

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Горшкова Екатерина Александровна

**Особенности иммунной системы голого землекопа
(*Heterocephalus glaber*)**

3.2.7 – Иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2023

Диссертация подготовлена в лаборатории молекулярных механизмов иммунитета Института молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта Российской академии наук.

**Научный
руководитель**

Недоспасов Сергей Артурович
доктор биологических наук, профессор, академик РАН

**Официальные
оппоненты**

Воротеляк Екатерина Андреевна
доктор биологических наук, член-корреспондент РАН,
ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова
Российской академии наук, лаборатория клеточной
биологии, заведующий лабораторией

Гривенников Игорь Анатольевич
доктор биологических наук, профессор
Национальный исследовательский центр «Курчатовский
институт», лаборатория молекулярной нейрогенетики и
врожденного иммунитета, главный научный сотрудник

Вишнякова Полина Александровна
кандидат биологических наук,
ФГБУ "Национальный медицинский исследовательский
центр акушерства, гинекологии и перинатологии им.
акад. В.И. Кулакова" Министерства здравоохранения
Российской Федерации, лаборатория регенеративной
медицины, заведующий лабораторией

Защита диссертации состоится 21 июня 2023 г. в 16 часов на заседании диссертационного совета МГУ.015.1 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, биологический факультет, ауд. М1.

E-mail: dkiselevs@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/015.1/2559/>

Автореферат разослан « » мая 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Д.Б. Киселевский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Голый землекоп (*Heterocephalus 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, низкие 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 недостаточно изучена.

На момент начала работы над диссертацией знания о специфических свойствах иммунной системы голых землекопов были отрывочны, к примеру, в литературе отсутствовало даже полноценное анатомическое описание лимфоидных органов голых землекопов. Методические подходы, используемые в работах с иммунными клетками голых землекопов, были неоднородны и недостаточно детально описаны. Так, только в конце 2019 года появилось несколько работ, демонстрирующих количественное преобладание миелоидных клеток в иммунной системе голого землекопа. При этом оказалось, что в организме *H. glaber* отсутствует популяция лимфоцитов, отвечающая за элиминацию инфицированных вирусами или злокачественных клеток – НК-клетки. Это обстоятельство, вступающее в кажущееся противоречие с устойчивостью вида к развитию злокачественных опухолей, только повысило интерес к продолжению исследования 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 глубоко изучена, что можно объяснить недостатком знаний об особенностях иммунной системы голых землекопов. Результаты настоящего исследования важны для понимания видоспецифичных особенностей иммунной системы голых землекопов в контексте адаптации вида.

Объектом исследования выступили голые землекопы (*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 изученные 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 метилцеллюлозой, дифференцировка макрофагов костного мозга. Были оптимизированы температурные условия и продолжительность ведения первичных культур. Так как физиологическая температура тела 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 стресстестов 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 миелоидными 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.

Апробация результатов и публикации

Результаты диссертационной работы были представлены и обсуждены на международных конференциях: конференции «Молекулярные медиаторы иммунитета и других физиологических процессов», Сириус, Россия, 25-27 ноября 2022, 6th European Congress of Immunology, online, 1-4 сентября 2021, Школе молодых ученых «Молекулярные медиаторы иммунитета», Российско-Германском симпозиуме «Актуальные проблемы современной биомедицины», Сириус, Россия, 30 ноября – 3 декабря 2019 г., II Объединенном научном форуме, Сочи, Дагомыс, Россия, 1-6 октября 2019, встрече фокус-группы «Альтернативные животные модели старения», Берлин, Германия, 19-20 июля 2019 г., 3-й Международном симпозиуме «Healthy Aging», Берлин, Германия, 20-22 февраля 2019 г., V Международной конференции «ПОСТГЕНОМ'2018», Казань, Россия, 29 октября – 2 ноября 2018, семинаре «Healthy Ageing», Геттинген, Германия, 24-25 апреля 2018 г.

Личный вклад автора

В настоящей работе был проведен комплекс экспериментальных исследований для выявления особенностей иммунной системы голого землекопа по сравнению с мышами линии C57Bl/6. Личный вклад автора состоит в планировании, постановке и анализе результатов экспериментов, анализе существующей литературы, составлении текста научно-квалификационной работы и публикаций. Скрининг антител на кросс-специфичность был произведен при участии лаборатории иммунохимии ФГБУ "ГНЦ Институт иммунологии" ФМБА России. Биоинформатический анализ результатов РНК-секвенирования был выполнен при участии сотрудников лаборатории сравнительной геномики и транскриптомики ИМБ им В.А.Энгельгардта РАН. 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".

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, который включает 125 источников. Работа изложена на 112 страницах, содержит 31 рисунок и 8 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Настоящая работа посвящена изучению иммунной системы неклассического объекта – голого землекопа. Вид *H. glaber* интересен множеством уникальных для млекопитающих физиологических свойств: высокая продолжительность жизни, устойчивость к гипоксии и образованию опухолей. Тем не менее, на сегодняшний день исследований о том, как иммунитет этих животных адаптирован к вышеперечисленным физиологическим особенностям, известно крайне мало. В работе были поставлены как практические задачи – подбор новых инструментов для исследования иммунитета голого землекопа, так и теоретические – закрытие пробелов в знаниях о морфологии и клеточном составе лимфоидных органов, поиск возможной связи между функциями миелоидных клеток и эволюционными адаптациями организма.

1. Строение и клеточный состав основных иммунных органов голого землекопа.

1.1. Панель кросс-специфичных антител.

Специфичные антитела к клеточным маркерам иммуноцитов – один из основных инструментов в экспериментальной иммунологии. При работе с нестандартными животными моделями репертуар подходящих иммунологических реагентов часто ограничен. В работе был проведён скрининг доступных антител на кросс-специфичность с тканями голого землекопа, включая подтверждение клонов, известных по ранее опубликованным работам (**Таблица 1**). Кросс-специфичность антител проверяли при окрашивании клеток костного мозга, селезенки и тимуса голого землекопа методом цитофлуориметрии. Кроме того, часть антител была проверена на пригодность для иммуногистохимии на замороженных или 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 (**Таблица 1**).

1.2. Особенности лимфоидных органов голого землекопа.

Основной целью настоящей работы было выявление особенностей иммунной системы голого землекопа, потенциально связанных с другими физиологическими адаптациями вида. При вскрытиях животных оценивались размеры тимуса, лимфоузлов, селезёнки, кишечника и Пейеровых бляшек, а также количество клеток костного мозга. Внутренняя структура органов изучалась на гистологических срезах. В части опытов перечисленные лимфоидные органы были подвергнуты механическому или ферментативному расщеплению для выделения единичных клеток и их последующего анализа методом проточной цитофлуориметрии.

Таблица 1. Панель кросс-специфичных антител, распознающих иммунциты голого землекопа.

