

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ  
ФГБУН ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ ИМ. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН

УДК 576.5

№ НИОКР 01201351275

№ ИС ГЗ 0108-2014-0004



УТВЕРЖДАЮ

Директор ИБР РАН

Член-корреспондент РАН

А.В. Васильев

«  » января 201 г.

ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

ТЕМА 4. МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ГИСТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ  
ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ  
(заключительный отчет)

Руководитель темы, д.б.н., г.н.с.

подпись, дата

В.В. Терских

Москва, 2017

## СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель темы, д-р биологических наук, профессор



---

подпись, дата

В.В. Терских (введение, раздел 1 заключение)

Ведущие исполнители темы:  
Кандидат биол. наук




---

подпись, дата

Е.В. Киселева (раздел 2)

Доктор биол. наук

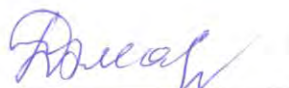


---

подпись, дата

Е.А. Воротеляк (раздел 3)

Доктор биол. наук



---

подпись, дата

Е.И. Домарацкая (раздел 4)

УДК 576.5

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Реферат	4
Обозначения и сокращения	5
Введение	5
Материалы и методы	9
Раздел 1. Дифференцировочный и морфогенетический потенциал эпителиальных стволовых клеток. Клеточные и молекулярные механизмы морфогенеза кожи и ее придатков	15
1.1. Морфогенез волосяных фолликулов в эмбриогенезе	15
1.2. Исследование Sca-1 <sup>+</sup> и Sca-1 <sup>-</sup> культур клеток поднижнечелюстной слюнной железы мыши	22
Раздел 2. Исследование молекулярных и клеточных механизмов развития патологических процессов мышечной дистрофии Ландузи-Дежерина.	26
Раздел 3. Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) из клеток амниотической жидкости человека доноров с синдромом Дауна.	32
Раздел 4. Стволовые мезенхимные клетки в индивидуальном развитии.	41
Заключение	46
Список цитируемой литературы	48
Публикации по теме	49

## Реферат.

Отчет 52 с., 34 рис. 3 табл, 4 ч., 42 источника (5 цитируемых статей, 23 статьи, 14 тезисы)

**Ключевые слова:** отчет, научно-исследовательская работа, стволовые клетки, эпителиальные стволовые клетки, эпителиальный морфогенез, плюрипотентность, клеточные культуры, мезенхимные мультипотентные стромальные клетки, метод репрограммирования клеток, регенеративная медицина, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, мышечная дистрофия Ландузи-Дежерина, клетки поднижнечелюстной железы мыши, фенотип Sca-1+, синдром Дауна, болезнь Альцгеймера.

Получены новые данные о морфогенезе в эмбриональном периоде волосяных фолликулов различных типов у мышей *we/wewal/wal*, для которых характерно облысение вскоре после рождения, в сравнении с мышами линии C57Bl6. Впервые показано, что у эмбрионов мутантных животных происходит задержка закладки фолликулов первой волны, имеются нарушения стратификации многослойного эпидермиса, при закладке остевых волос у них нарушен процесс компактизации эпителиальных клеток, что приводит к развитию аномальных плакод.

Для выявления локализации морфогенетически активных популяций эпителиальных клеток, ответственных за самоподдержание и регенерацию эпителиальной ткани, исследован морфогенетический потенциал клеток поднижнечелюстной железы мыши с фенотипом Sca-1+. В железе они располагаются в протоках с малым просветом. Предполагается, что эти просветы могут быть нишей стволовых эпителиальных клеток поднижнечелюстной слюнной железы мыши.

Исследованы (на цитогенетическом и биохимическом уровнях) возможности использования мезенхимных клеток для получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК). Проведен поиск источника клеток, наиболее подходящих для репрограммирования, а также условий, позволяющих получить индуцированные стволовые клетки путем минимального вмешательства в геном.

Создана *in vitro* модель болезни Альцгеймера на основе ИПСК, полученных от доноров с синдромом Дауна, которые являются крупнейшей группой людей с наследственной предрасположенностью к болезни Альцгеймера. Несколько культур ИПСК с кариотипом синдрома Дауна были дифференцированы в культуры зрелых нейронов. Нейроны пациентов с синдромом Дауна в отличие от контрольных нейронов здоровых людей эффективно накапливают патологические изоформы бета-амилоида, что является одним из основных признаков начальной стадии болезни Альцгеймера. То, что данный эффект наблюдается в *in vitro* культурах нейронов, является существенным доказательством генетической природы возникновения болезни Альцгеймера у пациентов с синдромом Дауна.

Проведено исследование гетерогенной популяции мезенхимных клеток для выявления генезисных особенностей мезенхимных стромальных клеток, которые представляют собой мультипотентные тканеспецифические стволовые и прогениторные клетки взрослого организма, способные дифференцироваться в определенные типы клеток соединительной ткани, такие как остеобласты, хондробласты, адипоциты, а также стромальные клетки, организующие кроветворное микроокружение; исследованы изменения функционального статуса стволовых клеток и их ниш в развитии патологических процессов с учетом хоминга стволовых/прогениторных клеток.

