

СОДЕРЖАНИЕ

Том 64, номер 3, 2022

Скаффолды – носители лекарственных средств и биологических молекул для биоинженерии костной ткани <i>И. А. Хлусов, Е. Д. Порохова, Е. Г. Комарова, Е. А. Казанцева, Ю. П. Шаркеев, К. А. Юрова, Л. С. Литвинова</i>	183
Роль опухолевого супрессора <i>RB</i> в развитии локализованного и кастрационно-резистентного рака предстательной железы <i>В. М. Рябов, М. А. Воскресенский, Б. В. Попов</i>	208
Поиск низкомолекулярных химических соединений, специфически взаимодействующих с прокаспазой-8 в сигнальном комплексе DISC <i>Й. Эсне, Н. В. Иванисенко, Л. К. Хиллерт-Рихтер, В. А. Иванисенко, И. Н. Лаврик</i>	216
Распределение метастазов в органах мышей после ортотопического введения клеток колоректального рака СТ26 <i>Л. С. Кузнецова, Б. А. Маргулис, И. В. Гужова, В. Ф. Лазарев</i>	226
Оценка состояния митохондрий CD4 ⁺ и CD8 ⁺ Т-лимфоцитов здоровых лиц <i>Л. Б. Королевская, Е. В. Сайдакова, Н. Г. Шмагель, К. В. Шмагель</i>	232
Нитроксидергические и кальретицин-содержащие непирамидные нейроны гиппокампа крысы <i>И. О. Илясов, Д. А. Суфиева, Д. Э. Коржевский</i>	240
Структура и физико-химические свойства паравертебральных сухожилий <i>А. А. Гайдаш, В. К. Крутько, М. И. Блинова, А. В. Нащекин, О. Н. Мусская, К. В. Скромная, О. А. Сычева, Л. В. Кульбицкая, Ю. П. Токальчик, А. И. Кулак</i>	249
Всероссийская конференция с международным участием “Актуальные проблемы современной гистологии”, посвященная 90-летию кафедры гистологии и эмбриологии им. проф. А.Г. Кнорре (Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, 17 июня 2022 г.)	262

Contents

Vol. 64, No. 3, 2022

Scaffolds as carriers of drugs and biomolecules for bone tissue bioengineering <i>I. A. Khlusov, E. D. Porokhova, E. G. Komarova, E. A. Kazantseva, Yu. P. Sharkeev, K. A. Yurova, L. S. Litvinova</i>	183
Role of the tumor suppressor <i>RB</i> in development of localized and castration-resistant prostate cancer <i>V. M. Ryabov, M. A. Voskresenskiy, B. V. Popov</i>	208
Development of small molecules targeting procaspase-8 at the DISC <i>J. Espe, N. V. Ivanisenko, L. K. Hillert-Richter, V. A. Ivanisenko, I. N. Lavrik</i>	216
Distribution of metastases in the organs of mice after orthotopic injection of CT26 colorectal cancer cells <i>L. S. Kuznetzova, I. V. Guzhova, B. A. Margulis, V. F. Lazarev</i>	226
Assessment of mitochondrial condition in CD4 ⁺ and CD8 ⁺ T cells from healthy subjects <i>L. B. Korolevskaya, E. V. Saidakova, N. G. Shmagel, K.V. Shmagel</i>	232
Nitroxidergic and calretinin-containing non-pyramidal neurons of the rat hippocampus <i>I. O. Iliasov, D. A. Sufieva, D. E. Korzhevskii</i>	240
Structure and physico-chemical properties of paravertebral tendons <i>A. A. Gaidash, V. K. Krut'ko, M. I. Blinova, A. V. Nashchekin, O. N. Musskaya, K. V. Skrotskaya, O. A. Sycheva, L. V. Kulbitskaya, Yu. P. Tokalchik, A. I. Kulak</i>	249
All-Russian conference with international participation "Actual problems of modern histology" dedicated to 90-year anniversary department of histology and embryology named after professor A.G. Knorre (St. Petersburg State Pediatric Medical University, June 17, 2022)	262

УДК 616-77;615.015.154:57.085.23

СКАФФОЛДЫ – НОСИТЕЛИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И БИОЛОГИЧЕСКИХ МОЛЕКУЛ ДЛЯ БИОИНЖЕНЕРИИ КОСТНОЙ ТКАНИ

© 2022 г. И. А. Хлусов^{1, 2}, Е. Д. Порохова^{1, 2}, Е. Г. Комарова¹, Е. А. Казанцева^{1, 3}, Ю. П. Шаркеев¹, К. А. Юрова⁴, Л. С. Литвинова⁴, *

¹Лаборатория физики наноструктурных биокомпозитов Института физики прочности и материаловедения СО РАН, Томск, 634055 Россия

²Кафедра морфологии и общей патологии Сибирского государственного медицинского университета, Томск, 634050 Россия

³Кафедра прочности и проектирования Национального исследовательского Томского государственного университета, Томск, 634050 Россия

⁴Центр иммунологии и клеточных биотехнологий Балтийского федерального университета им. И. Канта, Калининград, 236041 Россия

*E-mail: larisalitinova@yandex.ru

Поступила в редакцию 02.02.2022 г.

После доработки 05.03.2022 г.

Принята к публикации 10.03.2022 г.

Тема систем доставки разнообразных лекарственных средств и биологических молекул, включая скаффолд-технологии, актуальна, сложна и многогранна, но освещена в научной литературе фрагментарно. Во многих публикациях не представлены физико-химические свойства материалов-носителей, особенности их биодegradации, которые могут влиять на высвобождение молекул из матрицы и их фармакологическую активность. В других источниках слабо описаны фармакокинетика препаратов и/или клеточные/тканевые реакции. В результате разрозненная информация затрудняет целенаправленный поиск материала и не позволяет делать однозначные выводы по актуальной проблематике. В связи с этим, на основе обзорных и оригинальных статей собраны и критически осмыслены сведения в области разработки и функционирования скаффолдов как носителей лекарственных и биологических молекул; классифицированы материалы и вещества, применяемые в системах доставки лекарств и биологических молекул, а также клеточные и тканевые реакции при их использовании. Особое внимание в обзоре уделено композитным скаффолдам с кальцийфосфатным компонентом в качестве носителей различных фармакологических агентов как эффективных систем доставки в приложениях к биоинженерии костной ткани.

Ключевые слова: стволовые и костные клетки *in vitro*, дефекты костной ткани *in vivo*, клиническая апробация, композитные материалы, фосфаты кальция, фармакологические препараты, биомолекулы, системы доставки

DOI: 10.31857/S0041377122030051

Разработка и внедрение новых эффективных технологий, материалов и лекарственных средств для реконструкции тканевых дефектов становится лидирующим направлением исследований и коммерциализации во всем мире. Разработка систем капсулирования и адресной доставки лекарств, активных веществ и генетического материала признается одними из приоритетных направлений фундаментальных и прикладных исследований в Российской Федерации с перспективой выхода на мировые рынки к 2030 году (Программа фундаментальных научных исследо-

ваний в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 гг.)).

Для поддержания роста, усиления пролиферации и дифференцировки клеток в тканевые структуры активно изучаются “скаффолды” (от английского scaffolds – строительные леса, матрицы, носители, подложки, каркасы), обеспечивающие трехмерную архитектуру для клеточных взаимодействий (Ratner et al., 2004). Скаффолды перспективны при коррекции различных заболеваний и их осложнений (заболевания опорно-двигательного аппарата, сердечно-сосудистые болезни, диабет, опухоли) во многих направлениях тканевой инженерии, включая, но не ограничиваясь, регенерацию костной и хрящевой ткани, восстановление периодонта, сухожилий, роговицы и сердечных клапанов, коррекцию пороков разви-

Принятые сокращения: БФ – бисфосфонаты; ГАП – гидроксипатит; КФ – кальцийфосфат; МСК – мезенхимные стволовые клетки; ППИ – перипротезная инфекция; ПТГ – паратиреоидный гормон; СаР – фосфат кальция; BMPs – морфогенетические белки кости.

тия носа и ушной раковины, замещение связок, восстановления кожных покровов (Garg et al., 2012).

На мировом рынке медицинских изделий сегмент имплантатов для биоинженерии и замещения дефектов костной ткани, согласно маркетинговому исследованию компании Statistics MRC (США, <http://www.strategymrc.com>), является одним из самых быстроразвивающихся (прогнозируемый трехкратный прирост в период с 2015 по 2022 г.) со среднегодовым темпом роста 18.6% к 2022 г. (Orthopedic Biomaterials – Global Market Outlook (2015–2022)). Тем не менее, многие проблемы остеосинтеза (остеопоретические изменения кости, несрастающиеся переломы, формирование ложных суставов и пр.) и эндопротезирования (разрушение и расшатывание имплантатов), включая перипротезные инфекционные осложнения вообще (Karadia et al., 2016) и в онкохирургии костей, в частности (Lin et al., 2021), имеют тенденцию к нарастанию.

Одним из направлений преодоления сложившегося кризиса представляется использование скаффолдов, подходящих для доставки в патологический очаг и высвобождения фармакологических агентов, обладающих терапевтическим и/или регенераторным потенциалом (Garg et al., 2012). Функционализация объема и/или поверхности скаффолдов посредством биологических и лекарственных молекул (Czekanska et al., 2018) призвана улучшить эффективность тканевой инженерии и регенеративной медицины; соответственно, скаффолды становятся носителями и средствами доставки веществ для стимуляции тканевой регенерации посредством активации эндогенных стволовых клеток, контроля процессов воспаления и опухолевого роста, профилактики/лечения инфекционных осложнений. При этом скаффолды должны способствовать стабильному, пролонгированному и, по возможности, контролируемому высвобождению лекарств с достижением высоких локальных концентраций, уменьшением системных и побочных эффектов фармакологических агентов и, соответственно, стоимости лечения хронических дегенеративных заболеваний.

Тема разработки, изучения принципов работы и применения систем доставки разнообразных лекарственных средств и биологических молекул, включая скаффолд-технологии, сложна, многогранна и в настоящее время освещена в научной литературе недостаточно. Во многом это обусловлено научной специализацией авторов публикаций (материаловедение, фармакология, клеточные технологии). Так, некоторые авторы обращают особое внимание на классификацию (например, Garg et al., 2012; Sayed et al., 2017), методы получения и физико-химические свойства скаффолдов-носителей препаратов (Bose, Tarafder, 2012; Sayed et al., 2017; Limongi et al., 2020); в других работах внимание акцентируется на некоторые принципы создания и функционирования систем доставки, пути высвобождения лекарств и био-

молекул (Porter et al., 2009; Zeng et al., 2019). Обширными, но разобщенными направлениями в литературе являются иммобилизация в материалы и скаффолды лекарств и биомолекул различных классов (Bose, Tarafder, 2012; Ferracini et al., 2018), а также апробация разрабатываемых систем доставки *in vitro* и/или *in vivo* (Tenkumo et al., 2020; Paulini et al., 2022). Во многих публикациях либо не охарактеризованы физико-химические свойства материалов-носителей, особенности их биодegradации, которые могут влиять на высвобождение молекул из матрицы и их фармакологическую активность, либо слабо описаны фармакокинетика препаратов и/или клеточные/тканевые реакции. Как следствие, разрозненная информация затрудняет целенаправленный поиск материала и не позволяет делать однозначные выводы по актуальной проблематике.

В связи с этим, на основе обзорных и оригинальных статей собраны и критически осмыслены сведения в области разработки и функционирования скаффолдов как носителей лекарственных и биологических молекул; классифицированы материалы и вещества, применяемые в системах доставки лекарств и биологических молекул, а также клеточные и тканевые реакции при их использовании, преимущественно, в приложении к биоинженерии костной ткани.

СКАФФОЛДЫ ДЛЯ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ И БИОЛОГИЧЕСКИХ МОЛЕКУЛ

Варианты имплантируемых (в качестве покрытий или скаффолдов) или инъектируемых скаффолдов/цементов для доставки клеток и/или молекул весьма разнообразны (Zeng et al., 2019) и могут в себя включать (самостоятельно или в виде композитов) (Garg et al., 2012) по структуре и/или форме: 1) трехмерные (3D) пористые конструкции; 2) (нано)волокнистые матрицы; 3) микро- и наносферы. По природе материала: 1) металлы, их оксиды и сплавы (Sayed et al., 2017); 2) деминерализованный костный матрикс (Van de Putte, Urist, 1965); 3) фосфаты кальция (гидроксиапатит (ГАП), ди-, три- и октакальцийфосфаты (КФ)) (Bose, Tarafder, 2012; Garg et al., 2012; Liang et al., 2020); 3) биоактивные стекла (силикатные, боратные, фосфатные, боросиликатные) и их композиты (Ge et al., 2019); 4) натуральные (альгинат, коллаген, хитозан, желатин, фибрин, фибронектин, фиброин шелка, альбумин, декстран, гепарин и др.) или синтетические полимеры (в частности, полилактид, полигликолид, поликапролактон, поливиниловый спирт, полиуритан, полиалкоаноаты и их сополимеры) (Santoro et al., 2014; Abdel-Fattah et al., 2015; Bhattacharjee et al., 2017; Zhang et al., 2018; Huang et al., 2019; Литвинова и др., 2020; Shafabakhsh et al., 2020); 5) кремний и его оксиды (Sayed et al., 2017); 8) углеродные материалы (Yadavalli et al., 2019).

По размерам пор 3D-скаффолды как системы доставки разделяют на: 1) макропористые (диаметр

пор более 50 нм); 2) мезопористые (2–50 нм); 3) микропористые (диаметр менее 2 нм) (Sayed et al., 2017) согласно The International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) (Arguebo, 2012). Существует определенное противоречие различных классификаций, поскольку с точки зрения тканевой инженерии (Ebrahimi, 2021) распределение материалов по размерности пор выглядит следующим образом: 1) макропористые (диаметр пор более 100 мкм); 2) микропористые (1–100 мкм); 3) субмикропористые (0.1–1 мкм); 4) нанопористые (менее 100 нм).

В свою очередь, среди материалов с разной природой, структурой, формой и размерами, по особенностям реакций на раздражители выделяют отдельный класс “интеллектуальных” (Ju et al., 2009) или “умных” (Montoya et al., 2021) систем (инертных, активных, чувствительных, саморегулируемых), предсказуемо реагирующих изменением свойств на вариации температуры, ионной силы раствора, концентрации веществ, электромагнитного поля, ультразвука, смачиваемости и топографии поверхности и т.п.

Методы получения скаффолдов, включая современные аддитивные технологии (Wang et al., 2016; Yan et al., 2019; Limongi et al., 2020), обширны и многократно описаны (например, Raeisdasteh Hokmabad et al., 2017; Sayed et al., 2017). Следует отметить, что загрузка биологически активных веществ в материал скаффолдов на этапе их изготовления значительно сужает круг методов получения систем доставки, поскольку влияние химических растворителей и высоких температур оказывает разрушающее действие на биомолекулы.

ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ СИСТЕМ ДОСТАВКИ НА ОСНОВЕ СКАФФОЛДОВ ДЛЯ КОСТНОЙ ТКАНИ

Системное введение лекарственных веществ и/или биологических молекул часто является малоэффективным вследствие их короткого времени жизни (особенно в физиологических средах), неизбирательного биораспределения, потенциальной токсичности и риска канцерогенной активности. Таким образом, включение биоактивных веществ в скаффолд позволяет, теоретически, решать несколько основных задач: обеспечение локализованной доставки оптимальных концентраций фармакологических агентов; сохранение биологической активности молекул; контролируемое высвобождение веществ в течение необходимого периода времени; снижение системной токсичности.

Дополнительными преимуществами рельефных (пористых (диаметр пор 50–150 мкм) и/или шероховатых скаффолдов (биodeградируемых и нерастворимых), как носителей лекарств и биомолекул, является их способность модулировать активность стволовых клеток и иммунной системы, способствовать ангиогенезу, необходимому для процессов костного

ремоделирования (Sundelacruz, Kaplan, 2009; Li et al., 2019; Khlusov et al., 2020).

Основные варианты разработки систем доставки описаны в многочисленных работах, например (Potter et al., 2009; Sundelacruz, Kaplan, 2009). Мы представили на рис. 1 общие принципы создания и функционирования систем доставки лекарств и биомолекул, основываясь на одном из последних обзоров (Zeng et al., 2019).

При разработке конкретных систем доставки способ загрузки в скаффолд-носитель лекарственных средств и биологических молекул вытекает из конечной цели их создания (свойства препарата, требуемая скорость/время и концентрация выделения вещества, место применения), базируется на двух основных методах их связывания с материалом — физическом и химическом (рис. 1). Физический способ загрузки достаточно простой и эффективный, использует разнообразные принципы (поверхностная адсорбция или объемная абсорбция, инкапсуляция, ионное комплексообразование, афинное связывание) и методы заполнения матрицы (экстракция из растворителя, механический способ, высокое давление, смешивание в горячем расплаве и др.), которые минимально влияют на лекарственное средство и его эффективность. В то же время, физическая загрузка приводит, как правило, к быстрому высвобождению веществ из скаффолдов (за исключением некоторых видов инкапсулирования), слабое взаимодействие вещества и материала скаффолда ограничивает равномерность выделения лекарства. Химический способ загрузки помогает преодолеть данные ограничения, увеличить время выделения (рис. 1) и стабилизировать концентрацию высвобождаемых препаратов. Однако, в некоторых случаях, например, при загрузке антибиотиков, их медленное выделение в низких концентрациях может способствовать развитию микробной антибиотикорезистентности (Parent et al., 2017).

В свою очередь, активно изучаются принципы функционирования систем доставки, сложные по своей природе, поскольку они основаны на свойствах лекарств и биомолекул, параметрах матриц-носителей (например, способности к биодеградации, степени “интеллектуальности” и др.), принципах создания (физических, химических) самих скаффолдов и систем доставки в целом, что, в совокупности, определяет пути и скорость высвобождения препаратов (рис. 1). До конца нерешенными, в сравнении с обычным использованием лекарственных средств, являются вопросы фармакокинетики и фармакодинамики, поддержания терапевтической концентрации (Zeng et al., 2019), чувствительности таргетных клеточных систем и тканей в организме.



Рис. 1. Общие принципы создания и функционирования систем доставки лекарств и биомолекул (по Zeng et al., 2019).

ОСНОВНЫЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ВЕЩЕСТВА И БИОМОЛЕКУЛЫ В СИСТЕМАХ ДОСТАВКИ ДЛЯ БИОИНЖЕНЕРИИ КОСТНОЙ ТКАНИ

В различных исследованиях изучали внедрение в системы доставки таких лекарственных и биологических молекул, как антимикробные и противовоспалительные препараты, цитокины и факторы роста, нуклеиновые кислоты, гормоны, цитостатики (табл. 1) (Garg et al., 2012; Limongi et al., 2020). В качестве клинических приложений рассматриваются различные нозологические формы патологии костной ткани: длительно несрастающиеся переломы (антибиотики, остеоиндуктивные агенты), остеомиелит (антибиотики), остеоартрозы/остеоартриты (декстран), остеонекротоз (симвастатин), остеокаркома и костные метастазы (доксорубин) (Ferracini et al., 2018), остеопороз (бисфосфонаты, паратиреоидный гормон) (Asafo-Adjei et al., 2016; Wang et al., 2018).

Так, бисфосфонаты (БФ) являются производными фосфоновых кислот, содержащими две фосфонатные группы (PO_3^{2-}), и синтетическими аналогами природных неорганических пирофосфатов – эндогенных регуляторов минерализации костной ткани, обладающих аффинностью к ионам кальция. После-

довательность P–C–P в молекулах БФ устойчива к гидролизу в отличие от P–O–P цепочки в пирофосфатах. БФ, включая их азотсодержащие формы, замедляют темп костного ремоделирования. Они в большей степени подавляют костную резорбцию, чем костеобразование, за счет прямого ингибирования функциональной активности, подвижности остеокластов и их связывания с костной тканью. Такие эффекты сопровождаются увеличением костной массы. В боковых цепях атомов углерода БФ содержатся два радикала, которые используются для химической конъюгации БФ со скаффолдами (Хлусов и др., 2013; Zeng et al., 2019). При этом присутствие КФ материалов в культуре клеток костного мозга *in vitro* модифицирует биологическую активность БФ (Хлусов и др., 2014).

Остеосаркомы являются часто встречающейся злокачественной опухолью в первые 10–20 лет жизни человека (Morrow, Khanna, 2015). В их лечении применяют традиционные хирургические, радио- и химиотерапевтические подходы. Тем не менее, 5-летняя выживаемость при саркомах мягких тканей не превышает 50–60%, поскольку системная токсичность применяемых цитостатических препаратов резко ограничивает их терапевтическую эффек-

Таблица 1. Примеры перспективных препаратов и биологических молекул в составе скаффолдов и других систем доставки для повышения эффективности биоинженерии костной ткани

Название	Цель использования	Ссылки
Бисфосфонаты		
Бисфосфонаты (хлордронат, этидронат), включая азотсодержащие формы (ризедронат, алендронат, ибандронат, золедронат и др.)	Антирезорбтивная активность и усиление минеральной плотности костей при остеопорозе и раковых метастазах в кость за счет преимущественного подавления остеокластов. Азотсодержащие БФ имеют более высокую аффинность к апатитам. Нет существенных различий в клинической эффективности разных классов БФ	Nancollas et al., 2006; Puljula et al., 2015; Ferracini et al., 2018; Zeng et al., 2019; Bae et al., 2021
Антимикробные средства		
Тетрациклин, доксициклин; гентамицин; ванкомицин; цефалексин	Антимикробный эффект с риском формирования микробной резистентности к препаратам	Bose, Tarafder, 2012
Ионы металлов (Ag, Zn, Cu и др.)	Антимикробный эффект; профилактика образования бактериальной биопленки; отсутствие микробной резистентности к препаратам Стимуляция (за исключением Ag) регенераторного потенциала клеток кости и костного мозга	Wang, Yeung, 2017; Rizwan et al., 2018; Sedelnikova et al., 2019
Противоопухолевые препараты		
Метотрексат; Цисплатина; Доксорубин	Инкапсуляция и/или включение в состав скаффолдов (прежде всего, костного цемента) для профилактики минимальной остаточной болезни, метастазов и микробных осложнений. Снижение системной токсичности химиотерапии, усиление противоопухолевой эффективности препаратов	Yang et al., 2009; Tanzawa et al., 2011; Ferracini et al., 2018
Полипептидные факторы роста и гормоны		
Морфогенетические белки кости (Bone morphogenetic proteins; BMPs)	Индукция роста кости из мезенхимных стволовых клеток (МСК) без инициации остеокластов	Boontheekul, Mooney, 2003;
Трансформирующий фактор роста- β (Transforming growth factor- β ; TGF- β)	Способствует росту кости за счет стимуляции миграции клеток-предшественников, регуляции их пролиферации, дифференцировки и синтеза костного матрикса. Подавляет пролиферацию и дифференцировку предшественников остеокластов	Kempen et al., 2010; Bose, Tarafder, 2012; Liang et al., 2020
Фактор роста фибробластов (Fibroblast growth factor; FGF)	Стимулирует ранозаживление; усиливает пролиферацию остеобластов, что способствует ангиогенезу	
Фактор роста тромбоцитов (Platelet-derived growth factor; PDGF)	Активирует ранозаживление, пролиферацию костных клеток и ангиогенез	
Инсулиноподобный фактор роста (Insulin-like growth factor; IGF)	Стимулирует пролиферацию остеобластов, синтез костного матрикса и активность остеокластов	
Фактор роста эндотелия сосудов (Vascular endothelial growth factor; VEGF)	Индукцирует ангиогенез и неоваскуляризацию посредством усиления миграции, пролиферации и выживания эндотелиоцитов	
Антагонист рецептора к интерлейкину-1 (IL-1Ra)	Противовоспалительные свойства при остеоартрите: увеличение биоактивности и периода полураспада молекулы; снижение дегенеративных изменений хрящевой ткани	Whitmire et al., 2012
Гены факторов роста	Доставка и экспрессия генов в клетках организма-хозяина для преодоления проблемы иммуногенности, короткого периода жизни и необходимости применения высоких доз рекомбинантных факторов роста	Kofron, Laurencin, 2006; Phillips et al., 2007; Malek-Khatabi et al., 2020

Таблица 1. Окончание

Название	Цель использования	Ссылки
Паратиреоидный гормон	Повышение минерализации костной мозоли и ремоделирования кости в месте перелома	Ferracini et al., 2018
Другие классы препаратов и биомолекул		
микроРНК	Биотехнологические подходы к позитивной/негативной внутриклеточной регуляции стволовых, прогениторных и опухолевых клеток, в том числе, кости, на (пост)транскрипционном уровне	Eskildsen et al., 2011; Zhou et al., 2014; Peng et al., 2015
“молчащие” РНК (siRNA)		Ferracini et al., 2018
“Малые” молекулы (ресвератрол; стронцияранелат; хелидонаткальция; кальций; литий; дексаметазон; глицерофосфат; аскорбиновая кислота; аденозин; статины; апатиниб и др.)	Молекулярная масса молекул обычно менее 900 Дальтон (Ferracini et al., 2018). Регуляция определенных клеток-мишеней (МСК, остеобласты, остеокласты, эндотелиоциты) для усиления остеогенной дифференцировки <i>in vitro</i> и ремоделирования кости <i>in vivo</i> . Апатиниб (ингибитор тирозинкиназы, блокирующий рецепторы VEGF 2-го типа) проходит клинические испытания в приложении к комбинированному лечению остеосаркомы	Ferracini et al., 2018; Avdeeva et al., 2019; Zhang et al., 2020; Xie et al., 2021
Противовоспалительные (ибупрофен)	Профилактика и снижение интенсивности постимплантационного воспаления	Girod Fullana et al., 2010
Гепарин	Самостоятельная система доставки лекарств и молекул; регулятор остеогенной и ангиогенной активности МСК	Zhang et al., 2018; Литвинова и др., 2020; Норкин и др., 2021

тивность. В связи с этим, системы местной доставки цитостатиков и БФ (Ferracini et al., 2018), наряду с другими фармакологическими веществами (остеопонтин, сиалопротеин, малые интерферирующие РНК, микроРНК) (Elazar et al., 2010; Reufsteck et al., 2012; Chen et al., 2019), рассматриваются как перспективная терапевтическая стратегия при опухолях кости и раковых метастазах в кость (табл. 1).

Современной проблемой является перипротезная инфекция (ППИ), особенно в первые два года после эндопротезирования крупных суставов (Ellengieder et al., 2011; Тихилов и др., 2014), остеосинтеза и других костных операциях. Несмотря на тот факт, что различные антибиотики в составе имплантатов и средств доставки (например, в костном цементе при эндопротезировании) снижают риск ППИ, существует реальная необходимость дополнительной антимикробной модификации поверхности и структуры имплантатов, способствующей снижению их бактериальной колонизации и последующих инфекционных осложнений (Parvizi et al., 2008). В этом плане ионы серебра, меди, цинка (табл. 1) и других металлов (Юрова и др., 2021) рассматриваются как перспективные компоненты систем доставки с точки зрения эффективности, биобезопасности и экономической целесообразности (Parvizi et al., 2013; Wang, Yeung, 2017).

Разнообразной группой биологически активных веществ, модулирующих процессы регенерации костной ткани, являются многочисленные цитоки-

ны, хемокины (Khlusov et al., 2020) и факторы роста, обладающие, как правило, плеiotропными эффектами. Так, морфогенетические белки кости (bone morphogenic proteins, BMPs) из семейства трансформирующего фактора роста- β (transforming growth factor- β , TGF- β) вызывают локальное образование хрящевой и костной ткани в месте их введения, что позволяет считать их одними из немногих истинных остеоиндукторов (Urist, Strates, 1971). С другой стороны, они оказывают широкое влияние на морфогенез нервных волокон, сосудов, зубов, сердца, лимфатической и кроветворной систем в кооперации с другими регуляторными молекулами, прежде всего, трансформирующим фактором роста- β (Lyons et al., 1990).

Рекомбинантные белки BMP-2 и BMP-7 были рекомендованы Управлением по контролю за продуктами питания и лекарственными средствами США (Food and Drug Administration, FDA) для клинических исследований и приложений к регенерации костной ткани (Kofron, Laurencin, 2006), в том числе на носителях в виде коллагеновой губки или пасты (Ratko et al., 2010). По мере накопления опыта клинического применения BMPs частота осложнений при их системном назначении составила 20–70% со стороны нервной системы и уrogenитального тракта; отмечены нарушения заживления ран (гематома, инфицирование), случаи эктопического костеобразования в мягких тканях и повышенная резорбция

костей (James et al., 2016). Сдерживающим фактором широкого использования BMPs является также высокая цена (вследствие больших затрат на стадии R&D), несопоставимая с эффективностью белковых препаратов. По состоянию на 2017 г., согласно отчету международной маркетинговой и консалтинговой фирмы iData Research Inc. (США, <https://www.idata-research.com>) (US Market Overview for Orthopedic Biomaterials 2017), в США, наиболее объемном сегменте мирового рынка, другие препараты BMPs пока не получили разрешения к широкому клиническому применению. Кроме того, BMPs пока не получили одобрения к клиническому применению у детей, беременных женщин и больных с онкологическими заболеваниями (Emara et al., 2015).

В связи с этим, полипептидные факторы роста привлекли внимание в качестве перспективных наполнителей систем доставки для их локального высвобождения в патологических очагах (табл. 1) в меньшей концентрации, что, соответственно, позволит снизить затраты и риск побочных эффектов при системном назначении. Новым экспериментальным направлением стало развитие генной терапии на основе вирусных, наноразмерных и других систем доставки генов факторов роста (Kofron, Laurencin, 2006; Phillips et al., 2007; Malek-Khatibi et al., 2020).

Еще одним интересным и перспективным биотехнологическим направлением в регенеративной медицине является изучение и применение микроРНК, модулирующих посттранскрипционную активность генов на уровне мРНК. Малые интерферирующие РНК (siRNA) и микроРНК являются внутриклеточными регуляторами функций (пролиферация, дифференцировка, созревание, апоптоз) стволовых и прогениторных клеток, включая мезенхимные стволовые клетки (МСК) и преостеобласты (Peng et al., 2015; Ferracini et al., 2018). В рамках проблемы локальной доставки нуклеиновых кислот активно изучаются как вирусные (Liao et al., 2014), так и скаффолд-системы (иммобилизация молекул на поверхности и/или в объеме скаффолда) (Eskildsen et al., 2011; Pan et al., 2021) со своими преимуществами и недостатками.

Однако лишь немногие разработки дошли до клинического использования и имеют перспективу для клинических приложений (Kabu et al., 2015) в инженерии костной ткани, несмотря на значительное количество патентов в этой области (например, Farrar et al., 2013; Митриченко и др., 2021). Исключениями считаются местная противоопухолевая химиотерапия, а также введение антибиотиков и антимикробных металлов в системы доставки и ортопедические конструкции (Ellenrieder et al., 2011; Ferracini et al., 2018; Huang et al., 2019). Так, описан успешный клинический случай (табл. 1) применения TiCuN покрытия на имплантатах для профилактики остеомиелита после ревизионного замещения эн-

допротеза тазобедренного сустава (Ellenrieder et al., 2011). Рекомбинантный паратиреоидный гормон (ПТГ) и его некоторые производные (ПТГ 1–34) разрешены FDA для системного подкожного введения при остеопорозе; изучается эффективность ПТГ при костных переломах (Ferracini et al., 2018), в том числе, в случае локальной доставки в место перелома (Jung et al., 2007). Лимитирующим фактором для иммобилизации ПТГ, как и для других полипептидных молекул, является сохранение их активности при введении в систему доставки и последующем хранении перед использованием (Kothari et al., 2011), а также вопросы предимплантационной стерилизационной подготовки.

КЛЕТочНЫЕ И ТКАНЕВЫЕ РЕАКЦИИ НА СКАФФОЛДЫ-НОСИТЕЛИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И БИОЛОГИЧЕСКИХ МОЛЕКУЛ

Примеры применения скаффолдов в исследованиях in vitro

Многообразие комбинаций лекарственных средств и бимолекул (табл. 1), а также материалов, предлагаемых для их доставки в костную ткань, не позволяет даже кратко изложить их в одной обзорной статье. Исторически BMPs рассматриваются как одни из ведущих стимуляторов костеобразования, в том числе в составе скаффолдов-носителей. В одном из последних обзоров (Paulini et al., 2022) представлены клеточные эффекты рекомбинантного белка BMP-2, иммобилизованного на носителях из различного материала (коллаген, коллаген/ГАП, гликозаминогликаны, эластин, шелк, полимеры), включая пористые 3D-скаффолды, полученные *in vitro* различными авторами, в отношении МСК человека и животных. Отмечено усиление клеточной адгезии, повышение экспрессии мРНК генов остеодифференцировки (runx-related transcription factor 2 (RUNX2), остеокальцин (OC)), экспрессии и секреции маркеров остеогенеза (щелочная фосфатаза (alkaline phosphatase, ALP), OC, остеоопонтин и костный сиалопротеин), обусловленные выделением BMP-2 из матриц носителей.

Например, Тан с соавторами (Tan et al., 2012) показали *in vitro* возможность продолжительного (до 21 сут) линейного кумулятивного высвобождения до 80% введенного рекомбинантного белка человека BMP-2 (15 мкг/мл) из частиц ГАП/коллаген, помещенных в альгинатный гидрогель и сформированных в цилиндры. Остеогенная активность BMP-2 фиксировалась авторами *in vitro* по усилению секреции ALP МСК человека после контакта с экстрактами цилиндров, содержащими фактор роста (табл. 2). Согласно представленным графикам, к 21-м сут активность белка постепенно снижалась (примерно в 2 раза по сравнению с таковой в 1-е сут экстракции) и достигала 60 Ед/л. В случае добавления 0.5 мкг/мл

ВМР-2 активность ALP в контрольной (без цилиндров) культуре клеток составила 275 Ед/л. Полученные результаты свидетельствовали о возможности длительного выделения полипептидного фактора роста с относительным сохранением его биоактивности. Достоинством работы является краткое описание методов стерилизации отдельных компонентов системы доставки и упоминание, что смешивание и изготовление цилиндрических скаффолдов проводилось в стерильных условиях чистой комнаты.

Ли с соавторами (Lee et al., 2021) создали многокомпонентную композитную матрицу, состоящую из наночастиц (средний диаметр 98 нм) ГАП и сетки коллагена I типа, в которую помещали ВМР-2 и/или алендронат методом физической адсорбции или в пористых микросферах (средний диаметр 30 мкм) из полилактидгликолида (PLGA). В последующем материал формовали в скаффолды (диски 8 × 2 мм) в полиметилсилоксане (1 мкг/скаффолд). Показан синергетический эффект иммобилизованных веществ на остеодифференцировку преостеобластных клеток линии МС3Т3-Е1 (табл. 2). Скаффолды системы “ГАП/коллаген” стерилизовали ультрафиолетом, что неприемлемо для апроксимации разработки в клиническую практику. Кроме того, начальные (до растворения) дозы препаратов в скаффолде были нами высчитаны из кинетики их высвобождения, поскольку прямые указания в самой статье не обнаружены.

Проводится также изучение других факторов роста в приложении к биоинженерии костной ткани. В частности, *in vitro* и *in vivo* тестировали остеогенную активность фактора роста фибробластов-2 (fibroblast growth factor, FGF-2) на композитных кальций-магний-силикатных скаффолдах, полученных методом послойной 3D-печати, с последующим формированием желатинового покрытия и загрузкой FGF-2 из раствора (Lai et al., 2021). Авторы отметили позитивный эффект фактора роста на культуре МСК вартонова студня пупочного канатика и при закрытии дефекта бедренной кости кроликов (табл. 2). В то же время многие методические моменты (размеры скаффолдов, подробности иммерсионного метода растворения *in vitro*), включая стерилизацию конструкций и их компонентов, в указанной работе не описаны.

В плане разработки подходов к генной терапии вызывает интерес исследование, выполненное *in vitro* и *in vivo* на наноразмерной системе доставки “CaP/PEI/siRNA/SiO₂” (Tenkumo et al., 2020). Система состоит из наночастиц фосфата кальция (CaP) с полиэтиленамином (PEI) с включением siRNA против гена фактора некроза опухоли α (tumor necrosis factor- α ; TNF- α), покрытой тонкой оболочкой из силикатного стекла (SiO₂) (табл. 2). Показано снижение экспрессии гена провоспалительного цитокина в клетках, противовоспалительный и костно-заживляющий эффекты на модели дефекта

периодонта крыс при использовании данной системы. О стерилизации системы доставки и ее компонентов данные не приводятся.

КФ носители лекарственных и биологических молекул имеют определенные преимущества перед другими классами материалов, поскольку служат естественным резервуаром ионов кальция и фосфора, необходимых для инициации процессов остеогенеза и минерализации (Zeng et al., 2019). КФ материалы применяются в форме наночастиц, цементов, объемных пористых скаффолдов, покрытий и др. (Bose, Tarafder, 2012). В случае КФ скаффолдов и покрытий, технологически формируемая внутренняя и наружная пористость опосредуют не только различные варианты иммобилизации веществ-наполнителей, но и обеспечивают транспорт жидкостей, клеточную инфильтрацию, вращение кровеносных сосудов и тканей (Zeng et al., 2019). Известными полезными свойствами КФ являются их стойкость к температурной стерилизации, а также относительная механическая прочность (прежде всего, в виде покрытий на металлических конструкциях), требуемая при хирургической коррекции травм и заболеваний длинных трубчатых костей.

КФ материалы могут использоваться как самостоятельные системы доставки, а также в комбинации с микро- и наночастицами (капсулами), наполненными лекарственными и биомолекулами, и покрытыми полимерными/липидными слоями, предохраняющими от “взрывного” выделения иммобилизованного вещества. Для иммобилизации препаратов используются как физическая адсорбция лекарственного агента, так и его химическая конъюгация в полимерном слое (Bose, Tarafder, 2012). Так, Радин с соавторами (Radin et al., 1997) показали быстрое (в первые 24 ч) высвобождение ванкомицина, загруженного в КФ покрытие по механизму физической адсорбции иммерсионным методом. Тонкий слой фосфатидилхолина на КФ покрытии замедляет и продлевает выделение антибиотика до 72 ч в концентрациях, подавляющих рост золотистого стафилококка (*Staphylococcus aureus*) (табл. 2).

Биодеградируемые магниевые сплавы считаются перспективными материалами для биоинженерии костной ткани. В то же время, при их имплантации *in vivo* отмечается высокая частота ППИ (Хлусов и др., 2019). Недавно разработан скаффолд на основе магниевых сплавов – Mg + микродуговое кремнийсодержащее покрытие + альгинатный гель + ванкомицин (0.5 мас. % методом погружения) (Minting et al., 2020). Модифицированный скаффолд улучшал коррозионное поведение и гемосовместимость (снижение гемолиза эритроцитов и адгезии тромбоцитов). В то же время, массивное логарифмическое выделение антибиотика (до 0.7 мг/см² скаффолда) в фосфатный буфер с достижением участка насыщения наблюдалось уже в первые 50 мин теста на растворение. Противомикробное действие (зона просветле-

Таблица 2. Примеры применения скаффолдов, преимущественно с кальцийфосфатным компонентом, в качестве носителей лекарственных и биологических молекул для биоинженерии костной ткани и замещения ее дефектов (в хронологическом порядке)

Материал/композит	Свойства объемной или поверхностной структуры	Метод получения	Введенное вещество	Метод/кинетика/эффективность высвобождения молекул	Клеточные/тканевые эффекты	Ссылки
Исследования <i>in vitro</i>						
ГАП/ТКФ покрытие на Ti-6Al-4V дисках (диаметр 12.5 мм; толщина 3 мм)	Толщина покрытия 5–80 мкм; масса 8–24 мг	Электрофорез суспензии ГАП + последующее спекание. Часть образцов дополнительно покрывалась слоем фосфатидилхолина (ФХ) куриного яйца (10–20 мг/мл)	Ванкомицин 800–1200 мкг/см ² ; физическая адсорбция из раствора	Иммерсионный метод в аналоге физиологической жидкости. Экспоненциальное убывание выхода антибиотика с 60 мкг/мг покрытия (1 ч экстракции) до следовых количеств после 24 ч; ФХ слой продлевает высвобождение ванкомицина до 72 ч в концентрации 5–20 мкг/мг покрытия	Подавление роста золотистого стафилококка экстрактами покрытия в первые 24 ч. ФХ слой продлевает антибактериальный эффект до 72 ч	Radin et al., 1997
ГАП/поликапролактон (PCL) губка (20 × 20 × 6 мм ³ (масса 0.8–1 г))	Свободные связанные поры (диаметр 150–200 мкм); общая пористость 87%	Погружение пористо-сетчатой полиуретановой (ПУ) формы в суспензию ГАП с последующей сушкой и выжиганием ПУ матрицы. Нанесение ГАП/PCL/антибиотик покрытия методом погружения/сушки в течение 48 ч	Тетрациклина гидрохлорид 0.25–0.75 мас. %	Иммерсионный метод в фосфатном буфере. Линейная деградация скаффолда с потерей 20–45% исходной массы к 7 дню. Логарифмическое кумулятивное высвобождение антибиотика в период от 2 ч до 7 дней: 20–30% в первые 2 ч и 40–60% (до 0.05 мг/мл) к 7 дню наблюдения	Не описаны	Kim et al., 2004
Биоактивная костная паста (БКП; CERAPASTE. Япония) или костный цемент (КЦ; Stryker Co., Япония)	Цилиндры (диаметр 7 мм, длина 14 мм)	Формование суспензии в акриловых трубках до затвердения	Цис-диаминдихлорплатина (100 мг порошка на 21 г цилиндра)	Иммерсионный метод в фосфатном буфере. Убывание по экспоненте со 180 мкг/мл почти до нуля за 1 нед. для БКП (14% за 8 нед.). Всего 0.3% препарата выходит линейно из КЦ за 4 нед.	Полулетальная доза цисплатины 2.08 мМ в отношении SOSN2 клеток остеосаркомы крысы. Экстракты (1–7 дней) цилиндров с цисплатиной вызывали 2-кратное торможение 24-ч роста опухолевых клеток согласно МТТ тесту	Tanzawa et al., 2011

Таблица 2. Продолжение

Материал/компонент	Свойства объемной или поверхностной структуры	Метод получения	Введенное вещество	Метод/кинетика/эффективность высвобождения молекул	Клеточные/тканевые эффекты	Ссылки
Частицы гидроксиапатит (ГАП)/коллаген в гидрогеле на основе альгината/глюконолактона, формованном в цилиндры	Диаметр частиц ГАП/коллаген 50 ± 6.6 мкм; Размер цилиндров 8 мм в диаметре и 10 мм в длину	Метод формования композита из гидрогеля описан	Рекомбинантный BMP-2 человека (15 мкг/мл)	Линейное высвобождение до 80% BMP-2 в течение 21 дня с сохранением остеогенной активности белка	Усиление секреции щелочной фосфатазы (ALP) МСК костного мозга после 5 дней контакта с экстрактом цилиндров, содержащих BMP-2	Tan et al., 2012
КФ покрытие на чистом Ti (BT1-0) или Ti-40Nb сплаве	Металлические пластины (10 × 10 мм), толщина 1 мм. Свойства ди- и моноКФ покрытия: индекс шероховатости Ra = 2.9–3.3 мкм; толщина 48–60 мкм; масса 13.5–15 мг	Микродуговой способ формирования покрытия из порошка ГАП-Zn или ГАП-Cu в электролите	Zn или медь (Cu) (0.3–0.4 ат. % в покрытии)	Иммерсионный метод в среде RPMI-1640. Выход Cu в 7-дневном экстракте составил 0.5% от количества в покрытии	Увеличение подвижности МСК человека (КФ-Zn), секреции остеокальцина (КФ-Cu). Бактериостатический эффект в отношении роста колоний <i>S. aureus</i> (КФ-Zn и КФ-Cu). Результаты варьируют на разных металлических подложках	Литвинова и др., 2017; Komarova et al., 2020
Наночастицы CaP/PEI/siRNA/SiO ₂ , содержащие siRNA против гена фактора некроза опухоли (TNF- α)	Диаметр частиц 40–90 нм; дзета-потенциал 23 мВ	Наночастицы фосфата кальция (CaP) с полиэтиленгликолем (PEI) смешивали с водным раствором TNF- α -siRNA, потом с тетраэтилокси силикатом; CaP/PEI/siRNA частицы, покрытые SiO ₂ слоем, выделяли ультрацентрифугированием и разбивали ультразвуком	2000 молекул siRNA/частицу	Не описаны. Наночастицы поглощались клетками	Эффективность снижения экспрессии мРНК гена TNF- α в J774.2 моноцитах мышей, миелокариоцитах и клетках десны крыс составила 12–36% при клеточной жизнеспособности >65%; активность ALP повышалась в миелокариоцитах через 24 ч культивирования с наночастицами	Tenkumo et al., 2020

Таблица 2. Продолжение

Материал/компонент	Свойства объемной или поверхностной структуры	Метод получения	Введенное вещество	Метод/кинетика/эффективность высвобождения молекул	Клеточные/тканевые эффекты	Ссылки
Паста для 3D-печати: порошок силиката кальция, легированного магнием (MgCS) + PCL в соотношении 50 : 50	Скаффолды из пасты с внутренними балками и порами 500 × 300 мкм. Размер скаффолдов не указан. Химически Ca ₂ Mg(SiO ₄) ₄	Послойная 3D-печать при 80°C. Покрытие из желатина в 0–5%-ном растворе с последующей сшивкой генипином	Физическая 2-ч адсорбция рекомбинантного FGF-2 из раствора 500 нг/мл в желатиновое покрытие	Иммерсионный метод до 3 мес., растворитель не указан. Желатиновый слой логарифмически замедляет потерю массы скаффолдов к 3 мес. с 45 до 30%; усиливает кумулятивный логарифмический выход FGF-2 с 20 нг (скаффолд без покрытия) до 90 нг (покрытие из 5% раствора желатина) к 14 дню растворения	В остеогенной среде МСК пупочного канатика на 3 и 7 сут лучше пролиферируют и экспрессируют ALP на скаффолдах с желатиновым слоем, насыщенным FGF-2	Lai et al., 2021
Наночастицы ГАП/коллаген I типа + PLGA, формованные в полиметилсилоксане	Средний диаметр ГАП частиц 98 нм; сетка поперечно-сшитого коллагена крысы; микросферы (диаметр 30 мкм) PLGA (50 : 50)	Метод формования дисков 8 × 2 мм	Рекомбинантный BMP-2 человека (0.25 мкг/мл) и/или алендронат (АЛД) (80 мкг/мл)	Иммерсия в фосфатный буфер при встряхивании до 8 нед. Логарифмический кумулятивный выход веществ, физически адсорбированных в скаффолде: BMP-2 (30% в 1-й день; 90% в течение 7 дней); АЛД (60% в 1-й день; 90% в течение 14 дней). PLGA капсулы замедляли, но пролевали выход BMP-2 (до 15 дней) и АЛД (до 8 нед.)	Синергетический эффект препаратов на жизнеспособность и ALP активность MC3T3-E1 преosteобластов в 7-дневной культуре.	Lee et al., 2021

Таблица 2. Продолжение

Материал/ композит	Свойства объемной или поверхностной структуры	Метод получения	Введенное вещество	Метод/кинетика/ эффективность высвобождения молекул	Клеточные/ тканевые эффекты	Ссылки
КФ покрытие на Ti–6Al–4V или Ti–6Al– 7Nb сплавах	Металлические диски диамет- ром 11 мм и пластины (10 × 10 мм), толщина 1 мм; тонкое (тол- щина 1.2– 1.3 мкм) КФ покрытие (Ca/Pat = 2.2– 2.3)	Магнетронное напыление ГАП-Zn мишени на металлическую подложку	Цинк (Zn; 0.4– 0.8 мас. % в покрытии)	Иммерсионный метод в 0.9% рас- творе хлорида натрия. Линейное 5-нед нарастание выхода Zn из покрытия (до 0.05– 0.07 мг/л) в проти- вовес линейно убы- вающим высвобождению ионов кальция и фосфора	7-дневные экстракты КФ-Zn покрытия подавляют в 4–5 раз 24 ч рост колоний <i>S. aureus</i> на агаре. Кроме того, КФ-Zn покрытия контактно подавляют 48 ч жиз- неспособность лей- козных Т- лимфоцитов линии Jurkat; не нарушают индуцированную КФ остеодифференци- ровку и минерализа- цию (при окраске ализириновым крас- ным) МСК человека	Prosolov et al., 2021

Исследования *in vivo*

КФ покрытие на Ti–6Al–4V дисках (диаметр 10 мм)	Толщина без- пористого октакальций- фосфатного покрытия 23– 25 мкм; крити- ческая нагрузка (до разрушения покрытия) в скретч-тесте 1.8–2.5 Н	Осаждение на подложку в тече- ние 48 ч при 37°C из перена- сыщенной сус- пензии КФ, содержащей 10 мг/л ВМР-2. Хранение образ- цов при –80°C	Рекомбинант- ный ВМР-2 (0.1–0.5 мкг/мг покрытия; 0.98– 1.7 мг/диск)	Линейная 5-недель- ная деградация КФ покрытия; 60% ВМР-2 выделялось в течение 5 нед. после подкожной имплантации кры- сам. Наличие ВМР-2 ускоряет деграда- цию покрытия через активацию остеокластов	Только в группе с ВМР-2 отмечено эктопическое костео- образование на имплантированных образцах: 6–10 мм ³ со 2-й нед. экспери- мента; до 65% всей поверхности имплан- тата к 5 нед.	Liu et al., 2005
--	--	--	--	--	---	---------------------

Таблица 2. Продолжение

Материал/ композит	Свойства объемной или поверхностной структуры	Метод получения	Введенное вещество	Метод/кинетика/ эффективность высвобождения молекул	Клеточные/ тканевые эффекты	Ссылки
Гранулят ГАП/ГКФ (Zimmer Scandi- navia)	Не описаны	Олигонуклео- тидная транс- фекция (25 нМ) иммортиализи- рованной линии МСК костного мозга человека <i>in vitro</i> ; их вве- дение в грану- лят (5×10^5 клеток на 40 мг)	микроРНК-138 или ее антаго- нист	Подкожная имплантация системы доставки NOD/SCID мышам	МикроРНК-138 подавляет экспрес- сию остеогенных генов (<i>RUNX2</i> , <i>ALPL</i> и <i>OC</i>) через 1 нед. и уменьшает в 5 раз площадь роста экто- пической кости через 8 нед. после имплан- тации трансфициро- ванных МСК на грануляте. Анти- мик- роРНК-138, напро- тив, усиливает в 2 раза рост кости из транс- фицированных МСК, засеянных в гранулят, в эктопическом тесте	Eskildsen et al., 2011
Биоактивная костная паста (CERAPASTE, Япония) или костный цемент (Stryker Co., Япония)	Цилиндры (диаметр 7 мм, длина 14 мм)	Формование суспензии в акриловых труб- ках до затверде- ния	Цис-диаминди- хлорплатина (100 мг порошка на 21 г цилиндра)	Иммерсионный метод в фосфатном буфере. Убывание по экспоненте со 180 мкг/мл почти до нуля за 1 нед. для БКП (14% за 8 нед.). Всего 0.3% препарата выходит линейно из КЦ за 4 нед.	Торможение роста (пролиферации) SOSN2 остеосар- комы, перевитой в матригеле в костно- мозговой канал крыс. К 6-й нед. объем опу- холи вокруг цилин- дров с цитостатиком составил 20 см ³ при 40 см ³ в контроле; 2 из 7 крыс выжили в тече- ние 14 нед.	Tanzawa et al., 2011
Частицы гид- роксиапатит (ГАП)/коллаген в гидрогеле на основе альги- ната/глюконо- лактона	Диаметр частиц ГАП/коллаген 50 ± 6.6 мкм	Получение инъ- екционного гид- рогеля описано	Рекомбинан- тый BMP-2 человека	Введение в дефект свода черепа (8 мм в диаметре) 1 мл геля, содержащего 15 мкг/мл BMP-2	BMP-2 улучшает гистологические и рентгеновские (объем новой кости; тол- щина костных трабе- кул) результаты ремодели- рования костной ткани через 4–8 нед. после введения в костный дефект	Tan et al., 2012

Таблица 2. Продолжение

Материал/компонент	Свойства объемной или поверхностной структуры	Метод получения	Введенное вещество	Метод/кинетика/эффективность высвобождения молекул	Клеточные/тканевые эффекты	Ссылки
ТКФ- α порошок	Пластины 1.8×3 мм. Толщина каждого слоя 89 мкм	Послойная 3D-печать с применением 8.75 мас. % фосфорной кислоты. Загрузка антибиотиков в виде порошка при печати либо инфузией растворов антибиотиков в скаффолд. PLGA (50 : 50) покрытие на скаффолды	Ванкомицин 5–10 мас. % (182.5–365 мкг/скаффолд) и рифампин 0.05–0.5 мас. % (3.5–35 мкг/скаффолд)	Без PLGA слоя быстрый выход всего рифампина из скаффолда <i>in vivo</i> в течение 2 дней. PLGA (5–20%) обеспечивает высвобождение антибиотика по синусоиде с пиком (выше 10 мкг/мл) на 9-й день. В течение 14 дней дозы (70–1.8 мкг/мл) рифампицина выше минимальной подавляющей концентрации (0.08 мкг/мл)	Подавление роста микробной пленки метициллин-чувствительного <i>S. aureus</i> на скаффолдах + PLGA на модели остеомиелита бедра мышей VALB/c. Снижение костной резорбции, обусловленной инфекцией. 50%-ное снижение случаев высеваания микробов из кости после терапии	Inzana et al., 2015
КФ покрытие на чистом Ti (BT1-0) или Ti–40Nb сплаве	Металлические пластины (10×10 мм), толщина 1 мм. Свойства ди- и моноКФ покрытия: индекс шероховатости Ra = 2.9–3.3 мкм; толщина 48–60 мкм; масса 13.5–15 мг	Микродуговой способ формирования покрытия из порошка ГАП в электролите	Zn или медь (Cu) (0.3–0.4 ат. % в покрытии)	Эктопический подкожный тест костеобразования на мышцах	Присутствие в КФ покрытия Zn или Cu несколько снижает (со 100 до 67%; КФ покрытие на титане) либо не влияет (КФ покрытие на Ti–40Nb сплаве) на частоту остеогенеза из сингенного костного мозга	Komarova et al., 2020
Паста на основе наночастиц CaP/PEI/siRNA/SiO ₂ , содержащая siRNA против гена фактора некроза опухоли (TNF- α)	Диаметр частиц 40–90 нм; дзета-потенциал 23 мВ. 2000 молекул siRNA/частицу	Смешивание компонентов в водных растворах	~5.4 μ g siRNA-TNF- α в 1.6 мг пасты/дефект периодонта	Не описаны	Противовоспалительный и костно-заживляющий эффект, обусловленный снижением экспрессии мРНК гена TNF- α , увеличением мРНК ALP и активности фермента через 21 сут после имплантации пасты	Tenkumo et al., 2020

Таблица 2. Продолжение

Материал/ композит	Свойства объемной или поверхностной структуры	Метод получения	Введенное вещество	Метод/кинетика/ эффективность высвобождения молекул	Клеточные/ тканевые эффекты	Ссылки
Синтетический бифазный кальцийфосфатный (КФ) материал (inRoad) в сравнении с коммерческим ксенографтом кости (Bio-oss)	90 ± 5% ГАП и 10 ± 5% β-трикальцийфосфат (β-ТКФ); кристалличность 90%; соотношение Ca/P = 1.66	Пористые гранулы (0.3–1 мм) получены размалыванием цельного блока, спеченного (3 ч при 1230°C) из пасты на основе бифазной КФ наносупензии (частицы 200–400 нм) в поливиниловом спирте, карбоксиметилцеллюлозе и аммониевом полиакрилате	Алендронат (0; 1 или 5 мг) введен иммерсионным методом при 24-ч встряхивании на шейкере с последующей вакуумной сушкой. Степень загрузки в скаффолд 72–83%	Эффективность <i>in vitro</i> логарифмического высвобождения алендроната в фосфатный буфер составила (при встряхивании в течение 1–28 дней) 69% при дозе 1 мг и 27% при дозе 5 мг (из Bio-oss 83 и 29%, соответственно)	Дозозависимое увеличение, в большей степени, минеральной плотности кости свода черепа, чем усиление остеогенеза, в течение 4, 8 и 12 недель после имплантации овариэктомированными крысам в 5 мм дефект свода черепа	Bae et al., 2021
Паста для 3D-печати: порошок силиката кальция, легированного магнием (MgCS) + поликапролактон (PCL) в соотношении 50 : 50	Скаффолды из пасты с внутренними балками и порами 500 × 300 мкм. Размер скаффолдов не указан. Химический состав Ca ₂ Mg(SiO ₄) ₄	Послойная 3D-печать при 80°C. Покрытие из желатина в 0–5% растворе с последующей сшивкой генипином	Физическая 2 ч адсорбция рекомбинантного FGF-2 из раствора 500 нг/мл в желатиновое покрытие	Критический дефект (6 × 6 мм) в мышелке бедренной кости кроликов	Наличие FGF-2 в скаффолде улучшает в 1.5 раза рентгеновские (объем новой кости, толщина костных трабекул) и гистологические (окраска по Массону и ван Коссу) результаты ремоделирования костной ткани через 4 и 8 нед. после введения в область костного дефекта	Lai et al., 2021
Наночастицы ГАП/коллаген I типа + PLGA, формованные в полиметилсилоксане	Средний диаметр ГАП частиц 98 нм; сетка попеременно-сшитого коллагена крысы; микросферы (диаметр 30 мкм) PLGA (50 : 50)	Метод формования дисков 8 × 2 мм	Рекомбинантный BMP-2 человека (0.25 мкг/мл) и/или алендронат (80 мкг/мл)	Введение дисков в дефект свода черепа крысы (8 мм в диаметре)	Синергетический эффект препаратов на микрокомпьютерные и гистологические признаки усиления остеогенеза в течение 2–8 нед. после имплантации	Lee et al., 2021

Таблица 2. Окончание

Материал/композит	Свойства объемной или поверхностной структуры	Метод получения	Введенное вещество	Метод/кинетика/эффективность высвобождения молекул	Клеточные/тканевые эффекты	Ссылки
Клинические испытания/апробация						
TiCuN покрытие на временном металлическом эндопротезе (спейсере) тазобедренного сустава	Гладкое покрытие на ножке и головке спейсера	Физическое осаждение покрытия из газовой фазы (PVD метод) на ножку эндопротеза	Медь (Cu)	Не представлено. Предположительно, деградация/резорбция покрытия	Отсутствие микробиологических и гистологических (при биопсии) признаков стафилококковой инфекции через 6 нед. после имплантации спейсера. Концентрация Cu в крови в пределах нормы (11–23.5 мкМ). Через 1 год после установки постоянного эндопротеза – оссификация вокруг ножки эндопротеза без признаков ее расшатывания	Ellenrieder et al., 2011
Покрытие из геля, содержащего антибиотика	Не описаны	Аппликация 5–10 мл гидрогеля (состав не указан) на поверхность ножки эндопротеза сразу после установки в канал бедренной кости	Гентамицин 200 мг + ванкомицин 250 мг	Не представлено. Предположительно, деградация гидрогеля	Улучшение результатов тотального эндопротезирования тазобедренного сустава у 17 пациентов в течение 6 мес. после операции: 3 осложнения при 11 в контроле, из них 0 случаев ППИ при 6 случаях в контроле	De Meo et al., 2020

ния вокруг дисков с загруженным антибиотиком через 24 ч культивирования на агаре) отмечено авторами в отношении золотистого стафилококка (*S. aureus*), но не кишечной палочки (*Escherichia coli*). Во многом аналогичное (“взрывное”) высвобождение тетрациклина в первые 2 ч с последующим выходом на плато к 7-м сут деградации пористого скаффолда “ГАП/поликапролактон” (табл. 2) выявлено другими авторами (Kim et al., 2004). По-видимому, системы доставки в обоих случаях были собраны в стерильных условиях из стерильных компонентов, поскольку методы обеззараживания матриц или готовых изделий перед исследованиями не представлены.

В свою очередь, микроэлементы цинк и медь, помимо антимикробных и остеогенных свойств в составе скаффолдов (Limongi et al., 2020), допускают возможность различных способов стерилизации перед использованием. В одной из работ показано антимикробное и противоопухолевое действие ионов

цинка в составе термически стерилизованных (сухожаровый шкаф) КФ магнетронных покрытий на титановых сплавах при сохранении способности МСК жировой ткани человека к дифференцировке в остеобласты и формированию межклеточного минерализованного матрикса (Prosolov et al., 2021). Введение Zn в состав КФ покрытия существенно не влияло на его растворимость (табл. 2).

Во многом схожие результаты *in vitro* (подвижность и дифференцировка МСК человека в остеобласты; бастериостатический эффект) и *in vivo* (эктопический остеогенез) (табл. 2) получены для малых концентраций Zn или Cu в составе КФ покрытий, сформированных на титановых сплавах методом микродугового оксидирования и стерилизованных сухим жаром (Komarova et al., 2020).

При реконструктивных операциях на костях после удаления злокачественных новообразований и метастазов КФ цемент с химиотерапевтическими препаратами (6-меркаптопурин, цисплатин, доксо-

рубицин, метотрексат) является одним из решений для снижения риска опухолевых рецидивов и расширения имплантатов и эндопротезов. При этом эффективность *in vitro* высвобождения цитостатиков из КФ цемента (14–64%) выше таковой для цементов на основе полиметилакрилата (5–20%) (Phull et al., 2020). Многочисленные исследования КФ цементов, несущих противоопухолевые препараты, начались с 1994 г. (Otsuka et al., 1994). Например, в одном из исследований формировали цилиндры (диаметр 7 мм, длина 14 мм) из костного цемента или биоактивной костной пасты, насыщенных противоопухолевым цитостатиком (цисплатиной) (Tanzawa et al., 2011). Была установлена эффективность композиции в отношении торможения роста клеток остеосаркомы крыс линии SOSN2 *in vitro* и *in vivo* (табл. 2). К сожалению, методы стерилизации скаффолдов и/или конечной системы доставки цитостатика не описаны.

Несмотря на продолжающиеся исследования (Pountos et al., 2018; Dewhurst et al., 2020) гиперкальциемия вследствие остеолитического эффекта опухолевого роста и биodeградации самого КФ цемента вызывают настороженность при внедрении разработок в клиническую практику (Phull et al., 2020).

Примеры применения скаффолдов в исследованиях *in vivo*

Опубликованы результаты изучения эффекта системы доставки БФ (алендронат) на основе гранул синтетического бифазного КФ материала в сравнении с коммерческим ксенографтом кости (Bio-oss) (Bae et al., 2021). Установлены 28-дневное логарифмическое высвобождение БФ *in vitro* и улучшенная эффективность синтетической системы доставки (в сравнении с Bio-oss) в отношении минерализации дефекта свода черепа у крыс с остеопорозом после удаления яичников (табл. 2). На основании гистологического исследования (без использования морфометрического анализа) авторы делают заключение о постимплантационном усилении остеогенеза (в сравнении с Bio-oss), которое, однако, не подтвердилось методом микрокомпьютерной морфометрии. Кроме того, отсутствует информация о стерилизации изделий, способной оказывать модулирующее действие на свойства скаффолда и/или эффективность введенных в него лекарств и биомолекул (см. выше). По-видимому, изготовление систем доставки проводилось в стерильных условиях, что затруднительно воспроизвести в условиях неспециализированных лечебных учреждений.

Ранее другие авторы (Peter et al., 2005; Garbuz et al., 2008) сообщили об усилении периимплантационного роста кости, повышенной костной плотности и механической фиксации металлических имплантатов с КФ покрытиями, насыщенными золедронатом (0.2–16 мкг/титановый цилиндр 3 × 5 мм) или алендронатом (1.37 мкг на пластины 8 × 3 мм из пористого тантала), на модели костной полости в бедре

крыс или кроликов. Напротив, неубедительные (в сравнении с композитом “титан/ГАП” без препарата) данные получены для пористых цилиндров из титана, напечатанных на 3D-принтере, несущих ГАП покрытие с алендронатом (20–180 мкг/см²), имплантированных в костномозговой канал бедренной кости собак (Puga et al., 2016).

Представляет интерес сложное исследование, выполненное относительно недавно (Inzana et al., 2015). Методом 3D-печати получены многокомпонентные антибиотикосодержащие скаффолды из порошка ТКФ. Показана их эффективность на модели дефекта бедренной кости у мышей, осложненного остеомиелитом, вызванным золотистым стафилококком (*S. aureus*) (табл. 2). К сожалению, в работе отсутствуют четкие описания условий стерилизационной подготовки скаффолдов перед имплантацией зараженным животным. Кроме того, многокомпонентные имплантаты, как правило, редко находят широкое клиническое применение.

В литературе имеются данные о том, что линия МСК, выделенная из костного мозга человека и трансфицированная микроРНК-138, после заселения на гранулят ГАП/ТКФ слабее дифференцируется в остеобласты при подкожной имплантации мышам (Eskildsen et al., 2011) (табл. 2). Напротив, *in vitro* трансфекция МСК антагонистом микроРНК-138 способствует экспрессии в них генов остеогенной дифференцировки (*RUNX2*, *ALP* и *OC*) *in vivo* и усилению подкожного эктопического костеобразования на грануляте ГАП/ТКФ.

Остеогенные эффекты относительно низких (единицы/десятки мкг) и высоких (до 12 мг) доз BMPs, иммобилизованных на различных носителях, включая КФ материалы (керамика, цемент) и биостекло, в разном виде эктопического теста и при моделировании дефектов кости у мелких и крупных лабораторных животных подробно представлены в литературе (например, Stokovic et al., 2021). Общей тенденцией является снижение применяемой концентрации BMP белков и разработка носителей с максимальным высвобождением белка. Отмечаются удовлетворительные либо очень хорошие результаты, свидетельствующие об усилении регенерации и минерализации кости в зоне дефекта, подтвержденные данными рентгенографии, компьютерной томографии и гистологии (Paulini et al., 2022). Исследования, в центре которых находятся вопросы снижения концентрации молекул BMP и улучшения их фармакокинетики (Liu et al., 2005; Eskildsen et al., 2011; Lee et al., 2021), кратко описанные в табл. 2, находятся в современном тренде.

Удивительно, что способы стерилизации систем доставки описываются только в 35% проанализированных публикаций (в частности, Swanson et al., 2020) и упоминаются, чаще всего, обтекаемо. Из них в 60% случаев представлены методы, не разрешенные к клиническому использованию для импланти-

руемых изделий, например, ультрафиолетовое облучение (Hickey et al., 2015; Abdollahi Boraie et al., 2020) в комбинации с этиловым спиртом (Shie et al., 2013). В то же время, существующие химические (растворы и газы) и физические (температура, лучевая энергия) методы, разрешенные к использованию для стерилизации медицинских изделий, могут в значительной степени влиять на физико-химические и биомедицинские свойства как скаффолда-носителя (Хлусов и др., 2011; Vukova et al., 2014; Lenfeld et al., 2020), так и лекарственного наполнителя. В свою очередь, смешивание в асептических условиях препаратов с несущим материалом непосредственно перед применением, как делается во многих случаях (табл. 2), снижает равномерность распределения лекарственных и биологических молекул, предъявляет серьезные (био)технологические требования к помещениям и персоналу, которые трудно и затратно создавать и контролировать в лечебных учреждениях.

Примеры клинических исследований и применения скаффолдов

Часть разработок с иммобилизацией ВМР белков на различных носителях дошла до клинических испытаний, как например, исследования рекомбинантного ВМР-6 в суставе аутологичной крови при остеотомии большеберцовой кости (Chiari et al., 2020), а также при дистальном радиальном переломе (Durdevic et al., 2020).

Огромное количество синтетических КФ материалов в различных сочетаниях и приложениях применяется в клинике ортопедии и травматологии, прежде всего, в форме костных цементов. Кроме того, в США и Европе проводятся свыше 300 клинических испытаний, из которых 118 уже завершились (Thrivikraman et al., 2017). Клинически доказана необходимость добавления антибиотиков в костный цемент (Parvizi et al., 2008) и в состав покрытий (De Meo et al., 2020) (табл. 2) при операциях эндопротезирования крупных суставов для снижения риска ППИ.

Тем не менее, короткий период высвобождения антибиотиков из костного цемента (иногда всего несколько дней) (Anagnostakos et al., 2009) вызывает существенную проблему при операциях, осложненных ППИ и формированием микробных биопленок. Одним из современных решений является модификация поверхности имплантатов с помощью покрытий, содержащих на поверхности или в объеме антимикробные металлы. Так, показана 6-недельная клиническая эффективность TiCuN покрытия, нанесенного на поверхность временного имплантата (спейсера), при двухэтапном эндопротезировании тазобедренного сустава, осложненного стафилококковой ППИ (Ellenrieder et al., 2011). Выбор меди обусловлен ее эффективностью при подавлении роста микробных биопленок и относительно низкой токсичностью в сравнении с другими антибактериаль-

ными металлами (серебро, цинк, кобальт и другие) (Nie et al., 2010).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Системы доставки лекарств и биологических молекул являются современным, междисциплинарным направлением на стыке фармакологии и фармации, биотехнологий, медицинского материаловедения и биомедицины с 10-кратным приростом числа публикаций за последние 30 лет (к 2020 г. до 22618 статей/год по запросу “drug delivery” в Pubmed, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>). Преимуществами систем доставки, по сравнению с традиционным назначением лекарств, считаются стабильное, пролонгированное, контролируемое высвобождение препаратов с сохранением их активности, достижением локальных терапевтических концентраций, уменьшением системных и побочных проявлений и стоимости лечения хронических и опухолевых заболеваний. Помимо этого структура и материал скаффолдов-носителей влияют на пролиферацию, дифференцировку и созревание стволовых и прогениторных клеток, эндотелиальных и иммунокомпетентных клеток, способствуют врастанию тканей и кровеносных сосудов организма-хозяина (Sundelacruz, Kaplan, 2009; Khlusov et al., 2020), что может усиливать терапевтическое/регенеративное действие лекарственных средств и биологических молекул при бионженерии костной и других тканей. Бурно развивающиеся методы 3D-био-печати (Shafiee et al., 2019; Matai et al., 2020; Zhang et al., 2020; Wang et al., 2021) дают новые возможности в этом направлении.

Несомненным достоинством проанализированных работ является, во многих случаях, апробация разрабатываемых систем доставки как *in vitro*, так и *in vivo*. Однако во многих публикациях недостаточно представлены физико-химические свойства материалов-носителей препаратов, особенности их биодеградации и клеточных/тканевых реакций, которые могут влиять на высвобождение молекул из матрицы и их фармакологическую активность. Следует отметить, что многочисленные разработки с трудом доходят до практического использования; в литературе встречаются единичные клинические публикации (табл. 2). Одним из ограничений является, без сомнения, сложная и длительная система обращения (регистрации, производства, хранения, контроля качества и реализации) лекарственных препаратов. На основе проведенного анализа, общей проблемой доклинического изучения и применения всех лекарств и биологических молекул (за исключением, пожалуй, антимикробных металлов) в составе систем доставки являются вопросы их стерилизационной подготовки, условий хранения (прежде всего, скаффолдов и наполнителей, разработанных на основе биотехнологий) и увеличения стоимости разработок, обусловленного наметившейся тенденцией к усложнению состава таких конструкций.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 21-73-10265).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Сибирскому государственному медицинскому университету за частичную поддержку в рамках Программы стратегического академического лидерства “Приоритет – 2030”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментов с участием животных или людей авторы не проводили.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Литвинова Л.С., В.В. Шуплецова, Дунец Н.А., Хазиахматова О.Г., Юрова К.А., Хлусова М.Ю., Слепченко Г.Б., Черемпей Е.Г., Шаркеев Ю.П., Комарова Е.Г., Седельникова М.Б., Хлусов И.А.* 2017. Дисбаланс морфофункциональных реакций Т-лимфоцитов линии Jurkat при краткосрочном культивировании с рельефным цинк- или медьсодержащим кальцийфосфатным покрытием на титане. Доклады академии наук. Т 472. № 3. С. 354 (*Litvinova L.S., Shupletsova V.V., Dunets N.A., Khaziyakhmatova O.G., Yurova K.A., Khlusova M.Yu., Slepchenko G.B., Cherempey E.G., Sharkeev Yu.P., Komarova E.G., Sedelnikova M.B., Khlusov I.A.* 2017. Imbalance of morphofunctional responses of Jurkat T lymphoblasts at short-term culturing with relief zinc- or copper-containing calcium phosphate coating on titanium. *Doklady Biochemistry and Biophysics.* V. 472. P. 35. <https://doi.org/10.1134/S1607672917010094> <https://doi.org/10.7868/S0869565217030252>
- Литвинова Л.С., Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Хлусова М.Ю., Малащенко В.В., Шунькин Е.О., Тодосенко Н.М., Норкин И.К., Иванов И.А., Хлусов И.А.* 2020. Остеогенные и ангиогенные свойства гепарина как системы доставки биомолекул при биоинженерии кости: краткий критический обзор. Биомедицинская химия. Т. 66. № 6. С. 431 (*Litvinova L.S., Yurova K.A., Khaziyakhmatova O.G., Khlusova M.Yu., Malashchenko V.V., Shunkin E.O., Todosenko N.M., Norkin I.K., Ivanov I.A., Khlusov I.A.* 2021. Osteogenic and angiogenic properties of heparin as a system for delivery of biomolecules for bone bioengineering: a brief critical review. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry.* V. 15. № 2. P. 147. <https://doi.org/10.1134/S1990750821020050> <https://doi.org/10.18097/PBMC20206606431>
- Митриченко Д.В., Просолов А.Б., Хлусов И.А., Комков А.Р.* Интрамедуллярный антимикробный фиксатор: Патент РФ на полезную модель № 202062 от 28.01.2021 (*Mitrichenko D.V., Prosolov A.B., Khlusov I.A., Komkov A.R.* Intramedullar antimicrobial implant: RU patent 202062 from 28.01.2021.)
- Норкин И.К., Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Малащенко Е.С., Малащенко В.В., Шунькин Е.О., Хлусов И.А., Литвинова Л.С.* 2021. Стимулирующее влияние высоких доз гепарина на миграционную активность и сохранение стволовости МСК в присутствии остеозамещающих материалов. Медицинская иммунология. Т. 23. № 4. С. 831 (*Norkin I.K., Yurova K.A., Khaziyakhmatova O.G., Melashchenko E.S., Malashchenko V.V., Shunkin E.O., Khlusov I.A., Litvinova L.S.* 2021. Stimulating effect of high dose heparin on migration activity and MSC stemness preservation in the presence of bone-substituting materials. *Medical Immunology (Russia).* V. 23. № 4. P. 831.) <https://doi.org/10.15789/1563-0625-SEO-2283>
- Программа фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 гг.), утвержденная Распоряжением Правительства РФ от 31.12.2020. № 3684-р (Long-term program of fundamental scientific research in the Russian Federation (2021–2030) approved by the Decree of the Government of the Russian Federation of December 31. 2020. № 3684-р.)
- Тихилов Р.М., Шубняков И.И., Коваленко А.Н., Тотоев З.А., Бо Л., Билык С.С.* 2014. Структура ранних ревизий эндопротезирования тазобедренного сустава. Травматология и ортопедия России. № 2. С. 5. (*Tikhilov R.M., Shubnyakov I.I., Kovalenko A.N., Totoyev Z.A., Bo L., Bilyk S.S.* 2014. The structure of early revisions after HIP replacement. *Traumatology and Orthopedics of Russia.* № 2. P. 5.)
- Хлусов И.А., Пичугин В.Ф., Гостищев Э.А., Шаркеев Ю.П., Сурменев Р.А., Сурменева М.А., Легостаева Е.В., Чайкина М.В., Дворниченко М.В., Морозова Н.С.* 2011. Влияние физических, химических и биологических манипуляций на поверхностный потенциал кальцийфосфатных покрытий на металлических подложках. Бюллетень сибирской медицины. № 3. С. 72. (*Khlusov I.A., Pichugin V.F., Gostischev E.A., Sharkeyev Yu.P., Surmenev R.A., Surmeneva M.A., Legostayeva Ye.V., Chaikina M.V., Dvornichenko M.V., Morozova N.S.* 2011. The influence of physical, chemical and biological manipulations on surface potential of calcium phosphate coatings on metal substrates. *Bulletin of Siberian Medicine.* V. 10. № 3. P. 72.)
- Хлусов И.А., Венгеровский А.И., Нечаев К.А., Дворниченко М.В., Саприна Т.В.* 2013. Применение бисфосфонатов при несовершенном остеогенезе у детей. Клиническая фармакология и терапия. Т. 22. № 2. С. 78. (*Khlusov I.A., Vengerovskii A.I., Nechaev K.A., Dvornichenko M.V., Saprina T.V.* 2013. The use of bisphosphonates in osteogenesis imperfecta in children. *Clinical Pharmacology and Therapy.* V. 22. № 2. P. 78.)
- Хлусов И.А., Рязанцева Н.В., Венгеровский А.И., Нечаев К.А., Якушина В.Д., Дворниченко М.В., Шаркеев Ю.П., Легостаева Е.В., Новицкий В.В.* 2014. Модулирующее влияние матриц с кальцийфосфатным покрытием на цитотоксичность стронция ранелата и ибандроновой кислоты in vitro. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. Т. 157. № 2. С. 177. (*Khlusov I.A., Ryazantseva N.V., Vengerovskii A.I., Nechaev K.A., Yakushina V.D., Dvornichenko M.V., Sharkeev Yu.P., Legostayeva E.V., Novitskii V.V.* 2014. Modulating effect of matrices with calcium phosphate coating on cytotoxicity of strontium ranelate and ibandronic acid in vitro. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* V. 157. № 2. P. 215.)