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	Shebzukhov et al., 2019
Mouse-anti Guinea pig CD8a, Bio-Rad	CT6, IgG1	Цитотоксические Т-клетки	Связывание клеток голого землекопа - цитометрия	Shebzukhov et al., 2019
Mouse-anti human CD14, DRFZ	TM1, IgG1	Моноциты, макрофаги, нейтрофилы		Shebzukhov et al., 2019
Rat-anti mouse CD11b, eBioscience	M1/70, IgG2b	Макрофаги, моноциты, нейтрофилы	qRT-PCR на отсортированных клетках; Связывание клеток голого землекопа – цитометрия, иммуногистохимия	Горшкова и др., 2019 Wada et al, 2019 Emmrich et al, 2022
Rat-anti mouse CX3CR1, BioLegend	SA011F11, IgG2a	Моноциты	Связывание клеток голого землекопа – цитометрия	Gorshkova et al, 2023
Rat-anti mouse CD20, Abcam	SP32	В-клетки, только внутриклеточно	Связывание клеток голого землекопа - цитометрия, иммуногистохимия	Не опубликовано

Костный мозг голого землекопа представлен меньшим количеством клеток, чем у мыши. Так, из бедренных, больших берцовых и плечевых костей голого землекопа в совокупности удавалось получить около 15 млн клеток, столько же, сколько стандартно можно извлечь из одной бедренной кости мыши возраста 8-12 недель. Таким образом, если считать, что процентное содержание костного мозга в костях конечностей относительно всего скелета у голого землекопа соответствует значениям, наблюдаемым у мышей, то в пересчёте на одну бедренную кость у голого землекопа наблюдается значительно меньшее количество клеток костного мозга. При этом частота миелоидных CD11b⁺ CD14⁺ клеток в костном мозге голого землекопа была значительно выше, чем у мыши (Рисунок 1).

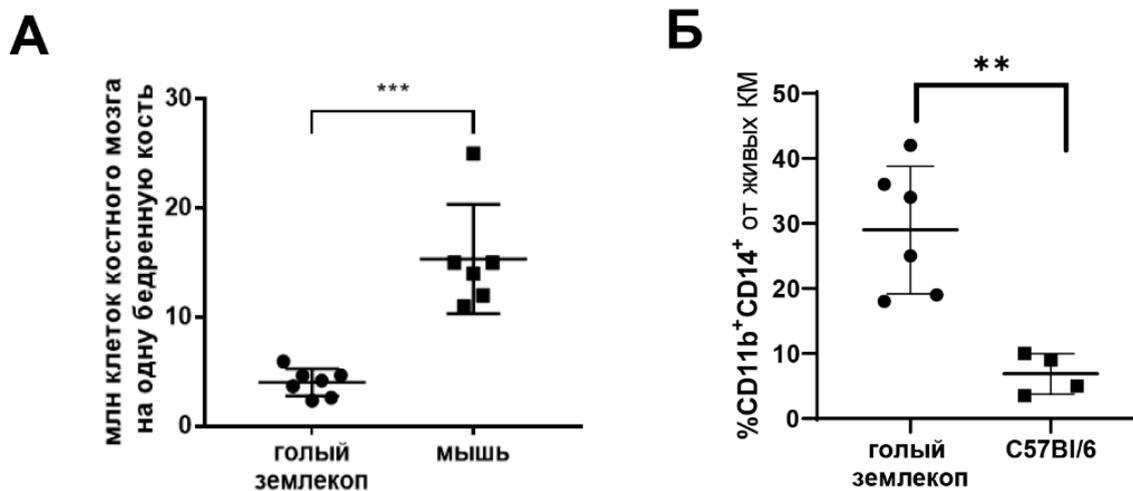


Рисунок 1. В костном мозге голого землекопа увеличена доля CD14⁺ миелоидных клеток по сравнению с мышью.

А. Количество иммунных клеток, выделенных из костного мозга в пересчёте на одну бедренную кость. **Б.** Процентное содержание CD14⁺ миелоидных клеток (VD⁻ CD8⁻ CD11b⁺ CD14⁺) костного мозга у голого землекопа и мыши линии C57Bl/6. Статистический анализ проведен с помощью t-теста Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0.05$.

** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

При сравнении размера и формы тимуса был отмечен факт, что даже у молодых особей голого землекопа (от 12 недель) грудной тимус имеет меньший размер (2-3 мм), чем у мышей (5-6 мм в длину). Интересно, что при гистологическом анализе тимусов животных возраста от 12 недель до шести лет не было отмечено существенной инволюции.

Одним из наиболее крупных вторичных лимфоидных органов голого землекопа является селезёнка (**Рисунок 2А**). При этом абсолютное количество иммунных клеток селезёнки после лизиса эритроцитов составляло всего около 10 млн клеток против 60-100 млн, получаемых из селезёнки C57Bl/6 мышей возраста 8-12 недель, содержащихся в SPF-условиях (**Рисунок 2Б**). На гистологических срезах селезёнки заметно, что у голого землекопа снижен относительный объем белой пульпы (**Рисунок 2В**), что подтверждается цитометрическими данными - так, отрицательная по миелоидным маркерам, смешанная популяция лимфоцитов, представлена меньшим процентом у голого землекопа, чем у мыши, а доля миелоидных CD11b-положительных клеток в селезёнке голого землекопа, напротив, выше, чем у мышей (**Рисунок 2Г**). В популяции миелоидных CD11b⁺ клеток селезёнки наблюдается более высокая экспрессия CD14. Предположительно, снижение содержания лимфоцитов в селезёнке может складываться из уменьшения доли таких популяций как CD20⁺ В лимфоциты и CD8⁺ Т лимфоциты (**Рисунок 2Д, Е**), что не противоречит литературным данным.

Лимфоузлы удавалось обнаружить в типичных для грызунов локациях. Несмотря на малый размер, лимфоузлы голого землекопа обладали нормальной структурой – на срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, были различимы фолликулы, находящиеся в периферической части кортекса.

