

УДК 577.35.085

## ПАРАМЕТРЫ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА И АКТИВНОСТЬ ОРНИТИНДЕКАРБОКСИЛАЗЫ В КРАСНОМ КОСТНОМ МОЗГЕ ГИБЕРНИРУЮЩИХ СУСЛИКОВ *Urocitellus undulatus*

© 2023 г. Г.Е. Аксёнова\*, О.С. Логвинович\*\*, В.Н. Афанасьев\*, К.И. Лизоркина\*

\*Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН, ул. Институтская, 3 Пушкино Московской области, 142290,

E-mail: AksyonovaGE@rambler.ru

\*\*Гомельский государственный медицинский университет, ул. Ланге, 5, Гомель, 246000, Республика Беларусь

Поступила в редакцию 15.03.2023 г.

После доработки 18.07.2023 г.

Принята к публикации 19.07.2023 г.

В сезон гибернации у межбаутных активных сусликов *Urocitellus undulatus* параметры клеточного цикла клеток красного костного мозга не отличаются от летних значений. У животных в состоянии оцепенения по сравнению с состоянием межбаутной активности суммарная доля покоящихся (G0) и находящихся в пресинтетической (G1) фазе клеток увеличена с 71.8 до 76.0%, доля клеток в синтетической (S) фазе снижена с 19.3 до 15.3%. Суммарная доля клеток в постсинтетической (G2) фазе и в митозе (M) не меняется, но растёт соотношение (G2+M)/S. При входе в состояние оцепенения изменения параметров наблюдаются при снижении температуры тела ниже 25°C, их зависимость от температуры немонотонна. Активность ключевого фермента синтеза полиаминов орнитиндекарбоксилазы, маркера активации и пролиферации клеток, у межбаутных активных и летних животных достоверно не отличается, во время входа в состояние оцепенения при температуре тела ниже 25°C резко снижается, и остаётся на низком уровне в течение баута спячки и при пробуждении до достижения температуры тела 30°C. Обсуждается роль изменений параметров, связанных с пролиферативной активностью, в адаптации кроветворной ткани при гибернации якутского суслика.

*Ключевые слова:* гибернация, костный мозг, клеточный цикл, пролиферация, орнитиндекарбоксилаза.

DOI: 10.31857/S0006302923050174, EDN: PGWGKV

Зимоспящие млекопитающие являются уникальным объектом для изучения адаптивных возможностей организма, в частности, адаптации активно пролиферирующих тканей, к которым относится гемопоэтическая ткань красного костного мозга. Зимняя спячка сусликов состоит из циклов (баутов) оцепенения, или торпора, или собственно спячки, прерываемых кратковременными пробуждениями. Продолжительность баута спячки составляет от нескольких дней до трех недель, температура тела (Т<sub>т</sub>) достигает значений, близких к нулю, частота сердечных сокращений – нескольких ударов в минуту, уровень метаболизма снижен на 96–98% [1, 2]. При пробуждении животные за короткий период (2–3 ч) возвращаются к нормотермии, восстанавливая измененный во время баута спячки уровень физиологических и обменных процессов [1–3]. Период меж-

баутной активности обычно длится от нескольких часов до суток, реже, у крупных видов сусликов (к которым относится якутский суслик *U. undulatus*) – до двух суток [1–4]. Вход в состояние оцепенения происходит медленнее, чем пробуждение, и занимает у мелких видов сусликов 12–18 ч [1, 2], у крупных – до 24 ч [5].

Пролиферация клеток – энергоёмкий процесс, который сильно зависит от температуры и уровня метаболизма. В состоянии торпора показано резкое снижение митотического индекса в быстро обновляющихся тканях – слизистой оболочке органов желудочно-кишечного тракта [6, 7], костном мозге [8], селезенке [9]; при пробуждении митотическая активность восстанавливается. В периоды межбаутной активности также возобновляется рост зубов [10], восстанавливается нормальный клеточный состав крови (в состоянии оцепенения у большинства видов наблюдается лейко- и тромбоцитопения) [11, 12]. В сезон гибернации у сусликов с января начинает восста-

Сокращения: Т<sub>т</sub> – температура тела; ОДК – орнитиндекарбоксилаза.

навливаться подвергшаяся инволюции лимфоидная ткань селезенки [13] и кишечника [14]. Сохранение морфофункциональной целостности быстро обновляющихся тканей в период сезонной гетеротермии свидетельствует о надежных механизмах, обеспечивающих как их защиту от повреждений при изменении в широких пределах температуры, уровня метаболизма, циркуляции крови, так и возобновление пролиферации в короткие периоды межбютной нормотермии. Для многих клеточных культур млекопитающих глубокая (ниже 10°C), а для некоторых линий и умеренная (25°C) гипотермия вызывает повреждение клеточных структур и апоптоз после возвращения к оптимальным условиям культивирования [15–19]. Важным адаптивным механизмом клеток является задержка клеточного (митотического) цикла при неблагоприятных условиях [20, 21]. Снижение температуры культивирования вызывает накопление клеток преимущественно в G<sub>1</sub>-, реже – в G<sub>2</sub>-фазе [15, 16, 22–24]. У гибернирующих сусликов в состоянии оцепенения показано накопление клеток крипт эпителия кишечника в G<sub>2</sub>-фазе [7]. У крыс, перенесших искусственный гипобиоз, наблюдалось накопление тимоцитов в G<sub>1</sub>-фазе клеточного цикла [25].

