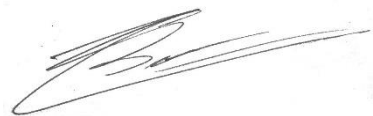


*На правах рукописи*



БИЛЯЛОВ АЙРАТ ИЛЬДАРОВИЧ

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ  
РЕГЕНЕРАЦИИ ЭЛАСТИЧЕСКОГО ХРЯЩА  
МЫШЕЙ РОДА *ACOMYS***

1.5.22. Клеточная биология

1.5.7 Генетика

Автореферат диссертации  
на соискание учёной степени  
кандидата медицинских наук

Казань – 2024

Работа выполнена на кафедре морфологии и общей патологии института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

**Научные руководители:** **Андрей Павлович Киясов**, доктор медицинских наук, профессор, академик АН РТ, директор института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»  
**Олег Александрович Гусев**, PhD (биологические науки), ведущий научный сотрудник научного центра «Регуляторная геномика» ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

**Официальные оппоненты:** **Андрей Германович Гунин**, доктор медицинских наук, профессор, исполняющий обязанности заведующего кафедры акушерства и гинекологии имени Г.М. Воронцовой ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова» (г. Чебоксары)  
**Марат Садекович Сабилов**, кандидат биологических наук, руководитель лаборатории, научный сотрудник лаборатории биоинформатики и молекулярной генетики ФГБУН "Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН" (г. Москва)

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Самара)

**Защита диссертации состоится** «22» мая 2024 г. в 15:00 часов на заседании диссертационного совета КФУ.015.1 при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420015, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Карла Маркса, д. 76, в зале заседания ученого совета (ауд. 208).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского при Казанском (Приволжском) федеральном университете по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 35.

Сведения о защите, автореферат и диссертация размещены на официальных сайтах ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (<https://vak.minobrnauki.gov.ru>) и ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» (<http://kpfu.ru>).

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 г.

Учёный секретарь  
диссертационного совета, д.б.н., профессор



Т.А. Аникина

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность

Регенерация – это основа жизни и существования всех живых организмов. Тысячи клеток нашего тела отмирают, и на смену им за счет физиологической регенерации появляются новые клетки. Выделяют физиологическую и репаративную регенерацию, первая характеризуется постоянным восстановлением тканей, клеток и внутриклеточных структур в процессе нормальной жизнедеятельности организма, вторая в результате патологических изменений [Das, 2020]. Следует признать, что многие процессы восстановления клеток и тканей млекопитающих являются ограниченными и неполноценными, в отличие от других классов, например, представителей класса земноводных (саламандры), способных полностью восстанавливать утерянные конечности [Joven, 2019; Arenas Gómez, 2021].

В случае, когда репаративная регенерация у млекопитающих заканчивается формированием части идентичной погибшей ткани, говорят о полной регенерации или реституции. В другом – возникает неполная регенерация (субституция) [Саркисов, 1999]. В зоне повреждения образуется неспецифическая для данного органа ткань, которая в дальнейшем подвергается рубцеванию. При этом оставшиеся структуры компенсаторно увеличиваются в своей массе, т.е. гипертрофируются [Непомнящих, 1998]. Возникает регенерационная гипертрофия, которая и является выражением сущности неполной регенерации с потерей биологических функций данного участка [Marongiu, 2017].

Наибольшим потенциалом к регенерации обладает эпителиальная ткань, далее мышечная, причем скелетные мышцы восстанавливаются лучше, чем гладкие, а сердечная имеет ограниченный потенциал к регенерации [Исламов, 1994; Киясов, 2022]. Способности восстановления нервной ткани активно изучается [Gerber, 2018; Huang, 2023; Mahdian, 2023]. Среди разновидностей соединительных тканей наблюдаются отличия в способностях регенерации, так костная ткань и кровь способны к самообновлению и восстановлению своих структур, а хрящевая ткань обладает низким потенциалом к регенерации [Саркисов, 1999; Пресняков, 2021].

Хрящ лишен обширной сосудистой сети и состоит из уникального типа клеток, называемых хондроцитами, которые проявляют ограниченные способности к пролиферации и миграции [Shiromoto, 2022]. Отсутствие адекватного кровоснабжения ограничивает доставку питательных веществ, факторов роста, кислорода и клеток к поврежденному участку, препятствуя

началу процесса восстановления. В результате хондроциты сталкиваются с микросредой, характеризующейся отсутствием факторов, необходимых для клеточной пролиферации и восстановления объема и структуры ткани [Newton, 2010; Слесаренко, 2012; Зар, 2019; Liu, 2021]. К тому же хондроциты имеют ограниченную способностью к пролиферации и миграции. Эти покоящиеся клетки находятся в лакунах хряща и обладают низким митотическим потенциалом, что приводит к замедлению скорости их обновления и снижению способности восстанавливать поврежденные участки [Космачева, 2008; Akkiraju, 2015]. Более того, присущая зрелым хондроцитам фенотипическая стабильность препятствует их способности трансформироваться в репаративные клетки-предшественники, которые могли бы участвовать в процессах репаративного хондрогенеза [Liu, 2021].

По этой причине гистотипическое восстановление целостности суставного хряща, хряща перегородки носа, трахеи, а также эластической хрящевой ткани ушной раковины в большинстве случаев не происходит: дефекты этих структур заполняются плотной волокнистой соединительной тканью, которая не обладает необходимыми биомеханическими свойствами [Mobasher, 2009; Nims, 2016; Пресняков, 2022].

Патологией суставного хряща в современном мире страдают миллионы людей, особенно в странах с высокой продолжительностью жизни. Риск возникновения повреждения хряща увеличивается при малоподвижном образе жизни и травмах, а также у пожилых людей. Развивающееся при этом воспаление проявляется болью; нарушается нормальное функционирование хрящевой ткани, а высвобождение интерлейкина-1 $\beta$  и фактора некроза опухоли еще больше ускоряет данный процесс, приводит к апоптозу хондроцитов. В течение многих десятилетий прошлого века велись разработки основополагающих аспектов влияния на регенерацию хрящевой и костной тканей с целью максимально полного восстановления их структуры и функции. Однако до сих пор эта проблема не нашла окончательного решения. Многочисленные публикации порой носят противоречивый характер. В настоящее время не существует эффективных фармакологических средств, способствующих заживлению дефектов хряща.

Изучение механизмов репаративной регенерации у животных (млекопитающих), обладающих способностями к восстановлению тканей без развития рубца, поможет раскрыть закономерности репаративного гистогенеза, что может подтолкнуть к улучшению уже имеющихся или созданию новых генно-клеточных препаратов и лекарственных изделий, направленных на

индукцию хондрогенеза в поврежденных тканях [Grol, 2018; Wasylczko, 2020; Пресняков, 2021]. Одним из таких животных является мышь рода *Acomys*. Это представитель класса млекопитающих, который обладает повышенной способностью к регенерации и восстановлению функциональности тканей без развития фиброза [Nguyen, 2023]. В частности, в случае полнослойного удаления кожного лоскута, этапы свертывания крови и образования струпа (корочка, покрывающая поверхность раны) проходят быстрее в сравнении с обычными лабораторными мышами, и более 50% площади раны может быть закрыто струпом в течение 24 часов после нанесения травмы [Gaire, 2021]. Клетки эпидермиса активно пролиферируют сразу после повреждения, эпидермальные слои утолщаются в краях дефекта, при этом скорость миграции клеток заметно выше, чем в коже мышей линии Balb/c и крыс линии Wistar [Yoon, 2020; Gaire, 2021].

Одной из моделей повреждения тканей для комплексной оценки регенеративных способностей является травматизация ушной раковины [Rai, 2014; Hassan, 2022]. В этой модели, помимо восстановления кожного лоскута, окружающего раковину, оценивается и восстановление целостности эластической хрящевой ткани [Oh, 2018; Li, 2019].

