

УДК 611.452

НОВЫЕ МЕХАНИЗМЫ КЛЕТОЧНОГО ОБНОВЛЕНИЯ ХРОМАФФИННОЙ ТКАНИ**Н.В. Яглова, С.С. Обернихин, Е.П. Тимохина, С.В. Назимова, В.В. Яглов***НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского», г. Москва, Россия***Введение**

Хромаффинная ткань в организме представлена хромаффинными клетками мозгового вещества надпочечников и параганглиями, вырабатывающими катехоламины, энкефалины и энкефалин-содержащие пептиды [1]. Ее роль в реализации защитных реакций на стресс уникальна и имеет сложные механизмы. Хромаффинные клетки надпочечников являются не только оригинальным "преобразователем стресса" в организме, но и регуляторным узлом для секреции пептидов, важных для стресса и воспаления, а также для интеграции стрессового ответа с нервной системой [2]. Защитные реакции требуют активного участия и мозгового и коркового вещества надпочечников, и их дисфункция может иметь необратимые последствия для организма. Однако способность к регенерации у этих двух структур различна. Известно, что у коркового вещества она значительно выше, чем у мозгового [3]. Механизмы репаративной регенерации и самообновления хромаффинных клеток мало изучены, что является серьезным препятствием для развития новых более эффективных способов лечения нейродегенеративных заболеваний, таких как клеточная терапия.

Цель работы – выявление факторов и механизмов, обеспечивающих самообновление хромаффинных клеток мозговом веществе надпочечников.

Материалы и методы

Объектом исследования были самцы крыс Вистар (n=20). Животных выводили из эксперимента в пубертатном периоде (6 недель), когда надпочечник активно развивается и в постпубертатном периоде в возрасте 10 недель, когда рост надпочечника крысы завершается [4,5]. Эксперимент проведен в соответствии с ГОСТ 33215–2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур», ГОСТ 33216–2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными, Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами», Европейской Конвенцией о защите позвоночных животных (Страсбург, 1986 г.), а также Приказом МЗ РФ № 199н от 1 апреля 2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики».

Проводили гистологическое исследование экваториальных срезов органа, окрашенных гематоксилином и эозином. Морфометрию светооптических препаратов проводили с помощью программы "Image Scope" ("Leica Microsystems", Германия). Определяли площадь мозгового вещества и площадь, занимаемую хромаффинными клетками в мозговом веществе.

Для определения степени дифференцировки хромаффинных клеток использовали иммуногистохимическое выявление тирозингидроксилазы с помощью поликлональных кроличьих антител ("Abcam", Великобритания). Пролиферативную активность хромаффинных клеток исследовали с помощью антител к Ki-67, экспрессию лиганда Shh, транскрипционных факторов POU5F1 и Sox2 в хромаффинных клетках выявляли также иммуногистохимическим методом с использованием поликлональных антител ("Abcam", Великобритания). Подсчитывали процент позитивных клеток. Производили иммуногистохимическое исследование β-катенина, являющегося активатором канонического Wnt-сигналинга, с определением процента позитивных клеток с мембранной, цитоплазматической и ядерной локализациями белка.

Статистическую обработку осуществляли с помощью пакета прикладных программ Statistica 7.0 (Statsoft Inc., США). Центральные тенденции и рассеяния количественных признаков, имеющих приблизительно нормальное распределение, описывали средним значением и стандартной ошибкой среднего значения ($M \pm m$). Сравнение независимых групп по количественному признаку выполняли с помощью t-критерия Стьюдента с учетом значений критерия Левена о равенстве дисперсий и χ^2 . Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

У крыс в периоде полового созревания мозговое вещество надпочечников имело типичное строение и было образовано скоплениями хромаффинных клеток, разделенных венозными синусоидами. Хромаффинные клетки занимали около 75 % площади мозгового вещества. Скопления хромаффинных клеток были разделены прослойками соединительной ткани.

100 % хромаффинных клеток характеризовались высокой экспрессией тирозингидроксилазы, что свидетельствует об их терминальной дифференцировке. Процент пролиферирующих хромаффиноцитов был небольшим. Экспрессия β-катенина в хромаффинных была низкой. Чаще встречались клетки с мембранной локализацией β-катенина. Среди хромаффинных клеток выявлялись единичные POU5F1-позитивные клетки, а транскрипционный фактор Sox2 не в хромаффинных клетках не обнаруживался. Встречались единичные клетки с ядерной локализацией сигнальной молекулы Shh.