Пролиферация клеток и тканей требует синтеза полиаминов. Полиамины путресцин, спермидин и спермин являются алифатическими поликатионами, присутствующими в клетках эукариот и прокариот [26], которые связаны с нормальным и неопластическим ростом тканей [26, 27]. В клетках млекопитающих ключевым скоростью-лимитирующим ферментом биосинтеза полиаминов является орнитиндекарбоксилаза (ОДК, КФ 4.1.1.17), продуцирующая путресцин. Стимуляция клеточной пролиферации сопровождается резким повышением активности ОДК, что приводит к увеличению внутриклеточных концентраций полиаминов [26–28]. Ингибирование синтеза полиаминов приводит к торможению пролиферации [29–31] с накоплением клеток преимущественно в фазе G<sub>1</sub> [30, 31]. У крыс в условиях искусственного гипобиоза было показано резкое падение активности ОДК в органах системы крови – костном мозге [32], тимусе и селезенке [25]. В настоящей работе мы использовали параметры распределения клеток по стадиям митотического цикла (G<sub>0</sub>+G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>+M, (G<sub>2</sub>+M)/S) и активность ОДК красного костного мозга для изучения процессов адаптации в кроветворной ткани в ходе баутов спячки при гибернации якутского суслика.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали меченый L-[1-<sup>14</sup>C] орнитин фирмы Amersham International (США),

дифтотреитол, L-орнитин, трис фирмы Sigma (США), пиридоксаль-5'-фосфат от Ferak (Германия), Na<sub>2</sub>-ЭДТА фирмы Acros (США), остальные реактивы отечественного производства квалификации не ниже «х.ч.».

В экспериментах использовали длиннохвостых сусликов *Uroditellus undulatus* (прежнее название *Spermophilus undulatus*) обоих полов массой 500–800 г, средняя масса 590 ± 15 г, отловленных летом в окрестностях г. Якутска и содержавшихся в стандартных условиях вивария ИБК РАН (температура воздуха 20–21°C, влажность 65%) в индивидуальных клетках при естественном освещении. Гнездовой материал и пищу давали *ad libitum*. Перед сезоном спячки сусликов переносили в темное помещение с температурой 1–3°C и размещали в деревянных боксах размером 20 × 20 × 25 см с гнездовым материалом. Для регистрации состояния животных в подстилку гнезд были вмонтированы термодатчики. Температура «подстилки» у гибернирующих животных была порядка 2–4°C и при выходе из спячки поднималась до 12–16°C.

Опыты на сусликах *U. undulatus* проводили в летний период со второй декады июня до первой декады июля включительно (летние суслики) и в сезон гибернации (конец декабря – начало марта). Суслики были разделены на пять групп: группа 1 – летние (*n* = 18); группа 2 – межбютные активные животные (*n* = 11), которых умерщвляли через 3–24 ч после пробуждения, с *T<sub>T</sub>* 37°C; группа 3 – входящие в состояние оцепенения суслики (*n* = 28), которых умерщвляли при входе в спячку; группа 4 – спящие животные (*n* = 18), которых декапитировали на третьи-десятые (в среднем пятые) сутки спячки, при *T<sub>T</sub>* 1–7°C; группа 5 – пробуждающиеся от спячки животные при *T<sub>T</sub>* 6–31°C (*n* = 15), которых декапитировали до завершения их выхода в активное состояние.

Различия в средней массе у различных групп животных не превышали 3.5% и не были достоверны.

Сусликов декапитировали с помощью гильотины, немедленно вскрывали и измеряли температуру в области сердца датчиком электротермометра ТЭМП-60 с точностью до 0.2°C. Красный костный мозг из передних конечностей (плечевая кость) извлекали на леду. Распределение клеток по фазам митотического цикла определяли методом проточной цитофлуориметрии. Клеточную суспензию готовили в среде Хенкса без ионов кальция. Фиксацию проводили добавлением холодного 96% этанола при встряхивании (1 : 1 по объему) и выдерживали при –20°C не менее суток. Окрашивали ДНК-специфичным флуоресцентным красителем Hoechst-33258 (1 мкг/мл в 0.1 М трис–HCl-буфере, pH 7.4, содержащем 0.1 М NaCl) в течение 30 мин при 37°C. Анализ

проводили на приборе ЛАКС-1, разработанном в ИБК РАН [33].

Подсчет ядерных клеток костного мозга проводили в камере Горяева. Навеску ткани суспендировали в 400–500 объемах 4%-й уксусной кислоты.

Для определения активности ОДК замороженную в жидком азоте ткань костного мозга помещали в стеклянный гомогенизатор с фторопластовым пестиком с добавлением 10–15 объемов буфера (0.1 М трис–НСI (рН 7.5), 5 мМ дитиотреитола, 0.5 мМ ЭДТА и 40 мкМ предварительно нейтрализованного пиридоксаль-5'-фосфата), и гомогенизировали в течение 0.5 мин при 2°C. Гомогенат центрифугировали при 20000 g в течение 30 мин при 2°C и в супернатанте определяли активность ОДК (при 37°C) радиоизотопным методом по освобождению  $^{14}\text{CO}_2$  из меченого L-[1- $^{14}\text{C}$ ]орнитина [34] с некоторыми модификациями [35]. Белок в супернатанте (экстрагируемый белок) определяли методом Лоури.

Результаты представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка, достоверность различий оценивали по *t*-критерию Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Для оценки изменений пролиферативной активности гемопоэтической ткани гибернирующих сусликов *U. undulatus* было исследовано распределение ядерных клеток красного костного мозга (миелокариоцитов) по фазам клеточного цикла методом проточной цитофлуориметрии. Показатели клеточного цикла у летних и межбавутных активных сусликов были примерно одинаковы (рис. 1, группы 1 и 2). В сезон гибернации у спящих сусликов доля клеток в фазе синтеза ДНК (S-фаза) достоверно снижена по отношению к межбавутным активным животным (с 19.3% до 15.3% соответственно), в то же время увеличена доля суммарной популяции покоящихся клеток (фаза  $G_0$ ) и клеток в пресинтетической фазе  $G_1$  ( $G_0+G_1$ ) с 71.8% до 76.0%. Доля клеток в постсинтетической и митотической фазах ( $G_2+M$ ) у летних, зимних активных и спящих сусликов была примерно одинакова. Отношение количества клеток в ( $G_2+M$ )- и S-фазах у индивидуальных животных ( $G_2+M$ )/S в состоянии оцепенения достоверно увеличивается по отношению к межбавутным активным и летним животным (рис. 1, группы 1, 2 и 4).