Проведен анализ гистологических изменений и роли стволовых клеток в патологическом процессе перерождения мышечной ткани в жировую и соединительную ткань при мышечной дистрофии Ландузи-Дежерина.

#### **Обозначения и сокращения.**

BMSC — bone marrow stromal cells

FSHD — facioscapulohumeral dystrophy

RNA — ribonucleic acid

RT-PCR — reverse transcription polymerase chain reaction

АЖ— амниотическая жидкость

БА — болезнь Альцгеймера

ИМ — иммортализованные миобласты

ИПСК — индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

ЛЛПМД — лице-плече-лопаточная мышечная дистрофия

МДЛД — мышечная дистрофия Ландузи-Дежерина

ММСК — мультипотентные мезенхимные стромальные клетки

м-РНК — матричная рибонуклеиновая кислота

МСК— мезенхимные стромальные клетки

ОТ-ПЦР — полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

СД — синдром Дауна

## **Введение.**

Исследования процессов тканевой дифференцировки и морфогенеза становятся в последнее время одними из самых востребованных направлений в клеточной биологии и биологии развития. Особое значение изучение этих вопросов приобретает в связи с развитием клеточных технологий и, в том числе, технологий использования стволовых клеток. Реализация результатов исследований позволит добиться качественно нового уровня лечения многих социально значимых заболеваний, таких как травмы (ожоги, трофические язвы, дефекты опорно-двигательного аппарата, недостаток тканей после удаления опухолей и др.), сахарный диабет, цирроз печени. Биология стволовых клеток и клеточные технологии, основанные на применении стволовых клеток в медицинской практике, занимают ведущее место в современных биомедицинских исследованиях. Приоритет отдается получению пациент-специфических плюрипотентных стволовых клеток, способных дифференцироваться в клетки практически всех тканей организма. Использование клеток взрослого организма позволяет исключить работу с эмбриональными стволовыми клетками и, таким образом, избежать этических проблем. Планируется использование индуцированных стволовых клеток для моделирования болезней, скрининга лекарственных препаратов и проверки токсичности. В ближайшие годы ожидается широкомасштабное использование индуцированных клеток для клеточной терапии и выращивания отдельных органов и их частей для трансплантации.

Другим перспективным типом стволовых клеток для практического применения являются мезенхимные стволовые клетки (МСК). Популяция МСК обладает уникальными свойствами. Они характеризуются фенотипической и функциональной пластичностью, обладают иммуносупрессорной активностью, ее клетки способны к миграции в кровотоке. Исследование закономерностей формирования дефинитивной популяции МСК позволит получить более целостное представление о системе МСК, а также подобрать оптимальный источник МСК для репарации тканевых дефектов.

Клеточные технологии становятся исключительно перспективным направлением развития современной регенеративной биологии. Они позволяют реконструировать ткани и органы с восстановлением характерных для них функций, используя живые клетки. Клеточные технологии основаны на индукции морфогенетических процессов в пораженных тканях и органах в ответ на трансплантацию клеток или тканевых эквивалентов.

Детальное изучение механизмов эпителиального морфогенеза и пластичности клеток эпителиальных тканей позволит разработать подходы для коррекции функциональной или структурной недостаточности органов и тканей с использованием методов тканевой инженерии и клеточной терапии. Клеточные механизмы морфогенетических и гистогенетических процессов обеспечивают все многообразие форм высших организмов. Большая часть морфогенетических

процессов осуществляется за счет ограниченного числа фундаментальных клеточных механизмов, включающих пролиферацию и миграцию клеток, избирательный апоптоз, компактизацию клеток, эпителио-мезенхимный и мезенхимно-эпителиальный переход. Клеточные механизмы морфогенеза тесно связаны с проблемой стволовых клеток, проблемой плюрипотентности клеток и механизмами регенерации. Источником регенерации всех эпителиев являются эпителиальные стволовые клетки. В железах эпителиальные стволовые клетки локализуются в протоковых областях, не только обеспечивая самоподдержание и регенерацию этих структур, но и выполняя дополнительные физиологические функции.

Мезенхимные клетки привлекают к себе внимание исследователей, поскольку за последние годы значительно расширились наши представления о разнообразии и гетерогенности этих клеток. Мезенхимные клетки обладают большой фенотипической и функциональной пластичностью. В составе популяции мезенхимных клеток обнаружены мультипотентные и плюрипотентные клетки, обладающие свойствами стволовых клеток. Мезенхимные клетки могут быть использованы для получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. Это направление исследований было отмечено Нобелевской премией в 2012 году. Среди гетерогенной популяции мезенхимных клеток мезенхимные стромальные клетки занимают особое место. Они рассматриваются как мультипотентные тканеспецифические стволовые и прогениторные клетки взрослого организма, способные дифференцироваться в определенные типы клеток соединительной ткани, такие как остеобласты, хондробласты, адипоциты, а также стромальные клетки, организующие кроветворное микроокружение. Хотя мезенхимные стромальные клетки обнаружены в различных органах и тканях взрослого организма, основным источником этих клеток в постнатальном онтогенезе является костный мозг. Обнаружение в костном мозге мезенхимных клеток с плюри- и мультипотентными свойствами не только расширяет представления о механизмах клеточной дифференцировки, но, кроме теоретического, может иметь и практическое значение. В последнее время интерес к этим клеткам значительно возрос, поскольку биологические особенности мезенхимных стромальных клеток позволяют рассматривать их как весьма перспективный материал для восстановления поврежденных и патологически измененных тканей, что открывает возможности для их использования в клинике и разработке методов клеточной терапии.

