



Форма направления реферативно-библиографических сведений  
о результатах научно-исследовательской, опытно-конструкторской и  
технологической работы

I. Сведения о НИОКТР

Номер государственного учета НИОКТР

Дата постановки НИОКТР на учет

AAAA-A19-119040290079-0	02/04/2019
-------------------------	------------

Наименование НИОКТР

-Клеточные и молекулярные механизмы развития и регенерации тканей и органов у низших и высших позвоночных. Поиск способов регуляции восстановительных процессов

Руководитель НИОКТР

Фамилия, Инициалы

Ученая степень

Ученое звание

Маркитантова Ю.В.,	Кандидат биологических наук	Не указано
--------------------	-----------------------------	------------

II. Сведения об отчете

Номер государственного учета отчета

Дата постановки отчета на учет

AAAA-B20-220032090134-8	20/03/2020
-------------------------	------------

Наименование отчета

КЛЕТОЧНЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ И РЕГЕНЕРАЦИИ ТКАНЕЙ И ОРГАНОВ У НИЗШИХ И ВЫСШИХ ПОЗВОНОЧНЫХ. ПОИСК СПОСОБОВ РЕГУЛЯЦИИ ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ по Разделу № 50 «Биология развития и эволюция живых систем» Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 гг.  
(заключительный отчет)

Тематическая(-ие) рубрика(-и)

Индекс УДК

34.03.37; 62.33.31; 34.51.15	57.017.35
------------------------------	-----------

Коды международной классификации отраслей наук

01.00.00
----------

Дата утверждения отчета

27/12/2019

Кол-во книг (томов)

1

Общее кол-во страниц

78

Номера книг (томов)/Кол-во страниц

1/78	2/0	3/0	4/0	5/0	6/0	7/0	8/0	9/0	10/0	11/0	12/0	13/0	14/0	15/0	16/0	17/0	18/0	19/0	20/0
------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

Приложений

0

Таблиц

2

Иллюстраций

13

Библиография

115

Публикаций по результатам НИОКТР

5

Фамилия, инициалы

Должность

СНИЛС

Подпись

Руководитель организации-исполнителя

Васильев А. В.	Директор	00133521977	
----------------	----------	-------------	--



Место для печати

ФГАНУ «Центр информационных технологий  
и систем органов исполнительной власти»  
Зарегистрировано в государственном  
информационном фонде неопубликованных  
документов

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ ИМ. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН  
(ИБР РАН)

УДК 576.5

Рег. № ГЗ 0108-2019-0005

Рег. № НИОКТР АААА-А19-119040290079-0

УТВЕРЖДАЮ  
Директор ИБР РАН  
доктор биологических наук,  
член-корреспондент РАН  
А.В. Васильев  
«27» декабря 2019 г.



ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

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

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

(заключительный отчет)

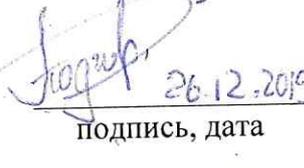
Руководитель НИР,  
главный научный сотрудник  
кандидат биологических наук

  
26.12.2019  
подпись, дата

Ю.В. Маркитантова

Москва 2019

## СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель, главный научный сотрудник, кандидат биологических наук	 подпись, дата	Ю.В. Маркитантова, (раздел 1,3) 26.12.2019
Исполнители: главный научный сотрудник, доктор биологических наук	 подпись, дата	Э.Н. Григорян (раздел 1, 3) 26.12.2019
Ведущий научный сотрудник, доктор биологических наук	 подпись, дата	И.Г. Панова (раздел 1) 26.12.2019
Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук	 подпись, дата	В.Н. Сими́рский (раздел 1) 28.12.19
Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук	 подпись, дата	А.С. Микаелян (раздел 2) 26.12.19
Научный сотрудник, кандидат биологических наук	 подпись, дата	Е.А. Радугина (раздел 3) 27-12-19
Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук	 подпись, дата	О.В. Подгорный (раздел 4) 26.12.2019
Нормоконтроль, ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук	 подпись, дата	Е.Б. Абрамова 26.12.2019

## РЕФЕРАТ

Отчет 78 с., 13 рис., 2 табл., 115 источников, 5 отчетных публикаций

РЕГЕНЕРАЦИЯ, НЕЙРОГЕНЕЗ, КАНЦЕРОГЕНЕЗ, ПРОГЕНИТОРЫ, ДИФФЕРЕНЦИРОВКА, ПЛАСТИЧНОСТЬ, СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ, ФАКТОРЫ ТРАНСКРИПЦИИ

Цель работы – разработка стратегий использования эндогенного резерва и регуляции дифференцировки клеток при регенерации тканей глаза, мышц, в процессах нейрогенеза и канцерогенеза. В работе использовали методы: ПЦР реального времени, иммунохимии, Вестерн-блот, флуоресцентного мечения, морфометрии, биоинформатики, транскриптомики.

Модели: 1) репрограммирование клеток РПЭ *in vivo* при регенерации сетчатки (хвостатые амфибии), сетчатка, РПЭ 3D-*in vitro*; латентные прогениторы регенерации сетчатки *in vitro* (млекопитающие); ткани глаза в развитии; 2) нейрогенеза; 3) фиброза, регенерации и канцерогенеза печени *in vivo* и *in vitro* (млекопитающие).

Изучены мишени регуляторных белков, экспрессия факторов транскрипции в процессах активации конверсии РПЭ, стимуляции пролиферации и поддержании мультипотентного состояния клеток при регенерации сетчатки у хвостатых амфибий. Выявлена роль сигнальных белков в регуляции дедифференцировки и пролиферации клеток РПЭ, также необходимых для стабилизации их дифференцированного состояния. Определена роль эндогенного и экзогенного Fgf2 в стимуляции пролиферации клеток на моделях регенерации нейральных тканей глаза. Обнаружено влияние кондиционированных сред из регенератов нейральной ткани глаза тритона на пластичность клеток линии ARPE-19 человека *in vitro* на клеточном и геномном уровне. Выявлена ткане- и таксон специфическая активность генов семейства Pitx и их изоформ хвостатых амфибий. Обнаружено разнообразие способов восстановления сетчатки, при сходстве экспрессии генов. Обобщены данные исследований моделей регенерации тканей низших позвоночных, основным источником которой являются клетки со свойствами «стволовости» (stem-like cells (SLCs)). Получены данные о потенциальных молекулярных механизмах зависимых от силы гравитации изменений поведения SLCs, сигнальных путях FGF2 и HSPs. Выявлена специфичность карбоцианиновых зондов для анализа внеклеточного матрикса (ВКМ) при регенерации и патологии тканей. Изучена экспрессия сигнальных путей и мишеней, влияние локального микроокружения в развитии рака печени и поджелудочной железы млекопитающих. Определен потенциал и возможности использования СК гиппокампа, что необходимо для оценки действия регулирующих их активность пронейрогенных факторов. Результаты исследований способствуют

разработке эффективных способов коррекции нарушений нейрогенеза при патологиях, стимуляции регенерации тканей у млекопитающих.

## СОДЕРЖАНИЕ

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	6
ВВЕДЕНИЕ	7
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	10
РАЗДЕЛ 1. КЛЕТОЧНЫЕ, МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ И РЕГЕНЕРАЦИИ ТКАНЕЙ ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА	10
ПОДРАЗДЕЛ 1.1.	10
ПОДРАЗДЕЛ 1.2.	15
ПОДРАЗДЕЛ 1.3.	23
ПОДРАЗДЕЛ 1.4.	30
РАЗДЕЛ 2. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ КАНЦЕРОГЕНЕЗА И РЕГЕНЕРАЦИИ ПЕЧЕНИ	37
ПОДРАЗДЕЛ 2.1.	37
РАЗДЕЛ 3. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИЗМЕНЕНИЙ РЕГЕНЕРАЦИОННЫХ ПРОЦЕССОВ У ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ ПОД ВЛИЯНИЕМ ФАКТОРОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ	49
ПОДРАЗДЕЛ 3.1.	49
РАЗДЕЛ 4. ПРОЛИФЕРАТИВНЫЙ КАСКАД В НИШЕ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЗУБЧАТОЙ ИЗВИЛИНЫ ГИППОКАМПА	56
ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ	63
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	66
ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ГЗ ЗА 2019 ГОД	78

## ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ:

В настоящем отчете о НИР применяют следующие сокращения и обозначения:

м-РНК - матричная рибонуклеиновая кислота

ПЦР - полимеразная цепная реакция

РПЭ - ретинальный пигментный эпителий

СТ - стекловидное тело

СК - стволовые клетки

НП - нейральные прогениторы

ТФ - транскрипционные факторы

FGF2 - фактор роста фибробластов 2

ТФ – транскрипционные факторы

ГЦК – гепатоцеллюлярная карцинома

ЭМП – эпителио-мезенхимный переход

ВКМ – внеклеточный матрикс

кПЦР – количественная ПЦР

ЦМЗ – цилиарномаргинальная зона

БрдУ – бромдезоксиуридин

ИЦХ – иммуноцитохимия

КС – кондиционированная среда

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

## ВВЕДЕНИЕ

Широкомасштабные исследования механизмов и способов регенерации тканей и органов у позвоночных животных и человека дают ключи к управлению этими процессами для восстановления утраченных или поврежденных при травмах и заболеваниях структур организма, что определяет перспективность развития этой области. В настоящее время исследования регенерации, проводимые в мире, развиваются в нескольких направлениях. Основными остаются поиск и изучение клеток - источников для регенерации, исследование поведения и молекулярно-генетического профиля таких клеток, стимуляция эндогенного резерва для регенерации. С учетом этих данных проводится исследование роли системных организменных и локальных факторов (сигнальных путей, факторов ниш стволовых и прогениторных клеток), способных регулировать поведение клеток - источников регенерации. Среди возможных способов регенерации изучается использование эндогенного потенциала клеток со свойствами стволовости, а также стратегия репрограммирования. Регуляция регенерации предполагает, прежде всего, активацию регенеративных ответов, а именно - вход клеток в пролиферативную фазу с целью репрограммирования в заданном направлении дифференцировки. Существенным разделом современного изучения регенерации является исследование влияния внешних условий, действия экзогенных факторов, на морфогенетические механизмы развития ткани образующейся *de novo*.

Современный уровень развития мировой науки в области фундаментальных основ регенерации и регенерационной медицины, подводят к пониманию ключевых основ многих регенерационных процессов в контексте работы генных сетей (сигнальных путей, экспрессии факторов транскрипции) и эпигенетических условий для восстановления тканей. Исследования ведутся на моделях низших и высших позвоночных животных. Особенностью отечественной школы изучения регенерации является ее многолетний опыт в развитии теоретических и экспериментальных подходов, разработке новых моделей регенерации *in vivo* и *in vitro*, детальное документированное описание морфологии и биохимии регенерационных процессов. В соответствии с ранее полученными данными, особенности цитоскелета клеток РПЭ, межклеточных контактов и быстрого ремоделирования ВКМ, определяют способность к быстрой конверсии фенотипа этих клеток, их репрограммированию *in vivo* (natural reprogramming) в нейральном направлении при регенерации сетчатки у тритонов. Это позволило перейти к изучению процессов восстановления с помощью современных методов, дающих информацию о молекулярно-генетических основах выявленных ранее закономерностей и этапов регенерации многих тканей и ряда органов.

Исследования механизмов регенерации тканей и органов, проводимые в параллели с изучением их развития, показали, что при регенерации воспроизводятся многие молекулярные процессы онтогенеза, происходит реэкспрессия ключевых сигнальных белков, транскрипционных и других регуляторных факторов, однако процессы регенерации и развития не являются идентичными. Это наиболее полно иллюстрируют исследования регенерации тканей глаза у позвоночных. К настоящему времени накоплена обширная информация о способах и молекулярных факторах для поддержания и активации клеток, являющихся потенциальными источниками для регенерации тканей глаза [6, 7]. Клетки-источники регенерации сетчатки представлены как стволовыми, так и малодифференцированными клетками, а также латентными, но специализированными предшественниками. Молекулярно-генетический профиль в разной степени отражает таковой в развитии по экспрессии набора ТФ, характерных для области глазного поля позвоночных (семейств факторов Pax6, Chx, Rx, Six, Sox, Chx, Prox, Pitx и др.), а также ТФ индукции плюрипотентности (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-мус, OSK). Наряду с этим мало- или недодифференцированные клетки, а также латентные, но дифференцированные предшественники обладают экспрессией генов, обеспечивающих их специализацию и функционирование. Показано, что во многих случаях факторы роста, сигнальные пути FGF2, EGF, IGF, CNTF, WNT/ $\beta$ -катенин и Notch-Delta, антиоксиданты, способны не только поддержать состояние стволовости в клетках, но и активировать у таких клеток регенерационные ответы: репрограммирование, пролиферацию и миграцию клеток. Другие сигнальные пути, запускаемые TGF- $\beta$ , BMP4, RA и SHH, наоборот, в ряде случаев блокируют такие ответы. Тем не менее, очевидно, что при сходстве набора ключевых транскрипционных факторов, существуют различия в стратегиях регенерации или защиты ткани при ее повреждении, у эволюционно отдаленных видов позвоночных. Различия связаны со структурной организацией генома и локальными факторами (клеточное и молекулярное микроокружение: сигнальные молекулы, транскрипционные факторы и др.), а также с системной регуляцией регенеративных ответов (гормоны, клетки иммунной системы, клетки крови), при тесной взаимосвязи всех уровней контроля регенерации.

Ключевые вопросы для понимания механизмов дифференцировки клеток и регенерации тканей связаны с инициацией, дедифференцировкой клеток и/или активацией клеток со свойствами стволовых, эпителио-мезенхимной трансформацией клеток при травмах и онкогенезе, общностью и различиями в поведении одноименных клеток на начальных этапах регенерации и развития патологий тканей у человека.

*В тему «Клеточные и молекулярные механизмы развития и регенерации тканей и органов у низших и высших позвоночных. Поиск способов регуляции восстановительных*

процессов» вошли исследования на нескольких моделях:

1) регенерация сетчатки у хвостатых амфибий (*Urodela*) – модель естественного репрограммирования клеток РПЭ, *in vivo*; нейральная сетчатка и РПЭ в системе органотипического *3D-in vitro* (хвостатые амфибии); РПЭ, латентные прогениторы, клетки-источники для регенерации сетчатки *in vitro* (млекопитающие, человек); 2) ткани глаза (сетчатка, хрусталик, стекловидное тело) позвоночных в развитии; 3) нейрогенез у мышей за счет стволовых клеток на модели гиппокампа (млекопитающие); 4) модели фиброза, регенерации и канцерогенеза печени млекопитающих (мыши) после ее химического повреждения и др. Для изучения влияния физических факторов (тепловой шок, разные дозы гравитации), способных оказать влияние на регуляцию молекулярных механизмов регенерации применяются модели тканевой и эпиморфной регенерации у *Urodela*. Разносторонние исследования на разных моделях *in vivo* и *in vitro* позволяют выявлять общие закономерности молекулярно-генетических аспектов регуляции регенерации органов и тканей, а также решать важные частные вопросы, находящие практическое приложение в биомедицине. Последние важны для разработки биомедицинских подходов для стимуляции и регуляции регенеративного ответа тканей у высших позвоночных и человека, а также коррекции патологических изменений в тканях в процессах развития.

## ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

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

#### ПОДРАЗДЕЛ 1.1. ИССЛЕДОВАНИЕ УЧАСТИЯ РЕГУЛЯТОРНЫХ ГОМЕОБОКССОДЕРЖАЩИХ ГЕНОВ В РЕГЕНЕРАТИВНЫХ ОТВЕТАХ ТКАНЕЙ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ КЛЕТОК ГЛАЗА ПОЗВОНОЧНЫХ

##### 1.1.1. ВВЕДЕНИЕ.

Ранее были изучены клеточные механизмы развития и регенерации тканей глаза у низших позвоночных (Urodela), проведена молекулярно-генетическая характеристика клеток пигментного эпителия сетчатки глаза тритонов, ассоциированная с педоморфозом, для объяснения высокой способности этих животных к регенерации сетчатки и хрусталика. Выявлены особенности пролиферативной активности и дифференцировки клеток в эмбриональном развитии сетчатки, хрусталика глаза у низших и высших позвоночных, при регенерации тканей глаза (сетчатки, хрусталика) у низших позвоночных, развитии тканей глаза у млекопитающих (человека). Определены ключевые регуляторные факторы, компоненты сигнальных каскадов, участвующие в контроле широкого спектра функций (адгезии клеток к ВКМ, миграции, пролиферации, дифференцировки, естественного репрограммирования).

В исследованиях регуляции процессов регенерации/развития тканей, глаза, у низших и высших позвоночных (с использованием указанных моделей), показано, что поддержание пула прогениторных клеток глаза, их дифференцировка у разных видов позвоночных, естественное репрограммирование при регенерации сетчатки у хвостатых амфибий, осуществляется при участии ключевых ТФ, среди которых гомеодоменсодержащие транскрипционные факторы. Все больше появляется аргументов в пользу точки зрения, что процессы регенерации связаны с видовыми и тканеспецифическими особенностями регуляции, как на локальном, так и системном уровне. Эти процессы во многом определяются взаимодействиями основных форм генов и свойственными им наборами изоформ. В исследованиях таксонспецифической и тканеспецифической экспрессии гомеобокссодержащих генов, участвующих в контроле регенерации сетчатки тритона, проведен филогенетический анализ ключевых регуляторных генов и их изоформ, у представителей разных таксономических групп. Изучена эволюционная взаимосвязь генов (белков) семейства *Pitx* факторов транскрипции бикоидного класса: *Pitx1*, *Pitx2*, *Pitx3*, выявлено наиболее высокое их сходство с

одноименными транскриптами и белками у амфибий и птиц, таксонспецифические различия по основным формам генов и соответствующим изоформам.

### 1.1.2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования в работе использованы тритоны *P.waltl*. Применяли различные способы повреждения тканей глаза (удаление/отслойка сетчатки, удаление хрусталика), у хвостатых амфибий, с использованием моделей *in vivo* и 3D *in vitro*. Была продолжена молекулярно-генетическая характеристика свойств РПЭ и радужки глаза *Urodela*, объясняющих высокую способность этих животных к регенерации сетчатки и хрусталика. Дизайн олигонуклеотидов к генам интереса осуществляли с помощью программного обеспечения Primer3, Beacon Designer 7.2. Анализ последовательностей проводили с помощью свободных баз данных нуклеотидных и белковых последовательностей NCBI, UCSC, EMBL и т.п. мРНК генов анализировали с помощью полуколичественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) и кПЦР. РНК выделяли с помощью TRI-реагента (MRC, США), обрабатывали DNase Turbo (Ambion, США) для устранения примесей геномной ДНК. Первую цепь кДНК синтезировали с использованием Omniscript RT Kit (Quiagen, Germany). кДНК из сетчатки, РПЭ, были нормализованы по референсному гену *Gapdh*. ПЦР проводили с матрицами кДНК, полученными из тканей глаза, с использованием набора для амплификации (Silex, Россия) в инструменте Mastercycler Personal (Eppendorf, Германия). Продукты амплификации разделяли электрофорезом в агарозном геле в трис-ЭДТА-боратном буфере в присутствии бромистого этидия. Биоинформационный анализ секвенированных нуклеотидных последовательностей регуляторных генов, выявленных в регенерирующих тканях глаза, проводили с использованием пакета программ MEGA-X. Иммунофлуоресцентный анализ проводили по стандартной методике на криостатных срезах толщиной 14 мкм, фиксированных смесью ацетон-метанол (1:1) при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Использовали вторичные антитела к IgG крысы, конъюгированные с флуорохромом AlexaFluor 568 (“Molecular Probes”, США, 1:200). Ядра клеток окрашивали специфичным для ДНК красителем Draq5 (“Biostatus Limited”, Великобритания, 1:3000). Срезы заключали в забуференный глицерин (90%, трис-HCl буфер, pH 8.0), с 0.1% *p*-фенилендиамином. Иммунофлуоресцентную реакцию анализировали с помощью конфокального микроскопа Zeiss LSM 510 (“Carl Zeiss Inc.”, Германия).

### 1.1.3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучен ряд транскрипционных факторов (ТФ), являющихся пререквизитом для регенерации сетчатки у низших позвоночных хвостатых амфибий (Urodela) и объясняющих высокие способности этих животных к полноценной регенерации тканей глаза (сетчатки, хрусталика). В исследованиях гомеобоксодержащих генов, участвующих в контроле регенерации, проведен филогенетический анализ секвенированных нуклеотидных последовательностей полученных из сетчатки и РПЭ тритона *P.waltl* для генов семейства Pitx: *Pitx1*, *Pitx2*, *Pitx3*, между представителями разных таксономических групп. Эти гены контролируют формирование многих тканей и органов в эмбриогенезе позвоночных и реэкспрессируются в процессе регенерации тканей. Среди известных функций изучаемых генов – участие в контроле нейрогенеза (*Pitx2*) [1, 2], развитии и регенерации конечности и плавника позвоночных (*Pitx1*) [3-5]. С помощью праймеров, сконструированных к наиболее консервативным участкам гена *Pitx1* позвоночных (*Danio rerio*, *Xenopus laevis*, *Gallus gallus*), из сетчатки взрослых тритонов *P.waltl* были получены ПЦР-фрагменты, определена их нуклеотидная последовательность. Анализируемые последовательности содержат гомеодомен и домен OAR. Анализ полученных последовательностей с помощью программы Blast (Pub Med), множественного выравнивания с известными последовательностями мРНК для ряда позвоночных и построения филогенетических деревьев (метод ближайших соседей, Neighbor-Joining) подтвердил гомологию одного из фрагментов с геном *Pitx1*, а другого – с *Pitx2*. Полученные нами фрагменты были использованы в качестве зондов (Query Sequence) для поиска полноразмерных транскриптов в базе данных транскриптома тритонов *P.waltl*, любезно предоставленной Dr. Elewa [6]. В результате скрининга обнаружены 9 транскриптов, три гомологичны *Pitx1*, а шесть – *Pitx2*. Транскрипты *Pitx1* тритона наиболее сходны с соответствующими транскриптами у шпорцевой лягушки и курицы, а транскрипты *Pitx2* – с транскриптами этого гена у человека. Ранее был выявлен и изучена локализация белка *Pitx2* в регенерации сетчатки [7]. Соответствующие белки содержат гомеодомен и домен OAR, характерные для генов семейства Pitx. Для выравнивания последовательностей применяли пакет программ MEGA X, алгоритм Neighbor-Joining. Оценку статистической достоверности сравнения 1000 выборок проводили с помощью bootstrap-анализа (выше 70%). Проведенный нами филогенетический анализ показал эволюционную взаимосвязь изучаемых генов (белков) у представителей разных таксономических групп и наиболее высокое сходство *Pitx1*, *Pitx2*, *Pitx3* тритона *P.waltl* с одноименными транскриптами и белками, аннотированными в доступных базах для

амфибий и птиц. Проведен биоинформационный анализ генов этого семейства и их изоформ у хвостатых амфибий, обладающих высокими регенерационными способностями. Нам не удалось выявить транскрипты, гомологичные *Pitx3*, у хвостатых амфибий видов *P.waltl* и *C.pyrhogaster*. Исключение составляют тритоны *Hynobius*, у которых выявлены лишь две изоформы *Pitx3*. Кроме того, у этого вида тритонов обнаружен химерный транскрипт, который кодирует последовательности, гомологичные генам *Pitx3* и *Zmynd8*. Получены данные, свидетельствующие о том, что для изучаемых генов и их изоформ характерна избирательная ткане- и таксонспецифическая активность. Выявление ткане-, стадио- и таксонспецифических изоформ исследуемых регуляторных генов объясняет их дифференциальную активность и участие в создании молекулярного генного профиля клеток в развитии и регенерации тканей разных позвоночных [8].

Получены результаты, дополняющие характеристику таксонспецифических, клеточных и генетических свойств РПЭ глаза у тритонов. Дальнейшая молекулярно-генетическая характеристика клеточных источников регенерации сетчатки, позволит, с учетом известных различий в стратегиях регенерации, осуществлять поиск эффективных подходов, которые могут быть использованы для получения регенерационного резерва с заданными свойствами и стимуляции восстановления тканей глаза у высших позвоночных. Определение характера экспрессии регуляторных генов в клетках-источниках регенерации, эпигенетических особенностей регуляции, зависимости регенерационных способностей от возраста, локальных и системных факторов регуляции важно для безопасной трансляции в биомедицину подходов для обеспечения регенерационных процессов за счет эндогенных клеток-источников.

