

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

ISSN 0041-3771

ЦИТОЛОГИЯ

TSITOLOGIYA

2023. Том 65

2023. Vol. 65

6



САНКТ-ПЕТЕРБУРГ

СОДЕРЖАНИЕ

Том 65, номер 6, 2023

Частичное репрограммирование клеток как способ ревитализации живых систем <i>М. А. Шорохова</i>	509
Особенности структуры и функций бактериальных комплексов SMC <i>Н. Е. Морозова, А. С. Потысьева, А. Д. Ведяйкин</i>	522
Метаболизм и рецепторные механизмы действия ниацина <i>С. Е. Бороновский, В. С. Копылова, Я. Р. Нарциссов</i>	535
Обзор локальных клеточно-молекулярных процессов регенерации костной ткани, индуцированных кальцийфосфатными материалами <i>Л. А. Мирошниченко, Т. Ю. Полякова, Л. С. Литвинова, И. А. Хлусов</i>	557
Децеллюляризованный внеклеточный матрикс замедляет преждевременное старение эндометриальных мезенхимных стромальных клеток человека <i>Е. Б. Бурова, И. Е. Перевозников, Р. Е. Ушаков</i>	573
Белок щелевых контактов коннексин-43 в глиальных клетках чувствительного ганглия крысы <i>Е. А. Колос, Д. Э. Коржевский</i>	583
Особенности строения стенки восходящей части аорты преждевременно рожденных крыс <i>О. Н. Серебрякова, В. В. Иванова, И. В. Мильто</i>	593

Contents

Vol. 65, No. 6, 2023

Partial cell reprogramming as a method of revitalizing living systems <i>M. A. Shorokhova</i>	509
Structural and functional features of bacterial SMC complexes <i>N. E. Morozova, A. S. Potysyeva, A. D. Vedyaykin</i>	522
Metabolism and receptor mechanisms of niacin action <i>S. E. Boronovskiy, V. S. Kopylova, Y. R. Nartsissov</i>	535
Review of local cellular and molecular processes of bone tissue regeneration induced by calcium phosphate materials <i>L. A. Miroshnichenko, T. Yu. Polyakova, L. S. Litvinova, I. A. Khlusov</i>	557
Decellularized extracellular matrix retards premature senescence of human endometrial mesenchymal stromal cells <i>E. B. Burova, I. E. Perevoznikov, R. E. Ushakov</i>	573
Gap junction protein connexin-43 in glial cells of rat dorsal root ganglion <i>E. A. Kolos, D. E. Korzhevskii</i>	583
Structural features of ascending aorta wall in premature born rats <i>O. N. Serebryakova, V. V. Ivanova, I. V. Milto</i>	593

ЧАСТИЧНОЕ РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ КЛЕТОК КАК СПОСОБ РЕВИТАЛИЗАЦИИ ЖИВЫХ СИСТЕМ

© 2023 г. М. А. Шорохова*

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

*E-mail: shili-mariya@yandex.ru

Поступила в редакцию 01.07.2023 г.

После доработки 06.08.2023 г.

Принята к публикации 01.09.2023 г.

Старение и ассоциированные с ними заболевания — острая проблема современной биологии и медицины. Хотя старение в настоящее время невозможно предотвратить, его влияние на продолжительность жизни и здоровье пожилых людей потенциально может быть сведено к минимуму с помощью вмешательств, направленных на возвращение клеток к нормальному функционированию. Постоянный поиск путей омоложения и улучшения регенеративной способности клеток привел к открытию в 2016 г. метода частичного репрограммирования, основанного на краткосрочной экспрессии факторов репрограммирования (Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc). В результате происходит восстановление молодой эпигенетической сигнатуры стареющих клеток. Эффективность метода показана как в системе *in vitro*, так и в системе *in vivo*. В представленном обзоре обсуждаются основные успехи частичного репрограммирования, а также проблемы и нерешенные вопросы, с которыми столкнулись исследователи. Отдельно обсуждаются данные о молекулярных изменениях в процессе частичного репрограммирования. Метод частичного репрограммирования дает широкий спектр возможностей для фундаментальных исследований старения и омоложения. А дальнейшие работы в этом направлении могут привести к разработке терапевтических стратегий с целью облегчения возрастных заболеваний и, таким образом, к улучшению здоровья и долголетию.

Ключевые слова: частичное репрограммирование, клеточная идентичность, плюрипотентность, омоложение, соматические клетки

DOI: 10.31857/S0041377123060093, **EDN:** OTBHIL

Процесс старения представляет собой системное снижение функционирования от клеток до всего организма. Актуальным вопросом современной биологии и медицины является поиск эффективных стратегий омоложения, с целью придания состарившимся клеткам или органам более молодых характеристик. На данный момент разработано несколько стратегий направленных на омоложение клеток и всего организма.

Настоящий обзор посвящен одной из них — омоложению с помощью частичного репрограммирования. Метод был разработан в 2016 г. В обзоре предпринята попытка максимально полно охватить результаты исследований частичного репрограммирования старых клеток с момента первой публикации по этой тематике до настоящего времени. Отдельно в обзоре

рассматриваются выявленные молекулярные пути, участвующие в процессе омоложения. Глубокое понимание движущих сил процесса репрограммирования обеспечит дальнейшее постижение клеточного омоложения и оценку возможностей применения метода в лечении заболеваний человека, связанных со старением. Более того, в настоящем обзоре приводится обсуждение проблем, с которыми столкнулись исследователи и поставлены вопросы, на которые еще предстоит ответить.

СТАРЕНИЕ НА КЛЕТОЧНОМ И ОРГАНИЗМЕННОМ УРОВНЕ

Население Земли неуклонно растет. Благодаря развитию медицины и технологий удалось значительно увеличить длительность жизни людей, что значительно увеличило популяцию пожилых людей. По оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), к 2030 г. ожидается, что 1 из 6 человек, или 2.1 млрд, будет старше 60 лет. Старение — это процесс изменения живых систем во времени, вызывающий нарушения в их структуре и функциях. Большая часть возрастных изменений приводит к

Принятые сокращения: ЭСК — эмбриональные стволовые клетки; eAge — эпигенетический возраст; iPSCs — индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; OS — совокупность факторов Oct4 и Sox2; OSK — совокупность факторов Oct4, Sox2 и Klf4; OSKM — совокупность факторов Oct4, Sox2, Klf4 и cMyc; SASP — секреторный фенотип, связанный со старением.

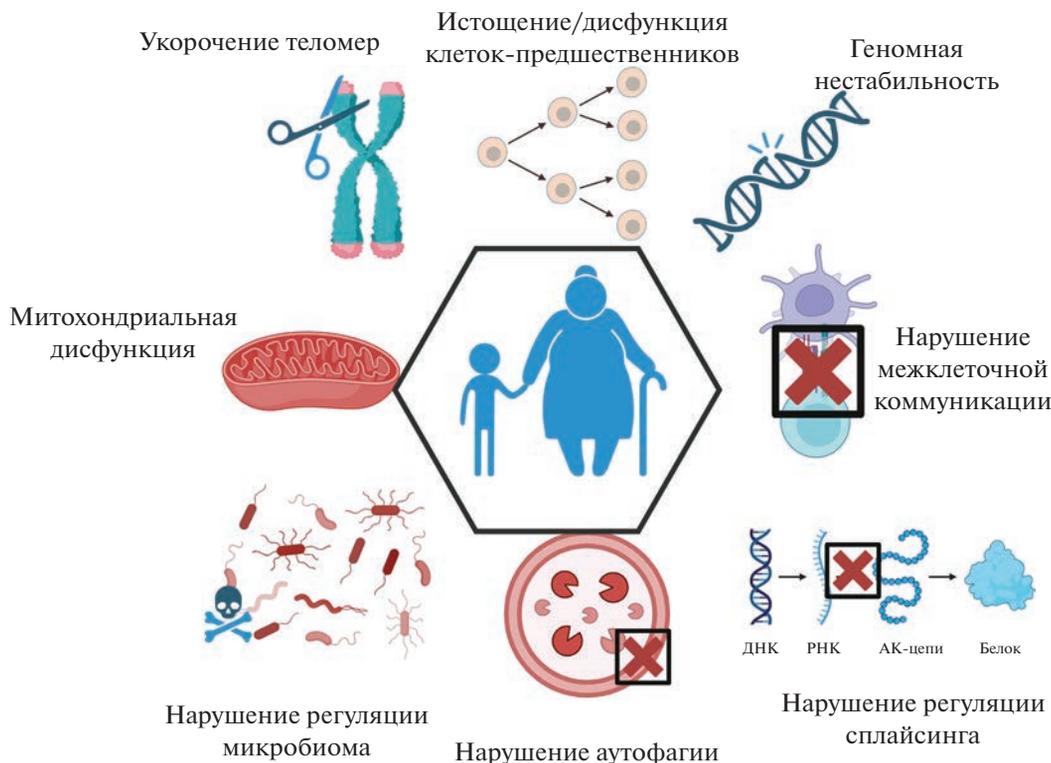


Рис. 1. Схема ключевых признаков старения. Показаны: нестабильность генома, нарушение межклеточной коммуникации, нарушение регуляции сплайсинга, нарушение аутофагии, нарушение регуляции микробиома, митохондриальная дисфункция, укорочение теломер. АК – аминокислота.

ухудшению функций органов чувств, снижению активности в повседневной жизни, к повышенной восприимчивости к инфекциям и увеличению частоты заболеваний и, как следствие, к слабости или инвалидности (López-Otín et al., 2013; Brett, Rando, 2014). Хотя исследования в этой области активно развиваются, и с каждым годом увеличивается количество новой информации, в области биологии старения остается очень много нерешенных вопросов.

В ходе изучения процесса старения на клеточных моделях были определены его признаки, универсальные для любого клеточного типа (рис. 1). К ним относятся геномная нестабильность, истощение/дисфункция клеток-предшественников, теломерные и эпигенетические изменения, нарушение регуляции белкового гомеостаза, нарушение восприятия питательных веществ, митохондриальная дисфункция, нарушение межклеточной коммуникации, хроническое воспаление низкой степени выраженности (вызванное секреторным фенотипом, связанным со старением – SASP), фиброз, нарушение регуляции микробиома, нарушение аутофагии, изменение механических свойств клеток, нарушение регуляции сплайсинга и другие (Schmauck-Medina et al., 2022).

До недавнего времени одной из важнейших проблем в изучении биологии старения и при разработке методов борьбы со старением было отсутствие

универсального маркера старения, позволяющего уловить изменение биологического возраста во времени. Одно из важных требований заключалось в том, чтобы этот биомаркер был неинвазивным или, по крайней мере, нелетальным. Многие исследования на тканевом уровне ограничены этим критерием (органы могут быть извлечены только из умерщвленных мышей в определенный момент времени).

Более десяти лет назад был разработан метод определения биологического возраста на основе метилирования ДНК, названный эпигенетическими часами (Bocklandt et al., 2011; Koch, Wagner, 2011). Эпигенетические часы – это совокупность эпигенетических меток ДНК, позволяющая определить биологический возраст ткани, клетки или органа. Наиболее широко применимым и используемым является первый мультитканевый предиктор возраста – “часы Хорвата”. Они демонстрируют самую высокую корреляцию с хронологическим возрастом, предсказывая возраст (или эпигенетический возраст eAge) множества тканей со средней ошибкой 3.6 года (Horvath, 2013). Примечательно, что имеются доказательства того, что отклонение прогнозируемого и хронологического возраста связано со смертностью и распространенностью возрастных особенностей, что указывает на то, что eAge обеспечивают измере-



Рис. 2. Схема основных стратегий омоложения организма с кратким описанием сути метода: метаболические манипуляции, гетерохронная трансплантация, использование сенолитиков, частичное репрограммирование.

ние биологического возраста, а не хронологического (Lin et al., 2016; Bell et al., 2019).

РАЗЛИЧНЫЕ СТРАТЕГИИ ОМОЛОЖЕНИЯ

Старение многих видов млекопитающих, в том числе людей, ранее рассматривали как необратимый процесс (Galkin et al., 2020). Однако изучение механизмов старения и более глубокое понимание этого процесса позволили разработать несколько стратегий замедления старения и обращения его вспять (рис. 2).

Согласно геронтологии, любые вмешательства, нацеленные на один из признаков старения, перечисленных в предыдущем разделе, могут опосредованно воздействовать и на другие признаки (Chini et al., 2019; Lewis-McDougall et al., 2019; Vizioli et al., 2020; Dungan et al., 2022; Zhu et al., 2022) Существует ряд стратегий омоложения организма.

Омоложение с помощью диеты. Это одна из самых изученных и самых старых манипуляций, направленных на борьбу с признаками старения организма (Brandhorst et al., 2015). Состав рациона питания и уровень калорийности являются ключевыми факторами, влияющими на старение и возрастные заболевания (Blagosklonny, 2013; Gems, Partridge, 2013; López-Otín et al., 2013). Во многих исследованиях было выявлено, что снижение калорийности употребляемой пищи, а так же периодическое голодание оказывает значительное влияние на репарацию окислительного повреждения тканей, оптимизируя энергетический обмен и усиливая клеточную защиту, улучшая общее состояние как на клеточном уровне, так и на уровне организма в целом (Haigis, Yankner, 2010; Lee et al., 2012; Brandhorst et al., 2015).

Циклы полного голодания, длящиеся 2 или более дней, но разделенные, по крайней мере, неделей обычного питания, становятся высокоэффективной стратегией защиты нормальных клеток и органов от различных токсинов и токсических состояний (Raffaghello et al., 2008; Verweij et al., 2011). Получены замечательные результаты при изучении влияния полного голодания. Было обнаружено, что периодическое полное голодание вызывает снижение уровня глюкозы в крови, инсулина и инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1) (Lee et al., 2010) и сопровождается аутофагией (Madeo et al., 2010).

Таким образом, во многих исследованиях показано, что изменения рациона питания и периодическое голодание способно очень благоприятно влиять как клеточном уровне, так на организменном, нивелируя или уменьшая признаки старения органов и тканей. В некоторых исследованиях удалось увеличить срок жизни экспериментальных животных с помощью различных диет.

Омоложение с помощью гетерохронной трансплантации. Другим методом омоложения, результаты которого заставляют исследователей оптимистично смотреть в будущее, является гетерохронный парабриоз. Это хирургическая процедура, при которой соединяют кровеносную систему старой мыши с системой молодой мыши. В результате таких хирургических манипуляций продолжительность жизни старой мыши увеличивается (Ludwig, Elashoff, 1972; Conboy et al., 2005). Было обнаружено, что при кратковременном соединении системы кровообращения молодых и пожилых мышей у старых мышей проявлялись признаки молодых мозга, мышц и печени, улучшались когнитивные функции, пополнялся пул стволовых клеток и повышались регенеративные

способности (Conboy et al., 2005). В последствии исследователи сосредоточились на переливании крови, форменных элементов крови и трансплантации костного мозга экспериментальным животным для изменения биологического возраста подопытных.

Удивительные данные были получены при трансплантации костного мозга: эпигенетический возраст реципиентов крови начинал соответствовать возрасту доноров (Stölzel et al., 2017). А в другом исследовании было показано, что трансплантация костного мозга увеличивала продолжительности жизни мышей на 12% (Guderyon et al., 2020). При исследовании трансплантации форменных элементов крови достигнуты обнадеживающие результаты (Yousefzadeh et al., 2021).

Многочисленные исследования показали, что кровь от молодого организма может обратить вспять процессы старения в старом организме. Хотя переливание молодой крови эффективно для омоложения у пожилых мышей, остается неясным, имеет ли клинические преимущества переливание молодой крови пожилым людям.

Сенолитики. Другой подход к омоложению связан с клеточным фенотипом SASP и с избирательным удалением накапливающихся старых клеток из клеточной популяции. Была выдвинута гипотеза, что удаление стареющих клеток из тканей и органов может приводить к омоложению в целом (Childs et al., 2015).

Для этого используют так называемые сенолитики, которые избирательно убивают стареющие клетки, или сеноморфные средства, подавляющие фенотип SASP. К настоящему времени идентифицировано несколько классов сенолитических и сеноморфных средств, включая природные соединения (например, кверцетин и куркумин). И хотя убедительных доказательств их терапевтического потенциала пока нет, можно полагать, что на их основе смогут появиться терапевтические препараты для лечения возрастных заболеваний.

Частичное репрограммирование старых клеток. Это стратегия омоложения совсем новая. Исследования индуцированных плюрипотентных клеток дают основания полагать, что возрастные клеточные фенотипы, включающие морфологические параметры, количество митохондрий и целостность ядерной мембраны, могут быть обратимы (Miller et al., 2013; Mahmoudi et al., 2019). Однако в процессе репрограммирования клетки переходят в плюрипотентное состояние и теряют свою клеточную идентичность (Evans, Kaufman, 1981; Takahashi, Yamanaka, 2016). Следовательно, индукция плюрипотентности или прямой перенос плюрипотентных клеток в систему *in vivo* неизменно приводит к канцерогенезу (Abad et al., 2013; Ohnishi et al., 2014; Moradi et al., 2019). Чтобы использовать эффект омоложения в процессе репро-

граммирования, необходимо отделить этот процесс от дедифференцировки и потери клеточной идентичности, что, несомненно, крайне сложная задача. В 2016 г. было предложено элегантное решение этой дилеммы (Osampo et al., 2016). Авторы предложили метод циклического частичного репрограммирования, что позволило добиться эффекта омоложения на прогерийных мышах без образования тератом (Osampo et al., 2016). Эта работа стала прорывной в биологии старения и открыла новое направление в области омоложении соматических клеток.

ИДЕЯ И ПРИНЦИПЫ МЕТОДА ЧАСТИЧНОГО РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ СТАРЫХ КЛЕТОК

В 2006 г. были выявлены четыре транскрипционных фактора (Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc), названные факторами Яманаки, которые, будучи экспрессированными в соматических клетках, могут эффективно возвращать их к состоянию ранних эмбриональных клеток (Takahashi, Yamanaka, 2006). Такие клетки назвали индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками (iPSCs). Интересно, что при репрограммировании в iPSCs практически все возрастные изменения ДНК обращаются вспять (Koch et al., 2013; Weidner et al., 2014). Таким образом, прогнозируемый eAge клеток близок к нулю, даже если репрограммирование проводилось на клетках от пожилых доноров. Однако в процессе полного репрограммирования клетки теряют свою клеточную идентичность. При применении метода клеточного репрограммирования в системе *in vivo* на экспериментальных животных (мышях) неизбежно возникали опухоли (Abad et al., 2013; Ohnishi et al., 2014). Таким образом, репрограммирование с целью омоложения оказалось неприменимо к системе *in vivo*.

Первая идея использования цикла репрограммирования не до конца, а только частично, появилась в 2014 г. при изучении ранних этапов репрограммирования старых фибробластов. Было обнаружено (Manukyan, Singh, 2014), что подвижность эссенциального эпигенетического модификатора HP1β одинакова в эмбриональных стволовых клетках человека и в клетках iPSC. HP1β менее подвижен в стареющих фибробластах, чем в молодых делящихся фибробластах (Manukyan, Singh, 2014); после введения факторов Яманаки в стареющие фибробласты подвижность HP1β в стареющих клетках увеличивается и через 9 сут становится такой же, как и в молодых фибробластах.

Эта работа подготовила почву для работы других авторов (Osampo et al., 2016), которая заслуженно считается прорывной и основополагающей в области омоложения с помощью частичного репрограммирования (рис. 3). Эти авторы сообщили, что частичное репрограммирование, достигаемое путем периодической индукции OSKM (несколько повто-

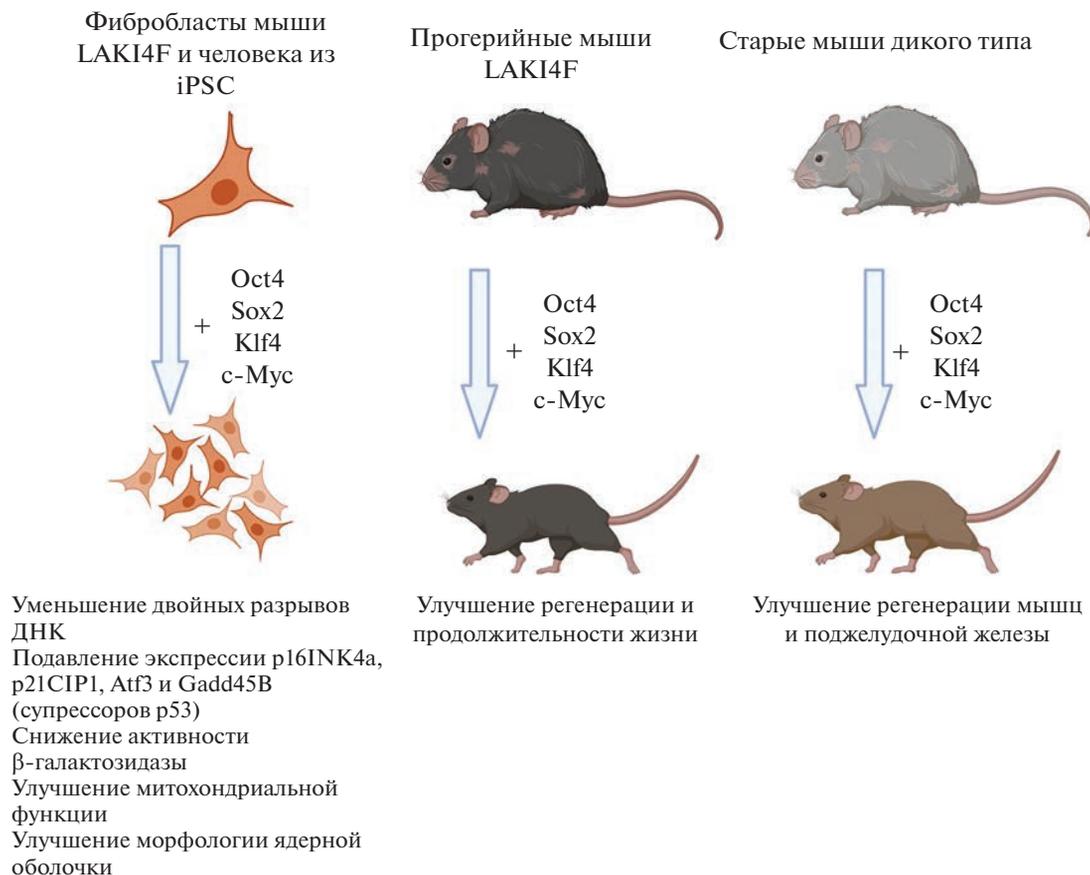


Рис. 3. Схема частичного репрограммирования путем кратковременной циклической экспрессии OSKM: улучшение характеристик старых клеток в культуре, уменьшение физиологических признаков старения и, как следствие, удлинение продолжительности жизни в мышечной модели преждевременного старения (LAK14F) и улучшение регенеративных способностей у старых мышей дикого типа (по: Osampo et al., 2016).

ров, по схеме: 2 сут включено, 5 сут выключено), уменьшает признаки старения без потери клеточной идентичности (Osampo et al., 2016). Было проведено частичное репрограммирование сначала на фибробластах прогерийных мышей, в результате чего снизились возрастные признаки, такие как повреждение ДНК, изменения ядерной оболочки, дисрегуляция модификаций гистонов, синтез активных форм кислорода в митохондриях. После этого метод частичного репрограммирования применили *in vivo* к прогерийным мышам, в результате чего продолжительность их жизни увеличилась, а образования тератом не наблюдали. Метод частичного репрограммирования испытали также на естественно состарившихся мышцах и показали улучшенную регенеративную способность мышц и поджелудочной железы после травм и возросшую толерантность к глюкозе (рис. 3).

За этой работой (Osampo et al., 2016) последовал шквал работ по омоложению с помощью частичного репрограммирования клеток. К сожалению, анализ с помощью метода эпигенетических часов для мышей был недоступен авторам (Osampo et al., 2016),

поэтому точную степень омоложения путем частичного репрограммирования *in vivo* нельзя было определить количественно.

Однако метод стал доступен для последующих исследований. В исследовании Olova с соавторами (Olova et al., 2019) было обнаружено, что снижение eAge началось между 3- и 7-ми сут после трансдукции OSKM в частично репрограммированных клетках TRA-1-60 (+). Начиная с 20-ых сут, eAge в репрограммируемых клетках стабильно обнулялся. Популяции клеток TRA-1-60 (+) на 7- и 11-е сут ранее характеризовались как “частично репрограммированные” из-за их высокой экспрессии маркеров плюрипотентности, а также высокой скорости реверсии к соматическому состоянию (Tanabe et al., 2013). Следовательно, наблюдаемое снижение eAge на 7- и 11-е сут предполагает, что частичное репрограммирование действительно можно рассматривать как механизм омоложения в клетках человека.

Применение неинтегрирующего протокола частичного репрограммирования с коктейлем мРНК, несущих OSKM и LIN28, продемонстрировало мно-

гогранное уменьшение клеточного старения фибробластов человека и эндотелиальных клеток от пожилых доноров: сброс eAge, снижение воспалительных реакций в хондроцитах и восстановление юношеских регенеративных реакций с возрастом, в каждом случае без изменения клеточной идентичности (Sarkar et al., 2020). Таким образом, было показано, что использование метода частичного репрограммирования (в различных его модификациях) приводит к снижению eAge.

БЕЗОПАСНОСТЬ И НАДЕЖНОСТЬ ЧАСТИЧНОГО РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ

Полный цикл репрограммирования до уровня iPSCs сопровождается рядом опасностей, ограничивающих широкое использование цикла дедифференцировки в целях регенеративной медицины (Maniyan, Singh, 2014). Более того, было показано, что индукция iPSCs *in vivo* посредством непрерывной экспрессии OSKM увеличивает частоту тератом (Abad et al., 2013). В связи с этим особенно остро встает вопрос, насколько безопасно частичное репрограммирование старых клеток?

Метод омоложения с помощью техники частичного репрограммирования показал себя очень многообещающе для обращения вспять старения без потери клетками их идентичности как *in vivo* (Osampo et al., 2016; Y. Lu et al., 2020; Alle et al., 2021), так и *in vitro* (Olova et al., 2019; Sarkar et al., 2020; Gill et al., 2022). Однако точные механизмы этого метода омоложения еще предстоит выявить и изучить. В связи с этим отслеживание любых следов плюрипотентности в частично репрограммированных клетках (особенно *in vivo*) является необходимой мерой предосторожности, чтобы свести к минимуму долгосрочный риск канцерогенеза.

В плане безопасности использования метода частичного репрограммирования идет большая работа по подбору оптимального коктейля для репрограммирования. В наборе OSKM большие опасения вызывает фактор с-Мус из-за того, что он является онкогеном. Поэтому в ряде работ исследовали эффект комбинации без фактора с-Мус (коктейль OSK: Oct4, Sox2, Klf4). Показано, что использование только Oct4 и Sox2 (OS) восстанавливало молодой профиль транскрипции в мезенхимных клетках без потери клеточной идентичности (Roux et al., 2022). Таким образом, риск потери клеточной идентичности и образования неопластической трансформации получается свести к минимуму (Roux et al., 2022). Экспрессия набора OSK (без с-Мус) восстанавливала остроту зрения у 11-месячных мышей и без канцерогенеза (Y. Lu et al., 2020); канцерогенеза не наблюдали даже через 10–18 мес непрерывной экспрессии OSK. Также было показано, что временная экспрес-

сия неканонического фактора репрограммирования Nanog омолаживает стареющие миообласты без возникновения тератом (Shahini et al., 2021). Несмотря на достигнутые успехи, поисковые работы по выявлению оптимального по эффективности и безопасности коктейля репрограммирования продолжаются.

Другой важный момент, который необходимо учитывать в вопросе безопасности омоложения, это способ введения факторов репрограммирования. Наиболее изученным и распространенным методом является доставка факторов с помощью ретровирусов (Takahashi, Yamanaka, 2006; Ohnuki et al., 2014). Однако этот метод несет риски, такие как инсерционный мутагенез, остаточная экспрессия, повторная активация факторов репрограммирования (Hu, 2014; Klawitter et al., 2016). Сейчас появились альтернативные методы доставки – трансфекция РНК, транзиентная трансфекция, неинтегрирующиеся вирусные векторы, которые считаются более безопасными (Sarkar et al., 2020). Отдельное направление – это репрограммирование на основе химических веществ. Такой тип репрограммирования основан на прямом преобразовании соматической клетки в плюрипотентное состояние с помощью малых молекул и факторов роста (Hou et al., 2013; Ye et al., 2016; Kim et al., 2020). Такой способ также позволяет избежать использования с-Мус (Hofmann et al., 2015).

Перспективными выглядят методы доставки транскрипционных факторов с помощью электропорации (Sarkar et al., 2020), а также с помощью липофильных соединений. В той связи особенно актуальна недавняя работа, посвященная разработке липофильных соединений, способных проникать через клеточные мембраны и регулировать факторы репрограммирования (Guan et al., 2022). Местное применение таких соединений к состарившимся тканям (например, коже) может обеспечить омоложение путем частичного репрограммирования клеток *in vivo* у людей. Однако надо помнить о необходимости соблюдать осторожность, чтобы избежать необратимой дедифференцировки с сопутствующим риском неопластической трансформации.

В отношении частичного репрограммирования очень важны временные рамки этого процесса. В ряде исследований были определены общие закономерности для разных типов соматических клеток. Эффект омоложения в процессе репрограммирования наблюдается только в определенном временном окне. Далее клетки теряют свою клеточную идентичность и начинают дедифференцироваться.

Хорошо известно, что частичное репрограммирование происходит в рамках ранней, обратимой фазы во время репрограммирования iPSC во времени, которое включает стохастическую активацию генов плюрипотентности. За ней следует более детерми-

нированная фаза созревания с предсказуемым порядком изменений экспрессии генов, когда судьба клеток прочно связана с плюрипотентностью. Действительно, было показано, что фибробласты мыши не могут стать iPSC и вернуться к своему исходному соматическому состоянию, если экспрессия OSKM прекращается во время начальной стохастической фазы. Было показано, что клетки TRA-1-60 (+) при репрограммировании на 7- и 11-е сут еще не достигли созревания и частично репрограммированы (Tanabe et al., 2013). Однако в другом исследовании было продемонстрировано, что большая часть маркерных генов фибробластов поддерживает относительно высокий уровень экспрессии до 15-х сут (Olova et al., 2019). Интересно, что пошаговое снижение экспрессии генов фибробластов совпадает с пиком экспрессии генов, характерных для старых клеток, и таким образом задерживает потерю соматической идентичности, но не экспрессию генов плюрипотентности. Вместе эти факты (разная динамика ступенчатой экспрессии генов фибробластов и снижения (линейное) eAge дополнительно указывает на то, что дедифференцировка и эпигенетическое омоложение могут быть не связаны.

Итак, большинство клеток на 15-е сут репрограммирования проходят точку невозврата и окончательно теряют свою клеточную идентичность (Tanabe et al., 2013). Т.е. безопасное в плане дедифференцировки состояние заканчивается в период 11–15 сут от начала процесса репрограммирования. Таким образом, частичное репрограммирование может обеспечить во времени “безопасное окно”, в котором клетки способны достичь существенного эпигенетического омоложения при сохранении их изначальной клеточной идентичности.

Кроме того, стоит учитывать этиологию репрограммируемых клеток, т. к. различные ткани организма обладают различной пластичностью. Так, гепатоциты взрослого организма более пластичны по сравнению с кардиомиоцитами. Гепатоциты демонстрируют спонтанное клеточное репрограммирование во время регенерации печени, а специфичная для гепатоцитов экспрессия OSKM всего за 2 сут приводит к летальному исходу (Hishida et al., 2022). А кардиомиоциты требуют 6 сут экспрессии OSKM для проявления признаков дедифференцировки и 12 сут для проявления признаков болезни и гибели животных (Chen et al., 2021). В связи с этим, один из способов адаптировать метод репрограммирования — это использовать циклическую экспрессию OSKM локально, в так называемой “оптимальной зоне возрастного репрограммирования” (Singh et al., 2019); только в пределах этой зоны происходит репрограммирование с целью омоложения (Abad et al., 2013). Таким образом, можно варьировать по длительности циклы репрограммирования с учетом пластичности репрограммируемой ткани.

Еще один интересный вопрос заключается в том, будут ли омолаживаться с помощью репрограммирования постмитотические терминально дифференцированные клетки, такие как нейроны, кардиомиоциты или адипоциты. В ряде работ было показано, что сначала в репрограммируемых клетках восстанавливалась клеточная пролиферация, а уже позже наблюдали эффект омоложения (Manukyan, Singh, 2014; Sarkar et al., 2020). Эти результаты позволяют предположить, что клеточная пролиферация является необходимым условием омоложения.

Другой важный вопрос, касающийся временных параметров, относится к стабильности достигнутых эффектов омоложения в процессе частичного репрограммирования. Недавно была предпринята попытка ответить на этот вопрос: при исследовании репрограммирования фибробластов от донора среднего возраста *in vitro*, экспрессию OSKM прекращали через 10, 13, 15 и 17 сут (Gill et al., 2022). Наблюдаемый эффект омоложения клетки сохраняли в течение как минимум 4 нед. после прекращения экспрессии OSKM. Таким образом, клетки приобрели состояние, соответствующее более молодому возрасту согласно eAge. Профиль экспрессии изменился и приблизился к профилю более молодых клеток.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ПРОЦЕССЕ ЧАСТИЧНОГО РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ КЛЕТОК

Изменение идентичности соматических клеток взрослого человека в сторону эмбриональных клеток *in vitro* путем сверхэкспрессии четырех транскрипционных факторов Яманаки, связанных с плюрипотентностью, произвело революцию в биологии более 15 лет назад (Takahashi, Yamanaka, 2006). С тех пор многие работы были направлены на изучение молекулярных основ клеточной пластичности, лежащей в основе изменения клеточной судьбы. При этом раскрываются многие метаболические, эпигенетические, транскриптомные и протеомные аспекты этого процесса.

Большая часть экспериментов, основанных на анализе клеточных популяций, не давали четкого представления о клеточной судьбе во время репрограммирования. Только недавно с помощью мультиомных технологий в нескольких исследованиях начали изучать судьбы единичных клеток во время OSKM-индуцированного репрограммирования (Schiebinger et al., 2019; X. Liu et al., 2020). Открытием этих работ было то, что в одной популяции репрограммируемых клеток есть клетки с различными направлениями развития, включая клетки экстраэмбриональные (энтодермальные и трофэктодермальные), нейрональные и мезодермальные. До недавнего времени подобных исследований в системе *in vivo* не было.

В 2022 г. впервые клеточное репрограммирование с помощью OSKM *in vivo* проследили в динамике (Chondronasiou et al., 2022). Используя поджелудочную железу в качестве модели, авторы охарактеризовали клеточные состояния, возникающие на ранней стадии репрограммирования (через 7 сут после экспрессии OSKM), с помощью scRNA-seq (исследования транскриптома на единичных клетках) и выявили неоднородную реакцию на индукцию OSKM клеток одного и того же органа. Кроме того, авторы (Chondronasiou et al., 2022) определили сигнатуру генов, характерную для промежуточного репрограммирования в поджелудочной железе, которая также наблюдалась в других частично репрограммированных тканях (в желудке и толстой кишке). Подобные данные представляют особый интерес с точки зрения начальных этапов репрограммирования.

Данные о молекулярных изменениях в процессе частичного репрограммирования старых клеток стали появляться только в последние годы. В связи с этим хотелось бы остановиться подробнее на работах, посвященных этой тематике.

Изначально стирание признаков старения наблюдали в процессе полного репрограммирования. Так, несколькими исследовательскими группами было показано, что iPSC, полученные от молодых и старых доноров, в значительной степени неотличимы, и это сходство сохраняется после дифференцировки полученных iPSC в различных направлениях (Nishimura et al., 2013; Mertens et al., 2015). Впоследствии было обнаружено, что частичное репрограммирование уменьшает транскрипционные признаки старения во многих типах клеток человека и мыши (Gill et al., 2022; Lu et al., 2019; Sarkar et al., 2020; Shahini et al., 2021) и улучшает регенеративную способность клеток органов и тканей (Lu et al., 2019; Rodríguez-Matellán et al., 2020; Sarkar et al., 2020; Chen et al., 2021). Была сделана оценка влияния временной экспрессии факторов репрограммирования (OSKLMN) на транскриптом фибробластов и эндотелиальных клеток от пожилых людей и транскриптомом тех же типов клеток, выделенных от молодых доноров (Sarkar et al., 2020). При сравнении частично репрограммированных старых клеток и контрольных (старых) клеток обнаружили, что в фибробластах 1042 гена (734 активированных и 308 подавленных), а в эндотелиальных клетках 992 гена (461 активированных и 531 подавленных) экспрессировались дифференцированно. При анализе генных модулей дифференциально экспрессируемых генов было обнаружено, что экспрессия OSKLMN способствует очень быстрой активации профиля экспрессии генов молодых клеток, специфичного для клеточного типа, при этом экспрессия генов клеточной идентичности была неизменной.

В работе по изучению связи между изменением eAge и активности генов плюрипотентности в про-

цессе репрограммирования (Olova et al., 2019) было выделено 2 группы паттернов экспрессии генов – ранних (кластер 1) и поздних (кластер 2) активированных генов плюрипотентности соответственно. В кластере 1 гены плюрипотентности включали *NANOG*, *SALL4*, *ZFP42*, *TRA-1-60*, *UTF1*, *DPPA4* и *LEFTY2*, их экспрессия резко увеличивалась в течение первых 10 сут, а затем к 20 сут устанавливалась на стабильном уровне. В кластере 2 гены плюрипотентности (поздно экспрессирующиеся, такие как *LIN28*, *ZIC3* и *DNMT3B*) повышали экспрессию медленнее и достигали стабильного уровня плюрипотентности к 28 сут. Интересно, что eAge сбрасывался до нуля в то время, когда гены в кластере 1 достигали уровней своего плюрипотентного состояния, которое по времени предшествует полной плюрипотентности. Это также совпало с пиком экспрессии ряда генов эмбрионального развития между 15 и 20 сут и может свидетельствовать о том, что перезагрузка отмечает точку, в которой клетки достигают эмбрионоподобного состояния, но еще не являются полностью плюрипотентными. Таким образом, снижение eAge наблюдается хорошо в пределах первой волны экспрессии гена плюрипотентности. Кроме того, исследователи изучили динамику подавления генов, характерных для фибробластов в качестве показателя потери идентичности соматических клеток. 19 часто используемых маркерных генов фибробластов (кластер 1: *REX1* (*ZFP42*), *TRA-1-60/81* (*PODXL*, *UTF1*, *DPPA4*, *TGFB1* (*CRIP1*), *SALL4*, *LEFTY1*, *LEFTY2*, *DNMT3A*, *TFCP2L1*, *TERF1*; *DPPA5*, *TERT*, *ZIC3*, *LIN28A*, *LIN28B*, *LECT1*, *DNMT3B*, *COL3A1*, *FSP-1*, *TGFB3*, *TGFB2*; кластер 2: *COL1A2*, *ITGA1*, *DDR2*, *P4HA3*, *THY1*, *FAP*; *CD248*, *VIM*; кластер 3: *COL1A1*, *ITGA5*, *P4HA1*, *P4HA2*, *TGFB1*, *HSP47*, *CD34*) были сгруппированы в три составных паттерна экспрессии, два из которых (кластеры 2 и 3) показывали быстрое снижение экспрессии после индукции OSKM. Кластер 1 оставался со стабильной экспрессией в течение первых 15 сут. Через 15 сут экспрессия генов фибробластов быстро снижалась во всех трех кластерах и только к 35-м сут все они достигали уровня экспрессии эмбриональных стволовых клеток (ЭСК), а фибробласты полностью теряли соматическую идентичность. Кластер 1 (содержащий маркеры идентичности фибробластов *FSP1*, *COL3A1* и *TGFB2/3*) демонстрировал самое медленное снижение и был последним, достигшим уровней экспрессии ЭСК. Таким образом, было обнаружено, что ряд генов, специфичных для фибробластов, поддерживал высокие уровни экспрессии до 15-х сут, когда наблюдалось значительное снижение eAge.

Исследования изменения экспрессии генных модулей продолжились и далее с помощью технологии RNA-seq единичных клеток для определения изме-

нений экспрессии генов, вызванных частичным репрограммированием (Roux et al., 2022). К настоящему времени это первое и единственное исследование геномов частично репрограммированных клеток с помощью технологии RNA-seq единичных клеток, в связи с чем хотелось бы остановиться на результатах этой работы более подробно.

Авторы (Roux et al., 2022) выполнили частичное репрограммирование первичных адипогенных и мезенхимных стволовых клеток (МСК) молодого и пожилого возраста и профилировали экспрессию генов одиночных клеток в различные моменты времени после отмены фактора репрограммирования. Было обнаружено, что частичное репрограммирование адипоцитов индуцировало набор новых состояний экспрессии генов по сравнению с контрольными клетками. При дифференциальном анализе экспрессии генов эти авторы обнаружили, что репрограммирование значительно изменило уровень экспрессии в сторону молодости в 3485 генах из общего числа 5984 генов, измененных с возрастом, при этом репрограммирование противодействовало возрастным изменениям во многих наборах генов. Наиболее яркими были усиление адипогенного метаболизма жирных кислот, регуляция которого снижается с возрастом, и подавление генов воспалительной реакции, усиливающейся с возрастом. В МСК частичное репрограммирование индуцировало новый профиль экспрессии генов, а именно подавление регуляции программы эпителиально-мезенхимного перехода (EMT), восстановление экспрессии генов, характерных для молодых клеток (712 генов), а программа индуцированных старением фиброзных генов была подавлена. При этом исследование отдельных генов показало, что идентичность соматических клеток определяет эффекты частичного репрограммирования. Таким образом, авторы пришли к выводу, что в некоторых соматических клетках экспрессия генов, характерных для молодых клеток может быть восстановлена более эффективно, чем в других (Roux et al., 2022).

Эти же авторы исследовали влияние частичного репрограммирования на отдельные гены-маркеры идентичности соматических клеток. На адипогенных клетках они обнаружили, что гены *Lpl* и *Fabp4* (адипогенные) были значительно подавлены, а *Nanog*, *Snca* и *Fgf13* были активированы. В МСК аналогично: гены *Acta2*, *Thy1* и *Col1a1* (мезенхимные) были подавлены, в то время как *Nanog*, *Snca* и *Fgf13* были активированы. Авторы приходят к выводу, что клеточные идентичности после частичного репрограммирования значительно подавляются (Roux et al., 2022). Важно заметить, что эти результаты контрастируют с предыдущими сообщениями о том, что частичное репрограммирование не влияет на идентичность соматических клеток и не активирует гены

плюрипотентности. Требуется продолжение исследований, чтобы понять влияние частичного репрограммирования на экспрессию генов соматических клеток и механизмы ревитализации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Существует представление, что накопление молекулярных повреждений в клетках и тканях с течением времени играет центральную роль в процессе старения (Gladyshev et al., 2021). В разных тканях скорость накопления молекулярных повреждений разная, в связи с этим некоторые органы и ткани могут стареть быстрее, чем весь организм. С этим эффектом можно связать появление заболеваний различных органов, ассоциированных с возрастом, таких как сердечная недостаточность и ишемическая болезнь сердца, старческая астения, глаукома, диабетическая ангиоретинопатия, заболевания сетчатки и другие. Предложенный подход омоложения (Guan et al., 2022) дает возможность локально частично репрограммировать клетки, таким образом омолодить и регенерировать поврежденный орган. В связи с этим метод имеет перспективы для использования его в медицинской практике.

Метод частичного репрограммирования открывает широкий спектр возможностей для фундаментальных исследований. Изучение молекулярных особенностей процесса омоложения путем частичного репрограммирования позволит более глубоко понять не только сам процесс ревитализации, но и молекулярные и клеточные механизмы, лежащие в основе процесса старения. А возможность омолодить клетки и снова запустить процесс старения может стать очень удобной модельной системой для изучения старения.

Метод частичного репрограммирования появился сравнительно недавно и сейчас активно изучается и модернизируется. К настоящему времени доказана его эффективность как в системе *in vitro*, так и *in vivo*, разработаны несколько способов доставки факторов репрограммирования и регуляции их экспрессии; появились вариации состава коктейля факторов репрограммирования, обнаружены оптимальные зоны возрастного репрограммирования и оптимальное временное окно репрограммирования.

Мы еще далеки от широкого использования этого метода в медицинской практике. Но работа в этом направлении продолжается и в конечном итоге может привести к разработке терапевтических стратегий с целью уменьшения заболеваемости, связанной с возрастом и, таким образом, улучшения здоровья и долголетия.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда и Санкт-Петербургского научного фонда (проект № 22-24-20122).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментов с участием животных или людей авторы не проводили.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Abad M., Mosteiro L., Pantoja C., Cañamero M., Rayon T., Ors I., Graña O., Megías D., Domínguez O., Martínez D., Manzanares M., Ortega S., Serrano M.* 2013. Reprogramming *in vivo* produces teratomas and iPS cells with totipotency features. *Nature*. V. 502. P. 340. <https://doi.org/10.1038/nature12586>
- Alle Q., Le Borgne E., Bensadoun P., Lemey C., Béchir N., Gabanou M., Estermann F., Bertrand-Gaday C., Pessemesse L., Toupet K., Vialaret J., Hirtz C., Noël D., Jorgensen C., Casas F., Milhavet O., Lemaitre J.-M.* 2021. A single short reprogramming early in life improves fitness and increases lifespan in old age. *BioRxiv*. V. 21. P. e13714. <https://doi.org/10.1101/2021.03.13.43714>
- Bell C.G., Lowe R., Adams P.D., Baccarelli A.A., Beck S., Bell J.T., Christensen B.C., Gladyshev V.N., Heijmans B.T., Horvath S., Ideker T., Issa J.P.J., Kelsey K.T., Marioni R.E., Reik W. et al.* 2019. DNA methylation aging clocks: challenges and recommendations. *Genome Biol*. V. 20. P. 249. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1824-y>
- Blagosklonny M.V.* 2013. TOR-centric view on insulin resistance and diabetic complications: Perspective for endocrinologists and gerontologists. *Cell Death Disease*. V. 4: e964. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.506>
- Bocklandt S., Lin W., Sehl M.E., Sánchez F.J., Sinsheimer J.S., Horvath S., Vilain E.* 2011. Epigenetic predictor of age. *PLoS One*. V. 6: e14821. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014821>
- Brandhorst S., Choi I.Y., Wei M., Cheng C.W., Sedrakyan S., Navarrete G., Dubeau L., Yap L.P., Park R., Vinciguerra M., Di Biase S., Mirzaei H., Mirisola M.G., Childress P., Ji L., Groshen S. et al.* 2015. A Periodic diet that mimics fasting promotes multi-system regeneration, enhanced cognitive performance, and healthspan. *Cell Metab*. V. 22. P. 86.
- Brett J.O., Rando T.A.* 2014. Alive and well? Exploring disease by studying lifespan. *Curr. Opin. Genet. Dev*. V. 26. P. 33.
- Chen Y., Lüttmann F.F., Schoger E., Schöler H.R., Zelarayán L.C., Kim K.P., Haigh J.J., Kim J., Braun T.* 2021. Reversible reprogramming of cardiomyocytes to a fetal state drives heart regeneration in mice. *Science*. V. 373. P. 80.
- Childs B.G., Durik M., Baker D.J., Van Deursen J.M.* 2015. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nature Medicine*. V. 21. P. 1424.
- Chondronasiou D., Gill D., Mosteiro L., Urdinguio R.G., Berenguer-Llergo A., Aguilera M., Durand S., Aprahamian F., Nirmalathasan N., Abad M., Martin-Herranz D.E., Stephan-Otto Attolini C., Prats N. et al.* 2022. Multi-omic rejuvenation of naturally aged tissues by a single cycle of transient reprogramming. *Aging Cell*. V. 21: e13578. <https://doi.org/10.1111/acel.13578>
- Conboy I.M., Conboy M.J., Wagers A.J., Girma E.R., Weisman I.L., Rando T.A.* 2005. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature*. V. 433. P. 760.
- Cuervo A.M., Bergamini E., Brunk U.T., Dröge W., Ffrench M., Terman A.* 2005. Autophagy and aging: the importance of maintaining “clean” cells. *Autophagy*. V. 1. P. 131. <https://doi.org/10.4161/auto.1.3.2017>
- Dungan C.M., Figueiredo V.C., Wen Y., VonLohnden G.L., Zdunek C.J., Thomas N.T., Mobley C.B., Murach K.A., Brightwell C.R., Long D.E., Fry C.S., Kern P.A., McCarthy J.J., Peterson C.A.* 2022. Senolytic treatment rescues blunted muscle hypertrophy in old mice. *GeroScience*. V. 44. P. 1925. <https://doi.org/10.1007/s11357-022-00542-2>
- Galkin F., Mamoshina P., Aliper A., de Magalhães J.P., Gladyshev V.N., Zhavoronkov A.* 2020. Biohorology and biomarkers of aging: current state-of-the-art, challenges and opportunities. *ARR*. V. 60: e 60:101050. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2020.101050>
- Gems D., Partridge L.* 2013. Genetics of longevity in model organisms: debates and paradigm shifts. *Annu. Rev. Physiol*. V. 75. P. 621.
- Gill D., Parry A., Santos F., Okkenhaug H., Todd C.D., Hernandez-Herraez I., Stubbs T.M., Milagre I., Reik W.* 2022. Multi-omic rejuvenation of human cells by maturation phase transient reprogramming. *Elife*. V. 11: e71624. <https://doi.org/10.7554/eLife.71624>
- Gladyshev V.N., Kritchevsky S.B., Clarke S.G., Cuervo A.M., Fiehn O., de Magalhães J.P., Mau T., Maes M., Moritz R.L., Niedermhofer L.J., Van Schaftingen E., Tranah G.J., Walsh K., Yura Y., Zhang B., Cummings S.R.* 2021. Molecular damage in aging. *Nature Aging*. V.1: 1096. <https://doi.org/10.1038/s43587-021-00150-3>
- Guan J., Wang G., Wang J., Zhang Z., Fu Y., Cheng L., Meng G., Lyu Y., Zhu J., Li Y., Wang Y., Liuyang S., Liu B., Yang Z., He H., Zhong X., Chen Q. et al.* 2022. Chemical reprogramming of human somatic cells to pluripotent stem cells. *Nature*. V. 605. P. 325.
- Guderyon M.J., Chen C., Bhattacharjee A., Ge G., Fernandez R.A., Gelfond J.A.L., Gorena K.M., Cheng C.J., Li Y., Nelson J.F., Strong R.J., Hornsby P.J., Clark R.A., Li S.* 2020. Mobilization-based transplantation of young-donor hematopoietic stem cells extends lifespan in mice. *Aging Cell*. V. 19: e13110. <https://doi.org/10.1111/acel.13110>
- Haigis M.C., Yankner B.A.* 2010. The aging stress response. *Mol. Cell*. V. 40. P. 333.

- Hishida T., Yamamoto M., Hishida-Nozaki Y., Shao C., Huang L., Wang C., Shojima K., Xue Y., Hang Y., Shokhiev M., Mieczak S., Sahu S.K., Hatanaka F., Ros R.R., Maxwell M. et al. 2022. *In vivo* partial cellular reprogramming enhances liver plasticity and regeneration. *Cell Rep.* V. 39: 110730. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110730>
- Hofmann J.W., Zhao X., De Cecco M., Peterson A.L., Pagliaroli L., Manivannan J., Hubbard G.B., Ikeno Y., Zhang Y., Feng B., Li X., Serre T., Qi W., Van Remmen H., Miller R.A., Bath K.G. et al. 2015. Reduced expression of MYC increases longevity and enhances healthspan. *Cell.* V. 160. P. 477.
- Horvath S. 2013. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol.* V. 14. P. R115.
- Hou P., Li Y., Zhang X., Liu C., Guan J., Li H., Zhao T., Ye J., Yang W., Liu K., Ge J., Xu J., Zhang Q., Zhao Y., Deng H. 2013. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science.* V. 341. P. 651.
- Hu K. 2014. All roads lead to induced pluripotent stem cells: the technologies of iPSC generation. *Stem Cells Dev.* V. 23. P. 1285.
- Kim Y., Jeong J., Choi D. 2020. Small-molecule-mediated reprogramming: a silver lining for regenerative medicine. *Exp. Mol. Med.* V. 52. P. 213.
- Klawitter S., Fuchs N.V., Upton K.R., Muñoz-Lopez M., Shukla R., Wang J., Garcia-Cañadas M., Lopez-Ruiz C., Gerhardt D.J., Sebe A., Grabundzija I., Merkert S., Gerdes P., Pulgarin J.A., Bock A., et al. 2016. Reprogramming triggers endogenous L1 and Alu retrotransposition in human induced pluripotent stem cells. *Nat. Commun.* V. 7: 10286. <https://doi.org/10.1038/ncomms10286>
- Koch C.M., Reck K., Shao K., Lin Q., Joussem S., Ziegler P., Walenda G., Drescher W., Opalka B., May T., Brummendorf T., Zenke M., Saric T., Wagner W. 2013. Pluripotent stem cells escape from senescence-associated DNA methylation changes. *Genome Res.* V. 23. P. 248.
- Koch C.M., Wagner W. 2011. Epigenetic-aging-signature to determine age in different tissues. *Aging (Albany, NY).* V. 3. P. 1018.
- Lapasset L., Milhavel O., Prieur A., Besnard E., Babled A., Ät-Hamou N., Leschik J., Pellestor F., Ramirez J.M., De Vos J., Lehmann S., Lemaitre J.M. 2011. Rejuvenating senescent and centenarian human cells by reprogramming through the pluripotent state. *Genes Dev.* V. 25. P. 2248. <https://doi.org/10.1101/gad.173922.111>
- Lee C., Raffaghello L., Brandhorst S., Safdie F.M., Bianchi G., Martin-Montalvo A., Pistoia V., Wei M., Hwang S., Merlino A., Emionite L., De Cabo R., Longo V.D. 2012. Fasting cycles retard growth of tumors and sensitize a range of cancer cell types to chemotherapy. *Sci. Transl. Med.* V. 4: 124ra27. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003293>
- Lee C., Safdie F.M., Raffaghello L., Wei M., Madia F., Parrella E., Hwang D., Cohen P., Bianchi G., Longo V.D. 2010. Reduced levels of IGF-I mediate differential protection of normal and cancer cells in response to fasting and improve chemotherapeutic index. *Cancer Res.* V. 70. P. 1564.
- Lewis-McDougall F.C., Ruchaya P.J., Domenjo-Vila E., Shin Teoh T., Prata L., Cottle B.J., Clark J.E., Punjabi P.P., Awad W., Torella D., Tchkonja T., Kirkland J.L., Ellison-Hughes G.M. 2019. Aged-senescent cells contribute to im-
- paired heart regeneration. *Aging Cell.* V. 18: e12931. <https://doi.org/10.1111/acer.12931>
- Lin Q., Weidner C.I., Costa I.G., Marioni R.E., Ferreira M.R.P., Deary I.J., Wagner W. 2016. DNA methylation levels at individual age-associated CpG sites can be indicative for life expectancy. *Aging (Albany, NY).* V. 8. P. 394.
- Liu X., Ouyang J.F., Rossello F.J., Tan J.P., Davidson K.C., Valdes D.S., Schröder J., Sun Y.B.Y., Chen J., Knaupp A.S., Sun G., Chy H.S., Huang Z., Pflueger J., Firas J. et al. 2020. Reprogramming roadmap reveals route to human induced trophoblast stem cells. *Nature.* V. 586. P. 101.
- Longo V.D., Finch C.E. 2003. Evolutionary medicine: from dwarf model systems to healthy centenarians? *Science.* V. 299. P. 1342.
- López-Otín C., Blasco M.A., Partridge L., Serrano M., Kroemer G. 2013. The hallmarks of aging. *Cell.* V. 153. P. 1194.
- Lu A.T., Quach A., Wilson J.G., Reiner A.P., Aviv A., Raj K., Hou L., Baccarelli A.A., Li Y., Stewart J.D., Whitsel E.A., Assimes T.L., Ferrucci L., Horvath S. 2019. DNA methylation GrimAge strongly predicts lifespan and healthspan. *Aging (Albany, NY).* V. 11. P. 303.
- Lu Y., Brommer B., Tian X., Krishnan A., Meer M., Wang C., Vera D.L., Zeng Q., Yu D., Bonkowski M.S., Yang J.H., Zhou S., Hoffmann E.M., Karg M.M., Schultz M.B., Kane A.E., Davidsohn N. et al. 2020. Reprogramming to recover youthful epigenetic information and restore vision. *Nature.* V. 588. P. 124.
- Ludwig F.C., Elashoff R.M. 1972. Mortality in syngeneic rat parabionts of different chronological age. *Trans. N.Y. Acad. Sci.* V. 34. P. 582.
- Madeo F., Tavernarakis N., Kroemer G. 2010. Can autophagy promote longevity? *Nat. Cell Biol.* V. 12. P. 842.
- Mair W., Dillin A. 2008. Aging and survival: the genetics of life span extension by dietary restriction. *Annu. Rev. Biochem.* V. 77. P. 727.
- Manukyan M., Singh P.B. 2014. Epigenome rejuvenation: HP1 β mobility as a measure of pluripotent and senescent chromatin ground states. *Sci. Rep.* V. 4. P. 4789.
- Marioni R.E., Shah S., McRae A.F., Chen B.H., Colicino E., Harris S.E., Gibson J., Henders A.K., Redmond P., Cox S.R., Pattie A., Corley J., Murphy L., Martin N.G., Montgomery G.W. et al. 2015. DNA methylation age of blood predicts all-cause mortality in later life. *Genome Biol.* V. 16. P. 25.
- Mertens J., Paquola A.C.M., Ku M., Hatch E., Böhnke L., Ladjevardi S., McGrath S., Campbell B., Lee H., Herdy J.R., Gonçalves J.T., Toda T., Kim Y., Winkler J., Yao J. et al. 2015. Directly reprogrammed human neurons retain aging-associated transcriptomic signatures and reveal age-related nucleocytoplasmic defects. *Cell Stem Cell.* V. 17. P. 705.
- Miller J.D., Ganat Y.M., Kishinevsky S., Bowman R.L., Liu B., Tu E.Y., Mandal P.K., Vera E., Shim J.W., Kriks S., Taldone T., Fusaki N., Tomishima M.J., Krainc D., Milner T.A. et al. 2013. Human iPSC-based modeling of late-onset disease via progerin-induced aging. *Cell Stem Cell.* V. 13. P. 691.
- Narasimhan S.D., Yen K., Tissenbaum H.A. 2009. Converging pathways in lifespan regulation. *Curr. Biol.* V. 19: R657. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.06.013>
- Nishimura T., Kaneko S., Kawana-Tachikawa A., Tajima Y., Go-to H., Zhu D., Nakayama-Hosoya K., Iriguchi S., Uemura Y., Shimizu T., Takayama N., Yamada D., Nishimura K., Ohta-

- ka M. et al. 2013. Generation of rejuvenated antigen-specific T cells by reprogramming to pluripotency and redifferentiation. *Cell Stem Cell*. V. 12. P. 114.
- Ocampo A., Reddy P., Martinez-Redondo P., Platero-Luengo A., Hatanaka F., Hishida T., Li M., Lam D., Kurita M., Beyret E., Araoka T., Vazquez-Ferrer E., Donoso D., Roman J. L. et al. C. 2016. *In vivo* amelioration of age-associated hallmarks by partial reprogramming. *Cell*. V. 167. P. 1719.
- Ohnishi K., Semi K., Yamamoto T., Shimizu M., Tanaka A., Mitsunaga K., Okita K., Osafune K., Arioka Y., Maeda T., Soejima H., Moriwaki H., Yamanaka S., Wolftjen K., Yamada Y. 2014. Premature termination of reprogramming *in vivo* leads to cancer development through altered epigenetic regulation. *Cell*. V. 156. P.663.
- Ohnuki M., Tanabe K., Sutou K., Teramoto I., Sawamura Y., Narita M., Nakamura M., Tokunaga Y., Nakamura M., Watanabe A., Yamanaka S., Takahashi K. 2014. Dynamic regulation of human endogenous retroviruses mediates factor-induced reprogramming and differentiation potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 111. P. 12426.
- Olova N., Simpson D.J., Marioni R.E., Chandra T. 2019. Partial reprogramming induces a steady decline in epigenetic age before loss of somatic identity. *Aging Cell*. V. 18: e12877. <https://doi.org/10.1111/acel.12877>
- Raffaghello L., Lee C., Safdie F.M., Wei M., Madia F., Bianchi G., Longo V.D. 2008. Starvation-dependent differential stress resistance protects normal but not cancer cells against high-dose chemotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 105. P. 8215.
- Rodríguez-Matellán A., Alcazar N., Hernández F., Serrano M., Ávila J. 2020. *In vivo* reprogramming ameliorates aging features in dentate gyrus cells and improves memory in mice. *Stem Cell Reports* V. 15. P. 1056.
- Roux A.E., Zhang C., Paw J., Zavala-Solorio J., Malahias E., Vijay T., Kolumam G., Kenyon C., Kimmel J.C. 2022. Diverse partial reprogramming strategies restore youthful gene expression and transiently suppress cell identity. *Cell Syst*. V. 13. P. 574.
- Sarkar T.J., Quarta M., Mukherjee S., Colville A., Paine P., Doan L., Tran C.M., Chu C.R., Horvath S., Qi L.S., Bhutani N., Rando T.A., Sebastiano V. 2020. Transient non-integrative expression of nuclear reprogramming factors promotes multifaceted amelioration of aging in human cells. *Nat. Commun*. V. 11. P. 1545.
- Schiebinger G., Shu J., Tabaka M., Cleary B., Subramanian V., Solomon A., Gould J., Liu S., Lin S., Berube P., Lee L., Chen J., Brumbaugh J., Rigollet P., Hochedlinger K. et al. 2019. Optimal-Transport analysis of single-cell gene expression identifies developmental trajectories in reprogramming. *Cell*. V. 176. P. 928.
- Schmauck-Medina T., Molière A., Lautrup S., Zhang J., Chlopicki S., Madsen H.B., Cao S., Soendenbroe C., Mansell E., Vestergaard M.B., Li Z., Shiloh Y., Opresko P.L., Egly J.M., Kirkwood T. et al. 2022. New hallmarks of ageing: a 2022 Copenhagen ageing meeting summary. *Aging (Albany, NY)*. V. 14: 6829. <https://doi.org/10.18632/aging.204248>
- Shahini A., Rajabian N., Choudhury D., Shahini S., Vydiyam K., Nguyen T., Kulczyk J., Santarelli T., Ikhaphoh I., Zhang Y., Wang J., Liu S., Stableski A., Thiyagarajan R., Seldeen K. et al. 2021. Ameliorating the hallmarks of cellular senescence in skeletal muscle myogenic progenitors *in vitro* and *in vivo*. *Sci. Adv*. V. 7: eabe5671. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abe5671>
- Singh P.B., Laktionov P.P., Newman A.G. 2019. Deconstructing age reprogramming. *J. Biosci*. V. 44. P. 106.
- Smith E.D., Kaeberlein T.L., Lydum B.T., Sager J., Welton K.L., Kennedy B.K., Kaeberlein M. 2008. Age- and calorie-independent life span extension from dietary restriction by bacterial deprivation in *Caenorhabditis elegans*. *BMC Dev. Biol*. V. 8. P. 49.
- Stölzel F., Brosch M., Horvath S., Kramer M., Thiede C., Von Bonin M., Ammerpohl O., Middeke M., Schetelig J., Ehninger G., Hampe J., Bornhäuser M. 2017. Dynamics of epigenetic age following hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica*. V. 102: e321. <https://doi.org/10.3324/haematol.2016.160481>
- Takahashi K., Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. V. 126. P. 663.
- Tanabe K., Nakamura M., Narita M., Takahashi K., Yamanaka S. 2013. Maturation, not initiation, is the major roadblock during reprogramming toward pluripotency from human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 110. P. 12172.
- Verweij M., Van Ginhoven T.M., Mitchell J.R., Sluiter W., Den Engel S. Van, Roest H.P., Torabi E., Ijzermans J.N.M., Hoeymakers J.H.J., De Bruin R.W.F. 2011. Preoperative fasting protects mice against hepatic ischemia/reperfusion injury: mechanisms and effects on liver regeneration. *Liver Transplant*. V. 17. P. 695.
- Vizioli M.G., Liu T., Miller K.N., Robertson N.A., Gilroy K., Lagnado A.B., Perez-Garcia A., Kiourtis C., Dasgupta N., Lei X., Kruger P.J., Nixon C., Clark W., Jurk D., Bird T.G. et al. 2020. Mitochondria-to-nucleus retrograde signaling drives formation of cytoplasmic chromatin and inflammation in senescence. *Genes Dev*. V. 34. P. 428.
- Weidner C.I., Lin Q., Koch C.M., Eisele L., Beier F., Ziegler P., Bauerschlag D.O., Jöckel K.H., Erbel R., Mühleisen T.W., Zenke M., Brümmendorf T.H., Wagner W. 2014. Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites. *Genome Biol*. V. 15. P. R24.
- Ye J., Ge J., Zhang X., Cheng L., Zhang Z., He S., Wang Y., Lin H., Yang W., Liu J., Zhao Y., Deng H. 2016. Pluripotent stem cells induced from mouse neural stem cells and small intestinal epithelial cells by small molecule compounds. *Cell Res*. V. 26. P. 34.
- Yousefzadeh M.J., Flores R. R., Zhu Y., Schmiechen Z.C., Brooks R.W., Trussoni C.E., Cui Y., Angelini L., Lee K.A., McGowan S.J., Burrack A.L., Wang D., Dong Q., Lu A., Sano T., O'Kelly R.D. et al. 2021. An aged immune system drives senescence and ageing of solid organs. *Nature*. V. 594. P. s41586.

