. Постерный доклад.

18. Сухинич К.К. // II всероссийская конференция: "Внутриклеточная сигнализация, транспорт, цитоскелет" 20-23 октября 2015 Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург. Постерный доклад.

19. Aleksandrova M.A., Kuznetsova A.V., Kurinov A. M. The plasticity of adult human retinal pigment epithelia stem cells // International conference Cell technologies at the edge: research and practice. St. Peterburg, Russia, april 2016. p.59.

20. D. Namestnikova, I. Gubskiy, A. Gabashvili, P. Melnikov, K. Voitkovskaya, K. Sukhinich, A. Kutasheva, I. Vakhrushev, V. Burunova, L. Gubsky, K. Yarygin. Intra-arterial transplantation of mesenchymal stem cells in ischemic stroke: preventing the complications. Abstracts for the 10th World Stroke Congress, 2016, International Journal of Stroke, October 2016 11: 4-288, doi:10.1177/1747493016670567.

21. Кузнецова А.В., Александрова М.А., Куринов А.М. Регуляция пластичности клеток ретинального пигментного эпителия глаза взрослого человека // Сборник трудов Научная конференция с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии». Москва 2016. стр. 93-94.

22. Сухинич К. К., Александрова М.А. Анализ развития клеточных и тканевых трансплантатов эмбрионального неокортекса в интактном мозге взрослого реципиента // Сборник трудов Научная конференция с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии». Москва 2016. стр. 173-174.

23. Наместникова Д.Д., Губский И.Л., Габашвили А.Н., Мельников П.А., Войтковская К.С., Сухинич К.К., Витушев Е.Я., Бурунова В.В., Ярыгин К.Н., Губский Л.В. Миграция мезенхимальных стволовых клеток в головном мозге крыс при их стереотоксической трансплантации: в интактном мозге и в условиях острой фокальной ишемии. Судак, Крым, Россия; 1–11 июня 2016 г.: Труды Конгресса / Под ред. Лосевой Е.В., Крючковой А.В., Логиновой Н.А. – М.: МАКС Пресс, 2016. – 494 с. ISBN 978-5-317-05267-6.

24. Малахова Е.В. Влияние bFGF на дифференцировку клеток пигментного эпителия сетчатки *in vitro* // Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых Ломоносов-2016. Москва, 11-15 апреля 2016. Стр. 43-44.

Раздел 4. Клеточные и молекулярные механизмы развития и регенерации тканей глаза у низших и высших позвоночных животных

Ответственные исполнители: Григорян Э.Н., Маркитантова Ю.В., Новикова Ю.П., Поплинская В.А., Авдонин П.П.

Введение.

Изучение развития глаза в терминах клеточной и молекулярной биологии имеет огромное значение для понимания основных механизмов формирования наиважнейшей сенсорной системы животных и человека. Получаемые результаты не только позволяют определить причины развития тех или иных врожденных аномалий тканей глаза и патологии зрения, но и намечают инструментарий для преодоления возникающих в ходе развития глаза проблем. Регенерация тканей глаза – не менее важный раздел для систематического изучения, поскольку позволяет определить пути решения вопросов, связанных с клеточным замещением гибнущих в результате травмы или болезней (различные формы дистрофий сетчатки, нарушения функционирования хрусталика и т.д.) клеток и восстановления функции зрения. Клеточные источники для такого замещения, и молекулярные механизмы их активации – есть предмет различных, приведенных ниже исследований в рамках большого раздела № 4.

Материал и методы.

Материалом для изучения регенерации и развития и регенерации тканей глаза высших и низших позвоночных служили амфибии и грызуны, получаемые из аквариальной и вивария ИБР РАН. Использованные методы включали: микрохирургию, методы культивирования, тканевой и клеточной морфологии, морфометрии, BrdU и TUNEL эссеи, методы иммуногисто- и цитохимии, метод полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Результаты

4.1. В отчетный период проведена работа по изучению молекулярных механизмов развития и регенерации сетчатки и других тканей глаза у низших и высших позвоночных. Впервые изучено формирование сетчатки глаза в ходе развития тритона *Pleurodeles waltl*. Обнаружено, что дифференцировка клеток сетчатки происходит центробежно на фоне снижения общего числа клеток в S-фазе от центра к периферии сетчатки. При этом в краевой, ростовой зоне долго сохраняются BrdU позитивные клетки и клетки в фазе митотического деления. С помощью метода TUNEL изучена динамика апоптоза – обнаружено постепенное, с низкой скоростью снижение клеточной гибели в процессе дифференцировки сетчатки. В клетках-предшественниках нейронов сетчатки обнаружены транскрипционные факторы «глазного поля» Pax6, Prox1, Otx2. Позже, в

созревающих нейронах выявлена их дифференциальная экспрессия. Белок Pax6 локализован в ганглиозных клетках и амакриновых интернейронах, Prox1 – в амакриновых и горизонтальных клетках, Otx2 – в клетках всех трех ядерных слоев сетчатки. В дифференцирующемся ретинальном пигментном эпителии (РПЭ) удалось локализовать транскрипционные факторы Otx2, Mitf, участвующие в регуляции меланогенеза. Описана динамика экспрессии маркерного белка фоторецепторов - реCOVERина (recoverin) на последовательных стадиях развития *Pl. waltl*, демонстрирующая ход созревания и специализации клеток. Охарактеризован молекулярный профиль клеток краевой зоны сетчатки тритона *Pl. waltl*. В этой области глаза, месте локализации малодифференцированных предшественников, обнаружены продукты регуляторных генов *Wnt2*, *Vmp4*, *Sox2*, *Rx*, *Pax6*, *Prox1*. Выяснено, что «stem-like» клетки этой зоны, представляющие потенциал для роста и регенерации сетчатки, экспрессируют транскрипционные белковые молекулы - Pax6, Sox2, Rx, Six3, Prox1. Предполагается участие этих факторов в поддержании мультипотентного статуса клеток.

Полученные результаты согласуются с данными литературы об участии изучаемых регуляторных факторов в контроле морфогенеза сетчатки глаза других позвоночных животных, а также дают более полную характеристику клеткам – предшественникам нейронов сетчатки.

С помощью ОТ- и RT- ПЦР, Вестерн-блот гибридизации и иммуногистохимии изучена экспрессия гена *fgf2* и генов, кодирующих белки теплового шока (HSPs) в нормальных тканях и тканях глаза после инициации регенерации у тритона *Pl. waltl*. Впервые обнаружено, что вскоре после удаления сетчатки (4-8 дни), в РПЭ происходит down регуляция гена *fgf2* по сравнению с уровнем в нативной ткани (Рис. 5). Результаты по мРНК *fgf2* коррелируют со снижением интенсивности иммунореакции белкового продукта. Предполагается, что известный митогенный эффект Fgf2 проявляется позже, а именно после первого входа клеток РПЭ в S-фазу, начальный же этап характеризуется активацией экспрессии мастер гена *pax6*.

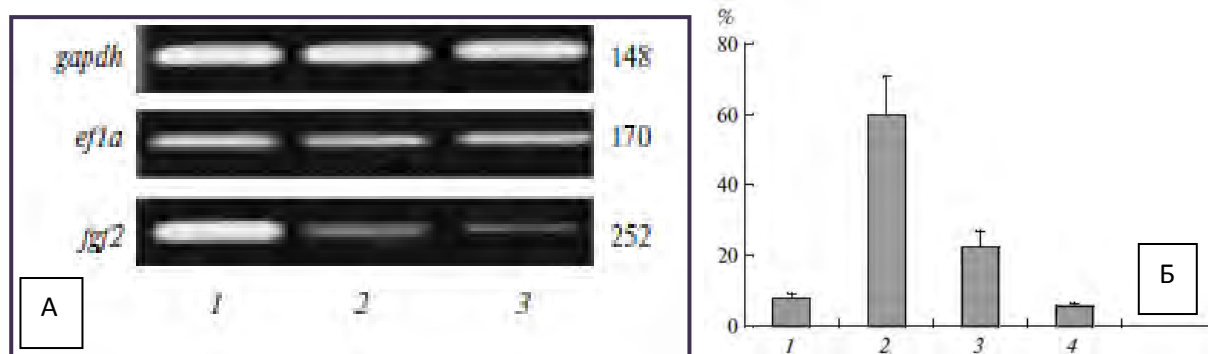


Рис. 5. Экспрессия гена *fgf2* в тканях нативного глаза и в ходе регенерации по данным ПЦР. Справа длина продуктов ПЦР в парах нуклеотидов. 1- сетчатка, 2 – РПЭ, 3- регенерат сетчатки, 8-е сут; Б - Динамика экспрессии гена *fgf2* на ранних стадиях регенерации сетчатки. 1- сетчатка, 0 сут, 2 – ретинальный пигментный эпителий (РПЭ), 0 сут, 3 – РПЭ, 4 сут; 4 – РПЭ, 8 сут.

В 2014-2016 г.г. показано, что белки HSP70 и HSP90, а также кодирующие их транскрипты соответствующих генов, экспрессируются в тканях глаза конститутивно. В тоже время в сетчатке эти белки распределены дифференциально: HSP70 доминирует в наружной сетчатке, а HSP90 – во внутренней, в частности в глиальных клетках Мюллера, а также зрительном нерве (рис. 6). В РПЭ и ростовой зоне глаза – источниках регенерации сетчатки у тритона – также выявлены транскрипты и белки теплового шока HSP70 и HSP90. Выяснено, что гены *Hsp70*, *Hsp90*, как и кодируемые ими белки, имеют высокую степень гомологии с таковыми других амфибий (например, *Xenopus laevis*).

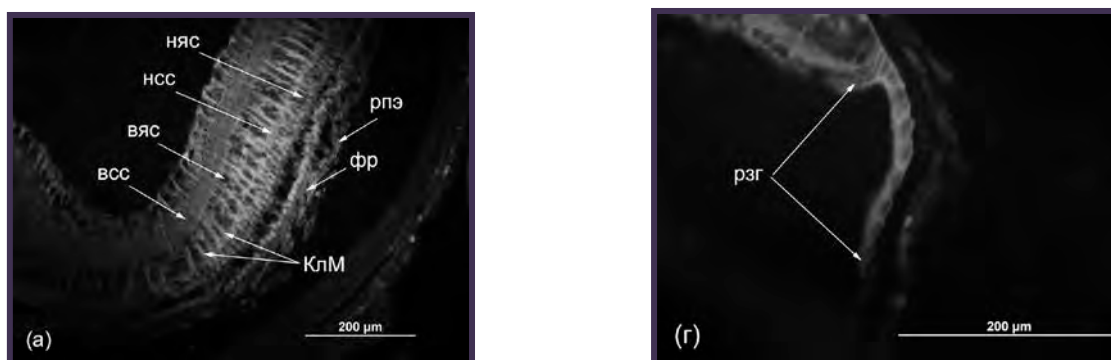


Рис. 6. Экспрессия HSP70 центральной (а) и периферической (г) областях неповрежденной сетчатки тритона.

В РПЭ и других тканях глаза тритона (*Pl. waltl*) выявлена экспрессия гена нуклеостемина (Ns), что может расцениваться как пререквизит высокой пластичности их дифференцировки при регенерации *in vivo*. Впервые в нативных тканях глаза взрослого тритона *Pleurodeles waltl* – хрусталике, РПЭ и сетчатке идентифицирован ген *Ns P.waltl*, кодирующий белок ядрышка нуклеостемин. Из исследуемых нами тканей глаза были выделены фрагменты кДНК, размером 369 п.о., с помощью специфических праймеров, методом полимеразной цепной реакции. В тканях глаза тритона *P.waltl* выявлены различия в интенсивности свечения ПЦР-продуктов, полученных с праймерами к гену *Ns*. Обнаруженные нами различия указывают на относительно более высокий уровень экспрессии гена *Ns* в сетчатке, при сравнении с хрусталиком и РПЭ глаза тритона.

В результате секвенирования и структурного анализа, установлена принадлежность полученных нами ПЦР-фрагментов к нуклеотидной последовательности гена нуклеостемина, идентифицированного также в кДНК- библиотеке тритона *Pleurodeles waltl* на личиночной стадии онтогенеза, аннотированного в банке данных NCBI (GenBank: JG014840.1). Сравнительный анализ полученной нуклеотидной последовательности гена нуклеостемина тритона *Pleurodeles waltl* с гомологами этого гена у других видов тритонов: *Synops pyrrohogaster* (GenBank: AB253365.1), *Notophthalmus viridescens* (GenBank: GQ844313.1), позволил выявить высокий процент сходства гена *Ns Pl.waltl* у данных видов из отряда хвостатых амфибий (*Urodela*) (рис.7). Гомология полученной нами нуклеотидной последовательности ПЦР продукта составила 83.4 и 88.4%, соответственно (рис. 2б). Нуклеотидная последовательность гена *Ns Pl.waltl* была переведена в аминокислотную последовательность, сравнение которой у тех же видов тритонов также выявило значительное сходство (рис.7). Гомология анализируемой аминокислотной последовательности кодируемого белка нуклеостемина составила 81.1 и 84.7 %, соответственно. Результаты исследования позволили сделать вывод о том, что полученная нами на матрице кДНК из нативных тканей глаза взрослого тритона, нуклеотидная последовательность принадлежит гену *Ns P.waltl*, ортологи которого высоко консервативны у разных представителей хвостатых амфибий.

Определена структура гена нуклеостемина, выявлены его транскрипты, обнаружен кодируемый этим геном белок GNL3 и описана его локализация в ядрах клеток.

А

	1	2	3	
1	█	83.4	88.4	1
2	18.5	█	92.2	2
3	12.7	8.3	█	3
	1	2	3	

Б

	1	2	3	
1	█	81.1	84.7	1
2	21.9	█	90.3	2
3	17.2	10.4	█	3
	1	2	3	

Рис. 7. Результаты сравнения (гомология, %) нуклеотидных (А) и аминокислотных (Б) последовательностей анализируемых участков гена и белка *Ns*. 1 – *P. waltl*, 2 – *C. pyrrhogaster*, 3 – *N. Viridescens*.