#### 1.1.4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведен биоинформационный анализ ряда гомеобоксодержащих генов, кодирующих транскрипционные факторы – регуляторов раннего развития и регенерации, экспрессирующихся в регенерирующих тканях глаза (сетчатка, хрусталик) низших позвоночных. Для изучаемых регуляторных генов семейства *Pitx* характерна ткане- и таксонспецифическая активность. Выявление таксонспецифических регуляторных генов и их изоформ важно для объяснения их дифференциальной активности в развитии и регенерации тканей позвоночных. Представленные результаты 2019 являются продолжением исследований, направленных на выявление сходства и различий регенерационного ответа нейральной ткани у разных позвоночных, поиск способов стимуляции и регуляцию регенеративного ответа тканей глаза и их восстановления, эффективных способов коррекции нарушений, возникающих при их повреждениях и

патологических состояниях. Развитие современных молекулярно-генетических и клеточных подходов в фундаментальных исследованиях, способствует накоплению данных, которые обогащают представления, как об отдельных звеньях регуляции, так и о системе регуляции процессами дифференцировки тканей в целом, что востребовано практической офтальмологией, регенеративной медициной.

## ПОДРАЗДЕЛ 1.2. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ РЕГУЛЯТОРНЫХ ФАКТОРОВ НА ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ СПОСОБНОСТИ НЕЙРАЛЬНЫХ ТКАНЕЙ ГЛАЗА В УСЛОВИЯХ ОРГАНОТИПИЧЕСКОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

### 1.2.1. ВВЕДЕНИЕ

Органотипическое культивирование является незаменимым инструментом в исследованиях механизмов развития, регенерации сетчатки и составляющих их процессов – клеточной пролиферации, миграции, дифференцировки, а также морфогенеза [9]. Этот способ культивирования в наибольшей степени подходит для симуляции условий, рассматриваемой как “*in vivo-like in vitro technology*” [10], а культивируемая ткань как “*in vivo-like in vitro model*” [11]. В значительной степени это актуально и для нейральной ткани, для сохранения сложной структурной и синаптической организации [9]. Сегодня органотипическое культивирование сетчатки wholemount широко используется для самых различных целей, в том числе для морфологических, биохимических и фармакологических исследований [12], генно-инженерных манипуляций, в частности переноса генов, способных транзитно экспрессироваться в клетках сетчатки [13]. Органотипические культуры являются незаменимой альтернативой экспериментам на млекопитающих, экономичны в отношении объемов тестируемых веществ, позволяют значительно снизить количество животных в эксперименте. В экспериментах на сетчатке позвоночных удалось выявить роль ряда факторов в увеличении жизнеспособности и снижении риска повреждения нейронов. Среди таких веществ – ростовые факторы, нейротрофины, цитокины, белки клеточной адгезии [14], а также антиоксиданты [15]. В экспериментах, проведенных с помощью органотипического ротационного культивирования, мы использовали изолированную сетчатку wholemount взрослых животных, с целью изучения ее способности к регенерации и/или реконструкции [16, 17], а также факторов, потенциально способных увеличивать клеточную жизнеспособность [15, 16, 18]. Спектр эндогенных клеток источников восстановления сетчатки описан в литературе последних лет [19, 20, 21]. В сетчатке глаза к категории клеток, которые в зависимости от вида и возраста животных потенциально могут или реально участвуют в восстановлении сетчатки, относят клетки цилиарной области глаза. У низших позвоночных животных это - цилиарная маргинальная зона - ЦМЗ, а у высших - область края сетчатки и цилиарного тела. Помимо этого регенерационный ресурс представляют РПЭ и клетки Мюллера. Возможности нейральной дифференцировки последних на протяжении длительного времени изучаются, в качестве источников для регенерации сетчатки млекопитающих. Использование в качестве объектов хвостатых амфибий для

органотипического культивирования нейральных тканей вносит свой существенный вклад в изучение восстановительных возможностей сетчатки [16]. В этих исследованиях удалось выяснить способы регенерации сетчатки и участие ее внутренних источников, в отсутствие РПЭ. Оказалось, что выбранные условия длительного культивирования (в пределах одного месяца) индуцируют активацию, пролиферацию и миграцию клеток – внутренних источников регенерации нейральной сетчатки, а также рост нейральных отростков жизнеспособных нейронов. В изолированной от РПЭ сетчатке восстановление могло происходить только за счет собственного клеточного ресурса нейральной сетчатки – клеток ЦМЗ, биполярно-подобных клеток и, возможно, клеток Мюллера [21].

Подход органотипического культивирования успешно применяется для исследования молекулярных механизмов гибели клеток, выявления роли факторов защиты сетчатки от оксидативного стресса, и других протекторов сетчатки [22].

Модели регенерации сетчатки взрослого тритона *Pleurodeles waltl* (Urodela) – изолированная сетчатка и ретинальный пигментный эпителий в составе заднего сектора глаза могут быть адаптированы для изучения эффекта действия регуляторных факторов в 3D органотипической культуре *in vitro*. В настоящей работе система органотипического культивирования нейральных тканей глаза тритона была использована для изучения роли и экспрессии экзогенного и эндогенного Fgf2 и нуклеостемина Ns, в контексте сравнения с экспрессией в сетчатке и РПЭ взрослого тритона *in vivo* [23].

### 1.2.2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе применен способ органотипического культивирования тканей глаза позвоночных, ранее разработанный в лаборатории. В экспериментах использованы взрослые тритоны *Pleurodeles waltl* (6 месяцев), разводимые в аквариальной ИБР РАН. После анестезии метансульфонатомтрикаином MS 222 (Sigma, США), в 0,65% физиологическом растворе NaCl (1: 1000), выделяли нейральную сетчатку и РПЭ с подлежащими сосудистой оболочкой и склерой. Детали выделения нейральной сетчатки и длительного процесса культивирования как такового описаны в статьях [16,17]. Трехмерное органотипическое культивирование тканей глаза проводили на минироллере RM-1 (Elmi, Латвия). Изолированную сетчатку и RPE с нижележащими тканями задней стенки глаза культивировали в условиях постоянного вращения колб (20 мл, Wheadon). Продолжительность культивирования тканей глаза составляла 14 и 21 день, скорость вращения роллера 40 об/мин при 20°C. Среда состояла из среды 199 (70%), бидистиллированной воды (30%), 1 М буфера HEPES (30 мл / 100 мл среды), гентамицина

сульфата (200 мкл / 100 мл среды) и 10% фетальной бычьей сыворотки (Hyclon) США). Рутинная гистология и иммунохимия применялись для анализа морфологии ткани глаза, поведения клеток и пролиферации сразу после культивирования (14, 21 день). Коммерческий FGF2 (Sigma, США) ( $1 \times 10^{-8}$  г / мл) и предшественник ДНК (BrdU) (Zymed, США) (0,5 мл раствора на 5 мл среды) добавляли во время смены среды. Образцы тканей глаза, культивируемые в отсутствие экзогенного FGF2 в среде для культивирования, служили контролем эффекта Fgf2. Эксперименты с добавлением Fgf2 и BrdU проводились только для образцов RPE. Для оценки состояния клеток сетчатки и РПЭ иммуногистохимически анализировали ряд параметров – клеточные пролиферацию, жизнеспособность, рост отростков, а также иммунофенотипы фоторецепторных и глиальных клеток. После окончания культивирования часть материала фиксировали в растворе Буэна, для морфологического анализа. Применяли рутинную методику с окрашиванием клеток гематоксилин-эозином. Анализ изображений и их регистрацию проводили с помощью светового микроскопа Olympus АН-3 (Австрия). Для иммуногистохимического исследования применяли стандартные методики после фиксации тканей в 4% PFA. Изучение пролиферативной активности клеток сетчатки осуществляли путем долговременной доставки к ткани сетчатки бромдеоксиуридина (БрдУ). Доставка БрдУ (аналога тимидина, маркера пролиферации) осуществлялась посредством введения предшественника в среду при очередной ее смене в концентрации, рекомендованной производителем (Sigma). Определение клеточной гибели в тканях глаза проводили с использованием метода TUNEL. Образцы после роллерного культивирования с добавлением экстрактов и без них, фиксированные 4% формалином, замораживали в ОСТ и изготавливали криосрезы на криостате M1900 (Leica, Germany), которые окрашивали компонентами кита DeadEnd<sup>TM</sup> Fluorometric TUNEL System (Promega) в соответствии с протоколом производителя.

Экспрессию эндогенного *fgf2* изучали с помощью ПЦР реального времени. Экспрессию генов *Pax6*, кодирующего фактор транскрипции, *Ns* (нуклеостемина), маркера РПЭ *RPE65*, маркера нейральной дифференцировки *bII-тубулина* в сетчатке тритона в условиях 3D-органотипического культивирования, после действия экзогенного Fgf2, изучали с использованием метода ОТ-ПЦР и кПЦР [23]. мРНК генов анализировали с помощью полуколичественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) и кПЦР. РНК выделяли с использованием реагента TRI (MRC, США), обрабатывали ферментом DNase Turbo (Ambion, США) для устранения геномной ДНК. Первую цепь кДНК синтезировали с использованием Omniscript RT Kit (Quiagen, Germany). кДНК из тканей, изолированной

сетчатки и РПЭ были нормализованы по уровню экспрессии гена домашнего хозяйства *Gapdh* для *P.waltl*. Анализ генов проводили с помощью открытых баз данных нуклеотидных и белковых последовательностей NCBI, UCSC, EMBL и т.п. Дизайн олигонуклеотидов для работ с кДНК осуществляли с помощью программного обеспечения Primer3, Beacon Designer 7.2. ПЦР проводили с матрицами кДНК, полученными из тканей глаза, с использованием набора для амплификации (Silex, Россия) в инструменте Mastercycler Personal (Eppendorf, Германия). Структура праймеров приведена в нашей статье [23]. кПЦР была выполнена на системе Applied Biosystems Step One Plus. Общий объем реакции составлял 25 мкл и содержал 5 мкл смеси 5 × HS Sybr + High ROX 5x ПЦР (Evrogen), 0,2 мкл кДНК из реакции RT (замещенной водой в отрицательных контролях), по 1 мкл каждого рабочего раствора прямого и обратного праймера. Программа для ПЦР включала: 38 циклов; денатурацию при 95° С в течение 1 мин, 95°С в течение 10 с, Ta в течение 20 с, синтез цепи при 72°С в течение 30 с; Повышение температуры от 60° С до 95°С, с шагом 0,5°С, проводили для обеспечения амплификации специфического продукта с ожидаемой Tm. Пороговый цикл определяли, применяя программное обеспечение “7500 Software 2.0.1” (“Applied Biosystems”). Каждая реакция проводилась в трех повторностях. Статистический анализ был выполнен после экспортирования данных в программу Microsoft Excel. Для расчета относительных величин (RQ) для каждого представляющего интерес гена, в каждой пробе, нормализованной по GAPDH, использовался метод ΔΔCt. Анализ результатов и статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программного обеспечения Statistica 6.0, для расчета средних RQ и стандартного отклонения для каждого представляющего интерес гена в каждой пробе и для определения статистической значимости различий между наблюдаемыми значениями и контрольным значением (1,0) с помощью t-теста. Различия считали достоверными при  $P < 0.05$ .

### 1.2.3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мы показали, что в данных условиях культивирования *in vitro* возможно моделирование процессов, происходящих в этих тканях *in vivo*. Прежде всего, была проведена морфологическая характеристика культивируемых тканей глаза – изолированной сетчатки и РПЭ в составе заднего сектора глаза (РПЭ+склера,+хороид) тритона. Культивирование проводили в течение 14 дней. При ротационном органотипическом культивировании *in vitro* вначале в результате смыкания краев (периферии) сетчатки тритона формировались замкнутые структуры – сфероиды с обращенным наружу фоторецепторным слоем. Через 2 недели, несмотря на гибель

отдельных фоторецепторов и клеток внутренней сетчатки, в образованных сфероидах сохранялась послойная организация. Вблизи зоны смыкания сфероида в НЯС и ВЯС обнаруживались многочисленные митозы. В НЯС митотические клетки располагались среди тел фоторецепторов, а в ВЯС - часто вблизи длинного отростка клеток Мюллера.

На полутонких срезах была очевидной гипертрофия клеток Мюллера, выражающаяся в значительном увеличении размеров ядер, числа ядрышек и толщины длинных отростков этих клеток. В этой популяции отдельные клетки также находились в митотической фазе. Через 2 нед культивирования в центральной области сетчатки, далекой от периферии, были видны клетки, мигрирующие из ВЯС в НЯС клеток, и также многочисленные митозы. Все это явилось подтверждением активного участия внутреннего резерва регенерации сетчатки тритона – клеток ЦМЗ, возможного участия потомков глии Мюллера, локализующихся в ВЯС и биполярно-подобных клеток, как было показано ранее [16]. Часть клеток в сфероидах, проанализированных на сериях полутонких срезах, имела характерные признаки нейробластов. Также было продемонстрировано, что в процессе длительного органотипического культивирования *in vitro*, неизбежно сопровождающегося ограниченной клеточной гибелью, в частности в популяции фоторецепторов, имеют место восстановительные процессы и реконструкция взрослой нейральной сетчатки (вне РПЭ), использующая у тритона внутренние клеточные источники и механизмы для восстановления. Модели регенерации сетчатки у взрослого тритона *Pleurodeles waltl* (Urodela) были адаптированы для изучения эффектов регуляторных факторов в 3D органотипической культуре *in vitro*. Мы обнаружили, что эти условия культивирования *in vitro* РПЭ и сетчатки являются подходящими и дают возможность воспроизвести отдельные процессы, происходящие *in vivo*. Исследование сетчатки тритона в ходе органотипического культивирования с помощью молекулярных методов подтвердило полученные нами морфологические сведения. О наличии значительного числа малодифференцированных клеток в культивируемой в течение 2-х недель сетчатке тритона свидетельствовали данные исследования, выполненного с помощью ПЦР. Fgf2 добавленный в среду культивирования, усиливает пролиферацию недифференцирующихся клеток РПЭ и последующее образование первого ряда клеток зачатка сетчатки, о чем судили и по экспрессии анализируемых генов маркеров дифференцировки. Было обнаружено возрастание уровня экспрессии генов, кодирующих белки ВП-тубулин (ВП-tub), нуклеостемин (Ns) (маркеров низкого уровня дифференцировки). Кроме того, показано участие нуклеостемина в поддержании пролиферативной активности клеток, что было ранее показано на других

экспериментальных моделях, также в контексте Fgf2-сигнального пути. Параллельно было выявлено усиление транскрипционной активности эндогенного *fgf2* ответственного за клеточную дедифференцировку и пролиферацию [23, 24].

Таким образом, культивируемая сетчатка продемонстрировала хорошую жизнеспособность *in vitro* и потенциал для самовосстановления, за счет участия низкодифференцированных предшественников на периферии ткани. В образцах сетчатки выявлена активация *fgf2* и *Ns*. В то же время, в RPE в составе заднего сектора глаза, экспрессия гена *fgf2* была на низком, едва определяемом уровне, но экспрессия гена *Ns* заметно увеличилась (рисунок 1.2.1). Результаты, полученные в двух разных моделях, подтверждают роль эндогенного (нейральная сетчатка) и экзогенного (пигментированный эпителий сетчатки) Fgf2 в процессах регенерации сетчатки, которая состоит в поддержании пролиферации клеток, регенерации нейральных тканей глаза тритона. Возрастание уровня экспрессии гена *Ns*, параллельно с таковым для *fgf2*, предполагает его участие в FGF2-опосредованном регуляторном пути.

Ранее, с использованием органотипического культивирования, было обнаружено, что для осуществления процесса регенерации у тритонов (*Cynops pyrrhogaster*) необходима хороидальная (сосудистая) оболочка [25]. Изолированный от хороида РПЭ не пролиферировал, но в присутствии сосудистой оболочки, даже будучи отделенным от нее мембранным фильтром, мог проявить свои регенераторные возможности – пролиферацию и трансдифференцировку в клетки сетчатки. Исследование роли ростовых факторов, источником которых мог быть хороид – Fgf2 и Igf1, указало на ведущую роль Fgf2, а Igf1 мог воздействовать на инициацию и прогресс регенерации сетчатки из РПЭ только совместно с Fgf2 [25].

По данным ПЦР в реальном времени, мы зарегистрировали увеличение экспрессии в тканях задней стенки глаза генов *fgf2*, *Ns*, вскоре после удаления сетчатки. Это подтверждает предположение о роли хороида, как источника факторов, в регенерации сетчатки у тритона за счет клеток РПЭ. Предполагается, что сосудистая оболочка обладает широким набором факторов, имеющих сигнальное и трофическое значение в развитии и при регенерации сетчатки глаза позвоночных. Дальнейшие исследования, с применением системы органотипического культивирования, направлены на выявление роли регуляторных факторов в тканях глаза тритона, в условиях (*in vivo-like*), максимально близких к условиям регенерации сетчатки *in vivo*.

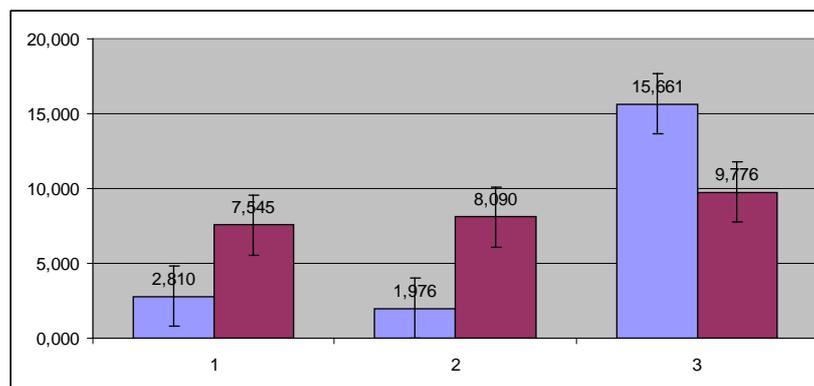


Рисунок 1.2.1. - Результаты qPCR экспрессии *fgf2*, *Ns*, *RPE65* на 14 день культивирования клеток РПЭ в роллерной органотипической трехмерной системе *in vitro*, в присутствии фактора роста фибробластов *Fgf2* в среде культивирования (красные столбцы) и в отсутствие фактора (синие столбцы). 1- эндогенный *fgf2*; 2 – *Ns*; 3 - *RPE65*

Таким образом, изучено поведение клеток собственно нейральной сетчатки и регенеративные ответы на действие экзогенного фактора роста фибробластов 2. Обнаружено, что добавление *Fgf2* в среду культивирования стимулирует пролиферацию дедифференцирующихся клеток пигментного эпителия сетчатки и последующее образование клеток зачатка сетчатки. Культивируемая изолированная от РПЭ нейральная сетчатка, продемонстрировала хорошую жизнеспособность и потенциал для самовосстановления за счет низкодифференцированных клеточных предшественников на периферии. В образцах нейральной сетчатки выявлено усиление транскрипционной активности генов *fgf2* и *Ns* (нуклеостемина). Уровень экспрессии гена *Ns* возрастающий параллельно с таковым для *fgf2*, вероятно, также свидетельствует о работе нуклеостемина в FGF2-опосредованной регуляторной сети. В культуре клеток РПЭ в составе с подлежащей сосудистой оболочкой и склерой, экспрессия гена *fgf2* была зарегистрирована на низком уровне, но выше, чем в контроле, а экспрессия гена *Ns* заметно увеличилась. Результаты подтверждают роль эндогенного (нейральная сетчатка) и экзогенного (пигментированный эпителиальный слой сетчатки) *Fgf2* в процессах регенерации сетчатки в двух разных моделях регенерации ткани глаза тритона [23].

#### 1.2.4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Модели 3D органотипического культивирования РПЭ и изолированной сетчатки тритона позволяют воспроизводить отдельные клеточные процессы, которые происходят *in vivo*. Мы обнаружили, что ДНК-синтезирующая активность РПЭ возрастает при действии экзогенного фактора роста фибробластов Fgf2. Параллельно с этим наблюдалось также небольшое увеличение экспрессии гена *fgf2* клетках РПЭ на 14 день культивирования. Изолированная сетчатка продемонстрировала самовосстановление за счет низкодифференцированных клеток, расположенных на периферии. Эти клетки, а также глия Мюллера продемонстрировали способность к миграции, возрастанию митотической активности и продукции нейробластов для восстановления сетчатки. Эти процессы в сетчатке коррелировали с возрастанием экспрессии генов *fgf2* и *Ns*, что указывает на важную роль этих двух факторов в независимой от РПЭ регенерации сетчатки. Наши результаты подтвердили данные о ключевой роли Fgf2 в стимуляции пролиферации клеток в регенерации и развитии тканей. Нуклеостемин может быть еще одним участником контроля поведения клеток сетчатки и клеток РПЭ, в FGF2-опосредованном сигнальном пути. Полученные результаты полезны для исследования РПЭ-зависимой и независимой регенерации сетчатки *in vivo* и *in vitro*. Данные исследования дают ключевую информацию для разработки методов стимуляции регенерации нейральных тканей, за счет активации эндогенного резерва клеток-источников. Следует подчеркнуть, что органотипическое культивирование сетчатки whole mount находит широкое применение для биохимических и фармакологических исследований, представляя собой альтернативу экспериментам *in vivo*, а также за счет минимизации объемов изучаемых факторов и числа используемых в эксперименте животных.

### ПОДРАЗДЕЛ 1.3. ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ КОМПОНЕНТОВ СЕКРЕТОМА ИЗ КОНДИЦИОНИРОВАННЫХ СРЕД РЕГЕНЕРАТОВ ТКАНЕЙ ГЛАЗА URODELA НА КЛЕТКИ ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ СЕТЧАТКИ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

#### 1.3.1. ВВЕДЕНИЕ

Сетчатка взрослых млекопитающих *in vivo* не способна к полноценной регенерации. Травмы и заболевания сетчатки и РПЭ приводят к нарушениям структуры и функционирования органа зрения. В отличие от млекопитающих, хвостатые амфибии, животные с высокими регенеративными способностями, как отмечено в предыдущем подразделе темы, обладают эндогенными механизмами для восстановления сетчатки даже после её полного удаления, в частности, за счет клеток пигментного эпителия сетчатки. При этом клетки РПЭ дедифференцируются, теряют гранулы меланина и характерные маркеры, входят в клеточный цикл, вновь образованные клетки-предшественники пролиферируют, дифференцируются, формируя полноценную сетчатку. Клетки РПЭ характеризуются высокой пластичностью [26]. Ранее были выявлены сигнальные молекулы, запускающие сигнальные пути, ответственные за де- и трансдифференцировку РПЭ у хвостатых амфибий. В сетчатке тритона существует дополнительный к РПЭ собственный резерв восстановления – краевая зона, состоящая из малодифференцированных клеток. Эти клетки принимают участие в восстановлении сетчатки после частичной потери популяции нейронов, в том числе фоторецепторов. Было высказано предположение о том, что, выделяемые регенератами сетчаток тритонов сигнальные факторы, могут участвовать в стимуляции регенерационного ответа клеток РПЭ человека, в частности их дедифференцировки, и последующего возможного образования нейронов и глии сетчатки. Цель работы состояла в изучении влияния сред, кондиционированных (КС) клетками регенератов сетчатки тритона на клетки РПЭ человека на морфологическом и геномном уровне.

#### 1.3.2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работу вели на линии клеток ARPE-19 пигментного эпителия сетчатки взрослого человека [27], предоставленную О.Ю. Плетьюшкиной (НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова). Для стабилизации культуры клетки после размораживания субкультивировали в течение 3 пассажей в ростовой среде, состоящей из культуральной среды DMEM/F12 (“Sigma-Aldrich”), L-глутамина (2 мМ; “Sigma-Aldrich”), 100 Ед/мл пенициллина и 100мкг/мл стрептомицина (“Pan Biotech”) и 10% ЭТС (“Gibco”), при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Снятие клеток с подложки при пассировании

проводили смесью растворов трипсина (0.25%) и версена (0.48 мМ, "Gibco", "Invitrogen") в соотношении 1:3 (v/v). Для индукции трансдифференцировки ARPE-19 использовали ростовую среду, состоящую из культуральной среды DMEM/F12 ("Sigma-Aldrich"), L-глутамина (2 мМ; "Sigma-Aldrich"), 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина ("Pan Biotech"), 1% ЭТС ("Gibco") и 50% КС регенератов сетчатки тритона. Клетки в концентрации  $2 \times 10^4 / \text{см}^2$  высаживали на поверхность культурального пластика ("Greiner Bio-One GmbH"). В качестве контроля использовали клетки, культивированные без добавления КС, в среде с 1% ЭТС. Среду меняли через каждые 72 ч. Изменение морфологии исследовали с помощью инвертированного микроскопа "Olympus CKX31" через 24, 48, 72 и 120 ч. Фотографии получали с помощью микроскопа "Olympus" с цифровой камерой DP70.