### **Цель работы**

На модели повреждения ушной раковины охарактеризовать этапы репаративного хондрогенеза у мышей *Acomys cahirinus* и выявить молекулярно-генетические маркеры, характерные для данного процесса.

### **Задачи исследования**

1. Провести сравнительный морфологический анализ репаративного хондрогенеза эластического хряща у мышей *Acomys cahirinus* и мышей линии Balb/c после повреждения ушной раковины.
2. С помощью иммуногистохимического анализа охарактеризовать особенности репаративного хондрогенеза эластического хряща мышей рода *Acomys cahirinus*.
3. С помощью транскриптомного анализа выявить молекулярно-генетические маркеры хрящевой ткани у мышей *Acomys cahirinus* в ходе репаративного хондрогенеза.
4. Выявить особенности и отличия иммунного ответа на повреждение ушной раковины у мышей *Acomys cahirinus* и мышей линии Balb/c.

### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Эластический хрящ мышей *Acomys cahirinus* способен к полной регенерации, как после частичной травматизации, так и после полной

ампутации ушной раковины, путем накопления и пролиферации мелких упорядоченных хондроцитов с проксимального конца дефекта, с активной экспрессией белка SOX10, который является маркером клеток нейроэктодермального происхождения.

2. В клетках хрящевой ткани в группе *Acomys cahirinus* наблюдается многократное повышение уровней экспрессии уникальных маркеров (*Mmp3*, *Mmp10*, *Mt1* и *Mt2*), участвующих в репаративном хондрогенезе.

3. Воспалительный ответ на повреждение у мышей *Acomys cahirinus* характеризуется дифференциальной экспрессией 5 генов (*Mt2*, *Rpl28*, *Rps23*, *Rabep1*, *Slc9a9*) и отсутствием активации провоспалительных метаболических путей в иммунном кластере на 6 час, повышением количества иммунных клеток на 2 сутки и разрешением процесса на 5 сутки после травматизации ушной раковины.

### **Научная новизна исследования**

В работе впервые продемонстрированы возможности восстановления части ушной раковины мышей *Acomys cahirinus* после ее полной ампутации.

Впервые был проведен транскриптомный анализ на уровне единичных клеток ушной раковины мышей рода *Acomys cahirinus* и мышей линии Balb/c.

Принципиально новыми данными являются демонстрация экспрессии клетками хрящевой ткани уникальных маркеров и белков: Sox10 (SRY-related HMG-box) – маркер нейроэктодермальных клеток; Mmp3 (matrix metalloproteinase-3) и Mmp10 (matrix metalloproteinase-10) – белки семейства матриксных металлопротеиназ, которые участвуют в ремоделирование межклеточного матрикса в ходе репаративного хондрогенеза.

Выраженной новизной является открытие уникального клеточного ответа на повреждение тканей мышей рода *Acomys cahirinus* в виде гиперэкспрессии генов, кодирующих семейство белков металлопротеиназ 1 и 2 типа, которые обладают высокой антиоксидантной активностью.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

В ходе работы были продемонстрированы уникальные способности *Acomys cahirinus* к регенерации тканей после повреждения. Данных животных можно использовать, как новый модельный объект, для изучения процессов репаративного хондрогенеза.

Раскрываются уникальные молекулярные механизмы, способствующие ускоренной и качественной регенерации тканей ушной раковины, в том числе и эластического хряща.

Понимание молекулярных механизмов, определяющих полное восстановление эластического хряща, является фундаментальной основой для создания генно-клеточных лекарственных препаратов или медицинских изделий для стимуляции процессов репаративного гистогенеза у других видов млекопитающих, в том числе и человека.

### **Достоверность и апробация работы**

В работе были использованы современные общепризнанные гистологические, иммуногистохимические, морфометрические методы исследования, обладающие высокой степенью воспроизводимости, а также технологии РНК секвенирования одиночных клеток. Для теоретического обоснования и сравнительного анализа привлечено большое количество отечественных и зарубежных источников литературы. Результаты исследования представлены и обсуждены на Международной научно-практической конференции «Современная морфология и ее интеграция с клиническими дисциплинами», Бухара (2022); Ежегодной конференции Московского общества медицинских генетиков с международным участием, Москва (2022); XIII Международной конференции «Биоинформатика регуляции и структуры генома / Системная биология», Новосибирск (2022); «Инновационные технологии в исследованиях, диагностике и преподавании», Санкт-Петербург (2022); V Национальном конгрессе по регенеративной медицине, Москва (2022); III Всероссийской конференции "Высокопроизводительное секвенирование в геномике", Новосибирск (2022); IV Конгрессе Ортобиология «Patient cases — от теории к практике» Москва (2023); XI Московской конференции по вычислительной молекулярной биологии, Москва (2023); II OIC Youth Scientific Congress, Казань (2023); Всероссийской с международным участием школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «материалы и технологии XXI века», Казань (2023).

### **Личный вклад автора**

По теме диссертации автором проанализированы данные отечественной и зарубежной литературы. Автор принимал непосредственное участие в планировании, проведении экспериментальной и аналитической части работы. Представленные результаты получены лично автором на всех этапах работы. Автором проведен анализ полученных результатов эксперимента, обобщение и формулирование выводов. На основании полученных результатов автором опубликован ряд статей, а материалы диссертации были доложены на научных конференциях.

### **Связь работы с научными программами**

Диссертационная работа выполнена в рамках программы грантовой поддержки проектов и исследовательских программ по отдельным направлениям Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий (№ 075-15-2021-1344) «Регуляторная транскриптомика для оценки потенциала модификации генома и изучения регенерации в животноводстве» и программы стратегического академического лидерства ПРИОРИТЕТ-2030 Казанского (Приволжского) федерального университета.

### **Публикации**

Материалы диссертации нашли отражение в 11 научных публикациях: из них 4 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией, а также индексируемых в базе данных Scopus и Web of Science, и 7 тезисов научных докладов на международных и всероссийских конференциях.

### **Объем и структура диссертации**

Материал диссертационной работы изложен на 136 страницах машинописного текста. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, выводов, списка цитированной литературы, списка сокращений и приложений. Работа содержит 44 рисунка и 4 таблицы в основном тексте и 2 таблицы в приложениях. Список литературы включает 34 отечественных и 204 зарубежных источников.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Экспериментальное исследование выполнено на мышах *Acomys cahirinus* и мышах линии Balb/c. Всего было использовано 72 самца каждого вида мышей, которым моделировали две модели дефекта ушной раковины (округлый дефект и ампутация).

Хирургическое моделирование травматизации ушной раковины диаметром 3 мм было произведено по всем правилам асептики и антисептики, ранение было нанесено по центру ушной раковины устройством для биопсии кожи Dermo Punch (Strylab, Италия), избегая крупных сосудов. Ткани ушной раковины забирались для дальнейшего анализа (гистология и транскриптомика) путем полного удаления раковины в условиях глубокой наркотизации животных на следующих сроках: 6 часов и 2, 5, 15, 21 и 30 сутках после проведения операции.



Ампутация ушной раковины производилась микрохирургическим ножницами в условиях глубокой наркотизации животных. Ткани ушной раковины забирались для дальнейшего анализа на следующих сроках, для гистологического исследования на 1, 2 и 3 месяц после удаления, для транскрипционного анализа на 6 часов, 2 суток и 7 суток после проведения операции.

Часть материала после измельчали в капле охлаждённого на льду PBS 1X в течение 5 минут и гомогенизировали в смеси коллагеназы II 10 мг/мл, проназы 5 мг/мл и 0,4 мг/мл ДНКазы I с использованием программы 37\_multi\_E гомогенизатора gentleMACS. Из регидратированной суспензии выделяли ДНК-позитивные (Hoechst+) клетки. Из полученной суспензии готовили библиотеки для секвенирования РНК единичных клеток с использованием набора Chromium Next GEM Single Cell 5' (10X Genomics) по стандартному протоколу. Полученные библиотеки секвенировали на платформе HiSeq2000 (Illumina).

