ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ

ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ ИМ. В.А. ЭНГЕЛЬГАРДТА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Горшкова Екатерина Александровна

Особенности иммунной системы голого землекопа (*Heterocephalus glaber*)

специальность «3.2.7 – Иммунология»

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук

профессор, академик РАН

Недоспасов Сергей Артурович

Москва - 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 4

ВВЕДЕНИЕ 5

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 10

1.1. Положение на филогенетическом дереве и экология вида *H. glaber* 11

1.2. Физиологическая адаптация голых землекопов к подземному образу жизни 13

1.2.1. Эусоциальная структура колоний 13

1.2.2. Высокая продолжительность жизни и замедленное старение 15

1.2.3. Устойчивость к новообразованиям и противоопухолевые механизмы 16

1.2.4. Метаболизм, устойчивость к аноксии, гипоксии, гиперкапнии 18

1.2.5. Терморегуляция и теплообмен 21

1.3. Иммунная система голого землекопа 22

1.3.1. Кроветворение и лимфоидные органы 22

1.3.2. Чувствительность к вирусным инфекциям 23

1.3.3. Врождённый иммунитет 23

1.3.4. Утрата NK-клеток 24

1.3.5. Приобретённый иммунитет 25

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ 27

2.1. Голые землекопы 27

2.2. Мыши 27

2.3. Выделение клеток из тканей первичных и вторичных иммунных органов 27

2.3.1. Выделение клеток костного мозга 27

2.3.2. Выделение нейтрофилов костного мозга 28

2.3.3. Выделение периферических мононуклеаров крови 28

2.3.4. Выделение иммунных клеток селезёнки 29

2.3.5. Выделение клеток собственной пластинки кишечника 29

2.4. Проточная цитофлуориметрия 30

2.4.1. Поиск кросс-специфичных антител для проточной цитофлуориметрии 30

2.4.2. Исследование клеточного состава иммунных органов голого землекопа и мыши при помощи панели кросс-специфичных антител 30

2.5. Гистология, гистохимическое и иммунофлуоресцентное окрашивание 31

2.6. Получение мазков и окраска по Романовскому 32

2.7. Культивирование клеток костного мозга в полужидкой среде с ростовыми факторами 33

2.8. Получение и анализ свойств первичной культуры макрофагов костного мозга 33

2.8.1. Получение первичной культуры макрофагов костного мозга голого землекопа 33

2.8.2. Поляризация макрофагов голого землекопа в про- и противоспалительных условиях 34

2.8.3. Анализ клеточного метаболизма макрофагов голого землекопа 35
2.8.4. Анализ морфологии митохондрий макрофагов 38
2.9. Выделение РНК, обратная транскрипция, ПЦР в реальном времени и РНК-секвенирование 38
2.9.1. Выделение РНК и обратная транскрипция 38
2.9.2. Анализ экспрессии генов при помощи количественной ПЦР в реальном времени 39
2.9.3. Секвенирование РНК 40
2.10. Анализ продукции оксида азота макрофагами 41
2.11. Мультиплексный анализ продукции цитокинов и хемокинов 41
2.12. Биоинформатический анализ последовательностей 42
2.13. Биоинформатический анализ данных РНК-секвенирования 42
2.14. Статистический анализ данных 43
3.1. Кросс-специфичные антитела для проточной цитометрии и иммуногистохимии, распознающие поверхностные маркеры иммуноцитов голого землекопа 44
3.2. Особенности лимфоидных органов голого землекопа, изученные при помощи панели кросс-специфичных антител 44
3.2.1. Анатомическое строение иммунной системы голого землекопа 44
3.2.2. Клеточный состав основных иммунных органов голого землекопа 53
3.3. Миелоидные клетки голого землекопа в моделях *in vitro*. 58
3.3.1. Миелоидные клетки-предшественники 58
3.3.2. Особенности макрофагов голого землекопа 61
3.4. Модель системного воспаления 78
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ 81
4.1. Особенности иммунной системы голого землекопа на уровне организма 81
4.2. Особенности макрофагов голого землекопа 83
4.3. Системный ответ на LPS 87
ГЛАВА 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ 89
БЛАГОДАРНОСТИ 91
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 92
ПРИЛОЖЕНИЕ 103

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

2-DG – 2-дезоксиглюкоза

BCR – B-клеточный рецептор

BMDM – макрофаги костного мозга

CD – кластер дифференциации

CTL – цитотоксические Т-клетки

FCCP – п-трифторметоксикарбонилцианидфенилгидразон

FSC - прямое светорассеяние

FMO – контроль флуоресценции минус один

GALT – лимфоидная ткань, ассоциированная с кишечником

GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

IL - интерлейкин

LH – лютеинизируюший гормон

LPS - липополисахарид

LRC – рецепторный комплекс лейкоцитов

M-CSF – макрофагальный колониестимулирующий фактор

NKC – рецепторный комплекс NK-клеток

OM – олигомицин

PBMC – периферические мононуклеары крови

scRNA-seq – секвенирование РНК единичных клеток

SPF – апатогенные условия содержания

SSC – боковое светорассеяние

TCR – Т-клеточный рецептор

цАМФ – циклический аденозинмонофосфат

АТФ - аденозинтрифосфат

АФК – активные формы кислорода

ВЛО – вторичные лимфоидные органы

КОЕ – колониеобразующая единица

ПБ – Пейеровы бляшки

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Голый землекоп (*Heterocephalus glaber, H.glaber*) – небольшой грызун из семейства *Bathyergidae*, обитающий в Восточной Африке. Эти зверьки живут под землей семьями по 50-200 особей с чёткой социальной иерархией. В результате адаптации к изолированному подземному образу жизни у них возник ряд уникальных физиологических особенностей, благодаря которым этот вид завоевал популярность у исследователей механизмов старения и биологии опухолей.

С точки зрения молекулярной эволюции иммунная система является наиболее быстро адаптирующейся системой организма. Рассматривая хорошо известные особенности физиологии голых землекопов - высокую продолжительность жизни, низкую температуру тела и скорость метаболизма, устойчивость к образованию опухолей – можно предположить, что каждый из этих признаков оказывает влияние на иммунитет. Несмотря на это, иммунная система голого землекопа до сих пор была мало изучена.

На момент начала работы над диссертацией знания о специфических свойствах иммунной системы голых землекопов были обрывочны, в литературе отсутствовало даже полноценное анатомическое описание лимфоидных органов этих животных. Методические подходы, используемые в работах с иммуноцитами голых землекопов, были недостаточно проработаны. В конце 2019 года появилось несколько работ, описавших количественное преобладание миелоидных клеток в иммунной системе голого землекопа. При этом оказалось, что в организме этого грызуна отсутствует популяция лимфоцитов, отвечающих за элиминацию инфицированных вирусами или злокачественных клеток, – NK-клеток. Это свойство, вступающее в кажущееся противоречие с данными об устойчивости вида к онкологическим заболеваниям, только повысило интерес к продолжению исследований иммунной системы этих животных.

Целью настоящей работы являлась характеристика морфологии и клеточного состава лимфоидных органов голого землекопа, а также получение *in vitro* моделей для углубленного исследования адаптации иммунной системы голого землекопа на клеточном и молекулярном уровнях.

Для достижения этой цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Идентификация кросс-специфичных антител среди существующих коммерческих реагентов, направленных на антигены мыши или других грызунов и человека.

2. Описание анатомических особенностей лимфоидной ткани голого землекопа в сравнении с лабораторной мышью.
3. Разработка оптимальных методов получения первичных культур иммунных клеток голого землекопа.
4. Исследование иммунометаболических свойств миелоидных клеток голого землекопа, дифференцированных из культур костного мозга.

Научная новизна работы

Настоящая работа направлена на описание строения и свойств лимфоидной ткани в редкой и неклассической животной модели – голом землекопе H. glaber. На первом этапе работы среди множества доступных коммерческих реагентов были отобраны антитела, способные распознавать иммунные клетки голого землекопа, затем при помощи этих антител была дана первичная характеристика клеточного состава основных иммунных органов голого землекопа – костного мозга, селезенки, лимфоидной ткани, ассоциированной с кишечником (GALT). Клеточный состав GALT голого землекопа впервые определен в настоящей работе. Кроме того, в работе были предложены оригинальные методы дифференцировки миелоидных клеток костного мозга in vitro, а также была впервые проведена оценка изменений экспрессионного и метаболического профилей макрофагов костного мозга голого землекопа при поляризации в про- и противовоспалительных условиях.

Теоретическая и практическая значимость работы

Несмотря на высокий интерес исследователей к механизмам старения и устойчивости к образованию опухолей у голых землекопов, взаимосвязь этих особенностей со строением, составом и физиологией иммунной системы не была достаточно полно изучена. Результаты настоящего исследования важны для понимания видоспецифичных особенностей иммунной системы голых землекопов в контексте адаптации вида.

Объектом исследования являлись взрослые особи голых землекопов (*H. glaber*), содержащиеся в конвенциональных условиях в лаборатории молекулярных механизмов старения НИИ ФХБ им. Белозерского (Москва, Россия) и лаборатории репродуктивной биологии института дикой природы (Берлин, Германия).

Методология и предмет исследования

При выборе методов исследования иммунной системы голого землекопа за основу были взяты стандартные, хорошо отработанные, иммунологические подходы к работе с

иммунными органами и клетками мышей. Так, в работе были использованы методики выделения иммунных органов, а также иммуноцитов из тканей с последующим цитофлуориметрическим анализом – как для поиска подходящих кросс-специфичных антител, так и для последующего анализа клеточного состава лимфоидной ткани голого землекопа. В качестве контроля в большинстве экспериментов использовали иммунные органы и клетки мыши.

Для изучения свойств миелоидных клеток голого землекопа за основу были взяты методы *in vitro*, разработанные для мыши: подсчет колониеобразующих единиц миелоидного ряда в полужидкой среде с метил-целлюлозой и дифференцировка макрофагов из культуры костного мозга. Были оптимизированы температурные условия и продолжительность ведения первичных культур. Так как физиологическая температура голых землекопов значительно ниже, чем у мыши, была произведена оценка влияния температуры на рост клеточных культур. На последующих этапах работы свойства макрофагов голого землекопа изучали в модели поляризации в про- и противовоспалительных условиях. Так, при помощи метаболических стресс-тестов были определены изменения в гликолизе и митохондриальном дыхании в макрофагах голого землекопа при поляризации. Кроме того, с помощью РНК-секвенирования было прослежено изменение экспрессионных профилей в макрофагах голого землекопа в ответ на стандартные стимулы. Наконец, была исследована продукция оксида азота клетками голого землекопа.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Иммунная система голого землекопа отличается от таковой у мыши на уровне органов и клеток. Лимфоидная ткань, ассоциированная с кишечником, является самым крупным вторичным лимфоидным органом голого землекопа за счёт более высокого абсолютного количества лимфоцитов собственной пластинки кишечника, чем у мышей.
2. В костном мозге и селезёнке голого землекопа наблюдается меньшее абсолютное количество клеток, однако увеличено процентное содержание CD11b+ CD14+ миелоидной популяции по сравнению с мышью.
3. Миелоидные клетки-предшественники голого землекопа в первичных культурах чувствительны к температуре.
4. Активированные макрофаги костного мозга голого землекопа увеличивают экспрессию провоспалительных генов и аэробный гликолиз, но в то же время

способны лучше поддерживать функциональную активность митохондрий по сравнению с макрофагами мыши и не производят оксид азота.

Достоверность результатов

Выводы исследования сделаны на основании общепринятых методов статистической обработки данных и по результатам постановки как минимум двух независимых экспериментов. В большинстве случаев было поставлено три и более независимых экспериментов.

Личный вклад автора

В настоящей работе было выполнено комплексное выявление особенностей иммунной системы голого землекопа по сравнению с мышами линии C57Bl/6. Личный вклад автора состоял в планировании, постановке и анализе экспериментов, анализе существующей литературы, составлении текста диссертации и публикаций. Секвенирование РНК и биоинформатический анализ был выполнен при участии сотрудников лаборатории сравнительной геномики и транскриптомики ИМБ им. В.А.Энгельгардта РАН. Скрининг антител на кросс-специфичность был произведен при участии лаборатории иммунохимии ФГБУ "ГНЦ Институт иммунологии" ФМБА России. Анализ уровня 3-нитротирозина и 4-гидрокси-ноненаля в лизатах клеток был проведен при участии лаборатории митохондриальной медицины ФГБУ "Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова".

Апробация результатов и публикации

- Горшкова Е.А., Губернаторова Е.О., Медведовская А.Д., Высоких М.Ю., Хольце С., Хильдебрандт Т.Б., Друцкая М.С., Недоспасов С.А. Об особенностях лимфоидной ткани голого землекопа. // Российский иммунологический журнал — 2019. — Т. 13, № 1, С 7-14.
- Braude S., Holtze S., Begall S., Brenmoehl J., Dammann P., del Marmol D., Gorshkova E., Henning Y., Hoeflich A., Höhn A., Jung T., Hamo D., Shebzukhov Y., Sumbera R., Miwa S., von Zglinicki T., Hildebrand T. Surprisingly long survival of pre-mature conclusions about naked mole-rat biology // Biological Reviews. — 2020. — Vol. 96. – P. 376-393. (обзор)
- Holtze S., Gorshkova E., Braude S., Cellerino A., Dammann P., Hildebrandt T.B., Hoeflich A., Hoffmann S., Koch P., Skulachev M., Skulachev V.P., Terzibasi Tozzini E. and Sahm

A. Alternative animal models of aging research // Frontiers in Molecular Biosciences. — 2021. — Vol. 8. — P. 660959. (обзор)

- Gorshkova E.A., Gubernatorova E.O., Dvorianinova E.M., Yurakova T.R., Marey M.V., Averina O.A., Holtze S., Hildebrandt T., Dmitriev A.A., Drutskaya M.S., Vyssokikh M.Y. and Nedospasov S.A. Macrophages from naked mole-rat possess distinct immunometabolic signatures upon polarization // Frontiers in Immunology. — 2023. — Vol. 14. — P.1172467.

Тезисы:

- Gorshkova E., Gubernatorova E., Vyssokikh M., Drutskaya M., Nedospasov S. Functional polarization of naked mole rat bone marrow-derived macrophages. 6th European Congress of immunology // European Journal of Immunology. Special Issue. — 2021. — Т. 51, Прил. 1. — С. 153.
- Горшкова Е.А., Медведовская А.Д., Высоких М.Ю., Хольце С., Хильдебрандт Т.Б., Друцкая М.С., Недоспасов С.А. Особенности строения лимфоидных органов голого землекопа // Acta Naturae. Спецвыпуск. II Объединенный научный форум.VI съезд физиологов СНГ.VI съезд биохимиков россии IX Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Сочи, Дагомыс, 1–6 октября 2019). Научные труды. Том 2. — М.: Издательство «Перо», 2019. — С.204.
- Горшкова Е.А., Высоких М.Ю., Хольце С., Хильдебрандт Т., Шебзухов Ю.В., Друцкая М.С., Купраш Д.В., Недоспасов С.А. Рост и дифференцировка первичной культуры костномозговых макрофагов голого землекопа зависят от температуры. // В поисках моделей персонализированной медицины. Сборник научных трудов V еждународной конференции «ПОСТГЕНОМ’2018» — Казань.: Издательство Казанского университета, 2018. – С.124.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Впервые вид *H. glaber* был описан в 1845 году немецким натуралистом Эдвардом Рюппелем, который отдельно отметил лишённую шерсти кожу этих животных. В середине 20-го века начинается активное исследование необычной биологии голого землекопа: так, сначала внимание учёных привлекает терморегуляция вида, живущего под землёй. Голые землекопы имеют низкую температуру тела, близкую к температуре окружающей среды, что нехарактерно для млекопитающих [1]. Кроме того, исследователи обращают внимание на социальное поведение голых землекопов. Благодаря работам Дж. Джарвис, Р. Александра, П. Шермана в 70-80-х годах была описана так называемая «эусоциальная» структура колоний: в группе присутствует только одна размножающаяся самка (королева), в то время как остальные особи, самки и самцы, выполняют роль рабочих – роют и охраняют тоннели, ищут еду, заботятся о новорожденных [2]. Значительно позже описание эусоциальной структуры было дополнено «дисперсерами» (dispersers) [3]. Этих особей отличает крупный размер и значительный запас бурого жира вне зависимости от пола. Считается, что дисперсеры способны к расселению и основанию новых колоний.

Благодаря интересу биологов к эусоциальности голые землекопы попали в лаборатории мира, откуда начался их триумфальный путь в биомедицинской науке. Длительное наблюдение и морфологический анализ тысяч особей показали, что голые землекопы обладают феноменально высокой для грызунов продолжительностью жизни (более 30 лет) и практически не страдают от «болезней старости» - онкологических и нейродегенеративных заболеваний, патологий костной ткани. Всего было описано менее десяти случаев новообразований у голых землекопов при числе вскрытий, исчисляемом тысячами [4, 5]. Наблюдаемые свойства быстро сделали голых землекопов крайне востребованной моделью в изучении механизмов старения.

На сегодняшний день нет исчерпывающего объяснения причин устойчивости голых землекопов к онкологическим заболеваниям. В ранних работах группы Селуанова и Горбуновой были приведены доказательства того, что клетки голого землекопа, с одной стороны, более чувствительны к сигналам микроокружения [6-8], а с другой стороны, более устойчивы непосредственно к трансформации онкогенами [6]. Второй результат был недавно опровергнут работой, в которой трансфецированные онкогенами клеточные линии голого землекопа могли формировать опухоли в иммунодефицитных мышах на уровне, сравнимом с трансформированными клетками из мыши [9]. Исходя из этого, можно предположить, что исключительно низкий уровень встречаемости новообразований у голого землекопа в большей степени обусловлен механизмами межклеточного

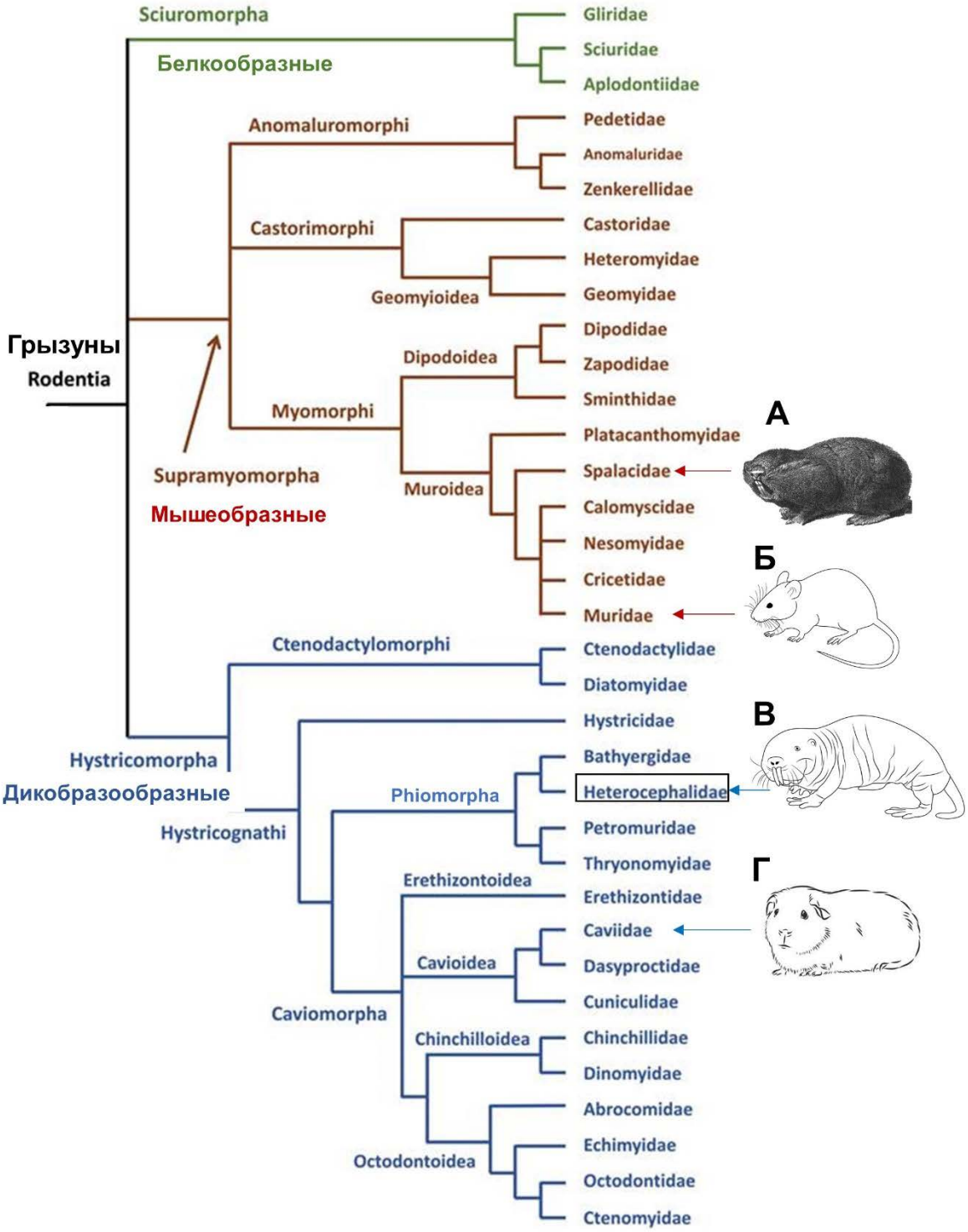
взаимодействия или иммунного контроля. Этот пример подчёркивает, что исследования необычной биологии голого землекопа активно развиваются, причём всё чаще подвергаются пересмотру ранее опубликованные работы.

В этой главе мы рассмотрим основные сведения о биологии вида *H. glaber* и более детально коснёмся эволюционных адаптаций вида и его иммунной системы.

1.1. Положение на филогенетическом дереве и экология вида *H. glaber*

Современная систематика отряда грызунов, к которому относится голый землекоп, отображена на Рисунке 1 [10]. Семейство *Heterocephalidae* входит в африканскую кладу *Phiomorpha* подотряда дикобразообразные (*Hystricognatha*). Второй кладой внутри подотряда, то есть близкими родственниками землекоповых, является южноамериканская фила *Caviomorpha,* в которую входят семейства свинковые и водосвинковые. Мышиные довольно далеко отстоят от землекоповых на филогенетическом дереве.

Африканские землекопы широко распространены по всей Африке к югу от Сахары и хорошо известны социальным поведением, которое демонстрируют голый землекоп (*H. glaber*) и дамарский пескорой (*Fukomys damarensis*) [11]. Все эти виды хорошо приспособлены к облигатно подземному образу жизни, хотя обитают в климатически различных областях: с разной географической высотой, режимом осадков и типом растительности. Также землекопы могут населять различные типы почв, от крупного песка до мелкой глины. Общим фактором, связывающим эти разрозненные места обитания, является присутствие геофитов - корней, клубнелуковиц и клубней растений, которые составляют основной рацион всех видов (также восполняя их потребности в жидкости). Для обнаружения и сбора подземных частей геофитов землекопы выкапывают обширные системы нор протяженностью в несколько километров [11]. Жилище голых землекопов состоит из нескольких «комнат», выполняющих функцию гнезда, хранилища пищи или туалета, соединенных тоннелями.



По D'Elía et al, 2019, с изменениями

Рисунок 1. Систематическое положение вида *H. glaber* и некоторых близких видов, исследуемых в лабораториях.

А – слепыш *Spalax galili*, устойчивый к развитию новообразований вид, неродственный голому землекопу; Б – мышь *Mus musculus*, наиболее полно изученный в иммунологии вид; В – голый землекоп *H. glaber*, самый долгоживущий вид грызунов; Г – морская свинка *Cavia porcellus*, наиболее близкородственный голому землекопу вид, изучаемый в лабораторных условиях.

1.2. Физиологическая адаптация голых землекопов к подземному образу жизни

Голый землекоп обладает множеством необычных для млекопитающих свойств: эусоциальность, высокая продолжительность жизни, гетеротермия, невосприимчивость к боли, способность к фруктолизу в условиях аноксии. В поисках ответа на вопрос, как столько уникальных особенностей физиологии могло закрепиться у одного вида, исследователи сходятся во мнении, что отправной точкой в эволюции вида являлся переход предков голого землекопа к обитанию под землей [12, 13]. Подземная экологическая ниша обладает уникальной стабильностью, ей присущи отсутствие суточных и годовых колебаний температуры и освещённости. У подземных организмов меньше естественных врагов-хищников. Вместе с этим, основными проблемами жизни под землёй становятся поиск пищи, а также необходимость эффективно преобразовывать сравнительно твёрдую среду, например, для строительства нор. Также для подземной экологической ниши характерен плохой газообмен.

Геном голого землекопа впервые был опубликован в 2011 году [14] и затем уточнен в 2014 [15] и 2020 [16], став источником большого количества гипотез о механизмах, лежащих в основе адаптации голого землекопа, некоторые из которых в дальнейшем подтвердились экспериментально.

1.2.1. Эусоциальная структура колоний

В 60-х годах термин «эусоциальность» был предложен в отношении организации сообществ насекомых. Так, в колониях эусоциальных насекомых (муравьев, пчёл, термитов) наблюдались характерные признаки: разделение особей на фертильных и стерильных рабочих, сосуществование нескольких взрослых поколений и коллективная забота о потомстве. Голый землекоп - первый вид млекопитающих, для которого был использован термин «эусоциальный» [17]. Группы голых землекопов стали называть колониями по аналогии с насекомыми. Более подходящий биологический термин для описания сообщества голых землекопов - «семья», несмотря на порой внушительный размер (до 80 особей). Внутри такой семьи наблюдаются признаки эусоциальности: репродуктивный альтруизм, пересечение взрослых поколений и пожизненная филопатрия большинства потомков.

Согласно гипотезе Джарвиса, эусоциальность африканских землекопов возникает как приспособление для совместного поиска пищи в среде с рассредоточенными пищевыми ресурсами [18]. Возможные генетические предпосылки эусоциальности были выявлены при анализе геномов 9 видов африканских землекопов: так, следы положительного отбора

были обнаружены в гене *Avpr1a,* кодирующем рецептор вазопрессина 1a, роль которого в формировании привязанности к партнеру была показана для полёвок. В этой работе также отмечали ген *Cd38,* кодирующий поверхностную АДФ-рибозилциклазу и гидролазу цАДФ-рибозы, участвующие не только в воспалении, но и в регуляции окситоцина [13]. Кроме того, ранее было показано участие пролактиновой системы в формировании социальных связей в семьях голого землекопа [19].

В колонии голых землекопов, как правило, присутствует одна фертильная самка – королева. Королева отличается от других особей морфологически – имеет удлиненное тело за счет роста поясничного отдела позвоночника при переходе в статус королевы [20]. Предполагается, что удлинение тела помогает самке вынашивать беременности. Обычно беременность у голых землекопов длится около 70 дней, рождается в среднем 12 потомков [21]. В зачатии потомства принимает участие, как правило, один фертильный самец (паша), все остальные особи в колонии – рабочие, выполняющие различные функции: строительство и поддержание тоннелей, поиск пищи, охрана границ от хищников, забота о новорожденных. При этом способность к размножению у рабочих самок подавляется гормонально – у них нет циклического изменения прогестерона и наблюдаются низкие уровни лютеинизирующего гормона (LH), что говорит об отсутствии овуляции. Считается, что агрессивное поведение королевы индуцирует стресс у рабочих, что и приводит к нарушению выработки гонадотропин-высвобождающего гормона (GnRH), регулирующего LH. При этом, в случае гибели королевы, любая из подчиненных самок может занять ее место, так как гормональный блок с репродуктивной системы снимается [2]. Стерильность рабочих самцов также поддерживается за счет глюкокортикоидов [22].

Таким образом, внутри одной колонии все особи являются потомками одной пары. Из-за этого долгое время в науке существовало убеждение, что голые землекопы - высокоинбредный вид [23], что могло бы объяснять довольно стремительное накопление молекулярных адаптаций, определяющих уникальные черты физиологии. Однако этот взгляд был пересмотрен после описания ещё одной особенной группы в сообществе голых землекопов – дисперсеров [3]. Дисперсеры крупнее обычных рабочих особей за счет накоплений бурого жира, мало задействованы в поддержании тоннелей и обычно активны в ночное время, кроме того, у них обнаруживается повышенный уровень LH в крови [24]. В дикой природе дисперсеры выполняют функцию захвата новой территории: при этом, для основания новой колонии и размножения дисперсеры предпочитают партнёров из других колоний.

Зная об этих особенностях размножения голых землекопов, такие эволюционные приспособления как высокая продолжительность жизни и устойчивость к онкологическим заболеваниям можно логически связать с переходом к подземному образу жизни. Так, эволюционный успех отдельной колонии зависел от того, насколько много у неё появится потомственных колоний, которые могли возникать только в случае успешного спаривания дисперсеров. Иными словами, колония была тем успешнее, чем больше дисперсеров производила – поэтому предпочтительным становилось долгое выживание и репродуктивное здоровье фертильных особей (королевы и паши), и отбор мог пойти по этому пути. В недавней работе было установлено, что особи более высокого социального ранга имеют более крупную селезёнку – вторичный лимфоидный и кроветворный орган [25]. Таким образом, нельзя исключить, что особенности социального поведения имеют прямое влияние на физиологию иммунной системы голых землекопов.

1.2.2. Высокая продолжительность жизни и замедленное старение

У млекопитающих продолжительность жизни практически всегда коррелирует с размером тела [26]. Максимальная продолжительность жизни голого землекопа - 37 лет [27], то есть намного превосходит прогнозируемую на основе корреляции с массой тела (~30 грамм). На сегодняшний день лишь небольшое число лабораторий и зоопарков содержат колонии голых землекопов на протяжении более 40 лет, поэтому не исключено, что максимальный наблюдаемый возраст будет увеличиваться и дальше.

Старение – процесс постепенной утраты репаративных и репродуктивных функций организма, который в конечном счете приводит к увеличению риска смерти с возрастом [28]. При анализе исторических данных о продолжительности жизни более 3200 особей голого землекопа был сделан вывод о том, что вероятность смерти животных не увеличивается с возрастом, поэтому в отношении *H. glaber* было предложено использовать термин «нестареющие млекопитающие» (negligible senescence) [29]. С другой стороны, обобщение, сделанное на основе закона Гомпертца, опровергается большей частью литературы. Даже в одной из первых работ о необычном долголетии голого землекопа [30], отмечается, что «старые голые землекопы менее активны, чем молодые особи… их кожа намного светлее, тоньше, и менее эластична». Более того, можно отследить молекулярные признаки старения, например, в печени голого землекопа с возрастом снижается активность специфических путей детоксикации, как у человека и мыши [31]. Недавно для голого землекопа были предложены «эпигенетические часы» [32], то есть набор характеристических геномных сайтов, метилирование которых изменяется с возрастом. Сама возможность обнаружения таких сайтов свидетельствует о том, что ткани голого

землекопа подвержены старению, однако, «скорость эпигенетических часов» у голого землекопа ожидаемо ниже, чем у мыши [33]. Интересно, что между органами голого землекопа также были обнаружены различия в скорости изменения паттернов метилирования ДНК в зависимости от возраста, из чего можно сделать вывод, что некоторые органы (например, кожа) лучше защищены от молекулярного старения. Анализ транскриптомов единичных клеток показал, что клетки эпидермиса, а также стволовые клетки кожи, практически не отличаются у молодых и старых животных, однако в предшественниках кератиноцитов старых особей наблюдается видоспецифичная активация гомеостатического гена *Igfbp3*. Скорость закрытия кожных ран при их экспериментальном нанесении также была сопоставима у молодых и старых особей [27]. Другой механизм защиты клеток от старения связывают с повышенными экспрессией β-катенина и содержанием холестерина в фибробластах голого землекопа. При подавлении экспрессии β-катенина путем РНК-интерференции, в фибробластах нарушался липидный обмен, замедлялась пролиферация и клетки приобретали «стареющий» фенотип [34].

Таким образом, у голого землекопа были обнаружены как молекулярные признаки старения, так и механизмы противостояния их развитию, что свидетельствует скорее о замедленном начале старения голых землекопов, но не полном его отсутствии.

1.2.3. Устойчивость к новообразованиям и противоопухолевые механизмы

Одной из первых гипотез о механизмах устойчивости голого землекопа к новообразованиям являлось предположение о том, что клетки голого землекопа более чувствительны к сигналам микроокружения [6, 7], в связи с чем при достижении определенной плотности запускается программа остановки клеточного цикла, которая, в свою очередь, имеет дополнительные видоспецифичные свойства, повышающие эффективность и надёжность остановки клеточного цикла [8].

Контактное торможение (contact inhibition) - свойство большинства нормальных адгезивных клеток. Когда клетки вступают в тесный контакт друг с другом, они перестают делиться и образуют плотный монослой. Опухолевые клетки, напротив, теряют это свойство. В ранних работах было показано, что фибробласты голого землекопа останавливают пролиферацию до образования плотного монослоя, типичного для фибробластов других видов, – этот феномен был назван «ранним контактным ингибированием» (early contact inhibition, ECI) [6]. Раннее контактное ингибирование было ассоциировано с активацией ингибитора циклин-зависимых киназ (CDK) p16, в то время как обычное контактное торможение в клетках человека или мыши зависит от p27 [35]. Для

полной утраты контактного ингибирования у голого землекопа было необходимо выключение обоих генов: *Cdkn2a*, кодирующего p16, и *Cdkn1b*, кодирующего p27. Помимо этого, у голого землекопа была обнаружена новая сплайсоформа продукта *Cdkn2a-Cdkn2b*, представляющая собой слитые первый экзон p15 со вторым и третьим экзонами p16 (pALT). pALT действует как ещё один ингибитор CDK, добавляя новый уровень контроля клеточного цикла клеток голого землекопа [8]. Несмотря на объективность наблюдений об особенностях организации генов ингибиторов CDK у голого землекопа, само существование «раннего контактного ингибирования» подвергалось критике из-за плохой воспроизводимости [36].

В оригинальной работе Tian *et al* (2013)[7] предполагалось, что активация ареста клеточного цикла зависит от взаимодействия гиалуроновой кислоты высокой массы с рецептором CD44, потому что при блокировке рецептора или изъятии из среды гиалуронана раннего контактного ингибирования *in vitro* не происходило. Гиалуроновая кислота - линейный глюкозаминогликан, составляющий основной небелковый компонент внеклеточного матрикса. В недавней работе с помощью атомно-силовой микроскопии было показано, что гиалуроновая кислота, выделенная из тканей голого землекопа, имеет сверхспирализацию и гелеобразное состояние, существенно отличаясь по структуре от выделенной из кожи человека [37]. Кроме того, в коже, мышцах и лимфоузлах голого землекопа наблюдается большая концентрация гиалуроновой кислоты, чем в тканях мыши и морской свинки [36]. Самое очевидное назначение необычного гиалуронана голого землекопа – поддержание эластичности и репаративных свойств кожи, что является приспособлением к активному рытью почвы. Необычные свойства гиалуроновой кислоты у голого землекопа обусловлены генетическими факторами: так, ген гиалуронансинтазы 2 (*Has2*) имеет уникальные замены в нуклеотидной последовательности, кроме того, ферменты, расщепляющие гиалуронан – гиалуронидазы - имеют сниженную активность в тканях голого землекопа [36, 38]. Так как для гиалуроновой кислоты помимо структурных функций известна роль в регуляции межклеточной коммуникации [39], возникла гипотеза, что специализированный гиалуронан голого землекопа может поддерживать противоопухолевые свойства микроокружения в тканях. Прямые эксперименты, в которых продукцию гиалуроновой кислоты в клетках голого землекопа подавляли посредством блокировки гиалуронан-синтазы 2 или сверхэкспрессии гиалуронидаз, показали, что клетки становятся склонными к образованию опухолей на фоне введения трансформирующего вектора SV40LT. При неизмененной продукции гиалуронана клетки были устойчивы к трансформации с использованием комбинации онкогенов [7]. С другой стороны, недавнее

исследование опровергает эти наблюдения: клетки голого землекопа, трансфецированные онкогенами SV40LT и HRAS, доставленными в составе более эффективных векторов, чем в оригинальной работе [7], могли как формировать колонии в агаре, так и образовывать опухоли в иммунодефицитных мышах, на уровне, сравнимом с трансформированными клетками из мыши [9]. Интересно, что сам по себе опухолевый супрессор p53 голого землекопа обладает необычными свойствами: высокой стабильностью, опосредованной неизвестными регуляторными белками-партнерами, и ядерной локализацией вне зависимости от индукции клеточного стресса [40].

Клетки голого землекопа частично устойчивы к репрограммированию индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC) и плохо формируют тератомы, что исследователи объясняют крайне стабильным эпигеномом [41]. Таким образом, высокий эпигенетический барьер, вероятно, также вносит вклад в устойчивость голого землекопа к опухолям.

Другим механизмом, который может способствовать устойчивости голого землекопа к новообразованиям, является высокоточный синтез белка. У голого землекопа и некоторых родственных видов была обнаружена уникальная форма 28S рРНК, несущая разрывы в регионе D6, что коррелировало с меньшей частотой «ошибок» при трансляции [42]. В настоящее время считается, что точность трансляции в клетках голого землекопа определяется не только уникальной 28S рРНК, но и рядом мутаций в молекулярном каскаде Akt/mTOR, контролирующем трансляцию [43].

Итак, гипотетические механизмы возникновения устойчивости голого землекопа к образованию опухолей были предложены на основании свойств фибробластов, изучаемых *in vitro*, поэтому вопрос о том, как они соотносятся с низкой встречаемостью неоплазий у голого землекопа в разных тканях *in vivo,* пока далек от решения. Кроме того, в исследованиях устойчивости голого землекопа к новообразованиям отсутствуют сведения об участии иммунной системы в противоопухолевой защите.

1.2.4. Метаболизм, устойчивость к аноксии, гипоксии, гиперкапнии

Метаболизм голых землекопов хорошо приспособлен к обитанию под землей и адаптирован к низким уровням кислорода (гипоксии) или полному его отсутствию (аноксии), а также высоким уровням углекислого газа (гиперкапнии). Существенное изменение содержания кислорода и углекислого газа может происходить при скоплении животных в гнезде, в то же время в тоннелях уровни кислорода сравнимы с атмосферными [44], поэтому метаболические адаптации голого землекопа позволяют этим животным не

только выдерживать высокие уровни гипоксии, но и относительно быстро переходить к нормоксии. Примечательно, что в условиях гипоксии потребление кислорода, частота сердцебиения и дыхания у голого землекопа замедляются, но поведение при этом не меняется – животное остается активным. У большинства других устойчивых к гипоксии млекопитающих, стресс, наоборот, вызывает замирание на фоне сниженного до минимума обмена веществ.

В нормальных условиях основным источником энергии в тканях голого землекопа являются жирные кислоты [31]. При гипоксии (3-8% O_2) в крови голых землекопов снижается потребление кислорода [45, 46], но повышается уровень глюкозы и поддерживается стабильный уровень АТФ, что может свидетельствовать о переходе к более активному гликолизу. С другой стороны, pH большинства тканей не изменяется, что не характерно для гликолиза. Повышение уровня лактата обнаруживается только в сердце [47]. Возможно, голые землекопы используют анаэробный метаболизм во время гипоксии, но особые буферные свойства ткани и крови маскируют метаболический ацидоз, либо его последствия быстро нивелируются путем синтеза глюкозы и гликогена из лактата при реоксигенации [45]. По другой гипотезе накопления лактата в тканях голого землекопа при стрессе не происходит, благодаря жёсткому сопряжению гликолиза и окислительного фосфорилирования [48].

Было показано, что голые землекопы могут выживать без кислорода в течение 18 минут, при этом в жизненно важных органах (мозге, почках) запускается фруктолиз [49]. В условиях аноксии в ткани мозга голого землекопа повышается уровень фруктозы, а также экспрессии переносчика фруктозы – GLUT5. Предполагается, что кетогексокиназа (КНК), при помощи которой фруктоза преобразуется в дигидроацетон-фосфат на первой стадии фруктолиза, не восприимчива к обратной негативной регуляции продуктами гликолиза (АТФ, лактатом), в связи с чем может поддерживать продукцию АТФ в условиях длительного дефицита кислорода.