- Хлусов И.А., Митриченко Д.В., Просолов А.Б., Николаева О.О., Слепченко Г.Б., Шаркеев Ю.П. 2019. Краткий обзор биомедицинских свойств и применения магниевых сплавов для биоинженерии костной ткани. Бюллетень сибирской медицины. Т. 18. № 2. С. 274 (Khlusov I.A., Mitrichenko D.V., Prosolov A.B., Nikolaeva O.O., Slepchenko G.B., Sharkeev Yu.P. 2019. Short review of the biomedical properties and application of magnesium alloys for bone tissue bioengineering. Bulletin of Siberian Medicine. V. 18. № 2. P. 274). <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-274-286>.
- Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Малащенко В.В., Шунькин Е.О., Мелашченко Е.С., Норкин И.К., Иванов П.А., Кривошеев В.В., Хлусов И.А., Литвинова Л.С. 2021. Роль компонентов искусственных матриц, применяемых для регенеративной медицины, в борьбе с перипротезной инфекцией. Гены & Клетки. Т. XVI. № 2. С. 6. [https://doi.org/](https://doi.org/(Yurova%20K.A.,%20Khaziakhmatova%20O.G.,%20Malashchenko%20V.V.,%20Shunkin%20E.O.,%20Melashchenko%20E.S.,%20Norkin%20I.K.,%20Ivanov%20P.A.,%20Krivoshchev%20V.V.,%20Khlusov%20I.A.,%20Litvinova%20L.S.))
- Abdel-Fattah W.I., Atwa N., Ali G.W. 2015. Influence of the protocol of fibroin extraction on the antibiotic activities of the constructed composites. Progress in Biomaterials. V. 4. № 2-4. P. 77. <https://doi.org/10.1007/s40204-015-0039-x>
- Abdollahi Boraie S.B., Nourmohammadi J., Sadat Mahdavi F., Yus J., Ferrandez-Montero A., Sanchez-Herencia A.J., Gonzalez Z., Ferrari B. 2020. Effect of SrR delivery in the biomarkers of bone regeneration during the in vitro degradation of HNT/GN coatings prepared by EPD. Colloids Surf. B Biointerfaces. V. 190. P. 110944. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.110944>
- Anagnostakos K., Wilmes P., Schmitt E., Kelm J. 2009. Elution of gentamicin and vancomycin from polymethylmethacrylate beads and hip spacers in vivo. Acta Orthop. V. 80. P. 193. <https://doi.org/10.3109/17453670902884700>
- Arruebo M. 2012. Drug delivery from structured porous inorganic materials. Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed Nanobiotechnol. V. 4. P. 16. <https://doi.org/10.1002/wnan.132>
- Asafo-Adjei T.A., Chen A.J., Najarzadeh A., Puleo D.A. 2016. Advances in controlled drug delivery for treatment of osteoporosis. Curr. Osteoporos Rep. V. 14. P. 226. <https://doi.org/10.1007/s11914-016-0321-4>
- Avdeeva E., Shults E., Rybalova T., Reshetov Y., Porokhova E., Sukhodolo I., Litvinova L., Shupletsova V., Khaziakhmatova O., Khlusov I., Guryev A., Belousov M. 2019. Chelidonic acid and its derivatives from saussurea controversa: isolation, structural elucidation and influence on the osteogenic differentiation of multipotent mesenchymal stromal cells in vitro. Biomolecules. V. 9. P. 189. <https://doi.org/10.3390/biom9050189>
- Bae C.S., Kim S.H., Ahn T., Kim Y., Kim S.E., Kang S.S., Kwon J.S., Kim K.M., Kim S.G., Oh D. 2021. Multiple porous synthetic bone graft comprising engineered micro-channel for drug carrier and bone regeneration. Materials (Basel). V. 14. P. 5320. <https://doi.org/10.3390/ma14185320>
- Bhattacharjee P., Kundu B., Naskar D., Kim H.W., Maiti T.K., Bhattacharya D., Kundu S.C. 2017. Silk scaffolds in bone tissue engineering: An overview. Acta Biomater. V. 63. P. 1. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.09.027>
- Boonthekul T., Mooney D.J. 2003. Protein-based signaling systems in tissue engineering. Curr. Opin. Biotechnol. V. 14. P. 559. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2003.08.004>
- Bose S., Tarafder S. 2012. Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: a review. Acta Biomater. V. 8. P. 1401. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.11.017>
- Bykova Iu., Weinhardt V., Kashkarova A., Lebedev S., Baumbach T., Pichugin V., Zaitsev K., Khlusov I. 2014. Physical properties and biocompatibility of UHMWPE-derived materials modified by synchrotron radiation. J. Mater. Sci. Mater. Med. V. 25. P. 1843. <https://doi.org/10.1007/s10856-014-5222-4>
- Chen R., Wang G., Zheng Y., Hua Y., Cai Z. 2019. Drug resistance-related microRNAs in osteosarcoma: Translating basic evidence into therapeutic strategies. J. Cell Mol. Med. V. 23. P. 2280. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14064>
- Chiari C., Grgurevic L., Bordukalo-Niksic T., Oppermann H., Valentiniš A., Nemecek E., Staats K., Schreiner M., Trost C., Kolb A., Kainberger F., Pehar S., Milosevic M., Martinovic S., Peric M., Sampath T.K., Vukicevic S., Windhager R. 2020. Recombinant human BMP6 applied within autologous blood coagulum accelerates bone healing: randomized controlled trial in high tibial osteotomy patients. J. Bone Miner. Res. V. 35. P. 1893. <https://doi.org/10.1002/jbmr.4107>
- Czekanska E.M., Geng J., Glinka M., White K., Kanczler J., Evans N.D., Oreffo R.O.C., Bradley M. 2018. Combinatorial delivery of bioactive molecules by a nanoparticle-decorated and functionalized biodegradable scaffold. J. Mater. Chem. B. V. 6. P. 4437. <https://doi.org/10.1039/c8tb00474a>
- De Meo D., Calogero V., Are L., Cavallo A.U., Persiani P., Villani C. 2020. Antibiotic-loaded hydrogel coating to reduce early postsurgical infections in aseptic hip revision surgery: a retrospective, matched case-control study. Microorganisms. V. 8(4). P. 571. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040571>
- Dewhurst R.M., Scalzone A., Buckley J., Mattu C., Rankin K.S., Gentile P., Ferreira A.M. 2020. Development of natural-based bone cement for a controlled doxorubicin-drug release. Front Bioeng Biotechnol. V. 8. P. 754. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00754>
- Durdevic D., Vlahovic T., Pehar S., Miklic D., Oppermann H., Bordukalo-Niksic T., Gavrankapetanovic I., Jamakosmanovic M., Milosevic M., Martinovic S., Sampath T.K., Peric M., Grgurevic L., Vukicevic S. 2020. A novel autologous bone graft substitute comprised of rhBMP6 blood coagulum as carrier tested in a randomized and controlled Phase I trial in patients with distal radial fractures. Bone. V. 140. P. 115551. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2020.115551>
- Ebrahimi M. 2021. Porosity parameters in biomaterial science: Definition, impact, and challenges in tissue engineering. Front. Mater. Sci. V. 15. P. 352. <https://doi.org/10.1007/s11706-021-0558-4>

- Elazar V., Adwan H., Bäuerle T., Rohekar K., Golomb G., Berger M.R.* 2010. Sustained delivery and efficacy of polymeric nanoparticles containing osteopontin and bone sialoprotein antisenses in rats with breast cancer bone metastasis. *Int. J. Cancer*. V. 126. P. 1749. PMID: <https://doi.org/10.1002/ijc.2489019739076>
- Ellenrieder M., Haenle M., Lenz R., Bader R., Mittelmeier W.* 2011. Titanium-copper-nitride coated spacers for two-stage revision of infected total hip endoprostheses. *GMS Krankenhhyg Interdiszip.* V. 6. P. 16. <https://doi.org/10.3205/dgkh000173>
- Emara K.M., Diab R.A., Emara A.K.* 2015. Recent biological trends in management of fracture non-union. *World J. Orthop.* V. 6. P. 623. <https://doi.org/10.5312/wjo.v6.i8.623>
- Eskildsen T., Taipaleenmäki H., Stenvang J., Abdallah B.M., Ditzel N., Nossent A.Y., Bak M., Kauppinen S., Kassem M.* 2011. MicroRNA-138 regulates osteogenic differentiation of human stromal (mesenchymal) stem cells in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 108. P. 6139. <https://doi.org/10.1073/pnas.1016758108>
- Farrar D.F., Macauley N.J., Rose J.* 2013. Bone putty: WO/2013/165333 from 07.11.2013
- Ferracini R., Martínez Herreros I., Russo A., Casalini T., Rossi F., Perale G.* 2018. Scaffolds as structural tools for bone-targeted drug delivery. *pharmaceutics*. V. 10. P. 122. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10030122>
- Garbuz D.S., Hu Y., Kim W.Y., Duan K., Masri B.A., Oxland T.R., Burt H., Wang R., Duncan C.P.* 2008. Enhanced gap filling and osteoconduction associated with alendronate-calcium phosphate-coated porous tantalum. *J. Bone Joint Surg. Am.* V. 90. P. 1090. PMID: <https://doi.org/10.2106/JBJS.G.0041518451402>
- Garg T., Singh O., Arora S., Murthy R.* 2012. Scaffold: a novel carrier for cell and drug delivery. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* V. 29. P. 1. <https://doi.org/10.1615/critrevtherdrugcarrier-syst.v29.i1.10>
- Ge Y.W., Lu J.W., Sun Z.Y., Liu Z.Q., Zhou J., Ke Q.F., Mao Y.Q., Guo Y.P., Zhu Z.A.* 2019. Ursolic acid loaded-mesoporous bioglass/chitosan porous scaffolds as drug delivery system for bone regeneration. *Nanomedicine*. V. 18. P. 336. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2018.10.010>
- Girod Fullana S., Ternet H., Freche M., Lacout J.L., Rodriguez F.* 2010. Controlled release properties and final macroporosity of a pectin microspheres-calcium phosphate composite bone cement. *Acta Biomater.* V. 6. P. 2294. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.11.019>
- Hickey D.J., Ercan B., Sun L., Webster T.J.* 2015. Adding MgO nanoparticles to hydroxyapatite-PLLA nanocomposites for improved bone tissue engineering applications. *Acta Biomater.* V. 14. P. 175. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.12.004>
- Huang P., Wang X., Liang X., Yang J., Zhang C., Kong D., Wang W.* 2019. Nano-, micro-, and macroscale drug delivery systems for cancer immunotherapy. *Acta Biomater.* V. 85. P. 1. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.12.028>
- Huang S., Huang G.* 2019. The dextrans as vehicles for gene and drug delivery. *Future Med. Chem.* V. 11. P. 1659. <https://doi.org/10.4155/fmc-2018-0586>
- Inzana J.A., Trombetta R.P., Schwarz E.M., Kates S.L., Awad H.A.* 2015. 3D printed bioceramics for dual antibiotic delivery to treat implant-associated bone infection. *Eur. Cell Mater.* V. 30. P. 232. <https://doi.org/10.22203/ecm.v030a16>
- James A.W., LaChaud G., Shen J., Asatrian G., Nguyen V., Zhang X., Ting K., Soo C.* 2016. A review of the clinical side effects of bone morphogenetic protein-2. *Tissue Eng. Part B Rev.* V. 22. P. 284. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2015.0357>
- Ju X.J., Xie R., Yang L., Chu L.Y.* 2009. Biodegradable 'intelligent' materials in response to physical stimuli for biomedical applications. *Expert Opin. Ther. Pat.* V. 19. P. 493. <https://doi.org/10.1517/13543770902771282>
- Jung R.E., Cochran D.L., Domken O., Seibl R., Jones A.A., Buser D., Hammerle C.H.* 2007. The effect of matrix bound parathyroid hormone on bone regeneration. *Clin. Oral Implants Res.* V. 18. P. 319. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2007.01342.x>
- Kabu S., Gao Y., Kwon B.K., Labhasetwar V.* 2015. Drug delivery, cell-based therapies, and tissue engineering approaches for spinal cord injury. *J. Control Release.* V. 219. P. 141. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.08.060>
- Kapadia B.H., Berg R.A., Daley J.A., Fritz J., Bhawe A., Mont M.A.* 2016. Periprosthetic joint infection. *Lancet*. V. 387. P. 386. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61798-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61798-0)
- Kempen D.H., Creemers L.B., Alblas J., Lu L., Verbout A.J., Yaszemski M.J., Dhert W.J.* 2010. Growth factor interactions in bone regeneration. *Tissue Eng. Part B Rev.* V. 16. P. 551. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2010.0176>
- Khlusov I.A., Litvinova L.S., Shupletsova V.V., Khaziakhmatova O.G., Malashchenko V.V., Yurova K.A., Shunkin E.O., Krivosheev V.V., Porokhova E.D., Sizikova A.E., Safiullina L.A., Legostaeva E.V., Komarova E.G., Sharkeev Y.P.* 2020. Co-stimulatory effect of rough calcium phosphate coating and blood mononuclear cells on adipose-derived mesenchymal stem cells in vitro as a model of in vivo tissue repair. *materials*. V. 13. P. 4398. <https://doi.org/10.3390/ma13194398>
- Kim H.W., Knowles J.C., Kim H.E.* 2004. Hydroxyapatite/poly(epsilon-caprolactone) composite coatings on hydroxyapatite porous bone scaffold for drug delivery. *Biomaterials*. V. 25. P. 1279. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.07.003>
- Kofron M.D., Laurencin C.T.* 2006. Bone tissue engineering by gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* V. 58. P. 555. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.03.008>
- Komarova E.G., Sharkeev Y.P., Sedelnikova M.B., Prymak O., Epple M., Litvinova L.S., Shupletsova V.V., Malashchenko V.V., Yurova K.A., Dzyuman A.N., Kulagina I.V., Mushtovatova L.S., Bochkareva O.P., Karpova M.R., Khlusov I.A.* 2020. Zn- or Cu-containing CaP-based coatings formed by micro-arc oxidation on titanium and Ti-40Nb alloy: part II—wettability and biological performance. *Materials*. V. 13. P. 4366. <https://doi.org/10.3390/ma13194366>
- Kothari R., Kumar V., Jena R., Tunga R., Tunga B.S.* 2011. Modes of degradation and impurity characterization in rhPTH (1-34) during stability studies. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* V. 65. P. 348. PMID: <https://doi.org/10.5731/pdajpst.2011.007452229352>

- Lai W.Y., Chen Y.J., Lee A.K., Lin Y.H., Liu Y.W., Shie M.Y. 2021. Therapeutic effects of the addition of fibroblast growth factor-2 to biodegradable gelatin/magnesium-doped calcium silicate hybrid 3D-printed scaffold with enhanced osteogenic capabilities for critical bone defect restoration. *Biomedicines*. V. 9. P. 712.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines9070712>
- Lee D., Wufuer M., Kim I., Choi T.H., Kim B.J., Jung H.G., Jeon B., Lee G., Jeon O.H., Chang H., Yoon D.S. 2021. Sequential dual-drug delivery of BMP-2 and alendronate from hydroxyapatite-collagen scaffolds for enhanced bone regeneration. *Sci. Rep.* V. 11. P. 746.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-80608-3>
- Lenfeld P., Brdlik P., Borůvka M., Běhálek L., Habr J. 2020. Effect of radiation crosslinking and surface modification of cellulose fibers on properties and characterization of biopolymer composites. *Polymers (Basel)*. Vol.12. P.3006.
<https://doi.org/10.3390/polym12123006>
- Li C., Yang L., Ren X., Lin M., Jiang X., Shen D., Xu T., Ren J., Huang L., Qing W., Zheng J., Mu Y. 2019. Groove structure of porous hydroxyapatite scaffolds (HAS) modulates immune environment via regulating macrophages and subsequently enhances osteogenesis. *J. Biol. Inorg. Chem.* V. 24. P. 733.
<https://doi.org/10.1007/s00775-019-01687-w>
- Liang Y., Luan X., Liu X. 2020. Recent advances in periodontal regeneration: A biomaterial perspective. *Bioact. Mater.* V. 5. P. 297.
<https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.02.012>
- Liao Y.H., Chang Y.H., Sung L.Y., Li K.C., Yeh C.L., Yen T.C., Hwang S.M., Lin K.J., Hu Y.C. 2014. Osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells and calvarial defect repair using baculovirus-mediated co-expression of BMP-2 and miR-148b. *Biomaterials*. V. 35. P. 4901.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.02.055>
- Limongi T., Susa F., Allione M., di Fabrizio E. 2020. Drug delivery applications of three-dimensional printed (3DP) mesoporous scaffolds. *Pharmaceutics*. V. 12. P. 851.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12090851>
- Lin T., Jin Q., Mo X., Zhao Z., Xie X., Zou C., Huang G., Yin J., Shen J. 2021. Experience with periprosthetic infection after limb salvage surgery for patients with osteosarcoma. *J. Orthop. Surg. Res.* V. 16. P. 93.
<https://doi.org/10.1186/s13018-021-02243-6>
- Liu Y., de Groot K., Hunziker E.B. 2005. BMP-2 liberated from biomimetic implant coatings induces and sustains direct ossification in an ectopic rat model. *Bone*. V. 36. P. 745.
<https://doi.org/10.1016/j.bone.2005.02.005>
- Lyons K.M., Pelton R.W., Hogan B.L. 1990. Organogenesis and pattern formation in the mouse: RNA distribution patterns suggest a role for bone morphogenetic protein-2A (BMP-2A). *Development*. V. 109. P. 833
- Malek-Khatibi A., Javar H.A., Dashtimoghadam E., Ansari S., Hasani-Sadrabadi M.M., Moshaverinia A. 2020. In situ bone tissue engineering using gene delivery nanocomplexes. *Acta Biomater.* V. 108. P. 326.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.03.008>
- Matai I., Kaur G., Seyedsalehi A., McClinton A., Laurencin C.T. 2020. Progress in 3D bioprinting technology for tissue/organ regenerative engineering. *Biomaterials*. V. 226. P. 119536.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119536>
- Minting D., Linlin H., Mengke P., Fenyan H., Qiang G., Yasha C., Peng L. 2020. Preparation of vancomycin-loaded alginate hydrogel coating on magnesium alloy with enhanced anti-corrosion and antibacterial properties. *Thin Solid Films*. V. 693. P. 137679.
<https://doi.org/10.1016/j.tsf.2019.137679>
- Montoya C., Du Y., Gianforcaro A.L., Orrego S., Yang M., Lelkes P.I. 2021. On the road to smart biomaterials for bone research: definitions, concepts, advances, and outlook. *Bone Res.* V. 9. P. 12.
<https://doi.org/10.1038/s41413-020-00131-z>
- Morrow J.J., Khanna C. 2015. Osteosarcoma genetics and epigenetics: Emerging biology and candidate therapies. *Crit. Rev. Oncog.* V. 20. P. 173.
<https://doi.org/10.1615/critrevoncog.2015013713>
- Nancollas G.H., Tang R., Phipps R.J., Henneman Z., Gulde S., Wu W., Mangood A., Russell R.G., Ebetino F.H. 2006. Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: differences in interactions with hydroxyapatite. *Bone*. V. 38. P. 617.
<https://doi.org/10.1016/j.bone.2005.05.003>
- Nie Y., Kalapos C., Nie X., Murphy M., Hussein R., Zhang J. 2010. Superhydrophilicity and antibacterial property of a Cu-dotted oxide coating surface. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* V. 9. P. 25.
<https://doi.org/10.1186/1476-0711-9-25>
- Otsuka M., Matsuda Y., Suwa Y., Fox J.L., Higuchi W.I. 1994. A novel skeletal drug delivery system using a self-setting calcium phosphate cement. 5. Drug release behavior from a heterogeneous drug-loaded cement containing an anticancer drug. *J Pharm Sci.* V. 83. P. 1565.
<https://doi.org/10.1002/jps.2600831109>
- Pan T., Song W., Xin H., Yu H., Wang H., Ma D., Cao X., Wang Y. 2021. MicroRNA-activated hydrogel scaffold generated by 3D printing accelerates bone regeneration. *Bioact. Mater.* V. 10. P. 1. PMID: PMC8637000
<https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.08.03434901525>
- Parent M., Baradari H., Champion E., Damia C., Viana-Trecant M. 2017. Design of calcium phosphate ceramics for drug delivery applications in bone diseases: A review of the parameters affecting the loading and release of the therapeutic substance. *J. Control Release*. V. 252. P. 1.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.02.012>
- Parvizi J., Saleh K.J., Ragland P.S., Pour A.E., Mont M.A. 2008. Efficacy of antibiotic-impregnated cement in total hip replacement. *Acta Orthop.* V. 79. P. 335.
<https://doi.org/10.1080/17453670710015229>
- Parvizi J., Gehrke T., Chen A.F. 2013. Proceedings of the international consensus on periprosthetic joint infection. *bone Joint J.* V.95. P. 1450.
<https://doi.org/10.1302/0301-620X.95B11.33135>
- Paulini M., Camal Ruggieri I.N., Ramallo M., Alonso M., Rodriguez-Cabello J.C., Esbrit P., Mardegan Issa J.P., Feldman S. 2022. Recombinant proteins-based strategies in bone tissue engineering. *Biomolecules*. V. 12. P. 3.
<https://doi.org/10.3390/biom12010003>
- Peng B., Chen Y., Leong K.W. 2015. MicroRNA delivery for regenerative medicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.* V. 88. P. 108.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.05.014>
- Peter B., Pioletti D.P., Laib S., Bujoli B., Pilet P., Janvier P., Guicheux J., Zambelli P.Y., Bouler J.M., Gauthier O. 2005. Calcium phosphate drug delivery system: influence of local

- zoledronate release on bone implant osteointegration. *Bone*. V. 36. P. 52.
<https://doi.org/10.1016/j.bone.2004.10.004>
- Phillips J.E., Gersbach C.A., Garcia A.J. 2007. Virus-based gene therapy strategies for bone regeneration. *Biomaterials*. V. 28. P. 211.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.07.032>
- Phull S.S., Yazdi A.R., Ghert M., Towler M.R. 2020. Bone cement as a local chemotherapeutic drug delivery carrier in orthopedic oncology: A review. *J. Bone Oncol.* V. 26. P. 100345.
<https://doi.org/10.1016/j.jbo.2020.100345>
- Porter J.R., Ruckh T.T., Popat K.C. 2009. Bone tissue engineering: a review in bone biomimetics and drug delivery strategies. *Biotechnol. Prog.* V. 25. P. 1539.
<https://doi.org/10.1002/btpr.246>
- Pountos I., Giannoudis P.V. 2018. Drug-eluting implants for the suppression of metastatic bone disease: current insights. *Expert Rev. Med. Devices*. V. 15. P. 301.
<https://doi.org/10.1080/17434440.2018.1456336>
- Prosolov K.A., Mitrichenko D.V., Prosolov A.B., Nikolaeva O.O., Lastovka V.V., Belyavskaya O.A., Chebodaeva V.A., Glukhov I.A., Litvinova L.S., Shupletsova V.V., Khasiakhmatova O.G., Malashchenko V.V., Yurova K.A., Shunkin E.O., Fedorov M.A., Komkov A.R., Pavlenko V.V., Anisenya I.I., Sharkeev Yu.P., Vladescu A., Khlusov I.A. 2021. Zn-Doped CaP-based coatings on Ti–6Al–4V and Ti–6Al–7Nb alloys prepared by magnetron sputtering: controllable biodegradation, bacteriostatic, and osteogenic activities. *Coatings*. V. 11. P. 809. ISSN: 2079-6412
<https://doi.org/10.3390/coatings11070809>
- Puljula E., Turhanen P., Vepsäläinen J., Monteil M., Lecouvey M., Weisell J. 2015. Structural requirements for bisphosphonate binding on hydroxyapatite: NMR study of bisphosphonate partial esters. *ACS Med. Chem. Lett.* V. 6. P. 397.
<https://doi.org/10.1021/ml5004603>
- Pura J.A., Boby J.D., Tanzer M. 2016. Implant-delivered alendronate causes a dose-dependent response on net bone formation around porous titanium implants in canines. *Clin. Orthop. Relat. Res.* V. 474. P. 1224.
<https://doi.org/10.1007/s11999-016-4714-6>
- Radin S., Campbell J.T., Ducheyne P., Cuckler J.M. 1997. Calcium phosphate ceramic coatings as carriers of vancomycin. *Biomaterials*. V. 18. P. 777.
[https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(96\)00190-1](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(96)00190-1)
- Raeisdasteh Hokmabad V., Davaran S., Ramazani A., Salehi R. 2017. Design and fabrication of porous biodegradable scaffolds: a strategy for tissue engineering. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* V. 28. P. 1797.
<https://doi.org/10.1080/09205063.2017.1354674>
- Ratko T.A., Belinson S.E., Samson D.J., Bonnell C., Ziegler K.M., Aronson N. 2010. Bone morphogenetic protein: the state of the evidence of on-label and off-Label Use. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US).
- Ratner B.D., Hoffman A.S., Schoen F.J., Lemons J.E. 2004. *Biomaterials science: An introduction to materials in medicine*, 2nd ed. San Diego: Elsevier Science Publishing Co. 864 p.
- Orthopedic biomaterials – global market outlook (2015–2022). электронный доступ: <https://www.mynewsdesk.com/us/statistics-market-research-consulting/pressreleases/orthopedic-biomaterials-global-market-outlook-2015-2022-1598444>
- Reufsteck C., Lifshitz-Shovali R., Zepp M., Bäuerle T., Kübler D., Golomb G., Berger M.R. 2012. Silencing of skeletal metastasis-associated genes impairs migration of breast cancer cells and reduces osteolytic bone lesions. *Clin. Exp. Metastasis*. V. 29. P. 441.
<https://doi.org/10.1007/s10585-012-9462-8>
- Rizwan M., Alias R., Zaidi U.Z., Mahmoodian R., Hamdi M. 2018. Surface modification of valve metals using plasma electrolytic oxidation for antibacterial applications: A review. *J. Biomed. Mater. Res. A*. V. 106. P. 590.
<https://doi.org/10.1002/jbm.a.36259>
- Santoro M., Tatara A.M., Mikos A.G. 2014. Gelatin carriers for drug and cell delivery in tissue engineering. *J. Control Release*. V. 190. P. 210.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.014>
- Sayed E., Haj-Ahmad R., Ruparelia K., Arshad M.S., Chang M.W., Ahmad Z. 2017. Porous inorganic drug delivery systems—a review. *AAPS PharmSciTech*. V. 18. P. 1507.
<https://doi.org/10.1208/s12249-017-0740-2>
- Sedelnikova M.B., Komarova E.G., Sharkeev Y.P., Ugodchikova A.V., Mushtovatova L.S., Karpova M.R., Sheikin V.V., Litvinova L.S., Khlusov I.A. 2019. Zn-, Cu- or Ag-incorporated micro-arc coatings on titanium alloys: Properties and behavior in synthetic biological media. *Surface and Coatings Technology*. V. 369. P. 52.
<https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2019.04.021>
- Shafabakhsh R., Yousefi B., Asemi Z., Nikfar B., Mansournia M.A., Hallajzadeh J. 2020. Chitosan: A compound for drug delivery system in gastric cancer—a review. *Carbohydr. Polym.* V. 242. P. 116403.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116403>
- Shafiee A., Atala A. 2017. Tissue engineering: toward a new era of Medicine. *Ann. Rev. Med.* V. 68. P. 29.
<https://doi.org/10.1146/annurev-med-102715-092331>
- Shie M.Y., Ding S.J. 2013. Integrin binding and MAPK signal pathways in primary cell responses to surface chemistry of calcium silicate cements. *Biomaterials*. V. 34. P. 6589.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.05.075>
- Stokovic N., Ivanjko N., Maticic D., Luyten F.P., Vukicevic S. 2021. Bone morphogenetic proteins, carriers, and animal models in the development of novel bone regenerative therapies. *Materials (Basel)*. V. 14. P. 3513.
<https://doi.org/10.3390/ma14133513>
- Sundelacruz S., Kaplan D.L. 2009. Stem cell- and scaffold-based tissue engineering approaches to osteochondral regenerative medicine. *Semin. Cell Dev. Biol.* V. 20. P. 646.
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2009.03.017>
- Swanson W.B., Zhang Z., Xiu K., Gong T., Eberle M., Wang Z., Ma P.X. 2020. Scaffolds with controlled release of pro-mineralization exosomes to promote craniofacial bone healing without cell transplantation. *Acta Biomater.* V. 118. P. 215.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.09.052>
- Tan R., She Z., Wang M., Yu X., Jin H., Feng Q. 2012. Repair of rat calvarial bone defects by controlled release of rhBMP-2 from an injectable bone regeneration composite. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* V. 6. P. 614.
<https://doi.org/10.1002/term.463>
- Tanzawa Y., Tsuchiya H., Shirai T., Nishida H., Hayashi K., Takeuchi A., Kawahara M., Tomita K. 2011. Potentiation of the antitumor effect of calcium phosphate cement containing anticancer drug and caffeine on rat osteosarcoma. *J.*

- Orthop. Sci. V. 16. P. 77.
<https://doi.org/10.1007/s00776-011-0045-3>
- Tenkumo T., Rojas-Sánchez L., Vanegas Sáenz J.R., Ogawa T., Miyashita M., Yoda N., Prymak O., Sokolova V., Sasaki K., Epple M. 2020. Reduction of inflammation in a chronic periodontitis model in rats by TNF- α gene silencing with a topically applied siRNA-loaded calcium phosphate paste. *Acta Biomater.* P. 105. V. 263.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.01.031>
- Thrivikraman G., Athirasala A., Twohig C., Boda S.K., Bertasconi L.E. 2017. Biomaterials for craniofacial bone regeneration. *Dent. Clin. North. Am.* V. 61. P. 835.
<https://doi.org/10.1016/j.cden.2017.06.003>
- Urist M.R., Strates B.S. 1971. Bone morphogenetic protein. *J. Dent. Res.* V. 50. P. 1392
- US Market Overview for Orthopedic Biomaterials 2017 – MedView. электронный доступ: <https://www.reportbuyer.com/product/4759849/us-market-overview-for-orthopedic-biomaterials-2017-medview.html>
- Van de Putte K.A., Urist M.R. 1965. Osteogenesis in the interior of intramuscular implants of decalcified bone matrix. *Clin. Orthop.* V. 40. P. 48.
- Wang Y., Newman M.R., Benoit D.S.W. 2018. Development of controlled drug delivery systems for bone fracture-targeted therapeutic delivery: A review. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* V. 127. P. 223.
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.02.023>
- Wang X., Xu S., Zhou S., Xu W., Leary M., Choong P., Qian M., Brandt M., Xie Y.M. 2016. Topological design and additive manufacturing of porous metals for bone scaffolds and orthopaedic implants: A review. *Biomaterials.* V. 83. P. 127.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.01.012>
- Wang W., Yeung K.W.K. 2017. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioact. Mater.* V. 2. P. 224.
<https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.05.007>
- Wang Z., Wang Y., Yan J., Zhang K., Lin F., Xiang L., Deng L., Guan Z., Cui W., Zhang H. 2021. Pharmaceutical electrospinning and 3D printing scaffold design for bone regeneration. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* V. 174. P. 504.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.05.007>
- Whitmire R.E., Wilson D.S., Singh A., Levenston M.E., Murthy N., García A.J. 2012. Self-assembling nanoparticles for intra-articular delivery of anti-inflammatory proteins. *Biomaterials.* V. 33. P. 7665.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.06.101>
- Xie L., Xu J., Sun X., Li X., Liu K., Liang X., Zhou Z., Zhuang H., Sun K., Wu Y., Gu J., Guo W. 2021. Apatinib plus ifosfamide and etoposide for relapsed or refractory osteosarcoma: A retrospective study in two centres. *Oncol. Lett.* V. 22. P. 552.
<https://doi.org/10.3892/ol.2021.12813>
- Yadavalli T., Ames J., Agelidis A., Suryawanshi R., Jaishankar D., Hopkins J., Thakkar N., Koujah L., Shukla D. 2019. Drug-encapsulated carbon (DECON): A novel platform for enhanced drug delivery. *Sci. Adv.* V. 5. P. 0780.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.aax0780>
- Yan Y., Chen H., Zhang H., Guo C., Yang K., Chen K., Cheng R., Qian N., Sandler N., Zhang Y.S., Shen H., Qi J., Cui W., Deng L. 2019. Vascularized 3D printed scaffolds for promoting bone regeneration. *Biomaterials.* V. 190. P. 97.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.10.033>
- Yang Z., Han J., Li J., Li X., Li Z., Li S. 2009. Incorporation of methotrexate in calcium phosphate cement: behavior and release in vitro and in vivo. *Orthopedics.* V. 32. P. 27.
<https://doi.org/10.3928/01477447-20090101-28>
- Zeng Y., Hoque J., Varghese S. 2019. Biomaterial-assisted local and systemic delivery of bioactive agents for bone repair. *Acta Biomater.* V. 93. P. 152.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.01.060>
- Zhang W., Shi W., Wu S., Kuss M., Jiang X., Untrauer J.B., Reid S.P., Duan B. 2020. 3D printed composite scaffolds with dual small molecule delivery for mandibular bone regeneration. *Biofabrication.* V. 12. P. 035020.
<https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab906e>
- Zhang Y., Sun T., Jiang C. 2018. Biomacromolecules as carriers in drug delivery and tissue engineering. *Acta Pharm. Sin. B.* V. 8. P. 34.
<https://doi.org/10.1016/j.apsb.2017.11.005>
- Zhou W., Hao M., Du X., Chen K., Wang G., Yang J. 2014. Advances in targeted therapy for osteosarcoma. *Discov. Med.* V. 17. P. 301

Scaffolds as Carriers of Drugs and Biomolecules for Bone Tissue Bioengineering

I. A. Khlusov^{a, b}, E. D. Porokhova^{a, b}, E. G. Komarova^a, E. A. Kazantseva^{a, c}, Yu. P. Sharkeev^a, K. A. Yurova^d, and L. S. Litvinova^{d, *}

^aLaboratory of Physics of Nanostructured Biocomposites, Institute of Strength Physics and Materials Science of SB RAS, Tomsk, 634055 Russia

^bMorphology and General Pathology Department, Siberian State Medical University, Tomsk, 634050 Russia

^cDepartment of Strength and Design, Tomsk State University, Tomsk, 634050 Russia

^dCenter of Immunology and Cell Biotechnology, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, 236041 Russia

*e-mail: larisalitvinova@yandex.ru

The topic of delivery systems for various drugs and biological molecules, including scaffold technologies, is relevant, complex and multifaceted, but is covered fragmentarily in the scientific literature. Many publications did not present the physicochemical properties of carrier materials, the features of their biodegradation, which can affect the release of molecules from the matrix and their pharmacological activity. In other references, the pharmacokinetics of drugs and/or cellular/tissue reactions are poorly described. As a result, disparate information makes it difficult to purposefully search for material and does not allow drawing unambiguous conclusions on topical issue. In this regard, on the basis of reviews and original articles, information on the development and functioning of scaffolds as carriers of me-

dicinal and biological molecules was collected and critically comprehended; materials and substances used in delivery systems, as well as cellular and tissue reactions during their employment, are classified. Especial attention in our review is paid to composite scaffolds with a calcium phosphate component being the carriers of various pharmacological agents for effective delivery systems in applications to bone tissue bioengineering.

Keywords: stem and bone cells *in vitro*, *in vivo* bone defects, clinical trials, composite materials, calcium phosphates, medicines, biomolecules, drug delivery

РОЛЬ ОПУХОЛЕВОГО СУПРЕССОРА *RB* В РАЗВИТИИ ЛОКАЛИЗОВАННОГО И КАСТРАЦИОННО-РЕЗИСТЕНТНОГО РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

© 2022 г. В. М. Рябов¹, М. А. Воскресенский², Б. В. Попов¹, *

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

²Городская многопрофильная больница № 2 МЗ РФ, Санкт-Петербург, 194354 Россия

*E-mail: borisvp478@gmail.com

Поступила в редакцию 25.02.2022 г.

После доработки 11.03.2022 г.

Принята к публикации 12.03.2022 г.

Рак предстательной железы (РПЖ) занимает в настоящее время в западных странах лидирующее положение по заболеваемости и смертности среди всех опухолевых заболеваний. РПЖ возникает в форме аденокарциномы (локализованный РПЖ), которая может находиться неопределенно долгое время в дремлющей форме, не угрожающей жизни пациента, или трансформироваться в агрессивный рак, нечувствительный к андроген-депривационной терапии — кастрационно-резистентный рак простаты, протекающий с метастазированием и быстро наступающим летальным исходом (КР-РПЖ). РПЖ возникает из эпителия предстательной железы, формирование и функционирование которого происходит под действием андрогенов. Андрогены, в основном дигидротестостерон, активируют сигнальный путь андрогенного рецептора (AR), который регулирует рост и деление эпителия простаты в нормальных условиях и в случае возникновения локализованного РПЖ. Андроген-депривационная терапия, например, с помощью ингибиторов андрогенного рецептора (энзалутамид, абиратерон), тормозит развитие локализованного РПЖ в течение 1.5–2-х лет, но затем теряет эффективность и неизбежно приводит к переходу заболевания в агрессивный КР-РПЖ. Инактивация опухолевого супрессора *RB* вносит вклад в развитие рака любой тканевой специфичности вследствие мутаций, потери гена или посттрансляционной модификации его продукта. Оценка состояния *RB* и его продукта показывает, что ген *RB* изменяется менее чем у 1% пациентов при локализованном РПЖ, но его потеря является причиной возникновения КР-РПЖ у 17–33% пациентов. В настоящем кратком обзоре данных литературы рассматривается роль сигнального пути pRb в патогенезе локализованного и кастрационно-резистентного РПЖ.

Ключевые слова: опухолевый супрессор *RB*, pRb, метилтрансфераза Ezh2, сигнальный путь pRb–E2F1–Ezh2, андрогенный рецептор (AR), андроген-депривационная терапия, локализованный рак предстательной железы, кастрационно-резистентный рак предстательной железы, нейроэндокринный рак предстательной железы

DOI: 10.31857/S0041377122030099

Ген чувствительности к возникновению ретинобластомы (*RB*) был первым идентифицированным опухолевым супрессором. Его существование было изначально предположено Knudson (1971), который изучал истории болезней пациентов, страдающих редкой формой опухоли сетчатки глаза у детей — ретинобластомой. Автор предположил, что ретинобластома вызывается двумя мутациями одного гена. В доминантно наследуемой форме одна мутация такого гена наследуется через зародышевые клетки, а

вторая возникает в соматических клетках сетчатой оболочки глаза (Knudson, 1971). Следуя этой гипотезе, ген *RB* успешно клонировали в 1986–1987 гг. (Friend et al., 1986; Lee et al., 1987). С этого времени *RB* и его продукт (pRb) постепенно заняли центральное место в литературе, описывающей основные функции клеток. Было найдено, что pRb играет центральную роль в биологии эмбриональных и тканеспецифических стволовых клеток зрелого организма, тканеспецифических дифференцированных клеток различных тканей. Мутации или утрата гена *RB*, инактивация его продукта служат причиной возникновения различных заболеваний, а поиск новых подходов и лекарств для лечения разнообразных болезней требует оценки статуса *RB* и его продукта (Sage, 2012).

Принятые сокращения: РПЖ — рак предстательной железы; КР-РПЖ — кастрационно-резистентный РПЖ; НЭ-РПЖ — нейроэндокринный РПЖ; СК — стволовые клетки; ЭСК — эмбриональные СК; AR — андрогенный рецептор; Ezh2 — метилтрансфераза, триметилирующая сайт H3K27; pRb — продукт гена *RB*; RB — опухолевый супрессор, определяющий чувствительность к возникновению ретинобластомы; TNF α — опухолевый ядерный фактор α .

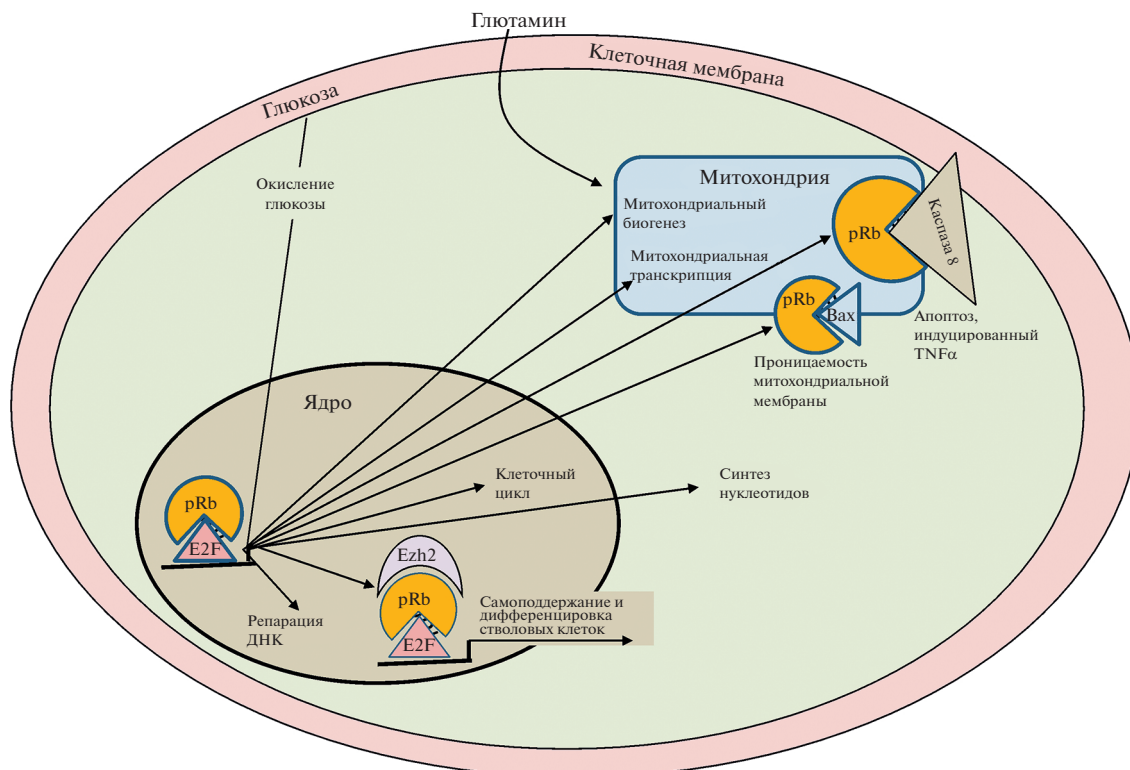


Рис. 1. Молекулярно-клеточные механизмы регуляции основных клеточных функций pRb – продуктом гена *RB*. pRb регулирует функции клетки через канонический и неканонический сигнальные пути. Канонический сигнальный путь включает регуляцию клеточного цикла, неканонический – регуляцию репарации ДНК, обмена веществ, ответа на повреждение ДНК, митохондриальный биогенез, митохондриальную транскрипцию и апоптоз, индуцированный фактором некроза опухолей α (TNF α). E2F – транскрипционные факторы семейства E2F, Ezh2 – метилтрансфераза, триметилирующая сайт H3K27, Вах – белок семейства Bcl-2, регулирующий проницаемость внешней мембраны митохондрий.

pRb регулирует основные функции клеток во всех многоклеточных организмах, в том числе у растений и животных. Область активности pRb включает регуляцию способности к самоподдержанию, поддержание состояния покоя, выбор клеточной судьбы и тканеспецифической дифференцировке в эмбриональных и тканеспецифических стволовых клетках зрелого организма (Sage, 2012). В дифференцированных клетках различной тканевой специфичности pRb выполняет роль убиквитарного регулятора клеточного цикла, дифференцировки, метаболизма, апоптоза, клеточного старения, аутофагии, клеточной памяти, ответа на повреждение ДНК и стабильности генома (рис. 1) (Weinberg, 1995; Sherr, 1996; Dyson, 1998; Knudsen, Knudsen, 2008; Dick et al., 2018; Baryshev et al., 2020; Popov et al., 2020).

Более 200 белков выполняют свои специфические функции путем взаимодействия с pRb, создавая, таким образом, биохимическую основу для его многофункциональности. Основными партнерами pRb являются транскрипционные факторы семейства E2F, которые опосредуют влияние pRb на транскрипцию множества генов, регулирующих базальные функции клеток. Транскрипционные факторы E2F предоставляют pRb возможность находить ми-

шени и регулировать транскрипцию путем прямого торможения активности E2F или с помощью привлечения других регуляторных молекул, например, метилтрансферазы Ezh2, которая метилирует K27 гистона H3 (H3K27me3), вызывая сайленсинг генов. Формирование троичного комплекса, включающего pRb, E2F1 и Ezh2, играет ключевую роль в регуляции самоподдержания, прогрессии клеточного цикла, дифференцировки и стабильности генома (Dick et al., 2018). С другой стороны, потеря, мутации, метилирование промотора *RB* или посттрансляционная модификация его продукта приводит к клеточным катастрофам, лежащим в основе различных заболеваний, наиболее разрушительным из которых является рак, включая РПЖ (Mandigo et al., 2021).

В настоящем кратком обзоре литературы рассматривается роль сигнального пути pRb–E2F1 в патогенезе локализованного и кастрационно-резистентного РПЖ. Опубликованные результаты свидетельствуют, что при локализованном РПЖ pRb сохраняет активность, но она используется опухолевыми клетками для создания конкурентных ростовых преимуществ. Потеря *RB* с полной утратой регуляторных функций сигнального пути pRb–E2F1

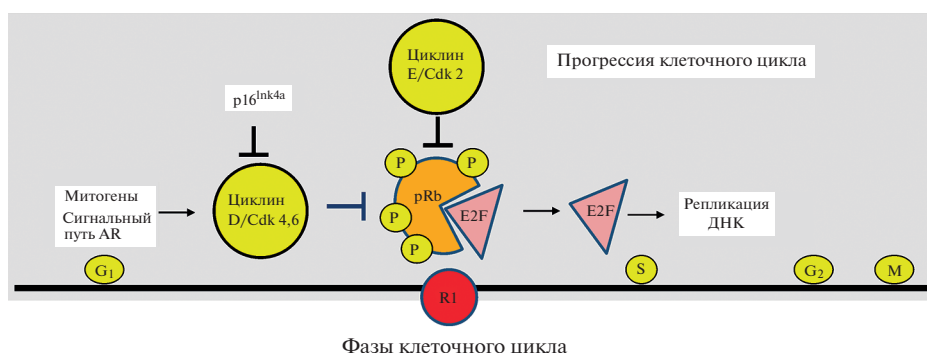


Рис. 2. Роль фактора pRb в регуляции клеточного цикла. pRb контролирует прохождение клеткой рестрикционной точки R1 в конце фазы G₁ путем связывания и временной инактивации активаторных транскрипционных факторов E2F. G₁, S, G₂, M – фазы клеточного цикла; R1 – рестрикционная точка фазы G₁, в которой регулируется переход G₁/S; AR – андрогенный рецептор; Cdk 2,4,6 – циклин-зависимые киназы.

приводит и доминирует в патогенезе кастрационно-резистентного РПЖ.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ОСНОВНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ФУНКЦИЙ ПРОДУКТОМ ГЕНА *RB*

Белок pRb физически взаимодействует более чем с 200 регуляторными молекулами, однако основными его партнерами являются белки семейства E2F. Весь спектр регуляторного влияния pRb осуществляется через канонический и неканонический сигнальные пути. Наиболее хорошо изученным в настоящее время является канонический сигнальный путь, опосредующий регуляторное влияние pRb на деление клетки. Неканонический сигнальный путь аккумулирует механизмы онкосупрессорной активности pRb, которые в значительной степени опосредуются его взаимодействием с одним из факторов семейства E2F–E2F1.

КАНОНИЧЕСКИЙ СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ pRb: РЕГУЛЯЦИЯ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА

pRb тормозит деление клетки в рестрикционной точке R1 путем связывания и временной инактивации активаторных E2F (рис. 2). Под действием митогенов в клетке образуются активные киназы циклин D/Cdk2 и циклин E/Cdk2, которые последовательно фосфорилируют pRb, способствуя освобождению активаторных E2F. Наконец, активаторные E2F транскрипционно вызывают синтез белков, необходимых для репликации ДНК и дальнейшей прогрессии клеточного цикла. Активность комплексов циклин D/Cdk4,6 тормозится белком p16^{Ink4a}. Гиперметилирование промотора гена p16^{Ink4a} (при раке пищевода, головы и шеи, немелкоклеточной карциномы легких, раке молочной железы, толстого кишечника) или потеря гена p16^{Ink4a} (в случаях глиомы, рака головы и шеи, яичников, мочевого пузыря, эндометрия) сопровождается гиперактивацией циклина

D/Cdk4 и гиперфосфорилированием pRb. В таких условиях отменяется рестрикционная точка R1, что способствует постоянному и автономному делению клетки. Подобная ситуация возникает и при амплификации гена циклина D1 (при раке пищевода, головы и шеи, молочной железы, эндометрия и меланоме) (Mandigo et al., 2021). При инактивации pRb, опосредованной гиперактивацией циклина D/Cdk4,6, в клинике используются ингибиторы Cdk4,6 (пальбоклиб, рибоциклиб), эффективность действия которых зависит от присутствия функционального pRb. Таким образом, pRb может использоваться как эффективный прогностический маркер для выбора таргетной терапии для лечения рака (Mandigo et al., 2021).

НЕКАНОНИЧЕСКИЙ СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ pRb

Клинические и экспериментальные исследования роли pRb показали, что механизм его действия выходит за пределы канонического сигнального пути. Было установлено, что pRb локализуется не только в промоторной, но и в инхансерной области генов, а также в повторяющихся последовательностях ДНК (Kareta et al., 2015; Ishak et al., 2016). Гиперфосфорилированный pRb был найден в связанном с хроматином виде в фазе S клеточного цикла (Avni et al., 2008), хотя в соответствии с гипотезой о канонической роли pRb его гиперфосфорилирование в рестрикционной точке R1 способствует диссоциации комплекса pRb/E2F и лишает pRb способности связывать хроматин (рис. 2). Клинические работы показали, что инактивация pRb часто коррелирует с повышением чувствительности к химеотерапии (Knudsen, Knudsen, 2008). Было установлено, что pRb регулирует не только клеточный цикл, но также потребление и окисление глюкозы, синтез нуклеотидов, обмен глутамина, цикл трикарбоновых кислот, митохондриальную транскрипцию, митохондриальный апоптоз, индуцированный TNF α , репарацию ДНК, самоподдержание и дифференцировку

эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) и соматических стволовых клеток (СК), ответ клетки на повреждение ДНК, стабильность генома (рис. 1) (Dick et al., 2018). Вновь найденные объекты регуляторного влияния *pRb* отнесены к неканоническому сигнальному пути, механизмы участия *pRb* в некоторых из них рассмотрены ниже.

Роль *pRb* в регуляции самоподдержания и дифференцировки СК. Изучение роли белков семейства Polycomb (PcG) показало, что как в эмбриональных (ЭСК), так и в соматических СК промоторы генов, поддерживающих мультипотентность и линейную дифференцировку, содержат “бивалентные” домены, включающие активную (H3K4me3) и репрессивную метку (H3K27me3) (Sharma et al., 2010; Попов, 2019). Эти модификации катализируются соответственно белками семейств Trithorax (TrxG) и PcG (Pianti, Shilatifard, 2016). В активно делящихся самоподдерживающихся ЭСК гены линейной дифференцировки не транскрибируются, но их репрессия отменяется при индукции линейной дифференцировки, что связано с утратой репрессивной метки H3K27me3. Активация экспрессии дифференцировочных генов сочетается с торможением транскрипции генов плюрипотентности (*OCT4*, *SOX2*, *NANOG*) в ЭСК путем повышения уровня репрессивной метки H3K27me3 в их промоторах. Такая регуляция позволяет дифференцировку СК в один клеточный тип, но предотвращает де- и трансдифференцировку. Современные исследования установили, что уровень метилирования промоторов генов плюрипотентности регулируется путем формирования комплексов *pRb/E2F1/Ezh2*, которые триметилируют сайт H3K27. Экспериментальная инактивация *pRb* сопровождается снижением уровня метилирования и репрограммированием СК (Kareta et al., 2015). В клинических условиях, потеря *Rb* и репрограммирование люминального фенотипа в нейроэндокринный найдены у 15–25% пациентов с КР-РПЖ (Vlachostergios et al., 2017).

Роль *pRb* в регуляции метаболизма. Было установлено, что сигнальный путь *pRb–E2F1* регулирует множество метаболических процессов, включая синтез нуклеотидов, окисление глюкозы и функцию митохондрий (рис. 1). Прямыми мишенями E2F1 являются гены ферментов синтеза нуклеотидов: тимидинкиназы (ТК) и дегидрофолатредуктазы (DHFR) (Anderson et al., 1996; Jensen et al., 1997); дегидрогеназы 4 пируваткиназы (PDK4), тормозящей вход пирувата в цикл трикарбоновых кислот (Hsieh et al., 2008); коактиватора 1 α PPARgamma (PCG-1alpha), способствующего митохондриальной транскрипции, биогенезу и потреблению кислорода (Dali-Youcef et al., 2007); гены белков, участвующих в транспорте электронов и окислительном фосфорилировании, например, субъединицы АТФ-синтазы, цитохром-с-оксидазы, убихинол-цитохром-с-редуктазы, и сукцинатдегидрогеназы (Dali-Youcef et al., 2007; Blanchet et al., 2011). Экспрессия транспортера глута-

мина ASCT2 и глутаминазы (GLS1) также регулируется сигналами *pRb–E2F1* (Reynolds et al., 2014).

Клеточный ответ на повреждение ДНК. Ответ клетки на повреждение ДНК включает репарацию ДНК, гомологичную рекомбинацию (HR), и соединение негомологичных концов ДНК (NHEJ). Репарация ДНК регулируется *pRb–E2F1* путем влияния на экспрессию генов, кодирующих факторы репарации MSH2, BRCA1, PCNA (Polager et al., 2002). В контексте регуляции негомологичной рекомбинации *pRb* взаимодействует с белками Ku70, Ku80, что необходимо для привлечения модификаторов хроматина (Cook et al., 2015). При HR вслед за двухнитевыми разрывами ДНК происходит фосфорилирование E2F1 киназами ATM/ATR с последующим привлечением к месту повреждения ДНК *pRb* и BRG1, инициирующего резекцию концов ДНК и последующую репарацию (Velez-Cruz et al., 2016).

Проницаемость мембраны митохондрий и митохондриальный апоптоз. В нормальных условиях *pRb* опосредует индуцированный TNF α апоптоз в митохондриях. В ходе возникновения апоптоза TNF α индуцирует образование каспазы 8, которая вызывает протеолиз *pRb* в С-концевом домене, что необходимо для активации последующего каспазного каскада (рис. 3a) (Hilgendorf et al., 2013). Мутация *Rb* в сайте протеолиза или взаимодействие его продукта с β -катенином вызывает устойчивость *pRb* к действию каспазы 8 и тормозит апоптоз (рис. 3б) (Han et al., 2013). Кроме того, *pRb* физически взаимодействует с белком Вах в мембране митохондрий, что увеличивает ее проницаемость, способствуя апоптозу (Wang et al., 2017).

Роль сигнального пути *pRb–E2F1–AR* в формировании и функционировании эпителия предстательной железы. Предстательная железа представляет собой небольшой вспомогательный орган в мужской репродуктивной системе, который показывает самую высокую чувствительность к онкогенной трансформации среди других органов у мужчин. РПЖ диагностируется в течение жизни у каждого восьмого лица мужского пола. В настоящее время заболеваемость и смертность от РПЖ занимают лидирующие позиции среди всех онкологических заболеваний: в западных странах и в США в 2021 г. они достигли соответственно 26 и 11% от всех опухолевых болезней у мужчин (Siegel et al., 2021).

Предстательная железа формируется и функционирует в эмбриональной жизни и после рождения путем взаимодействия мезенхимных и эпителиальных клеток, экспрессирующих андрогенный рецептор (AR) (Sunha, 1994). Предстательная железа возникает из эпителиальных клеток, продуцирующих AR, который также является критическим фактором возникновения, прогрессии РПЖ и эффективности его терапии (Balk, Knudsen, 2008). Удаление AR в начале применения противоопухолевой терапии является эффективным, но неизбежно сопро-

вождается рецидивом опухоли вследствие неконтролируемого восстановления сигнального пути AR (Feldman, Feldman, 2001). AR способствует делению клетки путем индукции экспрессии циклина D1, образования активной киназы циклин D/Cdk4,6 и последующего гиперфосфорилирования (инактивации) pRb (Xu et al., 2006). В начале фазы G₁ pRb находится в гипофосфорилированном активном состоянии и индуцирует остановку клеточного цикла в рестрикционной точке R1 перед началом репликации путем связывания и секвестрирования активаторных транскрипционных факторов E2Fs, включая E2F1 (рис. 2). Фосфорилирование pRb киназами циклин D/Cdk4,6 и циклин E/Cdk2 в результате активации сигнального пути AR освобождает связанные E2Fs, которые способствуют последовательному формированию различных киназ циклин/Cdks и делению клетки (Dyson, 1988). Утрата RB играет ключевую роль в патогенезе и снижении эффективности медикаментозного лечения РПЖ, направленного на модуляцию сигнального пути AR. Прогрессирование РПЖ включает две отдельные стадии: локализованный РПЖ и КР-РПЖ. В первой стадии болезнь может протекать неопределенно долго в дремлющей форме, не угрожающей жизни, или внезапно трансформироваться в агрессивный КР-РПЖ, сопровождающийся быстрым летальным исходом.

Локализованный РПЖ. Прогностические маркеры, свидетельствующие о трансформации локализованного РПЖ в КР-РПЖ не найдены. Опубликованные данные дают возможность предположить, что клинически локализованный РПЖ, при котором повышается уровень белка Ezh2, характеризуется плохим прогнозом (Varambally et al., 2002). В нормальных тканях продукция Ezh2 тормозится сигнальным путем pRb–E2F1, инактивация pRb в эксперименте и клинике повышает уровень Ezh2 (Brasken, Helin, 2009). Подобный механизм лежит также в основе активации сети плюрипотентности в дифференцированных клетках и трансдифференцировки люминального эпителия предстательной железы в нейроэпителий (рис. 3) (Kareta et al., 2015). Оценка внутриклеточного уровня pRb показывает, что утрата гена RB может быть причиной перехода локализованного РПЖ во вторую стадию болезни, а также доминировать в ходе КР-РПЖ, однако уровень белка не снижается в первой стадии при локализованном РПЖ (Sharma et al., 2010). Экспериментальное удаление RB ведет к повышению уровня E2F1, обогащению его связывания с промотором AR, повышению продукции AR. Потеря RB изменяет рекрутирование партнерских белков к AR в нелигированном и лигированном состояниях, отменяет транскрипционный ответ AR к андрогенам (Sharma et al., 2010).

КР-РПЖ. В начальной стадии развития рака клетки различных опухолей сохраняют функциональный pRb, чтобы получить конкурентные преимущества для роста и деления. Потеря RB сопровождается индукцией аутофагии путем накопления

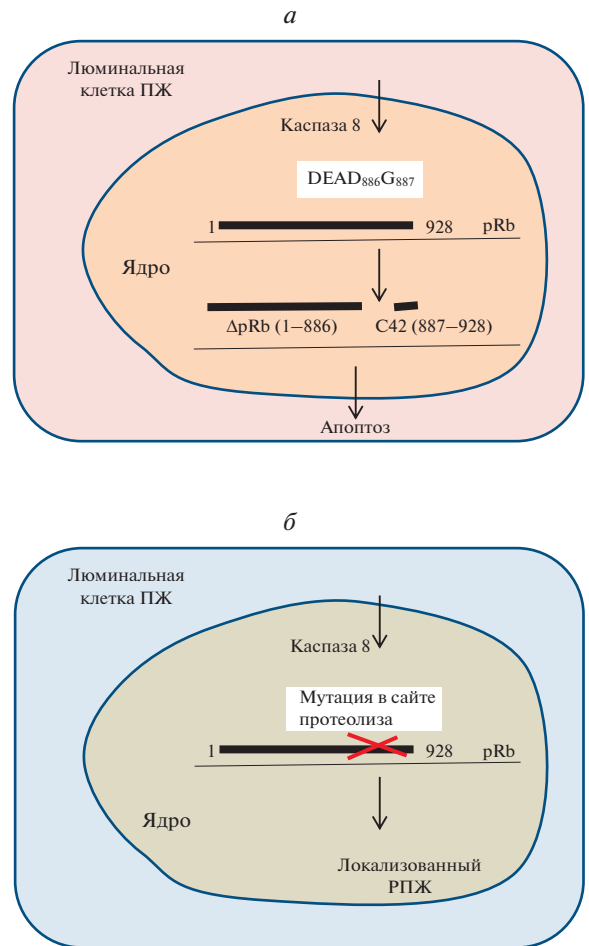


Рис. 3. Схематическое изображение роли pRb в торможении индуцированного TNF α митохондриального апоптоза при локализованном РПЖ. *а* – в нормальных условиях в ходе апоптоза, индуцированного TNF α , фактор pRb протеолизуется в митохондриях под действием каспазы 8 с образованием двух фрагментов, что необходимо для последующего каспазного каскада; *б* – при локализованном РПЖ pRb может приобретать устойчивость к действию каспазы 8 в результате мутации или взаимодействия с β -катенином. DEAD₈₈₆–C₈₈₇ – сайт pRb, в котором в нормальных условиях происходит его протеолиз каспазой 8 при апоптозе, индуцированном TNF α ; Δ pRb (1–886), C42 (887–928) – фрагменты pRb, образующиеся при его протеолизе каспазой 8.

реактивных молекул кислорода, активацией апоптоза транскрипционным фактором E2F1 в условиях потери супрессорного влияния на него pRb. В нормальных условиях TNF α вызывает в митохондриях синтез каспазы 8, протеолизирующей pRb, что необходимо для активации последующего каспазного каскада (рис. 3) (Hilgendorf et al., 2013). В некоторых типах рака толстого кишечника locus RB амплифицируется, и его продукт предотвращает опосредованное E2F1 транскрипционное торможение синтеза β -катенина, а также участвует в формировании комплекса pRb/ β -катенин, в котором pRb становит-

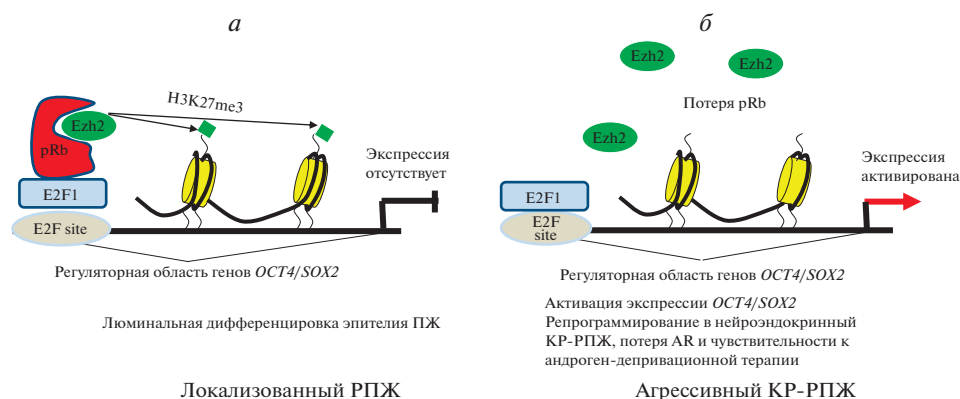


Рис. 4. Комплекс pRb/E2F1/Ezh2 тормозит экспрессию генов плюрипотентности в дифференцированных клетках эпителия предстательной железы (ПЖ). *а* – В нормальных условиях и при локализованном РПЖ экспрессия генов *OCT4* и *SOX2* тормозится комплексом pRb/E2F1/Ezh2, который триметирует сайт H3K27, вызывающий сайленсинг этих генов; *б* – потеря pRb нарушает образование комплексов pRb/E2F1/Ezh2 на промоторах *OCT4* и *SOX2* в клетках эпителия ПЖ, что сопровождается активацией их экспрессии, репрограммированием в нейроэпителий и формированием НЭ-РПЖ. *OCT4*, *SOX2* – гены сети плюрипотентности, остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

ся нечувствительным к протеолизу, вызываемому каспазой 8, и, таким образом, тормозит митохондриальный апоптоз, способствуя росту опухоли (Viataour, Sage, 2011; Han et al., 2013). Продукция pRb позволяет клеткам опухоли легких, молочной и поджелудочной желез приобретать резистентность к химиотерапии, *RB* подвергается мутациям менее чем в 1% случаев локализованного РПЖ, что свидетельствует о его способности поддерживать рост опухоли в этой стадии (Knudsen, Knudsen, 2008).

Андроген-депривационная терапия неизбежно способствует переходу локализованного РПЖ в стадию КР-РПЖ (Knudsen, Scher, 2009). Утрата *RB* является в 17–33% КР-РПЖ, в этих случаях в клетках полностью отменяется функция pRb в противоположность другим опухолям, в клетках которых активность pRb ослабляется путем фосфорилирования комплексов циклин D/Cdk4,6 (Mandigo et al., 2021). Утрата *RB* при КР-РПЖ ведет к нарушению сигнального пути pRb–E2F1, повышению способности E2F1 связывать хроматин и расширению цистрома E2F1. Новые связывающие сайты E2F1 локализируются в промоторных, внутригенных и дистальных межгенных областях (McNaig et al., 2018). Расширение области связывания E2F1 происходит вследствие увеличения числа связывающих его сайтов с низким аффинитетом и последующей экспрессии генов, активирующих автономное деление клеток опухоли. Потеря *RB* может вызывать формирование КР-РПЖ с нейроэндокринным фенотипом (НЭ-РПЖ), который возникает в 10–20% случаев КР-РПЖ (Vlachostergios et al., 2017). При НЭ-РПЖ клетки не продуцируют AR и его мишень – простатспецифический антиген. С механистической точки зрения возникновение такого фенотипа может быть следствием активации сигнального пути pRb–E2F1–Ezh2 и сети плюрипотентности (рис. 4). Идентифика-

ция специфических генов, нарушение регуляции которых происходит при потере *RB* и КР-РПЖ может обеспечить понимание патогенеза и разработку новых подходов для лечения этой смертельной в настоящее время болезни.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ген *RB*, определяющий чувствительность к возникновению опухоли сетчатки глаз у детей (ретинобластомы), был первым идентифицированным опухолевым супрессором. Изучение *RB* показало, что он вносит существенный вклад в регуляцию основных клеточных функций. Мутации, потеря *RB*, инактивация его продукта pRb играют патогенетическую роль в возникновении и развитии каждой опухоли. pRb влияет на транскрипцию множества генов путем физического взаимодействия более чем с 200 регуляторными белками. Основным партнером pRb является транскрипционный фактор E2F1, имеющий сайты связывания в промоторных областях множества генов. Сигнальный путь pRb–E2F1 регулирует продукцию AR, под влиянием которого происходит формирование, развитие и функционирование предстательной железы. Нарушение передачи сигналов pRb–E2F1 являются причиной возникновения и прогрессирования РПЖ, который в настоящее время занимает лидирующие позиции по заболеваемости и смертности от всех онкологических заболеваний у мужчин в западных странах. В своем развитии РПЖ проходит две стадии: локализованный РПЖ, который может неопределенно долго находиться в дремлющей форме, не угрожающей жизни пациента, и КР-РПЖ, неизбежно и быстро приводящий к смерти больного. Одной из причин перехода локализованного РПЖ в КР-РПЖ является применение андроген-депривационной терапии, которая вначале эффективно тормозит передачу

сигналов pRb–E2F1–AR, но неизбежно приводит к реактивации сигнального пути AR по коллатеральным путям. При локализованном РПЖ, клетки опухоли используют активность pRb для создания ростовых преимуществ по сравнению с нормальными клетками, в частности путем его участия в торможении передачи сигналов, необходимых для активации митохондриального апоптоза. Полная утрата функций pRb может быть причиной развития КР-РПЖ. В таких случаях происходит расширение цистрома транскрипционного фактора E2F1, который активирует экспрессию множества генов, способствующих автономному росту опухоли. Идентификация таких генов для разработки эффективной противоопухолевой терапии является приоритетной задачей в лечении КР-РПЖ.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках бюджетного финансирования Института цитологии РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В работе не участвовали животные или люди в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Понов Б.В. 2019. Семейство POLYCOMB: стволовые, опухолевые стволовые клетки и рак предстательной железы. Цитология Т. 61. С. 769. (Popov B.V. 2019. POLYCOMB family: stem cells, cancer stem cells and prostate cancer. Tsitologiya. V. 61. P. 769).
- Anderson M.M., Chen J., Cole C.N., Conrad S.E. 1996. Activation of the human thymidine kinase (TK) promoter by simian virus 40 large T antigen requires both the T antigen pRb family-binding domain and TK promoter sequences resembling E2F-binding sites. J. Virol. V. 70. P. 6304.
- Avni D., Yang H., Martelli F., Hofmann F., ElShamy W.M., Ganesan S., Scully R., Livingston D.M. 2008. Active localization of the retinoblastoma protein in chromatin and its response to S phase DNA damage. Mol. Cell. V. 12. P. 735.
- Balk S.P., Knudsen K.E. 2008. AR, the cell cycle, and prostate cancer. Nucl. Recept. Signal. V. 6. P. e001. <https://doi.org/10.1621/nrs.06001>
- Baryshev M., Petrov N., Ryabov V., Popov B. 2020. Transient expression of inactive RB in mesenchymal stem cells impairs their adipogenic potential and is associated with hypermethylation of the PPAR γ 2 promoter. Genes Dis. V. 7. P. 165.
- Blanchet E., Annicotte J.S., Lagarrigue S., Aguilar V., Clapé C., Chavey C., Fritz V., Casas F., Apparailly F., Auwerx J., Fajas L. 2011. E2F transcription factor-1 regulates oxidative metabolism. Nat. Cell Biol. V. 13. P. 1146.
- Bracken A.P., Helin K. 2009. Polycomb group proteins: navigators of lineage pathways in cancer. Nat. Rev. Cancer. V. 9. P. 773.
- Cook R., Zoumpoulidou G., Luczynski M.T., Rieger S., Moquet J., Spanswick V.J., Hartley J.A., Rothkamm K., Huang P.H., Mittnacht S. 2015. Direct involvement of retinoblastoma family proteins in DNA repair by non-homologous end-joining. Cell Rep. V. 10. P. 2006.
- Cunha G.R. 1994. Role of mesenchymal-epithelial interactions in normal and abnormal development of the mammary gland and prostate. Cancer. V. 74. P. 1030.
- Dick F.A., Goodrich D.W., Sage J., Dyson N.J. 2018. Non-canonical functions of the RB protein in cancer. Nat. Rev. Cancer. V. 18. P. 442.
- Dali-Youcef N., Matakis C., Coste A., Messaddeq N., Giroud S., Blanc S., Koehl C., Champy M.F., Chambon P., Fajas L., Metzger D., Schoonjans K., Auwerx J. 2007. Adipose tissue-specific inactivation of the retinoblastoma protein protects against diabetes because of increased energy expenditure. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 104. P. 10703.
- Dyson N. 1998. The regulation of E2F by pRB-family proteins. Genes Dev. V. 12. P. 2245.
- Feldman B.J., Feldman D. 2001. The development of androgen-independent prostate cancer. Nat. Rev. Cancer. V. 1. P. 34.
- Friend S.H., Bernards R., Rogelj S., Weinberg R.A., Rapaport J.M., Albert D.M., Dryja T.P. 1986. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. Nature. V. 323. P. 643.
- Han J., Soletti R.C., Sadarangani A., Sridevi P., Ramirez M.E., Eckmann L., Borges H.L., Wang J.Y. 2013. Nuclear expression of β -catenin promotes RB stability and resistance to TNF-induced apoptosis in colon cancer cells. Mol. Cancer Res. V. 11. P. 207.
- Hilgendorf K.I., Leshchiner E.S., Nedelcu S., Maynard M.A., Calo E., Ianari A., Walensky L.D., Lees J.A. 2013. The retinoblastoma protein induces apoptosis directly at the mitochondria. Genes Dev. V. 27. P. 1003.
- Hsieh M.C.F., Das D., Sambandam N., Zhang M.Q., Nahlé Z. 2008. Regulation of the PDK4 isozyme by the Rb-E2F1 complex. J. Biol. Chem. V. 283. P. 27410.
- Ishak C.A., Marshall A.E., Passos D.T., White C.R., Kim S.J., Cecchini M.J., Ferwati S., MacDonald W.A., Howlett C.J., Welch I.D., Rubin S.M., Mann M.R.W., Dick F.A. 2016. An RB-EZH2 Complex mediates silencing of repetitive DNA sequences. Mol. Cell. V. 4. P. 1074.
- Jensen D.E., Black A.R., Swick A.G., Azizkhan J.C. 1997. Distinct roles for Sp1 and E2F sites in the growth/cell cycle regulation of the DHFR promoter. J. Cell Biochem. V. 67. P. 24.
- Kareta M.S., Gorges L.L., Hafeez S., Benayoun B.A., Marro S., Zmoos A.F., Cecchini M.J., Spacek D., Batista L.F., O'Brien M., Ng Y.H., Ang C.E., Vaka D., Artandi S.E., Dick F.A. et al. 2015. Inhibition of pluripotency networks by the Rb tumor suppressor restricts reprogramming and tumorigenesis. Cell Stem Cell. V. 16. P. 39.
- Knudson A.G. Jr. 1971. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 68. P. 820.
- Knudsen E.S., Knudsen K.E. 2008. Tailoring to RB: tumour suppressor status and therapeutic response. Nat. Rev. Cancer. V. 8. P. 714.
- Knudsen K.E., Scher H.I. 2009. Starving the addiction: New opportunities for durable suppression of AR signaling in prostate cancer. Clin. Cancer Res. V. 15. P. 4792.
- Lee W.H., Bookstein R., Hong F., Young L.J., Shew J.Y., Lee E.Y. 1987. Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence. Science. V. 235. P. 1394.