В дальнейшем полученные данные секвенирования подвергались биоинформатической обработке, где образцы нативной ушной раковины были обозначены как АС и МС (*Acomys cahirinus* и Balb/c, соответственно), а образцы после проведения эксперимента как А6h, А2d, А5d в случае *Acomys cahirinus*, и М6h, М2d, М5d для Balb/c (6 часов, 2 суток, и через 5 суток после операции, соответственно).

В случае ампутации ушной раковины образцы нативной ушной раковины были обозначены как АСа и МСа (*Acomys cahirinus* и Balb/c, соответственно), а образцы после проведения эксперимента как А6ha, А2da, А7da в случае *Acomys cahirinus*, и М6ha, М2da, М7da для Balb/c (6 часов, 2 суток, и 7 суток после операции, соответственно).

Другую часть материала фиксировали в 10% забуференном формалине с последующей заливкой в парафин по стандартной методике. Поперечные парафиновые срезы ушной раковины окрашивали гематоксилином и эозином и по Маллори, а также иммуногистохимически антителами против эластина (Eln, (Affinity life bioscience), 1:100)) и антителами против ядерного транскрипционного фактора-10 (Sox10, (Affinity life bioscience), 1:100)). Цифровые гистотопограммы получали при помощи сканера гистологических препаратов NanoZoomer S60 Digital slide scanner: (Hamamatsu, Япония) и анализировали при помощи программы NDP.view2 (Hamamatsu, Япония).

Статистический анализ результатов морфометрических исследований проводили с помощью Microsoft Excel 2016 и программного пакета Statistica 12. Данные считались достоверными при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. Восстановление целостности ушной раковины

#### 1.1 Регенерация округлого дефекта ушной раковины

При макроскопической оценке можно отметить, что в течение месячного периода в контрольной группе, так и не произошло заметного восстановления раневой поверхности, только эпителизация дефекта. В отличие от группы *Acomys cahirinus*, где на 21 сутки наблюдали наличие белесой ткани в области дефекта, и к 30 суткам во всех случаях отмечали 100% закрытие округлого отверстия ушной раковины (Рисунок 1).

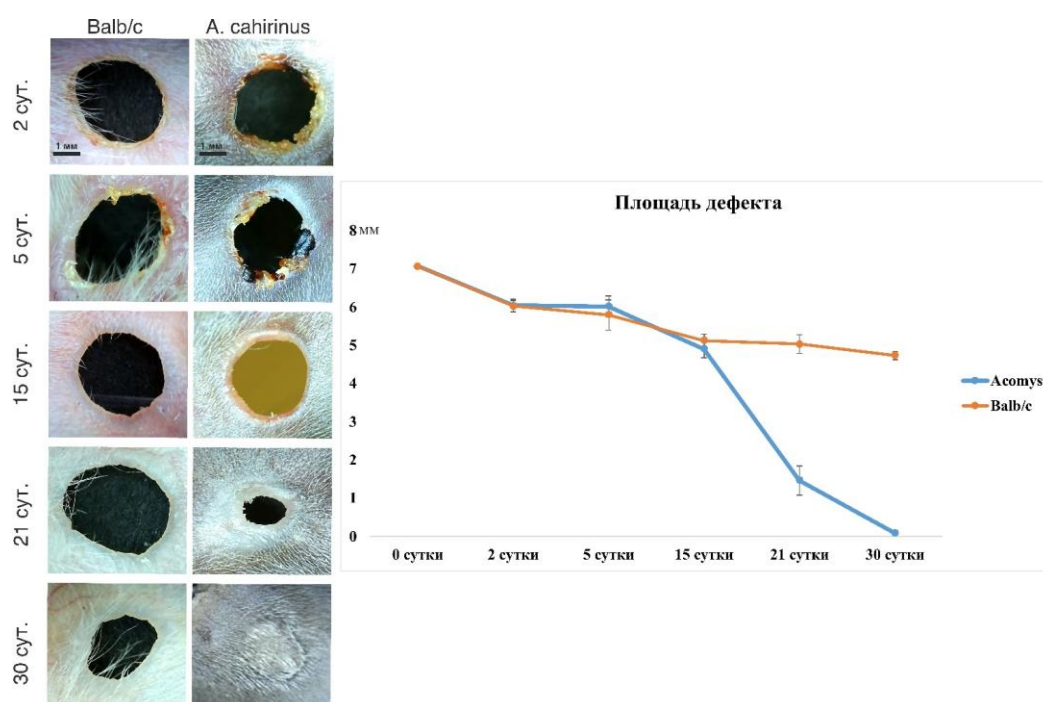
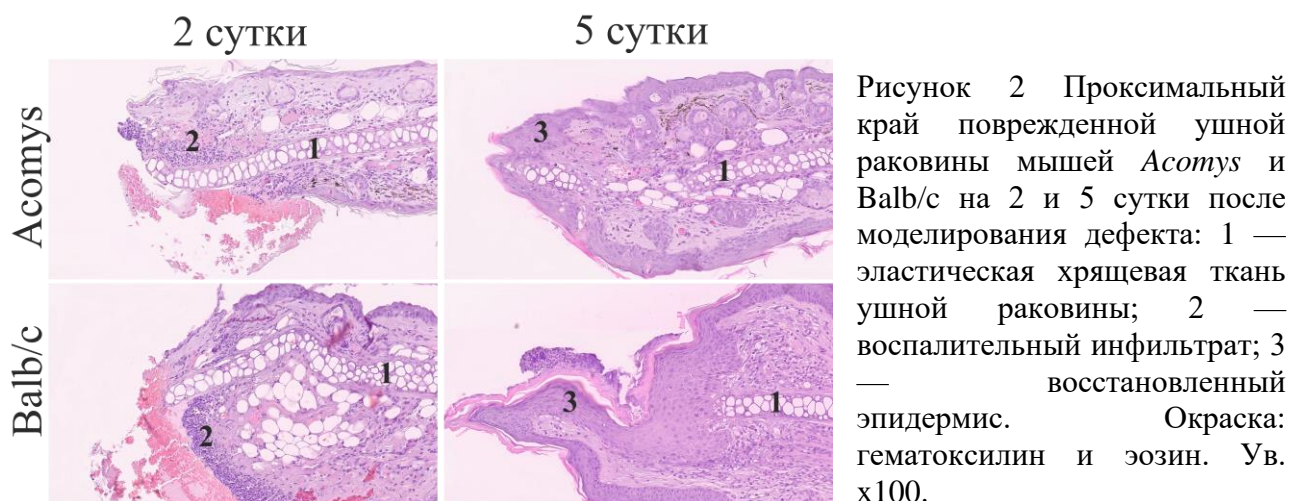


Рисунок 1. Дефекты ушной раковины *Acomys cahirinus* и Balb/c на различных этапах эксперимента. Макрофото съемка.

При микроскопической оценке на 2 сутки отмечали развитие умеренной воспалительной реакции как в группе мышей *Acomys cahirinus*, так и в группе Balb/c. На 5 сутки у мышей Balb/c обнаружили смешанно-клеточный воспалительный инфильтрат, состоящий преимущественно из сегментоядерных нейтрофильных лейкоцитов с незначительной примесью мононуклеарных клеток. Сосуды были дилатированы, полнокровны и содержали маргинализированные нейтрофилы, что свидетельствует о продолжении активной фазы экссудации. (Рисунок 2). У обоих видов животных процессы частичной или полной реэпителизации дефекта и отслоение некротизированной ткани завершались к 5 дню.



К 15 суткам в группе мышей Balb/c с в краях поврежденного хряща были обнаружены проявления незначительных процессов хондрогенеза, который характеризовался накоплением малодифференцированных скелетогенных клеток. Признаки синтеза компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ) отсутствовали. Дальнейшие процессы хондрогенеза у этой группы животных не получили своего развития. (Рисунок 3).