Механизмы, помогающие поддерживать необходимые уровни энергии в условиях гипоксии, также задействованы в контроле продукции активных форм кислорода (АФК). Так, у голого землекопа описаны митохондриальные механизмы [50], предотвращающие избыточную поляризацию клеток, ведущую к образованию АФК в норме [51] и при гипоксии [46]. Касательно других механизмов защиты от АФК у голого землекопа, данные противоречивы: например, в ткани сердца голого землекопа показано увеличение уровня глутатиона по сравнению с мышью [47], повышенная экспрессия фактора Nrf2 и глутатион-трансферазы (GST)[52], в то время как большинство других работ указывает на низкую

активность глутатион-редуктазы и низкое соотношение GSH/GSSG в тканях голого землекопа по сравнению с мышью [53]. Примечательно, что в тканях наблюдаются признаки окислительного стресса, а именно, накопление продуктов окисления белков и жиров – карбонилированные белки и реактивные соединения тиобарбитуровой кислоты (TBARS) [51], как будто бы голые землекопы на самом деле подвержены большему окислительному стрессу [54]. С другой стороны, уровни этих молекул у голых землекопов довольно стабильны в течение, как минимум, 12 лет жизни, хотя они сильно увеличиваются при старении у мышей [51]. Большая часть исследователей склоняется к тому, что наблюдаемые высокие уровни окислительного стресса в тканях голого землекопа компенсированы большей устойчивостью к клеточной смерти, вызываемой АФК [55, 56], специфическим составом мембран [57] и, вероятно, свойствами гиалуроновой кислоты высокой массы [36].

Помимо дефицита кислорода в гнёздах голого землекопа наблюдается избыток метаболического углекислого газа, медленно диффундирующего из их подземных жилищ. В основу гипотезы о том, что у голых землекопов нарушена рецепция углекислоты на уровне нервной системы легло наблюдение слабого вентиляционного ответа на гиперкапнический стимул у этих животных [58]. Кроме того, голые землекопы не чувствительны к ряду болевых стимулов из-за адаптации системы периферической нейротрансмиссии на молекулярном уровне. Так, у голых землекопов отсутствует субстанция Р в кожных нейронах [59, 60], а также продуцируется особая форма нейронального траспортера натрия Na(V)1.7, участвующего в сенситизации болевых рецепторов С-типа [61]. Интересно, что после внутрибрюшинной инъекции экзогенной субстанции Р у голых землекопов восстанавливается реакция на гиперкапнию и вентиляционный ответ [62].

Суммируя вышесказанное, можно сделать вывод, что голый землекоп – крайне устойчивый к гипоксии вид млекопитающих. Адаптация метаболизма сахаров и особенности контроля митохондриальных АФК позволяют голым землекопам поддерживать жизнеспособность тканей как при кислородном голодании, так и при реоксигенации. Отметим, что в последние годы в исследованиях иммунитета все большее место занимает клеточный метаболизм [63]. Как правило, покоящиеся или выполняющие гомеостатические функции иммунные клетки используют окислительное фосфорилирование или окисление жирных кислот для продукции АТФ и окислительно-восстановительных коферментов. Активация приводит к переходу иммунных клеток на гликолиз, как основной источник энергии, ремоделированию цикла Кребса и накоплению

метаболитов, которые, в свою очередь, могут способствовать реализации воспалительных функций. В связи с этим гипоксия – важнейший фактор, участвующий в формировании функционального фенотипа иммунных клеток [64]. Существуют данные о повышении базовых уровней HIF1-α [65] и NRF2[52] в тканях голого землекопа – оба фактора играют важную роль в регуляции метаболизма иммунных клеток при воспалении. Таким образом, адаптации голого землекопа к кислородному голоданию могут оказывать влияние на работу иммунной системы.

1.2.5. Терморегуляция и теплообмен

Характерная температура тела голых землекопов - 32-33 ^{o}C. Голый землекоп считается гетеротермным млекопитающим из-за его неспособности поддерживать постоянную температуру тела в широком диапазоне температур окружающей среды (T_a) [66]. С другой стороны, эти животные избегают переохлаждения за счет физической активности и социального поведения [2]. Одна из гипотез о причинах возникновения такой необычной черты предполагает, что низкая температура тела связана с адаптацией вида к освоению экологической ниши и строительству подземных тоннелей [67]. При интенсивной мышечной работе животное нагревается, но при этом не может эффективно рассеивать тепло из-за высокой влажности в тоннелях. В ходе эволюции у голых землекопов закрепляются особенности, помогающие отведению тепла – в первую очередь, отсутствие шерсти и подкожного жира. Кроме того, при анализе генома *H.glaber* были обнаружены уникальные мутации в гене *Ucp1*, кодирующем термогенин, участвующий в процессе несократительного термогенеза в буром жире [14]. В дальнейшем участие этих мутаций в формировании фенотипа гетеротермии не было до конца подтверждено – голые землекопы способны к термогенезу при температурах от 20 до 30 ^{o}C [68]. Вероятно, низкая температура тела является «платой» за экстраординарно высокую способность к рассеиванию тепла [67].

Известно, что повышение температуры – это один из древнейших иммунных механизмов борьбы организма с инфекциями. Показано как прямое влияние повышения температуры на стабильность вирусных или бактериальных белков, так и множество эффектов температуры на функции клеток врожденного и адаптивного иммунитета [69]. Максимальная температура, которую фиксировали в буром жире голого землекопа при стимуляции бета-3-адренорецепторов достигала примерно 35°C [68], и не известно, способен ли организм *H.glaber* развивать более высокие температуры при инфекциях. Поэтому можно ожидать, что иммунитет голого землекопа имеет дополнительные

приспособления для того, чтобы осуществлять эффективную защиту в условиях гетеротермии.

1.3. Иммунная система голого землекопа

Несмотря на значительный интерес исследователей к механизмам устойчивости к новообразованиям, высокой продолжительности жизни и метаболическим адаптациям голого землекопа, до недавнего времени в литературе было мало сведений об иммунной системе этого вида. По всей видимости, дефицит работ был связан с отсутствием экспериментальных протоколов и иммунологических реагентов, позволяющих изолировать и фенотипировать иммунные клетки голого землекопа. Однако с появлением высокопроизводительных методов анализа единичных клеток, не требующих использования специфичных к тканям голого землекопа антител, – секвенирования транскриптомов единичных клеток (scRNA-seq) - область начала активно развиваться. Рассмотрим историю изучения иммунной системы голого землекопа.

1.3.1. Кроветворение и лимфоидные органы

Довольно давно было показано, что голые землекопы имеют «типичное разнообразие лейкоцитов крови»[70, 71]. Однако анатомическое описание структуры лимфоидных органов оставалось достаточно скудным, например, было известно, что лентовидная селезёнка, типично расположенная для грызунов, способна к экстрамедуллярному кроветворению, при этом другие кроветворные и лимфоидные органы оставались вне фокуса внимания исследователей.

Несколько работ, включая настоящую, сообщают о более низком содержании клеток в костном мозге голых землекопов по сравнению с мышью [25, 72]. Было проведено исследование транскриптомов единичных клеток костного мозга голого землекопа, отсортированных по экспрессии маркеров CD11b, CD34, and Thy1. Примитивные стволовые клетки крови (HSPC) голых землекопов экспрессировали CD34, как и у приматов. Транскриптом HSPC был обогащен генами, ассоциированными с адипогенезом, гомеостазом холестерина и окислением жирных кислот, однако в метаболических стресс-тестах стволовые клетки крови голого землекопа демонстрировали «покоящийся» фенотип, а при микроскопии в них было охарактеризовано «полярное» расположение тубулина. Все перечисленные особенности фенотипа HSPC голого землекопа были сходны между молодыми и старыми особями, что можно интерпретировать как замедленное старение гемопоэтической системы [72].

Анализ клеточного состава костного мозга голых землекопов при помощи scRNA-seq показал большее количество гранулоцитов и их предшественников, а также сниженное – для В-клеток и их предшественников, по сравнению с мышью. Кроме того, в костном мозге голого землекопа эритропоэз был выражен ярче, чем мегакариоцитопоэз, что коррелировало с меньшим количеством тромбоцитов в крови голого землекопа, по сравнению с мышью [72].

1.3.2. Чувствительность к вирусным инфекциям

Наиболее ранние сообщения о работе иммунной системы голого землекопа касались случаев крайней чувствительности голого землекопа к вирусным инфекциям. В первом случае экспериментальное заражение рекомбинантным вирусом простого герпеса первого типа (HSV1), непатогенного для мыши, вызывало 100% гибель голых землекопов, при этом динамика развития заболевания и гистопатологическая картина при летальной инфекции HSV1, наблюдаемая у голых землекопов, была сходна с таковыми у людей с иммунодефицитом или находящихся на иммуносупрессивной терапии [73]. В другой работе было описано заражение колоний голых землекопов коронавирусом, которое привело к гибели более 60% рабочих особей [74]. Эти наблюдения легли в основу гипотезы о том, что у голых землекопов скомпрометирована работа противовирусных механизмов, и возможно, подавлена соответствующая ветвь иммунитета. Интересно, что в более поздней работе Emmrich *et al*. [72], было показано, что HPSC голого землекопа практически не отвечают на активацию полиинозиновой-полицитидиловой кислотой (поли (I:C)), моделирующей вирусную инфекцию.

1.3.3. Врождённый иммунитет

Эффективность работы антибактериальных механизмов врожденного иммунитета косвенно подтверждается способностью голого землекопа контролировать микрофлору [75, 76] и производством высокоактивных противомикробных пептидов [77]. Также сообщалось о более высокой продукции провоспалительных факторов и способности к фагоцитозу у активированных бактериальным липополисахаридом (LPS) макрофагов голого землекопа по сравнению с мышиными [78]. В период 2019-2022 годов при помощи технологии scRNA-seq был охарактеризован клеточный состав селезенки, крови и костного мозга [72, 79]. Одно из самых важных наблюдений этих работ - преобладание миелоидного компартмента иммунной системы в селезёнке у голого землекопа - совпадающее с результатами как настоящей работы, так и других, выполненных классическими иммунологическими методами [25, 80, 81]. С другой стороны, благодаря

транскриптомному анализу удалось не только описать разнообразие клеточного состава некоторых лимфоидных органов, но больше узнать о функциях конкретных типов иммунных клеток. Так, у голых землекопов, которым внутрибрюшинно вводили LPS, в селезёнке были зафиксированы высоко экспрессирующие лактоферрин нейтрофилы, в то время как у мышей популяция LPS-зависимых нейтрофилов со сходным транскриптомом не детектировалась. Наличие высокоактивных миелоидных клеток хорошо согласуется с гипотезами о том, что врожденный иммунитет голого землекопа эффективно отвечает на антигены бактериальной природы.

Другим важным наблюдением оказалось отсутствие популяции NK-клеток или клеток, обладающих похожим на NK-клетки мыши транскрипционным профилем [79]. В норме NK-клетки отвечают за элиминацию инфицированных вирусами или трансформированных клеток, поэтому отсутствие данной популяции не согласуется с феноменальной устойчивостью *H.glaber* к развитию новообразований, но может объяснять чувствительность к вирусным инфекциям.

1.3.4. Утрата NK-клеток

У млекопитающих рецепторы NK-клеток кодируются двумя генными комплексами: рецепторным комплексом лейкоцитов (LRC), который содержит преимущественно иммуноглобулиноподобные рецепторы – KIR, и рецепторным комплексом NK-клеток (NKC), который содержит преимущественно лектин-подобные рецепторы - Ly49 (*Klra*), Cd94 *(Klrd*) и Nkg2 (*Klrc*) [82]. Чтобы выяснить, связано ли отсутствие у голого землекопа клеток, соответствующих по транскрипционному профилю классическим NK, с изменениями в его геноме, был проведен сравнительный анализ генных комплексов LRC и NKC у голого землекопа, человека, мыши и морской свинки. Оказалось, что число KIR-генов у голого землекопа и морской свинки редуцировано, что контрастирует с LRC человека и других приматов. Кроме того, у голого землекопа обнаруживается по одному гену *Ly49* (гомолог Klra1 - LOC101714034), *Cd94* и *Nkg2a* в NKC. Семейство генов *Ly49* в NKC у мыши, напротив, увеличено [79]. Таким образом, на уровне генома характерные для NK-клеток рецепторы у голого землекопа не полностью утрачены, но, по всей видимости, их экспрессия происходит в других клеточных популяциях, отличных от классических NK-клетках мыши.

Действительно, согласно данным секвенирования гомолог *Cd94* голого землекопа экспрессируется на низком уровне, но в основном на CD8 Т-клетках. Интересно, что экспрессия гомолога *Cd94* обнаруживается также в макрофагах красной пульпы селезенки

[79]. Перитонеальные макрофаги голого землекопа могут активироваться в результате взаимодействия с антителами против NK1.1 (*Klrc1*) мыши [80].

Примечательно, что архитектура семейств генов рецепторов NK-клеток у морских свинок в целом сходна с голым землекопом, так что изменение NK-клеточной ветви может быть свойством всей филогенетической клады *Caviomorpha*. При этом у морских свинок, наряду с капибарами, выделяют популяцию атипичных моноцитов с NK-подобной активностью - клетки Фоа-Курлоффа [83], чьей отличительной чертой является наличие эксцентрического ядра с единичным включением, окрашиваемым реактивом Шиффа. У голых землекопов подобной популяции пока не было обнаружено.

1.3.5. Приобретённый иммунитет

Транскриптомный анализ показал снижение доли B-клеток в селезенке голого землекопа [79], а согласно цитометрическим данным содержание цитотоксических CD8-положительных клеток также уменьшено [81], что может указывать на меньшую представленность клеток адаптивного иммунитета в лимфоидных органах голого землекопа. С другой стороны, значимых отклонений в работе первичных лимфоидных органов или потери генов, ассоциированных с развитием T- и B-клеток у голого землекопа, не выявлено [72, 84]. Более того, предварительные данные scRNA-seq тимуса голого землекопа указывают на то, что маркеры цитотоксических клеток ассоциированы в большей степени с CD4-положительными, а также с γδ T клетками [84].

Тем самым, несмотря на наблюдаемый в последние два года взрыв транскриптомных исследований на уровне единичных клеток, знания об иммунной системе голого землекопа пока недостаточно интегрированы в общую картину биологии вида. Вероятно, действие специфической патогенной нагрузки, а также внутренних факторов, в первую очередь, адаптации метаболизма и сенсорных систем голого землекопа, сформировало те особенности иммунитета (увеличение значимости миелоидных популяций и перестройка ролей разных типов лимфоцитов) которые в настоящий момент параллельно изучаются несколькими научными группами.

С учетом вышеизложенного в представленной работе были поставлены как технические задачи – подбор и валидация новых молекулярных инструментов для исследования иммунитета голого землекопа, так и биологические – закрытие пробелов в знаниях на органном уровне, поиск возможной связи между такими особенностями, как гетеротермия и устойчивость к гипоксии и функциями миелоидных клеток (Рис. 2). Глобальной перспективой дальнейших исследований иммунной системы голого землекопа

станет описание механизмов, участвующих в поддержании высокой продолжительности жизни и устойчивости к опухолеобразованию, которые в будущем смогут предложить новые стратегии для биомедицины.

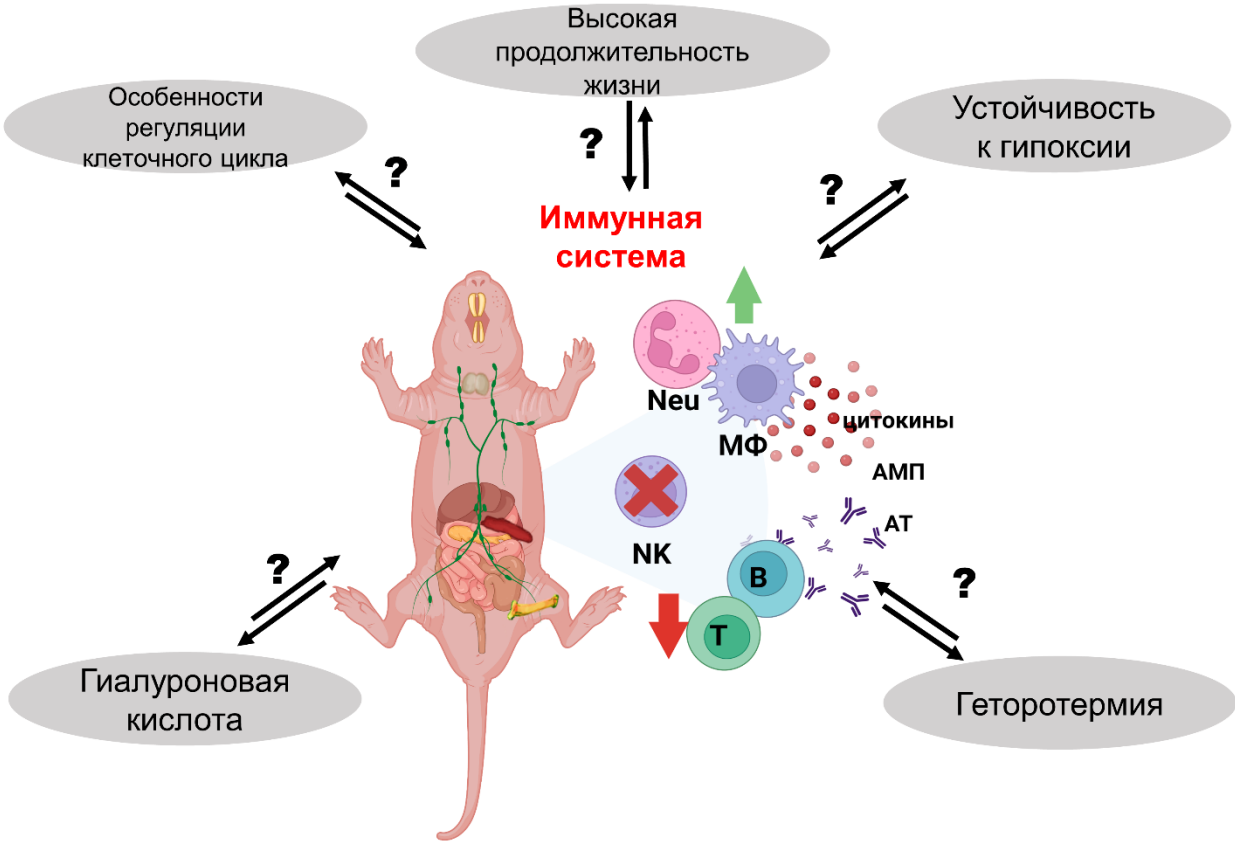


Рисунок 2. Иммунная система голого землекопа в контексте эволюционной адаптации к подземному образу жизни.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Голые землекопы

В работе были использованы образцы половозрелых рабочих особей голого землекопа возраста от 3 месяцев до 6 лет, полученных из колоний института зоологии и дикой природы Лейбница (Берлин, Германия), а также колонии института НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ. За время работы была проведена некропсия 60 животных (Приложение, Таблица 7). В ходе вскрытий, как правило, биологический материал отбирался не только для иммунологических исследований, но также и для ряда других.

2.2. Мыши

В качестве контроля была использована группа половозрелых мышей линии C57Bl/6 в возрасте 2-6 месяцев, полученных из питомника лабораторных животных «Пущино». Мышей содержали в чистой комнате лаборатории молекулярных механизмов иммунитета ИМБ им. Энгельгардта РАН, либо в Автономном экспериментально-биологическом комплексе для временного размещения и исследования генетически модифицированных линий лабораторных мышей категории SPF (виварий) ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН. В некоторых экспериментах были использованы мыши конвенционального статуса, приобретенные в зоомагазине и содержавшиеся не более одних суток в изолированной от вивария лабораторной комнате под вытяжкой.

2.3. Выделение клеток из тканей первичных и вторичных иммунных органов

Для оценки морфологии и клеточного состава использовали грудной тимус, костный мозг, селезенку, а также клетки собственной пластинки кишечника голого землекопа и мыши.

2.3.1. Выделение клеток костного мозга

Для получения костного мозга у голого землекопа и у мыши выделяли кости конечностей, очищали от окружающих тканей, на несколько секунд помещали в 70% этиловый спирт, затем кости в стерильной среде DMEM переносили в ламинарный шкаф. При помощи ножниц и пинцета удаляли эпифизы костей, затем выдували содержимое 5-10 мл PBS (Phosphate buffered saline, натрий-фосфатный буфер) и пипетировали для получения одноклеточной суспензии. После этого небольшой объем суспензии осаждали, осуществляли лизис эритроцитов в буфере АСК (0,15 М NH_4Cl, 0,01 М $KHCO_3$, 0,0001 Na_2ЭДТА) и проводили подсчет клеток в камере Горяева при окрашивании трипановым

синим. Для анализа методом проточной цитометрии отбирали не более 500 тыс клеток, оставшиеся клетки использовали в других опытах *in vitro*.

2.3.2. Выделение нейтрофилов костного мозга

Для отделения фракции зрелых нейтрофилов применяли метод градиентного центрифугирования. Готовили растворы Перколла (Percoll PLUS, GE Healthcare, США) 78%, 69% и 52%, и наслаивали по 3 мл каждого раствора (от большей концентрации к меньшей) в 15 мл пробирках. Сверху на градиент Перколла наслаивали 2-3 млн клеток костного мозга голого землекопа или мыши, после чего пробирки центрифугировали при ускорении 1500g и комнатной температуре с плавным торможением центрифуги. Фракции клеток, оказавшиеся на границе 78% и 69% Перколла, а также 52%/69% Перколла, собирали пипеткой, отмывали центрифугированием в PBS с 2% фетальной бычьей сыворотки (FBS, «Capricorn Scientific», Германия), и ресуспедировали осадок клеток в среде RPMI 1640 с добавлением 2 mM L-глутамина («Capricorn Scientific», Германия) и антибиотиками PenStrep («Gibco», США) и 5% FBS. Клетки анализировали методами проточной цитометрии или световой микроскопии.

2.3.3. Выделение периферических мононуклеаров крови

Так как прижизненный забор крови у голых землекопов затруднен, для выделения периферических мононуклеаров крови проводили посмертный забор крови из левого желудочка сердца. У мышей кровь собирали тотально из щечного синуса. С учётом большого объема забора крови, а также локализации в большом круге кровообращения сразу после сердца, образцы крови мыши считали аналогичными образцам крови голого землекопа, несмотря на разный способ забора.

Кровь собирали в пробирки, содержащие раствор гепарина в PBS. Фракцию периферических лейкоцитов крови отделяли при помощи метода градиентного центрифугирования: кровь наносили на равный объем фиколла (плотность 1,077 г/см^3, «Панэко», Россия) и откручивали в течение 30 минут при ускорении 350g и плавном разгоне и торможении центрифуги. Для последующего анализа были отобраны фракции, содержащие гранулоциты и периферические мононуклеары. Для избавления от остатков фиколла к клеткам добавляли 5 мл PBS и центрифугировали (7 минут 4°C 300g). Осажденные клетки разводили в 2% растворе FBS в PBS для дальнейшего окрашивания антителами и анализа в проточной цитофлуориметрии.

2.3.4. Выделение иммунных клеток селезёнки

Селезёнку голого землекопа и мыши очищали от жира и соединительной ткани и взвешивали. Затем селезёнку механически перетирали через нейлоновое ситечко для клеток (70 мкм). Образцы осаждали центрифугированием в течение 7 минут при 300g, 4˚C, затем осадок клеток ресуспендировали в нагретом до 37˚C лизирующем буфере ACK и инкубировали 2 минуты при комнатной температуре. Реакцию лизиса останавливали добавлением большого объема 2% раствора FBS в PBS. После этого клетки вновь осаждали центрифугированием (7 минут, 4 ˚C, 300g) и ресуспендировали в 500 мкл PBS с 2% FBS для подсчета клеток. Спленоциты окрашивали антителами для дальнейшего анализа методом проточной цитометрии. В случае работы с лейкоцитами селезенки в опытах *in vitro* все процедуры по выделению клеток проводили стерильно в ламинарном шкафу.

2.3.5. Выделение клеток собственной пластинки кишечника

Промытый от содержимого тонкий кишечник хранили на льду. Для выделения лимфоцитов кишечник очищали от жира, затем срезали Пейеровы бляшки, кишечник разрезали вдоль и последовательно промывали в четырех чашках Петри в холодном PBS.

Выделение лимфоцитов *lamina propria* (LPL) проходило в два этапа. Сначала кишечник разрезали на несколько крупных фрагментов и помещали в 5 мл буфера для механической диссоциации ворсинок (HBSS, 10 mM HEPES и 5mM EDTA). Ткань кишечника инкубировали в течение 20 минут при 37 °C и покачивании (220 rpm), после чего активно встряхивали на вортексе в течении 15 секунд и пропускали содержимое пробирки через металлическое ситечко. Оставшиеся в ситечке фрагменты кишечника помещали в 5 мл свежего буфера и повторяли инкубацию. После пропускания через металлическое ситечко фрагменты кишечника переносили в стерильные чашки Петри и на льду измельчали ножницами. Гомогенат ткани переносили в пробирки с 5 мл буфера для ферментативного расщепления (DPBS, 2% FBS, Collagenase D, 500 мкг/мл; Dispase II, 280 мкг/мл; DNAse I, 500 мг/мл) и инкубировали в течение 20 минут при 37°C и покачивании (220 rpm). После инкубации гомогенат ткани встряхивали на вортексе в течение 20 секунд, супернатант пропускали через 70 мкм ситечко для клеток в новые пробирки. Фрагменты кишечника, оставшиеся на ситечке, собирали и перекладывали в пробирку с 5 мл свежего буфера для ферментативного расщепления и снова инкубировали в течение 20 минут при 37°C и покачивании. По окончании инкубации пробирки встряхивали на вортексе, суспензию пропускали через 70 мкм ситечко в пробирку, в которой уже содержались супернатанты после первой инкубации. Ситечко дополнительно промывали средой

cDMEM, после чего суспензию центрифугировали при комнатной температуре, 800g, 10 минут. Супернатант удаляли, а осадок клеток ресуспендировали в 40% Перколле для отделения лимфоцитов при помощи градиентного центрифугирования (80/40% Перколл, 350g, 20 мин с плавным ускорением и торможением центрифуги). Фракцию клеток, находящуюся на границе 80% и 40% Перколла, отбирали пипеткой, промывали центрифугированием в PBS с 2% FBS, и затем ресуспендировали в 500 мкл cDMEM с 10% FBS для последующего анализа методом проточной цитометрии.

2.4. Проточная цитофлуориметрия

2.4.1. Поиск кросс-специфичных антител для проточной цитофлуориметрии

Для проверки антител с известной видовой специфичностью на способность связывать маркеры клеток голого землекопа сначала окрашивали спленоциты каждым из анализируемых флуоресцентно-меченных антител, а затем проводили анализ методом проточной цитометрии. Для этого клетки селезёнки осаждали в 96-луночных планшетах с V-образным дном по 100-200 тыс клеток на лунку, центрифугируя 7 минут при 300g и температуре 4°C. Полученный осадок ресуспендировали в 50 мкл на лунку раствора антител против CD16/32 мыши (блокаторы Fcγ-рецепторов) в PBS с 2% FBS для блокировки неспецифичного связывания и инкубировали в течение 20 минут. После этого клетки отмывали 150 мкл PBS с 2% FBS, осаждали центрифугированием (7 минут 4°C 300g). Далее осадок ресуспендировали в буфере с антителами, используя несколько разведений (отправным разведением считали то, которое рекомендовано производителем) и инкубировали 20 минут при температуре 4°C, затем вновь отмывали и ресуспедировали в PBS с 2% FBS для анализа на проточном цитометре. Окрашивание проверяли при исследовании образца на приборе BD FACS Canto II. В случае обнаружения положительного окрашивания антитело считали кандидатным на кросс-специфичность и проводили последующие проверки – повторение окрашивания и в некоторых случаях, сортировка клеток, окрашенных антителом, и определение экспрессии гена маркера в положительной и отрицательной по маркеру популяции клеток.

2.4.2. Исследование клеточного состава иммунных органов голого землекопа и мыши при помощи панели кросс-специфичных антител

Для анализа клеточного состава отдельных иммунных органов выделенные клетки окрашивали флуоресцентно-мечеными антителами, связывающимися со специфичными для различных популяций клеток маркерами. Окрашивание проводили аналогично пункту 2.4.1. В 96-луночные планшеты с V-образным дном наносили клетки, выделенные из

различных иммунных органов голого землекопа и мыши, блокировали неспецифичное связывание при помощи антител против CD16/32 мыши, после чего инкубировали со смесью антител, для которых было установлена способность распознавать иммунные клетки голого землекопа (Таблица 2). Кроме проб с полным окрашиванием также использовали контроли: неокрашенный, с окрашиванием только одним антителом (single stain), с окрашиванием всеми антителами, кроме одного (fluorescence minus one, FMO). Для исследования на проточном цитометре BD FACS Canto II клетки отмывали от антител в 150 мкл PBS/FBS, осаждали и ресуспендировали в буфере BD FACS Flow Buffer. Обработку результатов проточной цитофлуориметрии проводили с помощью программы FlowJo («Tree Star», США).

Таблица 2. Используемые в цитометрическом анализе конъюгированные с флуорофорами антитела к маркерам иммунных клеток мыши и голого землекопа.

Маркер	Краситель	Клон	
		Мышь	Голый землекоп
CD11b	PerCP-Cy5.5	M1/70	
CD14	APC	Sa14-2	TM1
CD8	FITC	53-6.7	CT6
CX3CR1	bv421	SA011F11	
CD20	PE	SP32	
Fixable Viability Dye	APC-Cy7		

2.5. Гистология, гистохимическое и иммунофлуоресцентное окрашивание

Для получения гистологических срезов тимуса, лимфоузлов, селезенки и Пейеровых бляшек голого землекопа и мыши, ткани фиксировали нейтральным забуференным 10% формалином («BioVitrum», Россия), затем производили обезвоживание изопропиловым спиртом и ткани заключали в парафин Paraplast («Leica», Германия). Срезы органов толщиной 5 мкм были подготовлены на микротоме Slee Cut 4055 («Slee Mainz», Германия) и окрашены гематоксилином и эозином («BioVitrum», Россия). Для иммунофлуоресцентного окрашивания срезов тимуса и селезёнки голого землекопа сначала проводили депарафинизацию срезов и демаскирование антигенов в растворе 15 mM цитрата натрия (pH 6) при кипячении в скороварке в течение 6 минут. Блокировку неспецифического связывания производили путем нанесения на срезы 5% раствора сухого молока в буфере TBS-T (0,1% Tween-20, трис-хлорид натрия, pH 7.4). Окрашивание первичными антителами (Таблица 3), разведенными в буфере 5% сухого молока в TBS,

проводили во влажной камере при покачивании в течение ночи при комнатной температуре. После этого срезы два раза по 5 минут отмывали TBS-T, и окрашивали вторичными антителами, конъюгированными с флуорофорами (Таблица 3), разведенными в 5% козьей сыворотки в TBS в течение часа. Срезы вновь отмывали TBS-T два раза по 5 минут и затем заключали под покровным стеклом с использованием буфера, содержащего ядерный краситель DAPI (Fluoromount-G with DAPI, «Thermo Scientific», США). Анализ срезов тканей, окрашенных гематоксилином и эозином, либо антителами, проводили при помощи микроскопа Leica DM4000 B LED («Leica», Германия).

На изображениях селезёнки голого землекопа и мыши, окрашенных гематоксилином и эозином, полученных при малом увеличении (25x) оценивали отношение площади фолликулов белой пульпы к общей площади среза в поле зрения при помощи программы ImageJ.

Таблица. 3 Используемые в иммунногистфлуоресцентном анализе антитела к маркерам иммунных клеток голого землекопа.

Маркер	Клон	Вид	Титр первичного антитела	Вторичное антитело	Титр вторичного антитела
CD11b	M1/70	Rat	200	Anti-rat-Cy3	500
CD3	CD3-12	Rat	200	Anti-rat-Cy3	500
CD8	CT6	Mouse	100	Anti-mouse-A647	400
CD20	SP32	Rat	1000	Не использовалось (конъюгат с PE)	

2.6. Получение мазков и окраска по Романовскому

Для получения мазка на предметном стекле, осадок клеток ресуспендировали в малом объёме FBS. Затем суспензию растирали по поверхности вторым предметным стеклом и высушивали. Стекла фиксировали в метаноле в течение 5 минут, после чего окрашивали раствором Май-Грюнвальда в течение 5 мин. После этого стекла промывали PBS и затем помещали в раствор красителя Гимзы на 15-20 минут. Наконец, стекла промывали водой и высушивали, после чего заключали под покровное стекло и анализировали при помощи светового микроскопа.

2.7. Культивирование клеток костного мозга в полужидкой среде с ростовыми факторами

Для того, чтобы оценить способность к дифференцировке кроветворных клеток-предшественников костного мозга голого землекопа в присутствии рекомбинантных ростовых факторов человека и мыши, а также эффективность роста миелоидных колоний при различных температурах – 37°C – стандартной температуры для ведения клеточных культур мыши и 32 °C – температуры, традиционно используемой в работе с клеточными культурами голого землекопа, проводили опыты с культивированием кроветворных клеток-предшественников костного мозга голого землекопа и мыши в полужидкой среде с метил-целлюлозой, содержащей смесь рекомбинантных ростовых факторов человека – SCF, IL-3, IL-6 GM-CSF, G-CSF, Epo («StemMACS HSC-CFU Media, complete with Epo, human», «Miltenyi Biotec», Германия). Аликвоты полужидкой среды размораживали в течение ночи при температуре 4°C, затем активно перемешивали при помощи вортекса и оставляли при комнатной температуре. Тем временем, выделенные из костного мозга клетки обрабатывали буфером ACK, и для последующего культивирования в полужидкой среде разводили в среде RPMI с 2% FBS в концентрации 5×10^5 на мл. На 1 мл полужидкой среды добавляли по 100 мкл клеток, активно взбалтывали на вортексе. По 500 мкл смеси среды с клетками костного мозга наносили шприцом с иглой 18G во внутренние лунки 24-луночного планшета. Периферические лунки заливали стерильной водой mQ для того, чтобы поддерживать необходимый уровень влажности и предотвратить пересыхание лунок с полужидкой средой. Планшеты находились при температуре 37°C и 32°C в течение 14 суток. На 14-15 день колонии подсчитывали, виды колоний отличали по морфологии под инвертированным микроскопом Zeiss Primovert.

2.8. Получение и анализ свойств первичной культуры макрофагов костного мозга

2.8.1. Получение первичной культуры макрофагов костного мозга голого землекопа

Для получения первичной культуры макрофагов голого землекопа костный мозг выделяли описанным ранее способом (см. раздел 2.3.1.). Затем клетки подсчитывали и рассаживали на 10 см чашки Петри по 1 млн в мл в 6-8 мл среды. Параллельно высаживали клетки костного мозга мыши с использованием аналогичной среды и концентрации клеток. В ходе работы было проверено несколько типов сред для дифференцировки макрофагов костного мозга голого землекопа, однако в результатах приведены эксперименты, поставленные с использованием следующего состава жидкой питательной среды: 90% cDMEM (DMEM с 4,5 г/л глюкозы, 2 mM L-глутамином, и 1 mM пирувата натрия

(«Capricorn Scientific» Германия), а также смесью антибиотиков (Pen Strep, «Gibco», США), 10% FBS («Capricorn Scientific», Германия) и 20-40 нг/мл рекомбинантного M-CSF мыши («Miltenyi Biotec», Германия). Клетки костного мозга голого землекопа и мыши выращивали в инкубаторе в течение 7 суток (были использованы две температурные точки – 32°C и 37°C, 5% CO_2). На пятый день производили частичную замену среды, добавляя по 5 мл свежеприготовленной. На седьмой день клетки снимали с чашек, для чего отбирали надклеточную среду, затем промывали чашки от неприкрепленных клеток, остатков среды и дебриса в 5 мл PBS, и, наконец, оставляли инкубироваться в 5 мл PBS при температуре 4°C в течение 30 мин, для того чтобы клетки открепились от поверхности чашек. Клетки снимали интенсивным пипетированием, подсчитывали их число в камере Горяева при окрашивании трипановым синим и рассаживали на плашки для поляризации и проведения метаболических тестов. В ходе работы был также испробован протокол выращивания макрофагов голого землекопа в течение более продолжительного периода – 21 день. При таком подходе неприкрепленные клетки, оставшиеся в среде после забора макрофагов на седьмой день, вновь высаживали в среду, содержащую M-CSF и продолжали культивировать ещё 2 недели при температуре 32°C, с добавлением свежей среды на 8, 14 и 18 дни от выделения из костного мозга.

Фенотип полученных культур макрофагов голого землекопа верифицировали методами иммуноцитофлуоресценции и проточной цитофлуориметрии при сравнении с клетками мыши. Для оценки морфологии макрофаги голого землекопа рассаживали на стёкла для конфокальной микроскопии, окрашивали антителами против CD11b (Таблица 3) и исследовали на конфокальном микроскопе Leica LSM5. Кроме того, культуры, окрашенные антителами (Таблица 2), специфичными для маркеров макрофагов как мыши, так и голого землекопа (CD11b, CD14) исследовали на проточном цитометре BD FACS Canto II.

2.8.2. Поляризация макрофагов голого землекопа в про- и противоспалительных условиях

Поляризация макрофагов – совокупность изменений, происходящих в клетке на функциональном и морфологическом уровне при реакции на определенный стимул микроокружения. Обычно выделяют два характерных фенотипа макрофагов: провоспалительные (M1), и противовоспалительные (M2). В нашей работе был использован протокол поляризации макрофагов аналогичный работе [85]: для получения M1 макрофагов голого землекопа и мыши, клетки инкубировали в течение суток в присутствии 10 нг/мл LPS («Sigma»), 10 нг/мл рекомбинантного интерферона гамма мыши (IFNγ, «Miltenyi

Biotec»), для получения М2 макрофагов к клеткам добавляли 20 нг/мл рекомбинантного интерлейкина-4 мыши (IL-4, «Miltenyi Biotec») в среде 90% cDMEM 10% FBS. В некоторых опытах для поляризации М2 был использован цАМФ (N6,2′-о-дибутириладенозина 3′,5′-цикло-монофосфата натриевая соль, Sigma, США).

Для поляризации и последующего анализа экспрессии генов и продукции цитокинов, а также продукции NO (выделения РНК из клеток и сбора надклеточной среды, соответственно) на седьмой день макрофаги рассаживали в 24-луночные планшеты по 200-500 тыс клеток на лунку в 1 мл среды. В качестве контроля выступали неактивированные клетки (М0), которые также инкубировали в течение суток, но в среде без добавления факторов поляризации. Для опыта с РНК-секвенированием макрофаги, полученные на 21 день, рассаживали по 500 тыс на лунку и активировали вышеописанным образом. Через 24 часа надклеточную среду собирали, клетки промывали 1 мл PBS, затем лизировали в буфере RLT из набора Qiagen RNAeasy Mini kit («Qiagen», Германия).

2.8.3. Анализ клеточного метаболизма макрофагов голого землекопа

Изменение клеточного метаболизма является характерной чертой поляризации макрофагов. С учетом того, что у голого землекопа наблюдаются яркие адаптационные изменения организма, связанные с системным метаболизмом, было интересно анализировать метаболизм иммунных клеток, в частности, макрофагов.

Исследования метаболизма клеток проводили на приборе Seahorse XFe24 Analyzer («Agilent Technologies», США) по модифицированному протоколу производителя. Технология Seahorse позволяет оценить основные показатели гликолиза в клетках по уровню внеклеточного закисления среды (extracellular acidification rate, ECAR), а также показатели окислительного фосфорилирования (OXPHOS) - по уровню поглощения кислорода (oxygen consumption rate, OCR). Во время метаболического стресс-теста к клеткам последовательно добавляются вещества («инъекции»), влияющие на протекание гликолиза и дыхания, например, субстраты или блокаторы ферментов, что, в свою очередь, приводит к изменению регистрируемых уровней ECAR и OCR. В нашей работе был использован т.н. комбинированный стресс-тест, позволяющий оценить как показатели гликолиза (базовый уровень, максимальный уровень и запас), так и параметры кислородного дыхания (базовое, максимальное, необходимое для продукции АТФ митохондриальное дыхание, и утечку протонов) (Рис. 3).

За двое суток до метаболического теста клетки рассаживали в 24-луночные планшеты Seahorse для клеток: макрофаги голого землекопа по $2{,}5\times10^5$ клеток на лунку,

макрофаги мыши по 1,2-1,5×10^5 клеток на лунку в 1 мл с DMEM с 10% FBS, оставляли на ночь в инкубаторе при температуре 32ºС или 37ºС, соответственно. На следующий день визуально оценивали конфлюентность культуры (более 90%) и активировали клетки в М1 и М2 по описанному ранее протоколу (раздел 2.8.2.). Для калибровки картриджей с детекторами Seahorse, согласно протоколу производителя, за день до метаболического теста в нижнюю плашку (Utility plate), добавляли по 1 мл калибровочной жидкости и оставляли на ночь в инкубаторе без CO_2 при температуре 32 ºС или 37ºС.