Иммунохимически исследована локализация фактора транскрипции PROX1 в сетчатке взрослого человека и с 9.5 по 31 нед развития. PROX1 выявлен в ядрах нейробластов сетчатки на 9.5 нед. и в дифференцирующихся интернейронах ее внутреннего ядерного слоя в период с 13 – 31 нед пренатального развития. Тот же характер локализации белка сохранялся и в зрелых нейронах сетчатки взрослого человека. Сходный характер локализации PROX1 обнаружен в регенерирующей, развивающейся и взрослой сетчатке тритона. Результаты указали на участие PROX1 в регуляции дифференцировки интернейронов внутреннего ядерного слоя сетчатки, и подтвердили консервативность функций PROX1/Prox1 в сетчатке позвоночных.

4.2. Изучены способы ремоделирования сетчатки у видов, способных (тритон) и неспособных (крыса) мобилизовать для восстановления эндогенные клеточные источники. Проведение облучения сетчатки тритона и крысы ярким светом и ее 3D-культивирование позволили выявить, какие процессы являются универсальными, а какие специфичны для этих двух разных объектов. Общность проявлялась в апоптозе фоторецепторов, выселении клеток РПЭ, вымещении биполяров в области гибели фоторецепторов и глиальном ответе. Отличия же проявлялись в том, что у тритона имела место регенерация сетчатки за счет клеток-предшественников, а у крысы – только реконструкция сетчатки без использования механизма клеточного замещения.

Результаты данных подразделов темы вносят существенный вклад в понимание молекулярных механизмов развития глаза позвоночных животных, демонстрируют определенную

универсальность и консерватизм регуляторных механизмов при развитии и регенерации, а также в эволюционном ряду.

4.3. Изучена роль интегринов в регуляции дифференцировки эпителия хрусталика глаза у зародышей мыши. Предполагается, что интегрины выполняют двоякую функцию: β_1 -интегрин обеспечивает нормальный морфогенез и стабилизирует дифференцировку эпителия хрусталика, тогда как α_v -интегрин инициирует эпителиально-мезенхимный переход эпителия хрусталика. Тканеспецифический нокаут β_1 -интегрина на стадии формирования первичных волокон приводил к изменениям сигнальных путей в клетках эпителия хрусталика (включая TGFbeta, BMP), внутриклеточных медиаторов (Smads) и каскады протеинкиназ (FAK, ERK, RhoA). Наиболее существенным результатом нокаута явилось увеличение экспрессии α_v -интегрина. Изучена роль интегринов в регуляции дифференцировки эпителия хрусталика (ЭХ) глаза зародышей мыши. Получены два типа нокаута гена β_1 -интегрина, один из которых (нокаут в волокнах хрусталика) приводил к нарушению пространственной организации волокон и развитию катаракты, а другой - (одновременно в волокнах и эпителии) приводил к развитию микрофтальмии. Получен также более ранний нокаут гена β_1 -интегрина с использованием промотора Pax6, инициация которого совпадает по времени с началом экспрессии Pax6 в хрусталиковой плакоде. Отсутствие β_1 -интегрина в хрусталиковом пузырьке приводила к выходу клеток эпителия из клеточного цикла и дифференцировке в волокна к 12.5 сут эмбрионального развития. Данные дают основание предполагать, что β_1 -интегрин, помимо своей основной функции (обеспечение адгезии к внеклеточному матриксу) играет важную роль в морфогенезе хрусталика и дифференцировке его клеток. Данное исследование впервые представляет неканоническую, морфогенетическую роль интегринов, приводящую к широкому спектру изменений в развитии не только хрусталика, но глаза в целом.

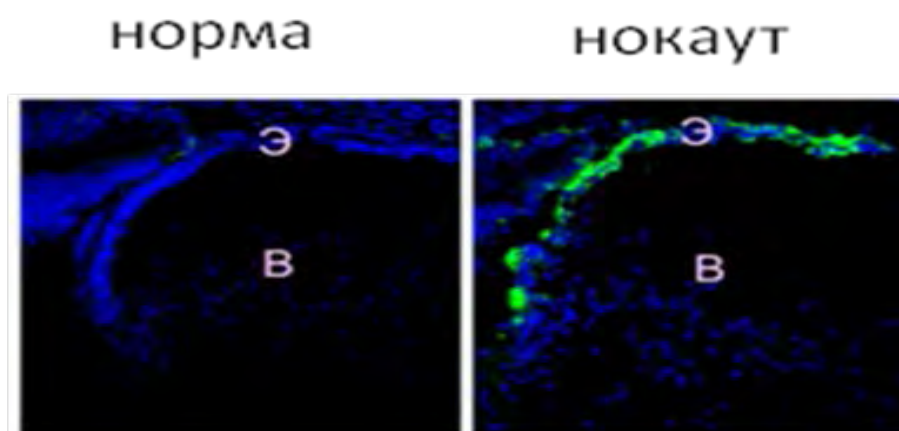


Рис. 8. Повышение уровня гладкомышечного α -актина в эпителии хрусталика мышцы после нокаута бета 1-интегрина на стадии формирования первичных волокон. Э - эпителий хрусталика; В – волокна хрусталика

Помимо проведенных экспериментальных исследований были обобщены данные по изученным ранее клеточным и молекулярным механизмам, лежащим в основе инициации регенерации сетчатки тритона и развития пролиферативной ретинопатии у млекопитающих на моделях *in vivo* и *in vitro*. Выявлено сходство основных триггеров этих процессов, определено, что различия заложены в доминирующей компетенции клеток ретинального пигментного эпителия (РПЭ) к нейральной дифференцировке у амфибий и фибробластоподобной у млекопитающих и человека.

Обобщены также результаты изучения молекулярно-генетического статуса клеток РПЭ взрослых амфибий (Urodela). Обнаружены особенности, позволяющие этим клеткам естественным образом репрограммироваться *in vivo* (natural reprogramming), превращаться в клетки сетчатки после ее повреждения или удаления. Выяснено, что у этих животных в РПЭ имеет место феномен одновременного проявления молекулярных признаков (транскрипционных факторов и сигнальных путей), характерных для раннего развития глаза, и таковых, отвечающих за функциональную специализацию РПЭ половозрелого организма.

Суммирована информация, свидетельствующая о том, что присущий саламандрам педоморфоз обуславливает сохранение ювенильности на всех уровнях организации – от организменного до молекулярно-генетического. Это, в свою очередь, существенно облегчает инициацию и развитие регенераторных ответов на травму вплоть до осуществления эпиморфной регенерации целых органов. В качестве примера прослежены вызванные педоморфозом клеточные и молекулярно-генетические особенности тканей глаза и мозга Urodela, играющие перmissive роль в их регенерации.

Список публикаций по разделу 4 (включая все подразделы).

1. Markitantova Y., Avdonin P., Grigoryan E. Molecular insight into retinal pigment epithelium of lower vertebrates in the aspects of retinal regeneration // J. Wound Repair and Regeneration. 2014. V. 22. № 5. P. A10.
2. Grigoryan E., Novikova J., Poplinskaya V., Markitantova Y. Remodelling of damaged sensory retina of lower and higher vertebrates in vivo and in vitro // J. Wound Repair and Regeneration. 2014. V. 22. № 5. P. A.10.
3. Novikova Yu.P., Gancharova O.S., Eichler O.V., Philippov P.P., and Grigoryan E.N. Preventive and Therapeutic Effects of SkQ1 - Containing Visomitin Eye Drops against Light-Induced Retinal Degeneration // Biochemistry (Moscow). 2014, V. 79. N. 10. P. 1101-1110.
4. Новикова Ю.П., Ганчарова О.С., Эйхлер О.В., Филиппов П.П., Григорян Э.Н. Профилактическое и лечебное действие SkQ1-содержащих глазных капель визомитин при фотоиндуцируемых повреждениях сетчатки глаза // Биохимия. 2014. Т. 79. № 10. С 1355-1366.
5. Маркитантова Ю.В., Зиновьева Р.Д. Внутриклеточная локализация транскрипционного фактора PROX1 в сетчатке глаза человека в онтогенезе // Известия РАН. Серия биологическая. 2014. № 2. С.117-122.
6. Маркитантова Ю.В., Авдонин П.П., Григорян Э.Н. Компоненты FGF сигнального пути в тканях заднего сектора глаза взрослого тритона *Pleurodeles waltl* // Известия. РАН. 2014. Сер. биологическая. С. 325-333
7. Григорян Э.Н. Факторы компетенции клеток ретинального пигментного эпителия для репрограммирования в нейрональном направлении при регенерации сетчатки у тритонов // Известия РАН. Серия: Биологическая. 2015. N 1. С. 5-16.
8. *Маркитантова Ю.В., Авдонин П.П., Григорян Э.Н.* Идентификация гена нуклеостемина в тканях глаза взрослого тритона *Pleurodeles waltl* // Известия РАН. Серия: Биологическая. 2015. N 5. С. 453-460.
9. *Панова И.Г., Маркитантова Ю.В., Смирнова Ю.А., Зиновьева Р.Д.* Молекулярно-генетические механизмы морфогенеза роговицы // Известия РАН. Серия: Биологическая. 2015. N 2. С. 117-126.
10. *Григорян Э.Н., Новикова Ю.П., Поплинская В.А.* Структурные изменения сетчатки низших и высших позвоночных при тканевом культивировании *in vitro* и повреждении *in vivo* // VIII Российский Общенациональный офтальмологический форум: Сб. науч. тр.: научно- практической конференции с международным участием. Москва, 22-24 сентября 2015 г. / Под ред. В.В. Нероева. – М.: Апрель, 2015. Т.2. С. 791-795.

11. Маркитантова Ю.В., Авдонин П.П., Григорян Э.Н. Клеточные и молекулярные механизмы нейрогенеза сетчатки глаза низших позвоночных в онтогенетическом развитии и регенерации. Сборник научных трудов международной научной конференции «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии». Москва. 2014. С. 168-170.
12. Новикова Ю.П., Поплинская В.А., Григорян Э.Н. Ремоделирование сетчатки глаза высших и низших позвоночных животных в условиях органотипического культивирования *in vitro* и при повреждении сетчатки *in vivo*. Сборник трудов международной научной конференции "Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии". Москва. 2014. С. 210- 213.
13. Маркитантова Ю.В., Панова И.Г., Смирнова Ю.А., Сухих Г.Т., Зиновьева Р.Д. Изучение молекулярных механизмов дифференцировки клеток роговицы – основа для разработки методов регенеративной медицины. «Пролиферативный синдром в биологии и медицине». I Российский конгресс с международным участием. Москва. 27-28 ноября, 2014 г. Сборник трудов. С. 17-22.
14. Григорян Э.Н., Новикова Ю.П., Поплинская В.А. Структурные изменения в сетчатке низших и высших позвоночных при тканевом культивировании *in vitro* и повреждении *in vivo*. «Пролиферативный синдром в биологии и медицине». I Российский конгресс с международным участием. Москва. 27-28 ноября, 2014 г. Сборник трудов. С. 23-25.
15. Маркитантова Ю.В. Авдонин П.П., Григорян Э.Н. Экспрессия нуклеостемина в процессе репрограммирования *in situ* клеток пигментного эпителия глаза при регенерации сетчатки у взрослого тритона. Цитология. 2014. Т.56. №9. С. 671-672.
16. Markitantova Y., P. Avdonin, E. Grigoryan Molecular insight into retinal pigment epithelium of lower vertebrates in the aspects of retinal regeneration. 24th Annual meeting of the European Tissue Repair Society. Edinburgh. 10-12 September. 2014. P. 100-101.
17. Grigoryan E., J. Novikova, V. Poplinskaya, Y. Markitantova. Remodelling of damaged sensory retina of lower and higher vertebrates *in vivo* and *in vitro*. 24 th Annual meeting of the European Tissue Repair Society. Edinburgh. 10-12 September. 2014. P.104-105.
18. Novikova Yu.P., Grigoryan E.N. Remodeling of the retina of lower and higher vertebrates after damage *in vivo* and *in vitro*. 11th ISOPT Clinical. Reykjavik, Iceland. June 19-22, 2014. P. 101.
19. Григорян Э.Н. Высокая регенерационная способность хвостатых амфибий (Urodela) как результат проявления половозрелыми животными ювенильных черт // Онтогенез. 2016. Т. 47, № 2, с. 99–109.
20. Bobrovsky P, Manuvera V, Polina N, **Podgorny O**, Prusakov K, Govorun V, Lazarev V. Recombinant Human Peptidoglycan Recognition Proteins Reveal Antichlamydial Activity. Infect. Immun. 2016 Jun 23;84(7):2124-30. doi: 10.1128/IAI.01495-15.