Partial Cell Reprogramming as a Method of Revitalizing Living Systems

M. A. Shorokhova*

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

**e-mail: shili-mariya@yandex.ru*

Aging and associated diseases are an acute problem of modern biology and medicine. Although aging cannot be prevented at present, its impact on the lifespan and health of the elderly can potentially be minimized by interventions aimed at returning these cellular processes to normal functioning. The ongoing search for ways to rejuvenate and improve the regenerative capacity of cells led to the discovery of partial reprogramming in 2016. Partial reprogramming is based on the short-term expression of reprogramming factors (Oct4, Sox2, Klf4 and c-Myc). As a result, the young epigenetic signature of aging cells is restored. The efficacy of the method has been shown in both in vitro and in vivo systems. In this review we discuss the main successes of partial reprogramming, as well as the problems and unresolved issues faced by the researchers. Separately, we focus on the data on molecular changes during partial reprogramming. The method of partial reprogramming provides a wide range of opportunities for fundamental research of aging and rejuvenation. Further work in this direction can lead to the development of therapeutic strategies to alleviate age-related diseases and thus improve health and longevity.

Keywords: partial reprogramming, cell identity, pluripotency, rejuvenation, somatic cells

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИЙ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ SMC

© 2023 г. Н. Е. Морозова¹, А. С. Потысьева¹, А. Д. Ведяйкин¹, *

¹Научно-исследовательский комплекс “Нанобиотехнологии” Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого, Санкт-Петербург, 195251 Россия

*E-mail: misterkotlin@gmail.com

Поступила в редакцию 12.05.2023 г.

После доработки 20.07.2023 г.

Принята к публикации 13.08.2023 г.

Белковые комплексы SMC (от англ. Structural maintenance of chromosomes, далее в тексте – комплексы SMC) являются ключевыми участниками пространственной организации ДНК во всех живых организмах – в бактериях, археях и эукариотах. У бактерий имеется несколько гомологов комплексов SMC, которые выполняют, на первый взгляд, несвязанные друг с другом функции, однако действуют посредством очень похожих между собой, высококонсервативных механизмов. За последние годы установлено, что комплексы SMC способны осуществлять формирование петель ДНК (последствием так называемой экстрюзии петель), что позволяет рассматривать их как отдельный класс ДНК-транслоказ. В данной работе обсуждаются бактериальные комплексы SMC в сравнении с их гомологами, такими как MukBEF, MksBEF, RecN и Wadjet, а также с комплексами SMC эукариот. Обсуждаются их свойства, роль и функции в ключевых процессах бактериальной клетки.

Ключевые слова: SMC, сегрегация ДНК, пространственная организация ДНК, экстрюзия петель (loop extrusion), ДНК-транслоказа

DOI: 10.31857/S004137712306007X, **EDN:** ORQQEY

В данной работе рассматриваются общие представления о функциях, роли и молекулярных механизмах работы комплексов SMC и их гомологов у бактерий. Белковые комплексы семейства SMC (далее – комплексы SMC) имеются у всех живых организмов, в которых они выполняют важные функции в таких процессах, как репликация ДНК, репарация, защита от чужеродной ДНК. Хорошие обзоры, посвященные комплексам SMC в целом, представлены в нескольких работах последних лет (Yatskevich et al., 2019; Kim et al., 2023). Данный обзор, прежде всего, посвящен описанию комплексов SMC и их гомологов, имеющих у бактерий. Тем не менее, так как комплексы SMC достаточно консервативны и имеются, по-видимому, у всех живых организмов, кратко рассмотрены также комплексы SMC эукариот.

Наиболее исследована на данный момент роль комплексов SMC в поддержании пространственной организации ДНК, что справедливо как для эукариот, так и для бактерий. Кроме укладки ДНК в интерфазном ядре, пространственная организация ДНК выражается в таких явлениях, как, например, конденсация и сегрегация хромосом у эукариот во время митоза, а также сегрегация нуклеоидов (хромосом) бактерий. Для решения непростой задачи поддержания пространственной организации ДНК привлекаются комплексы SMC, а также другие белки и слож-

ные многобелковые комплексы, в том числе нуклеосома (в эукариотах). Длинные молекулы геномной ДНК эукариот при участии гистонов и других факторов образуют эухроматин и гетерохроматин (Yoshinaga, Inagaki, 2021). Во время митоза и мейоза образуются более компактизованные хроматиды, до определенного момента сцепленные между собой в пары сестринских хроматид благодаря комплексам белков, в которые входят конденсины и когезины (одни из эукариотических комплексов SMC). Конденсины играют центральную роль в конденсации и сегрегации хромосом во время митоза. В сегрегации хромосом во время митоза участвуют когезины (Sutani, Yanagida, 1997), обеспечивая сцепление сестринских хроматид. Похожая ситуация наблюдается во время мейоза (Ishiguro, 2019). У бактерий, несмотря на отсутствие гистонов, нуклеоиды поддерживаются в конденсированном и достаточно упорядоченном состоянии, причем одну из важнейших ролей в поддержании пространственной организации нуклеоида играют комплексы SMC (Dame et al., 2020). Как и конденсины эукариот, комплексы SMC бактерий участвуют в конденсации и сегрегации ДНК.

Учитывая структурную и филогенетическую консервативность, в настоящее время считают, что все комплексы SMC, как прокариотические, так и эука-

риотические, действуют по механизмам, имеющим общий принцип. Только в последнее время на молекулярном уровне стало проявляться, как именно они действуют: комплексы SMC не функционируют статически, удерживая молекулы ДНК вместе, вместо этого они работают подобно ДНК-транслоказам (Yatskevich et al., 2019; Kim et al., 2023). Установлено, что комплексы SMC формируют из молекул ДНК петли (такое поведение называется “экструзия петель”, англ. loop extrusion), имеющие достаточно большой размер (до нескольких сотен тысяч пар оснований), причем независимо от того, упакована ли в данный момент молекула ДНК в нуклеосомную нить или используется РНК-полимеразой для транскрипции.

В обзоре рассматриваются такие бактериальные комплексы SMC, как “классический” и наиболее изученный комплекс SMC-ScpAB бактерий (главным образом на примере бактерии *Bacillus subtilis*), а также комплексы MukBEF и MksBEF. Кроме того, обсуждаются открытые совсем недавно комплексы Wadjet, участвующие в защите от чужеродной ДНК.

Важной особенностью данного обзора является рассмотрение белка RecN, который имеется у многих бактерий наряду с другими комплексами SMC, является гомологом SMC и участвует в гомологичной рекомбинации. Несмотря на то, что свойства RecN (и предполагаемого комплекса на его основе) изучены намного хуже, чем у других комплексов SMC, данный белок представляет значительный интерес, так как вовлечен в важнейший процесс – репарацию ДНК.

ЯВЛЕНИЕ КОМПАКТИЗАЦИИ ДНК У ЭУКАРИОТ И ПРОКАРИОТ

Прежде чем перейти к обсуждению комплексов SMC, представляется важным кратко обсудить явление, с которым связаны некоторые из комплексов SMC, а именно явление компактизации ДНК. Это явление впервые было описано в эукариотических клетках. Более полувека назад было установлено, что эукариотический хроматин имеет характерную периодическую структуру, представленную молекулой ДНК, намотанной на нуклеосомы, которые были описаны как “бусины на нитке” (Olins, Olins, 1974). Однако до сих пор есть много пробелов в понимании того, как в клетках эукариот обеспечивается пространственная организация ДНК. Например, не до конца ясна природа структуры, характерной для интерфазного ядра – волокна хроматина толщиной около 30 нм (Xu et al., 2021).

Первоначальные попытки объяснить образование хроматинного волокна толщиной 30 нм были основаны на свойствах нуклеосом. Действительно, гистоны являются наиболее распространенными белками в составе хромосом, поэтому закономерно предположить, что именно гистоны выполняют наиболее важные

функции по поддержанию пространственной организации хромосом. Предполагалось, что волокна диаметром 10 нм, состоящие из ДНК, намотанной на нуклеосомы, могут складываться в волокна более высокого порядка диаметром 30 нм. Изменения в структуре хромосом, как предполагается, управляются активируемыми АТФ факторами ремоделирования хроматина и факторами модификации гистонов или и тем, и другим (Georgatos et al., 2009). Однако известные свойства нуклеосом и модифицированных гистонов не могут объяснить всю сложность упаковки хроматина. Также на настоящий момент установлено, что волокна толщиной 30-нм не образуются в ядрах многих видов эукариотических клеток (Eltsov et al., 2008; Ou et al., 2017). Более того, недавние эксперименты показали, что структуры, напоминающие хроматиды митотических хромосом, могут быть восстановлены в экстрактах яиц (ооцитов) *Xenopus* без участия нуклеосом (Shintomi et al., 2017). На основании этих наблюдений можно предположить, что в основе пространственной организации хромосом должен лежать какой-то другой принцип, не зависящий от гистонов.

Для того чтобы выявить упорядоченность в организации ДНК у бактерий, потребовалось гораздо больше времени, чем в случае эукариот (интересно заметить, что у бактерий с большим опозданием были открыты и многие другие атрибуты, первоначально считавшиеся принадлежностью исключительно эукариот, например, белки цитоскелета (Cabeen, Jacobs-Wagner, 2010)). Повторяющиеся структурные единицы ДНК (подобные фрагментам ДНК, намотанным на нуклеосомы) бактерий так и не были идентифицированы. Однако за последние годы появились доказательства того, что бактериальные хромосомы представляют собой не просто неструктурированные массивы ДНК, а напротив, сворачиваются в достаточно упорядоченные структуры (Dame et al., 2020). Немалую роль в формировании этих структур играют комплексы SMC. Достижения в области микроскопии, структурной биологии и разработка подходов, позволяющих анализировать геном, выявили многие молекулярные механизмы, лежащие в основе явления пространственной организации ДНК бактерий. Комплексы SMC и другие нуклеоид-ассоциированные белки, рассматриваемые в следующей главе, играют важнейшую роль в этом явлении.

МЕСТО КОМПЛЕКСОВ SMC СРЕДИ БЕЛКОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ДНК БАКТЕРИЙ

В отличие от хромосом эукариот, регулярно повторяющиеся структурные единицы, такие как нуклеосомы, в нуклеоидах бактерий не выявляются. Вместо этого бактериальная хромосома компактизуется с помощью нуклеоид-ассоциированных белков

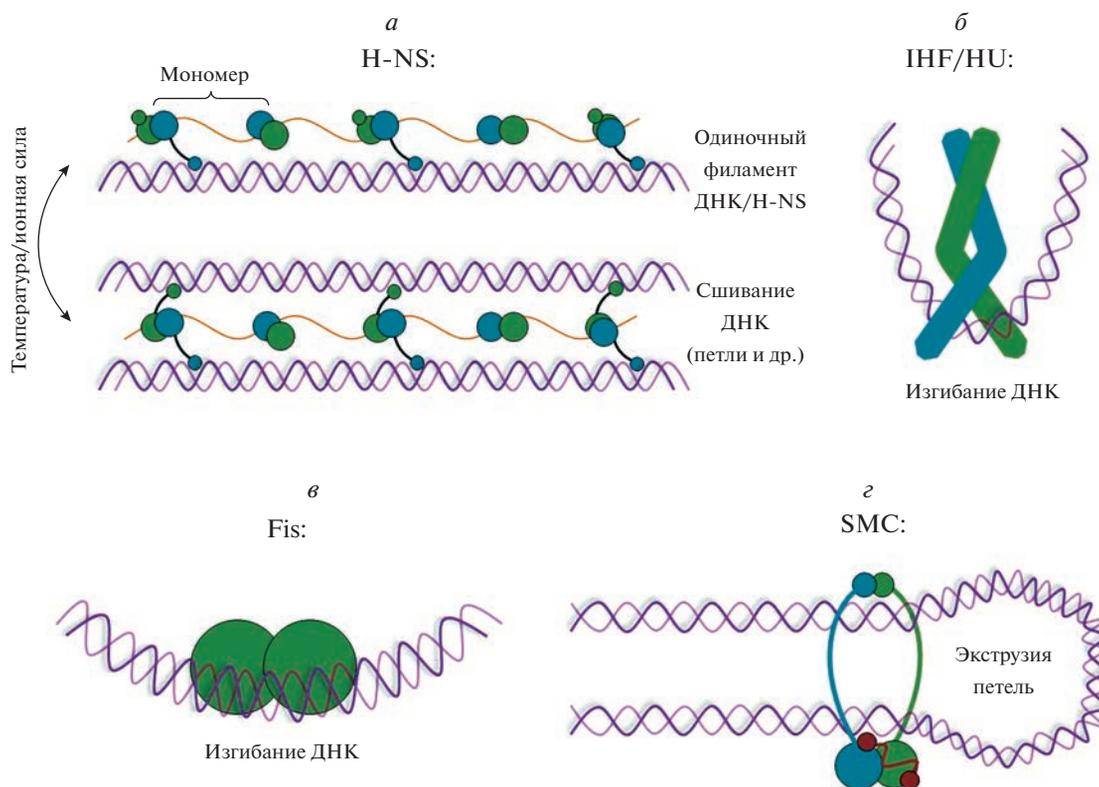


Рис. 1. Белки бактерий, участвующие в пространственной организации ДНК. Мономеры белков обозначены голубым и зеленым цветом, ДНК — фиолетовым. *а* — Гистоноподобный белок H-NS взаимодействует с ДНК, а также олигомеризуется посредством контактов “голова к голове” и “хвост к хвосту”. В зависимости от условий среды (температура, ионная сила) H-NS в комплексе ДНК может формировать нитевидные структуры (сверху) или стимулировать латеральное взаимодействие между молекулами ДНК (снизу). Последнее взаимодействие приводит в том числе к образованию петель ДНК. *б* — Гистоноподобные белки IHF и HU функционируют как белки, изгибающие ДНК. IHF создает в ДНК сильные изгибы до 160° , тогда как HU изгибает ДНК менее резко. *в* — Белок Fis связывается с последовательностями ДНК в виде димера и индуцирует изгиб ДНК на 50° – 90° . *г* — Комплексы SMC представляют собой белки, стимулирующие образование петель ДНК

(NAP, от англ. nucleoid-associated proteins), наиболее важные из которых рассматриваются в данной главе.

Гистоноподобный белок H-NS (от англ. histone-like nucleoid structuring protein) представляет собой небольшой белок, который связывается с малой бороздкой ДНК с помощью С-концевого домена у *Escherichia coli* и родственных бактерий (см. рис. 1а) (Grainger, 2016). Данный белок лучше связывается с АТ-богатыми участками (Gordon et al., 2011). N-концевой домен H-NS содержит два сайта, которые обеспечивают взаимодействие мономеров H-NS между собой посредством контактов “голова–голова” и “хвост–хвост” (Arold et al., 2010). Это приводит к образованию либо нуклеопротеиновых филаментов, либо петель между участками ДНК, соединенными с помощью H-NS (Dame et al., 2006), причем способность образовывать те или иные структуры зависит от внешних условий (температура, ионный состав). Белки, функционально сходные с H-NS, обнаружены у многих видов бактерий. Например, белок Rok *B. subtilis* не имеет структурного сходства с H-NS *Escherichia coli*, однако выполняет ту же физиологическую роль, связываясь с АТ-богатыми

участками ДНК и вызывая образование петель (Smits, Grossman, 2010). Вероятно, H-NS и подобные ему белки вызывают формирование статичных петель ДНК, что вносит вклад в поддержание нуклеоида в компактной форме.

Другой ДНК-связывающий белок бактерий — Fis (от англ. factor for inversion stimulation) — связывается с ДНК в виде димера благодаря мотиву НТН (спираль-поворот–спираль) и вызывает изгиб ДНК (рис. 1в), а не образование петель, в отличие от белка H-NS и его гомологов (Stella et al., 2010). Fis распознает вырожденный палиндром ДНК длиной 15 п.н., имеющий G в положении 1 и C в положении 15 (5'-GNNVRRWWWYVNNC-3'). Распознавание мишени управляется формой малой бороздки, возникающей благодаря последовательности сайта связывания. Степень изгиба ДНК, вызванная связыванием Fis, может варьироваться от 50° до 90° в зависимости от фланкирующей последовательности ДНК (Hancock et al., 2016). Fis часто обнаруживается в местах пересечения дуплексов ДНК (Schneider et al., 2001). Это мо-

жет стабилизировать плектоны (участки суперспиралей) в суперскрученной ДНК.

Изгиб ДНК за счет связывания с другим гистонподобным белком, влияющим на конформацию бактериальной хромосомы – IHF (от англ. integration host factor) – является более сильным, до 160° (рис. 1б) (Rice et al., 1996). IHF связывает консенсусную последовательность (5'-WATCAANNNTTR-3') в виде гетеродимера, состоящего из α -субъединицы и β -субъединицы. Высокая внутриклеточная концентрация IHF приводит к его неспецифическому взаимодействию со многими неканоническими ДНК-мишенями. Белок IHF идентифицирован только у грамотрицательных бактерий.

Аминокислотная последовательность другого белка, вызывающего изгиб ДНК – HU (от англ. heat unstable) – на 40% идентична белку IHF (Rouvière-Yaniv, Gros, 1975; Stojkova et al., 2019). В отличие от IHF, HU широко распространен среди бактерий (Grove, 2011). В клетках *E. coli* HU образует гетеродимеры α -субъединицы и β -субъединицы. Гомодимеры HU преобладают среди других бактерий, у которых имеется лишь один ген, кодирующий гомолог HU. HU не имеет специфичности к последовательности ДНК, но его способ распознавания мишени похож на таковой у IHF (рис. 1). ДНК изгибается под действием HU в меньшей степени, чем в случае IHF, и под разными углами (van Noort et al., 2004). Связывание HU происходит преимущественно с изогнутой ДНК (Swinger, Rice, 2007). Последовательное связывание димеров HU вызывает скручивание ДНК вокруг связанных белков с образованием филаментов. Это приводит к тому, что HU может самостоятельно или вместе с топоизомеразой I влиять на суперскрученность кольцевой ДНК (Bensaid et al., 1996). Как правило, у бактерий ДНК отрицательно сверхспирализована для облегчения процессов, требующих плавления ДНК (Witz, Stasiak, 2010).

Также к белкам, участвующим в пространственной организации ДНК бактерий, относятся комплексы SMC (рис. 1з), которые способны к связыванию и транслокации ДНК, в том числе образуют петли из ДНК. В отличие от рассмотренных выше белков, SMC способны активно влиять на пространственную организацию ДНК, используя энергию гидролиза АТФ. Комплексы SMC рассматриваются далее.

КРАТКАЯ ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ КОМПЛЕКСОВ SMC

В 1990 г. было высказано предположение о наличии гипотетического механизма сворачивания ДНК, приводящего к формированию петель по всей длине хромосомы (Riggs, 1990). Данный механизм мог бы объяснить, в частности, конденсацию хромосом в митозе. Однако молекулярные основы данного процесса были долгое время неясны. Интересно за-

метить, что еще до того, как Риггс постулировал сворачивание ДНК, ген *SMC1* (от англ. stability of minichromosomes 1) был обнаружен у *Saccharomyces cerevisiae* (Larionov et al., 1985; Strunnikov et al., 1993), а в 1990-х гг. последовало открытие гомологичных генов в других организмах. На основании данных, полученных при изучении мутаций в данных генах, было установлено, что эти белки каким-то образом вовлечены в поддержание пространственной организации ДНК, хотя молекулярные механизмы этого вовлечения были неясны. В результате расшифровка аббревиатуры SMC поменялась на современную (англ. structural maintenance of chromosomes).

Связь белков SMC с предложенным Риггсом механизмом сворачивания ДНК (Riggs, 1990) не была очевидной. Модель, в рамках которой комплексы SMC активно вовлечены в формирование петель из молекулы ДНК, была лишь одной из многих и не получила убедительных подтверждений до использования методов определения конформации хромосом (Hi-C и другие) около десяти лет назад. Две статьи, одна из которых была посвящена организации генома в клетках млекопитающих, а другая – у бактерий *B. subtilis*, опубликованные с разницей лишь в несколько месяцев, предоставили первые данные *in vivo*, указывающие на тот факт, что комплексы SMC могут активно участвовать в экстрюзии петель ДНК (Sanborn et al., 2015; Wang et al., 2015). За этими исследованиями последовали дальнейшие эксперименты *in vivo* и *in vitro*, кульминацией которых стала визуализация экстрюзии петель ДНК, вызываемая комплексами SMC, на уровне одиночных молекул ДНК (Ganji et al., 2018). На настоящий момент открыто множество гомологов комплексов SMC во всех живых организмах. Однако до сих пор имеется множество пробелов в понимании свойств комплексов SMC, поэтому ведется активное исследование уже известных комплексов, а также открытие новых гомологов. Например, совсем недавно были открыты комплексы Wadjet, защищающие бактерии от чужеродной ДНК (Deep et al., 2022).

СТРУКТУРА КОМПЛЕКСОВ SMC

Комплексы SMC представляют собой кольцевидные структуры, состоящие из пары мономеров белков SMC (Nolivos, Sherratt, 2014), клейзина (Schleiffer et al., 2003) и вспомогательных/регуляторных белков типа KITE (от англ. kleisin-interacting winged-helix tandem elements – тандемные элементы в виде спирали, взаимодействующие с клейзином) (Palecek, Gruber, 2015) или (в зависимости от вида комплекса SMC) HAWK (от англ. HEAT repeat subunits containing proteins associated with kleisins – субъединицы повторов HEAT, содержащие белки, связанные с клейзином) (см. рис. 2) (Wells et al., 2017). Сравнение различных комплексов SMC по их составу представлено в табл. 1.

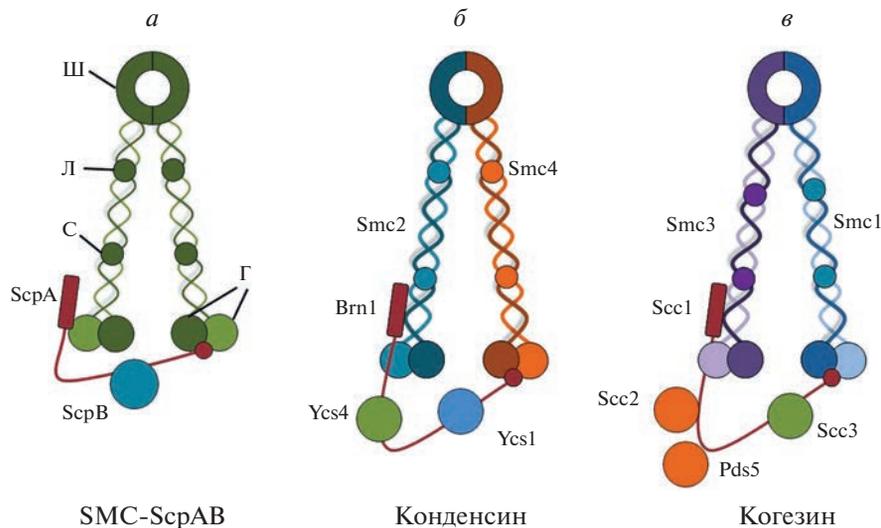


Рис. 2. Общая структура различных видов комплексов SMC. Комплекс SMC состоит из пары мономеров SMC, клейзина и регуляторных белков типа КИТЕ или HAWK. Каждый мономер SMC состоит из “шарнирного” домена димеризации (обозначен Ш, англ. “hinge”), АТФазного “головного” домена (обозначен Г, англ. “head”) и антипараллельного суперспирального “плеча”, простирающегося между шарнирным и головным доменами. Суперспирали имеют разрывы структуры, называемые “локоть” (обозначен Л, англ. “elbow”) и “сустав” (обозначен С, англ. “joint”). *а* – Бактериальный комплекс SMC проиллюстрирован на примере SMC *B. subtilis*, который образован гомодимером SMC; кольцеобразную структуру дополняют клейзин – ScpA, а также регуляторный белок типа КИТЕ – ScpB, который взаимодействует с клейзином. *б, в* – Конденсин и когезин проиллюстрированы с использованием соответствующих комплексов *S. cerevisiae*. У конденсина имеются два белка типа HAWK – Ycs4 и Ycg1, связанные с клейзином Brn1. У когезина имеется белок типа HAWK – Scc3, а также два дополнительных белка типа HAWK – Scc2 и Pds5, которые конкурируют за один и тот же сайт связывания у клейзина – Scc1.

Отдельные субъединицы (мономеры) белков SMC имеют вытянутую форму с доменом димеризации, называемым шарниром (англ. hinge), на одном конце, который соединен антипараллельной суперспиралью длиной 50-нм с головным (англ. head) доменом АТФазы, который является характерным для белков типа ABC (от англ. ATP-binding cassette) (рис. 2). Головной домен ABC-подобной АТФазы состоит из двух долей. Первая доля представляет собой N-концевой домен, образующий мотив Walker A, который связывает АТФ. Вторая доля представляет собой C-концевой домен, содержащий сигнатурный мотив, способный связывать γ -фосфат АТФ, связанный с головным доменом соседнего мономера, а также мо-

тив Walker B, необходимый для гидролиза АТФ (Glioris et al., 2014).

V-образный димер SMC может состоять из мономеров одного типа (гомомеры SMC встречаются в бактериальных комплексах SMC, MukBEF и др.) или двух различных типов (гетеродимеры входят в состав когезина, конденсина и комплекса Smc5–Smc6 эукариот). Димер SMC связывается с клейзином с образованием кольца, которое, вероятно, захватывает ДНК и, опоясывая два участка молекулы ДНК, образует петлю из ДНК (Gruber et al., 2003). Существует альтернативная модель, согласно которой петля может образовываться путем димеризации димеров SMC (т.е. за счет образования тетрамера SMC), каждый из которых охватывает одну из частей

Таблица 1. Состав комплексов SMC эукариот и бактерий

Комплекс SMC	Состав димера SMC	Клейзин	КИТЕ/HAWK
Когезин <i>S. cerevisiae</i>	Smc1/Smc3	Scc1	Scc3, Scc2 и Pds5 (HAWK)
Конденсин <i>S. cerevisiae</i>	Smc2/Smc4	Brn1	Ycs4 и Ycg1 (HAWK)
Smc5–Smc6 <i>S. cerevisiae</i>	Гетеродимер Smc5/Smc6	Nse4	Nse1, Nse3 (КИТЕ)
SMC <i>B. subtilis</i>	Гомодимер SMC/SMC	ScpA	ScpB (КИТЕ)
MukBEF <i>E. coli</i>	Гомодимер MukB/MukB	MukF	MukE (КИТЕ)
MksBSEF <i>P. aeruginosa</i>	Гомодимер MksB/MksB	MksF	MksE (КИТЕ)
RecN <i>E. coli</i>	Гомодимер RecN/RecN	Неизвестен	Неизвестны
Wadjet <i>P. aeruginosa</i>	Гомодимер JetC/JetC	JetA	JetB (КИТЕ)

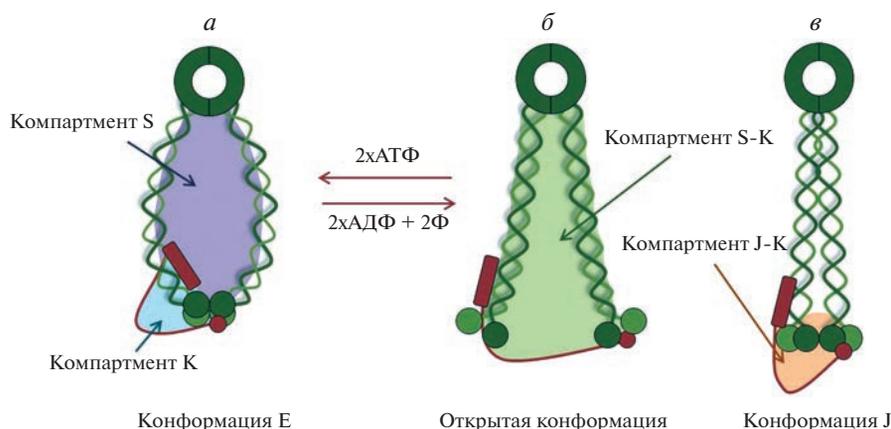


Рис. 3. Различные топологические компартменты, образованные SMC в различных конформациях. *a* – Закрытая конформация E (англ. engaged) демонстрирует 2 компартмента: компартмент SMC (S) и компартмент клейзина (K). *б* – Открытая конформация демонстрирует один компартмент SMC-клейзин (S-K). *в* – Конформация с совмещенными сигнатурными мотивами (J) демонстрирует один компартмент клейзина и головных доменов SMC (J-K)

ДНК, такую структуру иногда называют “наручники” (Zhang et al., 2008), однако в настоящее время больше склоняются к первой модели. Клейзины взаимодействуют с регуляторными белками типа KITE и HAWK, которые, по-видимому, влияют на конформацию комплекса SMC, взаимодействуя с другими факторами. Бактериальные и архейные комплексы SMC, а также эукариотический комплекс Smc5–Smc6 рекрутируют белки типа KITE. Комплексы SMC конденсина и когезина эукариот рекрутируют белки типа HAWK (Wells et al., 2017).

В настоящее время считается, что в отсутствие АТФ комплекс SMC находится в открытой конформации, при которой димер SMC имеет V-образную форму, а клейзин замыкает комплекс, формируя таким образом один компартмент S-K (рис. 3). При связывании АТФ 2 головных домена SMC сближаются, образуя закрытую конформацию E (от англ. engaged) (Lammens et al., 2004). В конформации E имеются 2 компартмента – K и S, разделенные между собой головными доменами SMC. Кроме двух описанных выше конформаций комплекса SMC – открытой (V-образной, в отсутствие АТФ) и закрытой (O-образной, в присутствии АТФ), описана также третья – совмещенная конформация J (от англ. juxtaposed), в которой сигнатурные мотивы головных доменов совмещены друг с другом (в отличие от конформации E, в которой они удалены друг от друга) (Diebold-Durand et al., 2017). В конформации J суперспирали SMC соприкасаются друг с другом, при этом АТФ в составе комплекса отсутствует, как и в открытой конформации.

Интересная особенность, характерная для белков SMC, – это прерывистость их суперспиралей. Один из распространенных разрывов суперспирали называется локоть (англ. elbow). Структурные данные указывают на то, что суперспирали конденсина, когезина, а также бактериального комплекса MukBEF за-

частую изгибаются в районе локтя (Yoshimura et al., 2002; Hons et al., 2016; Bürmann et al., 2019). Интересно отметить, что изогнутые в локте молекулы SMC существуют наряду с выпрямленными, что может указывать на переключение (например, при связывании и гидролизе АТФ) между этими двумя конформациями, однако на настоящий момент это неизвестно. Переключение между такими конформациями теоретически может быть объяснением наблюдаемой транслоказной активности (то есть перемещения однонитевой или двунитевой молекулы ДНК, обусловленного гидролизом АТФ) под действием комплекса SMC, т.е. быть одним из механизмов экструзии петель ДНК. Кроме локтя, имеется еще один разрыв суперспирали SMC – сустав (англ. joint). Как и в случае локтя, роль сустава в активности комплексов SMC в настоящее время не изучена.

ЭКСТРУЗИЯ ПЕТЕЛЬ КОМПЛЕКСАМИ SMC

Способность образовывать петли ДНК является ключевым свойством комплексов SMC, хотя, как было сказано выше, точные молекулярные основы этого механизма на настоящий момент неизвестны. Впервые предложенный в 2001 г. (Nasmyth, 2001) и формализованный теоретически в 2012 г. (Alipour, Marko, 2012), механизм экструзии петель заключается в связывании комплекса SMC с молекулой ДНК, при этом из нее формируется петля (рис. 4) (Wang et al., 2017). Затем этот комплекс “протягивает” ДНК через кольцо, образуя растущую петлю ДНК (Ganji et al., 2018). За счет этого механизма, как считается, белки SMC некоторых бактерий двунаправленно транслоцируют ДНК и постепенно перемещаются вдоль хромосомы к макродомену Ter (часть нуклеоида, содержащая сайт терминации репликации). Экструзионный комплекс SMC может состоять из сложной молекулы ДНК, протянутых через одно кольцо

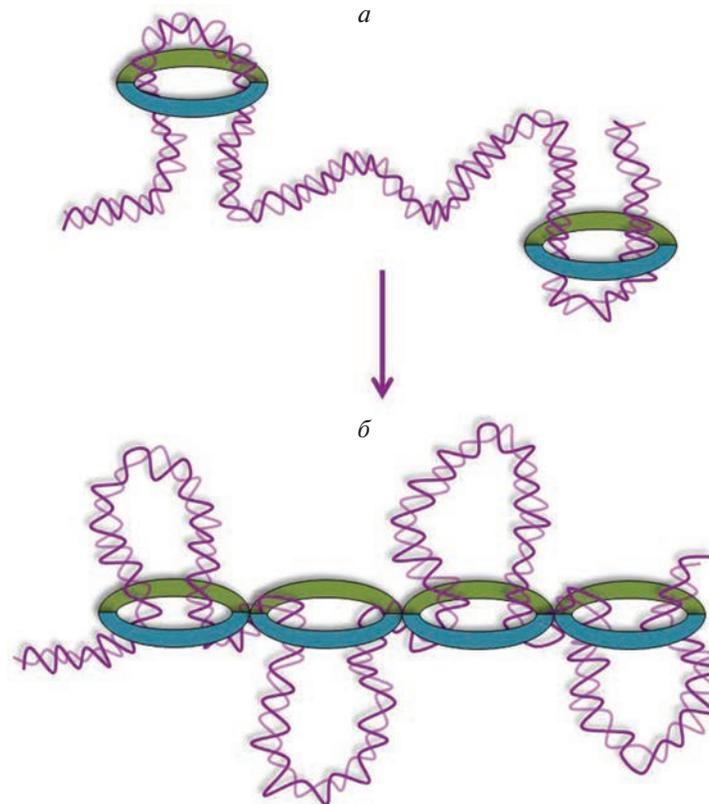


Рис. 4. Модель, иллюстрирующая, как комплекс SMC способен формировать петли из молекулы ДНК. *а* – На начальном этапе происходит сборка комплексов SMC на молекуле ДНК, при этом комплекс захватывает 2 участка одной молекулы ДНК. *б* – Далее происходит экструзия петель ДНК, вызванная транслоказной активностью, а также привлечение дополнительных комплексов SMC.

SMC, что называется моделью с одним кольцом (Gruber et al., 2003), или из молекулы ДНК, протянутой через два кольца тетрамера SMC (модель наручников) (Zhang et al., 2008).

На скорость экструзии петель SMC значительно влияет транскрипция. Активно транскрибируемые гены ослабляют перемещение ДНК через комплекс SMC (Tran et al., 2017). Например, у *B. subtilis* действие SMC может быть замедлено в несколько раз из-за противоположно ориентированного активно транскрибируемого гена (Wang et al., 2017). Наряду с активной экструзией петель, предложена также модель статичного связывания комплекса SMC с ДНК (Hirano, 2002), хотя на сегодняшний день она не подтверждается.

ОСОБЕННОСТИ КОМПЛЕКСОВ SMC ЭУКАРИОТ

Комплексы SMC впервые были открыты в эукариотах, и во многом их свойства изучены лучше, чем свойства их бактериальных гомологов. Эукариоты имеют 3 основных вида комплексов SMC – конденсины (содержат гетеродимер Smc2 и Smc4), когезины (Smc1 и Smc3), а также комплекс Smc5–Smc6

(содержат одноименный гетеродимер). Наиболее изучена роль комплексов SMC в процессе деления, а именно при сегрегации хромосом. В ходе сегрегации хромосом конденсация ДНК происходит при участии конденсинов, в то время как когезия сестринских хроматид обеспечивается за счет когезина (Kim et al., 2023).

У высших эукариот имеются 2 вида конденсинов – конденсин I и конденсин II (Hirota et al., 2004). Конденсин II локализуется в ядре и связывает хроматин в профазе, в то время как конденсин I является цитоплазматическим и, таким образом, может действовать на хроматин только после разрушения ядерной оболочки. Было установлено, что на первом этапе конденсин II способствует образованию больших петель ДНК размером около 400 т.п.н., тогда как конденсин I – петлей размером около 80 т.п.н., вложенных внутри больших петель (Gibcus et al., 2018).

Кроме конденсинов, процесс сегрегации ДНК эукариот требует участия еще одного комплекса SMC – когезина, необходимого для удержания сестринских хроматид вместе до определенного момента. Когезия устанавливается во время S фазы клеточного цикла одновременно с репликацией ДНК (Nasmyth, 2001). Когезин может загружаться на ДНК

двумя независимыми путями: когезиновые комплексы могут загружаться *de novo* во время или вовлекаться в когезию после репликации, будучи уже ассоциированными с хроматином (Srinivasan et al., 2020).

Предполагают, что один когезиновый комплекс в форме кольца (Gruber et al., 2003) окружает одну молекулу ДНК из каждой сестринской хроматиды (Naering et al., 2008). Хотя точный молекулярный механизм данного процесса пока неизвестен, исследования *in vitro* показали, что когезин, когда он связан с молекулой двунитевой ДНК, способен захватывать и другую молекулу одонитевой, но не двунитевой ДНК, в присутствии Scc2 (белка типа HAWK) и АТФ (Murayama et al., 2018). Вероятно, в данном процессе когезин может связываться с реплицируемой лидирующей цепью, а затем захватывать запаздывающую цепь до ее превращения в двунитевую молекулу ДНК. Когезин также может стабильно связывать две двунитевые молекулы АТФ-зависимым образом (Gutierrez-Escribano et al., 2019). Однако неясно, каким образом при помощи когезина обеспечивается когезия именно сестринских хроматид (а не случайных пар хроматид) и является ли эффективным связывание двунитевых молекул ДНК, поскольку в работах *in vitro* пока не удалось обнаружить такие взаимодействия (Murayama et al., 2018).

Кроме конденсинов и когезинов у эукариот имеется еще один комплекс SMC – Smc5–Smc6. Считается, что комплекс Smc5–Smc6 вовлечен в репликацию и репарацию ДНК, однако его свойства изучены намного хуже, чем свойства конденсинов и когезина. Недавно для данного комплекса была продемонстрирована способность экструдировать петли в условиях *in vitro*, аналогичная конденсинам и когезинам (Pradhan et al., 2023).

РОЛЬ КОМПЛЕКСОВ SMC БАКТЕРИЙ

У бактерий идентифицированы три основных вида комплексов SMC: SMC-ScpAB у *B. subtilis* и *Caulobacter crescentus*, SMC-подобный MukBEF у *E. coli* и других гамма-протеобактерий и дельта-протеобактерий и MukBEF-подобный MksBEF, обнаруженный у более широкого спектра бактерий. Эти комплексы SMC участвуют в сегрегации вновь реплицированных сестринских хромосом (Danilova et al., 2007; Yu et al., 2010; Minnen et al., 2011; Petrushenko et al., 2011; Schwartz, Shapiro, 2011; Wang et al., 2014). Наличие у бактерии хотя бы одного комплекса SMC является жизненно важным, что подтверждается в том числе наличием соответствующих генов у “минимальной” бактерии (Hutchison et al., 2016). В данной главе описаны бактериальные комплексы SMC главным образом на примере *B. subtilis*, а в последующих главах обсуждаются особенности других SMC-подобных комплексов (MukBEF и др.).

Комплекс SMC *B. subtilis* состоит из гомодимера SMC, клейзина ScpA и регуляторного белка типа KITE – ScpB. Было высказано предположение, что энергия гидролиза АТФ используется для активации комплекса SMC-ScpAB, что, в свою очередь, облегчает его связывание с сайтами parS (Minnen et al., 2016). Однако роль ScpB остается в значительной степени неизвестной. В то время как ScpB не принимает непосредственного участия в формировании кольцевой структуры комплекса, он необходим для активации АТФазной активности SMC и загрузки комплекса на ДНК (Wilhelm et al., 2015). Поэтому разумно предположить, что ScpB играет важную роль в регуляции SMC-ScpAB, изменяя конформацию комплекса.

В отличие от эукариот, у прокариот отсутствует когезия сестринских хроматид. У прокариот сегрегация сестринских хроматид связана с репликацией. SMC многих бактерий (например, у *B. subtilis*) загружаются на хромосомы в центромероподобных последовательностях parS, прилегающих к точке начала репликации, с помощью белка ParB, участвующего в сегрегации хромосом (Gruber, Errington, 2009). После связывания с ДНК комплексы SMC экструдируют петли ДНК (Ganji et al., 2018; Kim et al., 2020). Анализ Hi-C в *B. subtilis* показал, что SMC выполняют экструзию петель всей хромосомы размером в несколько миллионов пар оснований до тех пор, пока не будет достигнут макромономер Ter (Wang et al., 2017; Wang et al., 2018). Это приводит к тому, что две половины кольцевой хромосомы сшиваются, в результате хромосома приобретает серповидную форму.

РОЛЬ И ОСОБЕННОСТИ SMC-ПОДОБНЫХ КОМПЛЕКСОВ MukBEF И MksBEF

У бактерий без системы ParABS, таких как *E. coli*, SMC-подобный комплекс MukBEF неспецифически связывается с хромосомой (Nolivos et al., 2016; Japaridze et al., 2023). Состав комплекса MukBEF в целом гомологичен комплексам SMC бактерий (табл. 1). В отличие от комплекса SMC *B. subtilis* и других бактерий, факторы загрузки для SMC-подобных белков MukBEF и MksBEF в настоящее время неизвестны (возможно, они отсутствуют). Считают, что SMC-подобные комплексы MukBEF и MksBEF играют похожую роль на таковую у комплексов SMC (Zhou, 2022), однако благодаря MukBEF *E. coli* образует не серповидная, а кольцевидная хромосома. Визуализация бактериальной хромосомы в комплексе с SMC показала, что комплексы MukBEF формируют из ДНК многочисленные петли, которые образуют волночко, напоминающее конденсированные митотические хромосомы у эукариот (Mäkelä, Sherratt, 2020). Хотя трудно предложить альтернативную модель того, как комплексы SMC организуют бактериальные хромосомы, прямых доказательств экструзии петель бактериальными комплексами SMC в условиях *in vi-*

tro на одномолекулярном уровне до сих пор не было получено.

Некоторые виды бактерий имеют более одного вида комплексов SMC, присутствующих в одних и тех же клетках; например, виды *Pseudomonas* кодируют как SMC-ScpAB, так и гомолог MukBEF, MksBEF, при этом гены MksBEF встречаются у многих бактерий, как грамположительных, так и грамотрицательных. При этом MksBEF наряду с другими комплексами SMC участвуют в сегрегации ДНК (Zhao et al., 2020). Интересно отметить, что родственные комплексы MksBEFG (Weiß et al., 2023) участвуют в защите от чужеродной ДНК (подобно комплексам Wadjet, рассматриваемым далее).

РОЛЬ И ОСОБЕННОСТИ SMC-ПОДОБНЫХ КОМПЛЕКСОВ WADJET

Недавно были описаны новые системы бактерий, защищающие их от трансформации чужеродной ДНК подобно системам рестрикции-модификации, CRISPR-Cas и др. (Deer et al., 2022). Такие системы получили название Wadjet и представляют собой одну из разновидностей комплексов SMC. Показано, что структура полноразмерного комплекса JetABC схожа со структурой комплексов MukBEF и MksBEF, а процесс связывания ДНК в этих системах происходит практически идентично субъединицами JetC и MukB/MksB соответственно (Deer et al., 2022).

Системы Wadjet активны против кольцевых плазмид длиной до 100 т.п.н., осуществляя их разрезание в случайном месте. При этом линейные молекулы ДНК и бактериальный геном не подвергаются деградации под действием Wadjet. Для успешного разрезания чужеродной ДНК требуется АТФ. Таким образом, системы Wadjet, по-видимому, используют экструзию петель для того, чтобы отличить плазмиды от геномной ДНК.

Например, в одной из опубликованных работ (Liu et al., 2022) описана система JetABCD *E. coli*. Результаты криоэлектронной микроскопии показали, что комплекс представлен двумя гомодимерами JetC, которые находятся в конфигурации “димер из димеров”, ориентированы друг к другу под углом приблизительно равным 30° и связаны друг с другом комплексом JetAB. Что касается JetD, то согласно модели, полученной с помощью программы AlphaFold, он обладает высокой степенью гомологии с доменом TOPRIM ДНК-топоизомеразы VI.

Предполагают, что системы Wadjet распознают инвазивную ДНК на основе ее небольшого размера и кольцевой формы. Одна из гипотез гласит, что комплекс JetABCD производит экструзию плазмидной ДНК, в результате чего два комплекса JetABCD сближаются друг с другом и останавливаются, что может приводить к изменению конформации комплексов и служить сигналом для расщепления ДНК

двумя субъединицами JetD, которые в норме удалены друг от друга и неактивны, а при сближении образуют нуклеазный комплекс. Если же комплексы JetABCD находятся на хромосоме, то они, вероятно, не образуют нуклеазный комплекс, так как могут претерпевать спонтанную диссоциацию или диссоциируют в результате встречи с другими комплексами (Liu et al., 2022).

СВОЙСТВА SMC-ПОДОБНОГО БЕЛКА RecN

Важной задачей любого организма является поддержание целостности его генетического материала. У бактерий в результате повреждений ДНК, вызванных различными факторами, такими как ионизирующее излучение, активный кислород, воздействие химических веществ, воздействие УФ-излучения и др., возникает особое состояние, характеризующееся повышенной экспрессией генов, отвечающих за репарацию ДНК и называемое SOS-ответом. SOS-ответ – важный процесс, позволяющий клетке восстанавливать двунитевые разрывы ДНК с помощью рекомбинационной репарации (гомологичной рекомбинации). Не восстановленный или восстановленный неправильно, двунитевой разрыв ДНК может приводить к потере генетической информации, хромосомным перестройкам, мутагенезу и даже к клеточной гибели. Одним из важных участников SOS-ответа является белок RecN, относящийся к семейству SMS-белков (McLean et al., 2021).

Молекулярный механизм гомологичной рекомбинации, позволяющей восстановить разрыв ДНК, известен довольно хорошо, в то время как механизм поиска неповрежденного гомологичного участка ДНК, с некоторой вероятностью находящегося на значительном удалении от поврежденного участка, до сих пор изучен мало. Предполагается, что поиск такого участка осуществляется с помощью длинного филамента, образованного рекомбиназой RecA (Wiktor et al., 2021). Показано, что белок RecN принимает активное участие в поиске гомологии белком RecA (Chimthanawala et al., 2022). Считается, что белок RecN у бактерий формирует комплекс, предположительно состоящий из двух мономеров (Pellegrino et al., 2012). RecN, как и другие гомологи SMC, содержит длинный сверхспиральный участок с АТФазным доменом на конце. При димеризации этот участок образует ABC-подобный сайт, который способен связывать две молекулы АТФ. Механизм работы и функции белка RecN в настоящее время до конца не ясны, несмотря на то, что он играет важную роль в процессе репарации в бактериальных клетках. Известно, что RecN привлекается в центры репарации ДНК совместно с белком RecA, который является ключевым ферментом для осуществления гомологичной репарации и активации SOS-ответа у бактерий (Pellegrino et al., 2012; Keyamura et al., 2013; Lesterlin et al., 2014).

Согласно данным, полученным в условиях *in vitro*, RecA стимулирует АТФазную активность RecN, а RecN в свою очередь стимулирует процесс переноса гомологичных нитей, являющийся одной из ключевых функций белка RecA (Uranga et al., 2017). RecN также может взаимодействовать с концевыми участками однострессовой ДНК и никированными участками двустрессовой ДНК, образуя из них петли при наличии АТФ (Sanchez et al., 2008).

Также было обнаружено, что RecN играет роль в поиске RecA гомологичных участков ДНК на больших расстояниях в процессе рекомбинации (Chimthanawala et al., 2022). После возникновения двустрессового разрыва ДНК, RecA скапливается в этой области и формирует филамент, который движется по клетке. Транслокация филамента RecA сопровождается изменением его длины, при этом филамент RecA делает множество обходов клетки, пока не найдет гомологичную последовательность, после чего происходит восстановление разрыва ДНК. Пока неизвестно, как именно, но RecN играет важную роль в этом процессе как основной участник в поиске гомологии и репарации разрыва ДНК с помощью гомологической рекомбинации.

Интересно отметить, что в отличие от других комплексов SMC, для RecN до сих пор не найдены такие партнеры, как клейзин и вспомогательные белки типа KITE и HAWK. Возможно, такие партнеры отсутствуют, что делает RecN уникальным среди других SMC-подобных белков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Комплексы SMC являются важными компонентами любой живой клетки, в том числе бактериальной, и вовлечены в такие процессы, как репликация и сегрегация ДНК, репарация, а также защита от чужеродной ДНК. В данном обзоре рассмотрены известные на сегодняшний день представители семейства комплексов SMC, имеющиеся у бактерий. Сравнение комплексов SMC, MukBEF, MksBEF, Wadjet и RecN бактерий позволяет сделать вывод о высокой консервативности комплексов SMC по их составу, за исключением RecN, для которого не найдены другие субъединицы комплекса. С учетом высокой гомологии комплексов SMC, приведено также краткое описание эукариотических комплексов SMC. Интересно отметить, что ключевое свойство для комплексов SMC — экструзия петель — до сих пор напрямую не продемонстрировано для комплексов SMC бактерий, в отличие от SMC эукариот.

Дальнейшие исследования должны продемонстрировать способность бактериальных комплексов SMC осуществлять экструзию петель в условиях *in vitro*. Кроме того, необходимо прояснить роль АТФазной активности в данном процессе. Данная роль до сих пор является гипотетической для всех комплексов SMC. Также требуется детально исследовать роль

вспомогательных белков, входящих в комплексы SMC. Для белка RecN необходимо выяснить, действительно ли данный белок образует комплекс без клейзина и других партнеров.

Можно предположить, что рассмотренные в данной обзорной работе бактериальные комплексы SMC являются не единственными, и в ближайшее время предстоит открытие новых представителей данного семейства.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы работы выражают благодарность Побегалову Георгию Евгеньевичу за плодотворное обсуждение рукописи данной работы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-74-00072).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Alipour E., Marko J.F. 2012. Self-organization of domain structures by DNA-loop-extruding enzymes. *Nucleic Acids Res.* V. 40. P. 11202.
- Arold S.T., Leonard P.G., Parkinson G.N., Ladbury J.E. 2010. H-NS forms a superhelical protein scaffold for DNA condensation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 107. P. 15728.
- Bensaid A., Almeida A., Drlica K., Rouviere-Yaniv J. 1996. Cross-talk between topoisomerase I and HU in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* V. 256. P. 292.
- Bürmann F., Lee B.G., Than T., Sinn L., O'Reilly F.J., Yatskevich S., Rappsilber J., Hu B., Nasmyth K., Löwe J. 2019. A folded conformation of MukBEF and cohesin. *Nat. Struct. Mol. Biol.* V. 26. P. 227.
- Cabeen M.T., Jacobs-Wagner C. 2010. The bacterial cytoskeleton. *Annu. Rev. Genet.* V. 44P. 365.
- Chimthanawala A., Parmar J.J., Kumar S., Iyer K.S., Rao M., Badrinarayanan A. 2022. SMC protein RecN drives RecA filament translocation for *in vivo* homology search. *Proc. Natl. Acad. Sci.* V. 119. P. e2209304119.
- Dame R.T., Noom M.C., Wuite G.J. 2006. Bacterial chromatin organization by H-NS protein unravelled using dual DNA manipulation. *Nature.* V. 444. P. 387.
- Dame R.T., Rashid F.-Z.M., Grainger D.C. 2020. Chromosome organization in bacteria: mechanistic insights into genome structure and function. *Nat. Rev. Genet.* V. 21. P. 227.
- Danilova O., Reyes-Lamothe R., Pinskaya M., Sherratt D., Possoz C. 2007. MukB colocalizes with the oriC region and is required for organization of the two *Escherichia coli* chro-

- mosome arms into separate cell halves. *Mol. Microbiol.* V. 65. P. 1485.
- Deep A., Gu Y., Gao Y.Q., Ego K.M., Herzik M.A., Jr., Zhou H., Corbett K.D. 2022. The SMC-family Wadjet complex protects bacteria from plasmid transformation by recognition and cleavage of closed-circular DNA. *Mol. Cell.* V. 82. P. 4145.e7.
- Diebold-Durand M.L., Lee H., Ruiz Avila L.B., Noh H., Shin H.C., Im H., Bock F.P., Bürmann F., Durand A., Basfeld A., Ham S., Basquin J., Oh B.H., Gruber S. 2017. Structure of full-length SMC and rearrangements required for chromosome organization. *Mol. Cell.* V. 67. P. 334.e5.
- Eltsov M., MacLellan K.M., Maeshima K., Frangakis A.S., Dubochet J. 2008. Analysis of cryo-electron microscopy images does not support the existence of 30-nm chromatin fibers in mitotic chromosomes in situ. *Proc. Natl. Acad. Sci.* V. 105. P. 19732.
- Ganji M., Shaltiel I.A., Bisht S., Kim E., Kalichava A., Haering C.H., Dekker C. 2018. Real-time imaging of DNA loop extrusion by condensin. *Science.* V. 360. P. 102.
- Georgatos S.D., Markaki Y., Christogianni A., Politou A.S. 2009. Chromatin remodeling during mitosis: a structure-based code? *Front. Biosci. (Landmark Ed).* V. 14. P. 2017.
- Gibcus J.H., Samejima K., Goloborodko A., Samejima I., Naimova N., Nuebler J., Kanemaki M.T., Xie L., Paulson J.R., Earnshaw W.C., Mirny L.A., Dekker J. 2018. A pathway for mitotic chromosome formation. *Science.* V. 359: eaao6135.
- Gligoris T.G., Scheinost J.C., Bürmann F., Petela N., Chan K.L., Uluocak P., Beckouët F., Gruber S., Nasmyth K., Löwe J. 2014. Closing the cohesin ring: Structure and function of its Smc3-kleisin interface. *Science.* V. 346. P. 963.
- Gordon B.R., Li Y., Cote A., Weirauch M.T., Ding P., Hughes T.R., Navarre W.W., Xia B., Liu J. 2011. Structural basis for recognition of AT-rich DNA by unrelated xenogeneic silencing proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 108. P. 10690.
- Grainger D.C. 2016. Structure and function of bacterial H-NS protein. *Biochem. Soc. Trans.* V. 44. P. 1561.
- Grove A. 2011. Functional evolution of bacterial histone-like HU proteins. *Curr. Issues Mol. Biol.* V. 13. P. 1.
- Gruber S., Errington J. 2009. Recruitment of condensin to replication origin regions by ParB/SpoOJ promotes chromosome segregation in *B. subtilis*. *Cell.* V. 137. P. 685.
- Gruber S., Haering C.H., Nasmyth K. 2003. Chromosomal cohesin forms a ring. *Cell.* V. 112. P. 765.
- Gutierrez-Escribano P., Newton M.D., Llauró A., Huber J., Tanasie L., Davy J., Aly I., Aramayo R., Montoya A., Kramer H., Stigler J., Rueda D. S., Aragon L. 2019. A conserved ATP- and Scc2/4-dependent activity for cohesin in tethering DNA molecules. *Sci. Adv.* V. 5: eaay6804.
- Haering C.H., Farcas A.-M., Arumugam P., Metson J., Nasmyth K. 2008. The cohesin ring concatenates sister DNA molecules. *Nature.* V. 454. P. 297.
- Hancock S.P., Stella S., Cascio D., Johnson R.C. 2016. DNA sequence determinants controlling affinity, stability and shape of DNA complexes bound by the nucleoid protein Fis. *PLoS One.* V. 11: e0150189.
- Hirano T. 2002. The ABCs of SMC proteins: two-armed ATPases for chromosome condensation, cohesion, and repair. *Genes Dev.* V. 16. P. 399.
- Hirota T., Gerlich D., Koch B., Ellenberg J., Peters J.M. 2004. Distinct functions of condensin I and II in mitotic chromosome assembly. *J. Cell Sci.* V. 117. P. 6435.
- Hons M.T., Huis In't Veld P.J., Kaesler J., Rombaut P., Schleiffer A., Herzog F., Stark H., Peters J. M. 2016. Topology and structure of an engineered human cohesin complex bound to Pds5B. *Nat Commun.* V. 7P: 12523.
- Hutchison C.A., Chuang R.-Y., Noskov V.N., Assad-Garcia N., Deerinck T.J., Ellisman M.H., Gill J., Kannan K., Karas B.J., Ma L., Pelletier J.F., Qi Z.-Q., Richter R.A., Strychalski E.A., Sun L., et al. 2016. Design and synthesis of a minimal bacterial genome. *Science.* V. 351: aad6253.
- Ishiguro K.I. 2019. The cohesin complex in mammalian meiosis. *Genes Cells.* V. 24. P. 6.
- Japaridze A., van Wee R., Gogou C., Kerssemakers J.W.J., van den Berg D.F., Dekker C. 2023. MukBEF-dependent chromosomal organization in widened *Escherichia coli*. *Front. Microbiol.* V. 14P: 1107093.
- Keyamura K., Sakaguchi C., Kubota Y., Niki H., Hishida T. 2013. RecA protein recruits structural maintenance of chromosomes (SMC)-like RecN protein to DNA double-strand breaks. *J. Biol. Chem.* V. 288. P. 29229.
- Kim E., Barth R., Dekker C. 2023. Looping the genome with SMC complexes. *Annu. Rev. Biochem.* V. 92. P. 15.
- Kim E., Kerssemakers J., Shaltiel I.A., Haering C.H., Dekker C. 2020. DNA-loop extruding condensin complexes can traverse one another. *Nature.* V. 579. P. 438.
- Lammens A., Schele A., Hopfner K.P. 2004. Structural biochemistry of ATP-driven dimerization and DNA-stimulated activation of SMC ATPases. *Curr. Biol.* V. 14. P. 1778.
- Larionov V.L., Karpova T.S., Kouprina N.Y., Jouravleva G.A. 1985. A mutant of *Saccharomyces cerevisiae* with impaired maintenance of centromeric plasmids. *Curr. Genet.* V. 10. P. 15.
- Lesterlin C., Ball G., Schermelleh L., Sherratt D.J. 2014. RecA bundles mediate homology pairing between distant sisters during DNA break repair. *Nature.* V. 506. P. 249.
- Liu H.W., Roisné-Hamelin F., Beckert B., Li Y., Myasnikov A., Gruber S. 2022. DNA-measuring Wadjet SMC ATPases restrict smaller circular plasmids by DNA cleavage. *Mol. Cell.* V. 82. P. 4727.e6.
- Mäkelä J., Sherratt D.J. 2020. Organization of the *Escherichia coli* chromosome by a MukBEF axial core. *Mol. Cell.* V. 78. P. 250.e5.
- McLean E.K., Lenhart J.S., Simmons L.A. 2021. RecA is required for the assembly of RecN into DNA repair complexes on the nucleoid. *J. Bacteriol.* V. 203: e0024021.
- Minnen A., Attaiech L., Thon M., Gruber S., Veening J.W. 2011. SMC is recruited to oriC by ParB and promotes chromosome segregation in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* V. 81. P. 676.
- Minnen A., Bürmann F., Wilhelm L., Anchiimiuk A., Diebold-Durand M.L., Gruber S. 2016. Control of SMC coiled coil architecture by the ATPase heads facilitates targeting to chromosomal ParB/parS and release onto flanking DNA. *Cell Rep.* V. 14. P. 2003.
- Murayama Y., Samora C.P., Kurokawa Y., Iwasaki H., Uhlmann F. 2018. Establishment of DNA-DNA interactions by the cohesin ring. *Cell.* V. 172. P. 465.e15.