После завершения роста надпочечников к 10-й неделе у крыс размеры органа статистически значимо увеличились по сравнению с периодом полового созревания. Площадь мозгового вещества также увеличилась. Соотношение площади хромаффинных клеток и стромы не изменялось (рис. 1).

У всех хромаффинных клетках обнаруживалось высокое содержание фермента тирозингидроксилазы в цитоплазме аналогичное пубертатному периоду (рис 2). В среднем количество делящихся хромаффинных клеток составляло 1,5–1,7 %, что было значительно меньше, чем в периоде полового созревания и (рис. 2).

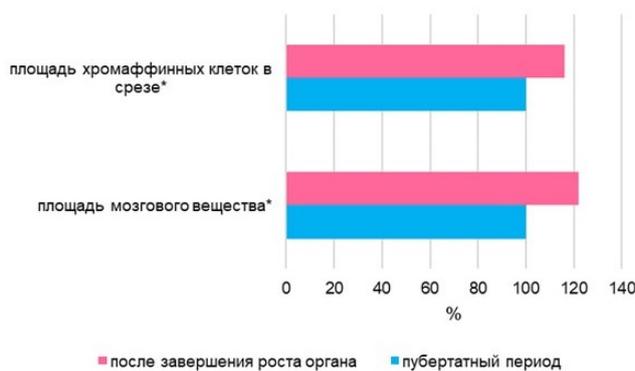


Рис. 1 – Возрастные изменения размеров мозгового вещества надпочечников крыс

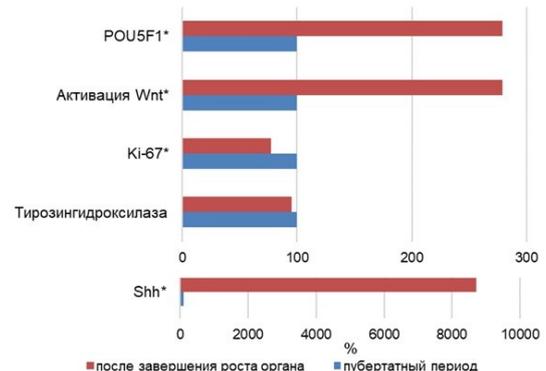


Рис. 2 – Возрастные изменения экспрессии транскрипционного фактора POU5F1, активации Wnt-сигналинга, Ki-67, лиганда Shh и тирозингидроксилазы в хромаффинных клетках мозгового вещества надпочечников крыс

Примечания: значения пубертатного возраста приняты за 100 %. * – статистически значимые отличия от значений пубертатного периода

Относительное содержание β-катенин-позитивных хромаффинных клеток с локализацией в плазмолемме уменьшилось в два раза, вследствие чего общее количество β-катенин-позитивных клеток не изменилось по сравнению с пубертатным периодом. Но процент хромаффинных клеток с локализацией β-катенина, свидетельствующей об активации Wnt-сигналинга, в ядре увеличился почти в три раза (рис. 2).

К моменту завершения роста надпочечников количество POU5F1-позитивных клеток увеличилось, при этом степень увеличения численности была идентичной увеличению показателя активации Wnt-сигналинга. Количество хромаффинных клеток, экспрессирующих лиганд Shh, значительно возросло. Процент Shh-позитивных клеток соответствовал показателю POU5F1. Sox2 по-прежнему не выявлялся.

Обсуждение

В настоящем эксперименте мы установили, что пролиферативная активность хромаффинных клеток снижается по мере роста надпочечников до критически низких значений. Следовательно, должен существовать иной механизм индукции клеточного деления. Wnt-сигналинг влияет на многие аспекты развития и функции нервной системы. Белки Wnt активируют множество сигнальных путей и индуцируют разнообразные клеточные процессы, включая пролиферацию и дифференцировку клеток, изменения транскрипции генов и др. [6]. Нами продемонстрировано, что число клеток с транслокацией β -катенина в ядро после завершения роста органа увеличивается, то есть, после остановки роста происходит усиление активации канонического Wnt-сигналинга в хромаффинных клетках, что можно рассматривать как дополнительный механизм физиологической регенерации.