Кондиционированные среды получали в результате культивирования тканей глаза тритонов ранее разработанным нами способом. Для получения кондиционированной среды от регенерирующих сетчаток тритонов, использовали взрослых половозрелых тритонов *Pleurodeles waltl* в возрасте от 6 мес до 1 года, выращенных в аквариальной Института биологии развития РАН. Тритонов наркотизировали в растворе MS-222 (1:1000, "Sigma-Aldrich") в течение 10-15 мин до иммобилизации животного. Выделение глаз проводили в стерильных условиях, с помощью микрохирургических инструментов. Под бинокляром выделяли сетчатку, полностью свободную от РПЭ, хороидальной и склеральной оболочек. Образцы сетчаток, полученных от 4-5 тритонов, помещали в стеклянные флаконы в ростовую среду, состоящую из культуральной среды 199 ("Биолот") и стерильной бидистиллированной  $\text{H}_2\text{O}$  (в соотношении 70% среды 199 и 30% воды), 1М HEPES, 80 мг/л гентамицина сульфата и 10% ЭТС. Флаконы устанавливали в мини-роллер RM-1 ("Elmi", Латвия). Образцы культивировали в темноте при температуре 22—24 °С при скорости вращения 60 об./мин. Через 120 ч культивирования меняли среду на ростовую среду того же состава, но без ЭТС и культивировали ещё 48 ч. Далее полученную КС стерилизовали через 0.22-µm фильтры ("Millipore"), аликвотировали, хранили при -70°С и использовали в качестве добавки к культуральной среде для индукции фенотипических и молекулярных изменений в клетках ARPE-19. В работе использовали КС от целых, неразрушенных, регенерирующих в течение 5 дней сетчаток тритона.

Оценку морфологических изменений проводили по фотографиям случайных полей зрения (изображения формата JPEG, размером 1360x1024 пикселя). С помощью графического планшета и стилуса в программе Image J1.52r (Wayne Rasband, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, США) каждая клетка обводилась вручную,

исключая те клетки, которые выходили за границы фотографии. В каждой группе было проанализировано от 100 до 200 клеток, в зависимости от плотности клеток, используя 4-12 фотографий, при увеличении объектива микроскопа 20X. Программа автоматически рассчитывала площадь (Area) проекции клетки на подложке (далее площадь клетки), периметр (Perimeter), большую (M) и малую (m) оси эллипса, описанного вокруг клетки [28]. Площадь и периметр клеток рассчитывались в пикселях, так как в анализе использовались относительные значения, что не требовало перевода в метрические единицы. Статистический анализ выполняли в программе Excell 2013 (“Microsoft Corporation”, США). Оценку пролиферативной активности клеток проводили с помощью МТТ-теста. Для этого клетки высаживали на поверхность 96-луночных планшетов в двух концентрациях:  $1 \times 10^4/\text{см}^2$  и  $2 \times 10^4/\text{см}^2$  и культивировали в течение 24 ч в отсутствие (контроль) и присутствии КС регенератов сетчатки тритона. Для оценки пролиферативной активности клеток за 3 ч до окончания срока культивирования в каждую лунку добавляли маточный раствор МТТ (5 мг/мл; “Sigma Aldrich”) в соотношении 1:10 по отношению к объему ростовой среды. По окончании инкубации удаляли ростовую среду, затем для извлечения из клеток образовавшегося темноокрашенного формазана добавляли 100 мкл ДМСО (“Applichem”) и ресуспендировали осадок. Анализ оптической плотности окрашенного раствора проводили на планшетном анализаторе Stat Fax 2100 (“Awareness Technology Inc.”) при 545 нм и корректирующем фильтре 630 нм. Исследования проведены в двух повторах по 16 лунок планшета, на каждую группу, в том числе контрольную. Для вычисления средних значений оптической плотности окрашенных растворов и стандартных отклонений применяли программное обеспечение Excell 2007 (“Microsoft Corporation”, США). Пролиферативную активность клеток (%) оценивали по изменению средних значений оптической плотности растворов по отношению к контролю, принятого за 100%. Для оценки статистической значимости различий между группами использовали t-критерий Стьюдента. Воздействие КС регенератов сетчатки тритона на пролиферативную активность клеток ПЭС считали выявленным при уровне значимости  $P < 0.05$ . Дополнительный анализ количества клеток выполняли в программе Cell Count3 (Россия) по фотографиям случайных полей зрения. Для каждой группы обсчитывали 10-20 изображений при увеличении микроскопа 10X, содержащих не менее 1000 клеток суммарно. Статистический анализ выполняли в программе Excell 2013 (“Microsoft Corporation”, США).

Для иммуноцитохимического окрашивания (ИЦХ), клетки высаживали на круглые покровные стекла (“Cell Star”) в 24-луночные планшеты и после культивирования в

отсутствии (контроль) или в присутствии КС регенератов сетчатки тритона через 24, 48, 72 и 120 ч фиксировали в течение 6 мин 4% раствором параформальдегида (“Sigma Aldrich”). Препараты хранили в смеси глицерина и этиленгликоля при - 20 °С до проведения ИЦХ окрашивания. Дифференцировку клеток оценивали иммунохимически, используя первичные антитела к коннексину 43 (Cx43, C6219, lot: 102K4859, 1:200; кроличьи поликлональные; “Sigma Aldrich”) и  $\beta$ III-тубулину (ab7751, lot: 754961, 1:200; мышинные моноклональные; “Abcam”), разведенные в 0.1% растворе БСА (“Sigma”). Препараты экспериментальной и контрольной групп клеток ПЭС обрабатывали параллельно для последующего проведения сравнительного анализа. ИЦХ-окрашивание включало в себя обработку 10% раствором козьей сывороткой для блокировки неспецифического связывания, инкубацию с первичными антителами при 4 °С в течение ночи, связывание первичных антител с соответствующими вторичными антителами, мечеными флуорохромами Alexa Fluor 488 или 594 (1:300; “Molecular Probes”, США), в течение 2 ч при комнатной температуре, заключение в среду с ядерным красителем DAPI (“Vectashield”; “Vector Laboratories”). Фотосъемку результатов ИЦХ-анализа проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Keyence BZ-9000E.

Подготовку проб, выделение суммарной РНК из культур клеток и количественную ПЦР проводили по ранее разработанному методу [29,30]. Выделение суммарной РНК из культуры клеток проводили с помощью TRI Reagent (“Sigma Aldrich”) в соответствии с инструкцией производителя. Для этого TRI Reagent добавляли в лунки 6-луночного планшета с клетками через 24, 72, 120 ч после культивирования без (контроль) или с КС регенератов сетчатки тритона. Синтез кДНК проводили с помощью набора Revert Aid H Minus Kit (“Fermentas”, Латвия) в объеме 20 мкл, используя 1 мкг тотальной РНК, обработанной ДНКазой. Методом кПЦР оценивали изменения уровня экспрессии мРНК следующих генов транскрипционных факторов, сигнальных белков и маркеров дифференцировки: *OCT4*, *NANOG*, *OTX2*, *PAX6*, *MITF*, *KRT18*,  $\beta$ III-тубулин (*TUBB3*), *COL1A1* (праймеры и зонды “ДНК Синтез”), *KLF4* (праймеры были предоставлены Э.Б. Дашинамаевым, Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН), *NES*, *BMP2*, *BMP4*, (“Applied Biosystems”). Праймеры и зонды представлены в публикации [29,30]. Эндогенным контролем служил *GAPDH* (праймеры и зонд “ДНК Синтез”). Смесь реагентов для кПЦР (25 мкл) включала 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 мкМ dNTPs, 1 Ед Maxima HS Taq-полимеразы (“Fermentas”), 5 мкл разведенной кДНК (эквивалентной 4 нг исходной тотальной РНК), 250 нМ праймеров и 250 нМ зонда, которые представлены в работах [29,30]. кПЦР проводили на приборе “ABI Prism 7500 PCRsystem” (“Applied Biosystems”).

Программа для ПЦР включала: 1 цикл денатурации при 95°C 3 мин, 40 циклов денатурации при 95°C 15 сек и совмещенный этап отжига-синтеза при 60°C 1 мин. Пороговый цикл определяли, применяя программное обеспечение “7500 Software 2.0.1” (“Applied Biosystems”, США). Экспрессию мРНК определяли постановкой ПЦР в двух повторах. Обработка данных кПЦР включала усреднение значений Ct для повторных точек в эксперименте, расчет значений относительной экспрессии исследуемых генов методом  $\Delta\Delta Ct$  для каждого образца с использованием значения Ct по гену *GAPDH*. Результаты представлены как средние значения и ошибка среднего. Для оценки статистической значимости различий между группами использовали t-критерий Стьюдента. Различия считали достоверными при  $P < 0.05$ .

### 1.3.3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В данном исследовании мы воздействовали 50% кондиционированными средами (КС) регенератов сетчатки тритона на клетки РПЭ человека линии ARPE-19. Обнаружены фенотипические изменения клеток ARPE-19, напоминающие признаки дедифференцировки этой популяции клеток. Данные RT-PCR продемонстрировали существенное повышение экспрессии маркеров плюрипотентности OCT4, NANOG, KLF4 (рисунок 1.3.1).

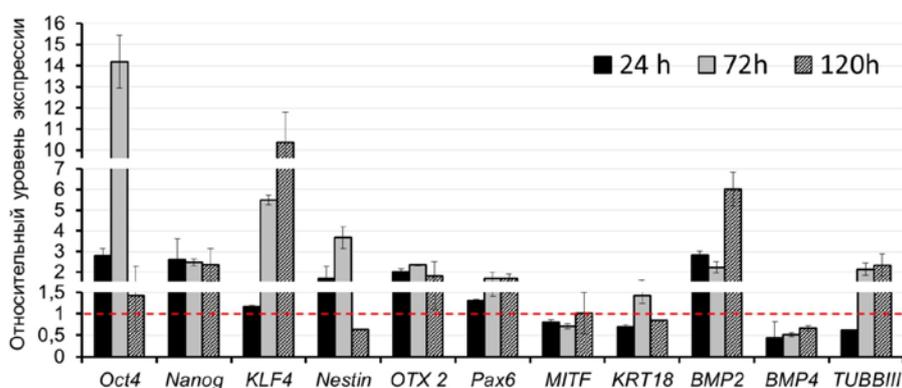


Рисунок 1.3.1. - Влияние 50% КС регенератов сетчатки тритона на экспрессию мРНК маркеров дифференцировки и плюрипотентности клеток ARPE-19. Изменение экспрессии относительно контрольной культуры (принята за 1) клеток ARPE-19.

В иммуноцитохимическом исследовании (ИЦХ) наблюдали большое количество клеток, утративших окрашивание как к маркерам эпителиальной, так и нейральной, дифференцировки. Часть клеток сохраняла способность к дифференцировке в нейральном

направлении. Данные RT-PCR показали повышение экспрессии маркеров нейральной дифференцировки  $\beta$ III-TUBULIN, PAX6, что подтверждено иммунохимически. Отмечено, сохранение некоторыми клетками эпителиальной природы, что отражалось в морфологии и положительном окрашивании на Cx43 (маркер щелевых контактов в эпителиальной ткани) (рисунок 1.3.2).

Интересно, что сходным с действием экстракта эффектом обладал фактор роста фибробластов FGF2. Будучи добавленным в среду культивирования в концентрации 50 нг/мл, он приводил к активации пролиферации РПЭ крысы, в норме *in vivo* демонстрирующего единичные митозы на периферии слоя. Ранее в исследованиях FGF2, известного своим митогенным эффектом при регенерации и в развитии глаза, а также компонентов FGF2 сигнального пути, экспрессия и локализация их были показаны в сетчатке тритона *Pl.waltl* [23, 24]. Также мы продемонстрировали роль экзогенного фактора роста фибробластов в стимуляции дедифференцировки и пролиферации клеток ретинального пигментного глаза линии ARPE19 человека, что, вероятно, опосредовано через регуляцию экспрессии генов мультипотентности [31, 32].

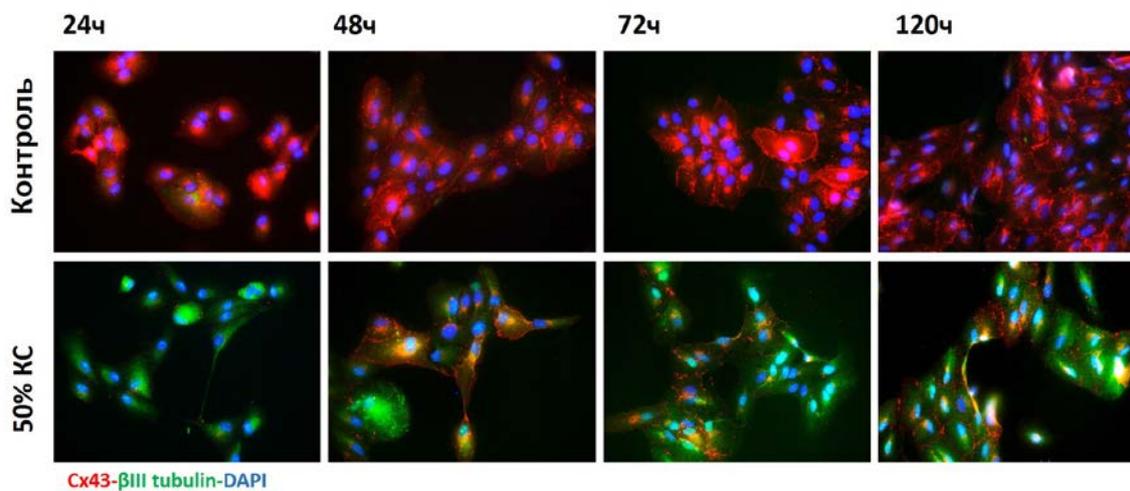


Рисунок 1.3.2. - Иммуноцитохимическая характеристика клеток ARPE-19 через 24 ч , 48 ч , 72 ч и 120 ч после инкубации с 50% КС регенератов сетчатки тритона. Иммунофлуоресцентный метод. Двойное окрашивание на Cx43 (красное свечение) и  $\beta$ -III-тубулин (зеленое свечение), ядра окрашены DAPI (синее свечение).

#### 1.3.4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследования позволяют сделать вывод о том, что кондиционированные среды регенератов сетчатки амфибий способны оказывать воздействие на изменение фенотипа клеток РПЭ человека [32]. Этот процесс, по-видимому, осуществляется, через регуляцию экспрессии генов, участвующих в обеспечении мультипотентного состояния клеток. Полученные результаты дают основание для продолжения исследований сразу в нескольких направлениях. Первое – это накопление и систематизация данных по регенеративным ответам РПЭ и нейральной сетчатки глаза млекопитающих, после действия экстрактов тканей глаза тритона, в сопоставлении с данными культивирования одноименных тканей в средах (с сывороткой, без сыворотки), без добавления экстрактов и с добавлением КС, полученных от сетчаток животных, не обладающих способностью к восстановлению. Второе – проведение расширенного иммунохимического скрининга на предмет выявления на фоне пролиферации и появления признаков дедифференцировки клеток РПЭ, признаков проявления других клеточных фенотипов, помимо пронейрального. Третье – проведение биохимического исследования состава КС для определения спектра молекул, являющихся индукторами регенеративных ответов в клетках РПЭ и обеспечивающих жизнеспособность клеток нейральной сетчатки *in vitro*. Проводимые исследования важны для понимания биологии клеток РПЭ, ограничений регенерации нейральной ткани у млекопитающих, а также позволят подойти к выбору надежных клеточных источников и эффективных способов стимуляции регенерации в нерегенерирующих тканях глаза млекопитающих.

**ПОДРАЗДЕЛ 1.4. ИССЛЕДОВАНИЕ МОРФОГЕНЕЗА И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ  
ТКАНЕЙ ГЛАЗА ЧЕЛОВЕКА В РАННЕМ ПРЕНАТАЛЬНОМ РАЗВИТИИ.  
РАЗРАБОТКА КРАСИТЕЛЕЙ-ЗОНДОВ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ  
В НОРМЕ И ПАТОЛОГИИ**

**1.4.1. ВВЕДЕНИЕ**

В 2019 г. было продолжено исследование стекловидного тела, как внутренней среды глаза, биологически значимой для правильной дифференцировки и стабилизации окружающих его тканей – сетчатки и хрусталика. Среди важнейших условий для нормального развития человека в эмбриональном и плодном периодах относят систему антиоксидантной защиты и систему врожденного иммунитета. Ранее в тканях глаза (стекловидном теле, сетчатке и хрусталике) человека в пренатальном развитии нами было показано присутствие молекул, обладающих свойствами антиоксидантов: лютеина, альбумина, альфа-фетопропротеина и мочевой кислоты. Показано присутствие альбумина, альфа-фетопропротеина и лютеина в стекловидном теле, хрусталике и сетчатке [33-35] и мочевой кислоты [36] в стекловидном теле глаза у плодов человека. Имеются данные о том, что мочевая кислота участвует в индукции TLR4-зависимого врожденного иммунного ответа [37].

В настоящем исследовании продолжено изучение экспрессии Toll-подобных рецепторов в сетчатке и хрусталике плодов человека в раннем пренатальном развитии. У млекопитающих рецепторы этого класса являются компонентами системы врожденного иммунитета. Факторы врожденного иммунитета представляют собой наследственно закрепленную систему защиты от патогенов, обеспечивающую их распознавание и элиминацию в первые часы после их вторжения, и выработку сигналов, обуславливающих формирование специфического иммунного ответа. Toll-подобные рецепторы (TLRs) представляют первую линию защиты, в активации сигналов, инициирующих процессы воспаления в организме, в ответ на проникновение бактериальных и вирусных агентов [38, 39].

Все чаще появляются сведения, указывающие на то, что кроме роли в иммунитете, Толл-подобные рецепторы (TLR) участвуют в регуляции процессов эмбрионального развития различных органов и тканей позвоночных, экспрессируясь в делящихся и дифференцирующихся клетках формирующихся тканей эмбрионов млекопитающих и могут участвовать в регуляции процессов эмбрионального развития различных органов и тканей позвоночных. Согласно данным литературы последних лет TLRs и их адапторные белки связаны с различными аспектами нейрогенеза в процессе развития мозга и с пластичностью нервных клеток [38, 39]. Недавно установлено, что эта функция

реализуется через каскад митоген-активируемых протеинкиназ (MAP-киназ) и активацию транскрипционного фактора AP-1 (activator protein) и [39, 40]. В предшествующем исследовании мы показали динамику локализации Toll-подобных рецепторов 2 и 4 в пренатальном развитии сетчатки глаза человека с 9 по 30 неделю, установив ее стадиозависимый характер [41].

В структурно-организованных биосистемах исследования фотоники красителей имеют большое фундаментальное и прикладное значение. В связи с этим, поиск простых и удобных методов анализа состава и изучения структурно-организованных систем на основе биомолекул (белков, нуклеиновых кислот и др.) с использованием красителей-зондов, весьма актуален. Такими зондами могут быть *мезо*-замещенные полиметиновые (карбоцианиновые) красители. *Мезо*-замещенные красители обладают уникальным набором спектрально-флуоресцентных и фотохимических свойств, чувствительных к молекулярному окружению [42]. В структурно-организованных системах фотоника этих красителей резко изменяется, что позволяет их использовать для изучения таких систем. Одной из особенностей этих красителей является подвижное равновесие между *транс*- и *цис* изомерами, по-разному взаимодействующими с биомолекулами. Взаимодействие красителей с компонентами структурно-организованных систем приводит к росту флуоресценции и интеркомбинационной конверсии в триплетное состояние. Нами разработаны спектрально-флуоресцентные и фотохимические зонды на основе *мезо*-замещенных карбоцианинов, спектр применения которых постоянно расширяется. В частности, один из анионных карбоцианинов широко использовался нами как зонд в биологических системах, содержащих сывороточный альбумин и коллагены.

В данном исследовании проведен анализ взаимодействий *мезо*-замещенных карбоцианиновых красителей с биомолекулами, в контексте обсуждения фотоники *мезо*-замещенных карбоцианинов в комплексах с биомолекулами. Рассмотрены также возможности по применению этих красителей в качестве зондов в биологических системах

Задачи работы: 1) продолжить исследование присутствия молекул-антиоксидантов в стекловидном теле (мочевая кислота, катехоламины, билирубин), сетчатке и хрусталике (катехоламины), 2) исследовать экспрессию мРНК генов *TLR2* и *TLR4* в сетчатке и хрусталике в пренатального развития человека на стадиях 13, 17 и 19 недель и 3) изучить спектрально-люминесцентными методами взаимодействие ряда *мезо*-замещенных карбоцианиновых красителей с мицеллярными системами, содержащими соли желчных кислот, с целью разработки эффективных зондов для исследования внеклеточного матрикса в биологических системах.

#### 1.4.2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения анализа уровня экспрессии генов, кодирующих *TLR2* и *TLR4* рецепторы, проводили ПЦР с использованием специфических праймеров и стандартного набора реактивов для амплификации (“Qiagen”, США). Энуклеированные глаза очищали от окружающих тканей и отмывали в нескольких сменах физиологического раствора (0.9% NaCl). Затем под бинокулярной лупой МБС-9 отрезали по лимбу роговицу, вынимали стекловидное тело, хрусталик и отделяли сетчатку. Стекловидное тело центрифугировали (12500 об/мин, eppendorf centrifuge 5417R, 4°C, 30 мин). После центрифугирования отбирали надосадочную жидкость. Осадок стекловидного тела, сетчатку и хрусталик использовали для исследования уровня экспрессии мРНК толл-подобных рецепторов: TLR2, TLR4, методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени (все использованные реактивы и детектирующие амплификаторы производства ООО «ДНК-Технология», Россия).

Во избежание деградации мРНК взятый материал помещался в пробирки с раствором гуанидинтиоцианата (лизирующий раствор набора «Проба НК»). Выделение суммарной РНК проводили с использованием набора «Проба НК». Принцип метода основан на лизисе клеток, осаждении РНК изопропанолом в присутствии соосадителя, последующих отмывках и элюции РНК. В реакции использовали олигонуклеотиды, высокоспецифичные в отношении транскриптов генов и не отжигающиеся на матрице геномной ДНК. Поэтому в этой работе обработка образцов ДНК-азой не проводилась. Реакцию обратной транскрипции ставили при температуре 40°C в течение 30 минут, с последующей инактивацией обратной транскриптазы в течение 5 минут при температуре 95°C. В реакции обратной транскрипции использовалась смесь специфических олигонуклеотидов всех исследуемых генов. Амплификация осуществлялась в режиме реального времени с измерением уровня флуоресценции по каналу FAM на каждом цикле при температуре отжига праймеров 64°C. Реализацию «горячего старта» обеспечивали использованием Taq-полимеразы, активность которой блокировали антителами и восстанавливали при прогревании. Реакцию проводили в двух повторах для каждой точки. Уровень экспрессии мРНК измеряли в относительных единицах, нормировку уровня экспрессии мРНК исследуемых генов проводили методом сравнения пороговых циклов (метод  $\Delta\Delta Cq$ ) относительно референсных генов B2M, TBP, GUSB, HPRT1 и образца с минимальным уровнем экспрессии исследуемого гена.

Содержание билирубина и мочевой кислоты в супернатантах стекловидного тела измеряли на клиническом биохимическом анализаторе BA-400 (BioSystems S.A., Spain).

Катехоламины (норадреналин, адреналин, дофамин) и их предшественника – аминокислоту ДОФА определяли методом ВЭЖХ. В настоящем исследовании использовали мезо-замещенные карбоцианиновые красители для структурного изучения мицеллярных систем, содержащих соли желчных кислот (холаты): дезоксихолат натрия, холат натрия и таурохолат натрия («Sigma», США). В работе были использованы спектрально-флуоресцентные методы, ранее описанные в работе [41].