- Nasmyth K. 2001. Disseminating the genome: joining, resolving, and separating sister chromatids during mitosis and meiosis. *Annu. Rev. Genet.* V. 35. P. 673.
- Nolivos S., Sherratt D. 2014. The bacterial chromosome: architecture and action of bacterial SMC and SMC-like complexes. *FEMS Microbiol. Rev.* V. 38. P. 380.
- Nolivos S., Upton A.L., Badrinarayanan A., Muller J., Zawadzka K., Wiktor J., Gill A., Arciszewska L., Nicolas E., Sherratt D. 2016. MatP regulates the coordinated action of topoisomerase IV and MukBEF in chromosome segregation. *Nat. Commun.* V. 7: 10466.
- Olins A.L., Olins D.E. 1974. Spheroid chromatin units (v bodies). *Science.* V. 183. P. 330.
- Ou H.D., Phan S., Deerinck T.J., Thor A., Ellisman M.H., O'Shea C.C. 2017. ChromEMT: Visualizing 3D chromatin structure and compaction in interphase and mitotic cells. *Science.* V. 357: eaag0025.
- Palecek J.J., Gruber S. 2015. Kite proteins: a superfamily of SMC/Kleisin partners conserved across Bacteria, Archaea, and Eukaryotes. *Structure.* V. 23. P. 2183.
- Pellegrino S., Radzimanowski J., de Sanctis D., Boeri Erba E., McSweeney S., Timmins J. 2012. Structural and functional characterization of an SMC-like protein RecN: new insights into double-strand break repair. *Structure.* V. 20. P. 2076.
- Petrushenko Z.M., She W., Rybenkov V.V. 2011. A new family of bacterial condensins. *Mo. Microbiol.* V. 81. P. 881.
- Pradhan B., Kanno T., Umeda Igarashi M., Loke M.S., Baaske M.D., Wong J.S.K., Jeppsson K., Björkegren C., Kim E. 2023. The Smc5/6 complex is a DNA loop-extruding motor. *Nature.* V. 616. P. 843.
- Rice P.A., Yang S., Mizuuchi K., Nash H.A. 1996. Crystal structure of an IHF-DNA complex: a protein-induced DNA U-turn. *Cell.* V. 87. P. 1295.
- Riggs A.D. 1990. DNA methylation and late replication probably aid cell memory, and type I DNA reeling could aid chromosome folding and enhancer function. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* V. 326. P. 285.
- Rouvière-Yaniv J., Gros F. 1975. Characterization of a novel, low-molecular-weight DNA-binding protein from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 72. P. 3428.
- Sanborn A.L., Rao S.S., Huang S.C., Durand N.C., Huntley M.H., Jewett A.I., Bochkov I.D., Chinnappan D., Cutkosky A., Li J., Geeting K.P., Gnirke A., Melnikov A., McKenna D., Stamenova E.K., et al. 2015. Chromatin extrusion explains key features of loop and domain formation in wild-type and engineered genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 112. P. E6456.
- Sanchez H., Cardenas P.P., Yoshimura S.H., Takeyasu K., Alonso J.C. 2008. Dynamic structures of *Bacillus subtilis* RecN-DNA complexes. *Nucleic Acids Res.* V. 36. P. 110.
- Schleiffer A., Kaitna S., Maurer-Stroh S., Glotzer M., Nasmyth K., Eisenhaber F. 2003. Kleisins: a superfamily of bacterial and eukaryotic SMC protein partners. *Mol. Cell.* V. 11. P. 571.
- Schneider R., Lurz R., Lüder G., Tolksdorf C., Travers A., Muskhelishvili G. 2001. An architectural role of the *Escherichia coli* chromatin protein FIS in organising DNA. *Nucleic Acids Res.* V. 29. P. 5107.
- Schwartz M.A., Shapiro L. 2011. An SMC ATPase mutant disrupts chromosome segregation in *Caulobacter*. *Mol. Microbiol.* V. 82. P. 1359.
- Shintomi K., Inoue F., Watanabe H., Ohsumi K., Ohsugi M., Hirano T. 2017. Mitotic chromosome assembly despite nucleosome depletion in *Xenopus* egg extracts. *Science.* V. 356. P. 1284.
- Smits W.K., Grossman A.D. 2010. The transcriptional regulator Rok binds A+T-rich DNA and is involved in repression of a mobile genetic element in *Bacillus subtilis*. *PLoS Genet.* V. 6: e1001207.
- Srinivasan M., Fumasoni M., Petela N.J., Murray A., Nasmyth K.A. 2020. Cohesion is established during DNA replication utilising chromosome associated cohesin rings as well as those loaded de novo onto nascent DNAs. *Elife.* V. 9: e56611.
- Stella S., Cascio D., Johnson R.C. 2010. The shape of the DNA minor groove directs binding by the DNA-bending protein Fis. *Genes Dev.* V. 24. P. 814.
- Stojkova P., Spidlova P., Stulik J. 2019. Nucleoid-associated protein HU: A lilliputian in gene regulation of bacterial virulence. *Fron. Cell. Infect. Microbiol.* V. 9: 159.
- Strunnikov A.V., Larionov V.L., Koshland D. 1993. SMC1: an essential yeast gene encoding a putative head-rod-tail protein is required for nuclear division and defines a new ubiquitous protein family. *J. Cell Biol.* V. 123. P. 1635.
- Sutani T., Yanagida M. 1997. DNA renaturation activity of the SMC complex implicated in chromosome condensation. *Nature.* V. 388. P. 798.
- Swinger K.K., Rice P.A. 2007. Structure-based analysis of HU-DNA binding. *J. Mol. Biol.* V. 365. P. 1005.
- Tran N.T., Laub M.T., Le T.B.K. 2017. SMC progressively aligns chromosomal arms in *Caulobacter crescentus* but is antagonized by convergent transcription. *Cell Rep.* V. 20. P. 2057.
- Uranga L.A., Reyes E.D., Patidar P.L., Redman L.N., Lusetti S.L. 2017. The cohesin-like RecN protein stimulates RecA-mediated recombinational repair of DNA double-strand breaks. *Nat. Commun.* V. 8: 15282.
- van Noort J., Verbrugge S., Goosen N., Dekker C., Dame R.T. 2004. Dual architectural roles of HU: formation of flexible hinges and rigid filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 101. P. 6969.
- Wang X., Brandão H.B., Le T.B., Laub M.T., Rudner D.Z. 2017. *Bacillus subtilis* SMC complexes juxtapose chromosome arms as they travel from origin to terminus. *Science.* V. 355. P. 524.
- Wang X., Hughes A.C., Brandão H.B., Walker B., Lierz C., Cochran J.C., Oakley M.G., Kruse A.C., Rudner D.Z. 2018. In vivo evidence for ATPase-dependent DNA translocation by the *Bacillus subtilis* SMC condensin complex. *Mol. Cell.* V. 71. P. 841.e5.
- Wang X., Le T.B., Lajoie B.R., Dekker J., Laub M.T., Rudner D.Z. 2015. Condensin promotes the juxtaposition of DNA flanking its loading site in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.* V. 29. P. 1661.
- Wang X., Tang O.W., Riley E.P., Rudner D.Z. 2014. The SMC condensin complex is required for origin segregation in *Bacillus subtilis*. *Curr. Biol.* V. 24. P. 287.
- Weiß M., Giacomelli G., Assaya Mathilde B., Grundt F., Haouz A., Peng F., Petrella S., Wehenkel Anne M., Bramkamp M. 2023. The MksG nuclease is the executing part of the bacterial plasmid defense system MksBEFG. *Nucleic Acids Res.* V. 51. P. 3288.
- Wells J.N., Gligoris T.G., Nasmyth K.A., Marsh J.A. 2017. Evolution of condensin and cohesin complexes driven by re-

- placement of Kite by Hawk proteins. *Curr. Biol.* V. 27. P. R17.
- Wiktor J., Gynnå A.H., Leroy P., Larsson J., Coceano G., Testa I., Elf J. 2021. RecA finds homologous DNA by reduced dimensionality search. *Nature.* V. 597. P. 426.
- Wilhelm L., Bürmann F., Minnen A., Shin H.C., Toseland C.P., Oh B.H., Gruber S. 2015. SMC condensin entraps chromosomal DNA by an ATP hydrolysis dependent loading mechanism in *Bacillus subtilis*. *Elife.* V. 4: e06659.
- Witz G., Stasiak A. 2010. DNA supercoiling and its role in DNA decatenation and unknotting. *Nucleic Acids Res.* V. 38. P. 2119.
- Xu P., Mahamid J., Dombrowski M., Baumeister W., Olins A.L., Olins D.E. 2021. Interphase epichromatin: last refuge for the 30-nm chromatin fiber? *Chromosoma.* V. 130. P. 91.
- Yatskevich S., Rhodes J., Nasmyth K. 2019. Organization of chromosomal DNA by SMC complexes. *Annu. Rev. Genet.* V. 53. P. 445.
- Yoshimura S.H., Hizume K., Murakami A., Sutani T., Takeyasu K., Yanagida M. 2002. Condensin architecture and interaction with DNA: regulatory non-SMC subunits bind to the head of SMC heterodimer. *Curr. Biol.* V. 12. P. 508.
- Yoshinaga M., Inagaki Y. 2021. Ubiquity and origins of structural maintenance of chromosomes (SMC) proteins in Eukaryotes. *Genome Biol. Evol.* V. 13: evab256.
- Yu W., Herbert S., Graumann P.L., Götz F. 2010. Contribution of SMC (structural maintenance of chromosomes) and SpoIIIE to chromosome segregation in *Staphylococci*. *J. Bacteriol.* V. 192. P. 4067.
- Zhang N., Kuznetsov S.G., Sharan S.K., Li K., Rao P.H., Pati D. 2008. A handcuff model for the cohesin complex. *J. Cell Biol.* V. 183. P. 1019.
- Zhao H., Bhowmik B.K., Petrushenko Z.M., Rybenkov V.V. 2020. Alternating dynamics of *oriC*, SMC, and MksBEF in segregation of *Pseudomonas aeruginosa* chromosome. *mSphere.* V. 5: e00238-20.
- Zhou M. 2022. DNA sliding and loop formation by *E. coli* SMC complex: MukBEF. *Biochem. Biophys. Rep.* V. 31: 101297.

Structural and Functional Features of Bacterial SMC Complexes

N. E. Morozova^a, A. S. Potysyeva^a, and A. D. Vedyaykin^{a, *}

^a*Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, NIK "Nanobiotechnologies", St. Petersburg, 195251 Russia*

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

SMC complexes (Structural maintenance of chromosomes) are key participants in the spatial organization of DNA in all living organisms – in bacteria, archaea and eukaryotes. In bacteria, there are several homologues of SMC complexes that perform seemingly unrelated functions, but function through very similar, highly conserved mechanisms. In recent years, it has been established that SMC complexes are capable of forming loops from DNA (through the so-called loop extrusion), which allows them to be considered as a separate class of DNA translocases. This paper discusses bacterial SMC complexes in comparison with their homologues such as MukBEF, MksBEF, RecN, and Wadjet, as well as with eukaryotic SMC complexes. Their properties, role and functions in the key processes of the bacterial cell are discussed.

Keywords: SMC, chromosome segregation, three-dimensional structure of chromosomes, loop extrusion, DNA translocase

МЕТАБОЛИЗМ И РЕЦЕПТОРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ НИАЦИНА

© 2023 г. С. Е. Бороновский¹, В. С. Копылова^{1, *}, Я. Р. Нарциссов^{1, 2}

¹Научно-исследовательский институт цитохимии и молекулярной фармакологии, Москва, 115404 Россия

²Биомедицинская исследовательская группа BiDiPharma GmbH, Siek, 22962 Germany

*E-mail: kopilova.veronika@yandex.ru

Поступила в редакцию 26.04.2023 г.

После доработки 11.07.2023 г.

Принята к публикации 13.07.2023 г.

В работе обсуждается метаболизм ниацина, также известного как витамин В3 или РР, и механизмы его рецепторного действия в организме человека. Ниацин существует в виде различных молекулярных соединений, которые действуют как предшественники никотинамидных коферментов. Эти коферменты играют решающую роль в метаболизме, являясь донорами или акцепторами электронов в окислительно-восстановительных реакциях, катализируемых различными ферментами. Поддержание внутриклеточного пула ниацина жизненно важно не только для окислительно-восстановительного метаболизма, но и для функционирования NAD-зависимых путей. При этом патофизиологические ситуации и изменение активности ферментов могут влиять на потребность в различных формах ниацина. Помимо опосредованного воздействия через никотинамидные коферменты, он также имеет ряд прямых эффектов, включающих в себя антилиполитическую, вазодилататорную и нейропротекторную функции, точный механизм действия которых в настоящее время до конца не исследован. В целом, ниацин играет жизненно важную роль в поддержании эффективного функционирования клетки, и дальнейшее изучение его влияния на различные физиологические процессы, включая микробиом кишечника и эпигенетическую регуляцию, может привести к новым открытиям и методам лечения различных заболеваний.

Ключевые слова: витамин В3, ниацин, метаболизм, NAD

DOI: 10.31857/S0041377123060032, **EDN:** QMLAPN

Ниацин (витамин В3, РР) – водорастворимый витамин, который в организме человека существует в форме оснований (никотиновой кислоты (NA), никотинамида (NAM)) и их нуклеозидов (рибозид никотинамида (NR) и рибозид никотиновой кислоты (NAR)), показанных на рис. 1. Эти молекулярные соединения являются предшественниками никотинамидных коферментов, к числу которых относятся никотинамидадениндинуклеотид (NAD) и его фосфорилированная форма – никотинамидадениндинуклеотидфосфат (NADP), а также восстановленные формы этих соединений – NADH и NADPH соответственно. В составе данных нуклеотидов никотинамидная составляющая действует как донор

или акцептор электронов во многих жизненно важных окислительно-восстановительных реакциях, катализируемых десятками различных ферментов. Незаменимая аминокислота триптофан в клетках млекопитающих частично может служить еще одним источником NAD. Оба никотинамидных кофермента выполняют разные функции в метаболизме: очень высокое соотношение $NAD^+/NADH$ способствует окислительному катаболизму, в результате чего происходит синтез АТФ. В физиологических условиях соотношение свободного $NAD^+/NADH$ в цитозоле составляет около 700 (Vina et al., 2016), хотя это значение может варьировать в диапазоне 500–1000 (Goodman et al., 2018), в то время как в митохондриях это соотношение существенно ниже (7–10) (Yang, Sauve, 2016). В свою очередь, низкое соотношение $NADP^+/NADPH$, порядка 10^{-3} – 10^{-2} (Goodman et al., 2018), обеспечивает сильно восстанавливающую среду для биосинтетических реакций. При этом при исследовании опухолевых клеток человека было показано, что в митохондриях это соотношение также в несколько раз ниже, чем в цитозоле и ядре (Sallin et al., 2018). Поддержание внутриклеточно-

Принятые сокращения: ART – ADP-рибозилтрансферазы; NA – никотиновая кислота; NAAD – адениндинуклеотид NA; NAD и NADH – никотинамидадениндинуклеотид и его восстановленная форма соответственно; NADP и NADPH – никотинамидадениндинуклеотидфосфат и его восстановленная форма соответственно; NAM – никотинамид; NAMN – моонуклеотид NA; NAMPT – NAM-фосфорилтрансфераза; NAPRT – NA-фосфорилтрансфераза; NAR – рибозид NA; NMN – никотинамидмоонуклеотид; NR – рибозид никотинамида; NRK – никотинамидрибозидкиназа; SIRT – сиртуины.

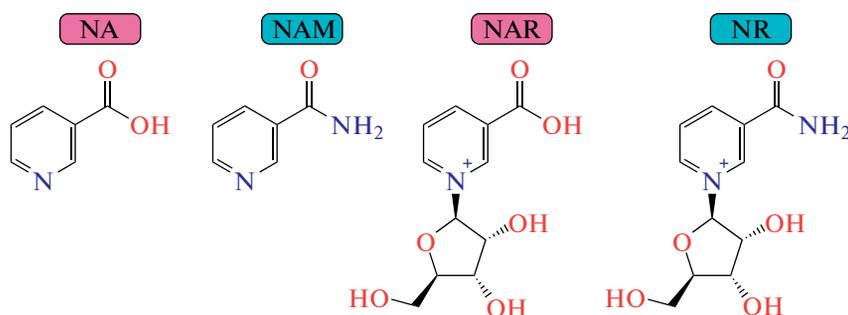


Рис. 1. Различные формы ниацина: никотиновая кислота (NA), никотинамид (NAM), рибозид никотиновой кислоты (NAR) и рибозид никотинамида (NR).

го пула NAD важно не только для обеспечения окислительно-восстановительного метаболизма, но и для функционирования других NAD-зависимых путей. Так, NAD является субстратом важнейших для жизнедеятельности клетки регуляторных белков, таких как ADP-рибозилтрансферазы, поли(ADP-рибоза)полимеразы и деацетилазы белков. ADP-рибозилтрансферазы расщепляют NAD до NAM и ADP-рибозильных продуктов, которые играют ключевую роль в клеточных сигнальных каскадах, регулирующих экспрессию генов, клеточный цикл, секрецию инсулина и репарацию ДНК (Anderson et al., 2017). Кроме того, эти ферменты участвуют в апоптозе, биогенезе митохондрий, ответе на ЭР-стресс и других жизненно необходимых процессах (Куликова и др., 2018). Также NAD является эндогенным агонистом пуриnergических рецепторов P2Y(1) и P2Y(11), посредством которых он активирует иммунные клетки (Klein et al., 2009). Таким образом, уровень динуклеотида должен постоянно поддерживаться на физиологическом уровне для обеспечения эффективного функционирования клетки.

МЕХАНИЗМЫ, СОПРЯЖЕННЫЕ С ПОТРЕБЛЕНИЕМ НИАЦИНА

NA, NAM и их нуклеозиды поступают в организм преимущественно экзогенно, а затем используются для биосинтеза NAD и NADP, что является основным способом регуляции уровня никотинамидных коферментов в клетках млекопитающих. Поскольку NAD и NADP не могут пересекать клеточные мембраны, они расщепляются в кишечнике до никотинамидмононуклеотида (NMN) и NR (Canto, 2022). При этом было показано, что перорально введенные NR и NMN превращаются в NAM до попадания в системный кровоток, тогда как при внутривенной инъекции эти соединения могут метаболизироваться до NAM непосредственно в кровотоке (Liu et al., 2018). В свою очередь, NAM, как правило, преобразуется кишечным микробиомом посредством нико-

тинамидазы PncA в NA, которая, попадая через воротную вену в печень, является стабильным прекурсором NAD в данном органе (Shats et al., 2020). Интересно, что этот процесс играет большую роль на более поздней стадии синтеза NAD в печени после перорального введения NR или NAM, тогда как на ранней стадии уровень NAD повышается непосредственно за счет NR и NAM, поступающих с кровью из тонкого кишечника (Yaku et al., 2021). В целом, скорость и эффективность метаболизма различных предшественников NAD существенно зависит от состава кишечного микробиома.

Следует отметить, что уровень ниацина, циркулирующего в крови человека, является достаточно низким. Так, в соответствии с рядом экспериментальных работ, концентрация NAM в плазме человека составляет 0.4–0.8 мкМ (Trammell et al., 2016; Grant et al., 2019; Ito et al., 2020), однако наблюдали и более высокие уровни NAM, вплоть до 60 мкМ (Clement et al., 2019). При этом концентрации NA и NR в плазме человека существенно ниже и находятся в наномолярном диапазоне, составляя соответственно 100–300 нМ (Clement et al., 2019) и 15–45 нМ (Airhart et al., 2017; Nakagawa-Nagahama et al., 2023). В свою очередь, уровень NAR в крови человека является минимальным из всех форм ниацина (1 нМ) (Nakagawa-Nagahama et al., 2023).

Синтез никотинамидных коферментов. Эффективность ниацина как предшественника никотинамидных коферментов определяется активностью ферментов, способствующих его превращению в NAD, поскольку скорость транспорта его форм через клеточную мембрану не является лимитирующим фактором (Canto, 2022). Установлены различные неспецифические переносчики, посредством которых описанные выше предшественники NAD попадают в клетку. NAM является исключением в связи с тем, что его переносчик не был идентифицирован (Canto, 2022). Существует предположение, что он попадает в клетки путем простой диффузии, однако ско-

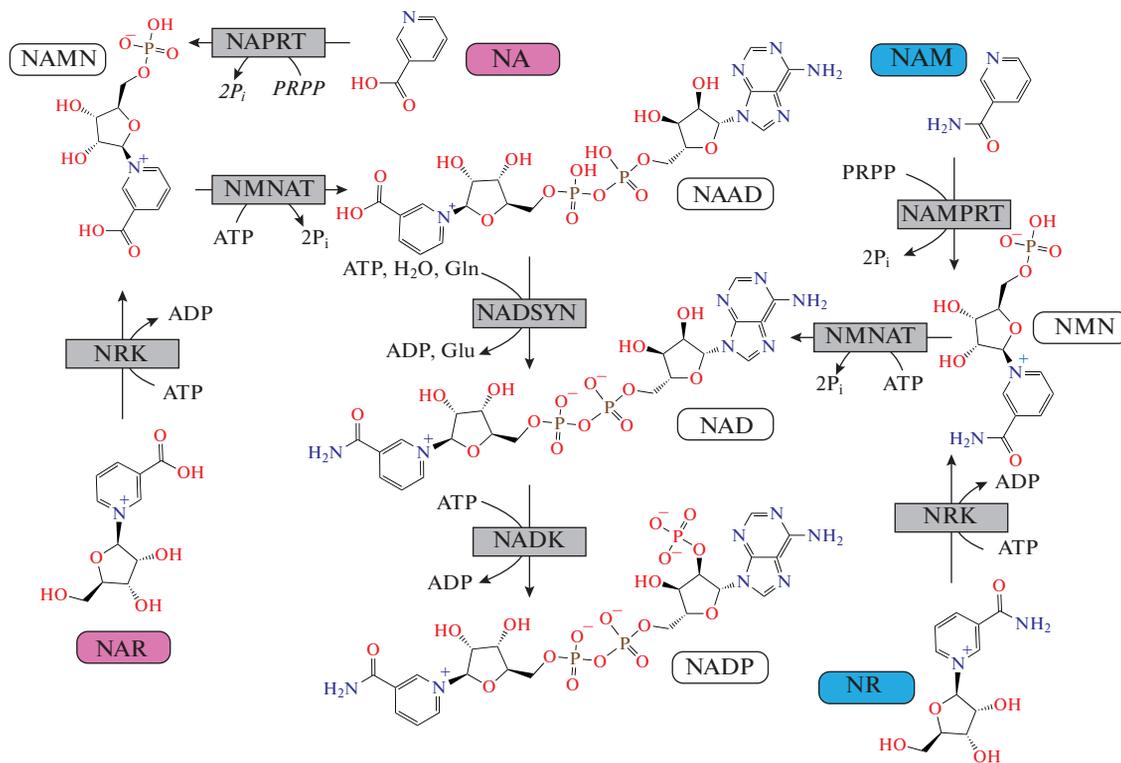


Рис. 2. Пути синтеза NAD/NADP из никотинамида, никотиновой кислоты и их рибозидов. NAMPRT – никотинамид фосфорибозилтрансферазы; NMNAT – никотинамидмононуклеотид аденилтрансферазы; NRK – никотинамидрибозидкиназа; NAPRT – фосфорибозилтрансфераза никотиновой кислоты; NADSYN – ATP-зависимая NAD-синтетаза; NADK – NAD-киназа.

рость диффузии NAM через клеточную мембрану плохо изучена (Zapata-Perez et al., 2021). Кроме того, в качестве предшественника никотинамидных коферментов может выступать незаменимая аминокислота триптофан. Синтез NAD из L-триптофана происходит посредством кинуренинового пути, включающего несколько ферментативных реакций, в процессе протекания которых происходит образование пиридинового кольца. В связи с этим этот путь носит название *de novo*. В целом, в клетках млекопитающих все пути биосинтеза NAD можно условно разделить на две основные группы: “амидированный” и “деамидированный” пути. NAM и NR содержат амидную группу и относятся к первому типу. В свою очередь, пути синтеза NAD из триптофана, NA, а также NAR образуют вторую группу. В ходе экспериментального исследования двух альтернативных путей биосинтеза в различных тканях мышей в физиологических условиях было показано, что практически во всех клетках преобладает “амидированный” путь (Mori et al., 2014). При этом самые высокие скорости синтеза NAD наблюдали в печени и почках, а самые низкие – в крови. Наибольшая относительная доля синтезированного по “деамидированному” пути NAD характерна для клеток крови

и тонкого кишечника, при этом в крови этот путь может вносить больший вклад в увеличение общего пула NAD при добавлении достаточного количества NA. Из-за высокой потребности большинства типов клеток в NAD и NADP нарушение этих путей биосинтеза приводит к сильному падению их клеточной концентрации, что в конечном итоге может являться причиной гибели клеток.

Амидированный путь. Путь биосинтеза NAD, берущий свое начало от NAM, является самым коротким и протекает в две стадии (рис. 2). Первая реакция, катализируемая NAM-фосфорибозилтрансферазой (NAMPRT, EC 2.4.2.12), превращает субстраты NAM и 5'-фосфорибозил-1-пирофосфат (PRPP) в NMN. Далее NMN преобразуется в NAD за счет никотинамидмононуклеотид аденилтрансферазы (NMNAT, EC 2.7.7.1). В большинстве исследованных к настоящему времени клеток лимитирующей стадией NAM-индуцированного синтеза NAD является первая реакция. Необходимо отметить, что существует экспериментально обоснованная гипотеза, в соответствии с которой NMN может выступать в роли внеклеточного предшественника NAD, проникая в клетку напрямую посредством специфического транспортера SLC12A8 (Grozio et al., 2019). Однако

есть ряд подтвержденных данных, доказывающих, что NMN дефосфорилируется NR перед транспортом в клетку (Schmidt, Brenner, 2019). Таким образом, необходимы дополнительные исследования для подтверждения транспорта NMN через клеточную мембрану, а также его роли в поддержании клеточного пула NAD.

NAMPRT представляет собой димерную фосфорибозилтрансферазу типа II, которая экспрессируется почти во всех исследованных тканях и клетках, что предполагает плеiotропные функции фермента в организме человека (Garten et al., 2015). Кроме того, аминокислотная последовательность этого фермента обладает значительной консервативностью у различных организмов, начиная от прокариот и примитивных многоклеточных животных и заканчивая млекопитающими. Данный факт свидетельствует о жизненно важной роли NAMPRT в функционировании клеток. При этом и экспрессия, и активность NAMPRT модулируются клеточными уровнями NAD, что позволяет поддерживать необходимый уровень никотинамидных коферментов в клетке (Fletcher, Lavery, 2018). Экспрессируемый NAMPRT локализован преимущественно в ядре и цитоплазме (Garten et al., 2015), однако он может секретироваться в виде внеклеточного фермента (eNAMPRT), который, как изначально считалось, способствует превращению NAM в NMN в кровотоке. Однако, ввиду низких уровней субстратов и продуктов реакции в кровотоке, эта точка зрения не является полностью обоснованной (Canto, 2022). В недавних исследованиях было показано, что eNAMPRT переносится через системный кровоток во внеклеточных везикулах, способных поглощаться другими клетками и тканями для усиления биосинтеза NAD (Yoshida et al., 2019).

Второй белок описанного выше пути синтеза — NMNAT — в организме человека представлен тремя различными генными продуктами: ядерным гомоэкзамерным изоферментом NMNAT1, цитозольным мономерным изоферментом NMNAT2 и митохондриальным гомотетрамерным изоферментом NMNAT3 (Magni et al., 2004). Специфическая для органелл локализация NMNAT указывает на возможные характерные функции и различную потребность в конкретном изоферменте. Интересно, что были обнаружены дополнительные функции NMNAT, включающие потенциальную роль в процессе репарации ДНК посредством белок-белкового взаимодействия и нейропротекторные функции в нервной системе грызунов. Долгое время считалось, что активность NMNAT3 позволяет поддерживать необходимый уровень NAD в митохондриях за счет преобразования NMN, поступающего из цитозоля (Berger et al., 2005). Однако недавно было установлено, что переносчик SLC25A51 спосо-

бен импортировать NAD в митохондрии (Luongo et al., 2020).

Помимо отличий в субклеточной локализации, изоформы NMNAT человека характеризуются также различным распределением в тканях. Так, наиболее распространенной формой фермента является NMNAT1, экспрессируемый во всех тканях, за исключением селезенки; NMNAT2, в свою очередь, локализован в основном в головном мозге и частично в сердце, скелетных мышцах и поджелудочной железе, а NMNAT3, напротив, обладает самым высоким уровнем экспрессии в легких и селезенке (Berger et al., 2005). Все три изоформы обладают разными свойствами, но *in vivo* катализируют одну и ту же АТФ-зависимую реакцию аденилирования. Мутации в ядерно-специфической изоформе NMNAT1 приводят к нарушениям поддержания физиологического гомеостаза NAD в нейронах и являются причиной неврологических расстройств, таких как врожденный амавроз Лебера (Falk et al., 2012) и наследственная спастическая параплегия (Sadr et al., 2023). Низкие уровни экспрессии NMNAT2 приводят к нарушениям в развитии периферических аксонов (Lukacs et al., 2019). Так, мыши с нокаутом по этому белку умирают при рождении из-за серьезных дефектов аксонов как в периферической, так и в центральной нервной системе (Gilley et al., 2019). Что касается NMNAT3, то его дефицит у мышей ведет к снижению концентрации АТФ и остановке гликолиза в эритроцитах, вызывая спленомегалию и гемолитическую анемию (Hikosaka et al., 2014). Однако случаи мутации NMNAT3 у людей описаны не были (Lukacs et al., 2019).

Кроме того, NMNAT катализирует вторую реакцию пути синтеза NAD, в котором его предшественником является NR. В организме млекопитающих NR поступает в клетки посредством уравнивающих переносчиков нуклеозидов (ENT) SLC29A1-4 (Zapata-Perez et al., 2021). После попадания в клетку, NR фосфорилируется никотинамидрибозидкиназой (NRK, EC 2.7.1.22) до NMN, который затем трансформируется в NAD с помощью NMNAT. Эта киназа является высококонсервативным ферментом, который в клетках млекопитающих существует в виде двух изоформ: NRK1 и NRK2 (Ratajczak et al., 2016). В тканях человека NRK1 экспрессируется повсеместно, самые высокие уровни при этом наблюдаются в печени и почках, тогда как NRK2 является специфичным для мышц с преобладающей экспрессией в скелетных мышцах (Fletcher, Lavery, 2018). В условиях стресса, приводящих к падению уровня NAMPRT, уровень NRK2 существенно увеличивается, что, по-видимому, позволяет использовать NR в

качестве источника NAD, когда NAM-индуцированный синтез становится неэффективным.

Деамидированный путь. Никотиновая кислота, попадающая в клетку через переносчики SLC5A8 и SCL22A1 (Zapata-Perez et al., 2021), метаболизируется до NAD по пути Прейсса–Хэндлера, состоящего из трех стадий (рис. 2). На первом этапе NA и 5'-фосфорибозил-1-пирофосфат превращаются в мононуклеотид NA (NAMN) под действием фосфорибозилтрансферазы NA (NAPRT, EC 6.3.4.21). Затем NMNAT катализирует добавление аденилового фрагмента из АТФ с образованием адениндинуклеотида NA (NAAD), который в конечном итоге амидируется до NAD с помощью АТФ-зависимой NAD-синтетазы (NADSYN1, EC 6.3.5.1), использующей глутамин в качестве донора NH₂-группы.

NAPRT является ферментом, ограничивающим скорость синтеза NAD по пути Прейсса–Хэндлера, и относится к подсемейству фосфорибозилтрансфераз типа II. Этот белок состоит из двух доменов и функционирует как димер (Marletta et al., 2015). Интересно, что две фосфорибозилтрансферазы человека, участвующие в биосинтезе NAD, имеют консервативную структуру, однако их активные центры характеризуются индивидуальными особенностями, объясняющими субстратную специфичность. Впервые, NAPRT, в отличие от NAMPT, не подвергается обратному ингибированию NAD (Galassi et al., 2012), во-вторых, у NAPRT отсутствует сайт связывания с мощным селективным ингибитором FK866, который в настоящее время используют в клинических испытаниях в качестве противоопухолевого агента (Marletta et al., 2015). Экспрессия NAPRT у млекопитающих характеризуется широкой вариабельностью, что свидетельствует о наличии тканеспецифических путей биосинтеза NAD. Так, в эритроцитах человека, где он впервые был описан, этот фермент играет ключевую роль в повышении уровня NAD. Кроме того, высокая активность NAPRT обнаруживается в печени, почках и тонком кишечнике, а в мышцах, легких и мозге NAPRT практически не экспрессируется (Duarte-Pereira et al., 2016). В раковых клетках NAPRT экспрессируется более активно, поскольку опухолевые ткани характеризуются повышенной потребностью в NAD (Duarte-Pereira et al., 2016). В связи с этим, исследование мутаций, снижающих экспрессию NAPRT, может быть полезно при разработке противораковых препаратов (Duarte-Pereira et al., 2014).

В клетках млекопитающих синтетаза NADSYN1, катализирующая последнюю стадию биосинтеза NAD по пути Прейсса–Хэндлера, представляет собой гомогексамерный белок, локализованный в цитозоле (Mori et al., 2014). Фермент относится к се-

мейству АТФ-пирофосфатаз N-типа, при этом его двухдоменная структура позволяет использовать глутамин в качестве донора азота. При исследовании активности NADSYN1 в тканях мышцы было обнаружено, что самые высокие уровни экспрессии присущи печени и почкам, а самые низкие – головному мозгу, в то время как в легких и скелетных мышцах белок найден не был. В соответствии с общепринятым мнением, как уже было сказано выше, эукариотические NAD-синтетазы являются глутамин-зависимыми, тогда как в клетках прокариот некоторые NAD-синтетазы могут использовать только аммиак (Bieganowski, Brenner, 2003). При этом показано, что у мышей фермент NADSYN1 обильно экспрессируется в тонком кишечнике, печени, почках и семенниках и практически не обнаруживается в скелетных мышцах и сердце (Hara et al., 2003). На основании биохимического анализа Hara с сотрудниками (Hara et al., 2003) идентифицировали аммиачно-зависимую NAD-синтетазу человека, которая, как в последствии было установлено, являлась бактериальным ферментом. У людей миссенс-мутации гена, кодирующего NADSYN1, приводят к резкому снижению уровня NAD и вызывают множественные пороки развития сердца, почек, позвонков и конечностей (Szot et al., 2020).

Вторым предшественником NAD в деамидированном пути в эукариотических клетках является NAR, который за счет фосфорилирования с помощью киназы NRK превращается в NAMN, а затем метаболизируется по пути Прейсса–Хэндлера (рис. 2). В целом, механизм проникновения NAR в клетки остается неизученным, однако, существует предположение, что переносчик нуклеозидов SLC28A3 может осуществлять транспорт NAR через плазматическую мембрану (Kropotov et al., 2021).

Путь синтеза de novo. Триптофан не является формой ниацина, однако, в контексте роли ниацина как прекурсора NAD, нельзя не затронуть и этот путь синтеза. Несмотря на то, что в единицах “ниацин-эквивалента” соотношение между собственно ниацином и триптофаном является достаточно низким (1/60), данный путь играет немаловажную роль в функционировании организма. Путь синтеза *de novo* (рис. 3), состоящий из девяти этапов, инициализируется L-триптофаном, который попадает в клетку посредством переносчиков нейтральных аминокислот, таких как SLC6A19, SLC7A5 и SLC36A4 (Куликова и др., 2018; Zapata-Perez et al., 2021). Первоначально N-формилкинуренин (N-FK) образуется из триптофана индоламин-2,3-диоксигеназой (IDO, EC 1.13.11.52) или триптофан-2,3-диоксигеназой (TDO, EC 1.3.11.11). При этом в большинстве органов L-триптофан метаболизируется IDO, тогда как экспрессия TDO происходит в основном в

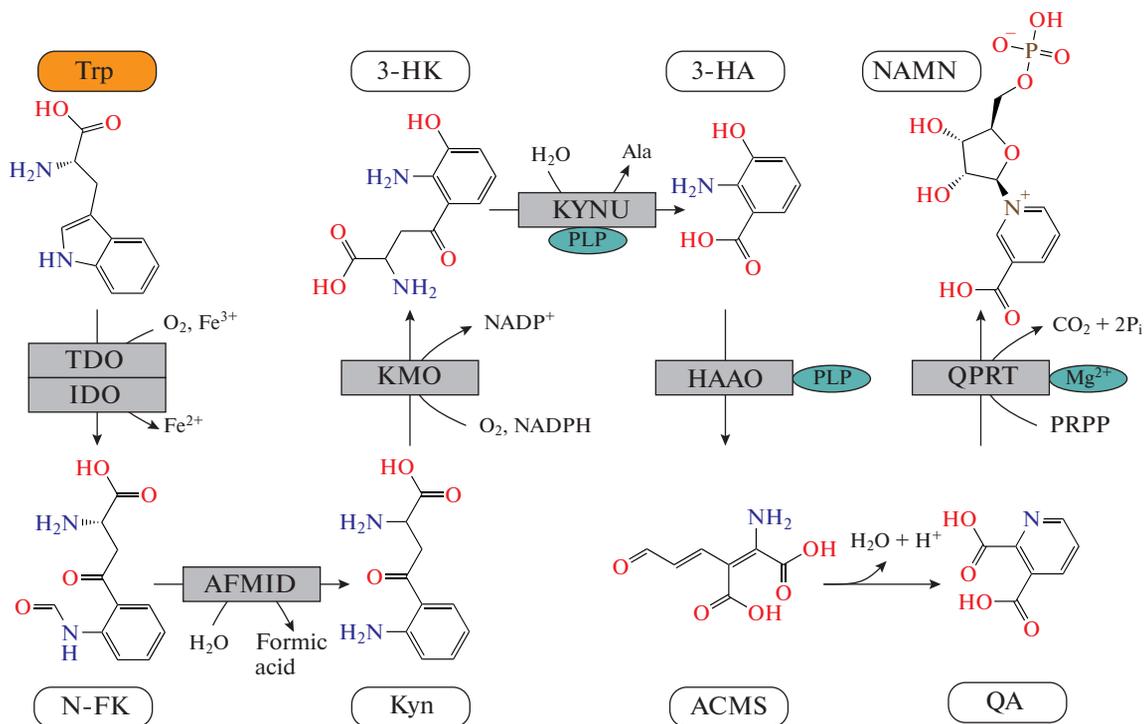


Рис. 3. Путь синтеза NAMN из триптофана *de novo*. TDO – триптофан-2,3-диоксигеназа; IDO – индоламин-2,3-диоксигеназа; AFMID – арилформамидаза; KMO – кинуренин-3-монооксигеназа; KYNU – кинурениназа; HAAO – 3-гидроксиантранилат-3,4-диоксигеназа; PLP – пиридоксальфосфат; QPRT – хинолилат фосфорибозилтрансферазы; N-FK – N-формилкинуридин; Kyn – кинуренин; 3-НК – 3-гидроксикинуридин; 3-НА – 3-гидроксиантранилиловая кислота; ACMS – α -амино- β -карбоксимуконат- ϵ -полуальдегид; QA – хинолиновая кислота.

печени. Затем последовательность из четырех ферментативных реакций, осуществляемых арилформамидазой (AFMID, EC 3.5.1.9), кинуренин-3-монооксигеназой (KMO, EC 1.14.13.9), кинурениназой (KYNU, EC 3.7.1.3) и 3-гидроксиантранилат-3,4-диоксигеназой (HAAO, EC 1.3.11.6), превращает N-FK через 3-гидроксикинуридин (3-НК) и 3-гидроксиантранилиловую кислоту (3-НА) в α -амино- β -карбоксимуконат- ϵ -полуальдегид (ACMS). ACMS, в свою очередь, может подвергаться либо полному окислению, либо спонтанной циклизации с образованием хинолиновой кислоты (QA). В последнем случае QA преобразуется хинолилатфосфорибозилтрансферазой (QPRT, EC 2.4.2.19) в NAMN, который является одним из метаболитов пути Прейсса–Хэндлера. Кинурениновый путь реализуется в основном в печени, однако почки также способны преобразовывать L-триптофан в NAD. При этом на основании количественного анализа потоков NAD предполагается, что эта аминокислота может являться более предпочтительным прекурсором по сравнению с NA (Chanvillard et al., 2022). Мутации, вызывающие инактивацию ферментов HAAO и KYNU, приводят к патологическим изменениям почек и снижению уровня NAD, циркулирующего в крови человека (Shi et al., 2017).

Таким образом, наиболее эффективным предшественником NAD в большинстве тканей млекопитающих является NAM. Так, у мышей при отсутствии ферментов пути Прейсса–Хэндлера уровень NAD в печени не менялся. Аналогично, у мышей с дефицитом NRK1 не было обнаружено изменений уровней NAD в разных тканях (Ratajczak et al., 2016). Кроме того, уникальные ферменты пути Прейсса–Хэндлера (NAPRT и NADSYN1) в мышцах не экспрессируются. Напротив, в тонком кишечнике биосинтез NAD происходит в основном из NA (Hara et al., 2007). В свою очередь, почки и печень могут использовать NAM, NA и L-триптофан для поддержания гомеостаза NAD. При этом, согласно одним экспериментальным данным, основным прекурсором является NA (Hara et al., 2007), а согласно другим – L-триптофан (Chanvillard et al., 2022). В целом, все деаминированные предшественники NAD, такие как NAR, L-триптофан и NA, эффективны только в тканях, в которых реализуется путь Прейсса–Хэндлера.

Утилизация ниацина. Помимо потребления в процессе синтеза NAD, ниацин метаболизируется посредством нескольких ферментативных систем и в конечном итоге выводится из организма. NA в сочетании с коферментом А (CoA) образует никотинил-

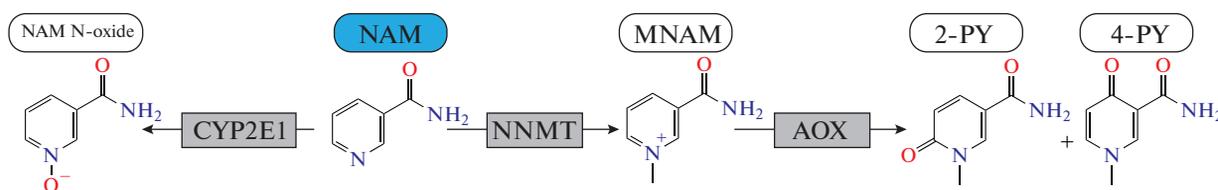


Рис. 4. Пути утилизации NAM. MNAM – 1-метилникотинамид; NNMT – никотинамид-N-метилтрансфераза; AOX – альдегидоксидаза; CYP2E1 – цитохром P450 2E1; 2-PY и 4-PY – 1-метил-2-пиридон-5-карбоксамид и 1-метил-4-пиридон-3-карбоксамид соответственно.

CoA, который, взаимодействуя с глицином, метаболизируется до никотинуровой кислоты (NUA) (Montserrat-de la Paz et al., 2017). В свою очередь, основной метаболический путь утилизации никотинамида включает две последовательные стадии (рис. 4). Первоначально NAM метилируется никотинамид-N-метилтрансферазой (NNMT, EC 2.1.1.1) до 1-метилникотинамида (MNAM) с переносом метильной группы с S-аденозил-L-метионина (SAM) и образованием S-аденозил-L-гомоцистеина (SAH). Далее MNAM, который является токсичным соединением, нейтрализуется путем окисления альдегидоксидазой (EC 1.2.3.1) до 1-метил-2-пиридон-5-карбоксамид (2-PY) и 1-метил-4-пиридон-3-карбоксамид (4-PY).

Следует отметить, что в физиологических условиях активность NNMT достаточно низкая, поскольку для эффективной работы фермента необходима высокая концентрация NAM ($K_M = 430$ мкМ) (Xie et al., 2020). Рост уровня NAM приводит к снижению концентрации SAM, который является универсальным донором метильной группы для гистонов, негистоновых белков, нуклеиновых кислот и липидов (Eckert et al., 2019). Таким образом, опосредованное NNMT истощение SAM влияет на экспрессию генов посредством ослабления метилирования гистонов, например, в раковых клетках, адипоцитах и эмбриональных стволовых клетках. При этом метилирование гистонов связано с ацетилированием, фосфорилированием и моноубиквитинированием гистонов, которые в совокупности регулируют структуру хроматина и транскрипцию. По-видимому, этим объясняется наблюдаемый высокий уровень экспрессии NNMT при таких заболеваниях, как ожирение, рак, болезнь Паркинсона, диабет 2 типа и гепатоксичность (Hwang, Song, 2020). Кроме того, NAM может быть также преобразован CYP2E1 в N-оксид NAM (рис. 4) (Real et al., 2013). Однако K_M данной реакции лежит уже в миллимолярном диапазоне ($K_M = 2.98$ мМ), и, по-видимому, данная активность характерна при введении высоких фармакологических доз ниацина. О роли N-оксида NAM в настоящее время известно достаточно мало. Так, в печени млекопитающих он

может являться субстратом для альдегидоксидазы (Kitamura, Tatsumi, 1984). Также было показано, что он индуцирует дифференцировку промиелобластов HL-60 при промиелоцитарном лейкозе (Iwata et al., 2003). Оценка влияния N-оксида NAM на эту клеточную линию может быть полезна при изучении различных иммунологических расстройств. При исследовании экскреции NAM и его катаболитов у мышей было показано, что основная их часть приходится на 2-PY/4-PY (60%) и MNAM (14%), являющиеся продуктами основного метаболического пути, и только 16% – на N-оксид NAM, при этом NAM может выводиться и в неметаболизированном виде (Maeta et al., 2014). В целом, похожую картину наблюдали и у людей в фармакокинетическом исследовании (Menon et al., 2007). Так, при пероральном приеме 2 г ниацина около 75% введенной дозы выделялось с мочой в виде ниацина и его производных, при этом большая часть экскретировалась в виде 2-PY и MNAM, а на никотинуровую кислоту в среднем приходилось около 14% (Menon et al., 2007).

МЕХАНИЗМЫ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПУЛА НИАЦИНА

Помимо поступления с пищей, клеточный пул ниацина, в частности NAM, может восстанавливаться за счет использования NAD в качестве субстрата для различных семейств ферментов, включающих ADP-рибозилтрансферазы (ART) и сиртуины, а также при регуляции никотинамидных коферментов (рис. 5). Далее каждый из этих процессов будет рассмотрен более подробно.

ADP-рибозилтрансферазы. ADP-рибозилтрансферазы переносят звено ADP-рибозы (ADPr) с NAD на боковые цепи определенных аминокислотных остатков белков-субстратов, в результате чего происходит высвобождение NAM (рис. 5). Известными акцепторами в эукариотических клетках являются остатки глутамата, аспартата, серина, лизина, аргинина и аспарагина (Hottiger et al., 2010). При этом некоторые трансферазы могут присоединять дополнительные повторяющиеся звенья ADPr путем образования гликозидной связи между остатками рибозы, что

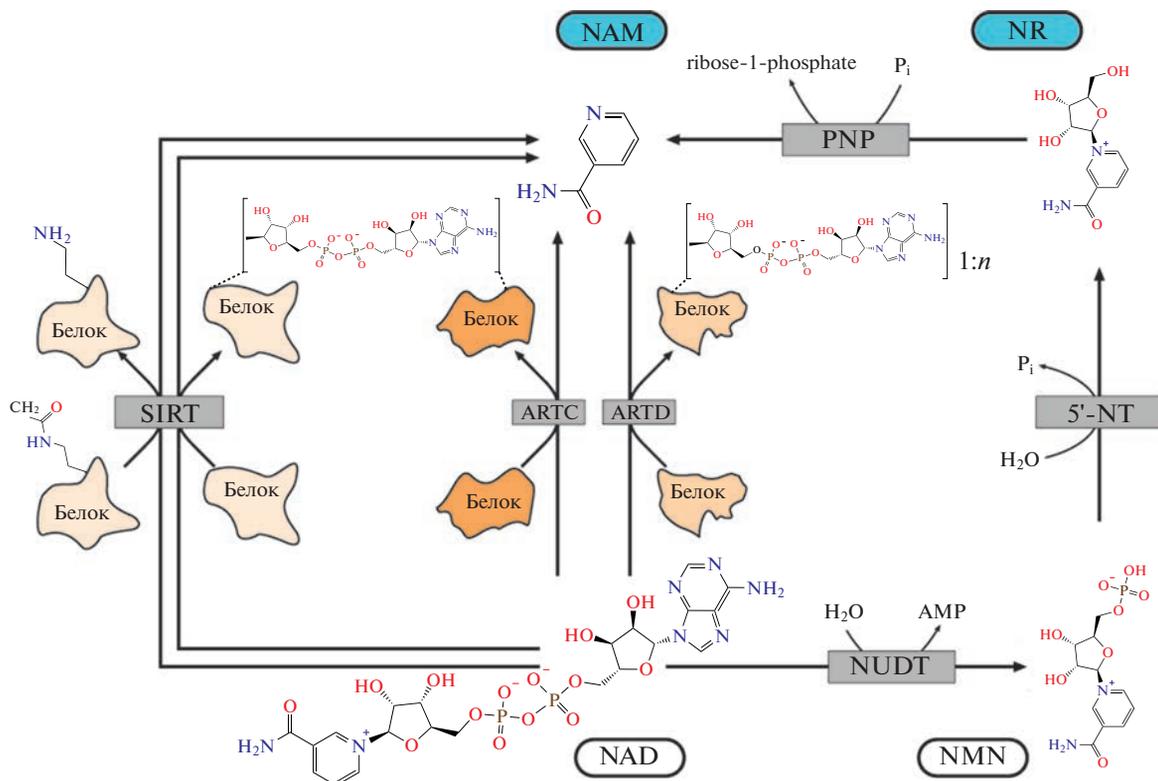


Рис. 5. Механизм восполнения пула NAM и рибозида никотинамида (NR) при различных процессах катаболизма NAD. ARTC – ART, гомологичная холерному токсину; ARTD – ART, гомологичная дифтерийному токсину; SIRT – сиртуины; NUDT – NUDIX-гидролаза; 5'-НТ – 5'-нуклеотидаза; PNP – пуриннуклеозидфосфорилаза.

приводит к формированию длинных полимеров, как линейных, так и разветвленных, содержащих до 200 звеньев ADPr (Burkle, 2005). Таким образом, в клетках млекопитающих осуществляется моно- и поли-ADP-рибозилирование белков, приводящее к образованию моно(ADPr) (MAR) и поли(ADPr) (PAR) соответственно. Самым большим семейством ART, включающим 17 ферментов, является семейство поли(ADP-рибоза)полимераз (PARP), которые в соответствии с другой классификацией относят к семейству ADP-рибозилтрансфераз, гомологичных дифтерийному токсину (ARTD) (Crawford et al., 2018; Hottiger et al., 2010). Эти белки локализованы преимущественно в ядре и цитозоле, при этом основной активностью большинства PARP является моно-ADP-рибозилирование и только четыре фермента катализируют поли-ADP-рибозилирование (PARP1, PARP2, PARP5a, PARP5b) (Vyas et al., 2014). Необходимо отметить, что основную часть функции ADP-рибозилирования в клетке выполняют PARP1 и PARP2, при этом активация этих ферментов при повреждении ДНК приводит к снижению клеточного пула NAD на 10–20% в течение нескольких минут (Bai, Canto, 2012).

Как уже было сказано, для синтеза NAD необходима молекула АТФ, следовательно, повышенная активность PARP будет вызывать истощение АТФ, что в конечном итоге может служить причиной гибели клеток. Второе семейство ART, содержащее четыре белка (ART1–ART4), называют также ADP-рибозилтрансферазами, гомологичными холерному токсину (ARTC) (Hottiger et al., 2010). По известным в настоящее время данным, активация каждого из них приводит к образованию MAR и происходит исключительно на гуанидиновом фрагменте аргинина (Laing et al., 2011). ARTC закреплены на клеточной мембране и (или) секретируются в межклеточное пространство, где они модифицируют растворимые и связанные с мембраной белковые мишени (Crawford et al., 2018). ADP-рибозилирование белков является обратимой посттрансляционной модификацией, играющей роль в различных биологических процессах, таких как поддержание стабильности генома, регуляция транскрипции, врожденного иммунитета и межклеточных взаимодействий, репарация одно- и двуниевых разрывов ДНК, энергетический метаболизм, а также гибель клеток (Crawford et al., 2018).

Сиртуины (SIRT) представляют собой NAD-зависимые деацетилазы и моно-ADP-рибозилтрансфе-

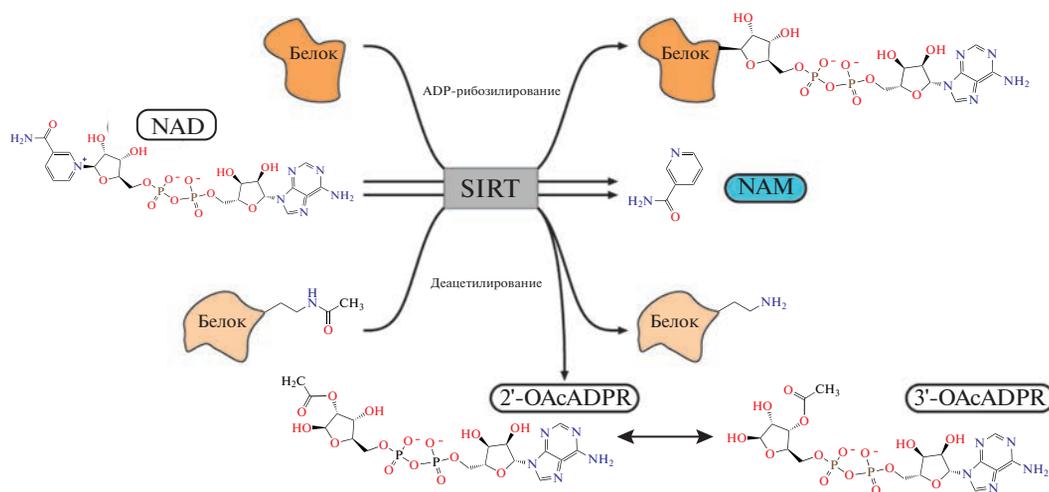


Рис. 6. Два основных типа активности сиртуинов, приводящих к восполнению пула никотинамида. 2'-OAcADPR – 2'-O-ацетил-ADP-рибоза; 3'-OAcADPR – 3'-O-ацетил-ADP-рибоза.

разы, принадлежащие к семейству высококонсервативных белков. По известным данным, в клетках человека это семейство включает семь изоферментов SIRT1–SIRT7, обладающих различной субстратной специфичностью и субклеточной локализацией (Yamagata et al., 2014). Предполагается, что SIRT1, SIRT6 и SIRT7 локализованы преимущественно в ядре, SIRT3–SIRT5 экспрессируются в основном в митохондриях, а SIRT1 является цитоплазматическим ферментом (Gomes et al., 2015). Однако, согласно ряду исследований, некоторые из приведенных изоферментов характеризуются множественной локализацией. Так, SIRT1 и SIRT7 были также обнаружены в цитоплазме (Kiran et al., 2013), а SIRT2 и SIRT3, в свою очередь, могут экспрессироваться в ядре (Osborne et al., 2014). Наиболее важной и распространенной активностью сиртуинов является деацетилирование белков (рис. 6), которое происходит путем отщепления NAM от NAD и переноса ацетильной группы с остатка лизина модифицированного белка на ADP-рибозу (ADPR) с образованием NAM (Wang et al., 2019). Продуктом данной реакции также является 2'-O-ацетил-ADP-рибоза (2'-OAcADPR), которая путем внутримолекулярной переэтерификации может преобразовываться в 3'-O-ацетил-ADP-рибозу (3'-OAcADPR), и при нейтральном pH оба изомера находятся в равновесии 48:52 (Jackson, Depu, 2002). При этом сильной деацетилирующей активностью обладает большинство членов семейства сиртуинов, за исключением SIRT4 и SIRT5.

Кроме того, некоторые сиртуины выполняют и другие функции. SIRT4 в основном использует NAD для переноса ADP-рибозы на глутаматдегидрогеназу (GDH), что приводит к подавлению активности GDH и, следовательно, ограничению метаболизма

глутамата (Haigis et al., 2006). Также моно-ADP-рибозилирование осуществляется посредством SIRT6, который помимо этого может выполнять деацелирование жирных кислот (Roessler, 2015). Необходимо отметить, что сиртуины имеют существенные структурные отличия от белков ART (Hottiger et al., 2010). SIRT5 обладает сильной десукцинилирующей и демалонилирующей активностью (Du et al., 2011). В зависимости от целевого белка, сиртуины влияют на несколько биологических процессов, включая транскрипцию, клеточный цикл, стабильность генома, гибель клеток и митохондриальный биогенез (Xu et al., 2018).

Регуляция уровня никотинамидных коферментов. Существует путь ресинтеза NAM из NAD, состоящий из трех последовательных стадий. На первом этапе NAD расщепляется за счет активности NUDIX-гидролаз (NUDT) до AMP и NMN, который далее может дефосфорилироваться цитозольными 5'-нуклеотидазами (сN-II/сN-III) до NR (рис. 5). Интересно, что данная реакция может протекать также и во внеклеточном пространстве, осуществляясь при этом эктоферментом 5'-нуклеотидазой – CD73 (Grozio et al., 2013). Третья стадия заключается в превращении NR в NAM под действием пуриноклеозидфосфорилазы (PNP).

Гидролазы семейства NUDIX представляют собой ферменты, которые катализируют расщепление нуклеозиддифосфатов, связанных с фрагментом X, в присутствии Mg²⁺ или других двухвалентных катионов (Zha et al., 2008). Ферменты этого семейства обладают различной клеточной локализацией и субстратной специфичностью. Известно, что в клетках млекопитающих NUDT12 и NUDT13 способны гид-

ролизовать NAD до AMP и NMN, его восстановленную форму – до AMP и NMNH, а также NADPH – до 2',5'-ADP и NMNH (Куликова, Никифоров, 2020). При этом NUDT12 может регулировать концентрацию никотинамидных коферментов преимущественно в пероксисомах, а NUDT13, как предполагается, играет роль в митохондриальном метаболизме пиридиновых нуклеотидов (Abdelraheim et al., 2017). В целом, гидролазы NUDIX выполняют защитные, регуляторные и сигнальные функции в метаболизме благодаря своей способности удалять из клеточной среды различные органические пирофосфаты (Palazzo et al., 2015).

5'-Нуклеотидазы (5'-NT). В клетках млекопитающих 5'-NT образуют группу из девяти генетически и структурно различных ферментов, функционирующих либо в комплексе с мембраной, либо в растворенном виде и преимущественно в цитозоле (Magni et al., 2013). 5'-NT катализируют гидролиз рибонуклеозид- и дезоксирибонуклеозидмонофосфатов в соответствующие нуклеозиды и характеризуются широкой субстратной специфичностью и различиями в регуляторных механизмах (Bricard et al., 2017). Было показано, что в клетках человека цитозольные 5'-NT (сN-II и сN-III) могут дефосфорилировать NMN, образуя при этом NR (Kulikova et al., 2015). Необходимо отметить, что для протекания данной реакции необходима миллимолярная концентрация NMN, так как сN-II и сN-III обладают достаточно низким сродством к этому субстрату. Аналогичные выводы были сделаны и при исследовании дрожжевых аналогов цитозольных 5'-NT (Isn1 и Sdt1) (Vogan, 2009). сN-II повсеместно экспрессируется в организме человека, тогда как сN-III локализуется преимущественно в эритроцитах (Vogan, Brenner, 2010). Нуклеотидазы играют важную роль во внутриклеточной и внеклеточной активности, участвуя в синтезе нуклеиновых кислот, росте клеток, нейротрансмиссии, тоне кровеносных сосудов, регуляции метаболических ферментов, гормональной активности и иммунной системы, а также других критически важных для жизнедеятельности функций.