- Mandigo A.C., Tomlins S.A., Kelly W.K., Knudsen K.E.* 2021. Relevance of pRB Loss in Human Malignancies. *Clin. Cancer Res.* V. 28. P. 255.
- McNair C., Xu K., Mandigo A.C., Benelli M., Leiby B., Rodrigues D., Lindberg J., Gronberg H., Crespo M., De Laere B., Dirix L., Visakorpi T., Li F., Feng F.Y., de Bono J., Demichelis F., Rubin M.A., Brown M., Knudsen K.E.* 2018. Differential impact of RB status on E2F1 reprogramming in human cancer. *J. Clin. Invest.* V. 128. P. 341.
- Piunti A., Shilatifard A.* 2016. Epigenetic balance of gene expression by Polycomb and COMPASS families. *Science.* V. 352. P. aad9780.
- Polager S., Kalma Y., Berkovich E., Ginsberg D.* 2002. E2Fs up-regulate expression of genes involved in DNA replication, DNA repair and mitosis. *Oncogene.* V. 21. P. 437.
- Popov B., Petrov N., Ryabov V., Evsyukov I.* 2020. p130 And pRb in the maintenance of transient quiescence of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Int.* <https://doi.org/10.1155/2020/8883436>
- Reynolds M.R., Lane A.N., Robertson B., Kemp S., Liu Y., Hill B.G., Dean D.C., Clem B.F.* 2014. Control of glutamine metabolism by the tumor suppressor Rb. *Oncogene.* V. 33. P. 556.
- Sage J.* 2012. The retinoblastoma tumor suppressor and stem cell biology. *Genes Dev.* V. 26. P. 1409.
- Sharma A., Yeow W.S., Ertel A., Coleman I., Clegg N., Thangavel C., Morrissey C., Zhang X., Comstock C.E., Witkiewicz A.K., Gomella L., Knudsen E.S., Nelson P.S., Knudsen K.E.* 2010. The retinoblastoma tumor suppressor controls androgen signaling and human prostate cancer progression. *J. Clin. Invest.* V. 120. P. 4478.
- Siegel R.L., Miller K.D., Fuchs H.E., Jemal A.* 2021. *Cancer Statistics, 2021.* *CA Cancer J. Clin.* V. 71. P. 7.
- Sherr C.J.* 1996. Cancer cell cycles. *Science.* V. 274. P. 1672.
- Varambally S., Dhanasekaran S.M., Zhou M., Barrette T.R., Kumar-Sinha C., Sanda M.G., Ghosh D., Pienta K.J., Sewalt R.G., Otte A.P., Rubin M.A., Chinnaiyan A.M.* 2002. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature.* V. 419. P. 624.
- Vélez-Cruz R., Manickavinayam S., Biswas A.K., Clary R.W., Premkumar T., Cole F., Johnson D.G.* 2016. RB localizes to DNA double-strand breaks and promotes DNA end resection and homologous recombination through the recruitment of BRG1. *Genes Dev.* V. 30. P. 2500.
- Viatour P., Sage J.* 2011. Newly identified aspects of tumor suppression by RB. *Dis. Model Mech.* V. 4. P. 581.
- Vlachostergios P.J., Puca L., Beltran H.* 2017. Emerging variants of castration-resistant prostate cancer. *Curr. Oncol. Rep.* V. 19. P. 32.
- Wang C.Y., Xu Z.B., Wang J.P., Jiao Y., Zhang B.* 2017. Rb deficiency accelerates progression of carcinoma of the urinary bladder in vivo and in vitro through inhibiting autophagy and apoptosis. *Int. J. Oncol.* V. 50. P. 1221.
- Weinberg R.A.* 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell.* V. 81. P. 323.
- Xu Y., Chen S.Y., Ross K.N., Balk S.P.* 2006. Androgens induce prostate cancer cell proliferation through mammalian target of rapamycin activation and post-transcriptional increases in cyclin D proteins. *Cancer Res.* V. 66. P. 7783.

Role of the Tumor Suppressor *RB* in Development of Localized and Castration-Resistant Prostate Cancer

V. M. Ryabov^a, M. A. Voskresenskiy^b, and B. V. Popov^{a,*}

^a*Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064 Russia*

^b*Second City Hospital, Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, 194354 Russia*

**e-mail: borisvp478@gmail.com*

Prostate cancer (PC) currently occupies leading positions in morbidity and mortality among all oncogenic diseases of men in west countries. PC occurs in the form of adenocarcinoma (localized PC), which may exist uncertainly long time in dormant non-life-threatening patient form or transform into an aggressive cancer that is insensitive to androgen deprivation therapy, castration-resistant prostate cancer (CRPC), with metastasis and a rapidly fatal outcome. PC arises from the epithelium of the prostate gland, the formation and functioning of which occurs under action of androgens. Androgens, mainly dihydrotestosterone, induce the androgen receptor signaling pathway and regulate the growth and division of the prostate epithelium under normal conditions and in the cells of localized PC. Androgen deprivation therapy, such as androgen receptor inhibitors, blocks the development of localized PC within 1.5–2 years, but then loses its effectiveness that inevitably leads to transition of the disease into an aggressive and lethal CRPC. Inactivation of the tumor suppressor *RB* due to mutations, gene loss or post-translational modification of its product results in the development of cancer of any tissue specificity. However, assessment of the status of *RB* and its product shows that *RB* gene is altered in less than 1% of patients with localized PC, but its loss occurs in 17–33% of patients with CRPC. This review of the literature considers the role of the pRb–E2F1 signaling pathway in the pathogenesis of localized and castration-resistant PC.

Keywords: tumor suppressor *RB*, *RB* product (pRb), methyltransferase Ezh2, signal pathway pRb–E2F1–Ezh2, androgen receptor (AR), androgen-deprivation therapy, localized prostate cancer (PC), castration-resistant prostate cancer (CRPC), neuroendocrine prostate cancer (NEPC)

УДК 57.085.23

ПОИСК НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ, СПЕЦИФИЧЕСКИ ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИХ С ПРОКАСПАЗОЙ-8 В СИГНАЛЬНОМ КОМПЛЕКСЕ DISC

© 2022 г. Й. Эспе¹, Н. В. Иванисенко², Л. К. Хиллерт-Рихтер¹, В. А. Иванисенко², И. Н. Лаврик^{1, 2, *}¹ Отдел прикладных исследований воспаления Медицинского факультета Центра динамических систем Университета Отто фон Герике, Магдебург, Германия² Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, 630090 Россия

*E-mail: inna.lavrik@med.ovgu.de

Поступила в редакцию 25.02.2022 г.

После доработки 09.03.2022 г.

Принята к публикации 09.03.2022 г.

Рационально сконструированные низкомолекулярные химические соединения широко применяются для исследования молекулярных механизмов активации сигнальных путей. Активация внешнего пути апоптоза через рецепторы CD95/Fas или TRAIL-R1/2 инициируется образованием сигнального комплекса, индуцирующего гибель (DISC). Активация прокаспазы-8 в комплексе DISC является центральным событием, запускающим внешний путь апоптоза. Активация прокаспазы-8 происходит при ее димеризации в филаментах, образованных эффекторными доменами смерти (DED) данного белка. Образование DED филаментов происходит в составе комплекса DISC. В связи с этим, направленное воздействие на филаменты DED может позволить как выявить тонкие молекулярные механизмы активации комплекса DISC, так и осуществлять фармакологическое воздействие на внешний путь апоптоза. В настоящей работе мы разработали ряд низкомолекулярных химических соединений, с помощью скрининга *in silico* для направленного воздействия на прокаспазу-8 в составе филаментов DED. Далее мы осуществили экспериментальную проверку активности данных соединений и отобрали соединения, обладающие наибольшей эффективностью. Представленная работа описывает разработку новых химических соединений, которые предназначены для направленного воздействия на прокаспазу-8 и внешний путь апоптоза.

Ключевые слова: апоптоз, прокаспазы-8, активация каспазы, малые молекулы, DED, комплекс DISC, DR

DOI: 10.31857/S0041377122030026

Апоптоз – это программа клеточной гибели, необходимая для функционирования всех многоклеточных организмов. Апоптотический сигнал может быть вызван множеством факторов, включая активацию рецепторов смерти (DR) (Krammer et al., 2007). Апоптотический сигнальный каскад DR или внешний путь апоптоза запускается активацией соответствующих DR, таких как CD95/Fas или TRAIL-R1/2 (DR4/DR5). Связывание комплементарного лиганда смерти (DL) приводит к образованию сигнального комплекса, индуцирующего смерть (DISC) (Muzio et al., 1996; Sprick et al., 2000; Lavrik, Krammer, 2012). Комплекс DISC состоит из DR, а также белков FADD, прокаспаз-8, -10 и c-FLIP. Этот комплекс

служит центральной платформой для активации прокаспазы-8, которая инициирует последующий апоптотический ответ (Sprick et al., 2002; Hughes et al., 2009). Образование комплекса DISC основано на строго определенных взаимодействиях между доменами смерти (DD) и эффекторными доменами смерти (DED) его основных компонентов (Wilson et al., 2009). Более того, недавно было показано, что прокаспазы-8 образует в комплексе DISC филаменты DED посредством взаимодействий между ее DED доменами. Филаменты DED служат платформой для димеризации и последующей активации прокаспазы-8 (Dickens et al., 2012; Schleich et al., 2012; Fu et al., 2016).

Сообщалось, что в комплексе DISC присутствуют две изоформы прокаспазы-8: прокаспазы-8a и -8b (p55 и p53 соответственно) (Medema et al., 1997). Обе изоформы содержат в их N-концевом продомене два домена DED – DED1 и DED2, за которыми следуют каталитические домены p18 и p10 (рис. 1a). Анализ, выполненный с помощью криоэлектронной микро-

Принятые сокращения: Casp8in – ингибиторы каспазы-8; DD – домен смерти (death domain), DED – эффекторный домен смерти (death effector domain); DISC – сигнальный комплекс, индуцирующий смерть (death-inducing signaling complex); DL – лиганд смерти (death ligand); DR – рецептор смерти (death receptor); HeLa-CD95 – клетки HeLa, сверхэкспрессирующие CD95; Jurkat-C8-KO – клетки Jurkat, лишённые (с нокаутом) каспазы-8; SP – стандартная точность; XP – сверхточность.

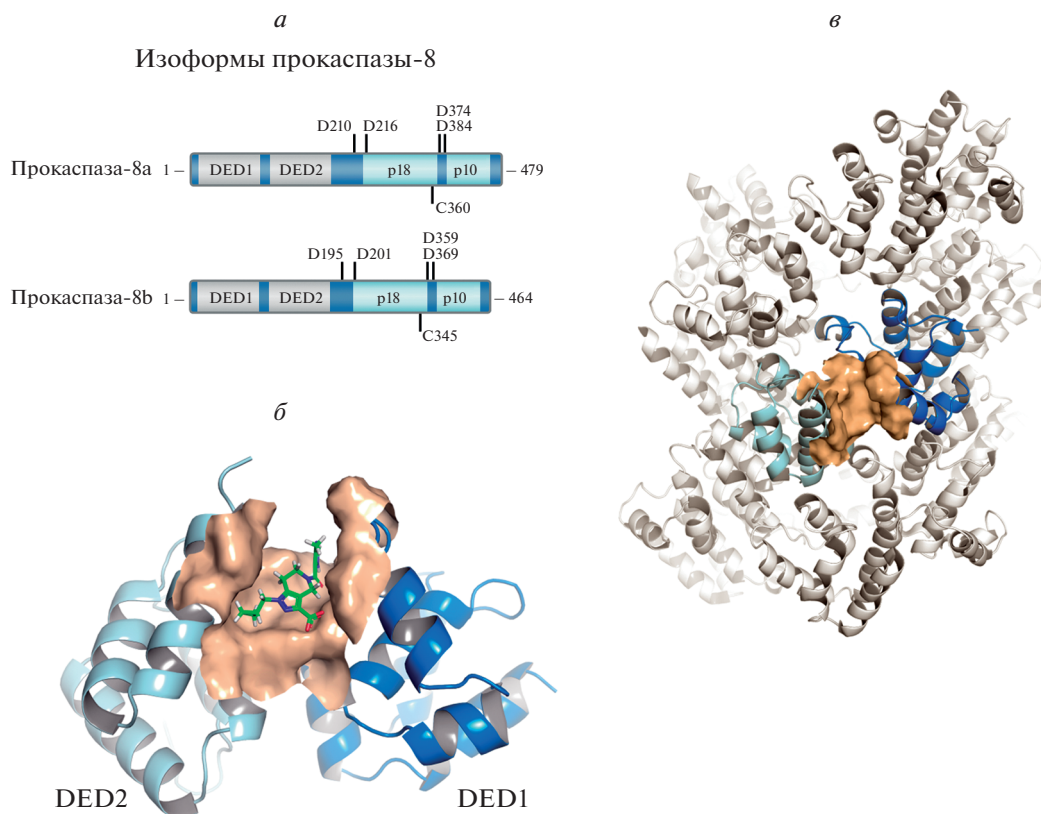


Рис. 1. Потенциальный сайт связывания малых молекул в продомене прокаспазы-8. *а* – Основные изоформы и доменная организация прокаспазы-8. *б* – *In silico* модель положения связывания низкомолекулярного химического соединения (зеленый цвет) с сайтом прокаспазы-8 (PDB: ID 4ZBW), локализованным между DED1 и DED2. Домен DED1 показан *темно-синим цветом*, DED2 – *голубым*. Молекулярная поверхность предполагаемого сайта связывания показана *коричневым цветом*. *в* – Структура филамента DED прокаспазы-8 (PDB: ID 5L08); одна из субъединиц прокаспазы-8 филамента DED окрашена, а предполагаемый сайт связывания показан в виде молекулярной поверхности *светло-коричневого цвета*.

скопии показал, что DED прокаспазы-8 собираются в упорядоченные структуры, которые были названы филаментами DED (Fu et al., 2016). Филамент DED формируется за счет трех типов взаимодействия между DED, которые классифицируются как тип I, II и III (Fu et al., 2016; Hillert et al., 2020a, 2020b). Структура DED доменов естественным образом приводит к образованию филаментов. В частности, каждый DED включает шесть интерфейсов – Ia/b, IIa/b и IIIa/b, – которые обладают способностью связываться друг с другом (Fu et al., 2016; Seyrek et al., 2020). Взаимодействия типа I опосредованы взаимодействиями интерфейсов Ia и Ib между соседними DED, которые в значительной степени опосредованы высококонсервативными остатками мотива “FL” (Phe/Leu) (Dickens et al., 2012). Взаимодействия типа I необходимы для сборки так называемых линейных цепей DED, которые, в свою очередь, представляют собой субструктуру филамента DED. Примечательно, что линейные цепи прокаспазы-8 сначала были предложены как платформа для димеризации и последующей активации прокаспазы-8 в комплексе DISC, но, как выяснилось позже, цепи DED являются

лишь субструктурой филамента DED (Dickens et al., 2012; Schleich et al., 2012; Fu et al., 2016).

В процессе димеризации, который происходит в составе филамента DED, прокаспазы-8a/b претерпевает конформационные изменения, приводящие к образованию активного центра и активации этого зимогена (Hughes et al., 2009; Dickens et al., 2012). Затем следует расщепление прокаспазы-8a/b по остаткам Asp374/Asp359, что приводит к образованию продуктов расщепления r43/p41 и r12, которые далее подвергаются автокаталитическому процессингу посредством протеолиза по остаткам Asp384 и Asp210/216; это, в свою очередь, приводит к образованию активного гетеротетрамера каспазы-8 r10₂/p18₂ (Lavrik et al., 2003; Golks et al., 2006; Hoffmann et al., 2009). Кроме того, было показано, что параллельно с процессингом по остаткам Asp374/Asp359 небольшое количество прокаспазы-8a/b также расщепляется по Asp216, что приводит к образованию продукта расщепления r30, который включает C-концевую часть прокаспазы-8a/b (Hoffmann et al., 2009). Однако роль образования протеолитического фрагмента r30 еще предстоит выяснить.

Фармакологическое адресное воздействие на DED-домены прокаспазы-8 может позволить более детально понять молекулярные механизмы активации внешнего пути апоптоза и разработать новые терапевтические подходы для лечения заболеваний, молекулярный механизм которых затрагивает нарушение данного сигнального пути (Vucur et al., 2015; Hillert et al., 2020). Наличие недавно расшифрованной пространственной структуры филаментов DED (Yu et al., 2009; Wang et al., 2010; Fu et al., 2016) делает возможным осуществление виртуального скрининга низкомолекулярных химических соединений, специфически взаимодействующих с данным молекулярным комплексом.

Настоящая работа посвящена компьютерному дизайну группы низкомолекулярных химических соединений Casp8ins (ингибиторы каспазы-8), предназначенных для ингибирования сборки филаментов DED за счет адресного взаимодействия с DED-доменами прокаспазы-8, и дальнейшей экспериментальной проверки их активности. Экспериментальную проверку способности полученных малых химических соединений ингибировать индукцию внешнего пути апоптоза проводили в культуре клеток при комбинированном действии соединений с DL. Полученные результаты показывают возможность создания с помощью структурно-ориентированного дизайна малых химических соединений, адресно воздействующих на прокаспазу-8 в составе филаментов DED, и представляют первоначальный анализ соединений этого типа.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Виртуальный скрининг. Молекулярный докинг и виртуальный скрининг проводили с использованием программы Glide пакета Schrödinger Small Molecule Drug Discovery Suite 2015-1 (Schrödinger, Inc) (Friesner et al., 2004, 2006; Halgren et al., 2004). Молекулярный докинг осуществляли в режимах стандартной точности (SP) и экстраточности (XP) с использованием пространственной структуры продомена прокаспазы-8, включающей DED1 и DED2 (Shen et al., 2015; PDB ID: 4ZBW). Перед проведением виртуального скрининга структура белка подверглась подготовительной обработке с использованием модуля “Protein preparation wizard” пакета Schrödinger Suite 2015-1 (Irwin, et al., 2012; Sterling et al., 2015). В расчетах применяли силовое поле OPLS_2005. Виртуальный скрининг выполняли с использованием библиотеки лидер-подобных коммерчески доступных соединений ZINC12, которая содержала структуры более 3.6 млн коммерчески доступных малых молекул (Irwin et al., 2012). Первый этап виртуального скрининга осуществляли в режиме стандартной точности (оценочная функция SP Score). На данном этапе было отобрано около 100 тыс. соединений с лучшими значениями оценочной функции SP Score программы Glide. Второй

этап виртуального скрининга проводили в режиме экстраточности с использованием оценочной функции XP Score. В результате этого этапа было отобрано 5000 соединений с лучшими значениями оценочной функции. На третьем этапе полученные соединения подвергали дальнейшему анализу — так называемой визуальной инспекции положения связывания лиганда с рецептором — для выбора соединений с учетом их структурных и физико-химических особенностей. Соединения, отобранные в результате применения всех трех шагов виртуального скрининга приведены на рис. 1а.

Клеточные линии. В работе использовали клеточную линию карциномы шейки матки человека HeLa, стабильно сверхэкспрессирующую CD95 (клетки HeLa-CD95) (Neumann et al., 2010). Клетки культивировали в среде DMEM/HAM F-12 (Merck Millipore, Германия), содержащей 10% термоинактивированной фетальной телячьей сыворотки, 1% смеси пенициллина со стрептомицином (1 : 1) и 0.0001% пуромидина в атмосфере 5% CO₂.

Кроме того, использовали клетки линий Jurkat 282 (ACC 282) Т-лейкоза человека и Jurkat, дефицитные по каспазе-8 (Jurkat-C8-KO) (Juo et al., 1998). Клетки культивировали в среде RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific Inc., США), содержащей 10% фетальной сыворотки теленка, инактивированной нагреванием, и 1% смеси пенициллина и стрептомицина (1 : 1) в атмосфере 5% CO₂.

Клеточные линии были получены из коллекции клеточных линий г. Брауншвейга (Германия).

Количественная оценка жизнеспособности клеток с помощью анализа количества АТФ в клетках. В 96-луночные планшеты высевали 1.2×10^4 клеток HeLa-CD95 на 1 лунку за 1 сут до стимуляции, или 2×10^4 клеток Jurkat 282 или Jurkat-C8-KO на 1 лунку в день эксперимента. За 2 ч до стимуляции DL добавляли ингибиторы каспазы-8 и панкаспазный ингибитор zVAD-fmk (50 мкМ). В каждую лунку добавляли по 50 мкл раствора CellTiter-Glo. Измерения проводили в соответствии с инструкциями производителя (CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay, Promega, Германия). Интенсивность люминесценции анализировали с помощью микропланшетного ридера Infinite M200pro (Tecan, Швейцария). Измеренное количество АТФ необработанных клеток принимали за одну относительную единицу (отн. ед.). Каждое измерение выполняли как минимум дважды.

Статистический анализ. Для выполнения T-тестов (парных, параметрических, двусторонних) использовали программное обеспечение Graphpad Prism 8, для апостериорных тестов Даннета — ANOVA. Различия считали достоверными при: ** $p < 0.005$ и * $p < 0.05$; нд — недостоверно.

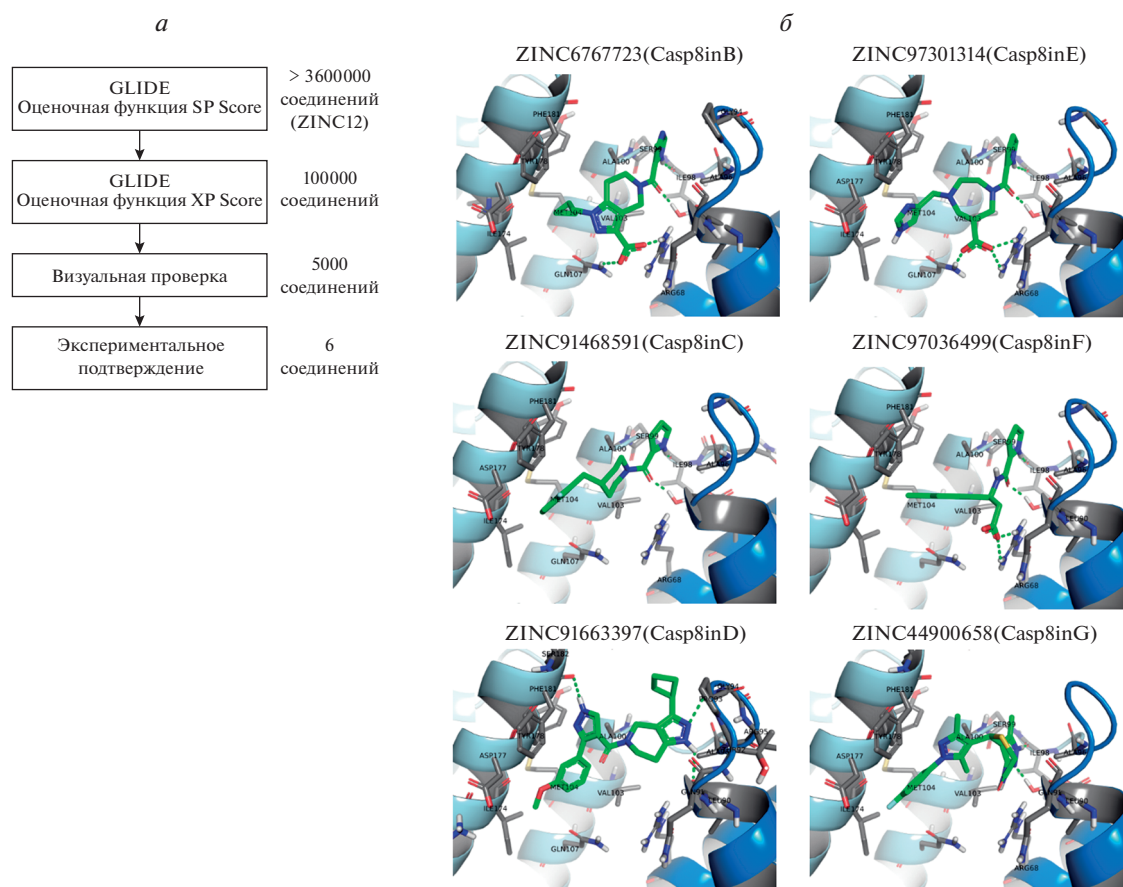


Рис. 2. Виртуальный скрининг библиотеки ZINC с использованием сайта, расположенного на линкере между доменами DED1 и DED2 прокаспазы-8. *a* – Схема виртуального скрининга, *б* – лиганды, выбранные для экспериментальной проверки. Обозначены идентификаторы ZINC и взаимодействующие остатки. Прокаспазы-8 DED1 показана *темно-синим* цветом, DED2 – *светло-синим*, а малая молекула – *зеленым*.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Виртуальный скрининг малых химических соединений, адресно-связывающихся с каспазой-8 (Casp8in). Известно, что N-концевой продомен прокаспазы-8 содержит два DED домена (DED1 и DED2) (рис. 1*a*). Мы предположили, что связывание низкомолекулярного химического соединения в районе линкерного участка между DED1 и DED2 доменами может нарушать правильную сборку филаментов DED и, как следствие, ингибировать активацию каспазы-8. Для проверки этой гипотезы было проведено комплексное компьютерно-экспериментальное исследование, включающее виртуальный скрининг малых химических соединений (Casp8inB–Casp8inG), способных адресно связываться с предполагаемым сайтом, расположенным в полости между DED1 и DED2 прокаспазы-8 (рис. 1*б, в*; рис. 2), и экспериментальное тестирование их биологической активности *in vitro* (рис. 3).

Детальный анализ пространственной структуры продомена прокаспазы-8, включающей DED1 и DED2 (Shen et al., 2015; PDB ID: 4ZBW), показал на-

личие потенциальной полости, подходящей для связывания малых химических соединений в области между DED1 и DED2 (рис. 2). В результате виртуального скрининга с использованием данного потенциального сайта связывания было отобрано шесть лучших соединений, которые мы назвали ингибиторами каспазы-8 (Casp8in).

Проверка активности соединений группы Casp8in с помощью CD95L-/TRAIL-опосредованного воздействия на клетки. Предполагаемый нами механизм биологической активности малых химических соединений Casp8in состоял в блокировании активации каспазы-8 в составе филаментов DED. Как ожидается, данная активность должна приводить к ингибированию DL-индуцированного апоптоза и восстановлению жизнеспособности клеток, обработанных препаратом Casp8in в комбинации с DL. Тестирование малых молекул проводили с учетом зависимости от времени действия и дозы соединения.

На первом этапе экспериментального исследования соединений Casp8in оценивали специфичность их влияния на жизнеспособность клеток, что пред-

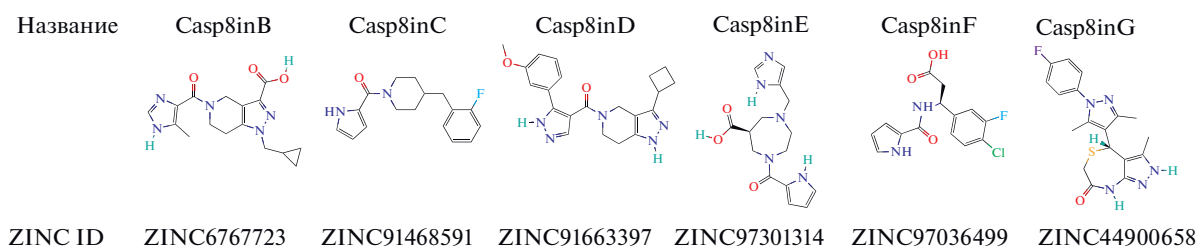


Рис. 3. Полученные низкомолекулярные химические соединений. Показана структура и указаны используемое название и идентификационный номер (ID) по базе данных ZINC.

ставляет собой один из необходимых тестов при анализе свойств соединений, полученных с помощью скрининга *in silico*. Для этого, в частности, оценивали жизнеспособность клеток Т-лейкемии Jurkat 282 при совместной обработке соединениями Casp8in и CD95L, а также Casp8in и TRAIL по сравнению с обработкой только CD95L и TRAIL (рис. 4, 5а, б). Оценка жизнеспособности клеток основывалась на измерении содержания клеточного АТФ с использованием тест-системы CellTiter-Glo (широко применяемый тест для определения жизнеспособности клеток). В качестве положительного контроля для проверки эффектов предполагаемых ингибиторов каспазы-8 мы использовали известный панкаспазный ингибитор zVAD-fmk в концентрации 50 мкМ.

В результате проведенных исследований было обнаружено, что стимуляция CD95L и TRAIL приводила к потере жизнеспособности клеток Jurkat 282. При этом оказалось, что 4 из шести тестируемых соединений (Casp8inB, Casp8inC, Casp8inD и Casp8inF) не оказывали сильного влияния на индуцированную DL потерю жизнеспособности клеток Jurkat 282 (рис. 4). Однако два соединения, Casp8inE и Casp8inG, продемонстрировали небольшую тенденцию к ингибированию TRAIL-индуцированной потери жизнеспособности клеток (рис. 5а, б). Более того, Casp8inE также уменьшал потерю жизнеспособности клеток после обработки CD95L (рис. 5а). На основании этих результатов соединения Casp8inE и Casp8inG были отобраны для проведения дальнейших экспериментальных исследований их свойств.

Для исключения неспецифического действия исследуемого соединения обычно в качестве контроля используется клеточная линия с делецией гена-мишени. Поскольку предполагаемыми мишенями действия изучаемых нами соединений является каспаза-8, то в качестве контроля были выбраны клетки Jurkat-C8-KO, в которых отсутствует каспаза-8. Известно, что в силу данной особенности эти клетки являются нечувствительными к CD95L- и TRAIL-опосредованной индукции апоптоза (Juo et al., 1998; Sprick et al., 2002). Результаты исследований по влиянию Casp8inE и Casp8inG на CD95L- или TRAIL-индуцированную потерю жизнеспособности клеток Jurkat-C8-KO показаны на рис. 5в, г. Как видно из рисунка, обработка клеток Jurkat-C8-KO соедине-

нием Casp8inE, как в случае применения только отдельно взятым соединением, так и в комбинации с DL, не оказало заметного влияния на их жизнеспособность. Этот результат свидетельствует об отсутствии неспецифических эффектов при действии Casp8inE.

Несколько иная картина наблюдалась при обработке клеток соединением Casp8inG. Применение данного соединения при высоких концентрациях (25 мкМ и выше) приводила к потере жизнеспособности клеток независимым от DL образом (рис. 5д). Цитотоксические эффекты Casp8inG при его высоких концентрациях также наблюдали на клетках Jurkat 282 (рис. 5е). Из полученных результатов следует, что Casp8inG оказывает цитотоксическое действие при высоких концентрациях в обоих тестируемых типах клеток Jurkat.

Для исключения эффектов, специфичных только к одному анализируемому типу клеток, мы дополнительно провели изучение свойств Casp8inE и Casp8inG с использованием клеток HeLa-CD95 (клетки HeLa, сверхэкспрессирующие CD95). Результаты по измерению эффекта Casp8inE и Casp8inG на CD95L- или TRAIL-индуцированную потерю жизнеспособности клеток HeLa-CD95 показаны на рис. 5д, е. Известно, что эта клеточная линия чувствительна к CD95L- и TRAIL-индуцированному апоптозу, а также есть данные по эффективному формированию в клетках комплекса DISC (Neumann et al., 2010; Hillert et al., 2020a, 2020b). Клетки HeLa-CD95 обрабатывали Casp8inE и Casp8inG дозозависимым образом, как отдельно взятыми соединениями, так и совместно с DL (рис. 5д, е). Подобно клеткам Jurkat 282, стимуляция DL приводила к потере жизнеспособности клеток HeLa-CD95. Однако в отличие от клеток Jurkat 282, не было обнаружено существенных различий в индуцированной DL потере жизнеспособности клеток при ко-стимуляции Casp8inG и Casp8inE. Интересно заметить, что соединение Casp8inG не проявляло цитотоксического действия на клетки HeLa-CD95 в том же диапазоне концентраций, что и на клетках Jurkat, что указывает на специфический цитотоксический эффект этого соединения на клетки Jurkat.

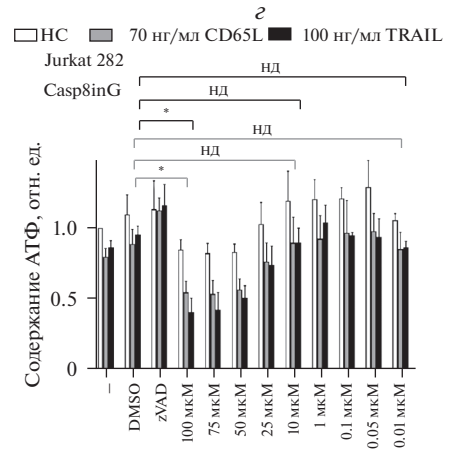
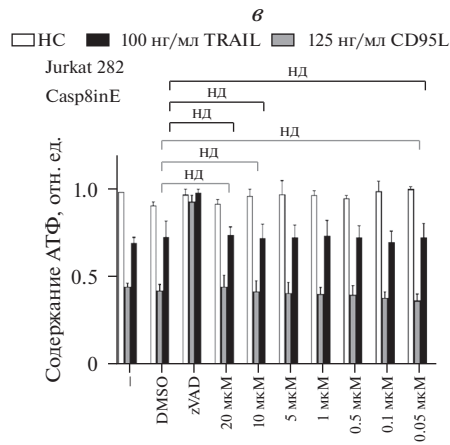
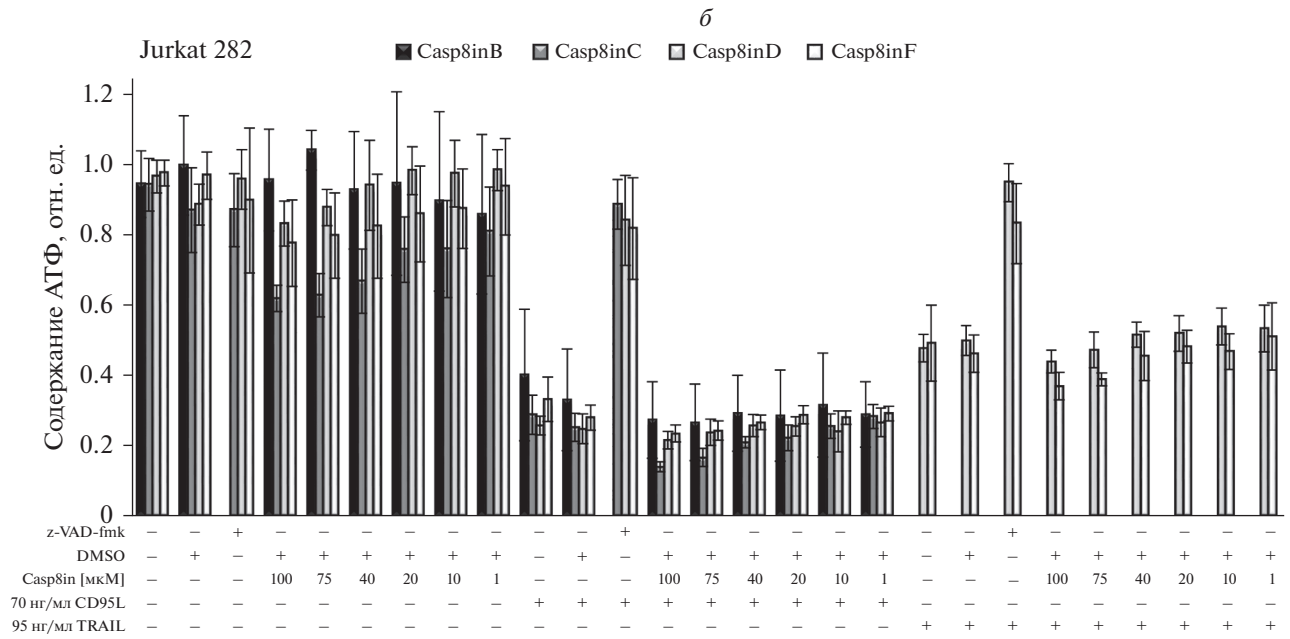
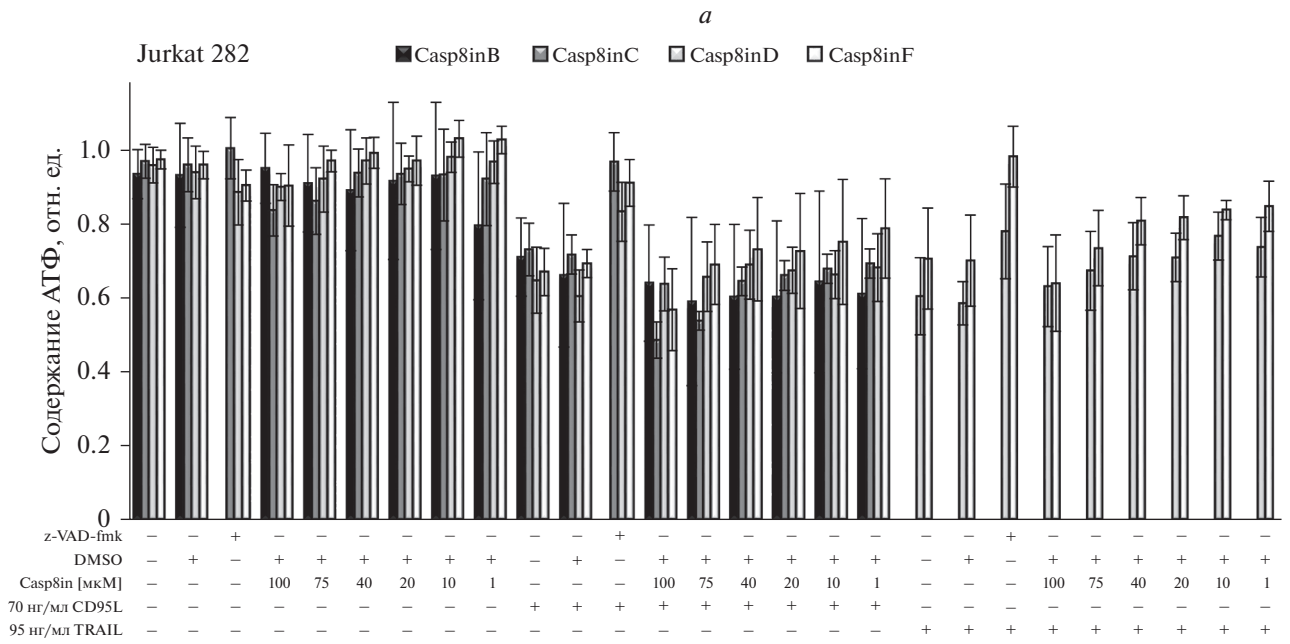


Рис. 4. Анализ жизнеспособности клеток Jurkat 282 при совместной обработке DL и ингибиторами каспазы-8 (Casp8in/DL). *a, б* – Клетки предварительно обрабатывали Casp8in B, C, D или F в течение 2 ч. После этого клетки обрабатывали CD95L или TRAIL в течение 6 ч (*a*) или 22 ч (*б*). *в, г* – Клетки предварительно обработаны Casp8inE (*в*) или Casp8inG (*г*) в течение 2 ч; *по горизонтали* – концентрация Casp8in. После этого клетки обрабатывали CD95L или TRAIL в течение 6 ч. Жизнеспособность клеток измеряли с использованием анализа жизнеспособности клеток Cell Titer-Glo-Luminescent (НС – нестимулированные клетки). Показаны средние значения и их стандартные отклонения; $n = 3$ (*a, б, в*) или $n = 2$ (*г*). Для статистического анализа использовали *T*-тесты. Различия достоверны при $*p < 0.05$; нд – недостоверно. Соединения Casp8in растворяли в ДМСО, который в максимальной концентрации использовали как отрицательный контроль; zVAD-fmk в концентрации 50 мкМ использовали как положительный контроль (то же относится к рис. 5).

В совокупности наши данные убедительно указывают на то, что два соединения – Casp8inG и Casp8inE – способны модулировать индуцированную DL потерю жизнеспособности клеток и поэтому их можно рассматривать как основу для дальнейшего развития ингибиторов, адресно действующих на каспазу-8, в будущих исследованиях.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе мы провели компьютерно-экспериментальный поиск малых молекул Casp8in (ингибиторов каспазы-8), способных модулировать индукцию внешнего пути апоптоза. В результате применения компьютерных методов виртуального скрининга было предложено 6 малых химических соединений, потенциально способных связываться с продоменом прокаспазы-8 в области контакта двух доменов DED1 и DED2. В качестве механизма действия соединений Casp8in предполагалось, что их связывание в заданном сайте будет препятствовать сборке филаментов DED, что, в свою очередь, может привести к снижению активности каспазы-8 в комплексе DISC и ингибированию последующей активации эффекторных каспаз и индукции апоптоза.

Экспериментальное исследование активности соединений Casp8in было выполнено с использованием тестов по оценке их влияния на жизнеспособность клеток при одиночной и комбинированной обработке совместно с DL. На данном этапе крайне важно определить, обладают ли выбранные соединения цитотоксическими эффектами, которые могут проявиться при использовании широкого диапазона концентраций этих соединений. Кроме того, для анализа малых молекул необходима проверка с использованием нескольких клеточных линий, в том числе ввиду различной степени экспрессии целевых белков в клетках разных типов (Fricker et al., 2010). Причем ключевым этапом данной проверки является использование генетических нокауты и фармакологических ингибиторов, позволяющих проверить специфичность эффектов анализируемых соединений. В связи с этим, в настоящей работе мы использовали клетки Jurkat-C8-KO, которые являются устоявшейся моделью для тестирования роли каспазы-8 в передаче сигналов, и панкаспазный ингибитор zVAD-fmk в качестве положительного контроля для оценки результатов ингибирования каспазы-8. Использование нокаутных клеточных линий позволяет выявить возможные нецелевые эффекты

и охарактеризовать диапазон цитотоксичности исследуемого соединения.

Проведенные нами экспериментальные исследования соединений Casp8in показали, что два из них (Casp8inG и Casp8inE) обладали заметной способностью увеличивать жизнеспособность клеток при DL-индуцированном апоптозе. Следует отметить, что Casp8inE не обладало цитотоксичностью на культуре клеток Jurkat-C8-KO, что подтверждает специфичность его действия на целевую мишень. В то же время, Casp8inG проявлял цитотоксический эффект при концентрациях выше 25 мкМ, что необходимо учитывать при оценке результатов тестирования его биологической активности.

Полученные результаты по активности соединений, созданных исключительно на основе компьютерного дизайна, внушают большой оптимизм по реализации выбранной стратегии создания ингибиторов индукции внешнего пути апоптоза, механизм действия которых основан на ингибировании формирования DED филаментов. Соединения Casp8inG и Casp8inE могут составить основу для дизайна улучшенных вариантов ингибиторов с использованием итерационного подхода, включающего последовательные шаги по оптимизации их химической структуры на основе компьютерного предсказания модификаций и экспериментальной оценки биологического эффекта.

В отличие от основных регуляторов внутреннего пути апоптоза, для которых специфические низкомолекулярные ингибиторы уже успешно разработаны и в настоящее время проходят клинические испытания, внешний путь только начинает изучаться (Vucur et al., 2015; Roberts et al., 2016; Hillert et al., 2020a). Создание соединений, нацеленных на внешний путь апоптоза, до сих пор требует решения полного комплекса задач, включая поиск валидных мишеней, дизайн малых химических соединений, действующих адресно на выбранную мишень, эффективные схемы экспериментальной проверки их биологической активности. Результаты исследования, представленные в настоящей работе, описывают одну из возможных стратегий по компьютерному дизайну и экспериментальному тестированию активности потенциальных ингибиторов внешнего пути апоптоза.

БЛАГОДАРНОСТИ

Мы благодарны А.С. Ищенко (ИЦиГ СО РАН) за ценные советы по моделированию.

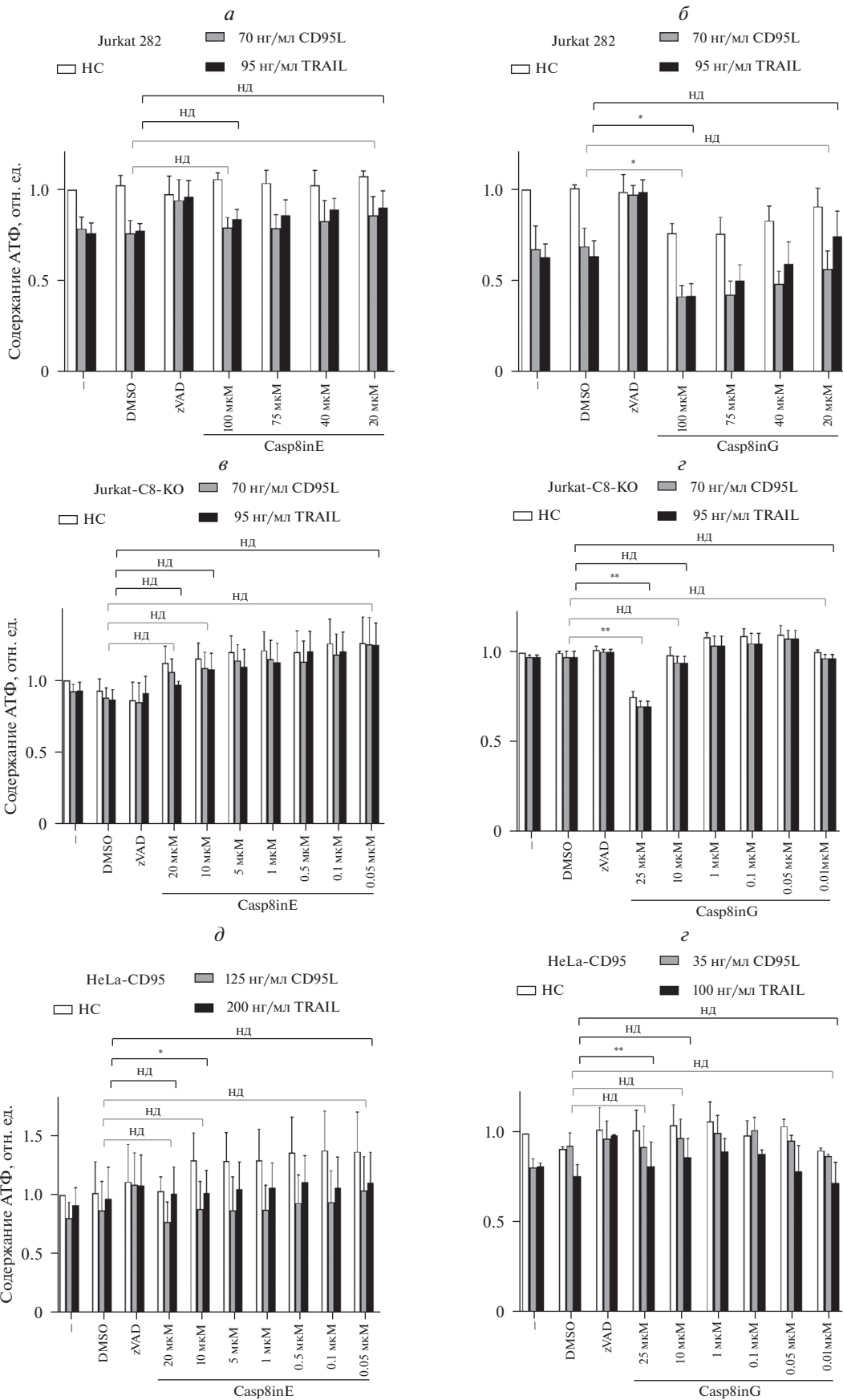


Рис. 5. Анализ жизнеспособности клеток разных линий при активации Casp8in/DL. По горизонтали – концентрация Casp8in. Клетки Jurkat 282 (а, б), Jurkat-C8-KO (в, г) и HeLa-CD95 (д, е) предварительно обрабатывали Casp8inE (а, в, д) или Casp8inG (б, г, е) в течение 2 ч. После этого клетки обрабатывали CD95L или TRAIL в течение 6 ч. Жизнеспособность клеток анализировали с помощью Cell Titer-Glo-Luminescent (НС – нестимулированные клетки). Обработку zVAD-fmk использовали в качестве положительного контроля. Показаны средние значения и их стандартные отклонения; $n = 3$ (а, б, в, г) или $n = 2$ (д, е). Для статистического анализа использовали T -тесты. Различия достоверны при $*p < 0.05$ или $**p < 0.005$; нд – недостоверно.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Центра динамических систем (CDS, Магдебург, Германия), Европейского фонда регионального развития (ЕС ERDF). Компьютерный дизайн молекулярных соединений проводился при поддержке гранта Минобрнауки РФ (соглашение No 075-15-2021-944; проект ERA-NET “Target identification and drug development in liver cancer (TAIGA)”). Суперкомпьютерные расчеты выполняли с использованием вычислительных ресурсов ЦКП “Биоинформатика” при поддержке бюджетного проекта № FWNR-2022-0020 “Системная биология и биоинформатика: реконструкция, анализ и моделирование структурно-функциональной организации и эволюции генных сетей человека, животных, растений и микроорганизмов”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментов с участием животных или людей авторами не проводили.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Й.Э.: проведение экспериментов; Н.В.И. и В.А.И.: моделирование; Л.К.Н.-Р.: технология; В.А.И. и И.Н.Л.: общее руководство; Й.Э. и И.Н.Л.: написание статьи; Й.Э. и Н.В.И. внесли равный вклад. Все авторы прочли рукопись и согласны с ее публикацией.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bucur O., Gaidos G., Yatawara A., Pennarun B., Rupasinghe C., Roux J., Andrei S., Guo B., Panaitiu A., Pellegrini M., Mierke D.F., Khosravi-Far R. 2015. A novel caspase 8 selective small molecule potentiates TRAIL-induced cell death. *Sci. Rep.* V. 5. P. 9893.
- Dickens L.S., Boyd R.S., Jukes-Jones R., Hughes M.A., Robinson G.L., Fairall L., Schwabe J.W., Cain K., Macfarlane M. 2012. A death effector domain chain DISC model reveals a crucial role for caspase-8 chain assembly in mediating apoptotic cell death. *Mol. Cell.* V. 47. P. 291.
- Fricker N., Beaudouin J., Richter P., Eils R., Krammer P.H., Lavrik I.N. 2010. Model-based dissection of CD95 signaling dynamics reveals both a pro- and antiapoptotic role of C-FLIPL. *J. Cell Biol.* V. 190. P. 377.
- Friesner R.A., Banks J.L., Murphy R.B., Halgren T.A., Klicic J.J., Mainz D.T., Repasky M.P., Knoll E.H., Shelley M., Perry J.K., Shaw D.E., Francis P., Shenkin P.S. 2004. Glide: A new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *J. Med. Chem.* V. 47. P. 1739.
- Friesner R.A., Murphy R.B., Repasky M.P., Frye L.L., Greenwood J.R., Halgren T.A., Sanschagrin P.C., Mainz D.T. 2006. Extra precision glide: Docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes. *J. Med. Chem.* V. 49. P. 6177.
- Fu T.M., Li Y., Lu A., Li Z., Vajjhala P.R., Cruz A.C., Srivastava D.B., DiMaio F., Penczek P.A., Siegel R.M., Stacey K.J., Egelman E.H., Wu H. 2016. Cryo-EM structure of caspase-8 tandem DED filament reveals assembly and regulation mechanisms of the death-inducing signaling complex. *Mol. Cell.* V. 64. P. 236.
- Golks A., Brenner D., Schmitz I., Watzl C., Krueger A., Krammer P.H., Lavrik I.N. 2006. The role of CAP3 in CD95 signaling: New insights into the mechanism of procaspase-8 activation. *Cell Death Differ.* V. 13. P. 489.
- Halgren T.A., Murphy R.B., Friesner R.A., Beard H.S., Frye L.L., Pollard W.T., Banks J.L. 2004. Glide: A new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. Enrichment factors in database screening. *J. Med. Chem.* V. 47. P. 1750.
- Hillert L.K., Ivanisenko N.V., Busse D., Espe J., Konig C., Peltek S.E., Kolchanov N.A., Ivanisenko V.A., Lavrik I.N. 2020a. Dissecting DISC regulation via pharmacological targeting of caspase-8/c-FLIPL heterodimer. *Cell Death Differ.* V. 27. P. 2117.
- Hillert L.K., Ivanisenko N.V., Espe J., Konig C., Ivanisenko V.A., Kahne T., Lavrik I.N. 2020b. Long and short isoforms of c-FLIP act as control checkpoints of DED filament assembly. *Oncogene.* V. 39. P. 1756.
- Hoffmann J.C., Pappa A., Krammer P.H., Lavrik I.N. 2009. A new C-terminal cleavage product of procaspase-8, p30, defines an alternative pathway of procaspase-8 activation. *Mol. Cell. Biol.* V. 29. P. 4431.
- Hughes M.A., Harper N., Butterworth M., Cain K., Cohen G.M., MacFarlane M. 2009. Reconstitution of the death-inducing signaling complex reveals a substrate switch that determines CD95-mediated death or survival. *Mol. Cell.* V. 35. P. 265.
- Irwin J.J., Sterling T., Mysinger M.M., Bolstad E.S., Coleman R.G. 2012. ZINC: a free tool to discover chemistry for biology. *J. Chem. Inf. Model.* V. 52. P. 1757.
- Juo P., Kuo C. J., Yuan J., Blenis J. 1998. Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Curr. Biol.* V. 8. P. 1001.
- Krammer P.H., Arnold R., Lavrik I.N. 2007. Life and death in peripheral T cells. *Nat. Rev. Immunol.* V. 7. P. 532.
- Lavrik I.N., Krammer P.H. 2012. Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC. *Cell Death Differ.* V. 19. P. 36.
- Lavrik I., Krueger A., Schmitz I., Baumann S., Weyd H., Krammer P.H., Kirchhoff S. 2003. The active caspase-8 heterote-

- tramer is formed at the CD95 DISC. *Cell Death Differ.* V. 10. P. 144.
- Medema J.P., Scaffidi C., Kischkel F.C., Shevchenko A., Mann M., Krammer P.H., Peter M.E., 1997. FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J.* V. 16. P. 2794.
- Muzio M., Chinnaiyan A.M., Kischkel F.C., O'Rourke K., Shevchenko A., Ni J., Scaffidi C., Bretz J. D., Zhang M., Gentz R., Mann M., Krammer P.H., Peter M.E., Dixit V.M. 1996. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell.* V. 85, P. 817.
- Neumann L., Pforr C., Beaudouin J., Pappa A., Fricker N., Krammer P.H., Lavrik I.N., Eils R. 2010. Dynamics within the CD95 death-inducing signaling complex decide life and death of cells. *Mol. Syst. Biol.* V. 6. P. 352.
- Roberts A.W., Davids M.S., Pagel J.M., Kahl B.S., Puvvada S.D., Gerecitano J.F., Kipps T.J., Anderson M.A., Brown J.R., Gressick L., Wong S., Dunbar M., Zhu M., Desai M.B., Cerri et al. 2016. Targeting BCL2 with venetoclax in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *New Eng. J. Med.* V. 374. P. 311.
- Schleich K., Warnken U., Fricker N., Ozturk S., Richter P., Kammerer K., Schnolzer M., Krammer P.H., Lavrik I.N. 2012. Stoichiometry of the CD95 death-inducing signaling complex: Experimental and modeling evidence for a death effector domain chain model. *Mol. Cell.* V. 47. P. 306.
- Seyrek K., Ivanisenko N.V., Richter M., Hillert L.K., Konig C., Lavrik I.N. 2020. Controlling cell death through post-translational modifications of DED proteins. *Trends Cell Biol.* V. 30. P. 354.
- Shen C., Yue H., Pei J., Guo X., Wang T., Quan J.M. 2015. Crystal structure of the death effector domains of caspase-8. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V. 463. P. 297.
- Sprick M.R., Rieser E., Stahl H., Grosse-Wilde A., Weigand M.A., Walczak H. 2002. Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8. *EMBO J.* V. 21. P. 4520.
- Sprick M.R., Weigand M.A., Rieser E., Rauch C.T., Juo P., Blenis J., Krammer P.H., Walczak H. 2000. FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity.* V. 12. P. 599.
- Sterling T., Irwin J.J. 2015. ZINC 15—Ligand Discovery for Everyone. *J. Chem. Inf. Model.* V. 55. P. 2324.
- Wang L., Yang J.K., Kabaleswaran V., Rice A.J., Cruz A.C., Park A.Y., Yin Q., Damko E., Jang S.B., Raunser S., Robinson C.V., Siegel R.M., Walz T., Wu H. 2010. The Fas-FADD death domain complex structure reveals the basis of DISC assembly and disease mutations. *Nat. Struct. Mol. Biol.* V. 17. P. 1324.
- Wilson N.S., Dixit V., Ashkenazi A. 2009. Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. *Nat. Immunol.* V. 10. P. 348.
- Yu J.W., Jeffrey P.D., Shi Y. 2009. Mechanism of procaspase-8 activation by c-FLIPL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 106. P. 8169.

Development of Small Molecules Targeting Procaspase-8 at the DISC

J. Espe^a, N. V. Ivanisenko^b, L. K. Hillert-Richter^a, V. A. Ivanisenko^b and , and I. N. Lavrik^{a, b, *}

^a*Translational Inflammation Research, Medical Faculty, Center of Dynamic Systems, Otto von Guericke University Magdeburg, Magdeburg, 39120 Germany*

^b*Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, 630090 Russia*

**e-mail: inna.lavrik@med.ovgu.de*

Pharmacological targeting *via* small molecule-based chemical probes has recently acquired attention as a valuable tool to dissect molecular mechanisms. Induction of extrinsic apoptosis *via* CD95/Fas and TRAIL-R1/2 is initiated by the formation of the Death-Inducing Signaling Complex (DISC). Procaspase-8 activation at the DISC is a central event triggering extrinsic apoptosis. Procaspase-8 activation takes place at the death effector domain (DED) filaments that are formed at the DISC. Hence, targeting the DED filaments is essential to gain insight into DISC control and pharmacological targeting of extrinsic apoptosis. In this study we developed the group of chemical probes that were designed *in silico* to target procaspase-8 at the DED filaments. This was followed by their experimental validation *via* cell viability assays and selection of the most effective compounds. Taken together, our study describes a development of new chemical compounds that are constructed to target procaspase-8 and extrinsic apoptosis.

Keywords: procaspase-8, small molecules, DED, DISC, apoptosis, caspase activation, DR

УДК 57.084.1

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ МЕТАСТАЗОВ В ОРГАНАХ МЫШЕЙ ПОСЛЕ ОРТОТОПИЧЕСКОГО ВВЕДЕНИЯ КЛЕТОК КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА СТ26

© 2022 г. Л. С. Кузнецова¹, Б. А. Маргулис¹, И. В. Гужова¹, В. Ф. Лазарев¹, *

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

*E-mail: lazarev@incras.ru

Поступила в редакцию 01.03.2022 г.

После доработки 11.03.2022 г.

Принята к публикации 12.03.2022 г.

Одной из причин высокого уровня смертности от рака кишечника является формирование метастазов, и для анализа механизма их развития необходимы эффективные животные модели рака. С целью формирования подобных моделей метастазирования мы осуществляли ортотопическую прививку мышам клеток колоректального рака мыши СТ26, содержащих ген люциферазы, в подслизистую область слепой кишки животных. Через 30 сут после прививки мышей умерщвляли и определяли наличие метастазов в органах на основе анализа количества матричной РНК гена люциферазы с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени. Установлено, что после ортотопического введения клеток колоректального рака СТ26 у экспериментальных животных обнаруживаются метастазы не только в печени, но и в легких, и в селезенке. Подобные данные получены впервые и позволяют рассматривать использованный нами протокол для моделирования на мышах процесса метастазирования колоректального рака.

Ключевые слова: мышь, колоректальный рак, метастазы, ортотопическая трансплантация, слепая кишка

DOI: 10.31857/S0041377122030087

Один из наиболее распространенных типов рака – колоректальный – часто сопровождается формированием множественных очагов опухолевого роста – метастазов (Roth et al., 2021). Процесс метастазирования, будучи не до конца изученным, коррелирует с неблагоприятным прогнозом для пациентов (Nagai et al., 2021).

Известно, что чаще всего при развитии колоректального рака можно наблюдать метастазы в печени (Acciuffi et al., 2022). Однако потенциальные очаги вторичного роста опухоли могут быть локализованы и в других органах, в том числе в селезенке и легких (Vatandoust et al., 2015). Для поиска новых лекарств и подходов к эффективной терапии метастазирующих опухолей нужны качественные и релевантные модели на животных. Критическое значение при этом имеют органы или ткани, в которых могут возникать очаги вторичного опухолевого роста. Клетки карциномы кишечника мыши СТ26 являются одной из наиболее удобных и доступных для исследователей моделей формирования опухолей *in vivo*, однако до сих пор не было известно, в каких органах могут формироваться метастазы в случае ортотопической трансплантации опухоли.

Чаще всего для моделирования метастазирования клетки СТ26 вводят животным либо внутривенно, и в этом случае формируются метастазы в легких (Hashemzahi et al., 2020), либо вводят в селезенку для

получения метастазов в печени (Sorski et al., 2014). Описанные способы введения опухолевых клеток серьезно ограничивают релевантность и корректность самой модели, поскольку в процессе метастазирования крайне важную роль играет микроокружение опухоли (Chandra et al., 2021). Кроме того, в этом случае невозможно в полной мере учесть процессы деградации ткани, окружающей опухоль, а также лимфатическую или сосудистую инвазию (Hanahan, Weinberg, 2011).

Альтернативой описанным методикам может быть ортотопическое введение клеток колоректального рака. Одним из наиболее эффективных и релевантных способов ортотопической трансплантации карциномы кишечника является введение суспензии клеток в подслизистую область слепой кишки (Hite et al., 2018).

Именно этот способ мы применили в настоящей работе, целью которой был поиск метастазов в тканях печени, селезенки и легких мышей после ортотопического введения раковых клеток непосредственно в область слепой кишки.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клетки. Клетки колоректального рака мыши СТ26 были любезно предоставлены профессором Г. Мультхофф (Технический университет Мюнхена,

Германия). Клетки культивировали в среде DMEM (Gibco, США), содержащей 10% бычьей эмбриональной сыворотки (FBS; Gibco, США), антибиотика пенициллин 100 ед/мл и стрептомицин 0.1 мг/мл (БиолоТ, Россия) при 37°C и 5% CO₂. Для экспериментов мы использовали линию клеток СТ26-luc, полученную с помощью трансдукции клеток СТ26 геном люциферазы (*luc*) в составе вектора pHIV-iR-FP720-E2A-Luc, как было описано ранее (Kotogova et al., 2021).

Ортогипическое введение клеток животным. Для экспериментов были использованы самки мышей линии BALB/c. Все животные были получены из питомника Центра генетических коллекций животных Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского (Нижний Новгород). Животных перед операцией наркотизировали с помощью смеси препаратов Золетил-100 (Virbac, Франция) и Рометар (Bioveta, Чехия), смешивая эти препараты с физиологическим раствором (Гематек, Россия) в объемном соотношении 1 : 3 : 40 соответственно. Клетки СТ26-luc в количестве от 10⁶ до 2.5 × 10⁶ суспензировали в 50 мкл среды DMEM и 50 мкл реактива Matrigel (Corning Incorporated, США) Затем суспензию клеток в объеме 100 мкл вводили в подслизистую область слепой кишки. Во время операции смачивали внутренние органы мыши физиологическим раствором, не допуская пересыхания. После операции брюшную полость зашивали, мышам для обезболивания вводили диклофенак (Атолл, Россия) в дозировке 1 мг на 1 кг веса животного. Спустя 30 сут животных умерщвляли, и извлекали органы (кишечник, печень, селезенку, легкие) для последующего анализа.

Полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ). Для анализа органов мышей с ПЦР-РВ их гомогенизировали и растворяли в реактиве ExtractRNA (Евроген, Россия) в соотношении 1 мл на 100 мг ткани. Выделение матричной РНК осуществляли по описанному ранее протоколу (Mikelladze et al., 2021). Далее для получения комплементарной ДНК проводили реакцию обратной транскрипции с помощью набора MMLV RT (Евроген, Россия) согласно протоколу производителя. Для анализа использовали 2 мкг РНК на пробу.

Все реакции ПЦР-РВ проводили на системе детекции ПЦР-РВ CFX96 (BioRad, США) с использованием qPCRMix-HS SYBR (Евроген, Россия) согласно протоколу производителя. Для подтверждения корректности ампликонов использовали анализ кривой плавления. Данные были проанализированы на кратность изменения количества матричной РНК с использованием программного обеспечения BioRad CFX (версия 3.1). Нуклеотидные последовательности праймеров были следующими: *актин*: (прямой) 5'-ACCGTGAAAAGATGACCCAGAT-3', (обратный) 5'-GTACGACCAGAGGCATACAGG-3'; *люцифераза*: (прямой) 5'-AGATCCTCAACGTGCAAAAGAAG-3',

(обратный) 5'-ACGAAGGTGTACATGCTTTGGA-3'. *Актин* использовали в качестве контроля для нормализации.

Все праймеры были заказаны в компании Евроген (Россия). Параметры ПЦР-РВ: 5 мин предварительной денатурации при 95°C; затем 40 циклов: 30 с при 95°C, 30 с при 65°C и 30 с при 70°C.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для изучения распределения вторичных очагов опухолевого роста в органах мышей мы использовали клетки колоректального рака мыши, трансдуцированные геном *luc*, СТ26-luc. Клетки с репортерным геном удобны для диагностики очагов опухолевого роста, поскольку в клетках тканей мыши указанный ген не экспрессируется. Клетки вводили в подслизистую область слепой кишки мыши, как показано на рис. 1а. Спустя 30 сут животных умерщвляли и извлекали органы для анализа. Типичный внешний вид очагов опухолевого роста в исследуемых органах представлен на рис. 1б–д.

Для подтверждения формирования опухолей у мышей после ортогипического введения клеток колоректального рака помимо визуальной диагностики мы анализировали уровень экспрессии гена *luc* в тканях кишечника экспериментальных животных. Для анализа мы использовали метод количественной ПЦР и установили, что у 4 из 6 мышей, которым вводили 10⁶ клеток СТ26-luc формировались первичные опухоли. В группе мышей, которым вводили 2.5 × 10⁶ СТ26-luc опухоли кишечника формировались у 4 животных из 5 (рис. 2). Таким образом ортогипическое введение клеток рака кишечника дало желаемый результат: мы наблюдали первичные очаги опухолевого роста у большинства животных.

Следующим этапом нашей работы был поиск метастазов в печени, селезенке и легких тех животных, у которых были выявлены очаги первичного опухолевого роста. Для этого мы проанализировали количество мРНК гена *luc* в соответствующих органах животных. На основе результатов ПЦР-РВ нам удалось установить наличие люциферазы в печени у 2-х животных из группы, которой вводили 10⁶ клеток СТ26-luc и у 4-х животных из группы, которой вводили 2.5 × 10⁶ этих же клеток (рис. 3а). Анализ экстрактов селезенки мышей позволил выявить экспрессию *luc* всего у 3-х животных: у одного из группы, которой вводили 10⁶ клеток СТ26-luc и у 2-х из группы, которой вводили 2.5 × 10⁶ клеток (рис. 3б). Аналогичные результаты были получены по данным анализа легких: экспрессию гена *luc* выявили у 3-х животных: у одного из группы, которой вводили 10⁶ клеток и у 2-х из группы, которой вводили 2.5 × 10⁶ клеток СТ26-luc (рис. 3в).

На основе полученных данных была составлена тепловая карта экспрессии гена *luc* в тканях кишечника, печени, селезенки и легких (рис. 4). Мы уста-

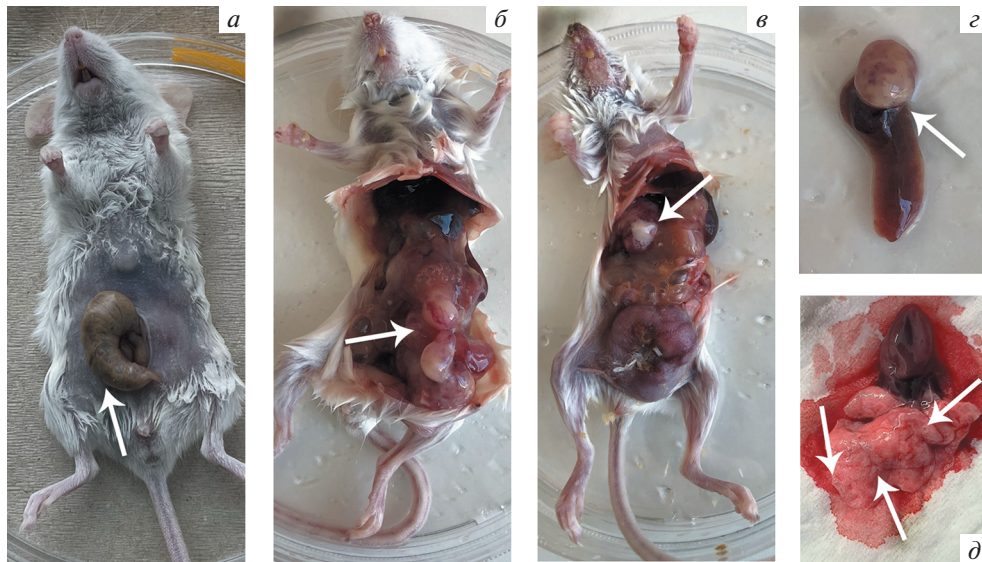


Рис. 1. Внешний вид зоны операции и сформированных спустя 30 сут после введения клеток СТ26 очагов опухолевого роста у мышей. *а* – Общий вид мыши во время проведения операции по инъекции клеток СТ26-luc в подслизистую область слепой кишки. *Стрелкой* обозначено место инъекции. *б* – Вид брюшной полости мыши с выросшей опухолью. *Стрелкой* отмечено злокачественное образование на стенке кишечника. *в* – Вид брюшной полости мыши с выросшей опухолью. *Стрелкой* показан метастаз на правой доле печени. *з* – Вид извлеченной из животного селезенки с метастазом (*стрелка*). *д* – Вид извлеченных из животного легких и сердца. На легких видны множественные метастазы (*стрелки*).

новили, что при ортотопическом введении клеток колоректального рака СТ26 наблюдаются множественные вторичные очаги опухолевого роста. Важно отметить, что метастазы в печень были обнаружены у всех животных, получивших инъекцию 2.5×10^6 клеток, у которых развилась первичная опухоль. При этом у 2-х животных были обнаружены метастазы во всех исследованных органах (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

Развитие карциномы кишечника в большинстве случаев сопровождается метастазированием в печень (Vatandoust et al., 2015). Реже наблюдаются метастазы в других органах, в том числе в легких (Chen et al., 2021), в селезенке (Vatandoust et al., 2015), в мозге (McKay, 2021) и даже в мышечной ткани (Guo et al., 2021). Мы предположили, что ортотопическая прививка клеток колоректального рака мыши сможет сделать картину процесса метастазирования более соответствующей процессу, происходящему в организме, то есть вызвать метастазирование не только в печень, но и в другие органы, например в селезенку и в легкие. Для проверки этой гипотезы мы использовали линию клеток СТ26, содержащую ген *luc*. Мы считаем, что использование люциферазы в качестве репортера позволяет надежно верифицировать наличие метастаза в органе в случае невозможности обнаружить его визуально. Дополнительно стоит отметить, что подобный подход с применением клеток, трансдуцированных люциферазным репортером, может быть использован для прижизненной диагностики очагов

опухолевого роста у мышей с помощью методики биолюминисценции (Banan et al., 2020).

В большинстве случаев при работе с *in vivo* моделями метастазирования колоректального рака спе-

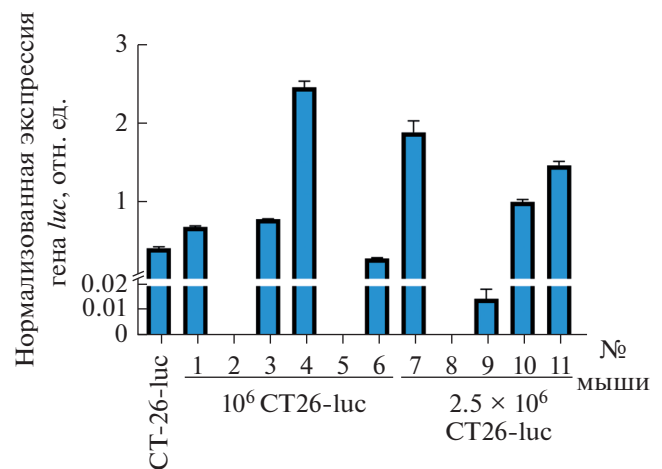


Рис. 2. Экспрессия гена люциферазы *luc* в слепой кишке мышей через 30 сут после инъекции им клеток СТ26-luc в разном количестве. Представлены результаты анализа тканей кишечника мышей методом RT-PCR. Клетки СТ26-luc вводили мышам в количестве 10^6 или 2.5×10^6 . В качестве положительного контроля использовали клетки СТ26-luc, выращенные *in vitro* (крайний левый столбик). Значения экспрессии гена *luc* нормализованы относительно гена актина. Показаны средние значения и среднеквадратичное отклонение по результатам трех независимых экспериментов.