21. Grigoryan E.N., Poplinskaya V.A., Novikova Y.P. Retinal remodeling under conditions of organotypic 3D culturing *in vitro* and after damage *in vivo* in lower and higher vertebrates // *New Front. Ophthalmol.* 2016. V. 2. N1. P. 66-76. DOI:10.15761/NFO.1000118.
22. Novikova Yu. P., Grigoryan E.N. Organotypic roller 3D culturing is an easy method for study of regenerative responses in tissues and evaluation of an effectiveness of pharmacological substances // *ETRS E- Bulletin.* 2016. I. 1. P. 7-9. <https://dub111.mail.live.com/mail/ViewOfficePreview.aspx?messageid=mgtP52Oozw5RGUnwAhWtek-A2&folderid=flinbox&attindex=0&cp=-1&attdepth=0&n=56416014> (электронная публикация).
23. Pathania M., Wang Y., Simirskii V.N., Duncan M.K. β 1-integrin controls cell fate specification in early lens development // *Differentiation* (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.diff.2016.08.002i> DOI: 10.1016/j.diff.2016.08.002.
24. Podgorny O.V., Lazarev V.N. Laser microdissection: A promising tool for exploring microorganisms and their interactions with hosts. // *J Microbiol Methods.* 2016 Jan 13. pii: S0167-7012(16)30001-X. doi: 10.1016/j.mimet.2016.01.001.
25. Grigoryan E.N., Markitantova Yu.V. Cellular and Molecular Preconditions for RPE Natural Reprogramming During Retinal Regeneration in Urodela // *Biomedicines.* 2016. V. 4. N. 28. P. 1-18.
26. Григорян Э.Н., Новикова Ю.П., Поплинская В.А. Структурные изменения сетчатки низших и высших позвоночных при тканевом культивировании *in vitro* и повреждении *invivo* // VIII Российский Общенациональный офтальмологический форум: Сб. науч. тр.: научно- практической конференции с международным участием. Москва, 22-24 сентября 2015 г. / Под ред. В.В. Нероева. – М.: Апрель, 2015. Т.2. С. 791-795.
27. Маркитантова Ю.В., Авдонин П.П., Григорян Э.Н. Экспрессия Fgf2 и Ns в специализированных и малодифференцированных клетках глаза взрослого тритона VIII Российский Общенациональный офтальмологический форум: Сб. науч. тр.: научно- практической конференции с международным участием. Москва, 22-24 сентября 2015 г. / Под ред. В.В. Нероева. – М.: Апрель, 2015. Т.2. С. 848-852.
28. Григорян Э.Н. Промежуточные филаменты клеток ретинального эпителия в процессе его репрограммирования в нейроны при регенерации тритона *Pleurodeleswalti* // II Всероссийская конференция: «Внутриклеточная сигнализация, транспорт, цитоскелет» 20-23 октября 2015 г. *Цитология.* Т. 57, N 9, 2015. С. 626.
29. Маркитантова Ю.В., Авдонин П.П., Григорян Э.Н. Исследование участия нуклеостемина и FGF2 в реализации митогенных сигналов при регенерации сетчатки у тритона // II Всероссийская конференция: «Внутриклеточная сигнализация, транспорт, цитоскелет» 20-23 октября 2015 г. *Цитология.* Т. 57, N 9, 2015. С. 640.

30. Смирский В.Н., Дункан М.К. Роль интегрин в стабилизации и модуляции дифференцировки эпителия на примере хрусталика глаза // Конференция «Морфогенез в индивидуальном и историческом развитии: устойчивость и вариабельность». М., 21-23 апреля, 2015. / Сборник тезисов. М. ОМТ ПИН РАН, 2015. 76 с. С. 62-63.

Раздел 5. Влияние факторов космического полета на регенерацию у низших позвоночных.

Ответственные исполнители: Радугина Е.А., Григорян Э.Н., Поплинская В.А., Маркитантова Ю.В.

Введение.

Изучение регенерации органов и тканей в условиях космических полетов и под действием отдельных полетных факторов (ПФ), таких как изменение гравитационного вектора, проводится нами на протяжении многих лет, а полученные результаты являются приоритетными. Исследование необходимо для того, чтобы понять влияние ПФ на ключевые процессы развития и регенерации, выявить молекулярную природу этих влияний и предсказать результаты их воздействия на другие организмы, регенерирующие или развивающиеся в условиях космических полетов.

Материал и методы.

В подразделах данной работы были использованы позвоночные животные, два традиционных для исследования влияния космических полетов объекта – хвостатые амфибии – тритоны *Pl. waltl* (Urodela) и мыши C57/Black. Условия факторов космического полета, в частности микрогравитации, создавались на борту биоспутника Бион - М1, условия гипергравитации - на центрифуге Эймского Центра НАСА, условия низкой гравитации – в глубоких аквариумах. Методы подготовки и анализа материала включали, микрохирургию, морфологические и морфометрические методы, иммуногистохимию, BrdU и TUNEL эссеи, ПЦР анализ, а также методы количественного анализа данных.

Результаты.

5.1. Ранее, в ходе экспериментов на борту спутников серии Фотон (2005, 2007) были выявлены изменения формы регенерирующего хвоста у Urodela в зависимости от гравитационной нагрузки. На основе этих наблюдений в лаборатории была разработана модель для изучения влияния гравитационной нагрузки на формирование органов у животных. За отчетный период у тритонов *Pl. waltl* развитие регенератов хвоста, различной в зависимости от дозы гравитации формы, подробно описано с использованием морфометрии и гистологии, изучен вклад клеточной пролиферации и клеточного апоптоза в проявление морфогенетического эффекта. Позже в ходе специальных лабораторных экспериментов было обнаружено, что сходный с эффектом гравитационной нагрузки морфогенетический феномен воспроизводится при действии теплового шока. Данные позволили предположить, что белки теплового шока (HSPs) являются посредниками в развитии эффекта в обоих случаях – как при действии высоких доз гравитации, так и при тепловом воздействии. С помощью методов молекулярной биологии и иммуногистохимии исследовали экспрессию белков HSP70 и HSP90. Методом ПЦР изучена экспрессия мРНК белков

теплового шока HSP70 и HSP90 в тканях интактного хвоста, после теплового шока и в регенерации на II и IV стадиях. мРНК для HSP90 существенно у- регулировалась только в прогрессе регенерации. мРНК для HSP70, напротив, детектировалась в нативных тканях, но увеличивала свою экспрессию при тепловом шоке и в прогрессе регенерации от I к IV стадии. После операции уровень экспрессии гена *Hsp70* в регенерате повышался, тогда, как экспрессия *Hsp90* поддерживалась на одном уровне, была относительно стабильна. Продукты этих генов (белки HSP70 и HSP90) локализовались в мышцах, соединительной ткани хвостов, а также в бластеме регенератов. Существенно, что, и после теплового шока, и при высоких дозах гравитационной нагрузки, белки HSP70 и HSP90 присутствовали в клетках эпидермиса, чего не наблюдали при низких гравитационных нагрузках и тепловых контролях. Таким образом, в данном разделе изучены молекулярные механизмы, лежащие в основе изменений формы осевых структур (спинного мозга и позвоночника) при регенерации хвоста у саламандр. Разработаны и использованы новые, оригинальные модели морфогенетических отклонений в развитии регенератов при увеличении гравитационной нагрузки и под действием теплового шока. Впервые обнаружено, что влияние физических факторов различной природы на морфогенез при регенерации опосредовано сходным молекулярным механизмом, включающим систему экспрессии генов и белков теплового шока (рис. 9).

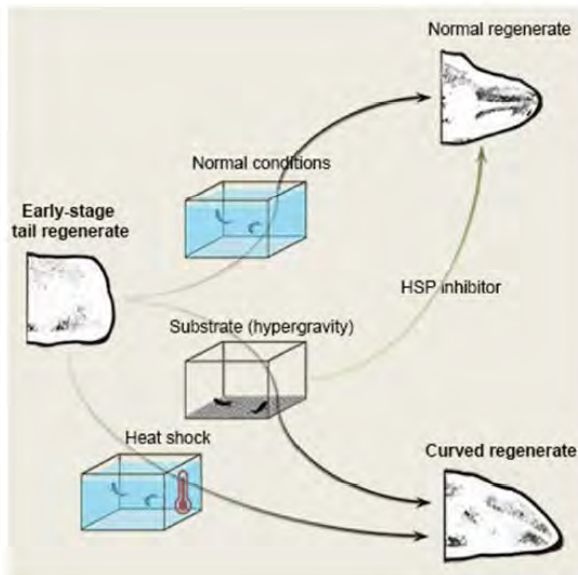


Рис. 9. Молекулярной основой, регулирующей изменения формы регенерирующих осевых структур под действием различных физических факторов, являются белки теплового шока.

5.2. За отчетный период изучено также состояние мышц проксимальной части бедра мышей, претерпевших месячный полет на борту биоспутника БионМ №1 (апрель-май 2013 г). Работа

выполнена методами морфометрии, иммуногистохимии и молекулярной биологии (ОТ-ПЦР). Отсутствие механической нагрузки в космическом полете, как известно, вызывает мышечную атрофию, изменения в соотношении типов мышечных волокон и белков, изменения генной экспрессии и угнетение регенерации мышц. Для грызунов данные в основном касаются кратковременных полетов. В настоящей работе использованы мышцы 6 мышей, полученные в соответствии с программой NASA Biospecimen Sharing Program при участии ИМБП РАН, после завершения полета Российского биоспутника Бион М1 (2013). В морфологическом исследовании выявлены все признаки атрофии и регенеративной гипоплазии мышц. В частности, наблюдалось двукратное снижение числа миоядер, их центральная локализация, низкая плотность волокон в ткани и миофибрилл в волокне, фрагментация и набухание волокон. Несмотря на очевидную атрофию, регенерация все же имела место в течение 30 дней микрогравитации, что выражалось в формировании атипичных, тонких, новых миофибрилл. Многие из них, при этом, содержали TUNEL позитивные, апоптотические ядра и демонстрировали деградацию миофибрилл. Это свидетельствует о том, что 30 дневная разгрузка в полете делает невозможными дифференцировку и рост регенерирующих волокон. В тоже время в гравитационном и виварных контролях животные обладали нормальной, хорошо развитой структурой мышечной ткани, нормальным снабжением со стороны сосудистой и нервной систем, а также очевидной регенерацией с формированием новых жизнеспособных волокон. Миоядра в ткани «летавших животных» демонстрировали стресс-ответы, обнаруженные нами по иммунолокализации в них белков c-jun и c-myc. Регенеративная активность клеток сателлитов была определена у мышей всех групп по экспрессии белков маркеров *rah7*, *MyoD*, а также по иммунолокализации миогенина и ПЦР идентификации транскриптов генов *MyoG* (рис. 10). Таким образом, условия длительного космического полета вызывают гипо- и атрофию мышц бедра *Quadriceps*, наряду с продолжающейся, но неполноценной регенерацией, сопровождаемой индукцией апоптоза и деградацией миофибрилл на стадии дифференцировки вновь образованных волокон.

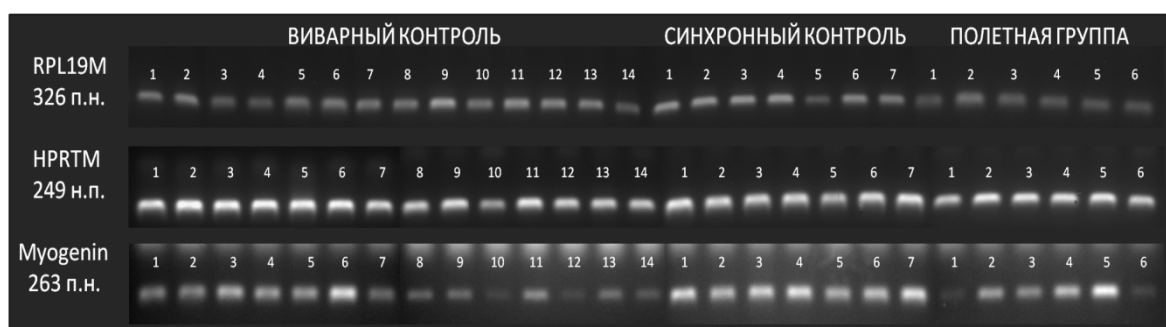


Рис. 10. ПЦР исследование наличия транскриптов иРНК гена *myoG* в образцах мышечной ткани мышей в контролях и полетной группе.

5.3. Завершена совместная с Эймским центром НАСА работа по изучению влияния гипергравитации (“2g”) на регенерацию хрусталика и роговицы у тритона *Pl. waltl*. В работе с использованием центрифуги изучено действие гипергравитации (2g) на регенерацию хрусталика и роговицы у тритонов *Pl. waltl*. Проведено сравнение с гравитационным 1g контролем, аквариальным (low-g) и базальным контролями. С помощью BrdU эссея и иммуногистохимического выявления FGF2 и его рецепторов Fgf2R, а также белка HSP70, сделана попытка объяснить происходящее при 2g снижение скорости и в ряде случаев нарушение регенерации хрусталика, возникающей при 2g отслойкой сетчатки и изменениями в связи с этим профилей экспрессии FGF2, Fgf2R и HSP70 (рис.11). Впервые полученные данные необходимы для предвидения возможных нарушений восстановительных процессов в глазу позвоночных, обусловленных такими факторами космических полетов, как перегрузки при взлете и посадке.

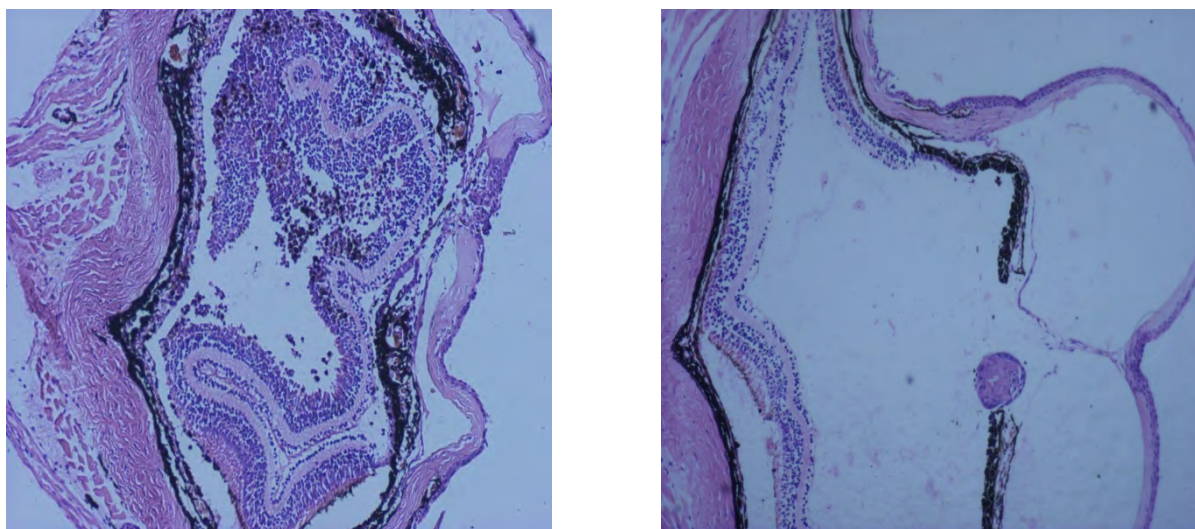


Рис. 11. Отслойка сетчатки в глазу тритона *Pl. waltl* экспонированного на 8ft центрифуге (2g) (слева) в сравнении с сетчаткой глаза тритона из группы 1g контроля.