В день эксперимента готовили полную среду для проведения комбинированного стресс-теста: DMEM без фенолового красного («Sigma»), 1 мМ L-глутамин, 1 мМ пируват натрия, pH 7.4. Макрофаги после поляризации отмывали по два раза 1 мл неполной среды (без L-глутамина и пирувата натрия), затем добавляли по 500 мкл среды для стресс-теста в каждую лунку и убирали планшет с клетками на 45 минут в инкубатор без CO_2 при температуре 32 ºС для макрофагов голого землекопа или 37 ºС для мыши. Вещества для инъекций также разводили в среде для эксперимента и раскапывали по портам (A, B, C, D) картриджа Seahorse (Таблица 4):

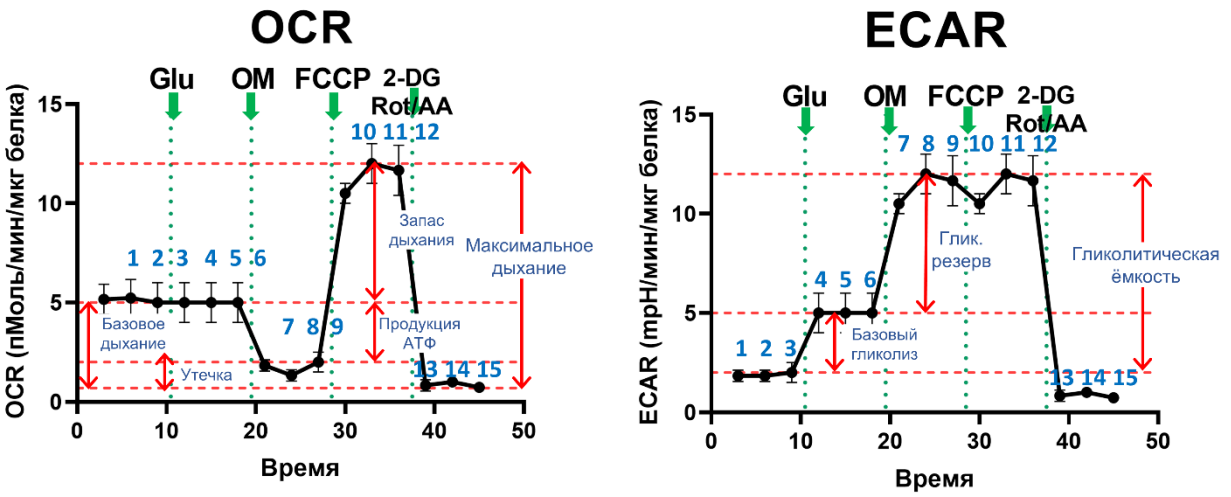
Таблица 4. Метаболический стресс-тест, применяемый для анализа клеточного метаболизма макрофагов голого землекопа

Метаболический стресс-тест	**Последовательность введения инъекций**	**Механизм**
Комбинированный тест	A - глюкоза 10 мМ	Субстрат гексокиназы, запуск гликолиза
	B - олигомицин 1 мкМ	Блокатор АТФ-синтазы, снижение потребления кислорода
	C - FCCP 2 мкМ	Разобщитель ЭТЦ, максимальное потребление кислорода
	D - ротенон 1 мкМ, антимицин А 1 мкМ; 2-дезоксиглюкоза, 5 мМ	блокаторы II и III комплексов ЭТЦ, остановка дыхания; блокатор гексокиназы, остановка гликолиза.

Программа инъекции из каждого порта состояла из 3-х циклов (3 мин перемешивание, 1 мин ожидание, 2 мин измерение), таким образом, после введения вещества прибор измерял по три точки ECAR и OCR.

Непосредственно перед тестом каждый раз проводили калибровку прибора Seahorse XFe24 Analyzer для оценки способности картриджа детектировать pH и содержание кислорода в среде. После процедуры калибровки планшет с калибровочной жидкостью заменяли на планшет с клетками и проводили метаболический тест по заданной программе (Таблица 4). Тесты для клеток голого землекопа и мыши проводились при разных температурах, поэтому, в соответствии с рекомендацией производителя, для смены температуры прибор оставляли на ночь и в один день проводили тесты при одной температуре.

Параметры гликолиза и окислительного фосфорилирования рассчитывали в соответствии с рекомендованным протоколом при помощи программы Wave («Agilent Technologies», США) (Рис. 3).



Параметры окислительного фосфорилирования

Базовое дыхание = OCR_6 – M ($OCR_{13,14,15}$)
Продукция АТФ = M ($OCR_{4,5,6}$) - M ($OCR_{7,8,9}$)
Утечка протонов = M ($OCR_{4,5,6}$) - M ($OCR_{10,11,12}$)
Макс. дыхание = max ($OCR_{10,11,12}$) - M ($OCR_{13,14,15}$)
Запас дыхания = max ($OCR_{10,11,12}$) - OCR_6

Параметры гликолиза

Базовый гликолиз = M ($ECAR_{4,5,6}$) - M ($ECAR_{1,2,3}$)
Гликолитическая ёмкость = M ($ECAR_{7,8,9}$) - M ($ECAR_{1,2,3}$)
Гликолитический резерв = M ($ECAR_{7,8,9}$) – M ($ECAR_{4,5,6}$)

Рисунок 3. Расчёт параметров окислительного фосфорилирования и гликолиза в комбинированном метаболическом стресс-тесте.

OCR – скорость потребления кислорода (oxygen consumption rate); ECAR – скорость внеклеточного закисления (extracellular acidification rate) – два параметра, которые считываются прибором Seahorse XFe24 Analyzer. Расчёт параметров на основе значений OCR и ECAR, M – среднее, max – максимальное из значений, зелёными стрелками отмечены «инъекции».

2.8.4. Анализ морфологии митохондрий макрофагов

Макрофаги, полученные на седьмой и 21 день из костного мозга голого землекопа, и на седьмой день из костного мозга мыши, высевали на чашки для конфокальной микроскопии (5×10^4 клеток на сектор) и затем проводили поляризацию (раздел 2.8.2.). После 24-часовой стимуляции клетки промывали PBS и окрашивали 100 нМ MitoTracker Green FM, 100 нМ MitoTracker Red FM и 2 мкг/мл Hoechst 33342 («Sigma Aldrich», США) в течение 30 мин при 32 ºС или 37 ºС. Микроскопию проводили с использованием конфокального микроскопа Leica TCS SP5 («Leica», Германия). Для анализа морфологии митохондриальной сети использовалось приложение MiNA, совместимое с Image-J[86].

2.9. Выделение РНК, обратная транскрипция, ПЦР в реальном времени и РНК-секвенирование

2.9.1. Выделение РНК и обратная транскрипция

В ходе работы был использован метод твердофазного выделения РНК на колонках Qiagen RNAeasy Mini kit («Qiagen», Германия). Для выделения РНК при помощи колонок Qiagen RNAeasy Mini kit, клетки растворяли в 350 мкл буфера RLT с добавлением бета-меркаптоэтанола. Лизат смешивали с 350 мкл 70% этилового спирта, наносили на колонки. 700 мкл пробы подвергали центрифугированию при температуре 4°C в течение 2 минут с ускорением 10000g. Далее на колонку последовательно наносили 350 мкл буфера RWI, после чего наносили ДНКазу I на 15 минут при комнатной температуре. После избавления от ДНК, колонки снова промывали центрифугированием с 350 мкл буфера RWI, а также два раза с 500 мкл спиртосодержащего буфера RPE. После стадии отмывки пробирку для сбора заменяли на чистую, колонки высушивали центрифугированием при температуре 4°C в течение 2 минут на максимальной скорости. Затем РНК элюировали с колонок водой, очищенной от РНКаз и ДНКаз (RNAse/DNAse free water) в стерильные пробирки на 1,5 мл.

Измерение концентрации РНК проводили с помощью спектрофотометра (NanoPhotometer® N50 Touch, IMPLEN). Образцы РНК сохраняли при температуре -80°C.

Для синтеза кДНК и последующей количественной ПЦР отбирали от 0,5 мкг РНК каждого образца. Обратную транскрипцию на основе РНК, очищенной от геномной ДНК, проводили с использованием набора Thermo Scientific RevertAid RT Kit («Thermo Scientific»). К 10 мкл образца добавляли 5 µM праймера (Oligo(dT)18 Primer) и инкубировали при температуре 65°C в течение 5 минут. Далее в реакционную смесь вносили 4 мкл 5X реакционного буфера (5X Reaction Buffer), 1 мкл ингибитора РНКаз (RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µl)), 2 мкл 10мМ смеси дезоксирибонуклеотидов (10 mM

dNTP Mix) и 1 мкл обратной транскриптазы M-MuLV (RevertAid RT (200 U/µl)). Смесь инкубировали при температуре 42°C в течение 60 минут, а затем 5 минут при температуре 70°C. Все инкубации образцов проводили с помощью амплификатора T100 («Bio-Rad», США). Образцы полученной кДНК хранили при температуре -20°C и позже использовали для постановки количественной ПЦР в реальном времени (qRT-PCR).

2.9.2. Анализ экспрессии генов при помощи количественной ПЦР в реальном времени

Для проведения qRT-PCR образцы кДНК разводили в 5 раз водой (DEPC). Реакционная смесь включала в себя 3 мкл готовой смеси для qPCR с интеркалирующим флуоресцентным красителем SYBR (qPCRmix-HS SYBR+LowROX, «Евроген», Россия), 1 мкл смеси 10 мкМ праймеров (Таблица 5), 7 мкл воды (DEPC) и 4 мкл матрицы кДНК. В образцы с отрицательным контролем вместо матрицы добавляли 4 мкл воды. На 96-луночную плашку для ПЦР в реальном времени (MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate, «Applied Biosystems») наносили сначала образцы кДНК, затем оставшиеся компоненты реакционной смеси. Для каждого образца, включая отрицательные контроли, реакцию проводили в двух технических повторах.

Полимеразную цепную реакцию с детекцией флуоресцентного сигнала осуществляли на платформе Quant Studio 6 («Applied Biosystems»). Режим амплификации был оптимизирован для всех праймеров: первичная денатурация кДНК - 10 мин 95°C, затем 40 циклов: денатурация - 15 сек 95°C, отжиг праймеров - 30 сек 62°C, элонгация ампликона – 30 сек 72 °C и чтение сигнала. После 40 циклов ПЦР снимали кривую плавления продукта, медленно поднимая температуру с 60 °C до 95 °C и считывая сигнал каждые 0.5°C, для оценки качества ПЦР.

Анализ относительной экспрессии генов проводили с использованием метода $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [87]. Параметр $\Delta\Delta C_t$ находили путем нормирования рассчитанного для опытных проб значения ΔC_t на среднее значение ΔC_t контрольных образцов. C_t– цикл амплификации, на котором содержание в реакционной смеси продукта достигает порогового значения, ΔC_t - разница между C_t референсного гена (*Actb*) и C_t гена интереса (Таблица 5).

Таблица 5. Гены голого землекопа и мыши, относительную экспрессию которых исследовали в настоящей работе, и последовательности праймеров, использованных при постановке qRT-PCR

Ген	Вид	Последовательность (5'-3') F	Последовательность (5'-3') R
Actb	*H.gl*	GCGCTCTTTCAGCCTTCTTT	TTGGCATAGAGGTCCTTGCG
Gapdh		TGACCCGTTCATTGACCTCAACTAC	AAGATGGAGATGGCCTTGCCG
Itgam		AGACAGACAGGGCATCCTTCG	GAACACATGGTCATGAGGGGGT
Tnf		ATGGCATGGATCTAACGG	CGGCTGACAGTATGGGTG
Fpr2		CAGATCACCAAGCCATTGCC	GCAACAAGAAGGGGCCGTAG
Cd38		AATTACAGTGACTCATGCTCAG	TCCAACACAAATGTGACTCAG
Arg1		CATCGGAGCCCCTTTCTCAA	ACCAGCATATCTCAACGCCG
Egr2		AATCTGCCCCCTTCTTTCGG	CCACTCCGTTCATCTGGTCA
Mrc1		AGCTTTGACTGCCTCGACTG	GTGGTCTTGTGTATTCACCTTTTGT
Actb	*M.mu*	CTCCTGAGCGCAAGTACTCTGTG	TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCC
Tnf		CAGCCTCTTCTCATTCCTGCTTGTC	CTGGAAGACTCCTCCCAGGGTATAT
Fpr2		CGAAGAGTGTAAGAAGGAGAC	AAGGAAGAAAGTGATGGAGAC
Cd38		CTACAGGCCTGCCAGGTTTC	GTTGCTTCTGAGCCCCTTCA
Arg1		TGAGGAAAGCTGGTCTGCTG	GGCCAGAGATGCTTCCAACT
Egr2		ATCCTAGGCTCAGTTCAACC	ATCATGCCATCTCCCGC
Mrc1		TACTTGGACGGATAGATGGAGG	CATAGAAAGGAATCCACGCAG

H.gl – H.glaber; M.mu – M. musculus. Прод – длина продукта ПЦР

2.9.3. Секвенирование РНК

Двенадцать образцов РНК (по четыре индивидуальные культуры макрофагов голого землекопа - не активированные, активированные в M1 и M2) выделяли с использованием набора Qiagen RNeasy Mini Kit с ДНКазой I («Qiagen», Германия). Концентрацию РНК измеряли с помощью набора Qubit RNA BR Assay Kit и флуориметра Qubit 4 («Thermo Fisher Scientific», США). Контроль качества РНК проводили на платформе Agilent

Bioanalyzer 2100 и с помощью набора Agilent RNA 6000 Nano («Agilent», США). Для подготовки библиотеки кДНК образцы РНК (300 нг на образец) сначала обогащали мРНК с помощью модуля магнитной изоляции NEBNext Poly(A) («NEB», США), а затем обрабатывали с помощью набора для подготовки направленной библиотеки РНК NEBNext Ultra II для Illumina («NEB», США). Для мультиплексирования образцов использовали праймеры с индексами 1-12 - NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (Index Primers Set 1) («NEB», США). Размер фрагментов в библиотеках кДНК (около 300 п.н.) был проверен с помощью прибора Agilent Bioanalyzer 2100 и набора Agilent DNA 1000 («Agilent», США). Чтение библиотек кДНК проводили на секвенаторе Illumina NextSeq 550 с помощью набора NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (75 Cycles) («Illumina», США). Полученные данные были депонированы в архиве NCBI Sequence Read Archive (SRA) под регистрационным номером BioProject PRJNA933639.

2.10. Анализ продукции оксида азота макрофагами

На седьмой и 21 день макрофаги костного мозга, высевали в количестве $0{,}5\times10^5$ клеток в 100 мкл cDMEM/10% FBS в 96-луночные планшеты, а затем активировали с использованием различных концентраций LPS, либо стандартного протокола поляризации. Продукция NO определялась при помощи реактива Грисса как концентрация нитрита в 50 мкл культурального супернатанта и оценивалась в мкМ с использованием стандартной кривой, полученной при разведении нитрита натрия.

2.11. Мультиплексный анализ продукции цитокинов и хемокинов

Для того, чтобы изучить профиль продукции цитокинов и хемокинов при поляризации макрофагов голого землекопа и мыши была использована технология мультиплексного анализа Luminex xMAP («Merck», США). Кратко, технология состоит в определении концентрации аналитов в смеси при помощи флуоресцентно-меченных магнитных сфер, на поверхность которых нанесены антитела к конкретному аналиту. Метка магнитной сферы позволяет определить, какой белок она распознает, поэтому сферы можно смешать и измерять до 50 различных молекул одновременно в одном образце. После инкубации образца с магнитными сферами, к ним последовательно добавляют антитела, конъюгированные с биотином, и фикоэритрин (PE), конъюгированный со стрептавидином. Таким образом, концентрация каждого аналита в пробе определяется по сигналу средней интенсивности флуоресценции (MFI) PE от вторичных антител. Анализатор Luminex MagPix считывает вышеописанные два параметра – флуоресценцию метки магнитной сферы при длине волны 635 нм (позволяет определить тип аналита) и MFI при длине волны

525 нм (позволяет определить концентрацию аналита, связавшегося с данным типом магнитных сфер, в смеси, при помощи стандартной кривой).

В настоящей работе был использован набор MILLIPLEX MAP Mouse Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel – Immunology Multiplex Assay («Millipore», США), позволяющий определить концентрацию 32 цитокинов и хемокинов в одном образце. В ходе пробоподготовки проводили инкубацию надклеточной среды от макрофагов M0, M1 и M2 голого землекопа и мыши с магнитными частицами из набора в течение ночи, окрашивание вторичными антителами и считывание плашки на следующий день. Экспорт и обработку данных проводили в программе Belysa («Merck», США).

Так как метод мультиплексного анализа Luminex xMAP построен на взаимодействии первичных антител с аналитом, мы предположили, что кросс-специфичные антитела из набора могут распознавать некоторые цитокины и хемокины голого землекопа. Кроме того, для использованного набора также известна кросс-специфичность с цитокинами морской свинки (IL-1β, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, CXCL10, CXCL2, CXCL5, CCL5), которая является эволюционно более близким видом к голому землекопу, чем мышь. Те аналиты, которые не имели сигнала в образцах голого землекопа или имели низкий сигнал только в образцах голого землекопа, но не мыши, были исключены из рассмотрения.

2.12. Биоинформатический анализ последовательностей

Нуклеотидные и аминокислотные последовательности рецепторов гематопоэтических факторов роста, цитокинов и хемокинов голого землекопа, мыши и человека скачивали из баз данных аннотированных геномов соответствующих организмов. Процент идентичных аминокислот при глобальном выравнивании последовательностей рассчитывали, используя алгоритм EMBOSS Needle [88] или pBLAST [89].

2.13. Биоинформатический анализ данных РНК-секвенирования

Транскриптомный анализ проводили с помощью программы PPline [90]. Сначала транскриптомные чтения были исследованы на наличие рРНК (последовательности рРНК *H. glaber* были загружены с https://rnacentral.org/search?q= Heterocephalus% 20glaber%20rRNA) и бактериального загрязнения (бактериальные геномы, собранные до 2015 г., были загружены из базы данных NCBI). Выравнивание чтений секвенирования с базами данных было выполнено с помощью Bowtie2 [91]. Программа Trimmomatic-0,38 использовалась для удаления последовательностей адаптера, а также исключения прочтений с низким качеством (конец: 24, скользящее окно: 4:14, minlen: 40) [92]. Выравнивание генома *H. glaber* GCA_000247695.1

(https://hgdownload.soe.ucsc.edu/hubs/GCA/014/060/925/) проводили с помощью STAR [93]. FeatureCounts из пакета subread 1.6.0 [94] и файл аннотаций *H. glaber* (GCF_000247695.1) использовали для подсчета числа прочтений на ген *H. glaber* в каждом образце. Дальнейший анализ дифференциально экспрессируемых генов (DEG) и построение диаграммы Венна выполняли с помощью программы RTrans (https://github.com/gskrasnov/RTrans), основанной на пакете edgeR 3.28.1 [95]. Были использованы метод нормализации TMM и QLF-тест. Дифференциально экспрессируемый ген попадал в диаграмму Венна при следующих пороговых значениях: строгое значение p = 0,01 (QLF-тест) - мягкое значение p = 0,05 (QLF-тест), строгое абсолютное значение logFC = 0,5, мягкое абсолютное значение logFC = 0,3, строгое logCPM = 1,5, строгое logCPM = 1,0. Чтобы быть включенной в пересечение, статистика должна была превосходить строгие пороги по крайней мере в одном сравнении и превосходить мягкие пороги в другом. Для дифференциально экспрессируемых генов с p-значением <0,01 (QLF-тест) точечные графики (volcano-plot) были созданы вручную в R 4.2.2 с использованием пакета ggplot. Для генов с пониженной и повышенной экспрессией, отображаемых на диаграммах Венна, анализ GO был проведен с помощью онлайн-инструмента DAVID [96].

2.14. Статистический анализ данных

Анализ данных проточной цитометрии проводили в приложении FlowJo («TreeStar», США). Статический анализ результатов проводили в программе GraphPad Prism 6.0 при помощи парного или непарного t-критерия Стьюдента, однопараметрического или двупараметрического дисперсионного анализа (ANOVA) или критерия Краскала-Уоллеса для данных, не соответствующих нормальному распределению. Статистически значимыми считали различия между группами при уровне значимости p<0,05.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Кросс-специфичные антитела для проточной цитометрии и иммуногистохимии, распознающие поверхностные маркеры иммуноцитов голого землекопа

В начале работы была изучена представленность нуклеотидных последовательностей ортологов основных маркеров иммуноцитов в геноме голого землекопа, и их консервативность между голым землекопом и организмами, для которых существуют широкие панели антител (человек, мышь) для предсказания возможной кросс-специфичности. Далее для скрининга было выбрано более 70 различных клонов антител против маркеров гемопоэтических и иммунных клеток (Приложение, Таблица 8), включая кросс-специфичные антитела, известные по ранее опубликованным работам [72, 80, 81].

Кросс-специфичность антител проверяли при окрашивании первичных клеток костного мозга, селезенки и тимуса голого землекопа методом цитофлуориметрии. Кроме того, часть антител была проверена на способность «работать» в иммуногистохимии на замороженных и заключённых в парафин образцах.

В результате скрининга было отобрано шесть антител, работающих в проточной цитометрии, и три - в иммуногистохимии, на основе которых и была составлена панель для анализа структуры и клеточного состава иммунных органов голого землекопа в настоящей работе (Таблица 6).

3.2. Особенности лимфоидных органов голого землекопа, изученные при помощи панели кросс-специфичных антител

3.2.1. Анатомическое строение иммунной системы голого землекопа

Основной целью настоящей работы было выявление особенностей иммунной системы голого землекопа, потенциально связанных с физиологической адаптацией вида. В начале было необходимо охарактеризовать иммунную систему вида в общем – на органном уровне. Для того, чтобы определить особенности строения иммунных органов голого землекопа, была проведена их морфологическая и анатомическая оценка в сравнении с органами мыши. Было установлено, что голый землекоп обладает, в целом, характерным для грызунов планом расположения и строения лимфоидных органов. С другой стороны, были отмечены некоторые особенности по сравнению с мышью, представляющие интерес в контексте эволюционных приспособлений голого землекопа, которые будут описаны ниже.

Таблица 6. Панель кросс-специфичных антител, распознающих иммунные клетки голого землекопа.

Антитела для скрининга были отобраны среди коллекции коммерчески доступных антител лаборатории молекулярных механизмов иммунитета ИМБ РАН и коллекции in-house антител Немецкого центра изучения ревматизма (DRFZ, Берлин, Германия).

Антитело	Клон/Изотип	Распознаваемые клетки голого землекопа	Метод верификации	Ссылка
Rat-anti human CD3e, Bio-Rad	CD3-12, IgG1	Т-клетки, только внутриклеточно	Связывание клеток голого землекопа – иммуногистохимия голого землекопа; иммуногистохимия	[81]
Mouse-anti Guinea pig CD8a, Bio-Rad	CT6, IgG1	Цитотоксические Т-клетки	Связывание клеток голого землекопа - цитометрия	[81]
Mouse-anti human CD14, DRFZ	TM1, IgG1	Моноциты, макрофаги, нейтрофилы		[81]
Rat-anti mouse CD11b, eBiosicense	M1/70, IgG2b	Макрофаги, нейтрофилы	qRT-PCR на отсортированных клетках; Связывание клеток голого землекопа – цитометрия, иммуногистохимия	[80]
Rat-anti mouse CX3CR1, BioLegend	SA011F11, IgG2a	Моноциты, микроглия	Связывание клеток голого землекопа – цитометрия	Не опубликовано
Rat-anti mouse CD20, Abcam	SP32	B-клетки	Связывание клеток голого землекопа - цитометрия, иммуногистохимия	Не опубликовано

3.2.1.1. Первичные лимфоидные органы

Первичными (центральными) лимфоидными органами называют анатомические структуры, в которых происходит развитие и созревание иммунных клеток из гемопоэтических предшественников. У взрослых млекопитающих к первичным лимфоидным органам относят костный мозг, где происходит основная часть кроветворения, и тимус – специализированный орган, обеспечивающий селекцию и

созревание Т-лимфоцитов. На эмбриональных стадиях развития в качестве первичного лимфоидного органа может выступать желточный мешок и, позднее, эмбриональные печень и селезенка. Селезёнка также может поддерживать экстрамедуллярное кроветворение у взрослых особей некоторых видов грызунов [97].

У некоторых видов млекопитающих описаны дополнительные первичные лимфоидные органы. Так, у жвачных в Пейеровых бляшках подвздошной кишки (*ileum*) может происходить перестройка генов В-клеток и создание первичных репертуаров BCR, аналогично тому, как это происходит в костном мозге у человека и мыши. В то же время у грызунов часто встречается так называемый шейный тимус (cervical thymus) - орган, обладающий сходным строением с грудным тимусом и поддерживающий селекцию Т-клеток. Не так давно наличие шейного тимуса было подтверждено и у голого землекопа [84]. Таким образом, видоспецифичные особенности центральных иммунных органов встречаются у разных групп животных и могут проявляться даже на уровне возникновения новых анатомических структур.

В ходе длительных наблюдений при вскрытии животных в колонии института зоологии и дикой природы Лейбница был отмечен факт, что даже у молодых особей (от 12 недель) голого землекопа грудной тимус имеет небольшой размер (2-3 мм)– меньше, чем у мышей сходного размера (5-6 мм в длину) (Рис. 4 А). В ходе настоящей работы при некропсии у нескольких половозрелых животных возраста от 3 месяцев до 6 лет собирали ткани тимуса, а затем была изучена морфология и проведен гистологический анализ этого иммунного органа.

Грудной тимус голого землекопа обладает обычной структурой и состоит из коры и медулы (Рис. 5 А). Стоит отметить, что в имеющуюся небольшую выборку входили образцы от молодых животных (от 11 недель до двух лет) и одной особи возраста более 6 лет. При этом существенной инволюции (замещения соединительной и жировой тканью, уменьшения кортекса и количества Т-клеток) грудного тимуса у 6-ти летней особи не наблюдалось, несмотря на небольшой размер органа (Рис. 5 Б). В нашей работе не исследовалась гистологическая структура шейного тимуса голых землекопов, однако исходя из литературных данных можно предположить, что шейный тимус также не подвергается инволюции [84]. Наличие шейного тимуса, функционально дублирующего грудной тимус, может объяснять существенную разницу в размерах грудного тимуса у молодых голых землекопов по сравнению с мышью (Рис. 4 А).

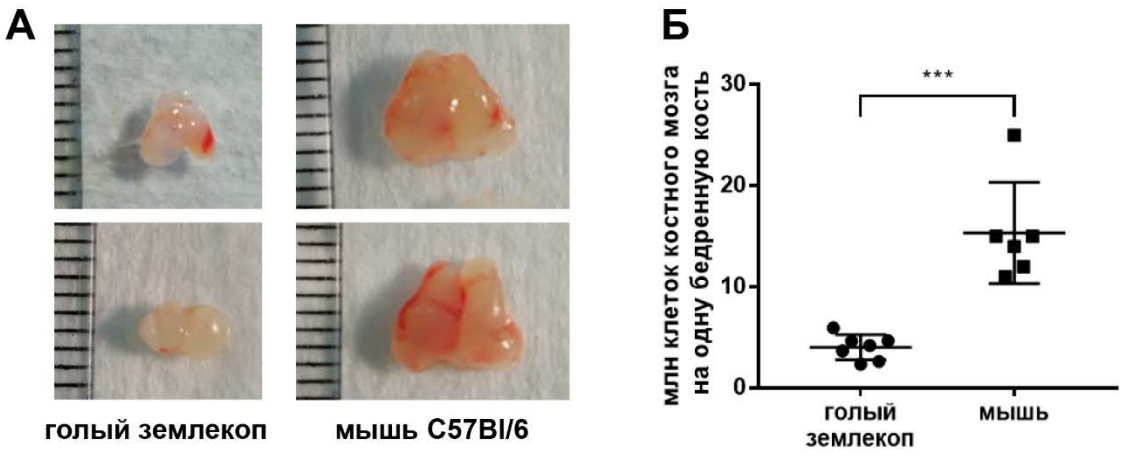


Рисунок 4. Первичные лимфоидные органы голого землекопа – тимус и костный мозг – меньше по размеру и содержанию клеток, чем у лабораторных мышей.

А – внешний вид тимуса голого землекопа (слева) и мыши (справа) Б - количество иммунных клеток, выделенных из костного мозга в пересчёте на одну бедренную кость.

Другой кроветворный орган, костный мозг, также отличается у голого землекопа и мыши по количеству клеток. В ходе работы костный мозг голого землекопа выделяли для получения первичных культур миелоидных клеток, а также для цитофлуориметрической оценки клеточного состава. Так, из двух бедренных (*femur*), двух больших берцовых (*tibia*) и двух плечевых костей (*humerus*) голого землекопа в совокупности удавалось получить только 15,3 ± 4,7 млн клеток (n=7), в то время как стандартное количество клеток, которое удается извлечь из одной бедренной кости мыши возраста 6-8 недель составляет около 15-20 млн. Если предположить, что процентное содержание костного мозга в полостях крупных костей конечностей относительно всего скелета у голого землекопа соответствует значениям, наблюдаемым у мышей [98], то у голого землекопа наблюдается значительно меньшее количество клеток костного мозга в пересчёте на одну бедренную кость (Рис. 4 Б). Данное наблюдение совпадает с выводами, сделанными в работах других групп [25, 72]. С другой стороны, можно допустить, что у голого землекопа отличное от мыши распределение клеток костного мозга в скелете и их предшественники сосредоточены, например, в костях позвоночника и рёбер. Эта особенность иммунной системы вида требует дальнейшего изучения.

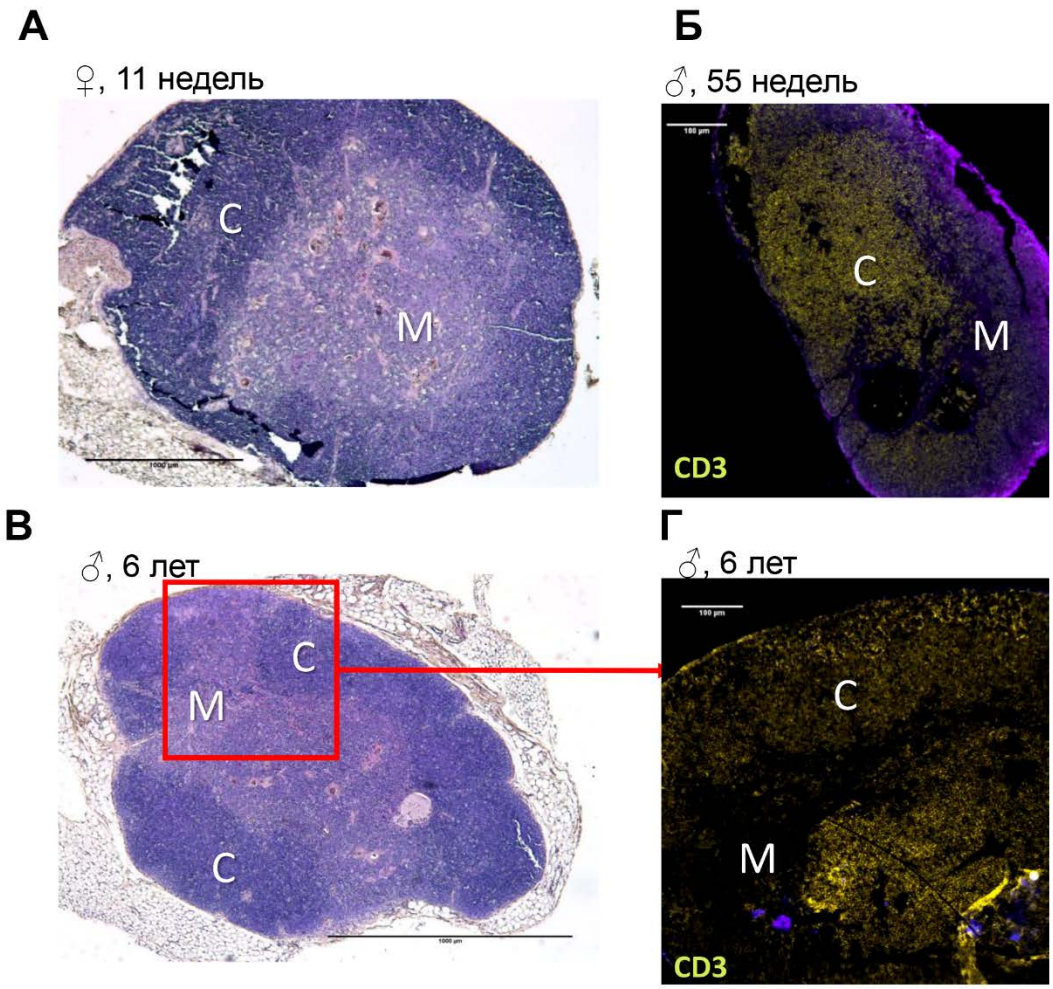


Рисунок 5. У голого землекопа не происходит существенной инволюции тимуса с возрастом.

А – тимус молодой самки голого землекопа, окрашивание гематоксилином и эозином толщина среза – 4 мкм, масштабная линейка – 1000 мкм. Б - тимус половозрелого самца голого землекопа, окрашивание антителами против CD3 толщина среза – 4 мкм, масштабная линейка – 100 мкм, В - тимус половозрелого самца голого землекопа возраста 6-ти лет, окрашивание гематоксилином и эозином и антителами против CD3 (Г). С – кортекс, М – медула тимуса.

3.2.1.2. Вторичные лимфоидные органы

Основная функция вторичных лимфоидных органов (ВЛО) - создание специфичной клеточной среды для поддержания жизни и дифференцировки лимфоцитов, презентации антигенов и развития иммунного ответа, поэтому их структура во многом схожа: наличие В-клеточных фолликулов, Т-клеточной и пограничных зон, обеспечивающих приток и фильтрацию антигенов, а также лимфатических сосудов, позволяющих антиген-презентирующим клеткам попадать в орган (в лимфоузлах и Пейеровых бляшках). Селезенка, помимо лимфоидной ткани, содержит так называемую красную пульпу – отдел,

в котором может происходить экстрамедуллярный эритропоэз и поглощение поврежденных и старых эритроцитов макрофагами.

Лимфоузлы у голого землекопа имеют небольшой размер, что затрудняло их поиск при стандартной процедуре некропсии. Тем не менее, лимфоузлы удавалось обнаружить в типичных для грызунов локациях – паховые, подмышечные, брахиальные, шейные, мезентериальные. Лимфоузлы голого землекопа обладают нормальной структурой – на срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, различимы фолликулы, находящиеся в периферической части кортекса (Рис. 6 А Б).

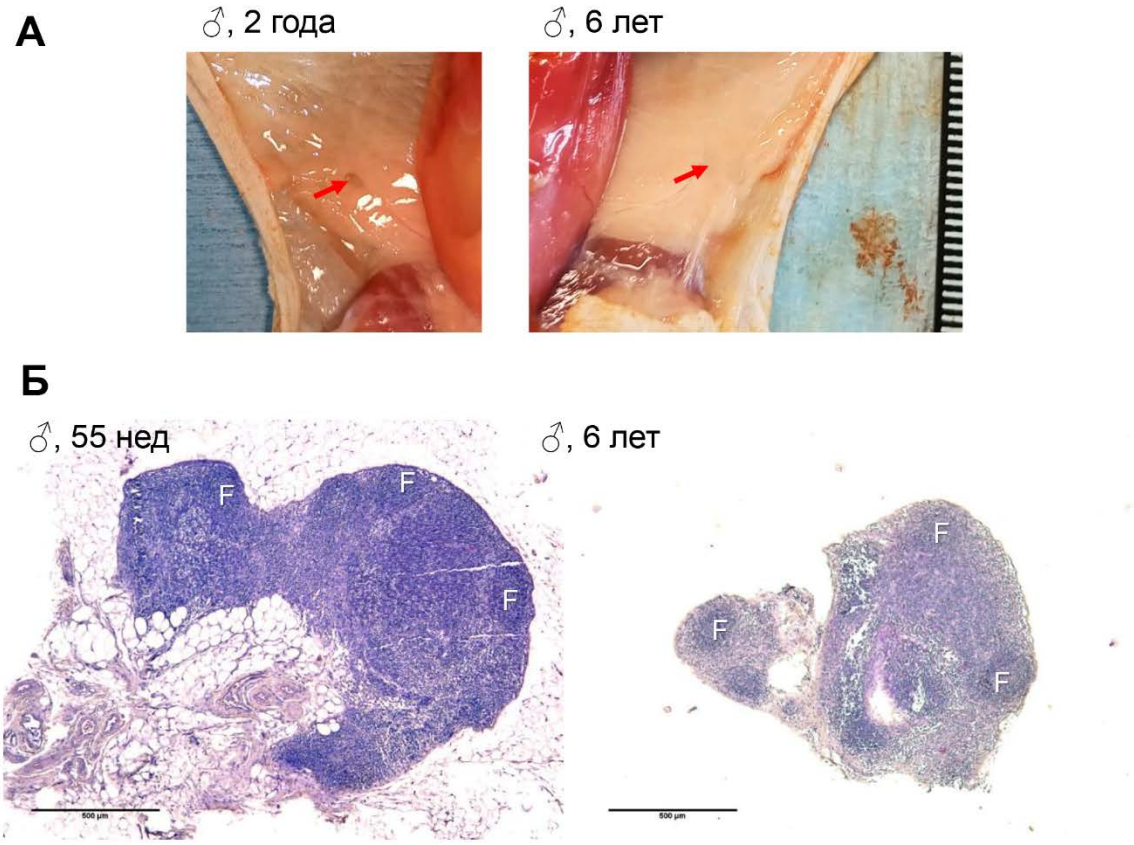


Рисунок 6. Расположение и структура лимфоузлов голого землекопа сравнимы с таковыми для лабораторной мыши.

А – Внешний вид паховых лимфоузлов у самцов голого землекопа разного возраста; Б – лимфоузлы самцов голого землекопа разного возраста, окрашивание гематоксилином и эозином, толщина среза – 4 мкм, масштабная линейка – 500 мкм. F – лимфоидный фолликул.

Одним из наиболее крупных вторичных иммунных органов голого землекопа является селезёнка. Селезёнка голого землекопа заметно отличается от селезёнки мыши на макроскопическом уровне (Рис. 7 А): для нее характерны меньшие длина и толщина, лентовидная форма и более светлая окраска. Относительная масса селезёнки у голого землекопа ниже, чем у мышей (Рис. 7 Б). Кроме того, абсолютное количество иммунных

клеток селезенки после лизиса эритроцитов составило всего около 10 млн клеток против 60-80 млн, получаемых из селезёнки мыши возраста 8-12 недель, содержавшейся в SPF-условиях (Рис. 7 В). Так как условия содержания голых землекопов в институте дикой природы Лейбница и НИИ ФХБ им. Белозерского являются конвенциональными, в качестве контроля при анализе морфологии и абсолютного количества клеток селезёнок было включено несколько образцов, полученных от конвенциональных мышей. Количество клеток, а также относительная масса селезёнок мышей, содержащихся в конвенциональных условиях, была выше, чем у мышей из SPF-вивария (Рис. 7 Б, В), из чего можно сделать вывод, что наблюдаемые у голого землекопа особенности строения и количественного содержания клеток селезёнок не зависели от статуса животных.

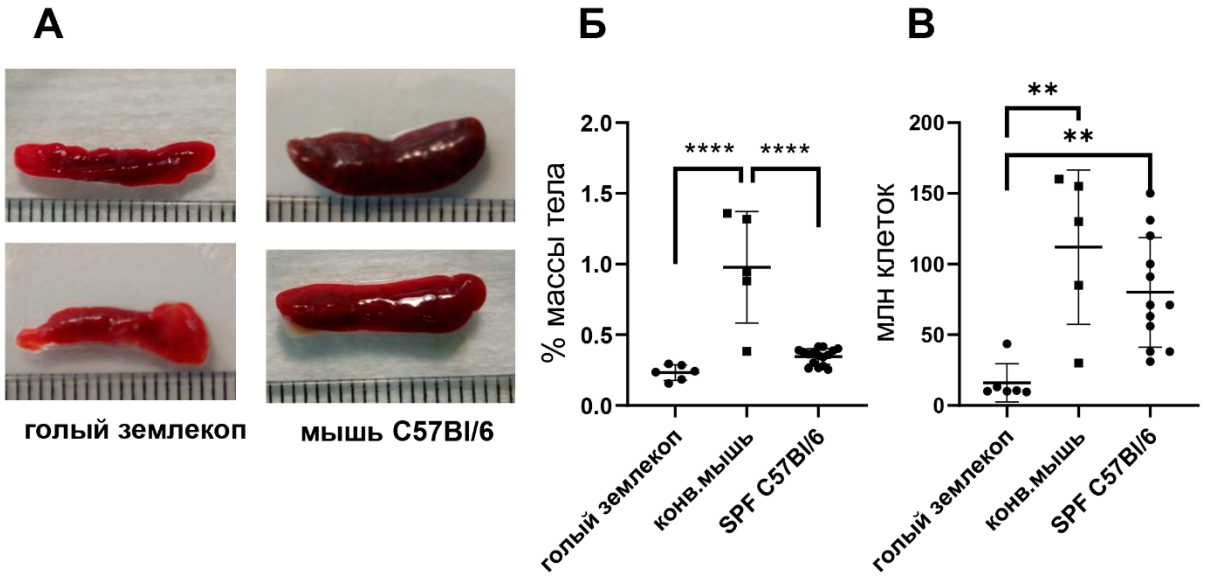


Рисунок 7. Селезёнка голого землекопа отличается по размеру и абсолютному содержанию иммунных клеток от селезёнки лабораторной мыши.