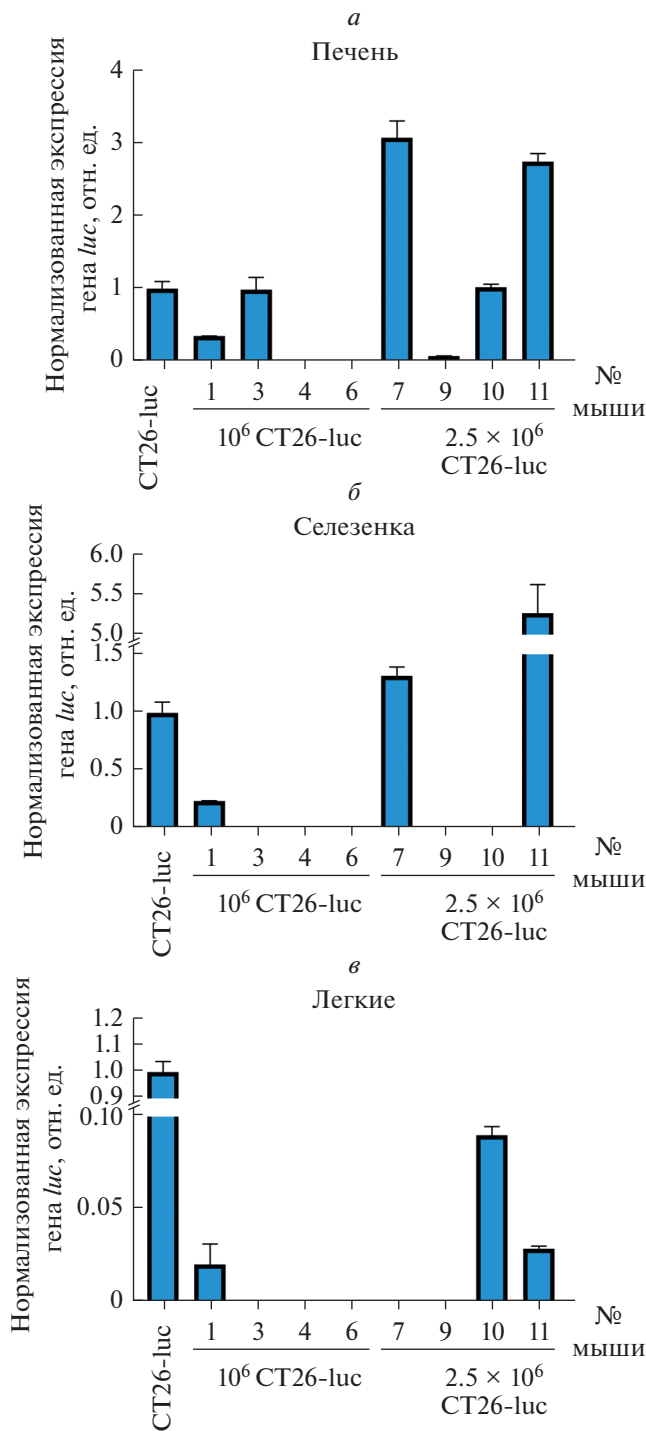


Рис. 3. Экспрессия гена *luc* в тканях мышей с развившимся злокачественным новообразованием. Представлены результаты анализа тканей печени (а), селезенки (б) и легких (в) мышей с помощью метода RT-PCR. Клетки ST26-luc были введены мышам в количестве 10⁶ либо 2.5 × 10⁶. Значения экспрессии гена *luc* нормализованы относительно гена актина. Показаны средние значения и среднеквадратичное отклонение по результатам трех независимых экспериментов.

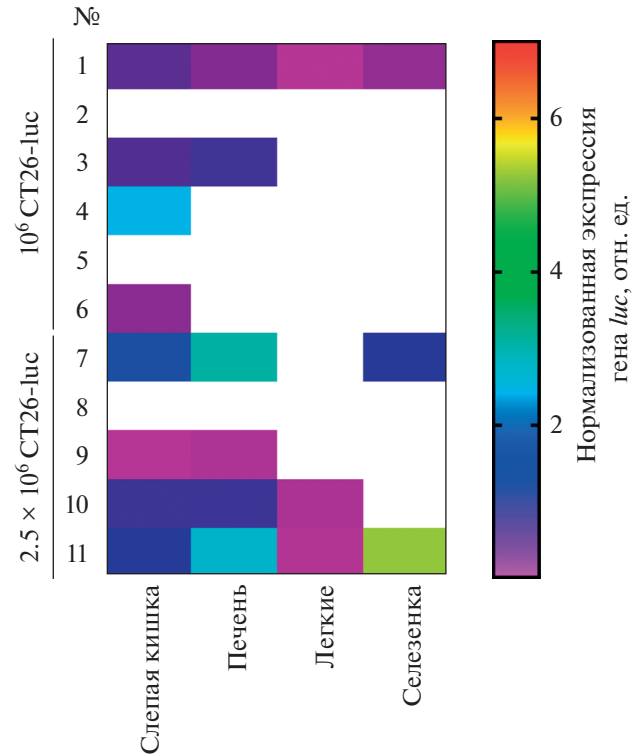


Рис. 4. Тепловая карта, показывающая результаты анализа экспрессии гена *luc* в различных органах мышей через 30 сут после инъекции им клеток ST26-luc. По вертикали слева – номер мыши, справа – цветовая шкала значений экспрессии, отн. ед.

циалисты обращают внимание на метастазы в печени (Oh et al., 2017); другие органы при этом остаются вне зоны интереса. В частности, для клеток ST26 ранее не было известно, что при ортотопическом введении они могут давать метастазы в легкие и селезенку. При необходимости получения легочных метастазов *in vivo* исследователи традиционно используют методику внутривенного введения опухолевых клеток (Hashemzahi et al., 2020). Еще один распространенный способ прививки колоректального рака при моделировании метастазирования – инъекции в селезенку (Huang et al., 2020; Fleten et al., 2017). Обычно этот способ используют для получения метастазов в печени (Huang et al., 2013). Однако все гетеротопические модели имеют определенные ограничения применения. В первую очередь, эти ограничения связаны с отсутствием адекватного микроокружения, что негативно сказывается на процессах метастазирования (Bürtin et al., 2020). Таким образом, полученные нами данные о появлении дополнительных очагов опухолевого роста при ортотопической трансплантации могут быть полезны для моделирования процессов метастазирования.

Настоящая работа была направлена на изучение возможности использования методики ортотопического введения клеток ST26 для моделирования

процессов метастазирования, сопутствующих прогрессии колоректального рака. Нам удалось продемонстрировать, что инъекция клеток колоректального рака мыши в подслизистую область слепой кишки с высокой вероятностью приводит к формированию метастазов не только в печени, но и в легких и селезенке. Таким образом, метод, описанный в данной работе, может быть использован для моделирования вторичного роста колоректальной опухоли в органах грудной и брюшной полости.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают признательность Р.В. Суезову (Институт цитологии РАН) за помощь в создании линии клеток СТ26, трансдуцированных геном люциферазы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (проект № 075-15-2020-773).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты на животных были одобрены этическим комитетом Института цитологии РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Acciuffi S., Meyer F., Bauschke A., Croner R., Settmacher U., Altendorf-Hofmann A.* 2022. Solitary colorectal liver metastasis: overview of treatment strategies and role of prognostic factors. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* V. 148. P. 657. <https://doi.org/10.1007/S00432-021-03880-4>
- Banan B., Beckstead J.A., Dunavani L.E., Sohn Y., Adcock J.M., Nomura S., Abumrad N., Goldenring J.R., Fingleton B.* 2020. Development of a novel murine model of lymphatic metastasis. *Clin. Exp. Metastasis.* V. 37. P. 247. <https://doi.org/10.1007/S10585-020-10025-3>
- Bürtin F., Mullins C.S., Linnebacher M.* 2020. Mouse models of colorectal cancer: Past, present and future perspectives. *World J. Gastroenterol.* V. 26. P. 1394. <https://doi.org/10.3748/WJG.V26.I13.1394>
- Chandra R., Karalis J.D., Liu C., Murimwa G.Z., Park J.V., Heid C.A., Reznik S.I., Huang E., Minna J.D., Brekken R.A.* 2021. The colorectal cancer tumor microenvironment and its impact on liver and lung metastasis. *Cancers (Basel).* V. 3. P. 6202. <https://doi.org/10.3390/CANCERS13246206>
- Chen H., Stoltzfus K.C., Lehrer E.J., Horn S.R., Siva S., Trifiletti D.M., Meng M. Bin, Verma V., Louie A.V., Zaorsky N.G.* 2021. The epidemiology of lung metastases. *Front. Med.* V. 8. <https://doi.org/10.3389/FMED.2021.723396>
- Fleten K.G., Bakke K.M., Mælandsmo G.M., Abildgaard A., Redalen K.R., Flatmark K.* 2017. Use of non-invasive imaging to monitor response to aflibercept treatment in murine models of colorectal cancer liver metastases. *Clin. Exp. Metastasis.* V. 34. P. 51. <https://doi.org/10.1007/S10585-016-9829-3>
- Guo Y., Wang S., Zhao Z.Y., Li J.N., Shang A., Li D.L., Wang M.* 2021. Skeletal muscle metastasis with bone metaplasia from colon cancer: A case report and review of the literature. *World J. Clin. cases.* V. 9. P. 9285. <https://doi.org/10.12998/WJCC.V9.I30.9285>
- Hanahan D., Weinberg R.A.* 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* V. 144. P. 646. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.02.013>
- Hashemzahi M., Naghibzadeh N., Asgharzadeh F., Mostafapour A., Hassanian S.M., Ferns G.A., Cho W.C., Avan A., Khazaei M.* 2020. The therapeutic potential of losartan in lung metastasis of colorectal cancer. *EXCLI J.* V. 19. P. 927. <https://doi.org/10.17179/EXCLI2020-2093>
- Hite N., Klinger A., Hellmers L., Maresh G.A., Miller P.E., Zhang X., Li L., Margolin D.A.* 2018. An optimal orthotopic mouse model for human colorectal cancer primary tumor growth and spontaneous metastasis. *Dis. Colon Rectum.* V. 61. P. 698. <https://doi.org/10.1097/DCR.0000000000001096>
- Huang X., Chen Z., Zhang N., Zhu C., Lin X., Yu J., Chen Z., Lan P., Wan Y.* 2020. Increase in CD4+FOXP3+ regulatory T cell number and upregulation of the HGF/c-Met signaling pathway during the liver metastasis of colorectal cancer. *Oncol. Lett.* V. 20. P. 2113. <https://doi.org/10.3892/OL.2020.11785>
- Huang X., Zou Y., Lian L., Wu X., He X., He X., Wu X., Huang Y., Lan P.* 2013. Changes of T cells and cytokines TGF- β 1 and IL-10 in mice during liver metastasis of colon carcinoma: implications for liver anti-tumor immunity. *J. Gastrointest. Surg.* V. 17. P. 1283. <https://doi.org/10.1007/S11605-013-2194-5>
- Komarova E.Y., Suezov R.V., Nikotina A.D., Aksenov N.D., Garaeva L.A., Shtam T.A., Zhakhov A.V., Martynova M.G., Bystrova O.A., Istomina M.S., Ischenko A.M., Margulis B.A., Guzova I.V.* 2021. Hsp70-containing extracellular vesicles are capable of activating of adaptive immunity in models of mouse melanoma and colon carcinoma. *Sci. Rep.* V. 11. P. 21314. <https://doi.org/10.1038/S41598-021-00734-4>
- McKay M.J.* 2021. Brain metastases: Increasingly precision medicine—a narrative review. *Ann. Transl. Med.* V. 9. P. 1629. <https://doi.org/10.21037/ATM-21-3665>
- Mikeladze M.A., Dutsheva E.A., Kartsev V.G., Margulis B.A., Guzova I.V., Lazarev V.F.* 2021. Disruption of the complex between GAPDH and Hsp70 sensitizes C6 glioblastoma cells to hypoxic stress. *Int. J. Mol. Sci.* V. 22. P. 1520. <https://doi.org/10.3390/ijms22041520>
- Nagai Y., Kiyomatsu T., Gohda Y., Otani K., Deguchi K., Yamada K.* 2021. The primary tumor location in colorectal cancer: A focused review on its impact on surgical management. *Glob. Heal. Med.* V. 3. P. 386. <https://doi.org/10.35772/GHM.2020.01096>
- Oh B.Y., Hong H.K., Lee W.Y., Cho Y.B.* 2017. Animal models of colorectal cancer with liver metastasis. *Cancer Lett.* V. 387. P. 114. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2016.01.048>
- Roth L., Russo L., Uluguel S., Santos R.F. Dos, Breuer E., Gupta A., Lehmann K.* 2021. Peritoneal metastasis: Current status

- and treatment options. *Cancers (Basel)*. V. 14. P. 60.
<https://doi.org/10.3390/CANCERS14010060>
- Sorski L., Levi B., Shaashua L., Neeman E., Benish M., Matzner P., Hoffman A., Ben-Eliyahu S.* 2014. Impact of surgical extent and sex on the hepatic metastasis of colon cancer. *Surg. Today*. V. 44. P. 1925.
<https://doi.org/10.1007/S00595-013-0768-1>
- Vatandoust S., Price T. J., Karapetis C. S.* 2015. Colorectal cancer: Metastases to a single organ. *World J. Gastroenterol.* V. 21. P. 11767.
<https://doi.org/10.3748/WJG.V21.I41.11767>

Distribution of Metastases in the Organs of Mice after Orthotopic Injection of CT26 Colorectal Cancer Cells

L. S. Kuznetzova^a, B. A. Margulis^a, I. V. Guzhova^a, and V. F. Lazarev^{a, *}

^a*Institute of Cytology Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064 Russia*

**e-mail: lazarev@incras.ru*

One of the reasons for the high mortality rate from colorectal cancer is the formation of metastases, and effective animal models of cancer are needed to analyze the mechanism of their development. In order to form such a model of metastasis, we carried out orthotopic inoculation of CT26 mouse colorectal cancer cells containing the luciferase gene into the submucosal region of the animal's caecum. Determination of the presence of metastases in the organs of mice was carried out on the basis of the analysis of the luciferase gene expression using real-time polymerase chain reaction. It has been established that after orthotopic injection of CT26 mouse colorectal cancer cells in experimental animals, metastases are found not only in the liver, but also in the lungs and spleen. Such data were obtained for the first time and allow us to consider the protocol we used to model the process of colorectal cancer metastasis.

Keywords: mouse, colorectal cancer, metastases, orthotopic transplantation, caecum

УДК 576.311.347

ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ МИТОХОНДРИЙ CD4⁺ И CD8⁺ Т-ЛИМФОЦИТОВ ЗДОРОВЫХ ЛИЦ

© 2022 г. Л. Б. Королевская¹*, Е. В. Сайдакова¹, Н. Г. Шмагель¹, К. В. Шмагель¹¹Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук – филиал Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук (ИЭГМ УрО РАН), Пермь, 614081 Россия

*E-mail: bioqueen@mail.ru

Поступила в редакцию 05.03.2022 г.

После доработки 11.03.2022 г.

Принята к публикации 11.03.2022 г.

Несмотря на активное исследование состояния митохондрий Т-лимфоцитов при патологических состояниях, данных о параметрах органелл у здоровых людей в доступной литературе не представлено. Целью настоящей работы была оценка состояния митохондрий в Т-лимфоцитах CD4⁺ и CD8⁺ здоровых субъектов. Методом проточной цитофлуориметрии определены масса и заряд митохондрий, а также содержание регулятора активности митохондрий (PGC-1 α) в CD4⁺- и CD8⁺-Т-лимфоцитах с учетом их принадлежности к клеткам памяти и покоящимся (делящимся) элементам. Впервые показано, что у здоровых субъектов в Т-лимфоцитах CD4⁺ и CD8⁺ имеются значительные различия по состоянию митохондрий. Установлено, что масса и заряд митохондрий в CD4⁺-Т-лимфоцитах, являющихся и не являющихся клетками памяти, а также в покоящихся и делящихся элементах существенно превышают соответствующие показатели в CD8⁺-Т-клетках. При этом среди Т-лимфоцитов CD4⁺ и CD8⁺ более высокая масса, заряд митохондрий и содержание PGC-1 α являются характерной особенностью клеток памяти и делящихся элементов. Кроме того, у здоровых лиц взаимосвязи между уровнем регулятора активности митохондрий и показателями их состояния в CD4⁺- и CD8-Т-лимфоцитах существенно различаются: содержание PGC-1 α в CD4⁺-Т-клетках прямо связано с массой митохондрий, а в CD8⁺-Т-лимфоцитах – с трансмембранным потенциалом органелл.

Ключевые слова: CD4⁺ Т-лимфоциты, CD8⁺ Т-лимфоциты, митохондрии, клетки памяти, делящиеся клетки, здоровые субъекты

DOI: 10.31857/S0041377122030063

Т-лимфоциты являются основными клеточными элементами адаптивной иммунной системы. Распознавание антигенспецифических сигналов наивными Т-клетками приводит к их активации, пролиферации и запуску программы дифференцировки в эффекторные лимфоциты. Завершение иммунного ответа сопровождается гибелью большей части антигенспецифических эффекторов и формированием немногочисленного клона долгоживущих клеток памяти (Farber et al., 2014). Последние характеризуются более высоким пролиферативным потенциалом при повторном контакте с антигеном (Rogers et al., 2000; van der Windt et al., 2013). Т-лимфоциты, несущие корецепторные молекулы CD4⁺ или CD8⁺, выполняют различные функции, действуя как координаторы и эффекторы иммунного ответа соответственно. Цитотоксические CD8⁺-Т-лимфоциты устраняют инфицированные клетки путем лизиса (Kaech, Wherry, 2007), CD4⁺ Т-лимфоциты обеспечивают реализацию иммунного ответа в определенном направлении за счет способности к дифференцировке в раз-

личные субпопуляции, в том числе Th1, Th2, Th17, фолликулярные хелперы, регуляторные клетки (Zhu et al., 2010). При этом обе субпопуляции Т-лимфоцитов – CD4⁺ и CD8⁺ – тесно кооперируют друг с другом при формировании противовирусного и противоопухолевого иммунитета (Novy et al., 2007; Ahrends et al., 2017).

Известно, что дифференцировка Т-лимфоцитов связана с их метаболизмом (van der Windt et al., 2012, 2013; Phan et al., 2016). Митохондрии являются центральным узлом метаболических путей в клетке и участвуют в ее жизненно важных функциях: производстве энергии, клеточном дыхании, продукции метаболических прекурсоров для синтеза макромолекул, активации, пролиферации, дифференцировке и апоптозе (Spinelli, Naigis, 2018). Дисфункция митохондрий нередко приводит к истощению клеток, что подтверждается большинством публикаций (Bensch et al., 2016; McKinney, Smith, 2018; Yu et al., 2020). Состояние истощения характеризуется постепенной потерей Т-клетками эффекторных функ-

ций, снижением пролиферативной способности, повышением экспрессии ингибиторных молекул, изменением метаболизма (McKinney, Smith, 2018; McLane et al., 2019). Истощение Т-лимфоцитов отмечено у лиц пожилого возраста (Ponnapan, Ponnapan, 2011), а также как результат постоянной стимуляции клеток антигеном при хронических инфекциях (Saeidi et al., 2018; McLane et al., 2019) и онкологических заболеваниях (Mumprecht et al., 2009; McLane et al., 2019). Несмотря на то, что активно ведутся исследования при патологических состояниях, изучение параметров митохондрий в Т-лимфоцитах здоровых людей до настоящего времени не проводили.

Целью данной работы была оценка состояния митохондрий Т-лимфоцитов CD4⁺ и CD8⁺ у здоровых добровольцев.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объект исследования. Проведение исследования было одобрено этическим комитетом Пермского краевого центра по борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями (рег. № IRB00008964). Было обследовано 23 относительно здоровых добровольца. Критерии включения в исследование были следующие: отсутствие в периферической крови антител к вирусам гепатита С и иммунодефицита человека, поверхностного антигена вируса гепатита В; отсутствие признаков респираторной инфекции в течение 14 сут до момента забора крови; для женщин – отсутствие беременности. Каждый участник исследования подписал информированное согласие. Забор венозной крови проводили натощак в вакуумные пробирки, содержащие в качестве антикоагулянта этилендиаминтетрауксусную кислоту (Weihai Hongyu Medical Devices Co Ltd, Китай). Мононуклеарные клетки выделяли центрифугированием двукратно разведенной крови в градиенте плотности Диаколл (1.077 г/мл; Диаэм, Россия). Клетки дважды отмывали в растворе фосфатно-солевого буфера Дульбекко (DPBS; Gibco, США) и помещали в среду, содержащую 90% термоинактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС; Biowest, Колумбия) и 10% диметилсульфоксида (AppliChem, Германия). Образцы подвергали контролируемому замораживанию в жидком азоте. Перед проведением исследования клетки размораживали.

Проточная цитометрия. Идентификацию Т-лимфоцитов CD4⁺ и CD8⁺ проводили методом проточной цитометрии на флюориметре Fortessa (Becton Dickinson, США) с использованием моноклональных антител анти-CD3-AF700, анти-CD8-BUV737 (Becton Dickinson, США), анти-CD4-Qdot605 и витального красителя LIVE/DEAD® Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit (Invitrogen, США). Массу и заряд мембраны митохондрий оценивали с применением митохондриально-селективных красителей MitoTracker

Green FM и MitoTracker Orange CM-H2TMRos (Invitrogen, США) соответственно. MitoTracker Orange является нефлюоресцентным красителем, который после проникновения в клетку пассивной диффузией, предпочтительно накапливается в митохондриях, где окисляется до флюоресцентной формы. Интенсивность свечения реагента прямо связана с величиной мембранного потенциала активных митохондрий (Cottet-Rousselle et al., 2011). Краситель MitoTracker Green избирательно аккумулируется в матриксе митохондрий, где ковалентно связывается с митохондриальными белками, реагируя со свободными тиоловыми группами остатков цистеина (Presley et al., 2003; Cottet-Rousselle et al., 2011). Накопление этого флюоресцентного маркера в матриксе митохондрий прямо пропорционально их массе и не зависит от мембранного потенциала органелл (Presley et al., 2003). Красители готовили согласно прилагаемым инструкциям производителя. В пробы с мононуклеарными клетками вносили MitoTracker Green и MitoTracker Orange в конечных концентрациях 25 нМ и 500 нМ соответственно. После окрашивания (37°C, 30 мин) клетки отмывали центрифугированием в растворе DPBS. Далее в пробы вносили флюорохром-меченые антитела и витальный краситель для поверхностного окрашивания клеток. Образцы инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин в защищенном от света месте. По окончании времени инкубации клетки отмывали центрифугированием в избыточном объеме раствора DPBS/2% ЭТС. Осадок ресуспендировали в растворе DPBS/2% ЭТС и проводили цитофлюориметрическое исследование.

Основным регулятором активности митохондрий является PGC-1 α (Peroxisome proliferator activated receptor γ Coactivator-1 alpha). Он действует как коактиватор транскрипционных факторов митохондриальных генов, вовлеченных в увеличение массы митохондрий, синтез ферментов цикла трикарбоновых кислот, β -окисления жирных кислот, протеинов комплексов дыхательной цепи и белков, регулирующих слияние (фрагментацию) митохондрий (Fernandez-Marcos, Auwerx, 2011; Cheng et al., 2018). Внутриклеточное содержание митохондриального регулятора определяли с применением поликлональных антител анти-PGC-1 α -DyLight488 (Novus Biologicals, Великобритания). Предварительно клетки окрашивали поверхностными флюорохром-мечеными антителами (см. выше), фиксировали (при комнатной температуре 60 мин в защищенном от света месте) и пермеабилizировали (двукратным центрифугированием) с использованием коммерческих буферных растворов для фиксации и пермеабилизации клеток (Invitrogen, США). После инкубации с анти-PGC-1 α -антителами (комнатная температура, защищенное от света место, 60 мин) клетки дважды отмывали центрифугированием в буфере для пермеабилизации, после чего ресуспендировали в растворе DPBS/2% ЭТС для проведения цитометрического анализа.

Разделение субпопуляций. Исходя из функциональных различий между Т-лимфоцитами CD4⁺ и CD8⁺ и наличия среди них разных субпопуляций клеток с уникальной метаболической программой (MacIver et al., 2013; Sun, Li, 2017), состояние митохондрий исследовали в лимфоцитах, относящихся и не относящихся к клеткам памяти, а также в делящихся и покоящихся элементах. Для разделения субпопуляций применяли моноклональные антитела анти-CD45RA-BV650 (BioLegend, США). Т-лимфоциты, не экспрессирующие молекулу CD45RA, относили к клеткам памяти (Sallusto et al., 1999). С использованием моноклональных антител анти-CD71-BV421 (Becton Dickinson, США) определяли делящиеся и покоящиеся элементы, к которым относили CD71-позитивные и CD71-негативные Т-лимфоциты соответственно. Последнее основано на том, что ранее мы показали возможность использования рецептора к трансферрину (CD71) в качестве суррогатного маркера пролиферирующих CD4⁺-Т-лимфоцитов (Younes et al., 2018): экспрессия маркера пролиферации клеток Ki-67 была тесно связана с появлением на поверхности клеток молекулы CD71 ($r = 0.985$).

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием непараметрических методов. В выборке рассчитывали медиану и межквартильный размах (25–75 перцентиль). Достоверность различий определяли на основе критерия Манна–Уитни. Корреляционный анализ проводили по методу Спирмена. Статистические расчеты и построение графиков выполняли с использованием программы Statistica 6.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Средний возраст обследованных здоровых добровольцев составил 32 г. (28–39 лет), среди которых преобладали женщины (65%). Различий по всем исследованным параметрам между мужчинами и женщинами не установлено. Относительное количество CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов в периферической крови составило 43.6% (42.0–47.5%) и 32.7% (27.7–37.5%) соответственно. Данные по субпопуляционному составу Т-лимфоцитов CD4⁺ и CD8⁺ представлены в табл. 1 и соответствуют норме (Yang et al., 2017; Toma et al., 2022).

Оценка показателей состояния митохондрий в Т-лимфоцитах CD4⁺ и CD8⁺ выявила следующие различия между пулами клеток. Так, масса органелл (рис. 1а) и величина трансмембранного потенциала митохондрий (рис. 1б) были значительно ниже в цитотоксических, чем в хелперных лимфоцитах ($P < 0.001$). При этом содержание нуклеарного коактиватора PGC-1 α – важного регулятора митохондриальной активности – было сопоставимо в обеих субпопуляциях Т-клеток (рис. 1в).

Таблица 1. Содержание различных субпопуляций Т-лимфоцитов в периферической крови здоровых людей

Показатель	CD4 ⁺	CD8 ⁺
	Т-лимфоциты ^а , %	Т-лимфоциты ^а , %
CD45RA ⁺	58.3 (51.8–62.5)	59.8 (54.1–70.2)
CD45RA [–]	41.8 (37.6–48.2)	40.2 (29.8–45.9)
CD71 ⁺	2.7 (2.1–3.7)	2.9 (2.8–3.5)
CD71 [–]	97.3 (96.3–98.0)	97.1 (96.5–97.2)

^а Доля клеток; показаны медианы и интерквартильные размахи; статистические расчеты выполнены по методу Манна–Уитни.

Известно, что деление Т-лимфоцитов тесно связано с адаптацией митохондрий к меняющимся энергетическим и биосинтетическим потребностям клетки (Spinelli, Haigis, 2018). Исследование массы органелл в покоящихся (CD71[–]) и делящихся (CD71⁺) Т-лимфоцитах выявило более высокие показатели в Т-клетках CD4⁺ по сравнению с популяцией CD8⁺ (рис. 2а). Так, среди делящихся элементов масса митохондрий в CD4⁺-Т-лимфоцитах была в 2.4 раза выше, чем в цитотоксических клетках ($P < 0.001$). В пуле покоящихся клеток различие между показателями Т-лимфоцитов CD4⁺ и CD8⁺ было чуть меньше (в 2.2 раза; $P < 0.001$). CD71⁺-элементы обладали более высокой массой митохондрий, чем популяция CD71[–], что оказалось справедливо как для CD4⁺-Т-лимфоцитов ($P < 0.01$), так и для CD8⁺-Т-клеток ($P < 0.001$). Примечательно, что даже в делящихся цитотоксических Т-лимфоцитах масса органелл была ниже, чем в покоящихся CD4⁺-Т-клетках, хотя различия не достигали уровня статистической значимости ($P > 0.05$). Таким образом, масса митохондрий в делящихся и покоящихся CD4⁺-Т-лимфоцитах здоровых субъектов существенно превышает таковую в соответствующих субпопуляциях CD8⁺-Т-клеток. Вместе с тем, делящиеся элементы вне зависимости от принадлежности к пулу хелперных или цитотоксических Т-лимфоцитов обладают большей массой органелл по сравнению с субпопуляцией клеток, находящихся в покое.

Схожие данные были получены при оценке заряда митохондрий (рис. 2б). Величина трансмембранного потенциала митохондрий в покоящихся и делящихся Т-лимфоцитах CD4⁺ превышала таковую в Т-клетках CD8⁺ более чем в 2.5 раза ($P < 0.001$). Хотя заряд органелл CD71⁺-элементов каждой из субпопуляций Т-лимфоцитов был выше соответствующих показателей среди клеток CD71[–], статистически значимые различия были установлены только при сравнении величин в пуле CD8⁺-Т-лимфоцитов ($P < 0.05$). Таким образом, у здоровых людей покоящиеся и делящиеся CD4⁺-Т-клетки обладают более высоким зарядом мембраны митохондрий по сравнению с о-

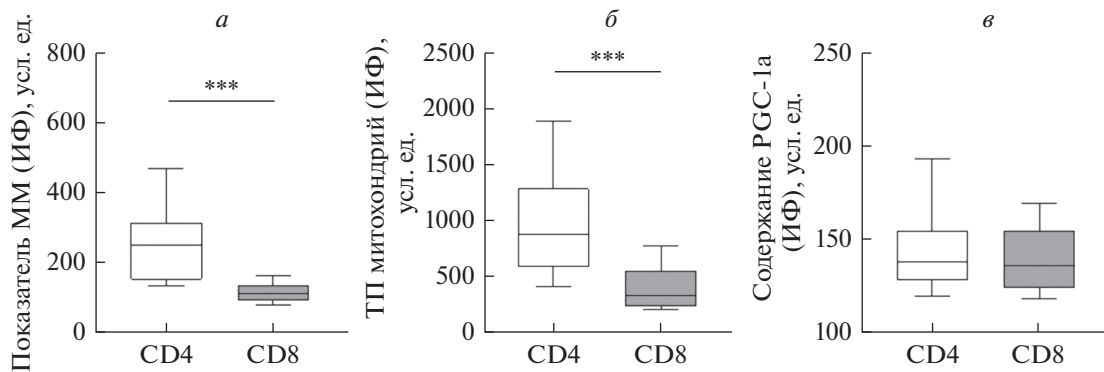


Рис. 1. Масса митохондрий (ММ), их трансмембранный потенциал (ТП) и содержание PGC-1 α в Т-лимфоцитах CD4⁺ и CD8⁺ здоровых доноров. Здесь и на рис. 2, 3: *по вертикали* – интенсивность свечения (ИФ) митохондриально-селективных красителей MitoTracker Green (а), MitoTracker Orange (б) и клеток, экспрессирующих PGC-1 α (в), отражающих соответствующие показатели (см. раздел “Материал и методика”). Представлены медианы (*горизонтальные линии*), интерквартильные размахи (*прямоугольники*), 10-я и 90-я перцентили (*вертикальные отрезки*); различия достоверны при * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ или *** $P < 0.001$ (U-критерий Манна–Уитни).

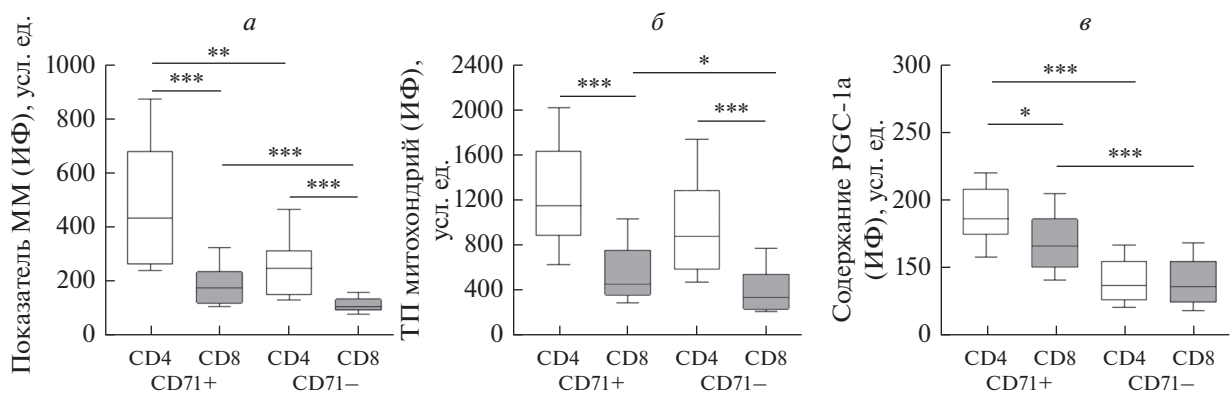


Рис. 2. Масса митохондрий (ММ), их трансмембранный потенциал (ТП) и содержание PGC-1 α в делящихся (CD71⁺) и покоящихся (CD71⁻) Т-лимфоцитах CD4⁺ и CD8⁺ здоровых людей. Объяснения в подписи к рис. 1.

ответствующими субпопуляциями цитотоксических Т-лимфоцитов. При этом делящиеся CD8⁺-Т-клетки характеризуются повышенным трансмембранным потенциалом органелл относительно его величины в покоящихся лимфоцитах.

Ключевым регулятором работы митохондрий является транскрипционный коактиватор PGC-1 α (Fernandez-Marcos, Auwerx, 2011). Оценка его содержания в покоящихся и делящихся Т-лимфоцитах CD4⁺ и CD8⁺ выявила следующие особенности (рис. 2в). Обе субпопуляции клеток не различались по уровню экспрессии этого белка среди элементов CD71⁻. При этом делящиеся Т-лимфоциты CD4⁺ и CD8⁺ содержали более высокие концентрации регуляторного протеина, чем соответствующие покоящиеся элементы этих субпопуляций ($P < 0.001$). Вместе с тем, цитотоксические Т-лимфоциты CD71⁺ несли в себе меньшее количество PGC-1 α , чем делящиеся CD4⁺-Т-клетки ($P < 0.05$). Полученные данные свидетельствуют о том, что в состоянии покоя уровень экспрессии митохон-

дриального регулятора в CD4⁺-Т-лимфоцитах сопоставим с таковым в CD8⁺-Т-клетках. Вместе с тем, содержание PGC-1 α в последних оказывается ниже при его оценке среди митотически активных элементов. При этом в делящихся Т-лимфоцитах как CD4⁺, так и CD8⁺ концентрация митохондриального регуляторного протеина существенно возрастает относительно его уровня в покоящихся клетках.

Таким образом, полученные нами данные о состоянии митохондрий в покоящихся и делящихся Т-лимфоцитах здоровых субъектов показали, что масса митохондрий, заряд их мембраны и содержание PGC-1 α в митотически активных Т-клетках CD4⁺ значительно выше, чем соответствующие параметры Т-лимфоцитов CD8⁺. Эта тенденция сохраняется и при оценке массы органелл и их мембранного потенциала в субпопуляциях покоящихся Т-клеток CD4⁺ и CD8⁺. Вместе с тем, митотически активные цитотоксические и хелперные Т-лимфоциты, в от-

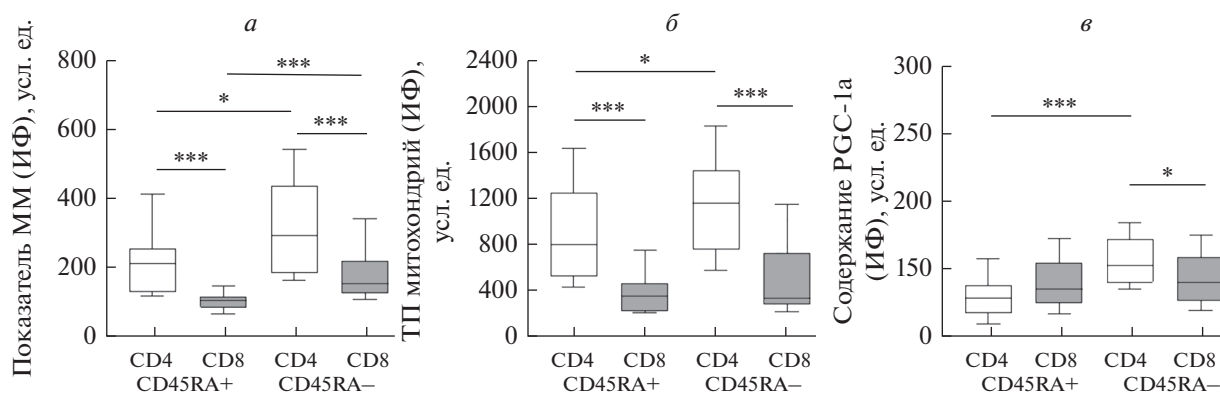


Рис. 3. Масса митохондрий (ММ), их трансмембранный потенциал (ТП) и содержание PGC-1 α в Т-лимфоцитах CD4⁺ и CD8⁺, относящихся (CD45RA⁻) и не относящихся (CD45RA⁺) к клеткам памяти, у здоровых субъектов. Объяснения в подпункте к рис. 1.

личие от покоящихся Т-клеток CD4⁺ и CD8⁺, обладают более высокой массой и зарядом митохондрий, а также несут в себе более высокие концентрации митохондриального регулятора PGC-1 α . Известно, что метаболизм покоящихся и активированных Т-лимфоцитов существенно отличается: последним требуется больше энергии и биосинтетических компонентов для роста, деления и дифференцировки в различные субпопуляции (MacIver et al., 2013; Sun, Li, 2017). Сходство выявленных нами изменений — более высокие показатели активности митохондрий в делящихся, чем в покоящихся клетках, — может свидетельствовать об идентичности метаболической адаптации Т-лимфоцитов CD4⁺ и CD8⁺ в организме. Вместе с тем, различия между хелперными и цитотоксическими Т-лимфоцитами по состоянию митохондрий — более низкая активность митохондрий в клетках CD8⁺ по сравнению с CD4⁺, — по-видимому, отражают исключительность метаболических программ, необходимых для поддержания и выполнения функций разных иммунных клеток (MacIver et al., 2013; Jones et al., 2017).

Формирование клеток памяти является уникальным свойством адаптивного иммунитета. Известно, что наивные Т-лимфоциты и клетки памяти имеют ряд метаболических различий (van der Windt et al., 2012, 2013; Callender et al., 2020). Так, повышенная митохондриальная активность клеток памяти способствует более быстрой их пролиферации при повторной стимуляции антигеном (van der Windt et al., 2013). Проведенная нами оценка состояния митохондрий в Т-лимфоцитах, относящихся (CD45RA⁻) и не относящихся (CD45RA⁺) к клеткам памяти, показала следующее. В обеих субпопуляциях масса органелл CD4⁺-Т-лимфоцитов (рис. 3а) почти в 2 раза превышала таковую в CD8⁺-Т-клетках ($P < 0.001$). Цитотоксические Т-лимфоциты памяти демонстрировали более высокую массу митохондрий, чем CD45RA-позитивные элементы ($P < 0.001$). Анало-

гичные данные были получены при оценке показателей среди CD45RA⁻ и CD45RA⁺ субпопуляций CD4⁺-Т-лимфоцитов ($P < 0.05$). Таким образом, у здоровых субъектов CD4⁺-Т-лимфоциты обладают большей массой митохондрий, чем CD8⁺-Т-лимфоциты, что оказалось справедливым, как для клеток относящихся, так и не относящихся к клеткам памяти. Вместе с тем, и CD4⁺-, и CD8⁺-Т-лимфоциты памяти характеризуются повышенной массой митохондрий по сравнению с соответствующими лимфоцитами, не принадлежащими к пулу клеток памяти.

Рядом авторов было показано, что величина мембранного потенциала митохондрий является ключевым фактором формирования CD8⁺-Т-лимфоцитов памяти (Sukumar et al., 2016). Проведенная нами оценка трансмембранного потенциала митохондрий в CD8⁺-Т-лимфоцитах, относящихся и не относящихся к клеткам памяти, не выявила статистически значимых отличий между субпопуляциями (рис. 3б). Вместе с тем, заряд органелл цитотоксических лимфоцитов, как в CD45RA⁺, так и CD45RA⁻ субпопуляциях был существенно ниже соответствующих показателей в CD4⁺-Т-клетках ($P < 0.001$). При этом, в отличие от CD8⁺-Т-лимфоцитов, хелперные клетки демонстрировали более высокую величину мембранного потенциала в субпопуляции клеток памяти относительно CD45RA⁺ элементов ($P < 0.05$). Полученные данные свидетельствуют о том, что у здоровых лиц CD4⁺-Т-лимфоциты, принадлежащие и не принадлежащие к клеткам памяти, наряду с повышенной массой митохондрий, обладают более высоким зарядом органелл по сравнению с соответствующими субпопуляциями CD8⁺-Т-клеток.

Ранее при оценке у здоровых людей состояния митохондрий в Т-лимфоцитах разной стадии дифференцировки было отмечено, что наивные клетки обладали сниженным мембранным потенциалом и массой митохондрий по сравнению с клетками центральной памяти (Nicoli et al., 2018). Однако эти дан-

Таблица 2. Связь содержания PGC-1 α с массой (I) и зарядом (II) митохондрий в Т-лимфоцитах CD4⁺ и CD8⁺ здоровых людей

Параметр	Т-лимфоциты CD4 ⁺		Т-лимфоциты CD8 ⁺	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
I				
Общий пул	0.462	<0.05	0.314	>0.05
CD45RA ⁺	0.410	>0.05	0.266	>0.05
CD45RA ⁻	0.401	>0.05	0.237	>0.05
CD71 ⁺	0.444	<0.05	0.304	>0.05
CD71 ⁻	0.486	<0.05	0.318	>0.05
II				
Общий пул	0.411	>0.05	0.484	<0.05
CD45RA ⁺	0.404	>0.05	0.430	<0.05
CD45RA ⁻	0.453	<0.05	0.571	<0.01
CD71 ⁺	0.548	<0.01	0.490	<0.05
CD71 ⁻	0.430	<0.05	0.493	<0.05

r – Коэффициент ранговой корреляции Спирмена; *P* – показатель статистической значимости.

ные были получены только для CD8⁺-Т-лимфоцитов. Сравнение состояния митохондрий Т-клеток CD8⁺ и CD4⁺ авторы не проводили. Другие исследователи при сопоставлении у здоровых доноров величин мембранного потенциала и массы митохондрий в Т-лимфоцитах CD4⁺ и CD8⁺ общего пула (Yu et al., 2017) и терминально-дифференцированных элементов (Callender et al., 2020) выявили более высокие показатели в хелперных клетках. Оценку состояния митохондрий в функционально активных субпопуляциях Т-лимфоцитов CD4⁺ и CD8⁺, таких как делящиеся элементы и клетки памяти, ранее никто не проводил.

Как уже упоминалось, PGC-1 α является основным регулятором активности митохондрий (Fernandez-Marcos, Auwerx, 2011). Оценка его содержания в клетках памяти (рис. 3в) выявила более высокие показатели в Т-лимфоцитах CD4⁺, чем в CD8⁺ ($P < 0.05$). При этом среди элементов CD45RA⁺ статистически значимых различий между Т-клетками CD4⁺ и CD8⁺ не установлено ($P > 0.05$). Цитотоксические Т-лимфоциты, относящиеся и не относящиеся к клеткам памяти, несли в себе сопоставимое количество митохондриального регулятора ($P > 0.05$), тогда как его концентрация в CD4⁺-Т-лимфоцитах памяти была существенно выше, чем среди элементов CD45RA⁺ ($P < 0.001$).

Таким образом, нами впервые установлено, что Т-лимфоциты CD4⁺, относящиеся и не относящиеся к клеткам памяти, обладают более высокой массой и величиной мембранного потенциала митохон-

дрий по сравнению с соответствующими субпопуляциями CD8⁺-Т-лимфоцитов. Масса органелл в цитотоксических и хелперных Т-лимфоцитах памяти существенно превышает таковую в элементах, не принадлежащих к клеткам памяти. При этом CD8⁺-Т-лимфоциты, являющиеся и не являющиеся клетками памяти, обладают сопоставимой величиной заряда мембраны митохондрий и содержанием митохондриального регулятора. Напротив, трансмембранный потенциал митохондрий и уровень PGC-1 α в Т-лимфоцитах памяти CD4⁺ значительно повышены относительно соответствующих величин в клетках, не принадлежащих к элементам памяти. Известно, что в патологических ситуациях истощению подвержены больше Т-лимфоциты CD8⁺, чем CD4⁺ (Bengsch et al., 2016; McLane et al., 2019; Yu et al., 2020). Вполне вероятно, что это может быть связано с обнаруженными нами более низкими показателями активности митохондрий в CD8⁺-Т-лимфоцитах относительно CD4⁺-Т-клеток.

Еще одним предположением различий состояний митохондрий между Т-лимфоцитами CD4⁺ и CD8⁺ может быть разное содержание в клетках регулятора митохондриальной активности. Проведенный корреляционный анализ между концентрацией PGC-1 α и параметрами митохондрий в Т-лимфоцитах CD4⁺ и CD8⁺ обнаружил следующие взаимосвязи (табл. 2). Оказалось, что уровни митохондриального регулятора в общем пуле CD4⁺-Т-лимфоцитов, а также в делящихся и покоящихся клетках прямо связаны с массой органелл каждой из популяций. При этом среди цитотоксических Т-лимфоцитов такие взаимосвязи отсутствовали. Более того, во всех исследованных субпопуляциях CD8⁺-Т-лимфоцитов были установлены самые низкие коэффициенты корреляции. Эти данные могут указывать на участие других, помимо PGC-1 α , факторов в регуляции массы митохондрий цитотоксических Т-лимфоцитов.

Однако о том, что PGC-1 α влияет на митохондрии Т-лимфоцитов CD8⁺, свидетельствуют обнаруженные нами во всех исследованных субпопуляциях клеток статистически значимые зависимости между концентрацией регулятора и зарядом мембраны митохондрий (табл. 2). При этом среди Т-лимфоцитов CD4⁺ такие взаимосвязи были установлены лишь в некоторых субпопуляциях.

Таким образом, нами впервые установлено, что у здоровых субъектов между Т-лимфоцитами CD4⁺ и CD8⁺ имеются существенные различия по состоянию митохондрий. Выявлено, что масса и трансмембранный потенциал митохондрий в CD4⁺-Т-лимфоцитах, являющихся и не являющихся клетками памяти, а также в покоящихся и делящихся элементах, существенно превышают соответствующие показатели в Т-клетках CD8⁺. При этом как среди хелперных, так и цитотоксических лимфоцитов более высокая масса, заряд митохондрий и содержание PGC-

1 α являются характерной особенностью клеток памяти и делящихся элементов. Более того, у здоровых лиц взаимосвязи между уровнем регулятора активности митохондрий и показателями их состояния в Т-лимфоцитах CD4⁺ и CD8⁺ существенно различаются: если в первом случае содержание PGC-1 α прямо связано с массой митохондрий, то во втором – с трансмембранным потенциалом органелл.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания “Роль метаболизма CD4⁺-Т-клеток памяти в нарушении регенерации иммунитета у ВИЧ-инфицированных пациентов на фоне антиретровирусной терапии”, номер государственной регистрации темы: 121112500044-9.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическими стандартами институционального и (или) национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие. Работа одобрена этическим комитетом Пермского краевого центра по борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями (рег. № IRB00008964).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ahrends T., Spanjaard A., Pilzecker B., Babala N., Bovens A., Xiao Y., Jacobs H., Borst J. 2017. CD4(+) T cell help confers a cytotoxic T cell effector program including coinhibitory receptor downregulation and increased tissue invasiveness. *Immunity*. V. 47. P. 848.
- Bengsch B., Johnson A.L., Kurachi M., Odorizzi P.M., Pauken K.E., Attanasio J., Stelekati E., McLane L.M., Paley M.A., Delgoffe G.M., Wherry E.J. 2016. Bioenergetic insufficiencies due to metabolic alterations regulated by the inhibitory receptor PD-1 are an early driver of CD8(+) T cell exhaustion. *Immunity*. V. 45. P. 358.
- Callender L.A., Carroll E.C., Bober E.A., Akbar A.N., Solito E., Henson S.M. 2020. Mitochondrial mass governs the extent of human T cell senescence. *Aging Cell*. V. 19. P. e13067.
- Cheng C.F., Ku H.C., Lin H. 2018. PGC-1 α as a pivotal factor in lipid and metabolic regulation. *Int. J. Mol. Sci.* V. 19. P. 3447.
- Cottet-Rousselle C., Ronot X., Lerverve X., Mayol J.F. 2011. Cytometric assessment of mitochondria using fluorescent probes. *Cytometry A*. V. 79. P. 405.
- Farber D.L., Yudanin N.A., Restifo N.P. 2014. Human memory T cells: Generation, compartmentalization and homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* V. 14. P. 24.
- Fernandez-Marcos P.J., Auwerx J. 2011. Regulation of PGC-1 α , a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. *Am. J. Clin. Nutr.* V. 93. P. 884S.
- Jones N., Cronin J.G., Dolton G., Panetti S., Schauenburg A.J., Galloway S.A.E., Sewell A.K., Cole D.K., Thornton C.A., Francis N.J. 2017. Metabolic adaptation of human CD4⁺ and CD8⁺ T-cells to T-cell receptor-mediated stimulation. *Front. Immunol.* V. 8. P. 1516.
- Kaech S.M., Wherry E.J. 2007. Heterogeneity and cell-fate decisions in effector and memory CD8⁺ T cell differentiation during viral infection. *Immunity*. V. 27. P. 393.
- MacIver N.J., Michalek R.D., Rathmell J.C. 2013. Metabolic regulation of T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* V. 31. P. 259.
- McKinney E.F., Smith K.G.C. 2018. Metabolic exhaustion in infection, cancer and autoimmunity. *Nat. Immunol.* V. 19. P. 213.
- McLane L.M., Abdel-Hakeem M.S., Wherry E.J. 2019. CD8 T cell exhaustion during chronic viral infection and cancer. *Annu. Rev. Immunol.* V. 37. P. 457.
- Mumprecht S., Schurch C., Schwaller J., Solenthaler M., Ochsenbein A.F. 2009. Programmed death 1 signaling on chronic myeloid leukemia-specific T cells results in T-cell exhaustion and disease progression. *Blood*. V. 114. P. 1528.
- Nicoli F., Papagno L., Frere J.J., Cabral-Piccin M.P., Clave E., Gostick E., Toubert A., Price D.A., Caputo A., Appay V. 2018. Naive CD8(+) T-cells engage a versatile metabolic program upon activation in humans and differ energetically from memory CD8(+) T-cells. *Front. Immunol.* V. 9. P. 2736.
- Novy P., Quigley M., Huang X., Yang Y. 2007. CD4 T cells are required for CD8 T cell survival during both primary and memory recall responses. *J. Immunol.* V. 179. P. 8243.
- Phan A.T., Doedens A.L., Palazon A., Tyrakis P.A., Cheung K.P., Johnson R.S., Goldrath A.W. 2016. Constitutive glycolytic metabolism supports CD8(+) T cell effector memory differentiation during viral infection. *Immunity*. V. 45. P. 1024.
- Ponnappan S., Ponnappan U. 2011. Aging and immune function: Molecular mechanisms to interventions. *Antioxid. Redox. Signal.* V. 14. P. 1551.
- Presley A.D., Fuller K.M., Arriaga E.A. 2003. MitoTracker Green labeling of mitochondrial proteins and their subsequent analysis by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* V. 793. P. 141.
- Rogers P.R., Dubey C., Swain S.L. 2000. Qualitative changes accompany memory T cell generation: Faster, more effective responses at lower doses of antigen. *J. Immunol.* V. 164. P. 2338.
- Saeidi A., Zandi K., Cheok Y.Y., Saeidi H., Wong W.F., Lee C.Y.Q., Cheong H.C., Yong Y.K., Larsson M., Shankar E.M. 2018. T-Cell exhaustion in chronic infections: Reversing the state of exhaustion and reinvigorating optimal protective immune responses. *Front. Immunol.* V. 9. P. 2569.
- Sallusto F., Lenig D., Forster R., Lipp M., Lanzavecchia A. 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. V. 401. P. 708.
- Spinelli J.B., Haigis M.C. 2018. The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. *Nat. Cell Biol.* V. 20. P. 745.
- Sukumar M., Liu J., Mehta G.U., Patel S.J., Roychoudhuri R., Crompton J.G., Klebanoff C.A., Ji Y., Li P., Yu Z., Whitehill G.D., Clever D., Eil R.L., Palmer D.C., Mitra S., Rao M.

- et al.* P. 2016. Mitochondrial membrane potential identifies cells with enhanced stemness for cellular therapy. *Cell Metab.* V. 23. P. 63.
- Sun H., Li X.* 2017. Metabolic reprogramming in resting and activated immune cells. *Metabolomics (Los Angel)*. V. 7. P. 188.
- Toma G., Lemnian I.M., Karapetian E., Grosse I., Seliger B.* 2022. Transcriptional analysis of total CD8(+) T cells and CD8(+)CD45RA(-) memory T cells from young and old healthy blood donors. *Front. Immunol.* V. 13. P. 806906. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.806906>
- Van der Windt G.J., Everts B., Chang C.H., Curtis J.D., Freitas T.C., Amiel E., Pearce E.J., Pearce E.L.* 2012. Mitochondrial respiratory capacity is a critical regulator of CD8⁺ T cell memory development. *Immunity.* V. 36. P. 68.
- Van der Windt G.J., O'Sullivan D., Everts B., Huang S.C., Buck M.D., Curtis J.D., Chang C.H., Smith A.M., Ai T., Faubert B., Jones R.G., Pearce E.J., Pearce E.L.* 2013. CD8 memory T cells have a bioenergetic advantage that underlies their rapid recall ability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 110. P. 14336.
- Yang P., Ma J., Yang X., Li W.* 2017. Peripheral CD4⁺ naive/memory ratio is an independent predictor of survival in non-small cell lung cancer. *Oncotarget.* V. 8. P. 83650.
- Younes S.A., Talla A., Pereira Ribeiro S., Saidakova E.V., Korolevskaya L.B., Shmagel K.V., Shive C.L., Freeman M.L., Panigrahi S., Zweig S., Balderas R., Margolis L., Douek D.C., Anthony D.D., Pandiyan P. et al.* 2018. Cycling CD4⁺ T cells in HIV-infected immune nonresponders have mitochondrial dysfunction. *J. Clin. Invest.* V. 128. P. 5083.
- Yu F., Hao Y., Zhao H., Xiao J., Han N., Zhang Y., Dai G., Chong X., Zeng H., Zhang F.* 2017. Distinct mitochondrial disturbance in CD4⁺T and CD8⁺T cells from HIV-infected patients. *J. Acquired Immune Defic. Syndr.* V. 74. P. 206.
- Yu Y.R., Imrichova H., Wang H., Chao T., Xiao Z., Gao M., Rincon-Restrepo M., Franco F., Genolet R., Cheng W.C., Jandus C., Coukos G., Jiang Y.F., Locasale J.W., Zippelius A., Liu P.S. et al.* 2020. Disturbed mitochondrial dynamics in CD8⁺ TILs reinforce T cell exhaustion. *Nat. Immunol.* V. 21. P. 1540.
- Zhu J., Yamane H., Paul W.E.* 2010. Differentiation of effector CD4⁺ T cell populations (*). *Annu. Rev. Immunol.* V. 28. P. 445.

Assessment of Mitochondrial Condition in CD4⁺ and CD8⁺ T Cells from Healthy Subjects

L. B. Korolevskaya^{a, *}, E. V. Saidakova^a, N. G. Shmagel^a, and K. V. Shmagel^a

^a*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms Ural Branch Russian Academy of Sciences (IEGM UB RAS), Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences (PFRC UB RAS), Perm, 614081 Russia*
**e-mail: bioqueen@mail.ru*

Despite the active study of T lymphocyte mitochondria under pathology, data on the organelles' condition in healthy people are not presented in the available literature. The aim of the present work was to assess mitochondrial condition in CD4⁺ and CD8⁺ T cells of healthy subjects. In CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes, the mitochondrial mass and mitochondrial membrane potential, as well as the content of mitochondrial activity regulator (PGC-1 α) were determined by flow cytometry. Naive and memory cells, as well as resting and cycling lymphocytes were compared. It has been shown for the first time that in healthy subjects, mitochondrial condition differs between CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes. Despite the cell maturation stage or resting/cycling status, the mass and membrane potential of mitochondria in CD4⁺ T lymphocytes significantly exceed those in CD8⁺ T cells. Both CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes had higher mitochondrial mass, mitochondrial membrane potential, and PGC-1 α content in memory cells and cycling elements. Furthermore, the relationship between the level of the mitochondrial activity regulator and indices of mitochondrial condition differ significantly between CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes: the PGC-1 α content in CD4⁺ T cells was directly related to the mitochondrial mass, but in CD8⁺ T lymphocytes it was correlated with the organelles' membrane potential.

Keywords: CD4⁺ T lymphocytes, CD8⁺ T lymphocytes, mitochondria, memory cells, cycling cells, healthy subjects

УДК 611.811.018;576.7

НИТРОКСИДЕРГИЧЕСКИЕ И КАЛЬРЕТИНИН-СОДЕРЖАЩИЕ НЕПИРАМИДНЫЕ НЕЙРОНЫ ГИППОКАМПА КРЫСЫ

© 2022 г. И. О. Илясов¹, Д. А. Суфиева¹, *, Д. Э. Коржевский¹¹Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, 197376 Россия

*E-mail: dinobrione@gmail.com

Поступила в редакцию 05.03.2022 г.

После доработки 10.03.2022 г.

Принята к публикации 13.03.2022 г.

Интернейроны гиппокампа, в отличие от пирамидных нейронов, представляют собой разнородную группу нейронов, которые отличаются морфологическими, цитохимическими и функциональными характеристиками. Целью данного исследования стало проведение сравнительного морфологического анализа нитроксидаергических (NOS⁺) и кальретинин-содержащих (CR⁺) непирамидных нейронов зон CA1 и CA3 гиппокампа крысы с помощью иммуногистохимических методов. Были продемонстрированы качественные и количественные различия популяций NOS⁺ и CR⁺ непирамидных нейронов в различных слоях изучаемых зон гиппокампа. Также были показаны различия в количественном составе изучаемых популяций интернейронов в двух субрегионах гиппокампа, которые соответствуют дорсальному и промежуточному гиппокампу. Было установлено, что NOS⁺-интернейроны более характерны для дорсального гиппокампа, в то время как большее число CR⁺-интернейронов представлено в промежуточном гиппокампе. Полученные в ходе исследования данные могут способствовать пониманию роли непирамидных нейронов в формировании функциональной специализации разных областей гиппокампа.

Ключевые слова: гиппокамп, интернейроны, NO-синтаза, кальретинин, иммуногистохимия

DOI: 10.31857/S004137712203004X

Гиппокамп является важной, сложноорганизованной и одной из наиболее изучаемых структур головного мозга. Установлено, что он задействован в обучении, консолидации памяти и пространственной ориентации, а также выполняет ряд других функций (Burgess et al., 2002; Squire, 2004). В гиппокампе принято выделять 4 зоны – CA1–CA4 и зубчатую фасцию (Lorente de Nò, 1934). Эта структура характеризуется ламинарной организацией. В зонах гиппокампа различают несколько слоев: stratum pyramidale (str. pyramidale), сформированный основными клетками гиппокампа – глутаматергическими пирамидными нейронами; str. oriens, образованный дендритами пирамидных нейронов; str. lucidum, который выделяется только в зоне CA3 и состоит из проксимальных участков дендритов пирамидных нейронов, где формируются синаптические контакты с аксонами мшистых волокон; str. radiatum, состоящий из множества дендритных ветвей пирамидных клеток, также здесь проходят коллатерали Шаффера, идущие из зоны CA3 в зону CA1; и str. lacunosum-moleculare, образованный, главным образом, из претерминальных и терминальных ветвлений апикальных дендритов пирамидных нейронов, здесь проходят афферентные волокна от энториальной коры и таламуса (Amaral et al., 1984).

Пирамидные нейроны являются основными клетками гиппокампа и опосредуют его главные функции. Известно, что развитие таких заболеваний как болезнь Альцгеймера, височная эпилепсия, шизофрения могут быть спровоцированы нарушениями в работе этих нейронов (Leite et al., 2002; Tóth et al., 2010; Zhou et al., 2017; Farahimanesh et al., 2018). В связи с этим, именно данные клетки всегда привлекали пристальное внимание исследователей. Однако исследования последних лет показывают, что не менее важную роль играют клетки, модулирующие работу пирамидных клеток – непирамидные нейроны гиппокампа. Эти клетки важны не только для регулирования возбудимости отдельных нейронов, но также участвуют во временной и пространственной синхронизации передачи нервного импульса гранулярными клетками зубчатой фасции и пирамидными клетками гиппокампа (Pelkey et al., 2017; Booker, Vida, 2018).

В то время как пирамидные нейроны представляют собой морфологически однородную группу клеток, непирамидные нейроны (10–20% от общего числа нейронов гиппокампа) формируют гетерогенную популяцию, состоящую из трех основных типов ГАМКергических нейронов: корзинчатых и аксоаксональных интернейронов, образующих контакты с начальными сегментами аксонов, а также прокси-

мальными отделами дендритов пирамидных нейронов; интернейронов, формирующих синаптические связи с дистальными отделами дендритов пирамидных нейронов; интернейронов, регулирующих активность других интернейронов (Tóth, Maglóczy, 2014). Сведения, касающиеся организации интернейронов гиппокампа, фрагментарны и часто противоречивы, что может объясняться как методическими сложностями при их идентификации, так и функциональной специализацией различных участков гиппокампа, которая может проявляться в различиях клеточного состава. Исследование непирамидных нейронов, их строения, организации и функций, необходимо для понимания механизмов функционирования нейронных сетей гиппокампа. Целью данного исследования стало сравнительное морфологическое изучение нитроксидаз (NOS⁺) и кальретинин-содержащих (CR⁺) непирамидных нейронов зон CA1 и CA3 гиппокампа крысы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материалом для настоящего исследования стал головной мозг половозрелых крыс-самцов породы Вистар ($n = 6$). При содержании и умерщвлении животных соблюдали международные правила Хельсинкской декларации о гуманном обращении с животными и “Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных” (приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.). Материал был фиксирован в цинк-этанол-формальдегиде и залит в парафин по общепринятой методике. Изготавливали фронтальные срезы толщиной 5 мкм. Предметом изучения стала область гиппокампа, расположенная от 3 мм до 5.52 мм относительно Брегмы (Paxinos, Watson, 2007).

Для иммуногистохимического исследования интернейронов гиппокампа препараты после стандартной процедуры депарафинирования подвергали тепловому демаскированию в модифицированном цитратном буфере S1700 (Dako, Дания). Для выявления интернейронов гиппокампа использовали мышиные моноклональные антитела к NeuN (клон A60) (Chemicon, США) в разведении 1 : 800, кроличьи поликлональные антитела к антигену нитроксидазы (NOS) (Spring Bioscience, США) в разведении 1 : 1000 и кроличьи поликлональные антитела к кальретинину (CR) (RTU, Genemed, США). Для выявления NeuN в качестве вторичных антител использовали набор Mach 2 Universal HRP Polymer Kit for mouse or rabbit (Biocare medical, США) с добавлением 2% сыворотки крови крысы, для выявления NOS и CR применяли набор Reveal Polyvalent HRP DAB Detection System (Spring Bioscience, США). Визуализацию продукта реакции проводили с использованием хромогена 3,3'-диаминобензидина (DAB⁺, Dako, Дания). Часть срезов подкрашивали квасцовым гематоксилином. После стандартной процедуры обезвоживания препараты заключали в перманентную среду Cyto-

seal 60 (Richard-Allan Scientific, США). Анализ препаратов проводили, используя световой микроскоп Leica DM750, оснащенный камерой ICC 50. Получение и обработку изображений осуществляли в программе LAS EZ (Leica, Германия).

Определение числа клеток осуществляли в программе Fiji (ImageJ) с применением плагина Cell Counter. В каждом случае подсчет клеток производили в зонах CA1 и CA3 гиппокампа по трем полям зрения для каждой зоны. Количество клеток пересчитывали на единицу площади, равную 1 мм². Также, расчеты производили в двух субрегионах гиппокампа, соответствующих координатам 3–4.36 мм (далее регион I) и 4.36–5.52 мм (далее регион II) относительно Брегмы. Данные представлены в виде средней \pm ошибка средней. Проверку на нормальность распределения вариант выборок производили с помощью критерия Колмогорова–Смирнова, далее использовали непараметрический критерий Манна–Уитни. Для сравнения популяций интернейронов выбранных субрегионов и сравнения количества интернейронов, выявляемых разными маркерами (NeuN, NOS и CR), использовали непараметрический критерий Манна–Уитни. Для статического анализа использовали программу Graph Pad Prism (Graph Pad Software, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

При изучении препаратов, окрашенных с использованием антител к ядерному антигену NeuN, наблюдали, что данный маркер выявляет как нейроны слоя str. pyramidale, так и нейроны, локализующиеся в других слоях гиппокампа – непирамидные нейроны (рис. 1). Продукт реакции локализовался в ядрах и перинуклеарной цитоплазме этих клеток. Иногда окрашивались начальные сегменты отростков. Непирамидные клетки имели либо округлую, либо веретеновидную форму, которая была типична для определенного слоя в каждой из исследуемых зон. Так, на границе str. lacunosum-moleculare и str. radiatum зоны CA1 была обнаружена большая популяция интернейронов, клетки которых имели веретеновидную форму и лежали тангенциально слою str. pyramidale (рис. 1а). В str. radiatum зоны CA1 интернейроны были округлой или веретеновидной формы, с радиально направленным отростком (рис. 1б). В str. oriens локализовались непирамидные нейроны с перикарионом веретеновидной или округлой формы (рис. 1в). В зоне CA3 в слоях str. lucidum, str. radiatum и str. lacunosum-moleculare найдены нейроны преимущественно округлой формы.

Было установлено, что при сравнении количества NeuN⁺-клеток между зонами CA1 и CA3 по всем слоям (кроме пирамидного) непирамидных нейронов в зоне CA3 было достоверно больше, по сравнению с зоной CA1 ($p = 0.006$). При сравнении количества непирамидных нейронов, расположенных в

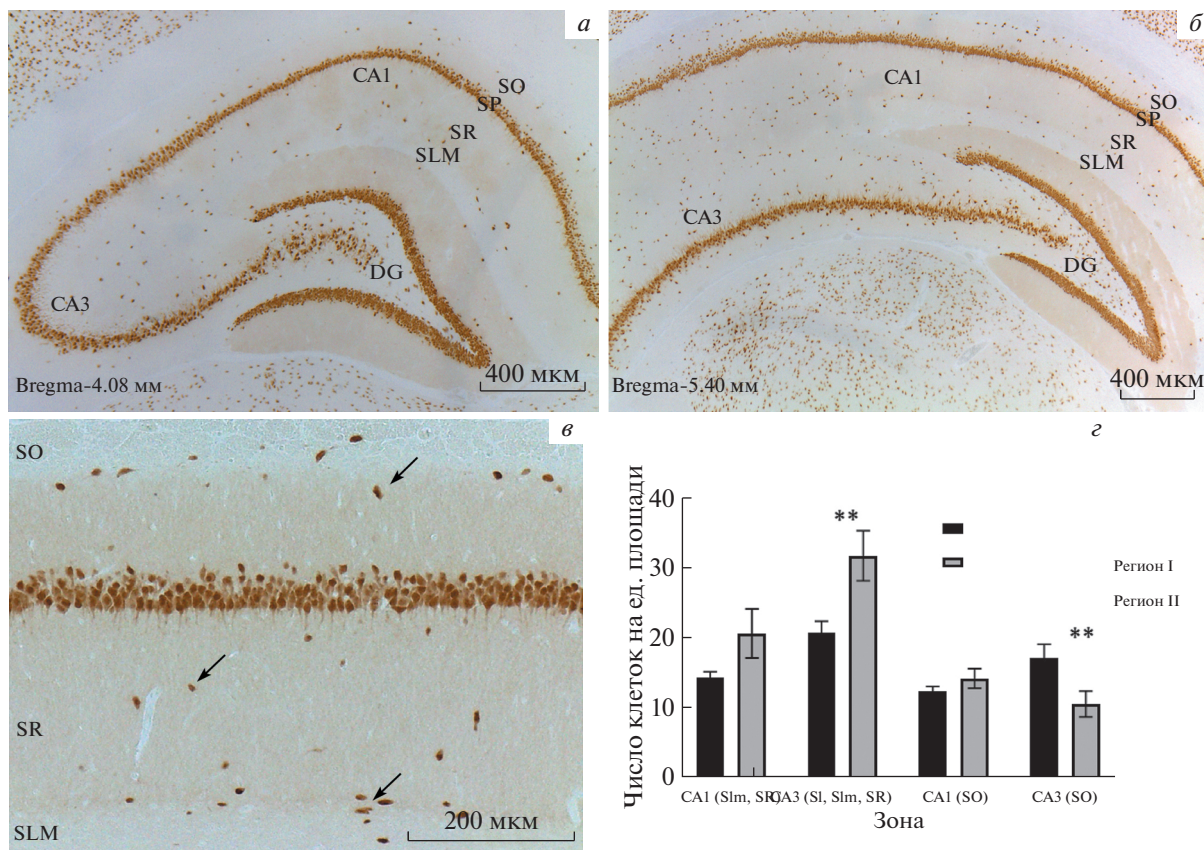


Рис. 1. Иммуногистохимическая реакция на антиген NeuN в регионе I (3–4.36 мм) (а), регионе II (4.36–5.52 мм) (б) и в зоне CA1 (в) гиппокампа крысы. Стрелками обозначены непирамидные нейроны. г – Число NeuN⁺-интернейронов в различных слоях зон CA1 и CA3 двух субрегионов гиппокампа. SL – str. lacunosum, SLM – str. lacunosum-moleculare, SR – str. radiatum, SP – str. pyramidale; SO – str. oriens; DG – зубчатая фасция гиппокампа. * – различия достоверны для $p < 0.05$; ** – для $p < 0.01$.

разных слоях зон CA1 и CA3 двух субрегионов гиппокампа, статистически значимые различия были выявлены в слоях str. lacunosum, str. lacunosum-moleculare, str. radiatum зоны CA3 (достоверно больше в регионе II, $p = 0.006$) и в str. oriens зоны CA1 (достоверно больше в регионе I, $p = 0.007$) (рис. 1г).

При анализе препаратов, окрашенных с использованием антител к NOS, наблюдали, что данный маркер не идентифицируется в пирамидных нейронах, но выявляется в непирамидных нейронах всех слоев гиппокампа. Данный белок локализуется как в телах (перинуклеарная область), так и в отростках клеток. Степень интенсивности окраски для разных клеток варьировала от слабой до умеренной. Часто выявлялись отростки мультиполярных нейронов (рис. 2а). Хорошо выявлялись, как правило, 1–2 радиально направленных отростка, которые имели варикозные утолщения по всей их длине (рис. 2б).

При сопоставлении количества интернейронов, расположенных в разных слоях зон CA1 и CA3 субрегионов I и II гиппокампа, статистически значимые различия были выявлены в str. pyramidale зоны CA1 (достоверно больше в регионе I, $p = 0.002$) и str.

lucidum зоны CA3 (достоверно больше в регионе I, $p = 0.009$) (рис. 2в).

Исследование кальретинина (CR) показало, что данный белок не обнаруживается в пирамидных нейронах, но идентифицируется в непирамидных нейронах всех слоев гиппокампа (рис. 3а). Продукт реакции локализуется как в телах, так и в отростках этих клеток. Отростки длинные, и часто имеют варикозные расширения по всей длине. Как правило, встречались биполярные, либо мультиполярные нейроны, крупные отростки которых были направлены радиально. Также кальретинин-иммуноположительные клетки и отростки были обнаружены в слоях str. oriens и str. lacunosum-moleculare, однако здесь они были ориентированы тангенциально, вдоль слоя (рис. 3б).

Количественная оценка CR⁺-непирамидных нейронов при сравнении зон CA1 и CA3 по всем слоям показала, что в зоне CA3 CR⁺-нейронов локализуется больше, по сравнению с CA1 зоной гиппокампа ($p = 0.0009$). Максимальное число кальретинин-положительных клеток было характерно для слоя str. pyramidale зоны CA3 (рис. 3в). Кроме того, в регионе II этих клеток оказалось значительно боль-

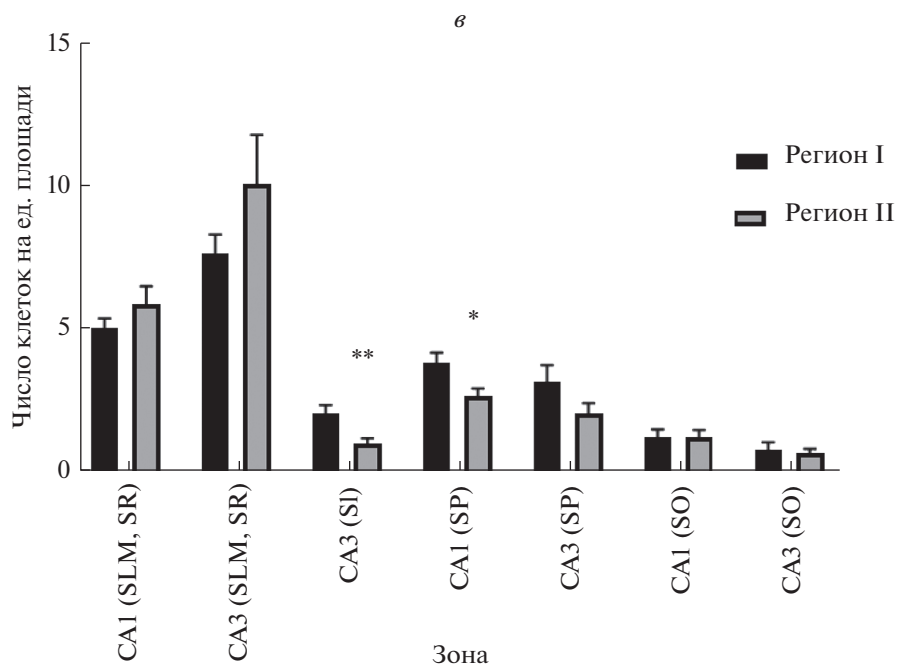
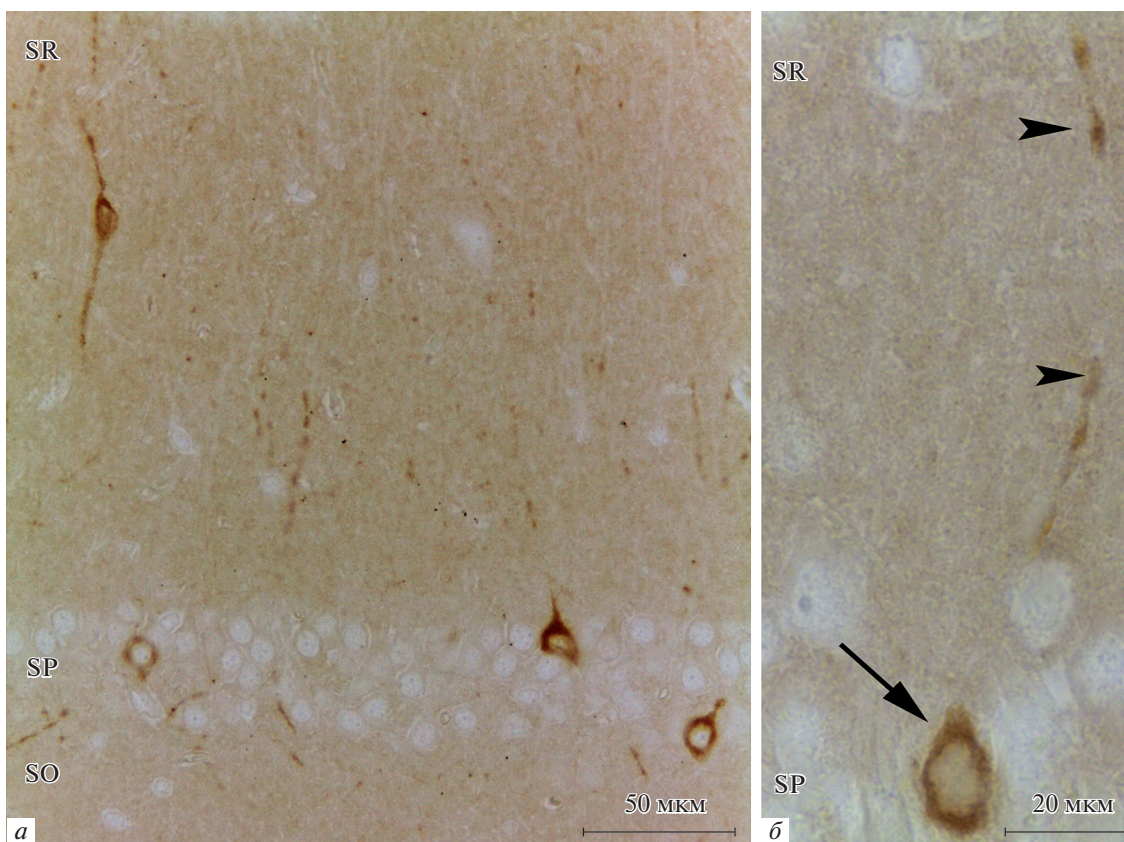


Рис. 2. Иммуногистохимическая реакция на NO-синтазу (NOS). *а, б* – Зона CA1 гиппокампа. *Стрелкой* обозначены NOS⁺-интернейроны, *головки стрелок* указывают на варикозные утолщения. *в* – Число NOS⁺ интернейронов в различных слоях зон CA1 и CA3 двух субрегионов гиппокампа. SLM – str. lacunosum-moleculare; SR – str. radiatum; SI – str. lucidum; SP – str. pyramidale; SO – str. oriens. * – различия достоверны для $p < 0.05$; ** – для $p < 0.01$.