#### 1.4.3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В продолжение исследований состава стекловидного тела глаза у плодов человека, в этой важной составляющей глаза обнаружено присутствие мочевой кислоты, катехоламинов и билирубина, обладающих свойствами антиоксидантов. Катехоламины присутствуют в сетчатке и хрусталике. Выявленные молекулы также являются биологически активными сигнальными молекулами, участвующими в физиологических процессах и дифференцировке клеток развивающегося глаза человека [43-45]. Методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени в сетчатке и хрусталике глаза плодов человека на стадиях 13, 17 и 19 недель пренатального развития человека была выявлена экспрессия мРНК генов, кодирующих рецепторы *TLR2* и *TLR4*. Роль Toll-подобных рецепторов, помимо иммунорегуляции, связана с участием в сигнальных каскадах, контролирующих процессы раннего развития тканей и органов и нейрогенеза у млекопитающих [38, 39, 46, 47]. В развитии сетчатки глаза, с началом нейрогенеза начинаются сложные процессы деления, миграции и дифференцировки нейробластов, роста нервных волокон, образующих глазной нерв, синаптогенеза и формирования слоев сетчатки, что приводит к морфологически и функционально дефинитивной сетчатке с обилием клеточных типов и синаптических связей, характерных для зрелого глаза.

В настоящей работе мы показали экспрессию Toll-подобных рецепторов *TLR2* и *TLR4* в сетчатке глаза человека в раннем пренатальном развитии, на всех исследованных стадиях экспрессия обоих генов сохранялась приблизительно на одном уровне. В хрусталике отмечена тенденция к увеличению уровня экспрессии мРНК *TLR2* и *TLR4* по мере пренатального развития плодов человека [48]. Сопоставление данных ПЦР с данными локализации белковых продуктов [41] показало, что по мере развития и дифференцировки сетчатки происходит пространственное изменение локализации этих рецепторов в сетчатке, с 9 по 30 недель развития глаза плодов человека. Преимущественная локализация *TLR2* и *TLR4* в сетчатых слоях на продвинутых стадиях морфогенеза сетчатки, как предполагается, связана с участием в регуляции нейрогенеза и аксоногенеза, образованием синаптических нейрональных связей между нейронами в

сетчатке. В совокупности, данные продемонстрировали относительно стабильную экспрессию рецепторов в ходе дифференцировки клеток сетчатки. В клетках эпителия хрусталика выявлена стадио-зависимая экспрессия *TLR2* и *TLR4* рецепторов в исследуемый период развития [48]. Обнаружение Toll-подобных рецепторов в клетках эндотелия, образующих стенки ретинальных сосудов, предполагает роль Toll-подобных рецепторов в барьере «кровь-сетчатка» в защите сетчатки от проникновения патогенов [41]. Разработка и усовершенствование методов анализа и изучения различных структурно-организованных молекулярных и супрамолекулярных биосистем с использованием красителей-зондов имеет фундаментальное и прикладное значение. Ранее обнаружено, что такими красителями-зондами могут служить полиметиновые (цианиновые) красители. Известно, что ряд этих красителей образуют нековалентные комплексы с биомолекулами, что создает предпосылки для их использования в качестве зондов в системах, содержащих биомолекулы. Полиметиновые (цианиновые) красители обладают высокими коэффициентами экстинкции и их свойства во многом определяются молекулярным окружением [42, 49].

Благоприятные свойства ряда *мезо*-замещенных карбоцианинов позволили нам рекомендовать их в качестве спектрально-флуоресцентных зондов для обнаружения и изучения биомолекул. К ним относятся ряд тиакарбоцианинов (для ДНК, гиалуроновой кислоты, хондроитин-сульфата, сывороточных альбуминов, коллагенов, холатов) и оксакарбоцианинов (для ДНК, альбуминов).

Для исследования молекулярного состава и структуры внеклеточного матрикса, имеющего важное значение для процессов нормального развития, регенерации и патологических процессов, продолжена разработка эффективных специфических зондов на основе полиметиновых красителей. В частности, спектрально-флуоресцентными методами изучалось взаимодействие ряда *мезо*-замещенных карбоцианиновых красителей с мицеллярными системами, содержащими соли желчных кислот, с целью разработки эффективных зондов для их исследования. В настоящей работе обнаружены резкие изменения свойств изучаемых красителей (в результате процессов агрегации-деагрегации, цис-транс-изомеризации) в указанных мицеллярных системах. Показано, что некоторые *мезо*-замещенные карбоцианиновые красители (прежде всего ДЭЦ, который ранее был нами использован при изучении стекловидного тела) могут служить спектрально-флуоресцентными зондами при изучении структурных перестроек в мицеллярных системах солей желчных кислот. Показано, что структурные перестройки в водных растворах холатов происходят в широком диапазоне их концентраций, а не только вблизи значений критических концентраций мицеллообразования (ККМ), а краситель ДЭЦ (пиридиниевая

соль 3,3'-ди-( $\gamma$ -сульфопропил)-4,5,4',5'-добензо-9-этилтиакарбоцианин-бетаина) может служить в качестве спектрально-флуоресцентного зонда при исследовании таких перестроек, в частности, служить индикатором для определения величины ККМ (рисунок 1.4.1).

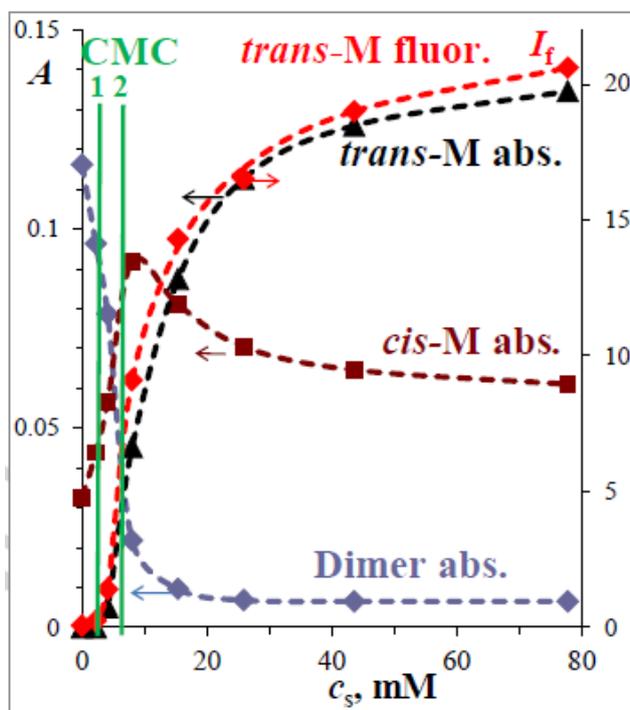


Рисунок 1.4.1. - Спектрально-флуоресцентные данные по взаимодействию красителя ДЭЦ с дезоксихолатом натрия.  $c_s$  – концентрация холата. ( $\frac{1}{2}D \rightleftharpoons cis-M$ ) + (S, SMic)  $\rightarrow cis-M@(S, SMic)$ ;  $cis-M@(S, SMic) + S \rightarrow trans-M@(LMic)$ , где D – димер ДЭЦ, M – мономер ДЭЦ (*цис* и *транс*), S – молекулы холата, SMic – малые ассоциаты (малые мицеллы) холата, LMic – большие мицеллы, СМС – ККМ.

Уникальные свойства красителя ДЭЦ дают возможность его широкого применения его в качестве спектрально-флуоресцентного зонда при изучении разнообразных систем, включающих биомолекулы: тканей глаза человека и животных в развитии, белковых покрытий наноразмерных частиц, мицеллярных систем солей желчных кислот [50-52].

#### 1.4.4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты настоящей работы являются вкладом в понимание общих закономерностей пренатального развития глаза человека. Полученные нами фундаментальные данные детализируют роль отдельных молекул в биологических системах в развитии глаза. Кроме того, эти данные могут найти практическое применение,

для диагностики некоторых патологий тканей глаза (Toll-подобные рецепторы). Изучение элементарных фотохимических процессов с участием *мезо*-замещенных карбоцианиновых красителей в комплексах с биомолекулами может дать большую и ценную информацию о детальном строении центров связывания, структуре и динамике биомолекулярных систем. Пристальный интерес к этому подходу в ведущих лабораториях мира позволяет ожидать интенсивное развитие этого направления в исследованиях различных биологических систем.

## РАЗДЕЛ 2. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ КАНЦЕРОГЕНЕЗА И РЕГЕНЕРАЦИИ ПЕЧЕНИ

### ПОДРАЗДЕЛ 2.1. ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ ПРОТЕКТОРНОГО И ПРОТИВОФИБРОЗНОГО ДЕЙСТВИЯ 4-МЕТИЛУМБЕЛЛИФЕРОНА НА МЫШИНЫХ МОДЕЛЯХ ФИБРОЗА И РЕГЕНЕРАЦИИ ПЕЧЕНИ *IN VIVO*.

#### 2.1.1. ВВЕДЕНИЕ

Гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК) является наиболее распространенными видами рака печени. Заболевание характеризуется быстрой прогрессией и устойчивостью к большинству современных методов противоопухолевой терапии. Развитие разных видов рака сопровождается рядом генетических событий, результатом которых являются изменения в ограниченном количестве конкретных генов – онкогенов или опухолевых супрессоров. Одними из важных показателей выживаемости опухолевых клеток это их способность к быстрой изменчивости за счет хромосомных aberrаций и изменения их микроокружения [53]. Согласно модели [54] одна инъекция алкилирующего препарата дипина, введенного мышам за 2 ч до стандартной операции частичной резекции печени, вызывает во всех покоящихся гепатоцитах (фаза клеточного цикла G<sub>0</sub>) повреждение ДНК (преимущественно двунитевые разрывы) и затем развитие в печени опухолевого процесса [54]. В 2011 году Стефенс и коллеги, сообщили об открытии новой формы нестабильности генома, названной хромотрипсисом, характеризующейся десятками или сотнями локально сгруппированных перестроек, влияющих на одну или несколько хромосом в раковых клетках [55]. Ранее нами были выполнены исследования явления хромотрипсиса в ходе гепатоканцерогенеза у мышей (самцов F1(CBA/C57Bl/6) массой 20–22 г в возрасте 2 мес. к началу опыта). В наших *in vivo* экспериментах с индукцией гепатоканцерогенеза в органе с исходно полиплоидной популяцией клеток - гепатоцитов были обнаружены цитогенетические изменения, суть и механизм образования которых, стали понятны только с привлечением современных концепций развития нарушения генома при опухолевой трансформации. В хромосомных пластинках полиплоидных гепатоцитов обнаружены многочисленные хромосомные aberrации, в том числе предполагаемые морфологические проявления хромотрипсиса – особого типа реорганизации генома, связанного с локальным распадом хромосом. В цитологических препаратах клеток печени среди структурных ядерных aberrаций были отмечены многочисленные микроядра, содержащие хромосомные фрагменты, как результат двунитевых разрывов ДНК. В связи с этим, микроядрам отводится роль исходного субстрата для развития хромотрипсиса.

При патологических процессах, раковом перерождении клеток, происходит дерегуляция и дезорганизация ВКМ, что способствует прогрессированию рака путем стимуляции клеточной трансформации и метастазирования [56]. Изменения в составе ВКМ, в частности, увеличение количества гиалуронана, коррелирует с плохим прогнозом во многих типах рака, включая рак желудка, кишечника, груди, яичника, мочевого пузыря, поджелудочной железы [57]. Нами был показан высокий уровень экспрессии гиалуронан синтетаз *Has2* и *Has3* при сохранении уровня гиалуронидаз *Hyal1* и *Hyal2* в культурах ГЦК, что свидетельствует об увеличении продукции гиалуронана в межклеточном матриксе. Наши данные могут свидетельствовать об участии гиалуронана в формировании и прогрессии опухолевого роста ГЦК.

С использованием другой модельной системы, мы провели исследование роли гиалуронана в стимуляции, развитии гепатоцеллюлярной карциномы на клеточных культурах, описанных в статье Дашенковой и др. [58]. 4-метилумбеллиферон (4MU) является ингибитором отложения гиалуронана и активным веществом химекромона, желчегонного и спазмолитического препарата. Однако механизмы действия 4-MU при токсическом повреждении печени пока еще недостаточно изучены. В настоящее время существуют множество доказательств того, что звездчатые клетки печени (HSC) являются основными клетками участниками, в процессе формирования фиброза печени. Активация звездчатых клеток в поврежденной печени, сопровождается трансдифференцировкой в миофибробласты, которые являются основным источником секреции компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ). ВКМ, в свою очередь, нарушает микроциркуляцию, приводящую к портальной гипертензии. HSC клетки локализованы в субэндотелиальном пространстве Дисса, между синусоидальными эндотелиальными клетками печени и гепатоцитами. Около 10 % всех резидентных клеток печени составляют HSC [50].

Мы провели анализ экспрессии белков маркеров и регуляторов HSC клеток в норме и при фиброзе печени мыши *in vivo*. Мы также оценили протекторные и лечебные возможности 4-метилумбеллиферона при развитии фиброза печени у мышей [59].

Различные клеточные линии рака в тканях служат инструментом для выявления взаимодействий и роли ключевых звеньев в регуляции процессов канцерогенеза. В настоящей работе мы также провели исследование роли сигнального пути IGF1 и генов-мишеней этого сигнального пути, на модели рака поджелудочной железы *in vitro*.

## 2.1.2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования были выполнены на моделях рака и фиброза печени мыши, рака пожелудочной железы, с применением систем *in vivo* и *in vitro*. Для индукции гепатоканцерогенеза печени использована оригинальная модель, основанная на сочетании кластогенного эффекта радиомиметика дипина и стандартной частичной гепатэктомии. Гепатоканцерогенез был индуцирован дипином (CAS 738-99-8). В работе были использованы методы гистологии-цитологии, клеточной биологии и белковой химии.

На 8-нед самок мышей BALB / c (n = 8 на группу) воздействовали CCl<sub>4</sub> путем ингаляции, которая проводилась два раза в неделю по 15 минут, в течение 2 или 4 недель. Экспериментальные группы животных: I – CCl<sub>4</sub> 4 недели воздействия; II – CCl<sub>4</sub> 2 нед воздействия далее 2 нед без воздействия; III – CCl<sub>4</sub> 4 нед и 4-MU последние 2 нед; IV – CCl<sub>4</sub> 2 нед и 2 нед 4-MU без воздействия CCl<sub>4</sub>; V – Контрольная группа; VI – CCl<sub>4</sub> 2 нед воздействия. Мыши в группах III и VI получали 4-MU перорально через зонд, в концентрации 800 мг/кг в день, в течение 2-х недель. Мышами из контрольной группы были интактные мыши.

По окончании эксперимента: мышей подвергали анестезии газовой смесью 2% изофлюрана с воздухом (скорость потока 0,6-0,8 л/мин) после чего проводили вскрытие и изъятие образцов печени. При завершении процедур мыши умерщвлялись путем дислокации шейных позвонков. Полученные образцы печени подготавливали для гистологического, иммуногистохимического анализа, выделения РНК и белка.

Гистологическая характеристика накопления коллагена при фиброзе и воздействие 4-MU (рисунок 2.1.1). Образцы печени размером 3-5 мм<sup>2</sup> экспериментальных и контрольных животных фиксировали в 10% растворе забуференного формалина (Biovitrum, Россия) в течение 12 часов. После этого осуществляли проводку кусочков ткани размером 5-7 мм<sup>3</sup> по спиртам (50%, 70%, 96% растворов этанола). Затем образцы помещались в кюветы со смесью 100% спирта (Деолабсолют, Bio-Optica, Италия) и стабилизированного хлороформа («ХЧ» Химмед, Россия), взятых в соотношении 1:1. Через 7-15 минут в зависимости от размера кусочка ткани погружались на дно кюветы. Далее образцы помещали в жидкий парафин, где инкубировали при 37° С. Через 8 часов парафин меняли на свежий, давали застыть и формировали блок для изготовления срезов толщиной 5 мкм на микротоме (Microm HM430, Thermo Fisher Scientific, Германия). Срезы помещались на адгезивные предметные стекла для последующей окраски. Готовые срезы окрашивали на коллаген, по методу ван-Гизона и Маллори используя наборы для

гистологической окраски (Биовитрум, Россия) следуя протоколам фирмы изготовителя. Съемку гистологических препаратов проводили с помощью микроскопа Keyence BZ9000 BioRevo. Съемка велась с использованием метода светлого поля при увеличении  $\times 10$ . Полученные изображения анализировали с помощью программного обеспечения ImageJ. Анализ накопления гиалуронана в ткани печени опытных животных. Для выявления гиалуроновой кислоты в ткани печени опытных животных использовали ГК-связывающий белок НАВР методом иммуногистохимического окрашивания и конфокальной микроскопии. Результаты данного исследования представлены на рисунке 2.1. Экспрессия белков регуляторов внеклеточного матрикса при воздействии 4-MU в фиброгенеза печени мышей. Образцы ткани массой 50 мг гомогенизировали в холодномлизирующембуфере RIPA (Thermo Fisher Scientific, Германия). После гомогенизации образцы инкубировали 30 минут на льду. Далее образцы центрифугировали 20 минут при 14000 об/мин. Супернатант переносили в новую 1.5 мл пробирку, для хранения. Во всех образцах определяли концентрацию белка колориметрическим BCA-методом, используя набор Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Германия) по протоколу фирмы изготовителя. Разделение белков проводили в 8% SDS-PAGE, количество белка в лунке составляло 50 мкг. Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану осуществляли с использованием Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad, США). Блокирование проводили 5% раствором сухого молока в буфере TBST в течение 60 минут. Далее мембрану инкубировали с первичными антителами в соответствии с рекомендациями производителя при комнатной температуре 60 минут. После инкубации мембрану трехкратно промывали буфером TBST. Далее мембрану инкубировали с вторичными антителами с пероксидазной меткой в течение 30 минут, после трехкратной промывки TBST использовали ECL для выявления сигнала. На рисунке 2.1.3. представлены данные Вестерн блот анализа. Список антител, использованных в работе. Первичные антитела использовали в разведении 1:1000: CD11b, Abcam-133357; FSTL1, RND Systems BAF1738;  $\alpha$ -SMA, Abcam-124964; Hyal1, Santa-Cruse-101340; CD44, LS-C150276; b-Actin, Sigma A5316; GAPDH, Abcam ab9485. Вторичные антитела использовали в разведении 1:5000: anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP -Jackson Immuno Research 31430, anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP – Jackson Immuno Research 31460 (США). Нами также проанализирована экспрессия маркеров фиброза с помощью ПЦР в реальном времени. Экстракция РНК из печени, проводимая методом Triagent (Sigma). Образцы РНК обрабатывали комплексом DNase I (Thermo Fisher Scientific). Обратную транскриптазо-полимеразную цепную реакцию (кДНК) проводили с помощью набора MMLV RT из 1 мкг РНК (Evrogen, Россия). Для

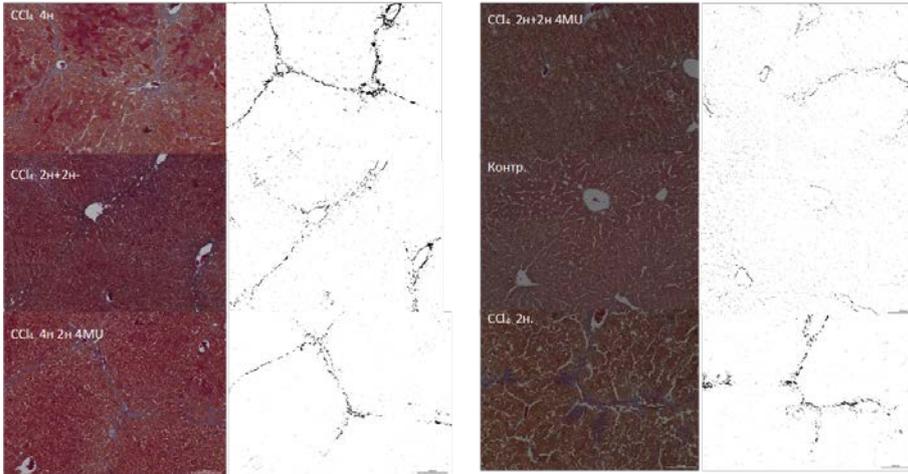
анализа qPCR использовался qPCRmix-HD SYBR (Evrogen, Россия). Данные анализа qPCR были обработаны и проанализированы с помощью Data Assis Software v.3.01 (Applied Biosystems, США). Транскриптомный анализ антифибротической активности 4-MU при фиброзе печени в печени экспериментальных групп определяли с помощью высокопроизводительного секвенирования (NGS).

### 2.1.3. РЕЗУЛЬТАТЫ

Изучена гистологическая картина срезов печени для каждой из исследуемых групп (рисунок 2.1.1). Три-хромное окрашивание выявило структурные изменения в группах, обработанных CCl<sub>4</sub>: увеличение накопления коллагена вблизи кровеносных сосудов, образование фиброзных перегородок и изменения паренхимы печеночной ткани [59]. Волокна коллагена образовывали тяжи, от одной портальной триады к другой, образуя зоны накопления вокруг кровеносных сосудов. Наблюдается увеличение центральной вены, иммунные и некротические клетки. Фиброзные нарушения ткани печени максимально проявлялись у мышей, получавших CCl<sub>4</sub> в течение 2 и 4 недель (группа I и VI). Гистологические образцы группы мышей, принимавших 4-MU (группы III и IV) показали более низкий процент накопления коллагена в сравнении с мышами, получавшими CCl<sub>4</sub> без 4-MU. Необходимо также отметить, что мы не наблюдали сильных изменений в паренхиме печени мышей, принимавших только 4-MU (рисунок 2.1.1).

Окрашивание ГК было на очень низком уровне в контрольные группы мышей и у мышей, получавших только 4-MU. В печени мышей с воздействием CCl<sub>4</sub> в течение 4 недель, накопление гиалуронана проявлялось по всему участку паренхимы – вокруг крупных кровеносных сосудов, синусоидов и крупных желчных протоков. В печени мышей, которые получали 4-MU в течение последних 2 недель 4 недельной ингаляции CCl<sub>4</sub>, накопление гиалуронана сохранялось вокруг сосудов, но исчезало из паренхимы печени (рисунок 2.2.2).

А



Б

### Накопление коллагена

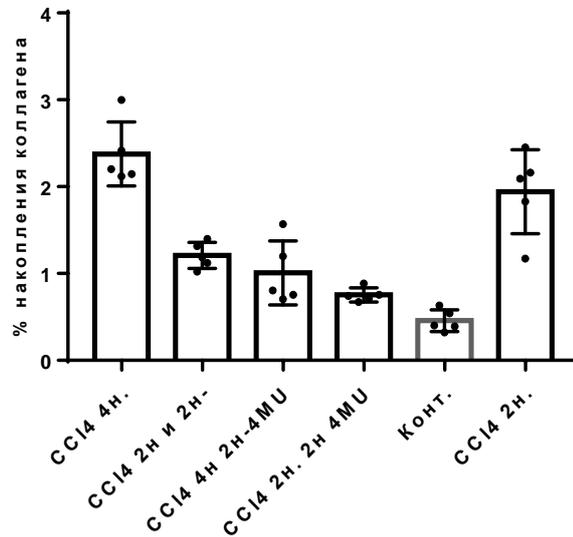


Рисунок 2.1.1. - Накопление коллагена у мышей, подвергнутых воздействию CCl<sub>4</sub>, и обработанных 4-MU. А - Окраска гистологических срезов по методу Ван Гизона. Голубым цветом окрашены волокна коллагена. Рядом монохромное изображение среза (черные пиксели соответствуют коллагеновым волокнам). (200 μm Увеличение x10). Б – оценка количества коллагена. Измерение производили с помощью программы ImagJ.