Сигнальный путь Shh играет важную роль в развитии нервной системы [7]. Shh, связываясь со своим рецептором Patched, подавляет связанный с G-белком рецептор Smoothed, что приводит к активации гомолога-1 онкогена, ассоциированного с глиомой (Gli-1). Активированный Gli-1 способствует экспрессии многих генов-мишеней, которые регулируют рост, выживание и дифференцировку различных клеток, включая нейроны [8]. Экспрессия Shh активируется в нейронах во время гипоксии, а ингибирование пути Shh усугубляет ишемическое повреждение нейронов мозга у крыс, что указывает на роль Shh в регенерации нервной ткани, что можно рассматривать как защитную реакцию, направленную на выживание клетки [9]. В данной работе мы выявили хромаффинные клетки, синтезирующие Shh, число которых увеличивалось к моменту завершения роста надпочечника. Известно, что в корковом веществе активация передачи сигналов Shh коррелирует с активностью Wnt-сигналинга, которая повышается во время процесса регенерации [10]. На основании полученных нами данных можно предположить, что аналогичные процессы происходят и в хромаффинных клетках надпочечников.

Факторы транскрипции POU5F1 и Sox2 экспрессируются на ранних стадиях эмбрионального развития млекопитающих [11, 12]. POU5F1 имеет решающее значение для поддержания клетками плюрипотентности, в то время как фактор Sox2 необязателен для ее установления во время эмбриогенеза [13, 14]. В настоящем исследовании мы установили, что транскрипционный фактор POU5F1 синтезируется в хромаффинных клетках мозгового вещества надпочечников в процессе постнатального развития. Высокое содержание тирозингидроксилазы в цитоплазме всех без исключения хромаффиноцитов указывает на их терминальную дифференцировку и значительную функциональную активность как в периоде роста мозгового вещества, так и после его завершения [15]. Эти данные означают, что выявленные и POU5F1-, и ядерный β -катенин-, и Shh-позитивные клетки являются высокодифференцированными хромаффинными клетками указывают, и указывают на отсутствие в мозговом веществе недифференцированных предшественников и низкодифференцированных клеток. Активация экспрессии POU5F1 и Shh, и их проникновение в ядра клеток указывают на возможность дедифференцировки хромаффиноцитов [16]. Аналогичные явления были выявлены и корковом веществе надпочечников взрослого организма [17, 18]. Эти данные также корреспондируют с результатами исследований других авторов, показавших возможность получения из мозгового вещества надпочечников взрослого организма клеток, способных к трансформации в дофаминергические нейроны [19]. Отсутствие экспрессии в хромаффинных клетках транскрипционного фактора Sox2 либо не является необходимым условием для поддержания регенераторного потенциала мозгового вещества надпочечников, либо его экспрессия кратковременна, поскольку имеются данные, что Sox2 необходим для индукции, а не поддержания плюрипотентного состояния [20]. В то же время, численность POU5F1- и Shh-позитивных клеток и клеток с активацией канонического Wnt-сигналинга была одинаковой, что указывает на возможное равноправное участие в процессах физиологической регенерации хромаффинных клеток.

Заключение

Таким образом, увеличение экспрессии и связывания с ДНК транскрипционного фактора POU5F1 и лиганда Shh, а также активация канонического Wnt-сигналинга в высокодифференцированных хромаффинных клетках, происходящие после завершения роста надпочечников что можно рассматривать как механизм физиологической регенерации хромаффинной ткани путем создания пула из числа дифференцированных клеток для дальнейшей дедифференцировки. Эти данные создают новое направление для исследований в нейробиологии и регенерации нервной ткани.

Работа выполнена по государственному заданию рег. номер № FGFZ-2022–0035.