А – внешний вид селезёнки голого землекопа (слева) и мыши (справа); Б – относительная масса (%) селезёнок голого землекопа и мышей конвенционального или SPF-статуса. В – количество иммунных клеток, выделенных из селезёнки голого землекопа и мышей конвенционального или SPF-статуса при перетирании на ситечке 70 мкм.

На гистологических срезах селезенки заметно, что у голого землекопа снижен относительный объем белой пульпы (Рис. 8 А - В). Строение белой пульпы также различается: у мыши В-клеточные фолликулы сливаются с параартериальными муфтами, а у голого землекопа – расположены разрозненно посреди красной пульпы (Рис. 8 А, Б). Вероятно, наблюдаемая архитектура ткани селезенки голого землекопа связана с активным эритропоэзом, признаки которого были обнаружены при секвенировании спленоцитов [79].

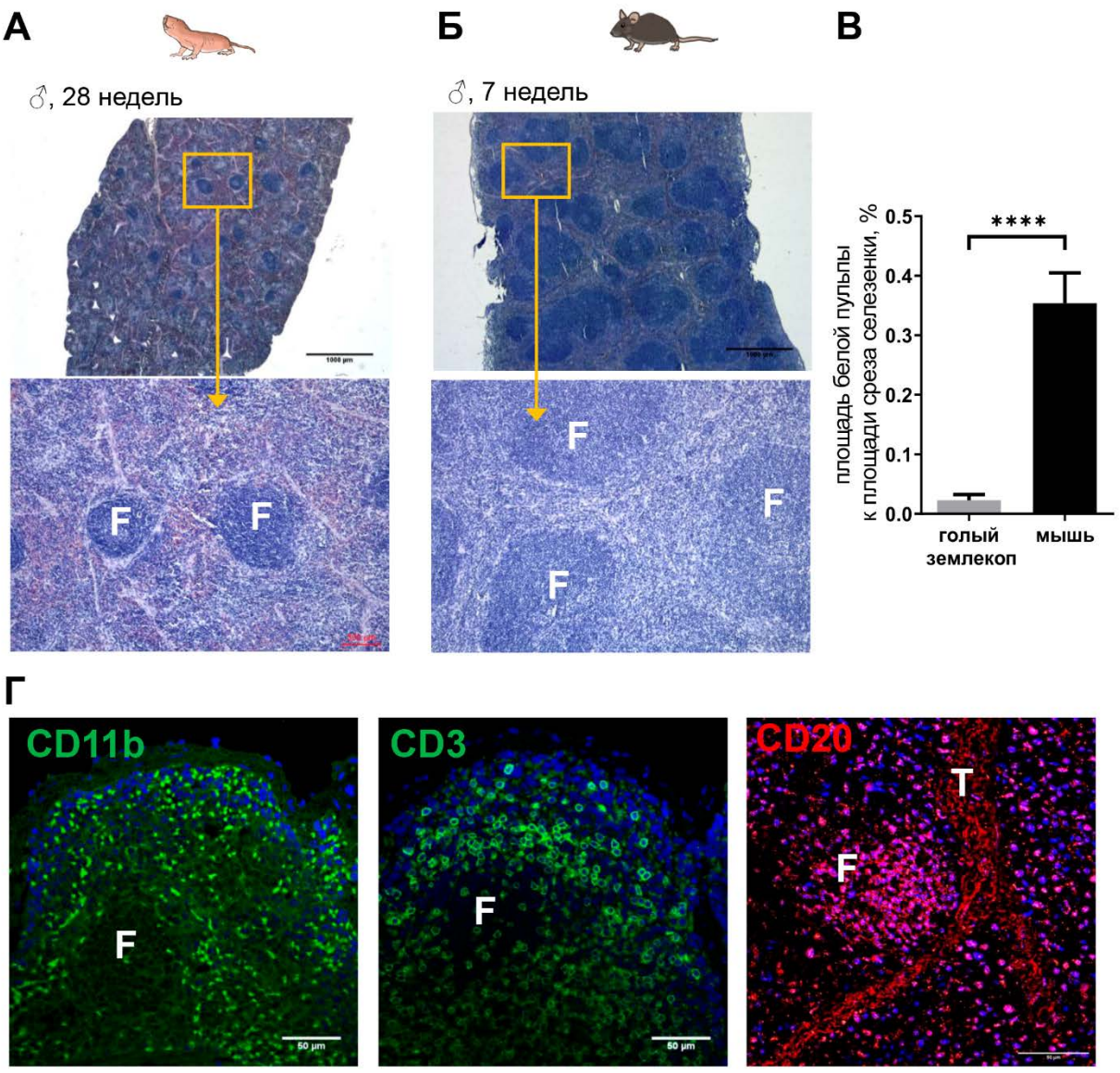


Рисунок 8. Площадь белой пульпы селезёнки голого землекопа меньше таковой у мышей.

А – ткань селезёнки голого землекопа и мыши (Б), окрашивание гематоксилином и эозином, толщина среза – 7 мкм, масштабная линейка – 1000 мкм; В – сравнение относительной площади фолликулов белой пульпы на срезах селезёнки голых землекопов (n = 4) и мышей (n=4). Г – ткань селезёнки голого землекопа, окрашенная кросс-специфичными антителами к CD11b, CD3 и CD20, масштабная линейка – 50 мкм. F – лимфоидный фолликул, Т-трабекула.

3.2.1.3. Кишечник и лимфоидная ткань, ассоциированная с кишечником

Кишечник является важнейшим резервуаром микробиоты в организме животных. У голых землекопов относительно короткий кишечник. В работе Kotze et al [99] на особях, отловленных в дикой среде, описана средняя длина тонкого кишечника – 4,4±0,3 см; средняя суммарная длина слепой (*caecum*) и толстой кишки 3,9±0,1 см.

Согласно нашим наблюдениям, длина тонкой кишки у половозрелых особей голого землекопа обоих полов конвенционального содержания составляет около 13,5±2,6 см (n = 15), при этом деление тонкой кишки на отделы (*duodenum, jejunum*) слабо выражено. У половозрелых лабораторных мышей линии C57Bl/6 SPF-статуса длина тонкого кишечника составляет 39,6±5,1 см, превосходя этот параметр у голых землекопов более, чем в два раза. На небольшой группе мышей конвенционального содержания (n = 5) мы также оценили протяженность тонкого кишечника, которая составила 50,5±2,2 см, что дает основания полагать, что условия содержания не имеют существенного влияния на данный параметр. С другой стороны, согласно литературным данным, germ-free мыши, у которых отсутствует микробиота, имеют более длинный кишечник, что связано с необходимостью компенсировать вклад микробиоты в переваривание пищи [100].

Лимфоидная ткань кишечника у голых землекопов ярко выражена, в отличие, например, от лимфоузлов. Размер и количество Пейеровых бляшек (ПБ) у голого землекопа соответствуют таковым у лабораторных мышей. Гистологический анализ срезов, окрашенных гематоксилином и эозином, не выявляет значимых отличий в структуре Пейеровых бляшек грызунов (Рис. 9 А, Б). Поскольку длина тонкого кишечника у голого землекопа в несколько раз меньше (Рис. 9 В), чем у мыши, а плотность расположения Пейеровых бляшек выше (Рис. 9 Г), можно предположить, что эти лимфоидные структуры играют особенно важную роль в контроле микробиоты у голого землекопа. С другой стороны, слепая кишка превосходит в объеме мышиную в несколько раз (Рис 9 Д), но при этом у обоих видов грызунов находятся по 1-2 крупные Пейеровы бляшки в этом отделе кишечника. Интересно, что примерно у трети животных, обнаруживались только единичные уплощённые ПБ при макроскопическом осмотре тонкого кишечника. Мы предположили, что это особенность более старых животных, так как уплощение и деградация ПБ с возрастом были показаны для человека и крыс [101], однако анализ корреляции между возрастом и количеством ПБ на единицу длины кишечника не показал высоких значений (R^2=35%) (Рис. 9 Е).

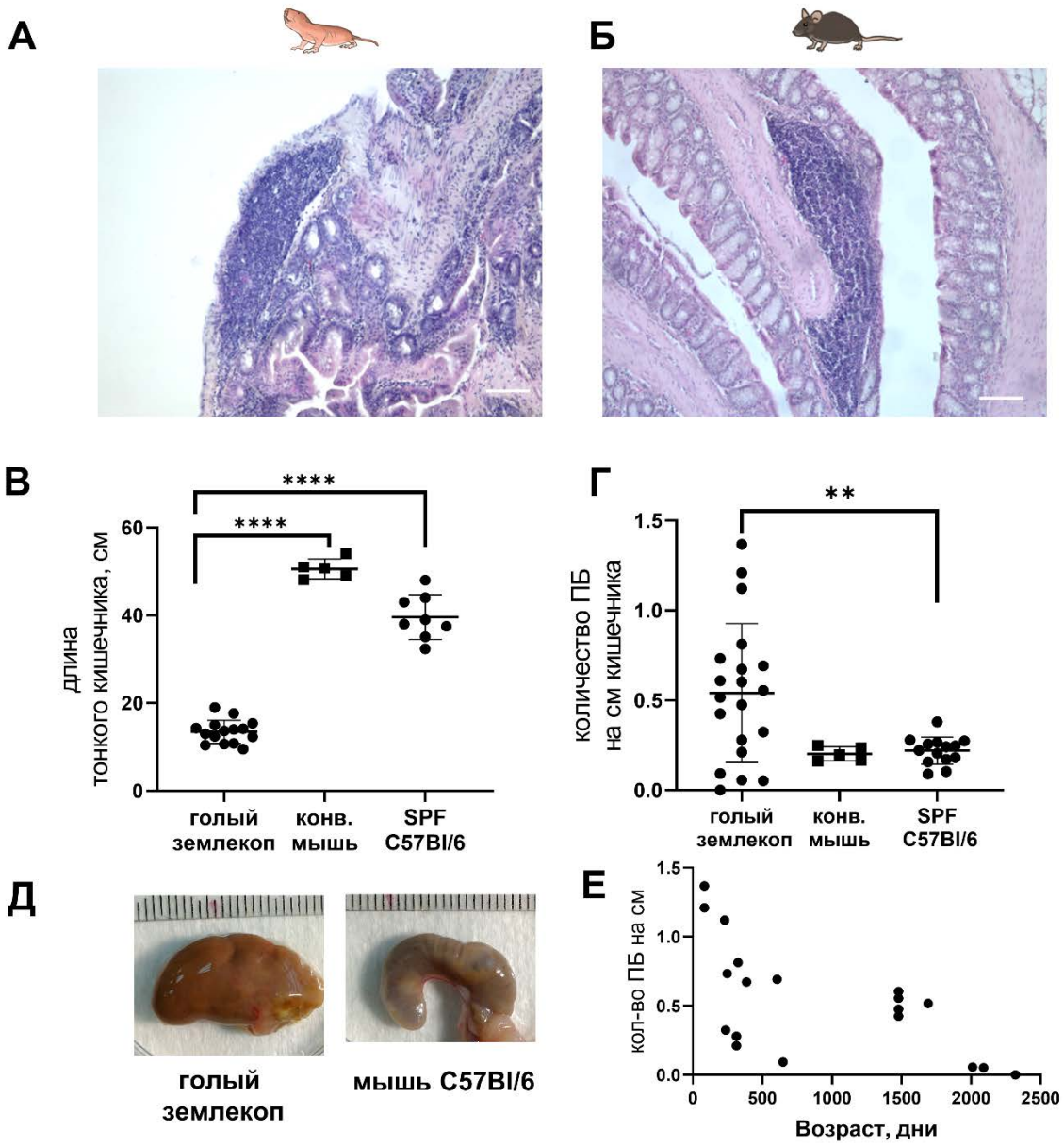


Рисунок 9. Пейеровы бляшки голого землекопа и мыши имеют схожие размер и структуру, однако за счёт меньшей длины тонкого кишечника плотность их расположения выше у голого землекопа.

А – срез Пейеровой бляшки тонкого кишечника голого землекопа и (Б) мыши линии C57Bl/6, окрашивание гематоксилином и эозином, толщина среза – 7 мкм, масштабная линейка – 500 мкм; В – сравнение длины тонкого кишечника и (Г) – плотности расположения Пейеровых бляшек тонкого кишечника у голого землекопа и мышей конвенционального и SPF-статуса; Д – внешний вид слепой кишки голого землекопа и мыши; Е – распределение плотности расположения Пейеровых бляшек в зависимости от возраста голого землекопа.

3.2.2. Клеточный состав основных иммунных органов голого землекопа

Получив общее представление об анатомических особенностях иммунных органов голого землекопа, на следующем этапе работы была поставлена задача охарактеризовать клеточный состав лимфоидной ткани с использованием панели кросс-специфичных антител (Таблица 6). В панели представлено несколько маркёров миелоидных клеток, что

позволяет выявить моноциты, нейтрофилы, макрофаги. Смешанную популяцию клеток-предшественников и малых лимфоцитов определяли по малому размеру и гранулярности в координатах прямого/бокового светорассеяния (FSC/SSC), а также как популяцию, отрицательную по маркерам CD11b, CX3CR1. Цитотоксические лимфоциты определяли по маркеру CD8, В-клетки по маркеру CD20 при внутриклеточном окрашивании. Стратегия последовательного выделения популяций при цитофлуориметрическом анализе иммунных органов голого землекопа приведена в Приложении (Приложение, Рис. 26). Для сравнения характеристик клеточного состава иммунных органов в качестве контроля использовали мышей C57Bl/6 возраста 8-12 недель SPF-статуса. Панель антител для проточной цитометрии для клеток мышей содержала другие клоны антител к маркерам CD14 и CD8 с аналогичными флуорофорами (APC и FITC) (Таблица 2). В каждом опыте использовали не только полностью окрашенные образцы, но и FMO-контроли.

3.2.2.1 Костный мозг

Для изучения клеточного состава костного мозга голого землекопа его выделяли из костей бедра, голени и плеча, затем избавлялись от эритроцитов при помощи буфера АСК. Параллельно костный мозг выделяли у мышей из бедренных костей.

Содержание отрицательных по миелоидным маркерам клеток в костном мозге голого землекопа и мыши не отличалось (Рис. 10 Б). Однако частота миелоидных $CD11b^+$ $CD14^+$ клеток в костном мозге голого землекопа была значительно выше, чем у мыши (Рис. 10 А, В). Для того, чтобы определить, к какой популяции миелоцитов относились клетки с высокой экспрессией CD14 проводили градиентное центрифугирование суспензии костного мозга, позволяющее отделить зрелые нейтрофилы (Приложение, Рис. 27), использованный метод был ранее описан для мыши [102]. Во фракции, которая у мыши соответствует зрелым нейтрофилам (Приложение, Рис. 27 А, В), у голого землекопа наблюдалась меньшая доля $CD14^+$ клеток (Приложение, Рис. 27 Д). Мы предположили, что $CD11b^+$ $CD14^+$ клетки костного мозга голого землекопа являются миелоидными предшественниками, что частично подтверждалось морфологией клеток на мазках, окрашенных по Романовскому (Приложение, Рис. 27 Е, Ж).

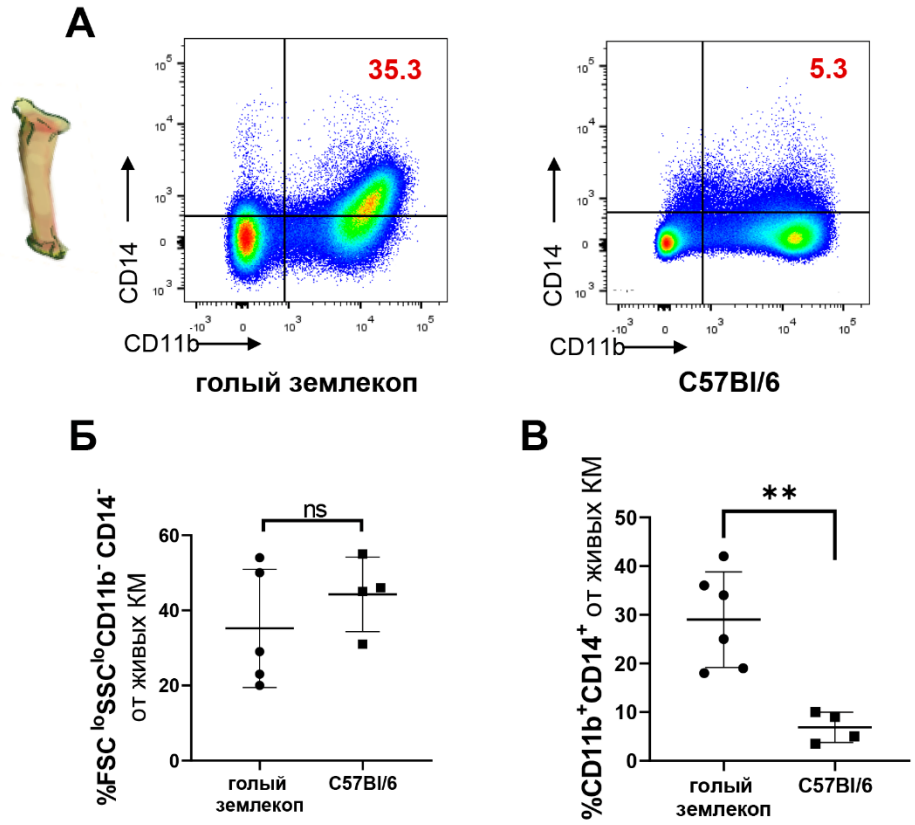


Рисунок 10. Определение клеточного состава костного мозга голого землекопа и мыши при помощи панели кросс-специфичных антител.

А – репрезентативные диаграммы распределения клеток костного мозга (VD^-CD8^-) по экспрессии маркёров $CD11b^+$ и $CD14^+$ у голого землекопа и мыши; Б – доля смешанной популяции лимфоцитоподобных клеток костного мозга (VD^- $CD11b^-$ $CD14^-$); В – процент $CD11b^+CD14^+$ положительных миелоидных клеток костного мозга. Статистический анализ был проведен при помощи t-критерия Стьюдента,** $p<0.01$.

3.2.2.2. Вторичные лимфоидные органы

При гистологическом анализе было обнаружено, что белая пульпа селезёнки голого землекопа редуцирована, что подтверждается данными цитофлуориметрии. Так, процентное содержание смешанной популяция лимфоцитов, отрицательной по миелоидным маркерам, было ниже у голого землекопа, чем у мыши. Доля миелоидных $CD11b^+$ клеток в селезёнке голого землекопа, напротив, выше, чем у мышей (Рис. 11 Б). Помимо этого, у голого землекопа наблюдалась более высокая экспрессия CD14 на миелоидных $CD11b^+$ клетках селезёнки (Рис 11 А). Предположительно, снижение содержания лимфоцитов в селезёнке могло складываться из уменьшения доли таких популяций как $CD8^+$ Т лимфоциты (Рис. 11 В) и $CD20^+$ В лимфоциты (Рис. 11 Г), что не противоречит литературным данным.

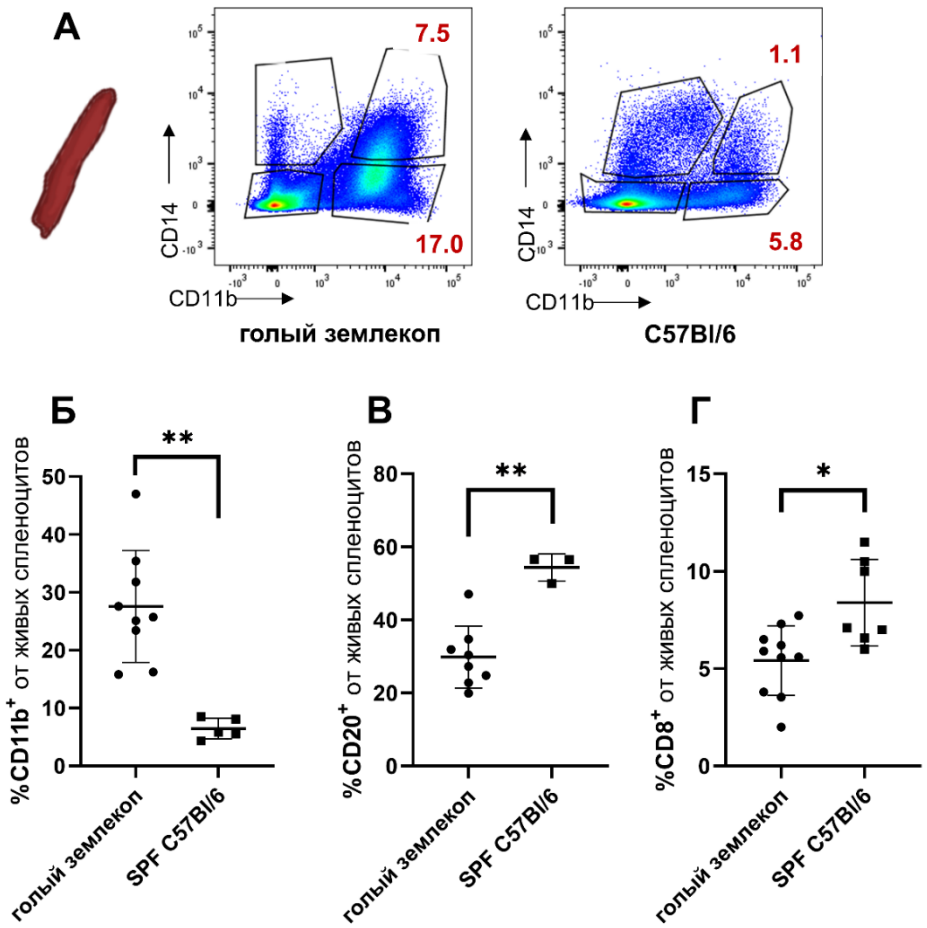


Рисунок 11. Определение клеточного состава селезёнки голого землекопа и мыши при помощи панели кросс-специфичных антител.

А – репрезентативные диаграммы распределения живых $CD8^-$ клеток селезёнки по экспрессии молекул CD11b и CD14 у голого землекопа и мыши; Б – доля миелоидных CD11b-положительных клеток селезёнки; В – процент $CD20^+$ клеток селезёнки. Г - процент $CD8^+$ Т-клеток селезёнки. Статистический анализ был проведен при помощи t-критерия Стьюдента,* $p<0.05$, ** $p<0.01$.

Результаты, полученные при цитометрическом анализе костного мозга и селезёнки, соответствовали литературным данным транскриптомного анализа единичных клеток из этих органов. Характеристика лимфоидной ткани, ассоциированной с кишечником (gut-associated lymphoid tissue, GALT), у голого землекопа в настоящей работе была проведена впервые.

При проведении ферментативного выделения клеток собственной пластинки кишечника (*lamina propria* lymphocytes - LPL) было обнаружено существенное отличие в абсолютном количестве, а также количестве клеток на грамм ткани кишечника у голого землекопа по сравнению с мышью (Рис.12 Б). Как было отмечено ранее, кишечник голых у землекопов значительно короче, чем у мышей (Рис. 9 В). Относительная масса кишечника голых землекопов ниже, чем у мыши, вне зависимости от иммунного статуса животных

(Рис.12 А). Таким образом, можно сделать вывод, что GALT голого землекопа, в которую входят как ПБ, так и LPL, представлена значительно большим количеством компактно расположенных иммунных клеток, чем аналогичная система у мышей. При помощи панели кросс-специфичных антител был оценен клеточный состав LPL: оказалось, что несмотря на различие в абсолютных количествах, доли миелоидных и В-клеток были сходными между видами (Рис. 12 В, Г). Был отмечен более высокий уровень $CD8^+$ клеток среди LPL у голого землекопа по сравнению с мышью (Рис. 12 Д).

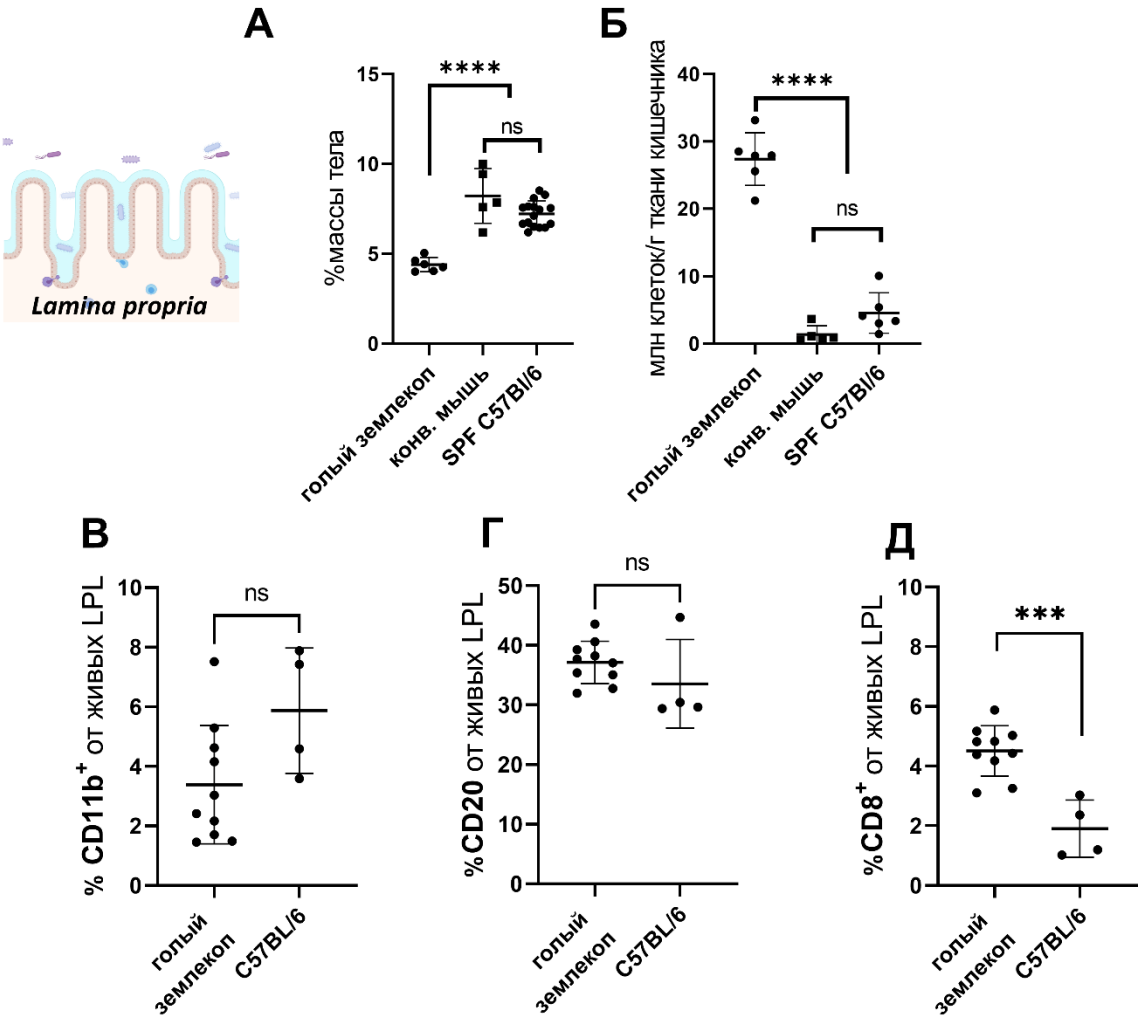


Рисунок 12. Определение клеточного состава иммунных клеток собственной пластинки кишечника голого землекопа и мыши при помощи панели кросс-специфичных антител.

А – относительная масса кишечника и Б – количество выделенных клеток LPL на грамм массы кишечника у голого землекопа, и мышей конвенционального и SPF-статуса. Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), ****$p<0.0001$; В – процент миелоидных, Г– $CD20^+$ В-клеток, Д - $CD8^+$ Т клеток в составе LPL у голого землекопа и мыши. Статистический анализ был проведен при помощи t-критерия Стьюдента, *** $p<0.001$, ns – не достоверно.

Так как количество LPL очень ярко различается у голого землекопа и мыши, мы предположили, что данные отличия могут быть обусловлены популяциями, которые мы не можем оценить при помощи имеющихся кросс-специфичных антител. В связи с этим, были получены мазки LPL, окрашенные по Май-Грюнвальду. Можно выделить несколько типов клеток, различающихся по размеру, форме ядра, отношению размера ядра к цитоплазме и окраске: малые лимфоциты (наивные Т и В лимфоциты и предшественники), средние и большие лимфоциты (активированные Т и В клетки, лимфоциты врожденного иммунитета), моноциты (крупные клетки с бобовидным ядром), эозинофилы (клетки, содержащие красные гранулы). Кроме того, на мазках наиболее часто встречались клетки с низким отношением площади ядра к цитоплазме. Опираясь на результаты цитометрического анализа, можно предположить, что они относились к В-клеточному ряду, однако для более точного определения необходимо применение дополнительных маркёров (Приложение, Рис. 28). На мазках не было обнаружено клеток Фоа – Курлофа, особой популяции NK, встречаемой у морских свинок [83].

Стоит отметить, что в составе GALT, помимо LPL, стандартно выделяют популяцию интраэпителиальных лимфоцитов (IEL). К сожалению, выделение IEL пока не было оптимизировано для мыши, в связи с чем для голого землекопа сравнительная характеристика данной популяции клеток не проводилась.

Итак, кишечник у голых землекопов, по всей видимости, играет важнейшую роль в предоставлении ниши для иммунных клеток, в то время как селезёнка больше задействована в кроветворении.

3.3. Миелоидные клетки голого землекопа в моделях *in vitro*

3.3.1. Миелоидные клетки-предшественники

Для того, чтобы ответить на вопрос, обусловлена ли большая доля миелоидных клеток в иммунных органах голого землекопа по сравнению с мышью большим количеством соответствующих предшественников, либо их большей продуктивностью, было решено изучить свойства предшественников костного мозга голого землекопа в культурах колониеобразующих единиц-предшественников в полужидкой среде с метил-целлюлозой (CFU-C). Исходя из того, что для клеточных культур голого землекопа была известна предпочтительная температура – 32 °C, также было исследовано, как температура, при которой происходит формирование колоний иммунных клеток голого землекопа, может влиять на эффективность данного процесса.

Костный мозг голого землекопа и мыши, обработанный буфером для лизиса эритроцитов, высаживали в полужидкую среду с добавлением рекомбинантных ростовых факторов человека (SCF, IL-3, IL-6 GM-CSF, G-CSF и Epo), способных поддерживать формирование миелоидных колоний, при температурах 32 °C и 37 °C. Кросс-специфичная активность данных факторов между мышью и человеком была известна из литературы [103], но мы предположили, что между человеком и голым землекопом она также будет сохраняться. Подсчет колоний проводили на 14-15 день (Рис. 13А).

Предположение о том, что смесь рекомбинантных ростовых факторов человека может поддерживать дифференцировку гемопоэтических клеток-предшественников голого землекопа подтвердилось – наблюдалось формирование колоний с характерной морфологией, среди которых наиболее хорошо поддавались классификации эритроидные (КОЕ-Э), макрофагальные (КОЕ-М) и гранулоцитарно-моноцитарные (КОЕ-ГМ), однако абсолютное количество колоний как в образцах мыши, так и голого землекопа было ниже ожидаемого. Нам не удалось установить статистически достоверных различий в количестве миелоидных колоний между культурами голого землекопа и мыши при температуре 32 °C (Рис. 13 Б). Таким образом, на основании этих опытов не удалось проверить гипотезу о том, что наблюдаемое увеличение доли миелоцитов на периферии у голого землекопа является следствием более интенсивного миелопоэза по сравнению с мышью.

Вместе с этим, при сравнении колоний костного мозга голого землекопа, полученных при разных температурах, была отмечена интересная закономерность. Оказалось, что дифференцировка кроветворных клеток-предшественников костного мозга происходит эффективно только при физиологически релевантной для голого землекопа температуре 32 °C: так, у голого землекопа при 32°C наблюдалось достоверно более высокое количество КОЕ-ГМ, чем при 37°C, в то время как у мыши температура влияла на размер миелоидных колоний, но не на их количество (Рис. 13 Б). Сведения о влиянии температуры на дифференцировку миелоидных клеток-предшественников были использованы нами для оптимизации протоколов получения макрофагов костного мозга.

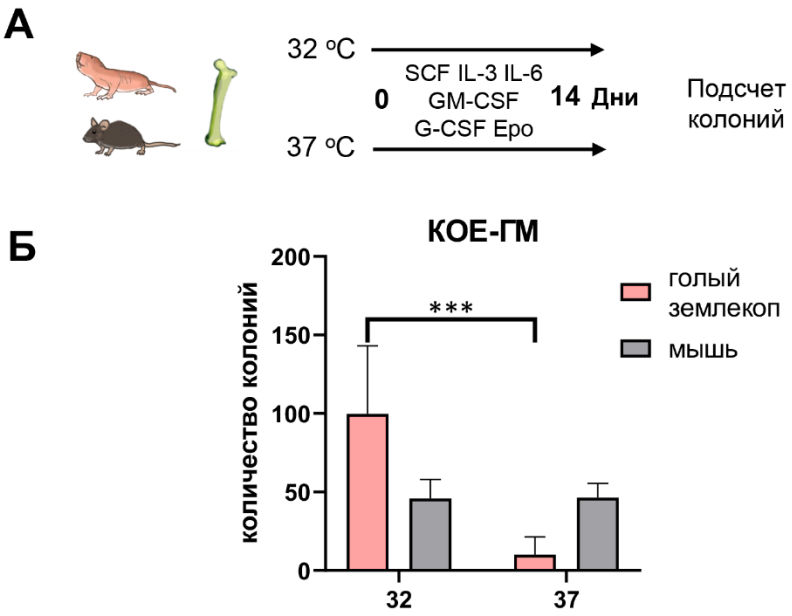


Рисунок 13. Дифференцировка миелоидных клеток-предшественников костного мозга голого землекопа происходит при температуре 32 °C, но не 37 °C.

А – схема эксперимента; Б – подсчёт КОЕ-ГМ, полученных из костного мозга голого землекопа и мыши (на 5×10^4 клеток костного мозга, обработанных АСК), представлены объединенные результаты двух экспериментов. *** $p<0.001$ по фактору температуры в 2-факторном дисперсионном анализе (2-way ANOVA).

Для того чтобы определить, является ли наблюдаемый в модели CFU-C эффект результатом воздействия температуры на выживаемость клеток или же на динамику их деления, были поставлены опыты по активации клеток селезёнки голого землекопа и мыши митогеном конканавалином А (Con A) при температурах 32 °C и 37 °C. Для оценки скорости деления перед активацией клетки окрашивали CFSE. В образцах мыши на третий день после активации при более высокой температуре наблюдалась более высокая доля поделившихся в ответ на стимуляцию Con A (1 мкг/мл) клеток (Приложение, Рис. 29 А). В спленоцитах мыши, содержащихся при температуре 32 °C, поделившиеся популяции становились хорошо заметны на шестой день (Приложение, Рис 29 Б), что говорит о том, что деление клеток в этих условиях происходило медленнее. В культурах спленоцитов голого землекопа деление клеток было отмечено на шестой день при температуре 37 °C (Приложение, Рис. 29 Б). Таким образом, было показано, что спленоциты голого землекопа могут делиться при температуре 37 °C, в отличие от гемопоэтических клеток-предшественников костного мозга, не формирующих при данной температуре колоний в модели CFU-C. Полученные результаты свидетельствуют о том, что различные по происхождению популяции иммунных клеток голого землекопа могут иметь неодинаковую чувствительность к температуре.

3.3.2. Особенности макрофагов голого землекопа

Макрофаги являются важнейшим элементом поддержания защиты и гомеостаза тканей. При воспалении макрофаги непосредственно захватывают и уничтожают патогены, а также активно выделяют цитокины, помогая регулировать иммунный ответ. После разрешения воспалительной реакции макрофаги участвуют в репарации, как поглощая разрушенные ткани, так и стимулируя восстановительные процессы, например, выделение белков внеклеточного матрикса. Тем самым, функциональный фенотип макрофагов обладает высокой пластичностью, то есть способностью изменяться под воздействием микроокружения. Мы предположили, что макрофаги голого землекопа также обладают особенностями, связанными с адаптацией вида, которые можно отследить на уровне экспрессионных и метаболических профилей. Для их изучения было необходимо разработать и описать *in vitro* модели.

3.3.2.1. Получение макрофагов костного мозга голого землекопа

Для получения макрофагов голого землекопа мы решили адаптировать хорошо изученную *in vitro* модель макрофагов костного мозга мыши. Исходя из того, что идентичность аминокислотных последовательностей рецепторов макрофагального фактора роста (M-CSF) - CSF-1R – составляет 74% между мышью и голым землекопом, мы использовали среду с M-CSF мыши для дифференцировки макрофагов костного мозга голого землекопа. В качестве источника M-CSF были проверены рекомбинантный белок (20-40 нг/мл), а также кондиционированная среда линии мышиной фибросаркомы L929, макрофаги голого землекопа дифференцировали при температурах 32 °C и 37 °C. Результат дифференцировки макрофагов голого землекопа в разных условиях оценивали по морфологии при микроскопии, изменению параметров прямого и бокового светорассеяния (FSC/SSC), а также сходству экспрессии поверхностных маркеров CD11b и CD14 между мышью и голым землекопом при помощи проточной цитофлуориметрии.

Обычно чистоту культуры макрофагов костного мозга мыши определяют по экспрессии маркеров CD11b и F4/80: на седьмой день в культурах наблюдается более 90% клеток, положительных по этим маркерам. У млекопитающих ген, кодирующий F4/80 (*Adgre1*), входит в быстро эволюционирующее семейство гомологов (*Adgre1-5*). Несмотря на высокое сходство нуклеотидных последовательностей гена *Adgre1* мыши и голого землекопа (>70%), среди проверенных в работе антител не было обнаружено кросс-специфичных клонов (Приложение, Таблица 8).

CD14 не является стандартным маркером в данной модели, поэтому сначала мы установили, как экспрессируется эта молекула на $CD11b^+$ $F4/80^+$ зрелых макрофагах мыши. Было установлено, что при стандартных условиях дифференцировки CD14 коэкспрессируется на зрелых макрофагах костного мозга мыши (Рис. 14 А, красная рамка). При температуре 32 °С большая часть клеток также приобретает фенотип $CD11b^+$ $CD14^+$, с другой стороны, сохраняется небольшая популяция клеток малого размера, экспрессирующих CD11b, возможно, миелоидных клеток-предшественников (Рис. 14 А, средняя панель). При этом по параметрам прямого и бокового светорассеяния (FSC/SSC) в культурах зрелых макрофагов наблюдается увеличение популяции крупных клеток по сравнению с днём 0 (Рис. 14 А, верхний ряд).

В костном мозге голого землекопа, как было отмечено выше, наблюдается большая доля $CD11b^+$ $CD14^+$ клеток, чем у мыши (Рис. 10 В). При градиентном центрифугировании большее количество $CD14^+$ клеток обнаруживается не во фракции зрелых нейтрофилов, а во фракции предшественников (Приложение, Рис. 27 Ж). При дифференцировке культуры костного мозга голого землекопа в присутствии рекомбинантного M-CSF мыши также наблюдалось увеличение популяции крупных клеток (Рис. 14 Б, верхний ряд). Интересно, что при температуре 32 °С популяция FSC^{hi} была более выражена, чем при температуре 37 °С (Рис. 14 Б, красная рамка). В культуре макрофагов голого землекопа происходило увеличение экспрессии CD14 при созревании (Рис. 14 Б, средняя панель), аналогично макрофагам мыши (Рис. 14 А). При температуре 37 °С уровень экспрессии CD14 на поверхности макрофагов был ниже, что может свидетельствовать о том, что они менее эффективно приобретали поверхностный фенотип зрелых клеток (Рис. 14 Б, правая панель; Приложение, Рис. 30 В). Кроме того, в культурах макрофагов костного мозга голого землекопа при температуре 37 °С детектировалось больше мёртвых клеток по сравнению с 32°С, в отличие от культур мыши (Приложение, Рис. 30 Г).

При микроскопическом рассмотрении культур костного мозга голого землекопа на седьмой день мы убедились в том, что крупные CD11b-положительные клетки, прикрепленные к чашкам, обладают морфологией макрофагов (Рис. 14 В). Неприкрепленные клетки, также экспрессирующие CD11b, но меньшие по размеру, по всей видимости, являются миелоидными клетками-предшественниками (Рис. 14 Г).