Для выявления динамики изменения рассматриваемых нами параметров в переходные периоды циклов оцепенения – межбавутной активности мы разделили данные, полученные в группе входящих в спячку сусликов (группа 3) на четыре

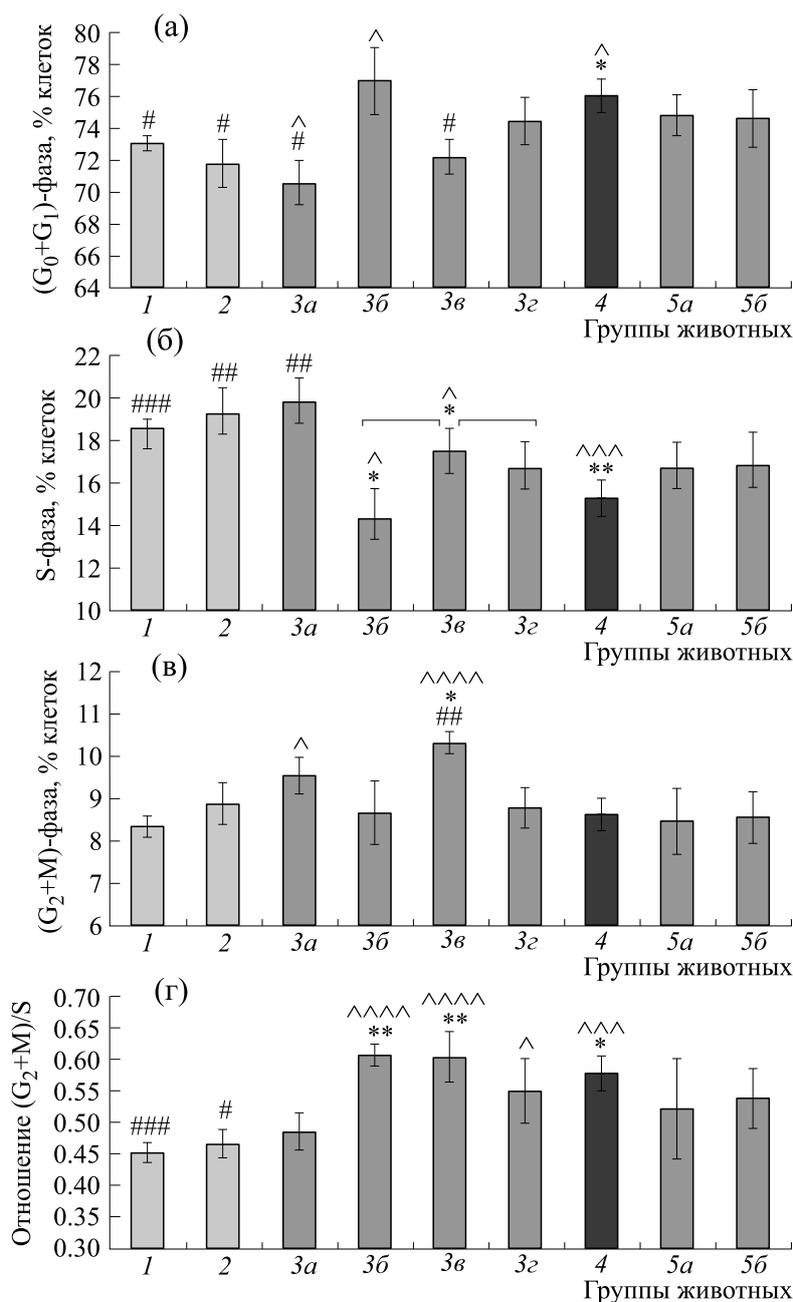
подгруппы: 3a –  $T_T$  в области сердца от 35 до 25°C включительно, 3б –  $T_T$  от 25 до 20°C включительно, 3в –  $T_T$  от 20 до 14°C включительно, 3г –  $T_T$  ниже 14°C. Данные, полученные в группе выходящих из спячки сусликов (группа 5), разделили на две подгруппы: 5a –  $T_T$  до 20°C включительно, 5б –  $T_T$  от 20°C до 31°C.

У входящих в спячку животных с температурой тела не ниже 25°C (подгруппа 3a), распределение клеток костного мозга по фазам клеточного цикла не отличалось от межбавутных активных, для ( $G_0+G_1$ )- и S-фаз сохранялось достоверное различие с группой спящих животных (рис. 1). В интервале температур от 25 до 20°C (подгруппа 3б) наблюдалось снижение доли клеток в S-фаза, увеличение до уровня спящих сусликов – в ( $G_0+G_1$ )-фаза. Отношение ( $G_2+M$ )/S также выросло до уровня спящих животных. При дальнейшем снижении температуры тела, в интервале температур от 20 до 14°C (подгруппа 3в), доля клеток в ( $G_0+G_1$ )-фаза снова становилась достоверно ниже, чем у спящих животных, при этом росла суммарная доля клеток в постсинтетической и митотической фазах ( $G_2+M$ ). Однако отношение ( $G_2+M$ )/S в подгруппах 3б и 3в не менялось. У выходящих из спячки сусликов параметры клеточного цикла не отличались достоверно от остальных групп.

Количество ядерных клеток красного костного мозга у спящих животных снижено по сравнению с летними, у межбавутных активных не отличалось достоверно от спящих и летних (рис. 2).

В сезон гибернации активность орнитиндекарбоксилазы в ткани костного мозга спящих сусликов *U. undulatus* резко, на 87%, снижена по сравнению с межбавутными активными животными. Различия в средних значениях фермента между группами нормотермных животных – летними и межбавутными активными – не были достоверны (рис. 3). При входе сусликов в состояние оцепенения, при температуре тела от 25°C и выше (подгруппа 3a), активность ОДК (в расчете на грамм ткани) не отличается от межбавутных активных животных, в подгруппах 3б-г, когда температура тела ( $T_T$ ) опускается ниже 25°C, активность ОДК достоверно не отличается от уровня спящих животных. У выходящих из спячки сусликов активность фермента остается на уровне спящих (рис. 3).