Список публикаций по разделу 5.

1. Радугина Е.А. Изменение морфогенеза регенерирующего хвоста тритона под действием внешних факторов – повышенной гравитационной нагрузки и теплового шока // Сборник научных трудов международной научной конференции «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии». – М.: Группа МДВ, 2014. С. 240-242. ISBN 978-5-905343-10-0.

2. Grigoryan E., V. Polinskaya, Y. Markitantova, E.Radugina, E.Blaber, E.Almeida. Exposure to microgravity for 30 days onboard Bion M1 caused muscle atrophy and decreased regeneration in the mouse femoral quadriceps / 40th COSPAR Scientific Assembly. Moscow. August 1-10, 2014.
3. Grigoryan E., Almeida E., Mitashov V.I. Regeneration of eye tissues is modulated by altered levels of gravity at 1G, 2G, and in microgravity during spaceflight/ 40th COSPAR Scientific Assembly. Moscow. August 1-10, 2014.
4. Blaber E., E. Grigoryan, R. Globus, E. Almeida. Long-duration spaceflight during the Bion-M1 spaceflight experiment resulted in significant bone loss in the femoral head and alterations in stem cell differentiation potential in male mice/40th COSPAR Scientific Assembly. Moscow. August 1-10, 2014.
5. Radugina E. A., E.N. Grigoryan, E.Almeida. Newt tail regeneration: a model of gravity dependent morphogenesis and clues to the molecular mechanisms involved / 40th COSPAR Scientific Assembly. Moscow. August 1-10, 2014.
6. Radugina E. A., E.N. Grigoryan. Evaluation of qualitative and quantitative effects of environmental factors upon newt tail regeneration/ 24 th Annual meeting of the European Tissue Repair Society. Edinburgh. 10-12 September. 2014. P.92.
7. Радугина Е.А. Белки теплового шока как возможные посредники изменения морфогенеза регенерирующего хвоста тритона под действием внешних факторов // Ломоносов – 2014: XXI Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых; секция «Биология»; 7-11 апреля 2014 г.; Москва, МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет: Тезисы докладов/ Сост. Е.В. Ворцепнева. – М.: Издательство Московского университета, 2014. С. 11. ISBN 978-5-19-010922-1
8. Григорян Э.Н., Блэйбер Е., Поплинская В.А., Радугина Е.А., Маркитантова Ю.В., Альмейда Е.А.М. Гипотрофия и угнетение регенерации мышц бедра у мышей, экспонированных на борту Бион М1 в течение 30 дней. Сборник отчетных статей "Проект Бион-М №1: результаты и перспективы экспериментов и исследований" 2014. Москва. В кн: Космический научный проект "Бион-М1" / Ред. А.И. Григорьев / М. Изд-во ГНЦ РФ - ИМБП РАН. 2016. - 624 с. ISBN 978-5-902119-32-6. С. 254-265.
9. Радугина Е.А. Результаты активации и фармакологического ингибирования белков теплового шока в ходе регенерации хвоста тритона в нормальных условиях и в условиях, вызывающих морфогенетические изменения в регенерате // Ломоносов – 2015: XXII международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых: Секция «Биология развития»; 13-17 апреля 2015 г., М., МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет: Тезисы докладов / Сост. И.А. Екимова. – М.: МАКС Пресс, 2015. – 420 с. ISBN 978-5-317-04941-6. С. 20.

10. Радугина Е.А., Э.Н. Григорян Влияние внешних факторов тна морфогенез регенерирующего хвоста тритона // Конференция «Морфогенез в индивидуальном и историческом развитии: устойчивость и вариабельность». М., 21-23 апреля, 2015 г. / Сборник тезисов. М. ОМТ ПИН РАН, 2015. 76 с. С. 55-56.

Раздел 6. Молекулярно-биологические аспекты развития стекловидного тела и окружающих его тканей глаза позвоночных.

Исполнители: Панова И.Г., Строева О.Г.

Введение.

Стекловидное тело (внеклеточный матрикс, расположенный между сетчаткой и хрусталиком) – самая объемная составляющая глаза – является одним из важнейших факторов, участвующих в регуляции морфогенеза и роста тканей глаза в раннем развитии. Создаваемое им внутриглазное давление осуществляет корреляцию соотношения структур глаза, характеризующихся разными скоростями роста и временем созревания, обеспечивает функциональное соответствие всех частей органа на протяжении онтогенеза. Помимо механической роли фактора натяжения, стекловидное тело, являясь внутриглазной средой, осуществляет транспорт сигнальных молекул между сетчаткой и хрусталиком, необходимых для роста, дифференцировки и функций этих структур глаза. Изучение молекул в составе стекловидного тела позволяет оценить их роль в раннем развитии глаза. В данной работе в стекловидном теле, сетчатке и хрусталике исследовали молекулы альбумина, альфа-фетопротеина и каротиноида лютеина.

Материал и методика.

Объектом исследования служил материал глаз, полученный от абортивных плодов с 12-й по 20-ю неделю гестации, а также аутопсийный материал, полученный при вскрытии мертвых плодов, нежизнеспособных после преждевременных родов по 31-ю неделю. Биологический материал получали из лицензированных учреждений Минздрава РФ, действующих в рамках законодательства Российской Федерации об охране здоровья граждан, и в соответствии с утвержденным перечнем медицинских показаний. Возраст плодов соответствует срокам, установленным врачом-акушером.

Альбумин и альфа-фетопротеин (АФП) исследовали в стекловидном теле, сетчатке и хрусталике. Стекловидное тело и гомогенаты сетчатки и хрусталика центрифугировали, отбирали супернатанты, которые использовали для измерения концентрации АФП и альбумина. Измерения АФП проводили с помощью иммуноферментной диагностической тест-системы «AFP Elecsys» (Швейцария). Измерения альбумина проводили с применением спектрально-флуоресцентных зондов ДЭЦ или СКК. Для обнаружения каротиноидов (лютеина) в стекловидном теле измеряли спектры поглощения нативного стекловидного тела. Измерения проводили на спектрофотометре UV-3101PC (Shimadzu Япония) в 1 мм кювете в диапазоне 300-600 нм. Содержание лютеина и его окисленных форм в стекловидном теле, сетчатке, хрусталике, пигментном эпителии сетчатки+сосудистая оболочка и цилиарном теле+радужка контролировали с помощью

хроматографического анализа (ВЭЖХ). Для ВЭЖХ на обращенной фазе был использован хроматограф производства фирмы Кнауер (Германия). Детектирование осуществляли по поглощению на спектрофотометрическом детекторе К-2501 на длине волны 430 нм. Разделение проводили путем линейного градиентного элюирования. В качестве контроля были использованы раствор лютеина (La Roche, Швейцария) и раствор окисленных форм лютеина в метаноле. Для получения окисленных форм лютеина раствор лютеина в метаноле облучали видимым светом.

Результаты

Концентрация альбумина в стекловидном теле, сетчатке и хрусталике глаз плодов человека представлена в таблице 1. В хрусталике на 14 неделе концентрация альбумина намного выше, чем на других сроках исследования – приблизительно в 4 раза по сравнению с 16, 17 и 18 неделями и в 2 раза по сравнению с 24 неделей. В сетчатке на 14 и на 24 неделях концентрация альбумина мало различается и в обоих случаях находится на низком уровне по сравнению с хрусталиком.

Таблица 1. Концентрация альбумина в стекловидном теле, сетчатке и хрусталике в пренатальном развитии глаза человека ($c \times 10^{-4}$ моль/л)

Возраст плодов, нед	Стекловидное тело	Сетчатка	Хрусталик
14	0.11	0.11	0.54
16	0.96	не анализировали	0.13
17	1.52, 1.29	не анализировали	0.13
18	1.2	не анализировали	0.11
24	0.76	0.069	0.26

Результаты ПЦР-анализа (рис. 12) показали, что мРНК к альбумину детектируется только в печени, в то время как в сетчатке и хрусталике не обнаруживается. Эти результаты свидетельствуют о том, что альбумин в процессе развития поступает в сетчатку и хрусталик извне. Одним из источников его поступления в сетчатку и хрусталик у плодов человека, по всей вероятности, является стекловидное тело, расположенное между ними, где в этот период исследования обнаружена высокая концентрация альбумина.

Физиологические функции альбумина в тканях глаза к настоящему времени находятся в стадии исследования и обсуждения. Такие свойства альбумина, как доставка макромолекул к тканям и органам, а также антиоксидантная функция, являются необходимыми для развития органов и тканей плодов человека, в том числе и глазных структур (Panova et al., 2015). Важным свойством альбумина является создание онкотического давления в жидких средах организма (Hankins, 2006). Повышенное содержание альбумина в стекловидном теле создает внутриглазное давление, которое является важным фактором общего роста глаза и морфогенеза его структур в период пренатального развития человека (Panova et al., 2015).










Ткани \ Гены	Сетчатка	Хрусталик	Печень
RPL 18s			
Alb			
AFP			

Рис. 12. Результаты ПЦР-анализа кДНК из тканей глаза и печени. Показано, что транскрипты гена альбумина (Alb) и альфа-фетопротеина (AFP) детектируются только в печени.

Концентрация АФП в стекловидном теле, сетчатке и хрусталике глаз плодов человека представлена в таблице 2. Между 14-й и 24-й неделями в стекловидном теле наблюдается высокая концентрация АФП. В сетчатке и хрусталике концентрация АФП на 1 или 2 порядка ниже, чем в стекловидном теле, но при этом имеет высокие значения до 24-й недели. На 31-й неделе наблюдается резкое снижение концентрации АФП, как в стекловидном теле, так и в хрусталике (сетчатку не измеряли), что согласуется с известной тенденцией уменьшения концентрации этого белка в общей циркуляции крови плода. Результаты ПЦР-анализа (рис. 12) показали, что мРНК к АФП детектируется только в печени (контроль), в то время как в сетчатке и хрусталике не обнаруживается.

Обнаруженная нами высокая концентрация АФП в стекловидном теле, сетчатке и хрусталике у плодов человека во втором семестре согласуется с представлением об участии АФП

в дифференцировке нейронов сетчатки и волокон хрусталика, как это было показано для центральной нервной системы и сетчатки у позвоночных животных.

Таблица 2. Концентрация АФП (МЕ/мл) в стекловидном теле, сетчатке и хрусталике в пренатальном развитии глаза человека («–» обозначает отсутствие измерений)

Возраст, недели (число плодов)	Стекловидное тело	Сетчатка	Хрусталик
14 (1)	2030600	–	–
16 (3)	1060600	–	2599
	– 186900	10078 41730	– 52218
18/19 (1)	498499	10825	3164
22 (1)	111700	–	2387
24 (2)	349200	30516	16892
	920600	54402	15018
31 (1)	5328	–	346

На мышах и крысах показано, что АФП с высокой степенью аффинности связывается с эстрогенами и, таким образом, участвует в регуляции половой дифференцировки мозга. Способность АФП связывать эстрогены позволяет предположить, что он защищает развивающийся плод от влияния материнских эстрогенов.

Изучено взаимодействие зонда ДЭЦ с сывороточными альбуминами различных представителей позвоночных животных (быка, крысы, кролика) в сравнении с сывороточным альбумином человека. Показано, что в системе «зонд ДЭЦ – сывороточный альбумин» проявляет высокую специфичность по отношению к альбумину человека, что, вероятно, объясняется

высокой эффективностью (энергией) связывания мономера ДЭЦ с альбумином человека. В случае других сывороточных альбуминов, по-видимому, эта энергия ниже, что дает возможность протекания конкурирующих процессов взаимодействия красителя с альбуминами. Полученные результаты важны для сравнительного исследования стекловидного тела разных представителей позвоночных и для исследования стекловидного тела в норме и патологии.

Разработанный нами спектрально-флуоресцентный зонд СКК использован для анализа воздействия различных лекарственных веществ на моделях увеитов. Определение содержания сывороточного альбумина в стекловидном теле кролика с помощью спектрально-флуоресцентного зонда – скварилиевого красителя СКК показало, что у интактных животных он обнаруживается в незначительных количествах, в то время как при экспериментальном увеите его содержание возрастает в 3000 раз. Супероксиддисмутаза (СОД), и дексаметазон достоверно снижают его содержание: СОД в 4.3 раза, дексаметазон – в 145 раз. Комбинация этих веществ снижает содержание альбумина в 30 раз. Данные свидетельствуют о том, что зонд СКК может быть успешно использован для сравнительного анализа лекарственного воздействия при лечении, по крайней мере, на различных моделях увеитов в условиях эксперимента.

В стекловидном теле в пренатальном глазу в отличие от глаза взрослого человека обнаружены каротиноиды (лютеин). Спектры поглощения нативного стекловидного тела и супернатантов стекловидного тела в пренатальном развитии представлены на рис. 13.