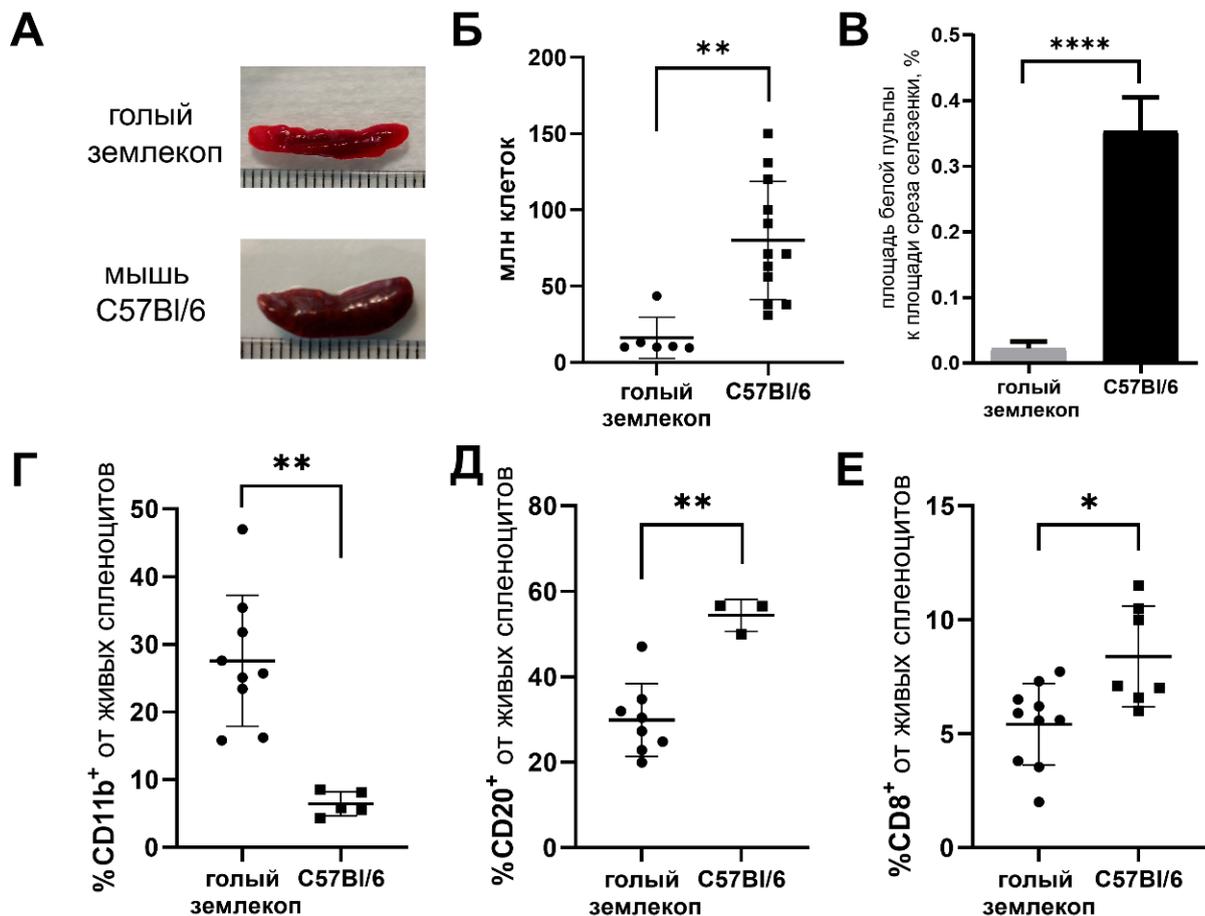


Рисунок 2. В селезёнке голого землекопа увеличена доля миелоидных клеток по сравнению с мышью.

А. Внешний вид селезёнки голого землекопа и лабораторной мыши. **Б.** Количество иммунных клеток, выделенных механически из селезёнки голого землекопа и мышей. **В.** Относительная площадь фолликулов белой пульпы на срезах селезёнки голого землекопа (n=3) и мыши (n=4). **Г.** Процентное содержание миелоидных клеток (VD⁻ CD8⁻ CD20⁻ CD11b⁺) в селезёнке. **Д.** Процентное содержание В-клеток (VD⁻ CD8⁻ CD20⁺ CD11b⁻) в селезёнке. **Е.** Процентное содержание цитотоксических Т-клеток (VD⁻ CD8⁺) клеток в селезёнке. Статистический анализ проведен с помощью t-теста Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0.05$. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$.

Несмотря на свою яркую выраженность, лимфоидная ткань, ассоциированная с кишечником (GALT), у голых землекопов ранее не была охарактеризована. Было отмечено, что размер и число Пейеровых бляшек (ПБ) у голого землекопа соответствуют таковым у лабораторных мышей, однако из-за того, что тонкий кишечник голого землекопа в несколько раз короче, чем у мыши, плотность расположения Пейеровых бляшек на единицу длины кишечника выше у исследуемого вида (**Рисунок 3Б**). С другой стороны, гистологический анализ не выявил значимых отличий в структуре Пейеровых бляшек обоих грызунов (**Рисунок 3А**). При ферментативном выделении лимфоцитов собственной пластинки кишечника (LPL) было обнаружено существенное превосходство в абсолютном количестве, а также относительном количестве клеток на грамм ткани кишечника у голого землекопа по сравнению

с мышью (**Рисунок 3В**). Таким образом, можно сделать вывод, что GALT голого землекопа, в которую входят как ПБ, так и LPL, представлена большим количеством 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 $CD11b^+$ миелоидных и $CD20^+$ В-клеток были сходными между видами (**Рисунок 3 Г, Д**). Был отмечен более высокий процент $CD8^+$ клеток среди LPL у голого землекопа по сравнению с мышью, что может являться следствием различий в условиях содержания животных (**Рисунок 3Е**).

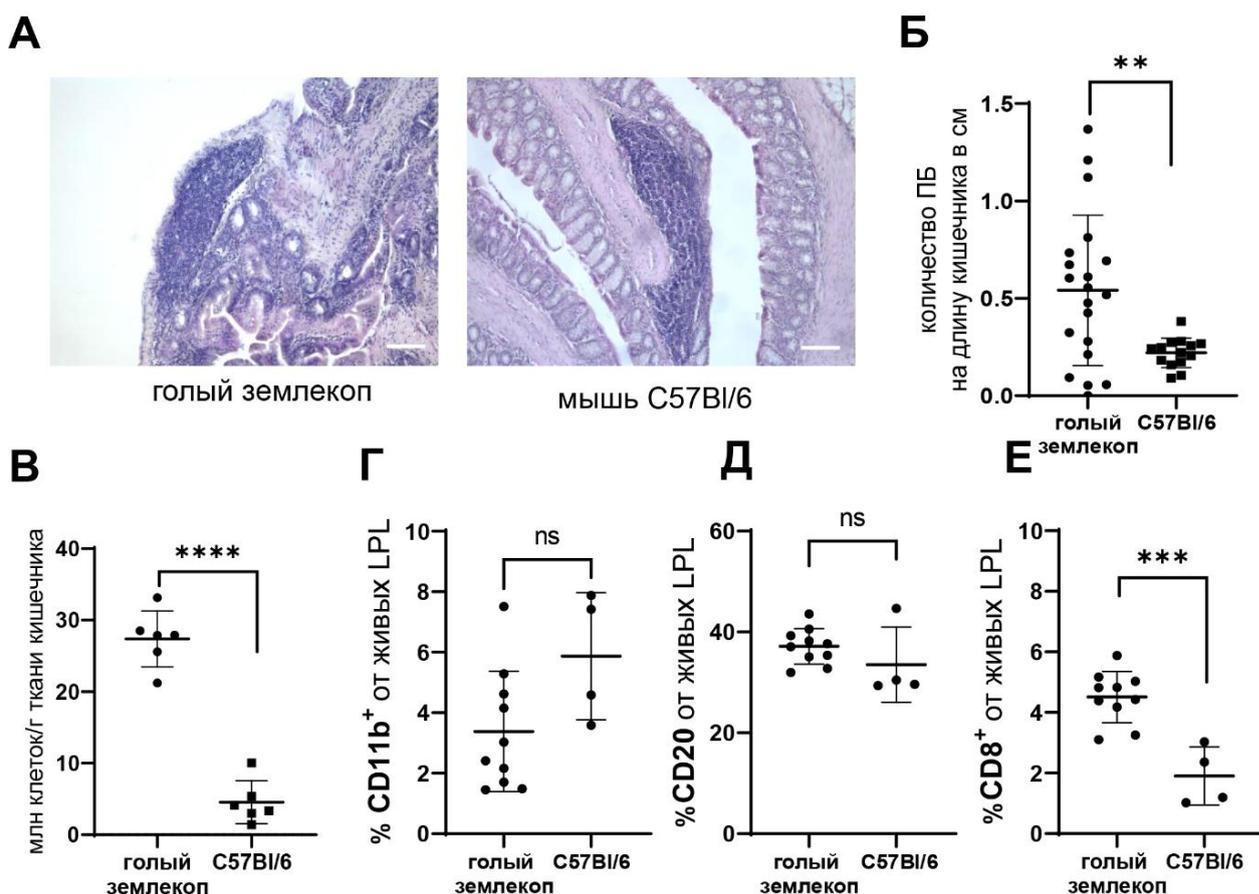


Рисунок 3. Лимфоидная ткань, ассоциированная с кишечником, является самым крупным вторичным лимфоидным органом голого землекопа.