Пурипнуклеозидфосфорилаза (PNP) представляет собой повсеместно экспрессируемый фермент, который в присутствии неорганического ортофосфата, используемого в качестве второго субстрата, разрушает гликозидную связь различных нуклеозидов с образованием соответствующего основания и рибозо-1-фосфата (Furihata et al., 2014). PNP играет ключевую роль в пути синтеза пуриновых нуклеотидов, а дефицит PNP в организме человека приводит к нарушению функции Т-клеток (Bzowska et al., 2000). В соответствии с экспериментальными данными, NR может гидролизироваться PNP до NAM (Belenky et al.,

2009). Более того, недавно было показано, что в клетках млекопитающих PNP является основным регулятором метаболизма NR. Так, например, введение NR в дозах 250 и 500 мг/кг приводит к значительному увеличению пула NAM в плазме, печени (Giroud-Gerbetant et al., 2019) и сердце (Trammell et al., 2016), а при подавлении активности PNP высокий уровень рибозида сохраняется в крови, почках и печени, что в целом уменьшает накопление NAM (Kropotov et al., 2022).

Синтез и деградации вторичных мессенджеров. Помимо описанных выше сиртуинов и ADP-рибозилтрансфераз, NAM также может быть синтезирован посредством ферментативной активности CD38, CD157 и SARM1.

Фермент CD38. CD38 (кластер дифференцировки 38) является многофункциональным ферментом, который впервые был обнаружен в тимоцитах и Т-лимфоцитах. Однако впоследствии было показано, что он широко экспрессируется практически во всех исследованных тканях (Graeff et al., 2006). При этом CD38 является основным источником эндогенного NAM, за счет метаболизма которого поддерживается гомеостаз NAD, что играет важную роль при патофизиологических состояниях организма (Hogan et al., 2019). Известны три типа фермента CD38, характеризующиеся различной локализацией. В некоторых клетках, преимущественно в лимфоцитах, CD38 экспрессируется на клеточной поверхности в виде трансмембранного белка II типа, каталитический домен которого обращен во внеклеточное пространство. Напротив, активный центр CD38 типа III ориентирован в цитозоль, что делает данную ориентацию более подходящей для выполнения внутриклеточных функций (Zhao et al., 2012). Существование изофермента III типа, возможно, является решением так называемого “топологического парадокса” CD38, заключающегося в несогласованности внеклеточной локализации каталитического домена и известных внутриклеточных функций продуктов реакции (de Flora et al., 1997). Другой потенциальный механизм влияния CD38 типа II на цитозольную передачу сигналов заключается в переносе субстратов и продуктов реакции через плазматическую или органеллярные мембраны (Davis et al., 2008). Помимо двух описанных выше типов CD38, также существует растворимая форма, обладающая основными активностями трансмембранного CD38 и локализованная как в цитоплазме, так и во внеклеточном пространстве (Zielinska et al., 2004). В целом, CD38 располагается преимущественно на плазматической мембране клеток с ориентацией II типа (Shrimp et al., 2014).

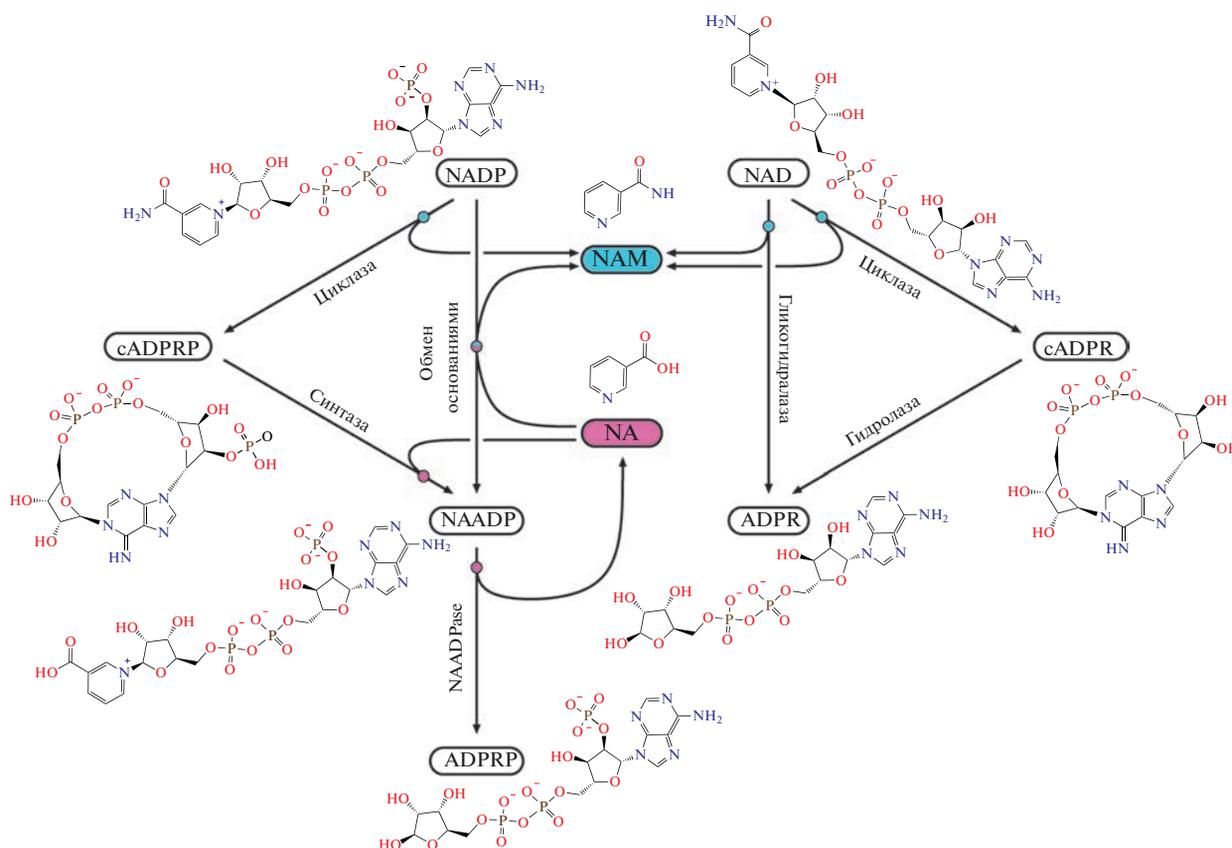


Рис. 7. Механизмы регуляции пула никотинамида и никотиновой кислоты в процессах синтеза и деградации вторичных мессенджеров посредством белка CD38.

Три основные функции, выполняемые CD38, способствуют синтезу NAM (рис. 7). Во-первых, гликогидролазная активность фермента продуцирует NAM и ADP-рибозу. Кроме того, CD38 способен циклизовать NAD с образованием циклической ADP-рибозы (cADPR) и NAM, при этом в нейтральной среде в отсутствие никотиновой кислоты CD38 может также циклизовать NADP в фосфоциклическую ADP-рибозу (cADPRP) с образованием NAM. Наконец, в кислой среде CD38 катализирует реакцию обмена оснований, при которой группа NAM заменяется фрагментом NA, что приводит к образованию адениндинуклеотидфосфата NA (NAADP) и свободного NAM.

ADPR, cADPR и NAADP относятся к семейству аденинсодержащих вторичных мессенджеров, участвующих в регуляции гомеостаза кальция в клетке. Кальций играет важную роль в функционировании сердечно-сосудистой системы, участвуя в сокращении и расслаблении мышечной стенки сосудов, при этом увеличение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} приводит к повышению артериального давления и вызывает пролиферацию кардиомиоцитов и гладкомышечных клеток (Wilson et al., 2019).

NAADP опосредует передачу кальциевых сигналов, действуя на двупоровый канал (TPC) в эндолизосомах и высвобождение Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума посредством активации рианодинового рецептора 1 (RyR1) (Zeidler et al., 2022). ADPR, в свою очередь, действует на внутриклеточный домен катионного канала TRPM2, тем самым активируя приток кальция в клетку через плазматическую мембрану (Sumoza-Toledo, Penner, 2011). Кроме того, cADPR и ADPR могут способствовать высвобождению кальция из саркоплазматического или эндоплазматического ретикулума за счет активации рианодинового рецептора 2 (RyR2) и повышения уровня входа Ca^{2+} по депо-управляемым кальциевым каналам (SOCE) (Zuo et al., 2021). Интересно, что cADPRP, также играющий важную роль в мобилизации кальция, опосредует высвобождение Ca^{2+} из того же хранилища, что и cADPR, причем более эффективно (Zhang et al., 1995).

Помимо перечисленных выше ферментативных функций, при нейтральных значениях pH CD38 способен катализировать синтез NAADP из NA и cADPRP (рис. 7) (Moreschi et al., 2006). Кроме того, было показано, что за счет NAADPase-активности CD38 мо-

жет гидролизовать NAADP до ADPRP, тем самым регулируя его концентрацию как вторичного мессенджера (Graeff et al., 2006). Высокая значимость данной реакции для функциональной передачи сигналов Ca^{2+} обусловлена необходимостью эффективного контроля клеточного уровня NAADP, являющегося наиболее мощным вторичным мессенджером.

Понимание механизмов и факторов, контролирующих различные функции CD38, имеет важное значение, поскольку измененная ферментативная активность CD38 приводит к развитию огромного количества заболеваний, таких как инфекции, нарушения обмена веществ, рак, болезни сердца и нейродегенерация. В целом, рассматривая функциональные особенности CD38, можно констатировать, что все типы активности этого белка, исключая только NAADPазную активность, направлены на увеличение пула NAM и, соответственно, уменьшение NA.

CD157 и его активность. В клетках млекопитающих основные ферментативные функции CD38 могут выполняться его гомологом CD157, также известным как антиген стромальных клеток костного мозга 1 типа (BST-1). Однако CD157, в отличие от преимущественно трансмембранного CD38, встраивается в мембрану посредством гликозилфосфатидилинозитольного (GPI) якоря и имеет два внеклеточных домена, связанных с ферментативной активностью белка и его адгезионными/сигнальными свойствами (Ortolan et al., 2002). В организме человека CD157 экспрессируется в основном в моноцитах и нейтрофилах, но этот фермент также может присутствовать в сосудистой эндотелии, мезотелиальных клетках, мезенхимных стволовых клетках и во многих других типах клеток (Ortolan et al., 2019). Как и CD38, CD157 является главным образом гликогидралазой, но использующей в качестве субстратов нуклеозиды, такие как NR, а не NAD (Yaku et al., 2021). Кроме того, CD157 обладает слабой ADP-рибозилциклазной активностью и может катализировать реакцию обмена оснований NR и NAR с использованием NA и NAM. Таким образом, CD157 обладает субстратной специфичностью, отличной от CD38. Благодаря своей ферментативной активности CD157 способен синтезировать такие вторичные мессенджеры, как sADPR и ADPR, однако с меньшей эффективностью, чем CD38 (Quarona et al., 2013).

SARM1 и его активность. Необходимо отметить, что, помимо CD38 и CD157, активностью NAD(P)-гликогидралазы, ADP-рибозилциклазы и обмена оснований обладает также SARM1, широко экспрессируемый в нейронах. При этом, CD38 и SARM1 не обладают схожей аминокислотной последовательностью и характеризуются различной субклеточной

локализацией (Zhao et al., 2019). Так, в отличие от CD38, SARM1 располагается преимущественно на цитозольной поверхности митохондрий (Gerdts et al., 2013). Было показано, что преобладающей активностью SARM1 при нейтральном pH является катализ реакции обмена оснований между NAM и NA, посредством которой образуется кальций-мобилизующий агент NAADP (Angeletti et al., 2022). Кроме того, SARM1 обладает более высокой активностью NAD-циклизации по сравнению с CD38, что свидетельствует о его большей эффективности в синтезе sADPR (Zhao et al., 2019). В целом, увеличение концентрации NMN в клетке является основным фактором повышенной активности SARM1 (Angeletti et al., 2022). Таким образом, еще одной функцией NMN, помимо его роли в качестве предшественника NAD, является управление ферментативной активностью SARM1. Помимо описанного выше, SARM1 является важным медиатором дегенерации аксонов (Osterloh et al., 2012), вызывающим быстрый распад NAD после повреждения (Gerdts et al., 2015). Было высказано предположение, что снижение экспрессии NMNAT2, приводящего к увеличению соотношения NMN/NAD, связано с активацией SARM1 (Figley et al., 2021).

Стоит отметить, что в случае описанных выше NAD-зависимых белков, ресинтезированный NAM проявляет двойственное действие. Выступая в роли субстрата для синтеза NAD по амидированному пути, он поддерживает работу этих ферментов. С другой стороны, путем прямого связывания NAM ингибирует эти белки (Yang, Sauve, 2006). При этом в случае малых концентраций наиболее вероятным является поддержание пула NAD, а ингибирование происходит при высоких фармакологических концентрациях (Kanayama, Luo, 2022). Так, например, показано, что концентрации NAM около 5 мМ приводят к росту соотношения NAD/NADH и активации SIRT1 (Li et al., 2015). В свою очередь, введение высоких концентраций NAM (20 мМ для SIRT1 (Lou et al., 2015) и 10 мМ для SIRT3/SIRT4 (Lee et al., 2013)) давало ярко выраженный ингибиторный эффект NAM. В целом, соотношение между активирующим и ингибирующим эффектами NAM определяется не только его эффективностью ингибирования соответствующих NAD-зависимых ферментов, но и эффективностью механизмов его потребления, в частности, для синтеза NAD по амидированному пути.

РЕЦЕПТОРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ НИАЦИНА

Ниацин играет важную роль в функционировании организма не только как предшественник NAD. Так, например, NA приводит к снижению уровня циркули-

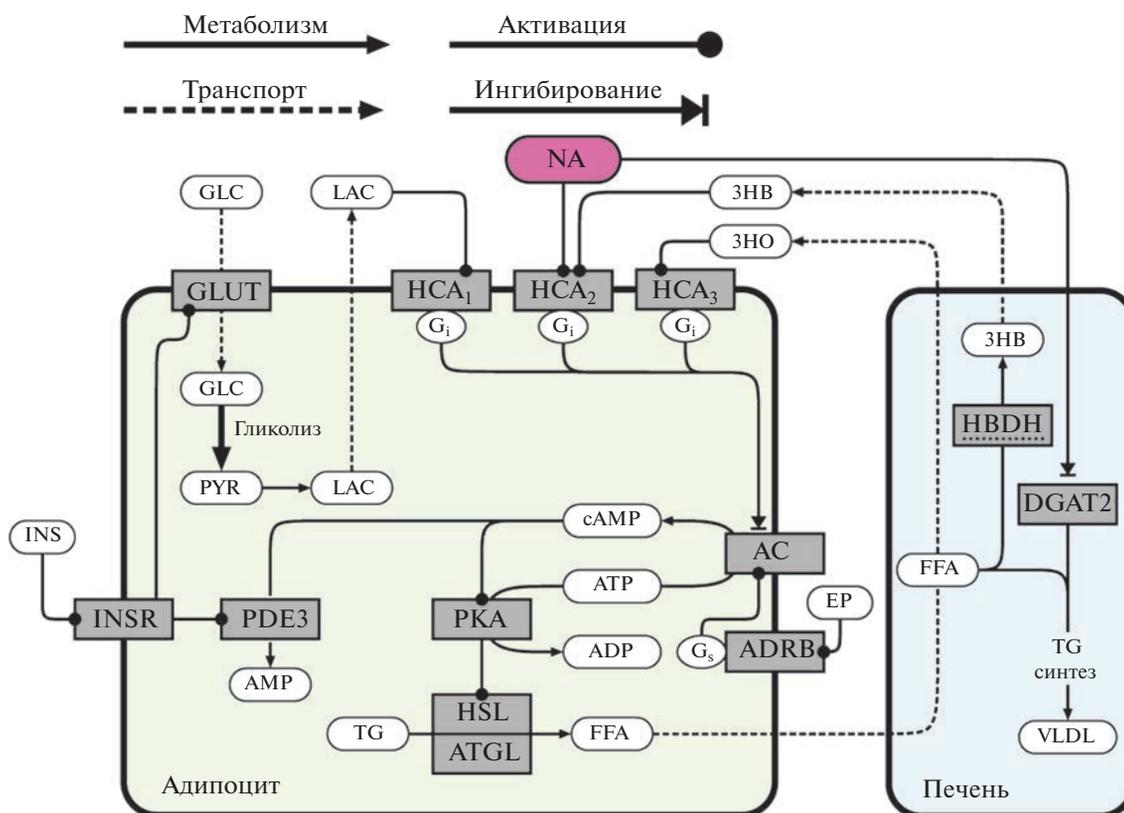


Рис. 8. Механизмы, обеспечивающие антилипидное действие ниацина. HCA₁₋₃ – семейство рецепторов гидроксикарбоновых кислот; INSR – инсулиновый рецептор; ADRB – β₂-адренергический рецептор; PDE3 – фосфодиэстераза 3; GLUT – транспортер глюкозы; AC – аденилатциклаза; PKA – протеинкиназа A; HSL – гормончувствительная липаза; ATGL – адипоцитарная триглицеридлипаза; DGAT2 – диацилглицерол-ацилтрансфераза 2.

рующих триглицеридов, липопротеинов низкой и очень низкой плотности и повышению концентрации липопротеинов высокой плотности (Carlson, 2005). Одним из возможных механизмов влияния NA на липидный профиль является активация ниацинового рецептора HCA₂, также известного как GPR109A, посредством которого ингибируется липолиз в жировой ткани (Soudijn et al., 2007). HCA₂ представляет собой рецептор, сопряженный с G-белком, который вместе со своими структурными гомологами HCA₁ (GPR81) и HCA₃ (GPR109B) образует семейство рецепторов гидроксикарбоновых кислот (Graff et al., 2016). Каждый из этих трех рецепторов играет определенную роль в регуляции липолиза адипоцитов (рис. 8). У человека самые высокие уровни экспрессии HCA₂ наблюдаются в адипоцитах белой и бурой жировой ткани. Кроме этого, HCA₂ обнаруживается также в кератиноцитах и иммунных клетках, включая нейтрофилы, макрофаги и моноциты (Wanders, Judd, 2011). Аналогичное распределение наблюдается и для рецептора HCA₃ (Wise et al., 2003), тогда как HCA₁ может быть лока-

лизован исключительно в адипоцитах (Ahmed et al., 2010).

Антилипидная функция ниацина. В адипоцитах активация NA-рецептора HCA₂ приводит к ингибированию аденилатциклазы, которая катализирует образование cAMP. Однако концентрация NA, необходимая для активации рецептора, может быть достигнута только при введении фармакологических доз NA (Geisler et al., 2021). HCA₂ может быть также активирован 3-гидроксibuтиратом (3HB), концентрация которого связана с уровнем свободных жирных кислот, что приводит к дополнительному уменьшению их уровня. Необходимо отметить, что в жировых клетках человека cAMP регулирует процесс липолиза. При этом активация инсулинового рецептора инсулином индуцирует фосфодиэстеразу 3 (PDE3) и последующий гидролиз cAMP, а активация β₂-адренергического рецептора эpineфрином, наоборот, облегчает липолиз (Liu et al., 2009). В результате падения уровня вторичного посредника cAMP снижается активность протеинкиназы A и гормончувствительной липазы. Таким об-

разом, происходит ингибирование липолиза за счет снижения гидролиза триглицеридов и высвобождения свободных жирных кислот (Chai et al., 2013). При этом уменьшается приток в печень свободных жирных кислот, являющихся субстратом для синтеза триглицеридов и липопротеинов очень низкой плотности (Digby et al., 2009). NA также может снижать синтез триглицеридов в печени путем ингибирования диацилглицерол-ацилтрансферазы 2 (DGAT2), которая катализирует обязательную терминальную стадию клеточного синтеза триглицеридов, используя в качестве субстратов диацилглицерол и асул-СоА (Ganji et al., 2004). В целом, концентрация триглицеридов в печени оказывает влияние и на другие липопротеины, так как триглицериды опосредуют синтез липидов очень низкой плотности, которые, в свою очередь, являются источником липопротеинов промежуточной и низкой плотности (Kamanna et al., 2009).

Механизм действия рецептора HCA₃ на процесс липолиза адипоцитов совпадает с функционированием HCA₂. Отличие состоит в том, что HCA₃ активируется 3-гидроксиоктаноатом (ЗНО), концентрация которого в плазме существенно возрастает в условиях повышенного окисления свободных жирных кислот. Как и HCA₂, рецептор HCA₃ опосредует механизм отрицательной обратной связи при таких условиях. Что касается рецептора HCA₁, то он активируется лактатом в диапазоне его физиологических концентраций (1–20 мМ) и подавляет липолиз в адипоцитах, аналогично двум другим HCA-рецепторам (Liu et al., 2009).

Необходимо отметить, что существует ряд факторов, опровергающих влияние NA на липидный профиль крови посредством активации HCA₂. Так, было показано, что при введении NA быстро индуцированное накопление триглицеридов в печени и концентрация неэтерифицированных жирных кислот в сыворотке снижались как у мышей с нормальным уровнем экспрессии HCA₂, так и у мышей с нокаутом по HCA₂ (Geisler et al., 2021). Полученные результаты указывают на возможность независимого от рецепторного механизма действия NA, с помощью которого увеличивается продукция липопротеинов высокой плотности и ограничивается активация транскрипции липогенных генов. Кроме того, при исследовании генетически модифицированных мышей и пациентов с дислипидемией, получавших NA и агонисты HCA₂, продемонстрировано, что рецептор не является основной молекулярной мишенью, ответственной за изменение липидного профиля крови (Lauring et al., 2012). Таким образом, за исключением описанного выше ингибирования диацилглицерол-ацилтрансферазы 2 вопрос о нере-

цепторном механизме действия NA на липиды плазмы пока остается открытым.

Ниацин-индуцированная вазодилатация. При применении NA в качестве лечебного препарата, например, от пеллагры возникают значительные вторичные эффекты, связанные с гиперемией (Pike, 2005). Вазодилатация кровеносных сосудов кожи вызывает покраснение, повышение температуры, ощущение покалывания и жжения, длящиеся в течение 1–2 ч (Lukasova et al., 2011). Наряду с антилипидными эффектами, активация рецептора HCA₂ опосредует прилив крови, индуцированный NA (Maciejewski-Lenoir et al., 2006). Увеличение перфузии кожных покровов происходит в две стадии, включающие короткую первую фазу, протекающую в клетках Лангерганса, за которой следует более продолжительная вторая фаза, опосредованная кератиноцитами (рис. 9) (Hanson et al., 2010). Активация G-белка, связанного с рецептором HCA₂, приводит к выбросу инозитолтрифосфата, продуцируемого фосфолипазой C β . Затем за счет активности фосфолипазы A₂ высвобождается арахидоновая кислота, как в кератиноцитах, так и в клетках Лангерганса. На следующем этапе арахидоновая кислота превращается в простагландин H₂ посредством циклооксигеназ (COX-1 и COX-2) в клетках Лангерганса и в кератиноцитах соответственно. Простагландин H₂, в свою очередь, используется для синтеза простагландина (PG) D₂ и простагландина E₂ соответствующими синтазами. При этом клетки Лангерганса способны секретировать как PGD₂-синтазу (PGD₂S), так и PGE₂-синтазу (PGE₂S), тогда как кератиноциты используют только PGE₂S (Hanson et al., 2012). Наконец, простагландины диффундируют в кровеносные сосуды кожи, где они активируют рецепторы DP₁ и EP₂/EP₄ (Benyo et al., 2005). При этом было показано, что большее влияние на NA-индуцированную гиперимию оказывает простагландин PGD₂, действующий через DP₁ (Cheng et al., 2006). Указанные простагландиновые рецепторы регулируют аденилатциклазу, активация которой приводит к увеличению концентрации вторичного мессенджера cAMP (Braune et al., 2020). В то время как сосудорасширяющие эффекты опосредуются повышением концентрации cAMP в гладкомышечных клетках сосудов (Muggau, 1990).

Нейропротекторное действие ниацина при ишемическом инсульте. Необходимо отметить, что применение ниацина не приводит к вазодилаторным эффектам в интракраниальных сосудах, однако NA оказывает защитное действие при ишемическом инсульте. Так, при исследовании модели инсульта у крыс было показано, что NA способствует уменьшению объема ишемизированных тканей и количества апоптотических нейронов, а также сохраняет аксо-

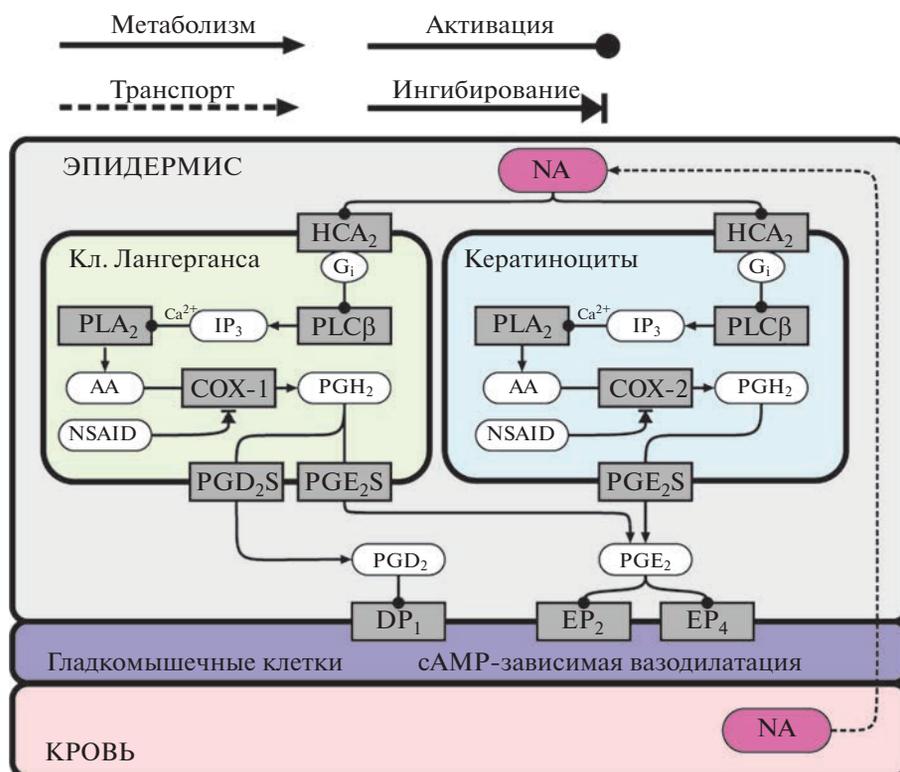


Рис. 9. Механизм ниацин-индуцированной вазодилатации. HCA₂ – ниациновый рецептор; PLCβ – фосфолипаза Cβ; PLA₂ – фосфолипаза A2; COX-1,2 – циклооксигеназы; PGE₂S – PGE₂-синтаза; PGD₂S – PGD₂-синтаза; DP₁, EP₂, EP₄ – простагландинные рецепторы.

ны и синапсы после инсульта и стимулирует ангиогенез (Tuteja, 2019). Положительное влияние NA объясняется активацией рецептора HCA₂, который экспрессируется в нейтрофилах, макрофагах и микроглии, играющих важную роль при ишемическом повреждении головного мозга (рис. 10). Моноциты изменяют дифференцировку с провоспалительного/профиброзного фенотипа LybC^{hi} на защитный фенотип LybC^{lo}, способствуя при этом восстановлению тканей (Li et al., 2022). В LybC^{lo} посредством активации HCA₂ индуцируется синтез PGD₂ гемопоэтической простагландин-D-синтазой (HPGDS) по метаболическому пути, аналогичному синтезу PGD₂ в клетках Лангерганса. Затем PGD₂ специфически связывается с рецептором DP₁, что является одним из ключевых компонентов, поддерживающих функциональность кровеносных сосудов и сокращающих область повреждения головного мозга при ишемическом поражении (Taniguchi et al., 2007). Кроме того, PGD₂ является предшественником 15-дезоксид^{12,14}-простагландина J₂ (15d-PGJ₂), который взаимодействует с гамма-рецептором, активируемым пероксисомными пролифераторами (PPARγ) (Scher, Pillinger, 2005). 15d-PGJ₂ способен стимулировать экс-

прессию фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), участвуя таким образом в формировании кровеносных сосудов посредством ангиогенеза (Kim, Surh, 2008). Другой механизм противовоспалительной активности основан на прямом ингибировании 15d-PGJ₂ IκB-киназы, которая отвечает за активацию фактора NF-κB провоспалительными стимулами (Rossi et al., 2000).

Следует отметить, что защита от ишемического повреждения не является единственной возможной нейропротекторной функцией ниацина. Существует большое количество экспериментальных подтверждений положительного действия различных форм ниацина при ряде нейродегенеративных заболеваний (Green et al., 2008; Gong et al., 2013; Xie et al., 2019). Однако описываемые механизмы, по большей части, либо сопряжены с поддержанием стабильного уровня NAD, либо включают целый спектр сиртуин-зависимых и сиртуин-независимых путей. Оценка вклада рецепторно-опосредованного механизма в данном случае представляется чрезвычайно сложной задачей (Seamon et al., 2020; Chong et al., 2021).

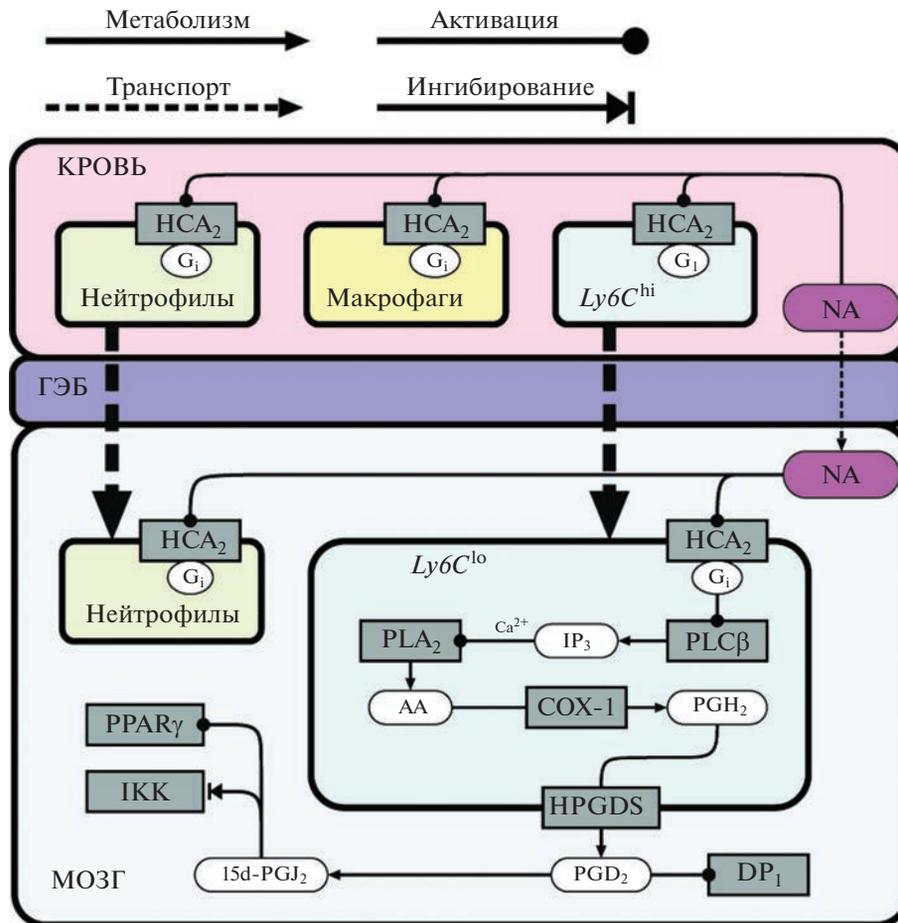


Рис. 10. Механизмы, обеспечивающие нейропротекторное действие ниацина. ГЭБ – гематоэнцефалический барьер; HCA₂ – ниациновый рецептор; PLCβ – фосфолипаза Cβ; PLA₂ – фосфолипаза A2; COX-1 – циклооксигеназа 1; HPGDS – гемопозитическая простагландин-D-синтаза; DP₁ – рецептор I простагландина D₂; PPARγ – гамма-рецептор, активируемый пероксисомными пролифераторами; IKK – IκB киназа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ниацин оказывает существенное влияние на поддержание эффективного функционирования клетки. Хотя его основная роль и состоит в обеспечении пула никотинамидных коферментов, ниацин в организме человека осуществляет и другие важные функции. Витамин B3 воздействует на несколько молекулярных процессов, которые тесно связаны друг с другом, что значительно затрудняет определение точных механизмов действия этого пищевого метаболита. Кроме того, различные патофизиологические ситуации, включающие изменение активности ферментов метаболизма ниацина, влияют на использование клетками различных предшественников NAD. Хотя к настоящему времени и установлена роль ниацина во многих клеточных процессах, обеспечивающих выработку энергии, клеточную защиту и восстановление, ряд вопросов все еще остается неизученным. Так, необходимы дополнительные исследования влияния микробиома кишечника на гомеостаз ниацина в организме млекопитающих, что

может являться критическим фактором в различных физиологических процессах, включая метаболизм, иммунный ответ и прогрессию заболеваний. Кроме того, отдельной масштабной темой является роль ниацина в регуляции эпигенетических процессов, таких как модификация гистонов и метилирование ДНК.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках плановой научно-исследовательской деятельности частного учреждения «Научно-исследовательский институт цитохимии и молекулярной фармакологии».

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В работе не было экспериментов с участием животных и людей.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Куликова В.А., Громыко Д.В., Никифоров А.А. 2018. Роль NAD в регуляторных процессах в клетках человека и животных. Биохимия. Т.83. С. 987. (Kulikova V.A., Gromyko D.V., Nikiforov A.A. 2018. The Regulatory role of NAD in human and animal cells. Biochemistry (Mosc). V. 83. P. 800.)
- Куликова В.А., Никифоров А.А. 2020. Роль гидролаз семейства NUDIX в метаболизме NAD и ADP-рибозы у млекопитающих. Биохимия. Т.85. С. 1037. (Kulikova V.A., Nikiforov A.A. 2020. Role of NUDIX hydrolases in NAD and ADP-ribose metabolism in mammals. Biochemistry (Mosc). V. 85. P. 883.)
- Abdelraheim S.R., Spiller D.G., McLennan A.G. 2017. Mouse Nudt13 is a Mitochondrial Nudix hydrolase with NAD(P)H pyrophosphohydrolase activity. Protein J. V. 36. P. 425.
- Ahmed K., Tunaru S., Tang C., Muller M., Gille A., Sassmann A., Hanson J., Offermanns S. 2010. An autocrine lactate loop mediates insulin-dependent inhibition of lipolysis through GPR81. Cell Metab. V. 11. P. 311.
- Airhart S.E., Shireman L.M., Risler L.J., Anderson G.D., Nagana Gowda G.A., Raftery D., Tian R., Shen D.D., O'Brien K.D. 2017. An open-label, non-randomized study of the pharmacokinetics of the nutritional supplement nicotinamide riboside (NR) and its effects on blood NAD+ levels in healthy volunteers. PLoS One. V. 12: e0186459. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186459>
- Anderson K.A., Madsen A.S., Olsen C.A., Hirschey M.D. 2017. Metabolic control by sirtuins and other enzymes that sense NAD(+), NADH, or their ratio. Biochim. Biophys. Acta Bioenerg. V. 1858. P. 991.
- Angeletti C., Amici A., Gilley J., Loreto A., Trapanotto A.G., Antoniou C., Merlini E., Coleman M.P., Orsomando G. 2022. SARM1 is a multi-functional NAD(P)ase with prominent base exchange activity, all regulated by multiple physiologically relevant NAD metabolites. Science. V. 25: 103812.
- Bai P., Canto C. 2012. The role of PARP-1 and PARP-2 enzymes in metabolic regulation and disease. Cell Metab. V. 16. P. 290.
- Belenky P., Christensen K.C., Gazzaniga F., Pletnev A.A., Brenner C. 2009. Nicotinamide riboside and nicotinic acid riboside salvage in fungi and mammals. Quantitative basis for Urh1 and purine nucleoside phosphorylase function in NAD+ metabolism. J. Biol. Chem. V. 284. P. 158.
- Benyo Z., Gille A., Kero J., Csiky M., Suchankova M.C., Nusing R.M., Moers A., Pfeiffer K., Offermanns S. 2005. GPR109A (PUMA-G/HM74A) mediates nicotinic acid-induced flushing. J. Clin. Invest. V. 115. P. 3634.
- Berger F., Lau C., Dahlmann M., Ziegler M. 2005. Subcellular compartmentation and differential catalytic properties of the three human nicotinamide mononucleotide adenyltransferase isoforms. J. Biol. Chem. V. 280. P. 36334.
- Bieganowski P., Brenner C. 2003. The reported human NADsyn2 is ammonia-dependent NAD synthetase from a pseudomonad. J. Biol. Chem. V. 278. P. 33056.
- Bogan K.L., Brenner C. 2010. 5'-Nucleotidases and their new roles in NAD+ and phosphate metabolism. New J. Chem. V. 34. P. 845.
- Bogan K.L., Evans C., Belenky P., Song P., Burant C.F., Kennedy R., Brenner C. 2009. Identification of Isn1 and Sdt1 as glucose- and vitamin-regulated nicotinamide mononucleotide and nicotinic acid mononucleotide [corrected] 5'-nucleotidases responsible for production of nicotinamide riboside and nicotinic acid riboside. J. Biol. Chem. V. 284. P. 34861.
- Braune S., Kupper J.H., Jung F. 2020. Effect of prostanoids on human platelet function: an overview. Int. J. Mol. Sci. V. 21: 9020. <https://doi.org/10.3390/ijms21239020>
- Bricard G., Cadassou O., Cassagnes L.E., Cros-Perrial E., Payen-Gay L., Puy J.Y., Lefebvre-Tournier I., Tozzi M.G., Dumontet C., Jordheim L.P. 2017. The cytosolic 5'-nucleotidase cN-II lowers the adaptability to glucose deprivation in human breast cancer cells. Oncotarget. V. 8. P. 67380.
- Burkle A. 2005. Poly(ADP-ribose). The most elaborate metabolite of NAD+. FEBS J. V. 272. P. 4576.
- Bzowska A., Kulikowska E., Shugar D. 2000. Purine nucleoside phosphorylases: properties, functions, and clinical aspects. Pharmacol Ther. V. 88. P. 349.
- Canto C. 2022. NAD(+) precursors: a questionable redundancy. Metabolites. V. 12: 630. <https://doi.org/10.3390/metabo12070630>
- Carlson L.A. 2005. Nicotinic acid: the broad-spectrum lipid drug. A 50th anniversary review. J. Intern. Med. V. 258. P. 94. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2005.01528.x>
- Chai J.T., Digby J.E., Choudhury R.P. 2013. GPR109A and vascular inflammation. Curr. Atheroscler. Rep. V. 15. P. 325.
- Chanvillard L., Tammara A., Sorrentino V. 2022. NAD(+) metabolism and interventions in premature renal aging and chronic kidney disease. Cells. V. 12. <https://doi.org/10.3390/cells12010021>
- Cheng K., Wu T.J., Wu K.K., Sturino C., Metters K., Gottesdiener K., Wright S.D., Wang Z., O'Neill G., Lai E., Waters M.G. 2006. Antagonism of the prostaglandin D2 receptor 1 suppresses nicotinic acid-induced vasodilation in mice and humans. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 103. P. 6682.
- Chong R., Wakade C., Seamon M., Giri B., Morgan J., Purohit S. 2021. Niacin enhancement for parkinson's disease: an effectiveness trial. Front. Aging Neurosci. V. 13. P. 667032. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.667032>
- Clement J., Wong M., Poljak A., Sachdev P., Braidly N. 2019. The Plasma NAD(+) metabolome is dysregulated in "normal" aging. Rejuvenation Res. V. 22. P. 121.
- Crawford K., Bonfiglio J.J., Mikoc A., Matic I., Ahel I. 2018. Specificity of reversible ADP-ribosylation and regulation of cellular processes. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. V. 53. P. 64.
- Davis L.C., Morgan A.J., Ruas M., Wong J.L., Graeff R.M., Poustka A.J., Lee H.C., Wessel G.M., Parrington J., Galione A. 2008. Ca(2+) signaling occurs via second messenger release from intraorganellar synthesis sites. Curr. Biol. V. 18. P. 1612.
- De Flora A., Guida L., Franco L., Zocchi E. 1997. The CD38/cyclic ADP-ribose system: a topological paradox. Int. J. Biochem. Cell Biol. V. 29. P. 1149.

- Digby J.E., Lee J.M., Choudhury R.P. 2009. Nicotinic acid and the prevention of coronary artery disease. *Curr. Opin. Lipidol.* V. 20. P. 321.
- Du J., Zhou Y., Su X., Yu J.J., Khan S., Jiang H., Kim J., Woo J., Kim J.H., Choi B.H., He B., Chen W., Zhang S., Cerione R.A., Auwerx J. et al. 2011. Sirt5 is a NAD-dependent protein lysine demalonylase and desuccinylase. *Science.* V. 334. P. 806.
- Duarte-Pereira S., Pereira-Castro I., Silva S.S., Correia M.G., Neto C., da Costa L.T., Amorim A., Silva R.M. 2016. Extensive regulation of nicotinate phosphoribosyltransferase (NAPRT) expression in human tissues and tumors. *Oncotarget.* V. 7. P. 1973.
- Duarte-Pereira S., Silva S.S., Azevedo L., Castro L., Amorim A., Silva R.M. 2014. NAMPT and NAPRT1: novel polymorphisms and distribution of variants between normal tissues and tumor samples. *Sci. Rep.* V. 4. P. 6311.
- Eckert M.A., Coscia F., Chryplewicz A., Chang J.W., Hernandez K.M., Pan S., Tienda S.M., Nahotko D.A., Li G., Blazzenovic I., Lastra R.R., Curtis M., Yamada S.D., Perets R., McGregor S.M. et al. 2019. Proteomics reveals NNMT as a master metabolic regulator of cancer-associated fibroblasts. *Nature.* V. 569. P. 723.
- Falk M.J., Zhang Q., Nakamaru-Ogiso E., Kannabiran C., Fonseca-Kelly Z., Chakarova C., Audo I., Mackay D.S., Zeitz C., Borman A.D., Staniszewska M., Shukla R., Palavalli L., Mohand-Said S., Waseem N.H. et al. 2012. NMNAT1 mutations cause Leber congenital amaurosis. *Nat. Genet.* V. 44. P. 1040.
- Figley M.D., Gu W., Nanson J.D., Shi Y., Sasaki Y., Cunnea K., Malde A.K., Jia X., Luo Z., Saikot F.K., Mosaiab T., Masic V., Holt S., Hartley-Tassell L., McGuinness H.Y. et al. 2021. SARM1 is a metabolic sensor activated by an increased NMN/NAD(+) ratio to trigger axon degeneration. *Neuron.* V. 109. P. 1118.
- Fletcher R.S., Lavery G.G. 2018. The emergence of the nicotinamide riboside kinases in the regulation of NAD+ metabolism. *J. Mol. Endocrinol.* V. 61. P. R107.
- Furuhata T., Kishida S., Sugiura H., Kamiichi A., Iikura M., Chiba K. 2014. Functional analysis of purine nucleoside phosphorylase as a key enzyme in ribavirin metabolism. *Drug. Metab. Pharmacokinet.* V. 29. P. 211.
- Galassi L., Di Stefano M., Brunetti L., Orsomando G., Amici A., Ruggieri S., Magni G. 2012. Characterization of human nicotinate phosphoribosyltransferase: kinetic studies, structure prediction and functional analysis by site-directed mutagenesis. *Biochimie.* V. 94. P. 300.
- Ganji S.H., Tavintharan S., Zhu D., Xing Y., Kamanna V.S., Kashyap M.L. 2004. Niacin noncompetitively inhibits DGAT2 but not DGAT1 activity in HepG2 cells. *J. Lipid Res.* V. 45. P. 1835.
- Garten A., Schuster S., Penke M., Gorski T., de Giorgis T., Kiess W. 2015. Physiological and pathophysiological roles of NAMPT and NAD metabolism. *Nat. Rev. Endocrinol.* V. 11. P. 535.
- Geisler C.E., Miller K.E., Ghimire S., Renquist B.J. 2021. The Role of GPR109a signaling in niacin induced effects on fed and fasted hepatic metabolism. *Int. J. Mol. Sci.* V. 22. <https://doi.org/10.3390/ijms22084001>
- Gerds J., Brace E.J., Sasaki Y., DiAntonio A., Milbrandt J. 2015. SARM1 activation triggers axon degeneration locally via NAD(+) destruction. *Science.* V. 348. P. 453.
- Gerds J., Summers D.W., Sasaki Y., DiAntonio A., Milbrandt J. 2013. Sarm1-mediated axon degeneration requires both SAM and TIR interactions. *J. Neurosci.* V. 33: 13569. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1197-13.2013>
- Gilley J., Mayer P.R., Yu G., Coleman M.P. 2019. Low levels of NMNAT2 compromise axon development and survival. *Hum. Mol. Genet.* V. 28. P. 448.
- Giroud-Gerbetant J., Joffraud M., Giner M.P., Cercillieux A., Bartova S., Makarov M.V., Zapata-Perez R., Sanchez-Garcia J.L., Houtkooper R.H., Migaud M.E., Moco S., Canto C. 2019. A reduced form of nicotinamide riboside defines a new path for NAD(+) biosynthesis and acts as an orally bioavailable NAD(+) precursor. *Mol. Metab.* V. 30. P. 192.
- Gomes P., Fleming Outeiro T., Cavadas C. 2015. Emerging role of sirtuin 2 in the regulation of mammalian metabolism. *Trends Pharmacol. Sci.* V. 36. P. 756.
- Gong B., Pan Y., Vempati P., Zhao W., Knable L., Ho L., Wang J., Sastre M., Ono K., Sauve A.A., Pasinetti G.M. 2013. Nicotinamide riboside restores cognition through an upregulation of proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1alpha regulated beta-secretase 1 degradation and mitochondrial gene expression in Alzheimer's mouse models. *Neurobiol. Aging.* V. 34. P. 1581.
- Goodman R.P., Calvo S.E., Mootha V.K. 2018. Spatiotemporal compartmentalization of hepatic NADH and NADPH metabolism. *J. Biol. Chem.* V. 293. P. 7508.
- Graeff R., Liu Q., Kriksunov I.A., Hao Q., Lee H.C. 2006. Acidic residues at the active sites of CD38 and ADP-ribosyl cyclase determine nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) synthesis and hydrolysis activities. *J. Biol. Chem.* V. 281. P. 28951.
- Graff E.C., Fang H., Wanders D., Judd R.L. 2016. Anti-inflammatory effects of the hydroxycarboxylic acid receptor 2. *Metabolism.* V. 65. P. 102.
- Grant R., Berg J., Mestayer R., Braidly N., Bennett J., Broom S., Watson J. 2019. A pilot study investigating changes in the human plasma and urine NAD+ metabolome during a 6 hour intravenous infusion of NAD. *Front. Aging Neurosci.* V. 11. P. 257.
- Green K.N., Steffan J.S., Martinez-Coria H., Sun X., Schreiber S.S., Thompson L.M., LaFerla F.M. 2008. Nicotinamide restores cognition in Alzheimer's disease transgenic mice via a mechanism involving sirtuin inhibition and selective reduction of Thr231-phosphotau. *J. Neurosci.* V. 28. P. 11500.
- Grozio A., Mills K.F., Yoshino J., Bruzzone S., Sociali G., Tokizane K., Lei H.C., Cunningham R., Sasaki Y., Migaud M.E., Imai S.I. 2019. Slc12a8 is a nicotinamide mononucleotide transporter. *Nat. Metab.* V. 1. P. 47.
- Grozio A., Sociali G., Sturla L., Caffa I., Soncini D., Salis A., Raffaelli N., De Flora A., Nencioni A., Bruzzone S. 2013. CD73 protein as a source of extracellular precursors for sustained NAD+ biosynthesis in FK866-treated tumor cells. *J. Biol. Chem.* V. 288. P. 25938.
- Haigis M.C., Mostoslavsky R., Haigis K.M., Fahie K., Christodoulou D.C., Murphy A.J., Valenzuela D.M., Yancopoulos G.D., Karow M., Blander G., Wolberger C., Prolla T.A., Weindruch R., Alt F.W., Guarente L. 2006. SIRT4 inhibits

- glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells. *Cell*. V. 126. P. 941. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.057>
- Hanson J., Gille A., Offermanns S. 2012. Role of HCA(2) (GPR109A) in nicotinic acid and fumaric acid ester-induced effects on the skin. *Pharmacol. Ther.* V. 136. P. 1.
- Hanson J., Gille A., Zwykiel S., Lukasova M., Clausen B.E., Ahmed K., Tunaru S., Wirth A., Offermanns S. 2010. Nicotinic acid- and monomethyl fumarate-induced flushing involves GPR109A expressed by keratinocytes and COX-2-dependent prostanoid formation in mice. *J. Clin. Invest.* V. 120. P. 2910.
- Hara N., Yamada K., Shibata T., Osago H., Hashimoto T., Tsuchiya M. 2007. Elevation of cellular NAD levels by nicotinic acid and involvement of nicotinic acid phosphoribosyltransferase in human cells. *J. Biol. Chem.* V. 282. P. 24574.
- Hara N., Yamada K., Terashima M., Osago H., Shimoyama M., Tsuchiya M. 2003. Molecular identification of human glutamine- and ammonia-dependent NAD synthetases. Carbon-nitrogen hydrolase domain confers glutamine dependency. *J. Biol. Chem.* V. 278. P. 10914.
- Hikosaka K., Ikutani M., Shito M., Kazuma K., Gulshan M., Nagai Y., Takatsu K., Konno K., Tobe K., Kanno H., Nakagawa T. 2014. Deficiency of nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase 3 (nmnat3) causes hemolytic anemia by altering the glycolytic flow in mature erythrocytes. *J. Biol. Chem.* V. 289. P. 14796.
- Hogan K.A., Chini C.C.S., Chini E.N. 2019. The multi-faceted ecto-enzyme CD38: roles in immunomodulation, cancer, aging, and metabolic diseases. *Front. Immunol.* V. 10. P. 1187. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01187>
- Hottiger M.O., Hassa P.O., Luscher B., Schuler H., Koch-Nolte F. 2010. Toward a unified nomenclature for mammalian ADP-ribosyltransferases. *Trends Biochem. Sci.* V. 35. P. 208.
- Hwang E.S., Song S.B. 2020. Possible Adverse effects of high-dose nicotinamide: mechanisms and safety assessment. *Biomolecules*. V. 10. P. 687.
- Ito T.K., Sato T., Hakamata A., Onoda Y., Sato S., Yamazaki F., Horikawa M., Takahashi Y., Kitamoto T., Suzuki M., Uchida S., Odagiri K., Setou M. 2020. A nonrandomized study of single oral supplementation within the daily tolerable upper level of nicotinamide affects blood nicotinamide and NAD⁺ levels in healthy subjects. *Translat. Med. Aging*. V. 4. P. 45.
- Iwata K., Ogata S., Okumura K., Taguchi H. 2003. Induction of differentiation in human promyelocytic leukemia HL-60 cell line by niacin-related compounds. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* V. 67. P. 1132.
- Jackson M.D., Denu J.M. 2002. Structural identification of 2'- and 3'-O-acetyl-ADP-ribose as novel metabolites derived from the Sir2 family of beta -NAD⁺-dependent histone/protein deacetylases. *J Biol Chem*. V. 277. P. 18535.
- Kamanna V.S., Ganji S.H., Kashyap M.L. 2009. The mechanism and mitigation of niacin-induced flushing. *Int. J. Clin. Pract.* V. 63. P. 1369.
- Kanayama M., Luo J. 2022. CD38-induced apoptosis and mitochondrial damage is restored by nicotinamide in prostate cancer. *Front. Mol. Biosci.* V. 9: 890402. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.890402>
- Kim E.H., Surh Y.J. 2008. The role of 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J(2), an endogenous ligand of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, in tumor angiogenesis. *Biochem. Pharmacol.* V. 76. P. 1544.
- Kiran S., Chatterjee N., Singh S., Kaul S.C., Wadhwa R., Ramakrishna G. 2013. Intracellular distribution of human SIRT7 and mapping of the nuclear/nucleolar localization signal. *FEBS J.* V. 280. P. 3451.
- Kitamura S., Tatsumi K. 1984. Involvement of liver aldehyde oxidase in the reduction of nicotinamide N-oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V. 120. P. 602.
- Klein C., Grahnert A., Abdelrahman A., Muller C.E., Hauschildt S. 2009. Extracellular NAD(+) induces a rise in [Ca(2+)](i) in activated human monocytes via engagement of P2Y(1) and P2Y(11) receptors. *Cell Calcium*. V. 46. P. 263.
- Kropotov A., Kulikova V., Nerinovski K., Yakimov A., Svetlova M., Solovjeva L., Sudnitsyna J., Migaud M.E., Khodorkovskiy M., Ziegler M., Nikiforov A. 2021. Equilibrative nucleoside transporters mediate the import of nicotinamide riboside and nicotinic acid riboside into human cells. *Int. J. Mol. Sci.* V. 22. <https://doi.org/10.3390/ijms22031391>
- Kropotov A., Kulikova V., Solovjeva L., Yakimov A., Nerinovski K., Svetlova M., Sudnitsyna J., Plusnina A., Antipova M., Khodorkovskiy M., Migaud M.E., Gambaryan S., Ziegler M., Nikiforov A. 2022. Purine nucleoside phosphorylase controls nicotinamide riboside metabolism in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* V. 298. P. 102615.
- Kulikova V., Shabalin K., Nerinovski K., Dolle C., Niere M., Yakimov A., Redpath P., Khodorkovskiy M., Migaud M.E., Ziegler M., Nikiforov A. 2015. Generation, release, and uptake of the NAD precursor nicotinic acid riboside by human cells. *J. Biol. Chem.* V. 290. P. 27124.
- Laing S., Unger M., Koch-Nolte F., Haag F. 2011. ADP-ribosylation of arginine. *Amino Acids*. V. 41. P. 257.
- Lauring B., Taggart A.K., Tata J.R., Dunbar R., Caro L., Cheng K., Chin J., Colletti S.L., Cote J., Khalilieh S., Liu J., Luo W.L., Maclean A.A., Peterson L.B., Polis A.B. et al. 2012. Niacin lipid efficacy is independent of both the niacin receptor GPR109A and free fatty acid suppression. *Sci. Transl. Med.* V. 4: 148ra115. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003877>
- Lee S.J., Choi S.E., Jung I.R., Lee K.W., Kang Y. 2013. Protective effect of nicotinamide on high glucose/palmitate-induced glucolipotoxicity to INS-1 beta cells is attributed to its inhibitory activity to sirtuins. *Arch. Biochem. Biophys.* V. 535. P. 187.
- Li J., Dou X., Li S., Zhang X., Zeng Y., Song Z. 2015. Nicotinamide ameliorates palmitate-induced ER stress in hepatocytes via cAMP/PKA/CREB pathway-dependent Sirt1 upregulation. *Biochim. Biophys. Acta*. V. 1853. P. 2929.
- Li Y.H., Zhang Y., Pan G., Xiang L.X., Luo D.C., Shao J.Z. 2022. Occurrences and functions of Ly6C(hi) and Ly6C(lo) macrophages in health and disease. *Front. Immunol.* V. 13:

- P. 901672.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.901672>
- Liu C., Wu J., Zhu J., Kuei C., Yu J., Shelton J., Sutton S.W., Li X., Yun S.J., Mirzadegan T., Mazur C., Kamme F., Lovenberg T.W. 2009. Lactate inhibits lipolysis in fat cells through activation of an orphan G-protein-coupled receptor, GPR81. *J. Biol. Chem.* V. 284. P. 2811.
- Liu L., Su X., Quinn W.J., 3rd, Hui S., Krukenberg K., Frederick D.W., Redpath P., Zhan L., Chellappa K., White E., Migaud M., Mitchison T.J., Baur J.A., Rabinowitz J.D. 2018. Quantitative Analysis of NAD synthesis-breakdown fluxes. *Cell Metab.* V. 27. P. 1067.
- Lou Y., Wang Z., Xu Y., Zhou P., Cao J., Li Y., Chen Y., Sun J., Fu L. 2015. Resveratrol prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity in H9c2 cells through the inhibition of endoplasmic reticulum stress and the activation of the Sirt1 pathway. *Int. J. Mol. Med.* V. 36. P. 873.
- Lukaacs M., Gilley J., Zhu Y., Orsomando G., Angeletti C., Liu J., Yang X., Park J., Hopkin R.J., Coleman M.P., Zhai R.G., Stottmann R.W. 2019. Severe biallelic loss-of-function mutations in nicotinamide mononucleotide adenyltransferase 2 (NMNAT2) in two fetuses with fetal akinesia deformation sequence. *Exp. Neurol.* V. 320: 112961.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2019.112961>
- Lukasova M., Hanson J., Tunaru S., Offermanns S. 2011. Nicotinic acid (niacin): new lipid-independent mechanisms of action and therapeutic potentials. *Trends Pharmacol. Sci.* V. 32. P. 700.
- Luongo T.S., Eller J.M., Lu M.J., Niere M., Raith F., Perry C., Bornstein M.R., Olyphint P., Wang L., McReynolds M.R., Migaud M.E., Rabinowitz J.D., Johnson F.B., Johnson K., Ziegler M. et al. 2020. SLC25A51 is a mammalian mitochondrial NAD(+) transporter. *Nature.* V. 588. P. 174.
- Maciejewski-Lenoir D., Richman J.G., Hakak Y., Gaidarov I., Behan D.P., Connolly D.T. 2006. Langerhans cells release prostaglandin D2 in response to nicotinic acid. *J. Invest. Dermatol.* V. 126. P. 2637.
- Maeta A., Sano M., Fukuwatari T., Shibata K. 2014. Simultaneous measurement of nicotinamide and its catabolites, nicotinamide N-oxide, N(1)-methyl-2-pyridone-5-carboxamide, and N(1)-methyl-4-pyridone-3-carboxamide, in mice urine. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* V. 78. P. 1306.
- Magni G., Amici A., Emanuelli M., Orsomando G., Raffaelli N., Ruggieri S. 2004. Structure and function of nicotinamide mononucleotide adenyltransferase. *Curr. Med. Chem.* V. 11. P. 873.
- Magni G., Amici A., Orsomando G. 2013. The enzymology of cytosolic pyrimidine 5'-nucleotidases: functional analysis and physiopathological implications. *Curr. Med. Chem.* V. 20. P. 4304.
- Marletta A.S., Massarotti A., Orsomando G., Magni G., Rizzi M., Garavaglia S. 2015. Crystal structure of human nicotinic acid phosphoribosyltransferase. *FEBS Open Bio.* V. 5. P. 419.
- Menon R.M., Gonzalez M.A., Adams M.H., Tolbert D.S., Leu J.H., Cefali E.A. 2007. Effect of the rate of niacin administration on the plasma and urine pharmacokinetics of niacin and its metabolites. *J. Clin. Pharmacol.* V. 47. P. 681.
- Montserrat-de la Paz S., Naranjo M.C., Lopez S., Abia R., Murrina F.J.G., Bermudez B. 2017. Niacin and its metabolites as master regulators of macrophage activation. *J. Nutr. Biochem.* V. 39. P. 40.
- Moreschi I., Bruzzone S., Melone L., De Flora A., Zocchi E. 2006. NAADP+ synthesis from cADPRP and nicotinic acid by ADP-ribosyl cyclases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V. 345. P. 573.
- Mori V., Amici A., Mazzola F., Di Stefano M., Conforti L., Magni G., Ruggieri S., Raffaelli N., Orsomando G. 2014. Metabolic profiling of alternative NAD biosynthetic routes in mouse tissues. *PLoS One.* V. 9: e113939.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113939>
- Murray K.J. 1990. Cyclic AMP and mechanisms of vasodilation. *Pharmacol. Ther.* V. 47. P. 329.
- Nakagawa-Nagahama Y., Igarashi M., Miura M., Kashiwabara K., Yaku K., Fukamizu Y., Sato T., Sakurai T., Nakagawa T., Kadowaki T., Yamauchi T. 2023. Blood levels of nicotinic acid negatively correlate with hearing ability in healthy older men. *BMC Geriatr.* V. 23. P. 97.
- Ortolan E., Augeri S., Fissolo G., Musso I., Funaro A. 2019. CD157: From immunoregulatory protein to potential therapeutic target. *Immunol. Lett.* V. 205. P. 59.
- Ortolan E., Vacca P., Capobianco A., Armando E., Crivellin F., Horenstein A., Malavasi F. 2002. CD157, the Janus of CD38 but with a unique personality. *Cell Biochem. Funct.* V. 20. P. 309.
- Osborne B., Cooney G.J., Turner N. 2014. Are sirtuin deacylase enzymes important modulators of mitochondrial energy metabolism? *Biochim. Biophys. Acta.* V. 1840. P. 1295.
- Osterloh J.M., Yang J., Rooney T.M., Fox A.N., Adalbert R., Powell E.H., Sheehan A.E., Avery M.A., Hackett R., Logan M.A., MacDonald J.M., Ziegenfuss J.S., Milde S., Hou Y.J., Nathan C., et al. 2012. dSarm/Sarm1 is required for activation of an injury-induced axon death pathway. *Science.* V. 337. P. 481.
- Palazzo L., Thomas B., Jemth A.S., Colby T., Leidecker O., Feijs K.L., Zaja R., Loseva O., Puigvert J.C., Matic I., Helleday T., Ahel I. 2015. Processing of protein ADP-ribosylation by Nudix hydrolases. *Biochem J.* V. 468. P. 293.
- Pike N.B. 2005. Flushing out the role of GPR109A (HM74A) in the clinical efficacy of nicotinic acid. *J. Clin. Invest.* V. 115. P. 3400.
- Quarona V., Zaccarello G., Chillemi A., Brunetti E., Singh V.K., Ferrero E., Funaro A., Horenstein A.L., Malavasi F. 2013. CD38 and CD157: a long journey from activation markers to multifunctional molecules. *Cytometry B Clin. Cytom.* V. 84. P. 207.
- Ratajczak J., Joffraud M., Trammell S.A., Ras R., Canela N., Boutant M., Kulkarni S.S., Rodrigues M., Redpath P., Migaud M.E., Auwerx J., Yanes O., Brenner C., Canto C. 2016. NRK1 controls nicotinamide mononucleotide and nicotinamide riboside metabolism in mammalian cells. *Nat. Commun.* V. 7: 13103.
<https://doi.org/10.1038/ncomms13103>
- Real A.M., Hong S., Pissios P. 2013. Nicotinamide N-oxidation by CYP2E1 in human liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.* V. 41. P. 550.
- Roessler C., Tutting C., Meleshin M., Steegborn C., Schutkowski M. 2015. A Novel continuous assay for the deacylase Sirtuin 5 and other deacetylases. *J. Med. Chem.* V. 58. P. 7217.
- Rossi A., Kapahi P., Natoli G., Takahashi T., Chen Y., Karin M., Santoro M.G. 2000. Anti-inflammatory cyclopentenone