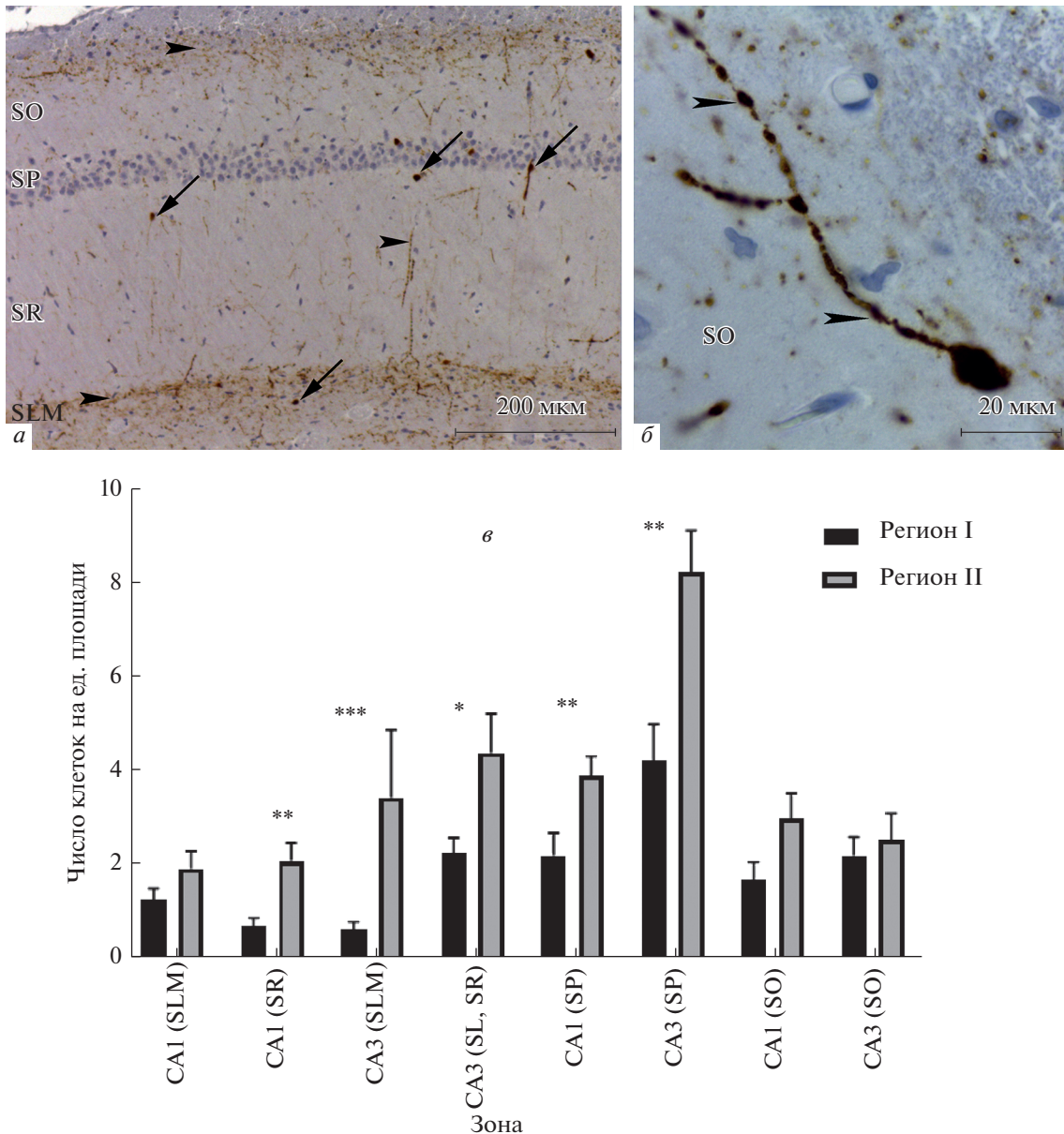


Рис. 3. Иммуногистохимическая реакция на кальретинин (CR). *а* – Зона CA1 гиппокампа. Стрелки указывают на CR⁺-интернейроны, головки стрелок – на CR⁺-волокна иммунореактивных клеток; SLM – str. lacunosum-moleculare; SR – str. radiatum; SP – str. pyramidale; SO – str. oriens; *б* – CR⁺-интернейрон слоя str. oriens с отростком, имеющим варикозные утолщения. *в* – Число CR⁺-интернейронов в различных слоях зоны CA1 и CA3 регионов I и II гиппокампа. SLM – str. lacunosum-moleculare; SR – str. radiatum; SL – str. lacunosum; SP – str. pyramidale; SO – str. oriens; * – различия достоверны для $p < 0.05$; ** – для $p < 0.01$; *** – для $p < 0.001$.

ше (в 2 раза), по сравнению с регионом I ($p = 0.002$). В зоне CA1 слоя str. pyramidale также число этих нейронов оказалось больше для региона II по сравнению с регионом I ($p = 0.002$). Для этого региона характерно большее число CR⁺-непирамидных нейронов по сравнению с регионом I также и для str. radiatum зоны CA1 ($p = 0.003$), для str. lacunosum-moleculare зоны CA3 ($p = 0.0008$) и слоев str. radiatum, str. lucidum зоны CA3 ($p = 0.04$) (рис. 3в).

При оценке различий числа клеток, иммунореактивных к NeuN, NOS и CR, было установлено, что различия статистически значимы для группы непиримидных нейронов, выявленных при реакции на NeuN, и группы NOS совместно с CR во всех исследуемых зонах ($p < 0.0001$). Также статистически значимые различия наблюдаются при сравнении клеток иммунореактивных к NOS и CR во всех исследуемых зонах (рис. 4).

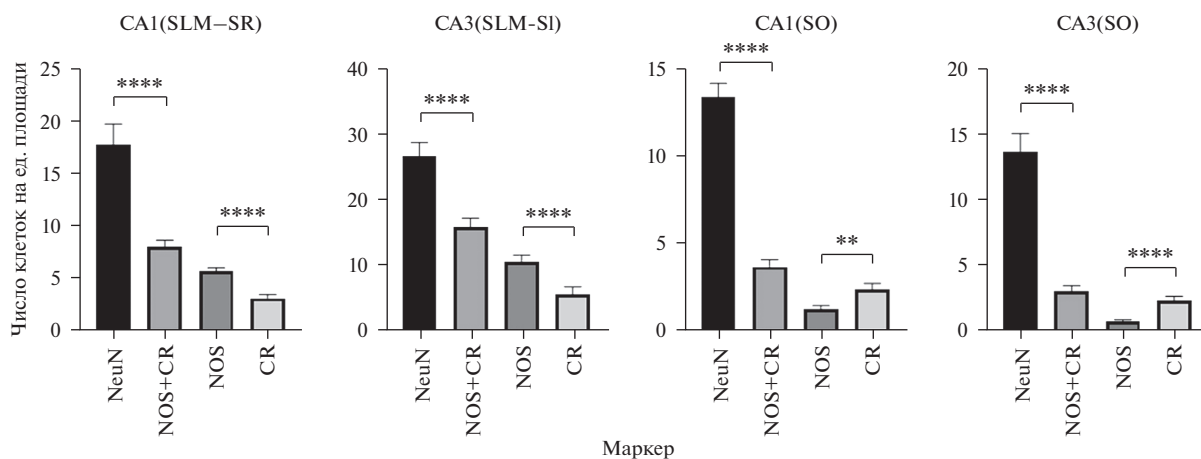


Рис. 4. Число иммунореактивных клеток при реакциях на NeuN, NOS, CR в слоях зон CA3 и CA1. SLM – str. lacunosum-moleculare; SR – str. radiatum; SP – str. pyramidale; SO – str. oriens. ** – различия достоверны для $p < 0.01$; **** – для $p < 0.0001$.

ОБСУЖДЕНИЕ

Интернейроны гиппокампа представляют собой разнообразную группу нейронов, которые различаются не только морфологическими и физиологическими, но и цитохимическими особенностями, что позволяет идентифицировать определенные типы непирамидных нейронов гиппокампа с помощью иммуногистохимических методов. Среди таких маркеров можно выделить NO-синтазу (NOS), кальретицин (CR), парвальбумин, соматостатин, вазоинтестинальный пептид (VIP) и др. (Booker, Vida, 2018). Настоящее исследование было сфокусировано на анализе нитроксидергических и кальретицин-содержащих интернейронов гиппокампа, как одних из наименее охарактеризованных типов интернейронов.

При анализе препаратов, окрашенных на NOS, были идентифицированы нейроны, характеризующиеся бисеровидными утолщениями отростков, которые преимущественно локализовались в слоях str. lacunosum-moleculare и str. radiatum, а также встречались в слое str. pyramidale. В литературных источниках описаны два типа интернейронов гиппокампа, содержащих NOS. К ним относятся нейроглиоформные клетки (neurogliaform cells) и плюшевидные клетки (Ivy cells) и интернейроны, ингибирующие активность других интернейронов, 3-го типа (Interneuron selective interneurons type 3, ISI-3 клетки) (Pelkey et al., 2017). NOS⁺-интернейроны, локализующиеся в слое str. lacunosum-moleculare, можно отнести к нейроглиоформным клеткам, так как только этот тип NOS⁺ интернейронов локализуется в данном слое. Для плюшевидных и ISI-3 клеток типична локализация в str. radiatum и str. pyramidale (Booker, Vida, 2018; Guet-McCreight et al., 2020).

CR-содержащие интернейроны в настоящей работе встречались во всех слоях зон CA1 и CA3 гиппокампа. Известно, что в гиппокампе CR⁺-клетками являются интернейроны, ингибирующие актив-

ность других интернейронов (ISI cells), среди которых выделяют три типа по цитохимическим, топографическим и функциональным особенностям. CR⁺-интернейроны, обнаруженные в слое str. lacunosum-moleculare и на границе этого слоя со слоем str. radiatum, можно отнести к ISI клеткам 2-го типа. В слоях str. pyramidale и str. radiatum располагаются ISI 1-го и 3-его типов, в то время как лежащие тангенциально вдоль слоя CR⁺ клетки в слое str. oriens относятся только к ISI клеткам 1-го типа (Pelkey et al., 2017; Booker, Vida, 2018; Guet-McCreight et al., 2020). Выявленные нами CR⁺-волокна в str. lacunosum-moleculare зон CA1 и CA3 являются аксонами глутаматергических CR-содержащих нейронов маммиллярных и таламических ядер (Tóth, Maglóczky, 2014). Кальретицин-положительные волокна слоя str. oriens могут оказаться аксонами и дендритами интернейронов этого слоя. Была выявлена группа CR⁺-интернейронов слоя str. oriens, посылающих аксон к ядрам медиальной перегородки (Gulyás et al., 1996).

Известно, что зоны гиппокампа CA1 и CA3 выполняют различные функции и отличаются не только по морфологии пирамидных нейронов и экспрессии в них ряда маркеров (Meyer, Radulovic, 2021), но также и составом интернейронов в этих регионах. В нашем исследовании установлено, что общее количество интернейронов в зоне CA3 превышает таковое в зоне CA1. Зона CA3 отличается более выраженной модуляцией активности нейронов с помощью ГАМК, по сравнению с зоной CA1 (Suzuki, Okada, 2007; Alkadhi, 2019). Это может объясняться тем, что зона CA3 является промежуточным звеном перфоративного пути (между гранулярными клетками зубчатой фации и пирамидными нейронами зоны CA1 гиппокампа) (Lorente de Nò, 1934), и, вероятно, для данной области более важно обеспечение вариативности регуляторных механизмов, контролируемых различными афферентными волокнами и, соответственно,

активность пирамидных нейронов зоны СА3. Наибольшее количество NOS⁺-интернейронов также характерно для str. lucidum и str. lacunosum-moleculare зоны СА3. Показано, что нейроглиаформные клетки вносят существенный вклад в ингибирование гранулярных клеток зубчатой фасции и сравнительно недавно открытых гранулярных клеток зон СА2 и СА3 (Price et al., 2005; Krook-Magnuson et al., 2012; Lau et al., 2017), что может объяснить функциональную значимость NOS-реактивных интернейронов поверхностных слоев и str. pyramidale этих зон. Наибольшее количество CR⁺-интернейронов было зарегистрировано в пирамидном слое СА3. Здесь они необходимы для подавления активности интернейронов, ингибирующих дистальные отделы дендритов пирамидных нейронов, таким образом, обеспечивая локальную активацию пирамидных нейронов зоны СА3. Известно, что популяция непирамидных нейронов, экспрессирующих соматостатин (SOM), также иннервируется CR⁺-интернейронами (Tuan et al., 2014).

В настоящее время известно, что существуют функциональные и морфологические различия между областями гиппокампа вдоль септотемпоральной оси, на основании которых выделяют дорсальный, промежуточный и вентральный гиппокамп (Farahimanesh et al., 2018; Gergues et al., 2020; Lothmann et al., 2021; Levone et al., 2021). Одной из самых изученных функций дорсальной области гиппокампа считается консолидация долговременной пространственной памяти, которая может быть следствием генерации долговременных депрессий синаптической передачи, после долговременных потенциалов в зубчатой фасции и в зоне СА1 в данном регионе (Kemp, Manahan-Vaughan, 2008). В ходе другого недавнего исследования, было показано, что в сходных условиях генерации долговременной депрессии не происходит в промежуточном субрегионе гиппокампа, где регистрировалась только кратковременная депрессия. Это, вероятно, вызвано быстрой обработкой поступающей информации и может быть связано с участием промежуточного гиппокампа в формировании кратковременной памяти (Vikbaev, Manahan-Vaughan, 2008). Основой перечисленных выше различий могут быть вариации в качественном и количественном составе интернейронов промежуточного и дорсального отделов гиппокампа. В настоящем исследовании вдоль септотемпоральной оси были выделены две области, которые топографически могут соответствовать областям в дорсальном (3–4.36 мм – Регион I) и промежуточном (4.36–5.52 мм – Регион II) гиппокампе. Количественная оценка интернейронов показала, что в некоторых слоях гиппокампа число изучаемых типов непирамидных нейронов различаются по выделенным двум регионам. Так, общее количество интернейронов в поверхностных слоях зоны СА3 оказалось большим в промежуточном гиппокампе, по сравнению с дорсальным субрегионом. В str. oriens наблюдалась противоположная картина, здесь количество NeuN⁺-со-

держащих непирамидных нейронов зоны СА3 дорсального гиппокампа было больше, по сравнению с соответствующей областью промежуточного субрегиона. Часть клеток, локализованная в str. oriens СА3 дорсального гиппокампа, по своей морфологии соответствует OLM-клеткам (oriens/alveus interneurons with lacunosum-moleculare axon arborization) (Mikulovic et al., 2015). Данные интернейроны посылают аксон в str. lacunosum-moleculare, ингибирующий дистальные дендриты пирамидных клеток и контролируя афферентный вход от нейронов энториальной коры и таламуса (Klausberger, 2009). Возможно, регуляция данного звена нейронной цепи имеет большее значение в дорсальном гиппокампе. Роль OLM-клеток в ритмогенезе подтверждается рядом исследований, в связи с чем они могут играть важную роль в механизме формирования памяти (Klausberger et al., 2003; Gulyás et al., 2003; Antonoudiou et al., 2020). Содержание NOS⁺-интернейронов слоя str. pyramidale зоны СА1 оказалось выше в дорсальном гиппокампе, по сравнению с той же областью промежуточного субрегиона. За счет большего количества NOS-реактивных клеток, вероятно, индуцируют в дорсальном гиппокампе более выраженный и зависимый от тета-колебаний тормозящий постсинаптический потенциал в пирамидных нейронах СА1 (Price et al., 2005). Это может быть важно для обеспечения регуляции тета-ритма и переключения работы пирамидных нейронов СА1 между режимами, которые зависят от прямых афферентных путей от энториальной коры в str. lacunosum-moleculare и путей от коллатерали Шаффера (Meyer, Radulovic, 2021). Большее количество CR⁺-интернейронов, найденных в пирамидном и поверхностных слоях зон СА1 и СА3 промежуточного гиппокампа, по сравнению с аналогичными слоями в дорсальном гиппокампе, может говорить о большей степени растормаживания нейронной сети, путем подавления активности интернейронов, формирующих синаптические связи с дистальными отделами дендритов пирамидных нейронов, что может иметь значение для кратковременной памяти. Также было отмечено максимальное количество NeuN⁺-интернейронов в поверхностных слоях зоны СА3, большая часть которых должна соответствовать интернейронам, иннервирующим дистальные отделы дендритов пирамидных нейронов, регуляцию которых осуществляют CR⁺-интернейроны, численность которых здесь также высока. Популяция CR⁺-интернейронов зоны СА3 может играть важную роль и в регуляции активности интернейронов слоя str. oriens, например, OLM-клеток (Gulyás et al., 1996).

Известно, что в нервной ткани ядерный антиген NeuN обнаруживается в большинстве зрелых нейронов (Gusel'nikova, Korzhevskiy, 2015), что позволяет выявить как пирамидные, так и непирамидные нейроны вне зависимости от их цитохимических маркеров. Было отмечено, что NeuN⁺-интернейронов зна-

чительно больше, по сравнению с интернейронами CR⁺ и NOS⁺. Это может указывать на то, что эти интернейроны составляют относительно небольшую долю интернейронов гиппокампа. Популяции CR⁺ и NOS⁺ интернейронов существенно меньше по численности, поскольку данные маркеры не характерны для многих групп интернейронов, в том числе иннервирующих дистальные отделы пирамидных нейронов, а также для корзинчатых и аксо-аксональных клеток, которые относятся к группе парвальбумин-содержащих интернейронов и которые являются доминирующей (примерно 50% всех интернейронов) и одной из наиболее хорошо охарактеризованных типов интернейронов (Klausberger, 2009; Tóth, Maglóczy, 2014; Booker, Vida, 2018).

Таким образом, в ходе настоящего исследования были установлены качественные и количественные различия популяций нитроксидаэргических и кальретинин-содержащих непирамидных нейронов зон CA1 и CA3 гиппокампа крысы. Было продемонстрировано, что в зоне CA3 наблюдается большее число непирамидных нейронов, чем в зоне CA1. Были выявлены различия в составе и количестве непирамидных нейронов в выбранных для анализа регионах (регион I и регион II), которые относятся к дорсальному и промежуточному гиппокампу соответственно. Было установлено, что NOS⁺-интернейроны более характерны для дорсального гиппокампа, в то время как большее число CR⁺-интернейронов представлено в промежуточном гиппокампе. Полученные в ходе исследования данные указывают на необходимость раздельного анализа клеточного состава интернейронов различных регионов гиппокампа при проведении физиологических исследований.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБНУ “Институт экспериментальной медицины”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При работе с животными соблюдены все применимые международные и национальные принципы гуманного обращения с животными. При содержании и умерщвлении животных соблюдали международные правила Хельсинкской декларации о гуманном обращении с животными и “Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных” (приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Alkadhi K.A. 2019. Cellular and molecular differences between area CA1 and the dentate gyrus of the hippocampus. Mol.

Neurobiol. V. 56. P. 6566.

<https://doi.org/10.1007/S12035-019-1541-2>

Amaral D.G., Insausti R., Cowan W.M. 1984. The commissural connections of the monkey hippocampal formation. J. Comp. Neurol. V. 224. P. 307.
<https://doi.org/10.1002/CNE.902240302>

Antonoudiou P., Tan Y.L., Kontou G., Louise Upton A., Mann E.O. 2020. Parvalbumin and somatostatin interneurons contribute to the generation of hippocampal gamma oscillations. J. Neurosci. V. 40. P. 7668.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0261-20.2020>

Bikbaev A., Manahan-Vaughan D. 2008. Relationship of hippocampal theta and gamma oscillations to potentiation of synaptic transmission. Front. Neurosci. V. 2. P. 56.
<https://doi.org/10.3389/NEURO.01.010.2008>

Booker S.A., Vida I. 2018. Morphological diversity and connectivity of hippocampal interneurons. Cell Tissue Res. V. 373. P. 619.
<https://doi.org/10.1007/S00441-018-2882-2>

Burgess N., Maguire E.A., O'Keefe J. 2002. The human hippocampus and spatial and episodic memory. Neuron. V. 35. P. 625.
[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00830-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00830-9)

Farahimanesh S., Karimi S., Haghparast A. 2018. Role of orexin-1 receptors in the dorsal hippocampus (CA1 region) in expression and extinction of the morphine-induced conditioned place preference in the rats. Peptides. V. 101. P. 25.
<https://doi.org/10.1016/J.PEPTIDES.2017.12.017>

Gergues M.M., Han K.J., Choi H.S., Brown B., Clausing K.J., Turner V.S., Vainchtein I.D., Molofsky A.V., Kheirbek M.A. 2020. Circuit and molecular architecture of a ventral hippocampal network. Nat. Neurosci. V. 23. P. 1444.
<https://doi.org/10.1038/S41593-020-0705-8>

Guet-McCreight A., Skinner F.K., Topolnik L. 2020. Common principles in functional organization of VIP/calretinin cell-driven disinhibitory circuits across cortical areas. Front. Neural Circuits. V. 14. P. 32.
<https://doi.org/10.3389/FNCIR.2020.00032/BIBTEX>

Gulyás A.I., Hájos N., Freund T.F. 1996. Interneurons containing calretinin are specialized to control other interneurons in the rat hippocampus. J. Neurosci. V. 16. P. 3397.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-10-03397.1996>

Gulyás A.I., Hájos N., Katona I., Freund T.F. 2003. Interneurons are the local targets of hippocampal inhibitory cells which project to the medial septum. The Eur. J. Neurosci. V. 17. P. 1861.
<https://doi.org/10.1046/J.1460-9568.2003.02630.X>

Gusel'nikova V.V., Korzhevskiy D.E. 2015. NeuN as a neuronal nuclear antigen and neuron differentiation marker. Acta naturae. V. 7. P. 42.
<https://doi.org/10.32607/20758251-2015-7-2-42-47>

Kemp A., Manahan-Vaughan D. 2008. The hippocampal CA1 region and dentate gyrus differentiate between environmental and spatial feature encoding through long-term depression. Cereb. Cortex. V. 18. P. 968.
<https://doi.org/10.1093/CERCOR/BHM136>

Klausberger T., Magill P.J., Márton L.F., Roberts J.D.B., Cobden P.M., Buzsáki G., Somogyi P. 2003. Brain-state- and cell-type-specific firing of hippocampal interneurons in vivo. Nature. V. 421. P. 844.
<https://doi.org/10.1038/NATURE01374>

Krook-Magnuson E., Varga C., Lee S.H., Soltesz I. 2012. New dimensions of interneuronal specialization unmasked by

- principal cell heterogeneity. *Trends Neurosci.* V. 35. P. 175. <https://doi.org/10.1016/J.TINS.2011.10.005>
- Lau P.Y.P., Katona L., Saghy P., Newton K., Somogyi P., Lamsa K.P. 2017. Long-term plasticity in identified hippocampal GABAergic interneurons in the CA1 area in vivo. *Brain Struct. Funct.* V. 222. P. 1809. <https://doi.org/10.1007/S00429-016-1309-7>
- Leite J.P., Chimelli L., Terra-Bustamante V.C., Costa E.T., Assirati J.A., De Nucci G., Martins A.R. 2002. Loss and sprouting of nitric oxide synthase neurons in the human epileptic hippocampus. *Epilepsia.* V. 43 Suppl. 5. P. 235. <https://doi.org/10.1046/J.1528-1157.43.S.5.29.X>
- Levone B.R., Codagnone M.G., Moloney G.M., Nolan Y.M., Cryan J.F., O'Leary O.F. 2021. Adult-born neurons from the dorsal, intermediate, and ventral regions of the longitudinal axis of the hippocampus exhibit differential sensitivity to glucocorticoids. *Mol. Psychiatry.* V. 26. P. 3240. <https://doi.org/10.1038/S41380-020-0848-8>
- Lothmann K., Deitersen J., Zilles K., Amunts K., Herold C. 2021. New boundaries and dissociation of the mouse hippocampus along the dorsal-ventral axis based on glutamatergic, GABAergic and catecholaminergic receptor densities. *Hippocampus.* V. 31. P. 56. <https://doi.org/10.1002/HIPO.23262>
- Lorente de Nò R. 1934. Studies on the structure of the cerebral cortex. *Journal für Psychologie und Neurologie.* V. 46. P. 113.
- Meyer M.A.A., Radulovic J. 2021. Functional differentiation in the transverse plane of the hippocampus: An update on activity segregation within the DG and CA3 subfields. *Brain Res. Bull.* V. 171. P. 35. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESBULL.2021.03.003>
- Mikulovic S., Restrepo C.E., Hilscher M.M., Kullander K., Leão R.N. 2015. Novel markers for OLM interneurons in the hippocampus. *Front. Cell Neurosci.* V. 9. P. 201. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2015.00201>
- Paxinos G., Watson C. 2007. The rat brain in stereotaxic coordinates, 6th edition. N.Y.: Elsevier/Academic Press. 456 p. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(84\)80278-7](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(84)80278-7)
- Pelkey K.A., Chittajallu R., Craig M.T., Tricoire L., Wester J.C., McBain C.J. 2017. Hippocampal GABAergic inhibitory interneurons. *Physiol. Rev.* V. 97. P. 1619. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00007.2017>
- Price C.J., Cauli B., Kovacs E.R., Kulik A., Lambolez B., Shigemoto R., Capogna M. 2005. Neurogliaform neurons form a novel inhibitory network in the hippocampal CA1 area. *J. Neurosci.* V. 25. P. 6775. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1135-05.2005>
- Squire L.R. 2004. Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiol. Learn Mem.* V. 82. P. 171. <https://doi.org/10.1016/J.NLM.2004.06.005>
- Suzuki E., Okada T. 2007. Regional differences in GABAergic modulation for TEA-induced synaptic plasticity in rat hippocampal CA1, CA3 and dentate gyrus. *Neurosci. Res.* V. 59. P. 183. <https://doi.org/10.1016/J.NEURES.2007.06.1472>
- Tóth K., Ero'ss L., Vajda J., Halász P., Freund T.F., Maglóczy Z. 2010. Loss and reorganization of calretinin-containing interneurons in the epileptic human hippocampus. *Brain.* V. 133. P. 2763. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWQ149>
- Tóth K., Maglóczy Z. 2014. The vulnerability of calretinin-containing hippocampal interneurons to temporal lobe epilepsy. *Front. Neuroanat.* V. 8. P. 100. <https://doi.org/10.3389/FNANA.2014.00100>
- Tyan L., Chamberland S., Magnin E., Camiré O., Francavilla R., Suzanne David L., Deisseroth K., Topolnik L. 2014. Dendritic inhibition provided by interneuron-specific cells controls the firing rate and timing of the hippocampal feedback inhibitory circuitry. *J. Neurosci.* V. 34. P. 4534. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3813-13.2014>
- Zhou X. yan, Zhang F., Ying C. jiang, Chen J., Chen L., Dong J., Shi Y., Tang M., Hu X. tong, Pan Z. hua, Xu N. na, Zheng K. yang, Tang R. xian, Song Y. jian. 2017. Inhibition of iNOS alleviates cognitive deficits and depression in diabetic mice through downregulating the NO/sGC/cGMP/PKG signal pathway. *Behav. Brain Res.* V. 322. P. 70. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2016.12.046>

Nitroxidergic and Calretinin-Containing Non-Pyramidal Neurons of the Rat Hippocampus

I. O. Iliasov^a, D. A. Sufieva^{a, *}, and D. E. Korzhevskii^a

^aInstitute of Experimental Medicine, St. Petersburg, 197376 Russia

*e-mail: dinobrione@gmail.com

Hippocampal interneurons, unlike pyramidal neurons, are a heterogeneous group of neurons that differ in morphological, cytochemical, and functional characteristics. The research was aimed at comparative morphological analysis of nitroxidergic (NOS⁺) and calretinin-containing (CR⁺) non-pyramidal neurons of the rat hippocampus CA1 and CA3 zones using immunohistochemical methods. Qualitative and quantitative differences between the populations of NOS⁺ and CR⁺ non-pyramidal neurons in different layers of the hippocampal CA1 and CA3 zones were demonstrated. Also it was shown the differences in quantitative composition of the interneurons under study in two subregions of the hippocampus, which correspond to the dorsal and intermediate hippocampus. It was found that NOS⁺ interneurons are more common in the dorsal hippocampus, while a greater number of CR⁺ interneurons are present in the intermediate hippocampus. The data obtained may contribute to understanding the role of non-pyramidal neurons in the formation of functional specialization of different hippocampal areas.

Keywords: hippocampus, interneurons, NO-synthase, calretinin, immunohistochemistry

УДК 57.085

СТРУКТУРА И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПАРАВЕРТЕБРАЛЬНЫХ СУХОЖИЛИЙ

© 2022 г. А. А. Гайдаш¹*, В. К. Крутько¹, М. И. Блинова², А. В. Нащекин³, О. Н. Мусская¹,
К. В. Скроцкая⁴, О. А. Сычева¹, Л. В. Кульбицкая¹, Ю. П. Токальчик⁵, А. И. Кулак¹

¹Институт общей и неорганической химии НАН Белоруссии, Минск, 220072 Белоруссия

²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

³Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург 194021 Россия

⁴Научно-исследовательский институт физико-химических проблем Белорусского государственного университета,
Минск, 220006 Белоруссия

⁵Институт физиологии НАН Белоруссии, Минск, 220072 Белоруссия

*E-mail: aljack880@gmail.com

Поступила в редакцию 10.02.2022 г.

После доработки 01.03.2022 г.

Принята к публикации 04.03.2022 г.

Сухожильная ткань активно используется в качестве сырья при получении коллагеновых гелей. При этом не всегда учитываются структура и физико-химические свойства внутрикапсулярных пучков и оболочек (перитеноны) сухожилий. С целью уточнения этих сведений методами сканирующей электронной микроскопии, рентгенофазового и термического анализов, а также инфракрасной (ИК) спектроскопии изучены внутрикапсулярные пучки и перитеноны паравертебральных сухожилий крыс линии Вистар. Установлено, что внутрикапсулярные сухожильные коллагеновые волокна собраны в пучки цилиндрической формы, сшитые фибриллярными узлами. Приоритетными локациями фибриллярных узлов являются обжимы в пограничных слоях внутрикапсулярных пучков и перитенонов, эндотеноны и зоны ремоделирования коллагеновых фибрилл. Перитеноны имеют каркасную структуру, образующую в наружном и внутреннем слоях солидные блоки коллагеновых массивов. Тканеспецифическими структурами перитенонов являются сесамовидные островки и глобулы, игольчатые и пластинчатые разрастания, остеоноподобные ламеллы, участвующие в упрочнении и оссификации сухожилий по механизмам гетерогенной и гомогенной нуклеации кальцийфосфатов. Основными компонентами минеральной фазы являются пирофосфаты семейства $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ и гидроксиапатиты. В сухожильных пучках пирофосфаты деконденсированы, что препятствует образованию гидроксиапатита. В перитенонах пирофосфаты конденсированы в моноклинные фенотипы, индуцирующие синтез гидроксиапатита. Имеются различия и в состоянии гидроксиапатита: в пучках он кристаллический, в перитенонах – аморфный. По данным термического анализа и ИК-спектроскопии внеклеточный матрикс внутрикапсулярных сухожильных пучков более подвижен, фибриллярный коллаген частично коагулирован и гидрофобен, устойчив к мацерации. В перитенонах внеклеточный матрикс вязкий, коллагеновые волокна гидрофильны и чувствительны к мацерации. Полученные данные имеют значение при прогнозировании специализированных свойств коллагеносодержащих материалов, учитывающих структурно-метаболические особенности анатомических компонентов сухожилий.

Ключевые слова: сухожилия, перитеноны, коллагеновые фибриллы, сесамовидная ткань, гетерогенная и гомогенная нуклеация кальцийфосфатов, пирофосфаты, гидроксиапатит

DOI: 10.31857/S0041377122030038

Сухожильная ткань – это переходная структура, которая занимает специализированные анатомиче-

ские пространства между мышцами и костным остовом. Сухожилия призваны реагировать, прежде всего, на сжимающие нагрузки. Именно поэтому сухожильная ткань филогенетически структурируется достаточно скоро: впервые появляется у беспозвоночных хордовых в виде миосепт (Gemballa et al., 2003). В целом эволюция сухожильной ткани предопределяет необходимость реагировать на сжимающие и растягивающие силы путем последовательно-

Принятые сокращения: ГК – гиалуроновая кислота; ДТА – дифференциально-термический анализ; ДТГ – дифференциальная термогравиметрия; ИК – инфракрасная; ТГ – термогравиметрия; РФА – рентгенофазовый анализ; СЭМ – сканирующая электронная микроскопия; СР – кальцийфосфат; НА – гидроксиапатит; Рi – неорганический фосфат; РРi – пирофосфат.

го приобретения дополнительных степеней свободы одно- дву- и трехмерных массивов коллагеновых волокон. При нарастании мощности деформирующих нагрузок сухожилия оптимизируют соотношение жесткости и прочности локальным уплотнением коллагеновых фибрилл и отверждением экстрафибрилярного матрикса, образуя временные или постоянно присутствующие, в той или иной мере подвижные очаги кальцификации, формирующиеся в том числе и в составе сесамовидной ткани (Summers, 2002).

Важным объектом адаптивных модификаций является внеклеточный матрикс — объем, состав и структура которого прогрессируют в ходе эволюции нелинейным образом. В одноосных сухожилиях, собранных в пучки, появляются многоосные оболочечные надстройки, создаваемые для более дифференцированного реагирования на механические нагрузки. Механобиологический посыл очевиден — сформировать композит-чувствительный материал, армированный фибриллярным коллагеном, с возможностями к механорецепции и направленному структурированию внеклеточного матрикса (Lanir, 1978).

Многомерность механобиологических трендов, их консерватизм, скачки структурно-генетических проявлений (подавлений), персистенция рудиментов и непредсказуемая актуализация атавизмов — природные обстоятельства, безусловно, затрудняющие разработку стратегий технологической обработки коллагенсодержащих сырьевых материалов. Механобиологический тренд главный, но не единственный. Не менее важен и морфогенетический тренд, реализующий сближение сухожилий с камбиальными структурами скелетных надкостниц. В такой ситуации в пограничные слои, в оболочечные образования сухожилий неизбежно проникают структуры регенераторного пула.

Механобиологические и морфогенетические факторы диверсифицируют структурно-метаболический континуум сухожильной ткани, вносят нюансы в состав и структуру пучковых и оболочечных компонентов сухожилий. Осознание механизмов действия этих факторов определит проектирование многомерных биоматериалов, тактику специализации задаваемых свойств по разным целевым направлениям (Zhang et al., 2021). Особое значение это имеет в матричных технологиях *in vitro*, где коллагеновые подложки используют в качестве индукторов, формирующих эпидермальные пласты и эпителиально-мезенхимные переходы, направляют хондроили остеогенез.

Цель работы: определить особенности структуры и физико-химических свойств внутрикапсулярных пучков и оболочечных перитенонов паравертебральных сухожилий, извлеченных из хвостов крыс Вистар.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объект исследования. Использовали половозрелых самцов крыс Вистар с массой тела 250–300 г, выдержанных на сбалансированном рационе. Изучали внутрикапсулярные сухожильные нити и перитеноны паравертебральных сухожилий, извлеченные из хвостов крыс. Биопсию производили у крыс, наркотизированных этиловым эфиром. Протоколы эксперимента утверждены этическим комитетом Института физиологии НАН Белоруссии и соответствовали Санитарным нормам 2.1.2.12-18-2006 (Национальный реестр правовых актов Республики Белоруссия, 2012. № 8/25189).

Иссечение образцов произведено по следующему алгоритму: отсепаровка кожи и круговой надрез связок, перелом и разделение позвоночного столба в средней части хвоста, извлечение из проксимального сегмента внутрикапсулярных сухожильных пучков, продольное вскрытие сухожильной оболочки, отсечение свободной части париетальных листков перитенонов. Данная техника позволяет выделять перитеноны без примеси надкостницы и, соответственно, уменьшает вероятность проникновения в образцы костного гидроксиапатита (НА). Исследуемые образцы распределены на две группы: 1-я — внутрикапсулярные сухожильные нити, 2-я — париетальные листки перитенонов.

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ). Образцы фиксировали на протяжении 3–5 сут в водном 3%-ном растворе глутарового альдегида, промывали в трех сменах дистиллированной воды, высушивали в течение 24 ч при температуре 37°C, дегидратировали в водных растворах этанола восходящей концентрации. Анализ морфологии поверхности полученных образцов производили на сканирующем электронном микроскопе LEO 1420 (Carl Zeiss, Германия) после напыления золота на установке K550X (Emitech, Англия).

Рентгенофазовый анализ (РФА). Режимы подготовки образцов, предназначенных для физико-химических исследований, представлены в табл. 1. Особенности пробоподготовки для РФА: свежесрезанные образцы хранили в морозильной камере до использования. Для уменьшения избыточного рассеяния рентгеновского излучения толстыми образцами отбирали тонкие (толщиной около 1 мм) внутрикапсулярные сухожильные нити и листки перитенонов и помещали на 3–5 сут в морозильную камеру (при –6°C) до проведения анализа. Непосредственно перед выполнением анализа образцы размораживали и подвергали обработке: в режимах 1 и 2 (табл. 1), РФА выполнен на дифрактометре ADVANCE D8 (Bruker, Германия) при $\text{CuK}\alpha = 0.15405$ нм с использованием базы данных ICDD PDF-2: карбонат-гидроксиапатит [00-035-0180], гидроксиапатит [01-084-1998]. Дифрактограммы сняты в диапазоне 5°–70° в масштабе 2 θ с шагом 0.01°, что позволило идентифицировать фазы.

Термический анализ. Для дериватографии использовали образцы, подготовленные в режиме 3 (табл. 1). Параметры термогравиметрии (ТГ), дифференциальной термогравиметрии (ДТГ) и дифференциально-термического анализа (ДТА) определены на дериватографе STA 409 PC LUXX (NETZSCH, Германия) при скорости потока воздуха 50 мл/мин.

ИК-спектроскопия. Использовали “влажный” и “твердотельный” варианты. Для влажного варианта готовили образцы в режиме 3 (табл. 1). Съемку спектров осуществляли в режиме “отражения” на ИК-Фурье-микроскопе Hyperion (Bruker, Германия) в диапазоне $2000-8000\text{ см}^{-1}$ с применением 15-кратного G_{ig}-объектива, позволяющего с приемлемой точностью позиционировать зонд спектрометра. Для твердотельного варианта использовали образцы, подготовленные в режиме 4 (табл. 1), спектры на отражение записывали на ИК-спектрометре Tensor 27 (Bruker, Германия) в диапазоне $400-4000\text{ см}^{-1}$.

Методологический подход реализован на принципе инструментального континуума: непротиворечивость результатов, полученных разными видами анализов, признание значимыми малых структурных сдвигов, если таковые затрагивают разнородные компартменты, выявление системности и стремление к целостным интерпретациям.

Статистическую достоверность межгрупповых различий оценивали по t_{Si} -критерию Стьюдента. По этическим соображениям выборки животных минимизировали: 3–5 особей в группе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сканирующая электронная микроскопия. Между висцеральным листком перитенона и позвоночным столбом (подлежащей надкостницей) имеется рыхлый волокнистый слой. Слой пронизан широкими интерстициальными каналами, местами, придающими ему спонгиозность, и ориентированными вдоль позвоночника (рис. 1а). Очевидно, что в условиях *in vivo* слой заполнен тканевой жидкостью (в том числе лимфой) и в этом смысле представляет собой гидродинамическую подушку, смягчающую локальные механические напряжения.

Внутрикапсулярные сухожильные нити собраны в плотно упакованные симметричные пучки цилиндрической формы, что придает волокнам линейную эластичность. В одном сухожилии в зависимости от возраста содержится 7–10 пучков диаметром 300–500 мкм. Пучки неравномерно волнисты, направлены вдоль длинной оси (рис. 1б). При растяжении за счет вязкой упругости пучки выпрямляются, увеличивая жесткость ткани с некоторой потерей прочности на изгиб (Lanig, 1980). На поверхностях пучков в изгибах контактирующие волокна перебрасываются друг относительно друга, образуя спаренные структуры – “фибрилярные узлы” (рис. 1в). В глубоких слоях пучков выявляются резко меняющие направ-

Таблица 1. Характеристика режимов подготовки образцов для физико-химических исследований

Режим	Пробоподготовка
1	После размораживания образцы разогревали до комнатной температуры и выдерживали 24 ч в герметичном контейнере
2	Размороженные образцы отжигали в течение 5 ч при 500°C
3	Образцы подвергали анализу не позднее чем через 0.5 ч после биопсирования
4	Сразу после биопсирования образцы помещали на 24 ч в термостат при температуре 37°C в открытом контейнере. Навеску образца с 800 мг порошка КВг измельчали на лабораторной шаровой вибромельнице с частотой колебаний 50 Гц, повторяя три раза. Таблетки прессовали на прессе Carl Zeiss Jena при нагрузке 400 кг/см^2

ление микрофибриллы: изгибаются под острыми углами и уходят вглубь (характерная для фибриллярного коллагена экваториальная исчерченность становится невидимой), уплощаются и принимают зигзагообразный ход (рис. 1г). Узлы участвуют в обжимах, углы и длина которых варьируют в разных слоях пучков: чем глубже, тем уже и короче. Не менее важен и показатель связности (r) в узлах: в сухожильных пучках r варьирует в пределах 3.1–3.3, что свидетельствует о понижении пластичности и увеличении устойчивости к действию интенсивных нагрузок (Burla et al., 2020). Зигзагообразные структуры, возможно являющиеся ранней разновидностью фибриллярных узлов, склонны накапливаться вблизи участков ремоделирования микрофибрилл, что способствует структурированию внеклеточного матрикса. Однако в зрелом сухожилии главным предназначением фибриллярных узлов является демпфирование сил растяжения (сжатия), а также скручивания при вращательно-колебательных движениях (Kastelic et al., 1978).

Перитеноны – это оболочечная ткань каркасной структуры, оплетающая внутрикапсулярные сухожильные пучки. В перитенонах ход волокон определяется слоем оболочки. В пограничных слоях перитенонов фибриллы складываются: в наружном слое в широкие пласты и упакованные солидные блоки (рис. 1д), внутренние волокна собраны в тяжи эндотенонов, которые разветвляются и уходят вглубь сухожильных пучков. Большая часть контактирующих микрофибрилл параллельны друг другу, они реже переплетаются и еще реже формируют фибриллярные узлы обжатия. В срединном слое перитенонов каркас преимущественно расправлен: волокна образуют широкопетлистую сеть, ячейки которой заполнены клеточными и волокнистыми (рис. 1е) компонентами матрикса. Каркас полиморфен: где-то расправ-

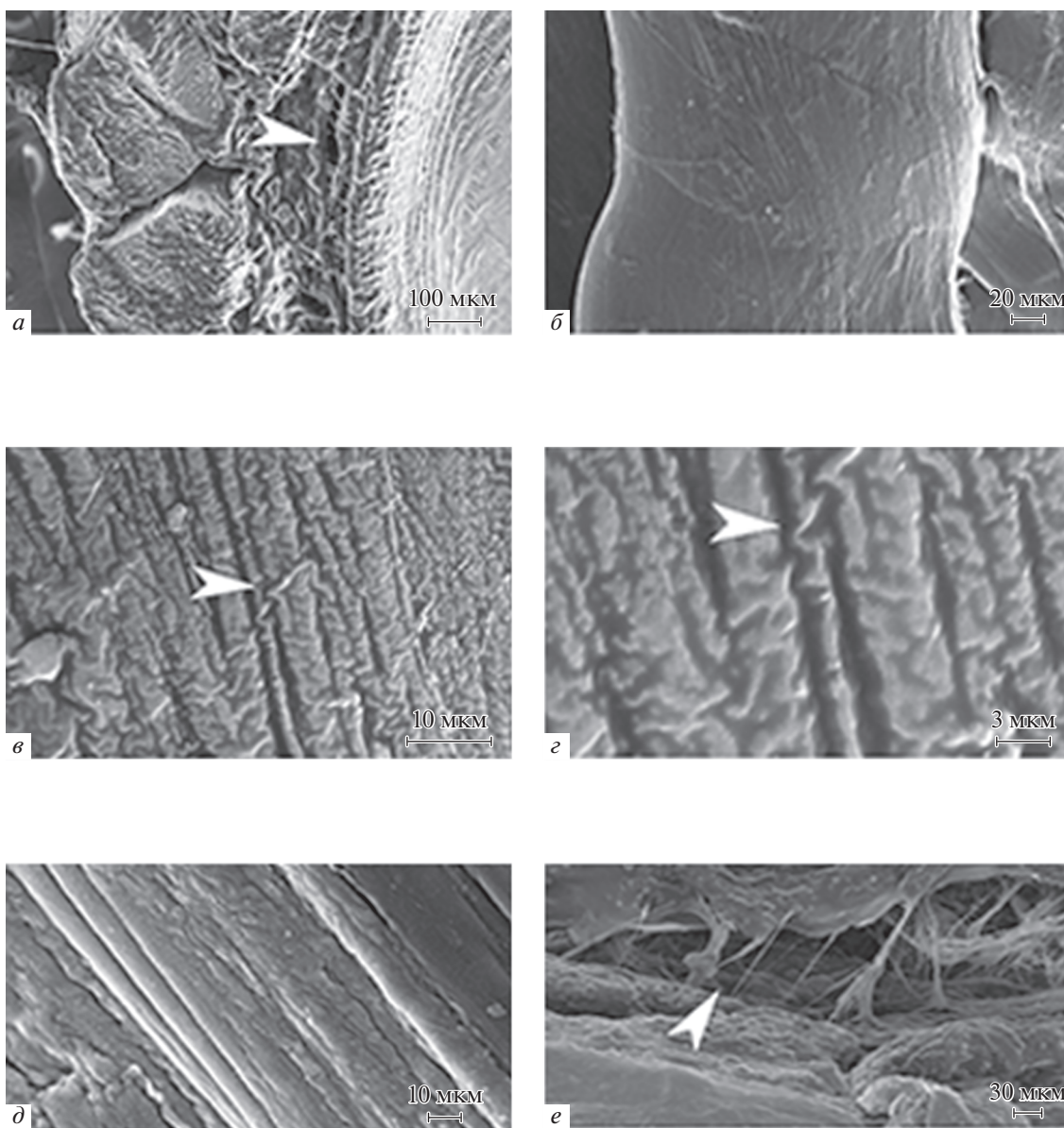


Рис. 1. Микрофотографии сухожилий (СЭМ). *a* – Интерстициальные каналы между висцеральным листком перитонеона и подлежащей надкостницей позвоночного столба (*стрелка*); *б* – волнистые внутрикапсулярные пучки, направленные по длинной оси; *в* – фибриллярные узлы, образованные перекидыванием контактирующих коллагеновых волокон с формированием спаренных структур (*стрелка*); *г* – зигзагообразные структуры в области образования фибриллярных узлов (*стрелка*); *д* – упакованные в солидные блоки коллагеновых волокон в наружном слое перитонеона; *е* – широкопетлистая сеть, образованная расправленными коллагеновыми волокнами в срединном слое перитонеона (*стрелка*).

лен, где-то коллабировав. Показатель связности варьирует в пределах 2.1, что свидетельствует о высокой пластичности и подвижности каркаса (Jansen et al., 2018). Это разупорядочивает гидродинамические потоки внеклеточного матрикса, усиливает внутреннее трение и повышает риски локальных микромеханических конфликтов в виде эксцессов неупругих деформаций и релаксаций. Очевидно, что ведущим механобиологическим мотивом структурирования каркаса перитонеонов становится рассеивание механической энергии. И в ходе эволюции этот мотив

развивает морфогенетический потенциал перитонеонов. В поле этого тренда формируются пластинчатые структуры, а именно: сесамовидные островки, игольчатые и ламеллоподобные разрастания.

Островки сесамовидной ткани неравномерно рассеяны в межклеточном пространстве и расположены преимущественно вблизи мягкой части энтез – костно-сухожильных соединений. Предпочтительность локации не случайна: энтезы – это механосенситивные центры, регулирующие распределение механических напряжений (Benjamin et al., 2006). На СЭМ ост-

ровки представлены очагами уплотненного внеклеточного матрикса, в центре которых имеются отростчатые минерализованные теноциты с признаками распада. Вблизи островков, а иногда и в контакте с ними располагаются ветвящиеся теноциты с признаками метаболической активности (рис. 2а). Важным компонентом островков являются сесамоидные тельца – овальные частицы (глобулы), диаметром до 15 мкм. Глобулы двухслойны – внутренний рыхлый слой интегрирован с подлежащим матриксом, наружный имеет вид полуободка (рис. 2б). Сесамоидные тельца имеют клеточное происхождение и цитогенетически связаны с матриксными пузырьками отростков теноцитов. Структура мембран (билипидная цитолемма), состав содержимого (кислые и щелочные фосфатазы; полисахариды, устойчивые к гиалуронидазам; протеогликаны; белки-транспортёры и кальцийфосфаты (СР)), а также поведение глобул (накопление в зонах ремоделирования) идентичны свойствам матриксных везикул, участвующих в процессах первичной минерализации регенерирующей хрящевой и костной тканью (Amizuka et al., 2012; Hasegawa et al., 2017). Основная часть сесамоидных глобул залегает в поверхностных слоях островков разрозненно, но нередко частицы обнаруживаются вблизи пор и лакун (рис. 2в). В области одного островка может находиться несколько десятков глобул, количество которых регулируется путем почкования с неравномерным распределением внутреннего содержимого.

Игольчатые разрастания – это остроконечные выросты матрикса, напоминающие “клювики”, расположенные чаще на поверхностях сесамоидных островков (рис. 2г). Направление структурных преобразований очевидно – расширение площади для гетерогенной нуклеации СР, что, по сути, является проявлением остеогенной дифференцировки. Остеогенная направленность проявляется и в другой функционально важной локации, а именно в пограничных слоях, в париетальных листках перитенонов. Здесь игольчатые формы принимают более развернутую структуру остеогенной направленности: пластинки имеют широкие основания, остроконечны, ветвятся и переплетаются, содержат гаверсоподобные отверстия (рис. 2д). Пластинчатые образования – структуры полиморфные. Наиболее распространенной формой являются пластинки компактизированных коллагеновых микрофибрилл, располагающиеся в широких межфибриллярных пространствах. Это тонкие, плотные в основаниях, прозрачные и разволокненные в оконечностях листки (рис. 2е).

Другой разновидностью пластинчатых образований являются остеоноподобные ламеллы, встречающиеся также в париетальных листках перитенонов в основном по линии прикрепления к позвоночному столбу. Форма ламелл схожа с формой зрелых остеонов с характерным отверстием гаверсовых каналов в центре, но без кровеносных сосудов и нервных стволов (рис. 3а). Ламеллы бесклеточны, слоисты (3–5 плотно склеенных слоев), строго располагаются на внутрен-

ней поверхности перитенонов и являются отвердевшими структурами. Это указывает на атавистичность и рудиментарность остеоноподобных ламелл, на развитие которых, по-видимому, наложен эволюционный запрет.

Сесамоидные островки, игольчатые и пластинчатые межфибриллярные разрастания локализованы в глубоких слоях перитенонов, подвержены структурным метаморфозам, ориентируются к сухожильно-костным переходам. Приближение этих структур в область энтез усиливает их регенераторный потенциал остеогенной направленности, реализуемый с участием механизмов гетерогенной и гомогенной нуклеации СР. Гетерогенная нуклеация на матрицах коллагеновых волокон проявляется в виде отложения на поверхностях субфибрилл и межфибриллярных пластинок микрогранул СР и депозитов (рис. 3б, в). Это отражает общие представления о стадиях матричного структурирования СР: первичное осаждение аморфных гранул в просветах интердигитирующих каналов – зазоров вдоль осей α -цепей тропоколлагенов, на которых кластеры заряженных аминокислот формируют нуклеационные центры, и далее темплатирующий рост аморфных СР и формирование массивов параллельно ориентированных кристаллитов гидроксиапатита (НА). По мере созревания кристаллиты захватывают внешние поверхности фибрилл и переходят в стадию отвердевания (Landis et al., 2009; Nudelman et al., 2010).

Явления матричной нуклеации проявляются в виде отложения депозитов преимущественно вблизи мест бифуркации, а также в виде структурного полиморфизма: ассиметричное смещение центров коротких осей, не строгая перпендикулярность ходу коллагеновых субфибрилл, размерная и пространственная разупорядоченность. Это свидетельствует о том, что в состоянии физиологического покоя процессы гетерогенной нуклеации “заторможены” на разных стадиях, из которых более зрелые при действии соответствующих факторов среагируют полным развертыванием потенциалов к остеогенной дифференцировке. Во внутрикапсулярных пучках структуры гетерогенной нуклеации выявляются в значительно меньших объемах, нежели в слоях оболочек сухожилий. Кроме того, в сухожильных пучках отсутствуют сесамоидная ткань, игольчатые и пластинчатые структуры, эксклюзивное наличие которых в перитенонах обуславливает повышенную чувствительность к остеогенным откликам.

Гомогенная нуклеация осуществляется с участием сесамоидных глобул. С помощью СЭМ это наблюдается в виде прорастания мембран сфероидов ограниченными депозитами в основном призматической формы (рис. 3г). Депозиты встречаются примерно в 10% глобул, которые в ходе прорастания деформируются: уплощаются, принимают полиморфные, угловатые формы. Мономорфное, преимущественно ограниченное состояние депозитов, отсутствие промежуточ-

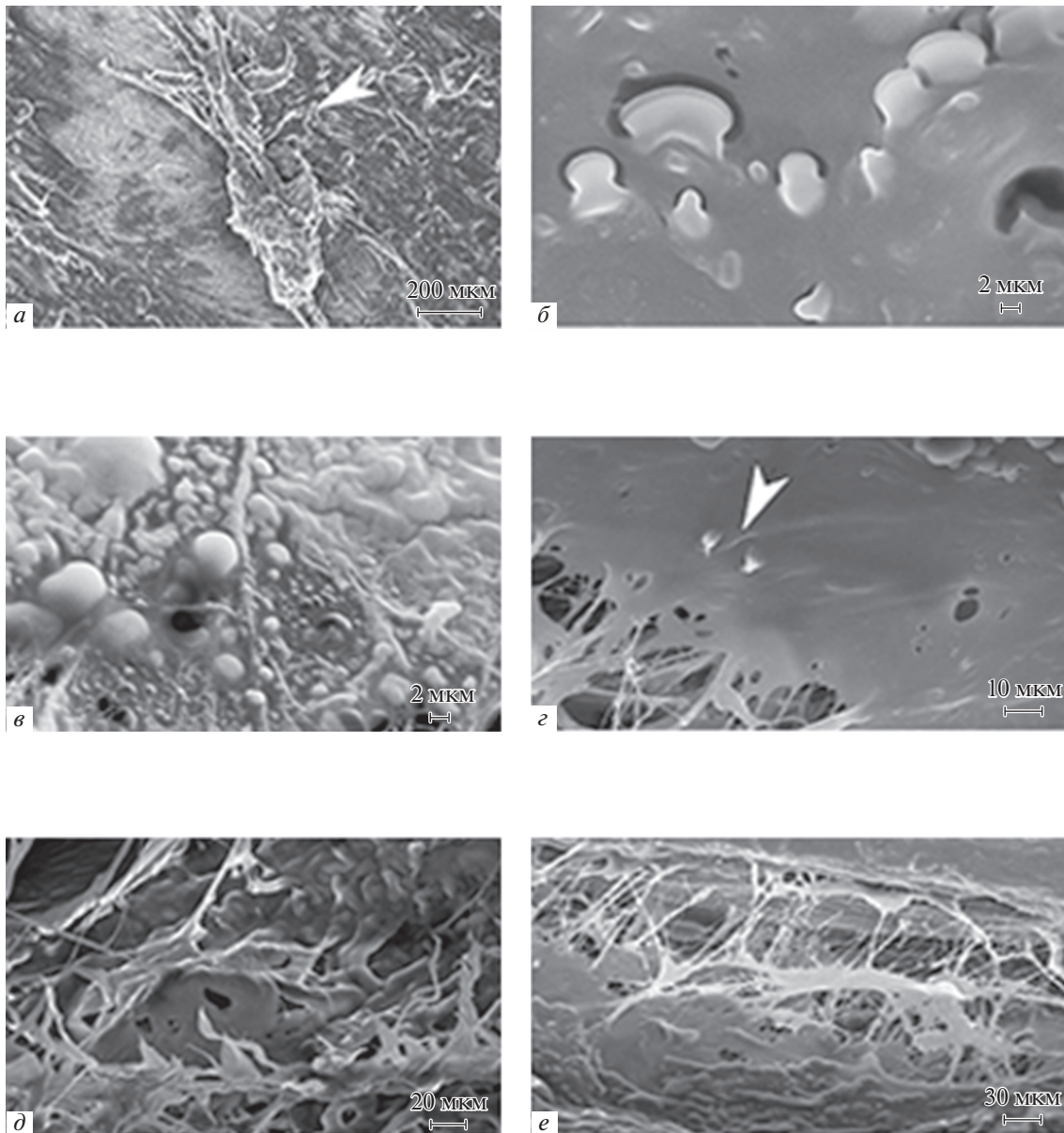


Рис. 2. Микрофотографии перитенонов (СЭМ). *a* – Сесамоидный островок, контактирующий с отростчатым теноцитом (стрелка); *b* – двухслойные глобулы сесамоидных островков, внутренний слой непосредственно интегрирован с подлежащим матриксом, наружный – имеет вид полуободка; *в* – сесамоидные глобулы, расположенные на поверхности островков, вблизи пор и лакун; *г* – игольчатые разрастания (“клювики”), расположенные на поверхностях сесамоидных островков (стрелка); *д* – остроконечные ветвящиеся пластинки с гаверсоподобными отверстиями; *е* – пластинки компактизированных коллагеновых микрофибрил, расположенные в межфибрилярных пространствах.

ных форм, проросшие глобулярные мембраны, свидетельствует о том, что процессы гомогенной нуклеации осуществляются в сесамоидных структурах по архаичным геобиохимическим механизмам, возможно, более консервативным, но для возбуждения которых требуются энергозатратные стимулы.

Рентгенофазовый анализ. На рентгендифрактограммах внутрикапсулярных сухожильных пучков и перитенонов, подготовленных в режиме 1, регистрируются рентгеноаморфные гало, формирующиеся за

счет вклада упругого рассеяния фибриллярного коллагена, имеющего квазикристаллическую структуру (рис. 4а, кривые 1, 2). Кристалличность обусловлена регулярными межмолекулярными ковалентными поперечными связями, определяется генетически детерминированной последовательностью аминокислотной сборки фибриллярных коллагенов (I, II, III и IV типов), не подвержена межвидовым вариациям и не является эксклюзивной особенностью хвостовых сухожилий. Учитывая, что фибрилляр-

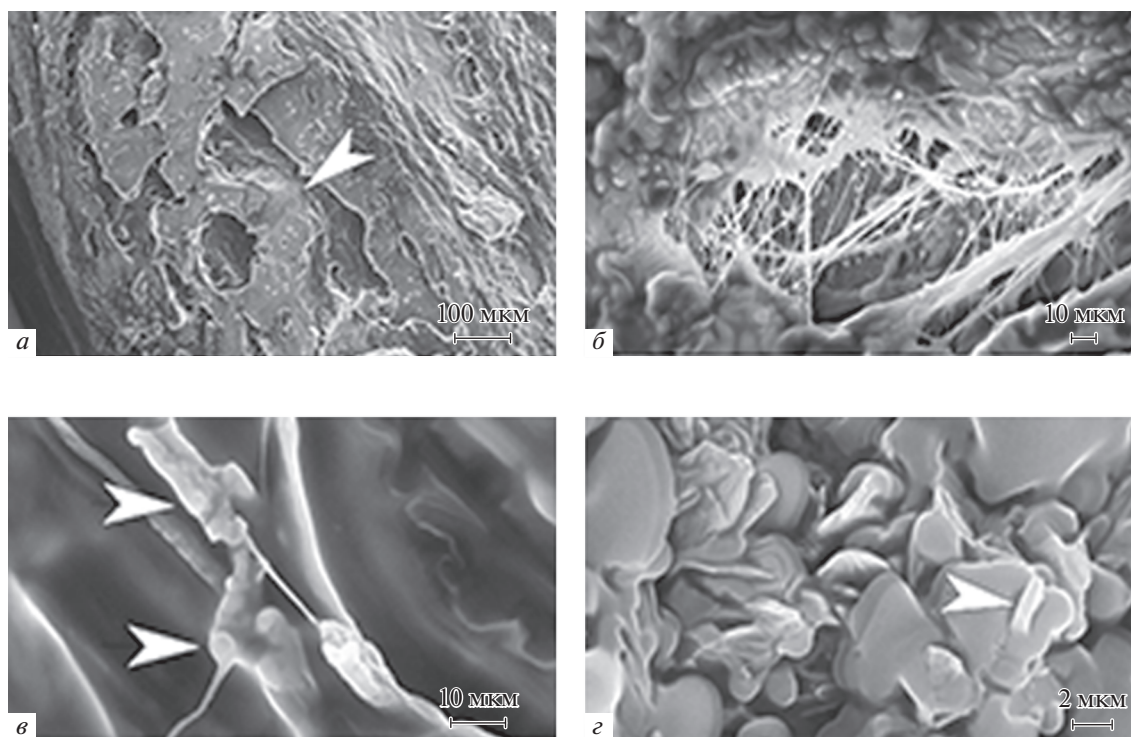


Рис. 3. Микрофотографии остеодных структур перитенонов (СЭМ). *а* – Ламеллы в виде тонких остеоноподобных пластинок с типичным отверстием гаверсова канала без кровеносных сосудов и нервных стволов (стрелки); *б* – отложения зерен кальцийфосфатов на поверхностях межфибриллярных пластинок; *в* – минеральные депозиты на коллагеновых субфибриллах (стрелки); *г* – огранные депозиты на поверхности капсул сесамондных глобул (стрелка).

ный коллаген I типа составляет более 95% органической фазы сухожилий, динамику гало можно соотнести к структурным вариациям, прежде всего именно этого типа коллагена. Вышеприведенные гало не позволяют судить о тонких изменениях в кристаллической структуре фибриллярного коллагена, организованного в крупную некристаллическую субстанцию. И тем не менее, присущие сухожильной ткани гофрированность и симметричная цилиндричность пучков в сочетании с пластинчатой и блочной организацией коллагенового каркаса, подвижность фибриллярных узлов в угловых и плоскостных обжимах структурированы, что делает возможным изучение такого типа образцов с помощью малоугловой рентгеновской дифракции (Gathercole, Keller, 1978).

Технические условия проведенного анализа, а именно существенное превышение размеров ячейки коллагенового домена (от ≈ 64 нм) относительно длины излучаемой волны ($\lambda_{\text{CuK}\alpha} = 0.15405$ нм) обеспечивают соблюдение условий корректности измерений в режиме малоугловой рентгенодифрактометрии. Исходя из этого, допущено, что динамика параметров гало, рефлексы которого устойчиво наблюдаются в диапазоне углов $2\theta < 30^\circ$, полезна при оценке интегральных трендов структурной (дисперсность, упорядоченность) вариабельности органической фазы сухожилий. Так, на рентгенодифрактограммах сухожильных пуч-

ков усредненное положение пиков гало варьирует в пределах 21.1° , перитенонов – 21.9° (рис. 4а, кривые 1, 2), что свидетельствует о более агрегированном и упорядоченном состоянии коллагеновой фракции внутрикапсулярных волокон, в сравнении с перитенонами. При прогреве до 500°C пик гало внутрикапсулярных волокон уширяется, изменяясь в диапазоне 20.5° – 21.7° , но усредненное положение пика сохраняется в исходном диапазоне (21.1°), а перитенонов сужается со сдвигом в малоугловую сторону – 20.5° (рис. 4а, кривые 3, 4). Это указывает на разнонаправленные тренды реагирования коллагеновых белков на экстремальные температуры: сухожильных пучков, склонных к разупорядочению, а перитенонов – наоборот.

Положения рефлексов минеральной фазы в значительной мере зависят от анатомического компонента сухожилий и способов пробоподготовки. В образцах 1-й и 2-й групп, подготовленных в режиме 1, наблюдается выход рефлексов НА и гидратированных неорганических пирофосфатов кальция (РР) семейства $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ (рис. 4б, кривая 2; рис. 4в, кривые 3, 4). Диагностика кристалличности и наноструктурности НА по данным РФА затруднительна. В сухожильных пучках характерный пик (31.8°) узкий, четко очерчен, что свидетельствует о доминировании упругого рассеяния. В перитенонах положение пика такое же (31.7°), но он широкий, конту-

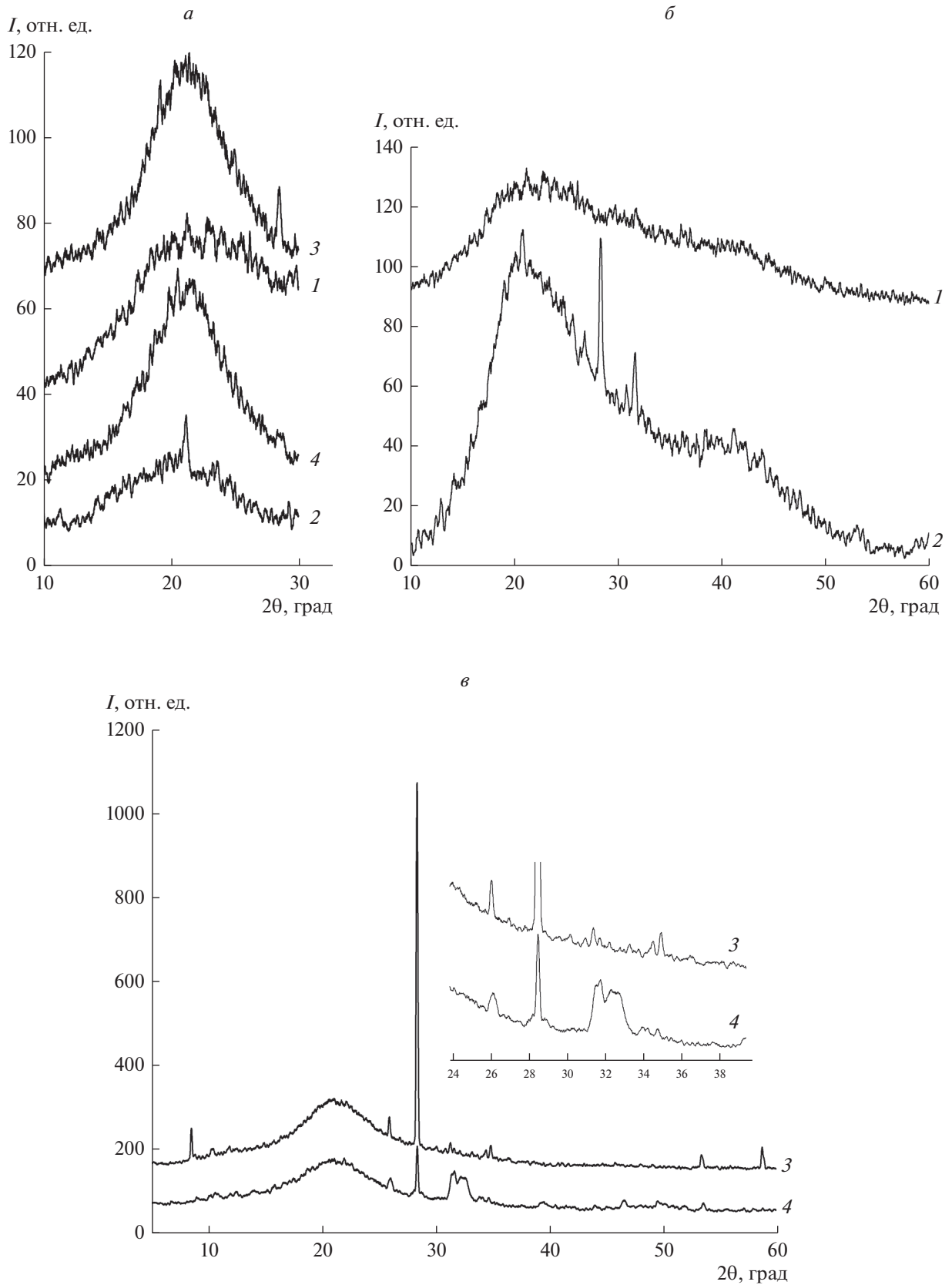


Рис. 4. Рентгендифрактограммы анатомических компонентов сухожилий. *a* – Дифрактограммы органической фазы (галло); *б* – дифрактограммы в области выхода рефлексов минеральной фазы нативных образцов; *в* – дифрактограммы в области выхода рефлексов минеральной фазы образцов после 500°C; 1 – сухожильные пучки нативные, 2 – перитеноны нативные, 3 – сухожильные пучки после 500°C, 4 – перитеноны после 500°C.

ры плохо очерчены, что говорит об уменьшении вклада упругого рассеяния. При отжиге сухожильных пучков характерные пики смещаются к 31.2° , сужаются и появляются дополнительные рефлексы (рис. 4в, кривая 3). В отожженных образцах перитенонов пики сдвигаются к 32.3° , уширяются, контуры расщепляются, деформируются, регрессируют дополнительные рефлексы и увеличивается их интенсивность (рис. 4в, кривая 4). Вышеприведенные соотношения параметров дифрактограмм свидетельствует о том, что в сухожильных пучках НА более кристаллически, а сами кристаллы НА достаточно крупные. В перитенонах кристаллиты НА мельче и, по-видимому, находятся в более аморфном состоянии.

Интенсивность образования НА регулируется молярным отношением неорганических фосфатов $[Pi]$ к $[PPi]$: при увеличении $[Pi]/[PPi]$ синтез НА возрастает (Thouvery et al., 2009). Однако метаболические особенности анатомических компонентов сухожилий вносят принципиальные нюансы. В нативных образцах сухожильных пучков PP_i не выявляются (рис. 4б, кривая 1), но их количество в виде триклинных форм PP_i резко увеличивается в отожженных образцах (рис. 4в, кривая 3). Это означает, что в сухожильных пучках присутствуют предшественники TRP_i . Синтез триклинных форм PP_i контролируется согласно $[Pi]/[PPi]$, из чего следует, что рост TRP_i подавляют высокие концентрации соединений семейства PP_i (Cheng et al., 1981). Учитывая это и данные РФА, можно предположить, что во внутрикапсулярных сухожильных пучках концентрации P_i высокие, а химически активных PP_i – низкие. При этом PP_i находятся в деконденсированном состоянии. И будучи мощными ингибиторами синтеза НА, подавляют его образование, а интенсивность рефлексов НА сухожильных пучков минимальна (рис. 4б, кривая 1). На дифрактограммах нативных образцов перитенонов в диапазоне кислых фосфатов выходят рефлексы PP_i (рис. 4б, кривая 2), что указывает на то, что PP_i в перитенонах присутствуют в рентгеноаморфном состоянии, а также в форме моноклинных фенотипов PP_i . Количество PP_i в отожженных образцах перитенонов значительно меньше, чем в сухожильных пучках (рис. 4в, кривая 4). В то время как в нативных образцах перитенонов концентрации PP_i , по-видимому, достаточно высоки, чтобы активировать синтез моноклинных фенотипов (Cheng et al., 1980), повышенные концентрации которых, в свою очередь, активируют синтез НА (Cheng, Pritzker, 1983; Mandel N., Mandel G. 1988), что отражают соответствующие дифрактограммы (рис. 4б, кривая 2; 4в, кривая 4). Таким образом, именно различия химической активности PP_i определяет регуляторные нюансы синтеза НА в сухожильной ткани. Характерные рефлексы НА, выявляемые во внутрикапсулярных сухожильных пучках и в перитенонах при термической нагрузке, отличаются поведением: при отжиге сухожильных пучков

рефлексы НА сужаются и смещаются в область малых углов (рис. 4в, кривая 3), а в перитенонах обратный тренд: рефлексы НА уширяются и пики смещаются в широкоугольном направлении (рис. 4в, кривая 4). Это значит, что в физиологических условиях предшественники НА пучковых сухожилий находятся в состоянии ближе к твердым телам кристаллической группы, решетки которых при нагревании упорядочиваются и увеличиваются в размерах. В перитенонах, наоборот, предшественники НА проявляют свойства стабильно аморфных тел, так как их структура при нагревании разупорядочивается и уменьшаются размеры доменов. Главная особенность обсуждаемых явлений – это разнонаправленность метаболических каскадов в органической и неорганической фазах сухожильной ткани. Это повышает вероятность возникновения рисков разных по содержанию, провоцирующих метаболические расстройства. Один из таких конфликтов хорошо известен – пирофосфатные тендинопатии, артропатии и т.п.