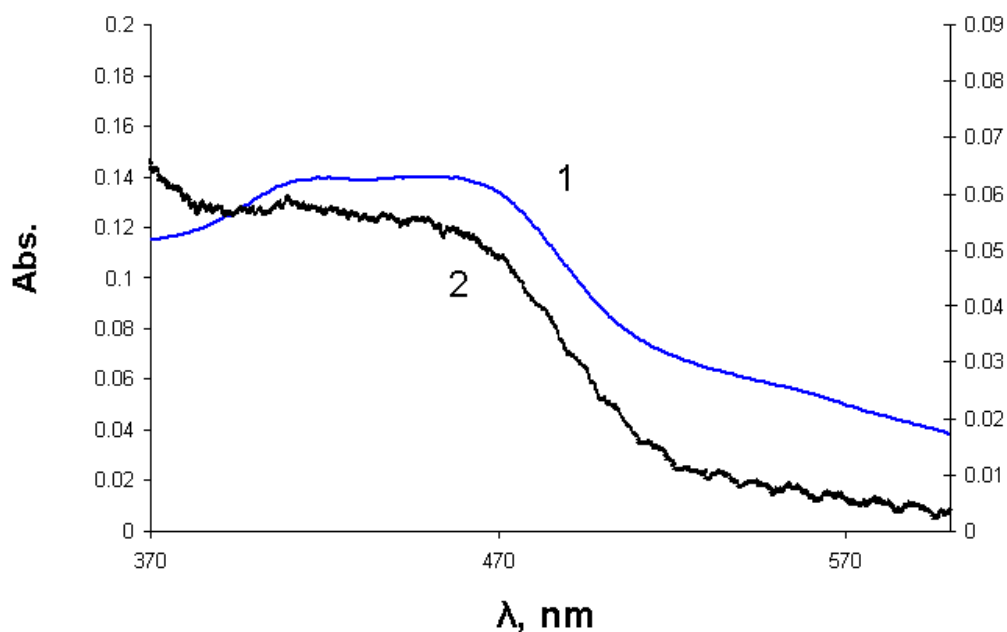


Рис. 13. Спектральная характеристика стекловидного тела глаза плодов человека на разных сроках гестации. 1 – спектры поглощения образцов нативного стекловидного тела, объединенных на сроках гестации 16–23 недель, 2 - спектры поглощения супернатанта стекловидного тела плодов человека на сроках гестации 16/18 недель.

Исследование методом ВЭЖХ хлороформных экстрактов из проб стекловидного тела, сетчатки и ретинального пигментного эпителия+сосудистая оболочка показало присутствие в них лютеина и окисленных форм лютеина. В пробах хрусталика и цилиарного тела+радужка были обнаружены только окисленные формы лютеина (рис. 14).

Лютеин и его окисленные формы, обнаруженный нами в тканях глаза человека в пренатальном развитии – это важные биологически активные молекулы, роль которых сводится не только к защите от окислительного стресса развивающихся тканей глаза человека (повреждающее действие света в утробе матери исключается), но и к активному участию в развитии сетчатки и хрусталика.

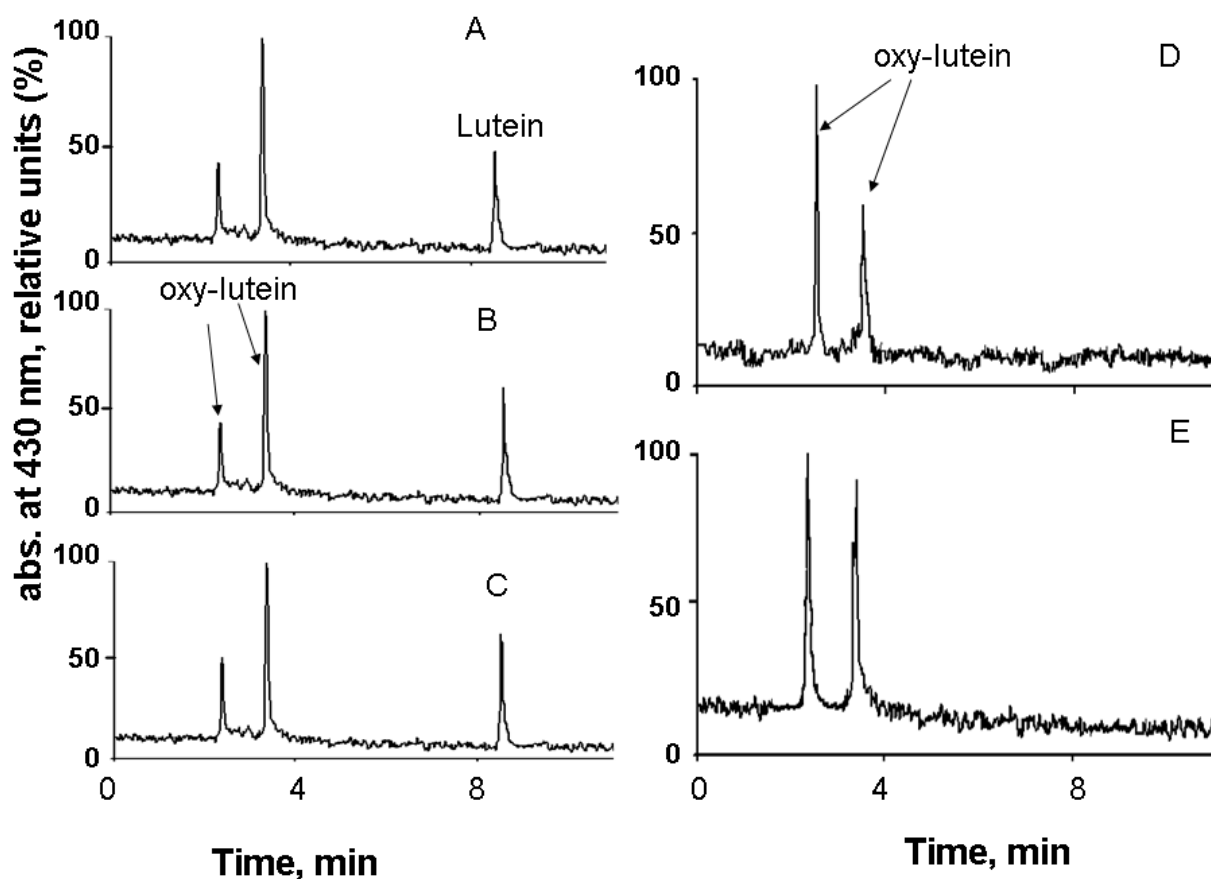


Рис. 14. Хроматограммы хлороформных экстрактов из различных тканей глаза человека на 24-й неделе пренатального развития. А – стекловидное тело, В – сетчатка, С – РПЭ+сосудистая оболочка, D – хрусталик, E – цилиарное тело+радужка. Детектирование по поглощению на длине волны 430 нм.

Таким образом, в исследуемый период наблюдается максимальное содержание альбумина и достаточно высокое содержание АФП, коррелирующие с ростом объема стекловидного тела и периодом интенсивного роста глазного яблока, а также высокое содержание лютеина, концентрация которого в стекловидном теле коррелирует с концентрацией альбумина. Высокая концентрация альбумина и АФП в стекловидном теле плодов человека, совпадающая с периодом интенсивного роста глаза, свидетельствует о том, что эти белки в пренатальном развитии являются частью молекулярной системы, которая обеспечивает онкотическое внутриглазное давление. Так как фактор натяжения, возникающего в стенках глаза под влиянием внутриглазного давления, является фактором нормального морфогенеза и согласованного роста всех частей глаза, правомерен вывод о важной морфогенетической роли альбумина и АФП в росте и нормальном формировании глаза человека в пренатальном развитии. Помимо создания онкотического давления альбумин и АФП играют важную роль в развитии структур глаза как белки-переносчики, поставляющие необходимые молекулярные компоненты для развивающейся сетчатки и хрусталика, в частности, полиненасыщенные жирные кислоты, необходимые для построения их клеточных мембран. Альбумин и АФП являются составной частью антиоксидантной системы, защищающей развивающийся глаз от окислительного стресса.

О важности роли лютеина в пренатальном развитии глаза человека свидетельствуют его функции. В частности: 1) Защита от окислительного стресса. В состав мембран активно пролиферирующих и дифференцирующихся клеток сетчатки, особенно фоторецепторных мембран зрительных клеток, а также волокон хрусталика, входят легко окисляющиеся полиненасыщенные жирные кислоты. В этот же период происходит регрессия гиалоидных сосудов и формирование definitiva кровеносной системы сетчатки. Присутствие кислорода создает опасность окислительного стресса. Каротиноиды – антиоксиданты и тушители синглетного кислорода. 2) Формирование и сохранение матрикса стекловидного тела. Лютеин ингибирует металлопротеиназы, которые разрушают внеклеточный матрикс. 3) Участие в дифференцировке макулы; предотвращение преждевременного старения сетчатки; участие в кислородном метаболизме бессосудистой фовеа – определяют бессосудистую область фовеа.

Итак, с применением полиметиновых красителей ДЭЦ и СКК в качестве спектрально-флуоресцентных зондов для сывороточных альбуминов человека и позвоночных животных было показано, что в системе «зонд ДЭЦ – сывороточный альбумин» ДЭЦ проявляет высокую

специфичность по отношению к альбумину человека, что, вероятно, объясняется высокой эффективностью (энергией) связывания мономера ДЭЦ с альбумином человека. В случае других сывороточных альбуминов, по-видимому, эта энергия ниже, что дает возможность протекания конкурирующих процессов взаимодействия красителя с альбуминами. Полученные результаты важны для сравнительного исследования стекловидного тела, сетчатки и хрусталика разных представителей позвоночных и для их исследования в норме и патологии. С применением иммуноферментной диагностической тест-системы «AFP Elecsys» проводили измерения альфа-фетопротеина (АФП) в стекловидном теле, сетчатке и хрусталике. Методами УФ-спектрофотометрии и ВЭЖХ обнаружено присутствие лютеина и окисленных форм лютеина в стекловидном теле, сетчатке и ретинальном пигментном эпителии+сосудистая оболочка и окисленных форм лютеина в хрусталике и цилиарном теле+радужка в пренатальном развитии человека.

Список публикаций по разделу 6:

1. Татиколов А.С., Панова И.Г. Спектрально-флуоресцентное изучение нековалентного взаимодействия мезо-замещенного цианинового красителя с сывороточными альбуминами. Химия высоких энергий. 2014. Т. 48. №. 2. С. 116-122.
2. Панова И.Г. Молекулярный состав стекловидного тела глаза позвоночных. Российский офтальмологический журнал. 2014. Т. 7 № 2. С. 98-102.
3. Панова И.Г., Татиколов А.С., Строева О.Г. Морфогенетическая роль альбумина стекловидного тела глаза человека в пренатальном развитии. «VII Российский общенациональный офтальмологический форум» (РООФ- 2014). Москва. Сборник статей. Т. 2. С. 626-629.
4. И.Г. Панова, А.С. Татиколов, О.Г. Строева. Функциональное значение альбумина и альфа-фетапротеина стекловидного тела глаза человека в пренатальном развитии. I Российский Конгресс с международным участием «Пролиферативный синдром в биологии и медицине» Москва, 27-28 ноября 2014 года. Сборник материалов. 2014. С. 12-17.
5. Панова И.Г., Строева О.Г. Роль каротиноидов в поддержании структуры и функции макулярной зоны глаза человека. VI Всероссийский семинар - "круглый стол" "макула" 2014. Ростов-на-Дону, 16-18 мая 2014 г. Тезисы докладов. С. 533-534.
6. Яковлева М.А., Панова И.Г., Татиколов А.С., Фельдман Т.Б., Островский М.А. / «Пренатальное развитие глаза человека. Обнаружение лютеина и его окисленных форм в тканях глаза». // XIV ежегодная международная молодежная конференция ИБХФ РАН-Вузы "Биохимическая физика" 28-30 октября 2014 г. Москва. С. 255-259.
7. Чеснокова Н.Б., Нероев В.В., Безнос О.В., Бейшенова Г.А., Панова И.Г., Татиколов А.С. Влияние инстилляций дексаметазона и супероксиддисмутазы на течение увеита и локальные биохимические процессы (экспериментальное исследование). Вестник офтальмологии. 2015. – Т. 131. № 3. С. 71-75.
8. Panova I.G., Tatikolov A.S., Stroeveva O.G. Albumins and carotenoids of the human fetal vitreous body and their morphogenetic role during midgestation. J. J. Ophthalmol. 2015, 1(2): 013. P. 1-9.
9. Панова И.Г., Татиколов А.С., Строева О.Г. Альбумин - полифункциональная молекула стекловидного тела глаза в пренатальном развитии человека. VII Российский симпозиум «Белки и пептиды». Материалы симпозиума. Новосибирск. 12-17 июля 2015 г. С. 309.
10. Панова И.Г., Татиколов А.С. Применение цианинового и скварилиевого красителей в качестве зондов для изучения альбуминов позвоночных. Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины: Материалы VI Междунар. науч.-практ. конф., г. Ростов-на-Дону, 1–3 октября 2015 г. Издательство Южного федерального университета, 2015. С. 119.

11. Панова И.Г., Татиколов А.С. Сывороточные альбумины различных представителей позвоночных: изучение с помощью спектрально-флуоресцентных зондов. V Съезд биофизиков России, Ростов-на-Дону, ЮФУ, 4-10 октября 2015 г. Материалы докладов, т. 2, с. 57.
12. Панова И.Г., Маркитантова Ю.В., Фирсова Н.В., Смирнова Ю.А., Зиновьева Р.Д. Исследование экспрессии сигнального белка *tgfbeta2* в пренатальном развитии глаза человека. Материалы симпозиума. «II Всероссийская конференция: Внутриклеточная сигнализация, транспорт, цитоскелет» 20-23 октября 2015. Санкт-Петербург. Цитология. Т. 57, № 9, 2015. С. 645-646.
13. Панова И.Г., А.С. Татиколов, Ю.А. Смирнова, Р.А. Полтавцева, Г.Т. Сухих. Альбумин в стекловидном теле, сетчатке и хрусталике глаза плодов человека. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2016. Т.162. № 11. С. 578-580.
14. Панова И.Г., А.С. Татиколов, Ю.А. Смирнова, Р.А. Полтавцева, Р.Д. Зиновьева, Г.Т. Сухих. Альбумин в тканях глаза плодов человека. Сборник материалов II Российского конгресса с международным участием «Пролиферативный синдром в биологии и медицине». Научное издание. Москва, 30 ноября – 2 декабря 2016 года. Издание ФГБОУ ВО «РНИМУ им. Н. И. Пирогова» Минздрава России, 2016. С. 54-57. ISBN 978-5-88458-332-0.
15. Панова И.Г., М.А. Яковлева, А.С. Татиколов, О.Г. Строева, Т.Б. Фельдман, Р.А. Полтавцева, Г.Т. Сухих, М.А. Островский. Дифференцировка центральной сетчатки: роль каротиноидов в структурной организации макулы глаза человека. Сборник материалов II Российского конгресса с международным участием «Пролиферативный синдром в биологии и медицине». Москва, 30 ноября – 2 декабря 2016 года. Издание ФГБОУ ВО «РНИМУ им. Н. И. Пирогова» Минздрава России, 2016. С. 58-61. ISBN 978-5-88458-332-0.
16. Панова И.Г., М.А. Яковлева, А.С. Татиколов, Т.Б. Фельдман, М.А. Островский. Пренатальное развитие глаза человека: значение каротиноидов стекловидного тела в морфогенезе макулы. VII Всероссийский с международным участием семинар – «круглый стол» «МАКУЛА». – 2016. Ростов-на-Дону. 20-22 мая 2016 г. С. 63-66.
17. Панова И.Г., Полтавцева Р.А., Татиколов А.С., Строева О.Г., Сухих Г.Т. Роль молекул стекловидного тела в пренатальном развитии глаза человека. Научная конференция с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии». Сборник научных трудов. Москва. 6-7 апреля 2016 г. С. 139-140.