- prostaglandins are direct inhibitors of IkappaB kinase. *Nature*. V. 403. P. 103.
- Sadr Z., Ghasemi A., Rohani M., Alavi A. 2023. NMNAT1 and hereditary spastic paraplegia (HSP): expanding the phenotypic spectrum of NMNAT1 variants. *Neuromuscular Disorders*. V. 33. P. 295.
- Sallin O., Reymond L., Gondrand C., Raith F., Koch B., Johnson K. 2018. Semisynthetic biosensors for mapping cellular concentrations of nicotinamide adenine dinucleotides. *Elife*. V. 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.32638>
- Scher J.U., Pillinger M.H. 2005. 15d-PGJ2: the anti-inflammatory prostaglandin? *Clin Immunol*. V. 114. P. 100.
- Schmidt M.S., Brenner C. 2019. Absence of evidence that Slc12a8 encodes a nicotinamide mononucleotide transporter. *Nat. Metab*. V. 1: 660. <https://doi.org/10.1038/s42255-019-0085-0>
- Seamon M., Purohit S., Giri B., Baban B., Morgan J., Chong R., Wakade C. 2020. Niacin for Parkinson's disease. *Clin. Exper. Neuroimmunol*. V. 11. P. 47.
- Shats I., Williams J.G., Liu J., Makarov M.V., Wu X., Lih F.B., Deterding L.J., Lim C., Xu X., Randall T.A., Lee E., Li W., Fan W., Li J.L., Sokolsky M. et al. 2020. Bacteria boost mammalian host NAD metabolism by engaging the deamidated biosynthesis pathway. *Cell Metab*. V. 31. P. 564.
- Shi H., Enriquez A., Rapadas M., Martin E., Wang R., Moreau J., Lim C.K., Szot J.O., Ip E., Hughes J.N., Sugimoto K., Humphreys D.T., McInerney-Leo A.M., Leo P.J., Maghzal G.J. et al. 2017. NAD deficiency, congenital malformations, and niacin supplementation. *New Engl. J. Med*. V. 377. P. 544.
- Shrimp J.H., Hu J., Dong M., Wang B.S., MacDonald R., Jiang H., Hao Q., Yen A., Lin H. 2014. Revealing CD38 cellular localization using a cell permeable, mechanism-based fluorescent small-molecule probe. *J. Am. Chem. Soc*. V. 136. P. 5656.
- Soudijn W., van Wijngaarden I., Ijzerman A.P. 2007. Nicotinic acid receptor subtypes and their ligands. *Med. Res. Rev*. V. 27. P. 417.
- Sumoza-Toledo A., Penner R. 2011. TRPM2: a multifunctional ion channel for calcium signalling. *J. Physiol*. V. 589. P. 1515.
- Szot J.O., Campagnolo C., Cao Y., Iyer K.R., Cuny H., Drysdale T., Flores-Daboub J.A., Bi W., Westerfield L., Liu P., Leung T.N., Choy K.W., Chapman G., Xiao R., Siu V.M. et al. 2020. Bi-allelic mutations in NADSYN1 cause multiple organ defects and expand the genotypic spectrum of congenital NAD deficiency disorders. *Am. J. Hum. Genet*. V. 106. P. 129.
- Taniguchi H., Mohri I., Okabe-Araori H., Aritake K., Wada K., Kanekiyo T., Narumiya S., Nakayama M., Ozono K., Urade Y., Taniike M. 2007. Prostaglandin D2 protects neonatal mouse brain from hypoxic ischemic injury. *J. Neurosci*. V. 27. P. 4303.
- Trammell S.A., Schmidt M.S., Weidemann B.J., Redpath P., Jaksch F., Dellinger R.W., Li Z., Abel E.D., Migaud M.E., Brenner C. 2016. Nicotinamide riboside is uniquely and orally bioavailable in mice and humans. *Nat. Commun*. V. 7: 12948. <https://doi.org/10.1038/ncomms12948>
- Tuteja S. 2019. Activation of HCAR2 by niacin: benefits beyond lipid lowering. *Pharmacogenomics*. V. 20. P. 1143.
- Vina J., Saez G.T., Gambini J., Gomez-Cabrera M.C., Borras C. 2016. Role of NAD(+)/NADH redox ratio in cell metabolism: A tribute to Helmut Sies and Theodor Bucher and Hans A. Krebs. *Arch. Biochem. Biophys*. V. 595. P. 176.
- Vyas S., Matic I., Uchima L., Rood J., Zaja R., Hay R.T., Ahel I., Chang P. 2014. Family-wide analysis of poly(ADP-ribose) polymerase activity. *Nat. Commun*. V. 5. P. 4426.
- Wanders D., Judd R.L. 2011. Future of GPR109A agonists in the treatment of dyslipidaemia. *Diabetes Obes. Metab*. V. 13. P. 685.
- Wang Y., He J., Liao M., Hu M., Li W., Ouyang H., Wang X., Ye T., Zhang Y., Ouyang L. 2019. An overview of Sirtuins as potential therapeutic target: structure, function and modulators. *Eur. J. Med. Chem*. V. 161. P. 48.
- Wilson C., Zhang X., Buckley C., Heathcote H.R., Lee M.D., McCarron J.G. 2019. Increased vascular contractility in hypertension results from impaired endothelial calcium signaling. *Hypertension*. V. 74. P. 1200.
- Wise A., Foord S.M., Fraser N.J., Barnes A.A., Elshourbagy N., Eilert M., Ignar D.M., Murdock P.R., Steplewski K., Green A., Brown A.J., Dowell S.J., Szekeres P.G., Hassall D.G., Marshall F.H. et al. 2003. Molecular identification of high and low affinity receptors for nicotinic acid. *J. Biol. Chem*. V. 278. P. 9869.
- Xie N., Zhang L., Gao W., Huang C., Huber P.E., Zhou X., Li C., Shen G., Zou B. 2020. NAD(+) metabolism: pathophysiologic mechanisms and therapeutic potential. *Signal Transduct. Target Ther*. V. 5: 227. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00311-7>
- Xie X., Gao Y., Zeng M., Wang Y., Wei T.F., Lu Y.B., Zhang W.P. 2019. Nicotinamide ribose ameliorates cognitive impairment of aged and Alzheimer's disease model mice. *Metab. Brain Dis*. V. 34. P. 353.
- Xu J., Jackson C.W., Khoury N., Escobar I., Perez-Pinzon M.A. 2018. Brain SIRT1 mediates metabolic homeostasis and neuroprotection. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. V. 9: 702. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00702>
- Yaku K., Palikhe S., Izumi H., Yoshida T., Hikosaka K., Hayat F., Karim M., Iqbal T., Nitta Y., Sato A., Migaud M.E., Ishihara K., Mori H., Nakagawa T. 2021. BST1 regulates nicotinamide riboside metabolism via its glycohydrolase and base-exchange activities. *Nat. Commun*. V. 12. P. 6767. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27080-3>
- Yamagata K., Goto Y., Nishimasu H., Morimoto J., Ishitani R., Dohmae N., Takeda N., Nagai R., Komuro I., Suga H., Nureki O. 2014. Structural basis for potent inhibition of SIRT2 deacetylase by a macrocyclic peptide inducing dynamic structural change. *Structure*. V. 22. P. 345.
- Yang T., Sauve A.A. 2006. NAD metabolism and sirtuins: metabolic regulation of protein deacetylation in stress and toxicity. *AAPS J*. V. 8: E632. <https://doi.org/10.1208/aapsj080472>
- Yang Y., Sauve A.A. 2016. NAD(+) metabolism: bioenergetics, signaling and manipulation for therapy. *Biochim. Biophys. Acta*. V. 1864. P. 1787.
- Yoshida M., Satoh A., Lin J.B., Mills K.F., Sasaki Y., Rensing N., Wong M., Apte R.S., Imai S.I. 2019. Extracellular vesicle-contained eNAMPT delays aging and extends lifespan in mice. *Cell Metab*. V. 30. P. 329.
- Zapata-Perez R., Wanders R.J.A., van Karnebeek C.D.M., Houtkooper R.H. 2021. NAD(+) homeostasis in human

- health and disease. *EMBO Mol. Med.* V. 13. P. e13943. <https://doi.org/10.15252/emmm.202113943>
- Zeidler J.D., Hogan K.A., Agorrod G., Peclat T.R., Kashyap S., Kanamori K.S., Gomez L.S., Mazdeh D.Z., Warner G.M., Thompson K.L., Chini C.C.S., Chini E.N. 2022. The CD38 glycohydrolase and the NAD sink: implications for pathological conditions. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* V. 322. P. C521.
- Zha M., Guo Q., Zhang Y., Yu B., Ou Y., Zhong C., Ding J. 2008. Molecular mechanism of ADP-ribose hydrolysis by human NUDT5 from structural and kinetic studies. *J. Mol. Biol.* V. 379. P. 568.
- Zhang F.-J., Gu Q.-M., Jing P., Sih C.J. 1995. Enzymatic cyclization of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP). *Bioorganic Med. Chem. Letters.* V. 5. P. 2267. [https://doi.org/10.1016/0960-894X\(95\)00393-8](https://doi.org/10.1016/0960-894X(95)00393-8)
- Zhao Y.J., Lam C.M., Lee H.C. 2012. The membrane-bound enzyme CD38 exists in two opposing orientations. *Sci. Signal.* V. 5. P. ra67.
- Zhao Z.Y., Xie X.J., Li W.H., Liu J., Chen Z., Zhang B., Li T., Li S.L., Lu J.G., Zhang L., Zhang L.H., Xu Z., Lee H.C., Zhao Y.J. 2019. A cell-permeant mimetic of NMN activates SARM1 to produce cyclic ADP-ribose and induce non-apoptotic cell death. *iScience.* V. 15. P. 452. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.05.001>
- Zielinska W., Barata H., Chini E.N. 2004. Metabolism of cyclic ADP-ribose: Zinc is an endogenous modulator of the cyclase/NAD glycohydrolase ratio of a CD38-like enzyme from human seminal fluid. *Life Sci.* V. 74. P. 1781.
- Zuo W., Liu N., Zeng Y., Liu Y., Li B., Wu K., Xiao Y., Liu Q. 2021. CD38: A potential therapeutic target in cardiovascular disease. *Cardiovasc. Drugs Ther.* V. 35. P. 815.

Metabolism and Receptor Mechanisms of Niacin Action

S. E. Boronovskiy^a, V. S. Kopylova^{a, *}, and Y. R. Nartsissov^{a, b}

^a*Institute of Cytochemistry and Molecular Pharmacology, Moscow, 115404 Russia*

^b*Biomedical Research Group, BiDiPharma GmbH, Siek, 22962 Germany*

*e-mail: kopilova.veronika@yandex.ru

The article discusses the metabolism of niacin, also known as vitamin B3 or PP, and the mechanisms of its receptor-induced functions in the human body. Niacin exists as a several molecular compounds that act as the nicotinamide coenzymes precursors. These coenzymes being electron donors or acceptors in redox reactions catalyzed by various enzymes play a crucial role in metabolism. Maintenance of the intracellular niacin pool is vital not only for redox metabolism, but also for the NAD-dependent pathways functioning. At the same time, pathophysiological situations and changes in enzyme activity can affect the necessity for various niacin forms. In addition to indirect effects via nicotinamide coenzymes, it also has a number of direct effects, including anti-lipolytic, vasodilatory, and neuroprotective functions, the exact mechanism of which has not been studied fully up to date. Overall, niacin plays a vital role in maintaining the efficient cell functioning, and further study of its influence on various physiological aspects, including the gut microbiome and epigenetic regulation, could lead to new discoveries and treatments for various diseases.

Keywords: vitamin B3, niacin, metabolism, NAD

ОБЗОР ЛОКАЛЬНЫХ КЛЕТОЧНО-МОЛЕКУЛЯРНЫХ ПРОЦЕССОВ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ, ИНДУЦИРОВАННЫХ КАЛЬЦИЙФОСФАТНЫМИ МАТЕРИАЛАМИ

© 2023 г. Л. А. Мирошниченко¹, Т. Ю. Полякова², Л. С. Литвинова¹ *, И. А. Хлусов¹

¹Лаборатория клеточных и микрофлюидных технологий, Сибирский государственный медицинский университет, Томск, 634050 Россия

²Кафедра нормальной физиологии, Сибирский государственный медицинский университет, Томск, 634050 Россия

*E-mail: larisalitinova@yandex.ru

Поступила в редакцию 20.06.2023 г.

После доработки 01.08.2023 г.

Принята к публикации 04.08.2023 г.

Одной из ведущих причин госпитализации, инвалидизации и смертности 50% женщин и 20% мужчин в возрастной группе старше 50 лет являются переломы костей и их осложнения, обусловленные заболеваниями опорно-двигательной системы. Активный поиск решения проблемы, связанной с ограничениями применения в клинике ауто-, алло- и ксенотрансплантатов, для замещения костных дефектов, инициировал развитие регенеративного подхода, основанного на постепенном замещении искусственного материала растущей костной тканью. Перспективными в этом отношении являются материалы на основе фосфатов кальция, выполняющие роль активного источника химических элементов (кальций, фосфор и др.), способные оптимизировать процесс сращения костного дефекта и обеспечить замену имплантата новой костной тканью. В представленном обзоре обобщены данные из литературы о локальной биологической активности, клетках-мишенях и молекулярных эффектах фосфатов кальция. Показано, что кальцийфосфатные материалы биосовместимы, способны адсорбировать регуляторные белки и клетки, оказывая влияние на их генетический и секреторный аппарат и запуская процесс дифференцировки МСК в остеогенном направлении. При этом успешная реализация локальных механизмов остеоинтеграции на границе раздела кость–имплантат снижает риск перипротезной инфекции и отторжения искусственных изделий. Дальнейшее изучение и использование кальцийфосфатных материалов позволит осуществить значительный прорыв в решении современных проблем регенерации костной ткани, связанный с точным (цифровым) биоинженерным подходом на основе аддитивных технологий и искусственного интеллекта.

Ключевые слова: кальцийфосфатные материалы, остеоиндукция, остеогенные клетки, остеогенез, регенерация, мезенхимные стволовые клетки, клеточно-молекулярные механизмы

DOI: 10.31857/S0041377123060068, EDN: QNYLGA

Переломы костей и их осложнения (несращение, ложные суставы, остеомиелит и др.) (Ekegren et al., 2018), а также заболевания (остеонекроз, остеопороз и др.) (Miller, 2016; Zhao et al., 2018) являются одной из ведущих причин госпитализации, инвалидизации и смертности населения во всем мире. Так, 70% людей в возрастной группе от 50 лет и старше рискуют получить переломы, обусловленные остеопорозом (Coughlan, Dockery, 2014).

Большую проблему составляют крупные (более 2.5 см) костные дефекты (Schemitsch, 2017), которые часто формируются после травм и заболеваний костей (включая онкологические), не могут регенерировать посредством биологических механизмов (El-Rashidy et al., 2017) и требуют хирургического лечения. Активный поиск решения проблем, связанных с применением аутоотрансплантатов (золотой стандарт лечения, но малый объем кости, двойная травматизация), алло- и ксенотрансплантатов (риск переноса инфекций, иммунологический конфликт, слабый остеогенез) (Karalashvili et al., 2018), деминерализованного костного матрикса (неэффективен по некоторым сообщениям (Samrana et al., 2014)) для замещения костных дефектов, инициировал развитие альтернативных методов и материалов для тканевой инженерии (Thrivikraman et al., 2017). Существуют надежды если не на сокращение сроков

Принятые сокращения: BMP – морфогенетический белок кости; МСК – мезенхимная стволовая клетка; СККМ – стромальные клетки костного мозга; СаР – кальцийфосфат; НАР – гидроксипатит; М-CSF (CSF1) – макрофагальный колониестимулирующий фактор; MNGC – многоядерная гигантская клетка; РКС – протеинкиназа С; Рi – фосфатная группа (неорганический фосфор); РРi – пирофосфат; RANK – рецептор-активатор NF-κB; RANKL – лиганд RANK; β-TCP (TCP) – β-трикальцийфосфат; TGF-β – трансформирующий фактор роста β.

терапии, то на оптимизацию и контроль за процессом лечения по сравнению с использованием традиционных трансплантатов (Корель, Кузнецов, 2019).

В настоящее время актуальным становится регенеративный подход к лечению повреждений и заболеваний костной ткани, основанный на постепенном замещении искусственного материала растущей костной тканью. Биоматериал, выполняющий роль активного источника химических элементов (кальций, фосфор и др.), необходимых для построения костной ткани, должен оптимизировать процесс сращения костного дефекта за счет резорбции и замены имплантата новой костной тканью. Понятными и наиболее изученными свойствами в этом отношении обладают материалы на основе фосфатов кальция (Liu et al., 2022).

По ключевому словосочетанию “calcium phosphate materials for bone” поисковая система Pubmed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) показала прирост публикаций от одной в 1976 г. до ежегодных 321–360 статей в 2013–2021 гг. Однако несмотря на многообразие исследований и разработок в области кальцийфосфатных (СаР) материалов и покрытий, до сих пор биологические механизмы их остеоинтеграции мало понятны (Xiao et al., 2020); клиническое применение носит консервативный характер (Jeong et al., 2019), в основном в области цементов для заполнения костных дефектов (Thrivikraman et al., 2017).

Существует локальное и дистантное (через регуляторные системы организма) влияние имплантируемых материалов и изделий на органы-мишени (Ratner et al., 2004).

В настоящем обзоре обобщены данные из литературы о локальной биологической активности, клетках-мишенях и молекулярных эффектах фосфатов кальция, применяемых для стимуляции репаративной регенерации костной ткани.

КАЛЬЦИЙФОСФАТНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

В настоящее время синтетические СаР-материалы и покрытия, благодаря своему физико-химическому подобию минеральному матриксу природной костной ткани, активно применяются в биомедицине (одни или в составе композитов) для замещения дефектов, лечения повреждений и заболеваний опорно-двигательного аппарата (Kim, Park, 2020), в том числе при сниженном потенциале к репарации кости. Синтезированная керамика, в основном, состоит из спеченных СаР, включающих трикальцийфосфат (ТСР или β -ТСР), гидроксиапатит (НАР) или двухфазный СаР (НАР и β -ТСР кальцийфосфат), а также аморфный СаР (Samavedi et al., 2013). Активное изучение фосфатов кальция в качестве биоматериалов для трансплантации началось с 1900-х годов прошлого столетия. Первые попытки их использования для заполнения костных дефектов у кроли-

ков были предприняты в первой половине XX века (Albee, 1920).

СаР-керамика относится к классу перестраиваемых биоактивных материалов, способных образовывать связи с окружающими тканями и проявлять остеокондуктивность (свойство образования костной ткани на поверхности или в объеме материала за счет усиления кондукции остеогенных клеток и реваскуляризации) и (или) остеоиндуктивность (способность материала и/или его компонентов стимулировать дифференцировку стволовых клеток в хондроциты и остеобласты) (Fillingham, Jacobs, 2014). Однако не все типы СаР-керамики обладают одинаковым биологическим действием (Ghosh et al., 2008); большинство из них являются остеокондуктивными, и только некоторые типы способны к остеоиндукции (Jeong et al., 2019).

Различия связаны с особенностями физико-химических и структурных параметров СаР-керамики. Многочисленные исследования позволили сформировать ряд типов СаР-керамики по остеоиндуктивному потенциалу в присутствии остеогенных добавок (аскорбиновой кислоты, дексаметазона, глицерофосфата): ТСР > двухфазный СаР \approx НАР > аморфный СаР (Yuan et al., 2010), а также при их отсутствии: двухфазный СаР > ТСР > НАР (Polini et al., 2011). Эти различия в рядах остеоиндуктивности предполагают, что физико-химические свойства СаР-керамики могут значительно влиять на остеоиндукцию; кроме того, двухфазные СаР, которые сочетают свойства как НАР, так и ТСР, могут обладать более высокой остеоиндуктивностью, чем чистые НАР или ТСР.

Остеорепаративная функция СаР обусловлена не только биосовместимостью, но и биоразлагаемостью (Ben-Nissan, 2014). В этом плане пришло понимание, что аморфные СаР, вследствие своей высокой растворимости и способности трансформироваться в октакальцийфосфат, могут не только вызывать периимплантационное воспаление (Edwards et al., 2011), но и способствовать остеоиндукции *in vitro* (Litvinova et al., 2020) и *in vivo* (Komarova et al., 2020).

В организме биологически активные материалы из СаР-керамики претерпевают биотрансформацию: растворение (клеточную резорбцию), ионный обмен и осаждение минеральной фазы (Мао et al., 2015). Как следствие, формируется слой карбонатного гидроксиапатита как триггер образования новой минерализованной кости (Daculsi et al., 1989) на границе раздела, что приводит к химическому и биологическому соединению материала имплантата с костной тканью (Добринская, 2018). Апатитовый слой растет в виде поликристаллических агломератов, в состав которых включаются эндогенные белки костного матрикса, способствующие прикреплению и росту стволовых и остеогенных клеток. Эти клетки продуцируют костный внеклеточный матрикс, обеспечивающий биоминерализацию — связывание неорганической поверхности имплантата с органиче-

скими компонентами тканей (Du et al., 2000). Таким образом, граница раздела между биоактивным имплантатом и костью при ее ремоделировании почти идентична естественно возникающим границам раздела между остеонами.

После имплантации растворимость СаР приводит к локальному увеличению концентрации ионов кальция и фосфата, а также изменению уровня рН (Ben-Nissan et al., 2014), влияющего на адгезию белков (Jeong et al., 2019). Растворимость фосфатов кальция снижается в следующем порядке: аморфный СаР > ТСР > двухфазный СаР > НАР и зависит от отношения Са/Р (более низкое соотношение характеризуется более высокой кислотностью и растворимостью фосфатов кальция) и значений рН среды. Среди СаР стехиометрический НАР (Са/Р = 1.67) является наиболее стабильным и наименее растворимым в водной среде (Samavedi et al., 2013).

Согласно существующим данным, костный минерал первоначально образуется за счет спонтанного осаждения ионов кальция и фосфата с образованием кристаллов НАР в матричных везикулах остеообластов, которые затем попадают во внеклеточную жидкость, способствуя дальнейшей кристаллизации. Этот процесс негативно регулируется пирофосфатом (PPi), который образуется как внутри-, так и вне клеток, поскольку избыток PPi приводит к снижению минерализации костей, а дефицит — к избыточному образованию минералов (Sapir-Kogen, Livshits, 2011). В свою очередь, щелочная фосфатаза во внеклеточных везикулах высвобождает фосфатные группы (Pi) из пирофосфата, которые, напротив, стимулируют кальцификацию тканей. Таким образом, соотношение Pi/PPi является недавно установленным молекулярным механизмом, модулирующим минерализацию костного матрикса (Murshed, 2018).

Известно, что гомеостаз фосфатов контролирует гликопротеин 1 плазматических клеток, кодируемый геном эктонуклеотидной пирофосфатазы/фосфодиэстеразы 1 (ENPP1), который активируется для подавления дальнейшей минерализации в ответ на экспрессию высоких уровней белка кости BMP-2 и начало минерализации (Goding et al., 2003). Однако исследования показали, что экспрессия гликопротеина 1 ограничена теми клетками, которые находятся в непосредственном контакте с остеоиндуктивной СаР поверхностью. Вероятно, это обусловлено локальным истощением ионов кальция и неорганического фосфата в пересыщенной среде вследствие обратного осаждения и кристаллизации СаР на искусственном материале (Bohner, Miron, 2018; Othman et al., 2019).

Клетки, находящиеся в прямом контакте с таким материалом, первыми дифференцируются в остеогенном направлении (Othman et al., 2019). Остеокласты, образующиеся из предшественников моноцитарного ряда, уменьшают значение рН до 5 за счет протонирования межклеточной среды (Humbert et al.,

2019), секретируют катепсин К и матриксные металлопротеиназы, что, в дополнение к химическому растворению, приводит к резорбции СаР-керамики и высвобождению ионов Са и фосфата (Ripamonti, Roden, 2010). В связи с вариабельной растворимостью СаР-материалов и покрытий, существует их прямое (за счет структуры объема и/или поверхности) и не прямое (посредством ионного обмена) влияние на их деградацию (Bianchi et al., 2014), а также на костную ткань и ее компоненты (Khlusov, et al., 2018).

НЕПРЯМОЕ ВЛИЯНИЕ СаР НА ОСТЕОГЕННЫЕ КЛЕТКИ, ОСТЕОИНДУКТИВНЫЕ ГЕНЫ, СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ И БЕЛКИ

Ионы кальция и фосфата влияют на регенерацию костей посредством внутриклеточной передачи сигналов (Jeong et al., 2019). Так, согласно данным из литературы (Jung et al., 2010), внеклеточный кальций, полученный в результате растворения НАР, связываясь с кальций-чувствительными рецепторами, через кальциевые каналы активирует путь СаМК2α/CAM, который в свою очередь модулирует дифференцировку остеообластов через белок CREB и (или) путь ERK1/2 (Zayzafoon et al., 2005). Подтверждена также роль Са²⁺ и в активации классического MAP-киназного пути (Liu et al., 2008).

Ионы кальция и фосфата способствуют экспрессии маркеров дифференцировки и созревания остеообластов, таких как коллаген I типа, щелочная фосфатаза (ALP), морфогенетические белки кости (BMP), остеоопонтин, остеокальцин, костный сиалопротеин, фактор транскрипции RUNX2 (Orimo, 2010). Например, в независимой работе (Barradas et al., 2012) показано, что повышение уровня Са²⁺ в межклеточной среде увеличивает экспрессию мРНК гена *BMP-2* в стромальных клетках костного мозга (СККМ) человека в отсутствие остеогенных добавок, предположительно за счет активации протеинкиназы С (PKC) и ERK1/2-зависимого пути, в результате чего димер c-FOS—c-JUN может связываться с доменом AP-1 в промоторной области гена *BMP-2*. При этом увеличение концентрации Са²⁺ вне клетки способствует внутриклеточному выбросу его из органелл (Majidinia et al., 2018). Одним из тонких регуляторных механизмов этого процесса могут быть Са²⁺-активируемые калиевые каналы цитоплазматической мембраны, которые способствуют внутриклеточному повышению концентрации Са²⁺, гиперполяризации мембраны и инициации дифференцировки мезенхимных стволовых клеток (МСК) (Pchelintseva, Djamgoz, 2018).

Существует предположение, что минерализация и регуляция скорости роста кристаллов минеральной фазы может инициироваться белками (Bellows et al., 1991). Так, различные неколлагеновые белки, связанные с подложкой ковалентными связями, могут

способствовать минерализации (Добринская, 2018). В то же время в зависимости от внешних факторов подобные протеины могут как инициировать, так и блокировать процессы минерализации (Nudelman et al., 2010). Известно, что макромолекулы, подавляющие рост кристаллов в растворе, могут быть подложкой для ориентированной нуклеации новой минеральной фазы (Flade et al., 2001). Кроме того, адсорбция протеинов может понижать поверхностную энергию на границе керамика–жидкость и, тем самым, снижать способность поверхности к минеральной нуклеации, а также тормозить процессы минерализации вследствие адсорбции белков на центрах выделения новой кристаллической фазы (Combes, Ray, 2002).

Ряд исследователей указывают на участие ионов Ca^{2+} в секреции про- и противовоспалительных цитокинов (Litvinova et al., 2020) с остеомодулирующим потенциалом (Yugova et al., 2021), в стимуляции зрелых костных клеток за счет образования оксида азота (Foreman et al., 2005), увеличении продолжительности жизни остеобластов через активацию пути PI3K/Akt (Danciu et al., 2003), а также в дифференцировке остеокластов и регулировании их резорбтивной активности (Kuroda et al., 2008).

Кроме того, ионизированный кальций, высвобождающийся из СаР-материалов, индуцирует остеогенную дифференцировку МСК и клеточных линий остеобластов (Viti et al., 2016). При этом отмечен (эпигенетический эффект в отношении экспрессии генов остеогенной дифференцировки, например, *RUNX2*, *BMP-6*, *ALPL* (Litvinova et al., 2020), *SMAD* и *RAS* (Viti et al., 2016).

В настоящее время активно изучаются многочисленные сигнальные пути и регуляторные сигналы (микроРНК, молчащие РНК и т.п.), участвующие в (эпигенетическом контроле остеобластов и остеокластов (Vulf et al., 2022). Дифференцировка МСК в остеобласты представляет собой сложное взаимодействие между паракринными и аутокринными сигналами, которые запускают несколько клеточных и молекулярных механизмов, способствующих активации двух транскрипционных факторов – *RUNX2* и нижестоящего *Osterix* (Garg et al., 2017). *RUNX2* активируется посредством многих сигнальных путей, включая белки BMP и трансформирующий фактор роста $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) (James, 2013). BMP участвуют в дифференцировке МСК и (или) остеобластов в сторону хондроцитов и остеобластов (Garg et al., 2017). BMP-2, -4, -6, -7 и -9 активируют остеобластогенез, тогда как BMP-3 и BMP-13 действуют как ингибиторы остеогенной дифференцировки (Shen et al., 2009). TGF- $\beta 1$ способствует образованию остеокластов из стимулированных предшественников RANK, но снижает экспрессию RANKL в остеобластах (Quinn et al., 2001).

Тем не менее, расшифровка конкретных молекулярных механизмов и их взаимодействия после имплантации СаР-материалов еще впереди. Роли фос-

фатов в костной минерализации и остеогенезе в литературе уделяется гораздо меньшее внимание. Считается, что при первичной минерализации ионы фосфата и кальция поступают в везикулы на наружной стороне мембраны остеобластов через мембранные переносчики и ферменты. Накопление Ca^{2+} и PO_4^{3-} в пузырьках матрикса вызывает зарождение и рост кристаллов из малорастворимых фосфатов кальция. Кристаллы фосфатов кальция образуются радиально внутри пузырька, проникают через его мембрану и продолжают расти за его пределами, в конечном итоге образуя минерализованные узелки. Затем растущие минерализованные узелки пропитывают коллагеновые фибриллы. После этого минеральная плотность костей постепенно увеличивается в процессе вторичной минерализации. Механизмы этого явления остаются неясными, но ключевую роль могут играть остециты; предполагается, что остециты обеспечивают транспорт Ca^{2+} и PO_4^{3-} через каналцы сети остеоцитов, а также регулируют минерализацию окружающего костного матрикса (Hasegawa et al., 2022).

Повышение содержания свободного фосфата в культуральной среде приводит к увеличению уровня РНК остеопонтина в клетках преosteобластов MC3T3-E1 за счет активации ERK1/2- и PKC-зависимых путей (Julien et al., 2009). Выявлена дозозависимая активация BMP-2 в клетках, происходящих из надкостницы человека, в ответ на лечение ионами фосфата отдельно или в сочетании с кальцием (Chai et al., 2011). Авторы предположили участие этих ионов в активации аутокринных/паракринных сигнальных механизмов, участвующих в дифференцировке клеток.

В другой работе продемонстрировали, что ионы кальция в растворе способствуют адсорбции BMP-2 на поверхности HAP, в то время как ионы фосфата, по-видимому, ингибируют этот процесс (Voix et al., 2005). В то же время ионизированный неорганический фосфор (Pi) увеличивал экспрессию *BMP-2* на уровне мРНК и белка, а также активность промотора *BMP-2*, действуя через сигнальные каскады cAMP/PKA и ERK1/2 в клетках пульпы зуба человека (Tada et al., 2011).

Другие авторы (Khoshniat et al., 2011) выяснили, что для активации ERK1/2-зависимого пути для Pi необходим Ca^{2+} . Рядом исследователей показано, что фосфат по принципу отрицательной обратной связи между RANK-лигандом и сигналом его рецептора регулирует соотношение RANK-лиганд/остеопротегерин для ингибирования процессов дифференцировки остеокластов и резорбции кости (Zhang et al., 2011). Введение кроликам ионов Ca^{2+} и фосфата в концентрации 1.8 и 0.09 мМ соответственно способствовало пролиферации и дифференцировке СККМ (Liu et al., 2009). Более высокие концентрации фосфата не влияли на дифференцировку клеток, но вызывали их гибель. Напротив, более высокие концентрации

Ca²⁺ ингибировали дифференцировку клеток (о чем свидетельствует снижение секреции щелочной фосфатазы и экспрессии мРНК коллагена I типа/остеокальцина), но способствовали минерализации матрикса (Samavedi et al., 2013). Получены данные о том, что истощение ионов кальция и (или) фосфата в центре имплантируемого материала может индуцировать формирование кости за счет восприятия кальция иммунными и костными клетками (Bohner, Miron, 2018). Напротив, повышенное содержание ионов кальция и фосфата в межклеточной среде может негативно влиять на прикрепление остеобластов (Meleti et al., 2000).

ПРЯМОЕ ОСТЕОМОДУЛИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ КАЛЬЦИЙФОСФАТНЫХ МАТЕРИАЛОВ

Фосфаты кальция, сформированные в виде объемных материалов или покрытий, играют важную роль в адгезии клеток и формировании тканей, в том числе влияя на адсорбцию белков внеклеточного матрикса на поверхности (Bulnheim, et al., 2012). Адсорбция белка представляет собой сложный процесс, обусловленный термодинамическими и кинетическими изменениями, которые зависят от состояния поверхности биоматериала, ионного окружения и структурных (химических) свойств белка (Tsapikouni, Missirlis, 2008).

Остеоиндуктивные белки, в том числе BMP, и фактор роста TGF- β , обладают высоким родством к фосфатам кальция (Bagdas et al., 2011). С точки зрения химии поверхности CaP-материалов, TSP связывает больше белков, чем NAP. В свою очередь экспрессия генов, кодирующих остеогенные пептиды и факторы дифференцировки (остеокальцин, костный сиалопротеин, остеоопонтин и RUNX2) в МСК, имплантированных на NAP, была ниже, чем на β -TSP, что связано по мнению авторов с 10–15-кратным увеличением удельной площади поверхности (микропористости) TSP и высвобождением кальция (Yuan et al., 2010).

В принципе, аффинность BMP к нестехиометрическим CaP (например, кремний-замещенному NAP) примерно в 1.5–2 раза выше по сравнению с чистым (без добавок) NAP (Mafina et al., 2017). Этот феномен может быть одним из молекулярных механизмов повышенной остеогенной описанной активности силиконированных CaP-материалов и покрытий (например: Пичугин и др., 2011).

Адсорбируемые клеточно-адгезивные белки (фибронектин, коллаген, витронектин) межклеточного матрикса играют важную роль в клеточной адгезии, опосредованной интегринами на клеточных мембранах, и во многом определяют эффективность регенерации кости (Gustavsson et al., 2012). Связывание интегрин иницирует кластеризацию рецепто-

ров адгезии, формирование фокальных контактов адгезии, распластывание клеток, реорганизацию актинового цитоскелета и проявление сократительных сил, что активирует такие клеточные функции, как миграция, пролиферация и дифференцировка (Добринская, 2018; Matsuura et al., 2000; Stephansson et al., 2002). Нарушение этих взаимодействий может значительно ингибировать дифференцировку и минерализацию остеобластов, поскольку связывание интегрин приводит к фосфорилированию киназы фокальной адгезии, что, в свою очередь, активирует ERK1/2-зависимый путь (Salasznyk et al., 2007; Marino et al., 2010).

Наряду с химией поверхности, физическое структурирование объема CaP (например, формирование пористости) или поверхности (в частности придание шероховатости) в значительной степени модулирует их биологическую активность. Так, многочисленные исследования показывают, что поверхности с размерами структурных элементов менее 100 нм (шероховатость, зернистость и др.) могут способствовать лучшей адсорбции белка, чем поверхности с размерами более 100 нм (Li et al., 2012). Значительно увеличивает адсорбцию белка высокая пористость CaP-керамики с размером пор в широком диапазоне (от 20 до 500 мкм), которая способствует увеличению удельной площади поверхности, а значит и усилению явлений растворения/преципитации (Othman et al., 2019).

Этот эффект также наблюдается при увеличении количества пор (Jeong et al., 2019), но зависит от структуры и химического состава белка (Zhu et al., 2010; Samavedi et al., 2013). Интересно, что микропористые CaP-скаффолды показали более высокий рост кости в костных дефектах критического размера у коз по сравнению с аутологичными костными трансплантатами или теми же CaP, имеющими более крупные поры на поверхности и, соответственно, меньшую удельную площадь поверхности (Fellah et al., 2008).

С другой стороны, макроструктурирование объема и поверхности материалов может способствовать прямой (без участия остеогенных белков) адгезии клеток (Curtis, Wilkinson, 1997) и дифференцировке МСК в остеобласты, синтезирующие минерализованный костный матрикс (Khlusov et al., 2020). Исследования показывают, что для оптимального костеобразования CaP-материалам необходима макрошероховатая или макропористая структура с диаметром пор более 100 мкм (Ebrahimi, 2021), поскольку формирование кости происходит, в основном, в вогнутых участках пор (Ripamonti, Roden, 2011). В этом плане концепция искусственных ниш для МСК, согласно которой дифференцировка стволовых клеток в остеобласты преобладает в углублениях CaP-

поверхности определенного размера (Khlusov et al., 2013), в какой-то степени объясняет биомиметическое подобие искусственных макропор естественным микротерриториям (ямкам) для остеобластов, формируемым остеокластами при естественной (физиологической и репаративной) регенерации кости (Khlusov et al., 2022).

Кроме того, размер пор влияет на ангиогенез (Wang et al., 2014). Показано, что вращание кровеносных сосудов и костной ткани в скаффолд возможно при размере пор более 50 мкм (Habibovic et al., 2006; Shi et al., 2022). Высказано предположение, что низкое напряжение кислорода в центральной области имплантатов может спровоцировать дедифференцировку перicyтов из кровеносных сосудов в остеобласты (Diaz-Flores et al., 1992). Таким образом, распределение питательных веществ, клеток и последующее образование капилляров должны предшествовать процессу эктопического формирования кости, при их недостатке этот процесс может быть задержан или снижен (Habibovic et al., 2006).

В дополнение к физическим свойствам, таким как шероховатость и пористость, адсорбция белка и клеток зависит от поверхностного заряда (дзета-потенциала) искусственного материала. Адсорбция белка на СаР-керамике опосредована электростатическими взаимодействиями как с катионными кальциевыми центрами, так и с анионными фосфатными сайтами, но зависит от структуры и химического состава белков (Kandori et al., 2004, 2007). Так, гибкие клеточно-адгезивные белки (например, фибронектин и витронектин) могут подвергаться структурной перестройке и адсорбироваться на поверхности СаР-керамики, в то время как фибриллярные белки (например, коллагены) – нет (Zhu et al., 2009). Таким образом, наличие катионных атомов и молекул (например, кальция) и способность белков адаптироваться к рельефу поверхности, по-видимому, облегчают белковую адсорбцию на плохо растворимых СаР, таких как НАР.

Поверхностный заряд через изменения концентрации и конформации адсорбированных белков способен модулировать клеточную адгезию на поверхности имплантата. Например, показано, что отрицательно заряженные титановые имплантаты, покрытые Са²⁺, улучшают адгезию остеобластов по сравнению с имплантатами, покрытыми анионами фосфата (Feng et al., 2004). В этом плане может идти прямое электростатическое взаимодействие кальцинированной поверхности титана с отрицательно заряженными остеобластами (Chen et al., 2011).

Интересно, что МСК предпочитают дифференцироваться в остеобласты, позитивные по щелочной фосфатазе и остеокальцину в углублениях СаР-покрытия, несущих локальный отрицательный заряд поверхности. В свою очередь, МСК с фенотипом остеокластоподобных клеток (с экспрессией кислой фосфатазы) располагаются на выступах (сфероли-

тах) СаР-поверхности (Khlusov et al., 2013, 2018). При этом неравномерное распределение заряда по рельефу поверхности обусловлено преимущественным распределением фосфатных групп “кислых” СаР в углублениях поверхности, что способствует избыточному отрицательному заряду СаР-наночастиц, формирующих микрометровые сферолиты микродугового покрытия (Khlusov et al., 2018).

Помимо поверхностного заряда, на адсорбцию белка влияет и природа ионного окружения. Например, показано, что адсорбция белка зависит от величины рН и ионной силы водной среды (Zhu et al., 2007); в частности, авторы сообщают об уменьшении адсорбции бычьего сывроточного альбумина на частицах двухфазного СаР либо при повышении рН среды, либо при увеличении концентрации ионов фосфата. Растворимость СаР-керамики также может влиять на адсорбцию белка, воздействуя на равновесную концентрацию ионов вблизи поверхности материала и рН среды (Samavedi et al., 2013; Jeong et al., 2019). Эту гипотезу поддерживают данные о том, что адсорбция фибриногена, инсулина и коллагена I типа на поверхности двухфазного СаР более высокая, чем на поверхности НАР, поскольку более растворимая фаза β-ТСР в двухфазном СаР способствует локальному увеличению концентрации ионов, поверхностного заряда и значений рН (Zhu et al., 2010). Показано, что СККМ кролика лучше адгезируют к НАР (с более высокой кристалличностью), чем к аморфным СаР (с более низкой кристалличностью и высокой растворимостью) сопоставимых размеров (Hu et al., 2007). Аналогичные результаты получены в работах, изучающих прикрепление остеобластов свода черепа крыс к различным типам СаР-керамики (Verube et al., 2005).

СаР-керамика также может влиять на поведение клеток, меняя концентрации ионов в растворе посредством механизмов адсорбции/выщелачивания (Gustavsson et al., 2012). Показано, что остеобластоподобные клетки MG-63 прикреплялись и распространялись на стабильных, менее растворимых поверхностях, таких как НАР, в то время на растворимых поверхностях (β-ТСР), клеток почти не наблюдали (John et al., 2003). Плохую адгезию и распластывание клеток по поверхности β-ТСР авторы связывают с быстрым выщелачиванием ионов фосфата и переосаждением апатитового слоя на поверхности, что приводит к повышению уровня фосфора и снижению концентрации кальция в культуральной среде с β-ТСР. Другие авторы подтвердили, что высвобождение ионов и рекристаллизация (возможно, в виде апатита) регулируют клеточную адгезию и пролиферацию СККМ крыс на разных поверхностях (Knabe et al., 2000).

Таким образом, стабильные кристаллические разновидности СаР-керамики, по-видимому, влияют на адгезию клеток и остеогенных молекул, преимущественно, через биомиметическую структуру,

подобную структуру костной ткани, заряженные центры и конформационную перестройку адгезирующих белков, выполняя роль строительных лесов (скаффолдов) для костных клеток; аморфная и растворимая СаР-керамика способствует изменениям концентрации ионов (электрокинетического потенциала) и локального уровня pH вблизи искусственных поверхностей. По-видимому, в обоих случаях *in vivo* реализуются сценарии остеогенеза, связанные с преимущественной остеокондукцией (врастанием кости в структуру) на стабильных СаР-поверхностях или остеоиндукцией (образованием кости *de novo* из стволовых клеток) вблизи более растворимых форм фосфатов кальция (Карлов, Хлусов, 2003). В связи с этим, СаР-материалы с контролируемой биодеградацией их структуры (поверхности) и сохранением оптимальной биомеханики можно считать идеальными имплантатами для репаративной регенерации и минерализации заново образованной костной ткани. Тем не менее, пока поиски идеальных СаР-материалов не увенчались успехом, выявление ведущего вектора их применения (переломы, локальный или системный остеопороз, замедленная консолидация, ложные суставы, несрастающиеся переломы и др.) на основе индивидуальных характеристик поверхности и, соответственно, формирование панели имплантатов для конкретных клинических ситуаций может решить многие текущие задачи биоинженерии костной ткани.

СаР-МАТЕРИАЛЫ, МЕЗЕНХИМНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ, ИММУНИТЕТ И ОСТЕОГЕНЕЗ

Достижения в области остеоиммунологии (Okamoto, Takayanagi, 2019) рассматривают продуктивное воспаление в ответ на имплантацию СаР-материалов как один из потенциальных механизмов, модулирующих процессы остеоиндукции (Юрова и др., 2020). Фундаментальные исследования последних лет выявили динамические взаимодействия между системой скелета и иммунной системой (Chang et al., 2008). Было показано, что популяция так называемых костных макрофагов (OsteoMacs), находящихся внутри кости в виде характерной структуры купола, покрывающей зрелые остеобласты (Chang et al., 2008), является важным типом клеток в регенерации костной ткани (Vatoot et al., 2017a), что подтверждают эксперименты на нокаутных по OsteoMacs моделях мышей с повреждением бедренной кости (Vatoot et al., 2017b). До недавнего времени считали (van Furth, Cohn, 1968), что предшественниками резидентных тканевых макрофагов являются моноциты крови. Однако, согласно новым данным, большинство макрофагов, включая OsteoMacs, самообновляются в резидентных тканях (Davies et al., 2013).

К настоящему времени установлено, что моноциты (макрофаги), появляющиеся в инфильтрате в зоне имплантации, участвуют не только в формирова-

нии соединительной ткани, но и являются основными эффекторными клетками в иммунных реакциях на биоматериалы, модулирующими остеогенез (Miron, Bosshardt, 2016). Так, изучение нокаутных моделей продемонстрировало, что потеря макрофагов вокруг костнопластических материалов может полностью отменить их остеоиндуктивную способность, что подтверждает их ключевое значение в модуляции иммунной системы, контролирующей процессы костеобразования (Davison et al., 2014).

Для изучения роли макрофагов в репаративном остеогенезе использовали β -ТСР в качестве модельного биоматериала (Chen et al., 2014). Было показано, что данный СаР поляризовал макрофаги в регенераторный фенотип M2, что было связано с активацией сигнального пути рецептора, чувствительного к кальцию. Также было обнаружено, что данные макрофаги после стимуляции β -ТСР экспрессировали BMP-2, что указывает на возможность их участия в остеогенезе (Chen et al., 2014).

Стимуляция моноцитов/макрофагов в ответ на имплантацию СаР способствует образованию так называемых многоядерных гигантских клеток (MNGC), появление которых ранее пытались охарактеризовать как часть реакции на инородное тело, поскольку MNGC продуцируют значительное количество провоспалительных цитокинов, включая IL-1b, TNF- α , IL-6, IL-8 и воспалительный белок макрофагов MIP-1 β (Vasconcelos et al., 2015). Такие MNGC образуются путем слияния моноцитов (макрофагов) на различных костных заменителях, не окруженных костью. Гистохимически они слегка положительны при окраске на тартрат-резистентную кислую фосфатазу (TRAP) и иногда связаны с небольшими лакунами резорбции, что указывает на потенциальную остеокластоподобную активность (McNally et al., 2008).

В настоящее время MNGC отводится немаловажная роль в регуляции остеогенеза. Многочисленные исследования неизменно демонстрируют высокое количество MNGC вокруг трансплантатов костных заменителей и корреляцию их наличия с лучшим сохранением костной массы в местах трансплантации (Jensen et al., 2014). MNGC, полученные *in vitro*, могут растворять НАР, хотя и не так эффективно, как остеокласты, но не способны резорбировать костный матрикс (ten Harkel et al., 2015).

Продемонстрировано, что MNGC не резорбируют кость, но экспрессируют молекулы фенотипа макрофагов M2 (Ym1 и Alox15), заживляющих раны и прекращающих воспаление (Katsuyama et al., 2015). Тем не менее, при повторных заменах суставов обнаруживали MNGC, преимущественно экспрессирующие воспалительные факторы поляризации M1 (Nich et al., 2013).

Следует отметить, что интегриновые рецепторы β 1 и β 2 являются преобладающими связывающими доменами во время развития моноцитов и макрофа-

гов (McNally, Anderson, 1995). IL-4 и IL-13 являются двумя важными цитокинами для слияния и образования MNGC и, как полагают, продуцируются в основном Т-лимфоцитами (McNally, Anderson, 1995; Rodriguez et al., 2009). Кроме того, для слияния макрофагов с образованием MNGC необходима матриксная металлопротеиназа MMP-9 (MacLauchlan et al., 2009). Поверхностные рецепторы во время слияния включают CD44, CD47, CD200, сигнальный регуляторный белок 1a, IL-4r, E-кадгерин и рецептор маннозы (Anderson et al., 2008).

Было показано, что MNGC изначально прикрепляются к компонентам комплемента и фибриногену, а позднее взаимодействует с витронектином (McNally et al., 2008). В слиянии, функционировании и выживании MNGC также участвуют STAT6, рецептор P2X7 и коннексин 43 (Moreno et al., 2007). Выявлено, что макрофаги/MNGC экспрессируют HLA-DR, CD98, B7-2 (CD86) и B7eH1 (PD-L1), но не B7-1 (CD80) или B7eH2 (B7RP-1). При этом на них не обнаруживаются некоторые молекулы, обнаруженные на остеокластах (кальцитониновый рецептор, тартратрезистентная кислая фосфатаза и RANK) или дендритных клетках (CD1a, CD40, CD83, CD95/fas); в то же время, выявлена презентация интегрин X (CD11c), CD68 и DC-SIGN, специфичных для дендритных клеток (McNally, Anderson, 2011).

Важно отметить, что моноциты/макрофаги секретируют макрофагальный воспалительный белок MIP-1 α (макрофагальный воспалительный белок 1 α) и моноцитарный хемотрактантный белок-1 (MCP-1), являющиеся эффекторами усиленной миграции MCK (Sadowska et al., 2019).

Несмотря на то, что секреторная роль MCK в регенерации кости на CaP-биоматериалах остается неясной, немногочисленные данные указывают на участие их иммуномодулирующих свойств (Rana et al., 2022). Интересно, что совместная трансплантация CaP и MCK усиливает мобилизацию в место имплантации макрофагов, поляризованных как в сторону провоспалительного (M1), так и противовоспалительного (M2) фенотипов (Gamblin et al., 2014). Баланс этих фенотипов играет ключевую роль в каскаде заживления кости, предотвращая развитие хронического воспаления и способствуя переходу к формированию кости (Pajarinen et al., 2018). Однако существующие сведения о влиянии этих типов макрофагов на остеобластогенез достаточно противоречивы (Pajarinen et al., 2018). Недавние исследования показали, что макрофаги M1 усиливают раннюю остеогенную дифференцировку без какого-либо влияния на минерализацию матрикса, которая впоследствии усиливается макрофагами с фенотипом M2 (Zhang et al., 2017). Следует отметить, что MCK имеют тенденцию ограничивать поляризацию мак-

рофагов до M1, отдавая предпочтение поляризации M2 (Иванюк и др., 2018).

Интересно, что MCK, трансплантированные с двухфазным CaP, привлекая циркулирующие моноциты, индуцируют их дифференцировку в остеокласты, тем самым способствуя резорбции старой и образованию новой кости (Humbert et al., 2019). Кондиционированные среды из культуры MCK также оказывают прямое положительное влияние на остеокластогенез (Ogata et al., 2017). Этот эффект MCK может быть основан на повышенной секреции или мембранной экспрессии RANKL. Действительно, остеокластогенез в основном регулируется как *in vivo*, так и *in vitro* макрофагальным колониестимулирующим фактором (M-CSF, CSF1) и тройной системой, включающей активатор рецептора ядерного фактора κ B (RANK), его лиганд (RANKL) и остеопротегерин. Следует отметить, что экспрессия этих белков увеличивается по мере созревания остеобластов. M-CSF обеспечивает выживание и пролиферацию предшественников остеокластов, а также позволяет им эффективно реагировать на стимуляцию RANKL. RANKL запускает дифференцировку в остеокласты путем связывания RANK, в то время как остеопротегерин предотвращает взаимодействие в качестве рецептора-приманки для RANKL (Feng, 2014).

Остеокласты играют ключевую роль в гомеостазе и ремоделировании кости, постоянно поддерживая баланс между ее формированием и резорбцией. Это подтверждается их присутствием в месте имплантации CaP перед формированием новой кости (Sims, Martin, 2014). Кроме того, остеокласты высвобождают факторы роста при деградации костного матрикса и, что наиболее важно, экспрессируют факторы хемотаксиса и остеогенеза для остеобластов, такие как BMP6, WNT10b и S1P (Henriksen et al., 2014).

Показано, что остеокласты в ассоциации с CaP или костью секретируют СТНRC1 – белок, усиливающий остеобластогенез (Takeshita et al., 2013). Хотя точный молекулярный механизм, участвующий в рекрутировании остеокластов, остается в значительной степени неизвестным, было показано, что интегрин AV β 3 является доминирующим доменом, связывающим остеокласты, и одним из типичных маркеров, используемых для их дифференциальной идентификации от предшественников макрофагов (Teitelbaum, 2005). Этот интегрин распознает ряд молекул внеклеточного матрикса, включая остеопротегерин, фибронектин, витронектин и фибриноген, которые обычно связываются через RGD-домен пептидов (McNally et al., 2007).

Совсем недавно был описан обратный сигнальный механизм, посредством которого остеокласты,

секретируя везикулы, экспрессирующие RANK, стимулируют мембранный RANKL на поверхности остеобластов, что индуцирует образование кости (Ikebuchi et al., 2018). Кроме того, остеокласты, резорбируя биоматериал, повышают локальные концентрации кальция и фосфата и тем самым способствуют отложению апатитового слоя и рецепции кальция клетками других типов (Bohner, Miron, 2018).

Влияние МСК на другие звенья врожденного и приобретенного иммунитета характеризуется образованием регуляторных дендритных клеток, ингибированием дегрануляции тучных клеток, ограничением эффекторных функций NK-клеток, подавлением пролиферации В-, CD8⁺ и CD4⁺ Т-клеток при одновременном появлении клеток с фенотипом Th2 и Treg (Najar et al., 2016). Внеклеточные везикулы, продуцируемые МСК, также участвуют в иммуномодуляции, переключая фенотип макрофагов с провоспалительного на противовоспалительный, в том числе за счет переноса специфических некодирующих микроРНК (Дьячкова и др., 2022). Кроме того, секреция про- и противовоспалительных молекул (Silva et al., 2018), стимулированными МСК, прямо или косвенно (через модуляцию врожденных и адаптивных иммунных клеток) способствует образованию остеокластов (Humbert et al., 2019).

Дендритные клетки, фагоцитирующие частицы CaP, через секрецию воспалительных цитокинов стимулируют адаптивный иммунный ответ посредством праймирования Т-клеток (Sokolova et al., 2010), в которых активируемый сигнальный путь NF-κB способствует усиленному высвобождению хемокина CCL5, рекрутирующего МСК в окружающий искусственный скаффолд (Zhao et al., 2020). Поскольку МСК подвергаются остеодифференцировке вскоре после имплантации CaP-материала, новообразованная кость происходит в основном из остеобластов хозяина, что влечет за собой рекрутирование и дифференцировку новых МСК (Millan, et al., 2018). Ремоделирование кости может протекать: 1) через эндохондральную оссификацию, включающую первоначальную дифференцировку МСК в хондробласты, последующую перестройку и кальцификацию хрящевого матрикса с образованием губчатой кости; 2) через внутримембранную оссификацию соединительнотканного зачатка, приводящую к прямой дифференцировке МСК в остеобласты (Dimitriou et al., 2005).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

CaP-материалы биосовместимы, адсорбируют регуляторные белки и клетки, оказывая влияние на их генетический и секреторный аппарат, и запускают процесс дифференцировки МСК в остеогенном

направлении. Васкуляризация CaP-скаффолдов, в том числе за счет биодеградации (биорезорбции) объема и (или) их поверхности, обеспечивает в дальнейшем рост и продвижение костной ткани в структуру скаффолдов. Модуляция как врожденного, так и адаптивного иммунного ответа регулирует локальное (в месте имплантации) воспаление и репаративную регенерацию кости. При этом успешная реализация локальных механизмов остеоинтеграции на границе раздела кость–имплантат снижает риск перипротезной инфекции (Raphel et al., 2016) и отторжения искусственных изделий.

Мы попытались на рис. 1 схематически отразить описанные в обзоре основные взгляды на локальную биосовместимость, клетки-мишени и молекулярные (прямые и опосредованные через растворение) эффекты CaP-материалов и покрытий, обладающих остеоинтегрирующим потенциалом. В связи с многогранностью клеточно-молекулярных механизмов остеоинтеграции имплантатов (рис. 1) возникает естественный вопрос: каков размер территории их реализации, чтобы считать описанные в обзоре процессы относительно локальными, не затрагивающими в значительной степени системные (интегральные) механизмы регуляции регенерации?

Костная ткань, как любая биологическая ткань, имеет свою иерархию, которая топографически формируется из природных микротерриторий, в частности нишеподобных образований (размерностью примерно 40–100 мкм) для стволовых клеток, остеобластов (Khlusov et al., 2022) и остеонов – структурно-функциональных (анатомических) единиц костной ткани (внутренний диаметр до 200 мкм; длина до 10 мм) (Maggiano et al., 2016) с доменоподобной организацией (Maloney et al., 1978) популяций костных клеток. По-видимому, воспалительные (репаративные) процессы, протекающие в указанных анатомических границах, можно рассматривать как локальные, реализующиеся посредством механизмов физиологической регенерации костной ткани, не предполагающей существенной активации стресс-реализующих систем, способных негативно влиять на приживание имплантата.

Отсюда в практическом плане следует гипотеза, что CaP-материалы и покрытия, несущие искусственные аналоги естественных остеогенных микротерриторий (ниш, доменов) (например: Khlusov et al., 2011), могут рассматриваться как биомиметические (биоинспирированные) биоинженерные конструкции, во многом реализующие местные физиологические механизмы их остеоинтеграции. Разработка подобных материалов позволит осуществить значительный прорыв в решении современных проблем регенерации костной ткани,

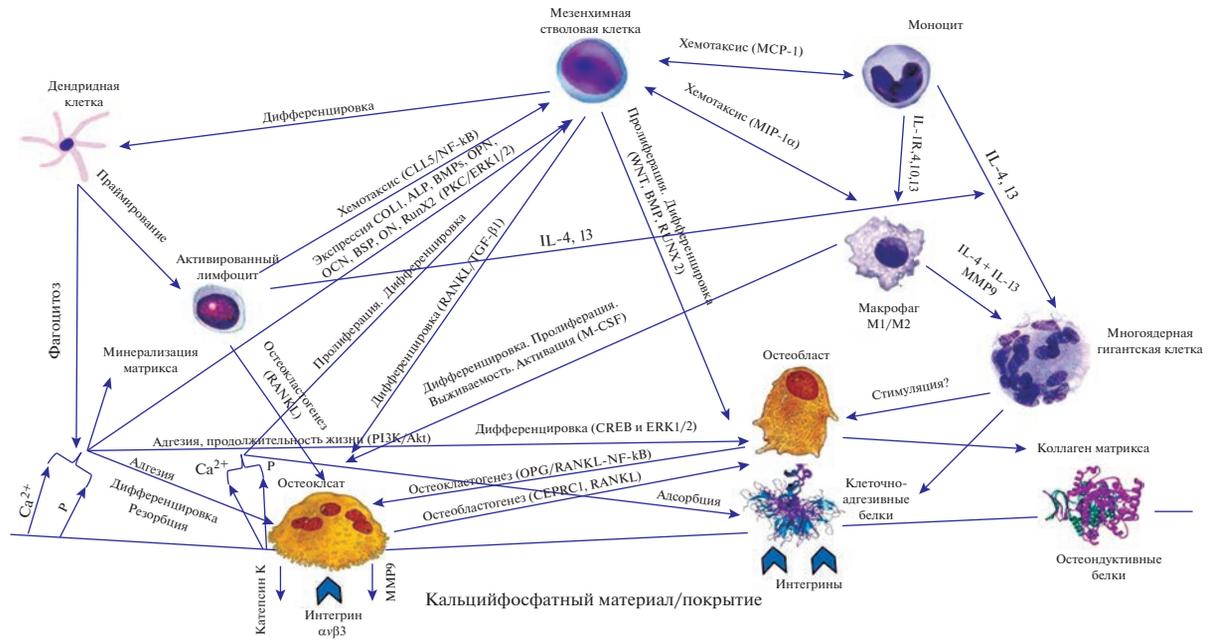


Рис. 1. Клеточные и молекулярные эффекторные системы, участвующие в локальной остеомодулирующей (остеогенной/резорбтивной) активности кальцийфосфатных материалов и покрытий для биоинженерии костной ткани. Объяснения в тексте.