При использовании рекомбинантного M-CSF мыши в концентрации 40 нг/мл, наблюдалось более высокая коэкспрессия CD11b и CD14, чем при использовании кондиционированной среды L929 (Приложение, Рис. 30 А, Б), поэтому в дальнейшей работе применяли протокол с рекомбинантным белком.

Опираясь на наши наблюдения, а также на ранее опубликованные работы [78, 80], в рамках настоящей работы, прикреплённые, положительные по маркерам CD11b и CD14 клетки, полученные из костного мозга голого землекопа в присутствие рекомбинантного M-CSF мыши при температуре 32 °C, считали макрофагами костного мозга голого землекопа.

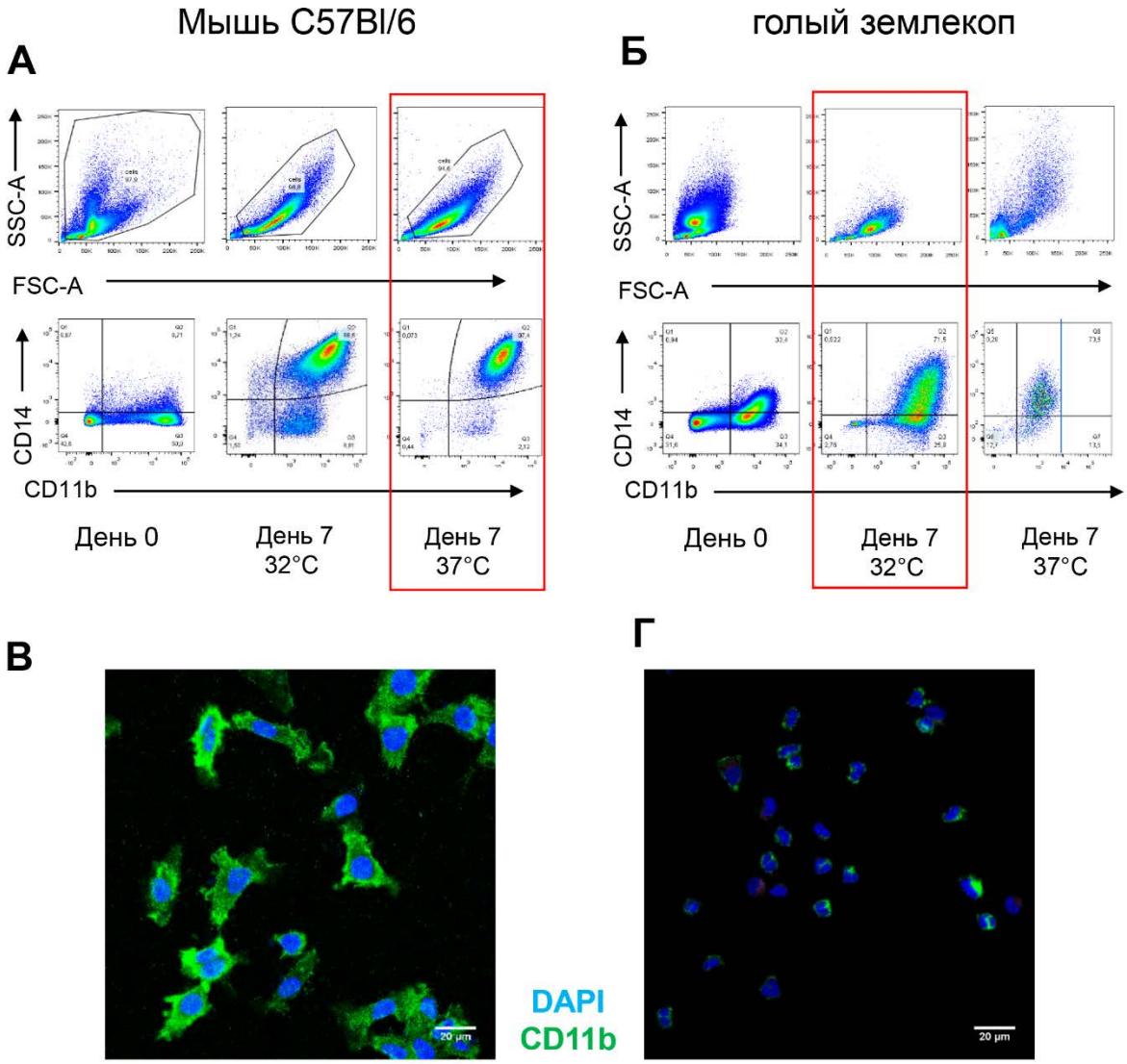


Рисунок 14. При созревании макрофагов костного мозга мыши в присутствие рекомбинантного M-CSF наблюдается увеличение экспрессии CD14.

А - Цитометрия первичной культуры клеток костного мозга мыши в день 0 и день 7 при культивировании в присутствии M-CSF мыши при температуре 32 °C и 37 °C, на рисунке приведены репрезентативные диаграммы распределения клеток по прямому (FSC-A) и боковому (SSC-A) светорассеянию (верхний ряд), и флуоресценции CD11b и CD14 (нижний ряд). Границы отсечения CD14-положительных клеток были определены при помощи положительного контроля (PBMC) и FMO контроля. Б – цитометрия культур костного мозга голого землекопа в день 0 и день 7 при культивировании в присутствие M-CSF мыши при температуре 32 °C и 37 °C. Границы отсечения CD14-положительных клеток были определены при помощи FMO контроля. В – макрофаги костного мозга голого землекопа, окрашенные антителами против CD11b, на седьмой день; Г –неприкрепленные клетки в

культурах костного мозга голого землекопа, окрашенные антителами против CD11b. Изображения получены на конфокальном микроскопе, масштабная линейка – 20 мкм.

Недавно появились сведения о том, что у голых землекопов увеличена длина цикла деления клеток [72], из чего следует, что скорость роста культур может быть ниже, чем у мыши. С этим коррелировали наблюдения, сделанные в настоящем исследовании: недостаточно высокая конфлюентность культур макрофагов на седьмой день и наличие неприкрепленных предшественников в супернатантах. Был опробован протокол продолжительного выращивания макрофагов костного мозга голого землекопа в течение трёх недель с добавлением свежей среды через каждые пять дней. Степень созревания культуры макрофагов также оценивали в проточной цитофлуориметрии. На 21-й день наблюдались практически полное отсутствие неприкреплённых клеток и более высокая конфлюентость культур (>90%), при этом MFI CD14 был лишь незначительно выше по сравнению с седьмым днем (Рис.15 Г).

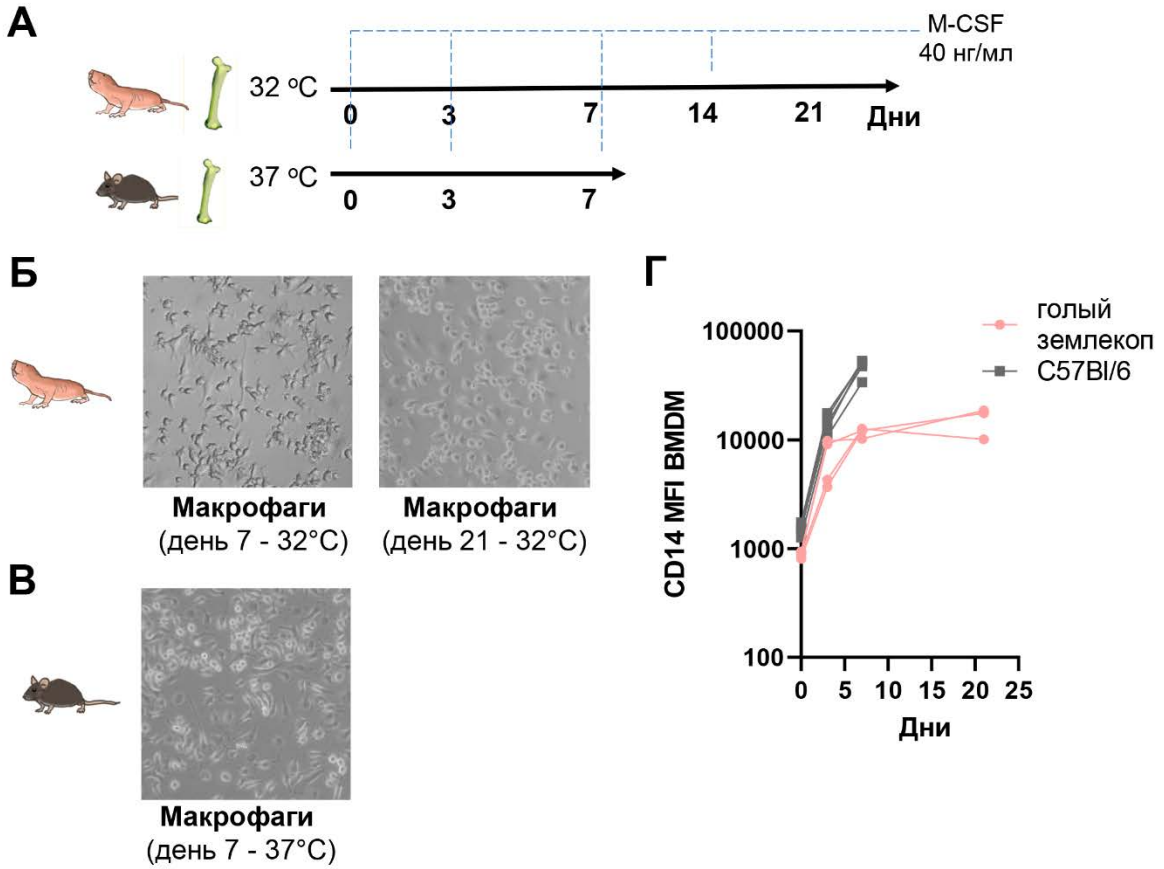


Рисунок 15. Дифференцировка макрофагов костного мозга голого землекопа продолжается при длительном ведении культуры в присутствие рекомбинантного M-CSF мыши.

А – макрофаги костного мозга голого землекопа выращивали в течении 21 дня, с добавлением свежего M-CSF на дни 0, 3, 7, 14, 18, при температуре 32 °C, в дни 0, 3, 7, 21 проводились визуальный осмотр и цитометрический анализ культур; культуры мыши выращивали в течении 7 дней при температуре 37 °C и оценивали в дни 0, 3, 7. Б –

изображение макрофагов костного мозга голого землекопа в дни 7 и 21; В – изображение макрофагов костного мозга мыши на день 7. Г – оценка экспрессии CD14 в культурах $CD11b^+$ макрофагов костного мозга голого землекопа и мыши в дни 0, 3, 7, 21.

Большинство экспериментов по анализу свойств макрофагов голого землекопа было проведено с использованием культур, полученных на седьмой день. Наиболее важные результаты были воспроизведены в двух экспериментах на культурах, выращенных в течении 21 дня. Предложенный в настоящей работе протокол продолжительной дифференцировки не был ранее использован другими группами и представляет интерес для будущих исследований.

3.3.2.2 Поляризация макрофагов голого землекопа в про- и противовоспалительных условиях

Высокая экспрессия CD14 (ко-рецептора, участвующего в распознавании LPS) в свежевыделенном костном мозге голого землекопа (Рис. 10 В) могла указывать на то, что макрофаги голого землекопа хорошо отвечают на активацию LPS, или изначально обладают большим потенциалом для антибактериального ответа.

Для оценки предрасположенности макрофагов голого землекопа к провоспалительному или противовоспалительному ответу большой интерес представляла модель поляризации макрофагов. Важной предпосылкой для выбора модели поляризации M1/M2 также была информация о наличии мутаций в гене *Arg1* у *H.glaber*: этот фермент участвует в определении судьбы макрофага и крайне важен для осуществления противовоспалительных функций [104, 105].

Для поляризации культуру макрофагов голого землекопа (M0) рассаживали на седьмой или 21 день и активировали смесью LPS (10 нг/мл) и рекомбинантного IFNγ мыши (10 нг/мл) или рекомбинантным IL-4 мыши (20 нг/мл) при температуре 32 °C . В некоторых опытах были использованы контроли с активацией только LPS (10-100 нг/мл) для M1 поляризации или дибутирилом цикло-АМФ (0,5 мг/мл) – для M2 поляризации. Через 24 часа собирали образцы надклеточной среды для анализа цитокиновых профилей и уровня оксида азота. Клетки лизировали для выделения РНК и последующего анализа экспрессии генов. Для исследования метаболических профилей макрофаги также рассаживали по 250 т клеток на лунку и активировали в течение 24 часов, после чего проводили стресс-тест с добавлением метаболических субстратов и блокаторов на платформе Agilent Seahorse. В качестве контроля в каждом опыте были использованы макрофаги костного мозга мыши, для которых были соблюдены одинаковые условия дифференцировки и активации, кроме температуры (37 °C).

При анализе экспрессии генов методом qRT-PCR было показано, что активация макрофагов голого землекопа LPS или сочетанием LPS и рекомбинантного IFNγ может значимо повышать уровень экспрессии генов, характерных для М1-поляризации: *Cd38*, *Fpr2*, *Tnf* (Рис. 16 А). В культуре М1-макрофагов мыши в стандартных условиях изменение экспрессии этих генов было выражено более ярко (Рис. 16 Б). Для М2-ассоциированных генов *Arg1, Egr2, Mrc1* не удалось установить статистически значимых отличий в экспресии между М1 и макрофагами, активированными при помощи рекомбинантного IL-4 или цАМФ для голого землекопа (Рис. 16 В), при этом противовоспалительные макрофаги мыши в параллельно проведенных опытах имели характерный экспрессионный профиль с увеличением экспрессии *Arg1* при обеих типах М2 активации (Рис. 16 Г).

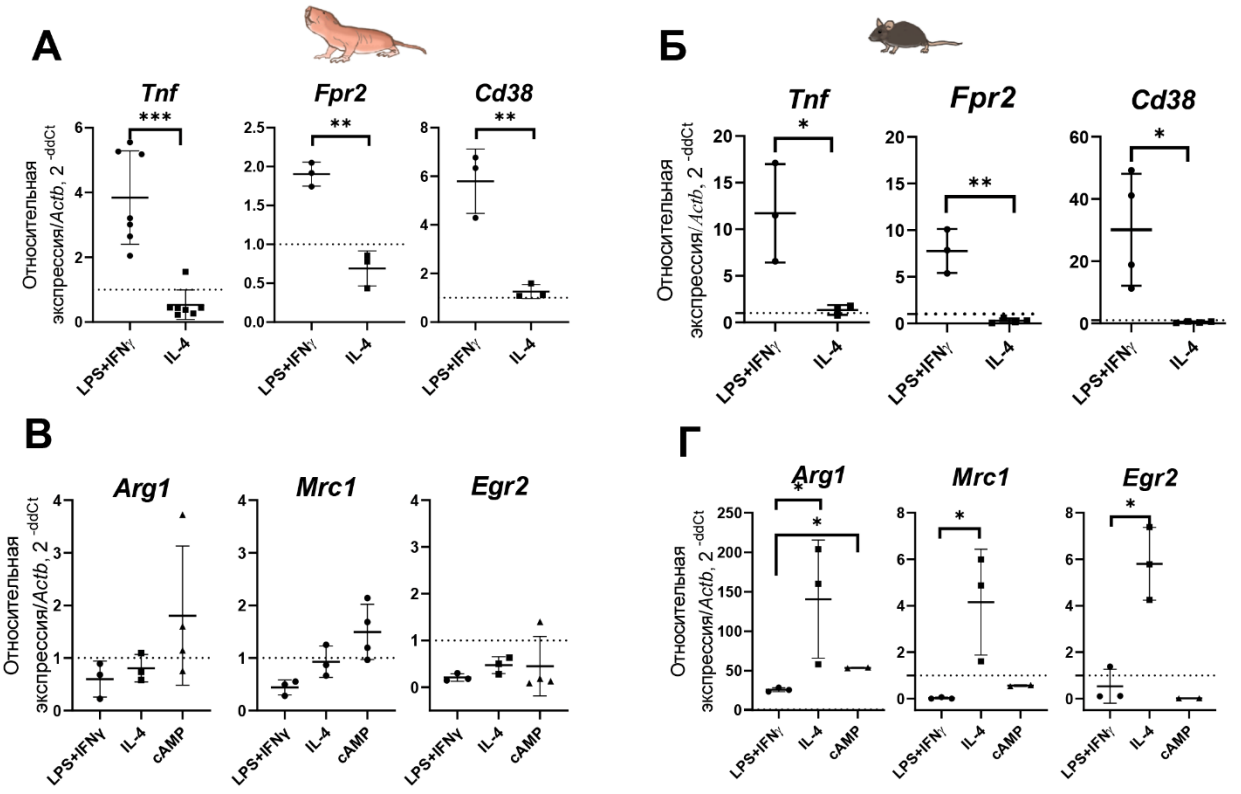


Рисунок 16. М1 макрофаги голого землекопа и мыши имеют сходные экспрессионные профили.

А - Изменение относительной экспрессии некоторых М1-ассоциированных генов (*Tnf, Fpr2, Cd38*) в макрофагах голого землекопа и (Б) мыши через 24 часа после активации смесью LPS (10 нг/мл) и IFNγ (10 нг/мл) или IL-4 (20 нг/мл). В - Изменение относительной экспрессии М2-ассоциированных генов (*Arg1, Egr2, Mrc1*) в макрофагах голого землекопа и (Г)мыши через 24 часа после активации LPS (10 нг/мл) и IFNγ (10 нг/мл), IL-4 (20 нг/мл) или цАМФ (0,5 мг/мл). Пунктирной линией отмечено значение относительной экспрессии равное единице, за которое принималась экспрессия гена в контрольных образцах. Для сравнения относительной экспрессии между группами образцов использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) или t-критерий Стьюдента. * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

Кроме экспрессии генов на уровне мРНК, была оценена продукция цитокинов М1 и М2 макрофагами мыши и голого землекопа при помощи мультиплексного анализа. Так как выбранный нами метод основан на распознавании антителами, для голого землекопа удалось проанализировать только 9 аналитов, которые были отобраны на основании предположения о кросс-специфичности (раздел 2.11.).

У мыши большая часть провоспалительных цитокинов (IL-1β, TNF, IL-17) и хемокинов, привлекающих моноциты (CCL4) и нейтрофилы (CXCL2, CXCL5) ожидаемо сильнее продуцируется М1 макрофагами. В макрофагах голого землекопа, активированных только LPS (10 нг/мл), практически не изменялась продукция цитокинов, а при добавлении IFNγ значимо возрастала продукция IL-17, в то время как повышение уровней других М1-ассоциированных цитокинов имело скорее вид тенденции (IL-1β, CCL4, CXCL2). М2 макрофаги мыши, как правило, мало изменяют продукцию этих цитокинов (Рис. 17 Б). Совсем другая картина наблюдается в культуре первичных макрофагов голого землекопа, простимулированных IL-4 мыши: они активно продуцируют хемокины (CCL4, CXCL5), и цитокины как характерные для М2 (IL-13, IL-10), так и нехарактерные (IL-1β) (Рис. 17 А).

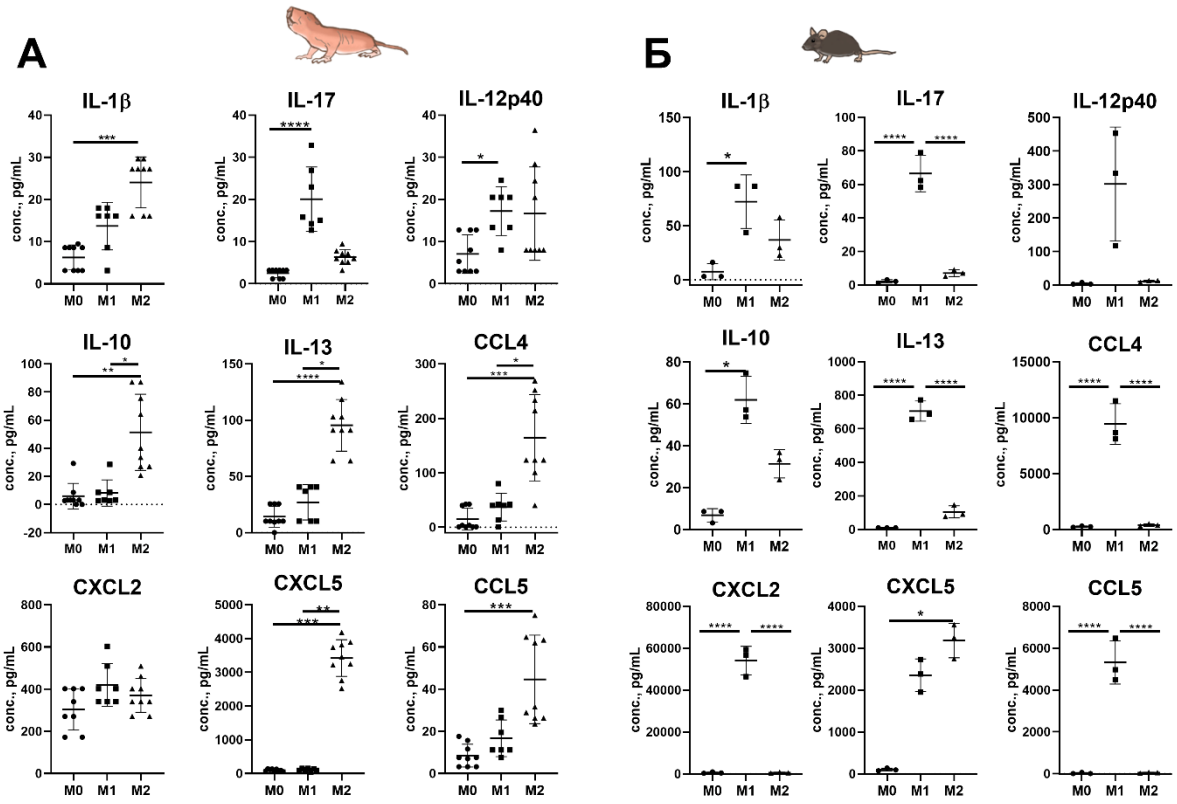


Рисунок 17. Продукция цитокинов М1 и М2 макрофагами голого землекопа и мыши.

А - Концентрация цитокинов в надсредах макрофагов голого землекопа и мыши (Б) через 24 часа после активации смесью LPS (10 нг/мл) и IFNγ (10 нг/мл) или IL-4 (20 нг/мл). Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Суммарно, данные экспрессионного анализа свидетельствуют о том, что программы М1-поляризации в макрофагах голого землекопа и мыши реализуются сходным образом. В то же время, как рекомбинантный IL-4 мыши, так и цАМФ, не приводит к повышению экспрессии М2-ассоциированных генов, включенных в анализ, через 24 часа. При этом под действием IL-4 клетки голого землекопа начинают продуцировать больше хемокинов и цитокинов по сравнению с М0, что может свидетельствовать хотя бы о частичном распознавании рекомбинантного белка и активации клеток. Продукция цитокинов в М1-клетках голого землекопа менее ярко выражена, чем у мыши. Опираясь на эти результаты, мы предположили, что при выбранных нами условиях поляризация макрофагов голого землекопа как в сторону воспалительного, так и противовоспалительного фенотипов, проходит отличным от мыши образом.

3.3.2.4. Особенности клеточного метаболизма классически- и альтернативно-активированных макрофагов голого землекопа

М1 и М2 макрофаги мыши имеют различные фенотипы с точки зрения клеточного метаболизма. Так, было показано, что провоспалительные макрофаги используют гликолиз в качестве основного источника энергии на фоне подавленного митохондриального дыхания. М2 макрофаги, напротив, обладают высоким уровнем окислительного фосфорилирования и могут использовать жирные кислоты в качестве источника ацетил-коА [63]. Так как макрофаги голого землекопа показали отличия от макрофагов мыши при поляризации на уровне экспрессии генов и продукции цитокинов, было интересно изучить их метаболическую активность.

Измерение параметров клеточного метаболизма было отработано на М1 и М2 макрофагах мыши. Результаты, полученные в комбинированном метаболическом стресс-тесте (Табл. 4), согласовались с ранее описанными в литературе [85]: так, у М1 макрофагов были увеличены базовый и максимальный уровни гликолиза и значимо подавлено дыхание (Рис. 18). М2 макрофаги мыши демонстрировали более высокие, чем неактивированные контроли, запас дыхания, уровень максимального потребления кислорода, а также уровень дыхания, ассоциированного с продукцией АТФ (Рис.18 А-В). Максимальная ёмкость гликолиза также была повышена в М2 клетках мыши относительно контролей (Рис. 18 В). Так как для ведения культур голого землекопа используется отличная от мыши температура, было изучено, как этот параметр влияет на клеточный метаболизм М1 и М2 макрофагов мыши. Метаболический фенотип М1 макрофагов мыши не отличался у культур, дифференцированных при разных температурах. В то же время М2 макрофаги мыши, выращенные при температуре 32 °C, не показали характерного усиления

митохондриального дыхания (Рис. 18 Г-Е, зеленая кривая). Таким образом, температура влияет на метаболические параметры М2 макрофагов мыши, что имеет значение для интерпретации результатов подобных тестов для голого землекопа.

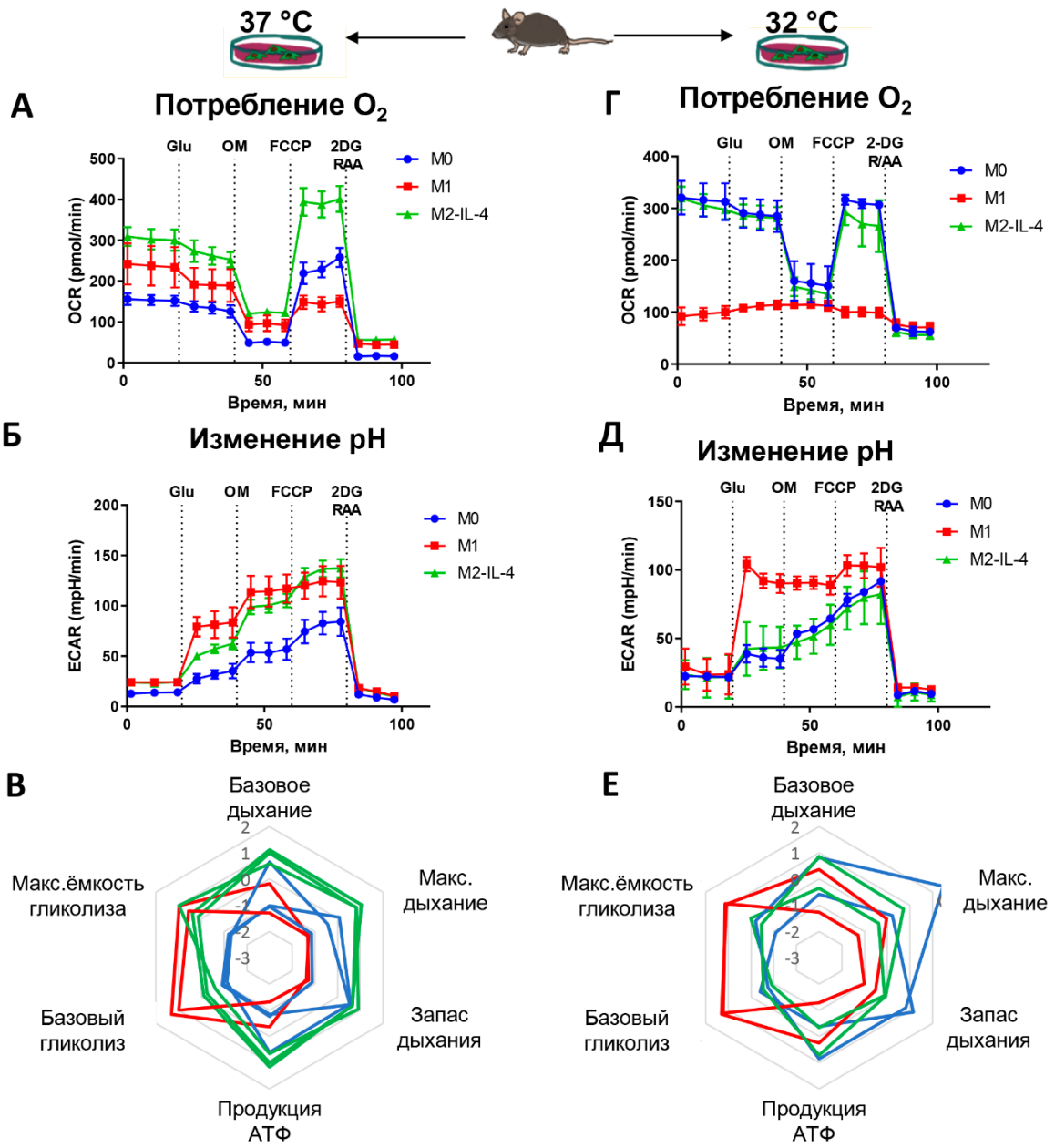


Рисунок 18. Метаболические профили М1 и М2 макрофагов мыши при разных температурах.

Комбинированный метаболический стресс-тест для определения уровней потребления кислорода(А) и внеклеточного закисления (Б) в М0 (синяя кривая), М1 (красная кривая) и М2 (зеленая кривая) макрофагах мыши, культивируемых при температуре 37 °С; В – объединенные из нескольких экспериментов значения метаболических параметров для М0, М1 и М2 макрофагов мыши, Z-трансформированное среднее для параметра, каждая кривая представляет собой индивидуальную культуру, полученную при 37 °С. Комбинированный метаболический стресс-тест для определения уровней потребления кислорода (Г) и неклеточного закисления (Д) в М0 (синяя кривая), М1 (красная кривая) и М2 (зеленая кривая) макрофагах мыши, культивируемых при температуре 32 °С. Д – объединенные из

нескольких экспериментов значения метаболических параметров для M0, M1 и M2 макрофагов мыши, Z-трансформированное среднее для параметра, каждая кривая представляет собой индивидуальную культуру, полученную при 32 °C.

В комбинированном метаболическом стресс-тесте M1 макрофаги голого землекопа воспроизводимо демонстрировали ожидаемый фенотип аэробного гликолиза: во всех опытах наблюдалось значимое падение «дыхательного запаса», то есть способности потреблять кислород после разобщения дыхательной цепи на фоне блокировки АТФазы, и увеличение скорости гликолиза относительно неактивированных контролей (Рис. 19 А-Г). На макрофагах, взятых в опыт после 21 дня в культуре, усиление гликолиза в провоспалительных условиях было выражено ярче (Рис. 19 Е).

Метаболический профиль макрофагов голого землекопа, активированных IL-4 мыши, резко отличался от наблюдаемого у мышей в стандартных условиях профиля (Рис. 19 В). В части опытов не было отмечено достоверных отличий между метаболическими профилями M2 и M0 макрофагов голого землекопа. В некоторых опытах наблюдалось подавление дыхания в M2 клетках голого землекопа (Рис. 19 А, Д, Е). Эти результаты коррелируют с картиной, наблюдаемой в M2 макрофагах мыши, дифференцировка которых происходила при пониженной температуре (Рис. 18 Е).

Результаты метаболического профилирования M1 и M2 макрофагов голого землекопа согласуются с данными по экспрессии и продукции цитокинов: M1 приобретают ожидаемые для провоспалительных клеток свойства, в то время как активации M2-программы не происходит.

Дыхательная активность клеток может регулироваться состоянием митохондрий: так, фрагментация митохондрий, ассоциированная с воспалением, приводит к подавлению дыхания в M1 макрофагах; слияние митохондрий в сети, наоборот, способствует интенсификации дыхания и наблюдается в противовоспалительных макрофагах.

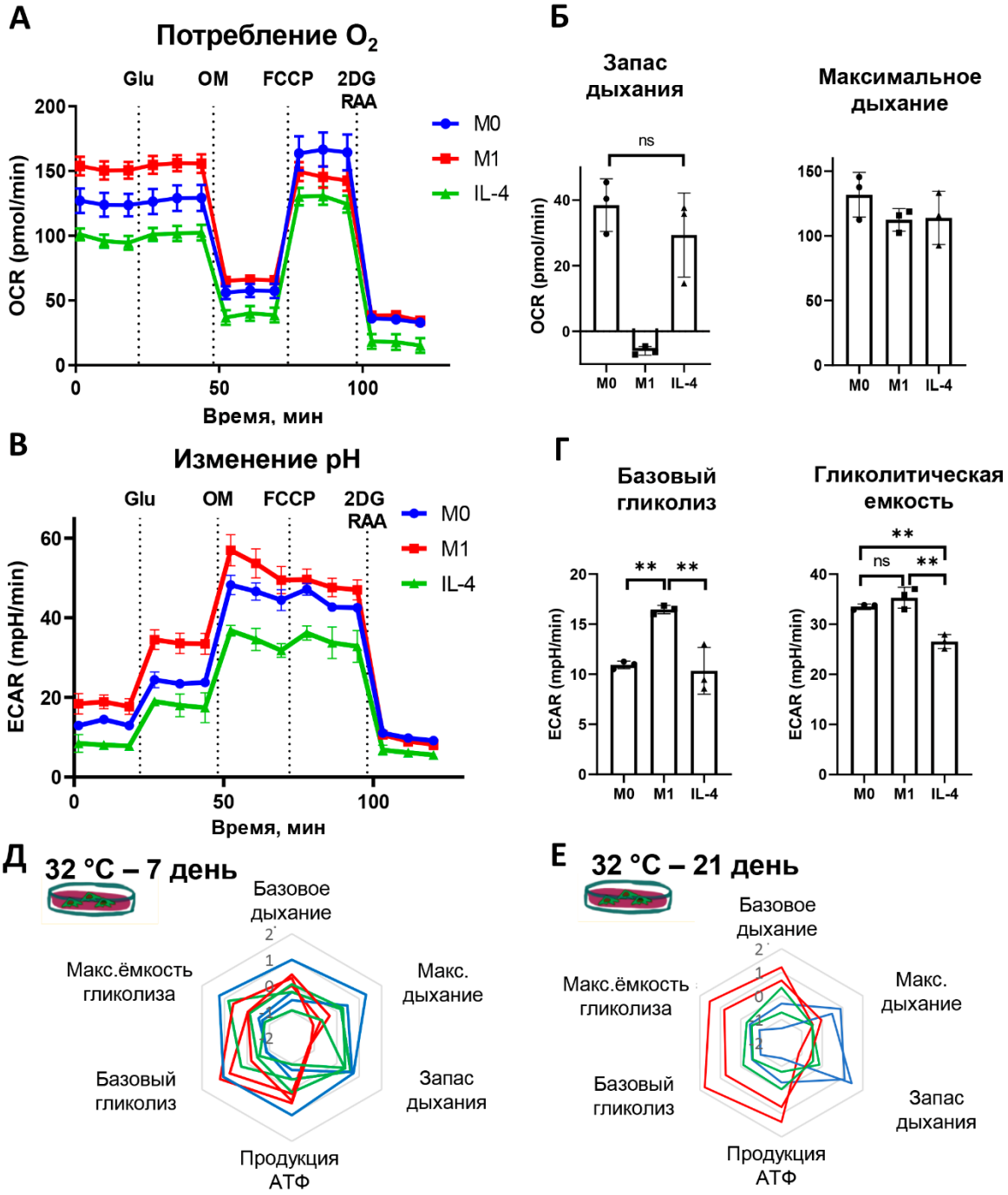


Рисунок 19. M1 макрофаги голого землекопа увеличивают способность к гликолизу, в то время как метаболические профили M2 макрофагов практически не изменяются.

А - Смешанный тест для определения уровней окислительного фосфорилирования на M0 (синяя кривая), M1 (красная кривая) и M2 (зеленая кривая) макрофагах голого землекопа; Б - M2 макрофаги голого землекопа запас дыхания и уровень максимального дыхания, сравнимые с клетками M0. В - Смешанный метаболический стресс-тест для определения уровней гликолиза на M0 (синяя кривая), M1 (красная кривая) и M2 (зеленая кривая) макрофагах голого землекопа; Г – M1 макрофаги голого землекопа демонстрируют повышение базового гликолиза и максимальной гликолитической ёмкости; Результат был повторён в трех независимых опытах. Для сравнения метаболических параметров в группах M0, M1, M2 использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). ** $p<0.01$.

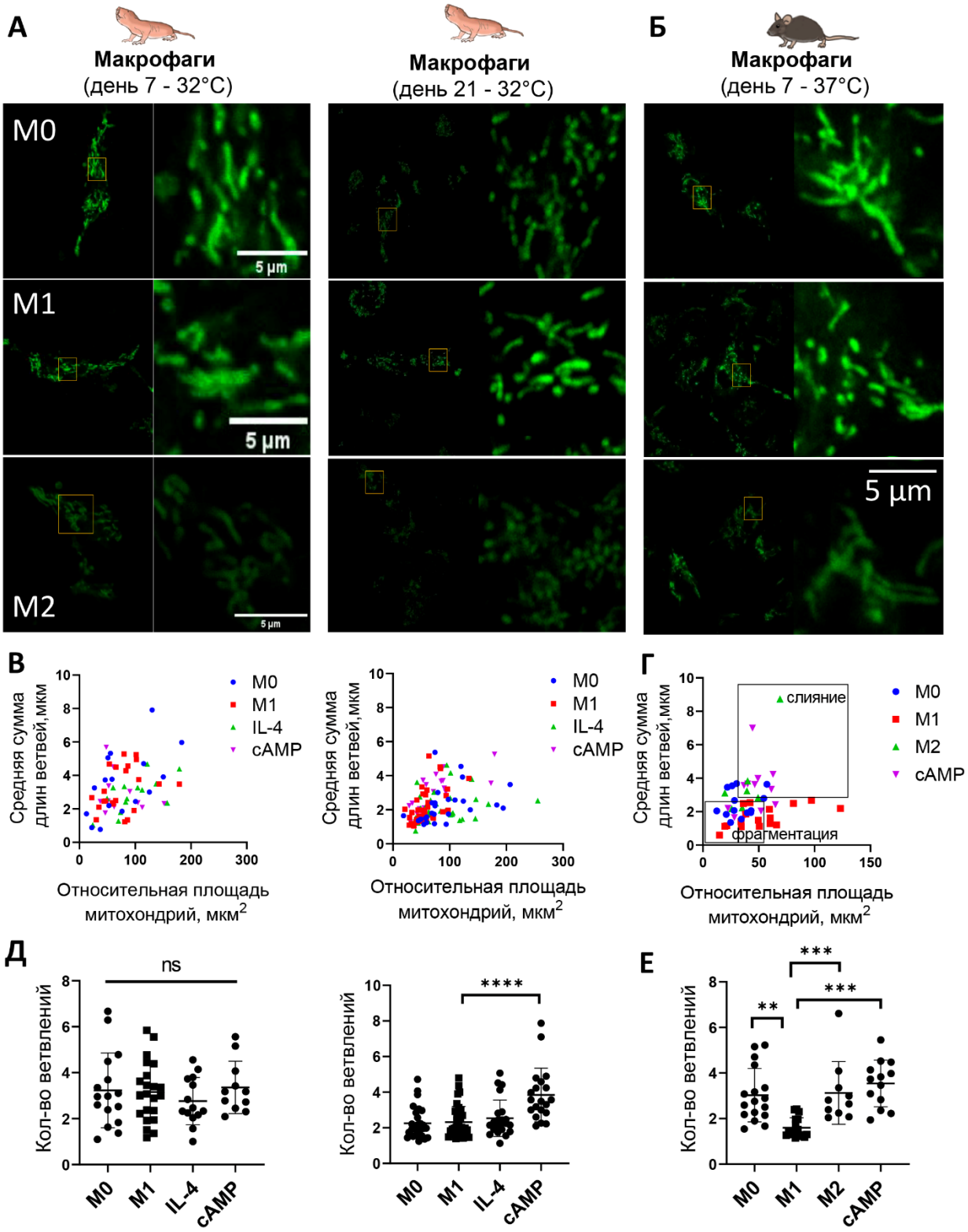


Рисунок 20. М1 поляризация в макрофагах голого землекопа приводит к менее выраженной фрагментации митоходрий, чем в макрофагах мыши.

А – Репрезентативные микроскопические изображения макрофагов голого землекопа и мыши, окрашенных MitoTracker Green, приведены изображения единичных клеток, а также приближенное изображение характерной структуры митохондрий; масштабная линейка – 5 мкм. Б – диаграмма распределения клеток по параметрам относительной площади митохондрий (мкм^2) и средней суммы длин элементов (ветвей) митохондриальной сети (мкм); В - среднее количество ветвлений в каждой из митохондриальной сети. Параметры

митохондриальных сетей были проанализированы при помощи приложения MiNA на выборке от 20 индивидуальных клеток [86]. Для сравнения параметров между группами M0, M1, M2, цАМФ использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). ** $p<0.01$; *** $p<0.001$; **** $p<0.0001$; ns – не достоверно.