А. Срез Пейеровой бляшки тонкого кишечника голого землекопа и мыши линии C57Bl/6, масштабная линейка – 500 мкм. **Б.** Плотность Пейеровых бляшек на см тонкого кишечника. **В.** Количество LPL на грамм массы кишечника. **Г.** Процентное содержание миелоидных клеток ($VD^- CD8^- CD20^- CD11b^+$) в LPL. **Д.** Процентное содержание В-клеток ($VD^- CD8^- CD20^+ CD11b^-$) в LPL. **Е.** Процентное содержание цитотоксических Т-клеток ($VD^- CD8^+$) в LPL. Статистический анализ проведен с помощью t-теста Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, ns - не достоверно.

Согласно литературным данным, селезёнка голого землекопа важна для экстрамедуллярного эритропоэза, который, в свою очередь, сильно развит у этих животных как приспособление против гипоксии (Emmrich et al, 2022; Vegay et al, 2022). Можно предположить, что функции селезёнки, как вторичного лимфоидного органа, были частично утрачены, о чем свидетельствует меньший объем белой пульпы. В таком случае, роль GALT как основного компартмента

для поддержания иммунного ответа могла компенсаторно возрасти. С другой стороны, большая плотность иммунных клеток в кишечнике голого землекопа может играть важную роль в поддержании барьерных функций и контроле микробиоты.

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

2.1. Особенности макрофагов голого землекопа.

Для получения макрофагов голого землекопа была адаптирована хорошо изученная *in vitro* модель макрофагов, дифференцированных из костного мозга мыши. Исходя из того, что идентичность аминокислотных последовательностей рецепторов макрофагального фактора роста (M-CSF) - CSF-1R – между мышью и голым землекопом составляет 74%, мы использовали среду с добавлением M-CSF мыши для дифференцировки макрофагов из костного мозга голого землекопа. При дифференцировке культуры костного мозга голого землекопа в присутствии рекомбинантного M-CSF мыши наблюдалось увеличение популяции крупных адгезивных клеток, обладающих морфологией макрофагов и положительных по CD11b (**Рисунок 4А, Б**).

При цитометрическом анализе было отмечено увеличение экспрессии CD14 при созревании макрофагов голого землекопа, аналогично тому, как это происходит в культурах макрофагов мыши (**Рисунок 4В**). При температуре 37 °С уровень экспрессии CD14 на поверхности макрофагов был ниже, что может свидетельствовать о том, что они менее эффективно приобретали зрелый поверхностный фенотип в этих температурных условиях (**Рисунок 4Г**). Кроме того, в культурах костного мозга голого землекопа при температуре 37 °С детектировалось больше мёртвых клеток по сравнению с 32°С, в отличие от культур мыши (**Рисунок 4Д**). Также в модели CFU-C рост колоний из кроветворных клеток-предшественников костного мозга происходил эффективно только при физиологически релевантной для голого землекопа температуре 32 °С.

Недавно появились сведения о том, что у голых землекопов увеличена длительность цикла деления клеток (Emmrich et al, 2022), 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 неприкрепленных клеток и более высокая конфлюэнтность культур (>90%), при этом MFI CD14 был лишь незначительно выше по сравнению с седьмым днем (**Рисунок 4А, В**).

Большинство экспериментов по анализу свойств макрофагов голого землекопа было проведено с использованием культур, полученных на седьмой день, однако наиболее интересные результаты были повторены два раза 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.

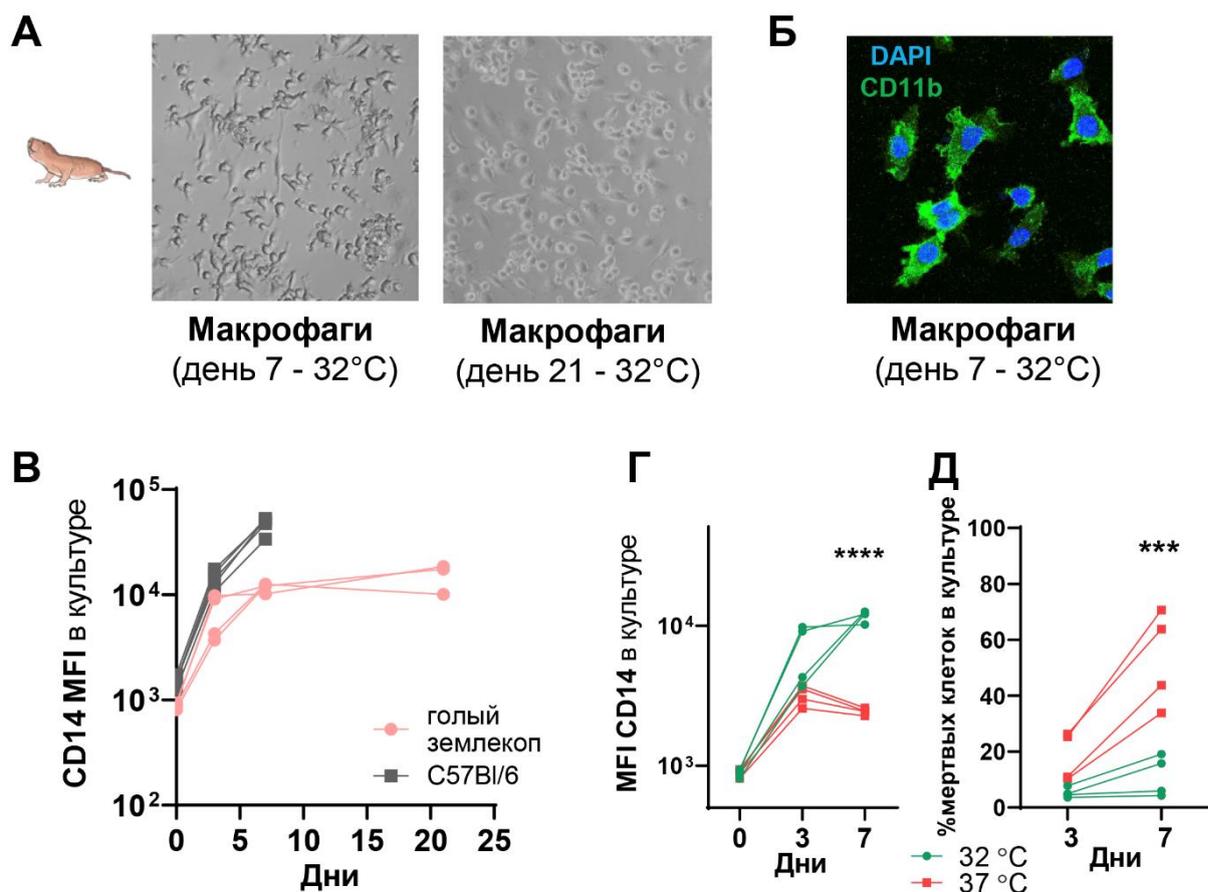


Рисунок 4. Получение макрофагов костного мозга голого землекопа.