связанный с точным (цифровым) биоинженерным подходом на основе аддитивных технологий.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства “Приоритет-2030” Сибирского государственного медицинского университета.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментов с участием людей или животных авторы не проводили.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Добринская М.Н. 2018. Влияние новых нанодисперсных допированных макро- и микроэлементами карбонат-фосфатов кальция на организм экспериментальных животных. Автореф. канд. дис. Екатеринбург. 20 с. (Dobrinskaya M.N. Influence of new nanosized calcium carbonate-phosphates doped with macro- and microelements on the body of experimental animals. Ph. D. Thesis. Yekaterinburg. 20 pp.).
- Дьячкова У.Д., Виговский М.А., Басалова Н.А., Григорьева О.А., Ефименко А.Ю. 2022. Внеклеточные везикулы МСК переключают фенотип макрофагов с провоспалительного на противовоспалительный. Гены и клетка. Т. 7. № 3. С. 81. (Dyachkova U.D., Vigovsky M.A., Basalova N.A.,

Grigorieva O.A., Efimenko A.Yu. 2022. MSC extracellular vesicles switch the macrophage phenotype from pro-inflammatory to anti-inflammatory. Genes and cells. V. 7. No 3. P. 81.)

Иванюк Е.Э., Надеждин С.В., Покровская Л.А., Шуплетцова В.В., Хазиахматова О.Г., Юрова К.А., Малащенко В.В., Литвинова Л.С., Хлусов И.А. 2018. Субпопуляции макрофагов и мезенхимные стволовые клетки в регуляции ремоделирования костной ткани. Цитология. Т. 60. № 4. С. 252. (Ivanyuk E.E., Nadezhdin S.V., Pokrovskaya L.A., Shupletsova V.V., Khaziyakhatova O.G., Yurova K.A., Malashchenko V.V., Litvinova L.S., Khlusov I.A. 2018. Macrophage subpopulations and mesenchymal stem cells in the regulation of bone tissue remodeling. Tsitologiya. V. 60. № 4. P. 252).

Карлов А.В., Хлусов И.А. 2003. Зависимость процессов репаративного остеогенеза от поверхностных свойств имплантатов для остеосинтеза. Геней ортопедии № 3. С. 46. (Karlov A.V., Khlusov I.A. 2003. Dependence of the processes of reparative osteogenesis on the surface properties of implants for osteosynthesis. Orthopedic genius. № 3. P. 46).

Корель А.В., Кузнецов С.Б. 2019. Тканеинженерные стратегии для восстановления дефектов костной ткани. Современное состояние вопроса. Межд. журн. прикладных и фундамент. иссл. № 4. С. 228. (Korel A.V., Kuznetsov S.B. 2019. Tissue engineering strategies for the restoration of bone defects. The current state of the issue. International J. Applied Basic Res. № 4. P. 228).

Пичугин В.Ф., Сурменева М.А., Сурменев Р.А., Хлусов И.А., Эппле М. 2011. Исследование физико-химических и биологических свойств кальцийфосфатных покрытий, созданных методом ВЧ-магнетронного распыления кремнийзамещенного гидроксиапатита. Поверх-

- ность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования. № 9. С. 54 (Pichugin V.F., Surmeneva M.A., Surmenev R.A., Khlusov I.A., Eppe M. 2011. Study of physicochemical and biological properties of calcium phosphate coatings prepared by RF magnetron sputtering of silicon-substituted hydroxyapatite. J. Surf. Investig. № 5. P. 863.).
- Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Малащенко В.В., Норкин И.К., Иванов П.А., Хлусов И.А., Шунькин Е.О., Тодосенко Н.М., Мелашченко Е.С., Литвинова Л.С. 2020. Клеточно-молекулярные аспекты воспаления, ангиогенеза и остеогенеза. Краткий обзор. Цитология. Т. 62. № 5. С. 305. (Yurova K.A., Khaziakhmatova O.G., Malashchenko V.V., Norkin I.K., Ivanov P.A., Khlusov I.A., Shunkin E.O., Tодosenko N.M., Melashchenko E.S., Litvinova L.S. 2020. Cellular and molecular aspects of inflammation, angiogenesis and osteogenesis. Short review. Tsitologiya. V. 62. № 5. P. 305.).
- Albee F.H. 1920. Studies in bone growth: triple calcium phosphate as a stimulus to osteogenesis. Ann. Surg. V. 71. P. 32.
- Anderson J.M., Rodriguez A., Chang D.T. 2008. Foreign body reaction to biomaterials. Seminars Immunol. V. 20. P. 86.
- Barradas A.M., Fernandes H.A., Groen N., Chai Y.C., Schrooten J., van de Peppel J., van Leeuwen J.V., van Blitterswijk C.V., de Boer J. 2012. A calcium-induced signaling cascade leading to osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. Biomaterials. V. 33. P. 3205.
- Barradas A.M., Yuan H., van Blitterswijk C.A.C., Habibovic P. 2011. Osteoinductive biomaterials: current knowledge of properties, experimental models and biological mechanisms. Eur. Cells Mater. V. 21. P. 407.
- Batoon L., Millard S.M., Raggatt L.J., Pettit A.R. 2017a. Osteomacs and bone regeneration. Curr. Osteoporos Rep. V. 15. P. 385.
- Batoon L., Millard S.M., Wullschlegel M.E., Preda C., Wu A.C.-K, Kaur S., Tseng H.-W., Hume D.A., Levesque J.-P., Raggatt L.J., Pettit A.R. 2017b. CD169 + macrophages are critical for osteoblast maintenance and promote intramembranous and endochondral ossification during bone repair. Biomaterials. V. 196. P. 51.
- Bellows C.G., Aubin J.E., Heersche J.N. 1991. Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro: the role of alkaline phosphatase and organic phosphate. Bone Min. V. 14. P. 27.
- Ben-Nissan B. 2014. Advances in calcium phosphate biomaterials. Springer Berlin: Heidelberg. P. 547.
- Berube P., Yang Y., Carnes D.L., Stover R.E., Boland E.J., Ong J.L. 2005. The effect of sputtered calcium phosphate coatings of different crystallinity on osteoblast differentiation. J. Periodontol. V. 76. P. 1697.
- Bianchi M., Urquia Edreira E.R., Wolke J.G., Birgani Z.T., Habibovic P., Jansen J.A., Tampieri A., Marcacci M., Leeuwenburgh S.C., van den Beucken J.J. 2014. Substrate geometry directs the in vitro mineralization of calcium phosphate ceramics. Acta Biomater. V. 10. P. 661.
- Bohner M., Miron R.J. 2018. A proposed mechanism for material-induced heterotopic ossification, Mater. Today. V. 22. P. 132.
- Boix T., Gomez-Morales J., Torrent-Burgues J., Monfort A., Pulgdomenech P., Rodriguez-Clemente R. 2005. Adsorption of recombinant human bone morphogenetic protein rhBMP-2m onto hydroxyapatite. J. Inorg. Biochem. V. 9. P. 1043.
- Bulnheim U., Müller P., Neumann H.-G., Peters K., Unger R.E., Kirkpatrick C.J., Rychly J. 2012. Endothelial cells stimulate osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells on calcium phosphate scaffolds. J. Tissue Engineering and Regener. Med. V. 8. P. 831.
- Campana V., Milano G., Pagano E., Barba M., Cicione C., Sallonna G., Lattanzi W., Logroscino G. 2014. Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice. J. Mater. Sci. Mater Med. V. 25. P. 2445.
- Chai Y.C., Roberts S.J., Schrooten J., Luyten F.P. 2011. Probing the osteoinductive effect of calcium phosphate by using an in vitro biomimetic model. Tiss. Eng. A. V. 17. P. 1083.
- Chang D.T., Jones J.A., Meyerson H., Colton E., Kwon I.K., Matsuda T., Anderson J.M. 2008. Lymphocyte/macrophage interactions: biomaterial surface-dependent cytokine, chemokine, and matrix protein production. J. Biomed. Mater. Res. A. V. 87. P. 676.
- Chen L., Mccrate J.M., Lee J.C., Li H. 2011. The role of surface charge on the uptake and biocompatibility of hydroxyapatite nanoparticles with osteoblast cells. Nanotechnol. V. 22: 105708.
- Chen Z., Wu C., Gu W., Klein T., Crawford R., Xiao Y. 2014. Osteogenic differentiation of bone marrow MSCs by beta-tricalcium phosphate stimulating macrophages via BMP2 signalling pathway. Biomaterials. V. 35. P. 1507.
- Combes C., Ray C. 2002. Adsorption of proteins and calcium phosphate materials bioactivity. Biomaterials. V. 23. P. 2817.
- Coughlan T., Dockery F. 2014. Osteoporosis and fracture risk in older people. Clin. Med. (Lond). V. 14. P. 187.
- Curtis A., Wilkinson C. 1997. Topographical control of cells. Biomaterials. V. 18. P. 1573.
- Daculsi G., Legeros R.Z., Nery E., Lynch K., Kerebel B. 1989. Transformation of biphasic calcium phosphate ceramics in vivo: ultrastructural and physicochemical characterization. J. Biomed. Mater. Res. V. 23. P. 883.
- Danciu T.E., Adam R.M., Naruse K., Freeman M.R., Hauschka P.V. 2003. Calcium regulates the PI3K-Akt pathway in stretched osteoblasts. FEBS Lett. V. 536. P. 193.
- Davies L.C., Rosas M., Jenkins S.J., Liao C.T., Scurr M.J., Brombacher F., Fraser D.J., Allen J.E., Jones S.A., Taylor Ph.R. 2013. Distinct bone marrow-derived and tissue-resident macrophage lineages proliferate at key stages during inflammation. Nat. Commun. V. 4. P. 1886.
- Davison N.L., Gamblin A.L., Layrolle P., Yuan H., de Bruijn J.D., Barrere-de Groot F. 2014. Liposomal clodronate inhibition of osteoclastogenesis and osteoinduction by submicrostructured beta-tricalcium phosphate. Biomaterials. V. 35. P. 5088.
- Diaz-Flores L., Gutierrez R., Lopez-Alonso A., Gonzalez R., Varela H. 1992. Pericytes as a supplementary source of osteoblasts in periosteal osteogenesis. Clin. Orthop. Relat. Res. V. 275. P. 280.
- Dimitriou R., Tsiridis E., Giannoudis P.V. 2005. Current concepts of molecular aspects of bone healing. Injury. V. 36. P. 1392.
- Du C., Cui F.Z., Zhang W., Feng Q.L., Zhu X.D., de Groot K. 2000. Formation of calcium phosphate/collagen composites through mineralization of collagen matrix. J. Biomed. Mater. Res. V. 50. P. 518.

- Ebrahimi M.* 2021. Porosity parameters in biomaterial science: Definition, impact, and challenges in tissue engineering. *Front. Mater. Sci.* V. 15. P. 352.
- Edwards F.C., Taheri A., Dann S.C., Dye J.F.* 2011. Characterization of cytolytic neutrophil activation in vitro by amorphous hydrated calcium phosphate as a model of biomaterial inflammation. *J. Biomed. Mater. Res. A.* V. 96. P. 552.
- Ekegren C.L., Edwards E.R., de Steiger R., Gabbe B.J.* 2018. Incidence, costs and predictors of non-union, delayed union and mal-union following long bone fracture. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* V. 15. P. 2845.
- El-Rashidy A.A., Roether J.A., Harhaus L., Kneser U., Boccacini A.R.* 2017. Regenerating bone with bioactive glass scaffolds: a review of *in vivo* studies in bone defect models. *Acta Biomater.* V. 62. P. 1.
- Fellah B.H., Gauthier O., Weiss P., Chappard D., Layrolle P.* 2008. Osteogenicity of biphasic calcium phosphate ceramics and bone autograft in a goat model. *Biomaterials.* V. 29. P. 1177.
- Feng B., Weng J., Yang B.C., Qu S.X., Zhang X.D.* 2004. Characterization of titanium surfaces with calcium and phosphate and osteoblast adhesion. *Biomaterials.* V. 25. P. 3421.
- Feng W.* 2014. Osteoclastogenesis and osteoimmunology. *Front. Biosci.* V. 19. P. 758.
- Fillingham Y., Jacobs J.* 2014. Bone grafts and their substitutes. *J. Indian Soc. Periodontol.* V. 18. P. 610.
- Flade K., Lau C., Mertig M., Pompe W.* 2001. Osteocalcin-controlled dissolution-precipitation of calcium phosphate under biometric conditions. *Chem. Mater.* V. 13. P. 3596.
- Foreman M.A., Gu A.Y., Howl J.D., Jones S., Publicover S.J.* 2005. Group III metabotropic glutamate receptor activation inhibits Ca^{2+} influx and nitric oxide synthase activity in bone marrow stromal cells. *J. Cell Physiol.* V. 204. P. 704.
- Gamblin A.-L., Brennan M.A., Renaud A., Yagita H., Lézet F., Heymann D., Trichet V., Layrolle P.* 2014. Bone tissue formation with human mesenchymal stem cells and biphasic calcium phosphate ceramics: the local implication of osteoclasts and macrophages. *Biomaterials.* V. 35. P. 9660.
- Garg P., Mazur M.M., Buck A.C., Wandtke M.E., Liu J., Ebraheim N.A.* 2017. Prospective review of mesenchymal stem cells differentiation into osteoblasts. *Orthop Surg.* V. 9. P. 13.
- Ghosh S.K., Nandi S.K., Kundu B., Datta S., De D.K., Roy S.K., Basu D.* 2008. *In vivo* response of porous hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate prepared by aqueous solution combustion method and comparison with bioglass scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* V. 86. P. 217.
- Goding J.W., Grobber B., Slegers H.* 2003. Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* V. 1638. P. 1.
- Gustavsson J., Ginebra M. P., Planell J., Engel E.* 2012. Osteoblast-like cellular response to dynamic changes in the ionic extracellular environment produced by calcium-deficient hydroxyapatite. *JMSMM.* V. 23. P. 2509.
- Habibovic P., Sees T.M., van den Doel M.A., van Blitterswijk C.A., de Groot J.K.* 2006. Osteoinduction by biomaterials—physicochemical and structural influences. *Biomed. Mater. Res. A.* V. 77. P. 747.
- Hasegawa T., Hongo H., Yamamoto T., Abe M., Yoshino H., Haraguchi-Kitakamae M., Ishizu H., Shimizu T., Iwasaki N., Amizuka N.* 2022. Matrix vesicle-mediated mineralization and osteocytic regulation of bone mineralization. *Int. J. Mol. Sci.* V. 23. P. 9941.
- Henriksen K., Karsdal M.A., John Martin T.* 2014. Osteoclast-derived coupling factors in bone remodeling. *Calcif. Tiss. Int.* V. 94. P. 88.
- Hu Q.H., Tan Z., Liu Y.K., Tao J.H., Cai Y.R., Zhang M., Pan H., Xu X., Tang R.* 2007. Effect of crystallinity of calcium phosphate nanoparticles on adhesion, proliferation, and differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *J. Mater. Chem.* V. 17. P. 4690.
- Humbert P., Brennan M.A., Davison N., Rosset Ph., Trichet V., Blanchard F., Layrolle P.* 2019. Immune modulation by transplanted calcium phosphate biomaterials and human mesenchymal stromal cells in bone regeneration. *Front. Immunol.* V. 10. P. 663.
- Ikebuchi Y., Aoki S., Honma M., Hayashi M., Sugamori Y., Khan M., Kariya Y., Kato G., Tabata Y., Penninger J.M., Udagawa N., Aoki K., Suzuki H.* 2018. Coupling of bone resorption and formation by RANKL reverse signalling. *Nature.* V. 561. P. 195.
- James A.W.* 2013. Review of signaling pathways governing MSC osteogenic and Adipogenic differentiation. *Scientifica (Cairo).* 2013: 684736.
- Jensen S.S., Bosshardt D.D., Gruber R., Buser D.* 2014. Long-term stability of contour augmentation in the esthetic zone: histologic and histomorphometric evaluation of 12 human biopsies 14 to 80 months after augmentation. *J. Periodontol.* V. 85. P. 1549.
- Jeong J., Kim J.H., Shim J.H., Hwang N.S., Heo C.Y.* 2019. Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration. *Biomater. Res.* V. 23. P. 4.
- John A., Varma H.K., Kumari T.V.* 2003. Surface reactivity of calcium phosphate based ceramics in a cell culture system. *J. Biomater.* V. 18. P. 63.
- Julien M., Khoshniat S., Lacreusette A., Gatius M., Bozec A., Wagner E.F., Wittrant Y., Masson M., Weiss P., Beck L., Magne D., Guicheux J.* 2009. Phosphate-dependent regulation of MGP in osteoblasts: role of ERK1/2 and Fra-1. *J. Bone Miner. Res.* V. 24. P. 1856.
- Jung G.Y., Park Y.J., Han J.S.* 2010. Effects of HA released calcium ion on osteoblast differentiation. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* V. 21. P. 1649.
- Kandori K., Miyagawa K., Ishikawa T.* 2004. Adsorption of immunoglobulin onto various synthetic calcium hydroxyapatite particles. *J. Colloid. Interface Sci.* V. 273. P. 406.
- Kandori K., Murata K., Ishikawa T.* 2007. Microcalorimetric study of protein adsorption onto calcium hydroxyapatites. *Langmuir.* V. 23. P. 2064.
- Karalashvili L., Kakabadze A., Uhryn M., Vyshnevskaya H., Ediberidze K., Kakabadze Z.* 2018. Bone grafts for reconstruction of bone defects (review). *Georgian Med. News.* V. 282. P. 44.
- Katsuyama E., Miyamoto H., Kobayashi T., Sato Y., Hao W., Kanagawa H., Fujie A., Tando T., Watanabe R., Morita M., Miyamoto K., Niki Y., Morioka H., Matsumoto M., Toyama Y. et al.* 2015. Interleukin-1 receptor-associated kinase-4 (IRAK4) promotes inflammatory osteolysis by activating

- osteoclasts and inhibiting formation of foreign body giant cells. *J. Biol. Chem.* V. 290. P. 716.
- Khlusov I.A., Khlusova M.Yu., Zaitsev K.V., Kolokol'tsova T.D., Sharkeev Yu.P., Pichugin V.F., Legostaeva E.V., Trofimova I.E., Klimov A.S., Zhdanova A.I.* 2011. Pilot in vitro study of the parameters of artificial niche for osteogenic differentiation of human stromal stem cell pool. *Bull. Exp. Biol. Med.* V. 150. P. 535.
- 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 Yu.P.* 2020. Costimulatory 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.
- Khlusov I.A., Litvinova L.S., Yurova K.A., Khlusova M.Y.* 2022. Precise tissue bioengineering and niches of mesenchymal stem cells: their size and hierarchy matter. *Biocell.* V. 46. P. 1635.
- Khlusov I.A., Shevtsova N.M., Khlusova M.Y.* 2013. Detection in vitro and quantitative estimation of artificial microterritories which promote osteogenic differentiation and maturation of stromal stem cells. *Methods Mol. Biol.* V. 1035. P. 103.
- Khlusov I.A., Dekhtyar Y., Sharkeev Y.P., Pichugin V.F., Khlusova M.Y., Polyaka N., Tjulkins F., Vendinya V., Legostaeva E.V., Litvinova L.S., Shupletsova V.V., Khaziakhmatova O.G., Yurova K.A., Prosolov K.A.* 2018. Nanoscale electrical potential and roughness of a calcium phosphate surface promotes the osteogenic phenotype of stromal cells. *Materials.* V. 11. P. 978.
- Khoshniat S., Bourguine A., Julien M., Petit M., Pilet P., Rouillon T., Masson M., Gatus M., Weiss P., Guicheux J., Beck L.* 2011. Phosphatedependent stimulation of MGP and OPN expression in osteoblasts via the ERK1/2 pathway is modulated by calcium. *Bone.* V. 48. P. 894.
- Kim S.E., Park K.* 2020. Recent advances of biphasic calcium phosphate bioceramics for bone tissue regeneration. *Adv. Exp. Med. Biol.* V. 1250. P. 177.
- Knabe C., Driessens F.C.M., Planell J.A., Gildenhaar R., Berger G., Reif D., Fitzner R., Radlanski R.J., Gross U.* 2000. Evaluation of calcium phosphates and experimental calcium phosphate bone cements using osteogenic cultures. *J. Biomed. Mater. Res.* V. 52. P. 498.
- 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.
- Kuroda Y., Hisatsune Ch., Nakamura T., Matsuo K., Mikoshiba K.* 2008. Osteoblasts induce Ca^{2+} oscillation-independent NFATc1 activation during osteoclastogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 105. P. 8643.
- Li B., Liao X.L., Zheng L., Zhu X. D., Wang Z., Fan H.S., Zhang X.* 2012. Effect of nanostructure on osteoinduction of porous biphasic calcium phosphate ceramics. *Acta Biomater.* V. 8. P. 3794.
- Litvinova L., Yurova K., Shupletsova V., Khaziakhmatova O., Malashchenko V., Shunkin E., Melashchenko E., Todosenko N., Khlusova M., Sharkeev Y., Komarova E., Sedelnikova M., Khlusov I.* 2020. Gene expression regulation and secretory activity of mesenchymal stem cells upon in vitro contact with microarc calcium phosphate coating. *Int. J. Mol. Sci.* V. 21. P. 7682.
- Liu D., Genetos D.C., Shao Y., Geist D.J., Li J., Ke H.Zh., Turner Ch.H., Duncan R.L.* 2008. Activation of extracellular-signal regulated kinase (ERK1/2) by fluid shear is Ca^{2+} and ATP-dependent in MC3T3-E1 osteoblasts. *Bone.* V. 42. P. 644.
- Liu Q., Lu W.F., Zhai W.* 2022. Toward stronger robocast calcium phosphate scaffolds for bone tissue engineering: A mini-review and meta-analysis. *Biomater. Adv.* V. 134. P. 112578.
- Liu Y.K., Lu Q.Z., Pei R., Ji H.J., Zhou G.S., Zhao X.L., Tang R.K., Zhang M.* 2009. The effect of extracellular calcium and inorganic phosphate on the growth and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in vitro: implication for bone tissue engineering. *Biomed. Mater.* V. 4: 025004.
- MacLauchlan S., Skokos E.A., Mezmarich N., Zhu D.H., Raoof S., Shipley J.M., Senior R.M., Bornstein P., Kyriakides Th.R.* 2009. Macrophage fusion, giant cell formation, and the foreign body response require matrix metalloproteinase 9. *J. Leukoc. Biol.* V. 85. P. 617.
- Mafina M.K., Sullivan A.C., Hing K.A.* 2017. Use of a fluorescent probe to monitor the enhanced affinity of rh-BMP-2 to silicated-calcium phosphate synthetic bone graft substitutes under competitive conditions. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* V. 80. P. 207.
- Maggiano I.S., Maggiano C.M., Clement J.G., Thomas C.D., Carter Y., Cooper D.M.* 2016. Three-dimensional reconstruction of Haversian systems in human cortical bone using synchrotron radiation-based micro-CT: morphology and quantification of branching and transverse connections across age. *J. Anat.* May. V. 228. P. 719.
- Majidinia M., Sadeghpour A., Yousefi B.* 2018. The roles of signaling pathways in bone repair and regeneration. *J. Cell Physiol.* V. 233. P. 2937.
- Maloney M.A., Dorie M.J., Lamela R.A., Rogers Z.R., Patt H.M.* 1978. Hematopoietic stem cell regulatory volumes as revealed in studies of the bgj/bgj:W/WV chimera. *J. Exp. Med.* V. 147. P. 1189.
- Mao L., Liu J., Zhao J., Chang J., Xia L., Jiang L., Wang X., Lin K., Fang B.* 2015. Effect of micro-nano-hybrid structured hydroxyapatite bioceramics on osteogenic and cementogenic differentiation of human periodontal ligament stem cell via Wnt signaling pathway. *Int. J. Nanomedicine.* V. 8. P. 1887.
- Marino G., Rosso F., Cafiero G., Tortora C., Moraci M., Barbarisi M., Barbarisi A.* 2010. Beta-tricalcium phosphate 3D scaffold promote alone osteogenic differentiation of human adipose stem cells: in vitro study. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* V. 21. P. 353.
- Matsuura T., Hosokawa R., Okamoto K., Kimoto T., Akagawa Y.* 2000. Diverse mechanisms of osteoblast spreading on hydroxyapatite and titanium. *Biomaterials.* V. 21. P. 1121.
- McNally A.K., Anderson J.M.* 1995. Interleukin-4 induces foreign body giant cells from human monocytes/macrophages. Differential lymphokine regulation of macrophage

- fusion leads to morphological variants of multinucleated giant cells. *Am. J. Pathol.* V. 147. P. 1487.
- McNally A.K., Anderson J.M. 2011. Foreign body-type multinucleated giant cells induced by interleukin-4 express select lymphocyte co-stimulatory molecules and are phenotypically distinct from osteoclasts and dendritic cells. *Exp. Mol. Pathol.* V. 91. P. 673.
- McNally A.K., Jones J.A., MacEwan S.R., Colton E., Anderson J.M. 2008. Vitronectin is a critical protein adhesion substrate for IL-4-induced foreign body giant cell formation. *J. Biomed. Mater. Res. A.* V. 86A. P. 35.
- McNally A.K., Macewan S.R., Anderson J.M. 2007. Alpha subunit partners to beta1 and beta2 integrins during IL-4-induced foreign body giant cell formation. *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* V. 82. P. 568.
- Meleti Z., Shapiro M., Adams C.S. 2000. Inorganic phosphate induces apoptosis of osteoblast-like cells in culture. *Bone.* V. 27. P. 359.
- Millan C., Vivanco J.F., Benjumedá-Wijnhoven I.M., Bjelica S., Santibanez J.F. 2018. Mesenchymal stem cells and calcium phosphate bioceramics: implications in periodontal bone regeneration. *Adv. Exp. Med. Biol.* V. 1107. P. 91.
- Miron R.J., Bosshardt D.D. 2016. OsteoMacs: key players around bone biomaterials. *Biomaterials.* V. 82. P. 1.
- Moreno J.L., Mikhailenko I., Tondravi M.M., Keegan A.D. 2007. IL-4 promotes the formation of multinucleated giant cells from macrophage precursors by a STAT6-dependent, homotypic mechanism: contribution of E-cadherin. *J. Leukoc. Biol.* V. 82. P. 1542.
- Murshed M. 2018. Mechanism of bone mineralization. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* V. 8: a031229. Erratum in: *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2020. V. 10.
- Najar M., Raicevic G., Crompot E., Fayyad-Kazan H., Bron D., Toungouz M., Lagneaux L. 2016. The immunomodulatory potential of mesenchymal stromal cells. *J. Immunother.* V. 39. P. 45.
- Nich C., Takakubo Y., Pajarinen J., Ainola M., Salem A., Sillat T., Rao A.J., Raska M., Tamaki Y., Takagi M., Konttinen Y.T., Goodman St.B., Gallo J. 2013. Macrophages-key cells in the response to wear debris from joint replacements. *J. Biomed. Mater. Res. A.* V. 101. P. 3033.
- Nudelman F., Pieterse K., George A., Bomans P.H.H., Friedrich H., Brylka L.J., Hilbers P.A.J., de With G., Somerdijk 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.
- Ogata K., Katagiri W., Hibi H. 2017. Secretomes from mesenchymal stem cells participate in the regulation of osteoclastogenesis *in vitro*. *Clin. Oral Investig.* V. 21. P. 1979.
- Okamoto K., Takayanagi H. 2019. Osteoimmunology. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* V. 9: a031245.
- Orimo H. 2010. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J. Nippon Med. Sch.* V. 77. P. 4.
- Othman Z., Fernandes H., Groot Arjan J, Luidier Theo M., Alcinesio A., de Melo Pereira D., Guttenplan Al.P.M., Yuan H., Habibovic P. 2019. The role of ENPP1/PC-1 in osteoinduction by calcium phosphate ceramics *Biomaterials.* V. 210. P. 12.
- Pajarinen J., Lin T., Gibon E., Kohno Y., Maruyama M., Nathan K., Lu L., Yao Zh., Goodman St.B. 2018. Mesenchymal stem cell-macrophage crosstalk and bone healing. *Biomaterials.* V. 196. P. 80.
- Pchelintseva E., Djamgoz M.B.A. 2018. Mesenchymal stem cell differentiation: Control by calcium-activated potassium channels. *J. Cell Physiol.* V. 233. P. 3755.
- Polini A., Pisignano D., Parodi M., Quarto R., Scaglione S. 2011. Osteoinduction of human mesenchymal stem cells by bioactive composite scaffolds without supplemental osteogenic growth factors. *PLoS One.* V. 6: e26211.
- Quinn J.M.W., Itoh K., Udagawa N., Häusler K., Yasuda H., Shima N., Mizuno A., Higashio K., Takahashi N., Suda T., Martin T.J., Gillespie M.T. 2001. Transforming growth factor β affects osteoclast differentiation via direct and indirect actions. *J. Bone Miner. Res.* V. 16. P. 1787.
- Rana N., Suliman S., Mohamed-Ahmed S., Gavasso S., Gjertsen B.T., Mustafa K. 2022. Systemic and local innate immune responses to surgical co-transplantation of mesenchymal stromal cells and biphasic calcium phosphate for bone regeneration. *Acta Biomater. Actions.* V. 141. P. 440.
- Raphel J., Holodniy M., Goodman S.B., Heilshorn S.C. 2016. Multifunctional coatings to simultaneously promote osseointegration and prevent infection of orthopaedic implants. *Biomaterials.* V. 84. P. 301.
- Ratner B.D., Hoffman A.S., Schoen F., Lemons J. (Eds.) 2004. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine.* San Diego, CA, USA: Elsevier Acad. Press. 864 p.
- Ripamonti U., Roden L.C. 2010. Induction of bone formation by transforming growth factor-beta2 in the non-human primate *Papio ursinus* and its modulation by skeletal muscle responding stem cells. *Cell Prolif.* V. 43. P. 207.
- Ripamonti U., Roden L.C., Ferretti C., Klar R.M. 2011. Biomimetic matrices self-initiating the induction of bone formation. *J. Craniofac. Surg.* V. 22. P. 1859.
- Rodriguez A., Macewan S.R., Meyerson H., Kirk J.T., Anderson J.M. 2009. The foreign body reaction in T-cell-deficient mice. *J. Biomed. Mater. Res. A.* V. 90. P. 106.
- Sadowska J.M., Wei F., Guo J., Guillem-Marti J., Lin Zh., Ginebra M.-P., Xiao Y. 2019. The effect of biomimetic calcium deficient hydroxyapatite and sintered β -tricalcium phosphate on osteoimmune reaction and osteogenesis. *Acta Biomater.* V. 96. P. 605.
- Salasznyk R.M., Klees R.F., Williams W.A., Boskey A., Plopper G.E. 2007. Focal adhesion kinase signaling pathways regulate the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Exp. Cell Res.* V. 313. P. 22.
- Samavedi S., Whittington A.R., Goldstein A.S. 2013. Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: a review of properties and their influence on cell behavior. *Acta Biomater.* V. 9. P. 8037.
- Sapir-Koren R., Livshits G. 2011. Bone mineralization and regulation of phosphate homeostasis. *IBMS BoneKEy.* V. 8. P. 286.

- Schemitsch E.H.* 2017. Size matters: defining critical in bone defect size! *J. Orthop. Trauma.* V. 31. P. S20.
- Shen B., Bhargav D., Wei A., Williams L. A., Tao H., Ma D.D.F., Diwan A.D.* 2009. BMP-13 emerges as a potential inhibitor of bone formation. *Int. J. Biol. Sci.* V. 5. P. 192.
- Shi F., Fang X., Zhou T., Huang X., Duan K., Wang J., Qu S., Zhi W., Weng J.* 2022. Macropore regulation of hydroxyapatite osteoinduction via microfluidic pathway. *Int. J. Mol. Sci.* V. 23. P. 11459.
- Silva L.H.A., Antunes M.A., Dos Santos C.C., Weiss D.J., Cruz F.F., Rocco P.R.M.* 2018. Strategies to improve the therapeutic effects of mesenchymal stromal cells in respiratory diseases. *Stem Cell Res. Ther.* V. 9. P. 45.
- Sims N.A., Martin T.J.* 2014. Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit. *Bonekey Rep.* V. 3. P. 1.
- Sokolova V., Knuschke T., Kovtun A., Buer J., Epple M., Westendorf A.M.* 2010. The use of calcium phosphate nanoparticles encapsulating Toll-like receptor ligands and the antigen hemagglutinin to induce dendritic cell maturation and T cell activation. *Biomaterials.* V. 31. P. 5627.
- Stephansson S.N., Byers B.A., Garcia A.J.* 2002. Enhanced expression of the osteoblastic phenotype on substrates that modulate fibronectin conformation and integrin receptor binding. *Biomaterials.* V. 23. P. 2527.
- Tada H., Nemoto E., Foster B.L., Somerman M.J., Shimauchi H.* 2011. Phosphate increases bone morphogenetic protein-2 expression through cAMP-dependent protein kinase and ERK1/2 pathways in human dental pulp cells. *Bone.* V. 48. P. 1409.
- Takeshita S., Fumoto T., Matsuoka K., Park K., Aburatani H., Kato S., Ito M., Ikeda K.* 2013. Osteoclast-secreted CTHRC1 in the coupling of bone resorption to formation. *J. Clin. Invest.* V. 123. P. 3914.
- Teitelbaum S.L.* 2005. Osteoporosis and integrins. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* V. 90. P. 2466.
- Ten Harkel B., Schoenmaker T., Picavet D.I., Davison N.L., de Vries T.J., Everts V.* 2015. The foreign body giant cell cannot resorb bone, but dissolves hydroxyapatite like osteoclasts. *PLoS ONE.* V. 10: e0139564.
- 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.
- Tsapikouni T.S., Missirlis Y.F.* 2008. Protein-material interactions: from micro-to-nano scale. *Mater. Sci. Eng. B.* V. 152. P. 2.
- van Furth R., Cohn Z.A.* 1968. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J. Exper. Med.* V. 128. P. 415.
- Vasconcelos D.P., Costa M., Amaral I.F., Barbosa M.A., Aguas A.P., Barbosa J.N.* 2015. Modulation of the inflammatory response to chitosan through M2 macrophage polarization using pro-resolution mediators. *Biomaterials.* V. 37. P. 116.
- Viti F., Landini M., Mezzelani A., Petecchia L., Milanese L., Scaglione S.* 2016. Osteogenic differentiation of MSC through calcium signaling activation: transcriptomics and functional analysis. *PLoS One.* V. 11: e0148173.
- Vulf M., Khlusov I., Yurova K., Todosenko N., Komar A., Kozlov I., Malashchenko V., Shunkina D., Khaziakhmatova O., Litvinova L.* 2022. MicroRNA regulation of bone marrow mesenchymal stem cells in the development of osteoporosis in obesity. *Front. Biosci. (Schol Ed).* V. 14. P. 17.
- Wang Y., Hu J., Jiao J., Liu Z., Zhou Z., Zhao C., Chang L.J., Chen Y.E., Ma P.X., Yang B.* 2014. Engineering vascular tissue with functional smooth muscle cells derived from human iPS cells and nanofibrous scaffolds. *Biomaterials.* V. 35. P. 8960.
- Xiao D., Zhang J., Zhang C., Barbieri D., Yuan H., Moroni L., Feng G.* 2020. The role of calcium phosphate surface structure in osteogenesis and the mechanisms involved. *Acta Biomater.* V. 106. P. 22.
- Yuan H.P., Fernandes H., Habibovic P., de Boer J., Barradas A.M.C., de Ruiter A., Walsh W.R., van Blitterswijk C.A., de Bruijn J.D.* 2010. Osteoinductive ceramics as a synthetic alternative to autologous bone grafting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 107. P. 13614.
- Yurova K.A., Melashchenko E.S., Khaziakhmatova O.G., Malashchenko V.V., Melashchenko O.B., Shunkin E.O., Norkin I.K., Ivanov P.A., Khlusov I.A., Litvinova L.S.* 2021. Osteogenic differentiation factors of multipotent mesenchymal stromal cells in the current understanding. *Curr. Pharm. Des.* V. 27. P. 3741.
- Zayzafoon M., Fulzele K., McDonald J.M.* 2005. Calmodulin and calmodulin-dependent kinase IIalpha regulate osteoblast differentiation by controlling c-fos expression. *J. Biol. Chem.* V. 280. P. 7049.
- Zhang R., Lu Y., Ye L., Yuan B., Yu Sh., Qin Ch., Xie Y., Gao T., Drezner M.K., Bonewald L.F., Feng J.Q.* 2011. Unique roles of phosphorus in endochondral bone formation and osteocyte maturation. *J. Bone Miner. Res.* V. 26. P. 1047.
- Zhang Y., Böse T., Unger R.E., Jansen J.A., Kirkpatrick C.J., van den Beucken J.P.* 2017. Macrophage type modulates osteogenic differentiation of adipose tissue MSCs. *Cell Tiss. Res.* V. 369. P. 273.
- Zhao L., Kaye A.D., Kaye A.J., Abd-Elsayed A.* 2018. Stem cell therapy for osteonecrosis of the femoral head: current trends and comprehensive review. *Curr. Pain Headache Rep.* V. 22. P. 41.
- Zhao Z., Zhao Q., Gu B., Yin C., Shen K., Tang H., Xia H., Zhang X., Zhao Y., Yang X., Zhang Y.* 2020. Minimally invasive implantation and decreased inflammation reduce osteoinduction of biomaterial. *Theranostics.* V. 10. P. 3533.
- Zhu X.D., Fan H.S., Li D.X., Xiao Y.M., Zhang X.D.* 2007. Protein adsorption and zeta potentials of a biphasic calcium phosphate ceramic under various conditions. *J. Biomed. Mater. Res B.* V. 82B. P. 65.
- Zhu X.D., Fan H.S., Xiao Y.M., Li D.X., Zhang H.J., Luxbacher T., Zhang X.D.* 2009. Effect of surface structure on protein adsorption to biphasic calcium-phosphate ceramics in vitro and in vivo. *Acta Biomater.* V. 5. P. 1311.
- Zhu X., Zhang H.J., Fan H.S., Li W., Zhang X.D.* 2010. Effect of phase composition and microstructure of calcium phosphate ceramic particles on protein adsorption. *Acta Biomater.* V. 6. P. 1536.

Review of Local Cellular and Molecular Processes of Bone Tissue Regeneration Induced by Calcium Phosphate Materials

L. A. Miroshnichenko^a, T. Yu. Polyakova^b, L. S. Litvinova^{a, *}, and I. A. Khlusov^a

^aLaboratory of Cellular and Microfluidic Technologies, Siberian State Medical University, Tomsk, 634050 Russia

^bDepartment of Normal Physiology, Siberian State Medical University, Tomsk, 634050 Russia

*e-mail: larisalitvinova@yandex.ru

One of the leading causes of hospitalization, disability and mortality of 50% of women and 20% of men over the age of 50 are bone fractures and their complications caused by diseases of the musculoskeletal system. In this regard, an active search for a solution to the problem associated with the limitations of the use of auto-, allo-, and xenografts in the clinic to replace bone defects initiated the development of a regenerative approach based on the gradual replacement of artificial material with growing bone tissue. Promising in this regard are materials based on calcium phosphates, which act as an active source of chemical elements (calcium, phosphorus, etc.), which can optimize the process of bone defect fusion and ensure the replacement of the implant with new bone tissue. The review summarizes literature data on local biological activity, target cells, and molecular effects of calcium phosphates. It has been shown that calcium phosphate materials are biocompatible, capable of adsorbing regulatory proteins and cells, influencing their genetic and secretory apparatus and triggering the process of MSC differentiation in the osteogenic direction. At the same time, the successful implementation of local mechanisms of osseointegration at the “bone/implant” interface reduces the risk of periprosthetic infection (PJI) and rejection of artificial devices. Further study and use of calcium phosphate materials will make it possible to make a significant breakthrough in solving modern problems of bone tissue regeneration associated with an accurate (digital) bioengineering approach based on additive technologies and artificial intelligence.

Keywords: calcium phosphate materials, osteoinduction, osteogenic cells, osteogenesis, regeneration, mesenchymal stem cells, cellular and molecular mechanisms

УДК 576.08:576.52

ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННЫЙ ВНЕКЛЕТОЧНЫЙ МАТРИКС ЗАМЕДЛЯЕТ ПРЕЖДЕВРЕМЕННОЕ СТАРЕНИЕ ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

© 2023 г. Е. Б. Бурова¹, *, И. Е. Перевозников¹, Р. Е. Ушаков¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

*E-mail: lenbur87@mail.ru

Поступила в редакцию 05.07.2023 г.

После доработки 18.07.2023 г.

Принята к публикации 20.07.2023 г.

Внеклеточный матрикс (ВКМ), основной компонент внеклеточного пространства, опосредует передачу сигналов между клетками и контролирует их ключевые функции — пролиферацию, дифференцировку, миграцию. Актуальность изучения ВКМ обусловлена широким спектром его биологических свойств, которые могут быть использованы в регенеративной медицине и биоинженерии. Особый интерес представляют децеллюляризованные ВКМ (дВКМ) клеточного происхождения для исследования их регуляторной активности в отношении различных клеточных функций. В настоящей работе была проверена гипотеза о модулирующем влиянии дВКМ, депонированного молодыми МСК Вартонова студня пуповины, на фенотип старения эндометриальных МСК (эмСК), который клетки приобретают в ответ на окислительный стресс. Эта сторона функционирования ВКМ в контексте эмСК до сих пор не изучена. Сравнительное исследование H₂O₂-индуцированного старения эмСК, культивируемых на дВКМ и на пластике в течение длительного времени, показало существенное изменение основных маркеров старения в клеточной популяции на дВКМ. В совокупности, полученные результаты дают основание предполагать, что дВКМ способен частично обращать (тормозить) преждевременное старение эмСК в ответ на окислительный стресс, а также расширяют представление о ВКМ как регуляторе функциональной активности клеток.

Ключевые слова: внеклеточный матрикс, децеллюляризация, эндометриальные мезенхимные стромальные клетки, фенотип старения, окислительный стресс, преждевременное старение

DOI: 10.31857/S0041377123060044, EDN: QLQEKJ

В настоящее время продолжается активное исследование возможности применения мультипотентных мезенхимных стромальных клеток человека (МСК) в клеточной терапии, а также различных способов увеличения ее эффективности. Накопленные за последнее десятилетие данные показали, что трансплантированные аллогенные МСК теряют свои положительные эффекты из-за иммунного отторжения, тогда как на функцию аутологичных МСК отрицательно влияет возраст пациента, что ограничивает их терапевтический потенциал (Zhou et al., 2020). Одной из актуальных проблем, препятствующих широкому применению МСК, является преждевременное старение, которому они могут подвергаться во время трансплантации в организм пациента, особенно в зоны с протеканием воспали-

тельных процессов. Преждевременное старение МСК в ответ на стресс сопровождается различными фенотипическими изменениями, модуляцией секреторного фенотипа, приводит к остановке пролиферации, что значительно ограничивает их регенеративный потенциал (Liu et al., 2020; Lee et al., 2023).

Одним из перспективных подходов, направленных на преодоление связанных с трансплантацией МСК проблем, является создание на основе внеклеточного матрикса (ВКМ) биосовместимых скаффолдов, имитирующих нативную среду организма и повышающих устойчивость и выживаемость МСК при трансплантации (Assunção et al., 2020; Xing et al., 2020). При этом возможно использование как матриц, состоящих из отдельных белков микроокружения клеток, так и полноценного ВКМ клеточного происхождения (Zhou et al., 2016; Yang et al., 2020). МСК при культивировании синтезируют значительное количество ВКМ с различным составом фибриллярных и растворимых компонентов. Внимание исследователей привлекают децеллюляризованные ВКМ (дВКМ) тканей и культивируемых клеток, в

Принятые сокращения: АФ — автофлуоресценция; АФК — активные формы кислорода; дВКМ — децеллюляризованный внеклеточный матрикс; ПРС — полная ростовая среда; МСК и эмСК — мультипотентные мезенхимные стромальные клетки и эндометриальные МСК человека соответственно; PBS — фосфатно-солевой буферный раствор; SA-β-Gal — β-галактозидаза, ассоциированная с клеточным старением.

том числе МСК, в качестве источника биологических скаффолдов для регенеративной медицины (Matveeva, Andreeva, 2020; Ushakov, 2023). дВКМ — многокомпонентная сеть белков, оказывающих всестороннее влияние на клеточные функции — имитирует естественное клеточное микроокружение и обеспечивает клеткам более физиологичный субстрат по сравнению с культуральным пластиком. Как было продемонстрировано в ряде работ, культивирование на ВКМ клеточных культур стимулирует пролиферацию и миграцию (Lin et al., 2012) и вызывает апрегуляцию соответствующих генов (Ragelle et al., 2017), поддерживает стволовость (Lai et al., 2010) и способствует дифференцировке в различных направлениях (Rao Patabhi et al., 2014; Novoseletskaya et al., 2020; Yang et al., 2020), приводит к омоложению культуры (Choi et al., 2011; Joergensen, Rattan, 2014) и защищает от стресс-индуцированного старения (Liu et al., 2016; Zhou et al., 2018; Yu et al., 2019). Кроме того, культивирование клеток на дВКМ служит хорошей моделью для изучения взаимного влияния в системе матрикс—клетка, результаты которого могут способствовать пониманию процессов, происходящих *in vivo* в тканевых нишах МСК.

Основным объектом исследования в настоящей работе являются мультипотентные МСК, выделенные из десквамированного эндометрия в менструальной крови (эмСК). Выбор обусловлен, в первую очередь, легкой доступностью и неинвазивностью выделения, а также отсутствием этических проблем, связанных с их получением. В продолжении наших предыдущих работ по изучению механизмов стресс-индуцированного старения эмСК и его распространения на клетки микроокружения (Burova et al., 2013; Borodkina et al., 2014; Griukova et al., 2019; Vasilieva et al., 2020), мы поставили задачу выяснить, влияет ли ВКМ на фенотип преждевременного старения эмСК; эта сторона функционирования ВКМ в контексте эмСК до сих пор оставалась неизученной. С этой целью провели исследование динамики H₂O₂-индуцированного старения эмСК, культивируемых на пластике и на дВКМ, оценивая основные маркеры старения; продуцентом дВКМ были молодые МСК Вартонова студня пуповины человека. В совокупности, полученные результаты указывают на уникальную способность дВКМ частично обращать (или тормозить) преждевременное старение эмСК в ответ на окислительный стресс.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Культивирование клеток. Использовали мультипотентные мезенхимные стромальные клетки: 1) выделенные из десквамированного эндометрия в менструальной крови здоровых доноров (эмСК) и охарактеризованные ранее сотрудниками ИИЦ РАН (Земелько и др., 2011); 2) выделенные из Вартонова студня пупочного канатика человека линии WJ-1 (MSCWJ-1), полученные из Коллекции клеточных

культур позвоночных ИИЦ РАН и охарактеризованные ранее (Кольцова и др., 2017). Характеристики обеих линий клеток соответствовали минимальным критериям, предложенным ISTC (International Society for Cellular Therapy) (Dominici et al., 2006).

эмСК и MSCWJ-1 культивировали во флаконах T25 и T75 (Thermo Scientific, США) в полной ростовой среде (ПРС), содержащей DMEM/F12 (Gibco, США), 10% эмбриональной сыворотки (HyClone, США), 1% PenStrep (Gibco, США) и 1% GlutaMAX (Gibco, США), при 37°C в атмосфере 5% CO₂. После трипсинизации клеток с помощью 0.05%-ного раствора трипсин-ЭДТА (Invitrogen, США) полученную суспензию рассевали на чашки диаметром 35 мм (Thermo Scientific, США): MSCWJ-1 — по 200, эмСК — по 140 тыс. на чашку.

Депонирование внеклеточного матрикса (ВКМ). MSCWJ-1 на 10-м пассаже, предназначенные для депонирования ВКМ, рассевали на чашки, покрытые 0.1%-ным раствором желатина. Через 3 сут после посева заменяли ростовую среду на ПРС, содержащую 50 мкМ тринатриевой соли 2-фосфо-L-аскорбиновой кислоты (Sigma, Германия), которую стерилизовали фильтрацией через мембрану 0.22 мкм непосредственно перед использованием. Аскорбат натрия является необходимой добавкой для стабильной наработки ВКМ, выступая в роли антиоксиданта (Choi et al., 2008), а также кофактора ферментов лизилгидроксилазы и пролилгидроксилазы, участвующих в фибриллогенезе коллагена (Pinnell, 1985). Клетки культивировали в течение 14 сут, заменяя среду на свежую, содержащую аскорбат натрия, каждые 3 сут; затем осуществляли децеллюляризацию с целью получения бесклеточного ВКМ.

Децеллюляризацию ВКМ проводили с помощью 0.5%-ного раствора CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate) (Sigma, США), содержащего 20 мМ гидроксида аммония, в течение 3 мин при комнатной температуре с последующей осторожной промывкой PBS 5 раз по 3 мин; при необходимости хранили препараты бесклеточных ВКМ в PBS при 4°C.

Иммунофлуоресценция. Препараты дВКМ фиксировали 3.7%-ным раствором формалина в течение 15 мин и инкубировали в 0.5%-ном Triton X-100 в течение 15 мин. После каждой процедуры препараты промывали PBS 5 раз по 3 мин. Далее дВКМ обрабатывали 1%-ным бычьим сывороточным альбумином (БСА) в течение 30 мин и инкубировали в течение ночи при 4°C в приготовленных на 1%-ном БСА первичных антителах к фибронектину (Sigma, США) (разведение 1 : 400), коллагену I, III или IV типов (ИМТЕК, Россия) (разведение 1 : 20) с последующей промывкой PBS 5 раз по 2 мин. На следующий день препараты инкубировали с вторичными козьими антителами против иммуноглобулинов кролика и конъюгированными с флуорофором Alexa 488 (GAR-Alexa 488) (Invitrogen, США) (разведение 1 : 500),

в течение 40 мин при комнатной температуре и промывали PBS 5 раз по 2 мин. Для коллагена I типа использовали вторичные козы антитела против иммуноглобулинов мыши и конъюгированные с флуорофором Alexa 568 (GAM-Alexa 568) (разведение 1 : 500) (Invitrogen, США).

Полноту децеллюляризации ВКМ подтверждали отсутствием клеточных компонентов и ядер, окрашивая препараты на α -тубулин, актин и 4',6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI). дВКМ инкубировали с первичными антителами на α -тубулин (разведение 1 : 200) (Sigma, США) в течение 10 мин и со вторичными GAM-Alexa 568 (разведение 1 : 500) (Invitrogen, США) в течение 40 мин при комнатной температуре; для окраски на актин использовали фаллоидин, конъюгированный с тетраметилпроламином (разведение 1 : 400) (Invitrogen, США); окраску матриксов с помощью DAPI (разведение 1 : 1000) (Sigma, США) проводили в течение 5 мин при комнатной температуре в темноте. Анализировали препараты окрашенных дВКМ на флуоресцентном микроскопе Fluorescent Cell Imager (Bio-Rad, Сингапур). Анализ показал отсутствие в препаратах дВКМ клеточных компонентов и ядер (результаты не показаны).

Рецеллюляризация дВКМ. эМСК на 11-м пассаже были использованы для рецеллюляризации бесклеточных ВКМ. эМСК рассевали на чистые чашки диаметром 35 мм и параллельно на чашки с дВКМ в одинаковой плотности (140 тыс. на 1 чашку).

Индукция старения в эМСК при действии H_2O_2 . Программу преждевременного старения клеток инициировали через 2 сут после посева обработкой клеток 200 мкМ H_2O_2 (Sigma-Aldrich, St. Louis, США) в течение 1 ч; после промывки PBS клетки культивировали в ПРС в течение 6 и 16 сут, меняя среду на свежую каждые 3 сут. Условия обработки и культивирования эМСК на дВКМ и на пластике были идентичными.

Анализ внутриклеточного уровня АФК, жизнеспособности, автофлуоресценции (АФ) и размера клеток. Для оценки уровня АФК в эМСК, культивируемых на дВКМ и на пластике, использовали АФК-зависимый зонд диацетат 2,7-дихлор-флуоресцеина ($H_2DCF-DA$) (Molecular Probes, США). Окраску клеток с помощью 1 мМ раствора $H_2DCF-DA$ в DMSO проводили в ростовой среде без сыворотки в CO_2 -инкубаторе в течение 20 мин, промывали 1 раз PBS и собирали клетки трипсинизацией в 0.05%-ном растворе трипсин-ЭДТА с последующим центрифугированием. Суспензию клеток в PBS анализировали на проточном цитометре CytoFLEX S (Beckman Coulter, Бреа, Калифорния, США). Уровень АФК оценивали по изменению интенсивности флуоресценции DCF (усл. ед.). Для определения жизнеспособности к клеточной суспензии добавляли 50 мкг/мл йодистого пропидия (PI) и осторожно перемешивали в течение 30 с; для анализа обычно собирали не менее 3000 событий в качестве основ-

ной клеточной популяции. Репрезентативные точечные диаграммы PI vs. FSC позволяли различать PI-отрицательные (живые) клетки и PI-положительные (мертвые) клетки; одновременно оценивали количество живых клеток, среднее значение АФ, которое отражает присутствие липофусцина, и среднее значение прямого светорассеяния (forward scatter, FS), которое коррелирует с размером клеток. Полученные данные анализировали в программе CytExpert software (версия 2.3) (Beckman Coulter, Бреа, Калифорния, США).

Активность β -галактозидазы (SA- β -Gal), ассоциированной с клеточным старением определяли в соответствии с описанным ранее протоколом (Debasq-Chainiaux et al., 2009). Сначала эМСК обрабатывали с помощью 100 нМ бафиломицина А1 в течение 1 ч для защелачивания лизосом, затем в клеточную среду добавляли C12FDG (липофильный субстрат бета-галактозидазы), конъюгированный с флуоресцеином, до конечной концентрации 33 мМ, и инкубировали клетки в течение 2-х ч. Обработку клеток проводили при 37°C в атмосфере 5% CO_2 . Окрашенные клетки промывали PBS, собирали трипсинизацией и анализировали в проточном цитометре CytoFlex S (Beckman Coulter, Бреа, Калифорния, США); полученные данные анализировали с помощью программного обеспечения CytExpert (версия 2.0) (Beckman Coulter, Бреа, Калифорния, США).

Электрофорез и иммуноблотинг. Лизаты клеток получали, как описано ранее (Burova et al., 2013); концентрацию белка определяли по методу Бредфорда на спектрофотометре GeneQuant 1300 (Biochrom, США). Электрофоретическое разделение белков в 9%-ном полиакриламидном геле, перенос на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-C extra (Amersham Pharmacia Biotech, Швеция) и иммуноблотинг проводили по стандартным протоколам производителя (Bio-Rad Laboratories, США). Для визуализации белковых полос мембрану окрашивали красителем Ponceau S (Sigma, США).

Для специфического выявления белков использовали первичные моноклональные кроличьи антитела против ингибитора циклинзависимых киназ p21Waf1/Cip1 и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH, clone 14C10), а также поликлональные кроличьи антитела против фосфорилированной формы Rb (p-Rb) (Ser807/811). В качестве вторичных антител применяли козы антитела, выработанные против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (GAR-HRP). Все антитела были приобретены в фирме Cell Signaling (США). Пероксидазную активность конъюгатов вторичных антител детектировали с помощью метода ECL (Amersham, Швеция); хемилюминесцентное излучение регистрировали экспонированием на рентгеновскую пленку CEA RP NEW (CEA AB, Швеция).

Статистическую обработку данных проводили с помощью компьютерной программы Microsoft Excel

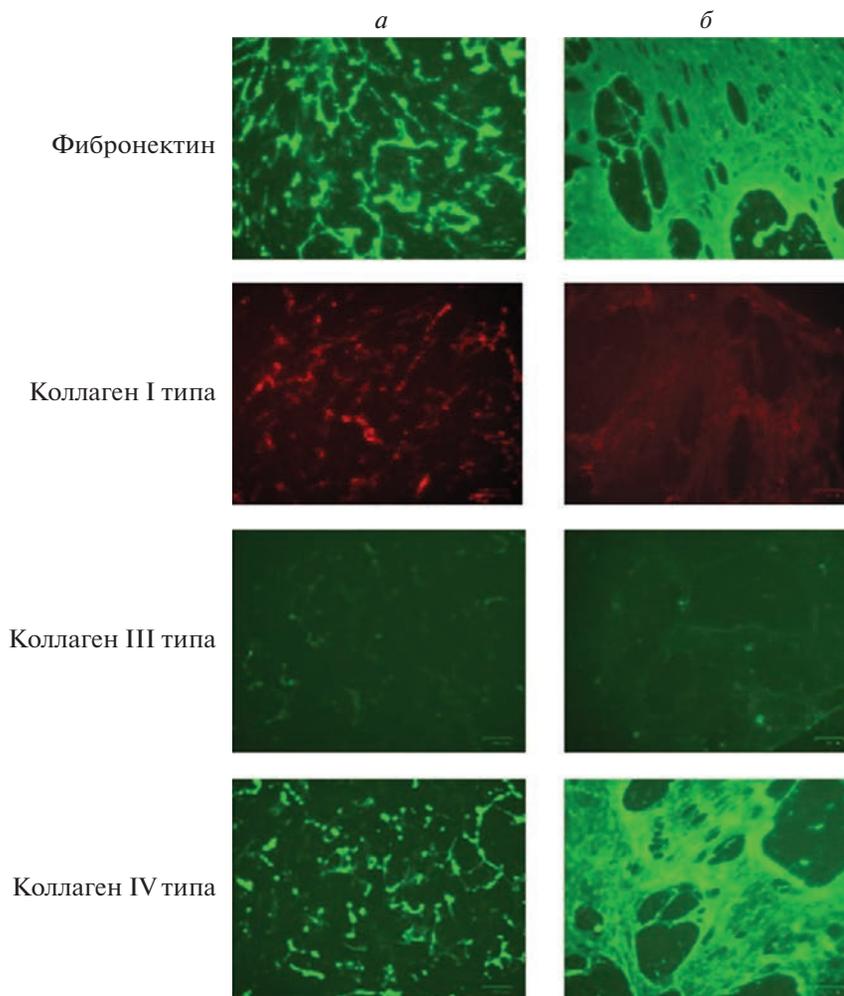


Рис. 1. Децеллюляризованные внеклеточные матриксы (дВКМ), депонированные эМСК (а) и клетками линии MSCWJ-1 (б). Иммунофлуоресцентная окраска основных белковых компонентов дВКМ – фибронектина, коллагенов I, III и IV типов. Препараты окрашенных дВКМ анализировали на флуоресцентном микроскопе Fluorescent Cell Imager (Bio-Rad, Сингапур). Масштабный отрезок: 100 мкм.

(Microsoft Corporation, США), используя пакет программ Microsoft Office 2016. Для оценки достоверности различий данных использовали программу OriginPro 2021 с привлечением дисперсионного анализа (ANOVA) с поправкой Бонферрони. Данные представлены в виде средних значений и их стандартных отклонений ($n = 3$).

В работе использовали неорганические соли производства фирмы Sigma (США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для изучения роли ВКМ в процессе преждевременного старения эМСК прежде всего необходимо было выбрать МСК, способные продуцировать прочный, стабильно воспроизводимый матрикс; доступность клеточных линий на ранних пассажах в достаточных количествах также имела существенное значение для планируемых широкомасштабных экс-

периментов. Нарработку и децеллюляризацию ВКМ проводили, как описано в разделе “Материал и методика”; полноту децеллюляризации ВКМ подтверждали методом иммунофлуоресценции по отсутствию клеточных компонентов (актинового и тубулинового цитоскелета, ядер) по сравнению с ВКМ с клетками-продуцентами (данные не показаны). Эффективность депонирования основных компонентов дВКМ – фибронектина, коллагенов I, III, IV типов – оценивали по целостности образованной белковой сети. Сравнив структурную сеть компонентов дВКМ, депонированных эМСК и MSCWJ-1, для дальнейших исследований выбрали клетки MSCWJ-1 (рис. 1а, б).

Для проверки гипотезы о модулирующем действии дВКМ на H_2O_2 -индуцированное клеточное старение мы провели рецеллюляризацию дВКМ популяцией эМСК и для сравнения посеяли те же клетки на чистые пластиковые чашки. Клетки под-

вергли сублетальному окислительному стрессу, индуцированному с помощью 200 мкМ H_2O_2 в течение 1 ч. Как было установлено в наших предыдущих работах, в этих условиях ЭМСК на пластике подвергаются преждевременному старению (Burova et al., 2013; Borodkina et al., 2014). Через 6 и 16 сут после окислительного стресса или через 1 сут после посева (в случае контрольных клеток) сравнивали маркеры старения в ЭМСК, культивируемых на пластике и на дВКМ. Для мониторинга фенотипа культивируемых в течение длительного времени клеток оценивали уровни АФК и АФ, размер клеток, активность SA- β -Gal и функциональный статус сигнальных белков p21 и Rb.

Измерение внутриклеточного уровня АФК в H_2O_2 -обработанных ЭМСК, культивируемых на пластике или дВКМ от молодых MSCWJ-1 10 пассажа, проводили с использованием АФК-чувствительного флуоресцентного зонда H_2 -DCF-DA, анализируя изменение интенсивности флуоресценции в клетках. Одновременно оценивали значения АФ (рис. 2б, в), которые при построении гистограмм (рис. 2а) вычитали из значений флуоресценции окрашенных клеток. В анализируемых временных точках (6 и 16 сут) уровень АФК в клетках на дВКМ был значительно ниже, чем на пластике; такая же закономерность была характерна и для контрольных необработанных клеток. Наибольшую разницу между флуоресценцией клеток на дВКМ и пластике наблюдали через 16 сут после обработки H_2O_2 (рис. 2а), причем эти же значения различались между собой, будучи нормированными на соответствующие контроли. Помимо этого, значение АФ в клетках на дВКМ через 16 сут после окислительного стресса было ниже, чем на пластике (рис. 2в).