Выход экстрагируемого белка костного мозга у летних, межбавутных активных и спящих животных не отличался и составлял  $75.0 \pm 2.7$ ,  $70.9 \pm 9.9$  и  $75.8 \pm 5.3$  мг/г ткани соответственно.

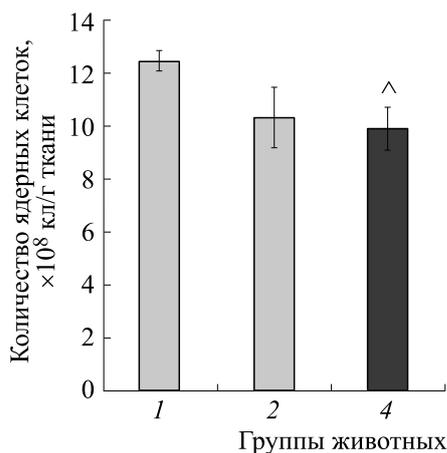


**Рис. 1.** Распределение клеток красного костного мозга сусликов *U. undulatus* по фазам клеточного цикла в летний период и в сезон гибернации. По оси X – обозначения групп животных (в скобках указано количество животных в группе): группа 1 – летние ( $n = 18$ ); группа 2 – межбугорные активные ( $n = 11$ ); 3 – входящие в состояние оцепенения (спячку): группа 3a –  $T_T$  от  $35^\circ\text{C}$  до  $25^\circ\text{C}$ , средняя  $T_T$   $29.7 \pm 2.0^\circ\text{C}$  ( $n = 6$ ); группа 3б –  $T_T$  от  $25^\circ\text{C}$  включительно до  $20^\circ\text{C}$ , средняя  $T_T$   $22.1 \pm 0.6^\circ\text{C}$  ( $n = 5$ ); группа 3в –  $T_T$  от  $20^\circ\text{C}$  включительно до  $14^\circ\text{C}$ , средняя  $T_T$   $16.2 \pm 0.7^\circ\text{C}$  ( $n = 8$ ); группа 3г –  $T_T$  от  $14^\circ\text{C}$  включительно и ниже, средняя  $T_T$   $10.1 \pm 0.9^\circ\text{C}$  ( $n = 9$ ); группа 4 – спящие, средняя  $T_T$   $4.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$  ( $n = 18$ ); группа 5 – пробуждающиеся (выходящие из спячки): группа 5a –  $T_T$  до  $20^\circ\text{C}$  включительно, средняя  $T_T$   $12.7 \pm 2.3^\circ\text{C}$  ( $n = 5$ ); группа 5б –  $T_T$  от  $20^\circ\text{C}$  до  $31^\circ\text{C}$ , средняя  $T_T$   $28.6 \pm 1.1^\circ\text{C}$  ( $n = 10$ ). ^ – Различия достоверны по отношению к летним (группа 1) сусликам,  $p < 0.05$ ; ^^^ –  $p < 0.005$ ; ^^^^ –  $p < 0.001$ . \* – Различия достоверны по отношению к межбугорным активным (группа 2) сусликам,  $p < 0.05$ ; \*\* –  $p < 0.01$ . # – Различия достоверны по отношению к спящим (группа 4) сусликам,  $p < 0.05$ ; ## –  $p < 0.01$ ; ### –  $p < 0.005$ .

**ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Красный костный мозг представляет собой активно пролиферирующую ткань. Это центральный орган кроветворения, в котором из ство-

ловых кроветворных клеток развиваются эритроциты, нейтрофильные, эозинофильные и базофильные гранулоциты, моноциты, В-лимфоциты, предшественники Т-лимфоцитов и тром-



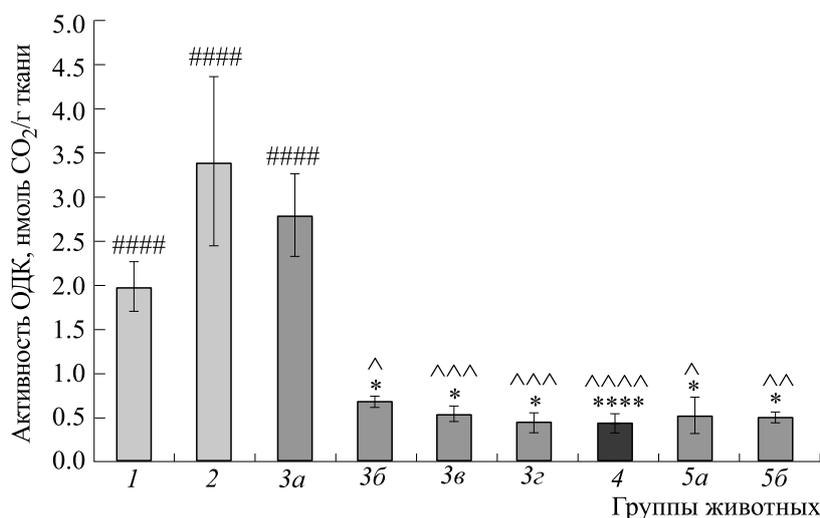
**Рис. 2.** Содержание ядерных клеток в красном костном мозге сусликов *U. undulatus* в летний период и в сезон гибернации. По оси X – обозначения групп животных: группа 1 – летние ( $n = 7$ ), группа 2 – межбаутные активные ( $n = 12$ ), группа 4 – спящие ( $n = 14$ ). ^ – Различия достоверны по отношению к летним (группа 1) сусликам,  $p < 0.05$ .

боциты. Несмотря на гетерогенность популяции клеток красного костного мозга, у человека и лабораторных животных показатели клеточного цикла в норме характеризуются высокой стабильностью и свидетельствуют о скорости пролиферации [34, 35]. Данные параметры у нормотермных сусликов *U. undulatus* в летний период и в сезон гибернации не отличаются по средним значени-

ям (рис. 1), и мы можем предположить, что у межбаутных активных сусликов восстанавливается скорость пролиферации, характерная для летних активных животных. В пользу этого предположения свидетельствует также восстановление активности ОДК до летнего контроля в период межбаутной активности (рис. 3), а также описанное ранее восстановление митотического индекса в красном костном мозге [8].