А. Внешний вид культуры макрофагов голого землекопа на седьмой и 21 день в культуре.

Б. Иммунофлуоресцентное окрашивание макрофагов костного мозга антителами к CD11b.

В. Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) CD14 при созревании культур макрофагов на 0, 3, 7, 21 день. Г. MFI CD14 и процентное содержание мёртвых клеток (VD⁺) в культурах костного мозга голого землекопа (Д) на 3 и 7 день при ведении на температурах 32 °C и 37 °C. Статистический анализ проведен методом многофакторного дисперсионного анализа (2-way RM ANOVA). Различия считали достоверными при $p < 0.05$. *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$

2.2. Свойства макрофагов голого землекопа в модели поляризации.

Для оценки предрасположенности макрофагов голого землекопа к провоспалительному или противовоспалительному ответу большой интерес представляло изучение поляризации макрофагов.

Для этого культуру макрофагов голого землекопа (M0) рассаживали на седьмой или 21 день и активировали смесью LPS (10 нг/мл) и рекомбинантного IFN γ мыши (10 нг/мл) или рекомбинантным IL-4 мыши (20 нг/мл) при температуре 32 °C (Рисунок 5А). 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, за исключением температуры (37 °C).

Активация макрофагов голого землекопа комбинацией LPS и IFN γ приводила к повышению относительной экспрессии генов, характерных для M1-поляризации: *Cd38*, *Fpr2*, *Tnf* (Рисунок 5Б, верхний ряд), а также вызывала продукцию IL-17 (Рисунок 5В). Для M2-ассоциированных генов *Arg1*, *Egr2*, *Mrc1*, напротив, не наблюдалось статистически значимого изменения экспрессии в макрофагах голого землекопа, активированных при помощи рекомбинантного IL-4 (Рисунок 5Б, нижний ряд), при том, что макрофаги мыши в параллельно проведенных опытах имели характерный для M2 экспрессионный профиль. С другой стороны, M2 макрофаги голого землекопа продуцировали некоторые цитокины и хемокины (Рисунок 5В).

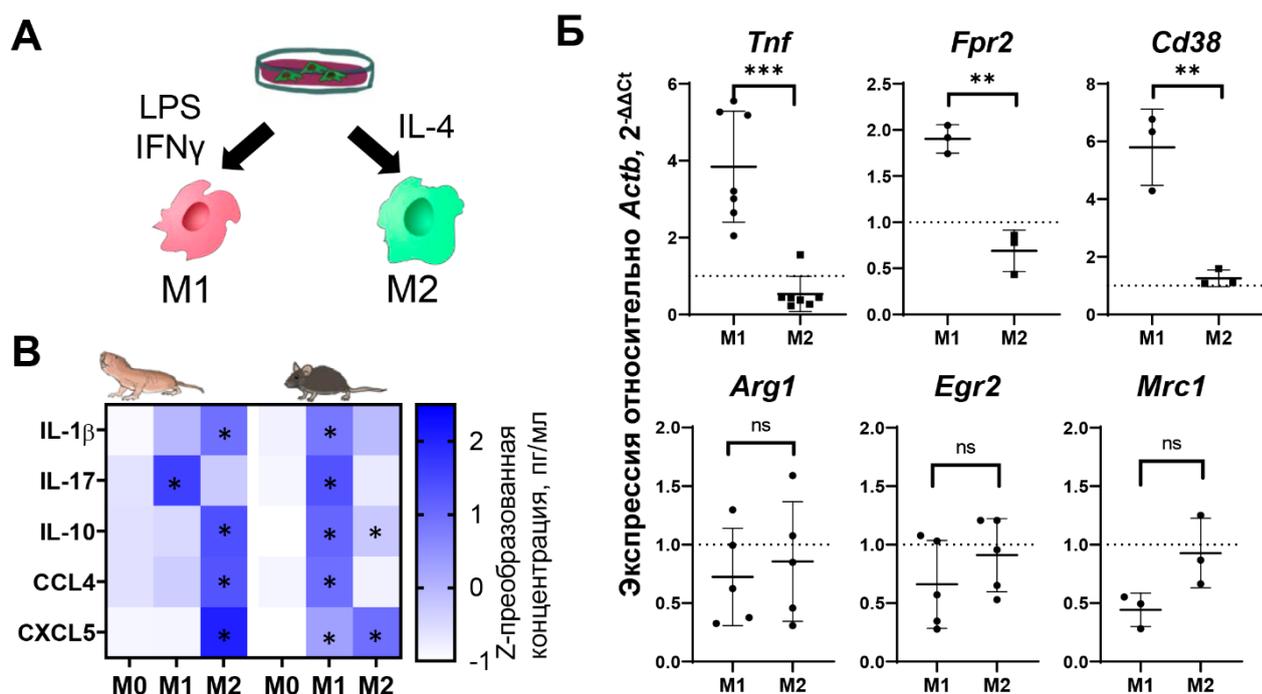


Рисунок 5. Поляризация макрофагов костного мозга голого землекопа.

А. Схема эксперимента. **Б.** Изменение экспрессии M1- и M2-ассоциированных генов относительно *Actb* в M1 и M2 макрофагах голого землекопа по сравнению с M0, измеренное методом qRT-PCR. Статистический анализ проведен с помощью t-теста Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0.05$. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, ns - не достоверно. **В.** Среднее значение Z-преобразованных концентраций цитокинов, полученных в пг/мл при мультиплексном анализе. Звездочкой отмечено статистически значимое различие ($p < 0.05$) по отношению к M0 при однофакторном дисперсионном анализе (1-way RM ANOVA).

Комбинированный метаболический стресс-тест на M1 макрофагах голого землекопа показал снижение уровня максимального потребления кислорода и отсутствие дыхательного запаса – то есть способности потреблять кислород после разобщения дыхательной цепи на фоне блокировки АТФазы (Рисунок 6 А), а также увеличение базового гликолиза и гликолитической емкости клеток АТФазы (Рисунок 6 Б). Таким образом, провоспалительные макрофаги голого

землекопа развивали ожидаемый метаболический профиль (Рисунок 6В, красная линия), сходный с M1 макрофагами мыши (Рисунок 6Е, красная линия).

Метаболический профиль макрофагов голого землекопа, активированных IL-4 мыши, практически не отличался от профиля M0 клеток (Рисунок 6 В, зелёная линия). В тоже время метаболический профиль M2 макрофагов мыши ожидаемо демонстрировал увеличение дыхательной активности (Рисунок 6 Е, зелёная линия).