Термический анализ. В образцах внутрикапсулярных коллагеновых волокон в сравнении с перитенонами регистрируется повышенная скорость потери массы воды до $49.2 \pm 2.5\%$ (рис. 5а, кривая 1) и понижение температуры при кипении до $110 \pm 3.2^\circ\text{C}$. Это в сочетании с ростом поглощаемой энергии свидетельствует о большей подвижности химических связей водной фазы, менее сильных адгезионных взаимодействиях и, следовательно, об относительно меньшей вязкости жидкой фракции внеклеточного матрикса. В изученной литературе нет ясности о природе этих эффектов.

В связи с данными РФА о накоплении во внутрикапсулярных коллагеновых волокнах химически активных PP_i , можно предположить, что во внеклеточном матриксе сухожильных пучков более кислая среда, в которой неизбежно повышается действие коагулирующих катионов PP_i в отношении отрицательно заряженных частиц. С другой стороны, известно, что поверхностный заряд тройных спиралей коллагена сильно зависит от pH – при увеличении кислотности в физиологически значимом диапазоне увеличивается доля отрицательных зарядов (Mogozova, Muthukumar, 2018). Последствия очевидны: возрастет коагулирующее влияние PP_i за счет связывания катионами. Именно этим объясняются относительно высокие значения экзотермических эффектов ($609.7 \pm 3.6^\circ\text{C}$) и уменьшенная скорость их нарастания (рис. 5б, кривая 1), свидетельствующие о повышенном уровне прочности, учитывая объем коллагеновой фракции, в первую очередь пептидных связей. Повышенная кислотность упрочнит связи и в интерфейсе коллаген–гиалуроновая кислота, так как увеличивается ее способность к самоассоциации, что, в свою очередь, увеличит плотность межмолекулярных контактов.

Тренды теплофизических параметров перитенонов противоположны, что позволяет предположить

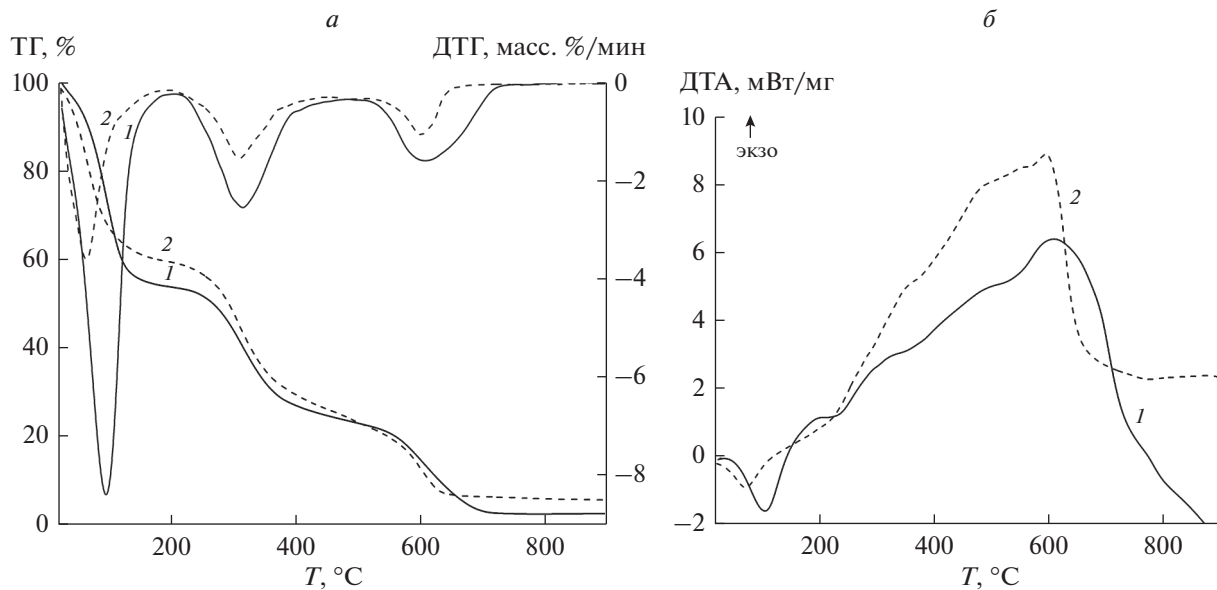


Рис. 5. Данные термического анализа анатомических компонентов сухожилий. *a* – Термогравиметрия и дифференциальная гравиметрия; *б* – дифференциально-термический анализ; 1 – сухожильные пучки, 2 – перитеноны.

факт относительной щелочности межклеточного вещества, в сравнении с сухожильными пучками. По отношению к водной фазе повышенная щелочность делает более вязкой жидкую среду внеклеточного матрикса (на ДТА наблюдаются замедление скорости потери массы до $36.6 \pm 3.8\%$ (рис. 5а, кривая 2) и повышение температуры кипения $123.1 \pm 7.8^\circ\text{C}$). Однако по отношению к органической фазе за счет внутримолекулярной динамики гиалуроновой кислоты (ГК) ситуация складывается иначе.

Известно, что по мере роста щелочности карбоксильные группы ГК депротонируются, гидроксильные группы диссоциируют, что вызывает разрывы и препятствует образованию водородных связей. В результате вязкость щелочных растворов ГК уменьшается. Разрывы водородных связей приводят к усадке полимера, так как ускоряется свободное вращение гликозидных связей и уменьшается агрегационный потенциал гиалуроновой кислоты (Cowman et al., 2015; Caspersen et al., 2014; Gatej et al., 2005). Повышенная способность к деагрегации имеет и кинетические последствия: при деагрегации увеличивается межфазное расслоение и соответственно увеличивается площадь поверхностей, что обеспечит соответствующий рост скорости химических реакций. Интегральным свидетельством этих процессов являются пониженная (относительно сухожильных пучков) температура экзотермических эффектов в среднем до $571.3 \pm 9.7^\circ\text{C}$ на фоне увеличения скорости их нарастания (рис. 5б, кривая 2).

ИК-спектроскопия. На ИК-спектрах перитенонов и внутрикапсулярных пучков фибриллярный коллаген I типа верифицируется наличием характеристичных полос валентных колебаний C=O в полосе

Амида I, составные частоты деформационных колебания NH и колебаний C–N в полосе Амида II, деформационных колебаний NH и валентных колебаний C–N в полосе Амида III, группы колебаний связанных гидроксильных групп и C=O, а также колебаний скелетных связей C–C (табл. 2). ИК-спектры влажных образцов перитенонов и пучковых сухожилий, охлажденных до комнатной температуры, не отличаются (табл. 2). Однако при действии температуры в физиологическом пределе на ИК-спектрах перитенонов и пучковых сухожилий появляются существенные различия. Так, в образцах перитенонов, прогретых при 37°C , регистрируется системный низкочастотный сдвиг пиков характеристичных полос коллагеновых белков: в комплексе Амида II, который свидетельствует о расширении углов деформационных колебания NH и, соответственно, указывает на разупрочнение пептидных связей в первичной цепи с замещением межцепочечных водородных связей интерстициальными водными мостиками; в полосе Амида III, который отражает уменьшение прочности пептидных водородных связей между первичными цепями. При этом полосы Амида I не сдвигаются.

Существенный низкочастотный сдвиг наблюдается и в полосе скелетных колебаний связей C–C (табл. 2). Причины растяжения связей в молекулах коллагена термообработанных перитенонов не ясны. Наиболее вероятный сценарий – это заполнение межцепочечных пространств водой, высвобождаемой в ходе мацерации. Внутрикапсулярные сухожильные пучки проявляют большую устойчивость: пики полос Амида I и II остаются в прежнем положении и только у Амида III смещаются в низкочастот-

Таблица 2. Данные ИК-спектроскопии внутрикапсулярных сухожильных пучков и перитенонов

Функциональные молекулярные группы	Характеристичные частоты (ν , см^{-1})			
	перитеноны, обработанные при 37°C	перитеноны нативные	внутрикапсулярные пучки, обработанные при 37°C	внутрикапсулярные пучки, нативные
PO ₄ растяжения (ν^1)	875	1056	875	937
CO ₃ групповая	1350	1443	1400	1459
Амид I	1723	1709	1712	1694
Амид II	1471	1568	1622	1567
Амид III	1134	1272	1164	1288
Скелетные колебания связей C—C	668	776	742	—

ную область (табл. 2). Подобная устойчивость, возможно, обусловлена сшивающим действием фибриллярных узлов, препятствующих локальному растяжению.

На ИК-спектрах перитенонов и внутрикапсулярных пучков присутствуют характеристичные полосы полносимметричных колебаний связи P—O (ν^1), а также выходят полосы групповых колебательных мод карбонильных групп (табл. 2). Здесь также наблюдаются низкочастотные сдвиги в прогретых образцах, причем в равной мере как в перитенонах, так и во внутрикапсулярных сухожильных пучках. Сдвиги явно обусловлены действием повышенной температуры и, возможно, гидратацией CP.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сухожилия – это природный композитный материал, иерархическая организация которого завершает мультимодальную эволюцию структурно-механических, физико-химических и морфогенетических тенденций. Структурно-механические детерминанты организуют внутрикапсулярные коллагеновые волокна в симметричных сухожильных пучках, а в перитенонах – каркасно-пластинчатые подструктуры. Универсальным регулятором структурно-механических трансформаций являются фибриллярные узлы – воспринимающие и демпфирующие линейные механические нагрузки. Приоритетным размещением фибриллярных узлов являются внутрикапсулярные сухожильные пучки, эндотеноны, а также зоны повышенной потребности в структурировании внеклеточного матрикса. Каркасная организация перитенонов амбивалентна: в пограничных слоях структурно консервативна, в срединных – мобильна и полиморфна. Это противоречие сглаживается при подводе механической энергии: каркас упорядочивается, сопряжение фибриллярных структур становится термодинамически выгодным, риски механических конфликтов на границах субкомпозиционных переходов снижаются. Эксклюзивными структур-

ными атрибутами перитенонов являются сесамоидная ткань, игольчатые разрастания и пластинчатые структуры, предоставляющие резервные опции в упрочнении/разупрочнении сухожилий.

Внеклеточный матрикс внутрикапсулярных сухожильных пучков содержит больше кислых функциональных групп, а в перитенонах, соответственно, – щелочных. Это ключевой отличительный фактор физико-химического гомеостаза, который определяет разнонаправленные регуляторные мотивы в органической и неорганической фазах сухожилий. В межклеточном веществе внутрикапсулярных сухожильных пучков более подвижна водная фаза, превалирует деконденсация неорганических пирофосфатов, что препятствует образованию кристаллитов гидроксиапатита, частично коагулирован фибриллярный коллаген и его поверхность гидрофобизируется. У перитенонов обратные тренды: более вязкая водная фаза, доминирует конденсация пирофосфатов, что благоприятствует синтезу и росту кристаллов гидроксиапатита, повышена гидрофильность, смачиваемость и адгезивность коллагеновых волокон. Во внутрикапсулярных сухожильных пучках органические полимеры более агрегированы, в перитенонах, наоборот, склонны к деагрегации. Это имеет кинетические последствия – скорости химических реакций в условиях межфазовых расслоений, увеличения площадей поверхностей будут расти. Таким образом, в перитенонах имеются структурные предпосылки, ускоряющие обмен веществ относительно метаболизма в сухожильных пучках. Полученные данные имеют значение при проектировании структурно-чувствительных материалов, предназначенных для клеточных технологий, с заданными составом, структурой и состоянием.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Государственной программы научных исследований “Хими-

ческие процессы, реагенты и технологии, биорегуляторы и биоорхимия” по заданию 2.1.04.7 на 2021–2025 гг. (ИОНХ НАН Б, НИИ ФХП БГУ, Институт физиологии НАН Б), Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания № FMFU-2021-0008 (ИНЦ РАН) и РФФ № 21-74-20120 (ФТИ РАН).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Протоколы экспериментов с материалом крыс утверждены этическим комитетом Института физиологии НАН Белоруссии и соответствовали Санитарным нормам 2.1.2.12-18-2006 (Национальный реестр правовых актов Республики Белоруссия, 2012. № 8/25189).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интереса.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Amizuka N., Hasegawa T., Oda K.* 2012. Histology of epiphyseal cartilage calcification and endochondral ossification. *Frontiers in Bioscience*. V. E4. P. 2085. <https://doi.org/10.2741/526>
- Benjamin M., Toumi H., Ralphs J.R., Bydder G., Best T.M., Milz S.* 2006. Where tendons and ligaments meet bone: attachment sites ('entheses') in relation to exercise and/or mechanical load. *J. Anat.* V. 208. P. 471. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2006.00540.x>
- Burla F., Dussi S., Martinez-Torres C., Tauber J., van der Gucht J., Koenderink G.H.* 2020. Connectivity and plasticity determine collagen network fracture. *PNAS*. V. 117. P. 8326. <https://doi.org/10.1073/pnas.1920062117>
- Caspersen M.B., Roubroeks J.P., Qun L., Shan H., Fogh J., Rudong Z., Tømmeraas K.* 2014. Thermal degradation and stability of sodium hyaluronate in solid state. *Carbohydr Polym.* V. 107. P. 25. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.02.005>
- Cheng P.T., Pritzker K.P.* 1983. Pyrophosphate, phosphate ion interaction: effects on calcium pyrophosphate and calcium hydroxyapatite crystal formation in aqueous solutions. *J. Rheumatol.* V. 10. P. 769.
- Cheng P.T., Pritzker K.P.* 1981. The effect of calcium and magnesium ions on calcium pyrophosphate crystal formation in aqueous solutions. *J. Rheumatol.* V. 8. P. 772.
- Cheng P.T., Pritzker K.P., Adams M.E., Nyburg S.C., Omar S.A.* 1980. Calcium pyrophosphate crystal formation in aqueous solutions. *J. Rheumatol.* V. 7. P. 609.
- Cowman M.K., Schmidt T.A., Raghavan P., Stecco A.* 2015. Viscoelastic properties of hyaluronan in physiological conditions. *F1000Res*. V. 4. P. 622. <https://doi.org/10.12688/f1000research.6885.1>
- Gatej I., Popa M., Rinauo M.* 2005. Role of the pH on hyaluronan behavior in aqueous solution. *Biomacromolecules*. V. 6. P. 61. <https://doi.org/10.1021/bm040050m>
- Gathercole L.J., Keller A.* 1978. X-ray diffraction effects related to superstructure in rat tail tendon collagen. *Biochim. Biophys. Acta*. V. 535. P. 253. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(78\)90092-2](https://doi.org/10.1016/0005-2795(78)90092-2)
- Gemballa S., Ebmeyer L., Hagen K., Hannich T., Hoja K., Rolf M., Treiber K., Vogel F., Weitbrecht G.* 2003. Evolutionary transformations of myoseptal tendons in gnathostomes. *Proc. R. Soc. B: Biol. Sci.* V. 270. P. 1229. <https://doi.org/10.1098/rspb.2003.2345>
- Hasegawa T., Yamamoto T., Tsuchiya E., Hongo H., Tsuboi K., Kudo A., Abe M., Yoshida T., Nagai T., Khadiza N., Yokoyama A., Oda K., Ozawa H., de Freitas P.H.L., Li M., Amizuka N.* 2017. Ultrastructural and biochemical aspects of matrix vesicle-mediated mineralization. *Jpn. Dent. Sci. Rev.* V. 53. P. 34. <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2016.09.002>
- Jansen K.A., Licup A.J., Sharma A., Rens R., MacKintosh F.C., Koenderink G.H.* 2018. The role of network architecture in collagen mechanics. *Biophys. J.* V. 114. P. 2665. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.04.043>
- Kastelic J., Galeski A., Baer E.* 1978. The multicomposite structure of tendon. *Connect. Tiss. Res.* V. 6. P. 11. <https://doi.org/10.3109/03008207809152283>
- Landis W.J., Silver F.H.* 2009. Mineral deposition in the extracellular matrices of vertebrate tissues: identification of possible apatite nucleation sites on type I collagen. *Cells Tiss. Organs*. V. 189. P. 20. <https://doi.org/10.1159/000151454>
- Lanir Y.* 1978. Structure-strength relations in mammalian tendon. *Biophys. J.* V. 24. P. 541. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(78\)85400-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(78)85400-9)
- Lanir Y.* 1980. A microstructure model for the rheology of mammalian tendon. *J. Biomech. Eng.* V. 102. P. 332. <https://doi.org/10.1115/1.3138231>
- Mandel N., Mandel G.* 1988. Calcium pyrophosphate crystal deposition in model systems. *Rheum. Dis. Clin. North. Am.* V. 14. P. 321.
- Morozova S., Muthukumar M.* 2018. Electrostatic effects in collagen fibril formation. *J. Chem. Physics*. V. 149. P. 163333. <https://doi.org/10.1063/1.5036526>
- Nudelmann F., Pieterse K., George A., Bomans P.H.H., Friedrich H., Brylka L.J., Hilbers P.A.J., With G., Sommerdijk N.A.J.M.* 2010. The role of collagen in bone apatite formation in the presence of hydroxyapatite nucleation inhibitors. *Nat. Mater.* V. 9. P. 1004. <https://doi.org/10.1038/nmat2875>
- Summers A.P., Koob T.J.* 2002. The evolution of tendon—morphology and material properties. *Comp. Biochem. Physiol.: A*. V. 133. P. 1159. [https://doi.org/10.1016/s1095-6433\(02\)00241-6](https://doi.org/10.1016/s1095-6433(02)00241-6)
- Thouverey C., Bechko G., Pikula S., Buchet R.* 2009. Inorganic pyrophosphate as a regulator of hydroxyapatite or calcium pyrophosphate dihydrate mineral deposition by matrix vesicles. *Osteoarth. Cartilage*. V. 17. P. 64. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2008.05.020>
- Zhang S., Ju W., Chen X., Zhao Y., Feng L., Yin Z., Chen X.* 2021. Hierarchical ultrastructure: An overview of what is known about tendons and future perspective for tendon engineering. *Bioact. Mater.* V. 8. P. 124. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.06.007>

Structure and Physico-Chemical Properties of Paravertebral Tendons

A. A. Gaidash^{a, *}, V. K. Krut'ko^a, M. I. Blinova^b, A. V. Nashchekin^c, O. N. Muszkaya^a, K. V. Skrotskaya^d,
O. A. Sycheva^a, L. V. Kulbitskaya^a, Yu. P. Tokalchik^e, and A. I. Kulak^a

^a*Institute of General and Inorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, 220072 Belarus*

^b*Institute of Cytology Russian Academy of Sciences, St. Petersburg 194064 Russia*

^c*Ioffe Physical-Technical Institute, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg 194021 Russia*

^d*Research Institute for Physical Chemical Problems of the Belarusian State University, Minsk, 220006 Belarus*

^e*Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, 220072 Belarus*

*e-mail: aljack880@gmail.com

Tendon tissue is actively used as a raw material in the production of collagen gels. This does not always take into account the structure and physico-chemical properties of the intracapsular bundles and sheaths (peritenones) of the tendons. In order to refine this information, scanning electron microscopy, X-ray phase and thermal analysis, and IR spectroscopy were used to study the intracapsular bundles and peritenons of the paravertebral tendons of Wistar rats. It has been established that intracapsular tendon collagen fibers are assembled into cylindrical bundles sutured with fibrillar knots. The priority locations of fibrillar knots are crimps in the boundary layers of intracapsular bundles and peritenons, endotenons and remodeling zones of collagen fibrils. Peritenones have a framework structure that forms solid blocks of collagen arrays in the outer and inner layers. Tissue-specific structures of peritenons are sesamoid islets and globules, needle-like and lamellar growths, osteon-like lamellae involved in the strengthening and ossification of tendons by the mechanisms of heterogeneous and homogeneous nucleation of calcium phosphates. The main components of the mineral phase are pyrophosphates of the $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ family and hydroxyapatites. In the tendon bundles, pyrophosphates are decondensed, which prevents the formation of hydroxyapatite. In peritenones, pyrophosphates are condensed into monoclinic phenotypes that induce the synthesis of hydroxyapatite. There are also differences in the state of hydroxyapatite: in bundles it is crystalline, in peritenones it is amorphous. According to thermal analysis and IR spectroscopy, the extracellular matrix of intracapsular tendon bundles is more mobile, fibrillar collagen is partially coagulated and hydrophobic, resistant to maceration. In peritenons, the extracellular matrix is viscous, the collagen fibers are hydrophilic and sensitive to maceration. The data obtained are important in predicting the specialized properties of collagen-containing materials, taking into account the structural and metabolic features of the anatomical components of the tendons.

Keywords: tendons, peritenons, collagen fibrils, sesamoid tissue, heterogeneous and homogeneous nucleation of calcium phosphates, pyrophosphates, hydroxyapatite

УДК 611.018

**ВСЕРОССИЙСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ
“АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ СОВРЕМЕННОЙ ГИСТОЛОГИИ”,
ПОСВЯЩЕННАЯ 90-ЛЕТИЮ КАФЕДРЫ ГИСТОЛОГИИ И ЭМБРИОЛОГИИ
ИМ. ПРОФ. А.Г. КНОРРЕ (САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
ПЕДИАТРИЧЕСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, 17 ИЮНЯ 2022 г.)**

DOI: 10.31857/S0041377122030075

**СТАНОВЛЕНИЕ КАФЕДРЫ ГИСТОЛОГИИ И ЭМБРИОЛОГИИ
ИМ. ПРОФЕССОРА А.Г. КНОРРЕ СПбГПМУ КАК НАУЧНОГО КОЛЛЕКТИВА**

© 2022 г. В. Г. Кожухарь*

*Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, 194100 Россия***E-mail: v.kojukhar@yandex.ru*

Кафедра гистологии и эмбриологии Ленинградского педиатрического медицинского института (ЛПМИ) (в настоящее время — Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет) была организована в 1932 г. При первых двух заведующих — проф. В.Ф. Мартынове (1932–1933 гг.) и проф. Б.И. Лаврентьеве (1933–1934 гг.), руководившими кафедрой по совместительству, деятельность кафедры ограничивалась чисто педагогическими функциями, научная работа не велась. Только под руководством проф. А.А. Заварзина (1935–1938 гг.) (рис. 1), когда кафедра получила более приспособленное помещение и расширила свою материальную базу, сотрудники кафедры приступили к научно-исследовательской работе (хотя и А.А. Заварзин заведовал кафедрой по совместительству). Тематика научных исследований сотрудников, естественно, соответствовала научным интересам А.А. Заварзина. Были выполнены исследования по сравнительной гистологии крови и соединительной ткани (доцент Г.В. Ясвоин, ассистенты М.Я. Левина и Г.А. Невмывака). Ассистент И.И. Гутнер занимался изучением нервной системы в онтогенезе, начатым еще в нейрогистологической лаборатории ЛПМИ, которой он заведовал с 1932 по 1941 гг. В этой лаборатории научными сотрудниками были М. Л. Боровский и А. М. Левикова, а консультантом — известный нейроморфолог профессор Б.С. Дойников. С 1935 г. названная лаборатория находилась на кафедре гистологии. За время существования лаборатории ее сотрудниками опубликовано 11 исследований, в том числе 3 кандидатских диссертации (И.И. Гутнер — о возрастных изменениях нервных клеток спинномозговых узлов, А.М. Левикова — о возрастных изменениях нервных клеток черного вещества и некоторых других участков головного мозга, ассистент кафедры нормальной анатомии Н.С. Севбо — о

возрастных особенностях строения нервных клеток симпатического ствола у человека). Четыре публикации М.Л. Боровского об эмбриональном и постнатальном развитии некоторых отделов коры головного мозга у человека и кошки составили его докторскую диссертацию.

В 1938 г., в связи с избранием А.А. Заварзина на заведование кафедрой гистологии I Ленинградского медицинского института, кафедру гистологии и эмбриологии ЛПМИ возглавил проф. Г.В. Ясвоин (опять же по совместительству) (рис. 2). Вскоре кафедра получила более просторное помещение в новом анатомическом корпусе (которое занимает и поныне), оборудование необходимое для учебного процесса, специальную лабораторную мебель, наглядные пособия, достаточное количество новых по тем временам микроскопов отечественного производства. В период, продолжавшийся до начала Великой Отечественной войны, проф. Г.В. Ясвоин опубликовал предварительное сообщение своей, изданной в полном виде уже после войны, монографии “О роли так называемых темных клеток” (Ясвоин, 1939а, б). В настоящее время эти работы представляют лишь исторический интерес. Доцент И.И. Гутнер подготовил к защите докторскую диссертацию “Онтогенез и структура задней центральной области и зернистого ретроспленального поля коры больших полушарий мозга человека и некоторых животных” (защищена в 1944 г.). Он же был редактором 5-го издания “Курса гистологии и микроскопической анатомии” А.А. Заварзина (1939). М.Я. Левина исследовала воспалительную реакцию соединительной ткани миноги, Г.А. Невмывака — дифференцировку соединительной ткани в онтогенезе человека. Эти исследования не были закончены в связи с началом Великой Отечественной войны. Научная работа на кафедре гистологии и эмбриологии ЛПМИ возобно-



Рис. 1. А.А. Заварзин (заведовал кафедрой с 1935 по 1938 г.).



Рис. 2. Г.В. Ясвоин (заведовал кафедрой с 1938 по 1941 г.).

вилась только в 1943 г., когда заведующим кафедрой стал доцент И.И. Гутнер. Было продолжено изучение развития нервной системы в онтогенезе. Ассистентами в те годы работали А.В. Жуковец, а к концу войны – М.Я. Левина, К.Е. Громцева и А.М. Левинова. Таким образом, главное научное направление кафедры могло бы стать нейрогистологическим, но в 1946 г. И.И. Гутнер (получивший уже звание профессора) переехал в Ярославль, где возглавил кафедру гистологии в Ярославском медицинском институте. Заведующим кафедрой гистологии и эмбриологии ЛПМИ был избран один из старших учеников А.А. Заварзина профессор Е.С. Данини (рис. 3), до этого многие годы возглавлявший кафедры университета и медицинского института в Перми. Кафедра в ЛПМИ стала постоянным и единственным местом его работы – он руководил кафедрой в течение 8 лет, до своей смерти в декабре 1954 г.

Под руководством Е.С. Данини увеличился штат кафедры: наряду с прежними сотрудниками (М.Я. Левина, К.Е. Громцева, А.М. Левинова) пришли новые преподаватели. В первую очередь это Л.Д. Марцинкевич – ученица Евгения Сильвиевича по Пермскому университету, а также Н.Р. Амосова и Л.Д. Лобза (Петрова). Все они подключились к разработке вопросов эволюционной гистологии тканей – производных мезенхимы. Целый ряд работ, выполненных Е.С. Данини и его сотрудниками, получили

широкую известность. Именно с приходом Евгения Сильвиевича на кафедре сложился стабильный коллектив и были заложены основы тех педагогических и научных подходов, которые определяли лицо кафедры на протяжении многих лет. На кафедре успешно развивалась научная работа по проблеме “Морфологические закономерности развивающегося организма”. Основным направлением исследований кафедры стало изучение тканей внутренней среды в сравнительно-гистологическом, экспериментальном и гистогенетическом аспектах (Е.С. Данини, 1948б). Собственно, это и было главным предметом научных интересов Е.С. Данини еще со времен “пермского периода” (так в шутку называли период его работы в Перми с 1918 по 1946 г.).

Сам Евгений Сильвиевич исследовал гистогенез соединительной ткани головы аксолотля, представив ряд аргументов в пользу эктоплазматической теории образования межклеточного вещества (Данини, 1948а), изучал развитие и строение дентина у амфибий (лягушка, тритон, аксолотль), установив ряд отличий дентина амфибий от дентина других позвоночных (Данини, 1951). К работе по исследованию дентина в сравнительном аспекте была привлечена и Л.Д. Марцинкевич (1951). Е.С. Данини выявил специфику так называемого “клеточного” (жирового) хряща в сравнении с другими разновидностями хрящевой ткани (Данини, 1955), написал две статьи, посвященных защите и дальнейшему

развитию теории камбиальности А.А. Заварзина (Данини, 1950, 1957), дорабатывал написанную еще в Перми монографию “Механические ткани позвоночных” (осталась в рукописи). Под руководством Е.С. Данини были выполнены исследования развития гиалиновой хрящевой ткани (Громцева, 1949, 1960), в которых автор так же, как и ее научный руководитель, придерживалась распространенной в то время эктоплазматической теории образования межклеточного вещества тканей внутренней среды. Было изучено развитие студенистой ткани пуповины человека (Левина, 1951, 1954). Интересно отметить, что в работах М.Я. Левиной было описано образование межклеточного вещества названной ткани за счет секреции фибробластами и даже гладкими миоцитами. В те годы большинство исследователей (в том числе Е.С. Данини) придерживались так называемой эктоплазматической теории возникновения межклеточного вещества волокнистых соединительных тканей. Эта теория предполагала образование межклеточного вещества путем непосредственного превращения в него эктоплазмы зрелых (биоплазматических) фибробластов. Будучи сторонником эктоплазматической теории Е.С. Данини, однако, не только не подверг критике работу своей сотрудницы, но и скорректировал собственные взгляды на происхождение межклеточного вещества (Данини, 1960).

На большом материале (более 40 видов из разных отрядов) ассистент Л.Д. Марцинкевич впервые изучила зависимость клеточного состава крови птиц от систематической принадлежности и экологических особенностей ареала вида, что было обобщено в ее кандидатской диссертации (Марцинкевич, 1953). Она и в дальнейшем продолжила исследования крови и соединительной ткани птиц в сравнительном и возрастном аспектах (Марцинкевич, 1954, 1955); ею было, например, показано, что у филогенетически древних нелетающих отрядов птиц эритроциты крупнее, чем у других птиц и приближаются по размерам к эритроцитам рептилий.

Сотрудниками Е.С. Данини экспериментально была выяснена роль механических раздражений как фактора, вызывающего регенерацию кости после перелома, и проанализированы источники образования костной мозоли, роль нервно-трофических факторов в заживлении переломов (Левикова, 1950; Самсонова, 1954, 1960).

Под руководством Е.С. Данини аспирант П.П. Румянцев (будущий известный гистолог и цитолог, директор Института цитологии АН СССР, чл.-корр. АН СССР) изучал особенности регенерации миокарда млекопитающих в зависимости от возраста (Румянцев, 1954, 1955), выполнил и защитил кандидатскую диссертацию, в которой гистологически было прослежено изменение регенераторной способности сердечной мышцы у котят в возрастном аспекте (Румянцев, 1953). Китайский аспирант Чэнь Ди исследовал регенеративные воз-



Рис. 3. Е.С. Данини (заведовал кафедрой с 1946 по 1954 г.).

можности кардиомиоцитов в условиях подкожной трансплантации (Чэнь Ди, 1957). Аспирант В.В. Молчанова начала диссертационную работу по исследованию изменений подкожной соединительной ткани при серозном воспалении (работа завершена уже после смерти Е.С. Данини в 1958 г.).

Таким образом, под руководством Е.С. Данини с 1946 по 1954 г. на кафедре гистологии и эмбриологии ЛПМИ сформировался коллектив единомышленников, объединенный общей теоретической концепцией и работающий в русле единого научного направления. В отличие от предыдущего периода, научная работа приобрела системный характер.

После смерти Е.С. Данини, с сентября 1955 по май 1981 г., кафедрой руководил профессор А.Г. Кнорре (рис. 4). Наряду с продолжением и завершением начатых ранее работ по сравнительной и экспериментальной гистологии крови, волокнистых соединительных и скелетных тканей, были предприняты широкие сравнительные исследования эмбрионального гистогенеза нервной ткани, различных эпителиев, сердечной мышечной ткани, а также полового зачатка. Кроме того, в сферу научных интересов А.Г. Кнорре входили вопросы развития зародыша и дифференцировки клеток эмбриональных зачатков. В 1956 г. вышла его работа с описанием раннего зародыша человека (Кнорре, 1956), выполненная на эмбриональном материале, полученном еще при работе А.Г. Кнорре в Военно-медицинской



Рис. 4. А.Г. Кнорре (в центре) с сотрудниками кафедры и аспирантами (конец 1955 г.).

академии. Это было описание зародыша человека на 14-е сут развития, вошедшего в историю науки под именем ВМА-1. Вероятно, уже в первые годы работы в ЛПМИ у Алексея Георгиевича возникла идея написания обобщающей сводки по эмбриональному гистогенезу, что впоследствии воплотилось в его знаменитой монографии.

В серии работ по изучению эмбрионального гистогенеза тканей нервной системы были прослежены источники возникновения и особенности дифференцировки нервной трубки и узлов симпатического ствола (Кнорре, 1949; Суворова, Кнорре, 1960), интрамуральных узлов двенадцатиперстной кишки и пищевода (Суворова, 1959, 1963), каудальных отделов толстой кишки (Семенова, 1958), нейронов крыши среднего мозга (Оленев, 1964), нейронов спинномозговых узлов (Умаров, 1969). Развитию автономной нервной системы и периодизации дифференцировки нейронов был посвящен ряд обзорно-теоретических работ (Кнорре, Суворова, 1959, 1961; Суворова, Кнорре, 1960). Были подробно исследованы изменения нервного аппарата и других тканевых компонентов толстой кишки при болезни Гиршпрунга у детей (Завалишина, 1969), а также в эксперименте изучено влияние тироксина на миграцию нейробластов в закладку интрамуральных ганглиев межмышечного сплетения кишки и дальнейшую дифференцировку уже сформированных ганглиев (Завалишина, Суворова, 1977). Результаты многочисленных исследований по развитию автономной нервной системы были обобщены в книге

А.Г. Кнорре и И.Д. Лев (1977), а также в монографии А.Г. Кнорре и Л.В. Суворовой (1984), вышедшей в свет уже после смерти Алексея Георгиевича.

К группе работ по изучению гистогенеза эпителиальных тканей относятся сравнительные исследования дифференцировки эпителия канальцев предпочки, первичной и вторичной почки у низших и высших позвоночных (Молчанова, 1972, 1975), показавшие на новом объекте специфику процессов дифференцировки провизорных и дефинитивных тканей. Исследования эпителия пупочного канатика проводила М.Я. Левина, сделавшая вывод об эпидермальной природе (эпидермальный тип по классификации Н.Г. Хлопина) данного эпителия, выражающейся в многослойности и способности к ороговению (Левина, 1960). Позже, уже после выхода в свет знаменитой монографии А.Г. Кнорре "Эмбриональный гистогенез" (1971), к эпителиальной тематике подключилась М.В. Атаманова (Столярова), которая исследовала эпителии беспозвоночных животных (кишечнодышащих) в эволюционном аспекте (Атаманова, 1976, 1977).

Впервые был систематически прослежен эмбриональный гистогенез сердечной мышечной ткани у зародышей курицы (Петрова, 1968) и кролика (Амосова, 1969) на многих последовательных стадиях. Авторами было показано, что эпикард и миокард развиваются из различных зачатков, а не из общей миоэпикардиальной пластинки.

Продолжились сравнительно гистологические исследования крови и соединительных тканей. Так, Л.Д. Марцинкевич (1961), изучив 10 видов из трех отрядов “белокровных” рыб Антарктики, обнаружила у них легко разрушающиеся эритроциты, развитие которых происходит в почке и частично в селезенке. На материале 8 видов птиц (Марцинкевич, 1966) была установлена видоспецифичность гранул эозинофильных лейкоцитов у ряда птиц (буревестников). Последние относятся к числу примитивных отрядов птиц, а эозинофилы подобного типа ранее были описаны у черепах. Таким образом, феномен инверсии окраски гранул эозинофильных лейкоцитов является общим для некоторых представителей зауропсид. Н.Р. Амосова продолжала всестороннее изучение хрящевых и соединительных тканей, в том числе при регенерации (Амосова, 1960).

Большой интерес, особенно в последние годы жизни, Алексей Георгиевич проявлял и к проблеме обособления и дифференцировке полового зачатка (гонобласта) у млекопитающих и человека. Под его руководством была выполнена серия работ по изучению первичных половых клеток у зародышей человека (Семенова-Тян-Шанская, 1969, 1971; Семенова-Тян-Шанская, Кнорре, 1972; Семенова-Тян-Шанская, Паткин, 1978, 1982). В этих исследованиях впервые было показано присутствие первичных половых клеток человека в кровеносных сосудах зародыша (E26–E33) и вследствие этого возможность переноса названных клеток с кровотоком, а также установлен факт гетерохроматинизации одной из X-хромосом в первичных половых клетках женского пола после завершения их миграции и контакта с клетками целомического эпителия полового валика. В продолжение этих исследований были выполнены работы по изучению дифференцировки целомического эпителия гонады зародыша человека и взаимодействию последнего с первичными половыми клетками (Кожухарь, 1978, 1979, 1980, 1982) (рис. 5). Была впервые описана ультраструктура клеток целомического эпителия бипотенциальной эмбриональной гонады человека, а также гонады на начальных этапах морфологической дифференцировки пола.

Анализ тематики исследований А.Г. Кнорре и его сотрудников показывает, что в центре внимания научных устремлений кафедры на протяжении многих лет находились вопросы дифференцировки клеток и тканей в эмбриогенезе и вопросы возрастной гистологии. Эмбриологические исследования кафедры были обобщены в монографии профессора А.Г. Кнорре “Эмбриональный гистогенез (морфологические очерки)” (1971) – первой в мировой литературе сводке на эту тему. Как продолжение “Эмбрионального гистогенеза” можно рассматривать последнюю книгу А.Г. Кнорре (в соавторстве с В.В. Молчановой и А.Г. Семеновой-Тян-Шанской) “Процессы дифференциации зародышевых листков и некоторых эмбриональных зачатков” (Кнорре и др., 1980).



Рис. 5. А.Г. Кнорре и В.Г. Кожухарь (декабрь 1979 г.).

Таким образом, можно выделить три этапа формирования кафедры гистологии и эмбриологии ЛПМИ как научного коллектива. Первый этап (1935–1946 гг.) – начало научной деятельности, которая, в силу разных причин, не носила системного характера; второй этап (1946–1955 гг.) – становление коллектива единомышленников, объединенного общим научным направлением и подходами, и третий этап (1955–1981 гг.) – период, когда кафедрой руководил Алексей Георгиевич Кнорре, – период исследований, проводимых в русле единой концепции на широком фронте изучения различных аспектов эмбрионального гистогенеза; период, когда работы сотрудников получили заслуженное признание. Можно сказать, что именно этот период стал “золотым веком” в развитии кафедры как научного коллектива.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Амосова Н.Р. 1960. Образование хрящевой и костной тканей при регенерации сухожилий. В сб.: Вопросы сравнительной, экспериментальной и возрастной морфологии тканей внутренней среды. Л. С. 181. (Amosova N.R. 1960. Formation of cartilage and bone tissue during tendon regeneration. In: Questions of comparative, experimental and age morphology of tissues of the internal medium. L. P. 181.)
- Амосова Н.Р. 1969. Эмбриональный гистогенез сердечной мышцы кролика. Труды общества АГЭ. Вып. 1. С. 9. (Amosova N.R. 1969. Embryonic histogenesis of rabbit cardiac muscle. Proceedings of the society of АНЭ. L. № 1. P. 9.)
- Атаманова М.В. 1976. Кожный и кишечный эпителии *Saccoglossus meresckowskii* и вопрос о “немертиновом” эпителии. В сб.: Эволюционная морфология беспозвоночных животных. Л. С. 20. (Atamanova M.V. 1976. Dermal and intestinal epithelium of *Saccoglossus meresckowskii* and the question of the “nemertinc” epithelium. In: Evolutionary morphology of invertebrates. L. P. 20.)
- Атаманова М.В. 1977. Кожный и кишечный эпителии кишечнодышащих как этап филогенетического разви-

- тия эпителиев хордовых. Арх. анат. Т. 73. Вып. 9. С. 55. (Atamanova M.V. 1977. Dermal and intestinal epithelium of enteropneusta as a phylogenetic stage in the development of epithelia of chordates. Arch. anat. T. 73. № 9. P. 55.)
- Громцева К.Е. 1949. Возрастные изменения структуры гиалинового хряща человека. Дис. ... канд. биол. наук. Л. (Gromtseva K.E. 1949. Age-related changes in the structure of human hyaline cartilage. PhD thesis. L.)
- Громцева К.Е. 1960. Образование и дифференцировка основного вещества гиалинового хряща человека. В сб.: Вопросы сравнительной, экспериментальной и возрастной морфологии тканей внутренней среды. Л. С. 53. (Gromtseva K.T. 1960. Formation and differentiation of the ground substance of human hyaline cartilage. In: Questions of comparative, experimental and age morphology of tissues of the internal medium. L. P. 53.)
- Гутнер И.И. 1944. Онтогенез и структура задней центральной области зернистого ретроспленального поля коры больших полушарий мозга человека и некоторых животных. Дис. ... докт. биол. наук. Л. (Gutner I.I. 1944. Ontogenesis and structure of the posterior central region of the granular retrosplenial field of the cerebral cortex of humans and some animals. Doct. thesis. L.)
- Данини Е.С. 1948а. Материалы по изучению гистологических процессов в области головы аксолотля во время метаморфоза. Сообщение 1. Об образовании межклеточного вещества соединительной ткани. Известия АН СССР. Серия биологич. № 5. С. 607. (Danini E.S. 1948a. Materials on the study of histological processes in the axolotl head area during metamorphosis. Message 1. On the formation of intercellular substance of connective tissue. News Acad. Sci. USSR, biol. series. No 5. P. 607.)
- Данини Е.С. 1948б. Некоторые соображения о развитии механических тканей в филогенетическом аспекте. Журн. общ. биологии. Т. 19. Вып. 4. С. 713. (Danini E.S. 1948b. Some considerations on the development of mechanical tissues the in phylogenetic aspect. J. General Biol. V. 19. № 4. P. 713.)
- Данини Е.С. 1950. Понятие о тканевой камбиальности в современной гистологии. Успехи совр. биол. 1950. Т. 29. Вып. 3. С. 379. (Danini E.S. 1950. The concept of tissue cambiality in modern histology. Succ. Modern Biol. V. 29. № 3. P. 379.)
- Данини Е.С. 1951. Сравнительно-гистологическое изучение дентина. Развитие и строение дентина некоторых амфибий. Докл. АН СССР. Т. 80. № 6. С. 949. (Danini E.S. Comparative histological study of dentin. Development and structure of dentin of some amphibians. Reports Acad. Sci. USSR. V. 80. № 6. P. 949.)
- Данини Е.С. 1955. О строении и развитии клеточного хряща. Арх. анат. Т. 34. № 2. С. 35. (Danini E.S. 1955. On the structure and development of cellular cartilage. Arch. anat. V. 34. № 2. P. 35.)
- Данини Е.С. 1957. Самообновление тканей и теория камбиальности академика А.А. Заварзина. Арх. анат. Т. 34. № 1. С. 16. (Danini E.S. 1957. Tissue self-renewal academician A.A. Zavarzins theory of cambiality. Arch. anat. V. 34. № 1. P. 16.)
- Данини Е.С. 1960. Некоторые соображения о филогенетическом развитии дентина. В сб.: Вопросы сравнительной, экспериментальной и возрастной морфологии тканей внутренней среды. Л. С. 35. (Danini E.S. 1960. Some considerations on the phylogenetic development of dentin. In: Questions of comparative, experimental and age morphology of tissues of the internal medium. L. P. 35.)
- Завалишина О.А. 1969. Об особенностях иннервации и состоянии некоторых тканей кишечной стенки у детей. Арх. анат. Т. 56. Вып. 3. С. 19. (Zavalishina O.A. 1969. Characteristics of innervation and condition of some tissues of intestinal wall in Hirschsprungs disease in children. Arch. anat. V. 56. № 3. P. 19.)
- Завалишина О.А., Суворова Л.В. 1977. Развитие интрамуральных ганглиев пищеварительной трубки у зародышей кролика в условиях тиреоидиновой нагрузки материнского организма. Арх. анат. Т. 78. Вып. 8. С. 11. (Zavalishina O.A., Suvorova L.V. 1977. Development of intramural intestinal tube ganglia in rabbit embryos under maternal thyroid loading. Arch. anat. V. 78. № 8. P. 11.)
- Кнорре А.Г. 1949. Эмбриональное развитие вегетативной нервной системы позвоночных. Успехи совр. биол. Т. 27. № 1. С. 37. (Knorre A.G. 1949. Embryonic development of the autonomic nervous system of vertebrates. Adv. modern biol. V. 27. № 1. P. 37.)
- Кнорре А.Г. 1956. Гистологические особенности двухнедельного зародыша человека. Арх. анат. Т. 33. Вып. 2. С. 38. (Knorre A.G. 1956. Histological features of a two-week human embryo. Arch. Anat. V. 33. № 2. P. 38.)
- Кнорре А.Г. 1971. Эмбриональный гистогенез. Л., Медицина. (Knorre A.G. 1971. Embryonic histogenesis. L., Meditsina.)
- Кнорре А.Г., Лев И.Д. 1977. Вегетативная нервная система. 2-е изд., перераб. и доп. Л., Медицина. (Knorre A.G., Lev I.D. 1977. The autonomic nervous system. 2nd ed., revised and expanded. L., Meditsina.)
- Кнорре А.Г., Молчанова В.В., Семенова-Тян-Шанская А.Г. 1980. Процессы дифференцировки зародышевых листков и некоторых эмбриональных зачатков. Итоги науки и техники. Серия "Морфология человека и животных. Антропология", М., изд. ВИНТИ. Т. 9. (Knorre A.G., Molchanova V.V., Semenova-Tjan-Shanskaya A.G. 1980. Processes of differentiation of germinal layers and some embryonic anlages. Results of science and technology. The series "Morphology of humans and animals. Anthropology". M., VINITI. V. 9.)
- Кнорре А.Г., Суворова Л.Д. 1959. Основные этапы дифференцировки нейрона. Обзор данных и задачи исследований. Арх. анат. Т. 37. Вып. 7. С. 3. (Knorre A.G., Suvorova L.V. 1959. Principal stages of neuron differentiation. Review of data and problems of investigation. Arch. anat. V. 37. № 7. P. 3.)
- Кнорре А.Г., Суворова Л.Д. 1961. Источники развития нейронов симпатических ганглиев пограничного ствола в эмбриогенезе позвоночных. Арх. анат. Т. 40. Вып. 5. С. 93. (Knorre A.G., Suvorova L.V. 1961. Sources of neurons development of sympathetic trunk ganglia in embryogenesis of vertebrates. Arch. anat. V. 40. № 5. P. 93.)
- Кнорре А.Г., Суворова Л.Д. 1984. Развитие вегетативной нервной системы в эмбриогенезе. М., Медицина. (Knorre A.G., Suvorova L.V. 1984. Development of the autonomic nervous system in Vertebrates embryogenesis. M., Meditsina.)
- Кожухарь В.Г. 1978. Дифференцировка эпителия зачатков гонад у ранних эмбрионов человека. Арх. анат. Т. 72. Вып. 4. С. 84. (Kozhukhar V.G. 1978. Epithelial differentiation in the germinal gonads of the human embryos. Arch. anat. V. 72. № 4. P. 84.)

- Кожухарь В.Г.* 1979. Дифференцировка целомического эпителия зачатков гонад млекопитающих и птиц. Арх. анат. Т. 76. Вып. 1. С. 69. (*Kozhukhar V.G.* 1979. Differentiation of the coelomic epithelium of the gonad germ in mammals and birds. Arch. anat. V. 76. № 1. P. 69.)
- Кожухарь В.Г.* 1980. О секреторной активности целомического эпителия эмбриональной гонады человека как факторе привлечения мигрирующих гоноцитов. Арх. анат. Т. 78. Вып. 4. С. 79. (*Kozhukhar V.G.* 1980. On secretory activity of coelomic epithelium in the human embryonic gonade as a factor attracting migratory gonocytes. Arch. anat. V. 78. № 4. P. 79.)
- Кожухарь В.Г.* 1982. Ультраструктурное исследование эпителия индифферентной гонады в эмбриогенезе человека. Арх. анат. Т. 82. Вып. 2. С. 57. (*Kozhukhar V.G.* 1982. Ultrastructural investigation of epithelium of the indifferent gonad in human embryogenesis. Arch. Anat. V. 82. № 2. P. 57.)
- Левикова А.М.* 1950. Наблюдение за экспериментальным остеогенезом у кролика. Докл. АН СССР. Т. 71. № 1. С. 149. (*Levikova A.M.* 1950. Observation of experimental osteogenesis in rabbit. Reports Acad. Sci. USSR. V. 71. № 1. P. 149.)
- Левина М.Я.* 1951. Студенистое вещество пуповины человека и его образование. Докл. АН СССР. Т. 79. № 4. С. 709. (*Levina M.J.* 1951. Gelatinous substance of the human umbilical cord and its formation. Reports Acad. Sci. USSR. V. 79. № 4. P. 709.)
- Левина М.Я.* 1954. Некоторые данные по гистогенезу вартонова студня пуповины человека. Докл. АН СССР. Т. 98. № 6. С. 1029. (*Levina M.J.* 1954. Some data on the histogenesis of wartons jelly of the human umbilical cord. Reports Acad. Sci. USSR. V. 98. № 6. P. 1029.)
- Левина М.Я.* 1960. К сравнительной гистологии амниотического эпителия млекопитающих. Арх. анат. Т. 39. Вып. 7. С. 37. (*Levina M.J.* 1960. On comparative histology of amniotic epithelium in mammals. Arch. anat. V. 39. № 7. P. 37.)
- Марцинкевич Л.Д.* 1951. Сравнительно-гистологическое изучение дентина. Строение и развитие дентина у некоторых ящериц. Докл. АН СССР. Т. 77. № 1. С. 113. (*Martzinkevitch L.D.* 1951. Comparative histological study of dentin. Structure and development of dentin in some lizards. Reports Acad. Sci. USSR. V. 77. № 1. P. 113.)
- Марцинкевич Л.Д.* 1953. Сравнительно-гистологическое изучение крови и соединительной ткани птиц. Дис. ... канд. биол. наук. Л. (*Martzinkevitch L.D.* 1953. Comparative histological study of blood and connective tissue of birds. PhD thesis, L.)
- Марцинкевич Л.Д.* 1954. Возрастные изменения крови и соединительной ткани птиц. Докл. АН СССР. Т. 99. № 5. С. 841. (*Martzinkevitch L.D.* 1954. Age-related changes in the blood and connective tissue of birds. Reports Acad. Sci. V. 99. № 5. P. 841.)
- Марцинкевич Л.Д.* 1955. Общая морфологическая характеристика и видовая специфичность клеток крови птиц. Докл. АН СССР. Т. 100. № 1. С. 167. (*Martzinkevitch L.D.* 1955. General morphological characteristics and species specificity of avian blood cells. Reports Acad. Sci. USSR. V. 100. № 1. P. 167.)
- Марцинкевич Л.Д.* 1961. Особенности крови и кроветворения белокровных рыб. Арх. анат. Т. 41. Вып. 12. С. 75. (*Martzinkevitch L.D.* 1961. Some characteristics of blood in white-blood fish. Arch. anat. V. 41. № 12. P. 75.)
- Марцинкевич Л.Д.* 1966. Лейкоцитарный состав крови антарктических птиц. Арх. анат. Т. 50. Вып. 4. С. 97. (*Martzinkevitch L.D.* 1966. Leucocytal constituents of blood in Antarctic birds. Arch. anat. V. 50. № 4. P. 97.)
- Молчанова В.В.* 1958. Возрастные изменения реакции подкожной соединительной ткани при серозном воспалении (экспериментально-гистологическое исследование). Дис. ... канд. биол. наук. Л. (*Molchanova V.V.* 1958. Age-related changes in the reaction of subcutaneous connective tissue in serous inflammation (experimental histological examination). PhD thesis, L.)
- Молчанова В.В.* 1972. Дифференцировка эпителиев канальцев первичной и вторичной почки у кролика. Арх. анат. Т. 63. Вып. 8. С. 106. (*Molchanova V.V.* 1972. Differentiation of the epithelia of the primary and secondary renal tubules in rabbits. Arch. anat. V. 63. № 8. P. 106.)
- Молчанова В.В.* 1975. Соотношение дифференцировки эпителиев провизорной и дефинитивной почек у позвоночных. Арх. анат. Т. 68. Вып. 6. С. 97. (*Molchanova V.V.* 1975. Correlation of differentiation of the provisory and definitive kidney epithelia in vertebrates. Arch. anat. V. 68. № 6. P. 97.)
- Оленев С.Н.* 1964. Дифференцировка нейронов зрительной коры среднего мозга (*tectum opticum*) куриного зародыша. Арх. анат. Т. 47. Вып. 9. С. 99. (*Olenev S.N.* 1964. Differentiation of neurons of tectum opticum of the midbrain in chick embryo. Arch. anat. V. 47. № 9. P. 99.)
- Петрова Л.Д.* 1968. Дифференцировка волокон сердечной мышцы в эмбриогенезе цыпленка. Материалы конф., посвящ. 100-летию каф. гистологии ВМА им. С.М. Кирова. Л. С. 169. (*Petrova L.D.* 1968. Differentiation of cardiac muscle fibers in chicken embryogenesis. Materials of the conference dedicated to the 100th anniversary of the Dep. of Histology of the MMA named after S.M. Kirov. P. 169.)
- Румянцев П.П.* 1953. Экспериментально-гистологическое исследование сердечной мышцы кошки в возрастном разрезе. Канд. дис. Л., 1953. (*Rumyantsev P.P.* 1953. Experimental histological examination of the heart muscle of the cat in the age aspect. PhD thesis, L.)
- Румянцев П.П.* 1954. Своеобразие регенеративных процессов в субэпикардальном слое сердечной мышцы. Докл. АН СССР. Т. 97. № 1. С. 177. (*Rumyantsev P.P.* 1954. The peculiarity of regenerative processes in the subepicardial layer of the heart muscle. Reports Acad. Sci. USSR. V. 97. № 1. P. 177.)
- Румянцев П.П.* 1955. Реакция миокарда млекопитающих на повреждение в зависимости от возраста животных. Докл. АН СССР. Т. 100. № 3. С. 601. (*Rumyantsev P.P.* 1955. Mammalian myocardial response to injury depending on the age of animals. Reports Acad. Sci. USSR. V. 100. № 3. P. 601.)
- Самсонова В.Ф.* 1954. Гистологические наблюдения над регенерацией кости кошки в различных условиях. Дис. ... канд. биол. наук. Л. (*Samsonova V.F.* 1954. PhD thesis, L.)

- Самсонова В.Ф.* 1960. Гистологические наблюдения над регенерацией кости кошки в различных условиях. В сб.: Вопросы сравнительной, экспериментальной и возрастной морфологии тканей внутренней среды. Л. С. 76. (*Samsonova V.F.* 1960. Histological observations of cat bone regeneration under various conditions. In: Questions of comparative, experimental and age morphology of tissues of the internal medium. L. P. 76.)
- Семенова О.А.* 1958. Развитие нервных элементов в заднем отделе кишечной трубки в связи с ее гистогенезом. Арх. анат. Т. 35. Вып. 4. С. 56. (*Seменова O.A.* 1958. The development of nerve elements in the posterior section of the intestinal tube in connection with histogenesis of the latter. Arch. anat. V. 35. № 4. P. 56.)
- Семенова-Тян-Шанская А.Г.* 1969. Первичные половые клетки зародышей человека в период миграции к зачаткам гонад. Арх. анат. Т. 56. Вып. 6. С. 3. (*Семенова-Тян-Шанская A.G.* 1969. Primordial germ cells during migration to gonad anlage in human embryos. Arch. anat. V. 56. № 6. P. 3.)
- Семенова-Тян-Шанская А.Г.* 1971. Первичные половые клетки зародышей высших позвоночных и человека ранних стадий развития. Арх. анат. Т. 60. Вып. 6. С. 106. (*Семенова-Тян-Шанская A.G.* 1971. Primitive sex cells in embryos of high vertebrates and men at early stages of development. Arch. anat. V. 60. № 6. P. 106.)
- Семенова-Тян-Шанская А.Г., Кнорре А.Г.* 1972. Половой зачаток (гонобласт), его происхождение и эволюция. Арх. анат. Т. 63. Вып. 8. С. 29. (*Семенова-Тян-Шанская A.G., Knorre A.G.* 1972. Gonoblast, its origin and evolution. Arch. anat. V. 63. № 8. P. 29.)
- Семенова-Тян-Шанская А.Г., Паткин Е.Л.* 1978. Изменение ядер гоноцитов на разных этапах их дифференцировки у ранних зародышей человека женского пола. Арх. анат. Т. 74. Вып. 4. С. 91. (*Семенова-Тян-Шанская A.G., Patkin E.L.* 1978. Changes in gonocyte nuclei at different stages of their differentiation in early human female embryos. Arch. anat. V. 74. № 4. P. 91.)
- Семенова-Тян-Шанская А.Г., Паткин Е.Л.* 1982. Изучение на изолированных ядрах динамики изменений хромосом женских половых клеток у ранних зародышей человека. Арх. анат. Т. 82. Вып. 2. С. 51. (*Семенова-Тян-Шанская A.G., Patkin E.L.* 1982. Study of the dynamics of chromosome changes in female germ cells in early human embryos on isolated nuclei. Arch. anat. V. 82. № 2. P. 51.)
- Суворова Л.В.* 1959. Развитие интрамуральных ганглиев двенадцатиперстной кишки в связи с ее гистогенезом. Арх. анат. Т. 36. Вып. 4. С. 51. (*Suvorova L.V.* 1959. Development of intramural ganglia of duodenum in connection with its histogenesis. Arch. anat. V. 36. № 4. P. 51.)
- Суворова Л.В.* 1963. Сопоставление развития некоторых интрамуральных нервных элементов с развитием остальных тканевых компонентов пищевода кролика. Арх. анат. Т. 45. Вып. 9. С. 31. (*Suvorova L.V.* 1963. Comparative study of development of some intramural nerve elements and other tissue components of oesophagus in rabbit. Arch. anat. V. 45. № 9. P. 31.)
- Суворова Л.В., Кнорре А.Г.* 1960. Источники развития интрамуральных вегетативных ганглиев в эмбриогенезе позвоночных. (Обзор литературы). Арх. анат. Т. 38. Вып. 1. С. 105. (*Suvorova L.V., Knorre A.G.* 1960. Sources of development of intramural vegetative ganglia in embryogenesis of vertebrates. Arch. anat. V. 38. № 1. P. 105.)
- Умаров У.Х.* 1969. Дифференцировка чувствительных нейронов спинальных ганглиев у куриного зародыша. Арх. анат. Т. 57. Вып. 10. С. 77. (*Umarov U.Kh.* 1969. Differentiation of sensory neurons of spinal ganglia in chick embryo. Arch. anat. V. 57. № 10. P. 77.)
- Чэнь Ди.* 1957. Изучение регенеративных возможностей сердечной мышцы некоторых млекопитающих в условиях подкожной трансплантации. Дис. ... канд. биол. наук. Л. (*Chen Di.* 1957. Study of the regenerative capabilities of the heart muscle of some mammals in conditions of subcutaneous transplantation. PhD thesis. L.)
- Ясвоин Г.В.* 1939а. Значение так называемых темных клеток. Успехи совр. биол. Т. 11. № 3. С. 430. (*Yasvoyn G.V.* 1939a. The meaning of the so-called dark cells. Succ. modern biol. V. 11. № 3. P. 430.)
- Ясвоин Г.В.* 1939б. О значении так называемых темных клеток. Докл. АН СССР. Т. 24. № 6. С. 607. (*Yasvoyn G.V.* 1939b. About the meaning of the so-called dark cells. Reports Acad. Sci. USSR. V. 24. № 6. P. 607.)

Formation of the Department of Histology and Embryology Named after Professor A.G. Knorre as a Research Team

© 2022 г. V. G. Kozhukhar*

St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, 194100 Russia

*e-mail: v.kojukhar@yandex.ru

The department of histology and embryology named after Professor A.G. Knorre was organized in 1932. However, scientific research at the department has been conducted since 1935 when Professor A.A. Zavarzin was the head of the department. For a number of reasons, these studies were not of a systemic nature. Only since 1946, when the department was headed by Professor E.S. Danini, scientific work took on a systematic character and the department became a team of like-minded people united by a common scientific direction. Since 1955, under the leadership of Professor A.G. Knorre, the front of scientific research has been expanded in the format of various aspects of embryonic histogenesis. The department was formed as a research team that received well-deserved acclaim.

Keywords: A.A. Zavarzin, E.S. Danini, A.G. Knorre, tissues of the internal medium, embryonic histogenesis

ОПЫТ РАБОТЫ СО СКАНИРОВАННЫМИ УЧЕБНЫМИ ГИСТОЛОГИЧЕСКИМИ ПРЕПАРАТАМИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИНТЕРАКТИВНОЙ ПАНЕЛИ

© 2022 г. В. А. Акулинин¹, *, И. А. Одинцова², Л. М. Макарьева¹, М. С. Коржук^{1, 2},
А. Ю. Шоронова¹, Д. Б. Авдеев¹

¹Омский государственный медицинский университет Минздрава России, Омск, Россия

²Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: v_akulinin@outlook.com

Вопрос современной организации обучения студентов в медицинских вузах для возможности получения комплексных и актуальных знаний в нашем быстро меняющемся мире всегда был безусловно важным. Современный технологический мир ждет от нас новых соответствующих решений и подходов. Мы хотим поделиться своим опытом и взглядами на формирование новой образовательной среды на наших кафедрах. В широком понимании будущее без прошлого не существует. Общеизвестно и неоспоримо и то, что фундаментом любых нынешних научно-технологических достижений и благ является история развития и становления в конкретном случае каждой кафедры.

В конце 2021 г. на кафедры были закуплены интерактивные панели Edflat ED 65 CT (4K UHD, Windows 10 и Android 8.0) со встроенной камерой и возможностью проводить телеконференции. Программа EShare позволяет одновременно выводить на интерактивную панель изображения с гаджетов и работать в интерактивном режиме. Подключение к интернету позволяет на занятиях заходить на образовательный портал университета и использовать другие информационные ресурсы всемирной сети. Кафедра анатомии человека предоставила нам доступ к цифровому анатомическому атласу для стола "Пирогов", который также может быть использован на интерактивной панели.

Было проведено сканирование 76 учебных гистологических препаратов из архива кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии Омского государственного медицинского университета и 42 препаратов из Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова (Санкт-Петербург). Сканер препаратов Leica Aperio CS2 лю-

безно предоставлен Группой компаний "БиоЛайн" (Санкт-Петербург).

При сканировании гистологических препаратов мы столкнулись с некоторыми трудностями получения качественных микрофотографий, что было связано с толщиной предметных стекол и толщиной среза препарата. Огромное значение имело качество окраски и среза гистологических препаратов, фокусировки точек и времени сканирования, выбор качественных учебных гистологических препаратов не всегда соответствовал хорошим сканированным микрофотографиям.

Для просмотра оцифрованных гистологических препаратов во время учебного процесса используется установленная на интерактивную панель бесплатная версия программы Aperio Image Scope. Это дало новую уникальную возможность для анализа сканированных микропрепаратов со студентами в интерактивном режиме: рассмотреть общий план препарата и сразу увеличивать его отдельные фрагменты, показывая мелкие структуры на большом увеличении. Помимо этого имеется возможность на изображении обозначать и рисовать изучаемые элементы, фотографировать со смартфона (Android, iOS) и переносить изображение на интерактивную панель с целью анализа и разбора препаратов.

Мы надеемся, что использование новых интерактивных технологий для анализа гистологических препаратов повысит учебную мотивацию студентов, их интерес к изучению гистологии, стремление к самообразованию, в том числе к освоению новых цифровых технологий для совершенствования учебного процесса.

АССОЦИАЦИЯ КСЕНОГЕННЫХ ФИБРОБЛАСТОВ И НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОЙ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ УСКОРЯЕТ ЗАЖИВЛЕНИЕ ИШЕМИЗИРОВАННОЙ РАНЫ КОЖИ ЗА СЧЕТ ХОУМИНГА СОБСТВЕННЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК К ХЕМОАТТРАКТАНТУ SDF-1

© 2022 г. Ю. Г. Барановский¹, Б. И. Кузьминов¹, Т. А. Бойко¹, И. А. Демьяненко¹,
Л. А. Кутузова¹, Е. Ю. Шаповалова¹, *

¹Медицинская академия им. С.И. Георгиевского КФУ им. В.И. Вернадского, Симферополь, Россия

*E-mail: Shapovalova_L@mail.ru

Адекватный ответ собственных стволовых клеток на хемоаттрактанты играет ключевую роль в разви-

тии органов в онтогенезе, а также в процессах обновления тканей и их регенерации в случае повреждений.

Локализация хемоаттрактанта SDF-1 (stromal cell-derived factor-1), обозначаемого также как CXCL12J, на плазматической мембране клеток повышается при гипоксии и механических травмах, что приводит к усиленной миграции в зону повреждения собственных стволовых клеток с рецепторами CXCR4 (Григорян, 2006), являющихся решающим фактором в заживлении повреждений.

Целью исследования было изучение влияния трансплантации комплекса низкомолекулярной гиалуроновой кислоты (ГК) и дермальных ксенофибробластов на содержание SDF-1-позитивных клеток и CD34-позитивных мезенхимальных стволовых клеток (МСК) в биоптатах регенерирующей экспериментальной ишемизированной раны кожи.

В исследовании использовали 112 белых мышей линии C57/Bl в возрасте 5–7 мес., которые содержались в виварии. Животные были разделены на контрольную (КГ) и экспериментальную группы (ЭГ). В каждой группе биоптат заживающей раны изучали на 4, 7, 10, 12, 15, 19, 23 и 26-е сут после операции по моделированию ишемизированной раны на спине животных в межлопаточной области. Для ЭГ дермальные фибробласты были получены методом ферментации, культивированы в среде DMEM F12 (Lonza) и в количестве 1.33 млн клеток ассоциированы с 2%-ной низкомолекулярной ГК в сочетании с 1.33 млн клеток ксенофибробластов. Наличие SDF-1 и CD34-позитивных клеток определяли иммуногистохимическим методом на парафиновых срезах. Использовали первичные поликлональные антитела к SDF-1 (Gene Tex Inc., США) и моноклональные антитела к CD34 (клон EP373Y, Abcam, США) в разведении 1 : 100. В качестве вторичных применяли

универсальные антитела (HiDef Detection™ HRP Polymer system, Cell Marque, США), конъюгированные с пероксидазой хрена. Срезы докрашивали гематоксилином Майера для визуализации ядер. Индекс SDF-1- и CD34-позитивных клеток определяли путем подсчета их количества на 100 клеток с последующим вычислением средних значений.

Обнаружено, что в биоптатах заживающего экспериментального кожного дефекта с недостаточностью васкуляризации на 4-е сут после трансплантации ксенофибробластов в сочетании с низкомолекулярной ГК индекс SDF-1-позитивных клеток в эпидермисе и дерме выше по сравнению с КГ, что обеспечивает положительный хемотаксис МСК. Однако в последующие временные точки индекс клеток, выделяющих фактор SDF-1, в ЭГ увеличивается медленнее, не достигая таковых значений в КГ, и раньше начинает уменьшаться (к 12-м сут в эпидермисе и 10-м сут в грануляционной ткани). Аналогичную динамику демонстрирует индекс МСК. Присутствие ГК в межклеточном веществе свойственно неповрежденной ткани, это тормозит продукцию SDF-1, а, соответственно, темпы привлечения МСК. А.С. Григорян (2006) показал, что несмотря на то, что клетки поврежденных тканей в большом объеме секретируют фактор SDF-1, его избыточное количество не только не привлекает МСК, но и оказывает противоположный эффект (“отпугивает” их). Вероятно, трансплантированные фибробласты и вслед за ними эпидермоциты способные активно делиться без привлечения МСК, что позволяет в этом случае обеспечивать заживление раны на 16.94% раньше, чем в контроле.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ ОЦЕНКИ НАВЫКОВ ЧТЕНИЯ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ НА КАФЕДРЕ ГИСТОЛОГИИ ПРИ ДИСТАНЦИОННОМ ОБУЧЕНИИ

© 2022 г. О. Ю. Береснева¹, *, С. В. Сазонов¹, С. А. Денисенко¹

¹Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург, Россия

*E-mail: beresnevaolga66@yandex.ru

На образовательный процесс в 2020–2021 гг. оказало влияние развитие пандемии COVID-19, что привело к введению гибридного обучения студентов – постоянным переходам с очной формы образования на дистанционную форму в режиме on-line (ДО) и обратно. Постоянно меняющиеся условия проведения практических занятий на кафедре гистологии, цитологии и эмбриологии ускорили цифровую трансформацию обучения (Сазонов, 2018). В течение двух лет мы старались и стараемся найти баланс между традиционными и новыми методами обучения, взять на вооружение новые возможности цифровых технологий, при этом постараться сохранить базовые принципы образовательного процесса при изучении дисциплины. Практические занятия на ка-

федре гистологии в режиме on-line проводили на платформе Microsoft Teams, рекомендуемой в УГМУ для использования в учебном процессе. Целью работы являлась оценка эффективности применения различных форм оценки навыков чтения гистологических препаратов студентами на практических занятиях на кафедре гистологии.

Основная проблема при ведении учебного процесса в дистанционном формате заключается в организации обратной связи со студентами. Оценка практических навыков студентов на кафедре гистологии проводили с использованием индивидуальных визуализированных контрольных заданий (пять вопросов к микрофотоснимкам гистологических препаратов, изучаемых на занятии, требующих от

студентов комплексных решений) и путем непосредственного устного опроса по сканированным препаратам – полнослайдовым изображениям гистологических препаратов (Береснева и др., 2021). Анкета, предложенная студентам, включала вопросы по качеству предложенных на ДО контрольных заданий и адекватности устной оценки практических навыков по WSI. Анкетирование проводилось после завершения практических занятий в форме ДО. Анкеты заполняли анонимно. В анкетировании принимали участие 42 студента педиатрического факультета второго курса и 5 преподавателей кафедры гистологии. Для сравнения средних баллов по практическим навыкам, полученным на аудиторных занятиях и на ДО, использовали данные 3 электронных журналов учета работы студентов на практических занятиях.

Результаты опроса показали, что устное собеседование по WSI предпочитают 74% студентов и 100% преподавателей. Однако, при отсутствии устойчивой связи (Интернета) целесообразно использовать рассылку индивидуальных визуализированных заданий (100% опрошенных студентов и преподавателей). За время ДО подобрано более 200 различных микрофотоснимков гистологических препаратов и создано к ним более 200 задач, состоящих из пяти вопросов, для выполнения которых студент должен

проявить несколько компетенций и совершить несколько мыслительных операций, а не просто узнать типовое задание и вспомнить алгоритм его решения. Выполненные дистанционно задачи (ограниченные временными рамками) позволяют преподавателю оценить самостоятельность выполнения практической работы, при этом, в условиях ограничения времени выполнения, риск списывания не являлся запредельным. Анализ результатов, полученных с применением 5-балльной оценочной шкалы, показал отсутствие статистически достоверно значимых отличий баллов, полученных за решение визуализированных ситуационных задач, за устный ответ с использованием WSI и баллов, полученных за традиционную диагностику препаратов с использованием микроскопа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Сазонов С.В. 2018. Цифровые технологии в изучении гистологии. Морфология. № 3. С. 242.
- Береснева О.Ю., Денисенко С.А., Сазонов С.В., Шамишурин Е.О. 2021. Whole slide imaging для приобретения навыков чтения гистологических препаратов на кафедре гистологии, цитологии и эмбриологии УГМУ в условиях дистанционного обучения. Вестник УГМУ. № 3. С. 3.

МЕТОДИКА ДИСТАНЦИОННОГО ПРЕПОДАВАНИЯ НА КАФЕДРЕ ГИСТОЛОГИИ С ЦИТОЛОГИЕЙ И ЭМБРИОЛОГИЕЙ ПРИВОЛЖСКОГО ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО МЕДИЦИНСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

© 2022 г. Н. В. Благова¹ *, М. Л. Бугрова¹

¹Приволжский исследовательский медицинский университет Минздрава России, Нижний Новгород, Россия

*E-mail: blagovanatalya@yandex.ru

В условиях сложившейся эпидемиологической ситуации встал вопрос о возможности преподавания дисциплины “Гистология” в дистанционном формате. Сложность заключалась в том, что большая часть предмета – это практические занятия, включающие в себя работу с микроскопом. В связи с этим основной целью стала разработка и внедрение метода дистанционного преподавания дисциплины “Гистология, эмбриология, цитология” в Приволжском исследовательском медицинском университете.

Методика использована для обучения студентов лечебного, педиатрического, стоматологического, медико-профилактического факультетов, а также факультета международного медицинского образования (более 880 человек). Создан банк отсканированных гистологических препаратов в удаленном хранилище, доступ к которому осуществляется посредством удаленного рабочего стола Microsoft Windows, реализованный на базе Astra Linux. Для просмотра препаратов используется программа QuPath v0.2.3 (разработана в Государственном университете Эдинбурга (Шотландия), открытый доступ

<https://qupath.github.io>). Ведение онлайн-занятий осуществлялось на платформе Webex (by CISCO). Для размещения учебных материалов и прикрепления домашних работ студентов использовался портал дистанционного образования ПИМУ (СДО) – платформа, базирующаяся на системе Moodle.

Оцифрованные гистологические препараты позволили изучать срезы без применения микроскопов. Преподаватель во время онлайн-занятия открывает программу QuPath, демонстрирует изображение и поясняет все морфологические элементы. Так же можно осуществлять опрос обучающихся: в онлайн-режиме: показывать элемент и задавать вопрос конкретному обучающемуся. В конце практического занятия студенты должны зарисовать гистологические препараты с обозначением основных структур в рабочую тетрадь и отправить скан-копию в свой личный кабинет на портале СДО. Преподаватель проверяет работы студентов и осуществляет текущий контроль: есть возможность увидеть прослушанные лекции, пройденные тесты, размещенные там же на портале в виде системы модулей. Участие в контроле за работой сту-

дента в модуле минимально, поскольку прохождение его элементов подчинено иерархической системе с автоматическими настройками доступа. Для подготовки к итоговому занятию и к экзамену обучающиеся могут использовать хранилище препаратов в режиме удаленного доступа. Проведение экзамена происходит аналогично практическому занятию.

Таким образом, на кафедре гистологии созданы и реализуются элементы электронных образовательных технологий для дистанционного преподавания дисциплины. Используемые алгоритмы и сервисы позволяют достаточно эффективно организовать образовательный процесс в соответствии с совре-

менными тенденциями и реализовывать наиболее информативные и удобные способы подачи материала студентам, осуществлять контроль полученных знаний. Приобретенный опыт и оценка используемой системы электронного обучения, служит отправной точкой для разработки принципиально новых, перспективных образовательных технологий, влекущих за собой изменение принципа реализации образовательной деятельности. В то же время, основываясь на результатах работы нашей кафедры и на опыте других вузов можно сделать вывод, что дистанционный формат обучения не может полностью заменить очный.