Раздел 7. Молекулярные механизмы регенерации и канцерогенеза печени млекопитающих и человека

Ответственные исполнители: *Микаелян А.С., Зиневич Л.С. Дашенкова Н.О.*

Введение

Гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК) является одним из наиболее распространенных онкологических заболеваний человека, на долю которой ежегодно приходится более половины миллиона смертей во всем мире. Гепатоканцерогенез является сложным многоступенчатым процессом, и обусловлен нарушениями в молекулярных сигнальных каскадах, в результате которых происходит потеря контроля над дифференцировкой, пролиферацией, апоптозом и адгезионными функциями клеток. Инсулиноподобные факторы роста (IGF1 и IGF2) играют важную роль в регуляции клеточного роста и дифференцировки и могут иметь как аутокринное и паракринное, так и гормональное действие. Печень является основным поставщиком инсулиноподобных факторов роста для всего организма. Они необходимы для нормального внутриутробного развития и постнатального роста. Мыши с полным нокаутом по гену IGF1 погибают сразу после рождения. Показано, что при развитии некоторых опухолей (опухоль мозга, простаты и рака молочной железы) повышается уровень IGF1 в крови, однако уровень IGF1 в крови у больных раком печени понижен. Рецептор IGF1 является одной из мишеней для таргетной терапии рака. Исследования по разделу 7 были направлены на изучение механизмов регуляции IGF сигнального пути в гепатоцеллюлярной карциноме (ГЦК).

Материал и методы.

Моделями исследования являлись гепатоцеллюлярная карцинома и регенерация печени мыши. Объектом исследования служили мыши, получаемые из вивария ИБР РАН. Индукцию гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) мыши проводили с помощью однократной внутрибрюшинной инъекции диэтилнитрозамина (ДЭНА) в дозе 25 мг/кг веса 2-х недельным мышам линии C57Bl6. Экспериментальные мыши были разделены на несколько групп, отличающихся временем после инъекции мутагена: 4, 6, 8, 12 месяцев. Гистологический анализ образцов проводили по стандартному протоколу с окраской гематоксилином и эозином. Применяли методы полимеразной цепной реакции. Матричную РНК выделяли методом Trizagent из замороженных образцов печени. С помощью спектрофотометрии измеряли концентрацию и чистоту полученной РНК. Далее конструировали кДНК библиотеки с помощью обратной транскриптазы. Методом ПЦР с помощью Tag-полимеразы проверяли качество кДНК библиотек и размер продуктов. Праймеры подобраны так, что температура отжига составляет 60°C. Анализ

паттерна экспрессии мРНК генов *Igf-1R*, *Igfbp-1,-2,-3,-4,-5,-6,-7* проводился с помощью полуколичественного метода полимеразной цепной реакции в реальном времени с использованием интеркалирующего красителя ROX. Статистический анализ проводили в программе Statistica-6 по критерию Стюдента. В работе применяли также способы получения и культивирования первичных и клонированных культур клеток ГЦК.

Результаты

Исследования проводили на модели химически индуцированной ГЦК мыши с помощью диэтилнитрозамином. Стадии формирования опухолей подтверждались гистологическими исследованиями, продемонстрировавшими развитие: дисплазии (4 мес), дисплазии (6 мес), узелка (8 мес), опухолевой ткани (8 мес), опухолевой ткани (12 мес). Сравнения проводили с контрольной неповрежденной печенью, образцы которой по локализации соответствовали областям развития опухоли.

В результате проведенного белкового анализа рецептора *Igf-1R*, маркера ГЦК альфа-фетопротейна (АФП), альфа-тубулина и FoxO3 ткани опухоли, окружающей ее ткани на 12 месяцев после воздействия диэтилнитрозамина и здоровой печени мыши были получены следующие результаты. Фетальный белок АФП детектируется только в опухолевой ткани и не обнаруживается в окружающей опухоль ткани и в контрольной печени. АФП является одним из маркеров ГЦК у человека (.Sizaret P, et al., 1975). Проведенный нами анализ также показал значительное увеличение этого белка в ГЦК мыши. Транскрипционный фактор FoxO3, активность которого регулируется IGF1 зависимым путем, нами детектируется только в опухолевой ткани (рис. 15).

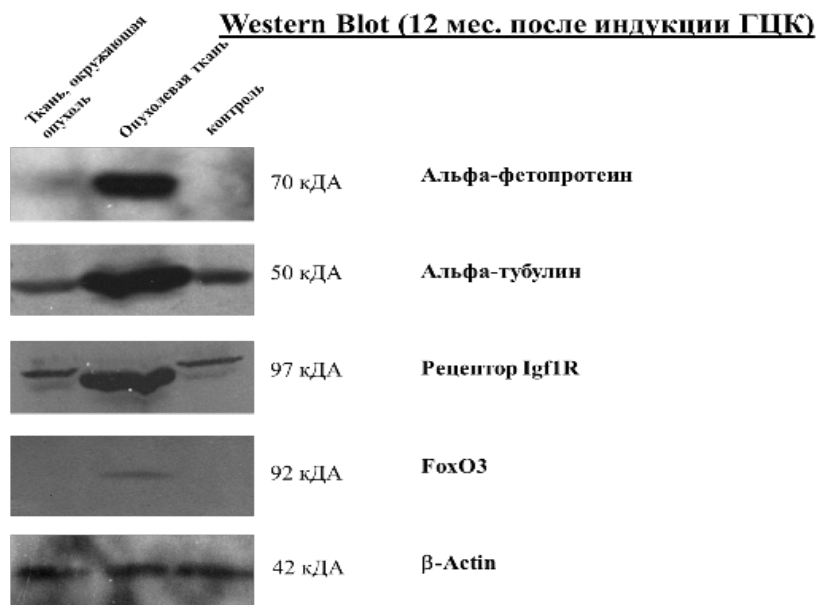


Рис. 15. Результаты Вестрен-блот анализа наличия рецептора Igf-1R, маркера ГЦК альфа-фетопротеина (АФП), альфа-тубулина и FoxO3 в опухолевой ткани, ткани, окружающей опухоль и в контрольной ткани печени мыши.

Также мы показали, что количество белка Igf1R рецептора значительно выше в опухолевой ткани по сравнению с контролем и с окружающей тканью. Анализ данных, полученных методом ПЦР в реальном времени, показал повышение экспрессии мРНК гена Igf1R в опухолевой и окружающей ее ткани по сравнению с контролем, причем в опухоли выше, чем в окружающей ее ткани.

Наши данные по экспрессии IGFbp1 показывают возрастание уровня Igfbp1 в образцах ГЦК, начиная с 8 месяцев после воздействия ДЭНА по сравнению с аденомой и контрольной тканью печени (рис. 16). По литературным данным, в работах проведенных на клеточных линиях гепатомы HepG2 возрастание экспрессии Igfbp1 ассоциируется с гипоксией (Tazuke, 1998), которая в свою очередь может опосредовано активировать экспрессию Igfbp1.

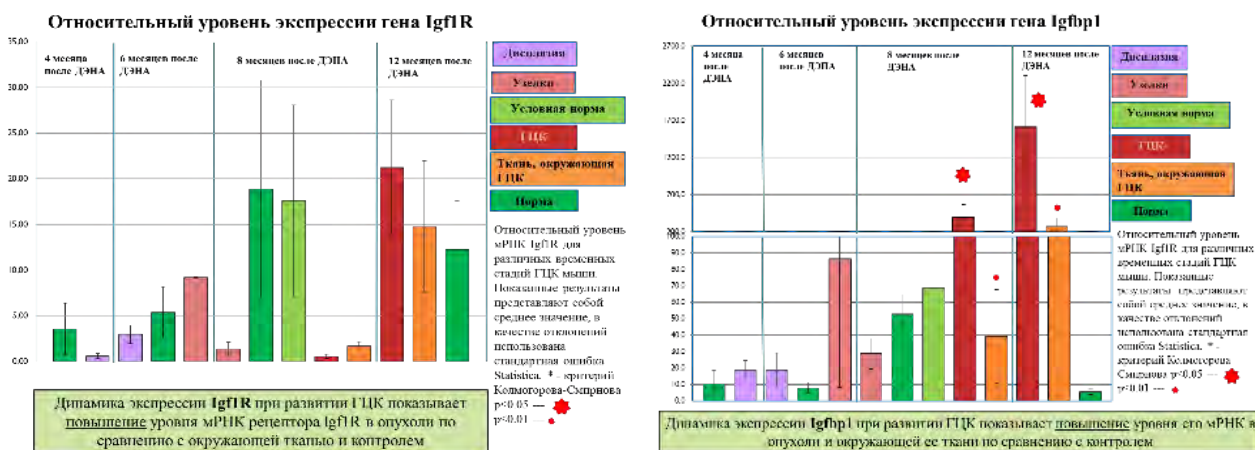


Рис. 16. Относительный уровень экспрессии гена рецептора Igf1R в ГЦК, окружающей опухоль ткани и в контроле

Показано также достоверное возрастание экспрессии Igfbp2 в опухоли по сравнению с контролем и окружающей опухоль тканью на 8-й месяц после воздействия ДЭНА. Однако на 12-й месяц уровень его значительно падает, тогда, как в окружающей опухоль ткани уровень Igfbp2 остается неизменным или возрастает незначительно. Известно, что активация Igfbp2 стимулирует экспрессию теломеразы (Moore et al, 2003), что может способствовать увеличению выживаемости опухолевых клеток. Экспрессия гена Igfbp3 в ГЦК при сравнение с окружающей опухоль тканью и контрольными образцами на 8-й месяц опухолевого роста понижена (рис.17). Заметное возрастание Igfbp3 наблюдается на 12-й месяц, а уровень его экспрессии в окружающей опухоль ткани не отличается от контроля. Понижение экспрессии Igfbp3 также наблюдается и в ГЦК человека (Chung et al, 2002).

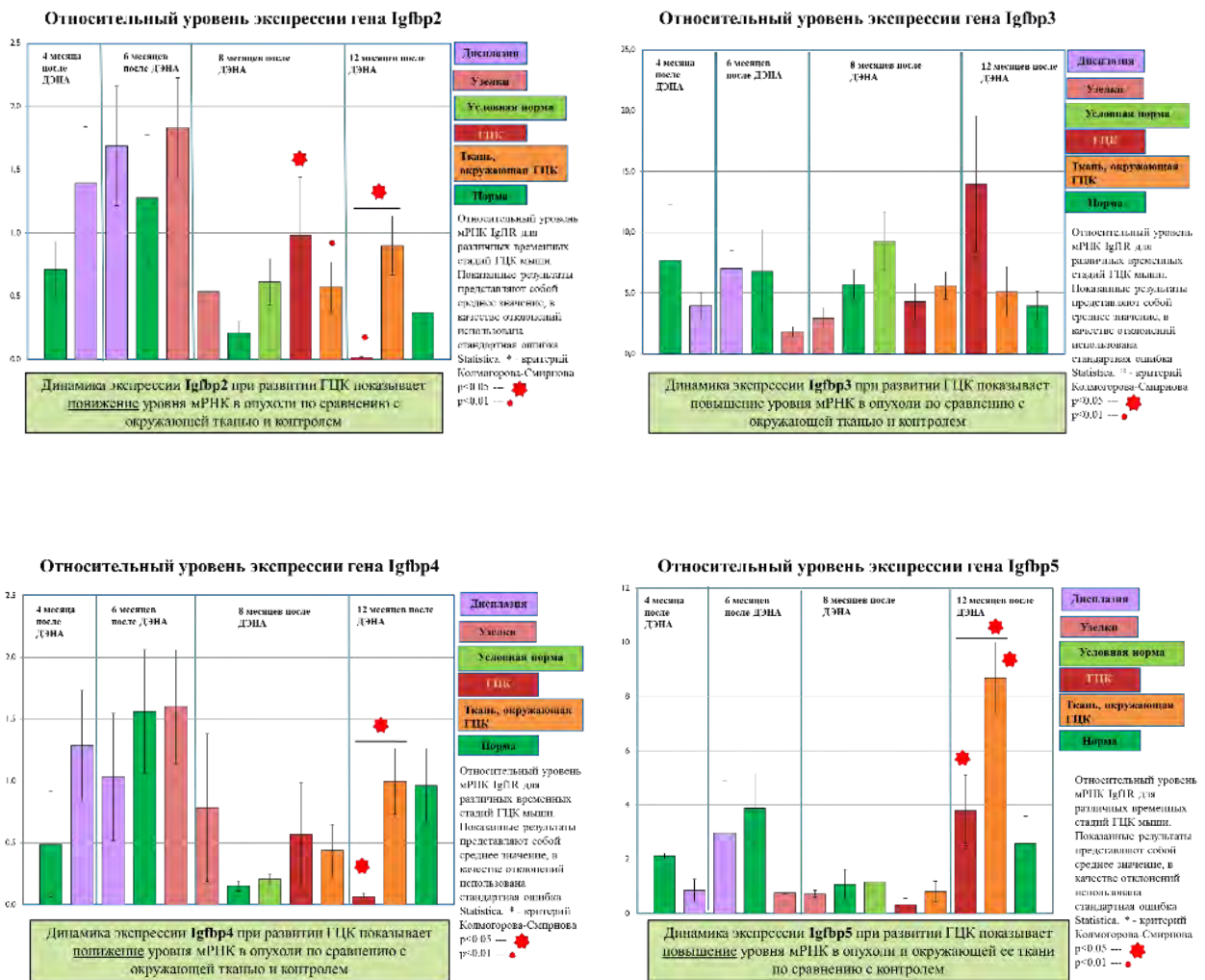


Рис. 17. Относительный уровень экспрессии генов рецепторов Igfbp2,3,4,5 в ГЦК, окружающей опухоль ткани и в контроле

Igfbp4 расценивается как анти-ангиогенезный и анти-опухолевый белок (Moreno et al, 2006). Мы наблюдаем достоверное его снижение на 12-й месяц после воздействия ДЭНА. Однако на 8-й месяц опухолевого роста наблюдается тенденция к росту уровня мРНК Igfbp4 по сравнению с окружающей опухоль тканью и контрольной печенью. Уровень экспрессии Igfbp5, Igfbp6 и Igfbp7 незначительно возрастают на 12-й месяц развития онкогенеза печени. Значительный их рост наблюдается на тех же сроках и в ткани, окружающей опухоль (рис. 18).