Результаты анализа изменения размеров клеток в ходе эксперимента представлены на рис. 3а. В отличие от клеток на пластике, клетки на дВКМ имели меньший размер, причем разница в размере была наиболее значительна через 16 сут после обработки H_2O_2 , как и в случае с уровнем АФК и АФ (рис. 2а, в).

Анализ активности SA- β -Gal проводили с помощью проточной цитометрии с использованием C12FDG – липофильного субстрата β -Gal, конъюгированного с флуоресцеином. Интенсивность флуоресценции через 6 сут после обработки H_2O_2 была меньше в клетках, культивируемых на дВКМ, чем в клетках на пластике (рис. 3б), однако эти различия не были статистически значимыми. А уже через 16 сут наблюдали значительное уменьшение значений интенсивности флуоресценции клеток как на дВКМ, так и на пластике по сравнению с 6 сут, но между собой значения не различались.

Как известно, ингибитор циклин-зависимых киназ p21 и белок ретинобластомы Rb являются ключевыми компонентами сигнального каскада АТМ/p53/p21/Rb, ответственного за остановку клеточного цикла и запуск программы клеточного старения в ответ на

окислительный стресс. Как видно на рис. 4, через 6 сут после действия H_2O_2 фосфорилированная форма белка Rb исчезала в клетках, культивируемых как на дВКМ, так и на пластике; в то же время уровень белка p21 был значительно повышен (в большей степени в клетках на пластике), по сравнению с контрольными клетками. Эти факты свидетельствуют о том, что в обоих случаях клетки, обработанные H_2O_2 , находились в состоянии преждевременного старения. Однако через 16 сут культивирования старых (стареющих) ЭМСК картина существенно изменилась: мы наблюдали появление высокого уровня p-Rb в клетках на дВКМ, по сравнению с весьма незначительным повышением на пластике. Этот интересный феномен восстановления фосфорилирования Rb в старых клетках, культивируемых на дВКМ, может свидетельствовать о важной функциональной роли матрикса, продуцированного молодыми MSCWJ-1.

ОБСУЖДЕНИЕ

В наших предыдущих работах был детально исследован механизм преждевременного старения ЭМСК в ответ на окислительный стресс, индуцированный действием 200 мкМ H_2O_2 (Burova et al., 2013; Borodkina et al., 2014; Borodkina et al., 2016; Griukova et al., 2019; Vassilieva et al., 2020). Следует подчеркнуть, что все результаты были получены на клетках, культивируемых на пластиковых чашках, традиционно используемых для этой цели. Однако очевидно, что пластик, в отличие от ВКМ, не является релевантным субстратом для культивирования, поскольку в этих условиях клетки лишены тех сигналов, которые может обеспечить ВКМ. Это обстоятельство лишь подчеркивает актуальность изучения регуляторного действия ВКМ на функционирование МСК различной природы. В настоящем исследовании мы проверяли гипотезу о модулирующем влиянии дВКМ, который продуцировали молодые (раннего пассажа) MSCWJ-1, на фенотип старения ЭМСК.

Дизайн экспериментов предполагал использование дВКМ, депонированного клетками MSCWJ-1, с последующей его рецеллюляризацией молодыми ЭМСК, которые затем подвергали сублетальному окислительному стрессу, запуская программу клеточного старения. Для сравнения в параллельных экспериментах характеризовали процесс стресс-индуцированного старения ЭМСК, посеянных на пластиковые чашки.

Преждевременное старение клеток характеризуется рядом общепринятых фенотипических признаков, таких как клеточная гипертрофия, увеличение активности SA- β -Gal вследствие усиления биогенеза лизосом, повышение интенсивности автофлуоресценции, обусловленное накоплением в цитоплазме липофусцина, и усиление генерации внутриклеточных АФК (Campisi, d'Adda di Fagagna, 2007; Blagosklonny, 2011; Bertolo et al., 2019; Weng et al., 2022). В ответ на окислительное

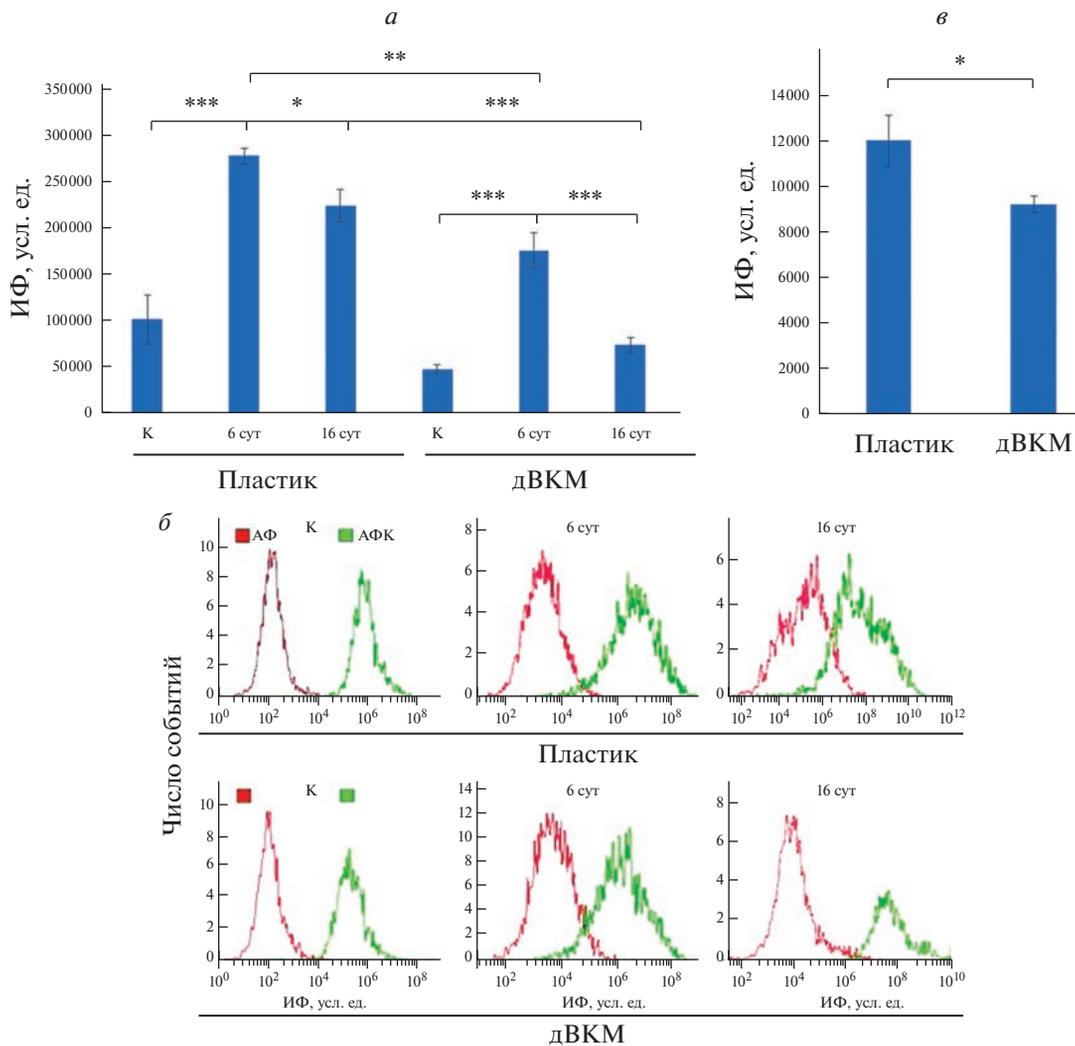


Рис. 2. Зависимость внутриклеточного уровня АФК и АФ от природы субстрата и продолжительности культивирования эМСК, обработанных H_2O_2 . Клетки, посеянные на пластик или дВКМ от MSCWJ-1, подвергали действию H_2O_2 (200 мкМ, 1 ч) и через 6 или 16 сут культивирования оценивали уровень АФК и АФ методом проточной цитометрии. *а* – Интенсивность флуоресценции (ИФ, усл. ед.) DCF (АФК-зависимого зонда H_2 -DCF-DA); К – контрольные интактные клетки; 6 и 16 сут – время культивирования после обработки H_2O_2 . *б* – Интенсивность АФ и зонда (ИФ) окрашенных клеток; по оси абсцисс – ИФ, усл. ед., по оси ординат – число событий. *в* – Интенсивность АФ клеток на пластике или дВКМ, через 16 сут после действия H_2O_2 . Показаны средние значения и их стандартные отклонения (*а, в*; вертикальные отрезки) из трех независимых экспериментов; различия достоверны при $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ и $***p < 0.001$.

повреждение ДНК активируется сигнальный путь ATM/p53/p21/Rb, что сопровождается повышением уровня ингибитора циклин-зависимых киназ p21 и падением уровня фосфорилирования белка ретинобластомы Rb с последующим арестом клеточного цикла (Engeland, 2022).

Сравнительная оценка уровня АФК в обработанных H_2O_2 эМСК на разных субстратах – пластике и дВКМ показала, что культивирование клеток на дВКМ приводит к существенному снижению в них уровня АФК. Следует подчеркнуть, что наибольшую разницу между дВКМ и пластиком мы зафиксировали через 16 сут после обработки H_2O_2 , причем различие сохранялось при нормировании уровней АФК

на соответствующие контроли. Эти результаты согласуются с данными из литературы, в соответствии с которыми в старых МСК костного мозга мышей уровень АФК значительно уменьшался в ответ на их культивирование на дВКМ, продуцированном молодыми МСК (Sun et al., 2011). В ряде работ тоже отмечали эффективность дВКМ в повышении устойчивости МСК из различных источников к воздействию АФК (Sart et al., 2020; Xing et al., 2020). Одна из причин наблюдаемых эффектов может быть связана со способностью дВКМ, продуцированного МСК, усиливать активность антиоксидантных ферментов клетки, таких как супероксиддисмутаза и каталаза (Pei et al., 2013; Liu et al., 2016; Zhou et al., 2018).

Мы обнаружили также, что интенсивность АФ клеток через 16 сут после их обработки H_2O_2 существенно ниже в эМСК, культивируемых на дВКМ; это может свидетельствовать о меньшем накоплении липофусцина в цитоплазме, характерном для более молодых клеток (Bertolo et al., 2019; Shatrova et al., 2021). В пользу “омоложения” клеточной популяции эМСК в наших экспериментах свидетельствует и факт сильного уменьшения размера клеток на дВКМ, которое коррелирует с продолжительностью взаимодействия матрикса и клетки. В то же время, через 16 сут после окислительного стресса снижалась активность SA- β -Gal в клетках на дВКМ и пластике, хотя статистически значимые различия между этими вариантами отсутствовали. В целом, наблюдаемый нами эффект торможения старения эМСК, который оказывает дВКМ, совпадает с описанным ранее защитным эффектом от H_2O_2 -индуцированного старения МСК Вартонова студня (Zhou et al., 2018) и МСК жировой ткани (Yu et al., 2019), который демонстрировали аутологичные дВКМ.

Анализ функционального статуса ключевых белков p21 и Rb сигнального каскада АТМ/p53/p21/Rb показал, что через 6 сут после стресса клетки как на ВКМ, так и на пластике находятся в состоянии преждевременного старения, о чем свидетельствует увеличение уровня p21 и одновременное падение уровня фосфорилирования Rb. Эти результаты полностью согласуются с описанным ранее механизмом H_2O_2 -индуцированного старения эМСК, культивируемых на пластике (Vurova et al., 2013; Borodkina et al., 2014). Принципиально иная ситуация наблюдается при пролонгировании культивирования: в клетках на дВКМ, в отличие от пластика, даже при сохранении уровня p21, фосфорилирование Rb достигает высокого уровня, характерного для пролиферирующих клеток. Принимая во внимание, что сигнальный путь АТМ/p53/p21/Rb активируется в ответ на повреждение ДНК и приводит к аресту клеточного цикла (Engeland, 2022), можно предположить, что антиоксидантные свойства дВКМ способствовали уменьшению повреждения ДНК при окислительном стрессе и торможению развития программы старения.

Нельзя также исключить участие сигнального каскада p38MAPK/p16INK4a в модуляции статуса фосфорилирования Rb при изучении дВКМ-зависимой регуляции старения эМСК. MAP-киназа p38 с большой вероятностью может рассматриваться в качестве кандидата на роль регулятора статуса Rb, учитывая ее вовлеченность в процесс H_2O_2 -индуцированного старения эМСК при культивировании на пластике (Borodkina et al., 2014). С другой стороны, уровень ингибитора циклин-зависимых киназ p16, в отличие от p21, может оказаться существенно пониженным на поздних стадиях старения, что объяснит повышение уровня фосфорилирования белка ретинобластомы.

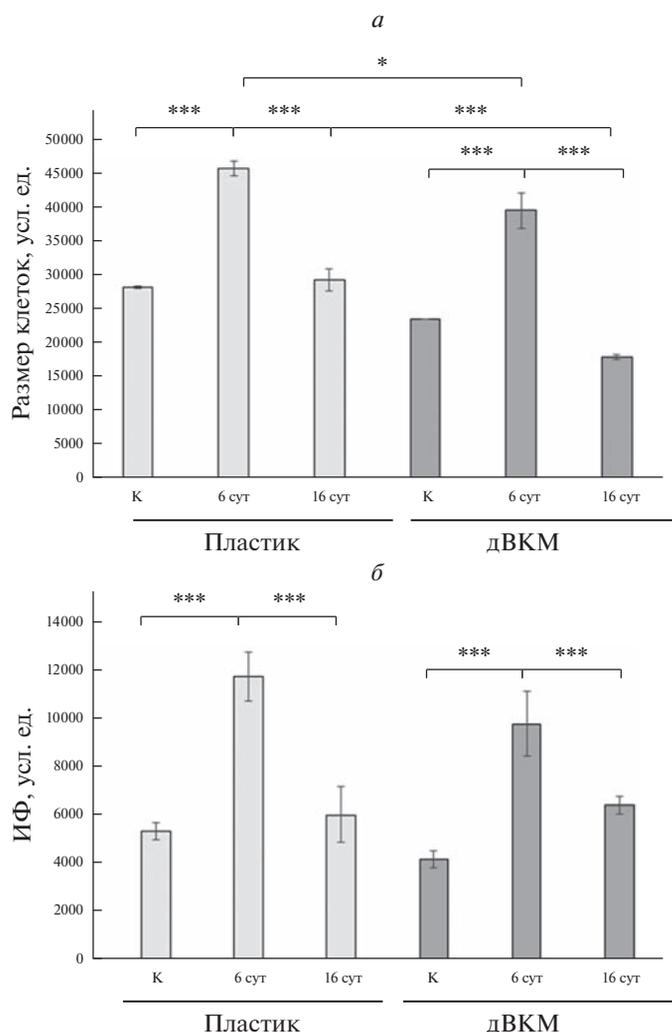


Рис. 3. Изменение размера эМСК (а) и активности в клетках β -галактозидазы (β -Gal), ассоциированной с клеточным старением, (б) через 6 и 16 сут после окислительного стресса. Клетки культивировали на дВКМ и на пластике. Проточная цитометрия. Размер клеток определяли на основе прямого светорассеяния (forward scatter, FS) живых клеток, активность β -Gal – по интенсивности флуоресценции (ИФ) C12FDG, липофильного субстрата β -Gal. Обозначения и другие объяснения те же, что к рис. 2.

Полученные результаты позволяют заключить: дВКМ, депонированный молодыми MSCWJ-1, способен не только модулировать фенотип старения эМСК, но и влиять на сигнальный путь, регулирующий процесс клеточного старения. Как показывает анализ данных из литературы и наших собственных, дВКМ клеточных культур обладает уникальной способностью защищать культивируемые на нем МСК от преждевременного старения в ответ на окислительный стресс. В перспективе это может обеспечить новую стратегию использования депонированного стволовыми клетками матрикса для преодоления проблемы клеточного старения и облегчения

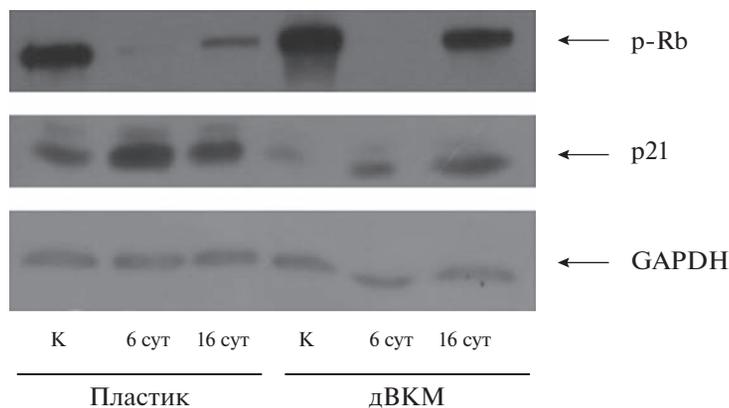


Рис. 4. Долгосрочное (6 и 16 сут) культивирование эМСК, обработанных H_2O_2 , на дВКМ изменяет функциональный статус белка Rb. Вестерн-блот-анализ с использованием специфических антител. К – контрольные интактные клетки. Указаны фосфорилированная форма Rb (p-Rb), а также белки p21 и GAPDH (использован в качестве контроля нагрузки).

клинического применения МСК в регенеративной медицине.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе мы продемонстрировали, что долгосрочное культивирование эМСК, в которых запущена программа старения, на дВКМ от молодых MSCWJ-1 приводит к понижению генерации АФК и интенсивности автофлуоресценции, уменьшению размера клеток и активности SA- β -Gal, а также изменению функционального статуса Rb по сравнению с теми же маркерами клеточного старения на пластике. В совокупности, эти результаты дают основание полагать, что данный ВКМ способен частично обращать (тормозить) преждевременное старение эМСК в ответ на окислительный стресс, а также расширяют представление о ВКМ как регуляторе функциональной активности клеток.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Внутреннего гранта Института цитологии РАН 2023 г.

БЛАГОДАРНОСТИ

Клетки линии MSCWJ-1 были получены из ЦКП “Коллекция культур клеток позвоночных”, поддержанного грантом Минобрнауки Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-683).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В экспериментах животные и люди не участвовали.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Кольцова А.М., Крылова Т.А., Мусорина А.С., Зенин В.В., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. 2017. Динамика свойств двух линий мезенхимных стволовых клеток, полученных из Вартонова студня пупочного канатика человека, при длительном культивировании. Цитология. Т. 59. С. 574. (Koltsova A.M., Krylova T.A., Musorina A.S., Zenin V.V., Turilova V.I., Yakovleva T.K., Poljanskaya G.G. 2018. The dynamics of cell properties during long-term cultivation of two lines of mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly of human umbilical cord. Cell Tiss. Biol. V. 12. P. 7.) <https://doi.org/10.1134/S1990519X1801011X>
- Матвеева Д.К., Андреева Е.Р. 2020. Регуляторная активность децеллюляризованного матрикса мультипотентных мезенхимных стромальных клеток. Цитология. Т. 62. С. 699. (Matveeva D.K., Andreeva E.R. 2020. Regulatory activity of decellularized matrix of multipotent mesenchymal stromal cells. Tsitologia. V. 62. P. 699.) <https://doi.org/10.31857/S004137712010003X>
- Земелько В.И., Гринчук Т.М., Домнина А.П., Арцибашева И.В., Зенин В.В., Кирсанов А.А., Бичева Н.К., Корсак В.С., Никольский Н.Н. 2011. Мультипотентные мезенхимные стволовые клетки десквамированного эндометрия. Выделение, характеристика и использование в качестве фидерного слоя для культивирования эмбриональных стволовых линий человека. Цитология. Т. 53. С. 919. (Zemelko V.I., Grinchuk T.M., Domnina A.P., Artzibasheva I.V., Zenin V.V., Kirsanov A.A., Bichevaia N.K., Korsak V.S., Nikolsky N.N. 2012. Multipotent mesenchymal stem cells of desquamated endometrium: isolation, characterization, and application as a feeder layer for maintenance of human embryonic stem cells. Cell Tiss. Biol. V. 6. P. 1.) <https://doi.org/10.1134/S1990519X12010129>
- Assunção M., Dehghan-Baniani D., Yiu C.H.K., Später T., Beyer S., Blocki A. 2020. Cell-derived extracellular matrix for tissue engineering and regenerative medicine. Front. Bioeng. Biotechnol. V. 8: 602009. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.602009>
- Bertolo A., Baur M., Guerrero J., Pötzel T., Stoyanov J. 2019. Autofluorescence is a reliable in vitro marker of cellular se-

- nescence in human mesenchymal stromal cells. *Sci. Rep.* V. 9. P. 2074.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-38546-2>
- Blagosklonny M.V.* 2011. Cell cycle arrest is not senescence. *Aging (Albany NY)*. V. 3. P. 94.
<https://doi.org/10.18632/aging.100281>
- Borodkina A., Shatrova A., Abushik P., Nikolsky N., Burova E.* 2014. Interaction between ROS dependent DNA damage, mitochondria and p38 MAPK underlies senescence of human adult stem cells. *Aging*. V. 6. P. 481.
<https://doi.org/10.18632/aging.100673>
- Borodkina A.V., Shatrova A.N., Deryabin P.I., Griukova A.A., Abushik P.A., Antonov S.M., Nikolsky N.N., Burova E.B.* 2016. Calcium alterations signal either to senescence or to autophagy induction in stem cells upon oxidative stress. *Aging (Albany NY)*. V. 8: 3400.
<https://doi.org/10.18632/aging.101130>
- Burova E., Borodkina A., Shatrova A., Nikolsky N.* 2013. Sublethal oxidative stress induces the premature senescence of human mesenchymal stem cells derived from endometrium. *Oxid. Med. Cell. Longev.* V. 2013: 474931.
<https://doi.org/10.1155/2013/474931>
- Campisi J., d'Adda di Fagagna F.* 2007. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* V. 8. P. 729.
<https://doi.org/10.1038/nrm2233>
- Choi K.M., Seo Y.K., Yoon H.H., Song K.Y., Kwon S.Y., Lee H.S., Park J.K.* 2008. Effect of ascorbic acid on bone marrow-derived mesenchymal stem cell proliferation and differentiation. *J. Biosci. Bioeng.* V. 105. P. 586.
<https://doi.org/10.1263/jbb.105.586>
- Choi H.R., Cho K.A., Kang H.T., Lee J.B., Kaerberlein M., Suh Y., Chung I.K., Park S.C.* 2011. Restoration of senescent human diploid fibroblasts by modulation of the extracellular matrix. *Aging Cell*. V. 10. P. 148.
<https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2010.00654.x>
- Debaqç-Chainiaux F., Erusalimsky J.D., Campisi J., Toussaint O.* 2009. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA- β -gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and *in vivo*. *Nat. Protoc.* V. 4. P. 1798.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2009.191>
- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D.S., Deans R.J., Keating A., Prockop D.J., Horwitz E.M.* 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. V. 8. P. 315.
<https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Engeland K.* Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling. 2022. *Cell Death Differ.* V. 29. P. 946.
<https://doi.org/10.1038/s41418-022-00988-z>
- Griukova A., Deryabin P., Shatrova A., Burova E., Severino V., Farina A., Nikolsky N., Borodkina A.* 2019. Molecular basis of senescence transmitting in the population of human endometrial stromal cells. *Aging*. V. 11: 9912.
<https://doi.org/10.18632/aging.102441>
- Joergensen P., Rattan S.I.S.* 2014. Extracellular matrix modulates morphology, growth, oxidative stress response and functionality of human skin fibroblasts during aging *in vitro*. *J. Aging Sci.* V. 2. P. 122.
<https://doi.org/10.4172/2329-8847.1000122>
- Lai Y., Sun Y., Skinner C.M., Son E.L., Lu Z., Tuan R.S., Jilka R.L., Ling J., Chen X.D.* 2010. Reconstitution of marrow-derived extracellular matrix *ex vivo*: a robust culture system for expanding large-scale highly functional human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* V. 19. P. 1095.
<https://doi.org/10.1089/scd.2009.0217>
- Lee S.S., Vũ T.T., Weiss A.S., Yeo G.C.* 2023. Stress-induced senescence in mesenchymal stem cells: Triggers, hallmarks, and current rejuvenation approaches. *Eur. J. Cell Biol.* V. 102. P. 151331.
<https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2023.151331>
- Lin H., Yang G., Tan J., Tuan R.S.* 2012. Influence of decellularized matrix derived from human mesenchymal stem cells on their proliferation, migration and multi-lineage differentiation potential. *Biomaterials*. V. 33. P. 4480.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.03.012>
- Liu X., Zhou L., Chen X., Liu T., Pan G., Cui W., Li M., Luo Z.P., Pei M., Yang H., Gong Y., He F.* 2016. Culturing on decellularized extracellular matrix enhances antioxidant properties of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* V. 61. P. 437.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.12.090>
- Liu J., Ding Y., Liu Z., Liang X.* 2020. Senescence in mesenchymal stem cells: functional alterations, molecular mechanisms, and rejuvenation strategies. *Front. Cell Dev. Biol.* V. 8: 258.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00258>
- Novoselefskaya E., Grigorieva O., Nimiritsky P., Basalova N., Eremichev R., Milovskaya I., Kulebyakin K., Kulebyakina M., Rodionov S., Omelyanenko N., Efimenko A.* 2020. Mesenchymal stromal cell-produced components of extracellular matrix potentiate multipotent stem cell response to differentiation stimuli. *Front. Cell Dev. Biol.* V. 8: 555378.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2020.555378>
- Pei M., Zhang Y., Li J., Chen D.* 2013. Antioxidation of decellularized stem cell matrix promotes human synovium-derived stem cell-based chondrogenesis. *Stem Cells Dev.* V. 22. P. 889.
<https://doi.org/10.1089/scd.2012.0495>
- Ragelle H., Naba A., Larson B.L., Zhou F., Prijic M., Whitaker C.A., Del Rosario A., Langer R., Hynes R.O., Anderson D.G.* 2017. Comprehensive proteomic characterization of stem cell-derived extracellular matrices. *Biomaterials*. V. 128. P. 147.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.03.008>
- Rao Pattabhi S., Martinez J.S., Keller T.C.S.* 3rd. 2014. Decellularized ECM effects on human mesenchymal stem cell stemness and differentiation. *Differentiation*. V. 88. P. 131.
<https://doi.org/10.1016/j.diff.2014.12.005>
- Rattan S.I., Keeler K.D., Buchanan J.H., Holliday R.* 1982. Autofluorescence as an index of ageing in human fibroblasts in culture. *Biosci. Rep.* V. 2. P. 561.
<https://doi.org/10.1007/BF01314216>
- Sart S., Jeske R., Chen X., Ma T., Li Y.* 2020. Engineering stem cell-derived extracellular matrices: Decellularization, characterization, and biological function. *Tissue Eng. Part B*. V. 26. P. 402.
<https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2019.0349>
- Shatrova A.N., Burova E.B., Kharchenko M.V., Smirnova I.S., Lyublinskaya O.G., Nikolsky N.N., Borodkina A.V.* 2021. Outcomes of deferoxamine action on H₂O₂-induced growth inhibition and senescence progression of human endometrial Stem Cells. *Int. J. Mol. Sci.* V. 22: 6035.
<https://doi.org/10.3390/ijms22116035>

- Sun E., Li Y., Lu W., Chen Z., Ling Z., Ran J., Jilka O.L. 2011. Rescuing replication and osteogenesis of aged mesenchymal stem cells by exposure to a young extracellular matrix. *FASEB J.* V. 25. P. 1474. <https://doi.org/10.1096/fj.10-161497>
- Vassilieva I., Kosheverova V., Vitte M., Kamentseva R., Shatrova A., Tsupkina N., Skvortsova E., Borodkina A., Tolkunova E., Nikolsky N., Burova E. 2020. Paracrine senescence of human endometrial mesenchymal stem cells: a role for the insulin-like growth factor binding protein 3. *Aging.* V. 12: 1987. <https://doi.org/10.18632/aging.102737>
- Weng Z., Wang Y., Ouchi T., Liu H., Qiao X., Wu C., Zhao Z., Li L., Li B. 2022. Mesenchymal stem/stromal cell senescence: hallmarks, mechanisms, and combating strategies. *Stem Cells Transl. Med.* V. 11. P. 356. <https://doi.org/10.1093/stcltm/szac004>
- Xing H., Lee H., Luo L., Kyriakides T.R. 2020. Extracellular matrix-derived biomaterials in engineering cell function. *Biotechnol. Adv.* V. 42. P. 107421. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107421>
- Yang L., Ge L., van Rijn P. 2020. Synergistic effect of cell-derived extracellular matrices and topography on osteogenesis of mesenchymal stem cells. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* V. 12. P. 25591. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c05012>
- Yu X., He Y., Chen Z., Qian Y., Wang J., Ji Z., Tan X., Li L., Lin M. 2019. Autologous decellularized extracellular matrix protects against H₂O₂-induced senescence and aging in adipose-derived stem cells and stimulates proliferation *in vitro*. *Biosci. Rep.* V. 39: BSR20182137. <https://doi.org/10.1042/BSR20182137>
- Zhou Y., Zimmer M., Yuan H., Naughton G.K., Ferman R., Li W.-J. 2016. Effects of human fibroblast-derived extracellular matrix on mesenchymal stem cells. *Stem Cell Rev. Rep.* V. 12. P. 560. <https://doi.org/10.1007/s12015-016-9671-7>
- Zhou L., Chen X., Liu T., Zhu C., Si M., Jargstorf J., Li M., Pan G., Gong Y., Luo Z.-P., Yang H., Pei M., He F. 2018. SIRT1-dependent anti-senescence effects of cell-deposited matrix on human umbilical cord mesenchymal stem cells. *J. Tiss. Eng. Regen. Med.* V. 12: e1008. <https://doi.org/10.1002/term.2422>
- Zhou X., Hong Y., Zhang H., Li X. 2020. Mesenchymal stem cell senescence and rejuvenation: current status and challenges. *Front. Cell Dev. Biol.* V. 8. P. 364. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00364>

Decellularized Extracellular Matrix Retards Premature Senescence of Human Endometrial Mesenchymal Stromal Cells

E. B. Burova^{a,*}, I. E. Perevoznikov^a, and R. E. Ushakov^a

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

**e-mail: lenbur87@mail.ru*

The extracellular matrix (ECM), the main component of the extracellular space, mediates signaling between cells and controls the key cell functions—proliferation, differentiation, and migration. The relevance of studying ECM is due to a wide range of its biological properties that can be applied in regenerative medicine and bioengineering. Cell-derived decellularized ECM (dECM) is used to study ECM as a regulator of the cell functional activity, as well as to mimic their tissue-specific microenvironment. Here, we hypothesized that dECM deposited by Wharton's jelly-derived MSCs modulates the senescence phenotype of endometrial MSCs (eMSCs) acquired in response to oxidative stress. This aspect of ECM functioning in the context of eMSCs has so far remained unexplored. A comparative study of prolonged H₂O₂-induced senescence of eMSCs exposed to both dECM and cultured plastic showed that dECM may effectively downregulate the main senescence markers. Our findings suggest that ECM is able to partially reverse (retard) the eMSCs premature senescence.

Keywords: extracellular matrix, decellularization, human endometrial mesenchymal stromal cells, senescence phenotype, oxidative stress, premature senescence

УДК 611.892

БЕЛОК ЩЕЛЕВЫХ КОНТАКТОВ КОННЕКСИН-43 В ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ГАНГЛИЯ КРЫСЫ

© 2023 г. Е. А. Колос¹, *, Д. Э. Коржевский¹

¹Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, 197376 Россия

*E-mail: koloselena1984@yandex.ru

Поступила в редакцию 19.06.2023 г.

После доработки 28.07.2023 г.

Принята к публикации 31.07.2023 г.

Цель настоящего исследования состояла в изучении динамики распределения и локализации белка щелевых контактов коннексина-43 (Cx43) в клетках ганглия заднего корешка спинного мозга (dorsal root ganglion, DRG) крысы на разных этапах постнатального онтогенеза для оценки морфологических признаков возрастных изменений межклеточных взаимодействий. Работа выполнена на крысах Вистар в возрасте 4 и 18 мес с помощью иммуногистохимических методов. Глиальные клетки выявляли с применением антител к глутаминсинтетазе, макрофаги – с применением маркера Iba-1. Установлено, что коннексин-43-содержащие структуры идентифицируются преимущественно в сателлитных глиальных клетках молодых и стареющих животных. Чувствительные нейроны, а также макрофаги DRG крыс исследованных возрастных групп коннексин-43 не содержат. При анализе возрастных изменений межклеточных контактов в DRG крыс было установлено, что зоны, обогащенные коннексином-43, соответствующие бляшкам (plaques) белковых каналов, обеспечивающие метаболическое взаимодействие сателлитных клеток в ганглиях задних корешков спинного мозга, с возрастом становятся более многочисленными. Данный факт может свидетельствовать об активации взаимодействия между глиальными клетками в чувствительных узлах крыс при старении.

Ключевые слова: старение, ганглий заднего корешка спинного мозга, иммуногистохимия, белок Iba-1, коннексин-43, щелевые каналы, межклеточные взаимодействия

DOI: 10.31857/S0041377123060056, **EDN:** QPQWCJ

Сложные взаимодействия между нейронами и глиоцитами нервной системы, включающие множество механизмов прямой и обратной связи, обеспечивают слаженное функционирование нейронных цепей, а также обуславливают проявления соответствующей реакции на патологическое воздействие (Kettenmann et al., 1996; Meyer, Kaspar, 2017; Adamczyk, 2023). В последнее десятилетие наблюдается рост числа научных работ, посвященных исследованию межглиальных и нейрон-глиальных взаимодействий, в которых рассматривается как влияние глиоцитов непосредственно на нейроны, так и их опосредованное влияние на нервные клетки путем изменения коммуникаций между глиальными клетками (Almad et al., 2016; Kim et al., 2020; Miyazaki, Asanuma, 2020).

Клеточные коммуникации в норме и при патологии обеспечивают различные типы контактов, в том числе щелевые. Щелевые контакты образованы коннексиновыми белками, объединенными в парные гексамерные комплексы (коннексоны). Непарные

коннексоны образуют открытые гемиканалы с особыми коммуникативными функциями. Одним из наиболее распространенных белков щелевых контактов в ЦНС является коннексин-43 (Jacobas et al., 2003; Chew et al., 2010; Basu, Das Sarma, 2018). Обширные исследования коннексин-43-содержащих щелевых контактов в центральной нервной системе (ЦНС) в норме и при повреждении проводились различными исследовательскими группами в течение нескольких последних десятилетий. Показано, что к увеличению экспрессии коннексина-43 в глиоцитах приводит ишемия ЦНС, травма спинного и головного мозга, вирусные инфекции (Fukuda, 2007; Chew et al., 2010; Orellana et al., 2012, 2016; Brocardo et al., 2019). На моделях различных нейродегенеративных заболеваний установлено, что экспрессия коннексина-43 возрастает в различных областях головного мозга лабораторных животных при развитии нейродегенеративных процессов (Huang et al., 2021). Большое внимание исследователи уделяют изучению нейропротекторной или нейротоксической роли таких изменений в системе щелевых контактов глиальных клеток (Fukuda, 2007; Chew et al., 2010; Orellana et al., 2012, 2016; Brocardo et al., 2019).

Принятые сокращения: ПНС – периферическая нервная система; Cx43 – коннексин-43; DRG – ганглий заднего корешка спинного мозга (dorsal root ganglion).

При этом сведения о роли белков семейства коннексинов во взаимодействии глиоцитов и нейронов периферической нервной системы (ПНС) немногочисленны и оставляют много вопросов. В частности не ясно, присутствуют ли коннексин-43-опосредованные коммуникации между нейронами и глиоцитами ганглия заднего корешка спинного мозга (DRG) и изменяются ли они при патологических нарушениях в ПНС. Вопрос возрастных количественных изменений коннексин-43-содержащих щелевых каналов в DRG также остается открытым. Вовлеченность щелевых контактов и полуканалов в межглиальные и нейрон-глиальные взаимодействия, а также изменения свойств таких межклеточных контактов в онтогенезе требует дополнительных исследований. Несмотря на большой интерес исследователей к проблемам старения нервной системы, в публикациях мало внимания уделяется изменениям межклеточных коммуникаций в ПНС в возрастном аспекте. В литературе представлено мало информации о возрастных изменениях глиальных щелевых контактов периферической нервной системы (Huang et al., 2006; Martinelli et al., 2004, 2005, 2006; Procacci et al., 2008). Основная масса исследований, касающихся реорганизации щелевых контактов в ПНС была выполнена с применением методов, не позволяющих четко визуализировать распределение структурных белков каналов в клетках (Huang et al., 2006; Martinelli et al., 2004, 2005, 2006; Hanani et al., 2023). Особенности возрастных межклеточных взаимодействий в DRG изучали главным образом с применением электронной микроскопии (Huang et al., 2006; Martinelli et al., 2004, 2005), а также путем внутриклеточного введения специфических флуоресцентных красителей (Huang et al., 2006; Hanani et al., 2023). Результаты таких исследований показывают, что количество щелевых контактов между глиоцитами при старении возрастает, но тип образующих их коннексинов остается неизменным. Лишь в единичных исследованиях с применением иммуногистохимических маркеров проводится оценка распределения коннексинов в ганглии заднего корешка спинного мозга (dorsal root ganglion, DRG) на разных сроках постнатального развития мышей (Procacci et al., 2008).

Цель настоящего исследования состояла в оценке динамики распределения и локализации белка щелевых контактов коннексина-43 (Cx43) в клетках ганглия заднего корешка спинного мозга крысы на разных этапах постнатального онтогенеза.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Работа выполнена на самцах крыс Вистар в возрасте 4 мес ($n = 6$) и 18 мес ($n = 6$). Все манипуляции с животными были выполнены в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» и с соблюдением Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в

иных научных целях (1986 г.). Исследование было одобрено этическим комитетом ФГБНУ «ИЭМ» (протокол № 4/22 от 29.09.2022).

У молодых и стареющих животных выделяли ганглии заднего корешка спинного мозга на уровне $S_{III}-S_V$ сегментов. В качестве фиксатора использовали раствор цинк-этанол-формальдегида, разработанный в Отделе общей и частной морфологии ФГБНУ «ИЭМ» Д.Э. Коржевским для проведения иммуногистохимических реакций на парафиновых срезах (Korzhevskii et al., 2014, 2015; Grigorev, Korzhevskii, 2018), обезжизняли в спиртах, заливали в парафин и изготавливали серийные срезы толщиной 5 мкм и 3 мкм. Полученные срезы обезпарафинивали и регидратировали, производили тепловое демаскирование антигена в течение 25 мин (99.5°C) в предварительно разогретом до 60°C 10%-ном водном растворе тиосульфата натрия. Для блокировки сайтов неспецифического связывания на срезы наносили блокировочный раствор Protein block (Spring Bioscience, США). Иммуногистохимическую реакцию на белок коннексин-43 (Cx43) проводили с использованием мышинных моноклональных антител (sc-271837, клон F-7, разведение 1 : 600, Santa Cruze Biotechnology, США). Время инкубации для первичных антител составило 24 ч при температуре 27°C. Кроме того, с целью установления типа клеток, синтезирующих белок щелевых контактов в ганглиях заднего корешка спинного мозга, на последовательных срезах толщиной 3 мкм проводили иммуногистохимическую реакцию на Cx43 и фермент глутаминсинтетазу – маркер глиальных клеток, позволяющий идентифицировать сателлитные глиальные клетки чувствительного ганглия (Hanani, Spray, 2012; Kolos, Korzhevskii, 2018). Для этого применяли антитела к коннексину-43 и моноклональные мышинные антитела к глутаминсинтетазе в разведении 1 : 800 (MAB302, клон GS-6, Chemicon, США). В качестве вторичных реагентов был использован набор UltraVision Quanto Detection System HRP (TL-060-QH; Thermo Fisher Scientific, США), обладающий специфичностью к мышинным и к кроличьим первичным антителам. Для предотвращения перекрестного связывания вторичных реагентов с собственными иммуноглобулинами крысы, к раствору вторичных антител добавляли нормальную крысиную сыворотку. Так как в областях глиальной оболочки нейронов кроме сателлитных глиальных клеток могут присутствовать также макрофаги, для их идентификации на последовательных срезах толщиной 3 мкм были проведены иммуногистохимические реакции на коннексин-43 и кальций-связывающий белок Iba-1, являющийся микроглиально-макрофагальным маркером (Ohsawa et al., 2000; Pierezan et al., 2014). Для идентификации макрофагов применяли поликлональные козы антитела (ab5076, разведение 1 : 1000, AbCam, Великобритания). В качестве вторичных антител применяли антитела из набора VECTASTAIN® Universal Quick kit (PK-8800; Vector Labora-

tories Inc, США) с добавлением нормальной мышечной сыворотки (Dako, Дания).

Во всех протоколах иммуногистохимических реакций для визуализации продукта реакции применяли хромоген 3',3'-диаминобензидин из набора DAB+ (Dako, Дания). После проведения реакции часть срезов подкрашивали квасцовым гематоксилином Караччи (Биовитрум, Россия) и 0.1%-ным водным раствором толуидинового синего по Нисслю (Sigma, США). В настоящем исследовании нейрональные элементы идентифицировали по морфологическим критериям после окраски толуидиновым синим или гематоксилином. Совместную локализацию исследуемых белков в пределах клетки определяли на последовательных срезах толщиной 3 мкм, позволяющих проследить топографию клеток в DRG.

Все полученные препараты анализировали с использованием светового микроскопа Leica DM750 (Германия), микрофотографии получали с применением камеры ICC50 (Leica, Германия) и программного обеспечения LAS EZ (Leica, Германия). Оценку возрастных морфологических и количественных изменений популяции сателлитных глиальных клеток проводили на препаратах, окрашенных с помощью антител к глутаминсинтетазе и гематоксилином. Для оценки возрастных изменений сателлитных глиальных клеток при старении производили фотосъемку исследуемых областей, расположенных близко друг к другу, но без перекрытия. Анализ изображений проводили с применением программы ImageJ (NIH, США). Проводили подсчет числа сателлитных клеток в глиальной оболочке каждого исследуемого чувствительного нейрона, учитывая сателлитные глиальные клетки, ядра которых располагаются в плоскости среза. Фрагменты цитоплазмы, не содержащие ядро в плоскости среза, при количественной оценке не учитывали.

С целью выявления изменений межклеточных взаимодействий, ассоциированных с возрастом, подсчитывали число Sx43-иммунопозитивных точек в пределах сателлитной оболочки каждого нейрона. Для анализа использовали срезы без дополнительного окрашивания гематоксилином, так как в этом случае Sx43-иммунопозитивные структуры выглядят более контрастными и четче визуализируются.

Количественный анализ проводили на изображениях, полученных при увеличении объектива 100×. Подсчет проводили для 100 чувствительных нейронов каждого животного. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0.05$. Данные гистограмм приведены в форме среднего значения \pm стандартное отклонение.

Специфичность иммуногистохимической реакции на коннексин-43, глутаминсинтетазу и белок Iba-1 оценивали при постановке отрицательного и положительного контролей. Для положительного контроля использовали архивные срезы спинного мозга взрослых крыс, фиксированные и обработанные та-

ким же образом, как и исследуемые чувствительные ганглии. При постановке отрицательного контроля исключали инкубацию с первичными антителами. На срезы ганглия заднего корешка спинного мозга крыс наносили разбавитель для антител (S0809; Dako, Дания).

При постановке отрицательного контроля для иммуногистохимического выявления коннексина-43, глутаминсинтетазы и белка Iba-1 на срезах ганглиев задних корешков спинного мозга молодых и стареющих животных зон иммунореактивности не обнаружено.

При проведении положительного иммуногистохимического контроля для коннексина-43 на срезах спинного мозга в сером веществе идентифицируется интенсивное точечное окрашивание нейропиля, обусловленное экспрессией белка астроглией. В области пограничной глиальной мембраны, образованной ножками астроцитов, также присутствует точечное окрашивание. Кроме того, интенсивное окрашивание присутствует в клетках оболочек спинного мозга, а также точечные иммунопозитивные структуры присутствуют в эпендимных клетках. При постановке положительного иммуногистохимического контроля для глутаминсинтетазы отмечено присутствие фермента в отростчатых клетках серого вещества спинного мозга, имеющих морфологические признаки астроцитов, а также в мелких округлых клетках — олигодендроцитах спинного мозга. Присутствие белка Iba-1 в спинном мозге крыс при постановке положительного контроля отмечено в клетках с округлыми или веретеновидным телом и длинными тонкими ветвящимися отростками — микроглиоцитах спинного мозга. Таким образом, результаты положительного иммуногистохимического контроля для всех маркеров свидетельствуют в пользу высокой специфичности использованных протоколов окрашивания.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ганглиях задних корешков спинного мозга нервные и глиальные клетки располагаются особым образом. Клеточные тела первичных сенсорных нейронов локализируются по периферии органа, их отростки располагаются преимущественно в центральной части узла. Окрашивание гистологических срезов ганглия гематоксилином или толуидиновым синим по Нисслю позволяет легко идентифицировать нейроны и сателлитную глию. Нейроны чувствительного ганглия идентифицируются как округлые или овальные клетки с крупным светлым ядром и темным компактным ядрышком. Цитоплазма таких клеток содержит интенсивно окрашенные гранулы хроматофильной субстанции (вещество Ниссля). Тело каждого нейрона окружено тонкой оболочкой, образованной уплощенными глиальными клетками с темными мелкими ядрами эллиптической формы — сателлитными глиальными клетками (рис. 1а). Таким образом, в чувствительных ганглиях глиальные

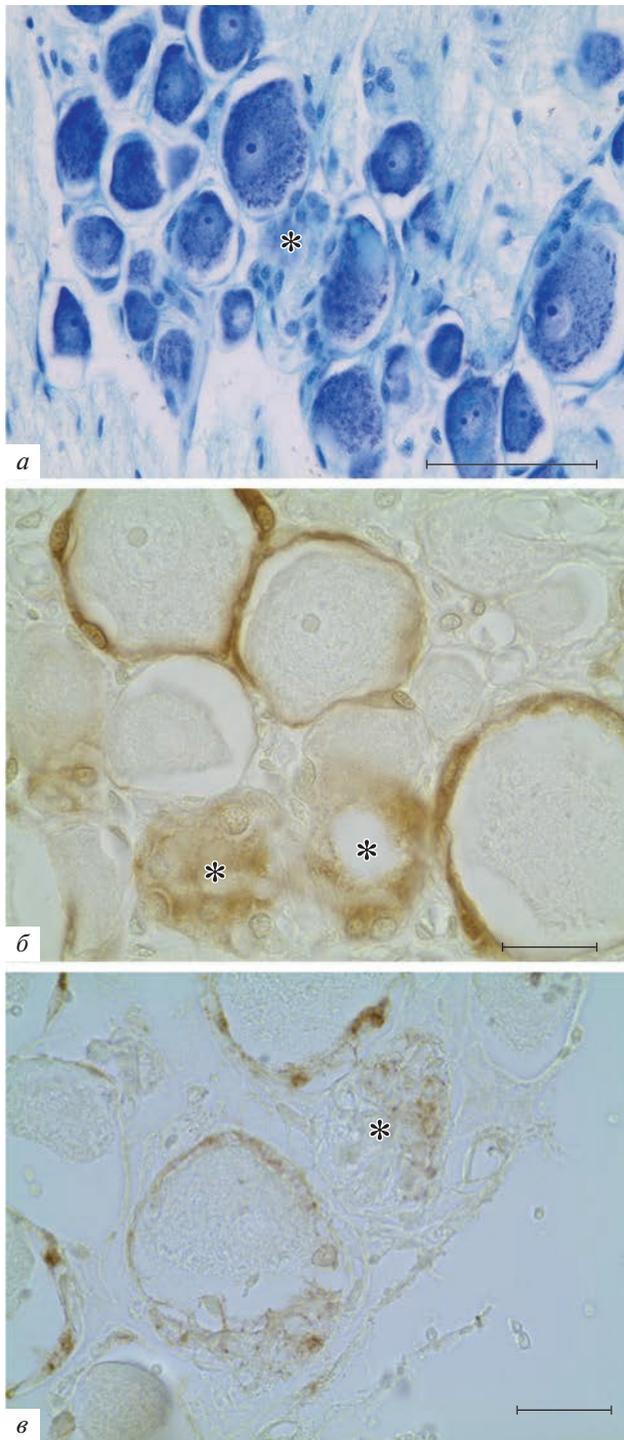


Рис. 1. Клетки ганглии заднего корешка спинного мозга крыс в возрасте 4 мес. *а* – Окраска толуидиновым синим по Нисслю, *б* – иммуногистохимическая реакция на глутаминсинтетазу, *в* – иммуногистохимическая реакция на коннексин-43. Звездочки – узелки Нажотта. Масштабные отрезки: *а* – 50 мкм, *б*, *в* – 20 мкм.

При исследовании межклеточных контактов в ганглии молодых животных коннексин-43-иммунопозитивные структуры были выявлены вокруг тел как мелких, так и крупных сенсорных нейронов. Для установления локализации зон иммунореактивности была проведена подкраска срезов гематоксилином, а также на последовательных срезах толщиной 3 мкм была проведена иммуногистохимическая реакция на Сх43 и фермент глутаминсинтетазу, являющийся маркером сателлитной глии. При выявлении Сх43 в сателлитных глиальных клетках идентифицируется диффузное окрашивание цитоплазмы низкой интенсивности, преимущественно в околоядерной зоне, а также интенсивно окрашенные мелкие точки, локализованные на поверхности глиоцитов в области их контактов друг с другом. Данные точки представляют собой бляшки (plaques) белковых каналов (коннексонов) (рис. 2*а*). Диффузное иммуномечение цитоплазмы, вероятно, связано с диффузным цитоплазматическим распределением коннексина-43 в клетках, обусловленным активным транспортом Сх43-содержащих везикул к формирующимся бляшкам щелевых контактов с участием микротрубочек. Однако данное предположение требует дополнительных исследований. Большое количество иммунопозитивных точек и диффузное окрашивание цитоплазмы присутствует в структурах, образованных компактно сгруппированными глутаминсинтетаза-иммунопозитивными мелкими клетками с округлыми ядрами (рис. 1*б*, *в*). Такие структуры представляют собой скопления сателлитных глиальных клеток, называемые “остаточными узелками” или узелками Нажотта (Nageotte nodules) (рис. 1*а*, *б*, *в*). Установлено, что основное количество коннексин-43-иммунопозитивных структур обнаруживается в пределах глиальной оболочки чувствительных нейронов, образованной глутаминсинтетаза-содержащими клетками. В ходе исследования не было обнаружено окрашивания и иммунопозитивных точечных структур в области тел ганглии заднего корешка спинного мозга молодых крыс.

В DRG стареющих животных идентифицируется большое количество Сх43-иммунопозитивных точек в пределах глиальной оболочки каждого нейрона (рис. 2*б*). Также большое количество коннексин-позитивных точек идентифицируется в остаточных узелках Нажотта. При иммуногистохимическом выявлении коннексина-43 и глутаминсинтетазы на серийных последовательных срезах DRG стареющих животных установлено, что большинство Сх43-иммунореактивных точек локализовано в области глутаминсинтетаза-положительных сателлитных клеток (рис. 3*а*, *б*). Также как у молодых животных, при старении не было обнаружено коннексин-43-иммунопозитивных точечных структур в области тел нейронов.

Стоит отметить, что в ходе исследования DRG молодых и стареющих животных в области глиальной оболочки отдельных чувствительных нейронов были обнаружены глутаминсинтетаза-иммунопози-

клетки легко отличимы от тел нервных клеток по их форме, положению и морфологическим характеристикам ядра.

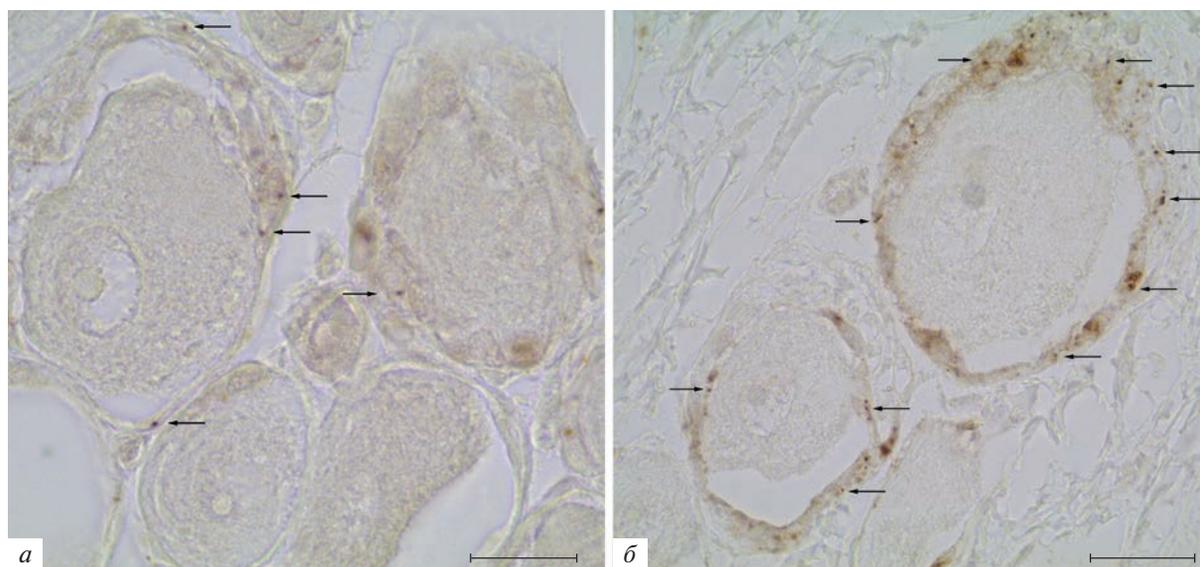


Рис. 2. Коннексин-43 в сателлитных глиальных клетках спинномозгового ганглия молодых (4 мес, *а*) и стареющих (18 мес, *б*) крыс. Стрелки – коннексин-43-иммунопозитивные точки в сателлитных глиальных клетках. Иммуногистохимическая реакция на коннексин-43. Масштабный отрезок – 20 мкм.

тивные клетки, не проявляющие иммунореактивность при реакции на коннексин-43. Такие клетки располагаются во внешних слоях многослойной глиальной оболочки нейронов в области расположения отростков нейронов (рис. 3*в, г*).

В результате количественной оценки среднего числа сателлитных глиальных клеток, образующих оболочку одного нейрона было установлено, что данный показатель значимо не отличается в исследованных возрастных группах и составляет для крыс в возрасте 4 и 18 мес 3.31 ± 0.34 и 3.35 ± 0.13 соответственно ($p > 0.05$). При этом среднее число Сх-43-иммунопозитивных точек в глиальных оболочках стареющих животных в два раза превышает аналогичный показатель у молодых крыс ($p < 0.05$) (рис. 4).

При проведении реакции на белок Iba-1 в DRG крыс двух исследованных возрастных групп были выявлены иммунопозитивные клетки неправильной амeboидной формы. У молодых животных такие клетки располагаются преимущественно в соединительной ткани между глиальными оболочками соседних нейронов. Отмечено, что у стареющих животных нередко Iba-1-иммунопозитивные клетки проникают между сателлитными глиальными клетками, а их толстые отростки достигают поверхности чувствительного нейрона (рис. 5). При анализе распределения Сх43 и белка Iba-1 на последовательных серийных срезах толщиной 3 мкм DRG животных обеих возрастных групп не было обнаружено зон совместной локализации исследуемых маркеров в одной клетке, что свидетельствует об отсутствии коннексин-43-содержащих контактов между макрофагами и глиальными клетками DRG.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время убедительно показано, что в передаче сигналов в центральной нервной системе принимают участие не только нейроны, но и глиальные клетки, включая астроциты, олигодендроциты и микроглию, которые оказывают влияние на синаптическую активность нервных клеток (Tsuda et al., 2005; Ji et al., 2006; Kettenmann et al., 2011). Структурной особенностью чувствительных узлов периферической нервной системы является отсутствие синаптических контактов между сенсорными нейронами в пределах ганглия (Pannese, 1981). Напротив, тело каждого сенсорного нейрона изолировано слоем сателлитных глиальных клеток и заключено в оболочку из соединительной ткани, образуя структурную единицу ганглия заднего корешка спинного мозга. Такое структурированное расположение нейрональных и глиальных элементов DRG указывает на то, что их взаимодействие является ключевым фактором, регулирующим нейронную активность. Одним из способов коммуникации сателлитных глиальных клеток друг с другом являются щелевые контакты. Показано, что щелевые каналы и гемиканалы, образованные белком коннексином-43, и паннексоны, расположенные в сателлитных глиальных клетках, играют важную роль в паракринной коммуникации между глиальными клетками и сенсорными нейронами (Procacci et al., 2008; Huang et al., 2010; Retamal et al., 2017; Hanani, Spray, 2020; Xing et al., 2023). Таким образом, межглиальные и нейрон-глиальные взаимодействия имеют основополагающее значение для нормального функционирования периферической нервной системы. Однако точные механизмы такой связи до сих пор неясны. С применением электронной микроскопии было показано, что в интактном

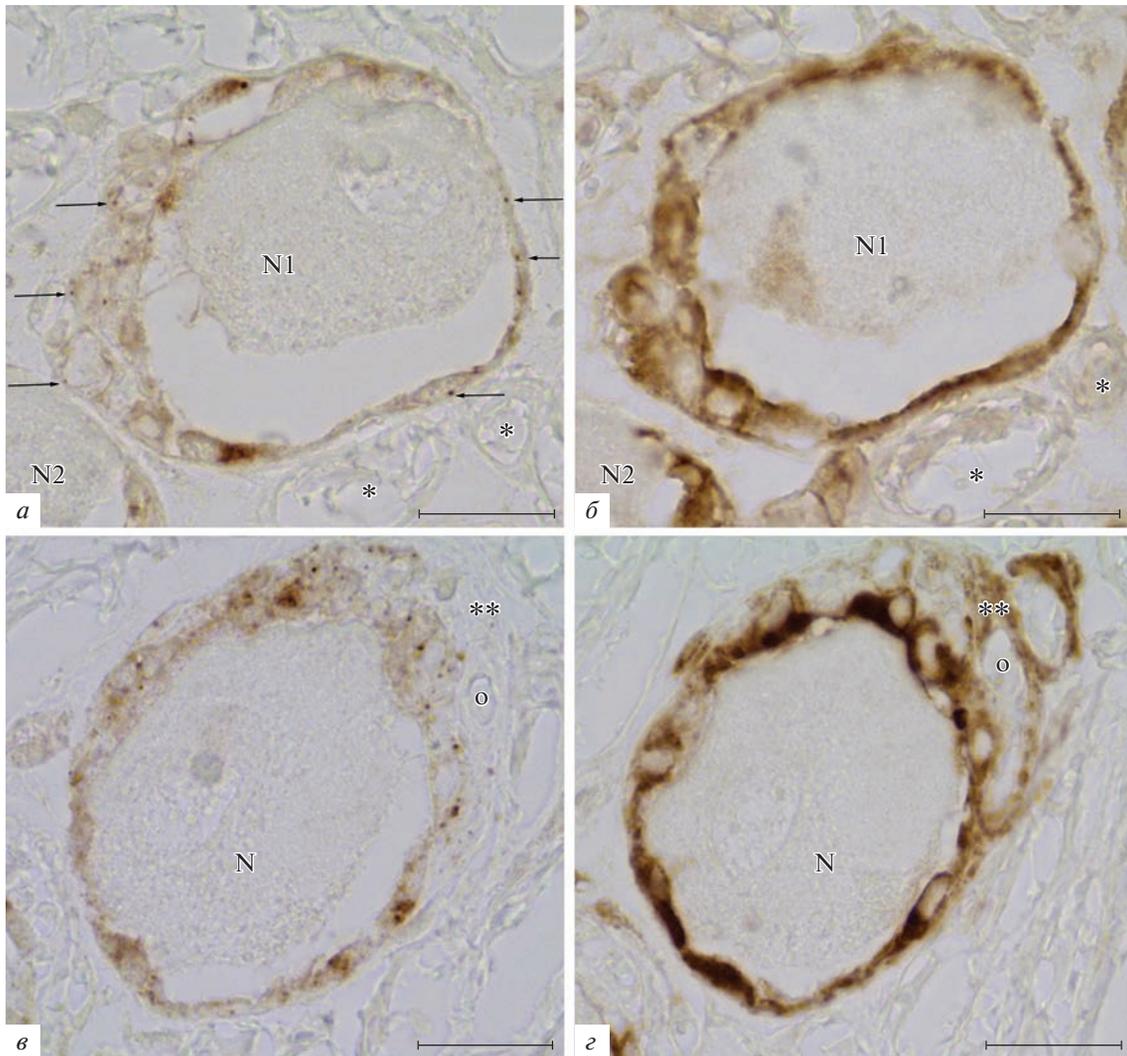


Рис. 3. Совместная иммуногистохимическая локализация коннексина-43 (*а, в*) и глутаминсинтазы (*б, г*) в глиальной оболочке чувствительного нейрона крысы в возрасте 18 мес на последовательных срезах. * – топографические маркеры, указывающие на кровеносные капилляры на рис. *а* и *б*. O – топографические маркеры, указывающие на отросток чувствительного нейрона на рис. *в* и *г*. ** – область локализации спутниковых глиальных клеток, не экспрессирующих коннексин-43. N, N1 и N2 – чувствительные нейроны. Стрелки – коннексин-43-иммунопозитивные точки в спутниковых глиальных клетках. Иммуногистохимическая реакция на коннексин-43 (*а, в*) и глутаминсинтазу (*б, г*). Масштабный отрезок – 20 мкм.