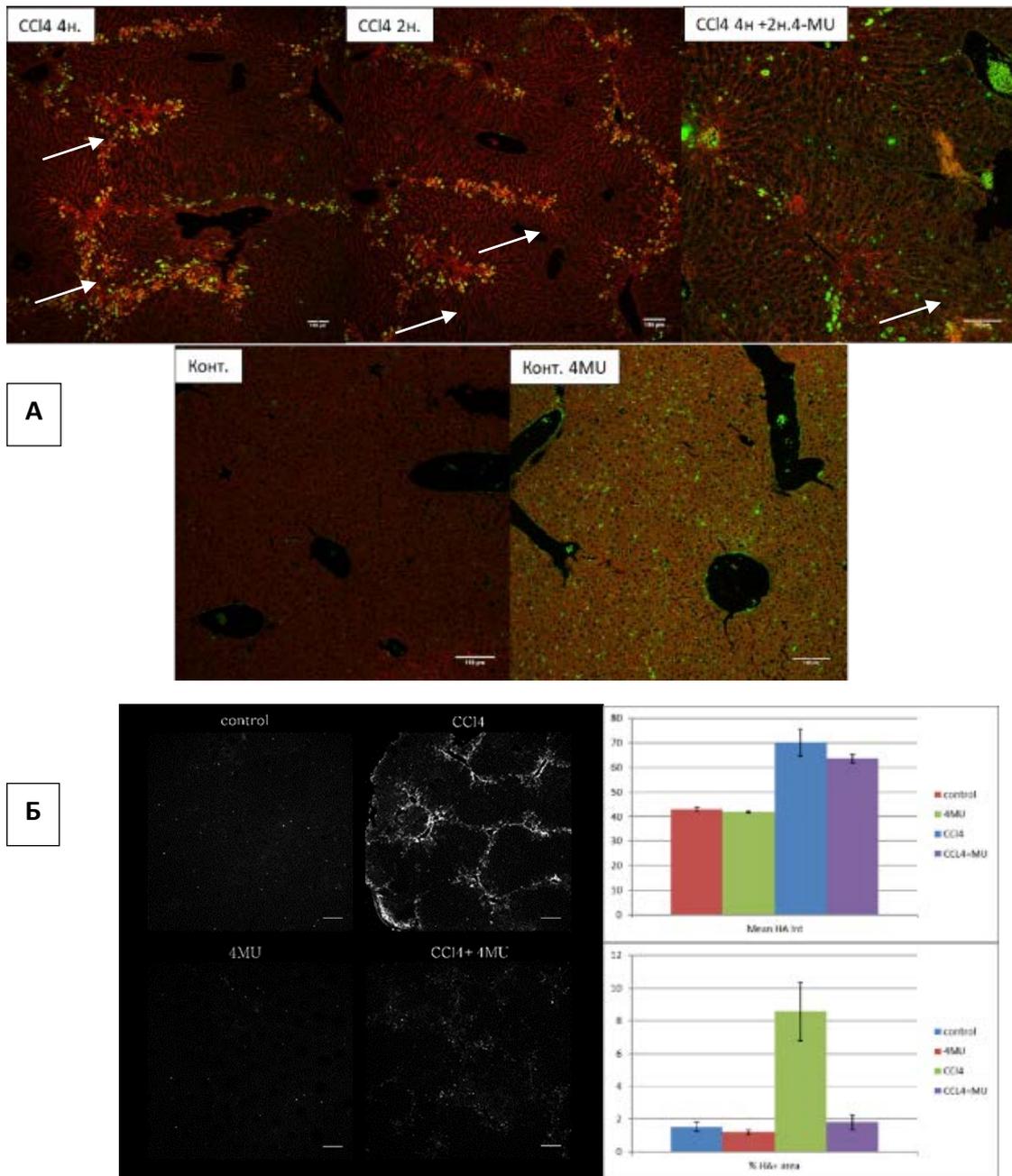


Рисунок 2.1.2. - Конфокальная микроскопия срезов печени опытных животных на гиалуронан. А – Иммунофлуоресцентное окрашивание срезов проводили помощью НАВР Alexa488. Стрелками обозначены области накопления ГК. Б – данные накопления ГК на срезе (увеличение x10).

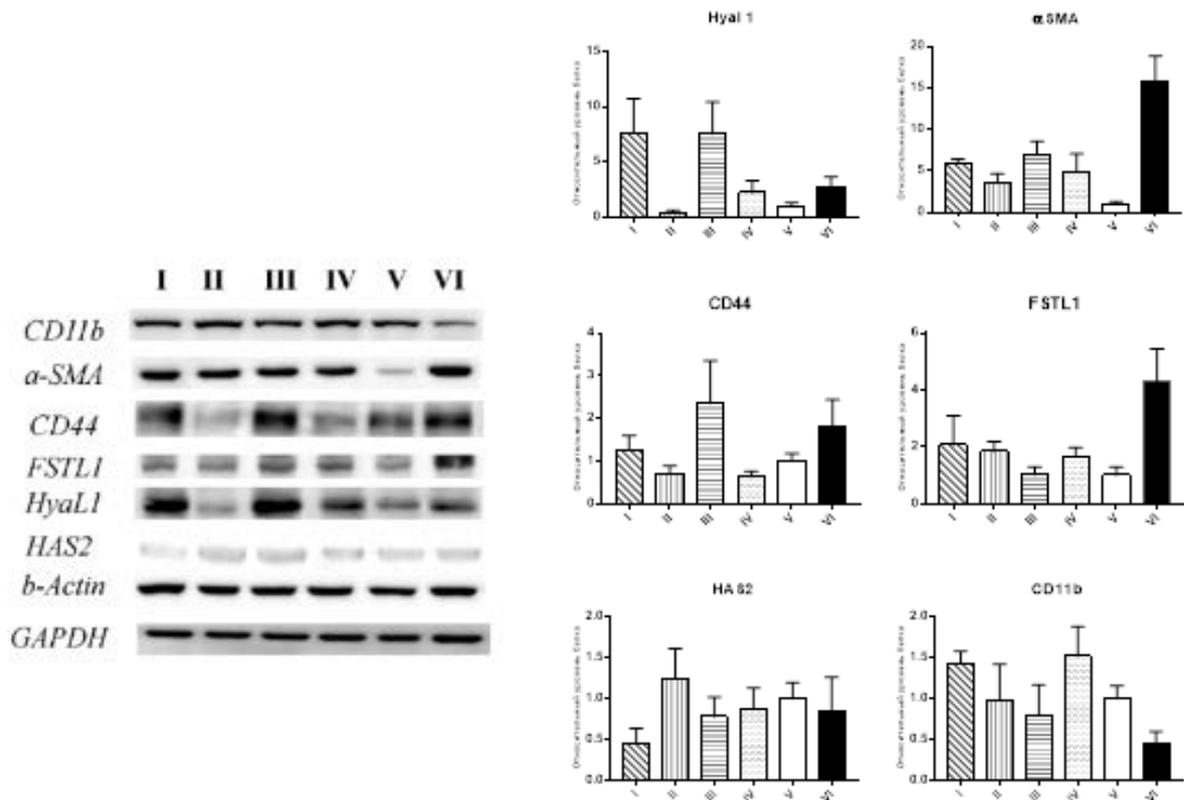


Рисунок 2.1.3. - Вестерн-блот анализ белков маркеров и регуляторов HSC клеток. А – Вестерн-блот белков маркеров фиброза. Б – Графическое изображение данных вестерн блот-гибридизации (mean ± S.D). По 8 образцов на каждую группу I - CCl4 4 нед воздействия; II- CCl4 2 нед воздействия далее 2 нед без воздействия; III - CCl4 4 нед и 4-MU последние 2 нед; IV - CCl4 2 нед и 2 нед 4-MU без воздействия CCl4; V - Контрольная группа; VI - CCl4 2 нед воздействия

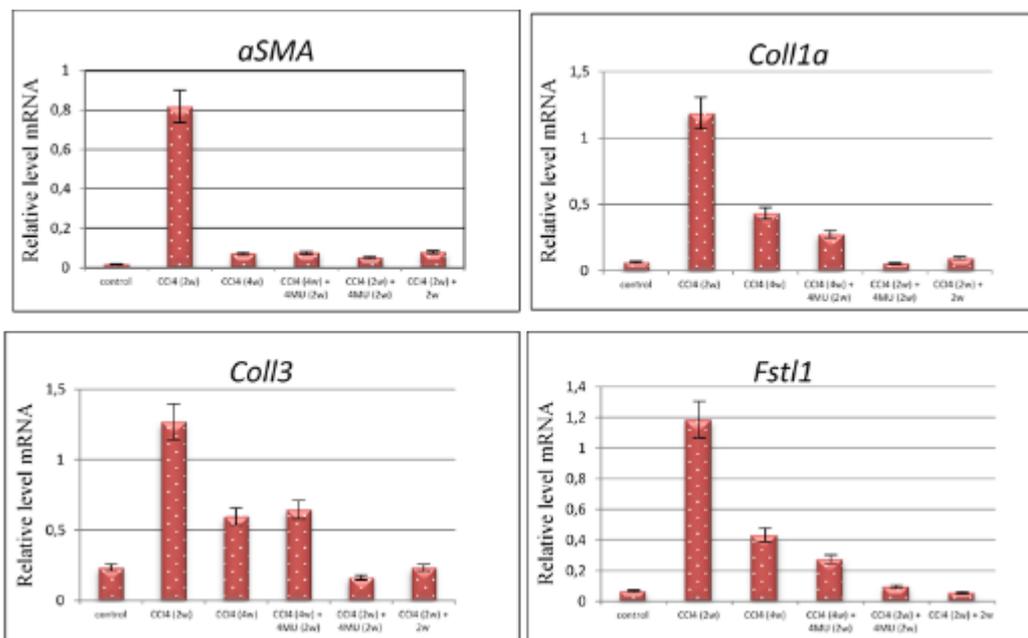


Рисунок 2.1.4. - Относительный уровень мРНК в образцах печени опытных животных. Нормализация экспрессии исследуемых генов проводилась относительно мРНК *GAPDH* (mean  $\pm$  S.E.)

Как видно из графиков, уровень экспрессии маркеров фиброза печени значительно возрастает относительно контроля, однако образцы печени мышей, принимающих 4-MU, показывают снижение экспрессии и стремятся к уровню мРНК нормальной ткани по сравнению с мышами, получавшими  $CCl_4$ .

Анализ данных транскриптов выявил 2847 дифференциально экспрессирующихся генов в 7 экспериментальных группах. Анализ основных компонентов показал, что 72 % вариабельности экспрессии генов. Многомерный анализ распределение экспрессии генов в экспериментальных группах выявил 3 основных кластера (рисунок 2.1.5).

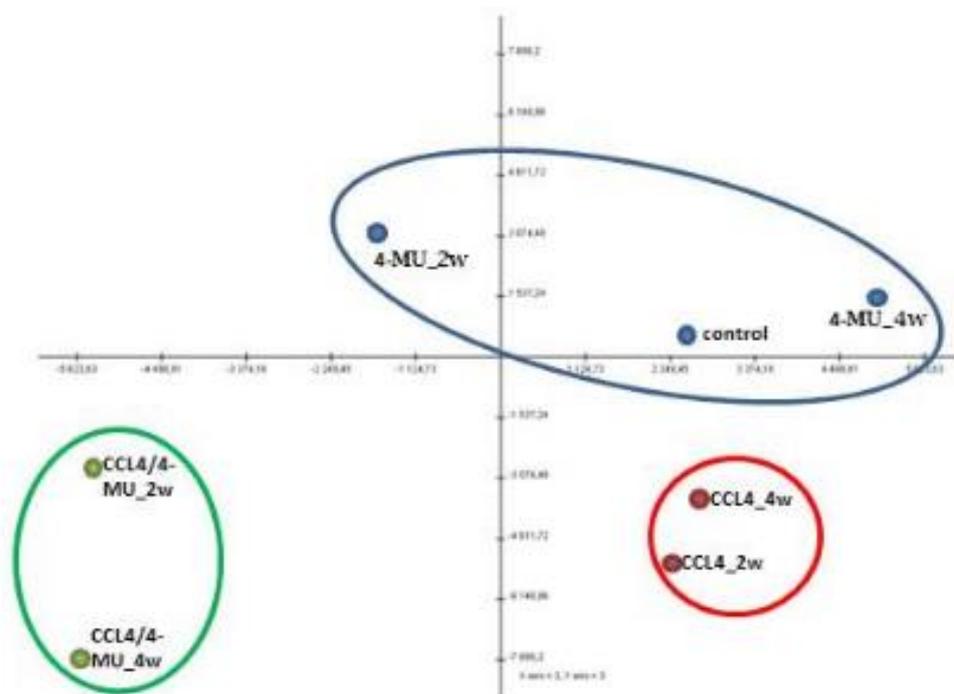


Рисунок 2.1.5. - Результаты анализа основных компонентов были получены по значениям 2847 дифференциально экспрессируемых генов, отобранных с помощью программы ANOVA.

Образцы животных, получавшие CCL<sub>4</sub>, разделялись от контрольной и обработанной CCL<sub>4</sub> / 4MU групп и составляли вторую когорту. Образцы ткани печени животных, при воздействии CCL<sub>4</sub> / 4MU, значительно отличались от контрольной группы и группы CCL<sub>4</sub>, и были объединены в третью когорту. Кластерный анализ дифференциально экспрессированных генов выявил 2 больших кластера (рисунок 2.1.6).

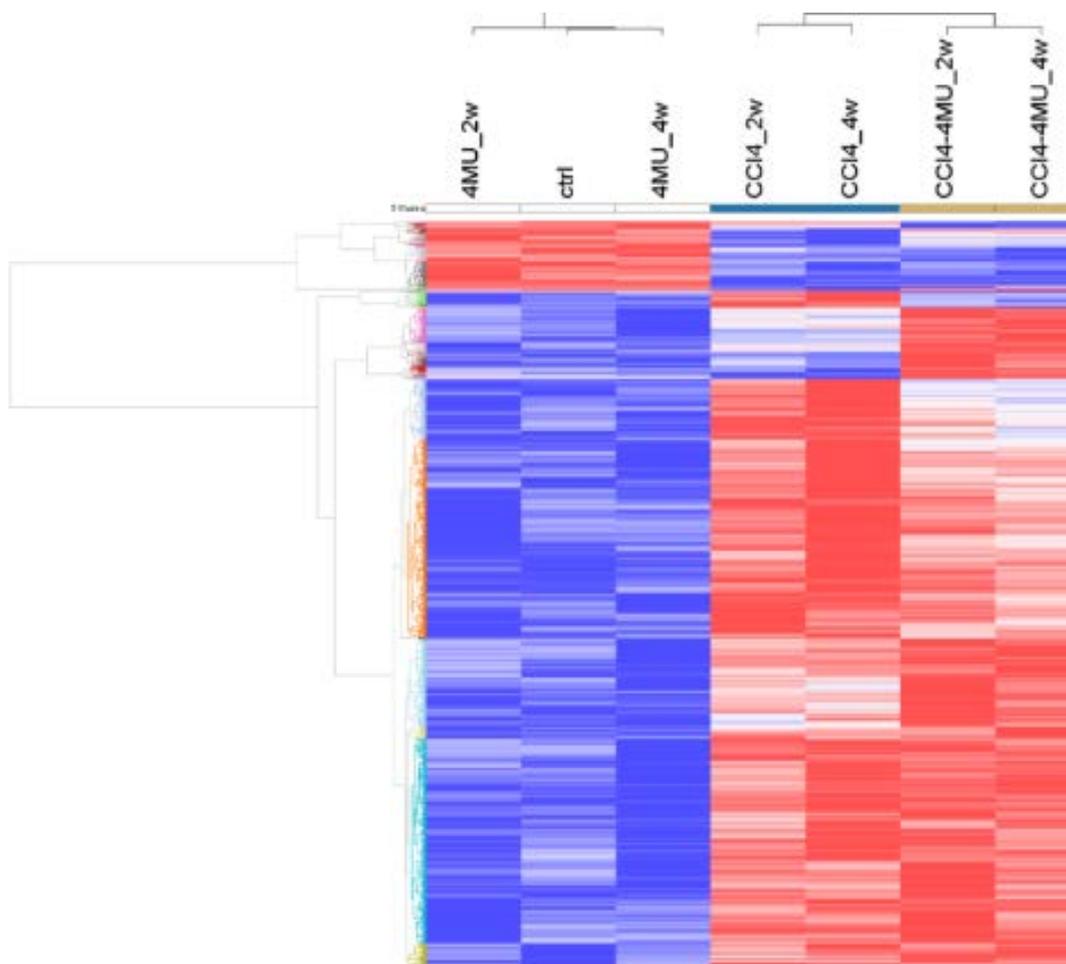


Рисунок 2.1.6. - Кластерный анализ дифференциально экспрессирующихся генов в группах экспериментальных животных

С использованием другой модельной системы, проведен сравнительный анализ роли IGF сигнального пути в развитии канцерогенеза разных экспериментальных моделей рака – ГКЦ мыши и рака поджелудочной железы. В исследованиях развития ГКЦ у мыши было обнаружено изменение профиля экспрессии генов сигнального пути Igf, в процессе опухолевой трансформации клеток, на фоне развития ранее выявленного хромотрипсиса в микроядрах полиплоидных гепатоцитов, что приводит к возникновению хромосомных aberrаций. На другой модели рака – в клеточной системе рака поджелудочной железы показано, что стимуляция сигнального пути IGF1 приводит к фосфорилированию его рецептора IGF1R и активации сигнального каскада Pi-3k/Akt в клетках рака этого органа. Как оказалось, активация пути Pi-3k/Akt не оказывает влияния на дифференцировку в клеточных линиях рака поджелудочной железы по мезенхимному типу и экспрессию маркеров эпителиальных белков [59, 60].

#### 2.1.4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, было изучено действие 4-метилумбиллиферона на модели регенерации печени после токсического воздействия СС14. Показано, что метилумбиллиферон снижает накопление коллагена и гиалуроновой кислоты при токсическом повреждении печени СС14, тем самым проявляет протекторные свойства ткани печени. Показано изменение основных маркеров фиброза, таких как Col1,  $\alpha$ SMA, *Hyal1*, при воздействии метилумбиллиферона. С помощью NGS анализа установлено что под действием метилумбиллиферона при развитии фиброза, снижено изменение экспрессии генов – участников сигнальным путей TGF-beta и Wnt/beta-catenin. Впервые показано снижение экспрессии гена *FSTL1*, что приводит к замедлению трансдифференцировки стеллатных клеток печени в миофибробласты.

Был проведен сравнительный анализ экспрессии компонентов IGF сигнального пути в развитии канцерогенеза разных экспериментальных моделей рака – ГКЦ мыши и рака поджелудочной железы. Выявлена перестройка работы генома, сопровождающая опухолевую трансформацию клеток в процессе развития онкогенеза в разработанных нами моделях рака. Исследования продемонстрировали важную роль в развитии рака локального микроокружения, или ниш, раковой клетки. Полученные результаты по исследованию экспрессии ключевых генов – регуляторов эпителио-мезенхимного перехода и миграции клеток на моделях гепатоцеллюлярной карциномы печени и рака поджелудочной железы *in vivo* и *in vitro* способствуют детализации картины генной регуляции в ходе канцерогенеза тканей млекопитающих и человека.

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

**ПОДРАЗДЕЛ 3.1. ИССЛЕДОВАНИЕ ПОВЕДЕНИЯ КЛЕТОК СО СВОЙСТВАМИ СТВОЛОВЫХ – ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ТКАНЕЙ НА МОДЕЛЯХ РЕГЕНЕРАЦИИ У URODELA, В УСЛОВИЯХ МИКРОГРАВИТАЦИИ**

**3.1.1. ВВЕДЕНИЕ**

Разработка моделей регенерации у низших и высших позвоночных для изучения возможностей восстановительных процессов в условиях длительных космических полетов является важным направлением исследований, имеющим практическое значение для космической реабилитационной медицины. В частности, исследования возможного вклада в регенерацию и поведение клеток со свойствами стволовости, в условиях реальной и симулированной невесомости позволят предвидеть ответ этих клеток в разных тканях человека, представляющие основной источник регенерации, в стрессовых условиях космического полета *in vivo*. Эта информация также необходима для разработки клеточных и биотехнологических подходов регенеративной медицины. В исследованиях роли внешних факторов на регенерационные ответы, используется широкий спектр клеточных моделей, наиболее распространенными из которых являются стволовые клетки человека и грызунов. В совокупности, результаты исследований разных моделей, демонстрируют влияние невесомости на миграцию, пролиферацию и дифференцировку стволовых клеток – ключевые процессы в развитии и регенерации тканей [61-67]. Влияние микрогравитации на стволовые клетки во многом зависит от ткани. Получены данные о влиянии реальной и симулированной невесомости на эмбриональные стволовые клетки млекопитающих; плюрипотентные стволовые клетки человека в процессе дифференцировки в кардиомиоциты; нейральные стволовые клетки крысы; мезенхимные стволовые клетки. Исследование эмбриональных стволовых клеток включено в обширную программу на борту станции ISS/Kibo. Картину полной цепи молекулярных событий от восприятия невесомости до измененного поведения стволовых клеток получить достаточно трудно, учитывая как положительное, так и отрицательное влияние разных факторов космического полета на клеточные процессы в разных системах. В этой связи обсуждается роль механических факторов и кислорода, которые способны вызывать изменения в экспрессии генов, контролирующих «стволовое» состояние, пролиферацию и дифференцировку клеток [68].

В данной работе мы сосредоточились на анализе роли и поведения стволовых клеток, которые обеспечивают источник регенерации тканей глаза, конечности, хвоста у низших позвоночных (Urodela). Этот модельный объект дает возможность исследовать эффекты реальной и симулированной невесомости (в том числе длительной) на стволовые клетки при регенерации *in vivo*, а также проводить сравнение ответов различных популяций стволовых клеток в пределах одного организма. В нашем обзоре обобщены результаты многолетних исследований регенерации у взрослых тритонов на российских биоспутниках и научных спутниках Фотон, а также в условиях симулированной невесомости. В этих экспериментах изучались клетки пигментного эпителия сетчатки, пигментного эпителия радужки, нейральной сетчатки, в частности, мюллеровской глии, а также клетки бластемы регенератов конечности и хвоста тритонов. Все клетки характеризуются тем или иным набором «незрелых» черт, сближающих их со стволовыми, среди которых: способность к смене дифференцировки, активность «эмбриональных» генов, запуск генов «стволовости» (*sox2*, *klf4*, *c-myc*) в ответ на повреждение ткани, ядерная локализация нуклеостемина, «эмбриональный» характер хроматина.

### 3.2.2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились на взрослых тритонах видов *Pleurodeles waltl*, *Triturus vulgaris*. Мы смогли стандартизировать большинство условий, используя очень однородные группы животных (по возрасту, полу), аналогичные экспериментальные протоколы (с минимальными вариациями для соответствия конкретным задачам), единообразную технику работы, методы обращения с животными и системы технического обслуживания. В полетных экспериментах на борту спутника, группу животных, называемых «полетной группой», подвергшихся воздействию невесомости в специальной камере, оборудованной газообменными фильтрами (контейнер «Тритон»), сравнивали с несколькими контрольными группами. Базальный контроль – животные, фиксированные в день запуска; аквариальный контроль – животные, прошедшие те же процедуры, что и полетная группа, но содержащиеся в воде в лабораторных условиях; синхронный контроль – животные, прошедшие те же процедуры и содержащиеся в лаборатории в тех же камерах, что и полетная группа. Эти сведения о 12-ти проведенных полетных экспериментах, позволили создать массив воспроизводимых и заслуживающих доверия результатов (таблица 3.1.1).

Таблица 3.1.1. - Полеты и характеристики животных: тритонов (*Pleurodeles waltl*; все, кроме Бион М1) и мышей (C57Bl/6N SPF; Бион-М1).