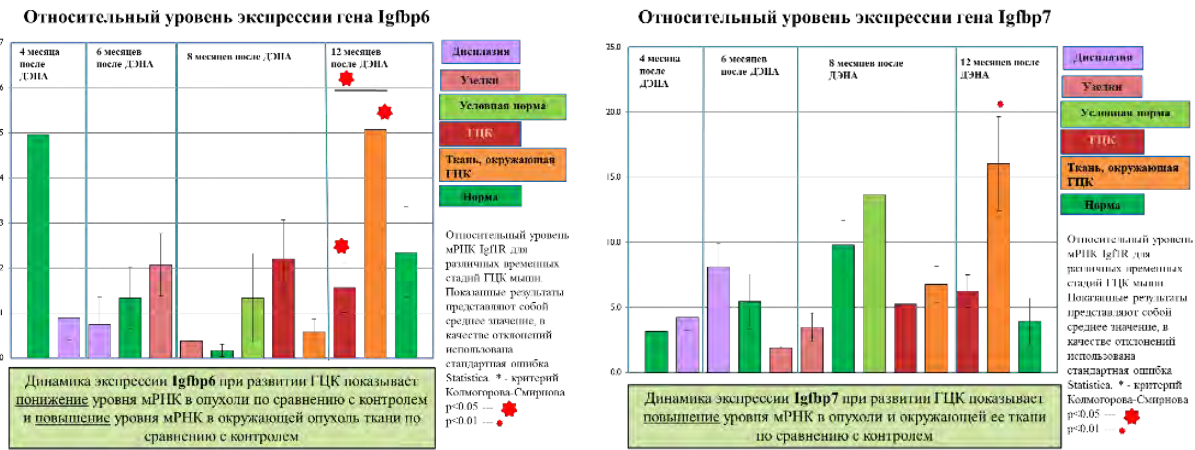


Рис. 18. Относительный уровень экспрессии генов рецепторов Igfbp6,7 в ГЦК, окружающей опухоль ткани и в контроле

В рамках данного раздела темы была дана также сравнительная молекулярно-генетическая характеристика первичных клеточных линий и ткани гепатокарциномы мыши. Известно, что ткань многих солидных опухолей, в том числе ГЦК, гетерогенна и представлена различными клеточными популяциями, происходящими из разных клеток-предшественников, т.н. «стволовых клеток рака». Из первичной культуры гепатокарциномы мыши были получены 11 клональных клеточных культур, три из них - методом «single cell cloning» (рис. 19). Была дана их морфологическая и молекулярная характеристики в сравнении с таковыми для клеток химически индуцированной ГЦК. Все культуры были охарактеризованы методом Вестерн-блот по наличию белка альфа-фетопротеина, а также методом ПЦР в реальном времени - по экспрессии генов CD44, Cdh1, Cdh2, Ctnnb1, и некоторых генов Igf-1 регуляторного пути - Igf-1, Igf-1R, Igfbp-1, Igfbp-2.

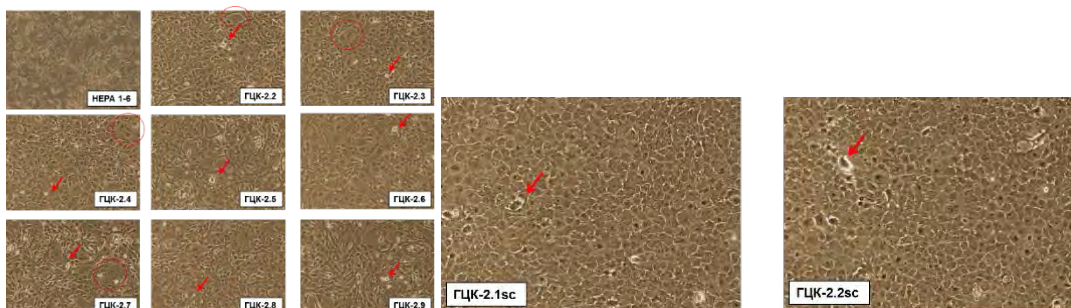


Рис. 19. Культивированные линии клеток гепатоцеллюлярной карциномы.

Выделенные субклоны состояли из эпителиоподобных клеток, обладающих повышенной пролиферативной активностью. Альфа-фетопротеин (маркер опухолевых клеток ГЦК) и

повышенный уровень мРНК гена *CD44* (маркера стволовых клеток рака) выявлены во всех клональных культурах, а также в ткани опухоли. Изучение экспрессии компонентов IGF регуляторного пути в культурах ГЦК обнаружило повышение для *Igfbp-3* и понижение для *Igf-1R* и *Igfbp-5* относительно этих показателей для ткани здоровой печени. Эти данные сходны с результатами изучения экспрессии генов в опухолевой ткани на ранних сроках развития ГЦК (рис. 20). При сравнении трех культур, полученных методом single cell cloning, с другими клеточными линиями и тканью опухоли в двух линиях экспрессия *Igf-1* и *Igfbp-2* была повышена, а *Igfbp-1* - понижена.

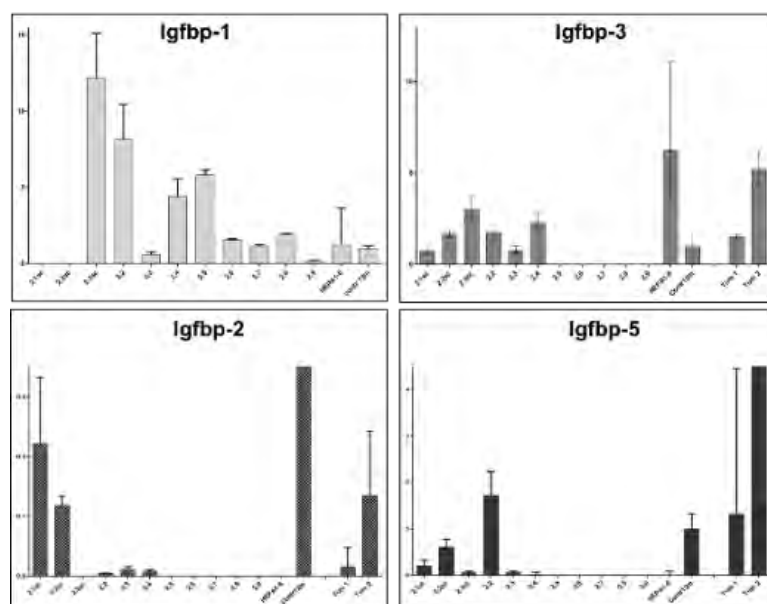


Рис. 20. Экспрессии компонентов IGF регуляторного пути в культурах клеток ГЦК.

Проведенный нами кластерный анализ всех данных, полученных по исследуемым генам в клеточных линиях, продемонстрировал как сходства, так и различия в клеточных популяциях. Все клеточные линии разделились на три суб-кластера, каждый из которых отражает степень злокачественности полученных клеточных линий (рис.21).

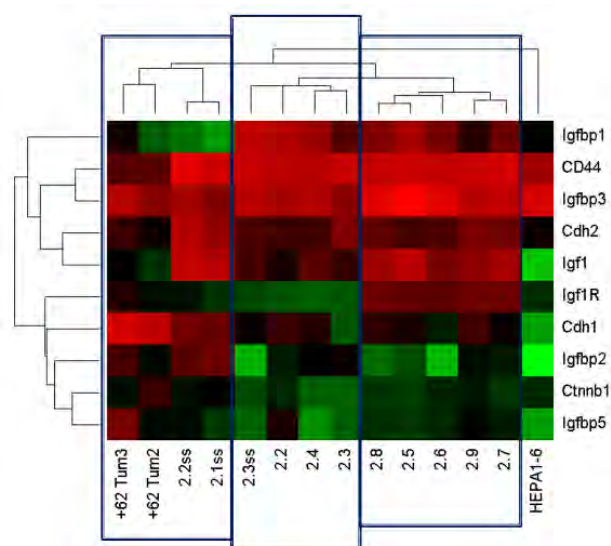


Рис. 21. Кластерный анализ данных по исследуемым генам в клеточных линиях ГЦК.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что клональные клеточные культуры ГЦК во многом сохраняют молекулярный паттерн, характерный для опухоли *in vivo*. В то же время отличия некоторых первичных культур от прочих линий и ткани ГЦК отражают гетерогенную структуру опухоли и позволяют выявить более и менее злокачественные клоны. Работа по данному разделу необходима для понимания характера опухолей ГЦК, их гетерогенности, сходства и особенностей, т.е. дают информацию, крайне важную для разработки способов терапевтического воздействия на этот вид злокачественных опухолей.

Раздел 8. Регуляторные механизмы клеточного цикла гепатоцитов при регенерации печени.

Введение.

В работе по разделу 8 была изучена экспрессия белка Ki67 в клетках печени мыши при регенерации. Ядерный белок Ki-67 синтезируется только в пролиферирующих клетках. Экспрессия гена Ki-67 может быть выявлена в течение всех фаз митотического цикла. В то же время в фазе пролиферативного покоя - G0 - белок Ki-67 не определяется. Клетки опухолей, а также клеточных линий в культуре *in vitro*, представляют собой популяции непрерывно циклирующих клеток. После очередного митоза клетки таких популяций вступают в G1 фазу следующего митотического цикла (переход M/G1). Дифференцированные функционирующие клетки многих тканей в организме пребывают в состоянии пролиферативного покоя (G0), но, получив сигнал к делению, могут перейти в фазу G1 клеточного цикла (переход G0/G1). Модели регенерации печени после частичной резекции или химического повреждения ткани охватывают все фазы клеточного цикла, включая переходы: G0/G1, G1, S, G2, M, M/G0.

Материал и методы.

В настоящем исследовании использованы стандартные модели регенерации печени мыши: частичная резекция 70% массы ткани, интоксикация четыреххлористым углеродом и массивное поражение ткани печени при сочетании действия гепатотоксина с последующей частичной резекцией. Изучение экспрессии маркера пролиферации Ki67 проводилось на срезах поврежденной и нормальной печени с помощью методов иммуноцитохимии с использованием анти Ki67 – ДАБ меченых антител. Визуализация изображений и снятие сигнала проводились при разных разрешениях микроскопа, оснащенного компьютерной приставкой. Экспрессию гепатоцитами маркерного белка Ki67 и включение BrdU в фазе репликации ДНК выявляли также иммуногистохимически.

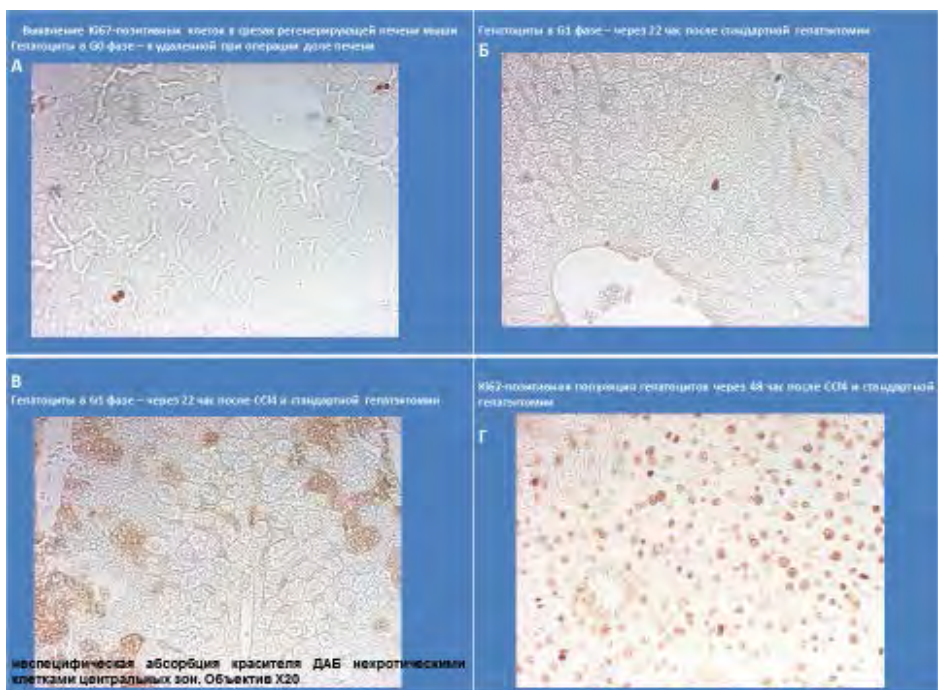


Рис. 22. Выявление Ki67 позитивных, единичных клеток в регенерирующей печени мыши через 22 часа после стандартной гепатэктомии (А,Б,В) и массовое включение маркера через 48 часов после затравки CCl4 и стандартной гепатэктомии (Г).