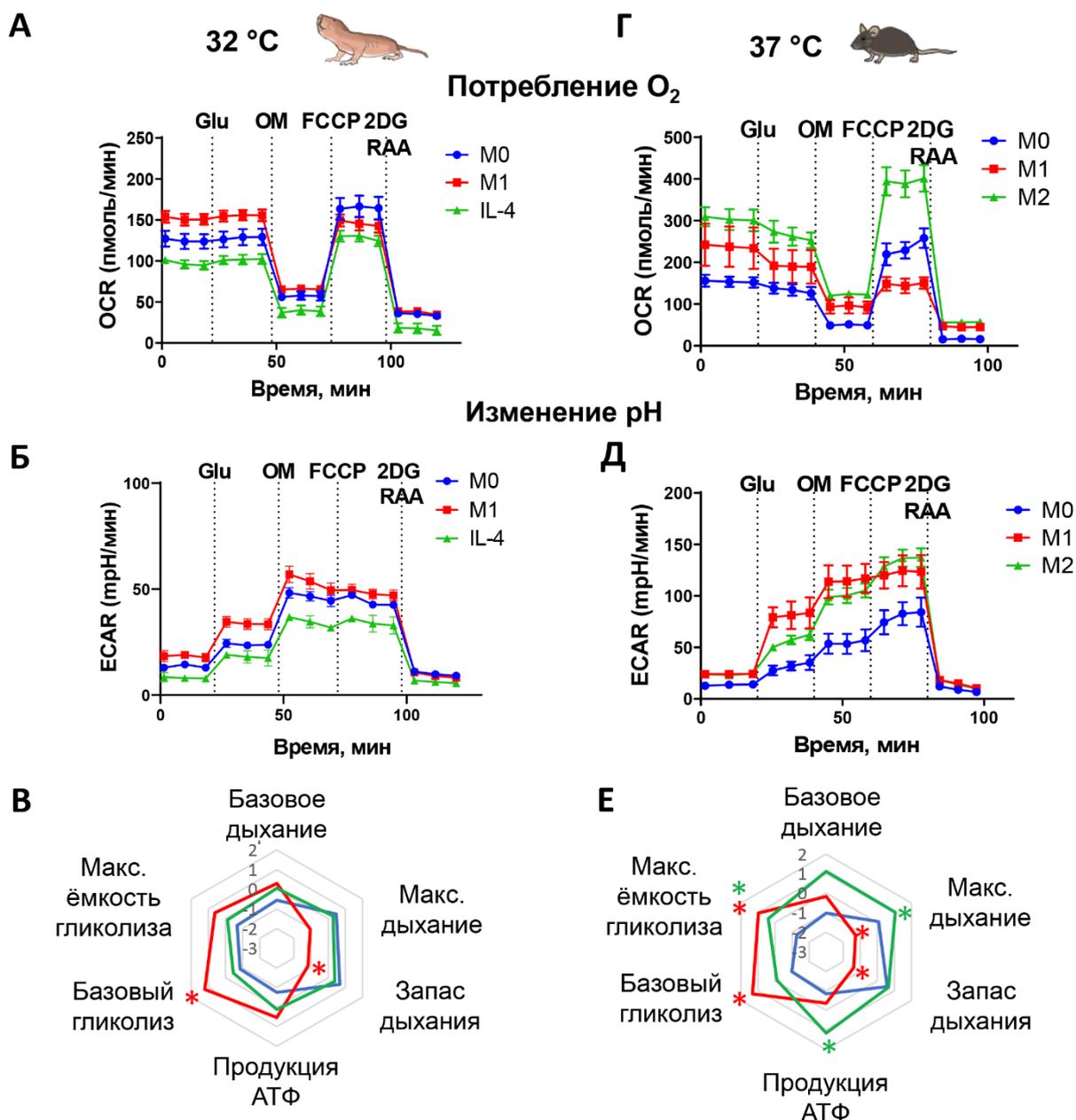


Рисунок 6. В M1 макрофагах голого землекопа подавлено дыхание и повышен гликолиз.

А. Репрезентативный график изменения потребления кислорода клетками (OCR) в комбинированном метаболическом стресс-тесте для определения уровней дыхания в M0 (синяя кривая), M1 (красная кривая) и M2 (зеленая кривая) макрофагах голого землекопа, полученный на платформе Agilent Seahorse. **Б.** Репрезентативный график изменения pH надклеточной среды (ECAR) для определения уровней гликолиза в макрофагах голого

землекопа. **В.** Репрезентативные метаболические профили M0, M1 и M2 макрофагов голого землекопа, построенные по Z-преобразованным средним значениям параметров дыхания и гликолиза, рассчитанных в стресс-тесте. Результат был повторён в трех независимых опытах. Репрезентативные графики изменения OCR (**Г**) и ECAR (**Д**) для макрофагов мыши, а также метаболические профили (**Е**) в комбинированном метаболическом стресс-тесте. Для сравнения параметров дыхания и гликолиза в группах M0, M1, M2 использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), отмечены значимые отличия с M0 для параметров M1 (красные звёздочки) и M2 (зелёные звёздочки). Glu - глюкоза, OM – олигомицин, FCCP - п-трифторметоксикарбонилцианидфенилгидразон, 2DG – 2-дезоксид-глюкоза, RAA – ротенон и антимицин А.

Несмотря на то, что в целом M1 макрофаги голого землекопа и мыши демонстрировали сходные фенотипы, для некоторых параметров были обнаружены видоспецифичные особенности. Так, митохондрии M1 макрофагов голого землекопа не подвергались фрагментации и практически не отличались по структуре от митохондрий неактивированных клеток (**Рисунок 7А**), в то время как в M1 макрофагах мыши наблюдались признаки фрагментации митохондрий (**Рисунок 7Б**). В M2 макрофагах голого землекопа не происходило изменения морфологии митохондрий по сравнению с M0, что не противоречило наблюдениям в метаболических стресс-тестах и анализу экспрессии генов.