Литература

1. Яглов В.В., Яглова Н.В. Основы частной гистологии. М.: КолосС, 2011, 431 с.
2. Eiden L.E., Jiang S.Z. What's New in Endocrinology: The Chromaffin Cell. *Front. Endocrinol.* 2018. V. 9. 711.
3. Bornstein S.R., Ehrhart-Bornstein M., Androutsellis-Theotokis A., Eisenhofer G., Vukicevic V., Licinio J., Wong M.L., Calissano P., Nisticò G., Preziosi P., Levi-Montalcini R. Chromaffin cells: the peripheral brain. *Mol Psychiatry.* 2012. V. 17. № 4. P. 354–358.
4. Pignatelli D., Xiao F., Gouvtia A., Ferreira J., Vinson G. Adrenarcho in the rat // *Journal of Endocrinology.* 2006. V. 191. N. 1. P. 301–308.
5. Яглова Н.В., Цомартова Д.А., Обернихин С.С., Назимова С.В. Роль канонического Wnt-сигналинга в морфогенезе и регенерации коркового вещества надпочечников крыс, подвергавшихся воздействию эндокринного дисраптора дихлордифенилтрихлорэтана в пренатальном и постнатальном периодах онтогенеза. *Известия Российской академии наук. Серия биологическая.* 2019. № 1. С. 81–89.
6. Mulligan K.A., Cheyette B.N. Wnt signaling in vertebrate neural development and function. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 2012. V. 7. N. 4. P. 774–787.
7. Wilson N.H., Stoeckli E.T. Sonic hedgehog regulates Wnt activity during neural circuit formation. *Vitamins and Hormones.* 2012. V. 88. P. 173–209.
8. Ho K.S., Scott M.P. Sonic hedgehog in the nervous system: functions, modifications and mechanisms. *Current Opinion in Neurobiology.* 2002. V. 12. N. 1. P. 57–63.
9. Ji H., Miao J., Zhang X., Du Y., Liu H., Li S., Li L. Inhibition of sonic hedgehog signaling aggravates brain damage associated with the down-regulation of Gli 1, Ptch 1 and SOD1 expression in acute ischemic stroke. *Neuroscience Letters.* 2012. V. 506. N. 1. P. 1–6.
10. Finco I., Lerario A.M., Hammer G.D. Sonic hedgehog and WNT signaling promote adrenal gland regeneration in male mice. *Endocrinology.* 2018. Vol. 159. P. 579–596.
11. Wu G., Schöler H.R. Role of Oct4 in the early embryo development. *Cell Regen.* 2014. V. 3. N. 1. 7.
12. Schaefer T., Lengerke C. Sox2 protein biochemistry in stemness, reprogramming, and cancer: the PI3K/AKT/SOX2 axis and beyond. *Oncogene.* 2020. V. 39. N. 2. P. 278–292.
13. Wu G., Han D., Gong Y., Sebastiano V., Gentile L., Singhal N., Adachi K., Fishedick G., Ortmeier C., Sinn M., Radstaak M., Tomilin A., Schöler H.R. Establishment of totipotency does not depend on Oct4A. *Nat. Cell Biol.* 2013. V. 15. N. 9. P. 1089–1097.
14. Masui S., Nakatake Y., Toyooka Y., Shimosato D., Yagi R., Takahashi K., Okochi H., Okuda A., Matoba R., Sharov A.A., Ko M.S., Niwa H. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol.* 2007. V. 9. N. 6. P. 625–635.
15. Weihe E., Depboylu C., Schütz B., Schäfer M.K., Eiden L.E. Three types of tyrosine hydroxylase-positive CNS neurons distinguished by dopa decarboxylase and VMAT2 co-expression. *Cell. Mol. Neurobiol.* 2006. V. 26. N. 4–6. P. 659–678.
16. Yang H., Liu C., Fan H., Chen B., Huang D., Zhang L., Zhang Q., An J., Zhao J., Wang Y., Hao D. Sonic Hedgehog Effectively Improves Oct4-Mediated Reprogramming of Astrocytes into Neural Stem Cells. *Mol Ther.* 2019. V. 27. N. 8. P. 1467–1482.
17. Яглова Н.В., Обернихин С.С., Назимова С.В., Яглов В.В. Роль транскрипционного фактора Oct4 в постнатальном развитии и функционировании коркового вещества надпочечников. *Клеточные технологии в биологии и медицине.* 2019. № 2. С. 114–120.
18. Яглова Н.В., Обернихин С.С., Яглов В.В., Назимова С.В., Тимохина Е.П., Цомартова Д.А. Воздействие низких доз эндокринного дисраптора дихлордифенилтрихлорэтана (ДДТ) нарушает транскрипционную регуляцию развития сетчатой зоны надпочечников у самцов. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2020. Т. 170. № 11. С. 651–655.
19. Vukicevic V., Schmid J., Hermann A., Lange S., Qin N., Gebauer L., Chunk K.F., Ravens U., Eisenhofer G., Storch A., Ader M., Bornstein S.R., Ehrhart-Bornstein M. Differentiation of chromaffin progenitor cells to dopaminergic neurons. *Cell Transplant.* 2012. V. 21. N. 11. P. 2471–2486.
20. Lo J.H., Edwards M., Langerman J., Sridharan R., Plath K., Smale S.T. Oct4: Sox2 binding is essential for establishing but not maintaining active and silent states of dynamically regulated genes in pluripotent cells. *Genes Dev.* 2022. V. 36. N. 19–20. P. 1079–1095.