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЯИЧНИКОВ МЕЛКИХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ, НАСЕЛЯЮЩИХ ЭКОСИСТЕМЫ КРУПНОГО ГОРОДА

© 2022 г. Е. В. Блинова¹, *, Н. Н. Шевлюк¹

¹Оренбургский государственный медицинский университет Минздрава России, Оренбург, Россия

*E-mail: k_histology@orgma.ru

Целью работы являлось исследование морфофункциональных характеристик яичников мелких млекопитающих, обитающих в условиях влияния факторов городской среды. Сбор материала проводили в пик репродуктивной активности в весенне-летний период (апрель—июнь) в 2018—2021 гг. Объектом исследования служили яичники половозрелых самок мелких млекопитающих: домашней мыши *Mus musculus* L. (40 особей), степной пеструшки *Lagurus lagurus* P. (19 особей), малой лесной мыши *Apodemus uralensis* P. (34 особи), полевой мыши *Apodemus agrarius* P. (28 особей), обыкновенной полевки *Microtus arvalis* P. (25 особей), обыкновенной бурозубки *Sorex araneus* L. (14 особей). Отлов животных производили на различных территориях г. Оренбурга — частный жилой сектор, многоэтажная жилая застройка, дачные массивы, склады хлебоприемных предприятий, полосы отчуждения железных дорог, лесополосы, парки и скверы. Контролем служили яичники животных тех же видов, отловленных в экологически благоприятных экосистемах Оренбургской области. Полученный материал (яичники) обрабатывали с использованием гистологических, гистохимических, иммуногистохимических и морфометрических методик. Статистическую обработку данных проводили в пакете прикладных программ Statistica v.7.0 (StatSoft, Inc.).

Характеристики яичников животных, отловленных на территории города, существенно различались, однако свидетельствовали о возможном участии этих животных в размножении. Исходя из структуры яичников, среди изученных животных могли участвовать в репродукции от $64.3 \pm 5.1\%$ (степная пеструшка) до $87.2 \pm 5.7\%$ (домашняя мышь). У большинства животных из городских экосистем выявлено достоверное снижение массы и линейных размеров яичников, что свидетельствует об участии

в репродукции животных более ранних возрастов в сравнении с естественными биоценозами. У самок всех видов установлено уменьшение количества фолликулов на единицу площади яичника, с одновременным возрастанием в яичнике доли фолликулов в стадии быстрого роста, а также возрастание числа атретических фолликулов. Выявлены деструктивные изменения в стенке антральных фолликулов, при этом степень выраженности деструктивных изменений в эпителиальных клетках выше, чем в клетках теки. Отмечена высокая экспрессия проапоптотического белка p53 в фолликулярных клетках стенки антральных фолликулов и умеренная экспрессия маркера пролиферативной активности белка Ki-67. Менее выражены деструктивные изменения в яичниках домашней и малой лесной мыши, а также рыжей полевки. Следует подчеркнуть, что деструктивные изменения были наиболее заметны в яичниках животных, населяющих парки и скверы города.

На основании полученных результатов можно полагать, что более быстрое истощение резерва фолликулов в яичниках самок из городских экосистем может быть обусловлено как интенсификацией размножения, так и более высокими показателями гибели фолликулов на разных стадиях роста. Высокий уровень экспрессии проапоптотического белка p53 на фоне умеренной экспрессии белка Ki-67 свидетельствует о нарушении баланса между процессами размножения клеток и апоптозом. Морфофункциональная характеристика яичников домашней и малой лесной мышей и рыжей полевки указывает на высокую адаптивность этих видов, что позволяет им успешно размножаться и поддерживать относительно высокую численность популяций в условиях городских экосистем.

РЕАКЦИЯ СТРУКТУР СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ РОТОГЛОТКИ НА ВИРУСНУЮ КОНТАМИНАЦИЮ ВПЧ-ЭТИОЛОГИИ

© 2022 г. О. Г. Восканян¹, А. Р. Ким¹, С. В. Иченко¹, Г. В. Рева^{1, 2, *}, В. В. Семигласова¹, И. В. Семенцов¹, Э. В. Слабенко¹, И. В. Рева^{2, **}

¹Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

²Международный медицинский научно-образовательный центр, Ниигата, Япония

*E-mail: RevaGal@yandex.ru

**E-mail: avers2@yandex.ru

Целью исследования явилось изучение реакции CD68-позитивных клеток при папилломавирусной инфекции слизистой оболочки ротоглотки.

Изучены 125 биопсий слизистой оболочки ротоглотки от 58 пациентов, полученных в соответствии с фундаментальными этическими принципами Хельсинкской декларации, GCP Rules (Good Clinical Practice) и одобренных этической комиссией ФГАОУ ВО ДВФУ Министерства образования и науки Российской Федерации. Проведено классическое окрашивание препаратов гематоксилином и эозином, иммуногистохимическое определение Ki-67-позитивных клеток и фенотипирование эффекторных клеток CD по протоколам ДАКО, ПЦР-диагностика для выявления HPV этиологии папиллом.

Проведенный анализ структуры папиллом ВПЧ этиологии на разных уровнях развития патологического процесса позволил установить, что процесс образования папилломы начинается с локального повышения пролиферативной активности кератиноцитов, способствующего образованию местного эпителиального возвышения над поверхностью слизистой оболочки ротоглотки (СОРГ) в виде папилломы. На втором этапе происходит врастание прилежащей к эпителию соединительной ткани СОРГ. При этом количество иммуноцитов/макрофагов в эпителиальном слое СОРГ уменьшается не только в зоне роста папилломы, но и в прилежащей к новообразованию ткани. Третья стадия характеризуется разрушением базальной мембраны СОРГ, апоптозом клеток камбиальных слоев и образованием лейкоцитарного инфильтрата в собственной пластинке

СОРГ. Зараженные вирусами кератиноциты фагоцитируются макрофагами или отслаиваются с поверхности эпителиального слоя. Тканевой дефект, возникающий в средних слоях эпителиального пласта, и отсутствие клеток Лангерганса указывают на взаимосвязь миграции антигенпрезентирующих клеток, экспрессирующих CD68, с нарушением дифференцировки кератиноцитов. Исчезновение из эпителия CD68-позитивных клеток и появление изменений в спектре межклеточных ансамблей в эпителиальном пласте на уровне промежуточного слоя свидетельствуют о хронизации вирусной контаминации в слизистой оболочке ротоглотки. Несмотря на разрастание эпителия, а затем и соединительной ткани с образованием папилломы, возвышающейся над поверхностью, пролиферативная активность эпителия снижается, а количество клеток с признаками апоптоза увеличивается. CD68-позитивные клетки исчезают из эпителиального слоя и обнаруживаются в соединительной ткани собственной пластинки.

Можно заключить, что снижение пролиферативной активности, усиление процесса апоптоза и нарушение дифференцировки эпителиальных клеток, приводящие к снижению барьерных свойств покровного эпителия, снижение количества CD68-позитивных клеток в эпителиальных слоях и возрастание их количества в собственной соединительно-тканной пластинке слизистой оболочки ротоглотки являются фактором риска хронизации ВПЧ-контаминации.

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РЕПАРАТИВНОГО ГИСТОГЕНЕЗА КОЖИ ПРИ ТЯЖЕЛОЙ КОМПРЕССИОННОЙ ТРАВМЕ

© 2022 г. А. В. Горбулич^{1, *}, О. Е. Миргородская¹

¹Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: alenagor@bk.ru

Цель данного исследования — выявить реактивные изменения клеточных дифферонов кожи и их взаимодействия при тяжелой компрессионной травме, оценить состояние тканевого компонента — рыхлой соединительной ткани, эпидермиса — и органного, представленного сосудами микроциркуляторного русла (МЦР) и дериватами кожи. Полученные в ходе экспериментов данные анализировали с учетом

концепции клеточно-дифферонной организации тканей и гипотезы о функциональных гистионах.

Крысам-самцам линии Вистар экспериментальной группы ($n = 28$) специальным устройством (тиски) под наркозом (препарат “Золитил-100”, доза 8 мг/кг) наносили тяжелую компрессионную травму задней правой конечности. Сила компрессии составила 10–12 кг/см², длительность сдавливания — 7 ч.

Выведение животных из эксперимента проводили с помощью передозировки наркотического вещества. Взятие материала для гистологического исследования производили через 3 ч и на 3-е, 7-е, 14-е, 28-е сут после нанесения компрессионной травмы. Материал фиксировали в 10%-ном забуференном формалине, затем обезживали в спиртах возрастающей концентрации и заливали в парафин. Гистологические срезы, окрашенные гематоксилином и эозином, анализировали под световым микроскопом Score A1 с камерой AxioCamERc 5s с использованием программы ZEN 2.3.

В работе были использованы классические морфологические подходы — анализ гистологических срезов кожи голени на разных сроках после длительного сдавления, окрашенных гематоксилином и эозином. Исследовали реактивные изменения эпидермиса, дермы, гиподермиса и дериватов кожи (сальные железы, волосные фолликулы).

На ранних сроках после отмены сдавления наблюдали расслоение рогового слоя эпидермиса. В проекции верхушек сосочков дермы в эпидермисе встречаются гибнущие базальные и шиповатые эпителиоциты, так же встречаются дезинтегрированные базальные эпителиоциты, утратившие связь с базальной мембраной. Они расположены одиночно или формируют малые группы по 2–3 клетки. Эпителиоциты имеют округлую форму, светлую цитоплазму и ядро, смещенное на периферию клетки. В

дерме и гиподермисе отмечена очаговая деструкция элементов соединительной ткани. Вокруг волосных фолликулов и концевых отделов сальных желез выражен отек. На 7-е и 14-е сут продолжаются реактивные изменения со стороны эпителиоцитов и клеточных дифферонов дермы. В прослойках соединительной ткани между дольками адипоцитов в гиподермисе отмечена инфльтрация лейкоцитами. Состояние тканевых элементов кожи на поздних сроках после травмы (28-е сут) характеризуется выраженной гипертрофией многослойного плоского ороговевающего эпителия (50–70 мкм по сравнению с 20–30 мкм сразу после снятия тисков) за счет клеток шиповатого слоя, снижения отечности соединительной ткани и наличием расширенных лимфатических капилляров. В области наложения тисков слои эпидермиса деформируются на всех сроках наблюдения. Из внутренних слоев дермы к базальной мембране эпидермиса мигрируют тканевые базофилы, лимфоциты и фибробласты, что свидетельствует о воспалительном процессе. Вероятно, из-за разрыва клеточной мембраны и гибели клеток при компрессионной травме осмотически активная цитоплазма высвобождается в межклеточное пространство, вызывая дальнейшее накопление жидкости и повышение давления внутри области сдавления. После отмены компрессионного воздействия реактивные изменения нарастают и захватывают все ткани кожи.

СОЗДАНИЕ БАЗЫ ДАННЫХ ОЦИФРОВАННЫХ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ К ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ ПО ДИСЦИПЛИНЕ “ВОЗРАСТНАЯ ГИСТОЛОГИЯ”

© 2022 г. С. А. Донсков¹, *, В. Г. Шестакова¹, Н. А. Костюничева¹, Е. А. Черняева¹, Д. В. Кузина¹, С. В. Фомина¹

¹Тверской государственной медицинской университет Минздрава России, г. Тверь, Россия

*E-mail: donskov_s@mail.ru

При изучении дисциплины “Гистология, эмбриология и цитология” в медицинском университете особое внимание уделяется получению у студентов базовых знаний о микроскопической функциональной морфологии, эмбриональном и постэмбриональном развитии органов и тканей. При этом делается акцент на возрастных морфологических особенностях органов. С целью реализации инновационных подходов к образовательному процессу на первом и втором курсах для обучающихся по специальности “Педиатрия” была введена дисциплина по выбору “Возрастная гистология”, включающая сведения о возрастных морфологических и функциональных аспектах органов и систем по наиболее значимым разделам.

Проблемы возрастной гистологии по-прежнему являются весьма актуальными и требующими особых базовых знаний. В связи с этим представляется

важным включать в практическую часть занятий просмотр и изучение препаратов, отражающих их морфологические особенности в возрастном аспекте. Цель исследования заключалась в создании электронного банка микропрепаратов разных возрастных групп для практической части теоретического модуля “Возрастная гистология”.

Производился посмертный забор биоптатов органов от лиц разных возрастных групп в соответствии с современной классификацией периодизации онтогенеза человека: плодный материал, новорожденных, грудного, детей, зрелых, пожилого и старческого возраста. Микропрепараты биоматериалов головного мозга, легкого, сердца, печени, желудка, почки, селезенки, вилочковой железы изготавливали по стандартной гистологической методике с использованием следующего оборудования: батарея проводки гистологического материала, термостат Т.С. 1/20,

вытяжная система Lamsystems, станция для заливки ESD-2800, полуавтоматический ротационный микротом Hestion ERM 3100. Работу проводили совместно с кафедрой патологической анатомии с привлечением членов СНО кафедр. Препараты изучали и фотографировали с помощью исследовательского микроскопа Olympus CX21, видеокамеры MC-10 USB 3.0 и пакета программ MC view Setup, MC view Dshow Setup и MC view Twain Setup (ООО “ЛОМО-Микроанализ”).

Изготовлены и описаны препараты головного мозга, легкого, сердца, печени, желудка, почки, селезенки, вилочковой железы разных возрастных групп. При описании отмечены возрастные морфо-

логические особенности и эти материалы включены в этапный и рубежный контроль знаний обучающихся. Создание и постоянное пополнение электронного банка возрастных гистологических микропрепаратов позволит лучше усвоить теоретический материал и акцентировать внимание обучающихся на возрастных морфологических особенностях микроанатомии различных органов. Необходимость этой работы продиктована как возможностью использования для обучающихся по программам специалитета, так и профориентации в отношении таких специальностей, как акушерство и гинекология, репродуктология, неонатология, патологическая анатомия и судебная медицина.

ЖЕЛТОЧНЫЙ МЕШОК ЧЕЛОВЕКА КАК ОРГАН ГОМЕОСТАЗА В СИСТЕМЕ ВНЕЗАРОДЫШЕВЫХ ОРГАНОВ

© 2022 г. Н. Н. Дубинина¹ *, Ю. И. Складнов¹, С. В. Залавина¹, Е. А. Попп¹

¹Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Новосибирск, Россия

*E-mail: anna.dubinina05@gmail.com

Одной из задач современной эмбриологии является постановка и решение вопросов, позволяющих оценить взаимодействие между собой не только всех компонентов системы “Мать–внезародышевые органы–плод”, но и ее окружения. Все перечисленные элементы существуют ограниченный период развития, характеризуются непростыми взаимоотношениями, которые непрерывно меняются на протяжении беременности. Вопрос межорганных связей выходит далеко за рамки взаимодействия просто отдельных органов, поэтому на первый план, как это ни странно, выходят отношения межклеточные.

В системе взаимодействующих провизорных органов человека на коротком этапе существования (5–8 нед. эмбриогенеза) основным связующим звеном является желточный мешок. В частности, он обладает уникальной способностью – в силу эволюционно закрепленных за ним функций обеспечивает распределение трофики внутри плодного мешка и макрофагов (как общую систему защиты). Целью исследования явилась идентификация клеточных элементов желточного мешка человека, которые обеспечивают связь анатомически обособленных структур системы “Мать–внезародышевые органы–плод” в единое функциональное звено.

Желточный мешок человека забирали из абортного материала в ГБУЗ НСО “Гинекологическая больница № 2”. Исследовано 17 желточных мешков с 6 по 12 неделю внутриутробного развития. Для светооптического исследования срезы окрашивали гематоксилином Майера и эозином. Для дифференциальной диагностики разных типов эпителия и клеточных элементов соединительной ткани использовали полутонкие срезы. Ультратонкие срезы исследовали в электронном микроскопе JEM-1010 (Jeol, Япония).

Желточный мешок человека относится к “свободному” типу и не имеет прямого контакта с тканями материнского организма. Микроворсинки на апикальной поверхности, пиноцитозные везикулы, прерывистая базальная мембрана, расширенные межклеточные пространства свидетельствуют в пользу выраженной абсорбционной способности эпителия экзоцеломического типа. Напротив, “желточный” эпителий, представляя собой филогенетически более древний тканевой подтип (появившийся еще у рыб), демонстрирует признаки активного белкового синтеза и утилизации комплексов липопротеидов. В составе соединительной ткани наряду с молодыми фибробластами обнаруживаются многочисленные “желточные” макрофаги, которые характеризуются ускоренной временной и этапной дифференциацией. По-видимому, они не только являются защитным барьером, но и играют важную роль в ремоделировании органа в период его регрессии.

Полученные морфологические данные позволяют предположить, что до момента установления гематотрофного типа питания желточный мешок является органом, активно вовлеченным в транспорт питательных веществ в направлении от экзоцеломы в сосуды желточного круга кровообращения. Быстрый рост плода, приводящий к уменьшению полости экзоцеломы и нарастанию компрессии, а также смена типа эмбриональной трофики являются важнейшими факторами, ограничивающими период активного функционирования этого провизорного органа. Гистогенез и функционирование желточного мешка человека является еще одним примером, где принцип асинхронного развития касается не только органного, но и тканевого уровня. Отражением данного принципа являются ускоренная дифференциация, специализация и последующая инволюция составляющих желточный мешок тканей.

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТИМУСА ЧЕЛОВЕКА СТАРШИХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП

© 2022 г. Л. М. Ерофеева

Научно-исследовательский институт морфологии человека им. академика А.П. Авцына, Москва, Россия

E-mail: gystology@mail.ru

Известно, что при физиологическом старении у человека нарушаются регуляторные механизмы гомеостатических систем и уменьшается степень сбалансированности адаптационно-приспособительных реакций (Ярилин, 2003; Чуров, 2013; Кытикова, 2015; Майбородин, 2016). В связи с этим представляет интерес изучение особенностей морфологии органов иммунной системы и в первую очередь тимуса, продуцирующего Т-лимфоциты — клетки, осуществляющие и регулирующие иммунные реакции и гомеостаз, в стареющем организме.

Цель исследования — изучить количественные параметры микроанатомии и клеточного состава функциональных зон тимуса у практически здоровых людей старших возрастных групп (от I зрелого до старческого периода). Материалом для исследований послужили кусочки тимуса, взятые от 34 трупов людей в возрасте от 24 до 86 лет (24 мужчины и 10 женщин), погибших в результате несчастных случаев и скоропостижно скончавшихся в результате сердечно-сосудистой недостаточности. Материал был распределен по возрастным группам: I зрелый (24–35 лет) ($n = 10$), II зрелый (37–60 лет) ($n = 7$), пожилой (60–75 лет) ($n = 13$), старческий (76–86 лет) ($n = 4$). Материал фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине. Гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином, азуром II и эозином, по методу Ван Гизона. Непрямым иммунопероксидазным иммуногистохимическим методом выявляли белки Ki-67 и PCNA. Морфометрическим методом определяли абсолютное и относительное содержание различных клеточных форм в структурно-функциональных компонентах тимуса (подкапсулярная зона, глубокие слои коркового вещества, мозговое вещество). Вариационно-статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы STATISTICA 6.0.

Исследования показали, что гистологическая структура тимуса у людей на протяжении I-го зрелого возрастного периода претерпевает значительные изменения. Наряду с дольками, имеющими типичную структуру, на гистологических срезах видны дольки с сильно выраженной фрагментацией коркового вещества за счет вставания волокнистой и жировой соединительной ткани в корковые септы. Иногда корковое вещество было сгруппировано в виде узелков. Мозговое вещество преобладало над корковым по площади, здесь встречались многочисленные тимусные тельца в основном в зрелой стадии. Несмотря на выраженные процессы жирового перерождения органа, клеточный состав изменялся незначительно. Отмечена высокая плотность распределения клеток на единице площади среза. Из них более 70%

приходилось на лимфоциты. Доля малодифференцированных клеток составляла $3.08 \pm 0.42\%$ — в подкапсулярной зоне, $2.79 \pm 0.57\%$ — в корковом веществе и $1.37 \pm 0.26\%$ — в мозговом веществе. Однако уровень митотической активности клеток в корковом веществе не превышал 1%, а в мозговом веществе составлял всего 0.2%. Выявлялось высокое содержание плазматических клеток, зрелых форм эозинофилов, а также выраженные морфологические признаки деструктивных процессов. Количество разрушенных клеток составляло в подкапсулярной зоне — $3.36 \pm 0.27\%$, в корковом веществе — $6.16 \pm 2.87\%$ и в мозговом веществе — $8.56 \pm 3.73\%$. По нашим данным во II зрелом возрастном периоде прогрессирование инволютивных процессов в тимусе более выражено. Так, в начале периода (у людей 37 лет) гистологическая структура тимуса незначительно отличалась от таковой у людей I-го зрелого возраста. У людей старше 50 лет тимус был представлен в виде разобщенных фрагментов коркового и мозгового вещества в жировой ткани. Отмечено, что процесс инволюции имеет разную скорость течения у разных людей. Так, у людей 50 лет встречались также хорошо сохранившиеся дольки с типичной гистоструктурой. В этом возрастном периоде отмечены значительные изменения в клеточном составе относительно показателей в I-м зрелом периоде: уменьшилось почти в 2 раза абсолютное содержание клеток на единице площади, сократилась доля лимфоцитов за счет усиления деструктивных процессов (доля разрушенных клеток составила около 11%). Значимо возросла доля плазматических клеток особенно в мозговом веществе. У людей пожилого и старческого возраста на месте тимуса остаются небольшие островки паренхимы без дифференцировки на корковое и мозговое вещество, окруженные жировой тканью. В процессе возрастной инволюции уменьшается содержание лимфоцитов, снижается их митотическая активность и уменьшается доля клеток, способных к пролиферации, как в корковом, так и в мозговом веществе. Это, по-видимому, обусловлено как отсутствием притока в тимус костномозговых предшественников, так и уменьшением количества эпителиальных ретикулярных клеток, создающих микроокружение для Т-лимфоцитов. Возрастные изменения сопровождаются уменьшением количества тимусных телец, среди которых возрастает доля зрелых форм. В тимусе людей старческого возрастного периода тимусные тельца не обнаруживаются.

Таким образом, скорость процессов возрастной инволюции тимуса носит индивидуальный характер и варьирует в широких пределах, что согласуется с продолжительностью жизни людей.

ХАРАКТЕРИСТИКА СЕКРЕТОРНЫХ КАРДИОМИОЦИТОВ ПОЛОВОЗРЕЛОГО ПОТОМСТВА МАТЕРЕЙ С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

© 2022 г. С. Н. Завьялов¹ *, Г. В. Брюхин¹, М. Л. Бугрова², Д. А. Нефедова²

¹Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, Челябинск, Россия

²Приволжский исследовательский медицинский университет Минздрава России, Нижний Новгород, Россия

*E-mail: chegresssss@mail.ru

Изучение рисков развития патологии у плода при наличии хронических заболеваний в материнском организме является актуальной проблемой. Многочисленными клиническими исследованиями показано негативное влияние сахарного диабета матери на становление систем жизнеобеспечения потомства. Одним из компонентов поддержания водно-солевого баланса в организме является система натрийуретических пептидов. Натрийуретические пептиды образуются главным образом в кардиомиоцитах правого предсердия. Несмотря на многочисленные исследования, влияние сахарного диабета матери на развитие эндокринной системы сердца плода остается не изученным. В связи с этим, целью настоящего исследования явился анализ особенностей морфофункционального состояния секреторных кардиомиоцитов потомства крыс с экспериментальным сахарным диабетом I типа.

Эксперимент проведен на половозрелых крысах-самцах, являющихся потомством самок крыс с экспериментальным сахарным диабетом I типа (опытная группа, $n = 5$) и интактных самок (контрольная группа, $n = 5$). Модель сахарного диабета воспроизводили по общепринятой методике с использованием стрептозотоцина. Морфофункциональное состояние секреторных кардиомиоцитов правого предсердия оценивали с использованием трансмиссионной электронной микроскопии и иммуноцитохимического анализа. На светооптическом уровне анализировали особенности структурных компонентов миокарда.

Полученные результаты позволяют констатировать, что гипергликемия матери в условиях эксперимента вызывает нарушения функционального состояния миокарда правого предсердия потомства. Так, у животных опытной группы в ткани правого предсердия большинство капилляров имеют перикапиллярный отек и агрегацию эритроцитов, что может свидетельствовать о нарушении реологических свойств крови и деструктивных изменениях в эндотелии. При этом почти у половины секреторных кардиомиоцитов обнаруживается внутриклеточный отек. Встречаются клетки с вакуолизированными митохондриями и расширенными цистернами саркоплазматического ретикулула. Более того, количество кардиомиоцитов, содержащих секреторные гранулы, снижено по сравнению с контролем.

Таким образом, анализ полученных результатов позволяет заключить, что сахарный диабет I типа матери (самки крысы) в условиях эксперимента обуславливает нарушение сосудов микроциркуляторного русла миокарда правого предсердия потомства, которое приводит к деструктивным изменениям секреторных кардиомиоцитов, в первую очередь их ультраструктуры и снижения синтетической активности. Результаты исследования раскрывают еще одно патогенетическое звено в нарушении морфофункционального становления систем жизнеобеспечения потомства от матерей с экспериментальным сахарным диабетом I типа.

РОЛЬ ЭМБРИОЛОГИЧЕСКОГО МУЗЕЯ В ПРЕПОДАВАНИИ ГИСТОЛОГИИ, ЭМБРИОЛОГИИ И ЦИТОЛОГИИ В ЮЖНО-УРАЛЬСКОМ ГОСУДАРСТВЕННОМ МЕДИЦИНСКОМ УНИВЕРСИТЕТЕ

© 2022 г. С. Н. Завьялов¹ *, О. Ю. Серышева¹, Н. А. Литвяков¹

¹Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, Челябинск, Россия

*E-mail: chegresssss@mail.ru

Не вызывает сомнения, что украшением каждой морфологической кафедры является наличие музея. Кафедра гистологии, эмбриологии и цитологии Южно-Уральского государственного медицинского университета обладает крупной и уникальной коллекцией эмбриологических препаратов, собранной действующим заведующим кафедрой профессором Г.В. Брюхиным. Экспозиция музея насчитывает свыше 300 влажных препаратов, отражающих различные стадии эмбрионального развития человека и

животных. Все экспонаты музея разделены на две категории: сравнительная и клиническая эмбриология. Последняя, в свою очередь, включает большую коллекцию экспонатов с нарушениями эмбрионального развития.

Данный музей играет особую роль в курсе преподавания “Гистологии, эмбриологии, цитологии” в ЮУГМУ. В рамках освоения клинической и сравнительной эмбриологии студенты университета детально изучают многочисленные препараты из эм-

бриологической коллекции. Каждый из экспонатов позволяет наглядно продемонстрировать ту или иную стадию эмбриогенеза, начиная с 3–4-й недели и заканчивая 40-й неделей развития. У студентов есть возможность рассмотреть внезародышевые органы, процессы формирования конечностей и лице-вых структур, морфологические особенности и размеры плодов на разных гестационных сроках. Это имеет значение не только в рамках изучения эмбриологии, но и на занятиях по частной гистологии. Так, например, студенты стоматологического факультета обращаются к музею при изучении процессов формирования верхней и нижней челюсти, мягкого и твердого неба. Особое значение для комплексного понимания процессов эмбрионального развития играет тератологическая коллекция. Плоды-русалки, сиамские близнецы, анэнцефалы, плоды с ихтиозом и тератомами повышают исследовательский и научный интерес среди студентов, а потому на базе музея проводятся заседания студенческого научного кружка. Участники готовят доклады, работают с эмбриональным материалом, учатся определять гестационный возраст плода и изготавливают новые экспонаты. Только за последние два года эмбриологическая коллекция пополнилась на 40 эмбрионов и плодов.

Эмбриологический музей ЮУГМУ играет значительную роль на всех этапах обучения студентов на кафедре гистологии, эмбриологии и цитологии. Работа в музее активизирует познавательную деятельность, способствует большему включению студентов в образовательный и научно-исследовательский процесс. Более того, в связи с проведением просветительской работы по пропаганде здорового образа жизни, высока роль музея в воспитательном плане. Наглядная демонстрация влияния тератогенных факторов на развитие эмбриона способствует формированию правильного представления о планировании семьи. Многие студенты, покидая музей, задумываются о выборе таких специальностей как “акушерство и гинекология”, “репродуктология”, “неонатология”, что свидетельствует о вкладе музея в профориентационную работу.

Таким образом, эмбриологический музей кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии ЮУГМУ является неотъемлемой частью учебного процесса, способствуя формированию у студентов общекультурных и профессиональных компетенций, необходимых для становления высококлассных специалистов любой врачебной специальности.

ОРГАНИЗАЦИЯ И ЭВОЛЮЦИОННЫЙ ГИСТОГЕНЕЗ КАТЕХОЛАМИНЕРГИЧЕСКИХ РЕГУЛЯТОРНЫХ СИСТЕМ НА ПРИМЕРЕ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ПОЛИХЕТ

© 2022 г. О. В. Зайцева^{1, 2, *}, С. А. Петров^{1, **}, В. Г. Копий^{3, ***}

¹Зоологический институт РАН, Санкт-Петербург, Россия

²Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

³Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН, Севастополь, Россия

*E-mail: ovzaitseva@inbox.ru

**E-mail: spspbg@gmail.com

***E-mail: verakopiy@gmail.com

Катехоламинергические регуляторные системы в последнее время все больше привлекают к себе внимание не только биологов, но и многих работников медицины. Катехоламины вместе с серотонином относятся к группе моноаминов — регуляторных веществ, способных, по всей видимости, не только у многоклеточных организмов разного уровня организации, но и у человека регулировать основные формы поведения, т.е. вызывать так называемое нейротрансмиттерзависимое поведение. Моноаминергические нейроны одними из первых появляются в ходе эволюции и онтогенеза животных и играют важную роль в их морфогенезе. В этом отношении распределение серотонинергических клеток и действие на организмы серотонина изучается в настоящее время очень интенсивно. В то же время катехоламинергические системы остаются еще мало изученными, особенно в эволюционном плане. Наиболее распро-

страненными катехоламинами являются дофамин, адреналин, норадреналин и октопамин. Показано, что у насекомых катехоламины оказывают в целом на организм мобилизирующее действие и необходимы для активного движения, в частности полета. Общую активацию организма эти вещества оказывают и у человека, однако их сильное воздействие может привести к нежелательным последствиям и, в частности, к возможности развития дистресса.

Для понимания общих закономерностей организации и эволюционного гистогенеза катехоламинергических систем представляется необходимым их всестороннее изучение у представителей основных групп не только позвоночных, но и беспозвоночных животных. В настоящей работе в качестве такой группы животных были выбраны аннелиды, у которых катехоламинергические системы еще практически не изучались. Объектами исследования стали представи-

тели четырех видов морских полихет: *Ficopomatus enigmaticus*, *Saccocirrus papillosa*, *Polygordius neapolitanus ponticus* и *Protodrilus flavocapitatus*. Животные были собраны в Черном море у берегов Крыма. Катехоламины выявляли гистохимическим методом GIF с использованием глиоксиловой кислоты. Сенсорные элементы дополнительно исследовали с помощью сканирующей электронной микроскопии. Анализ и фотографирование препаратов проводили с помощью конфокального микроскопа Leica TCS SP5 и электронного микроскопа FEI Quanta 250 центра коллективного пользования "Таксон" Зоологического института РАН (<http://www.ckr-rf.ru/ckr/3038/>). В работе частично использован фиксированный материал и приготовленные из него препараты полихет из коллекций аннелид Зоологического института РАН (УФК ЗИН РАН). Всего в работе было использовано около 40 животных.

Проведенное исследование показало, что, несмотря на принадлежность к разным систематическим группам, разную форму тела и сенсорных образований, а также на разный образ жизни, у всех животных катехоламинергические системы были представлены сходными элементами. Большая их часть располагалась на периферии и представляла собой многочисленные первичночувствующие сенсорные клетки в кожных покровах всего тела, вокруг рта, в пальпах или их модификациях (жабры сидячей фильтрующей

щей *Ficopomatus enigmaticus*), в параподиях (при их наличии) и в эпителии всего пищеварительного тракта. Характер распределения катехоламинергических сенсорных клеток и наличие у них жестких цилий позволило предположить их механосенсорную функцию. В пользу этого предположения свидетельствует и их отсутствие в выполняющих хемосенсорную функцию нухальных органах исследованных полихет. Значительное количество катехоламинергических нейронов было выявлено и в церебральном ганглии, а также по ходу брюшной нервной цепочки. Отдельные катехоламинергические рецепторные клетки были обнаружены среди эпителиальных клеток вентральной цилиарной полосы.

Обобщение полученных в настоящей работе данных с результатами наших более ранних аналогичных исследований, проведенных на гастроподах и немертинах, показывает значительный консерватизм катехоламинергических систем, их возможное активное участие в регулировании сенсорных функций, сокращения мускулатуры, пищеварительных функций и участие в инициации защитно-оборонительного поведения у животных разного уровня организации и филогенетического положения.

Работа выполнена в рамках госзадания ЗИН РАН № 1021051703357-3.

ОРГАНИЗАЦИЯ УЧЕБНОГО ПРОЦЕССА НА КАФЕДРЕ ГИСТОЛОГИИ, ЭМБРИОЛОГИИ, ЦИТОЛОГИИ ИГМУ В УСЛОВИЯХ ПАНДЕМИИ

© 2022 г. В. Г. Изатулин¹, О. А. Макарова¹

¹Иркутский государственный медицинский университет, Иркутск, Россия

В последнее время как никогда остро происходит дискуссия, каким методам обучения в ВУЗах отдать предпочтение: традиционному или дистанционному. Но в период распространения коронавирусной инфекции, когда возникла проблема, связанная с различными ограничениями, преподаватели вынуждены сочетать оба метода в зависимости от эпидемиологической ситуации.

Традиционные практические занятия на кафедре гистологии, цитологии и эмбриологии ИГМУ проводятся с использованием световых микроскопов и наборов гистологических препаратов. При введении ограничительных мер подключается использование коммуникативно-информационной системы (КИС) нашего ВУЗа. Лекции студенты могут прослушать на портале видеолекций ИГМУ, а также просмотреть их в текстовом формате и в формате презентаций на странице кафедры. Для изучения гистологических препаратов в условиях самоизоляции обучающиеся могут воспользоваться микротаблицами и фотографиями микропрепаратов из фонда кафедры. Использование КИС позволяет студенту индивидуаль-

но общаться с преподавателем, получая любую консультацию по интересующим его вопросам.

Для текущего и промежуточного контроля знаний используются письменный тестовый опрос на каждом практическом занятии и диагностика гистологических препаратов с использованием светового микроскопа во время коллоквиумов. При переходе на дистанционный режим обучения используется тестирующая база на сайте ИГМУ, которую подготовил и внедрил в учебный процесс педагогический коллектив кафедры. База включает себя теоретические вопросы, визуализированные задачи по тканям и частной гистологии. Последние представляют собой фото гистологических препаратов, рисунки, схемы и микротаблицы с обозначениями, к которым составлены вопросы, ответы на которые позволяют преподавателям дистанционно проверить умение студентов "читать" гистологические препараты без использования микроскопа. Такая форма контроля знаний очень эффективна.

Традиционные методы обучения, используемые в образовании, известны многим поколениям обучающихся, они проверены временем, надежны. Наря-

ду с получением знаний, умений и навыков при обучении происходит духовно-нравственное воспитание молодых людей. При этом лекция, практическое и семинарское занятия выступают как способ активного педагогического влияния, воспитания через предмет. Работа с видеоматериалом требует от обучающихся большой самоорганизованности. Учебный материал воспринимается студентами с различ-

ным уровнем усвояемости. Зависит это не столько от доступности и доходчивости учебной информации, сколько от уровня информационной культуры обучающихся. Таким образом, каждая из форм обучения обладает рядом достоинств и недостатков. Они дополняют друг друга, и выбор приоритетной формы обучения диктуется конкретными условиями, в частности эпидемиологической обстановкой.

РЕАКТИВНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ АДИПОЦИТОВ ПРИ ОСТРОМ ДЕСТРУКТИВНОМ ПАНКРЕАТИТЕ КАК МАРКЕР СИСТЕМНОГО ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА

© 2022 г. А. К. Имаева¹, *, Т. И. Мустафин¹, Л. А. Шарафутдинова¹

¹Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия

*E-mail: alfia.imaeva@mail.ru

Целью работы являлось изучение реактивных изменений жировых клеток различной локализации при остром деструктивном панкреатите. В качестве объекта исследования использовали образцы жировой ткани различной локализации, полученные от пациентов с острым панкреатитом и пациентов с интактной поджелудочной железой.

Производили забор кусочков жировой ткани размером 1 × 1 см из парапанкреатической клетчатки, клетчатки соответственно боковым каналам, околопочечной клетчатки, брыжейки, субэпикардальной клетчатки и подкожно-жировой клетчатки на уровне передней брюшной стенки. При выборе пациентов учитывали нормостенический тип телосложения и умеренный тип питания. Полученный материал фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина. После фиксации и заливки в парафин изготавливали гистологические срезы толщиной 5–7 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином. Морфометрическую обработку проводили с использованием компьютерной программы Image G 1.53. В ходе исследования определяли количество жировых клеток в поле зрения, площадь адипоцитов, ядерно-цитоплазматическое соотношение.

При остром деструктивном панкреатите выявлены выраженные признаки структурно-функциональных нарушений в жировых клетках изученной локализации (как вблизи деструктивного процесса, так и в жировой ткани отдаленных локализаций). Наибольшее количество жировых клеток нам удалось обнаружить в околопочечной клетчатке, клетчатке соответственно боковым каналам и в парапанкреатиче-

ской области. Наименьшее количество жировых клеток в поле зрения определялось в подкожной жировой клетчатке и жировой ткани корня брыжейки. Такие различия, по нашему мнению, обусловлены функциональной активностью адипоцитов. Морфометрические исследования выявили достоверное увеличение количества адипоцитов при остром деструктивном панкреатите в парапанкреатической и паранефральной области, а также в области эпикарда и подкожно-жировой клетчатке. Также было обнаружено увеличение площади ядра жировых клеток, что отразилось и на увеличении ядерно-цитоплазматического соотношения. Эти изменения ядер свидетельствуют об увеличении их синтетической активности. Признаки активации метаболизма в жировых клетках отдаленной от деструктивно измененной поджелудочной железы локализации могут свидетельствовать о системности воспалительного ответа с вовлечением жировой ткани при остром деструктивном панкреатите.

Морфофункциональные изменения жировой ткани в зависимости от локализации, заключающиеся в изменении размеров адипоцитов, типа кровоснабжения и иннервации, плотности распределения рецепторов, описаны многими авторами. Наше исследование подтвердило реактивные изменения в жировой ткани, локализованной вблизи и на удалении от деструктивно измененной поджелудочной железы. Эти изменения должны быть приняты во внимание для понимания перехода от локального повреждения поджелудочной железы к системному воспалению, происходящего при остром панкреатите.

ЦИФРОВЫЕ ИНСТРУМЕНТЫ В ПРЕПОДАВАНИИ ГИСТОЛОГИИ

© 2022 г. А. К. Имаева¹, Л. А. Шарафутдинова¹, *

¹Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия

*E-mail: sharafla@yandex.ru

Для достижения педагогической цифровой компетентности необходимы знание доступных цифро-

вых технологий, навыки и умения их использования на практике. Цифровые технологии все больше и

больше интегрируются в нашу повседневную жизнь и с успехом используются в процессе обучения гистологии, эмбриологии и цитологии. Переход к методикам цифровой визуализации в полной мере соответствует программе развития российского электронного медицинского образования и Национальной программе “Цифровая экономика Российской Федерации” 2019–2024 гг.

При проведении практических занятий по гистологии возможно использование некоторых цифровых инструментов. В частности, изучение гистологических препаратов с использованием технологии “Класс цифровой микроскопии”; мобильной программы по гистологии для IOS и Android AnatLab Atlas Histology (виртуальная микроскопия); сервисов Google (для заполнения Google-таблиц и Google-форм). В аудитории, оснащенной световыми микроскопами ZEISS и технологией iPad, преподаватель может просматривать все изображения, полученные со всех микроскопов одновременно. Более того, он имеет возможность выбрать, продемонстрировать и обсудить полученное студентом изображение с микроскопа отдельного учащегося, проецируя изображение на большой экран или монитор. Прикладное программное приложение ZEISS Labscore для визуализации изображений, получаемых при микроскопировании гистологических препаратов, а также мобильное приложение AnatLab Atlas Histology позволяют студентам и преподавателю получать и сохранять изображения. В качестве задания студенты могут создавать и пополнять галерею фотографий с микропрепаратов (и/или Google-презентацию), вносить обозначения структур, проводить измерения, а также записывать короткие видеоролики (обзорное описание микропрепарата со звуковым сопровождением). Таким образом, приложения позволяют студентам уделять больше времени изучению препаратов при не-

посредственном участии и помощи преподавателя, а занятие в классе цифровой микроскопии становится обучением в привычной цифровой среде и работой с привлекательной новой технологией, делает возможным совместное использование результатов с одноклассниками, а, значит, поддерживает высокий интерес к учебе. Помимо тщательного и детального изучения микропрепаратов на практическом занятии в качестве задания студентам также может быть предложена групповая работа по заполнению Google-таблиц по теме занятия, а также индивидуальная работа по заполнению Google-формы (в качестве вопросов предлагаются изображения микрофотографий изучаемых тканей). Обучение с использованием цифровых технологий дает много преимуществ и для преподавателя: повышение уровня мотивации студентов к более активному участию в работе; мониторинг работы всех студентов с собственного устройства без необходимости передвижения по аудитории; вовлечение в обсуждение всех студентов, индивидуальный подход к каждому студенту; совместное использование изображений и видео в режиме онлайн; совместный разбор и обсуждение заполненных Google-таблиц; пополнение электронного альбома микрофотографий препаратов; оперативный мониторинг степени усвоения темы занятия по результатам заполнения Google-формы.

Таким образом, использование в учебном процессе подобных цифровых инструментов позволяют эффективно организовать групповую и самостоятельную работу, способствуют совершенствованию практических умений и навыков студентов, активизируют познавательную деятельность и развивают творческий потенциал студентов, обеспечивают высокое качество наглядности преподавания, достаточную экономическую эффективность в условиях ограниченной в ресурсах материальной базы образования.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЩЕТИНКОЧЕЛЮСТНЫХ (CHAETOGNATHA) ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ПОВРЕЖДАЮЩИХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ

© 2022 г. А. П. Касаткина¹, М. В. Столярова², *, А. Ф. Сергеев¹

¹Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичёва ДВО РАН, Владивосток, Россия

²Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: mvstolyarova@yandex.ru

Щетинкочелюстные (Chaetognatha) – морские животные, постоянные представители планктона (Касаткина, Столярова, 2010). Рассматриваются как рано отделившаяся группа (Marlétaz et al., 2008), близкая к предкам Bilateria, в связи с чем представляют значительный интерес для сравнительно-морфологических исследований. Цель настоящей работы: изучение морфологических изменений щетинкочелюстных при повреждающих воздействиях – радиационном и геофизическом. Объект исследования: 1000 особей, подвергавшихся действию радиации (получены из бухты Чажма, имеющей радиоактивное загряз-

нение), и более 1000 особей, перенесших геофизическое воздействие (взяты из геофизически активных районов Берингова и Охотского морей, моря Лаптевых). Живых и фиксированных в формалине животных изучали визуально, с помощью ручной лупы и микроскопа. Отдельные экземпляры дополнительно исследовали на гистологических срезах, окрашенных гематоксилином и эозином.

При радиационном воздействии происходят изменения в многослойном кожном эпителии. Многослойный эпителий щетинкочелюстных в норме покрывает тело животных, образуя целостный пласт

(Касаткина, Столярова, 2010). Изменения особенно заметны в области, где эпителий образует “альвеолярную ткань”. На многих участках происходит отделение клеток и их групп от общего пласта, очевидно, за счет разрушения межклеточных контактов. В результате ровная поверхность эпителия нарушается. Хроматин клеточных ядер эпителия уплотняется. Базальная мембрана кожного эпителия собирается в складки, появляются места отрыва от нее мышц. Вместе с эпителием может отделяться и брюшной нервный ганглий. Кишечник на поперечном разрезе выглядит как неправильной формы конгломерат клеток или как уплощенный пузырек. Клетки кишечного эпителия, которые в норме имеют крупные размеры и светлую цитоплазму (Столярова, Касаткина, 1990), подвергаются сжатию и уплотнению, границы клеток и просвет кишки плохо определяют. Симметрия у аномальных экземпляров в большей или меньшей степени нарушена.

У щетинкочелюстных, подвергавшихся геофизическому воздействию, на поперечных срезах наблюдаются резкие деформации: дорсальные мышечные тяжи значительно смещены в горизонтальной плоскости относительно вентральных тяжей, тело животного сплющено в дорсо-вентральном направлении. Как на дорсальной, так и на вентральной стороне под слоем мышц видны пространства, которые расширяются на уровне боковых полей. Объяснением наблюдаемой картине является предположение о лизисе мышц. Пустые пространства, по-видимому, соответствуют участкам, где произошло растворение

мышечной ткани. Границы кишки и кишечный эпителий не просматриваются, на месте кишки находится масса, не имеющая определенной структуры. Очевидно, кишка также подвергается изменениям.

Можно заключить, что характер изменений, возникающих в тканях щетинкочелюстных при радиационном и геофизическом воздействиях, различается и является типичным для конкретного воздействующего фактора. Полученные результаты могут служить основанием для использования щетинкочелюстных как биоиндикаторов радиоактивного загрязнения и геофизической активности в морской среде.

Работа выполнена в рамках государственного задания по теме № 2021–2023, гос. рег. (1).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Касаткина А.П., Столярова М.В.* 2010. Морфология, систематика, экология щетинкочелюстных Японского моря и сопредельных акваторий. Владивосток: Дальнаука, 260 с.
- Столярова М.В., Касаткина А.П.* 1990. Ультраструктура кишечного эпителия у примитивного представителя щетинкочелюстных *Aidanosagitta macilenta*. Цитология. Т. 32. № 7. С. 671.
- Marlétaz F., Gilles A., Caubit X., Perez Y., Dossat C., Samain S., Guyapay G., Wincker P., Le Parco Y.* 2008. Chaetognath transcriptome reveals ancestral and unique features among bilaterians. *Genome Biol.* V. 9. R94. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-6-r94>

ВЫЯВЛЕНИЕ БАЗАЛЬНЫХ МЕМБРАН В ФОРМИРУЮЩИХСЯ ГОНАДАХ ЗАРОДЫШЕЙ ЧЕЛОВЕКА

© 2022 г. В. Г. Кожухарь¹*, М. Ю. Скворцова¹, Ю. С. Лукаш¹

¹Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: v.kojukhar@yandex.ru

Изучение формирования базальных мембран (БМ) и их последующих изменений в процессе органогенеза гонад имеют большое значение, т. к. БМ отграничивают друг от друга клетки, происходящие из различных эмбриональных зачатков (Кожухарь, 1978, 1979). БМ выполняют барьерную функцию, а нарушение их целостности позволяет клеткам различного происхождения непосредственно контактировать между собой. Цель работы: изучение БМ с использованием классических гистологических методов в развивающейся гонаде зародышей человека от момента закладки гонад до завершения их морфологической дифференцировки по половому признаку и сравнение результатов с таковыми, полученными при использовании специфических маркеров БМ – коллагена IV типа, ламинина и фибронектина (Heeren et al., 2015). Объект и методы исследования: изучали зародыши человека в возрасте от 28–30 сут

до 10 нед. внутриутробного развития. Были использованы классические методики для выявления БМ – импрегнация серебром по Карупу, окраска азаном и ШИК-реакция, а также трансмиссионная электронная микроскопия.

Эпителий полового валика на всем протяжении отграничен от подлежащей мезенхимы непрерывной ШИК-позитивной БМ. Последняя особенно хорошо выявляется при импрегнации серебром по Карупу (вероятно, в первую очередь за счет ретикулярной пластинки). Целостность БМ нарушена только на небольших участках, где гоноциты, завершившие миграцию, внедряются в целомический эпителий полового валика. Это подтверждает и электронная микроскопия. После 33 сут развития зародыша целомический эпителий полового валика начинает формирование первичных половых тяжей (ППТ), растающих в направлении мезенхимы ме-

зонефроса. У зародышей человека названные тяжи тесно прилежат друг к другу, заполняя собой большую часть объема формирующейся гонады, и окружены непрерывной БМ. Последняя на данной стадии развития является барьером между клетками целомического эпителия тяжей и мезенхимными клетками. После 35 сут развития значительно увеличивается объем гонады за счет разрастания ППТ, которые начинают отграничиваться от поверхностного эпителия вследствие формирования его собственной БМ. На дистальных концах ППТ нарушается целостность БМ. В этих участках имеют место непосредственные контакты между клетками тяжей (целомический эпителий) и мезенхимными клетками стромы мезонефроса. После начала морфологической дифференцировки пола (с 7-й нед.) в гонаде, формирующейся по мужскому типу, ППТ превращаются в закладки извитых семенных канальцев. Последние представляют собой тяжи эпителиальных клеток, окруженные непрерывной БМ. Поверхностный эпителий также имеет свою непрерывную БМ. При развитии гонады по женскому типу начинается формирование коры яичника вследствие пролиферации клеток поверхностного эпителия. Его БМ в местах врастания эпителиальных тяжей вглубь зачатка теряет целостность. В области формирующихся ворот яичника эпителий врастает не в

виде отдельных тяжей, а по всей поверхности органа. В центральной части яичника столь выраженно-го разграничения коры и мозгового вещества не наблюдается.

Таким образом, данные, полученные в результате применения классических гистологических методик, соответствуют результатам, полученным при использовании маркеров для выявления компонентов базальных мембран (Heeren et al., 2015). Это подтверждается при использовании электронной микроскопии. Более того, метод выявления базальных мембран с использованием импрегнации серебром по Карупу оказался даже более информативным, чем применение специфических маркеров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Кожухарь В.Г.* 1978. Дифференцировка эпителия зачатков гонад у ранних эмбрионов человека. *Арх. анат.* Т. 74. Вып. 4. С. 84.
- Кожухарь В.Г.* 1979. Дифференцировка целомического эпителия зачатков гонад млекопитающих и птиц. *Арх. анат.* Т. 76. Вып. 6. С. 69.
- Heeren A.M., Iperen L., Klootwijk D.B., Bernardo A.M., Roost M.S., Gomes-Fernandes M.M., Louwe L.A., Hilders C.G., Helmerhorst F.M., Westerlaken L.A.J., de Sousa Lopes S.M.C.* 2015. Development of the follicular basement membrane during human gametogenesis and early folliculogenesis. *BMC Dev. Biol.* V. 15: 4.

ФОРМИРОВАНИЕ ГЕТЕРОГЕННОСТИ ЭПИТЕЛИАЛЬНОЙ ВЫСТИЛКИ КАУДАЛЬНОГО ОТДЕЛА КИШЕЧНОЙ ТРУБКИ ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ В ЭМБРИОГЕНЕЗЕ

© 2022 г. А. С. Комарова

Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: comi27@rambler.ru

Изучение особенностей гистогенеза тканей при формировании задней кишки в эмбриогенезе у разных видов позвоночных животных позволяет дополнить теоретические положения учения о закономерностях эмбрионального гистогенеза, взаимодействия эпителиальных тканей различного генеза и концепции клеточно-дифферонной организации тканей.

Целью работы было выявление морфометрических особенностей тканевых структур задней кишки и сравнительное изучение морфометрических показателей в зоне формирования эпителиально-эпителиальных контактов тканевых структур в каудальной части развивающейся кишки. Материалом служил каудальный отдел кишечной трубки у эмбрионов кур на разных сроках эмбриогенеза ($n = 10$). Материал аккуратно разрезали вдоль вентральной стенки, расправляли и накалывали на пенопластовую пластинку (слизистая оболочка при этом была обращена наружу), затем фиксировали в 10%-

ном формалине. Срезы изготавливали на микротоме Sakura Accu-Cut SRM 200 (толщина среза 5–7 мкм), окрашивали гематоксилином и эозином. Для оцифровки гистологических препаратов и проведения морфометрии использовали установку микроскопа Zeiss Axio Scope.A1 с камерой Zeiss AxioCam ERc 5s и компьютерную программу Zen 2.3.

На 14–15 сут эмбриогенеза птиц обнаруживается задняя кишка и клоака. Выявлено тесное взаимодействие эпителиальных выстилок в каудальном отделе кишечной трубки, формируется связь между задней кишкой и клоакой. Морфологические и морфометрические показатели свидетельствуют о гетероморфном составе клеток выстилки клоаки. По данным морфометрических исследований двуслойной эпителиальной выстилки клоаки, форма и площадь ядер эпителиоцитов различаются в базальном и поверхностном слоях, что говорит о внутриклеточной и внутридифферонной гетероморфии эпителия каудального отдела кишечной трубки в эмбриогенезе.

НЕЙРО-ГЛИОЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ НЕОКОРТЕКСА БЕЛЫХ КРЫС НА ПЕРЕВЯЗКУ ОБЩИХ СОННЫХ АРТЕРИЙ

© 2022 г. Л. М. Макарьева¹, *, В. А. Акулинин¹, С. С. Степанов¹, М. С. Коржук¹,
А. Ю. Шоронова¹, Д. Б. Авдеев¹

¹Омский государственный медицинский университет Минздрава России, Омск, Россия

*E-mail: lyuba.mamontova.07@gmail.com

Целью исследования было изучение качественных и количественных характеристик нервной ткани сенсомоторной коры (СМК) крыс линии Wistar после перевязки общих сонных артерий (ПОСА) в динамике неполной глобальной ишемии.

На крысах моделировали ПОСА ($n = 30$), анестезия Zoletil 100 (10 мг/кг). Материал забирали через 1, 3, 7, 14 и 30 сут после ПОСА. Для морфологического исследования СМК использовали гистологические (окраска гематоксилин-эозином и тионином по методу Ниссля), иммуногистохимические (выявление белков NSE, MAP-2, GFAP, Iba-1, p38) и морфометрические методы исследования (с помощью плагинов программы ImageJ 1.53 Find Foci и FracLac). Оценивали общую численную плотность нейронов, относительное содержание гипо- и гиперхромных нейронов, пикноморфных и клеток-теней, а также численную плотность астроцитов, микроглиоцитов и олигодендроцитов, определяли нейро-глиальный индекс. С помощью иммуногистохимических реакций характеризовали состояние цитоскелета клеток и плотность меток синаптических терминалей. Для количественной оценки пространственной организации отростков астроцитов использовали фрактальный анализ (определяли фрактальную размерность и лакунарность). Для характеристики отека/набухания измеряли различные параметры яркости и распределения пикселей изображения. Пространственную организацию микрососудистой сети СМК изучали с помощью метода перфузионной наливки специального контрастного состава. Проверку статистических гипотез проводили в программе Statistica 8.0 с помощью непараметрических критериев Shapiro–Wilk W -test, Mann–Whitney U -test, Wilcoxon Matched Pairs Test, ANOVA Kraskel–Wallis и ROC анализа.

В результате проведенного исследования получены новые данные о citoархитектонике, нейроглиальной организации СМК белых крыс в норме и после ПОСА. Выявлены особенности реактивной, компенсаторной и репаративной реорганизации нейро-глио-сосудистых комплексов различных слоев СМК мозга крыс в норме и в постишемическом периоде. Выявлена корреляционная зависимость между изменениями нейронов и глиоцитов СМК мозга крыс в норме и после неполной глобальной ишемии. Изначально гетероморфная структурная организация различных слоев СМК становилась более выраженной после ПОСА за счет появления очагов дистрофически и некробиотически измененной нервной ткани с различными проявлениями отека/на-

бухания. Ключевыми были изменения, связанные с гиперхромией и дегидратацией, менее выраженными — с гипохромией и формированием клеток-теней. Максимальные проявления отека/набухания выявлялись в нейропиле, где через 3 сут появлялась тенденция к слиянию мелких очагов просветления с образованием конгломератов необратимо расширенных/измененных отростков астроцитов. Уже через 1 сут после ПОСА в СМК кроме скоплений различных темных нейронов выявляли гипохромные нейроны с признаками гомогенизации, выраженные проявления отека/набухания перикариона и перичеселлюлярного отека. В том или ином сочетании все эти изменения сохранялись в течение всего периода наблюдения, что свидетельствовало о хроническом течении патологического процесса в СМК после ПОСА. Даже через 30 сут сохранялись гипохромные нейроны с признаками гомогенизации, выраженные проявления отека–набухания перикариона и перичеселлюлярного отека. Перманентные изменения нейронов сопровождались реактивными и патологическими изменениями нейроглиальных клеток и системы внутреннего иммунитета — микроглии. В результате увеличивалось нейро-глиальное отношение. Однако индивидуальная динамика астроцитов, олигодендроцитов и микроглиоцитов значительно отличалась в слоях СМК и коррелировала с разными признаками изменения нейронов в течение всего периода наблюдения. Особое значение приобретали процессы реактивной реорганизации с усложнением отростков астроцитов, выявленные с помощью фрактального анализа.

Восстановление структур межнейронной коммуникации в СМК происходило на фоне уменьшения общей численной плотности пирамидных нейронов и проявлений гипергидратации. Выявленные изменения рассматриваются как основа перманентной компенсаторно-восстановительной реорганизации межнейронных отношений неокортекса на фоне вторичной ишемии головного мозга. Мы полагаем, что после ПОСА запускаются многочисленные процессы в нейро-глио-микрососудистых комплексах, препятствующие развитию необратимых изменений нейронов и в большей степени они выражены в крупноклеточном слое СМК.

ПРИМЕНЕНИЕ СКАНИРУЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ В ИЗУЧЕНИИ РЕПАРАТИВНОГО ОСТЕОГЕНЕЗА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ НАНОСТРУКТУРИРОВАННОГО ТИТАНА

© 2022 г. А. А. Матчин¹, А. А. Стадников¹, Е. В. Носов^{1, *}, Г. В. Клевцов²

¹Оренбургский государственный медицинский университет, Оренбург, Россия

²Тольяттинский государственный университет, Тольятти, Россия

*E-mail: nosov_new@mail.ru

Целью работы являлось изучение возможностей сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) в оценке поверхностных свойств наноструктурированного титана, изделия из которого изготавливаются методом РКУП-конформ, как метода для диагностики их остеointеграционного потенциала.

Проведены экспериментально-морфологические исследования на 10 кроликах породы Шиншилла. Животным под эфирным наркозом формировали модель линейного перелома нижней челюсти в пределах зубного ряда. Отломки нижней челюсти скрепляли с помощью мини-пластины и мини-шурупов. Объектом исследования были нижняя челюсть в зоне перелома, скрепленного с помощью мини-пластины и мини-шурупов, и окружающие мягкие ткани. В 1-й серии экспериментов перелом фиксировали мини-пластиной и мини-шурупами из наноструктурированного титана марки Grade-4, во 2-й серии – мини-пластиной и мини-шурупами из титана, изготовленные фирмой “Конмет”. Животных выводили из эксперимента путем ингаляции летальной дозы эфира на 40 сут после операции. Поверхности титановых конструкций и костной ткани изучали с помощью сканирующего электронного микроскопа фирмы TESCAN MIRA LMU (Чехия) на базе “Центра микроскопии и микробиологии” для выявления и поддержки одаренных детей “Гагарин” (г. Оренбург).

По результатам СЭМ, тканевой слой покрывает минипластину на всем протяжении неоднородным неровным слоем с наличием трещин. Тканевые структуры на поверхности изделия имели толщину около 25–50 мкм с наличием волокнистых и клеточных элементов, также имелись трещины шириной до 50 мкм, доходящие до поверхности мини-пластины. На поверхности пластины отсутствуют кратерообразные элементы в отличие от аналогичных структур на поверхности наноструктурированных мини-винтов.

Изучение поверхности мини-винтов из наноструктурированного титана позволило визуализировать тканевые структуры, которые покрывают изделие плотным слоем толщиной более 50 мкм с меньшим содержанием волокон. При большем увеличении можно видеть, что тканевые структуры покрывают поверхность резьбы мини-винта неоднородным слоем клеточных и волокнистых элементов без обнажения самого титана, что свидетельствует об их тесном контакте с поверхностью наноструктурированного титана.

Наличие и характер тканевых структур на поверхности изделий, визуализированные с помощью сканирующей электронной микроскопии, позволяют сделать заключение о высоких адгезивных свойствах наноструктурированного титана, в особенности на резьбе мини-винта, и его потенциале к формированию плотных костных структур по типу остеointеграции.

ТРОФИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ НЕЙРАЛЬНОЙ СЕТЧАТКИ ГЛАЗА ЧЕЛОВЕКА

© 2022 г. Е. С. Можилевская¹, И. В. Рева^{1, 2, **}, А. С. Новиков¹, Я. О. Садовая¹, Г. В. Рева^{1, 2, *}

¹Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

²Международный медицинский научно-образовательный центр, Ниигата, Япония

*E-mail: RevaGal@yandex.ru

**E-mail: avers2@yandex.ru

Целью исследования является изучение трофического обеспечения сетчатки в антенатальный период развития человека. Исследование проведено с учетом положений Хельсинкской декларации (2013), с разрешения этического комитета ФГАОУ ВО “Дальневосточный федеральный университет”. Материал 149 эмбрионов и 78 плодов человека получен в результате прерывания беременности по медицинским показаниям. С помощью иммуногистохимического мечения проведено фенотипирование иммуноцитов и

макрофагов на основе кластеров дифференцировки (Cluster of Differentiation – CD) – Т-лимфоцитов CD4/8, CD34, клеток Лангерганса CD68, интерстициальных макрофагов CD163, а также VEGF и S100. Статистический анализ полученных данных выполнен с помощью программного обеспечения STATISTICA 10.

На передней поверхности мозговых пузырей в конце 3-й недели за счет усиленной пролиферации клеток формируются глазные пузырьки, сообщаю-

щиеся с полостью мозгового пузыря. Иммуногистохимическое выявление VEGF-, а также CD34- и CD68-позитивных клеток показало, что инициация ангиогенеза происходит исключительно в мезенхиме, окружающей мозговой пузырь. Сококализация VEGF-позитивных клеток и PAX1-, CD68- и CD163-позитивных клеток свидетельствует об их синергизме в определении вектора роста кровеносных сосудов и ответных реакциях на информацию положения. Одновременно с формированием хрусталиковой плакиды начинается инвагинация наружной части глазного пузырька и формирование глазной чаши. Межфоторецепторный матрикс закладывается именно в этот ранний эмбриональный период между пигментным эпителием и нейральной стенкой глазного бокала. На данном этапе развития в формирующейся сетчатке глаза отсутствуют кровеносные сосуды, трофическое обеспечение всех структур внутренней оболочки глаза эмбриона человека реализуется за счет содержимого мозговых пузырей, путем диффузии ликвора через оболочки глаза. Нами отмечено, что при сближении внутренней и наружной стенок глазного бокала пространство между ними сужается постепенно до полного исчезновения, и на начальных этапах, как и мозговой пузырь, содержит клетки, экспрессирующие маркер S100. Наши данные свидетельствуют, что в раннем онтогенезе человека для развивающихся структур глаза характерна ликворная трофика пигментного

эпителия и нейрального слоя, представляющих собой сближающиеся стенки глазного бокала. В слоях нервных волокон, ганглионаров, биполяров, в среднем и внутреннем слоях сетчатки с 11 недели развивается процесс ангиогенеза, в отличие от фоторецепторного слоя, в котором сохраняется ликворная трофика. Ангиоингибиторы прозрачных сред глаза и межфоторецепторного матрикса являются продуктом секреции нейроглии, экспрессирующей маркер S100. Процессы формирования сетчатки и отсутствие ангиогенеза в фоторецепторном слое связаны с ингибированием миграции макрофагов, секреторных VEGF, а также с ликворозависимым трофическим обеспечением наружного ретинального слоя. Метаболическая связь между резидентными фагоцитами и пигментным эпителием сетчатки особенно важна на ранних этапах развития глазного бокала в отсутствие сосудистой системы сетчатки.

Таким образом, процессы отслоения сетчатки новорожденных и механизмов восстановления каркаса задней стенки глаза человека после ее прикрепления связаны с нейроглией, играющей важную роль в адгезии внутреннего и наружного листков глазного бокала. При повреждении нейроглии нарушается секреция ингибиторов ангиогенеза, что ведет к прорастанию сосудов в фоторецепторный слой, в норме зависящий от ликворной трофики на всех этапах онтогенеза человека.

АЛГОРИТМ ДИАГНОСТИКИ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ЦИТОПАТИЙ МЕТОДОМ ТРАНСМИССИОННОЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

© 2022 г. Д. А. Нефедова¹, *, Т. И. Васягина²

¹Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

²Приволжский исследовательский медицинский университет Минздрава России, отдел электронной микроскопии ЦНИЛ, Нижний Новгород, Россия

*E-mail: nifka22@mail.ru

Митохондриальные заболевания или цитопатии представляют собой гетерогенную группу нарушений, возникающих из-за дефектов в генах, кодирующих митохондриальные белки. Морфологические особенности митохондриальных болезней могут быть идентифицированы на субклеточном уровне с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ). Целью работы являлась разработка и апробация алгоритма ультраструктурной диагностики митохондриальных цитопатий на основе анализа современных сведений о митохондриальных болезнях.

Проведен поиск и систематизация данных литературы по заявленной теме в базах данных eLibrary, PubMed, Google Scholar. Это позволило разработать алгоритм анализа биопсийного материала (скелетной мышечной ткани), который был предоставлен ГБУЗ НО «Нижегородская областная детская клиническая больница», с помощью ТЭМ. Алгоритм

работы включал следующие этапы: (1) забор биопсийного материала для морфологического исследования; (2) фиксацию образцов ткани в растворе 2.5%-ного глутаральдегида и 1%-ном растворе четырехоксида осмия на 0.1 М фосфатном буфере; (3) обезвоживание в спиртах возрастающей концентрации и абсолютном ацетоне; (4) заключение в эпоксидную смолу (смесь эпона и аралдита); (5) приготовление серийных полутонких срезов и их окраска полихромными красителями метиленовым синим и основным фуксином (Humphrey, Pittman, 1974); (6) анализ тканевой организации образцов биопсийного материала на полутонких срезах (0.5–1 мкм), получение соответствующих цифровых изображений с помощью микроскопа DMLS фирмы Leica и малоформатной цветной камеры (CCD) в интервале рабочих увеличений от 10 до 100, а также выбор области для исследования в электронном микроскопе; (7) изготовление ультратонких срезов и их контрастирование 1%-ным спир-

товым раствором уранилацетата и цитратом свинца; (8) анализ ультраструктурной организации материала с помощью электронного микроскопа Morgagni 268D (FEI, США) при увеличениях 5000–25000×, морфометрический анализ с помощью программы ImageJ, статистический анализ полученных результатов при помощи программного обеспечения IBM SPSS Statistics 27.0.

При анализе биопсийного материала скелетных мышц на полутонких срезах выявлено значительное количество поврежденных мышечных волокон, центральное расположение ядер в некоторых из них, полосы, обусловленные аномально сильным сокращением миофибрилл. На ультратонких срезах отме-

чены субсарколеммальные скопления гликогена, липидов, а также митохондрии с паракристаллическими включениями и электронно-плотными преципитатами в матриксе. Обращало на себя внимание значительное количество крупных митохондрий, многие из которых содержали деструктивно измененные кристы. Полученные результаты полностью согласуются с данными других авторов.

Таким образом, разработанный на основе данных литературы и апробированный нами на биопсийном клиническом материале алгоритм морфологического анализа является эффективным методом диагностики митохондриальных цитопатий с помощью трансмиссионной электронной микроскопии.

ПАРАЛЛЕЛИЗМ В ЭВОЛЮЦИИ НЕОКОРТЕКСА ПОЗВОНОЧНЫХ

© 2022 г. Д. К. Обухов^{1, *}, Е. В. Пушина^{2, 3}, Т. А. Цехмистренко⁴

¹Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

²Национальный научный центр морской биологии, Владивосток, Россия

³Институт физиологии НАН Украины, Киев, Украина

⁴Университет дружбы народов, Москва, Россия

*E-mail: dkobukhov@yandex.ru

Неокортекс конечного мозга рассматривается как наиболее сложная структура в ЦНС позвоночных животных, которая достигает своего максимального развития у высших позвоночных и человека. При этом считалось, что у низших позвоночных животных эта структура либо еще не формируется, либо находится в зачаточном состоянии. В сообщении приводятся данные, свидетельствующие о том, что в процессе параллельной и независимой эволюции в классе хрящевых рыб в конечном мозге развились кортикальные структуры, сходные в морфофункциональном отношении с неокортикальными структурами мозга высших позвоночных животных. С помощью анатомических, нейростологических (окраска по Нислю и Гольджи), электронно-микроскопических и гистохимических методов исследовали структуру дорсальных (кортикальных) отделов полушарий конечного мозга нескольких видов современных акул: акула сельдевая атлантическая *Lamna nasus* Bon. (2 экз.); акула сельдевая тихоокеанская *Lamna ditropis* Hub. (3 экз.); акула кошачья *Scyliorhinus canicula* L. (2 экз.); акула голубая *Prionace glauca* L. (2 экз.); катран черноморский *Squalus acanthias* L. (25 экз.); акула полярная *Somniosus microcephalus* Bl. (3 экз.). Первое, что обращает на себя внимание — очень высокий индекс телэнцефализации, достигающий у голубой акулы — 55%, полярной акулы — 53%, сельдевой акулы — 47%. Эти значения значительно выше показателя у представителей других классов позвоночных и сравнимы с таковыми у млекопитающих, что косвенно свидетельствует о высоком уровне общей организации ЦНС хрящевых рыб.

Цитоархитектонический анализ структуры дорсальных (кортикальных) отделов полушарий хряще-

вых рыб показал наличие настоящей кортикальной пластинки. Считалось, что в ряду позвоночных животных кортикальная пластинка впервые формируется у рептилий. Для нейронного состава кортикальной пластинки ряда акул характерен чрезвычайно высокий уровень дифференцировки. В ее составе обнаружены типичные пирамидные нейроны, апикальные дендриты которых формируют пучки из 3–5 дендритов, сходные с дендритными пучками пирамид в микроколонках кортикальных модулей неокортекса млекопитающих. Важным признаком высокого уровня нейронной организации мозга акул является наличие шипиков на дендритах их нейронов (впервые появившихся у черепаха) и особенно присутствие в кортикальной пластинке большого количества высокодифференцированных короткоаксонных бесшипиковых звездчатых нейронов. Их появление в эволюции ЦНС рассматривается как важный признак прогрессивной дифференцировки структур мозга. Ультраструктурный анализ показал присутствие в этих пучках системы электротонических синапсов.

Гистохимически в паллиуме акул обнаружено большое количество ГАМК и глутаматэргических синапсов, что опять же наиболее характерно для неокортекса млекопитающих. У акул отмечается высокий уровень миелинизации аксонных систем мозга, что отличает их от других низших позвоночных животных, где уровень миелинизации низкий. В работах акад. Е.М. Крепса показано, что по биохимическому составу нейрональных мембран акул сходны с таковым у млекопитающих. Высокий уровень морфологической организации паллиума ряда акул коррелирует с уровнем функциональной организации

их мозга и сложным поведением. В полушариях отмечены проекции всех анализаторных систем и сформированы прямые таламо-кортикальные и кортико-спинальные тракты. Все это является ярким подтверждением одного из выводов теории параллелизма тканевых систем акад. А.А. Заварзина, который

говорит о возможности формирования в филогенетически различных группах животных сходных в морфофункциональном отношении тканевых систем (в данном случае неокортикальных формаций в полушариях конечного мозга акул и млекопитающих).

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ КАФЕДРЫ ГИСТОЛОГИИ В МЕДИЦИНСКОМ ВУЗЕ

© 2022 г. И. А. Одинцова¹, Р. К. Данилов¹, С. Э. Русакова¹, О. Е. Миргородская¹*, Д. Р. Слуцкая¹,
А. С. Комарова¹, А. В. Горбулич¹, Т. И. Березовская¹

¹Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: mirgolga@yandex.ru

Цель работы – анализ современного образовательного процесса по теоретической дисциплине с учетом внешних и внутренних факторов, влияющих на построение последовательности прохождения различных частей курса гистологии, наполнения курса современными, адаптированными к изменившимся внешним условиям в период пандемии COVID-19 организационным преобразованиями и конечным результатам оценки эффективности деятельности кафедр. Последнее традиционно предусматривает повышение уровня самостоятельной подготовки студентов, контроля усвоения материала, способности решать учебные и профессиональные задачи. Для достижения поставленной цели необходимо четко понимать границы своего предмета, быть в контакте с соответствующими кафедрами путем обсуждения педагогических проблем на междисциплинарных совещаниях. Между тем, как отмечал профессор А.А. Клишов, многие (особенно в клинической среде) понимают гистологию как часть анатомии (микроскопическую анатомию) или как комплекс методов микроскопической техники, а не как фундаментальную дисциплину, основным содержанием которой является система теорий и закономерностей о развитии, строении и функции тканей.

Экономические трудности переходного периода, связанные с распадом СССР, внесли существенные изменения в организацию учебного процесса на кафедрах медико-биологического профиля. Особенно негативно это отразилось на кафедре гистологии, которую стали объединять с кафедрой анатомии в единую кафедру морфологии. 20 лет назад по инициативе московских анатомов соответствующим образом изменилось и название журнала “Архив анатомии, гистологии и эмбриологии”, который стал называться “Морфология”. Ряд кафедр гистологии сохраняют свою самостоятельность, однако отсутствие четкого плана подготовки гистологов, закрытие факультетов подготовки и повышения квалификации гистологов, отсутствие обновления матери-

альной базы для продолжения фундаментальных научных исследований – все это стало основой для продолжения политики объединения кафедр, вместо междисциплинарной интеграции на базе собственных кафедральных научных школ и материальных ресурсов. Спустя три десятилетия мы пожинаем плоды перестройки образовательного процесса общеобразовательной и высшей школы, переживаем последствия тенденциозного и порой неоправданного решения материальных и кадровых вопросов путем слияния и копирования иностранных педагогических систем преподавания анатомии и гистологии в виде общего морфологического направления развития фундаментальных дисциплин. Это вредит не только развитию анатомии, но в большей мере препятствует или серьезно тормозит разработку фундаментальных проблем, связанных с пониманием закономерностей эмбриогенеза в отношении критических периодов развития человека и предупреждения аномалий развития, проблемы регенерационного гистогенеза в период возрастания локальных конфликтов и техногенных катастроф, разработки методов оптимизации раневого процесса и др.

Таким образом, назрела необходимость переосмыслить фазу переходного периода в образовательной деятельности фундаментальных дисциплин, исправить ошибки в методике подготовки кадров высшей квалификации, восстановить институт повышения кадров гистологов-преподавателей, улучшить материальную базу кафедр. Еще раз следует оценить с исторической точки зрения тот факт, что на первой гистологической конференции гистологов (1938 г.) было принято решение: объединение двух, пусть и родственных дисциплин, подрывает отечественную традицию возникновения кафедры гистологии из недр физиологии, тем самым обрывает гистофизиологический фундамент нашей науки.

ПОВРЕЖДЕНИЕ СТРУКТУРЫ КРАСНОГО КОСТНОГО МОЗГА В ПАТОГЕНЕЗЕ COVID-19

© 2022 г. И. В. Рева^{1, 2, *}, Т. Ямамото², М. Е. Тучина¹, В. В. Семигласова¹, Т. Н. Лемешко¹,
Э. В. Слабенко¹, А. В. Куделя¹, Г. В. Рева^{1, **}

¹Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

²Международный медицинский научно-образовательный центр, Ниигата, Япония

*E-mail: avers2@yandex.ru

**E-mail: RevaGal@yandex.ru

Мониторинг и анализ межклеточных взаимодействий при вирусном повреждении имеет решающее значение для понимания патогенеза заболевания, для разработки профилактики и таргетного лечения. Эти исследования приобретают особую значимость с учетом глобальной проблемы COVID-19, вызванной все более возрастающими по агрессивности штаммами SARS-CoV-2. Целью работы явился анализ изменений структуры красного костного мозга в патогенезе COVID-19.