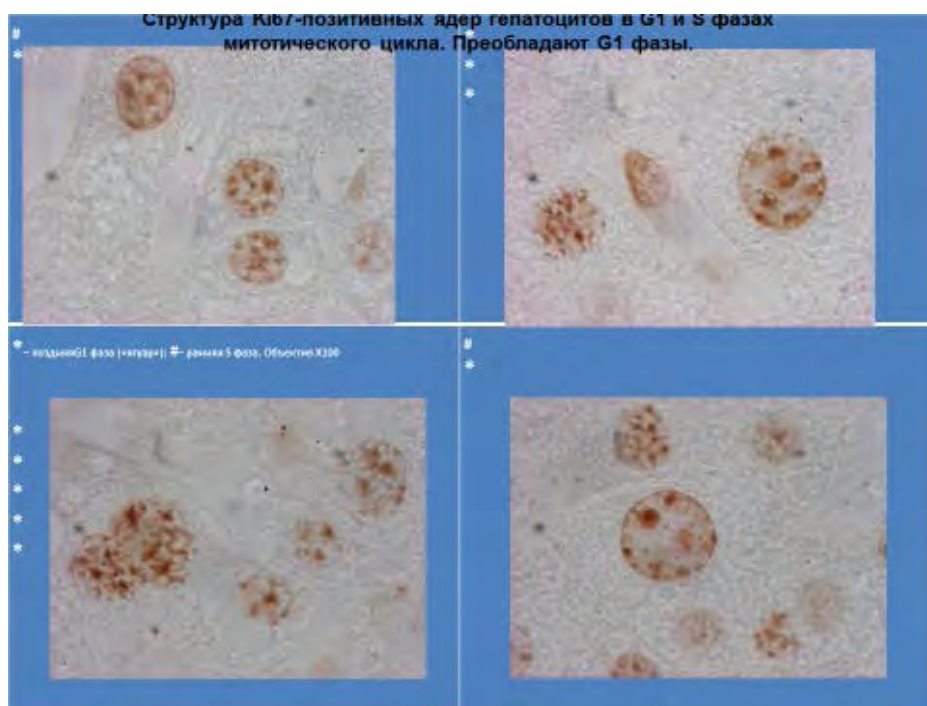


Рис. 23. Структура Ki67 позитивных ядер гепатоцитов в G1 и S – фазах митотического цикла. На рисунке видно преобладание клеток в фазе G1 (слева) над числом клеток в фазе S (справа) через 48 часов регенерации.

Ни в одной из перечисленных моделей методом иммуногистохимии белок Ki-67 практически не был выявлен в гепатоцитах в течение первых суток (через 22-24 ч) после индукции регенерации, вплоть до начала репликации ДНК. При этом Ki-67 включение наблюдалось в ядрах клеток воспаления и стромы печени, в данном случае служивших позитивным контролем иммунореакции.

Параллельно на всех этапах клеточного цикла был осуществлен анализ паттерна экспрессии генов клеточного цикла – циклинов D1, E, B - и белка Ki67. Первые результаты показали существование корреляции экспрессии Ki67 с синтезом ДНК, а также с экспрессией циклина D1 на всех фазах клеточного цикла, в том числе и G1 периоде. Методом ПЦР в реальном времени до начала фазы S в ткани печени выявлялась лишь слабая экспрессия гена Ki-67, в то время как экспрессия циклина D, определяющего начало активации митотического цикла, регистрировалась уже через 8 час, а циклина E (переход от G1 к S) к 24 час регенерации (рис. 23). Полученные данные по синтезу Ki-67 и экспрессии циклинов D и E четко коррелировали с включением гепатоцитами аналога тимидина - бромдезоксисуридина (BrdU) в начале фазы репликации ДНК.

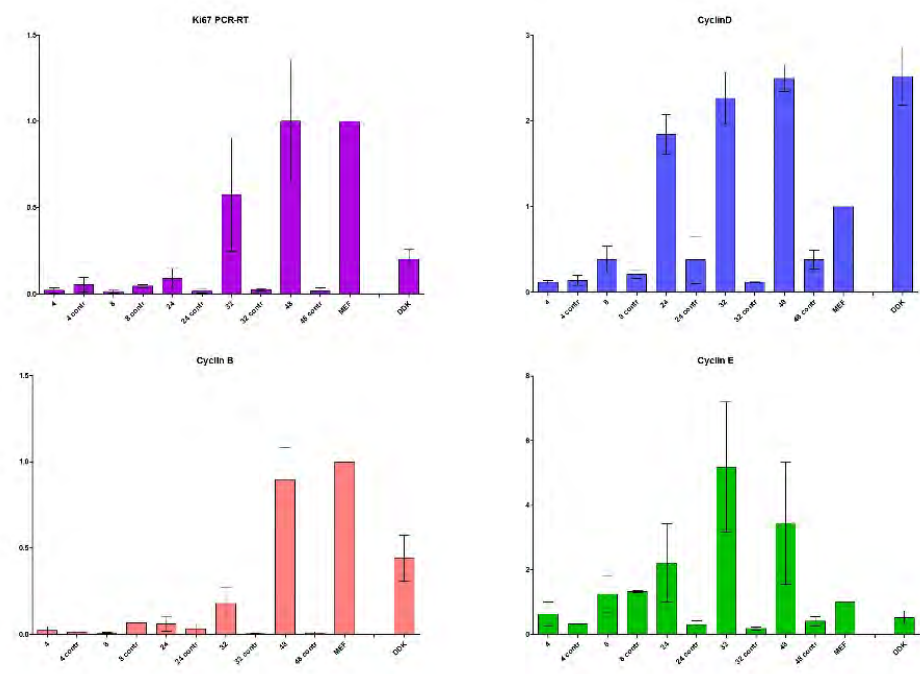


Рис. 23. Паттерн экспрессии генов клеточного цикла – циклинов D1, E, B, а также белка Ki67.

Современный уровень изучения индуцированной пролиферации основан на открытии у человека и других позвоночных нового класса генов, контролирующих переход G1/G0, т.е. выход клеток из состояния покоя G0 и вступление в фазу G1 пролиферативного цикла. Установлено, что в таких метаболически активных тканях как жировая ткань, кровь и клетки иммунной системы, при активации пролиферации происходит переключение путей выработки энергии. Продукция энергии путем окислительного фосфорилирования (АТФ митохондрий) переключается на пути использования глюкозы. Можно предполагать, что нетипичная экспрессия Ki67 в первом после перехода G0/G1 пролиферативном цикле гепатоцитов связана с генетически регулируемой перестройкой метаболизма и путей выработки энергии, необходимой для обеспечения при регенерации печени одновременно пролиферации и функции клеток органа.

Данные этого раздела работы, использующего модели повреждений и последующего восстановления печени при участии клеточной пролиферации, включая анализ всех фаз клеточного цикла, позволили приблизиться к пониманию особенностей экспрессии белка Ki67 и связь ее с таковой других регуляторов митотического цикла. Эта детализация необходима для понимания способов управления пролиферативными процессами при регенерации ткани после повреждения.

Публикации по разделам 7-8

1. Зиневич Л.С., Гончарова Н. О., Урываева И. В., Делоне Г. В., Микаелян А. С. Эксперсия Igf-1 и его изоформы в гепатоклеточных опухолях и окружающей их ткани при канцерогенезе печени мышей, индуцированном диэтилнитрозамином // 2013. Известия РАН. Серия биологическая, № 6, С: 673–681.
2. Гончарова Н.О., Зиневич Л.С. Изоформы гена Igf-1 в гепатоцеллюлярной карциноме у мышей // 2013. М: МАКС Пресс, XX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов», С.11-12.
3. Гончарова Н.О., Зиневич Л.С. Микаелян А.С. IGF-1 регуляторный путь в органогенезе печени мыши и канцерогенезе // 2013. Тезисы докладов 16 школы-конференции "Актуальные проблемы биологии развития" и IX конференции молодых ученых Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, С: 16-18.
4. Ильина, И. В., Овчинников, А. В., Чефонов, О. В., Ситников, Д. С., Агранат, М. Б., & Микаелян, А. С. Бесконтактная микрохирургия клеточных мембран с помощью фемтосекундных лазерных импульсов для оптоинъекции в клетки заданных веществ. Квантовая электроника, 2013. Т. 43. N4. С. 365-369.
5. Ilna, I. V., Ovchinnikov, A. V., Sitnikov, D. S., Chefonov, O. V., Agranat, M. B., & Mikaelyan, A. S. (2013, May). Noncontact microsurgery of living cell membrane using femtosecond laser pulses. In European Conference on Biomedical Optics (p. 88030A). Optical Society of America.
6. Гончарова Н.О. Локальная экспрессия Igf-связывающих белков в процессе развития химически индуцированной гепатоцеллюлярной карциномы мыши // 2014. М.: МАКС Пресс, Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2014», С: 342-343.
7. Дашенкова Н.О. Экспрессия внеклеточных регуляторов инсулиноподобного фактора роста (Igf-1) при развитии гепатоцеллюлярной карциномы мыши // 2014. Тезисы докладов X школы-конференции молодых ученых Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, С: 19-20.
8. Дашенкова Н.О. Воздействие генов Igf-1 регуляторного пути на рост и прогрессию химически индуцированной гепатоцеллюлярной карциномы у мышей // 2015. М: МАКС Пресс, XXII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов», С.14-15.

9. Урываева И.В., Делоне Г.В., Маршак Т.Л., Дашенкова Н.О., Микаелян А.С. Хромотриписис под микроскопом: случаи локальной фрагментации хромосом при канцерогенезе // 2015. Материалы международной конференции «Хромосома-2015», стр.165-166.
10. Дашенкова Н.О., А.С. Микаелян. Распределение экспрессии генов-участников сигнального пути Igf-1 при развитии химически индуцированной гепатоцеллюлярной карциномы у мыши // 2015. Материалы II Международной научной конференции «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы», г. Минск, Беларусь, С. 29.
11. Урываева И.В., Г.В. Делоне, Т.Л. Маршак, Н.О. Дашенкова, А.С. Микаелян. Хромотриписис и микроядерные аберрации в клетках печени при гепатоканцерогенезе // 2015. Материалы II Международной научной конференции «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы», г. Минск, Беларусь, С. 47.
12. Dashenkova N., A. Mikaelyan. Analys of Igf axis in development of HCC // 2015. European Journal of Cancer Supplements, Volume 13, Issue 1, November 2015, P. 11–12.
13. Kopantseva, M. R., Usova, E., Mikaelyan, A., Kostina, M., Melekhina, O., Egorov, V., & Kopantzev, E. P. Effect of IGF1 on cancer and stromal cells of human pancreatic tumors. 2015. Cancer Research Supplement, V. 75, N 15, P.
- 14 . Урываева И.В., Делоне Г.В., Дашенкова Н.О., Риппа А.Л., Микаелян А.С., Воротеляк Е.А. Переход G0/G1 клеточного цикла гепатоцитов при регенерации печени не индуцирует экспрессию белка Ki-67 – важной молекулярной мишени в диагностике рака // 2016. Сборник научных трудов научной конференции «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии», стр.183-184.
- 15 Дашенкова Н.О. Молекулярно-морфологическая характеристика клональных клеточных культур гепатоцеллюлярной карциномы мыши // 2016. Москва: Товарищество научных изданий КМК, XXIII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов», тезисы докладов, стр.36-37.
- 16 Дашенкова Н. О., Цитрина А. А., Микаелян А. С. Исследование экспрессии генов-регуляторов гиалуронана в клональных клеточных культурах опухоли гепатоцеллюлярной карциномы // 2016. Медицинский академический журнал, официальное издание северо-западного отделения медицинских наук, том 16 №3, ISSN 1608-4101, стр. 325-328.
- 17 Дашенкова Н.О. Исследование вклада отдельных клонов гепатоцеллюлярной карциномы в прогрессию опухоли // 2016. Тезисы докладов XVII школы-конференции с международным участием «Актуальные проблемы биологии развития», стр. 16-17.

- 18** Дашенкова Н.О., Микаелян А.С.. Исследование клональных клеточных культур, выделенных из опухолевой ткани ГЦК мыши, на маркеры эпителио-мезенхимного перехода // 2016. III Международная конференция «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы», стр. 23.

Заключение. С использованием различных моделей *in vivo* и *in vitro* (ткани глаза: сетчатка, ее пигментированный эпителий, хрусталик и стекловидное тело, а также мозг и печень позвоночных животных) изучены молекулярные механизмы развития, регенерации и канцерогенеза. Методами иммуноцитохимии и молекулярной биологии определены компоненты сигнальных путей, а также регуляторные гены и белки, ассоциированные с этапами развития тканей, нанесенным повреждением, регенерацией, репарацией, а также злокачественным ростом и апоптозом. Изучены фенотипические изменения клеток, трансплантированных в мозг млекопитающих, изменения развития хрусталика у мышей, нокаутных по интегринам. Выявлены механизмы, контролирующие клеточные и молекулярные изменения в ходе морфогенеза регенерирующего хвоста у амфибий и нейрогенеза у мышей под действием внешних и физиологических факторов. Изучен ряд компонентов стекловидного тела человека, принципиальных для нормального развития. Исследованы сигнальные пути, участвующие в канцерогенезе печени мыши и белки пролиферации клеток поврежденной и регенерирующей печени. Таким образом, в рамках темы № 6 в 2014-2016 г.г. с помощью клеточных и молекулярно-генетических методов был выполнен широкий, разносторонний фронт работ на различных биологических моделях *in vivo* и *in vitro*, направленный на понимание регуляторных механизмов развития тканей, их регенерации и канцерогенеза.

Отчет твержден Ученым советом ИБР РАН 27 декабря 2016 г., протокол № 14