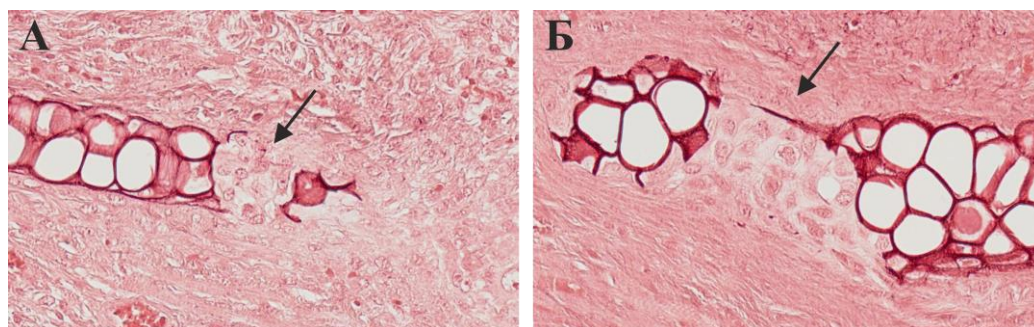


Рисунок 8. Край поврежденного хряща мышей Balb/c на 15 сутки. после формирования дефекта: А. Дистальный край поврежденного хряща ушной раковины; Б. Проксимальный конец. Стрелкой отмечены вновь образованные хондроциты. Окраска: орсеин. Ув. x200.

В отличие от мышей группы *Acomys cahirinus*, у которых на 30 сутки были обнаружены участки вновь образованного хряща, окружённого формирующейся надхрящницей Эластический хрящ прорастал в центральную часть дефекта, но имел морфологические отличия от хряща неповрежденной ушной раковины. Структура, сформированная в ходе хондрогенеза, характеризовалась мелкими упорядоченными хондроцитами, небольшими хондроцитарными лакунами, сформированной надхрящницей и начальными признаками формирования эластических волокон (Рисунок 4).



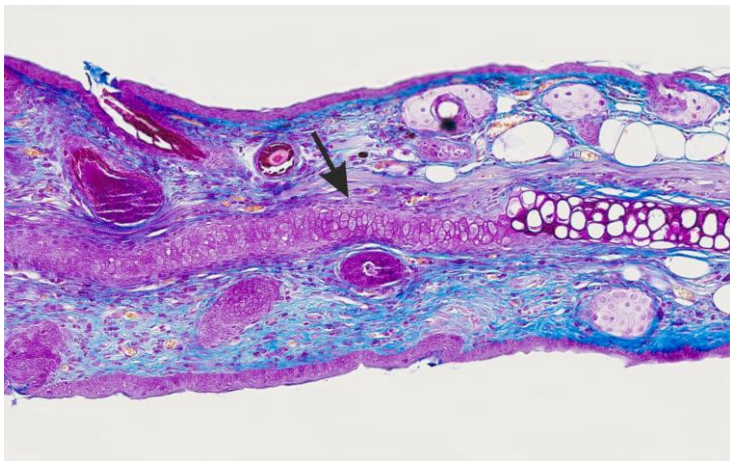


Рисунок 4. Ушная раковина *Acomys cahirinus* через 30 суток после формирования дефекта. Стрелкой отмечен репаративный хрящ. Окраска: по Маллори. Ув. x100.

## 1.2 Полное удаление ушной раковины

После ампутации ушной раковины в группе мышей *Acomys cahirinus* наблюдаются активные процессы морфогенеза. Так на второй и третий месяц можно увидеть вновь сформировавшуюся ушную раковину. В группе мышей Balb/c данное явление не наблюдалось (Рисунок 5).

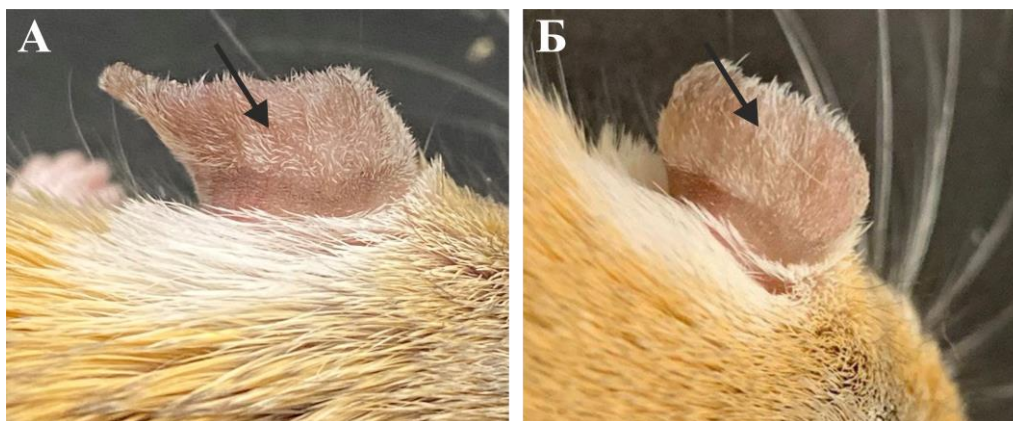


Рисунок 5. Состояние ушной раковины *Acomys cahirinus* после ампутации. А – через 2 месяца после ампутации, Б – через 3 месяца после ампутации. Макрофотосъемка.

При гистологической оценке происходящих процессов, можно отметить, что в регенерате ушной раковины наблюдаются также процессы репаративного хондрогенеза, заключающиеся в пролиферации и дифференцировки хондроцитарных клеток, формировании новой надхрящницы и синтезе компонентов ВКМ (Рисунок 6).

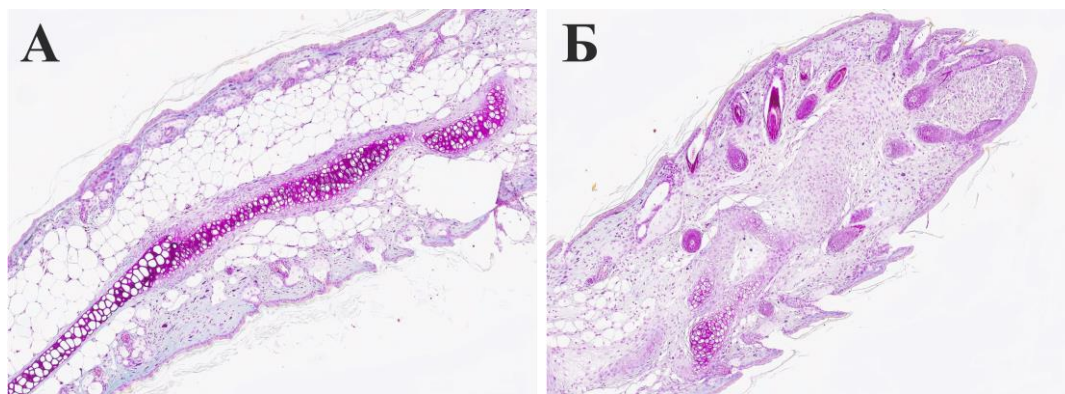


Рисунок 6. Ушная раковина *Acomys cahirinus* через 2 мес. после операции: А, Б. Варианты хрящевого регенерата на разных стадия хондрогенеза; красная Окраска: по Маллори. Ув.: А x20, В, С x100.

### *Заключение по разделу 1 результатов*

Таким образом, результаты эксперимента еще раз подтверждают, что мыши рода *Acomys cahirinus* обладают повышенными способностями к регенерации и, в частности, к восстановлению тканей ушной раковины после повреждения или ее полного удаления с сохранение идентичной гистоархитектоники. Причем спектр местных условий в области повреждения таков, что разрешает развитие репаративного хондрогенеза в том числе в области дефекта эластического хряща.