Исследования выполнены в соответствии с фундаментальными этическими принципами Хельсинкской декларации и одобрены этической комиссией ФГАОУ ВО ДВФУ. Диагноз у пациентов COVID-19, вызванной SARS-CoV-2, подтвержден с помощью ПЦР. Производили забор ткани красного костного мозга у умерших пациентов, не позднее 24 ч от наступления смерти. Всего в работе исследованы 67 биоптатов красного костного мозга от 65 пациентов. После отсепаровывания мягких тканей грудной клетки и подвздошной области, секционной пилой выпиливали фрагменты ребра и подвздошной кости с костным мозгом размерами 1 × 1 × 0,5 см. Биоптаты помещали в забуференный нейтральный 10%-ный формалин (Biovitrum, Россия) в соотношении 1 : 20. Объекты фиксировали 18–24 ч. Затем биоптаты красного костного мозга помещали в декальцинирующий раствор СофтиДек (Biovitrum, Россия) в соотношении 1 : 70 на срок не более 3 сут. При достижении мягкости кости промывали не менее 2 ч. После стандартной заливки в парафин, изготавливали срезы и их окрашивали гематоксилином и эозином. Анализ препаратов и получение цифровых изображений проводили с помощью микроскопа Olympus Vx52 и цифровой камеры DP25.

Только у двоих пациентов из 65 была выявлена эритропения (количество эритроцитов составляло $1.4 \times 10^{12}/л$ и $2 \times 10^{12}/л$). У остальных пациентов количественные показатели эритроцитов находились в пределах нормы. Однако патоморфологический анализ препаратов красного костного мозга пациентов с летальным исходом показал, что красный костный мозг является одним из участников патологических событий при COVID-19, вызванной SARS-CoV-2, и играет важную роль в патогенезе каскада реакций, ведущих к гипоксии и гибели инфицированных пациентов. Препараты красного костного мозга характеризовались уменьшением количества стромальных элементов, а также качественными и

количественными изменениями в структуре очагов гемопоэза, не только эритроцитарных ростков, но и гранулоцитарных.

У пациентов с нормальными показателями эритроцитов на препаратах красного костного мозга в поле зрения идентифицировали 1–2 гипохромных, базофильных и оксифильных эритроцита, маленьких или больших размеров, неправильной формы, а также 1–2 макрофага с гранулами железа и фагоцитированными эритроцитами. Лимфоциты характеризовались ярко базофильными ядрами, окруженными узким ободком цитоплазмы. Также отмечались клетки с фрагментирующимися или кольцевидными ядрами, свидетельствующими об апоптозе. Кровеносные сосуды идентифицировались, но ядра эндотелиоцитов были гипертрофированы, а цитоплазма истончена.

В материале погибших при заболевании COVID-19 пациентов на фоне низких показателей эритроцитов наблюдали почти полное отсутствие очагов эритропоэза в красном костном мозге, а также почти полное отсутствие стромальных элементов: не идентифицировались кровеносные сосуды и ретикулярные клетки, макрофаги отсутствовали, отмечались в небольшом количестве оксифильные эритробласты с гомогенно окрашенной цитоплазмой. Идентифицировались гипохромные и полихроматофильные эритроциты неправильной формы, эозинофильные гранулоциты разной степени зрелости, преимущественно юные и палочкоядерные. Кроме эозинофилов выявлялись палочкоядерные нейтрофилы.

Таким образом, красный костный мозг пациентов, погибших при COVID-19, вызванной SARS-CoV-2, на фоне полиорганной недостаточности, в зависимости от клинических показателей содержания эритроцитов в крови, морфологически отличается от красного костного мозга пациентов, погибших от осложнений сопутствующих заболеваний, отсутствием сохраненных очагов эритропоэза. При выраженной эритропении в крови пациентов можно предполагать нарушение эритропоэтической функции в красном костном мозге, что следует учитывать при разработке стратегии лечения этой группы пациентов.

ЦИТОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРИДАТКА СЕМЕННИКА МЕЛКИХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ, ОБИТАЮЩИХ В УСЛОВИЯХ ВЛИЯНИЯ ФАКТОРОВ ГОРОДСКОЙ СРЕДЫ

© 2022 г. М. Ф. Рыскулов¹, *, Н. Н. Шевлюк¹

¹Оренбургский государственный медицинский университет Минздрава России, Оренбург, Россия

*E-mail: k_histology@orgma.ru

Целью работы являлось исследование цитологической характеристики придатков семенников мелких млекопитающих, обитающих в условиях влияния факторов городской среды. Объектом исследования служили придатки семенника половозрелых самцов мелких млекопитающих: домовая мышь *Mus musculus* L. ($n = 40$ особей); степная пеструшка *Lagurus lagurus* P. ($n = 17$); малая лесная мышь *Apodemus uralensis* P. ($n = 30$); полевая мышь *Apodemus agrarius* P. ($n = 29$); обыкновенная полевка *Microtus arvalis* P. ($n = 24$); обыкновенная бурозубка *Sorex araneus* L. ($n = 11$). Отлов животных производился в период апреля–июня в 2017–2021 гг. на различных территориях г. Оренбурга (дома многоэтажной застройки, частный жилой сектор, дачные массивы, хлебоприемное предприятие, полосы отчуждения железных дорог, лесополосы, парки и скверы). Контролем служили животные тех же видов, отловленные в естественных экосистемах Оренбургской области. Полученный материал обрабатывали с использованием гистологических, гистохимических, иммуногистохимических и морфометрических методов. Статистическую обработку данных проводили в пакете прикладных программ Statistica v.7.0 (StatSoft, Inc.).

Численность представителей исследованных видов в городе варьировала от высокой (складские помещения, лесополосы, дачные участки, частная жилая застройка) до низкой (парки и скверы). По состоянию семенников и придатков в размножении могли участвовать от $95.3 \pm 3.7\%$ особей у домовой мыши до $73.4 \pm 2.7\%$ у степной пеструшки, что значительно выше, чем в условиях естественных экосистем. При этом интенсификация репродукции не полностью компенсировала повышенную гибель животных в условиях городской среды. Морфология придатков семенников животных из городских экосистем существенно различалась у разных видов, что

указывало на различие в видовых адаптационных возможностях. У исследованных видов в придатке семенника выявляли комплекс деструктивных изменений, проявляющихся в достоверном снижении массы и размеров органа, очаговой десквамации эпителия, снижении темпов митоза базальных клеток. Высота эпителия выносящих канальцев была сниженной у степной пеструшки на $17.4 \pm 1.2\%$, у полевой мыши на $14.2 \pm 1.0\%$. В главных и базальных клетках отмечался пикноз ядер. Доля деструктивно измененных эпителиоцитов колебалась от $3.2 \pm 0.3\%$ у малой лесной мыши до $12.1 \pm 0.6\%$ у степной пеструшки. Выявлено увеличение количества макрофагов в стенке выносящих канальцев и протока придатка по сравнению с контролем. В эпителии выносящих канальцев и протока придатка выявлен высокий уровень экспрессии как проапоптотического белка p53, так и маркера пролиферативной активности – белка Ki-67. Установлено уменьшение количества зрелых гамет в просвете выносящих канальцев и протока придатка, увеличение количества аномальных форм сперматозоидов, в частности отмечались дефекты их головки и хвоста. Деструктивные явления были более выражены у животных, населяющих парки и скверы города. Выявленные факты косвенно указывают на снижение фертильности животных. У домовой и малой лесной мышей отмеченные деструктивные изменения в придатке семенника были менее выражены.

Таким образом, цитологические особенности структур придатка семенника свидетельствуют о возможном ухудшении условий для созревания гамет. Менее выраженные нарушения в придатке семенника у домовой и малой лесной мыши указывают на высокую пластичность и адаптивность к условиям городской среды представителей этих видов.

МОДЕЛЬ ГОРМОНАЛЬНОЙ ИНДУКЦИИ ПОЛИКИСТОЗА ЯИЧНИКОВ У КРЫС

© 2022 г. А. В. Подрезова¹, *, В. С. Павлова¹, Т. И. Миронов¹

¹Санкт-Петербургский государственный медицинский педиатрический университет, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: podrezane@yandex.ru

Синдром поликистозных яичников (СПКЯ) является клиническим симптомокомплексом неизвестной этиологии, который характеризуется нарушением менструального цикла, бесплодием, ожирением, гирсутизмом, увеличением и склерокистозными измене-

ниями яичников. Моделирование СПКЯ позволяет подробно изучить эндокринные и морфологические изменения, происходящие в организме при данной патологии. В настоящий момент считается, что на фоне применения эстрогенсодержащих препаратов

может развиваться множественная атрезия третичных фолликулов, которая в дальнейшем и приводит к СПКЯ.

Самки крыс породы Wistar были распределены на 3 группы: контрольная группа (КГ) получала питание без гормонов ($n = 2$), первая экспериментальная группа (1ЭГ) получала эстроген и прогестерон ($n = 4$), вторая экспериментальная группа (2ЭГ) – только эстроген ($n = 4$). В эксперименте использовали препараты “Прогинова” в дозе 2 мг и “Прогестерон” в дозе 2 мг, которые вводили энтерально с пищей и водой. Полученные образцы яичников фиксировали в 10%-ном формалине по Лилли и заливали в парафин по стандартной методике. С парафиновых блоков на ротационном микротоме МПС-2 были получены срезы толщиной 5 мкм, которые наклеивали на стекла (в качестве адгезивного покрытия использовали смесь белка и глицерина). Депарафинировали по схеме: ксилол–этанол 96%–этанол 70%–вода, после чего окрашивали гематоксилином и эозином. Для

заключения препаратов использовали полистирол. Анализ и получение цифровых изображений были проведены с помощью светового микроскопа Zeiss Axio Lab.A1 FL-LED.

После первого кормления экспериментальных групп (1ЭГ, 2ЭГ) кормом с растворенными препаратами были отмечены изменения в этологическом критерии. Животные из 1ЭГ стали более активными, у них отсутствовала концентрация внимания на пище, при этом аппетит не изменился. В 2ЭГ было отмечено снижение аппетита. Через 3 нед. после второго кормления в результате приступа агрессии две крысы из 1ЭГ и одна из КГ погибли, еще одна крыса из 1ЭГ погибла спустя неделю. При вскрытии было выявлено абдоминальное ожирение. У животных из 2ЭГ наблюдали уменьшение диаметра рогов матки. На гистологических препаратах яичников, как в первой, так и во второй экспериментальных группах обнаружено большое количество полостей, заполненных жидкостью.

ХАРАКТЕР ВНУТРИЯДЕРНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ ХРОМАТИНРЕМОДЕЛИРУЮЩЕГО БЕЛКА ATRX В ПОЗДНЕМ ООГЕНЕЗЕ И РАННЕМ ЭМБРИОГЕНЕЗЕ МЛЕКОПИТАЮЩИХ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ПРЕДИКТОР УСПЕШНОСТИ ДОИМПЛАНТАЦИОННОГО РАЗВИТИЯ

© 2022 г. Ж. К. Сайлау¹, А. С. Трифонова², И. С. Степанова³, И. О. Боголюбова^{3, 4, *}

¹Международный клинический центр репродуктологии Persona, Алматы, Казахстан

²Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

³Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

⁴Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: ibogol@mail.ru

У млекопитающих, включая человека, процессы развития женских половых клеток, формирования мужского и женского пронуклеусов в зиготе, а также реактивация транскрипции на начальных этапах дробления сопровождаются выраженными структурно-функциональными перестройками хроматина. В регуляции его реорганизации в раннем развитии задействован весь комплекс ключевых эпигенетических механизмов: метилирование ДНК, посттрансляционные модификации гистонов и варианты формы гистонов, а также АТФ-зависимый ремоделинг хроматина с участием специфических белков, который можно рассматривать как один из ведущих факторов, определяющих успешность развития нового организма.

Основной целью нашего исследования являлся сравнительный анализ внутриядерного распределения хроматинремоделирующего белка ATRX в раннем развитии мыши: в ооцитах на стадии зародышевого пузырька (GV) и в дробящихся эмбрионах, различающихся по своей способности к реализации программы индивидуального развития. Были изучены ооциты мыши, полученные от самок разного воз-

раста, а также эмбрионы, развивающиеся *in vivo* и *in vitro* в разных по химическому составу средах. Параллельно было проведено пилотное исследование распределения ATRX в GV-ооцитах человека, полученных от фертильных женщин и женщин с бесплодием различной этиологии. Для локализации ATRX, в том числе в областях перичентромерного гетерохроматина, проводили иммунофлуоресцентное мечение с помощью специфических антител и иммуно-FISH с использованием зонда к мажорному сателлиту (MaCat) мыши.

Обнаружено, что внутриядерное распределение ATRX существенно различается между GV-ооцитами мыши, полученными от самок разного возраста. В GV-ооцитах человека отмечена высокая межиндивидуальная вариативность паттернов распределения ATRX, что позволяет предположить их зависимость от функционального состояния репродуктивной системы женщины. Установлено, что динамика перераспределения ATRX при развитии эмбрионов мыши *in vitro*, отличается от таковой при развитии *in vivo* и эти отличия наиболее выражены при остановке дробления *in vitro* (так называемый “двухклеточный

блок *in vitro*). Как в ооцитах, так и в эмбрионах различия в распределении *ATRХ* касаются в первую очередь его локализации в зонах перичентромерного гетерохроматина: в случае снижения потенций к развитию колокализация *ATRХ* и *MaCat* выражена в меньшей степени.

Мы полагаем, что изменение нормального паттерна внутриядерного распределения *ATRХ* в ооци-

тах и ранних эмбрионах можно рассматривать как потенциальный предиктор возможных нарушений доимплантационного развития. Нельзя исключать, что именно изменение уровня экспрессии гена *ATRХ* в *GV*-ооцитах является одним из патогенетических факторов, по крайней мере в некоторых случаях идиопатического бесплодия, однако ответ на этот вопрос требует дальнейших исследований.

ЗНАЧЕНИЕ ЭОЗИНОФИЛОВ В СТРУКТУРЕ ПОЛИПОВ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА

© 2022 г. И. В. Семенцов¹, Д. А. Звягинцев¹, И. О. Калинин¹, С. В. Иченко¹, В. Е. Толмачев¹ *, И. В. Рева^{1, 2}, **, Е. Р. Двойникова¹, Т. М. Обыденникова^{1, 3}, ***, В. В. Усов¹

¹Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

²Международный медицинский научно-образовательный центр, Ниизгата, Япония

³Тихоокеанский государственный медицинский университет, Владивосток, Россия

*E-mail: tolmachev-ve@mail.ru

**E-mail: avers2@yandex.ru

***E-mail: vl.tamara.n@yandex.ru

Целью исследования являлось изучение особенностей локализации эозинофилов среди клеточных фенотипов миелоидных клеток в структуре полипов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) человека.

Изучены биоптаты слизистой оболочки ЖКТ, полученные от 189 пациентов (112 мужчин и 77 женщин) в возрасте от 60 до 90 лет, у которых имели место полипы, рак, метастазы. С помощью классических методов окрашивания гематоксилином и эозином, а также с помощью иммуногистохимического выявления макрофагов CD68 и CD163 изучены полипы различных отделов ЖКТ. Демаскировку антигенных детерминант проводили в течение 1 ч. Для демаскировки антигенов использовали 10 ммоль/л цитратный буфер, pH 6.0 или DAKO TRS (Target retrieval solution, code № S 1700). Остывшие препараты промывали в дистиллированной воде. Использовали соответствующие антитела в разведении 1 : 50 и 1 : 100. Окрашивание коричневого цвета свидетельствовало о положительной реакции.

Полипы чаще выявляли в толстом кишечнике, как у мужчин, так и у женщин. Случаи малигнизации установлены клинически и подтверждены гистологически. Хирургические вмешательства были выполнены у 95% пациентов, консервативное лечение — у 2% больных, исход благоприятный, прогноз положительный у 93% больных. Применение протокола fast track surgery (FTS) — “ускоренное восстановление после хирургических операций” в сочетании с лапароскопическим доступом позволяло пациентам легче переносить хирургическое лечение и покинуть стационар через 5–6 дней после проведения операции. Возрастные изменения структуры слизистой оболочки ЖКТ заключались в наличии лейкоцитарной инфильтрации вокруг сосудов слизистой оболочки и подслизистой основы, наблюдаемой практически на всех срезах биоптатов. При этом

в составе инфильтратов в больших количествах идентифицировали CD68- и CD163-позитивные макрофаги и эозинофилы с разной морфологией. Эозинофилы первого типа имели четко идентифицирующуюся плазматическую мембрану, ядра круглой, овальной или неправильной формы. Эозинофилы второго типа имели признаки дегрануляции и ядра из двойных или одиночных фрагментов. Эозинофилы были локализованы не только в собственной пластинке, но и проникали в базальные эпителиальные слои. При изменении морфологии эпителия слизистой оболочки и его метаплазии в структуре полипа в наших наблюдениях эозинофилы отсутствовали. Вокруг дегранулирующих эозинофилов, наблюдали клетки в процессе апоптоза. Также идентифицировали клетки полипов, одиночные или в небольших кластерах, с ядрами извитой формы, неравномерно конденсированным хроматином, и инвагинациями ядерной оболочки. В этих клетках не наблюдали фрагментацию ядер, а плазматическая мембрана не показывала признаков разрушения. Идентифицированные в составе полипов патологические формы эозинофилов в норме отсутствуют как в периферической крови, так и в тканях.

Увеличение количества эозинофилов в общем воспалительном лейкоцитарном ансамбле в зоне малигнизации является подтверждением их участия в противоопухолевом механизме защиты. Эти данные необходимы для разработки стратегии методов лечения полипов ЖКТ с помощью индукции усиления секреторной активности эозинофилов. Одним из направлений таргетного лечения и профилактики канцерогенеза может стать использование реакции эозинофильного пула лейкоцитарного инфильтрата на воздействие лекарственных средств.

СОВРЕМЕННЫЕ СПОСОБЫ РЕГИСТРАЦИИ ИЗОБРАЖЕНИЙ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ МИКРОПРЕПАРАТОВ НА ЗАНЯТИЯХ ПО ГИСТОЛОГИИ В МЕДИЦИНСКОМ ВУЗЕ

© 2022 г. О. Ю. Серышева^{1, 2, *}, Г. В. Брюхин^{1, 2}, С. Н. Завьялов^{1, 2}

¹Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, Челябинск, Россия

²Челябинский государственный университет, Челябинск, Россия

*E-mail: 22kiti22@mail.ru

Одной из общепрофессиональных компетенций при реализации обучения в высшем медицинском учебном заведении, согласно Федеральному государственному образовательному стандарту, является способность оценивать морфофункциональные, физиологические состояния и патологические процессы в организме человека для решения профессиональных задач. Основы данного умения закладываются еще при изучении морфологических дисциплин, в частности на занятиях по дисциплине «Гистология, эмбриология и цитология». Особую значимость, в связи с этим, приобретают практические навыки, которыми должен овладеть учащийся.

В этом ключе работа со световым микроскопом является неотъемлемой частью освоения дисциплины. Исторически сложившимся способом регистрации полученной при световой микроскопии информации об исследуемом объекте является зарисовка его структур с использованием, например, цветных карандашей. Этот способ запечатления образа имеет огромное преимущество: в процессе изображения объекта дополнительно активизируются процессы запоминания. Однако нарастающие по мере увеличения объемов изучаемой информации темпы проведения практических занятий не всегда позволяют обучающемуся качественно изобразить структуры и обозначить их на рисунке.

Способствовать решению данной проблемы могут следующие шаги.

(1) Активное использование студентами на занятиях средств получения цифрового изображения. Практически все средства коммуникации, используемые студентами, имеют возможность качественной фото- и видеосъемки. Оснащение микроскопов универсальными адаптерами для сотовых телефонов позволит не только изучить препарат, параллельно

отрабатывая навыки микроскопии, но и запечатлеть изображение, создав собственную коллекцию микрофотографий гистологических препаратов. Преимуществом данного метода является самостоятельность студентов в выборе объектов для фото- и видеосъемки, что способствует развитию навыка системного и критического мышления.

(2) Создание педагогами кафедры и использование на занятиях собственной цифровой коллекции микрофотографий гистологических препаратов. Преимуществом данного метода является, во-первых, отбор наиболее качественных гистологических препаратов из имеющихся в фондах кафедры; во-вторых, заведомый акцент на наиболее значимых аспектах в изучении конкретного органа; в-третьих, возможности включения редких, необычных гистологических препаратов (например, специфических гистохимических окрасок тех или иных структур клетки), в том числе препаратов, изготовленных сотрудниками данной кафедры, что будет способствовать росту интереса не только к дисциплине в целом, но и к научной деятельности кафедры.

(3) Использование не только зарисовок гистологических структур на доске во время занятий, но и заранее изготовленных преподавателем рисунков (также в форме коллекции, по желанию – в оцифрованном виде). Это позволит сопоставить теоретическую информацию о строении структуры и увиденное в микроскопе изображение.

Преимуществом двух последних пунктов также является возможность использования полученных наглядных материалов с иллюстративной целью при реализации дистанционного обучения в условиях распространения новой коронавирусной инфекции (COVID-19).

ОПЫТ ПРЕПОДАВАНИЯ В ДИСТАНЦИОННОМ ФОРМАТЕ НА КАФЕДРЕ ГИСТОЛОГИИ И ЭМБРИОЛОГИИ ИМ. ПРОФЕССОРА А.Г. КНОРРЕ СПбГПУ

© 2022 г. М. Ю. Скворцова^{1, *}, Г. Н. Визичканич¹, В. Г. Кожухарь¹

¹Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: mar.jur.skv@yandex.ru

Целью работы являлось выяснение влияния дистанционного обучения на уровень знаний студентов и выявление наиболее приемлемых методов обу-

чения с использованием цифровых технологий с помощью анонимного анкетирования студентов и анализа результатов промежуточных аттестаций.

В связи с пандемией COVID-19 вузы вынужденно перешли на дистанционный формат обучения. В большинстве случаев дистанционные занятия копировали традиционную систему в виртуальных классах с использованием программы Discord. Положительную роль сыграл тот факт, что незадолго до начала пандемии, в силу ряда объективных причин (Кожухарь, Скворцова, 2021), большая часть микропрепаратов кафедры была переведена в цифровой формат, вследствие чего их можно было использовать при проведении дистанционных занятий. Студенты зарисовывали фотографии препаратов с экрана и отправляли рисунки преподавателю для проверки. По результатам анонимного анкетирования 67.9% студентов оценили качество иллюстративного сопровождения дистанционных занятий на “отлично”, 24.5% – на “хорошо”, 7.6% – на “удовлетворительно”. Анонимное анкетирование помогло выявить положительные и отрицательные стороны дистанционного обучения с точки зрения студентов. Среди отрицательных преваляровали такие, как снижение уровня мотивации к учебе (35.8%), отвлекающие факторы и нерабочая обстановка дома (47.2%) и недостаточная материально-техническая оснащенность вуза (43.4%). Среди положительных были указаны только второстепенные факторы, такие как отсутствие необходимости тратить время на дорогу и носить маску. Эти результаты, в целом, соотносятся с данными других авторов (Алешковский и др., 2020). Опасения, что уровень владения цифровыми технологиями у преподавателей будет значительно отставать от уровня студентов, в большинстве случаев не соответствовали действительности. Несмотря на то, что современную молодежь часто называют “цифровыми детьми” (Кожухарь, Скворцова, 2021), их навыки нередко ограничиваются использованием базовых программ. В связи с этим не только преподаватели, но и студенты довольно часто сталкивались с проблемами технического характера. Влияние дистанционного обучения на уровень знаний студентов полностью можно будет оценить только со временем. Пока мы можем судить об этом лишь по

результатам сессии. В зимнюю сессию 2021 г. у студентов, периодически находящихся на дистанционном обучении в течение года, средний балл по результатам экзаменов практически не изменился по сравнению с предыдущим годом. В зимнюю сессию 2022 г. у студентов, обучающихся в условиях пандемии в течение двух лет, средний балл также изменился незначительно, за исключением студентов, обучающихся по специальности “Лечебное дело”: в 2021 г. средний балл составлял 3.9, а в 2022 г. – 3.2, т.е. он существенно снизился. Тревожным моментом сессии 2022 г. явились массовые неявки на экзамен студентов, обучающихся по специальности “Медико-профилактическое дело”, а также иностранных студентов.

Можно заключить, что основным фактором, препятствующим обучению в дистанционном формате, является низкий уровень самоорганизации студентов. В первую очередь это относится к студентам младших курсов, у которых низкий уровень самосознания связан с юным возрастом, эмоциональной и ментальной незрелостью. У многих студентов длительное обучение в дистанционном режиме приводит к снижению когнитивных способностей, повышенному уровню инфантилизма и равнодушия к учебе. Дистанционное обучение (в первую очередь морфологическим дисциплинам) является вынужденной мерой. Цифровые технологии играют в обучении позитивную роль лишь как дополнение к традиционному занятию в очном режиме.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Кожухарь В.Г., Скворцова М.Ю.* 2021. Учебный процесс на кафедре гистологии и эмбриологии им. профессора А.Г. Кнорре: традиции, современность и перспективы. Медицина и организация здравоохранения. Т. 6. № 1. С. 26.
- Алешковский И.А., Гаспаривили А.Т., Крухмалева О.В., Нарбут Н.П., Савина Н.Е.* 2020. Студенты вузов России о дистанционном обучении: оценка и возможности. Высшее образование в России. № 10. С. 86.

ХАРАКТЕРИСТИКА ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ГИСТИОНОВ СЕЛЕЗЕНКИ ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ ПРИ ДОЗИРОВАННОМ ОБЛУЧЕНИИ

© 2022 г. Д. Р. Слуцкая¹, *, Т. И. Березовская¹

¹Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: dina_hanieva@mail.ru

Вопросы изучения радиационного воздействия на организм человека в настоящее время являются актуальными. Ведутся активные исследования действия радиационного облучения низкой интенсивности в малых дозах на молекулярные механизмы, изучаются отдаленные последствия такого действия.

Цель исследования: оценить реактивные изменения функциональных гистионов селезенки в усло-

виях радиационного облучения. Материалом служила селезенка лабораторных мышей-самцов ($n = 10$), извлеченная на 9-е сут после однократного облучения в дозах 6.5, 7 и 7.8 Гр с использованием рентгенотерапевтической установки РУМ-17. Контролем служила селезенка интактных животных. Селезенку фиксировали 24 ч в жидкости Буэна. Обезвоживание и заливку материала в парафин производили по общепринятой методике. Срезы изготавливали на

микротоме Sacura Accu-Cut SRM 200 (толщина среза 5–7 мкм), окрашивали гематоксилином и эозином. Для оцифровки гистологических препаратов и проведения морфометрии применяли установку микроскопа Zeiss Axio Scope.A1 с камерой Zeiss AxioCam ERc 5s и компьютерную программу Zen 2.3.

В селезенке мышей контрольной группы выявляются два функциональных гистиона – миелоидный (т.н. красная пульпа) и лимфоидный (лимфоидные узелки, т.н. белая пульпа). Средний диаметр лимфоидных узелков в селезенке интактных мышей составляет 206.60 ± 8.92 (176.21; 249.25) мкм, средняя площадь – 34577.54 ± 2784.03 (23161.71; 46663.79) мкм², толщина капсулы – 4.64 ± 0.26 (3.75; 5.26) мкм. При воздействии рентгеновского излучения в дозе 6.5 Гр на 9-е сут лимфоидные узелки приобретают овальную форму, средний диаметр составляет 132.12 ± 4.71 (121.94; 140.33) мкм², маргинальные зоны расширены. Площадь, занимаемая лимфоидным гистионом, составляет 13882.76 ± 967.19 (11678.92; 15465.60) мкм². Клеточный состав миелоидного гистиона достаточно бедный, мегакариоциты характеризуются выраженной оксифилией цитоплазмы, неправильной формой, диффузно распределенными ядрами, размеры которых резко уменьшены. При анализе гистологических структур селезенки мышей после облучения сублетальной дозой 7 Гр обращают на себя внимание структурные изменения в миелоидном

гистионе – это крупные светлые образования, напоминающие отек ткани. Площадь, занимаемая лимфоидными тканевыми элементами в селезенке, составляет 16074.31 ± 1004.08 (12771.08; 19200.47) мкм². Анализ гистологических препаратов и морфометрических измерений выявил увеличение площади опорно-сократительного аппарата органа и уменьшение функциональных зон. Ретикулярный синцитий беден гемопоэтическими клетками, мегакариоциты единичны. Анализ гистологических препаратов селезенки мышей после облучения дозой 7.8 Гр показал наличие изменений, выражающихся уменьшением доли лимфоидной ткани (11457.04 ± 975.358 (9268.65; 14023.80) мкм²), диаметра узелков (119.58 ± 5.13 (108.63; 133.60) мкм). При данном воздействии на орган отмечается увеличение соединительнотканного компонента – лимфоидные узелки окружаются соединительной тканью, стенка центральной артерии утолщается. В составе миелоидного гистиона мегакариоциты практически не встречаются, однако наблюдаются скопления гранулоцитов и макрофагов.

В ходе исследования выявлены особенности структуры функциональных гистионов селезенки, а также реактивные изменения сосудов в результате воздействия разных доз облучения. Эти данные являются исходными (базовыми) для анализа гистоархитектоники селезенки в условиях применения радиопротекторов нового поколения.

ОСОБЕННОСТИ РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ МИОКАРДА У ПАЦИЕНТОВ ПРИ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ, АССОЦИИРОВАННОЙ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА

© 2022 г. А. Д. Старченко¹, *, Ю. В. Лискова², А. А. Стадников¹

¹Оренбургский государственный медицинский университет Минздрава России, Оренбург, Россия

²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия

*E-mail: anastasiyadmitriyevnas@mail.ru

Цель исследования: определить морфологические особенности ремоделирования миокарда ушка правого предсердия (УПП) у пациентов с сердечной недостаточностью с сохраненной фракцией выброса левого желудочка (СНсФВ), ассоциированной с сахарным диабетом (СД) 2 типа.

В исследование включены 20 мужчин (66.21 ± 8.69 лет) и 12 женщин (66.75 ± 7.24 лет) с СНсФВ ишемического генеза I–IIA стадий, I–III функциональным классом (ФК) по NYHA, госпитализированных в кардиохирургическое отделение ГАУЗ «ООКБ» г. Оренбурга. Исследуемый материал – биоптаты миокарда УПП. Образцы получены интраоперационно при проведении коронарного шунтирования до подключения аппарата искусственного кровообращения на этапе канюляции полых вен через правое ушко и правое предсердие.

Биоптаты УПП фиксировали в 10%-ном растворе забуференного нейтрального формалина при комнатной температуре. После стандартной гистологической проводки материал был залит в парафин. Серийные срезы толщиной 4–5 мкм изготавливали на ротационном микротоме МПС-2. Депарафинированные срезы окрашивали гематоксилином Майера и эозином. На гистологических срезах проводили морфометрию в соответствии с принципами системного количественного анализа с применением программы ImageJ 1.48v (США). Статистическая обработка данных выполнена при помощи программы Statistica 10.0 (StatSoft, США). Уровень значимости p на всех этапах статистического анализа принимался равным 0.05.

Морфофункциональные изменения миокарда УПП включали ряд общих признаков независимо от половой принадлежности пациентов и стадии хро-

нической сердечной недостаточности (ХСН): кардиомиоциты (КМЦ) с преобладанием конденсации гетерохроматина ядер, КМЦ с вакуолизацией цитоплазмы, участки локального пересокращения мышечных волокон, разволокнение и фрагментация миофибрилл, формирование очагов интерстициального фиброза на месте поврежденных КМЦ, отечность эндотелия сосудов микроциркуляторного русла, спазм артериол, стаз форменных элементов крови в артериолах и капиллярах. Определялась избыточная полиплоидизация КМЦ (крупные ядра, диаметр 15.1–16.8 мкм), в зонах ишемии миокарда встречались участки новообразования сосудов микроциркуляции, что свидетельствует о сохраняющемся адаптогенезе структур миокарда.

При анализе морфометрических характеристик миокарда УПП у пациентов с СНсФВ II и III ФК установлены достоверное уменьшение диаметра КМЦ ($p = 0.0023$), объемной плотности (ОП) стромы ($p = 0.00012$) в сравнении с I ФК.

При оценке морфометрических показателей миокарда УПП у мужчин в зависимости от ФК ХСН вы-

явлены достоверно больший диаметр КМЦ при СНсФВ III ФК в сравнении с II ФК ($p = 0.0011$) и I ФК ($p = 0.0022$). Анализ морфометрических данных миокарда УПП у женщин исследуемой группы показал достоверно больший диаметр КМЦ при III ФК ХСН в сравнении с I ФК ($p = 0.0008$) и II ФК ($p = 0.0011$), диаметр ядер КМЦ в сравнении с ФК I ($p = 0.0002$).

Полученные результаты отражают особенности адаптивных механизмов, способствующих поддержанию гомеостаза миокарда при прогрессировании ХСН.

Установлено, что значимые структурно-функциональные изменения миокарда при СНсФВ, ассоциированной с СД 2 типа, не зависят от половой принадлежности пациентов и усугубляются по мере прогрессирования ХСН. Выявлено, что параллельно с процессами дезадаптации в условиях ишемии и гипергликемии активируются механизмы адаптивного ремоделирования, что актуально для дальнейшего исследования с целью разработки возможного фармакологического воздействия на них.

ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ И ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ КОЖНОГО ПОКРОВА И ЦЕНТРАЛЬНОЙ ПАРЕНХИМЫ *CONVOLUTA CONVOLUTA* (ASCOELA)

© 2022 г. М. В. Столярова*

Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: mvstolyarova@yandex.ru

Становление тканевой организации в процессе эволюции многоклеточных животных — одна из фундаментальных проблем современной биологии. Среди Bilateria бескишечные турбеллярии (Ascoela) рассматриваются как животные дотканевого уровня организации (Беклемишев, 1952). По данным молекулярной филогении (Ruiz-Trillo et al., 1999), бескишечные турбеллярии представляют собой самую древнюю ветвь Bilateria. Цель настоящей работы: изучение клеточной и тканевой организации кожного покрова и центральной паренхимы бескишечных турбеллярий. Объект исследования: широко распространенный вид — *Convoluta convoluta*. Методы исследования: общегистологические, гистохимические, трансмиссионная электронная микроскопия.

Кожный покров *C. convoluta* состоит из мерцательных и железистых (слизистых и зернистых) клеток, апикальные части которых плотно сомкнуты, а базальные концы погружены в паренхиму, базальная мембрана отсутствует. Апикальные части клеток образуют в совокупности пластинку толщиной 2–3 мкм, к которой прилежат мышечные слои стенки тела. Цитоплазма мерцательных клеток на границе с мышечными слоями разделяется на тонкие отростки. В тесной связи с клетками кожного покрова находятся

элементы периферической паренхимы и одноклеточные симбиотические водоросли. Между цитоплазматическими отростками мерцательных клеток и мышечными волокнами стенки тела имеются сообщения. Одна и та же клетка, по-видимому, может содержать мышечные пучки разных направлений. Небольшие мышечные пучки и скопления миофиламентов могут находиться также в апикальной пластинке. В составе мышечных пучков различимы толстые и тонкие миофиламенты диаметром соответственно 25 и 5 нм. Отростки, содержащие мышечные пучки, скреплены десмосомами. В мерцательных клетках имеется центральный отросток, содержащий ядро. На апикальной поверхности находится сложно организованный мерцательный аппарат и микроворсинки. Наличие микроворсинок свидетельствует о способности клеток кожного покрова к поглощению веществ. По строению мерцательные клетки представляют собой эпителиально-мышечные элементы, имеют сложную конфигурацию (Столярова, 2012). Обнаружен момент митотического деления мерцательной эпителиально-мышечной клетки. Секрет слизистых клеток содержит гликопротеины и гликозаминогликаны. Имеются разновидности слизистых клеток, отличающиеся

ультраструктурой секрета. Центральная (пищеварительная) паренхима не отграничена от периферической паренхимы, но имеет “обкладку” из веретеновидно вытянутых клеток. В центральной паренхиме находятся рыхло лежащие клетки со слабо различимыми границами и очень мелкими ядрами, фрагменты их цитоплазмы, многоядерные клетки. Через центральную паренхиму проходят тонкие мышечные пучки, встречаются глубокие части слизистых клеток.

Выводы: кожный покров *S. convoluta* лишен базальной мембраны, содержит эпителиально-мышечные клетки, что свидетельствует о его крайне примитивном строении. Центральная паренхима

также представляет собой особую, специализированную на пищеварении, систему.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Беклемишев В.Н.* 1952. Основы сравнительной анатомии беспозвоночных. М., Советская наука.
- Столярова М.В.* 2012. Сравнительная морфолого-физиологическая характеристика и реактивные особенности эпителиальных систем у животных разных уровней организации и человека: филогенетический аспект. Автореф. дис. ... доктора биол. наук. СПб.
- Ruiz-Trillo I., Riutort M., Littlewood D.T., Herniou E.A., Baguña J.* 1999 Acoel flatworms: earliest extant bilaterian Metazoans, not members of Platyhelminthes. *Science*. V. 283. P. 1919.

КОЖНЫЙ ЭПИТЕЛИЙ И ИНТРАЭПИТЕЛИАЛЬНАЯ НЕРВНАЯ СИСТЕМА *SACCOGLOSSUS MERESCHKOWSKII* (ENTEROPNEUSTA, NEMICHORDATA) КАК РЕЦЕПТОРНО-РЕГУЛЯТОРНЫЙ ТКАНЕВОЙ КОМПЛЕКС

© 2022 г. М. В. Столярова¹, *, Э. И. Валькович¹

¹Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: mvstolyarova@yandex.ru

Кишечнодышащие (кл. Enteropneusta, тип Nemichordata) среди современных животных наиболее близки к предкам хордовых. По данным молекулярно-биологических исследований их считают родственными древним вторичноротым животным (Bromham, Degnan, 1999). Нервная система кишечнодышащих расположена преимущественно интраэпителиально, лишь в области воротника она погружена под эпителий. Представляет интерес исследование кожного эпителия кишечнодышащих в сравнительно-эволюционном плане. Цель настоящей работы: изучение клеточного состава кожного эпителия кишечнодышащих, в составе которого располагаются и элементы нервной системы. Объект исследования: распространенный вид кишечнодышащих *Saccoglossus mereschkowskii*. Методы исследования: общегистологические и гистохимические, трансмиссионная электронная микроскопия, иммуноцитохимический метод выявления трансммиттера FMRF-амида.

Изучен кожный эпителий *S. mereschkowskii* в области хоботка и туловища. Эпителий образован мерцательными и железистыми клетками, расположенными на базальной мембране, по строению представляет собой однослойный ложномногорядный эпителий (Атаманова, 1977, 1978). В основании эпителия располагается нервный слой, содержащий нервные волокна и нервные клетки. Мерцательные клетки имеют на поверхности реснички и микроворсинки, в цитоплазме апикальных частей клеток — пучки миофиламентов. Железистые клетки представлены 4 ви-

дами: бокаловидные, слизистые, мелкозернистые и крупнозернистые. Базальные части мерцательных клеток проходят через нервный слой и контактируют с базальной мембраной, выполняя, очевидно, опорную функцию. Базальные отростки некоторых мерцательных клеток на границе с нервным слоем поворачивают и входят в его состав, что дает основания рассматривать их как рецепторные элементы. Бокаловидные клетки содержат секрет белкового состава, слизистые клетки образуют секрет, содержащий гликозаминогликаны. В гранулах зернистых клеток выявляются основные и кислые белки, гранулы обнаруживаются как в апикальных, так и в базальных частях клеток. Получены данные о выделении гранул на границе с базальной мембраной. Таким образом, зернистые клетки можно рассматривать как экзокринно-эндокринные (эндокриноподобные) элементы. В гранулах мелкозернистых клеток выявлен медиатор FMRF-амид. Базальные части мелкозернистых клеток найдены в слое нервных волокон. Можно заключить, что эти клетки представляют собой рецепторно-эндокриноподобные элементы. Обнаружены синапсоподобные контакты нервных клеток и нервных волокон с базальными частями железистых эпителиальных клеток.

Таким образом, кожный эпителий *S. mereschkowskii*, включающий эпителиальные и нейральные элементы, представляет собой эволюционно примитивный, но структурно и функционально сложный рецепторно — регуляторный тканевой комплекс, обеспечивающий функции рецепции, секреции и

регуляции функций как самих эпителиальных клеток, так и, по-видимому, общую регуляцию и мышечные сокращения. Также эпителий способен осуществлять поглощение веществ из внешней среды благодаря наличию микроворсинок.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Атаманова М.В. 1977. Кожный и кишечный эпителии кишечнодышащих как этап филогенетического разви-

тия эпителиев хордовых. Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. Т. LXXIII. Вып. 9. С. 55.

Атаманова М.В. 1978. Ультраструктурные особенности кожного эпителия *Saccoglossus mereschkowskii* (Enteropneusta). Цитология. 1978. Т. 20. № 12. С. 1355.

Bromham L.D., Degnan B.M. 1999. Hemichordates and deuterostome evolution: robust molecular phylogenetic support for a hemichordate + echinoderm clade. *Evol. Dev.* V. 1. № 3. P. 166.

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕТЕРОХРОМАТИНА В ООЦИТАХ МЫШИ, ПОЛУЧЕННЫХ ОТ САМОК РАЗНОГО ВОЗРАСТА

© 2022 г. А. С. Трифонова¹, И. О. Боголюбова^{2, 3, *}

¹Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

³Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: ibogol@mail.ru

Проблема репродуктивного старения в настоящее время имеет высокую актуальность в связи с выраженной тенденцией увеличения возраста деторождения. Однако с возрастом женщины неизбежно снижается не только фертильность при попытках естественного зачатия, но и способность ооцитов к созреванию и развитию, что существенно снижает эффективность вспомогательных репродуктивных технологий, включая ЭКО. В связи с этим высокую практическую значимость имеет поиск путей замедления/корректировки изменений, происходящих в ооцитах в связи с возрастом матери, что невозможно без понимания фундаментальных механизмов, лежащих в основе снижения способности ооцитов к успешному развитию. В этом плане особое внимание привлекают перестройки хроматина на поздних стадиях оогенеза, приводящие к постепенному угасанию транскрипционной активности ооцита и формированию особой мейоз-специфической структуры хроматина – кариосферы. Согласно имеющимся в литературе данным, нарушения или незавершенность процессов реорганизации хроматина в ооцитах не только снижает вероятность успешного завершения их созревания, но и может стать причиной остановки развития на доимплантационных стадиях эмбриогенеза.

Целью работы являлся сравнительный анализ структурно-функциональной организации гетерохроматина в ооцитах на стадии зародышевого пузырька (GV), полученных от молодых и старых мышей (в возрасте 2–3 мес. и 10–12 мес. соответственно). Для синхронизации полового цикла и увеличения числа преовуляторных фолликулов использовали однократную инъекцию фолликулстимулирующего гормона (Фоллигон, Intervet, 7.5 ME). Проводили иммунофлуо-

ресцентную локализацию хроматинре моделирующего белка ATRX и его основного функционального партнера Daхх с последующей конфокальной микроскопией, для визуализации хроматина использовали DAPI.

Согласно нашим предварительным данным, паттерны распределения гетерохроматина значительно различаются в ооцитах, полученных от самок разного возраста. Для GV ооцитов, полученных от молодых мышей, типичным было формирование DAPI-позитивной кольцеобразной структуры вокруг так называемого атипичного ядрышка (nucleolus like body, NLB). Согласно имеющимся данным, это гетерохроматиновое “кольцо” – кариосфера – является местом агрегации зон конститутивного гетерохроматина, в том числе перичентромерных последовательностей. В его составе локализуются изученные нами белки – ATRX и Daхх. В GV ооцитов, полученных от старых мышей, в некоторых случаях наблюдали признаки нарушения конденсации гетерохроматина вокруг NLB: вместо одного NLB с окружающим его гетерохроматином присутствовали несколько более мелких NLBs с относительно более тонким гетерохроматиновым кольцом (что нехарактерно для нормального развития ооцитов). Кроме того, в ооцитах от мышей старшей возрастной группы ATRX и Daхх были в меньшей степени представлены в составе кариосферы.

Таким образом, процессы реорганизации гетерохроматина в GV ооцитов существенно изменены в организме старых животных. Можно предположить, что в основе этих изменений лежит замедление и/или нарушение конденсации перичентромерного гетерохроматина вокруг NLBs.

ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ БОЛЬШОГО САЛЬНИКА В УСЛОВИЯХ ОПУХОЛЕВОГО ПОРАЖЕНИЯ ЯИЧНИКОВ

© 2022 г. Л. В. Халикова^{1, *}, Н. Н. Шевлюк^{2, **}, И. Р. Хасанова¹

¹Башкирский государственный медицинский университет Минздрава России, Уфа, Россия

²Оренбургский государственный медицинский университет Минздрава России, Оренбург, Россия

*E-mail: anifas09@mail.ru

**E-mail: k_histology@orgma.ru

Цель исследования: выявление цитологических и молекулярно-генетических особенностей большого сальника в условиях опухолевого процесса в яичниках. Исследовали большой сальник пациенток с первично диагностированным и верифицированным раком яичников II и IIIA стадиями ($n = 48$), полученный во время проведения стандартной операции – экстирпация матки с придатками с оментэктомией. Возраст пациенток варьировал от 50 до 67 лет, у всех была верифицирована низкодифференцированная аденокарцинома яичников. Пациентки были разделены на 2 группы: в первой группе у пациенток выявлены метастазы в большом сальнике, во второй группе метастазы не выявлены. Материал фиксировали в 10%-ном растворе формалина, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и заливали в парафин. Гистологические срезы окрашивали гематоксилином Майера и эозином. Для иммуногистохимического исследования использовали моноклональные антитела к белкам Ki-67, P53, CD7, CD4, CD8, CD68, E-cad, VEGF. Для статистической обработки данных использовали лицензионный пакет прикладных программ STATISTICA v. 7.0 (Stat Soft Inc., США). Для выполнения работы было получено добровольное информированное согласие пациенток на участие в проведенном исследовании. На выполнение работы имеется разрешение локального этического комитета Оренбургского государственного медицинского университета (протокол заседания локального этического комитета № 237 от 16 октября 2019 г.).

Анализ препаратов показал, что количество клеток, экспрессирующих маркер Т-киллеров, CD7 (< 0.001), и маркер макрофагов CD68 ($p < 0.0005$) выше в большом сальнике с метастатическим пора-

жением. В то же время, количество клеток, экспрессирующих маркер цитотоксических лимфоцитов CD8, не имело статистически значимых различий в обеих группах, а уровень клеток, экспрессирующих маркер лимфоцитов Т-хелперов CD4, был ниже в большом сальнике с метастазами. В яичниках с метастазами установлено более высокое количество клеток, экспрессирующих белок Ki-67 на фоне высокого содержания клеток, экспрессирующих P53. Сравнительный анализ количества клеток, экспрессирующих белок адгезии E-cadherin показал, что в большом сальнике с метастазами их уровень статистически значимо выше ($p < 0.001$). Было установлено высокое количество клеток, экспрессирующих VEGF в большом сальнике с метастазами, по сравнению с большим сальником без метастазов. Таким образом, в условиях опухолевого роста, высокое содержание иммуноцитов в окружающих тканях, на фоне прогрессирующего ангиогенеза и увеличения адгезивных свойств опухолевых клеток, может говорить о ремоделировании микроокружения тканей опухолевыми клетками, что может способствовать дальнейшему распространению злокачественного процесса.

Таким образом, уровень экспрессии маркеров Т- и В-лимфоцитов свидетельствует о нарушении взаимодействий систем Т- и В-лимфоцитов. Увеличение экспрессии молекул клеточной адгезии при метастазировании опухоли в большой сальник свидетельствует о вовлечении молекул клеточной адгезии в формировании метастатических очагов. Возрастание количества клеток, экспрессирующих белок Ki-67 на фоне высокого содержания клеток, экспрессирующих P53, указывает на агрессивный характер опухоли и на нарушение регуляторных механизмов апоптоза.

ВЫЯВЛЕНИЕ ЭЛЕМЕНТОВ ГАМКЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ В КЛЕТКАХ СУБВЕНТРИКУЛЯРНОЙ ЗОНЫ МОЗГА КРЫС В НЕОНАТАЛЬНЫЙ ПЕРИОД

© 2022 г. Л. И. Хожай*

Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: astarta0505@mail.ru

У млекопитающих и человека в субвентрикулярной зоне (СВЗ) взрослого мозга, которая представляет одну из нейрогенных ниш, продолжительный период времени сохраняется генерация нейральных

клеток. СВЗ содержит самый большой пул стволовых клеток, которые дают начало новым популяциям нервных и нейроглиальных клеток, постоянно мигрирующих в другие формации мозга. Известно,

что ГАМК во время раннего развития участвует в регуляции процессов пролиферации и миграции нейральных клеток.

Цель работы заключалась в выявлении прогениторных клеток СВЗ, экспрессирующих ГАМК, парвальбумин (Ca^{2+} -связывающий белок, колокализующийся с ГАМК), рецептор ГАМК $_{\alpha 1}$ и GAT-1 (транспортер ГАМК) в неонатальный период развития.

Работа проведена на лабораторных крысах линии Wistar. Проводили иммуногистохимические реакции на β -III-тубулин (маркер нейральной дифференцировки стволовых клеток) с использованием первичных кроличьих моноклональных антител (anti-beta-III-tubulin, клон EP1569Y, Abcam, Великобритания) в разведении 1 : 50; на ГАМК с использованием первичных кроличьих поликлональных антител (anti-GABA antibody, Abcam), 1 : 1000; на ГАМК $_{\alpha 1}$ -рецептор, включающий $\alpha 1$ -субъединицу с использованием первичных кроличьих поликлональных антител (anti-GABA $_{\alpha 1}$ receptor antibody, Abcam), 1 : 300; на парвальбумин с использованием кроличьих поликлональных антител (Anti-Parvalbumin antibody rabbit polyclonal, Abcam), 1 : 100; на GAT-1 с использованием первичных кроличьих поликлональных антител (anti-GABA transporter 1; GAT-1; Abcam), 1 : 100. Исследовали субвентрикулярную зону, расположенную вдоль стенки латерального желудочка мозга на 5-е ($n = 5$) и 10-е ($n = 6$) сут постнатального развития (P5, P10).

Показано, что в СВЗ в неонатальный период, так же, как и в СВЗ взрослого мозга присутствуют все типы прогениторных клеток, значительная часть которых (30%) дифференцируется по нейрональному типу и представляет собой мигрирующие юные нейробласты (тип А). Количество этих клеток остается постоянным на протяжении всего неонатального

периода. Показано, что юные нейробласты и часть астроцитоподобных стволовых клеток экспрессируют ГАМК. Число таких клеток составляет около 40%, их количество сохраняется постоянным на протяжении всего неонатального периода. Установлено, что мигрирующие нейробласты (типа А) экспрессируют парвальбумин. Численность популяции этих клеток на P5 и P10 является сходной (24.1 и 20.8% от общего числа клеток СВЗ соответственно). Изучение распределения GAT-1 на P5 и P10 показало, что к P10 интенсивность экспрессии GAT-1 возрастает в 2.5 раза (значения оптической плотности окрашивания в усл. ед. — 0.079 и 0.197 соответственно), что свидетельствует о значительном увеличении уровня трансмиссии ГАМК в СВЗ к концу неонатального периода. Подавляющее большинство (90%) клеток СВЗ (юные нейробласты (тип А), астроцитоподобные стволовые клетки (тип В) и часть транзиторных клеток (тип С)) экспрессируют рецептор ГАМК $_{\alpha 1}$. При этом численность популяций прогениторных клеток каждого типа в течение неонатального периода поддерживается на постоянном уровне. Присутствие рецептора ГАМК $_{\alpha 1}$ в подавляющем числе клеток СВЗ указывает на возможное вовлечение ГАМК в ГАМКергическую несинаптическую передачу сигналов, осуществляющих регуляцию поведения и функционирования клеток разных типов в СВЗ. Постоянная численность популяций различных типов клеток, экспрессирующих разные элементы ГАМКергической системы, свидетельствует о существовании в СВЗ механизма, связанного с ГАМК, контролирующего темпы пролиферации и миграции нейрогенных клеток из СВЗ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-015-00052).

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГАМК И GAT-1 В НЕОКОРТЕКСЕ КРЫСЫ В НЕОНАТАЛЬНЫЙ ПЕРИОД

© 2022 г. Л. И. Хожай*

Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

**E-mail: astarta0505@mail.ru*

Развитие и становление неокортекса у млекопитающих и человека является одним из важных и сложных процессов, происходящих в онтогенезе. В неокортексе человека формируются структурные и функциональные механизмы речи, мышления, сенсорных ответов и других когнитивных реакций. В состав коры головного мозга входят разные типы нейронов, каждый из которых обладает специфическими молекулярными и функциональными характеристиками, и локализуется в определенных слоях. Особый статус имеют тормозные ГАМКергические интернейроны, регулирующие активность отдельных популяций пирамидных нейронов неокортекса. Основным тормозным нейротрансмиттером в ЦНС

млекопитающих и человека является ГАМК. Для ГАМК в настоящее время описано четыре класса транспортных белков GAT-1, GAT-2, GAT-3 и GAT-4 (или BGT-1 betaine), из которых GAT-1 считается одним из основным транспортеров при синаптической нейротрансporte. Целью работы явилось изучение экспрессии ГАМК и GAT-1 в разных слоях неокортекса в неонатальный период развития.

Работа выполнена на крысах линии Wistar, были проведены иммуногистохимические реакции на ГАМК с использованием первичных кроличьих поликлональных антител (anti-GABA antibody, Abcam), 1 : 1000; на GAT-1 с использованием первичных кро-

личьих поликлональных антител (anti-GABA transporter-1, Abcam), 1 : 1000. Исследовали сенсомоторную область неокортекса на 5-е ($n = 6$) и 10-е ($n = 6$) постнатальные сутки (П5, П10). Оценку иммунореактивности (оптической плотности продукта реакции в условных единицах) осуществляли при помощи системы анализа изображений и программного обеспечения Видеозавр Мультиметр 2.3 (ООО “АТМ-практика”). Иммуногистохимическое выявление ГАМК показало, что на П5 в верхних слоях II–III присутствует 18.6 ± 2.1 клеток, экспрессирующих ГАМК. В слое IV и V их количество ниже в 1.5 и 2.3 раза (12.5 ± 1.8 и 8.0 ± 1.4 соответственно). В слое VI число этих нейронов соответствует таковому в верхних слоях (19.3 ± 1.2). На П10 в верхних слоях II–III и слое VI число иммунореактивных клеток резко снижается (в 2 раза), а в слоях IV и V остается без изменений. На П5 самая высокая интенсивность иммунореактивности на GAT-1 имела место в слое I (0.280 ± 0.004). Распределение GAT-1 в других слоях было различным: в слоях II–III и VI она одинаково низкая (0.044 ± 0.002 и 0.048 ± 0.003 соответственно), а в слоях IV и V почти в 2 раза выше, чем в II–III и VI. На П10 иммунореактивность на GAT-1 в слое I снижается почти в 2 раза по сравнению с таковым значением на П5, в остальных слоях неокортекса (II–III,

IV, V и VI) существенно повышается (в 3.1, 1.3, 1.2 раза соответственно).

Присутствие на П5 в верхних слоях II–III неокортекса значительного количества нейронов, иммунореактивных на ГАМК, и слабой экспрессии GAT-1, свидетельствуют о низком уровне трансмиссии ГАМК в этих слоях. В этот период продолжается дифференцировка главных нейронов и формирование нейрона и, вероятно, локализующаяся здесь ГАМК следует рассматривать не в качестве нейротрансмиттера, а в качестве модулятора. Значительное число нейронов, экспрессирующих ГАМК, в слое VI, видимо, образуется за счет их миграции в неокортекс через глубокие слои. К концу неонатального периода интенсивность миграции снижается, приводя к сокращению и число интернейронов. Показано, что на П10 во всех слоях число нейронов, экспрессирующих ГАМК, сокращается (на единицу площади), при этом существенно повышается экспрессия GAT-1, что может свидетельствовать о значительном увеличении уровня трансмиссии ГАМК к концу неонатального периода.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-015-00052).

ОРГАНИЗАЦИЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ СТУДЕНТОВ В УСЛОВИЯХ ЦИФРОВОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ПРАКТИЧЕСКОГО ЗАНЯТИЯ НА КАФЕДРЕ ГИСТОЛОГИИ ПРИ ДИСТАНЦИОННОЙ ФОРМЕ ОБУЧЕНИЯ

© 2022 г. Е. О. Шамшурина¹ *, С. В. Сазонов¹

¹Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург, Россия

*E-mail: elshamshurina@gmail.com

Цель работы: оценить опыт использования оцифрованных гистологических препаратов (Whole slide imaging – WSI) как элемента технологии дистанционного обучения (ДО) на кафедре гистологии, цитологии и эмбриологии для организации контроля самостоятельной работы студентов на практическом занятии и роль этой технологии в приобретении студентами практических навыков.

В период эпидемии коронавирусной инфекции COVID-19 самостоятельная работа студентов 1–2 курсов на практических занятиях проводится как в очном формате, с использованием микроскопов, так и дистанционно, с использованием сканированных гистологических препаратов (WSI) в рамках приобретения навыков микроскопирования гистологических препаратов (Павлов, 2019; Береснева и др., 2021). Проведен сравнительный анализ результатов оценки практических навыков студентов лечебного и педиатрического факультетов (13 групп, 156 человек) на практических занятиях на кафедре гистологии в очной и дистанционной формах за период весеннего и осеннего семестров 2021 г.

В рамках ДО практические занятия со студентами проводили в формате видеоконференции с использованием платформы Microsoft Teams. Во время занятия проводили входное курсовое тестирование (ВКТ) на обучающем портале университета. В рамках обсуждения теоретического материала и разбора гистологических препаратов, для самостоятельной работы студентов по формированию навыков чтения микропрепаратов, а так же для оценки приобретения ими практических навыков в конце занятия и при проведении промежуточных контролей модулей разделов общей, частной гистологии, цитологии и эмбриологии использовали оцифрованные гистологические препараты. Технология WSI позволяет студентам изучать структурные элементы в гистологических срезах при различных увеличениях (10–400×) удаленно, со своих компьютеров (Береснева и др., 2021). Использование студентами ранее разработанных на кафедре электронных образовательных ресурсов по всем препаратам значительно облегчают выполнение самостоятельной работы.

Анализ средней успеваемости студентов в периоды очного и дистанционного обучения показал улучшение результатов работы студентов как по отдельным факультетам (на 16.7–35%), так и в целом по всем проанализированным группам студентов (на 26.9%) при использовании WSI.

Таким образом, использование оцифрованных гистологических препаратов при проведении занятий при формате ДО и формирования практических навыков чтения микропрепаратов с использованием WSI, является для студентов единственно возможной альтернативой использования микроскопиче-

ской техники, позволяет овладевать практическими навыками, сохранить уровень общей успеваемости.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Павлов А.В. 2019. Виртуальная микроскопия в преподавании гистологии – новая реальность эпохи цифровых технологий. Морфология. Т. 156. № 5. С. 75.
- Береснева О.Ю., Денисенко С.А., Сазонов С.В., Шамишурин Е.О. 2021. Whole slide imaging для приобретения навыков чтения гистологических препаратов на кафедре гистологии, цитологии и эмбриологии УГМУ в условиях дистанционного обучения. Вестник УГМУ. № 3. С. 3.

ДЕРМАЛЬНЫЙ ЭКВИВАЛЕНТ С ФИБРОБЛАСТАМИ СТИМУЛИРУЕТ РЕГЕНЕРАЦИЮ КОЖНОГО ДЕФЕКТА ПО ХЕМОКИНОВОМУ ПУТИ CXCL12J–CXCR4

© 2022 г. Е. Ю. Шаповалова¹, *, Ю. Г. Барановский¹, С. В. Харченко¹,
А. Г. Барановский¹, И. А. Лугин¹

¹Медицинская академия им. С.И. Георгиевского КФУ им. В.И. Вернадского, Симферополь, Россия

*E-mail: Shapovalova_L@mail.ru

Установлено, что стволовые клетки экспрессируют на своей мембране ассоциированный с гетеротримерными G-белками трансмембранный рецептор CXCR4, связывающийся со специфическим лигандом – SDF-1 (CXCL12J) (stromal derived factor). Последний вырабатывается клетками многих тканей и приводит к усиленной миграции клеток предшественников в зоны повреждения, направленных на модуляцию миграционной оси SDF1 → CXCR4 (Григорян, 2006). Целью исследования было изучение влияния дермального эквивалента с ксеногенными фибробластами на экспрессию фактора SDF-1 клетками регенерата ишемизированного кожного дефекта и миграцию эндогенных CD34-положительных стволовых клеток (СК) в его ткани.

Работа выполнена на 112 белых мышах линии C57/B1 в возрасте 5–7 мес., которые содержались в виварии. Животные были разделены на контрольную (КГ) и экспериментальную группы (ЭГ). В каждой группе биоптат заживающей раны изучали на 4, 7, 10, 12, 15, 19, 23 и 26-е сут после операции по моделированию ишемизированной раны на спине животных в межлопаточной области. Для ЭГ дермальные фибробласты были получены методом ферментации, культивированы в среде DMEM F12 (Lonza) и в количестве 1.33 млн клеток ассоциированы в дермальный эквивалент из коллагена I типа в ростовой среде DMEM F12 (Lonza). Рубец заливали в парафин. Срезы окрашивали с помощью поликлональ-

ных антител к SDF-1 (Gene Tex Inc., США) и моноклональных антител к CD34 (клон EP373Y, Abcam, США), конъюгированных с пероксидазой хрена в разведении 1 : 100; визуализацию иммуногистохимической реакции проводили в системе диаминобензидин–H₂O₂.

В КГ на 4-е сут в регенерате модельной ишемизированной раны эпидермис (Э) не выявляется. Основу регенерата составляет грануляционная ткань (ГТ), клетки которой секретируют фактор SDF-1 (индекс $10.22 \pm 0.07\%$), привлекающий собственные СК. На 7-е сут эпителиоциты регенерирующего Э (индекс $12.41 \pm 0.11\%$) также начинают выделять фактор SDF-1. Увеличивающаяся концентрация этого хемоаттрактанта привлекает в рану СК с хемокиновым рецептором 4 (CXCR4). Они присутствуют в ГТ раны уже с 10-х сут регенерации (индекс $5.10 \pm 0.01\%$), а в формирующемся Э – несколько позже – с 12-х сут ($1.23 \pm 0.01\%$). До 15-ти сут фиксируется нарастание индекса SDF-1⁺-клеток, как в Э, так и в ГТ. После 15-х сут индекс таких клеток статистически достоверно уменьшается вплоть до исчезновения их из популяции к 26-м сут, когда морфологическая картина рубца сформировалась. При этом с появлением Э его клетки достоверно лидируют по способности к секреции хемоаттрактанта. Индекс СК в Э после обнаружения на 12-е сут статистически достоверно не увеличивается, а к 23-м сут – такие клетки не обнаруживаются. В рубцующейся ткани индекс СК статисти-

чески достоверно увеличивается до 15-ти сут, а затем количество таких клеток становится единичным.

В ЭК до 10-х сут индекс клеток, секретирующих хемоаттрактант SDF-1, достоверно увеличивается как в составе формирующегося Э, так и в составе ГТ биоптатов. После 10-х до 19-х сут индекс SDF-1⁺-эпидермоцитов неуклонно снижается и на 23-и сутки они не обнаруживаются. В ГТ индекс SDF-1⁺-клеток также уменьшается до полной элиминации после 23-х сут. Аутогенные CD34⁺-клетки впервые выявляются сразу с максимальным индексом в Э по-

сле 12-ти сут. В последующем индекс этих клеток постепенно падает до минимального (1.02 ± 0.001) к 26-м сут в ГТ. В Э на 26-е сут СК нет.

Таким образом, трансплантация в ишемизированную рану дермального эквивалента с ксенофибробластами на $11.52 \pm 0.01\%$ ускоряет заживление модельной ишемизированной раны, вероятно, за счет привлечения основных клеток регенерации фибробластов, обеспечивающих дополнительный хемотаксис собственных стволовых клеток по хемокинному пути CXCL12–CXCR4.

ФОРМИРОВАНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА ПОКРОВОВ АСЦИДИЙ – ОПИСАНИЕ НОВОЙ ФЕНОЛОКСИДАЗЫ ОБОЛОЧНИКОВ

© 2022 г. Т. Г. Шапошникова¹, *, М. А. Даугавет², М. И. Добрынина², А. И. Соловьева^{2, 3}, А. Миттенберг², С. В. Шабельников², И. Бабкина¹, А. Гринченко⁴, Д. Ильяскина^{4, 5}, О. И. Подгорная^{1, 2}

¹Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

³Зоологический институт РАН, Санкт-Петербург, Россия

⁴Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток, Россия

*E-mail: t.shaposhnikova@spbu.ru

На сегодняшний день оболочники (Tunicata) считаются ближайшими из ныне живущих родственников позвоночных животных в пределах типа хордовых. В данном контексте асцидии (кл. Ascidiacea, п/т Tunicata) представляют интерес для изучения ряда процессов как простая модельная система, имеющая общего предка с позвоночными. В частности, изучение развития структур внеклеточного матрикса – универсального компонента тканей всех многоклеточных животных, взаимодействия матрикса и клеток, закономерностей его эволюции легче проводить именно на простых системах. Асцидии обладают развитым внеклеточным матриксом, образующим покровы (тунику) этих животных.

Туника асцидий подвергается фенольному задубливанию – склеротизации белков хинонами, которые образуются из фенолов благодаря ферменту фенолоксидазе. Фенолоксидазная система возникла давно и широко распространена у живых организмов. В разных группах она используется для биосинтеза пигментов, нейротрансмиттеров, участвует в защитных реакциях и задубливании тканей. В образовании туники у взрослых асцидий участвуют клетки покровного эпителия и один из типов клеток крови – морулярные. У асцидии *Styela rustica* данный тип клеток содержит белок с молекулярной массой 48 кДа, р48. Взаимодействие антител к белку р48 с компонентами туники асцидий *S. rustica* и *Halocynthia aurantium* позволил предположить, что данный белок является компонентом фенолоксидазной системы. Две фенолоксидазы, ранее описан-

ные для асцидий, имеют сходство с ферментами позвоночных и артропод.

В настоящем исследовании мы описали ген, названный *Tuphoxin* (Tunicate PhenolOxidase), кодирующий р48 и несколько подобных белков у асцидий *S. rustica* и *H. aurantium*. Это новая фенолоксидаза асцидий, последовательность которой не имеет сходства с двумя описанными ранее ферментами. Ближайшими родственниками туфоксина являются гемоцианины моллюсков. Туфоксин синтезируется в клетках крови асцидий и может секретироваться во внеклеточный матрикс туники асцидий. Один зрелый транскрипт, кодирующий эту фенолоксидазу, может давать несколько белковых продуктов разного размера. Таким образом, предположительно происходит ограниченный протеолиз исходного белка. Уникальной особенностью туфоксинов и их гомологов среди Tunicata является наличие в их последовательности домена тромбоспондина первого типа (TSP1), который, как предполагается, обеспечивает взаимодействие с внеклеточным матриксом. Обнаружение TSP1 в структуре фенолоксидазы позволяет считать это нововведением эволюционной линии Tunicata.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-74-20102), Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-34-90077), стипендии Президента Российской Федерации для молодых ученых и аспирантов. Экспериментальная часть работы проводилась на станции ББС ЗИН РАН Картеш, использовалось оборудование Центра молекулярных и клеточных

технологий, Центра микроскопии и микроанализа и
Обсерватории экологической безопасности Научного

парка Санкт-Петербургского государственного уни-
верситета.

ИЗМЕНЕНИЯ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ ЯДРЫШЕК НЕЙРОНОВ НЕОКОРТЕКСА КРЫС ПОСЛЕ ПЕРИНАТАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ И ВОЗМОЖНОСТЬ ИХ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ

© 2022 г. Т. Т. Шишко*

Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

**E-mail: tamarashishko46@gmail.com*

Вопросы становления головного мозга во время раннего постнатального периода и воздействия в это время перинатальной гипоксии, приводящей, как известно, к развитию нейропсихической патологии, относятся к числу актуальных медицинских и социальных проблем. Известно, что ядрышки нейронов неокортекса осуществляют биосинтез субъединиц рибосом и участвуют в различных морфогенетических процессах. Целью настоящей работы явилось изучение ультраструктурных характеристик ядрышек нейронов неокортекса в неонатальный период после воздействия перинатальной гипоксии и последующего применения фенибута. Работа проведена на лабораторных крысах линии Wistar, была использована модель энцефалопатии новорожденных. Воздействие гипоксии на мозг осуществляли на 2-е постнатальные сутки в течение 1 ч в специальной камере с проточной газовой смесью, содержащей 7.8% кислорода. Было использовано 3 группы животных ($n = 8$ для каждой группы): 1 – крысы, подвергавшиеся воздействию гипоксии; 2 – крысы, получавшие после воздействия гипоксии фенибут; 3 – интактные животные того же возраста (контрольная группа). В качестве средства фармакологической коррекции применяли фенибут (ноотропный препарат, синтезированный на основе ГАМК, зарегистрированный в Государственном реестре лекарственных средств РФ), который вводили подкожно в терапевтической дозе 15 мг/кг в течение 10 сут после воздействия гипоксии. Ультраструктурное исследование сенсомоторной области неокортекса крыс проводили на 5 и 10 постнатальные сутки (П5 и П10) с использованием электронного микроскопа Tescan G2 Spirit (FEI, Германия).

Показано, что у контрольных крыс в ядрах пирамидных нейронов присутствуют ядрышки разных

типов, при этом преобладают ядрышки гранулярного и ретикулярного типа, различающиеся по соотношению гранулярного и фибриллярного компонента. После воздействия перинатальной гипоксии на развивающийся головной мозг выявлены изменения в ультраструктурной организации ядрышек нейронов неокортекса и численного соотношения ядрышек разных типов. У контрольных животных по мере увеличения неонатального возраста увеличивалось число ядрышек как гранулярного, так и ретикулярного типов, что может свидетельствовать об усилении процессинга рРНК. К концу неонатального периода были отмечены скопления гранул (субъединиц рибосом) возле ядерной мембраны, что может быть связано с продолжающейся дифференцировкой нервных клеток и формированием шероховатого эндоплазматического ретикулула. После воздействия перинатальной гипоксии в нейронах было выявлено значительное изменение численного соотношения ядрышек гранулярного и ретикулярного типов. Полученные результаты дают основание полагать, что ядрышки нейронов неокортекса могут быть мишенью воздействия перинатальной гипоксии, т.е. звеном в патогенезе развития энцефалопатии новорожденных. Применение фенибута после воздействия гипоксии приводило к нормализации численного соотношения ядрышек разных типов, которое соответствовало контрольным значениям. Влияние фенибута на сохранность ультраструктурной организации ядрышек нейронов, вероятно, еще раз подтвердило его нейропротекторные свойства.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-015-00052).

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ГИСТОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЖАБР И ПЕЧЕНИ САЗАНА И СУДАКА, ОБИТАЮЩИХ В ОЗЕРЕ БАЛХАШ

© 2022 г. Ж. Б. Олжабаева*, Б. А. Абдуллаева

Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Алматы, Казахстан

**E-mail: zhanna.olzhabayeva1@gmail.com*

Проблема реактивности организма и его адаптации к разнообразным факторам внешней среды является одной из центральных в теоретической и

практической биологии. В настоящее время внимание исследователей особенно привлекают вопросы экологической адаптации, в том числе у

рыб. Морфологические работы, освещающие соответствующие структурно-функциональные перестройки организма рыб в связи с их экологией остаются еще малоизученными. В частности, в недостаточной степени разработаны вопросы сравнительной морфологической оценки адаптивных реакций органов газообмена, пищеварительной и защитных систем.

Было проведено гистологическое исследование жабр и печени сазана и судака, обитающих в озере Балхаш. Морфологические изменения деструктивного характера отмечались в жабрах практически у всех исследованных особей. Они выражались в обширном отеке в эпителии жаберных лепестков и, в большей степени, в эпителии ламелл; в изменении формы ламелл; в некрозе респираторных клеток вторичного жаберного эпителия и их слущивании с поверхности ламелл, что приводило к оголению внутреннего сосудистого слоя; в деструкции столбчатых клеток сосудистого слоя, приводящей к объединению мелких капиллярных полостей в обширные кровеносные русла внутри сосудистого слоя, а при наличии некроза во вторичном эпителии — к кровоизлияниям. Наблюдаемые нами участки некроза респираторных клеток эпителия ламелл, а также отдельных столбчатых клеток сосудистого слоя ламелл свидетельствуют о наличии сильного токсического воздействия со стороны внешней среды, вызывающего гибель клеток. Наблюдаемое нами изменение формы ламелл также свидетельствует о воздействии токсикантов. Сгибание концов ламелл в виде крючков может быть вызвано некротическими изменениями во вторичном жаберном эпителии. Булавовидные расширения концов ламелл могут быть свидетельством нарушения целостности сосудистого слоя. Наблюдаемые нами деструктивные изменения морфологии жабр носили обширный характер, что свидетельствует о сильном токсичном воздействии на особей рыб.

Отметим, что изменения деструктивного характера наблюдались в составе ламелл, тогда как жаберные лепестки имели преимущественно сохранную

структуру. Известно, что ламеллы жабр в большей степени подвержены негативному воздействию, так как их структура предполагает их наибольшую уязвимость. Покрывающий их вторичный жаберный эпителий сформирован двумя слоями уплощенных респираторных клеток, под ним расположен сосудистый слой ламелл, сформированный расположенными в один ряд столбчатыми клетками, разделяющими капиллярные пространства. Данная структура ламелл приспособлена к активному транспорту растворенных в воде газов в кровь рыбы. Являясь наиболее проницаемой, она, в то же время, менее защищена от негативного воздействия и, соответственно, в большей степени повреждается.

У изученных особей сазана и судака гистоархитектоника печени была сохранена, однако синусоиды печени были несколько расширены, а перисинусоидальное пространство было заполнено мононуклеарными лейкоцитами. В печени у изученных особей наблюдалось нарушение микроциркуляторного русла в виде разрыва стенок сосудов, стаза крови в крупных сосудах перипортального русла, расслоение крови на форменные элементы и плазму, периваскулярный отек. На гистологических препаратах в гепатоцитах отмечалось неравномерное накопление липидов в цитоплазме клеток, пролиферация клеток Купфера. Жировая дистрофия гепатоцитов, регистрируемая у рыб, относится к дегенеративным (с разрушением клеток) типам изменений. Причинами дегенеративного ожирения органа могут выступать как нарушения обменных процессов, развивающиеся вследствие ограничения кровотока, так и действие токсичных веществ.

Таким образом, на основании выявленных выраженных морфологических изменений деструктивного характера в жабрах и печени сазана и судака можно сделать вывод о загрязнении данного водоема токсикантами. Сильное токсическое воздействие со стороны внешней среды приводит к тяжелым патоморфологическим изменениям и, как следствие, к нарушению функции изученных органов рыб.