DRG щелевые контакты присутствуют лишь между соседними спутниковыми глиальными клетками в оболочке, окружающей один нейрон. Щелевые контакты между соседними глиальными оболочками отсутствуют (Huang et al., 2006; Pannese, 2010). Однако взаимодействия между соседними нейронами в пределах одного ганглия в определенных условиях все же существуют, вероятно, за счет формирования новых щелевых каналов между глиальными клетками соседних нейронов (Hanani et al., 2002; Pannese et al., 2003; Huang et al., 2010; Pannese, 2010), а также формирования гемиканалов на цитоплазматической мембране сенсорных нейронов (Retamal et al., 2017). В настоящем исследовании мы не обнаружили присутствия коннексина-43 и кластеров коннексин-43-

содержащих каналов на поверхности чувствительных нейронов ни у молодых, ни у стареющих животных.

При патологических процессах в ПНС изменяется степень межглиальной коммуникации в пределах спутниковой оболочки каждого нейрона, что было показано в исследованиях повреждения периферического нерва, системного и локального воспаления, хронической боли. Показано, что экспериментально индуцированные болевые состояния и перерезка нерва приводят к увеличению экспрессии Cx-43 в спутниковой глии, а ингибитор щелевых контактов вызывает обезболивание при различных моделях боли (Lin et al., 2002; Hanani et al., 2002; Pannese et al., 2003; Dublin, Hanani, 2007; Wu et al., 2012; Hanani, 2015; Schmitt et al., 2020). Характер изменений нейрон-глиальных и межглиальных взаимодействий в

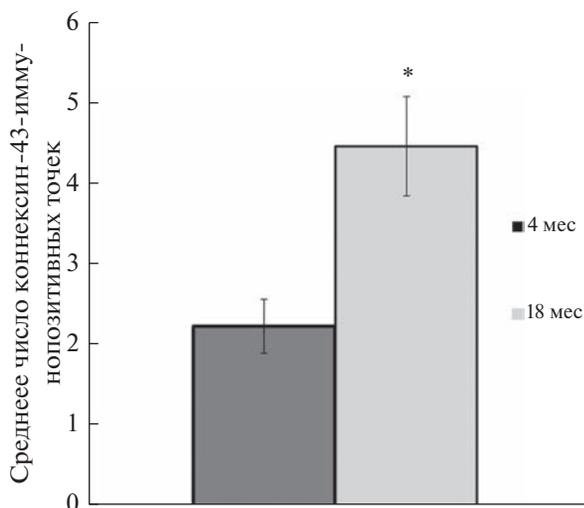


Рис. 4. Изменение среднего числа коннексин-43-иммунопозитивных точек в пределах глиальных оболочек чувствительных нейронов молодых (4 мес) и стареющих крыс (18 мес). * $p < 0.05$

DRG при старении изучен фрагментарно. Ряд исследований, выполненных на мышах, показывает, что при старении усиливается распространение флуоресцентного красителя между сателлитными глиальными клетками в пределах одной глиальной оболочки, кроме того, возрастает количество щелевых контактов между глиоцитами (Huang et al., 2006; Hanani et al., 2023). В исследованиях на кроликах установлена аналогичная закономерность (Martinelli et al., 2004, 2005). Однако, как отмечено ранее, методы исследования, использованные в данных работах, не позволяют определить структурные особенности вновь образованных при старении каналов и тип белков, участвующих в их формировании. При этом в литературе присутствуют данные количественной оценки реорганизации межклеточных взаимодействий при старении, согласно которым среднее количество Cx43-иммунопозитивных щелевых контактов в перинеуральных сателлитных клетках мышей значительно снижается при старении (Procacci et al., 2008).

В настоящем исследовании, проведенном на крысах, было показано, что среднее число бляшек (plaques) Cx43-содержащих каналов в пределах сателлитной оболочки чувствительного нейрона у стареющих животных в два раза превышает аналогичный показатель у молодых животных. Нами отмечено, что причиной таких количественных изменений не является возрастная глиоз в ганглии заднего корешка спинного мозга животных в возрасте 18 мес. При подсчете среднего количества клеток в глиальной оболочке каждого чувствительного нейрона нами не было отмечено значимого изменения количества сателлитных глиальных клеток при старении. Не выявлено также морфологических признаков апоптоза нейронов и нейродегенерации. Обнаружен-

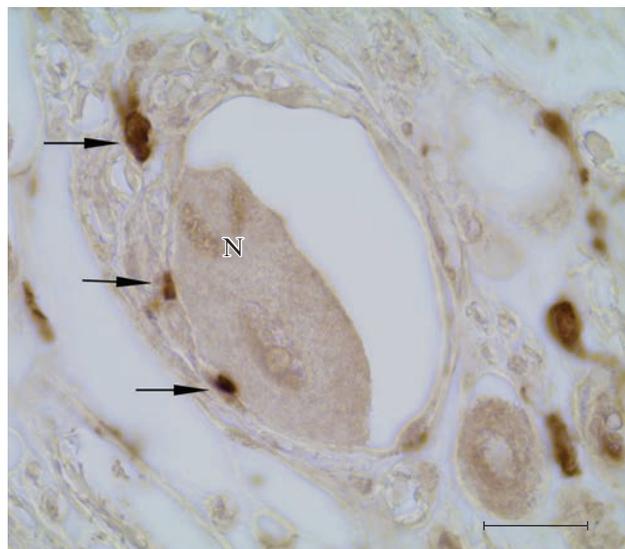


Рис. 5. Макрофаги в ганглии заднего корешка спинного мозга крысы в возрасте 18 мес. Иммуногистохимическая реакция на Iba-1. N — чувствительный нейрон. Стрелки — Iba-1-иммунопозитивные клетки, проникающие между сателлитными глиальными клетками. Масштабный отрезок — 20 мкм.

ные нами узелки Нажотта, представляющие собой области компактного расположения сателлитных глиальных клеток, занимающих область локализации дегенерировавших нейронов (Marshall, Duchon, 1975), присутствовали как у стареющих, так и у молодых животных. Бляшки (plaques) коннексин-43-содержащих каналов также присутствовали в “остаточных узелках” ганглиев задних корешков спинного мозга животных обеих возрастных групп. Однако в области многослойной глиальной оболочки чувствительных нейронов при старении отмечено значительное увеличение количества коннексин-позитивных точек, что свидетельствует о возрастной реструктуризации межклеточных контактов в пределах субъединиц DRG, вероятно, ведущей к активации связей между глиальными клетками. В сенсорных ганглиях каждый нейрон окружен отдельной сателлитной оболочкой, граничащей с соединительной тканью, содержащей капилляры, а сателлитные глиальные клетки экспрессируют белки-транспортёры различных нейроактивных молекул (Hanani, 2005; Jasmin et al., 2010). Таким образом, глиальная оболочка нейрона выполняет функции избирательного барьера между fenestrated капиллярами ганглия и нейронами, регулирует транспорт веществ к нейронам и выполняет нейропротекторную функцию. Установленный в настоящем исследовании факт увеличения количества коннексин-43-содержащих структур между сателлитными глиальными клетками при старении может свидетельствовать об изменении функционирования барьера.

Известно, что кроме тела чувствительного нейрона сателлитные глиальные клетки также покрывают

начальную область нейрита каждой клетки. В настоящем исследовании в составе глиальных оболочек чувствительных нейронов животных двух возрастных групп были обнаружены глутаминсинтаза-иммунопозитивные клетки, не содержащие коннексин-43. Такие клетки локализируются в области расположения нейритов чувствительных клеток, в поверхностных слоях глиальной оболочки. Таким образом, в составе сателлитной глиальной оболочки нами обнаружены клетки, не проявляющие при старении изменений межклеточных коммуникаций, опосредованных белком коннексин-43. В настоящее время выдвинуто предположение, что в составе глиальной оболочки DRG присутствует особый тип клеток – глиоциты, экспрессирующие рецептор нейротрофина р75, локализующиеся вдоль аксо дендрита и окружающие как миелинизированные, так и немиелинизированные области отростка чувствительных нейронов (Koike et al., 2019). Вопрос принадлежности данного типа глиоцитов к сателлитам или новому типу периферической глии широко обсуждается (Obata et al., 2006; Li et al., 2009; Nadeau et al., 2014; Koike et al., 2019). Установленное нами различие глиоцитов, образующих оболочку чувствительных нейронов, по типу белка, обеспечивающего межклеточные коммуникации, может внести вклад в исследование данного вопроса. Однако данный факт требует дополнительного изучения.

Следует отметить, что в пределах глиальной оболочки каждого нейрона DRG кроме сателлитных глиальных клеток могут присутствовать также макрофаги, которые по данным многочисленных исследований способны экспрессировать коннексин-43 (Rodjakovic et al., 2021). Сх43 участвует в межклеточной коммуникации макрофагов не только в физиологических условиях, но и при патологии (Rodjakovic et al., 2021). Однако в ходе настоящего исследования мы не обнаружили коннексина-43 в цитоплазме макрофагов DRG двух исследованных возрастных групп животных, а также не обнаружили формирования кластеров Сх43-содержащих каналов макрофагами глиальной оболочки чувствительных нейронов при старении. Данный факт свидетельствует о том, что такие коннексин-43-содержащие каналы формируются лишь между глиальными клетками ганглия заднего корешка спинного мозга и возрастные изменения межклеточной коммуникации, опосредованной данным белком, затрагивают лишь глиоциты чувствительного ганглия. Межклеточные коммуникации в DRG, по-видимому, важны в патогенезе ряда патологических состояний: в поддержании хронической боли, гипералгезии и патологий, связанных с системным воспалением. В связи с этим, можно предположить, что Сх43-содержащие каналы, экспрессируемые сателлитными глиальными клетками, могут стать новой фармакологической мишенью для лечения хронической боли, нередко развивающейся в пожилом возрасте.

Таким образом, данные полученные в настоящем исследовании могут указывать на динамические из-

менения межклеточных взаимодействий в ганглии заднего корешка спинного мозга крысы при старении. Установлено, что щелевые контакты, сформированные белком коннексин-43, образуют преимущественно сателлитные глиальные клетки чувствительных ганглиев животных разных возрастных групп. Бляшки (plaques) коннексин-43-содержащих белковых каналов, обеспечивающих метаболическое взаимодействие сателлитных клеток в ганглиях задних корешков спинного мозга, с возрастом становятся более многочисленными. Эти данные могут свидетельствовать об активации функциональной связи между сателлитными глиальными клетками в чувствительных узлах крыс при старении. Увеличение количества щелевых контактов с возрастом предположительно приводит к реорганизации глиального барьера в ганглиях задних корешков спинного мозга.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-25-10003, <https://rscf.ru/project/23-25-10003/>) и Санкт-Петербургского научного фонда в соответствии с соглашением от 05.05.2023 г. № 23-25-10003.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры с животными проводили в соответствии с “Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных” и с соблюдением Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (1986 г.). Исследование было одобрено этическим комитетом ФГБНУ “ИЭМ” (протокол № 4/22 от 29.09.2022).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Е.А. Колос: разработка плана исследования, постановка иммуногистохимических реакций, проведение анализа материала, написание текста статьи; Д.Э. Коржевский: редактирование текста статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Adamczyk A.* 2023. Glial–neuronal interactions in neurological disorders: Molecular mechanisms and potential points for intervention. *Int. J. Mol. Sci.* V. 24. P. 6274. <https://doi.org/10.3390/ijms24076274>
- Almad A.A., Doreswamy A., Gross S.K., Richard J.P., Huo Y., Haughey N., Maragakis N.J.* 2016. Connexin 43 in astrocytes contributes to motor neuron toxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *Glia.* V. 64. P. 1154. <https://doi.org/10.1002/glia.22989>
- Basu R., Das Sarma J.* 2018. Connexin 43/47 channels are important for astrocyte/oligodendrocyte cross-talk in myelin-

- ation and demyelination. *J. Biosci.* V. 43. P. 1055.
<https://doi.org/10.1007/s12038-018-9811-0>
- Brocardo L., Acosta L.E., Piantanida A.P., Rela L.* 2019. Beneficial and detrimental remodeling of glial connexin and pannexin functions in rodent models of nervous system diseases. *Front. Cell Neurosci.* V. 13: 491.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00491>
- Chew S.S., Johnson C.S., Green C.R., Danesh-Meyer H.V.* 2010. Role of connexin 43 in central nervous system injury. *Exp. Neurol.* V. 225. P. 250.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2010.07.014>
- Dublin P., Hanani M.* 2007. Satellite glial cells in sensory ganglia: Their possible contribution to inflammatory pain. *Brain Behav. Immun.* V. 21. P. 592.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2006.11.011>
- Fukuda T.* 2007. Structural organization of the gap junction network in the cerebral cortex. *Neuroscientist.* V. 13. P. 199.
<https://doi.org/10.1177/1073858406296760>
- Grigorev I.P., Korzhhevskii D.E.* 2018. Current technologies for fixation of biological material for immunohistochemical analysis (review). *Modern Technologies in Medicine.* V. 10. № 2. P. 156.
<https://doi.org/10.17691/stm2018.10.2.19>
- Hanani M., Huang T.Y., Cherkas P.S., Ledda M., Pannese E.* 2002. Glial cell plasticity in sensory ganglia induced by nerve damage. *Neuroscience.* V. 114. P. 279.
[https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(02\)00279-8](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(02)00279-8)
- Hanani M.* 2005. Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function. *Brain Res. Brain Res. Rev.* V. 48. P. 457.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.09.001>
- Hanani M., Spray D.C.* 2012. Glial cells in autonomic and sensory ganglia. In: *Neuroglia.* New York, Oxford Academic, 3 edn, 122–134.
<https://doi.org/10.1093/med/9780199794591.003.0011>
- Hanani M.* 2015. Role of satellite glial cells in gastrointestinal pain. *Front. Cell Neurosci.* V. 9: 412.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00412>
- Hanani M., Spray D.C.* 2020. Emerging importance of satellite glia in nervous system function and dysfunction. *Nat. Rev. Neurosci.* V. 21. P. 485.
<https://doi.org/10.1038/s41583-020-0333-z>
- Hanani M., Spray D.C., Huang T.Y.* 2023. Age-related changes in neurons and satellite glial cells in mouse dorsal root ganglia. *Int. J. Mol. Sci.* V. 24: 2677.
<https://doi.org/10.3390/ijms24032677>
- Huang T.Y., Hanani M., Ledda M., De Palo S., Pannese E.* 2006. Aging is associated with an increase in dye coupling and in gap junction number in satellite glial cells of murine dorsal root ganglia. *Neuroscience.* V. 137. P. 1185.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.10.020>
- Huang T.Y., Belzer V., Hanani M.* 2010. Gap junctions in dorsal root ganglia: possible contribution to visceral pain. *Eur. J. Pain.* V. 14. P. 49.e1.
<https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2009.02.005>
- Huang X., Su Y., Wang N., Li H., Li Z., Yin G., Chen H., Niu J., Yi C.* 2021. Astroglial connexins in neurodegenerative diseases. *Front. Mol. Neurosci.* V. 14: 657514.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.657514>
- Iacobas D.A., Urban-Maldonado M., Iacobas S., Scemes E., Spray D.C.* 2003. Array analysis of gene expression in connexin-43 null astrocytes. *Physiol. Genomics.* V. 15. P. 177.
<https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00062.2003>
- Jasmin L., Vit J.P., Bhargava A., Ohara P.T.* 2010. Can satellite glial cells be therapeutic targets for pain control? *Neuron Glia Biol.* V. 6. P. 63.
<https://doi.org/10.1017/s1740925x10000098>
- Ji R.R., Kawasaki Y., Zhuang Z.Y., Wen Y.R., Decosterd I.* 2006. Possible role of spinal astrocytes in maintaining chronic pain sensitization: review of current evidence with focus on bFGF/JNK pathway. *Neuron Glia Biol.* V. 2. P. 259.
- Kettenmann H., Faissner A., Trotter J.* 1996. Neuron-glia interactions in homeostasis and degeneration. In: Greger, R., Windhorst, U. (eds) *Comprehensive Human Physiology.* Springer, Berlin, Heidelberg.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-60946-6_27
- Kettenmann H., Hanisch U.K., Noda M., Verkhratsky A.* 2011. Physiology of microglia. *Physiol. Rev.* V. 91. P. 461.
- Kim Y.S., Choi J., Yoon B.-E.* 2020. Neuron-glia interactions in neurodevelopmental disorders. *Cells.* V. 9: 2176.
<https://doi.org/10.3390/cells9102176>
- Koike T., Tanaka S., Hirahara Y., Oe S., Kurokawa K., Maeda M., Suga M., Kataoka Y., Yamada H.* 2019. Morphological characteristics of p75 neurotrophin receptor-positive cells define a new type of glial cell in the rat dorsal root ganglia. *J. Comp. Neurol.* V. 527. P. 2047.
<https://doi.org/10.1002/cne.24667>
- Kolos E.A., Korzhhevskii D.E.* 2018. Glutamine synthetase-containing cells of the dorsal root ganglion at different stages of rat ontogeny. *Russ. J. Dev. Biol.* V. 49. P. 179.
<https://doi.org/10.1134/S1062360418030049>
- Korzhhevskii D.E., Sukhorukova E.G., Gilerovich E.G., Petrova E.S., Kirik O.V., Grigorev I.P.* 2014. Advantages and disadvantages of zinc-ethanol-formaldehyde as a fixative for immunocytochemical studies and confocal laser microscopy. *Neurosci. Behav. Physiol.* V. 44. P. 542.
<https://doi.org/10.1007/s11055-014-9948-8>
- Korzhhevskii D.E., Sukhorukova E.G., Kirik O.V., Grigorev I.P.* 2015. Immunohistochemical demonstration of specific antigens in the human brain fixed in zinc-ethanol-formaldehyde. *Eur. J. Histochem.* V. 59. P. 233.
<https://doi.org/10.4081/ejh.2015.2530>
- Li F., Li L., Song X.Y., Zhong J.H., Luo X.G., Xian C.J., Zhou X.F.* 2009. Preconditioning selective ventral root injury promotes plasticity of ascending sensory neurons in the injured spinal cord of adult rats—possible roles of brain-derived neurotrophic factor, TrkB and p75 neurotrophin receptor. *Eur. J. Neurosci.* V. 30. P. 1280.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06920.x>
- Lin S.H., Lu C.Y., Muhammad R., Chou W.Y., Lin F.C., Wu P.C., Lin C.R., Yang L.C.* 2002. Induction of connexin 37 expression in a rat model of neuropathic pain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* V. 99. P. 134.
- Marshall A., Duchon L.W.* 1975. Sensory system involvement in infantile spinal muscular atrophy. *J. Neurol. Sci.* V. 26. P. 349.
[https://doi.org/10.1016/0022-510x\(75\)90207-5](https://doi.org/10.1016/0022-510x(75)90207-5)
- Martinelli C., Sartori P., Ledda M., Pannese E.* 2004. Gap junctions between perineuronal satellite cells increase in number with age in rabbit spinal ganglia. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* V. 36. P. 17.
- Martinelli C., Sartori P., De Palo S., Ledda M., Pannese E.* 2005. Increase in number of the gap junctions between satellite neuroglial cells during lifetime: an ultrastructural study in rabbit spinal ganglia from youth to extremely advanced age. *Brain Res. Bull.* V. 67. P. 19.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2005.05.021>
- Martinelli C., Sartori P., De Palo S., Ledda M., Pannese E.* 2006. The perineuronal glial tissue of spinal ganglia. Quantitative changes in the rabbit from youth to extremely advanced

- age. *Anat. Embryol. (Berl)*. V. 211. P. 455.
<https://doi.org/10.1007/s00429-006-0097-x>
- Miyazaki I., Asanuma M. 2020. Neuron-astrocyte interactions in Parkinson's disease. *Cells*. V. 9: 2623.
<https://doi.org/10.3390/cells9122623>
- Meyer K., Kaspar B.K. 2017. Glia-neuron interactions in neurological diseases: Testing non-cell autonomy in a dish. *Brain Res*. V. 1656. P. 27.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.12.051>
- Nadeau J.R., Wilson-Gerwing T.D., Verge V.M. 2014. Induction of a reactive state in perineuronal satellite glial cells akin to that produced by nerve injury is linked to the level of p75NTR expression in adult sensory neurons. *Glia*. V. 62. P. 763.
<https://doi.org/10.1002/glia.22640>
- Obata K., Katsura H., Sakurai J., Kobayashi K., Yamanaka H., Dai Y., Fukuoka T., Noguchi K. 2006. Suppression of the p75 neurotrophin receptor in uninjured sensory neurons reduces neuropathic pain after nerve injury. *J. Neurosci*. V. 26. P. 11974.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.3188-06.2006>
- Ohsawa K., Imai Y., Kanazawa H., Sasaki Y., Kohsaka S. 2000. Involvement of Iba1 in membrane ruffling and phagocytosis of macrophages/microglia. *J. Cell Sci*. V. 113. P. 3073.
<https://doi.org/10.1242/jcs.113.17.3073>
- Orellana J.A., von Bernhardi R., Giaume C., Sáez J.C. 2012. Glial hemichannels and their involvement in aging and neurodegenerative diseases. *Rev. Neurosci*. V. 23. P. 163.
<https://doi.org/10.1515/revneuro-2011-0065>
- Orellana J.A., Retamal M.A., Moraga-Amaro R., Stehberg J. 2016. Role of astroglial hemichannels and pannexons in memory and neurodegenerative diseases. *Front. Integr. Neurosci*. V. 10: 26.
<https://doi.org/10.3389/fnint.2016.00026>
- Pannese E. 1981. The satellite cells of the sensory ganglia. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol*. V. 65. P. 1.
- Pannese E., Ledda M., Cherkas P.S., Huang T.Y., Hanani M. 2003. Satellite cell reactions to axon injury of sensory ganglion neurons: increase in number of gap junctions and formation of bridges connecting previously separate perineuronal sheaths. *Anat. Embryol. (Berl)*. V. 206. P. 337.
<https://doi.org/10.1007/s00429-002-0301-6>
- Pannese E. 2010. The structure of the perineuronal sheath of satellite glial cells (SGCs) in sensory ganglia. *Neuron Glia Biol*. V. 6. P. 3.
<https://doi.org/10.1017/S1740925X10000037>
- Pierezan F., Mansell J., Ambrus A., Hoffmann R.A. 2014. Immunohistochemical expression of ionized calcium binding adapter molecule 1 in cutaneous histiocytic proliferative, neoplastic and inflammatory disorders of dogs and cats. *J. Comp. Pathol*. V. 151. P. 347.
<https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2014.07.003>
- Procacci P., Magnaghi V., Pannese E. 2008. Perineuronal satellite cells in mouse spinal ganglia express the gap junction protein connexin43 throughout life with decline in old age. *Brain Res. Bull*. V. 75. P. 562.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2007.09.007>
- Retamal M.A., Riquelme M.A., Stehberg J., Alcayaga J. 2017. Connexin43 hemichannels in satellite glial cells, can they influence sensory neuron activity? *Front. Mol. Neurosci*. V. 10: 374.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00374>
- Rodjakovic D., Salm L., Beldi G. 2021. Function of connexin-43 in macrophages. *Int. J. Mol. Sci*. V. 22: 1412.
<https://doi.org/10.3390/ijms2203141>
- Schmitt L.-I., Leo M., Kutritz A., Kleinschnitz C., Hagenacker T. 2020. Activation and functional modulation of satellite glial cells by oxaliplatin lead to hyperexcitability of sensory neurons *in vitro*. *Mol. Cell. Neurosci*. V. 105: 103499.
<https://doi.org/10.1016/j.mcn.2020.103499>
- Tsuda M., Inoue K., Salter M.W. 2005. Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in "small" glia. *Trends Neurosci*. V. 28. P. 101.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.12.002>
- Wu A., Green C.R., Rupenthal I.D., Moalem-Taylor G. 2012. Role of gap junctions in chronic pain. *J. Neurosci. Res*. V. 90. P. 337.
<https://doi.org/10.1002/jnr.22764>
- Xing J., Wang H., Chen L., Wang H., Huang H., Huang J., Xu C. 2023. Blocking Cx43 alleviates neuropathic pain in rats with chronic constriction injury via the P2X4 and P38/ERK-P65 pathways. *Int. Immunopharmacol*. V. 114: 109506.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.109506>

Gap Junction Protein Connexin-43 in Glial Cells of Rat Dorsal Root Ganglion

E. A. Kolos^a, * and D. E. Korzhevskii^a

^a*Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia*

**e-mail: koloselena1984@yandex.ru*

The aim of this study was to assess the dynamics of distribution and localization of the gap junction protein connexin-43 (Cx43) in rat dorsal root ganglion (DRG) cells at different stages of postnatal ontogenesis to assess the morphological signs of age-related changes in intercellular interactions. The work was performed on Wistar rats at the age of 4 months and 18 months using immunohistochemical methods. Glial cells were detected using antibodies to glutamine synthetase, macrophages – using the antibodies to calcium-binding protein Iba-1. The paper describes the features of connexin-43 distribution in the spinal ganglion of young and old rats. It has been established that connexin-43-containing structures are identified mainly in satellite glial cells of young and aging animals. Sensitive neurons, as well as DRG macrophages of both groups of animals, do not show immunoreactivity. Analysis of age-related changes in intercellular contacts in rat DRG showed that plaques of connexin-43-containing protein channels that provide metabolic interaction of satellite cells in the spinal ganglia become more numerous with age. This fact may indicate the activation of the interaction between glial cells in the DRG of rats during aging.

Keywords: aging, dorsal root ganglion, immunohistochemistry, Iba-1, connexin-43, gap junction, cell–cell communication

УДК 611.132.1:618.39-092.9:599.323.4

ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ СТЕНКИ ВОСХОДЯЩЕЙ ЧАСТИ АОРТЫ ПРЕЖДЕВРЕМЕННО РОЖДЕННЫХ КРЫС

© 2023 г. О. Н. Серебрякова¹, *, В. В. Иванова¹, И. В. Мильто^{1, 2}

¹Кафедра морфологии и общей патологии Сибирского государственного медицинского университета Минздрава России, Томск, 634050 Россия

²Отдел молекулярной и клеточной радиобиологии ФГБУН “Северский биофизический научный центр” ФМБА России, Северск, 636013 Россия

*E-mail: oserebryakovan@gmail.com

Поступила в редакцию 23.05.2023 г.

После доработки 29.06.2023 г.

Принята к публикации 11.07.2023 г.

Преждевременное рождение оказывает выраженное влияние на все системы организма, в том числе на сердечно-сосудистую систему, которая претерпевает существенные адаптивные изменения в раннем постнатальном периоде онтогенеза. Всестороннее понимание последствий преждевременного рождения необходимо для обеспечения ранней профилактики, выявления и лечения отдаленных неблагоприятных последствий этого эффекта для здоровья. Целью данного исследования была оценка влияния преждевременного рождения на строение стенки восходящей части аорты крыс. В работе представлены результаты гистологического и морфометрического анализа стенки восходящей части аорты крыс Вистар, рожденных на 21 и 21.5 сут беременности (полный срок беременности составляет 22 сут). В стенке восходящей части аорты преждевременного рожденных крыс обнаруживаются признаки эластолиза и нарушение параллельного расположения эластических окончательных мембран. Показано, что преждевременное рождение приводит к уменьшению удельного объема эластических волокон и увеличению коллагеновых волокон в средней оболочке стенки восходящей части аорты преждевременного рожденных крыс.

Ключевые слова: аорта, преждевременное рождение, эластин, коллаген, крысы

DOI: 10.31857/S0041377123060081, **EDN:** PODDDN

По данным Всемирной организации здравоохранения в 2020 г. недоношенными (т.е. на сроке менее 37 полных недель беременности) родились 13.4 млн детей, что составляет более одной десятой от числа всех детей, родившихся в мире за этот год (Lawn et al., 2023).

Одним из основных процессов во внутриутробной и неонатальной жизни, способствующих увеличению риска хронических заболеваний во взрослом возрасте, является нарушение процессов адаптации (Nyut et al., 2017). Адаптация к изменению условий существования затрагивает весь организм новорожденного и нацелена на повышение его шансов на выживание, но в связи с уменьшением продолжительности внутриутробного периода развития, ресурсов организма становится недостаточно. Преждевременный переход сердечно-сосудистой системы к функционированию в атмосферных условиях приводит к формированию морфологических особенностей сосудистой стенки вследствие незавершенности ее пренатального морфогенеза.

Гипертоническая болезнь является одной из самых часто встречаемых сердечно-сосудистых патологий в развитых странах. Одним из предикторов

развития гипертонической болезни является ремоделирование сосудистой стенки, вследствие увеличения ее жесткости. Уменьшение количества и деградация эластических волокон в стенке аорты, уменьшение отношения эластических волокон к коллагеновым в результате избыточного синтеза коллагена гладкими миоцитами сосудистой стенки может привести к морфологическим и функциональным нарушениям сердечно-сосудистой системы (Tsamis et al., 2013). Наблюдения показывают, что уменьшение времени внутриутробного развития, связанное с преждевременным рождением, сопровождается повышением артериального давления и увеличением жесткости артерий как в раннем, так и в позднем постнатальном периоде онтогенеза, но патогенез этих изменений не полностью известен (Bertagnolli et al., 2016).

Целью настоящего исследования была оценка влияния преждевременного рождения на строение стенки восходящей части аорты крыс. Модели на животных незаменимы для определения механизмов, ответственных за патогенетические процессы, связанные с преждевременным рождением, а также необходимы для нахождения потенциальных мишеней

ней для превентивного вмешательства. В связи высокой плодовитостью и сравнительно коротким пренатальным периодом онтогенеза крысы являются подходящим модельным животным для исследования недоношенности. У разных пород лабораторных крыс срок беременности варьирует от 21 до 23 сут (Picut et al., 2018). Продолжительность пренатального периода онтогенеза у крыс Вистар в норме составляет 22 сут, плодный период начинается с 18 сут и занимает 4 сут. В связи с коротким плодным этапом пренатального периода развития, преждевременное рождение на 12 и 24 ч раньше срока оказывает существенное влияние на постнатальное развитие организма крысы (Toyouno et al., 1999).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Дизайн исследования. Эксперимент проводили на 84 крысах-самцах Вистар, из которых формировали 3 группы: контрольная группа (доношенные животные, 22 сут беременности, $n = 30$), 1 группа (недоношенные на 12 ч крысы, 21.5 сут беременности, $n = 28$) и 2 группа (недоношенные на 24 ч крысы, 21 сут беременности, $n = 26$). Более выраженная степень недоношенности (более 1 сут) у крыс приводит к преждевременному рождению нежизнеспособного потомства. Для получения потомства, к самкам крыс (3-х месячные весом 180 ± 20 г), находившимся на стадии проэструса полового цикла, подсаживали на ночь самцов крыс Вистар (2-х месячные весом 180 ± 20 г). На следующие сутки, самкам с утра делали влажалошечные мазки и при обнаружении в мазке сперматозоидов начинали отсчет первых суток беременности.

Индукцию преждевременных родов осуществляли подкожным введением самкам крыс мифепристона (1 мл, 10 мг на 1 кг массы тела; Sigma-Aldrich, США) за 48 ч (группа 2, недоношенные на 24 ч) и 36 ч (группа 1, недоношенные на 12 ч) до предполагаемого срока родов. Выведение потомства из эксперимента осуществляли на 1, 2, 4, 8 и 24 нед. постнатального периода онтогенеза асфиксией CO_2 . В контрольной группе на каждом сроке выводили по 6 животных, в 1 группе по 6 животных на 1, 2, и 4 нед. эксперимента и по 5 животных на 8 и 24 нед. постнатального периода онтогенеза, во 2 группе на 1 нед. эксперимента было выведено 6 крыс, на остальные сроки — по 5.

Фрагменты восходящей части аорты крыс промывали физиологическим раствором и фиксировали в 10%-ном водном растворе нейтрального формалина (рН 7.4) (БиоВитрум, Россия) в течение 24 ч для последующего гистологического и морфометрического исследования.

Животных содержали в стандартных условиях вивария с 12-часовой продолжительностью светового дня и свободным доступом к пище и воде. Протокол исследования одобрен этическим коми-

тетом ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (№ 8473/1 от 30.11.2020 г.).

Гистологическое исследование. После фиксации в формалине фрагменты восходящей части аорты преждевременно рожденных крыс промывали в проточной воде, проводили через Isoprep (БиоВитрум, Россия) и заливали в парафиновую смесь HISTOMIX (БиоВитрум, Россия). Из парафиновых блоков на автоматическом ротационном микротоме HM 355S (Thermo Fisher Scientific, США) готовили гистологические срезы (толщина 4 мкм), которые депарафинизировали в ксилоле, доводили до дистиллированной воды и окрашивали водным раствором гематоксилина Джилла (БиоВитрум, Россия) и водным раствором эозина (БиоВитрум, Россия) по 3 мин, орсеином (ПанЭко, Россия) по методу Унны–Тенцера с дифференцировкой в 1%-ном солянокислом спирте, а также по методу Массона с использованием анилинового синего для верификации коллагеновых волокон (ЭргоПродакшн, Россия). С помощью светового микроскопа Axioscope 40 (Zeiss, Германия) оценивали строение стенки восходящей части аорты, фотосъемку проводили при помощи цифровой камеры CanonG5 (Canon, Китай).

Морфометрическая и статистическая обработка данных. На поперечно ориентированных срезах восходящей части аорты, окрашенных гематоксилином и эозином, в программе ImageJ измеряли толщину комплекса внутренней и средней оболочек (в мкм) не менее чем в 10 полях зрения для каждого животного.

На гистологических срезах восходящей части аорты, окрашенных орсеином, в программе ImageJ вычисляли удельный объем эластических волокон во внеклеточном матриксе средней оболочки не менее чем в 5 полях зрения для каждого животного.

На гистологических срезах восходящей части аорты, окрашенных по методу Массона, в программе ImageJ вычисляли удельный объем коллагеновых волокон во внеклеточном матриксе средней оболочки не менее чем в 5 полях зрения для каждого животного.

Статистическую обработку полученных данных производили с помощью статистического пакета GraphPad Prism 9.0. Данные представляли в виде медианы, а также первого и третьего квартилей — Me (Q_{25} ; Q_{75}). Проверку на нормальность распределения количественных данных осуществляли с помощью критерия Шапиро–Уилка, сравнение внутри групп для оценки динамики проводили с помощью критерия Манна–Уитни. Определение статистической значимости различий между тремя группами проводили с помощью дисперсионного анализа непараметрическим критерием Краскела–Уоллиса с последующим *post-hoc* тестом Бонферрони для уменьшения ошибки множественных сравнений. Различия считали статистически значимыми при уровне ошибки $p < 0.05$.

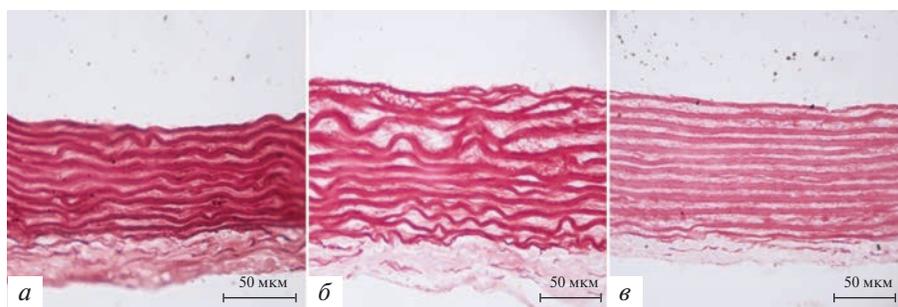


Рис. 1. Стенка восходящей части аорты крыс на 8 нед. постнатального периода онтогенеза. *a* – Контрольная группа (доношенные животные, рожденные на 22 сут беременности); *б* – 1 группа (недоношенные животные, рожденные на 21.5 сут беременности); *в* – 2 группа (недоношенные животные, рожденные на 21 сут беременности). Окраска орсеином по методу Унны–Тенцера.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристика средней оболочки стенки восходящей части аорты крыс. Средняя оболочка стенки аорты крыс состоит из интерстициальных клеток (гладких миоцитов и миофибробластов), коллагеновых и эластических волокон. Структурные компоненты средней оболочки равномерно концентрически ориентированы, образуя слои эластических окончатых мембран, которые формируют каркас средней оболочки и обеспечивают эластичность ее стенки при растяжении сосуда. На 1 нед. постнатального периода онтогенеза, средняя оболочка стенки восходящей части аорты крыс всех групп состоит из тонких извилистых эластических мембран, разделенных слоями гладких миоцитов с округлыми ядрами, также определяются митотически делящиеся клетки. На 2 нед. постнатального периода онтогенеза эластические мембраны средней оболочки стенки восходящей части аорты крыс всех групп утолщаются, в группе контрольных животных они также начинают выпрямляться и формировать эластические окончатые мембраны за счет ветвлений между соседними мембранами. К концу 4 нед. постнатального периода онтогенеза в средней оболочке стенки восходящей части аорты крыс контрольной группы определяются толстые и ровные эластические окончатые мембраны, разделенные одним слоем веретеновидных гладких миоцитов. В аналогичный срок в средней оболочке стенки восходящей части аорты крыс 1 и 2 групп визуально определяются более тонкие эластические окончатые мембраны. На 8 нед. постнатального периода онтогенеза в стенке восходящей части аорты преждевременно рожденных крыс 1 и 2 групп наблюдается выраженное снижение орсеинофилии эластических окончатых мембран. Эластические окончатые мембраны средней оболочки восходящей части аорты крыс 1 и 2 группы визуально тоньше, определяются локальные разрывы и разволокнения, в сравнении с контрольной группой в аналогичный срок (рис. 1).

Анализ толщины комплекса внутренней и средней оболочек стенки восходящей части аорты крыс. Дан-

ный морфометрический параметр является частым предиктором развития сердечно-сосудистых патологий во взрослом возрасте (Аверкин и др., 2020). Толщина комплекса внутренней и средней оболочек стенки восходящей части аорты крыс недоношенных на 12 ч (1 группа) меньше, чем у крыс контрольной группы с 1 по 4 нед. постнатального периода онтогенеза (табл. 1). На 1 нед. эксперимента аналогичный морфометрический показатель у недоношенных на 24 ч крыс в среднем больше, чем у контрольных животных и крыс 1 группы, что вероятно связано с повышенной извитостью эластических мембран и увеличенным расстоянием между ними. Со 2 по 4 нед. эксперимента толщина комплекса внутренней и средней оболочек стенки восходящей части аорты крыс, рожденных преждевременно на 24 ч, меньше по сравнению с контрольными животными в аналогичные сроки.

Анализ удельного объема эластических волокон в средней оболочке стенки восходящей части аорты. Окрашивание орсеином по методу Унны–Тенцера позволяет селективно выявить эластические волокна на гистологических срезах аорты. На 1 нед. эксперимента у недоношенных крыс 1 и 2 групп удельный объем эластических волокон в два раза меньше в сравнении с контрольными животными. У преждевременно рожденных крыс 1 и 2 групп на протяжении всего эксперимента удельный объем эластических волокон в средней оболочке стенки восходящей части аорты меньше по сравнению с контрольной группой (рис. 2). Удельный объем эластических волокон в средней оболочке стенки восходящей части аорты крыс во 2 группе меньше, чем в 1 группе со 2 по 24 нед. эксперимента.

Анализ удельного объема коллагеновых волокон в средней оболочке стенки восходящей части аорты. Окрашивание по методу Массона обеспечивает селективное выявление коллагеновых волокон анилиновым синим (рис. 3). На протяжении всего эксперимента у крыс всех групп наблюдается увеличение удельного объема коллагеновых волокон в средней оболочке стенки восходящей части аорты. У прежде-

Таблица 1. Динамика толщины комплекса внутренней и средней оболочек (в мкм) стенки восходящей части аорты доношенных (контрольная группа) и недоношенных животных, рожденных через 21.5 сут (12 ч недоношенности) и 21 сут (24 ч недоношенности)

Группа	Срок эксперимента, неделя				
	1	2	4	8	24
Контрольная группа	63.09 (60.77; 63.9)	105.76 (100.86; 108.41) ^a	118.08 (112.52; 121.31) ^a	108.78 (108.87; 109.49) ^a	122.41 (119.89; 123.99) ^a
1 группа (12 ч)	51.55 (43.78; 57.45) ^b	85.18 (80.45; 93.78) ^{a, b}	99.36 (92.79; 107.47) ^b	117.67 (107.15; 127.22)	116.66 (107.79; 117.96)
2 группа (24 ч)	65.41 (64.63; 65.51) ^c	84.65 (80.76; 86.92) ^{a, b}	89.93 (78.58; 89.65) ^b	105.69 (92.56; 109.96)	89.21 (71.93; 89.35)

Результаты представлены в виде медианы, в скобках указаны значения первого и третьего квартилей (Q1; Q3). ^a – отличие от показателя предыдущего срока этой же группы; ^b – отличие от соответствующего показателя крыс контрольной группы; ^c – отличие от соответствующего показателя крыс 1 группы. $p < 0.05$.

временно рожденных крыс 1 группы со 2 по 24 нед. эксперимента удельный объем коллагеновых волокон в средней оболочке стенки восходящей части аорты больше в сравнении с контрольной группой на аналогичных сроках (рис. 4). На протяжении всего эксперимента удельный объем коллагеновых волокон средней оболочки стенки восходящей части аорты преждевременно рожденных крыс 2 группы больше, чем у доношенных животных.

Анализ соотношения удельного объема эластических и коллагеновых волокон в средней оболочке стенки восходящей части аорты. Отношение удельного объема эластических волокон к коллагеновым в

средней оболочке стенки восходящей части аорты крыс всех групп на протяжении всего эксперимента снижается. У преждевременно рожденных крыс 1 и 2 групп на протяжении всего эксперимента отношение эластических волокон к коллагеновым в средней оболочке стенки восходящей части аорты меньше, чем у контрольных животных (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ

Количество и пространственная ориентация коллагеновых и эластических волокон в стенке аорты играет важную роль в поддержании ее структуры и

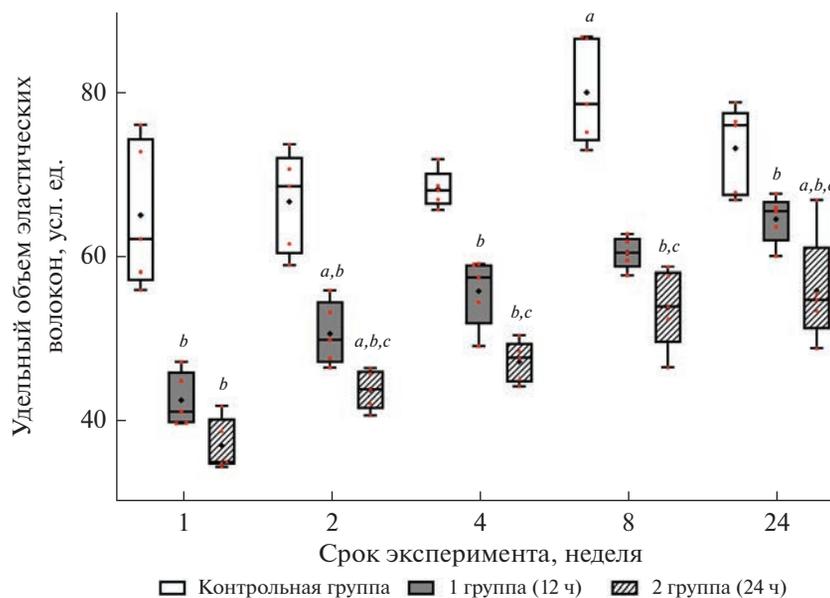


Рис. 2. Динамика удельного объема эластических волокон в средней оболочке стенки восходящей части аорты доношенных (контрольная группа) и недоношенных животных, рожденных через 21.5 сут (1 группа) и 21 сут (2 группа). Результаты представлены в виде медианы (Me), первого (Q1) и третьего (Q3) квартилей, плюсы показывают среднее значение показателя. ^a – Отличие от показателя предыдущего срока этой же группы; ^b – отличие от соответствующего показателя крыс контрольной группы; ^c – отличие от соответствующего показателя крыс 1 группы. $p < 0.05$.

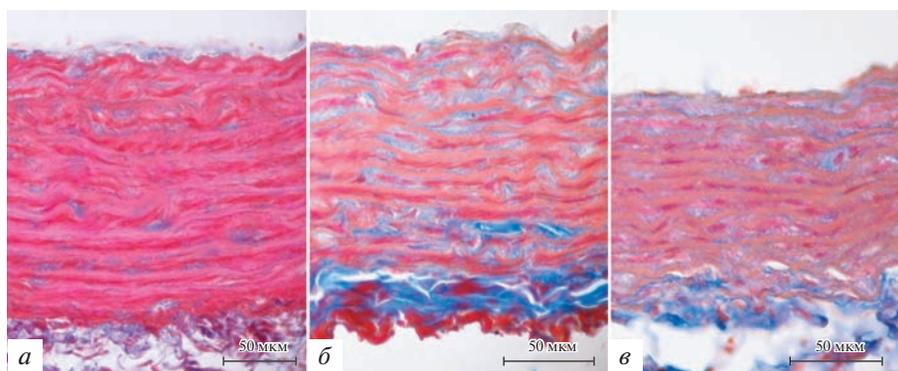


Рис. 3. Стенка восходящей части аорты крыс на 24 нед. постнатального периода онтогенеза. *a* – Контрольная группа (доношенные животные, рожденные на 22 сут беременности); *б* – 1 группа (животные, рожденные на 21.5 сут беременности); *в* – 2 группа (животные, рожденные на 21 сут беременности). Окраска по методу Массона. Коллагеновые волокна окрашены анилиновым синим. Визуально заметно преобладание коллагеновых волокон в средней оболочке стенки восходящей части аорты крыс 1 и 2 групп, по сравнению с контрольными животными.

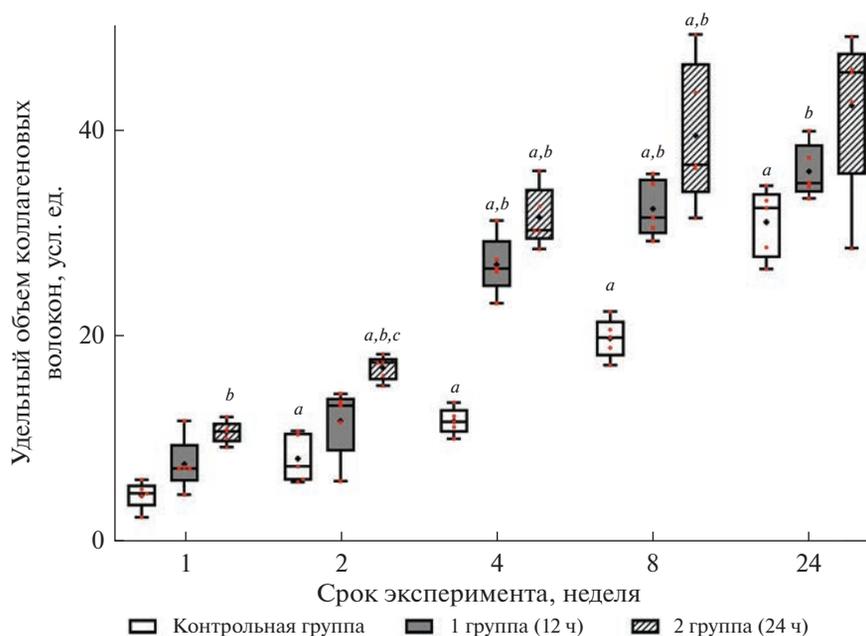


Рис. 4. Динамика удельного объема коллагеновых волокон в средней оболочке стенки восходящей части аорты доношенных (контрольная группа) и недоношенных животных, рожденных через 21.5 сут (1 группа) и 21 сут (2 группа). Результаты представлены в виде медианы (Me), первого (Q1) и третьего (Q3) квартилей, плюсы показывают среднее значение показателя. *a* – Отличие от показателя предыдущего срока этой же группы; *b* – отличие от соответствующего показателя крыс контрольной группы; *c* – отличие от соответствующего показателя крыс 1 группы, $p < 0.05$.

эластических свойств. Соотношение волокон внеклеточного матрикса средней оболочки в различных частях стенки аорты неодинаково (Coscannon et al., 2020). Наибольшее количество эластических волокон определяется в средней оболочке стенки восходящей части аорты и уменьшается по мере удаления от сердца, к брюшному отделу нисходящей части аорты, в стенке которой преобладают коллагеновые волокна (Sokolis et al., 2012; Liyanage et al., 2022). Доля эластических волокон по сравнению с коллагеновыми является основным фактором, определяющим

жесткость артерий, являющейся маркером риска развития сердечно-сосудистых заболеваний и артериальной гипертензии, в частности (O'Rourke et al., 2002; Chatmethakul et al., 2019). Экспериментальные исследования на животных подтверждают снижение отношения эластических волокон к коллагеновым при артериальной гипертензии (Arribas et al., 2006).

Синтез эластина интерстициальными клетками в стенке аорты начинается на раннем этапе плодного периода развития, но протекает наиболее интенсивно на 36–40 нед. беременности у человека и на 20–22 сут у

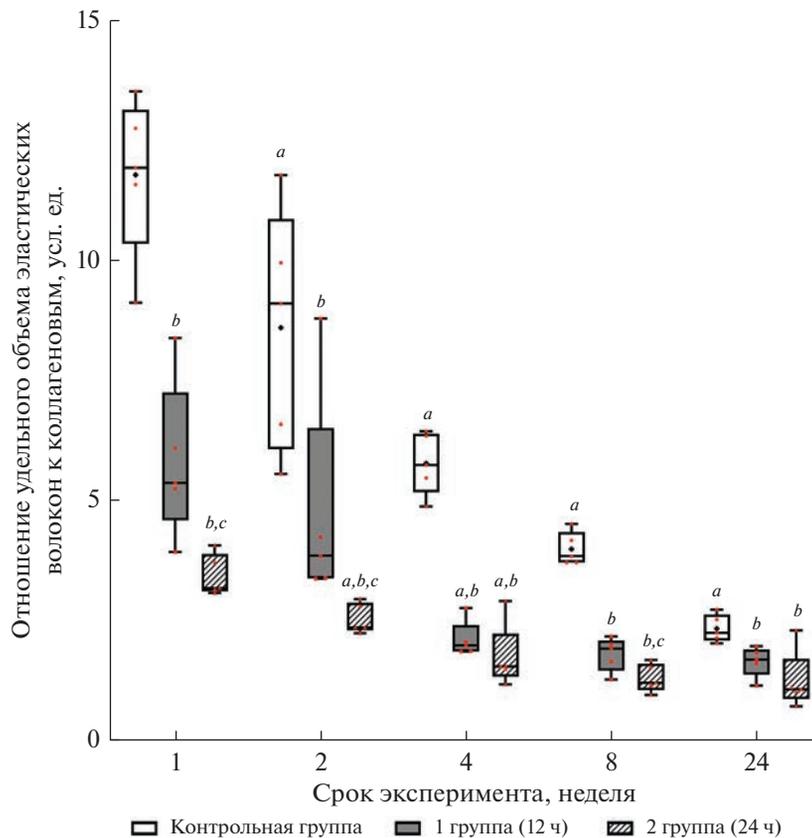


Рис. 5. Динамика отношения удельного объема эластических волокон к коллагеновым в средней оболочке стенки восходящей части аорты доношенных (контрольная группа) и недоношенных животных, рожденных через 21.5 сут (1 группа) и 21 сут (2 группа). Результаты представлены в виде медианы (Me), первого (Q1) и третьего (Q3) квантилей, плюсы показывают среднее значение показателя. *a* – Отличие от показателя предыдущего срока этой же группы; *b* – отличие от соответствующего показателя крыс контрольной группы; *c* – отличие от соответствующего показателя крыс 1 группы, $p < 0.05$.

крыс, после этого скорость его синтеза быстро снижается и становится чрезвычайно медленной, особенно в зрелом возрасте (Martyn et al., 1997). Преждевременное рождение нарушает сосудистый эластогенез в стенке артерий и постнатальные адаптивные механизмы не способны восстановить скорость и объем этого процесса. Таким образом, растяжимость артерий эластического типа уменьшается, что способствует развитию артериальной гипертензии в более позднем возрасте (Cho, 2022). Настоящее исследование подтверждает данные о том, что средняя оболочка стенки восходящей части аорты преждевременно рожденных крыс содержит меньшее количество эластических волокон, чем у доношенных особей. В позднем постнатальном периоде у преждевременно рожденных крыс в стенке восходящей части аорты обнаруживаются локальные разрывы и истончения эластических окончательных мембран, отсутствующие у доношенных животных того же возраста, что свидетельствует о нарушении формирования эластического каркаса средней оболочки стенки аорты в раннем постнатальном периоде онтогенеза. Обнаруженное уменьшение толщины внутренней и средней оболочек стенки восходящей части аорты недоно-

шенных животных на начальных неделях эксперимента, вероятно, связано с повышенной извитостью и нарушением параллельности эластических мембран, формирующихся в раннем постнатальном периоде онтогенеза.

Клинические исследования показывают, что изменения структуры стенки аорты человека начинают проявляться в популяции преждевременно рожденных людей, начиная с детского возраста, и усугубляются по мере взросления. Исследования популяции детей, рожденных недоношенными или с очень низкой массой тела при рождении, показали повышение у них артериального давления, что способствует увеличению риска развития артериальной гипертензии в более позднем возрасте (de Jong et al., 2012; Novi et al., 2016). Показано, что именно преждевременное рождение, а не низкая масса тела в результате задержки роста плода при рождении в срок, является причиной повышения артериального давления и жесткости артерий у преждевременно рожденных подростков (Rossi et al., 2011). Выяснено, что мужской пол и ограничение роста плода являются факторами, усугубляющими влияние преждевременных

родов на артериальное давление и жесткость аорты уже в подростковом возрасте (Liefke et al., 2023). В более позднем возрасте (≥ 60 лет) стенка аорты людей, страдающих гипертонической болезнью, имеет тенденцию как к повышенному содержанию коллагеновых волокон, так и к пониженному содержанию эластических волокон по сравнению с аортами людей того же возраста, не страдающих артериальной гипертензией (Tsamis et al., 2013). По результатам нашего исследования, представляется возможным сделать вывод о том, что степень увеличения содержания коллагена в средней оболочке стенки восходящей части аорты коррелирует со степенью недоношенности. Вероятно, усиленный синтез коллагенового компонента в средней оболочке стенки аорты недоношенных крыс является компенсаторным механизмом поддержания архитектуры внеклеточного матрикса в ответ на недостаточное количество эластического компонента.

Экспериментальные исследования показывают, что транзитное неонатальное воздействие высокого уровня кислорода, как модель преждевременного рождения, приводит к изменениям сосудистой стенки (снижению соотношения эластин/коллаген и сдвигу баланса в сторону повышенного отложения коллагена), которые связаны с повышенной ригидностью стенки сосуда в позднем постнатальном периоде онтогенеза (Huyard et al., 2014). Результаты настоящего исследования подтверждают, что преждевременное рождение способствует изменению отношения эластических волокон к коллагеновым в средней оболочке стенки восходящей части аорты в пользу последних.

Можно заключить, что преждевременное рождение способствует ремоделированию средней оболочки стенки восходящей части аорты вследствие увеличения коллагенового и уменьшения эластического компонента ее внеклеточного матрикса. Таким образом, одной из важнейших задач современной превентивной медицины становится нахождение вариантов профилактики риска развития сердечно-сосудистых заболеваний в когорте преждевременно рожденных людей.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Содержание, питание, уход и выведение животных из эксперимента осуществляли в соответствии с Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (приказ № 755 от 12.08.1987 г.) и Федерального Закона РФ “О защите животных от жестокого обращения” от 01.01.1997 г. Протокол исследования одобрен этическим комитетом ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (№ 8473/1 от 30.11.2020).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие конфликтов интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Аверкин Н.С., Федорова М.Г., Латынова И.В., Столяров А.П., Харитонов Е.А.* 2020. Взаимосвязь между отдельными морфометрическими параметрами артериальной стенки и их зависимость от возраста. Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. Т. 2. № 54. С. 99. (Averkin N.S., Fedorova M.G., Latorynova I.V., Stolyarov A.P., Kharitonov E.A. 2020. The interrelation between the individual morphometric parameters of the arterial wall and their dependence on age. University proceedings. Volga region. Medical sciences. V. 2. P. 99.)
- Arribas S.M., Hinek A., Gonzalez M.C.* 2006. Elastic fibers and vascular structure in hypertension. *Pharmacol. Ther.* V. 111. P. 771.
- Bertagnolli M., Luu T., Lewandowski A., Leeson P., Nuyt A.-M.* 2016. Preterm birth and hypertension: is there a link? *Curr. Hypertens. Rep.* V. 18: 28. <https://doi.org/10.1007/s11906-016-0637-6>
- Chatmethakul T., Roghair R.D.* 2019. Risk of hypertension following perinatal adversity: IUGR and prematurity. *J. Endocrinol.* V. 242. P. T21.
- Cho M.H.* 2022. Hypertension in adulthood is programmed during the perinatal period. *Clin. Exp. Pediatr.* V. 65. P. 494.
- Concannon J., Dockery P., Black A., Sultan S., Hynes N., McHugh P.E., Moerman K.M., McGarry J.P.* 2020. Quantification of the regional bioarchitecture in the human aorta. *J. Anat.* V. 236. P. 142.
- de Jong F., Monuteaux M.C., van Elburg R.M., Gillman M.W., Belfort M.B.* 2012. Systematic review and meta-analysis of preterm birth and later systolic blood pressure. *Hypertension.* V. 59. P. 226.
- Hovi P., Vohr B., Ment L.R.* 2016. Blood pressure in young adults born at very low birth weight: adults born preterm international collaboration. *Hypertension.* V. 68. P. 880.
- Huyard F., Zydorczyk C., Castro M.M., Cloutier A., Bertagnolli M., Sartelet H., Germain N., Comte B., Schulz R., DeBlois D., Nuyt A.M.* 2014. Remodeling of aorta extracellular matrix as a result of transient high oxygen exposure in newborn rats: implication for arterial rigidity and hypertension risk. *PLoS One.* V. 9. e92287.
- Lawn J., Ohuma E., Bradley E.* 2023. Small babies, big risks: global estimates of prevalence and mortality for vulnerable newborns to accelerate change and improve counting. *Lancet.* V. 401. P. 1707.
- Liefke J., Steding-Ehrenborg K., Sjöberg P., Ryd D., Morsing E., Arheden H., Ley D., Hedström E.* 2023. Higher blood pressure in adolescent boys after very preterm birth and fetal growth restriction. *Pediatr. Res.* V. 93. P. 2019.
- Liyanaige L., Musto L., Budgeon C., Ruttly G., Biggs M., Saratzis A., Vorp D.A., Vavourakis V., Bown M., Tsamis A.* 2022. Multimodal structural analysis of the human aorta: from valve to bifurcation. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* V. 63. P. 721.
- Martyn C.N., Greenwald S.E.* 1997. Impaired synthesis of elastin in walls of aorta and large conduit arteries during early development as an initiating event in pathogenesis of systemic hypertension. *Lancet.* V. 350. P. 953.

- Nuyt A.M., Lavoie J., Mohamed I., Paquette K., Luu T.M.* 2017. Adult consequences of extremely preterm birth: cardiovascular and metabolic diseases risk factors, mechanisms, and prevention avenues. *Clin. Perinatol.* V. 44. P. 315.
- O'Rourke M.F., Staessen J.A., Vlachopoulos C., Duprez D., Plante G.E.* 2002. Clinical applications of arterial stiffness; definitions and reference values. *Am. J. Hypertens.* V. 15. P. 426.
- Picut C.A., Ziejewski M.K., Stanislaus D.* 2018. Comparative aspects of pre- and postnatal development of the male reproductive system. *Birth Defects Res.* V. 110. P. 190.
- Rossi P., Tauzin L., Marchand E., Boussuges A., Gaudart J., Frances Y.* 2011. Respective roles of preterm birth and fetal growth restriction in blood pressure and arterial stiffness in adolescence. *J. Adolesc. Health.* V. 48. P. 520.
- Sokolis D.P., Krithais E.P., Giagini A.T., Lampropoulos K.M., Papadodima S.A., Iliopoulos D.C.* 2012. Biomechanical response of ascending aortic aneurysms: association with structural remodeling. *Comput. Methods Biomech. Biomed. Engin.* V. 15. P. 231.
- Toyono M., Ito T., Harada K., Tamura M., Takada G.* 1999. Morphological adaptation of the cardiovascular system in fetal rats during late gestation. *Tohoku J. Exp. Med.* V. 188. P. 299.
- Tsamis A., Krawiec J.T., Vorp D.A.* 2013. Elastin and collagen fibre microstructure of the human aorta in ageing and disease: a review. *J. R. Soc. Interface.* V. 10. e20121004.

Structural Features of Ascending Aorta Wall in Premature Born Rats

O. N. Serebryakova^{a, *}, V. V. Ivanova^a, and I. V. Milto^{a, b}

^a*Department of Morphology and General Pathology, Siberian State Medical University, Tomsk, 634050 Russia*

^b*Department of Molecular and Cellular Radiobiology, Seversk Biophysical Research Center, Federal Medical and Biological Agency of Russia, Seversk, 636013 Russia*

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

Preterm birth has a pronounced effect on all body systems, including the cardiovascular system, which undergoes significant adaptive changes in the early postnatal period of ontogenesis. A comprehensive understanding of the consequences of preterm birth is essential to ensure early prevention, detection and treatment of long-term adverse health effects. The aim of our study was to evaluate the effect of preterm birth on the structure of the wall of the ascending aorta in preterm rats. The paper presents the results of histological and morphometric analysis of ascending aorta wall in Wistar rats born on the 21st and 21.5 days of pregnancy (the total gestation period is 22 days). In ascending aorta wall of preterm born rats, signs of elastolysis and a violation of the parallelism of the elastic fenestrated membranes are found. It has been shown that preterm birth leads to a decrease in the specific volume of elastic fibers and an increase in collagen fibers in the middle shell of ascending aorta wall in prematurely born rats.

Keywords: aorta, preterm birth, elastin, collagen, rats