Параметры клеточного цикла клеток костного мозга сусликов также достаточно стабильны в ходе баутов гибернации, для них характерна небольшая амплитуда колебаний между физиологическими состояниями активности и торпора (рис. 1). Во время торпора наблюдается накопление клеток в ( $G_0+G_1$ )-фазе за счет их снижения в S-фазе.

В состоянии торпора в условиях глубокой гипотермии продвижение по клеточному циклу остановлено или резко замедлено, и сохраняется распределение, которое отражает адаптивные процессы, происходившие на этапе вхождения в спячку при более высоких температурах. Кроме фактора температуры, имеет место активная негативная регуляция клеточного цикла, что представляет собой адаптивную реакцию клеточной системы. К увеличению доли ( $G_0+G_1$ )-фаз может приводить как задержка вступления пролиферирующих клеток в синтетическую фазу (увеличение  $G_1$ ), так и увеличение доли зрелых покоящихся ядерных клеток ( $G_0$ ) в костном мозге. Это мо-



**Рис. 3.** Активность орнитиндекарбоксилазы красного костного мозга сусликов *U. undulatus* в летний период и в сезон гибернации. Обозначения, как на рис. 1, далее указаны отличающиеся параметры: группа 1 – ( $n = 12$ ); группа 2 – ( $n = 7$ ); группа 3a – средняя  $T_T 31.4 \pm 2.8^\circ\text{C}$  ( $n = 4$ ); группа 3б – средняя  $T_T 22.1 \pm 0.5^\circ\text{C}$  ( $n = 5$ ); группа 3в – средняя  $T_T 16.4 \pm 0.7^\circ\text{C}$  ( $n = 7$ ); группа 3г – средняя  $T_T 11.2 \pm 1.0^\circ\text{C}$  ( $n = 5$ ); группа 4 – средняя  $T_T 3.8 \pm 0.5^\circ\text{C}$  ( $n = 14$ ); группа 5a – средняя  $T_T 10.9 \pm 1.8^\circ\text{C}$  ( $n = 4$ ); группа 5б – средняя  $T_T 29.4 \pm 1.9^\circ\text{C}$  ( $n = 5$ ). ^ – Различия достоверны по отношению к летним (группа 1) сусликам,  $p < 0.05$ ; ^^ –  $p < 0.01$ ; ^^ ^ –  $p < 0.005$ ; ^^ ^ ^ –  $p < 0.001$ . \* – Различия достоверны по отношению к межбаутным активным (группа 2) сусликам,  $p < 0.05$ ; \*\*\*\* –  $p < 0.001$ . ##### – Различия достоверны по отношению к спящим (группа 4) сусликам,  $p < 0.001$ .

жет происходить, в свою очередь, за счет задержки выхода созревших клеток в кровоток и/или депонирования лейкоцитов крови. При этом следует отметить, что в состоянии торпора общее количество ядерных клеток в костном мозге не увеличивается по сравнению с межбугорными активными животными (рис. 2). По литературным данным, лейкопения у торпидных животных обусловлена депонированием лимфоцитов в периферических лимфоидных органах, но не в селезенке [38, 39], нейтрофилы прикрепляются к стенкам кровеносных сосудов в легких [40, 41]. Отношение  $(G_2+M)/S$  является характеристикой пролиферирующей клеточной популяции и не зависит от возможного изменения содержания в костном мозге зрелых или покоящихся клеток (фаза  $G_0$ ). Увеличение данного отношения в состоянии оцепенения свидетельствует о негативной регуляции клеточного цикла и позволяет говорить о некотором накоплении делящихся клеток у спящих сусликов также и в фазе  $G_2$  (рис. 1), несмотря на отсутствие разницы в доле клеток в фазе  $(G_2+M)$  для общей популяции.

Неблагоприятные условия приводят к задержке клеточного цикла в так называемых контрольных точках (checkpoints) — переходах  $G_1/S$  и  $G_2/M$  [20]. Для клеточных культур млекопитающих, растущих при субфизиологических температурах, характерно накопление клеток преимущественно в фазе  $G_1$ , так как переход  $G_1/S$  наиболее чувствителен к гипотермии и его задержка происходит в интервале температур 33–25°C, который разные авторы определяют как мягкую либо умеренную гипотермию [15, 16, 18, 22]. К задержке клеточного цикла приводит индукция белков p53 и p21. Стабилизация и активация транскрипционного фактора p53 при генотоксическом и негенотоксическом клеточном стрессе приводит, в частности, к экспрессии белков-ингибиторов циклинзависимых киназ семейства p21 (p21, p27 и p57) и задержке клеточного цикла в контрольной точке  $G_1/S$  [21], и в ряде случаев, особенно при генотоксическом стрессе, — к апоптозу. Холодовой стресс приводит к увеличению содержания p53 и p21 (p27) [23, 42] в клеточных культурах и задержке клеточного цикла, однако апоптоз при мягкой/умеренной гипотермии в большинстве случаев ингибируется [15, 24, 43]. Дефицит p53 может предотвращать накопление клеток в  $G_1$ -фазе при гипотермии [23]. В костном мозге тринадцатиполосных сусликов в сезон гibernации в семь раз увеличено количество транскриптов гена-ингибитора циклинзависимой киназы 1A CDKN1A (p21, Cip1); в состоянии оцепенения также была снижена экспрессия генов трех убиквитинлигаз (TOPORS, UBE2L6, RFWD3), которые используют p53 в качестве субстрата, что

может приводить к стабилизации этого цитостатического транскрипционного фактора [12].