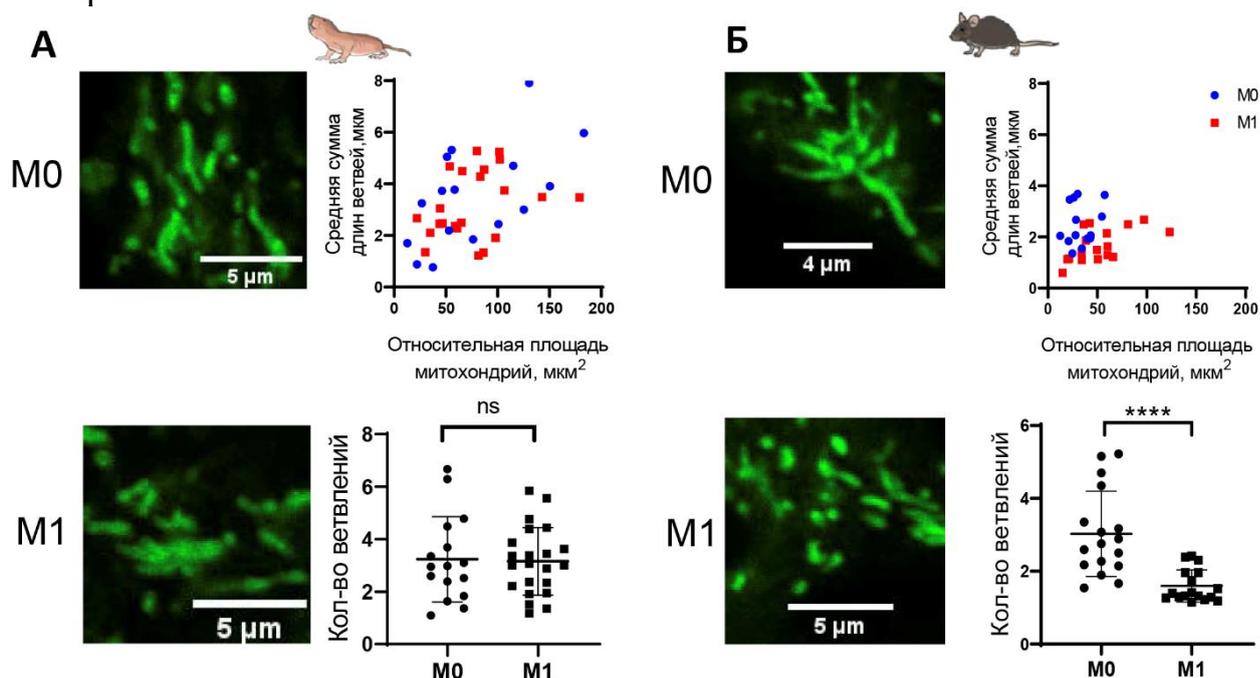


Рисунок 7. M1 поляризация в макрофагах голого землекопа приводит к менее выраженной фрагментации митохондрий, чем в макрофагах мыши.

А. Репрезентативные микроскопические изображения митохондрий, окрашенных MitoTracker Green, в M0 и M1 макрофагах голого землекопа; диаграмма распределения клеток по параметрам относительной площади митохондрий и средней суммы длин элементов митохондриальной сети; среднее количество ветвлений в каждой митохондриальной сети. **Б.** Аналогичные параметры для мыши. Морфология митохондриальных сетей была проанализирована при помощи приложения MiNA на выборке от 20 индивидуальных клеток. Для сравнения параметров между группами M0 и M1 использовали t-тест Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0.05$. **** $p < 0.0001$; ns – не достоверно.

Другим классическим молекулярным маркером M1-поляризации макрофагов мыши является продукция оксида азота (NO), который, в свою очередь, участвует в регуляции работы митохондрий и ЭТЦ, а также в поддержании фенотипа при поляризации. M1 макрофаги голого землекопа практически не производили NO, так как уровень сигнала в супернатантах M1 клеток был сравним с фоном (**Рисунок 8А**). В то же время M1 мыши, полученные в параллельных опытах, производили высокие уровни NO (**Рисунок 8В**). 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 IFN γ (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. С другой стороны, уровни NO в образцах мышей возрастали с течением времени и зависели от концентрации LPS и присутствия IFN γ . Аналогичные закономерности наблюдались при оценке в лизатах клеток уровня пероксинитрита – производной взаимодействия NO и супероксидного анион-радикала. Так, в M1 макрофагах голого землекопа, в отличие от мышинных клеток, не повышался уровень 3-нитро-тирозина (**Рисунок 8В**) – маркера воздействия пероксинитрита на белки.

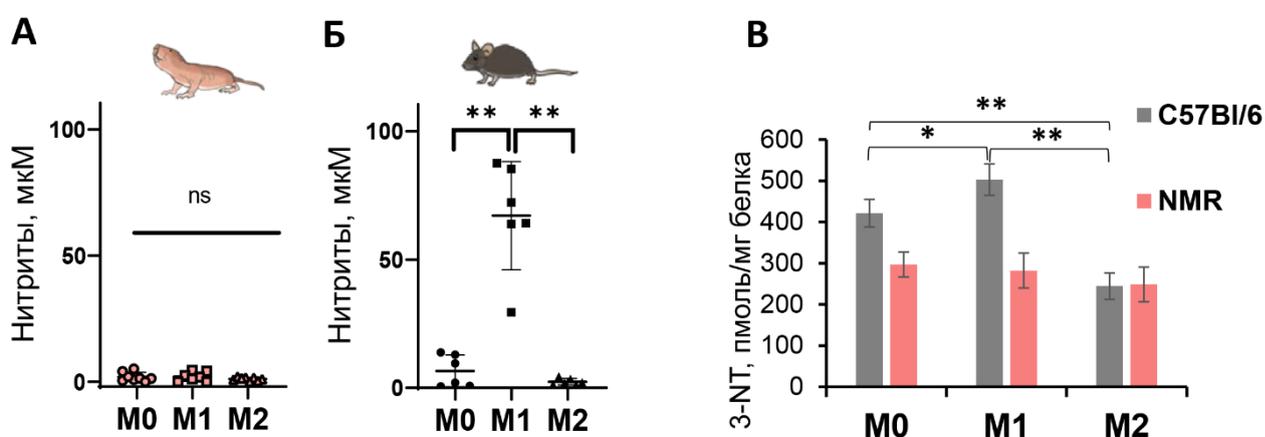


Рисунок 8. В M1 макрофагах голого землекопа подавлена продукция оксида азота.

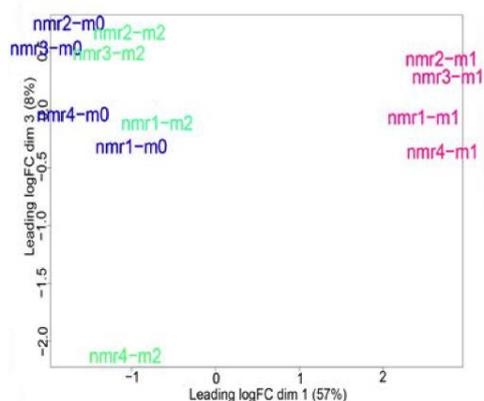
А. Концентрация нитритов, мкМ, в супернатантах макрофагов голого землекопа и мыши (**Б**), собранных после 24-часовой поляризации. **В.** Концентрация 3-нитро-тирозина на мг тотального белка в лизатах M0, M1 и M2 макрофагов голого землекопа и мыши. Статистический анализ проведен методом однофакторного дисперсионного анализа (1-way RM ANOVA). Различия считали достоверными при $p < 0.05$. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; ns - не достоверно.

Для более глубокого понимания программ поляризации M1 и M2 макрофагов голого землекопа было проведено секвенирование РНК.

Сравнение транскриптомов трёх групп показало существенные отличия M1 макрофагов от M0 и M2 образцов, а также малые отличия между M0 и M2

(Рисунок 9А). Среди дифференциально экспрессированных генов (DEGs) в образцах М1 по сравнению с М0 можно было выявить LPS-индуцированные (*Nfkb1*, *Cd14*, *Tlr4*, *Lyn*, *Tnip3*, *Pik3ap1*) и IFN γ -ассоциированные гены (*Irf1*, *Stat1*, *Cd38*, *Ifit3*), что подтвердило предыдущие наблюдения о том, что М1 макрофаги голого землекопа способны отвечать на данный стимул, несмотря на отсутствие яркого признака М1-фенотипа – продукции NO, зависящей от активности транскрипционного фактора NF- κ B (Рисунок 9Б). Анализ DEG не выявил отличий по экспрессии индуцибельной NO-ситазы (*Nos2*), которая отвечает за продукцию NO иммунными клетками. Экспрессия генов *Gch1* и *Slc7a2*, задействованных в осуществлении функций индуцибельной NO-ситазы, также не повышалась в М1 голого землекопа. На релевантных транскриптомах поляризованных макрофагов мыши, полученных из открытых баз данных, прослеживалась яркая сверх-регуляция перечисленных генов в М1 макрофагах мыши.