## **2. Секвенирование одиночных клеток**

В результате секвенирования были получены образцы данных ушных раковины обеих групп животных на разных точках эксперимента. Для возможности анализа происходящих процессов необходимо было интегрировать все образцы в единую систему координат. Каждая точка на кластерограмме соответствует одной клетке, которые объединяются в кластеры по мере сходства профилей их экспрессии. При помощи известных маркерных генов были определены следующие типы клеток ушной раковины: клетки хрящевой ткани, эпидермис и его производные, эндотелий, фибробласты, клетки иммунной системы, нейроглия, скелетные миоциты и адипоциты (Рисунок 7). Данные клеточные типы были определены как в образцах округлого дефекта ушной раковины, так и в случае ампутации.

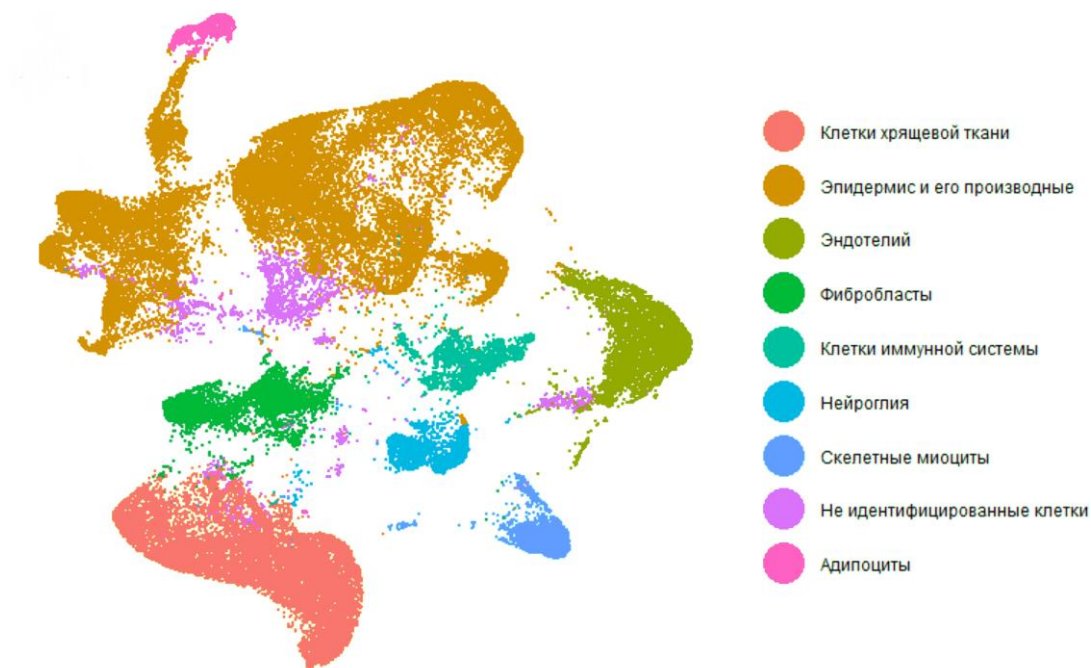


Рисунок 7. Объединенная кластерограмма проаннотированных клеточных типов ушной раковины обоих видов животных на разных точках эксперимента.

### *Заключение по разделу 2 результатов*

Таким образом впервые были получены образцы секвенирования одиночных клеток ушной раковины обоих видов животных на разных этапах эксперимента. При помощи методов биоинформатики были получены объединенные кластерограммы, клеточные популяции которой полностью соответствовали тканевому строению ушной раковины и включали в себя: клетки хрящевой ткани, эпидермис и его производные, адипоциты, иммунные клетки, нейроглию, фибробласты, скелетные миоциты и эндотелий.

## **3. Репаративный хондрогенез мышей *Acomys cahirinus***

### **3.1 Гистологический анализ**

В группе *Acomys cahirinus* основные процессы репаративного хондрогенеза визуализируются только начиная с 15 суток. На 15 сутки хондрогенез характеризуется утолщением надхрящницы и скоплением неупорядоченных округлых малодифференцированных скелетогенных клеток (Рисунок 8).



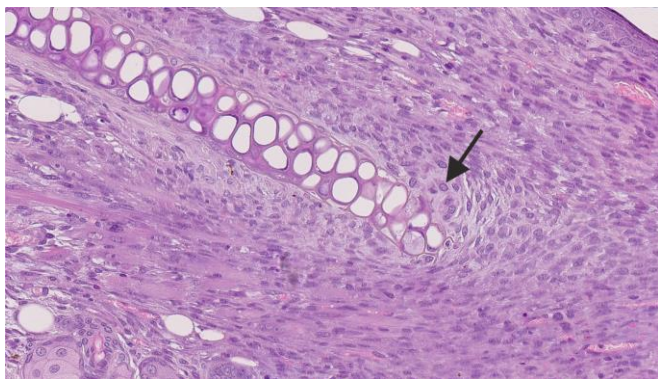


Рисунок 8. Проксимальный край поврежденного хряща мышечей *Acomys cahirinus* на 15 сутки после формирования дефекта. Стрелкой отмечена скелетогенная клетка. Окраска: гематоксилин и эозин. Ув.  $\times 300$ .

На 21 сутки в группе мышечей *Acomys cahirinus* мы наблюдали продолжающиеся процессы хондрогенеза в области проксимального края поврежденного хряща. Новообразованная структура характеризовалась мелкими упорядоченными предшественниками хондроцитарных клеток, наличием внеклеточного матрикса, а также формирующейся надхрящницей. Однако внеклеточный матрикс хондроцитарных регенератов не содержал в своем составе зрелые элауниновые волокна так и зрелые эластические волокна, что может говорить о не состоявшемся процессе эластогенеза и наличии юных хондроцитов на данные сроки. Процессы хондрогенеза происходили только в проксимальной части дефекта, дистальная часть хряща оставалась интактной (Рисунок 9).

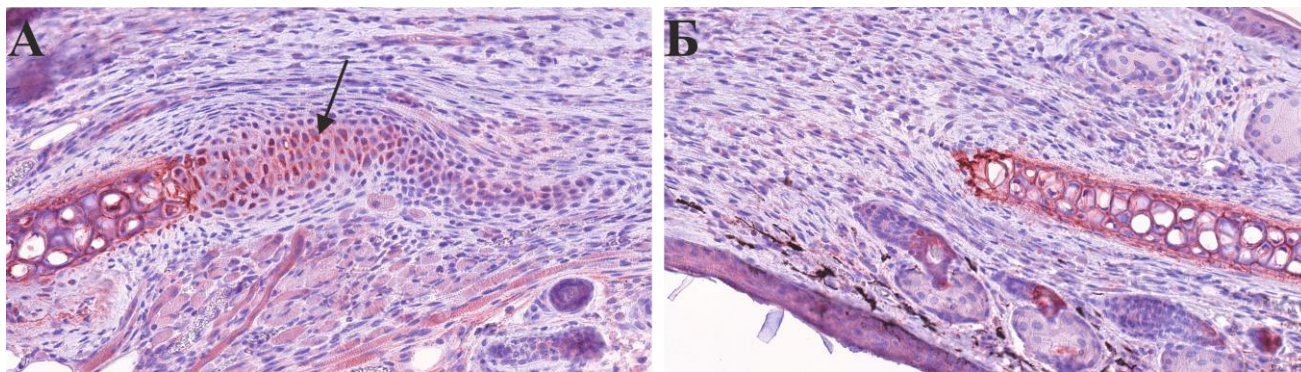


Рисунок 9. Ушная раковина *Acomys cahirinus* на 21 сутки после травматизации. А. Проксимальный край Ув.  $\times 200$ . Б. Дистальный край. Ув.  $\times 200$ . Стрелкой отмечено формирование эластических волокон. Окраска с использованием поликлональных антител, направленных против белка Elastin.