Полет	Год	Длительность, дней	Всего/погибло, шт	Возраст*	Масса, г	Длина, см
Cosmos-1667	1985	7	30/0	10	10.0-11.0	9.5-10.0
Cosmos-1887	1987	13	70/8	6	6.5-7.0	10.0-11.0
Фотон-4	1988	14	30/0	7	6.5-7.0	11.0-12.0
Фотон-5	1989	15	30/0	2	4.6-5.0	7.0-8.0
Cosmos-2044	1989	14	55/0	2	4.5-5.5	7.0-8.0
Фотон-6	1990	16	67/5	3	5.0-6.0	8.0-9.0
Фотон-7	1991	16	65/0	11	10.5-11.0	12.5-13.0
Cosmos-2229	1992-1993	12	45/9	12	11.0-12.0	15.0-17.0
Бион-11	1996-1997	14	30/0	12	8.5-9.5	12.0-13.5
Фотон-М2	2005	16	45/1	6	5.5-6.5	9.0-10.0
Фотон-М3	2007	12	50/0	7	6.5-7.5	11.0-12.0
Бион-М1	2013	30	28/0	8-9 нед	25.0-30.0	10.0-15.0

\* для тритонов возраст указан в месяцах после метаморфоза

### 3.2.3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В пигментном эпителии радужки - источнике для регенерации хрусталика, через 7 дней полета росла доля дедифференцированных, пролиферирующих клеток (Cosmos-1667, 1985) [68]. Радиоавтографический анализ подтвердил усиление пролиферации клеток, образующих хрусталик, и клеток из зон роста сетчатки и радужки, также имеющих черты стволовых (Cosmos-1887, Cosmos-2044 и Фотон-7) [70-73], которое сохраняется в течение 2 недель после посадки и приводит к увеличению регенерата хрусталика. Эффект отмечен даже в случае, когда космический полет предшествовал операции. Результаты были воспроизведены в условиях симулированной в клиностате невесомости в Кельнском университете, Германия [74], что доказывает решающую роль невесомости в этих изменениях. Интересно, что был обнаружен единичный случай разрастания ткани из частично депигментированных клеток радужки, вследствие избыточной пролиферации; в результате нарушалась морфология сетчатки, но клетки не имели свойств раковых. Сведения из данных литературы показывают возможность системных механизмов долговременного действия невесомости на клетки со свойствами стволовых, в т.ч. включающих компоненты комплемента C3 и C5, а также Wnt и Shh. Причем, действие гравитационной перегрузки на регенерацию хрусталика тритона прямо противоположно действию невесомости. Так, в исследованиях влияния невесомости в полете в спутнике Фотон-М3 (2007) показано, что в невесомости более выражена активация Fgf2, сопровождающая пролиферацию клеток радужки, а также

шаперона Hsp90, влияющего на широкий спектр клеточных процессов, в том числе связанных с восстановлением после повреждения [75]. Исследования гравитационных перегрузок на регенерацию хрусталика тритона в Эймском исследовательском центре НАСА, наоборот, показали ее замедление и десинхронизацию под действием нагрузки 2g, а также возникновение в ряде случаев отслоения сетчатки и нарушение локализации Fgf2 и его рецепторов [76].

Дана сравнительная характеристика моделей регенерации сетчатки из клеток РПЭ: ее отслоения, перерезки зрительного нерва, удаления сетчатки. Радиоавтографический анализ клеток пигментного эпителия сетчатки, регенерирующей после перерезки нерва во время 14-дневного полета на Бион-11, показал увеличение пролиферации в полете в 1.2-1.5 раза по сравнению с контролем [77], а также ускорение дедифференцировки пигментных клеток и регенерации сетчатки. Эксперименты в условиях симулированной невесомости проводились с использованием модели отслойки сетчатки у тритонов [78-79] и показали снижение уровня апоптоза, более активные процессы редифференцировки пигментного эпителия и регенерации сетчатки. Сделано заключение о положительном влиянии невесомости на пролиферацию и начало конверсии клеток пигментного эпителия сетчатки при регенерации. Приведены соображения о возможных механизмах этих изменений, включающих как системные, так и местные, как, например, сигнальные пути Fgf2, Wnt, Notch-Delta и транскрипционные факторы Pax6, Sox2, Oct4.

После микрохирургической отслойки сетчатки тритона растет популяция клеток мюллеровской глии (по радиоавтографической оценке), в условиях симулированной невесомости этот рост выражен в 1.5-2.0 раза больше [78, 80]. После перерезки зрительного нерва, клеток глии Мюллера, позитивных по Gfar, в группе животных на борту биоспутника Бион 11 было обнаружено на 40% больше, чем в контроле [80, 81]. Усиление окрашивания на белок Gfar, а также на Hsp90, наблюдалось и в случае регенерации хрусталика во время полета Фотон М3, после его удаления [75, 80]. В этой модели, глия Мюллера реагировала на изменения внутриглазного давления, похожая реакция имела место и в интактном глазу во время полета. Такое поведение клеток мюллеровской глии является клинически важным для космической медицины. Отмечено усиление экспрессии Gfar и Hsp90 в пролиферирующих клетках в ответ на повреждение. Наблюдаемые ответы мюллеровской глии на невесомость напоминали реактивный глиоз в сетчатке млекопитающих. Проведены параллели с поведением нейральных стволовых клеток в космических условиях. Они также сохраняли свою «стволовость», в том числе на уровне экспрессии соответствующих транскрипционных факторов, хотя медленнее

пролиферировали и легче проходили нейральную дифференцировку, а изменения эти опосредовались сигналами WNT, важными и для реактивного глиоза. Принимая во внимание различия в типах клеток, их происхождении и условиях эксперимента (*in vivo* и *in vitro*), мы можем резюмировать, что невесомость не нарушает «стволовое» состояние клеток в тканях глаза и не блокирует регенеративные реакции, хотя может сдвигать баланс между поддержанием популяции и дифференцировкой.

В вышеупомянутых многолетних экспериментах также активно изучалась регенерация моделей хвоста и конечностей тритона. Невесомость ускорила и синхронизировала регенерацию конечности тритона, с точки зрения размера и стадии развития, эффект сохранялся в течение 2 недель после посадки и был замечен даже в случае полета, проведенного до операции, индуцирующей регенерацию (рисунок 3.1.1) [69, 70, 73, 82-85]. Регенерация хвоста *P.waltl* была менее чувствительна к космическому полету. В ходе полетов Фотон -М2 и Фотон-М3 [86] размеры регенератов хвоста в разных группах не отличались, хотя имели место некоторые гистологические отличия между группами.

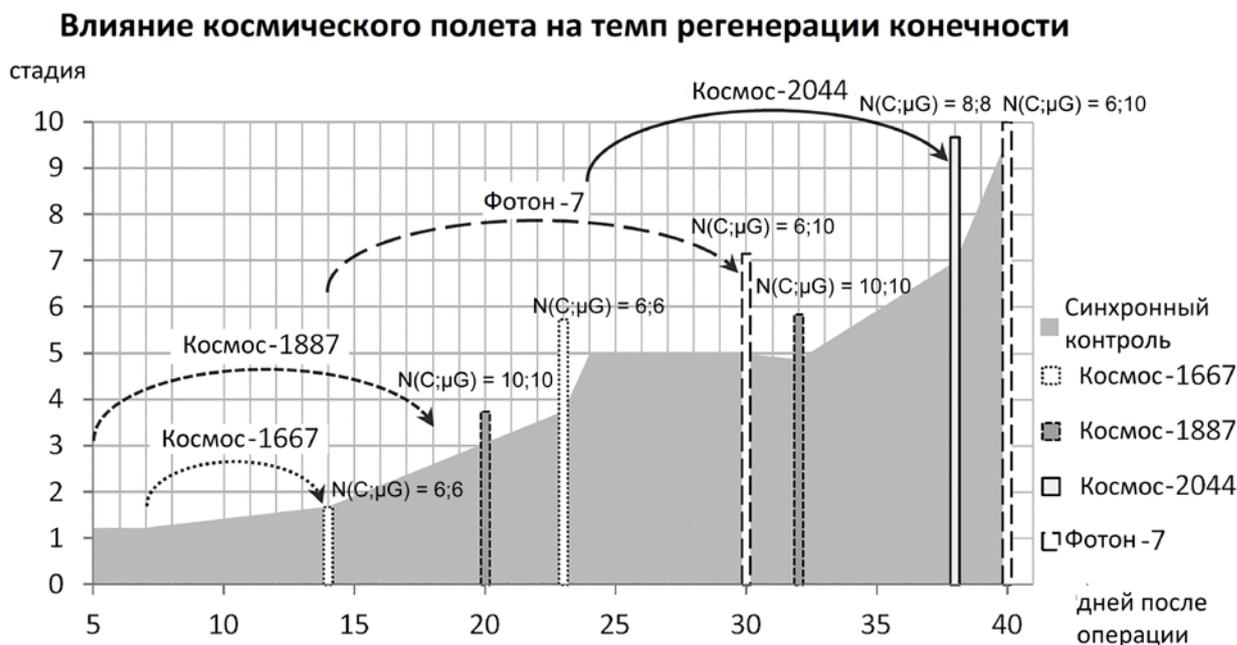


Рисунок 3.1.1. - Ускорение регенерации конечности в космическом полете (объединены данные четырех экспериментов). N(C;μG) – количество особей в контроле и невесомости, соответственно

Результаты экспериментов по регенерации конечности и хвоста тритонов двух видов (*P.waltl* и *T.vulgaris*) в условиях симулированной невесомости в целом повторили полученные в космическом полете [74, 87], подтверждая ведущую роль невесомости. В

ходе нескольких полетов разными способами оценивалась пролиферативная активность клеток регенератов; неоднократно сообщалось, что индексы пролиферации были выше в регенератах конечностей после космического полета, чем в синхронном контроле [69, 73, 83, 85]. Сравнения, однако, часто были затруднены из-за различий в достигнутой стадии; в полете Фотон-7 была проведена нормировка по стадиям регенерации конечности [74]. Регенераты из групп синхронного и аквариального контролей продемонстрировали практически идентичную динамику пролиферации клеток. В полетной группе уровень пролиферации на стадии аккумуляции бластемы был выше контрольных значений в 1.5-2.0 раза. Такие же значения были получены для бластемы и эпидермиса регенератов хвоста [86]. Клетки эпендимы, особенно на апикальном уровне, которые вносят вклад в регенерацию спинного мозга, также активнее делились в условиях космоса. В эксперименте Фотон-7 сравнивали влияние невесомости на два режима регенерации у тритона: тканевую регенерацию измельченных мышц и эпиморфную регенерацию после ампутации конечности [70]. В космическом полете первая – замедляется, а эпиморфная регенерация, наоборот, ускоряется. Было показано, что невесомость оказывает на интактные мышцы тритона столь же отрицательное воздействие, что и на мышцы млекопитающих: в них наблюдались все характерные гистологические признаки атрофии. Интересно, что до некоторой степени это происходило и в синхронном контроле; но во всех случаях частично компенсировалось за 10 дней. Высказано предположение, что космический полет приводит к дегенерации мышечных волокон в целом, что в случае неповрежденных мышц приводит к атрофии. Тем не менее, во время эпиморфной регенерации, действие невесомости облегчает процесс дедифференцировки мышц, вносящий основной вклад в формирование бластемы конечности. Напротив, дегенерация мышечных волокон в заживающих измельченных мышцах затрудняет регенерацию, поскольку последняя происходит через активацию резидентных взрослых стволовых клеток (пост-сателлитных клеток) и не зависит от дедифференцировки мышц. Регенерация же хвоста тритона в меньшей степени, чем регенерация конечности, зависит от мышечной дедифференцировки и в большей – от СК [88], что согласуется с отсутствием выраженного ускоряющего эффекта невесомости на регенерацию этой модели.

### 3.2.4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Десятилетия изучения поведения клеток-источников регенерации у тритона *in vivo* в условиях реальной и симулированной невесомости показали влияние невесомости на пролиферацию, дифференцировку и конверсию клеток. Обобщены результаты, полученные для различных регенерирующих тканей тритона [89]. Клетки пигментного эпителия радужки и сетчатки, клетки ростовых зон глаза, мюллеровская глия, обладающие чертами стволовых клеток, в условиях невесомости пролиферируют активнее. Причем этот эффект сохраняется несколько недель после ее воздействия. Мы предполагаем, что он опосредован системными изменениями, влияющими на локальные регуляторные пути, как, например, Fgf, Wnt и Hsp. Активация пролиферации клеток пигментного эпителия радужки и сетчатки сопровождается быстрой дифференцировкой и ускорением регенерации в целом. Интенсивная пролиферация мюллеровской глии приводит к явлению реактивного глиоза, направленного на защиту сетчатки в условиях стресса. Усиление пролиферации также очевидно в клетках бластемы регенерирующей конечности тритона в условиях невесомости. В то же время мышцы тритона, вероятно, в невесомости претерпевают распад волокон, как и мышцы млекопитающих. Этот процесс может привести к атрофии (в интактных мышцах), затруднить регенерацию (в иссеченных мышцах), либо ускорить регенерацию (при удалении фрагмента конечности).

Повышенная пролиферация клеток в изученных моделях *in vivo* в основном положительно влияла на регенерацию, но мы обнаружили также случаи морфологических aberrаций во вновь сформированных глазах, конечностях и хвостах. Полученные данные о влиянии невесомости на регенерацию тканей, актуальны как для исследования стволовых клеток (*in vivo* анализ которых часто затруднен), так и для гравитационной биологии, и позволяют проводить дальнейшие исследования основных молекулярных механизмов.

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

### 4.1 ВВЕДЕНИЕ

Новые нервные клетки рождаются и функционально интегрируются в нервную сеть зубчатой извилины гиппокампа на протяжении всей жизни млекопитающих, включая человека [90-93]. Начало новым нейронам дают так называемые стволовые клетки (СК), которые морфологически и по некоторым маркерам сходны с клетками радиальной глии развивающегося мозга [94, 95]. Тела этих СК располагаются в субгранулярной зоне зубчатой извилины. Они простирают сквозь всю толщу гранулярного слоя один апикальный отросток, который заканчивается ветвлением, распространяющимся примерно на треть ширины молекулярного слоя [94]. Эти клетки способны делиться, давая начало прогениторным клеткам, которые в свою очередь дифференцируются в нейробласты, а затем в нейроны.

Многочисленные исследования показывают, что в постнатальном онтогенезе нейрогенез в гиппокампе важен для когнитивных функций [96]. В то же время различные патологические состояния мозга часто сопровождаются нарушениями в продукции новых нейронов [97-104]. В этой связи нейрогенный каскад в гиппокампе рассматривается как мишень для терапии когнитивных нарушений и депрессии, развивающихся на фоне нейродегенеративных, нейропсихических и неврологических заболеваний, противораковой терапии или старения мозга. Имея представления о детальной картине нейрогенного каскада, мы сможем определить, какие его этапы подвергаются негативному воздействию и что необходимо «починить» для восстановления нейрогенеза, когнитивных функций и памяти. Кроме того, возможность управлять работой нейрогенного каскада открывает новые перспективы в использовании собственных клеточных резервов мозга для репарации нервной ткани в случае травмы или нейродегенеративного заболевания.

Понимание того, как устроен нейрогенный каскад и жизненный цикл СК, важно не только для того, чтобы определить потенциальные мишени для пронеурогенных факторов, но и для оценки долгосрочных последствий действия таких факторов. Сегодня в литературе рассматривается несколько сценариев, описывающих жизненный цикл СК и работу нейрогенного каскада [105]. В своих исследованиях в качестве доминирующего сценария мы рассматриваем модель стволовых клеток «однократного применения» [94]. В этой модели большая часть стволовых клеток находится в состоянии покоя. Однажды войдя в клеточный цикл, стволовые клетки подвергаются ассиметричному делению ограниченное число раз, давая начало транзиторным амплифицирующимся клеткам [94,

106, 107]. Последние делятся симметрично также ограниченное число раз. Часть транзиторных амплифицирующихся клеток подвергается апоптозу или элиминируется клетками микроглии [108]. Выжившие клетки становятся нейробластами, которые дифференцируются в зрелые нейроны гранулярного слоя, интегрируясь в существующую нейронную сеть. В свою очередь, СК после ограниченного числа делений утрачивают морфологию и молекулярные маркеры специфичные для клеток радиальной глии, и, по-видимому, необратимо превращаются в обычные астроциты гранулярного слоя, и никогда не возвращаются в клеточный цикл [94, 109]. Одним из биологических проявлений работы такого каскада нейрогенеза является истощение пула СК в зубчатой извилине с возрастом. Сегодня можно считать установленным, что возрастное снижение нейрогенеза в гиппокампе связано с истощением пула СК в результате их деления [94]. Однако, в литературе рассматриваются сценарии, где СК обладают способностью к симметричным делениям и чередованию фаз покоя и пролиферации [110, 111]. В этой связи для проверки правильности выводов модели СК «одноразового применения» об отсутствии чередования покоящегося и пролиферативного состояния мы впервые использовали недавно разработанный нами метод тройного маркирования [112, 113] для того, чтобы проверить, способны ли делящиеся СК, однажды вышедшие из клеточного цикла, вновь начать делиться.

#### 4.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы самцы мышей трансгенной линии nestin-GFP [114] в возрасте 1.5 месяца. Животные содержались в группах не более 4 особей в клетке с циклом день/ночь 12 ч. Доставка 5-йодо-2'-деоксиуридина (ЙоддУ), 5-хлоро-2'-деоксиуридина (ХлдУ) и 5-этинил-2'-деоксиуридина (ЭтдУ) осуществлялась по схеме, представленной на Рисунке 1. В промежуток времени от -1 до 0 дня животные всех экспериментальных групп получили 3 внутривентрикулярные инъекции ЙоддУ (173 мг/кг в фосфатно-солевом буфере (PBS)) с интервалом в 7 часов. Еще через 7 часов животным под действием общего наркоза (смесь кетамина 100 мг/кг и ксилазина 20 мг/кг) были имплантированы подкожно осмотические насосы (Alzet), предварительно заполненные раствором ХлдУ в диметилсульфоксиде. Эти осмотические насосы выкачивали в подкожное пространство ХлдУ в дозе 128 мг/кг в сутки. Затем проводилась повторная операция, в которой насосы с ХлдУ извлекались, а насосы с ЭтдУ (доза 123 мг/кг в сутки) имплантировались. Животные были разбиты на четыре группы (по 4-5 мышей в группе) таким образом, чтобы можно было «поймать» клетки, вернувшиеся в клеточный цикл, на 3-ий день (группа 2дня\_1день), на 4-ый день (группа 3дня\_1день), с 5-го по 7-ой день

(группа 4дня\_3дня) и с 8-го по 14-ый день (группа 7дней\_7дней). Эвтаназию животных проводили путем транскардиальной перфузии.

Перед транскардиальной перфузией мышей глубоко анестезировали введением 400 мкл 15% раствором хлоралгидрата в фосфатно-солевом буфере (PBS). Животных транскардиальноперфузировали по стандартной методике сначала раствором PBS, а затем охлажденным раствором 4% параформальдегида. После фиксации мозг отмывали в растворе PBS и приготавливали сагиттальные срезы толщиной 50 мкм на вибраторе, которые собирали последовательно в шесть лунок 24-луночной плашки. Таким образом, каждая лунка содержала целое полушарие, составленное из каждого 6-го среза [114]. По одной такой лунке от каждой мыши в эксперименте было взято для проведения окрашивания на три аналога тимидина и белок GFP для фенотипирования стволовых и прогениторных клеток. Окрашивание проводили в соответствии с нашим протоколом [111, 112]. Коротко, срезы инкубировались в растворе с детергентом для растворения клеточных мембран, чтобы в последующем обеспечить доступ антител к внутриклеточным антигенам на срезах мозга. Затем, проводилась первая клик реакция с флуоресцентным азидом для выявления ЭТДУ и вторая клик реакция с нефлуоресцентным азидом для блокировки неспецифического связывания антител против ХлДУ и ЙодДУ с ЭТДУ. После клик реакции срезы подвергали денатурированию ДНК в растворе соляной кислоты, что необходимо для связывания антител с ХлДУ и ЙодДУ. Нейтрализацию кислоты проводили 1М раствором борной кислоты. Срезы затем инкубировали в растворе первичных антител против ХлДУ, ЙодДУ и GFP белка. После отмывок проводили окрашивание вторичными антителами, помеченными различными флуорохромами. Срезы после окрашивания наносили на предметные стекла «мокрым» способом и заключали в специальную среду для флуоресцентной микроскопии под покрывное стекло.

Готовые препараты сагиттальных срезов сканировали на конфокальном микроскопе Perkin Elmer с так называемым спиннинг диском. На полученных изображениях проводили подсчет СК и прогениторных клеток, включивших любые комбинации меток, и аппроксимацию на их числа на целый мозг по ранее предложенному алгоритму [94, 114]. Количественные данные представляли в виде: среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего.

### 4.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основная идея в предложенной нами схеме тройного маркирования (рисунок 4.1.1.) заключается в том, что вначале мы метим с помощью трех внутрибрюшинных инъекций ЙоддУ все клетки, находящиеся в клеточном цикле (длительность клеточного цикла у СК и прогениторных клеток составляет примерно 28 часов). Часть из помеченных плеток уйдет в фазу G0, а часть продолжит деления. Чтобы отличить эти две популяции клеток, мы имплантируем осмотический насос, который непрерывно выкачивает ХлдУ. Благодаря этому, те клетки, которые продолжили деление после введения ЙоддУ, будут помечены второй меткой ХлдУ. Далее через различные промежутки времени (2, 3, 4 и 7 дней) после имплантации осмотических насосов с ХлдУ, они извлекаются, и на их место имплантируются осмотические насосы, которые выкачивают третью метку ЭтдУ. В этом случае мы сможем посмотреть, есть ли ЙоддУ (1-ая метка) - и ЭтдУ (2-ая метка) - положительные клетки, которые при этом не были бы помечены ХлдУ, на 3-ий день (группа 2дня\_1день), на 4-ый день (группа 3дня\_1день), с 5-го по 7-ой день (группа 4дня\_3дня) и с 8-го по 14-ый день (группа 7дней\_7дней). Выбор таких временных интервалов обусловлен тем, что, даже если предполагать наличие чередования покоящегося и пролиферативного состояния у стволовых и прогениторных клеток, то мы точно не знаем, каков интервал такого чередования. Чтобы это узнать мы разбили период времени от 2-х до 14-ти дней на более короткие временные отрезки.

Количественный анализ клеток с различными комбинациями меток их фенотипирование (наличие сигнала GFP для прогениторных клеток и наличие сигнала GFP и апикального отростка, простирающегося, как минимум, на треть гранулярного слоя для стволовых клеток), позволили установить, что у животных обнаруживаются как СК, так и прогениторные клетки, которые несут только 1-ую метку ЙоддУ и 3-ью метку ЭтдУ. При этом такие клетки детектируются на всех изученных временных интервалах. Однако, число таких клеток крайне невелико и, в среднем, не превышает 2% от общего числа делящихся клеток (рисунок 4.1.2). Кроме того, по результатам количественного анализа нельзя выделить временной интервал, в котором доля клеток, заново вошедших в цикл, была бы достоверно больше.

Полученные результаты показывают, что среди СК и прогениторных клеток, которые покинули клеточный цикл, есть те, которые снова делятся после пребывания в состоянии покоя в течение некоторого времени. Однако число таких событий крайне невелико. Равномерность распределения таких событий между разными временными интервалами указывает на то, что такие события носят скорее случайный характер, чем представляют собой закономерность. Другими словами, эти события не вносят

существенного вклада в общую картину пролиферации СК и прогениторных клеток и в целом находятся в согласии с моделью СК «одноразового применения» [94]. Здесь важно отметить, что эта модель не исключает такие события, как симметричные деления или чередование покоящегося и пролиферативного состояния у СК, а лишь утверждает, что на уровне популяции СК ведут себя так, как если бы они все были бы «одноразовыми». Прижизненные наблюдения нейрогенеза [107] и анализ индивидуальных клонов СК [109] показали разнообразие судеб СК и их потомков. Однако усредненные показатели кинетики и способов деления в этих работах оказываются не противоречащими модели СК «одноразового применения». Необходимо также обратить внимание на то, что жизненный цикл СК и способы их деления могут существенно отличаться в мозге при его патологии [110].