В поляризованных макрофагах голого землекопа и мыши была оценена морфология и структура митохондрий при помощи окрашивания митохондриальным красителем MitoTracker Green (Рис. 20). В M1 макрофагах мыши хорошо заметно укорочение митохондрий (Рис. 20 А, правый столбец, второй ряд; Рис. 20 Б, правый график). Помимо этого, в M1 макрофагах мыши происходит уменьшение количества ветвлений в митохондриальных структурах (Рис. 20 В, правый график), что свидетельствует о процессе митохондриальной фрагментации (fission). В провоспалительных макрофагах голого землекопа процесс укорочения митохондрий и деградации сетей не так ярко выражен, как у мыши (как в клетках, активированных на 7 день (Рис. 20 А-Б, левый столбец), так и на 21 день (Рис. 20 А-Б, средний столбец). По всей видимости, клетки голого землекопа способны лучше поддерживать дыхательные функции в условиях воспаления.

Активация макрофагов мыши агентами M2-поляризации приводила к росту средней протяженности длины ветвей в сети, и их разветвленности, особенно ярко на цАМФ (Рис. 20 Б, правый график). На семидневных макрофагах голого землекопа, активированных IL-4 или цАМФ, не наблюдалось значимых отличий от M0 в структуре митохондрий (Рис. 20 Б, В, левый график). Интересно, что в макрофагах голого землекопа, взятых в опыт на 21 день и активированных цАМФ, было отмечено увеличение количества ветвлений в митохондриальных сетях относительно M1 (Рис. 20 В, средний график).

Ещё одним важным молекулярным механизмом, который участвует как в регуляции работы митохондрий и ЭТЦ, так и в поляризации макрофагов, является метаболизм активных форм азота. Для оценки продукции оксида азота макрофагами голого землекопа и мыши был проанализирован уровень нитритов в супернатантах активированных клеток при помощи реактива Грисса. Оказалось, что M1 макрофаги голого землекопа практически не производят NO, так как уровень сигнала в секретомах M1 клеток сравним с фоном (Рис. 21 А). В то же время M1 мыши производят высокие уровни NO, что является характерной чертой M1 фенотипа, согласно литературным данным (Рис. 21 Б). Чтобы доказать, что отсутствие нитритов в образцах голого землекопа не зависело от конкретного протокола активации, были проверены супернатанты, собранные через 2, 8, 24 и 48 часов после активации клеток LPS (10 нг/мл, 100 нг/мл) или смесью LPS (100 нг/мл) и IFNγ (50 нг/мл). Как и в случае стандартной активации M1, используемой в большей части опытов, значительного увеличения содержания нитритов в образцах голого землекопа не было

обнаружено (Рис. 21 В). С другой стороны, уровни NO в образцах мышей возрастали с течением времени и зависели от концентрации LPS и присутствия IFNγ (Рис. 21 Г). Кроме того, в единичном опыте мы оценили содержание внутриклеточного оксида азота при помощи окрашивания макрофагов диацетатом 4-амино-5-метиламино-2',7'-дифлуорофлуоресцеина (DAF-FM). Как и ожидалось, MFI DAF-FM возрастал относительно неактивированных клеток в М1 мыши, в то время как М1 и М0 макрофаги голого землекопа не отличались по MFI DAF-FM (Рис. 21 Д).

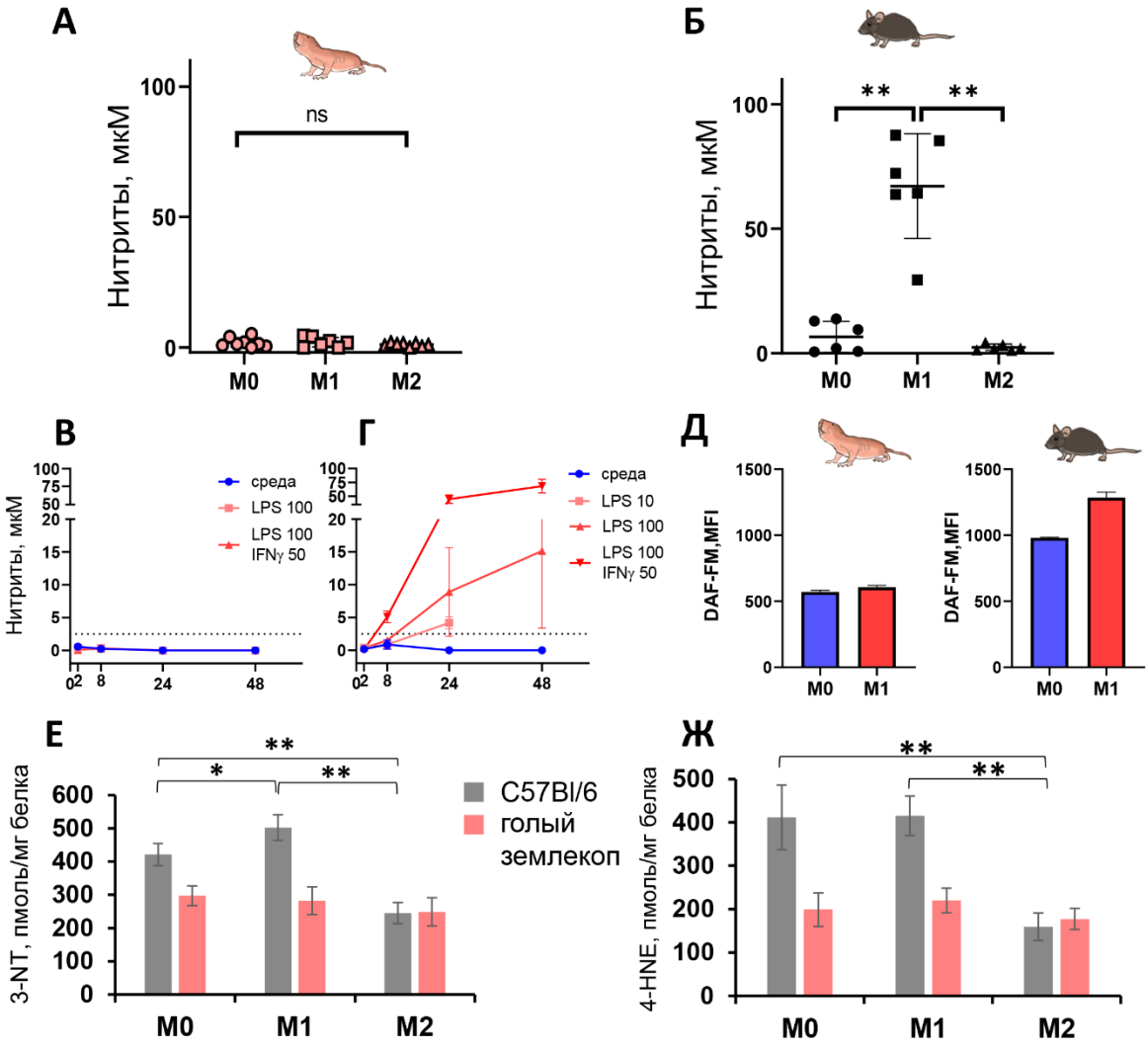


Рисунок 21. В М1 макрофагах голого землекопа подавлена продукция оксида азота.

А – уровень нитритов, измеренный при помощи реактива Грисса, в супернатантах, полученных от макрофагов голого землекопа и (Б) мыши после 24 ч поляризации. В – уровень нитритов в супернатантах макрофагов голого землекопа и мыши (Г), собранных через 2, 8, 24, 48 часов после активации LPS (10-100 нг/мл), либо смесью LPS (100 нг/мл) и IFNγ (50 нг/мл). Д – средняя интенсивность флуоресценции красителя DAF-FM в неакитивированных и М1 макрофагах голого землекопа и мыши, Е – уровень 3-нитротирозинов в лизатах М0, М1 и М2 клеток голого землекопа и мыши, Ж - уровень 4-гидрокси-ноненаля в лизатах М0, М1 и М2 клеток голого землекопа и мыши. Для сравнения

параметров между группами M0, M1, M2 использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). ** p<0.01; *** p<0.001; **** p<0.0001; ns – не достоверно.

Известно, что NO может быстро реагировать с супероксидным анион-радикалом с образованием пероксинитрита (PN), нестабильного при нейтральном pH в клетке ($NO\bullet + O2\bullet \rightarrow ONOO^-$) [106]. Продукты разложения пероксинитрита представляют собой высокореакционноспособные радикалы, которые атакуют как липиды, так и белки. Для того, чтобы косвенно оценить уровни PN в макрофагах голого землекопа и мыши, мы измеряли стабильный продукт модификации тирозина (3-нитротирозин, 3-NT) в лизатах культур. В M1 макрофагах мыши наблюдалось увеличение уровня 3-NT относительно M0, и снижение 3-NT – в M2 относительно M0 (Рис. 21 Е). Клетки голого землекопа не показали существенных различий в содержании 3-NT между группами M0, M1 и M2 (Рис. 21 Е), что коррелирует с отсутствием изменений уровней NO в супернатантах. Для косвенной оценки продукции супероксида мы измеряли в клеточных лизатах уровень 4-гидрокси-ноненаля (4-HNE) - продукта перекисного окисления липидов. Уровень 4-HNE был ниже в M2 макрофагах мыши по сравнению с M0 и M1 (Рис. 21 Ж). В то же время существенных различий по 4-HNE не наблюдалось при различных активациях макрофагов голого землекопа (Рис. 21 Ж).

3.3.2.5 Анализ транскриптомов M1 и M2 макрофагов голого землекопа

Для более глубокого понимания программ поляризации M1 и M2 макрофагов голого землекопа было проведено секвенирование 12 образцов РНК, полученных из четырёх 21-дневных дифференцированных культур макрофагов костного мозга голого землекопа, поляризованных в течение 24 часов (три группы - контроль, LPS и IFNγ, IL-4). Для сравнения использовались результаты РНК-секвенирования мышиных макрофагов, поляризованных 24 часа в присутствие аналогичных активаторов, из открытых баз данных (GSE103958 [107]; GSE159628 [108]).

Многомерное масштабирование данных трёх групп показало существенные отличия M1 макрофагов от M0 и M2 образцов, а также малые отличия между M0 и M2 (Рис. 22А, Б). Среди дифференциально экспрессированных генов (DEGs) в образцах M1 по сравнению с M0 можно было выявить LPS-индуцированные (*Nfkb1, Cd14, Tlr4, Lyn, Tnip3, Pik3ap1*) и IFNγ-ассоциированные гены (*Irf1, Stat1, Cd38, Ifit3*) (Рис. 22 В), что подтвердило данные о том, что M1 макрофаги голого землекопа реагировали на комбинацию LPS/IFNγ, даже несмотря на отсутствие яркого признака M1-фенотипа – продукции оксида азота, зависящей, в свою очередь, от активности фактора NF-κB.

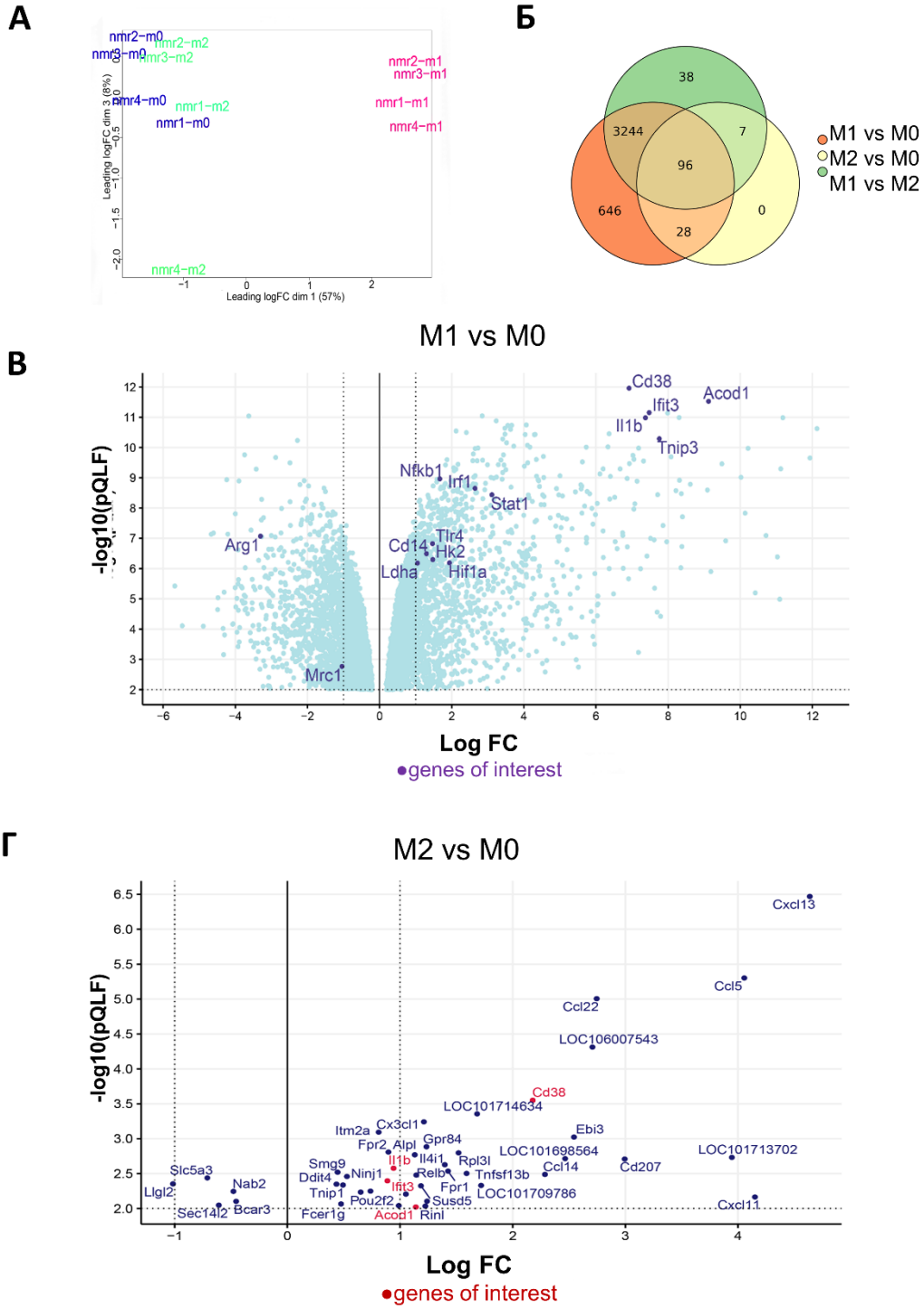


Рисунок 22. М1 макрофаги голого землекопа демонстрируют видоспецифичные особенности экспрессии генов, связанных с метаболизмом аргинина при воспалении.

А – MDS-диаграмма взаимного расположения транскриптомов в группах М0, М1 и М2 макрофагов голого землекопа; Б – Диаграмма Венна, демонстрирующая количество DEG в группах при попарном сравнении. В – Волкано-диаграмма DEG в М1 макрофагах голого землекопа по сравнению с М0, показаны DEG с $p<0.01$ (тест QLF). Г - Волкано-диаграмма DEG в макрофагах голого землекопа, активированных IL-4, по сравнению с М0, показаны DEG с $p<0.01$ (тест QLF).

Анализ DEG не выявил отличий по экспрессии индуцибельной NO-синтазы (*Nos2*), которая отвечает за продукцию NO иммунными клетками. В связи с этим мы проверили наличие ридов, которые выравниваются с последовательностью гена *Nos2* голого землекопа, в первичных данных секвенирования. К нашему удивлению, в образцах макрофагов голого землекопа таких ридов практически не содержалось. Экспрессия генов *Gch1* и *Slc7a2*, задействованных в осуществлении функций индуцибельной NO-синтазы, также не повышалась в M1 голого землекопа в то время, как в M1 мышей прослеживалась яркая сверхэкспрессия *Nos2*, *Gch1* и *Slc7a2* относительно M0 (Рис. 23).

Одним из наиболее высоко экспрессированных генов в M1 голого землекопа являлся ген аконитат декарбоксилазы 1 (*Acod1*), связанный с продукцией итаконата и так называемым «разрывом цикла Кребса». Повышение уровня экспрессии *Acod1*, а также генов *Hif1a*, *Hk2*, *Ldha* коррелировало с индукцией гликолиза, наблюдаемой в метаболических стресс-тестах в M1 макрофагах голого землекопа. В целом, анализ транскриптома не противоречил ранее полученным другими методами данным о специфическом иммунометаболическом фенотипе воспалительных макрофагов голого землекопа. Несмотря на сохранность ответа на LPS/IFNγ, характер изменения экспрессии генов, ассоциированных с метаболизмом оксида азота и аргинина, отличался между голым землекопом и мышью.

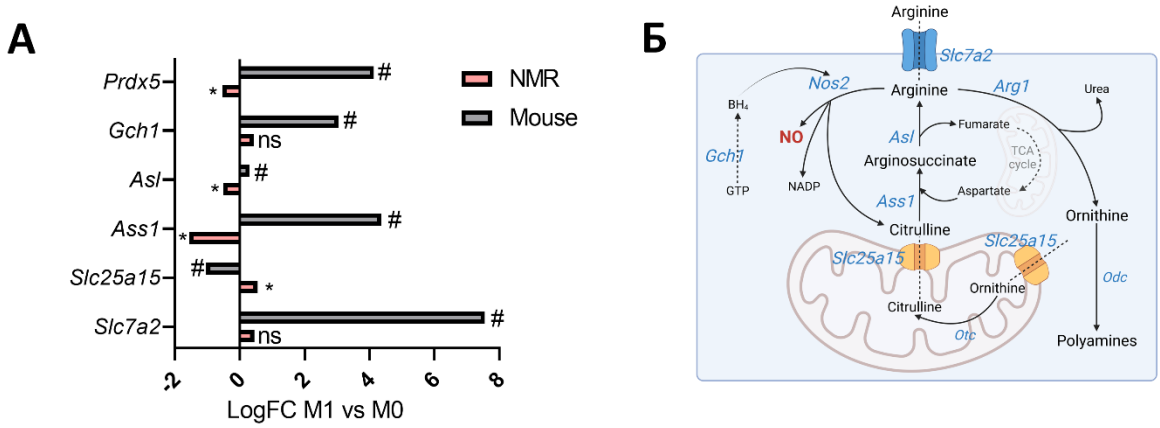


Рисунок 23. M1 макрофаги голого землекопа демонстрируют видоспецифичные особенности экспрессии генов, связанных с метаболизмом аргинина при воспалении.

А – Логарифмированные значения изменения экспрессии некоторых генов, ассоциированных с метаболизмом азота в M1 макрофагах по сравнению с M0 у голого землекопа и мыши (GSE103958), *,# $p<0.05$, тест QLF. Б – схема молекулярных путей, в которых задействованы выбранные гены.

Макрофаги голого землекопа, активированные при помощи рекомбинантного IL-4, имели почти такие же профили транскрипции, что и контрольные образцы (Рис. 22 А). В

соответствии с анализом экспрессии генов методом qRT-PCR, РНК-секвенирование не показало каких-либо различий в уровнях экспрессии характеристических М2-генов *Arg1, Egr2, Mrc1* между группами М2 и М0. В то же время экспрессия *Arg1* и *Mrc1* была значительно подавлена в М1, что говорит о том, что регуляция этих молекулярных путей хотя бы частично консервативна в клетках голого землекопа. В анализе DEG макрофаги голого землекопа, активированные IL-4, демонстрировали больше сходства с М1, чем с М0 (Рис. 22Б). Значимые изменения экспрессии наблюдались в генах, связанных с хемотаксисом (*Cxcl13, Ccl5, Ccl22*) (Рис. 22Г).

РНК-секвенирование макрофагов голого землекопа, активированных IL-4, показало статистически значимое изменение экспрессии лишь малого количества генов, которые, при этом, не являются характерными для ответа на IL-4 у мыши. На основании этих результатов нельзя сделать однозначный вывод о том, что функциональный фенотип, наблюдаемый в других опытах на макрофагах голого землекопа, активированных IL-4, а именно, увеличение продукции некоторых цитокинов и хемокинов, является видоспецифичной особенностью М2 поляризации *H.glaber*. Более подробно эта проблема рассмотрена в разделе «Обсуждение».

3.4. Модель системного воспаления

Для того, чтобы проверить, воспроизводятся ли особенности поляризации макрофагов голого землекопа, описанные нами в модели *in vitro*, в контексте целого организма *in vivo*, мы выбрали модель системного воспаления, индуцированного введением LPS. В особенности было интересно измерить продукцию оксида азота моноцитами крови, наиболее близкой к макрофагам костного мозга по происхождению популяцией иммунных клеток.

Опытной группе голых землекопов вводили 50 мкг LPS на 20 г веса внутрибрюшинно, животные из контрольной группы получали инъекцию PBS. Выбранная доза LPS вызывала у мышей воспроизводимое значимое увеличение продукции внутриклеточного NO в моноцитах крови через 24 часа после инъекции LPS, измеренное при помощи окрашивания DAF-FM в проточной цитометрии (Рис. 24 А).

Интересно, что голые землекопы в модели системного воспаления демонстрировали меньшее количество признаков «болезненного поведения». Если для мышей из опытной группы были характерны сниженная подвижность, диарея и обезвоживание, то у голых землекопов не наблюдалось подобных признаков. В одном из опытов была использована

группа мышей конвенционального содержания: среди этой группы болезненное поведение в ответ на LPS проявилось ещё сильнее, несколько животных пало.

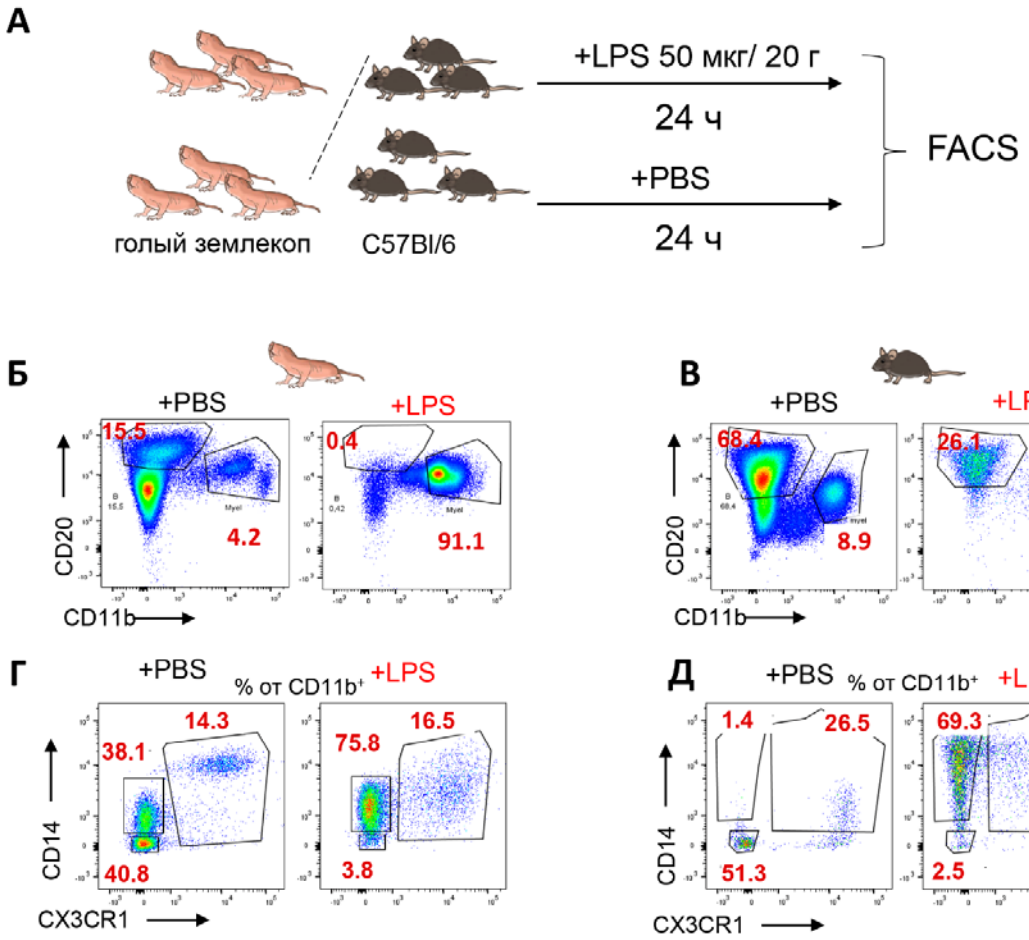


Рисунок 24. Сходная динамика изменений доли основных популяций иммунных клеток крови у голого землекопа и мыши в ответ на введение LPS.

А – схема эксперимента. Репрезентативные распределения клеток крови по маркерам CD20 и CD11b у контрольных и опытных животных в эксперименте с голым землекопом (Б) и мышью (В). Распределения миелоидных $CD11b^+$ клеток крови по маркерам CD14 и CX3CR1 у контрольных и опытных животных в эксперименте с голым землекопом (Г) и мышью (Д).

Кровь собирали через 24 часа после введения LPS или PBS, после чего окрашивали панелью кросс-специфичных антител (Таблица 6). В крови голых землекопов и мышей наблюдалась одинаковая тенденция: увеличение доли $CD11b^+$ клеток, по всей видимости, за счет нейтрофилов, а также снижение доли В-клеток (Рис. 24 Б, В). Отдельно были рассмотрены популяции $CD11b^+$ клеток в крови голого землекопа по экспрессии CD14-корецептора LPS, и CX3CR1 – рецептора хемокина CX3CL1, представленного на моноцитах. На основании обратного гейтирования популяций, мы предполагаем, что $CD14^+$ $CX3CR1^+$ клетки крови представляют собой, в основном, моноциты; $CD14^+$ $CX3CR1^-$ активированные LPS нейтрофилы, а отрицательные по обоим маркёрам миелоидные клетки, наблюдаемые в крови животных из контрольных групп, скорее всего являются

покоящимися гранулоцитами (Приложение, Рис. 31). В модели системного воспаления у групп, которым вводили LPS, возрастала доля $CD14^+$ $CX3CR1^-$ клеток (Рис. 24 Г, Д). При этом у голых землекопов, вероятно, в связи с конвенциональным статусом, эта популяция была представлена и в контрольной группе (Рис. 24 Г, левая диаграмма).

Наконец, был проанализирован уровень продукции внутриклеточного оксида азота в клетках крови голых землекопов и мышей в модели системного воспаления. Как при выделении популяции $CD11b^+$ целиком, так и в субпопуляции $CD11b^+$ $CD14^+$ $CX3CR1^+$, предположительно, состоящей из моноцитов крови (Рис. 25 А), не наблюдалось увеличения MFI DAF-FM у голого землекопа, что согласуется с данными *in vitro* (Рис. 21). При этом у мышей значительно увеличивался уровень средней флуоресценции DAF-FM во всех рассмотренных субпопуляциях и, особенно, ярко – в CD14-положительных клетках, отвечающих на LPS (Рис. 25 Б).

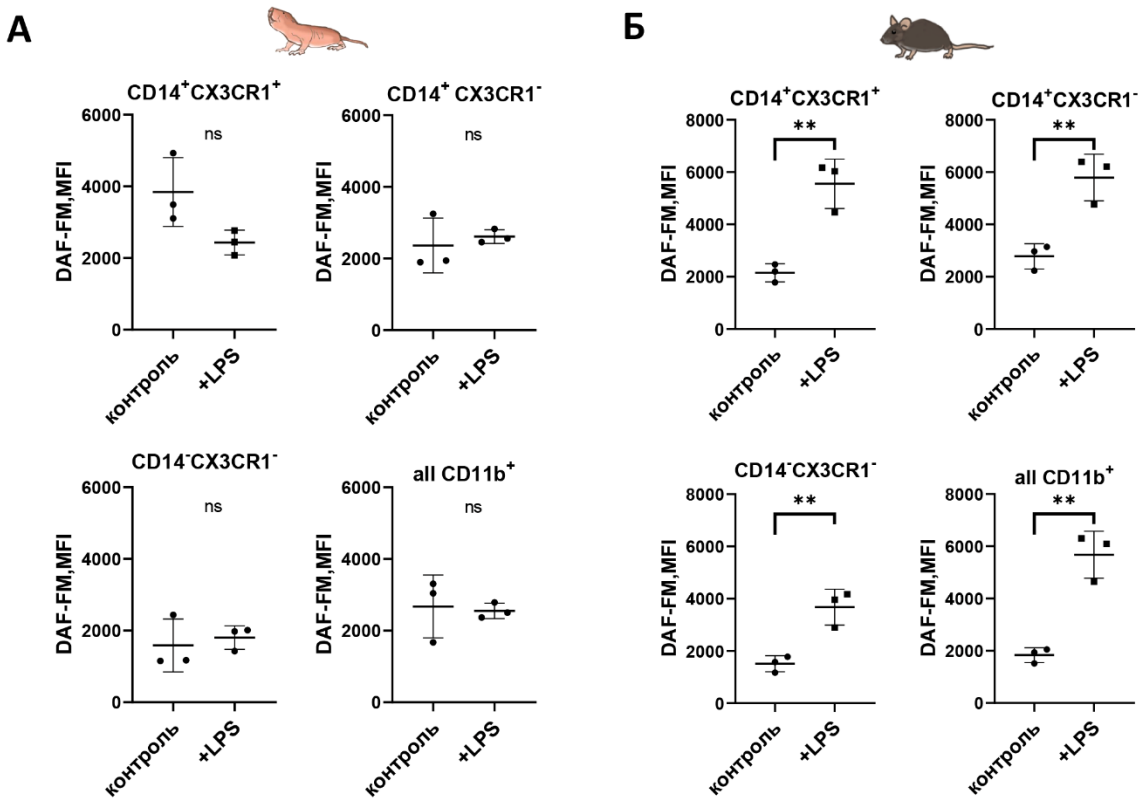


Рисунок 25. В ответ на введение LPS у голого землекопа не изменяется уровень внутриклеточного оксида азота в $CD11b^+$ клетках крови.

А – средняя интенсивность флуоресценции (MFI) красителя DAF-FM популяциях моноцитов, активированных нейтрофилов и других миелоидных клеток, выделенных из крови голого землекопа и мыши (Б) при экспериментальном системном воспалении.

Таким образом, особенности контроля продукции оксида азота наблюдались у голых землекопов не только *in vitro*, но и *in vivo* в модели системного воспаления.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Особенности иммунной системы голого землекопа на уровне организма

До последних лет в науке не существовало единого мнения относительно базовых характеристик иммунной системы голого землекопа - таких, как структура лимфоидных органов и их клеточный состав, вероятно, из-за ограниченного числа иммунологических реагентов, распознающих ткани голого землекопа. Данные о работе иммунитета голого землекопа получали, в основном, из наблюдений за здоровьем животных в лаборатории и дикой природе. Так, гистопатологические данные, собранные на протяжении 15 лет в одной из крупнейших лабораторных колоний показали, что одной из распространенных причин спонтанной гибели голых землекопов являлись укусы, нанесенные животными друг другу в борьбе за социальный статус в колонии, второе место занимали различные болезни почек, при этом о наличии иммунопатологий не сообщалось [109]. Были описаны случаи крайней чувствительности голого землекопа к вирусным инфекциям: неопасный для мыши вирус простого герпеса первого типа (HSV1) вызывал 100% гибель голых землекопов, при этом динамика развития заболевания и гистопатологическая картина, наблюдаемая у голых землекопов, была сходна с таковыми у людей с иммунодефицитами [73]. В другой работе сообщалось о том, что заражение колонии коронавирусом привело к гибели более 60% рабочих особей [74]. Более поздние исследования показали, что большая часть клеток селезёнки голого землекопа представлена нейтрофилами, популяция В-клеток существенно меньше, чем у мыши, а фракция NK-клеток отсутствует как в селезёнке, так и в крови. Наконец, содержание CTL в крови снижено по сравнению с мышью [81]. Суммируя эти факты, можно предположить, что голые землекопы – частично иммунодефицитный вид и, скорее всего, редукции подверглась адаптивная ветвь иммунитета. Наши данные указывают на то, что некоторые лимфоидные органы голого землекопа действительно обладают меньшим размером по сравнению с мышью, и содержат меньшее количество иммунных клеток (Рис. 4, Рис. 6). Похожие на обнаруженные нами количественные различия описаны при сравнении лабораторных и диких мышей [110]. Однако при меньшем абсолютном количестве, доля Т, В и миелоидных клеток в селезенке диких мышей была выше, чем у лабораторных, кроме того, клетки экспрессировали большее количество маркеров активации, что легко объясняется высокой патогенной нагрузкой в природе. Из этого можно сделать вывод, что полноценный, эффективно противостоящий широкому спектру патогенов иммунитет, как в случае диких мышей, может быть обеспечен за счет меньшего абсолютного количества клеток и их высокой активации, поэтому компактность иммунных органов голого землекопа никоим образом не свидетельствует в пользу дефицитного иммунитета у этих животных.

Интересно, что на фоне снижения доли В-клеток в селезёнке голого землекопа (Рис. 11 В), и некрупных лимфоузлов (Рис. 7), Пейеровы бляшки хорошо выражены (Рис. 9 Г). Можно предположить, что Пейеровы бляшки играют исключительную роль в онтогенезе иммунной системы вида. Так, например, у некоторых животных (коровы, овцы) лимфоидная ткань кишечника выступает в качестве первичного органа развития В-клеток [111]. В этом случае уменьшение количества и размера Пейеровых бляшек с возрастом могло быть свидетельством старения иммунной системы голого землекопа (Рис. 9 Е). Кроме того, мы обнаружили, что в собственной пластинке кишечника содержится очень высокое количество иммунных клеток на грамм ткани (Рис. 12 Б). На данном этапе исследования мы не проводили сравнительный анализ количества иммуноцитов, выделяемых из ворсинок кишечника (интраэпителиальных лимфоцитов, IEL), между голым землекопом и мышью. Известно, что в состав IEL мыши входят эффекторные Т-клетки, в первую очередь, неклассических фенотипов – γδ-Т, CD8αα. Учитывая то, что для голого землекопа было показано наличие «гибридных» γδ-Т, экспрессирующих некоторые маркёры цитотоксических лимфоцитов [84], в будущем будет интересно рассмотреть этот компартмент как потенциальное «место службы» данной популяции.

Выраженность лимфоидной ткани кишечника у голого землекопа может свидетельствовать о её важности в контроле микрофлоры. Наиболее крупным отделом кишечника голого землекопа является слепая кишка (Рис. 9 Д), занимающая около 8% массы тела и обеспечивающая до 60% энергетических потребностей животного, за счет микробного производства жирных кислот. Показано, что помимо непатогенной флоры, в основном представленной бактериями рода *Bacteroides*, в композиции микробиоты слепой кишки присутствуют также представители условно-патогенных родов грамм-отрицательных бактерий *Klebsiella* и *Treponema*, участвующие в ферментации пищи [76]. При оценке клеточного состава собственной пластинки кишечника с помощью панели кросс-специфичных антител было показано, что доля основных популяций сравнима между голым землекопом и мышью (Рис. 12 В-Д). Однако при анализе морфологии LPL окрашиванием по Романовскому было отмечено большое количество крупных лимфоцитов, вероятно, плазматических клеток, что могло бы быть связано с видоспецифичными механизмами контроля патогенных бактерий в кишечнике, например, высокой выработкой антител изотипа IgA (Рис. 13). К сожалению, данный анализ недостаточен для точного определения популяций, наблюдаемых в LPL. Мы провели РНК-секвенирование LPL голого землекопа, чтобы в будущем оценить клеточный состав, а

также проверить гипотезы об участии GALT в развитии или накоплении B-клеток и контроле условно-патогенной микробиоты.

В недавней работе показано [84], что у голого землекопа не происходит функциональная инволюция тимуса, как минимум, 11 лет, а также есть дополнительный парный шейный тимус. В нашей работе у самой старой из исследованных особей (самец 8417 возраста 6 лет) также не было обнаружено признаков инволюции тимуса (Рис. 5). Вместе с наблюдением об экспрессии маркеров цитотоксических клеток на неканонических популяциях лимфоцитов голого землекопа [74], эти факты говорят скорее в пользу того, что адаптивную ветвь иммунитета голого землекопа не стоит считать «редуцированной». Вероятно, она несет черты, наследуемые всей группой *Caviomorpha*, и более глубокое исследование родственных видов обнаружит сходные фенотипы распределения лимфоцитов. Тем самым, случаи чувствительности голого землекопа к некоторым вирусам, на данный момент преждевременно объяснять отсутствием у голого землекопа NK-клеток или уменьшением уровней канонических CD8-положительных T-клеток. Необходима разработка моделей вирусной инфекции у голого землекопа, чтобы до конца разобраться в этом вопросе.

Наконец, полученные нами данные о составе популяций иммунных клеток крови и гистологической структуре селезёнки голого землекопа (Рис. 7, Рис. 8, Рис. 11) хорошо согласуются с работами Cheng et al [78] и Hilton et al [79]. По всей видимости, миелоидные клетки, в особенности нейтрофилы, очень важны для функционирования иммунной системы голого землекопа.

4.2. Особенности макрофагов голого землекопа

Классический взгляд на старение иммунной системы подразумевает, что основным источником хронического воспаления являются миелоидные клетки. Формирование патогенного фенотипа этих клеток зависит от метаболизма – при старении макрофагов, например, наблюдается избыток митохондриальных активных форм кислорода (mtROS) и снижение эффективности кислородного дыхания, а также синтеза NAD+ [112]. Свойства макрофагов и нейтрофилов, ассоциированных с опухолями, также во многом определяются метаболизмом – адаптация к низкому содержанию кислорода и высокому – лактата в опухолевом микроокружении, может провоцировать толерогенность миелоидных клеток, и, как результат, уход опухолей от иммунного надзора [113]. Так как у голого землекопа преобладание миелоидных клеток в периферических иммунных органах сочетается с высокой продолжительностью жизни и отсутствием признаков старения, мы

предположили, что у *H.glaber* развита система контроля активации миелоидных клеток, позволяющая ограничивать их вредные свойства при хроническом воспалении, ассоциированном со старением и образованием опухолей.

В ходе работы была оптимизирована *in vitro* модель макрофагов костного мозга, призванная стать инструментом для изучения пластичности транскрипционного профиля иммунных клеток голого землекопа. При получении культур макрофагов голого землекопа мы исходили из высокой консервативности рецепторов к ростовым факторам, в связи с чем использовали рекомбинантные белки мыши. Кроме того, были использованы классические культуральные среды (DMEM с добавлением глюкозы, глутамина, пирувата, а также FBS).

Исходя из того, что для голых землекопов характерна более низкая температура тела, чем для мыши и человека, в ходе работы мы варьировали температурные условия, а также длительность ведения культур, так как температура может влиять на скорость деления клеток. Оказалось, что культуры костного мозга голого землекопа лучше дифференцировались при температуре 32 °C (Рис. 15 - 16; Приложение, Рис. 30), а при температуре 37 °C как в опытах с полужидкой средой (Рис. 15), так и культурах макрофагов (Рис. 16; Приложение, Рис. 30), дифференцировка клеток костного мозга нарушалась. В работе Wada et al [80] также был продемонстрирован более эффективный рост клеточной линии макрофагов голого землекопа при температуре 32 °C, но не 37 °C. Кроме того, продолжительное ведение культуры макрофагов голого землекопа показало, что дифференцировка макрофагов из предшественников может происходить в течение, как минимум, трёх недель (Рис. 15). Данные наблюдения согласуются с результатами исследования Emmrich et al [72], в котором было показано, что у стволовых клеток крови голого землекопа более продолжительный клеточный цикл.

Макрофаги голого землекопа приобретают, в целом, ожидаемый провоспалительный фенотип при активации LPS и рекомбинантным IFNγ мыши (Рис. 16, 17, 19), но при этом продукция NO в них ограничена (Рис. 21). Сниженная продукция NO коррелирует с отсутствием выраженной фрагментации митохондрий (Рис. 20) в M1 макрофагах голого землекопа.

Аэробный гликолиз является отличительной чертой активированных иммунных клеток [63]. В недавних исследованиях метаболизма голого землекопа в условиях гипоксии была выдвинута гипотеза о том, что в большинстве тканей этого вида гликолиз и OXPHOS тесно связаны, чтобы избежать системного или локального ацидоза в тканях [48]. Приведенная выше гипотеза не учитывала возможную роль NO и его производных в

регуляции OXPHOS [114]. Оксид азота, а также производное его взаимодействия с активными формами кислорода, пероксинитрит, способны оказывать прямое влияние на различные элементы ЭТЦ, ингибировать ферменты с антиоксидантными свойствами. В нашей работе мы наблюдали более низкие уровни продуктов окислительного стресса – 3-нитротирозина и 4-гидроксиноненаля в лизатах макрофагов голого землекопа по сравнению с мышами (Рис.21 Е, Ж). Можно предположить, что у голого землекопа существуют особые молекулярные механизмы контроля продукции не только NO, но и АФК, что подтверждается недавней работой Vyssokikh *et al*, описывающей механизм «мягкой деполяризации» митохондрий [51].