При мягкой/умеренной (до 25°C) гипотермии также происходит индукция РНК-связывающих белков, называемых белками холодового шока — CIRBP (CIRP) (cold-inducible RNA binding protein) и RBP3 (RNA binding motif protein 3) [15, 16]. CIRBP может выступать негативным регулятором клеточного цикла [16, 44]. При мягкой гипотермии (32°C) в мышечных фибробластах индуцировалась экспрессия CIRBP и замедлялся рост клеток. Задержка роста клеток при гипотермии частично отменялась при подавлении индукции CIRBP антисмысловыми олигонуклеотидами. Сверхэкспрессия CIRBP вызывала замедление роста при физиологической температуре с накоплением клеток в  $G_1$ -фазе. При температуре 25°C индукция CIRBP снижалась, а при 15°C — не наблюдалась [16, 44]. Эти данные также подтверждают, что наиболее активно адаптивные процессы в клеточных популяциях развиваются при температурах не ниже 25°C. Количество транскриптов гена CIRBP в костном мозге тринадцатиполосных сусликов в сезон гibernации было увеличено по сравнению с летним контролем в 1.4 и 2.3 раза у межбугорных активных (37°C) и спящих (менее 10°C) животных соответственно [12]. Однако отсутствуют данные об экспрессии этого белка в переходные периоды при оптимальной для этого температуре тела около 30°C.

Как мы видим, в костном мозге в интервале температур 25–20°C параметры клеточного цикла ( $G_0+G_1$ )-, S-, ( $G_2+M$ )-фазы, отношение  $(G_2+M)/S$ , уже соответствуют физиологическому состоянию оцепенения (рис. 1). Учитывая инерционность клеточного цикла, это свидетельствует о развитии адаптивных процессов торможения (негативной регуляции) клеточного цикла заранее, в интервале мягкой/умеренной гипотермии и, возможно, до начала падения температуры тела.

Изменения в подгруппе 3в (20–15°C) — вторичное падение доли клеток в  $G_1$  фазе (достоверное, в том числе, по отношению к подгруппе 3б), рост в ( $G_2+M$ ) фазах, тенденция к увеличению S-фазы — могут быть связаны как с продвижением по клеточному циклу с задержкой в контрольной точке  $G_2/M$ , так и с возможным временным снижением содержания в костном мозге зрелых клеток (фаза  $G_0$ ) в этот период. Ранее при входе в спячку в этом же интервале температур мы наблюдали временное снижение содержания ядерных клеток в селезенке сусликов [45].

ОДК — быстро обменивающийся, короткоживущий и динамично регулируемый фермент с периодом полужизни ( $t_{1/2}$ ) в нормальных тканях 10–30 мин [27]. Регуляция ОДК осуществляется

на уровне транскрипции, стабилизации мРНК, трансляции, деградации фермента, индукции специфических белков – негативных регуляторов семейства антизимов (AZ), ингибитора антизима (AZI) – и зависит от типа клеток, тканей, характера воздействия [28, 46, 47]. Регуляция экспрессии ОДК и других ферментов метаболизма полиаминов в значительной степени осуществляется на посттранскрипционном уровне [46]. Исследование транскриптома костного мозга тринадцатиполосного суслика [12] не выявило различий в количестве мРНК орнитиндекарбоксилазы (транскрипт гена ODC1) у торпидных и межбаутовых активных животных. Также не было различий в количестве мРНК основного белка – негативного регулятора орнитиндекарбоксилазы антизима 1 и минорного антизима 2 (транскрипты генов OAZ1 и OAZ2 соответственно) ([12], Suppl. fig. 1). Каталитически активным является гомодимер продуктов гена ODC1. Связываясь с мономерами ОДК, антизим разрушает активный реакционный центр фермента и способствует их быстрой деградации 26S протеосомой по убиквитин-независимому пути [46]. Мы можем полагать, что регуляция активности ОДК (включая регуляцию экспрессии антизимов) в костном мозге сусликов *U. undulatus* в ходе баутов спячки также осуществляется на посттранскрипционном уровне.

Адаптация на клеточном уровне включена в адаптивные реакции на уровне систем органов и целого организма. Ранее мы показали, что при входе в спячку активность ОДК селезенки сусликов и параметры, связанные с накоплением в селезенке эритроцитов (масса, содержание общего белка, гемоглобина), принимают значения, характерные для торпора, в это же время, когда  $T_T$  падает ниже границы мягкой/умеренной гипотермии до 25–20°C [45]. Таким образом, у входящих в спячку сусликов в органах системы крови – костном мозге и селезенке – параметры, относящиеся к биохимическим (активность ОДК), физиологическим (депонирование эритроцитов в селезенке) и клеточным (параметры клеточного цикла) процессам, имеющим разную скорость регуляции, скоординировано приводятся к значениям, характерным для торпора, в один и тот же период. Регулирующие торпор сигналы для этих процессов, по-видимому, индуцируются в разное время заранее, и поэтому, в том числе, развитие торпора не является стремительным, однако обеспечивается оптимальная защита органов, тканей и клеток при прохождении баутов спячки.

Разница в динамике регуляции активности ОДК и клеточного цикла отчетливо проявляется в модели искусственного гипобиоза. У крыс при охлаждении в условиях гипоксии/гиперкапнии быстро развивается гипобиоз, и различные по

скорости адаптивные процессы индуцируются в течение короткого времени. Крысы помещались в закрытый сосуд на три-три с половиной часа при температуре 1–2°C, причем их вход в состояние гипобиоза (с  $T_T$  15–18°C) происходил за еще более короткое время, по мере нарастания гипоксии и гиперкапнии. За это время активность ОДК падала до 20% от контроля в тимусе, до 24% в селезенке [25] и до 6% – в костном мозге [32], при отсутствии сдвигов в распределении тимоцитов и миелокариоцитов по фазам клеточного цикла [25, 32]. После возвращения к стандартным условиям животные выходят из состояния гипобиоза за два-три часа, однако наблюдаются эффекты последствия на клеточном и биохимическом уровне вследствие запущенных ранее процессов. Через 24 и 48 ч после окончания охлаждения у крыс наблюдалось накопление тимоцитов в фазе  $G_1$  со снижением доли S-фазы, и только через 72 ч происходило возвращение к контрольным значениям [25]. Клетки костного мозга крыс демонстрировали устойчивость к последствию гипобиоза, через 24 ч после окончания охлаждения параметры клеточного цикла не отличались от контроля [32]. Активность ОДК в тимусе и костном мозге полностью восстанавливалась через 48 часов [25, 32].