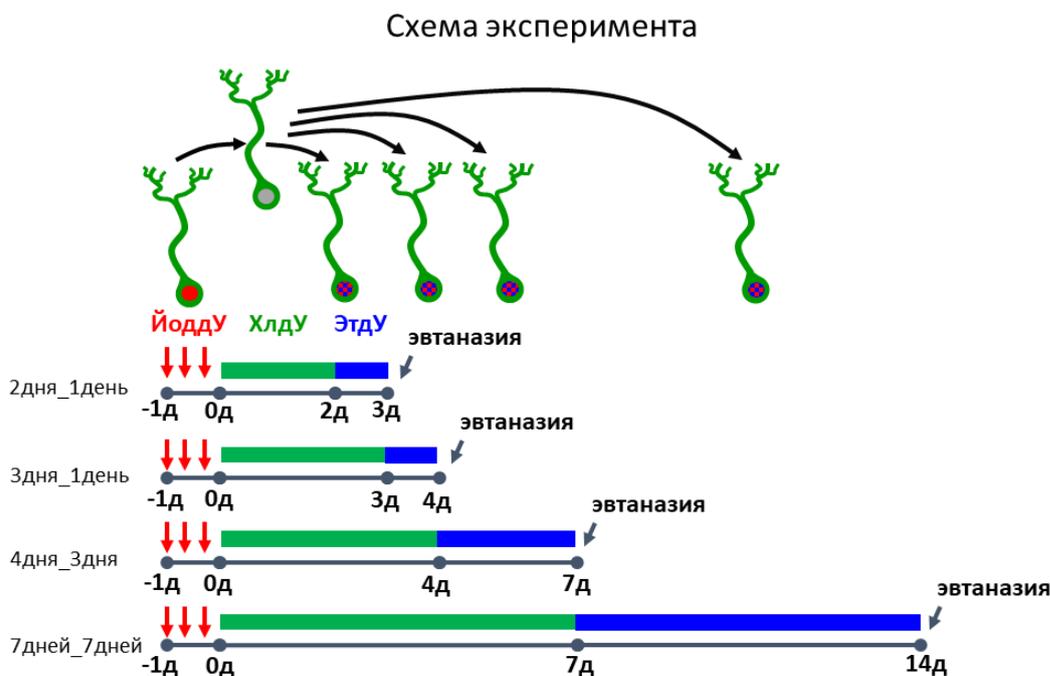


Рисунок 4.1.1. - Схема тройного маркирования для идентификации стволовых и прогениторных клеток, чередующих пролиферативное и покоящееся состояния

Доля стволовых и прогениторных клеток  
только с 1-ой и 3-ей меткой в общей  
популяции клеток делящихся клеток.

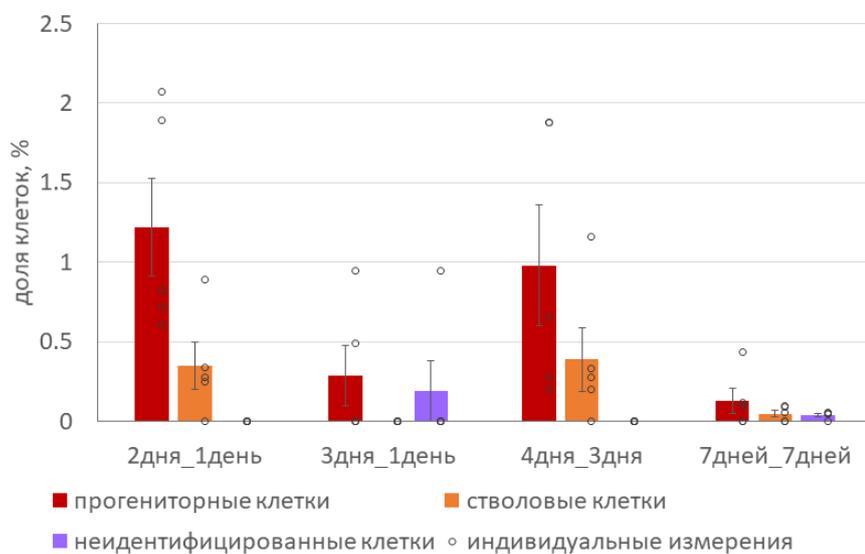


Рисунок 4.1.2. - Доля стволовых и прогениторных клеток (в процентах) в общей популяции делящихся клеток, которые, выйдя из клеточного цикла в 0-ой день, снова вошли в него в следующих временных интервалах: на 3-ий день (группа 2 дня\_1 день), на 4-ый день (группа 3 дня\_1 день), с 5-го по 7-ой день (группа 4 дня\_3 дня) и с 8-го по 14-ый день (группа 7 дней\_7 дней)

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе с использованием разработанного нами ранее метода тройного маркирования и путем прямых измерений мы показали, что у стволовых и прогениторных клеток в зубчатой извилине гиппокампа отсутствует чередование покоящегося и пролиферативного состояния. Обнаруженный нами возврат клеток из состояния покоя в клеточный цикл носит, по-видимому, случайный характер и не демонстрирует какую-либо закономерность или периодичность. Эти результаты подтверждают ранее предложенную модель СК «одноразового применения» [115]. Полученные данные развивают наши представления о жизненном цикле стволовых клеток гиппокампа, их потенциале и возможностях использования их резерва для коррекции нарушенного нейрогенеза при разнообразных патологических состояниях мозга. Кроме того, полученные результаты заставляют нас пересмотреть взгляды на действие тех пронеурогенных факторов, которые активируют деление покоящихся СК, поскольку в долгосрочной перспективе их изначально позитивное действие может приводить к преждевременному истощению пула стволовых клеток [116].

Работа выполняется в рамках совместного проекта ИБР РАН и лаборатории профессора Г.Н. Ениколопова, Университет Стони Брук, г. Стони Брук, шт. Нью-Йорк, США. Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП по биологии развития ИБР РАН.

## ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспериментальная работа выполнена на традиционных и оригинальных моделях: эпиморфная регенерация тканей глаза низших позвоночных (*Urodela*); клеточные линии РПЭ человека и органотипическое культивирования нейральных тканей глаза низших позвоночных (тритоны); ткани глаза плодов человека; модели тканевой и эпиморфной регенерации (ткани глаза, конечности, хвоста тритонов), в условиях невесомости; модель нейрогенеза в гиппокампе мыши; модели канцерогенеза, фиброза и регенерации печени мыши. Для решения частных научных вопросов, в рамках обозначенных разделов тематики, были применены современные молекулярно-генетические, био- и иммунохимические подходы, методы культивирования *in vitro* и *3D in vitro*, оригинальный метод тройного маркирования стволовых клеток, традиционные методы цито- и гистологии, а также оригинальные методы фотоники с использованием красителей-зондов.

Обобщены данные об источниках восстановления сетчатки позвоночных и преимуществах использования системы *3D in vitro* в изучении регенерации. Обнаружено разнообразие способов восстановления сетчатки, при некотором сходстве экспрессии генов. Изучены регенеративные ответы клеток РПЭ и нейральной сетчатки тритона на Fgf2 в условиях *3D in vitro*. Показана роль эндогенного и экзогенного Fgf2 на моделях регенерации сетчатки в стимуляции пролиферации. Проведена характеристика генетического профиля клеток – потенциальных источников регенерации тканей глаза позвоночных. Для ряда изучаемых регуляторных генов выявлена стадио-, ткане- и таксонспецифическая активность. В результате, получена информация о таксонспецифических особенностях экспрессии ряда сигнальных молекул, регуляторных генов, в том числе из числа гомеобоксодержащих, в дифференцировке тканей глаза (сетчатка, радужка, стекловидное тело) позвоночных в развитии, при регенерации. Выявление связи регуляторных генов и их изоформ с таксонспецифичностью существенно для объяснения их дифференциальной активности в развитии и регенерации тканей у эволюционно отдаленных позвоночных. Различия в структурной организации и регуляции экспрессии высококонсервативных факторов транскрипции определяют разнообразие регенерационных ответов в тканях разных видов животных, наряду с различиями в системной регуляции. Предварительно охарактеризовано действие экстрагируемых молекул секрета регенератов нейральных тканей глаза тритонов стимулирующее регенерационные ответы клеток ретинального пигментного глаза линии

ARPE19 человека. В этой системе выявлены морфологические признаки дедифференцировки клеток РПЭ, а также зарегистрированы изменения транскрипционной активности регуляторных факторов, участвующих в поддержании состояния стволовости в клетках. В тканях глаза плодов человека изучены экспрессия мРНК изучаемых Toll-рецепторов, коррелирующая с локализацией соответствующих белков, участвующих в сигналинге со стороны системы врожденного иммунитета. Проведена характеристика физико-химических свойства карбоцианиновых красителей-зондов для анализа биосистем в развитии и при регенерации, в частности, для изучения компонентов внеклеточного матрикса. Изучение элементарных фотохимических процессов с участием мезо-замещенных карбоцианиновых красителей в комплексах с биомолекулами дает ценную информацию о детальном строении центров связывания, структуре и динамике биомолекулярных систем. Выявление с использованием высокоспецифичных зондов биомолекул, участвующих в системах антиоксидантной и иммунной защиты глаза, ремоделирования внеклеточного матрикса, вносят вклад в понимание молекулярных процессов пренатального развития глаза человека и отклонений от нормального развития. С использованием разработанного нами ранее метода тройного маркирования и путем прямых измерений зарегистрировано отсутствие чередование покоящегося и пролиферативного состояния у стволовых и прогениторных клеток в зубчатой извилине гиппокампа. Полученные знания детализируют представления о жизненном цикле стволовых клеток гиппокампа, их потенциале, возможностях использования и стимуляции этого эндогенного резерва для коррекции нарушенного нейрогенеза при патологиях мозга.

Исследования роли внешних факторов на процессы регенерации и морфогенеза, на клетки-источники моделей тканевой и эпиморфной регенерации, позволили сделать вывод о том, что влияние микрогравитации на резидентные стволовые клетки (СК, SLCs) носит долговременный характер и проявляется даже в случае индукции регенерации (проведения операций) по завершении воздействия микрогравитации. Показано сохранение в условиях микро-g молекулярного механизма активации стволовых клеток саттелитов и инициации миогенеза. Получены первые данные о потенциальных молекулярных механизмах зависимых от силы гравитации изменений поведения СК, сигнальных путях FGF2 и HSPs. Анализ результатов проведен на фоне имеющихся в литературе сведений о поведении стволовых клеток млекопитающих в условиях измененного гравитационного вектора *in vitro* и низших позвоночных *in vivo*. Очевидно, что сегодня необходимо расширение подобных исследований, а также применение современных методов для понимания механизмов действия и характера ответов

стволовых клеток в разных тканях в измененном гравитационном векторе. Результаты этих исследований предоставляют информацию о поведении клеток со свойствами стволовых, обеспечивающих восстановительные процессы у организмов, находящихся в космических полетах, а также дают более глубокое понимание биологии стволовых клеток в целом.

На модели регенерации печени после токсического воздействия CCl<sub>4</sub> показано протекторное действие 4-метилумбиллиферона, снижающее накопление коллагена и гиалуроновой кислоты при токсическом повреждении печени CCl<sub>4</sub>. С помощью NGS анализа установлено, что действие метилумбиллиферона на клетки печени при развитии фиброза реализуется через регуляцию экспрессии генов – участников сигнальных путей TGF-beta и Wnt/beta-catenin, маркеров фиброза, таких как Col1,  $\alpha$ SMA, Hyal1, FSTL1. Впервые показано, что снижение экспрессии гена FSTL1 приводит к замедлению трансдифференцировки stellatных клеток печени в миофибробласты. В другой модельной системе клетках рака поджелудочной железы, показано, что стимуляция сигнального пути IGF1 приводит к фосфорилированию его рецептора IGF1R и активации сигнального каскада Pi-3k/Akt в этих клетках. Как оказалось, активация пути Pi-3k/Akt не оказывает влияния на дифференцировку в клеточной линии рака поджелудочной железы по мезенхимному типу, а также на изменение экспрессии маркеров эпителиальных тканей. Полученные результаты по исследованию экспрессии ключевых генов – регуляторов эпителио-мезенхимного перехода и миграции клеток на моделях ГКЦ и регенерации печени, рака поджелудочной железы, *in vivo* и *in vitro*, способствуют детализации картины генной регуляции и роли локальной ниши в канцерогенезе тканей млекопитающих.

Дальнейшие исследования по теме «Клеточные и молекулярные механизмы развития и регенерации тканей и органов у низших и высших позвоночных животных. Поиск способов регуляции восстановительных процессов», направлены на решение вопросов генетического контроля дифференцировки и конверсии фенотипа клеток, коррекции этих процессов при патологиях тканей, что важно для стимуляции эндогенных клеточных резервов для регенерации, разработки стратегий восстановления тканей и органов у высших позвоночных и человека.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Martin D.M., Skidmore J.M., Philips S.T., Vieira C., Gage P.J., Condie B.G., Raphael Y., Martinez S., Camper S.A. *PITX2* is required for normal development of neurons in the mouse subthalamic nucleus and midbrain // *Dev Biol* - 2004. Vol. 267. N1. - P. 93 - 108.
2. Mindy R. Waite, Skidmore J.M., Micucci J.A., Shiratori H., Hamada H., Martin J.F., Martin D.M. Pleiotropic and isoform-specific functions for *Pitx2* in superior colliculus and hypothalamic neuronal development // *Mol Cell Neurosci.* - 2013. Vol. 52. - P. 128-139.
3. Nemeč S., Luxey M., Jain D., Huang Sung A., Pastinen T., Drouin J. *Pitx1* directly modulates the core limb development program to implement hindlimb identity // *Development.* - 2017. Vol. 144. - P. 3325-3335.
4. Takashi Sh., Satoru Y., Rieko K., Shigenori T., Harumichi Sh. *Pitx1* expression in developing and regenerating axolotl limbs // *Okajimas Folia Anat. Jpn.* - 2015 - Vol. 200885. - P. 5–10.
5. Melville J., Hunjan S., McLean F., Mantziou G., Boysen K., Parry L.J. Expression of a hindlimb-determining factor *Pitx1* in the forelimb of the lizard *Pogona vitticeps* during morphogenesis // *Open Biol.* - 2016. - Vol. 6: 160252.
6. Elewa A., Wang H., Talavera-López C., Joven A., Brito G., Kumar A., Hameed L.S., Penrad-Mobayed M., Yao Z., Zamani N., Abbas Y., Abdullayev I., Sandberg R., Grabherr M., Andersson B., Simon A. Reading and editing the *Pleurodeles waltl* genome reveals novel features of tetrapod regeneration // *Nat. Commun.* - 2017. - Vol. 8. No. 1. 2286. doi: 10.1038/s41467-017-01964-9.
7. Avdonin P.P., Grigoryan E.N., Markitantova Yu.V. Transcriptional factor *Pitx2*: Localization during triton retina regeneration // *Biology Bulletin.* - 2010. - Т. 37. № 3. - С. 231-235.
8. Маркитантова Ю.В., Сими́рский В.Н. Особенности структурной организации и специфичность экспрессии гомеобокс-содержащих генов и их изоформ как основа различий регенерационных ответов // «Гены и клетки» Научно-практический журнал. - 2019. - Т. XIV. - С.166-167. ISSN 2313-1829
9. Amini R., Rocha-Martins M., Norden C. Neuronal migration and lamination in the vertebrate retina // *Front. Neurosci.* - 2018. - Vol. 11. - P. 742.
10. Schutgens F., Verhaar M.C., Rookmaaker M.B. Pluripotent stem cell-derived kidney organoids: An in vivo-like in vitro technology // *Eur. J. Pharmacol.* - 2016. - Vol. 790. - P. 12–20.

11. Cho H.J., Verbridge S.S., Davalos R.V., Lee Y.W. Development of an in vitro 3D brain tissue model mimicking in vivo-like pro-inflammatory and pro-oxidative responses // *Ann. Biomed. Eng.* - 2018. - Vol. 46. - P. 877–887.
12. Li Y., Zhang Y., Qi S., Su G. Retinal organotypic culture - a candidate for research on retinas // *Tissue Cell.* - 2018. - Vol. 51. - P. 1–17.
13. Moritoh S., Komatsu Y., Yamamori T., Koizumi A. Diversity of retinal ganglion cells identified by transient GFP transfection in organotypic tissue culture of adult marmoset monkey retina // *PLoS One.* - 2013. - Vol. 8: e54667.
14. Rattner A., Smallwood P.M., Williams J., Cooke C., Savchenko A., Lyubarsky A., Pugh E. N., Nathans J. A photoreceptor-specific cadherin is essential for the structural integrity of the outer segment and for photoreceptor survival // *Neuron.* - 2001. - Vol. 32. - P. 775–86.
15. Grigoryan E.N., Novikova Y.P., Gancharova O.S., Kilina O.V., Philippov P.P. New antioxidant SkQ1 is an effective protector of rat eye retinal pigment epithelium and choroid under conditions of long-term organotypic cultivation // *Adv. Aging Res.* - 2012. - Vol. 1. - P. 31–37.
16. Новикова Ю.П., Алейникова К.С., Краснов М.С., Поплинская В.А., Григорян Э.Н. Сетчатка глаза взрослых тритона и крысы в условиях органотипического культивирования in vitro // *Известия РАН. Сер. биол.* - 2010. № 4. - С. 389–402.  
Novikova Yu.P., Aleynikova K.S., Krasnov M.S., Poplinskaya V.A., Grygoryan E.N. In vitro organotypic cultivation of adult newt and rat retinas // *Biology Bulletin (Izvestiya RAN).* - 2010. - Vol. 37. № 4. - P. 327–338.
17. 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. - Vol. 2. - P. 66–76.
18. Grigoryan E. N., Novikova Y. P., Kilina O. V., Philippov P.P. 2013. New antioxidant SkQ1 is an effective protector of rat neural retina under conditions of long-term organotypic cultivation // *Adv. Aging Res.* - 2013. - Vol. 2. - P. 65–71.
19. Lahne M., Gorsuch R.A., Nelson C.M., Hyde D.R. Culture of adult transgenic zebrafish retinal explants for live-cell imaging by multiphoton microscopy // *J. Vis. Exp.* - 2017. - Vol. 120. - P. 55335.
20. Григорян Э.Н. Молекулярные факторы поддержания и активации "молодого" фенотипа клеток-источников регенерации тканей глаза // *Биохимия.* -2018. - Т. 83. № 11. - С. 1629–1644. Grigoryan E.N. Molecular factors of the maintenance and

- activation of the juvenile phenotype of cellular sources for eye tissue regeneration // *Biochemistry (Moscow)*. - 2018. - Vol. 83. № 11. - P. 1318–1331.
21. Григорян Э.Н. Эндогенные клеточные источники для регенерации сетчатки у позвоночных животных и человека // *Онтогенез*. 2019. Т. 50. № 1. С. 12–Grigoryan E.N. Endogenous cell sources for eye retina regeneration in vertebrate animals and humans // *Russian Journal of Developmental Biology (Ontogenез)*. - 2018. - Vol. 49. № 6. - P. 1–13.
  22. Hurst J., Kuehn S., Jashari A., Tsai T., Bartz-Schmidt K.U., Schnichels S., Joachim S.C. A novel porcine ex vivo retina culture model for oxidative stress induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> // *Altern. Lab. Anim.* - 2017. - Vol. 45. - P. 11–25.
  23. Markitantova Yu.V., Novikova Yu.P., Poplinskaya V.A., Grigoryan E.N. // Expression of Fgf2 and Nucleostemin in models of retina regeneration in the newt under conditions of 3D organotypic culture in vitro // *EC Ophthalmology*. - 2019. - Vol.10. № 12. - P.1-9.
  24. Маркитантова Ю.В., Авдонин П.П., Григорян Э.Н. Компоненты FGF сигнального пути в тканях заднего сектора глаза взрослого тритона *Pleurodeles waltl* // *Известия РАН. Сер. Биол.* 2014. № 4. С. 325–333. (Markitantova Y.V., Avdonin P.P., Grigoryan E.N. FGF2 signaling pathway components in tissues of the posterior eye sector in the adult newt *Pleurodeles waltl* // *Biol. Bull. (Moscow)*. - 2014. - Vol. 41. - P. 297–305.
  25. Mitsuda S., Yoshii C., Ikegami Y., Araki M. Tissue interaction between the retinal pigment epithelium and the choroid triggers retinal regeneration of the newt *Cynops pyrrhogaster* // *Dev. Biol.* - 2005. - Vol. 280. - P. 122–132.
  26. Salero E. и др. Adult Human RPE Can Be Activated into a Multipotent Stem Cell that Produces Mesenchymal Derivatives // *Stem Cell*. - 2012. - Т. 10. № 1. - С. 88–95.
  27. Dunn K.C., Aotaki-Keen A.E. ARPE-19, A Human Retinal Pigment Epithelial Cell Line with // *Exp. Eye Res.* - 1996. - Т. 62. № 2. - С. 155–169.
  28. Петров Ю.П., Цупкина Н.В. Сравнительная морфометрия эпителио- и фибробластоподобного типов в культуре // *Цитология*. - 2018. - Т. 60. № 8. - С. 645–652.
  29. Кузнецова А.В., Ржанова Л.А., Куринов А.М., Александрова М.А. Механизмы дедифференцировки клеток ретинального пигментного эпителия глаза взрослого человека in vitro. Морфологический и молекулярно-генетический анализ // *Цитология*. - 2018. - Т. 60. № 12. - С. 996–1007.
  30. Кузнецова А.В., Ржанова Л.А., Куринов А.М., Александрова М.А. Влияние основного фактора роста фибробластов на сигнальные пути в клетках ретинального

- пигментного эпителия человека // Цитология. - 2019. - Т. 61. № 4. - С. 286–300. DOI: 10.1134/S0041377119040023. Kuznetsova A.V., Rzhanova L.A., Kurinov A.M., Aleksandrova M.A. Effect of basic fibroblast growth factor on signaling pathways in adult human retinal pigment epithelial cells // Cell and Tissue Biology. 2019. Vol. 13, № 4. P. 292-304. DOI: 10.1134/S1990519X19040059.
31. Шафеи Е.В., Куринов А.М., Кузнецова А.В., Александрова М.А. Репрограммирование клеток ретинального пигментного эпителия человека под влиянием bFGF *in vitro* // Клеточные технологии. - 2017. - Т. 2. - С. 128–136.
  32. Шафеи Е.В., Новикова Ю.П. Изучение регенеративных возможностей пигментного эпителия сетчатки человека на примере линии ARPE-19 // «Гены и клетки» Научно-практический журнал. - 2019. - Т. XIV. – С. 260-261. ISSN 2313-1829.
  33. Panova I.G., Yakovleva M.A., Tatikolov A.S., Kononikhin A.S., Feldman T.B., Poltavtseva R.A., Nikolaev E.N., Sukhikh G.T., Ostrovsky M.A.. Lutein and its oxidized forms in eye structures throughout prenatal human development // Experimental Eye Research. - 2017. - Vol. 160. - P. 31-37. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exer.2017.04.008>
  34. Panova I.G., Tatikolov A.S., Smirnova Yu.A., Poltavtseva R.A., Sukhikh G.T. Albumin in the Vitreous Body, Retina and Lens of Human Fetal Eye // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. - 2017. - Vol. 162, No. 11. - P. 629-631. DOI 10.1007/s10517-017-3673-6
  35. Панова И.Г., Беззубенко Ю.В., Татиколов А.С., Полтавцева Р.А., Иванец Т.Ю., Сухих Г.Т. Альфа-фетопроtein в сетчатке и хрусталике глаза человека на ранних стадиях пренатального развития // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. - 2018. - Т. 54. № 2. - С. 111-114. DOI: 10.1134/S0022093018020047
  36. Panova I.G., Poltavtseva R.A., Sukhova Yu.V., Ivanets T.Yu., Tatikolov A.S., Sukhikh G.T. Uric acid as antioxidant in the vitreous body of the eye in prenatal human development // Neurochemical Journal. - 2018. - Vol. 12. No. 4. Supplements S73. - P.74. DOI: 10.1134/S1819712418040050
  37. Alvarez-Lario B., Macarron-Vicente J. Uric acid and evolution // Rheumatology. - 2010. - Vol. 49. - P. 2010–2015.
  38. Barak B., Feldman N., Okun E. Toll-like receptors as developmental tools that regulate neurogenesis during development: an update // Frontiers in Neuroscience. - 2014. - Vol. 8. Article 272. - P. 1-6.