Ортолог гена *Nos2* был аннотирован в последней версии генома голого землекопа. Кроме того, в данных РНК-секвенирования образцов LPL голого землекопа мы обнаружили последовательности, выравнивающиеся по отдельности с *Nos2*, *Nos1* и *Nos3*. Тем самым, несмотря на отсутствие *Nos2* в данных РНК-секвенирования макрофагов, голый землекоп не является естественным «нокаутом» по индуцируемой NO-синтазе.

Gch1, кодирующий GTP-циклогидролазу 1, участвует в образовании кофактора iNOS тетрагидробиоптерина (BH4). *Gch1* не активировался в M1 макрофагах голого землекопа, в отличие от M1-макрофагов мыши (Рис. 23 А). Интересно, что воспалительные M1 макрофаги костного мозга из мышей с генетическим нокаутом *Gch1* или *Nos2* имеют более высокое базовое и связанное с продукцией АТФ дыхание в метаболических стресс-тестах, более низкие уровни внеклеточного лактата и повышенную продукцию итаконата и IL-1β по сравнению с макрофагами дикого типа [115]. Транскриптомы M1 клеток голого землекопа в нашем исследовании также показали сверхэкспрессию генов *Acod1* и *Il1b* по сравнению с M0 (Рис. 22 В), что может коррелировать с отсутствием активности NO-синтазы.

Экспрессия многих генов, связанных с метаболизмом аргинина, изменяется при поляризации макрофагов мыши, так как эти молекулярные пути непосредственно предопределяют функциональный фенотип в клетках [114]. Например, в M1-клетках мыши высоко экспрессирован переносчик аргинина CAT2, кодируемый геном *Slc7a2,* по сравнению с M0 (Рис. 23 А). В M1 макрофагах голого землекопа не отмечается изменение экспрессии гена *Slc7a2,* что, в свою очередь, может предопределять внутриклеточные уровни аргинина, главного субстрата индуцированной NO-синтазы и аргиназы 1. Некоторые гены, кодирующие ферменты цикла мочевины и аспартат-аргиносукцинатного шунта (*Ass1, Asl, Slc25a15*), изменяют уровни экспрессии разнонаправленно - в макрофагах голого землекопа по сравнению с мышью (Рис. 23). Таким образом, ограниченная

продукция NO в макрофагах голого землекопа при воспалительном стрессе может быть обусловлена транскрипционной, посттранскрипционной регуляцией или модуляцией метаболических путей за счёт недостатка субстрата. Интересно, что ранее сообщалось о механизмах контроля NO в нейронах головного мозга голого землекопа: так, у мышей при гипоксии-реоксигенации ткани мозга *in vitro* наблюдался скачок продукции оксида азота, в то время как у голых землекопов возвращение к нормальным уровням кислорода не влияло на уровень продукции NO [116]. На основании наших данных можно предположить, что что аналогичные механизмы могут существовать и для активных форм азота, продуцируемых иммунными клетками в контексте воспаления.

В ранее опубликованной работе по поляризации макрофагов голого землекопа было показано отсутствие изменения экспрессии М2-ассоциированных маркеров в ответ на стимуляцию рекомбинантным IL-4 мыши или человека, что авторы интерпретировали как изначальную предрасположенность М0 макрофагов к фенотипу М2 [80]. Эксперименты в этом исследовании были проведены на клеточной линии, полученной из перитонеальных макрофагов, которые действительно более склонны к М2 фенотипу, чем макрофаги из костного мозга [117]. В нашем исследовании анализ транскриптомов макрофагов костного мозга, активированных рекомбинантным IL-4 мыши, показал сходство с М0 (Рис. 22 А, Б) и отсутствие чёткой М2-сигнатуры (Рис. 22 Г). Кроме того, макрофаги голого землекопа, активированные IL-4, не соответствовали ожидаемому М2-фенотипу и с точки зрения их метаболического профиля (Рис. 19). Данные о продукции и экспрессии хемокинов поляризованными макрофагами голого землекопа (Рис. 17 А) скорее противоречат гипотезе о предрасположенности к М2: альтернативно активированные макрофаги голого землекопа продуцировали хемокины CCL4, CCL5 и IL-1β, что более характерно для М1 фенотипа у мышей (Рис. 17 Б).

В целом, наши наблюдения, полученные на макрофагах голого землекопа, активированных в противовоспалительных условиях, могут быть объяснены двумя различными причинами: 1) рекомбинантный IL-4 мыши обладает недостаточным сродством к соответствующим рецепторам на клетках голого землекопа и вызывает лишь частичную активацию молекулярного каскада, 2) программа М2-поляризации в макрофагах голого землекопа отличается от таковой у мыши, или требует дополнительных, неизвестных на данный момент, факторов для запуска.

Отметим, что попарное выравнивание белковых последовательностей показало сходство между IL-4 мыши и голого землекопа на ~50-60% (в зависимости от выбранной аннотации генома *H.glaber*). Рекомбинантный IL-4 человека также содержит ~ 50%

сходных аминокислот. IL-4Rα показал ~54%, IL-13Rα и общая γ-цепь – около 80% сходства белковых последовательностей между видами. Таким образом, высокий уровень различий в аминокислотном составе между доступными рекомбинантными вариантами IL-4 и нативным цитокином представляет собой явное ограничение модели, применяемой в настоящем или в подобных ему исследованиях. В будущем эти опыты должны быть повторены с рекомбинантным IL-4 голого землекопа.

Как альтернативный подход к проблеме полноценности взаимодействия IL-4 мыши с рецепторами голого землекопа в некоторых опытах был использован цАМФ в качестве неспецифического активатора М2 фенотипа [118]. В макрофагах мышей экспрессия гена *Arg1*, важнейшего маркера М2-поляризации, повышалась, как при активации IL-4, так и цАМФ. При этом в макрофагах голого землекопа стимуляция цАМФ не приводила к повышению экспрессии *Arg1* (Рис. 16 Г). цАМФ также не вызывал видимого увеличения массы митохондрий в клетках голого землекопа (Рис. 20 Б, В), хотя и повышал уровень ветвления митохондриальных сетей макрофагов, полученных на 21 день (Рис. 20 Д). Таким образом, в наших экспериментальных условиях макрофаги голого землекопа плохо дифференцировались в сторону М2 фенотипа в том числе и при активации, не использующей белок-белковое взаимодействие типа рецептор-лиганд, что является доводом в пользу наличия видоспецифичных особенностей программы М2-поляризации у голого землекопа.

Интересно, что на уровне генома у голого землекопа обнаруживаются мутации, которые гипотетически могут влиять на развитие фенотипа М2-клеток. Во-первых, в гене *Arg1* есть специфичная для *Caviomorpha* замена H254, которая потенциально способна снижать активность фермента [119]. Вместе с особенностями метаболизма NO, обсуждавшимися выше, это может указывать на возможную реорганизацию цикла NO-мочевина, специфичную для голого землекопа. Во-вторых, кластер Retnl, кодирующий резистиноподобные белки у мыши, и задействованный в функционировании альтернативно-активированных макрофагов [120], у голых землекопов отсутствует [121].

4.3. Системный ответ на LPS

Предыдущие исследования LPS-токсичности *in vivo* выявили атипичную поведенческую реакцию у голых землекопов. В отличие от мышей [122], введение LPS не подавляло двигательную активность и не вызывало тревожного поведения у особей *H.glaber*. В то же время сообщалось о потере веса и уменьшении социальных взаимодействий [123]. Секвенирование единичных клеток крови и селезенки через 4 часа

после введения LPS выявило сходные изменения экспрессии генов у мышей и голого землекопа, включая активацию канонического пути NF-κB [79]. Однако продукция NO в крови голого землекопа ранее не оценивалась в модели LPS-индуцированного системного воспаления.

В соответствии с данными *in vitro*, мы не обнаружили продукции NO в моноцитах крови голого землекопа через 24 ч после введения LPS (Рис. 25). Такая адаптация голого землекопа к системному воспалительному стимулу, вероятно, необходима для контроля NO-зависимых молекулярных путей. Интересно, что недавнее исследование, в котором сравнивали ответ на LPS у оленьих хомячков (*Peromyscus*) и мышей, показало более низкую экспрессию *Nos2* в крови оленьих хомячков, которые являются природным резервуаром множества инфекций [124]. Сравнительный анализ транскриптомов макрофагов костного мозга семи видов (крысы, свиньи, лошади, овцы, козы, коровы, буйвола), активированных LPS, также продемонстрировал дивергентную экспрессию генов, связанных с метаболизмом аргинина [125]. Авторы предположили, что это происходит из-за дивергентной эволюции дистальных регуляторных элементов *Nos2* [125]. Мы обнаружили по крайней мере один консервативный сайт связывания NF-κB в промоторе гена *Nos2* голого землекопа, поэтому отсутствие индукции NO при активации LPS может быть обусловлено другими регуляторными областями или совершенно другими молекулярными механизмами, расшифровка которых потребует дальнейших исследований.

ГЛАВА 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Голый землекоп – новая модель в иммунологии. В ходе настоящей работы для изучения особенностей голого землекопа мы применили арсенал методов, известных из экспериментальной иммунологии мыши, и смогли получить новые интересные сведения, дополняющие картину строения и функционирования иммунной системы *H. glaber*.

Так, анализ морфологии и клеточного состава первичных лимфоидных органов в нашей работе хорошо коррелирует с новейшими данными, полученными с использованием scRNA-секвенирования. Новым результатом является характеристика лимфоидной ткани, ассоциированной с кишечником.

В настоящем исследовании была дана функциональная характеристика про- и противовоспалительных макрофагов костного мозга голого землекопа. Мы обнаружили, что поляризация макрофагов голого землекопа в провоспалительных условиях приводит к развитию ожидаемого иммунометаболического фенотипа. Отличительной чертой M1 макрофагов голого землекопа является отсутствие продукции оксида азота, в том числе при введении LPS системно. Макрофаги голого землекопа, активированные рекомбинантным IL-4, не приобретали характерные для противовоспалительных макрофагов черты. Наконец, в ходе работы были проверены ранее опубликованные и найдены новые антитела, способные распознавать иммунные клетки голого землекопа.

По результатам работы были сформулированы следующие выводы:

1. Иммунная система голого землекопа отличается от таковой у мыши на уровне органов и клеток. Так, лимфоидная ткань, ассоциированная с кишечником, является самым крупным вторичным лимфоидным органом голого землекопа за счёт более высокого абсолютного количества лимфоцитов собственной пластинки кишечника, чем у мышей.
2. В костном мозге и селезёнке голого землекопа наблюдается меньшее абсолютное количество клеток, однако увеличено процентное содержание CD11b+ CD14+ популяции по сравнению с мышью, что согласуется с преобладанием миелопоэза у голого землекопа.
3. Миелоидные клетки-предшественники голого землекопа производят колонии и приобретают зрелый фенотип в культуре макрофагов костного мозга при температуре 32 °C, но не 37 °C, что может отражать адаптацию иммунной системы голого землекопа к гетеротермии.

4. Макрофаги костного мозга голого землекопа, активированные LPS и IFNγ, увеличивают экспрессию провоспалительных генов, продукцию цитокинов и аэробный гликолиз, но в то же время способны лучше поддерживать функциональную активность митохондрий по сравнению с макрофагами мыши. M1 макрофаги голого землекопа не продуцируют оксид азота, что может отражать адаптацию иммунной системы к гипоксии в тканях голого землекопа.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю искреннюю благодарность своему научному руководителю – Сергею Артуровичу Недоспасову, без инициативы, организационных усилий и научного видения которого этот проект не состоялся бы. Спасибо Вам за возможность сделать первые шаги в удивительной науке – иммунологии и за Вашу заразительную энергию! Выражаю огромную благодарность Марине Сергеевне Друцкой за бесконечную поддержку и ценные советы на всех этапах работы.

Я благодарна коллегам, которые содержат колонии голых землекопов в Москве, – Михаилу Юрьевичу Высоких и Ольге Александровне Авериной, и в Берлине, - Томасу Хильдебранду, Сьюзан Хольце – за возможность работать с этим интересным объектом и присоединиться к содружеству учёных, исследующих голого землекопа по всему миру. Спасибо Стэну Бруде и Василию Николаевичу Манских за развенчание мифов о голых землекопах!

На разных этапах проекта с нами сотрудничало множество коллег. Юрий Владимирович Шебзухов поделился коллекцией плазмид, содержащих клонированные последовательности маркёров иммуноцитов голого землекопа. Александр Васильевич Филатов предоставил возможность протестировать свою коллекцию моноклональных антител на клетках голого землекопа. РНК-секвенирование и биоинформатический анализ были проведены благодаря сотрудникам лаборатории сравнительной геномики и транскриптомики ИМБ РАН: Алексею Александровичу Дмитриеву, Екатерине Дворяниновой, Елене Пушковой и Наталии Мельниковой. Отдельно хотелось бы поблагодарить коллег, помогавших мне в Берлине – Керима Мутига и Андрея Алексеевича Круглова.

Неоценимую помощь – техническую и моральную - мне оказывал коллектив Лаборатории молекулярных механизмов иммунитета. Бесконечную благодарность выражаю Екатерине Губернаторовой и Ольге Намакановой, которые были со мной в самые трудные и темные моменты. Спасибо Виолетте Гоголевой, Максиму Носенко и Каме Атретханы за конструктивную критику, Таисии Юраковой и Денису Анисову – за стимуляцию интереса к иммунометаболизму. Спасибо нашим студентам - Александре Медведовской, Альмине Полиновой, Анне Шейновой, Арине Дыгай, Тьи Нгуен, Анастасии Яковлевой, Фёдору Сысонову, Светлане Пуртовой – за возможность учиться и быть учителем. Наконец, благодарю Руслана Валерьевича Зварцева за мудрость и неиссякаемый оптимизм.

Выражаю благодарность Кириллу Корнееву из лаборатории Д.В Купраша, Ирине Астраханцевой, Александру Шумееву и сотрудникам Направления Иммунобиология и биомедицина Научно-технологического университета «Сириус». Спасибо Рафаелу Шаэновичу Казаряну за хорошее настроение и решение любых проблем.

Я благодарна сотрудникам кафедры иммунологии, особенно Евгению Сергеевичу Шилову, который был моим первым научным руководителем в студенческие годы, Дмитрию Борисовичу Киселевскому и Нине Владимировне Взоровой за организацию учебного процесса, а также Дмитрию Владимирову Купрашу, Нине Иосифовне Дризе и Марии Андреевне Лагарьковой за прочтение диссертации и ценные замечания.

Спасибо моим родным и любимым – за то, что подставляли плечо, терпели занудство, утирали мои слёзы и всегда в меня верили.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mcnab B. Citation Classic - the Metabolism of Fossorial Rodents - a Study of Convergence // Current Contents/Agriculture Biology & Environmental Sciences. – 1984. – Т. 46. – С. 16.

2. Braude S., Holtze S., Begall S., Brenmoehl J., Burda H., Dammann P., Del Marmol D., Gorshkova E., Henning Y., Hoeflich A., Hohn A., Jung T., Hamo D., Sahm A., Shebzukhov Y., Sumbera R., Miwa S., Vyssokikh M. Y., von Zglinicki T., Averina O., Hildebrandt T. B. Surprisingly long survival of premature conclusions about naked mole-rat biology // Biol Rev Camb Philos Soc. – 2021. – Т. 96, № 2. – С. 376-393.

3. Braude S. Dispersal and new colony formation in wild naked mole-rats: evidence against inbreeding as the system of mating // Behavioral Ecology. – 2000. – Т. 11, № 1. – С. 7-12.

4. Delaney M. A., Ward J. M., Walsh T. F., Chinnadurai S. K., Kerns K., Kinsel M. J., Treuting P. M. Initial Case Reports of Cancer in Naked Mole-rats (Heterocephalus glaber) // Vet Pathol. – 2016. – Т. 53, № 3. – С. 691-6.

5. Cole J. E., Steeil J. C., Sarro S. J., Kerns K. L., Cartoceti A. Chordoma of the sacrum of an adult naked mole-rat // J Vet Diagn Invest. – 2020. – Т. 32, № 1. – С. 132-135.

6. Seluanov A., Hine C., Azpurua J., Feigenson M., Bozzella M., Mao Z., Catania K. C., Gorbunova V. Hypersensitivity to contact inhibition provides a clue to cancer resistance of naked mole-rat // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2009. – Т. 106, № 46. – С. 19352-7.

7. Tian X., Azpurua J., Hine C., Vaidya A., Myakishev-Rempel M., Ablaeva J., Mao Z., Nevo E., Gorbunova V., Seluanov A. High-molecular-mass hyaluronan mediates the cancer resistance of the naked mole rat // Nature. – 2013. – Т. 499, № 7458. – С. 346-9.

8. Tian X., Azpurua J., Ke Z., Augereau A., Zhang Z. D., Vijg J., Gladyshev V. N., Gorbunova V., Seluanov A. INK4 locus of the tumor-resistant rodent, the naked mole rat, expresses a functional p15/p16 hybrid isoform // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2015. – Т. 112, № 4. – С. 1053-8.

9. Hadi F., Kulaberoglu Y., Lazarus K. A., Bach K., Ugur R., Beattie P., Smith E. S. J., Khaled W. T. Transformation of naked mole-rat cells // Nature. – 2020. – Т. 583, № 7814. – С. E1-E7.

10. D'Elia G., Fabre P. H., Lessa E. P. Rodent systematics in an age of discovery: recent advances and prospects // Journal of Mammalogy. – 2019. – Т. 100, № 3. – С. 852-871.

11. Faulkes C. G., Verheyen E., Verheyen W., Jarvis J. U., Bennett N. C. Phylogeographical patterns of genetic divergence and speciation in African mole-rats (Family: Bathyergidae) // Mol Ecol. – 2004. – Т. 13, № 3. – С. 613-29.

12. Faulkes C. G., Bennett N. C. Plasticity and constraints on social evolution in African mole-rats: ultimate and proximate factors // Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. – 2013. – Т. 368, № 1618. – С. 20120347.

13. Davies K. T., Bennett N. C., Tsagkogeorga G., Rossiter S. J., Faulkes C. G. Family Wide Molecular Adaptations to Underground Life in African Mole-Rats Revealed by Phylogenomic Analysis // Mol Biol Evol. – 2015. – Т. 32, № 12. – С. 3089-107.
14. Kim E. B., Fang X., Fushan A. A., Huang Z., Lobanov A. V., Han L., Marino S. M., Sun X., Turanov A. A., Yang P., Yim S. H., Zhao X., Kasaikina M. V., Stoletzki N., Peng C., Polak P., Xiong Z., Kiezun A., Zhu Y., Chen Y., Kryukov G. V., Zhang Q., Peshkin L., Yang L., Bronson R. T., Buffenstein R., Wang B., Han C., Li Q., Chen L., Zhao W., Sunyaev S. R., Park T. J., Zhang G., Wang J., Gladyshev V. N. Genome sequencing reveals insights into physiology and longevity of the naked mole rat // Nature. – 2011. – Т. 479, № 7372. – С. 223-7.
15. Keane M., Craig T., Alfoldi J., Berlin A. M., Johnson J., Seluanov A., Gorbunova V., Di Palma F., Lindblad-Toh K., Church G. M., de Magalhaes J. P. The Naked Mole Rat Genome Resource: facilitating analyses of cancer and longevity-related adaptations // Bioinformatics. – 2014. – Т. 30, № 24. – С. 3558-60.
16. Zhou X., Dou Q., Fan G., Zhang Q., Sanderford M., Kaya A., Johnson J., Karlsson E. K., Tian X., Mikhalchenko A., Kumar S., Seluanov A., Zhang Z. D., Gorbunova V., Liu X., Gladyshev V. N. Beaver and Naked Mole Rat Genomes Reveal Common Paths to Longevity // Cell Rep. – 2020. – Т. 32, № 4. – С. 107949.
17. Jarvis J. U. M. Eusociality in a Mammal - Cooperative Breeding in Naked Mole-Rat Colonies // Science. – 1981. – Т. 212, № 4494. – С. 571-573.
18. Jarvis J. U. M., Bennett N. C. Eusociality Has Evolved Independently in 2 Genera of Bathyergid Mole-Rats - but Occurs in No Other Subterranean Mammal // Behavioral Ecology and Sociobiology. – 1993. – Т. 33, № 4. – С. 253-260.
19. Bennett N. C., Ganswindt A., Ganswindt S. B., Jarvis J. U. M., Zottl M., Faulkes C. G. Evidence for contrasting roles for prolactin in eusocial naked mole-rats, Heterocephalus glaber and Damaraland mole-rats, Fukomys damarensis // Biol Lett. – 2018. – Т. 14, № 5.
20. Dengler-Crish C. M., Catania K. C. Cessation of reproduction-related spine elongation after multiple breeding cycles in female naked mole-rats // Anat Rec (Hoboken). – 2009. – Т. 292, № 1. – С. 131-7.
21. Roellig K., Drews B., Goeritz F., Hildebrandt T. B. The long gestation of the small naked mole-rat (Heterocephalus glaber Ruppell, 1842) studied with ultrasound biomicroscopy and 3D-ultrasonography // PLoS One. – 2011. – Т. 6, № 3. – С. e17744.
22. Bens M., Szafranski K., Holtze S., Sahm A., Groth M., Kestler H. A., Hildebrandt T. B., Platzer M. Naked mole-rat transcriptome signatures of socially suppressed sexual maturation and links of reproduction to aging // BMC Biol. – 2018. – Т. 16, № 1. – С. 77.

23. Ingram C. M., Troendle N. J., Gill C. A., Braude S., Honeycutt R. L. Challenging the inbreeding hypothesis in a eusocial mammal: population genetics of the naked mole-rat, Heterocephalus glaber // Mol Ecol. – 2015. – T. 24, № 19. – C. 4848-65.
24. O'Riain M. J., Jarvis J. U., Faulkes C. G. A dispersive morph in the naked mole-rat // Nature. – 1996. – T. 380, № 6575. – C. 619-21.
25. Begay V., Cirovic B., Barker A. J., Klopfleisch R., Hart D. W., Bennett N. C., Lewin G. R. Immune competence and spleen size scale with colony status in the naked mole-rat // Open Biol. – 2022. – T. 12, № 4. – C. 210292.
26. de Magalhaes J. P., Costa J., Church G. M. An analysis of the relationship between metabolism, developmental schedules, and longevity using phylogenetic independent contrasts // J Gerontol A Biol Sci Med Sci. – 2007. – T. 62, № 2. – C. 149-60.
27. Savina A., Jaffredo T., Saldmann F., Faulkes C. G., Moguelet P., Leroy C., Marmol D. D., Codogno P., Foucher L., Zalc A., Viltard M., Friedlander G., Aractingi S., Fontaine R. H. Single-cell transcriptomics reveals age-resistant maintenance of cell identities, stem cell compartments and differentiation trajectories in long-lived naked mole-rats skin // Aging (Albany NY). – 2022. – T. 14, № 9. – C. 3728-3756.
28. Dammann P., Scherag A., Zak N., Szafranski K., Holtze S., Begall S., Burda H., Kestler H. A., Hildebrandt T., Platzer M. Comment on 'Naked mole-rat mortality rates defy Gompertzian laws by not increasing with age' // Elife. – 2019. – T. 8.
29. Ruby J. G., Smith M., Buffenstein R. Naked Mole-Rat mortality rates defy gompertzian laws by not increasing with age // Elife. – 2018. – T. 7.
30. Buffenstein R., Jarvis J. U. The naked mole rat--a new record for the oldest living rodent // Sci Aging Knowledge Environ. – 2002. – T. 2002, № 21. – C. pe7.
31. Heinze I., Bens M., Calzia E., Holtze S., Dakhovnik O., Sahm A., Kirkpatrick J. M., Szafranski K., Romanov N., Sama S. N., Holzer K., Singer S., Ermolaeva M., Platzer M., Hildebrandt T., Ori A. Species comparison of liver proteomes reveals links to naked mole-rat longevity and human aging // BMC Biol. – 2018. – T. 16, № 1. – C. 82.
32. Lowe R., Danson A. F., Rakyan V. K., Yildizoglu S., Saldmann F., Viltard M., Friedlander G., Faulkes C. G. DNA methylation clocks as a predictor for ageing and age estimation in naked mole-rats, Heterocephalus glaber // Aging (Albany NY). – 2020. – T. 12, № 5. – C. 4394-4406.
33. Kerepesi C., Meer M. V., Ablaeva J., Amoroso V. G., Lee S. G., Zhang B., Gerashchenko M. V., Trapp A., Yim S. H., Lu A. T., Levine M. E., Seluanov A., Horvath S., Park T. J., Gorbunova V., Gladyshev V. N. Epigenetic aging of the demographically non-aging naked mole-rat // Nat Commun. – 2022. – T. 13, № 1. – C. 355.

34. Chee W. Y., Kurahashi Y., Kim J., Miura K., Okuzaki D., Ishitani T., Kajiwara K., Nada S., Okano H., Okada M. beta-catenin-promoted cholesterol metabolism protects against cellular senescence in naked mole-rat cells // Commun Biol. – 2021. – Т. 4, № 1. – С. 357.
35. Levenberg S., Yarden A., Kam Z., Geiger B. p27 is involved in N-cadherin-mediated contact inhibition of cell growth and S-phase entry // Oncogene. – 1999. – Т. 18, № 4. – С. 869-76.
36. Del Marmol D., Holtze S., Kichler N., Sahm A., Bihin B., Bourguignon V., Dogne S., Szafranski K., Hildebrandt T. B., Flamion B. Abundance and size of hyaluronan in naked mole-rat tissues and plasma // Sci Rep. – 2021. – Т. 11, № 1. – С. 7951.
37. Kulaberoglu Y., Bhushan B., Hadi F., Chakrabarti S., Khaled W. T., Rankin K. S., Smith E. S. J., Frankel D. The material properties of naked mole-rat hyaluronan // Sci Rep. – 2019. – Т. 9, № 1. – С. 6632.
38. Seluanov A., Gladyshev V. N., Vijg J., Gorbunova V. Mechanisms of cancer resistance in long-lived mammals // Nat Rev Cancer. – 2018. – Т. 18, № 7. – С. 433-441.
39. Kobayashi T., Chanmee T., Itano N. Hyaluronan: Metabolism and Function // Biomolecules. – 2020. – Т. 10, № 11.
40. Deuker M. M., Lewis K. N., Ingaramo M., Kimmel J., Buffenstein R., Settleman J. Unprovoked Stabilization and Nuclear Accumulation of the Naked Mole-Rat p53 Protein // Sci Rep. – 2020. – Т. 10, № 1. – С. 6966.
41. Tan L., Ke Z., Tombline G., Macoretta N., Hayes K., Tian X., Lv R., Ablaeva J., Gilbert M., Bhanu N. V., Yuan Z. F., Garcia B. A., Shi Y. G., Shi Y., Seluanov A., Gorbunova V. Naked Mole Rat Cells Have a Stable Epigenome that Resists iPSC Reprogramming // Stem Cell Reports. – 2017. – Т. 9, № 5. – С. 1721-1734.
42. Azpurua J., Ke Z., Chen I. X., Zhang Q., Ermolenko D. N., Zhang Z. D., Gorbunova V., Seluanov A. Naked mole-rat has increased translational fidelity compared with the mouse, as well as a unique 28S ribosomal RNA cleavage // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2013. – Т. 110, № 43. – С. 17350-5.
43. Maldonado G., Hernandez G. Translational control in the naked mole-rat as a model highly resistant to cancer // Biochim Biophys Acta Rev Cancer. – 2021. – Т. 1875, № 1. – С. 188455.
44. Holtze S., Braude S., Lemma A., Koch R., Morhart M., Szafranski K., Platzer M., Alemayehu F., Goeritz F., Hildebrandt T. B. The microenvironment of naked mole-rat burrows in East Africa // African Journal of Ecology. – 2018. – Т. 56, № 2. – С. 279-289.
45. Pamenter M. E., Dzal Y. A., Thompson W. A., Milsom W. K. Do naked mole rats accumulate a metabolic acidosis or an oxygen debt in severe hypoxia? // J Exp Biol. – 2019. – Т. 222, № Pt 3.

46. Pamenter M. E., Lau G. Y., Richards J. G., Milsom W. K. Naked mole rat brain mitochondria electron transport system flux and H(+) leak are reduced during acute hypoxia // J Exp Biol. – 2018. – T. 221, № Pt 4.
47. Faulkes C. G., Eykyn T. R., Aksentijevic D. Cardiac metabolomic profile of the naked mole-rat-glycogen to the rescue // Biol Lett. – 2019. – T. 15, № 11. – C. 20190710.
48. Freire Jorge P., Goodwin M. L., Renes M. H., Nijsten M. W., Pamenter M. Low Cancer Incidence in Naked Mole-Rats May Be Related to Their Inability to Express the Warburg Effect // Front Physiol. – 2022. – T. 13. – C. 859820.
49. Park T. J., Reznick J., Peterson B. L., Blass G., Omerbasic D., Bennett N. C., Kuich P., Zasada C., Browe B. M., Hamann W., Applegate D. T., Radke M. H., Kosten T., Lutermann H., Gavaghan V., Eigenbrod O., Begay V., Amoroso V. G., Govind V., Minshall R. D., Smith E. S. J., Larson J., Gotthardt M., Kempa S., Lewin G. R. Fructose-driven glycolysis supports anoxia resistance in the naked mole-rat // Science. – 2017. – T. 356, № 6335. – C. 307-311.
50. Munro D., Baldy C., Pamenter M. E., Treberg J. R. The exceptional longevity of the naked mole-rat may be explained by mitochondrial antioxidant defenses // Aging Cell. – 2019. – T. 18, № 3. – C. e12916.
51. Vyssokikh M. Y., Holtze S., Averina O. A., Lyamzaev K. G., Panteleeva A. A., Marey M. V., Zinovkin R. A., Severin F. F., Skulachev M. V., Fasel N., Hildebrandt T. B., Skulachev V. P. Mild depolarization of the inner mitochondrial membrane is a crucial component of an anti-aging program // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2020. – T. 117, № 12. – C. 6491-6501.
52. Lewis K. N., Wason E., Edrey Y. H., Kristan D. M., Nevo E., Buffenstein R. Regulation of Nrf2 signaling and longevity in naturally long-lived rodents // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2015. – T. 112, № 12. – C. 3722-7.
53. Lewis K. N., Andziak B., Yang T., Buffenstein R. The naked mole-rat response to oxidative stress: just deal with it // Antioxid Redox Signal. – 2013. – T. 19, № 12. – C. 1388-99.
54. Saldmann F., Viltard M., Leroy C., Friedlander G. The Naked Mole Rat: A Unique Example of Positive Oxidative Stress // Oxid Med Cell Longev. – 2019. – T. 2019. – C. 4502819.
55. Labinskyy N., Csiszar A., Orosz Z., Smith K., Rivera A., Buffenstein R., Ungvari Z. Comparison of endothelial function, O2-* and H2O2 production, and vascular oxidative stress resistance between the longest-living rodent, the naked mole rat, and mice // Am J Physiol Heart Circ Physiol. – 2006. – T. 291, № 6. – C. H2698-704.
56. Lewis K. N., Mele J., Hornsby P. J., Buffenstein R. Stress resistance in the naked mole-rat: the bare essentials - a mini-review // Gerontology. – 2012. – T. 58, № 5. – C. 453-62.

57. Hulbert A. J., Faulks S. C., Buffenstein R. Oxidation-resistant membrane phospholipids can explain longevity differences among the longest-living rodents and similarly-sized mice // J Gerontol A Biol Sci Med Sci. – 2006. – T. 61, № 10. – C. 1009-18.

58. Chung D., Dzal Y. A., Seow A., Milsom W. K., Pamenter M. E. Naked mole rats exhibit metabolic but not ventilatory plasticity following chronic sustained hypoxia // Proc Biol Sci. – 2016. – T. 283, № 1827. – C. 20160216.

59. LaVinka P. C., Brand A., Landau V. J., Wirtshafter D., Park T. J. Extreme tolerance to ammonia fumes in African naked mole-rats: animals that naturally lack neuropeptides from trigeminal chemosensory nerve fibers // J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol. – 2009. – T. 195, № 5. – C. 419-27.

60. Park T. J., Lu Y., Juttner R., Smith E. S., Hu J., Brand A., Wetzel C., Milenkovic N., Erdmann B., Heppenstall P. A., Laurito C. E., Wilson S. P., Lewin G. R. Selective inflammatory pain insensitivity in the African naked mole-rat (Heterocephalus glaber) // PLoS Biol. – 2008. – T. 6, № 1. – C. e13.

61. Smith E. S., Omerbasic D., Lechner S. G., Anirudhan G., Lapatsina L., Lewin G. R. The molecular basis of acid insensitivity in the African naked mole-rat // Science. – 2011. – T. 334, № 6062. – C. 1557-60.

62. Clayson M. S., Devereaux M. E. M., Pamenter M. E. Neurokinin-1 receptor activation is sufficient to restore the hypercapnic ventilatory response in the Substance P-deficient naked mole-rat // Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. – 2020. – T. 318, № 4. – C. R712-R721.

63. O'Neill L. A., Kishton R. J., Rathmell J. A guide to immunometabolism for immunologists // Nat Rev Immunol. – 2016. – T. 16, № 9. – C. 553-65.

64. Krzywinska E., Stockmann C. Hypoxia, Metabolism and Immune Cell Function // Biomedicines. – 2018. – T. 6, № 2.

65. Xiao B., Wang S., Yang G., Sun X., Zhao S., Lin L., Cheng J., Yang W., Cong W., Sun W., Kan G., Cui S. HIF-1alpha contributes to hypoxia adaptation of the naked mole rat // Oncotarget. – 2017. – T. 8, № 66. – C. 109941-109951.

66. Buffenstein R., Yahav S. Is the naked mole-rat Hererocephalus glaber an endothermic yet poikilothermic mammal? // Journal of Thermal Biology. – 1991. – T. 16, № 4. – C. 227-232.

67. Sumbera R. Thermal biology of a strictly subterranean mammalian family, the African mole-rats (Bathyergidae, Rodentia) - a review // J Therm Biol. – 2019. – T. 79. – C. 166-189.

68. Oiwa Y., Oka K., Yasui H., Higashikawa K., Bono H., Kawamura Y., Miyawaki S., Watarai A., Kikusui T., Shimizu A., Okano H., Kuge Y., Kimura K., Okamatsu-Ogura Y., Miura K. Characterization of brown adipose tissue thermogenesis in the naked mole-rat (Heterocephalus glaber), a heterothermic mammal // Sci Rep. – 2020. – T. 10, № 1. – C. 19488.

69. Evans S. S., Repasky E. A., Fisher D. T. Fever and the thermal regulation of immunity: the immune system feels the heat // Nat Rev Immunol. – 2015. – Т. 15, № 6. – С. 335-49.
70. Johansen K., Lykkeboe G., Weber R. E., Maloiy G. M. Blood respiratory properties in the naked mole rat Heterocephalus glaber, a mammal of low body temperature // Respir Physiol. – 1976. – Т. 28, № 3. – С. 303-14.
71. Holtze S., Koch R., Hildebrandt T. B., Lemma A., Szafranski K., Platzer M., Alemayehu F., Goeritz F., S. B. Hematologic adaptation to the subterranean environment by the naked mole-rat, Heterocephalus glaber (Ctenohystrica: Heterocephalidae) // Journal of Mammalogy. – 2020. – Т. 101, № 4. – С. 1000-1009.
72. Emmrich S., Trapp A., Tolibzoda Zakusilo F., Straight M. E., Ying A. K., Tyshkovskiy A., Mariotti M., Gray S., Zhang Z., Drage M. G., Takasugi M., Klusmann J. H., Gladyshev V. N., Seluanov A., Gorbunova V. Characterization of naked mole-rat hematopoiesis reveals unique stem and progenitor cell patterns and neotenic traits // EMBO J. – 2022. – Т. 41, № 15. – С. e109694.
73. Artwohl J., Ball-Kell S., Valyi-Nagy T., Wilson S. P., Lu Y., Park T. J. Extreme susceptibility of African naked mole rats (Heterocephalus glaber) to experimental infection with herpes simplex virus type 1 // Comp Med. – 2009. – Т. 59, № 1. – С. 83-90.
74. Ross-Gillespie A., O'Riain M. J., Keller L. F. Viral epizootic reveals inbreeding depression in a habitually inbreeding mammal // Evolution. – 2007. – Т. 61, № 9. – С. 2268-73.
75. Debebe T., Holtze S., Morhart M., Hildebrandt T. B., Rodewald S., Huse K., Platzer M., Wyohannes D., Yirga S., Lemma A., Thieme R., Konig B., Birkenmeier G. Analysis of cultivable microbiota and diet intake pattern of the long-lived naked mole-rat // Gut Pathog. – 2016. – Т. 8. – С. 25.
76. Cong W., Xing J., Feng Y., Wang J., Fu R., Yue B., He Z., Lin L., Yang W., Cheng J., Sun W., Cui S. The microbiota in the intestinal and respiratory tracts of naked mole-rats revealed by high-throughput sequencing // BMC Microbiol. – 2018. – Т. 18, № 1. – С. 89.
77. Cho H. S., Soundrarajan N., Le Van Chanh Q., Jeon H., Cha S. Y., Kang M., Ahn B., Hong K., Song H., Kim J. H., Oh K. S., Park C. The novel cathelicidin of naked mole rats, Hg-CATH, showed potent antimicrobial activity and low cytotoxicity // Gene. – 2018. – Т. 676. – С. 164-170.
78. Cheng J., Yuan Z., Yang W., Xu C., Cong W., Lin L., Zhao S., Sun W., Bai X., Cui S. Comparative study of macrophages in naked mole rats and ICR mice // Oncotarget. – 2017. – Т. 8, № 57. – С. 96924-96934.
79. Hilton H. G., Rubinstein N. D., Janki P., Ireland A. T., Bernstein N., Fong N. L., Wright K. M., Smith M., Finkle D., Martin-McNulty B., Roy M., Imai D. M., Jojic V., Buffenstein R. Single-cell transcriptomics of the naked mole-rat reveals unexpected features of mammalian immunity // PLoS Biol. – 2019. – Т. 17, № 11. – С. e3000528.

80. Wada H., Shibata Y., Abe Y., Otsuka R., Eguchi N., Kawamura Y., Oka K., Baghdadi M., Atsumi T., Miura K., Seino K. I. Flow cytometric identification and cell-line establishment of macrophages in naked mole-rats // Sci Rep. – 2019. – T. 9, № 1. – C. 17981.
81. Shebzukhov Y., Holtze S., Hirseland H., Schafer H., Radbruch A., Hildebrandt T., Grutzkau A. Identification of cross-reactive antibodies for the detection of lymphocytes, myeloid cells and haematopoietic precursors in the naked mole rat // Eur J Immunol. – 2019. – T. 49, № 11. – C. 2103-2110.
82. Kelley J., Trowsdale J. Features of MHC and NK gene clusters // Transpl Immunol. – 2005. – T. 14, № 3-4. – C. 129-34.
83. Revell P. A. Kurloff cell levels in the peripheral blood of normal and oestrogen treated guinea-pigs // Br J Exp Pathol. – 1974. – T. 55, № 6. – C. 525-32.
84. Emmrich S., Tolibzoda Zakusilo F., Trapp A., Zhou X., Zhang Q., Irving E. M., Drage M. G., Zhang Z., Gladyshev V. N., Seluanov A., Gorbunova V. Ectopic cervical thymi and no thymic involution until midlife in naked mole rats // Aging Cell. – 2021. – T. 20, № 10. – C. e13477.
85. Van den Bossche J., Baardman J., de Winther M. P. Metabolic Characterization of Polarized M1 and M2 Bone Marrow-derived Macrophages Using Real-time Extracellular Flux Analysis // J Vis Exp. – 2015.10.3791/53424 № 105.
86. Valente A. J., Maddalena L. A., Robb E. L., Moradi F., Stuart J. A. A simple ImageJ macro tool for analyzing mitochondrial network morphology in mammalian cell culture // Acta Histochem. – 2017. – T. 119, № 3. – C. 315-326.
87. Livak K. J., Schmittgen T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method // Methods. – 2001. – T. 25, № 4. – C. 402-8.
88. Rice P., Longden I. and Bleasby A. EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. // Trends in Genetics. - 2000 - T.16, №6 - C.276-277.
89. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. // J. Mol. Biol. - 1990 - T.215. - C.403-410.
90. Krasnov G. S., Dmitriev A. A., Kudryavtseva A. V., Shargunov A. V., Karpov D. S., Uroshlev L. A., Melnikova N. V., Blinov V. M., Poverennaya E. V., Archakov A. I., Lisitsa A. V., Ponomarenko E. A. PPLine: An Automated Pipeline for SNP, SAP, and Splice Variant Detection in the Context of Proteogenomics // J Proteome Res. – 2015. – T. 14, № 9. – C. 3729-37.
91. Langmead B., Salzberg S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 // Nat Methods. – 2012. – T. 9, № 4. – C. 357-9.
92. Bolger A. M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data // Bioinformatics. – 2014. – T. 30, № 15. – C. 2114-20.