Поскольку в данном исследовании клетки костного мозга сусликов были выделены из плечевых костей передних конечностей, а у крыс из бедренных костей, в планируемых далее экспериментах любопытным представляется сравнение параметров клеточного цикла костного мозга, выделенного также и из бедренных костей сусликов. Интерес в проведении таких исследований связан не только с тем, что бедренные кости являются одним из мест наибольшего сосредоточения красного костного мозга, но и главным образом с тем, что из-за особенностей кровотока разность температур между передней и задней половиной тела в максимальной точке разогрева у гибернантов достигает 14–15°C; при отогреве охлажденных крыс разности температур не наблюдается [48–50].

Механизмы задержки клеточного цикла при гипотермии и дефиците полиаминов сходны [23, 30, 31, 42], однако действие ингибиторов синтеза полиаминов приводит к изменениям параметров клеточного цикла более чем через сутки [31]. При гипобиозе крыс истощение полиаминов может вносить вклад в задержку клеточного цикла тимоцитов, так как снижение и восстановление доли клеток в S-фазе на сутки отстает от соответствующих изменений активности ОДК [25]. У сусликов падение активности ОДК в костном мозге не следует рассматривать причиной задержки вступления клеток в S-фазу, так как эти эффекты наблюдаются в одном интервале времени при входе в

спячку. При рассмотрении адаптивного характера изменений активности ОДК костного мозга, то, что она не включена в негативную регуляцию клеточного цикла при входе сусликов в спячку, может объясняться необходимостью полностью использовать для синтеза полиаминов короткий период эутермии. Снижение активности ОДК может играть роль в клеточной адаптации при выходе из спячки. Активность фермента не растет до достижения животными  $T_T$  30°C (рис. 3). Низкий уровень ОДК при пробуждении животных способствует предупреждению преждевременной стимуляции пролиферации клеток в неблагоприятных условиях при быстром росте температуры и оксигенации, что может приводить к апоптозу. Культивируемые клетки, получившие повреждения в условиях гипотермии, подвергаются апоптозу после возвращения к нормотермии [15–19]. С другой стороны, было показано [51–53], что уменьшение внутриклеточного пула полиаминов при ингибировании ОДК, наряду с задержкой клеточного роста, может вызывать индукцию антиапоптотических факторов и защищать клетки от апоптоза при повреждающих воздействиях.

В целом, приведенные в работе данные укладываются в концепцию, что устойчивость и заблаговременную подготовку пролиферирующих тканей гибернантов к прохождению периодов гипотермии во многом обеспечивает координация системных адаптивных реакций на клеточном и организменном уровне.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры с животными проводили в соответствии с требованиями Институтской комиссии по этике и Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (European Communities Council Directive (86/609/ЕЕС)).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. H. V. Carey, M. T. Andrews, and S. L. Martin, *Physiol. Rev.*, **83** (4), 1153 (2003).
2. F. Geiser, *Annu. Rev. Physiol.*, **66**, 239 (2004).
3. Q. Guo, X. Mi, X. Sun et al., *Sci. Rep.*, **7** (1), 10509 (2017).
4. Ø. Tøien, K. L. Drew, M. L. Chao, and M. E. Rice, *Am. J. Physiol.*, **281** (2), R572 (2001).
5. T. R. Jinka, Ø. Tøien, and K. L. Drew, *J. Neurosci.*, **31** (30), 10752 (2011).
6. M. S. Vinogradova, *Comp. Biochem. Physiol. A*, **91** (2), 235 (1988).
7. I. I. Kruman, E. N. Ilyasova, S. A. Rudchenko, and Z. S. Khurkhulu, *Comp. Biochem. Physiol. A*, **90** (2), 233 (1988).
8. В. М. Юнкер и Г. В. Алексеева, *Эволюц. биохимия и физиология*, № 2, 193 (1974).
9. E. W. Carlier, *J. Anat. Physiol.*, **27** (Pt 3), nil9, 354 (1893).
10. Г. А. Клевезаль и А. И. Ануфриев, *Зоологич. журн.*, **92** (4), 481 (2013).
11. H. R. Bouma, A. M. Strijkstra, A. S. Boerema, et al., *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **136** (3–4), 319 (2010).
12. S. T. Cooper, S. S. Sell, M. Fahrenkrog, et al., *Physiol. Genomics* **48** (7), 513 (2016).
13. Т. М. Шивачева и А. И. Хаджиолов, *Арх. анат. гистол. эмбриол.*, **92** (5), 48 (1987).
14. Т. М. Shivatcheva and A. I. Hadjioloff, *Dev. Comp. Immunol.*, **11** (4), 791 (1987).
15. M. B. Al-Fageeh and C. M. Smales, *Biochem. J.*, **397** (2), 247 (2006).
16. J. Fujita, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, **1** (2), 243 (1999).
17. A. Roobol, M. J. Carden, R. J. Newsam, and C. M. Smales, *FEBS J.*, **276** (1), 286 (2009).
18. T. Neutelings, C. A. Lambert, B. V. Nusgens, et al., *PLoS One*, **8** (7), e69687 (2013).
19. А. К. Гулевский, Ю. С. Ахатова и И. И. Щенявский, *Probl. Cryobiol. Cryomed.*, **27** (2), 97 (2017).
20. L. Hartwell, in *Cell Cycle Control*, Ed. by C. Hutchison and D. M. Glover, (Oxford University Press, 1995), pp. 1–15.
21. C. W. Anderson, E. Appella, R. Bradshaw, and E. Dennis, in *Regulation in organelle and cell compartment signaling* (New York: Acad. Press, 2011), pp. 235–254.
22. C. L. Rieder and R. W. Cole, *Cell Cycle*, **1** (3), 169 (2002).
23. Z. Matijasevic, J. E. Snyder, and D. B. Ludlum, *Oncol. Res.*, **10**, 605 (1998).
24. A. Moore, J. Mercer, G. Dutina, et al., *Cytotechnology*, **23**, 47 (1997).
25. Г. Е. Аксенова, О. С. Логвинович, Л. А. Фиалковская и др., *Биохимия*, **75** (9), 1257 (2010).
26. H. M. Wallace, A. V. Fraser, and A. Hughes, *Biochem. J.*, **376** (1), 1 (2003).
27. Н. К. Бердинских, С. П. Залеток, *Полиамины и опухолевый рост* (Наук. Думка, Киев, 1985).
28. A. E. Pegg, *J. Biol. Chem.* **281** (21), 14529 (2006).
29. T. Thomas, T. J. Thomas, *Cell. Mol. Life Sci.*, **58** (2), 244 (2001).
30. R. M. Ray, B. J. Zimmerman, S. A. McCormack, et al., *Am. J. Physiol.*, **276** (3), C684 (1999).
31. D. L. Kramer, B.-D. Chang, Y. Chen, et al., *Cancer Res.*, **61** (21), 7754 (2001).
32. I. K. Kolomyitseva, L. N. Markevich, N. I. Perepelkina, et al., in *Hypothermia: prevention, recognition and treatment*, Ed. by J. I.V. Delgado and V. G. F. Garza (Nova Sci. Publ., N.Y., 2012), pp.1–42.