39. Kawasaki T., Kawai T. Toll-Like Receptor Signaling Pathways // *Frontiers in Immunology*. - 2014. Vol. 5. Article 461. - P. 1-8. doi:10.3389/fimmu.2014.00461
40. Anthony N., Foldi I., Hidalgo A. Toll and Toll-like receptor signalling in development // *Development*. – 2018. – Vol. 145. dev156018. doi:10.1242/dev.156018
41. Панова И.Г., Низяева Н.В., Сеницына В.А., Полтавцева Р.А., Сухих Г.Т. Экспрессия Toll-подобных рецепторов в раннем пренатальном развитии сетчатки глаза человека // *Онтогенез*. - 2018. - Т. 49. № 6. - С. 369-374. DOI: 10.1134/S0475145018060046
42. Татиколов А.С., Акимкин Т.М., Кашин А.С., Панова И.Г. Мезо-замещенные полиметиновые красители – эффективные спектрально-флуоресцентные зонды для биомакромолекул // *Химия высоких энергий*. – 2010. - Т. 44. № 3. - С. 252–255.
43. Панова И.Г., Чибирева М.Д., Сухова Ю.В., Татиколов А.С., Полтавцева Р.А., Иванец Т.Ю. Молекулы-антиоксиданты в стекловидном теле глаза плодов человека: мочевая кислота и катехоламины // *Генетика – фундаментальная основа инноваций в медицине и селекции. Материалы VIII научно-практической конференции с международным участием (Ростов-на-Дону, 26–29 сентября 2019 г.)*; Южный федеральный университет. – Ростов-на-Дону; Таганрог: Издательство Южного федерального университета. 2019. – 254 с. - С.179-181. ISBN 978-5-9275-3236-0
44. Панова И.Г., Чибирева М.Д., Полтавцева Р.А. Катехоламины в тканях глаза в пренатальном развитии человека // *Гены и клетки. Научно-практический журнал*. - 2019. - Т. XIV. - С. 177-178. ISSN 2313-1829.
45. Панова И.Г., Сухова Ю.В., Татиколов А.С., Полтавцева Р.А., Иванец Т.Ю., Сухих Г.Т. Содержание билирубина в стекловидном теле глаза человека в пренатальном развитии // *Гены и клетки. Научно-практический журнал*. - 2019. - Т. XIV. - С. 177. ISSN 2313-1829
46. Kaul D., Habbel P., Derkow K., et al. Expression of Toll-Like Receptors in the Developing Brain // *PLoS ONE*. - 2012. - Vol. 7. No. 5. e37767. doi:10.1371/journal.pone.0037767
47. Kawasaki T/, Kawai T. Toll-Like Receptor Signaling Pathways // *Frontiers in Immunology*. - 2014. - Vol. 5. - P. 1-8. doi:10.3389/fimmu.2014.00461
48. Панова И.Г., Бурменская О.В., Полтавцева Р.А. Экспрессия мРНК Toll-подобных рецепторов TLR2 и TLR4 в сетчатке и хрусталике глаза плодов человека // *Материалы XVIII Конференции-школы с международным участием «Актуальные*

- проблемы биологии развития», 14-19 октября 2019 г. Стр.74. — М. Издательство Перо, 2019. — 108 с. 74. ISBN 978-5-00150-538-9
49. Tatikolov A.S. Polymethine dyes as spectral-fluorescent probes for biomacromolecules. *J. Photochem. Photobiol // C: Photochemistry Reviews.* - 2012. - Vol. 13. – P. 55–90. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2011.11.001>.
  50. Татиколов А.С., Пронкин П.Г., Шведова Л.А., Панова И.Г. Мезо-замещенные карбоцианины – эффективные спектрально-флуоресцентные и фотохимические зонды для структурно-организованных систем на основе биомолекул. *Химическая физика.* - 2019. - Т. 38. № 12. - С. 11-18. DOI: 10.1134/S0207401X19120185
  51. \*Tatikolov A.S., Pronkin P.G., Panova I.G. Spectral-fluorescent study of the interaction of polymethine day probes with biological surfactants – bile salts // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.* - 2019. - Vol. 216. - P. 190-201. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.03.017>
  52. \*Pronkin P.G., Tatikolov A.S., Panova I.G. Spectral-Fluorescent Study of the Interaction of Cationic and Anionic Polymethine Dyes with Sodium Deoxycholate in Aqueous Solutions // *Journal of Fluorescence.* - 2019. - Vol. 29. - P. 1161 - 1170. (WoS, Scopus) - Q3, <https://doi.org/10.1007/s10895-019-02432-x>
  53. Uryvaeva I.V., Mikaelyan A.S., Dashenkova N.O., Marshak T.L. Chromothripsis in Hepatocarcinogenesis: The Role of a Micronuclear Aberration and Polyploidy//*Biology Bulletin.* - 2018. - Vol. 45. Is. 5. - P. 419 - 425. DOI: 10.1134/S1062359018050163). \* Урываева И.В., Микаелян А.С., Дашенкова Н.О., Маршак Т.Л. Хромотрипсис при гепатоканцерогенезе: роль микроядерных aberrаций и полиплоидии//*Известия РАН. Сер.биол.* - 2018. № 5. - С. 461 - 468. DOI: 10.1134/S0002332918050168
  54. Uryvaeva I.V. A model of hepatic regeneration and carcinogenesis due to total liver cell injury induced by dipin and partial hepatectomy // *Monogr. Dev. Biol. Basel, Karger.* - 1992. - Vol. 23. - P. 230–236.
  55. Stephens P. J., Greenman C.D., Fu B., Yang F., Bignell G.R., Mudie L.J., Pleasance E.D., et al. Massive Genomic Rearrangement Acquired in a Single Catastrophic Event during Cancer Development // *Cell* - Vol. 144. N 1. - P. 27–40.
  56. Pickup M.W., Mouw J.K., Weaver V.M. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer // *EMBO Rep.* - 2014. - Vol.15. № 12. - P. 1243–1253.
  57. Whatcott C.J., Han H., Posner R.G., Hostetter G., Von Hoff D.D. Targeting the tumor microenvironment in cancer: why hyaluronidase deserves a second look // *Cancer Discov.* - 2011. - Vol. 1. № 4. - P. 291-296.

58. Дашенкова Н.О., Петракова О.С., Цитрина А.А., Микаелян А.С. Характеристика первичных культур гепатоцеллюлярной карциномы мыши и оценка их потенциала к эпителио-мезенхимному переходу // Клиническая и экспериментальная морфология. - 2017. № 3. - С. 44-49.
59. \*Andreichenko I.N., Tsitrina A.A., Fokin A.V., Gabdulkhakova A.I., Maltsev D.I., Perelman G.S., Bulgakova E.V., Kulikov A.M., Mikaelyan A.S., Kotelevtsev Y.V. 4-methylumbelliferone prevents liver fibrosis by affecting hyaluronan deposition, FSTL1 expression and cell localization // Int. J. Mol. Sci. - 2019. - V. 20. Is. 24.- P. 6301-6318. DOI:10.3390/ijms20246301. (WoS, Scopus) – Q2
60. Kopantzev E.P., Kopantseva M.R., Grankina E.V., Mikaelyan A.S., Egorov V.I., Sverdlov E.D. Activation of IGF/IGF-IR signaling pathway fails to induce epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells. Pancreatology. – 2019. - Vol. 19 (2). – P. 390-396. doi:10.1016/j.pan.2019.01.010
61. Meyers V.E., Zayzafoon M., Gonda S.R., Gathings W.E., McDonald J.M. Modeled microgravity disrupts collagen I/integrin signaling during osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells // Journal of Cellular Biochemistry. - 2004. - Vol. 93. - P. 697-707.
62. Zayzafoon M., Gathings W.E., McDonald J.M. Modeled microgravity inhibits osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells and increases adipogenesis // Endocrinology. - 2004. - Vol. 145. - P. 2421–2432.
63. Yuge L., Kajiume T., Tahara H., Kawahara Y., Umeda C., Yoshimoto R., Wu S.-L., Yamaoka K., Asashima M., Kataoka K., Ide T. Microgravity Potentiates Stem Cell Proliferation While Sustaining the Capability of Differentiation // Stem Cells and Development. - 2006. - Vol. 15. - P. 921–929.
64. Wang H.C., Zhang Z.Y., Xin W.G. Microgravity resulted from 3D dynamic culture induces compounding of bone marrow-derived mesenchymal stem cells with Pluronic F-127 scaffold used for repairing of cartilage defects // Chinese Tissue Engineering Clinical Recovery. - 2007. - Vol. 11. - P. 2609–2613.
65. Chen J., Liu R., Yang Y., Li J., Zhang X., Li J., Wang Z., Ma J. The simulated microgravity enhances the differentiation of mesenchymal stem cells into neurons // Neuroscience Letters. - 2011. - Vol. 505. - P. 171–175.
66. Zhang C., Li L., Chen J., Wang J. Behavior of stem cells under outer-space microgravity and ground-based microgravity simulation // Cell Biology International. - 2015. - Vol. 39. - P. 647–656.

67. Blaber E.A., Finkelstein H., Dvorochkin N., Sato K.Y., Yousuf R., Burns B.P., Globus R.K., Almeida E.A.C. Microgravity Reduces the Differentiation and Regenerative Potential of Embryonic Stem Cells // *Stem Cells and Development*. - 2015. - Vol. 24. - P. 2605–2621.
68. Bradamante S., Barengi L., Maier J.A. Stem Cells toward the Future: The Space Challenge // *Life*. - 2014. - Vol. 4. - P. 267–280.
69. Mitashov V.I., Grigoryan E.N., Tuchkova S.Y., Oigenblick E.A., Malchevskaya I.E. Regeneration in amphibia under the space flight conditions // *Cell Differentiation and Development*. - 1987. - Vol. 27. - P. 230.
70. Brushlinskaya N.V., Grigoryan E.N., Tuchkova S.Y., Anton H.J., Mitashov V.I. [Organ and tissue regeneration in lower vertebrate animals during space flight and after its completion] // *Ontogenez*. - 1997. - Vol. 28. - P. 198–210.
71. Brushlinskaya N.V., Tuchkova S.Y., Grigoryan E.N., Anton H.J., Mitashov V.I. [The characteristics of the effect of space flight factors on regeneration processes in mammals and Urodela] // *Izvestiya Rossiiskoi Akademii Nauk Seriya Biologicheskaya*. - 1994. - P. 667–676.
72. Brushlinskaya N.V. [The effect of space flight factors on the cellular proliferative activity of different eye tissues during lens regeneration in the Spanish newt *Pleurodeles waltlii*] // *Izvestiya Rossiiskoi Akademii Nauk Seriya Biologicheskaya*. - 1995. - P. 149–156.
73. Tuchkova S.Y., Brushlinskaya N.V., Grigoryan E.N., Mitashov V.I. [The comparative characteristics of crystalline lens and limb regeneration in newts operated on before and after the completion of an orbital space flight] // *Izvestiya Rossiiskoi Akademii Nauk Seriya Biologicheskaya*. - 1994. - Vol. 6. - P. 859–869.
74. Anton H.J., Grigoryan E.N., Mitashov V.I. Influence of longitudinal whole animal clinorotation on lens, tail, and limb regeneration in urodeles // *Advances in Space Research*. - 1996. - Vol. 17. - P. 55–65.
75. Grigoryan E.N., Poplinskaya V.A., Domaratskaya E.I., Novikova Y.P., Aleinikova K.S., Dvorochkin N., Almeida E.A.C. Tissue regeneration in Urodela on Foton-M3 // *Journal of gravitational physiology*. - 2008. - Vol. 15. - P. 277–280.
76. Grigoryan E.N., Dvorochkin N., Poplinskaya V.A., Yuosuf R., Radugina E.A., Almeida E.A.C. The effect of hypergravity on the lens, cornea and tail regeneration in Urodela // *Acta Astronautica*. - 2017. - Vol. 138. - P. 423–433.
77. Grigoryan E.N., Mitashov V.I., Anton H.J. Urodelean amphibians in studies on microgravity: effects upon organ and tissue regeneration // *Advances in Space Research*. - 2002. - Vol. 30. - P. 757–764.

78. Grigoryan E.N., Anton H.J., Mitashov V.I. Microgravity effects on neural retina regeneration in the newt // *Advances in Space Research*. - 1998. - Vol. 22. - P. 293–301.
79. Grigoryan E.N., Anton H.J. Specific features of eye regeneration after detachment of the retina in the newt induced by gravity changes in a clinostat // *Biology Bulletin*. - 1994. Vol. 3. - P. 342–352.
80. Grigoryan E.N., Anton H.J., Poplinskaya V.A., Aleinikova K.S., Domaratskaya E.I., Novikova Y.P., Almeida E.A.C. Signs of Müller cell gliotic response found in the retina of newts exposed to real and simulated microgravity // *Advances in Space Research*. - 2012. - Vol. 49. - P. 1465-1471.
81. Grigoryan E.N., Tuchkova S.Y., Poplinskaya V.A., Mitashov V.I. [Retinal regeneration after dissection of the optic nerve in newts exposed on board the Bion-11 biosatellite] // *Aviakosmicheskaja i ekologicheskaja meditsina*. -1999. - Vol. 33. - P. 15–20.
82. Mitashov V.I., Grigoryan E.N., Tuchkova S.Y., Cherdanzeva E.M. Organs and tissue regeneration in amphibia under the space flight conditions // In *ESA Ans ESTEC Publications*. - 1987. - P. 299–303.
83. Mitashov V.I., Grigoryan E.N., Tuchkova S.Y., Oigenblick E.A., Malchevskaya I.E. Lens and limb regeneration in the newt during and after 13 day long space flight // In *ESA Ans ESTEC Publications*. - 1990. - P. 85–92.
84. Mitashov V.I., Grigoryan E.N., Tuchkova S.Y., Malchevskaya I.E. Lens and Limb Regeneration in Amphibia under the Space Flight Conditions // In *Recent Trends in Regeneration Research*, Kiortsis, V, S Koussoulakos and H Wallace, eds. (Boston, MA: Springer US). - 1989. - P.135–136.
85. Grigoryan E.N., Oigenblick E.A, Tuchkova S.Y., Malchevskaya I.E., Mitashov V.I. The influence of spaceflight factors on lens and limb regeneration in newts // In *Results of Investigations on Biosatellites*. Nauka. - 1992. - P. 345–350.
86. Grigoryan E.N., Almeida E.A.C., Domaratskaya E.I., Poplinskaya V.A., Aleinikova K.S., Tairbekov M.G., Mitashov V.I. Experiment “Regeneration” Performed Aboard the Russian Spacecraft Foton-M2 in 2005 // *Journal of gravitational physiology*. - 2006. - Vol. 13. - P. 189–192.
87. Anton H.J., Grigoryan E.N., Krupp-Beyerlein K., Pitzer H., Mitashov V.I. Influence of clinorotation and fettering stress on tail regeneration of *Triturus vulgaris* (Urodela) // *Life Sciences in Space Research*. -1998. - Vol. 21. - P. 1159–1162
88. Morrison J.I., Lööf S., He P., Simon A. Salamander limb regeneration involves the activation of a multipotent skeletal muscle satellite cell population // *The Journal of Cell Biology*. - 2006. - Vol. 172. - P. 433–440.

89. Grigoryan E.N., Radugina E.A. Behavior of Stem-Like Cells, Precursors for Tissue Regeneration in Urodela, Under Conditions of Microgravity // Stem cells and development. - 2019. -Vol. 28. Is. 7. - P. 423-437. DOI: 10.1089/scd.2018.0220
90. Cameron HA, Woolley CS, McEwen BS, Gould E. Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat // Neuroscience. - 1993. - Vol. 56 (2). – P. 337-344.
91. Eriksson P.S., Perfilieva E., Björk-Eriksson T., Alborn A.M., Nordborg C., Peterson D.A., Gage F.H. Neurogenesis in the adult human hippocampus // Nat Med. - 1998. – Vol. 4 (11). – P. 1313-1317.
92. Kempermann G, Gage FH, Aigner L, Song H, Curtis MA, Thuret S, Kuhn HG, Jessberger S, Frankland PW, Cameron HA, Gould E, Hen R, Abrous DN, Toni N, Schinder AF, Zhao X, Lucassen PJ, Frisén J. Human Adult Neurogenesis: Evidence and Remaining Questions // Cell Stem Cell. - 2018. – Vol. 23(1). – P. 25-30. doi: 10.1016/j.stem.2018.04.004.
93. van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH. Functional neurogenesis in the adult hippocampus // Nature. – 2002. – Vol. 415 (6875). – P. 1030-1034.
94. Encinas J.M., Michurina T.V., Peunova N., Park J.H., Tordo J., Peterson D.A., Fishell G., Koulakov A., and Enikolopov G. Division-coupled astrocytic differentiation and age-related depletion of neural stem cells in the adult hippocampus // Cell Stem Cell. – 2011. – Vol. 8. – P. 566–579.
95. Seri B., García-Verdugo J.M., McEwen B.S., Alvarez-Buylla A. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus // J Neurosci. – 2001. – Vol. 21 (18). – P. 7153-7160.
96. Anacker C., Hen R. Adult hippocampal neurogenesis and cognitive flexibility -linking memory and mood // Nat Rev Neurosci. - 2017. – Vol. 18 (6). – P. 335-346. doi: 10.1038/nrn.2017.45.
97. Egeland M., Guinaudie C., Du Preez A., Musaelyan K., Zunszain P.A., Fernandes C., Pariante C.M., Thuret S. Depletion of adult neurogenesis using the chemotherapy drug temozolomide in mice induces behavioural and biological changes relevant to depression // Transl Psychiatry. - 2017. – Vol. 7 (4): e1101. doi: 10.1038/tp.2017.68.
98. Hattiangady B., Rao M.S., Shetty A.K. Chronic temporal lobe epilepsy is associated with severely declined dentate neurogenesis in the adult hippocampus // Neurobiol Dis. – 2004. – Vol. 3. – P. 473-490.

99. Marxreiter F., Regensburger M., Winkler J. Adult neurogenesis in Parkinson's disease // *Cell Mol Life Sci.* – 2013. – Vol. 70. – P. 459–473.
100. Miller B.R., Hen R. The current state of the neurogenic theory of depression and anxiety // *Curr Opin Neurobiol.* - 2015. – P. 51-58. doi: 10.1016/j.conb.2014.08.012.
101. Schoenfeld T.J., Cameron H.A. Adult neurogenesis and mental illness // *Neuropsychopharmacology.* - 2015. – Vol. 1. – P. 113-128. doi: 10.1038/npp.2014.230.
102. Paradisi M., Fernández M., Del Vecchio G., Lizzo G., Marucci G., Giulioni M., Pozzati E., Antonelli T., Lanzoni G., Bagnara G.P., Giardino L., Calzà L. Ex vivo study of dentate gyrus neurogenesis in human pharmaco-resistant temporal lobe epilepsy // *Neuropathol Appl Neurobiol.* - 2010. - Vol.6. - P. 535-550. doi: 10.1111/j.1365-2990.2010.01102.x.
103. Varela-Nallar L., Aranguiz F.C., Abbott A.C., Slater P.G., Inestrosa N.C. Adult hippocampal neurogenesis in aging and Alzheimer's disease // *Birth Defects Res C Embryo Today.* – 2010. – Vol. 4. - P. 284-296. doi: 10.1002/bdrc.20193.
104. Winocur G., Berman H., Nguyen M., Binns M.A., Henkelman M., van Eede M., Piquette-Miller M., Sekeres M.J., Wojtowicz J.M., Yu J., Zhang H., Tannock I.F.. Neurobiological Mechanisms of Chemotherapy-induced Cognitive Impairment in a Transgenic Model of Breast Cancer // *Neuroscience.* - 2018. – Vol. 369. – P. 51-65. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.10.048.
105. Lazutkin A., Podgorny O., Enikolopov G. Modes of division and differentiation of neural stem cells // *Behav Brain Res.* - 2019. - Vol. 374. - P. 112-118. doi: 10.1016/j.bbr.2019.112118.
106. Gonçalves J.T., Schafer S.T., Gage F.H. Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior // *Cell.* - 2016. – Vol.167 (4). – P. 897-914. doi: 10.1016/j.cell.2016.10.021.
107. Pilz G.A., Bottes S., Betizeau M., Jörg D.J., Carta S., Simons B.D., Helmchen F., Jessberger S. Live imaging of neurogenesis in the adult mouse hippocampus // *Science.* - 2018. – Vol. 359 (6376). – P. 658-662. doi: 10.1126/science.aao5056.
108. Sierra A., Encinas J.M., Deudero J.J., Chancey J.H., Enikolopov G., Overstreet-Wadiche L.S., Tsirka S.E., Maletic-Savatic M. Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis // *Cell Stem Cell.* – 2010. – Vol. 7 (4). – P. 483-495. doi: 10.1016/j.stem.2010.08.014.
109. Sierra A., Martín-Suárez S., Valcárcel-Martín R., Pascual-Brazo J., Aelvoet S.A., Abiega O., Deudero J.J., Brewster A.L., Bernales I., Anderson A.E., Baekelandt V., Maletić-Savatić M., Encinas J.M. Neuronal hyperactivity accelerates depletion of neural

- stem cells and impairs hippocampal neurogenesis // *Cell Stem Cell*. – 2015. – Vol. 16 (5). – P. 488-503. doi: 10.1016/j.stem.2015.04.003.
110. Bonaguidi M.A., Wheeler M.A., Shapiro J.S., Stadel R.P., Sun G.J., Ming G.L., Song H. In vivo clonal analysis reveals self-renewing and multipotent adult neural stem cell characteristics // *Cell*. – 2011. – Vol. 145 (7). – P. 1142-55. doi: 10.1016/j.cell.2011.05.024.
111. Urbán N., van den Berg D.L., Forget A., Andersen J., Demmers J.A., Hunt C., Ayrault O., Guillemot F. Return to quiescence of mouse neural stem cells by degradation of a proactivation protein // *Science*. – 2016. – Vol. 353 (6296). – P. 292-295. doi: 10.1126/science.aaf4802.
112. Podgorny O., Peunova N., Enikolopov G. Tracing dividing stem cells. *Aging* (Albany NY). – 2018. – Vol. 10 (7). - P. 1534-1535. doi: 10.18632/aging.101491.
113. Podgorny O., Peunova N., Park J.H., Enikolopov G. Triple S-Phase Labeling of Dividing Stem Cells // *Stem Cell Reports*. - 2018. - Vol. 10 (2). - P. 615-626. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.12.020.
114. Mignone J.L., Kukekov V., Chiang A.S., Steindler D., and Enikolopov G. Neural stem and progenitor cells in nestin-GFPtransgenic mice // *J Comp. Neurol*. – 2004. – Vol. 469. – P. 311–324.
115. Encinas J.M. and Enikolopov G. Identifying and quantitating neural stem and progenitor cells in the adult brain // *Methods Cell Biol*. – 2008. – Vol. 85. - P. 243–272.
116. Lazutkin A., Podgorny O., Enikolopov G. Modes of division and differentiation of neural stem cells // *Behav Brain Res*. - 2019. -Vol. 18 (374). - P. 112-118. doi: 10.1016/j.bbr.2019.112118.

ОТЧЕТНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ГЗ 0108-2018-0005

1. **Grigoryan E.N., Radugina E.A.** Behavior of Stem-Like Cells, Precursors for Tissue Regeneration in Urodela, Under Conditions of Microgravity // Stem cells and development. – 2019. – V. 28. Is. 7. – P. 423-437. DOI: 10.1089/scd.2018.0220. – (WoS, Scopus) – Q2-Q3.
2. Andreichenko I.N., **Tsitrina A.A.**, Fokin A.V., Gabdulhakova A.I., **Maltsev D.I.**, Perelman G.S., Bulgakova E.V., **Kulikov A.M., Mikaelyan A.S.**, Kotelevtsev Y.V. 4-methylumbelliferone prevents liver fibrosis by affecting hyaluronan deposition, FSTL1 expression and cell localization // Int. J. Mol. Sci. – 2019. – V. 20. Is. 24. – P. 6301-6318. DOI:10.3390/ijms20246301. (WoS, Scopus) – Q2
3. Pronkin P.G., Tatikolov A.S., **Panova I.G.** Spectral-Fluorescent Study of the Interaction of Cationic and Anionic Polymethine Dyes with Sodium Deoxycholate in Aqueous Solutions // Journal of Fluorescence. – 2019. – Vol. 29. – P. 1161-1170. DOI: 10.1007/s10895-019-02432-x. (WoS, Scopus) – Q3.
4. Tatikolov A.S., Pronkin P.G., **Panova I.G.** Spectral-fluorescent study of the interaction of polymethine day probes with biological surfactants – bile salts // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. – 2019. – Vol. 216. – P. 190-201. DOI: 10.1016/j.saa.2019.03.017. (WoS, Scopus) – Q1.
5. Lazutkin A., **Podgorny O.**, Enikolopov G. Modes of division and differentiation of neural stem cells G. // Behavioural brain research. – 2019. – V. 374. – P. 112118. DOI: 10.1016/j.bbr.2019.112118. (WoS, Scopus) – Q2-Q3.

Отчет утвержден на заседании Ученого совета, протокол № 14 от 27 декабря 2019 г.