А



М1 vs М0

Б

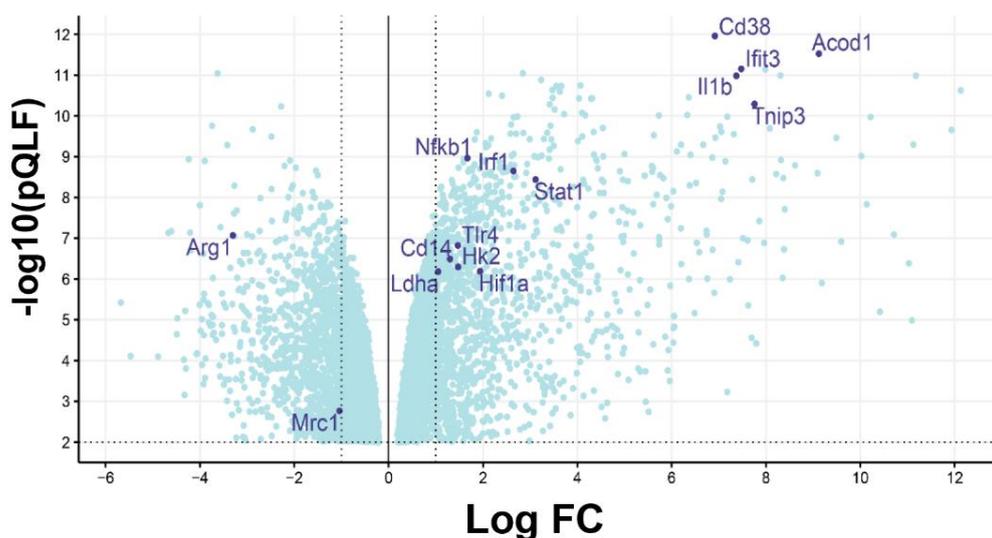


Рисунок 9. М1 макрофаги голого землекопа обладают характерным транскрипционным профилем, но демонстрируют видоспецифичные особенности экспрессии генов, связанных с метаболизмом азота.

А. MDS-диаграмма взаимного расположения транскриптомов в группах М0, М1 и М2 макрофагов голого землекопа. Б. Волкано-диаграмма DEG в М1 макрофагах голого землекопа по сравнению с М0, показаны DEG с $p < 0.01$ (F-тест Фишера (QLF)).

увеличения средней интенсивности флуоресценции красителя DAF-FM у голого землекопа. При этом у мышей значительно увеличивался уровень DAF-FM во всех рассмотренных субпопуляциях и особенно ярко – в CD14-положительных клетках, отвечающих на LPS (Рисунок 11Б).

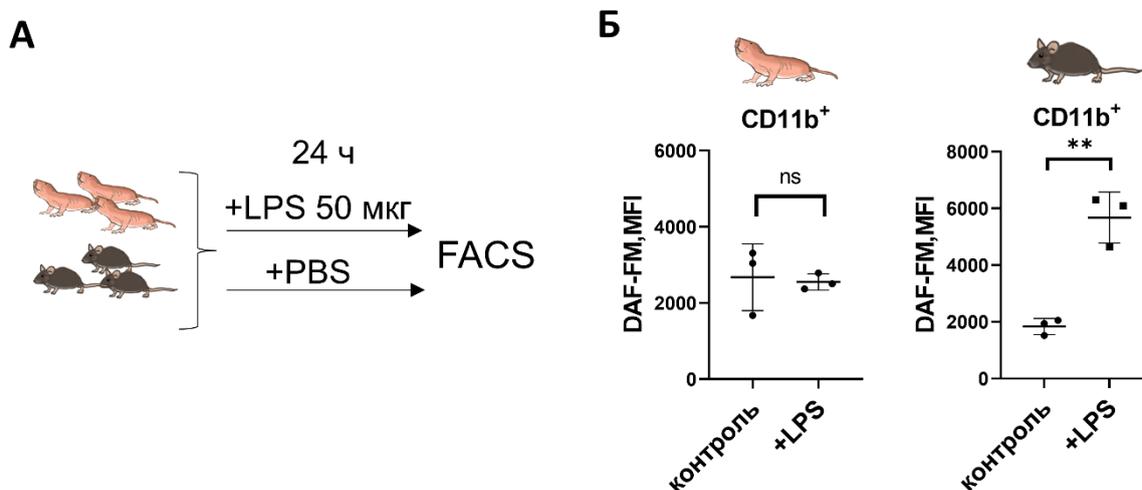


Рисунок 11. В ответ на введение LPS у голого землекопа не изменяется уровень внутриклеточного оксида азота в CD11b⁺ клетках крови

А. Схема эксперимента. Б. MFI красителя DAF-FM в популяции CD11b⁺ миелоидных клеток, выделенных из крови голого землекопа и мыши при экспериментальном системном воспалении. Статистический анализ проведен с помощью t-теста Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0.05$. ** $p < 0.01$, ns - не достоверно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

Анализ морфологии и клеточного состава первичных лимфоидных органов в нашей работе хорошо коррелирует с новейшими данными, полученными с использованием scRNA-секвенирования. Кроме того, нашим исследованием подтверждается воспроизведенное несколько раз в литературе наблюдение о преобладании в селезёнке голых землекопов миелоидных клеток и снижении В-клеточного компартмента. 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 макрофаги голого землекопа, активированные LPS и IFN γ , увеличивают экспрессию провоспалительных генов, продукцию цитокинов и аэробный гликолиз, но в то же время способны лучше поддерживать функциональность митохондрий по сравнению с мышинными макрофагами. Кроме того, провоспалительные макрофаги голого землекопа не продуцировали

оксид азота, в том числе при введении LPS системно. Макрофаги голого землекопа, активированные рекомбинантным IL-4, секретировали хемокины, но не приобретали характерные для противовоспалительных макрофагов черты. Наконец, в ходе работы были валидированы коммерческие антитела, способные распознавать иммуноциты голого землекопа, что важно для будущих исследований.

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 °С, но не 37 °С, что может отражать адаптацию иммунной системы голого землекопа к гетеротермии.
4. Макрофаги костного мозга голого землекопа, активированные LPS и IFN γ , 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.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Web of Science, Scopus или РИНЦ:

1. **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. Импакт-фактор WoS (JIF) = 8.786 (1.85/1.3)ⁱ
2. Holtze S., **Gorshkova E.**, Braude S., Cellerino A., Dammann P., Hildebrandt T.B., Hoefflich 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. Импакт-фактор WoS (JIF) = 6.113 (3.12/0.23)
3. 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. Импакт-фактор WoS (JIF) = 14.350 (2.1/0.1)

4. **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. Двухлетний импакт-фактор РИНЦ = 0,123 (0.92/0.8).

ⁱ В скобках приведен объем публикации в условных печатных листах и вклад автора в условных печатных листах