Для определения степени дифференцировки клеток новообразованных хондроцитарных регенератов было проведено окрашивание ушных раковин *Acomys cahirinus* поликлональными антителами, направленными против белка SOX10. На 5 сутки в группе *Acomys cahirinus* отмечали рыхло расположенные

продолговатые клетки мезенхимного происхождения с яркой позитивной ядерной реакцией на SOX10. На 21 сутки мы наблюдаем положительную реакцию в основном в репаративном хряще, а именно в хондробластах (Рисунок 10).

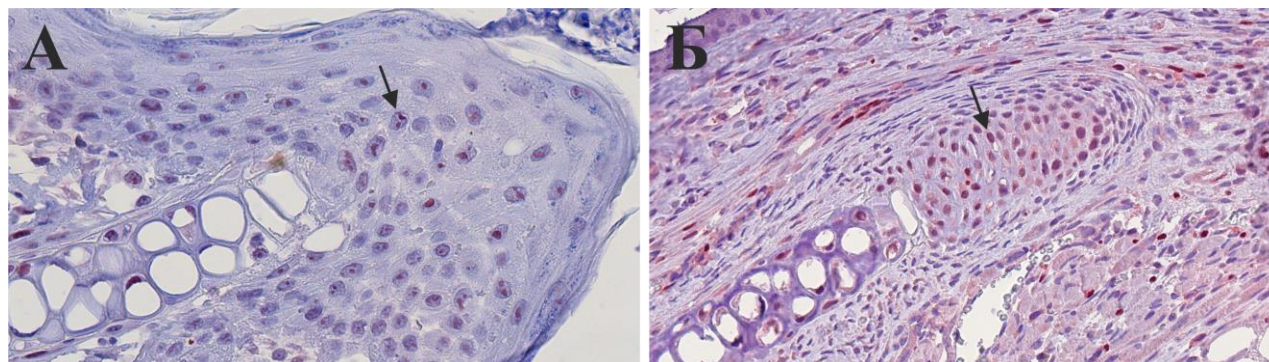


Рисунок 10. А. Клетки мезенхимного происхождения *Acomys cahirinus* на 5 сутки после травматизации, Ув. х600. Б. Хондроцитарный регенерат *Acomys cahirinus* на 21 сутки после травматизации, Ув. х400. Окраска с использованием поликлональных антител, направленных против белка SOX10.

Sox 10 является маркером клеток эктодермального происхождения. Одним из производных эктодермы является нервный гребень. Двумя ключевыми характеристиками клеток нервного гребня являются способность к миграции и мультипотентность.

### 3.2 Транскриптомный анализ хрящевой ткани

В ходе эксперимента были определены все дифференциально экспрессирующиеся (ДЭ) гены хрящевого кластера.

На 2 и на 5 сутки после операции в группе мышей *Acomys* наблюдали повышение экспрессии следующих генов, компонентов внеклеточного матрикса: *Col9a3*, *Col2a1*, *Col3a1*, *Col9a1*, *Col6a2*, *Acan* и *Eln*. Максимальный уровень экспрессии отмечался на 2 сутки. В отличие от мышей Balb/c, где был сниженный уровень ДЭ данных генов.

Следующим семейством генов, показывающие дифференциальную экспрессию у *Acomys cahirinus* в сравнении с Balb/c, являются матриксные металлопротеиназы (*MMP3*, *MMP10*). У мышей линии Balb/c не наблюдалась ДЭ данных генов ни на одних точках эксперимента (Рисунок 11).



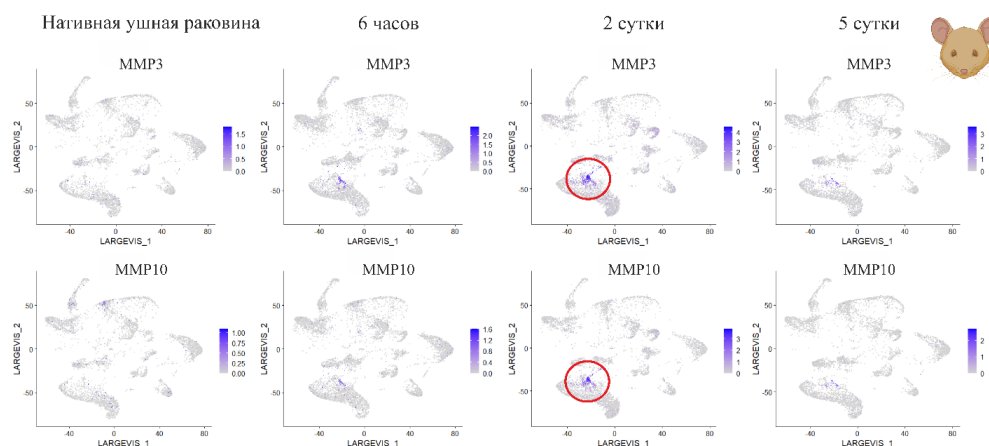


Рисунок 11. Экспрессия генов *MMP3* и *MMP10* клетками хрящевой ткани ушной раковины мышей *Acomys cahirinus* на разных временных точках. (интенсивность цвета пропорциональна уровню экспрессии гена в клетке).

### Заключение по разделу 3 результатов

Таким образом, в группе мышей *Acomys cahirinus* на ранних сроках после травматизации мы видим активность генов, кодирующих основные компоненты внеклеточного матрикса хряща, а также активность генов металлопротеиназ, которые участвуют в ремоделирование ВКМ. В группе мышей линии Balb/c клетки эластического хряща после травматизации не повышают уровень экспрессии генов ВКМ. Все это говорит о начинающемся процессе хондрогенеза в группе мышей *Acomys cahirinus*.

К тому же, нами были определены прогениторные клетки эластического хряща *Acomys cahirinus*. Ими оказались клетки нейроэктодермального происхождения, которые принимают активную роль в процессах репаративного хондрогенеза у данной группы мышей. Дальнейшие исследования в данной области помогут найти источник данных прогениторных нейроэктодермальных клеток и возможности их использовании в стимуляции аналогичных процессов у других видов животных.

## 4. Транскриптомный анализ иммунных клеток

При изучении соотношения клеточных типов в динамике между двумя изучаемыми видами животных наиболее явные отличия были связаны с клетками иммунного кластера. Так, в группе мышей *Acomys cahirinus* процент иммунных клеток в нативной ушной раковине составлял 2.5%, наибольшие значения отмечались на 2 сутки после проведения панч-биопсии – 4.3%, к 5 суткам относительное количество иммунных клеток возвращалось к норме и составило 2.5% (Рисунок 12). В группе мышей Balb/c наблюдали постоянное повышение числа клеток иммунного кластера, начиная с 4.1% (нативная ушная

раковина) и заканчивая 10.9% на 5 сутки эксперимента (Рисунок 12). Все это в полной мере коррелирует с процессами, которые мы наблюдаем на гистологической картине.

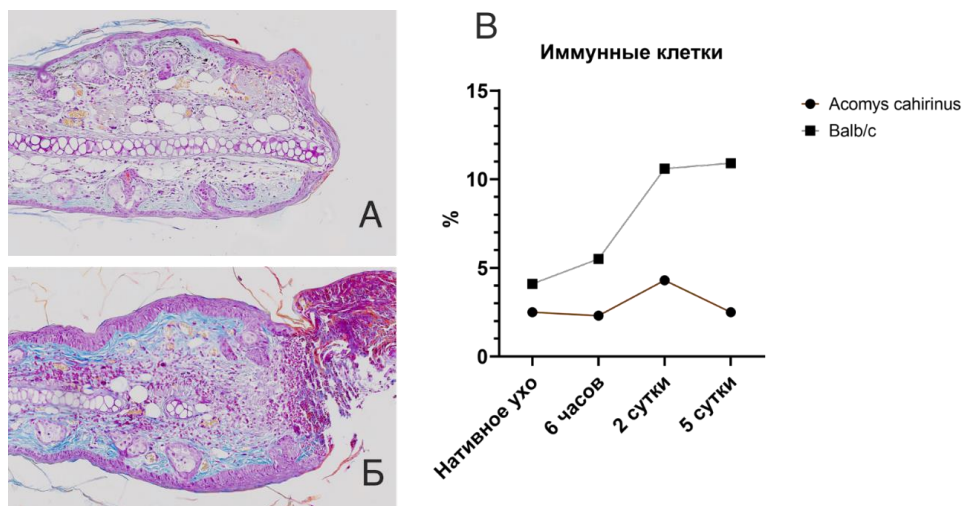


Рисунок 12. А, Б – проксимальный край ушной раковины на 5 сутки после операции мышей *Acomys cahirinus* и Balb/c соответственно. Окраска: по Маллори. Ув.  $\times 100$ . В. Изменение соотношения количества иммунных клеток в динамике.