93. Dobin A., Davis C. A., Schlesinger F., Drenkow J., Zaleski C., Jha S., Batut P., Chaisson M., Gingeras T. R. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner // Bioinformatics. – 2013. – T. 29, № 1. – C. 15-21.

94. Liao Y., Smyth G. K., Shi W. The Subread aligner: fast, accurate and scalable read mapping by seed-and-vote // Nucleic Acids Res. – 2013. – T. 41, № 10. – C. e108.

95. Robinson M. D., McCarthy D. J., Smyth G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data // Bioinformatics. – 2010. – T. 26, № 1. – C. 139-40.

96. Sherman B.T., Hao M., Qiu J., Jiao X., Baseler M.W., Lane H.C., Imamichi T.and Chang W.. DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update).// Nucleic Acids Res. – 2022. – T.50, №W1. – C.W216-W221.

97. Inra C. N., Zhou B. O., Acar M., Murphy M. M., Richardson J., Zhao Z., Morrison S. J. A perisinusoidal niche for extramedullary haematopoiesis in the spleen // Nature. – 2015. – T. 527, № 7579. – C. 466-471.

98. Lambert J.-F., Carlson J. E., Colvin G. A., Quesenberry P. J. Evaluation of mouse whole body bone marrow cellularity and distribution of hematopoietic progenitors // Experimental Hematology. – 2000. – T. 28, № 12. – C. 1493.

99. Kotze S. H., Van Der Merwe E. L., Bennett N. C., O'Riain M. J. The comparative anatomy of the abdominal gastrointestinal tract of six species of African mole-rats (Rodentia, Bathyergidae) // J Morphol. – 2010. – T. 271, № 1. – C. 50-60.

100. Kennedy E. A., King K. Y., Baldridge M. T. Mouse Microbiota Models: Comparing Germ-Free Mice and Antibiotics Treatment as Tools for Modifying Gut Bacteria // Front Physiol. – 2018. – T. 9. – C. 1534.

101. Hoorweg K., Cupedo T. Development of human lymph nodes and Peyer's patches // Semin Immunol. – 2008. – T. 20, № 3. – C. 164-70.

102. Boxio R., Bossenmeyer-Pourie C., Steinckwich N., Dournon C., Nusse O. Mouse bone marrow contains large numbers of functionally competent neutrophils // J Leukoc Biol. – 2004. – T. 75, № 4. – C. 604-11.

103. Haemopoiesis : a practical approach. / Testa N. G., Molineux G., 1993.

104. Dunn J., Gutbrod S., Webb A., Pak A., Jandu S. K., Bhunia A., Berkowitz D. E., Santhanam L. S-nitrosation of arginase 1 requires direct interaction with inducible nitric oxide synthase // Mol Cell Biochem. – 2011. – T. 355, № 1-2. – C. 83-9.

105. Jablonski K. A., Amici S. A., Webb L. M., Ruiz-Rosado Jde D., Popovich P. G., Partida-Sanchez S., Guerau-de-Arellano M. Novel Markers to Delineate Murine M1 and M2 Macrophages // PLoS One. – 2015. – T. 10, № 12. – C. e0145342.

106. Gryglewski R. J., Palmer R. M., Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor // Nature. – 1986. – T. 320, № 6061. – C. 454-6.
107. Das A., Yang C. S., Arifuzzaman S., Kim S., Kim S. Y., Jung K. H., Lee Y. S., Chai Y. G. High-Resolution Mapping and Dynamics of the Transcriptome, Transcription Factors, and Transcription Co-Factor Networks in Classically and Alternatively Activated Macrophages // Front Immunol. – 2018. – T. 9. – C. 22.
108. Hoeksema M. A., Shen Z., Holtman I. R., Zheng A., Spann N. J., Cobo I., Gymrek M., Glass C. K. Mechanisms underlying divergent responses of genetically distinct macrophages to IL-4 // Sci Adv. – 2021. – T. 7, № 25.
109. Manskikh V. N., Averina O. A., Nikiforova A. I. Spontaneous and Experimentally Induced Pathologies in the Naked Mole Rat (Heterocephalus glaber) // Biochemistry (Mosc). – 2017. – T. 82, № 12. – C. 1504-1512.
110. Abolins S., King E. C., Lazarou L., Weldon L., Hughes L., Drescher P., Raynes J. G., Hafalla J. C. R., Viney M. E., Riley E. M. The comparative immunology of wild and laboratory mice, Mus musculus domesticus // Nat Commun. – 2017. – T. 8. – C. 14811.
111. Yasuda M., Jenne C. N., Kennedy L. J., Reynolds J. D. The sheep and cattle Peyer's patch as a site of B-cell development // Vet Res. – 2006. – T. 37, № 3. – C. 401-15.
112. Minhas P. S., Liu L., Moon P. K., Joshi A. U., Dove C., Mhatre S., Contrepois K., Wang Q., Lee B. A., Coronado M., Bernstein D., Snyder M. P., Migaud M., Majeti R., Mochly-Rosen D., Rabinowitz J. D., Andreasson K. I. Macrophage de novo NAD(+) synthesis specifies immune function in aging and inflammation // Nat Immunol. – 2019. – T. 20, № 1. – C. 50-63.
113. Vitale I., Manic G., Coussens L. M., Kroemer G., Galluzzi L. Macrophages and Metabolism in the Tumor Microenvironment // Cell Metab. – 2019. – T. 30, № 1. – C. 36-50.
114. Van den Bossche J., Baardman J., Otto N. A., van der Velden S., Neele A. E., van den Berg S. M., Luque-Martin R., Chen H. J., Boshuizen M. C., Ahmed M., Hoeksema M. A., de Vos A. F., de Winther M. P. Mitochondrial Dysfunction Prevents Repolarization of Inflammatory Macrophages // Cell Rep. – 2016. – T. 17, № 3. – C. 684-696.
115. Bailey J. D., Diotallevi M., Nicol T., McNeill E., Shaw A., Chuaiphichai S., Hale A., Starr A., Nandi M., Stylianou E., McShane H., Davis S., Fischer R., Kessler B. M., McCullagh J., Channon K. M., Crabtree M. J. Nitric Oxide Modulates Metabolic Remodeling in Inflammatory Macrophages through TCA Cycle Regulation and Itaconate Accumulation // Cell Rep. – 2019. – T. 28, № 1. – C. 218-230 e7.
116. Wang T. H., Eaton L., Pamenter M. E. Nitric oxide homeostasis is maintained during acute in vitro hypoxia and following reoxygenation in naked mole-rat but not mouse cortical neurons // Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. – 2020. – T. 250. – C. 110792.

117. Zajd C. M., Ziemba A. M., Miralles G. M., Nguyen T., Feustel P. J., Dunn S. M., Gilbert R. J., Lennartz M. R. Bone Marrow-Derived and Elicited Peritoneal Macrophages Are Not Created Equal: The Questions Asked Dictate the Cell Type Used // Front Immunol. – 2020. – T. 11. – C. 269.

118. Polumuri S., Perkins D. J., Vogel S. N. cAMP levels regulate macrophage alternative activation marker expression // Innate Immun. – 2021. – T. 27, № 2. – C. 133-142.

119. Fang X., Seim I., Huang Z., Gerashchenko M. V., Xiong Z., Turanov A. A., Zhu Y., Lobanov A. V., Fan D., Yim S. H., Yao X., Ma S., Yang L., Lee S. G., Kim E. B., Bronson R. T., Sumbera R., Buffenstein R., Zhou X., Krogh A., Park T. J., Zhang G., Wang J., Gladyshev V. N. Adaptations to a subterranean environment and longevity revealed by the analysis of mole rat genomes // Cell Rep. – 2014. – T. 8, № 5. – C. 1354-64.

120. Nair M. G., Du Y., Perrigoue J. G., Zaph C., Taylor J. J., Goldschmidt M., Swain G. P., Yancopoulos G. D., Valenzuela D. M., Murphy A., Karow M., Stevens S., Pearce E. J., Artis D. Alternatively activated macrophage-derived RELM-alpha is a negative regulator of type 2 inflammation in the lung // J Exp Med. – 2009. – T. 206, № 4. – C. 937-52.

121. Hu Q., Tan H., Irwin D. M. Evolution of the Vertebrate Resistin Gene Family // PLoS One. – 2015. – T. 10, № 6. – C. e0130188.

122. Biesmans S., Meert T. F., Bouwknecht J. A., Acton P. D., Davoodi N., De Haes P., Kuijlaars J., Langlois X., Matthews L. J., Ver Donck L., Hellings N., Nuydens R. Systemic immune activation leads to neuroinflammation and sickness behavior in mice // Mediators Inflamm. – 2013. – T. 2013. – C. 271359.

123. Kisipan M. L., Ojoo R. O., Kanui T. I., Abelson K. S. P. Bodyweight, locomotion, and behavioral responses of the naked mole rat (Heterocephalus glaber) to lipopolysaccharide administration // J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol. – 2022. – T. 208, № 4. – C. 493-504.

124. Balderrama-Gutierrez G., Milovic A., Cook V. J., Islam M. N., Zhang Y., Kiaris H., Belisle J. T., Mortazavi A., Barbour A. G. An Infection-Tolerant Mammalian Reservoir for Several Zoonotic Agents Broadly Counters the Inflammatory Effects of Endotoxin // mBio. – 2021. – T. 12, № 2.

125. Young R., Bush S. J., Lefevre L., McCulloch M. E. B., Lisowski Z. M., Muriuki C., Waddell L. A., Sauter K. A., Pridans C., Clark E. L., Hume D. A. Species-Specific Transcriptional Regulation of Genes Involved in Nitric Oxide Production and Arginine Metabolism in Macrophages // Immunohorizons. – 2018. – T. 2, № 1. – C. 27-37.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 7. Список особей голого землекопа, образцы от которых были использованы в работе.

IZW – институт дикой природы Лейбница, Берлин, Германия; НИИ ФХБ – институт физико-химической биологии им. Белозерского МГУ.

ID	Пол	Возраст, д	Источник	Эксперименты, в которых были использованы образцы
13	F	82	IZW	Скрининг кросс-специфичных антител; Фиксация образцов для гистологии;
19	F	82		
9003	F	559		
9096	M	559		
3970	M	160		Скрининг кросс-специфичных антител; Отработка получения культуры макрофагов костного мозга (BMDM);
9006	M	490		
8286	M	378		
3975	M	413		Отработка получения культуры BMDM; Микроскопия культур BMDM; Фиксация образцов для гистологии;
3686	M	129		
9063	M	525		
2747	M	1001		
3964	F	346		
8486	F	1191	НИИ ФХБ	Отработка получения культуры BMDM; Активация макрофагов костного мозга LPS; Цитометрический анализ клеток костного мозга (BM), селезенки (Spl)
8463	F	1191		
8440	F	1168		
3974	F	346	IZW	Активация макрофагов костного мозга LPS; Цитометрический анализ клеток BM, Spl и периферической крови (Bl)
8213	F	827		
8273	F	827		
8477	F	408	НИИ ФХБ	Цитометрический анализ клеток BM, Spl и Bl; Подсчет CFU-C в среде с метил-целлюлозой; Активация макрофагов костного мозга LPS;
8448	F	409		
857	M	198		
7978	M	2010	IZW	Цитометрический анализ клеток BM, Spl, пейеровых бляшек (PP) и клеток собственной пластинки кишечника (LP); Подсчет CFU-C в среде с метил-целлюлозой;
0721	M	2089		
0844	M	227	НИИ ФХБ	Фиксация образцов для гистологии;
8479	F	596		Цитометрический анализ клеток BM, Spl, PP, LP; Подсчет CFU-C в среде с метил-целлюлозой; Поляризация макрофагов; Активация спленоцитов Con A.
4034	M	247	IZW	Скрининг кросс-специфичных антител; Цитометрический анализ клеток BM, Spl, PP, LP; Подсчет CFU-C в среде с метил-целлюлозой; Поляризация макрофагов
3597	M	247		
1060	M	235	НИИ ФХБ	Цитометрический анализ клеток BM, Spl, PP, LP; Подсчет CFU-C в среде с метил-целлюлозой; Поляризация макрофагов Активация спленоцитов Con A.
3582	M	313	IZW	Цитометрический анализ клеток BM, Spl, PP, LP;
3682	M	313		

3574	M	324		Отработка дифференцировки нейтрофилов костного мозга Активация спленоцитов Con A.
3575	M	228		
0853	M	612	НИИ ФХБ	Фиксация тканей для гистологии; Активация спленоцитов Con A
1059	F	605		Скрининг кросс-специфичных антител; Поляризация макрофагов; Отработка комбинированного метаболического стресс-теста; Отработка выделения нейтрофилов костного мозга
604	F	365		Поляризация макрофагов; Метаболические стресс-тесты; Отработка выделения нейтрофилов костного мозга;
2704	F	386		Фиксация тканей для гистологии; Цитометрический анализ клеток BM, Spl, PP, LPL. Поляризация макрофагов; Метаболические стресс-тесты; Отработка выделения нейтрофилов костного мозга;
2804	F	648		
8417	M	2319		Фиксация тканей для гистологии; Поляризация макрофагов
8414	M	1823		Поляризация макрофагов; Метаболические стресс-тесты; Отработка выделения нейтрофилов костного мозга;
8451	M	1823		
8427	F	1822		
8487	F	1822		
8437	F	1451		
8492	F	1451		
1240	M	794		Отработка длительной дифференцировки макрофагов; Поляризация макрофагов; Метаболические стресс-тесты; Секвенирование поляризованных макрофагов Секвенирование LPL
0823	F	1129		
0832	F	1129		
1230	M	713		
0833	M	1078		Отработка длительной дифференцировки макрофагов; Поляризация макрофагов; Метаболические стресс-тесты;
0827	F	1200		
0829	F	1200		
0821	M	1080		
0839	F	1080		
0836	F	1200		
0847	M	1691		Опыт с внутрибрюшинным введением LPS и оценкой продукции NO клетками крови
0845	M	1478		
0852	M	1478		
0846	M	1478		
0849	F	1478		
0841	F	1478		

Таблица 8. Список антител для цитофлуориметрии, проверенных на связывание с первичными клетками голого землекопа

Антитела для скрининга были отобраны из коллекции Deutsches Rheuma-Forschungszentrum (Германия), коллекции лаборатории молекулярных механизмов иммунитета ИМБ РАН, коллекции лаборатории иммунохимии института Иммунологии ФМБА России коллекции отдела генетики и наук о жизни университета Сириус.

Маркер	Основные популяции иммунных клеток, выявляемые при помощи маркера	% гомологии при выравнивании с белковой последовательностью голого землекопа		Проверенные клоны антител	Связывание с антигеном голого землекопа
		Человек	Мышь		
CD3 e	Т- лимфоциты	47	59	UCHT1 OCT3 OKT3 KT3 17A.2 CD3-12	CD3-12
CD3 d	Т- лимфоциты	71	62	RIV9	нет
CD4	Т-хелперы	56	49	EM4 LT4 SIM CT7 H155 RPA-T4 TT1 SK3 VIT4 OKT4 9H5A8 BL4 RM4.5	нет
CD8	Цитотоксические Т-лимфоциты	55	38	GN11/134D7 5H10 LT8	нет
CD19	В-лимфоциты	60	63	1D3 BU12 SD1	нет
CD20	В-лимфоциты	79	72	LD2 1F54 SP32	SP32
CD21	В-лимфоциты	67	66	7G6	нет
CD45R	В-лимфоциты	23	26	RA3.6B2	нет
CD25	Активированные лимфоциты, тимоциты, регуляторные Т-клетки	56	50	M-A251 3G10 pC61.5 2A3 4E3	нет
CD62L	Наивные Т-клетки	82	76	TD180	нет
CD69	Активированные лимфоциты	64	60	FN50 H1.2F3	нет

CD45	Лейкоциты	46	40	30-F11 HI-30 LT45 5B1	нет
CD11b	Макрофаги	75	72	M1/70	M1/70
CD11c	Дендритные клетки	71	69	N418 B-Ly6 HL3	нет
F4/80	Макрофаги	-	56	BM8 T45-2342	нет
Ly6C	Моноциты	37	19	HK1.4 AL-21	нет
Ly6G	Нейтрофилы	42	58	RB6-8C5	нет
CX3CR1	Моноциты, микроглия	76	69	SA011F11 2A9-1	SA011F11
IgM	B-клетки	66	64	CH2 R6-60.2	нет
MHCII	B-клетки, макрофаги	83	78	C120 L243 G46-6	нет
CD14	Моноциты	75	64	M5E2 TM1	TM1
CD34	Гематопоэтические предшественники и стволовые клетки	60	53	AC136	AC136
CD117	Гематопоэтические предшественники и стволовые клетки	78	83	ACK45	нет
CD44	Различные виды клеток	71	66	IM7 He7	нет
CD81	T-лимфоциты, B-лимфоциты	94	92	3E12	нет
NK1.1	NK-клетки мыши	48	-	PK136	Нет
NKp46	NK-клетки	33	26	29.A1.4	Нет
RoRγt	Лимфоциты врожденного иммунитета, Th17 клетки	66	84	Q31-378	Нет
Foxp3	T регуляторные клетки	87	84	MF23	MF23
IL-17A	Th17 клетки	65	59	eBio17B7 TC11-18H10	Нет
IFNγ	IFNγ-продуцирующие клетки	61	35	XMG1.2	Нет
TNF	TNF-продуцирующие клетки	75	80	Polyclonal (rat/mouse)	нет
Ter119	Эритроциты	-	-	Ter119	нет

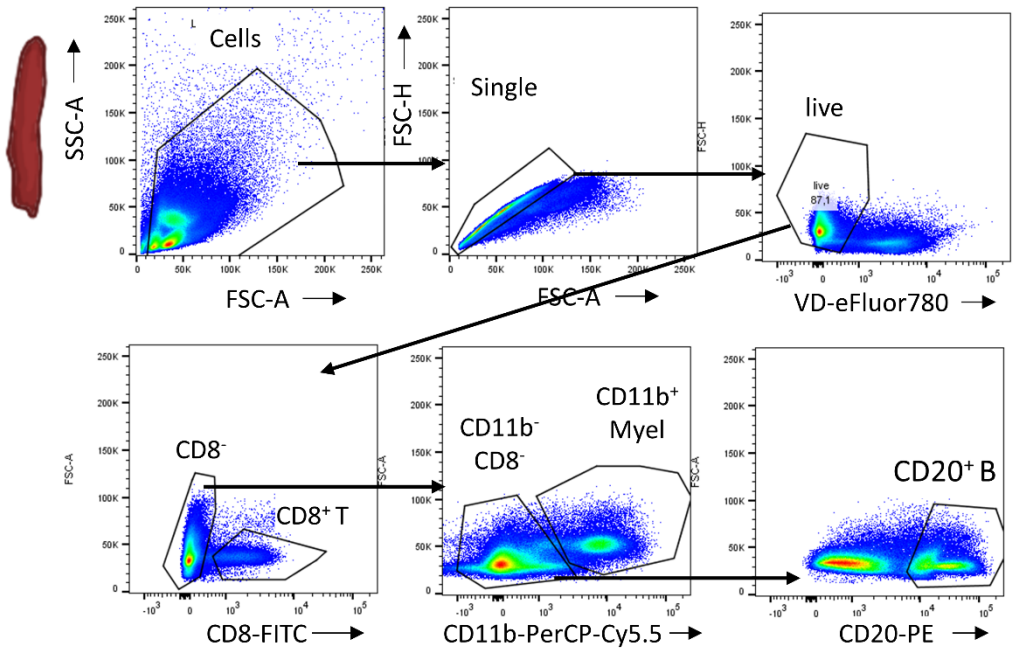


Рисунок 26. Стратегия последовательного выделения популяций иммунных клеток ВЛО голого землекопа при анализе окрашивания панелью кросс-специфичных антител для цитофлуориметрии.

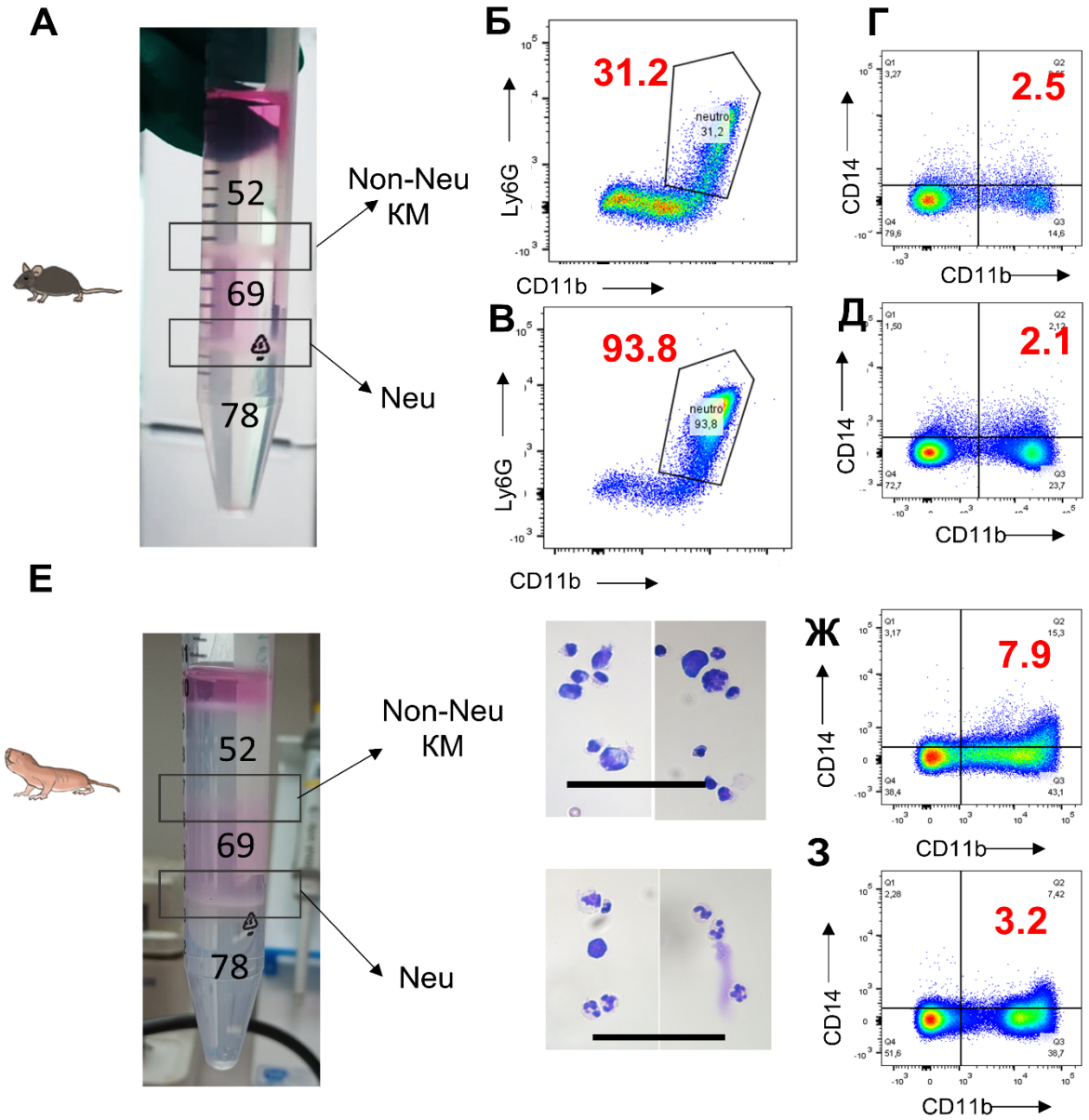


Рисунок 27. Выделение нейтрофилов костного мозга мыши и голого землекопа при помощи градиентного центрифугирования.

А – разделение клеток костного мозга мыши при помощи градиентного центрифугирования, на границе 69% и 78% перколла скапливаются зрелые нейтрофилы, на границе 52% и 69% другие лейкоциты костного мозга; Б – фракция «52/69» обеднена зрелыми $Ly6G^+$ нейтрофилами; В – фракция «69/78» на представлена зрелыми $Ly6G^+$ нейтрофилами более чем на 90 %; Г – экспрессия CD14 на клетках фракции «52/69»; Д – экспрессия CD14 на клетках фракции «69/78» костного мозга мыши; Е – разделение клеток костного голого землекопа при помощи градиентного центрифугирования; Ж – внешний вид фракции костного мозга голого землекопа «52/69» при окрашивании по Романовскому и экспрессия CD14 на клетках; З – внешний вид фракции «69/78» при окрашивании по Романовскому и экспрессия CD14 на клетках в проточной цитофлуориметрии.

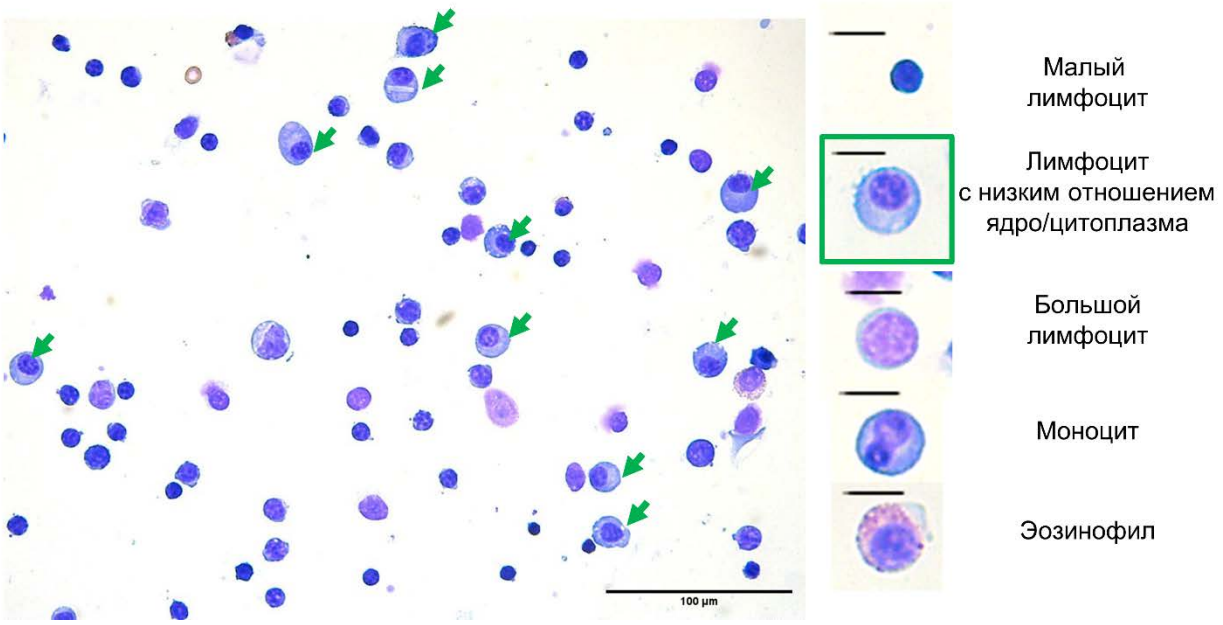


Рисунок 28. Репрезентативный мазок LPL голого землекопа.

Клетки LPL, ресуспендированные в FBS, наносились в капле на предметное стекло, после чего был сделан мазок и окрашивание по Май-Грюнвальду-Романовскому.

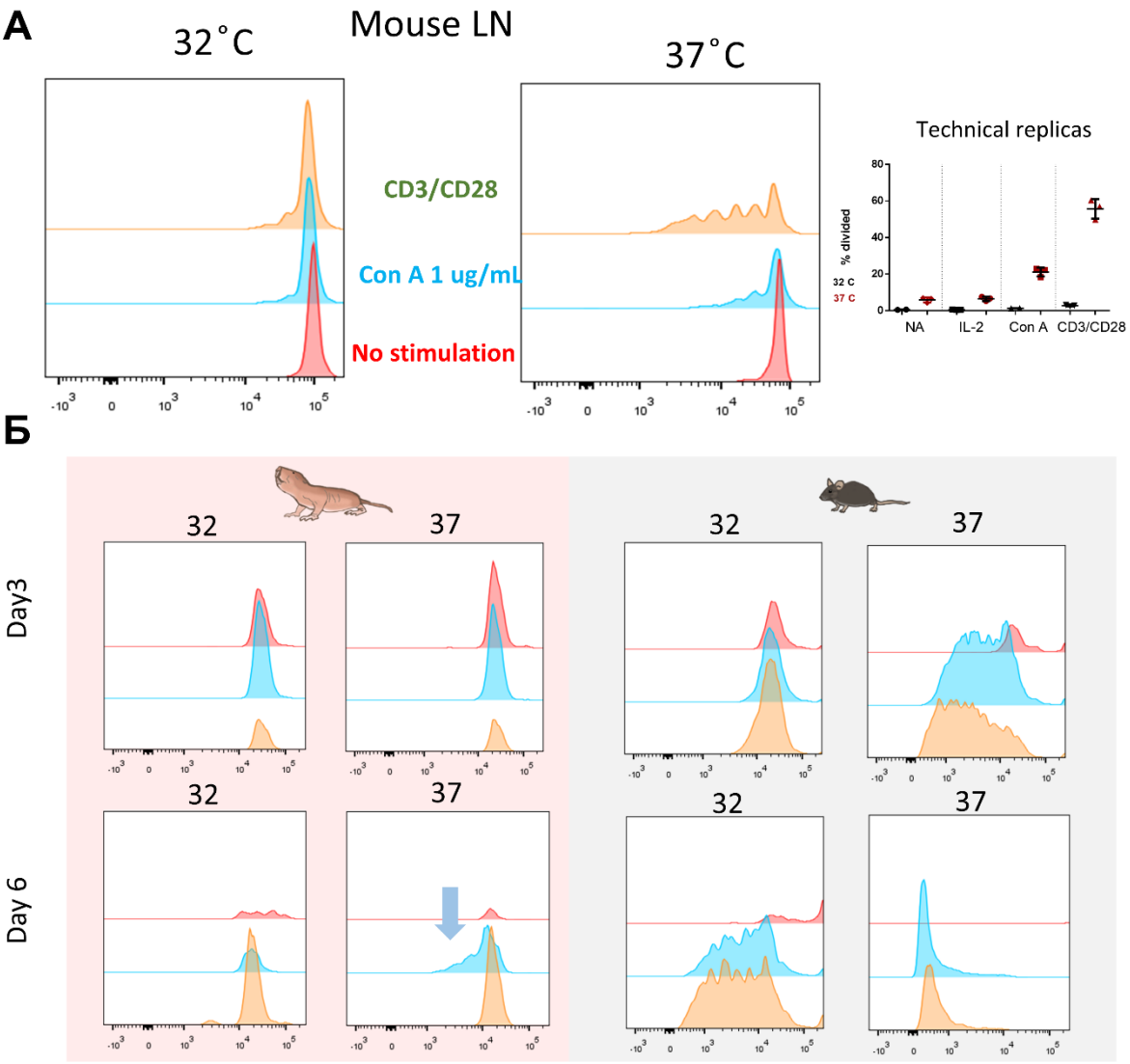


Рисунок 29. Активация деления меченных CFSE спленоцитов голого землекопа и мыши в различных температурных условиях.

А – при температуре 37 ºС на третий день наблюдалась более высокая доля лимфоцитов мыши, поделившихся в ответ на стимуляцию Con A (1 мкг/мл) и антител против CD3/CD28, чем при температуре 32 ºС. Б – спленоциты голого землекопа и мыши окрашивали CFSE и затем стимулировали митогенами – конканавалином А и смесью антител к CD3 и CD28 мыши, на 3 и 6 день оценивали процент поделившихся клеток при помощи проточной цитометрии. Спленоциты мыши, как и Т-клетки лимфоузла, при более высокой температуре делятся быстрее. В культурах активированных спленоцитов голого землекопа на третий день не детектируются поделившиеся клетки при обеих температурах, однако на шестой день в культурах клеток, культивируемых при 37 ºС, детектируются поделившиеся в ответ на стимуляцию ConA клетки (указано синей стрелкой). Антитела против CD3/CD28 мыши не стимулируют деление спленоцитов голого землекопа.

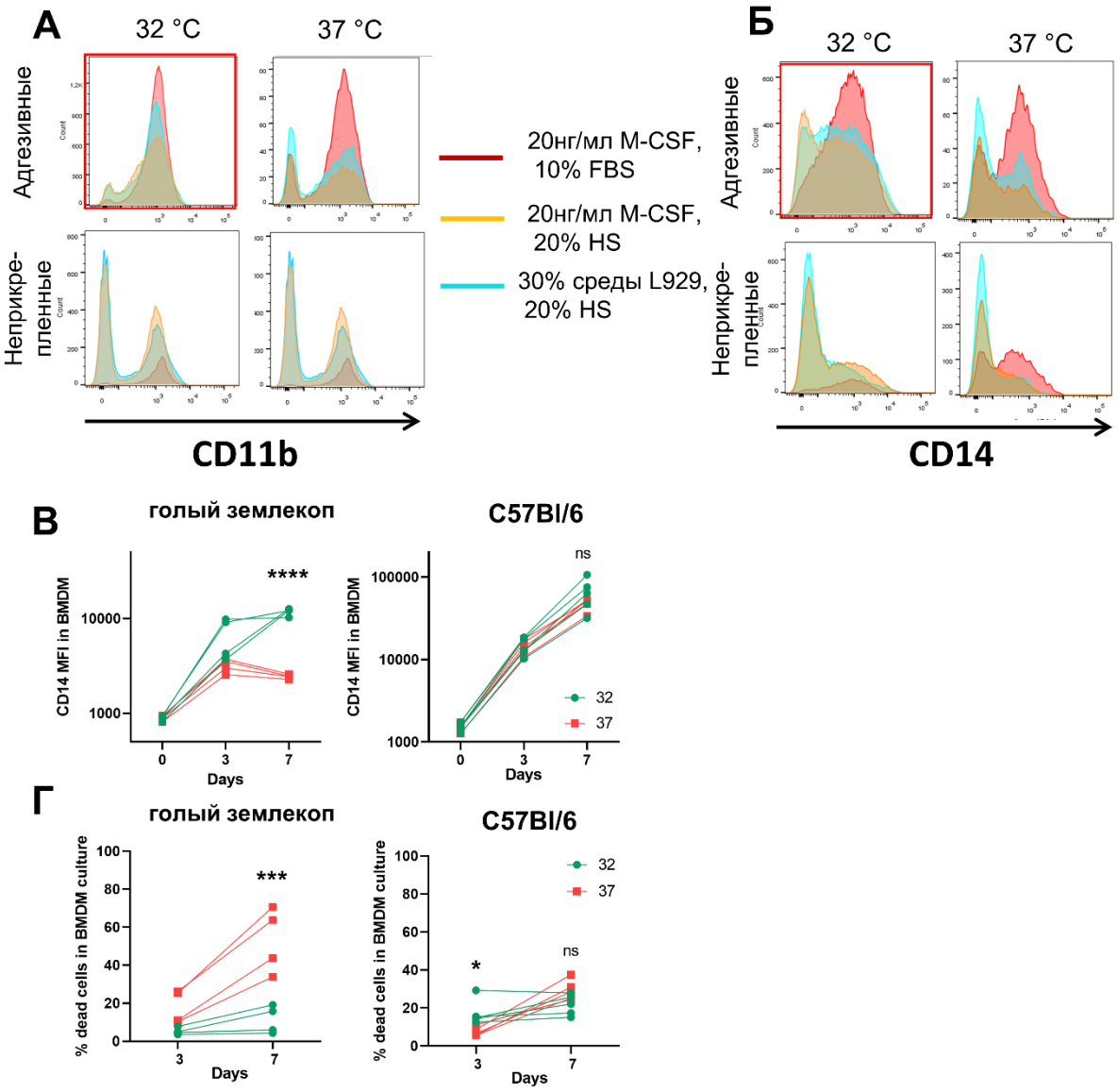


Рисунок 30. Оптимизация протокола получения макрофагов костного мозга голого землекопа.

А – гистограммы экспрессии CD11b на адгезивных и неприкрепленных клетках культур костного мозга голого землекопа, полученных при температурах 32 °C и 37 °C, и с использованием среды с содержанием: 1) 20 нг/мл рекомбинантного M-CSF мыши и 10% FBS (красная линия), 2) 20 нг/мл рекомбинантного M-CSF мыши и 20% лошадиной сыворотки (HS) (оранжевая линия), 3) 30% кондиционной среды L929 и 20% HS (голубая линия). **Б –** гистограммы экспрессии CD14 на прикрепленных и неприкрепленных клетках культур костного мозга голого землекопа, полученных при температурах 32 °C и 37 °C, и с использованием вышеуказанных сред. **В** – уровень MFI CD14 на клетках из культур костного мозга мыши и голого землекопа, дифференцируемых в присутствии M-CSF, при температурах 32 °C и 37 °C, на третий и седьмой день. **Г** – количество мертвых клеток в культурах костного мозга мыши и голого землекопа, дифференцируемых в присутствии M-CSF, при температурах 32 °C и 37 °C на третий и седьмой день.

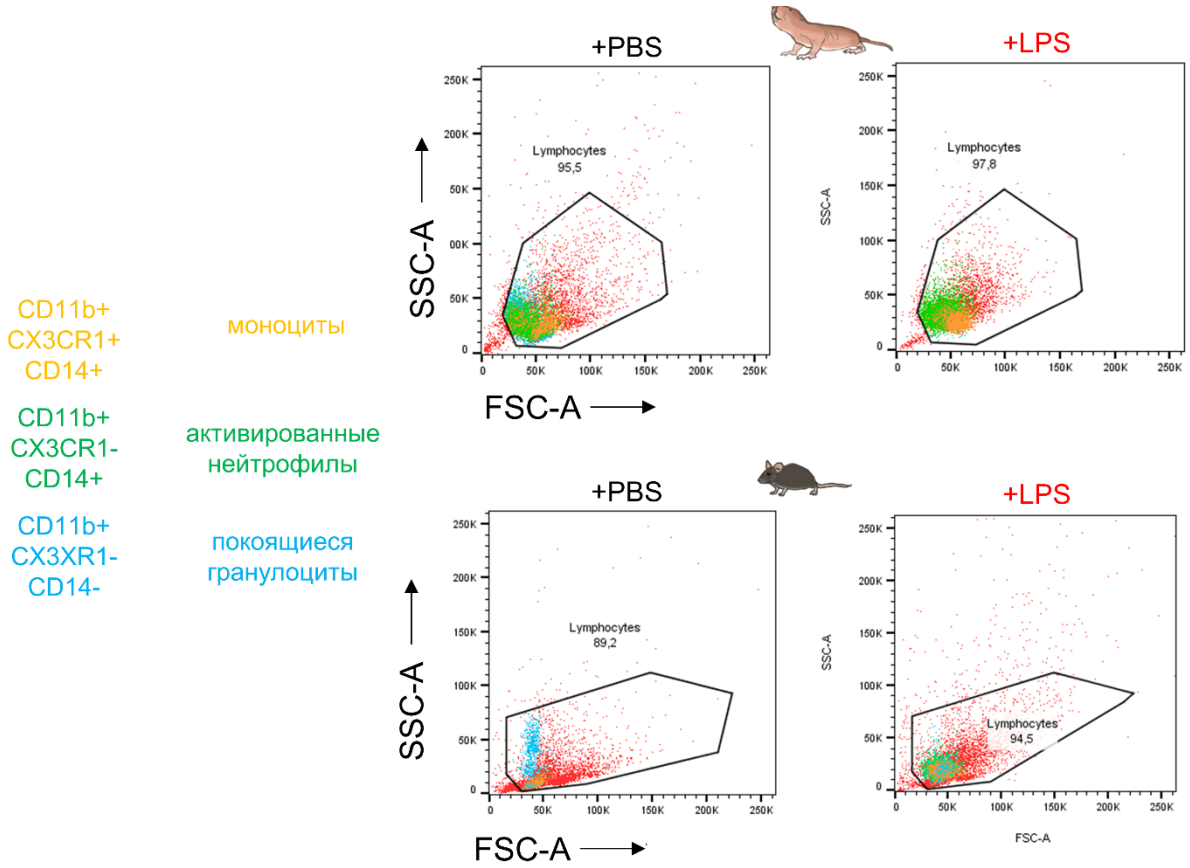


Рисунок 31. Предполагаемые на основании обратного гейтирования популяции CD11b^{+} миелоидных клеток в крови голого землекопа и мыши в модели системного воспаления.