33. V. N. Afanasyev, B. A. Korol, N. P. Matylevich, et al., *Cytometry*, **14** (6), 603 (1993).
34. J. Jänne, and H. G. Williams–Ashman, *J. Biol. Chem.*, **246** (6), 1725 (1971).
35. L. V. Slozhenikina, L. A. Fialkovskaya, and I. K. Kolomiytseva, *Int. J. Radiat. Biol.*, **75** (2), 193 (1999).
36. Г. И. Козинец, В. М. Погорелов, В.М. Котельников и др., *Лаб. дело*, № 7, 3 (1988).
37. Д. А. Шмаров, *Клин. Лаб. диагн.*, № 5, 40 (1993).
38. H. R. Bouma, F. G. M. Kroese, J. W. Kok, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108** (5), 2052 (2011).
39. C. C. Kurtz and H. V. Carey, *Dev. Comp. Immunol.*, **31** (4), 415 (2007).
40. M. Bohr, A. R. Brooks, and C. C. Kurtz, *Dev. Comp. Immunol.*, **47** (2), 178 (2014).
41. H. R. Bouma, G. J. Dugbartey, A. S. Boerema, et al., *J. Leukoc. Biol.*, **94** (3), 431 (2013).
42. T. Ohnishi, X. Wang, K. Ohnishi, and A. Takahashi, *Oncogene*, **16** (11), 1507 (1998).
43. T. Sakurai, K. Itoh, Y. Liu, et al., *Exp. Cell. Res.*, **309** (2), 264 (2005).
44. H. Nishiyama, K. Itoh, Y. Kaneko, et al., *J. Cell. Biol.*, **137** (4), 899 (1997).
45. Г. Е. Аксенова, О. С. Логвинович, Д. А. Игнатьев и И. К. Коломийцева, *Биофизика*, **63** (2), 311 (2018).
46. S. I. Hayashi and Y. Murakami, *Biochem. J.*, **306** (1), 1 (1995).
47. U. Mangold and E. Leberer, *Biochem. J.*, **385** (1), 21 (2005).
48. G. S. Travlos, *Toxicol. Pathol.*, **34** (5), 548 (2006).
49. R. W. Bullard and G. E. Funkhouser, *Am. J. Physiol.*, **203** (2), 266 (1962).
50. Н. М. Захарова, *Фундаментальные исследования*, **6**, 1401 (2014).
51. H. M. Zhang, J. N. Rao, X. Guo, et al., *J. Biol. Chem.*, **279**, 22539 (2004).
52. S. Bhattacharya, R. M. Ray, and L. R. Johnson, *Biochem J.*, **392**, 335 (2005).
53. P. Kucharewska, J. E. Welch, K. J. Svensson, and M. Belting, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **380** (2), 413 (2009).

## Cell Cycle Parameters and Ornithine Decarboxylase Activity in the Red Bone Marrow of Hibernating Ground Squirrels *Urocitellus undulatus*

G.E. Aksyonova\*, O.S. Logvinovich\*\*, V.N. Afanasyev\*, and K.I. Lizorkina\*

\**Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

\*\**Gomel State Medical University, ul. Lange 5, Gomel, 246000, Belarus*

During the hibernation season, the values for the parameters of the cell cycle of red bone marrow cells in the hibernating ground squirrels *Urocitellus undulatus*, when they return to an active-like state between periods of torpor and interbout arousal, do not differ from those observed in summer-active animals. In animals that enter a state of torpor, the cumulative percentage of cells in the resting phase (G0 phase) and pre-synthesis phase (G1 phase) increased from 71.8 to 76.0%, the percentage of cells in the synthesis phase (S phase) decreased from 19.3 to 15.3% compared to those animals that return to an active-like state between periods of torpor and interbout arousal. The cumulative percentage of cells in the post DNA synthesis phase (G2 phase) and mitosis (M) does not change, but (G2 + M)/S ratio increases. When animals enter a state of torpor, changes in parameter values are observed when the animal's body temperature drops below 25°C, this effect refers to a system whose thermal relaxation time is a nonmonotonic function of the initial temperature. The activity of the key enzyme of polyamine synthesis ornithine decarboxylase, a marker of cell activation and proliferation during interbout arousal does not significantly differ from that observed in summer-active animals; the enzymatic activity decreases sharply, when animals decrease their body temperature below 25°C and enter a state of torpor, and this activity remains at a low level during hibernation and arousal until body temperature reaches 30°C. The role of changes in the parameter values associated with proliferative activity in adaptation of hematopoietic tissue during hibernation of the Yakutian ground squirrel is discussed.

*Keywords: hibernation, bone marrow, cell cycle, proliferation, ornithine decarboxylase*