Были определены все дифференциально экспрессирующиеся гены в иммунном кластере через 6 часов после операции. Так, в группе мышей *Acomys cahirinus* дифференциальную экспрессию имело всего лишь 5 генов, когда в группе мышей Balb/c более 160. Наиболее значимыми генами, которые поменяли уровень своей экспрессии у Balb/c, были гены комплекса гистосовместимости, а именно, *H2-D1*, *H2-M2*, *H2-Q4*, *H2-DMb1*, а также другие гены, участвующие в воспалительной реакции. При помощи сервиса «DAVID Bioinformatics Resources» были спрогнозированы активные метаболические пути в группе мышей Balb/c на 6 ч. после травмы, наиболее активными оказались: процессинг и представление антигенов (P-value  $< 0.05$ ), фагосомный путь (P-value  $< 0.05$ ) и апоптотический путь (P-value  $< 0.05$ ). В группе *Acomys cahirinus* подобные явления не наблюдались.

#### Заключение по разделу 4 результатов

Таким образом, в группе мышей линии Balb/c наблюдаются типичные признаки воспалительной реакции с резким повышением количества клеток иммунной системы и активацией метаболических путей, связанных с воспалением. В группе мышей *Acomys cahirinus* можно отметить небольшое повышение количества клеток на 2 сутки и снижение их к 5 суткам, а также

меньшее количество дифференциально экспрессирующихся генов, что, в свою очередь, может играть большую роль в процессах репарации тканей без развития фиброза.

## 5. Металлотионеины - универсальный клеточный ответ

Во всех клеточных типах *Acomys cahirinus* наблюдается сверхэкспрессия гена семейства белков металлотионеинов 1 и 2 типа (*MT1* и *MT2*) с достоверной статистической разницей ( $P\text{-value} < 0.05$ ) на 6 ч. В группе мышей Balb/c такой статистический результат не наблюдается (Рисунок 13).

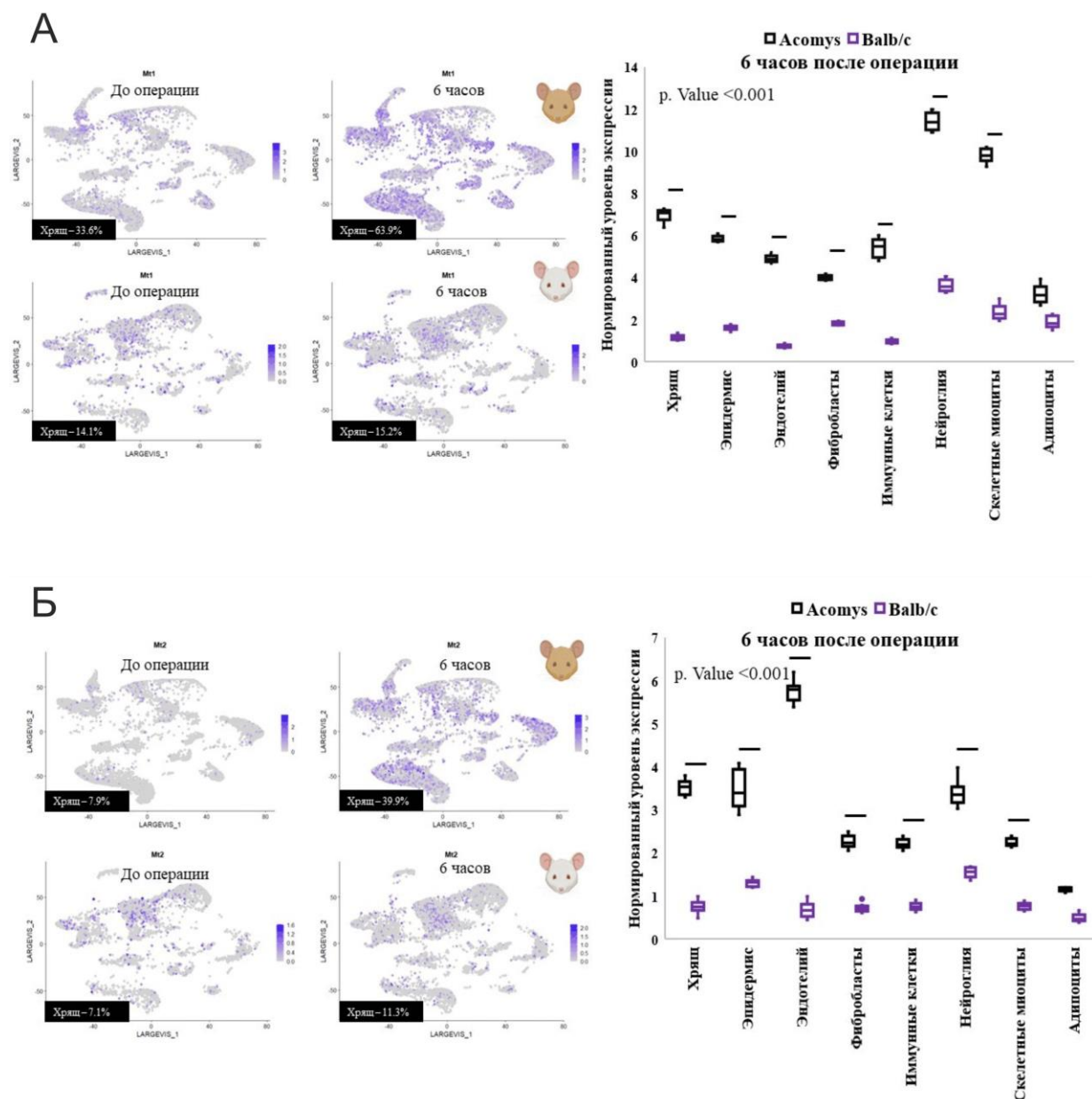


Рисунок 13. А - Дифференциальная экспрессия гена *Mt1* на 6 час после операции. Б - Дифференциальная экспрессия гена *Mt2* на 6 час после операции.

### Закключение по разделу 5 результатов

Металлотионеины – это семейство низкомолекулярных белков с высоким содержанием цистеина, способных связывать металлы, такие как медь, кадмий, цинк [Thirumoorthy, 2017]. В физиологических условиях МТ выполняют ряд функций, таких как обмен, аккумулялирование и внутриклеточный транспорт металлов (Zn, Cu, Cd), защита от металл-индуцированных повреждений, участие в работе антиоксидантной системы, влияние на иммунную систему, ингибирование апоптоза, ангиогенез. Другой наиболее важной функцией является антиоксидантная активность, обусловленная высвобождением Zn из МТ в результате окисления тиолатного кластера при повышении АФК. Таким образом, формируются свободные -SH фрагменты, которые участвуют в нейтрализации АФК в окислительно-восстановительном цикле [Ruttkay-Nedeckу В, 2013]. Таким образом, установленная нами сверхэкспрессия генов *MT1* и *MT2* у *Acomys cahirinus* может являться одним из универсальных типов клеточного ответа на повреждение. Повышенная экспрессия металлотионеинов может запускать каскад реакций, приводящих к ускоренной, качественной регенерации, благодаря способностям ингибирования каспаз и нейтрализации свободных радикалов.

### ВЫВОДЫ

1. 1. Дефект эластического хряща мышей *Acomys cahirinus* восстанавливается как после частичной травматизации ушной раковины, так и после ее полной ампутации. При округлом дефекте репаративный хондрогенез происходит путем пролиферации клеток проксимального конца. Дистальный конец остается интактным и не восстанавливается.
2. У мышей *Acomys cahirinus* экспрессия Sox10 (маркер нейроэктодермальных клеток) выявляется на 5 сутки после травматизации ушной раковины в клетках надхрящницы (фибробласты и хондрогенные клетки) и в клетках дермы (фибробласты), а на 15-30 сутки в репарационной части хряща и в скелетных миоцитах
3. В клетках ушной раковины мышей *Acomys cahirinus*, в отличие от мышей линии Balb/c, на ранних сроках после травмы хряща (до 5 суток) наблюдается повышенная экспрессия генов, участвующих в процессах хондрогенеза: *Mmp3* и *Mmp10* (матричные металлопротеиназы), белки которых участвуют в деградации поврежденной поверхности хряща; *Col9a3*, *Col2a1* и *Col3a1*, белки которых являются компонентом внеклеточного матрикса хряща; *Mt1*

(металлотионеин 1) и *Mt2* (металлотионеин 2), функция которых заключается в нейтрализации активных форм кислорода

4. У мышей линии Balb/c после травмы хряща наблюдаются типичные процессы воспалительной реакции с резким повышением количества клеток иммунной системы, дифференциальной экспрессией более 160 генов на 6 час и активацией метаболических путей, связанных с воспалением. Напротив, у мышей *Acomys sahirinus* идентифицируется лишь небольшое повышение количества иммунных клеток на 2 сутки и снижение их к 5 суткам, на 6 час детектируется дифференциальная экспрессия лишь 5 генов (*Mt2*, *Rpl28*, *Rps23*, *Rabep1*, *Slc9a9*) и отсутствие активации провоспалительных метаболических путей.

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

**Научные статьи, опубликованные в отечественных изданиях, которые входят в международные реферативные базы данных и системы цитирования (БАК, Scopus / Web of Science/ CA(pt)):**

1. Деев Р.В. Современные представления о клеточной гибели / Р.В. Деев, А.И. Билялов, Т.М. Жампеисов // Гены и клетки / Genes and Cells. – 2018. – Т.13. №1. – С.6-19.
2. Билялов А.И. Комбинированное применение плазмидного препарата рCMV-VEGFA и аутодермопластики для стимуляции заживления кожных дефектов в эксперименте / А.И. Билялов, М.С. Абызова, А.А. Титова, М.О. Мавликеев, А.А. Крылов, И.Я. Бозо, Р.В. Деев // Гены и клетки / Genes and Cells. – 2018. – Т.13. №1. – С.90-94.
3. Билялов А.И. У мышей рода *Acomys* после травмы восстанавливается эластический хрящ ушной раковины / А.И. Билялов, Д.Д. Филимошина, Н.С. Филатов, А.А. Билялова, А.А. Титова, Л.Р. Гатауллина, А.С. Плюшкина, Е.И. Шагимарданова, Р.В. Деев, А.П. Киясов, О.С. Козлова, А.А. Несмелов, О.А. Гусев // Гены и клетки / Genes and Cells. – 2022. – Т.17. №1. – С.42-47.
4. Билялов А.И. Металлотионеин - универсальный клеточный ответ на повреждение ушной раковины у *Acomys sahirinus* / А.И. Билялов, Н.С. Филатов, О.С. Козлова, Т.А. Воронина, А.А. Несмелов, Д.Д. Филимошина, А.А. Билялова, А.А. Титова, М.А. Титова, Е.И. Шагимарданова, О.А. Гусев, А.П. Киясов // Технологии живых систем. – 2023. – Т.20. №4. – С.101-111.

**Публикации в иных научных изданиях:**

5. Билялов А.И. *Acomys* - неканоническая модель регенерации / А.И. Билялов, Д.Д. Филимошина, А.А. Билялова, Н.С. Филатов, Л.Р. Гатауллина, А.А. Титова, О.С. Козлова, А.А. Несмелов, Е.И. Шагимарданова, Е.В. Пресняков, Р.В. Деев, А.П. Киясов, О.А. Гусев // Вопросы морфологии XXI века. Вып.7. Сборник научных трудов Всероссийской научной конференции

«Инновационные технологии в исследованиях, диагностике и преподавании». - СПб.: Издательство ДЕАН, 2022. – С.123-125.

6. Билялов А.И. Транскриптомика уха регенерирующих иглистых мышей *Acomys cahirinus* на уровне единичных клеток / О.С. Козлова, **А.И. Билялов**, А.А. Несмелов, Г.Р. Газизова, Е.И. Шагимарданова, О.А. Гусев // Высокопроизводительное секвенирование в геномике (HSG-2022): тезисы III Всероссийской конференции (19-24 июня 2022 г., г. Новосибирск). – Новосибирск: Академиздат, 2022. – С.85.

7. Билялов А.И. Оценка репаративного хондрогенеза эластического хряща иглистых мышей / А.И. Билялов, Д.Д. Филимошина, Н.С. Филатов, А.А. Билялова, А.А. Титова, Л.Р. Гатауллина, А.С. Плюшкина, Е.И. Шагимарданова, Р.В. Деев, А.П. Киясов, О.С. Козлова, А.А. Несмелов, О.А. Гусев // Гены и клетки / *Genes and Cells*. – 2022. – Т.17. №3. – С.29.

8. Bilyalov A. First insight into regeneration potential of the ears of *Acomys cahirinus* in the single-cell resolution / O. Kozlova, A. Bilyalov, A. Nesmelov, G. Gazizova, E. Shagimardanova, O. Gusev // *Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2022): The Thirteenth International Multiconference (4–8 July 2022, Novosibirsk, Russia); Abstracts*. – Novosibirsk: ICG SB RAS, 2022. – С.48.

9. Билялов А.И. Репаративный хондрогенез: от фундаментальных исследований к практическому применению / А.И. Билялов, Р.В. Деев, Е.В. Пресняков, И.Я. Бозо, О.А. Гусев, А.П. Киясов // IV конгресс ОРТОБИОЛОГИЯ 2023 «Patient cases - от теории к практике»: тезисы (21-22 апреля 2023 г.). - Воронеж: Издательско-полиграфический центр «Научная книга», 2023. – С.127-129.

10. Bilyalov A. Investigating chondrogenesis processes in *Acomys cahirinus* and Balb/c mice after trauma / A. Bilyalov, N. Filatov, O. Kozlova, A. Bilyalova, E. Shagimardanova, A. Kiyasov, O. Gusev // II OIC Youth Scientific Congress (November 8-11, 2023, Kazan): Abstracts. – Kazan, 2023. – С.28-29.

11. Билялов А.И. Особенности свертывающей системы мышей *Acomys Cahirinus* / Н.С. Филатов, А.И. Билялов, И.И. Газизов, Р.Р. Хисматуллин, Р.И. Литвинов, Е.И. Шагимарданова, А.П. Киясов, О.А. Гусев // Материалы и технологии XXI века: сборник тезисов Всероссийской с международным участием школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых / отв. ред. А.В. Герасимов. – Казань: Издательский дом Маковского, 2023. – С.69.

Адрес для отзывов на автореферат: 420008, Казань, ул. Кремлёвская, 18,  
Казанский федеральный университет, отдел аттестации научно-педагогических  
кадров, Ученому секретарю Диссертационного совета КФУ.015.1  
Аникиной Татьяне Андреевне, факс: (843)236-79-37,  
e-mail: TAAnikina@kpfu.ru

E-mail автора: BilyalovAir@yandex.ru