На сегодняшний день одним из перспективных направлений клеточной терапии является исследование изменения функционального статуса стволовых клеток и их ниш в развитии патологических процессов. Для эффективной клеточной терапии также необходимо понимать механизм хоминга стволовых/прогениторных клеток. Для гемопоэтических стволовых клеток и мезенхимных стволовых клеток достаточно подробно описан механизм взаимодействия фактора аттракции SDF-1 и его рецептора CXCR4. Однако для патологических состояний, при которых происходят и гистологические изменения, например, перерождение мышечной ткани в жировую и

соединительную ткань при мышечной дистрофии Ландузи-Дежерина, роль стволовых клеток не изучена.

В настоящее время актуальным направлением клеточной биологии является изучение механизмов репрограммирования взрослых клеток. Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток представляет собой интенсивно развивающееся направление, ориентированное на получение пациент-специфических плюрипотентных стволовых клеток, способных дифференцироваться в клетки практически всех тканей организма.

Также представляет собой интерес изучение условий репрограммирования клеток амниотической жидкости человека (АЖ), так как клетки АЖ являются низкодифференцированными клетками фетального происхождения, что позволяет рассчитывать на повышение эффективности репрограммирования.

Исследовательские работы, направленные на поиск источника клеток, наиболее подходящих для репрограммирования, а также условий репрограммирования, позволяющих получить индуцированные стволовые клетки путем минимального вмешательства в геном, несомненно, являются актуальными для развития клеточных технологий.



## **Материалы и методы.**

### ***Культивирование миобластов.***

Иммортализованные миобласты человека (ИМ) были получены из миобластов здоровых доноров (любезно предоставлены В. Мули (Dr.V. Mouly), Институт миологии, Париж) и культивированы в среде, состоящей из 4 частей high-glucose DMEM, 1 части среды 199, 20% FBS, 4 mM L-glutamine, 50 mkg/ml gentamicin, 1 mkg/ml Amphotericin B, 2,5 ng/ml human recombinant HGF (Sigma #H1404) и 1 mkM dexamethasone (Sigma #D4902), как описано ранее (Zhu CH, 2007). Первичные миобласты человека были выделены из биопсий скелетных мышц здоровых доноров и очищены с использованием магнитных частиц, конъюгированных с антителами против CD56/NCAM (Miltenyi Biotec), как описано ранее (Barro M, 2010), на первом пассаже заморожены и хранились в жидком азоте. После размораживания миобласты культивировали в среде для пролиферации (high-glucose DMEM (#D6546, Sigma), 20% FBS (HyClone), 4 mM L-glutamine (Sigma #68540–25 G), 50 µg/ml gentamicin (G1397 Sigma), 1 mkg/ml Amphotericin B (Fungizone, Gibco #15290–018)), клетки пассировали по достижении 50% монослоя и использовали для трансфекции и других тестов до 5 пассажа во избежание спонтанной дифференцировки. Первичные и иммортализованные миобласты культивировали в чашках Петри, покрытых коллагеном (стерильный раствор 0,1% коллагена в 0,2% уксусной кислоте).

### ***Выделение и культивирование МСК.***

МСК костного мозга человека (BMSC) были выделены по описанной ранее методике (Kiseleva EV, 2009). Мононуклеарные клетки были выделены из аспириатов костного мозга здоровых доноров с помощью центрифугирования в градиенте плотности (Histopaque-1077 (Sigma)) при 400 g, 30 мин при комнатной температуре. Полученную суспензию клеток три раза промывали в среде DMEM, высевали в культуральные флаконы в плотности  $10^6$  клеток/см<sup>2</sup> (Greiner Bio-One) и культивировали в среде low-glucose DMEM (Gibco), 10% FBS (HyClone), 2 mM GlutaMAX TM (Gibco), 50 U/ml пенициллина, 50 µg/ml стрептомицина (Gibco); среду меняли каждые 3 суток, пассировали по достижении 90% монослоя.

МСК жировой ткани человека выделяли по описанной ранее методике (ADAS) (Kiseleva EV, 2009). Аспириаты жировой ткани здоровых доноров трижды промывали в фосфатно-солевом растворе (PBS), содержащем 50 U/ml пенициллина, 50 µg/ml стрептомицина (Gibco), затем ферментировали при 37°C в течение 60 мин в растворе 0,075% коллагеназы 1 типа (Worthington). Суспензию клеток промывали в среде DMEM с 10% FBS и центрифугировали при 300 g 10 мин. Осадок ресуспендировали в растворе 160 mM NH<sub>4</sub>Cl и инкубировали 10 мин при комнатной температуре для лизиса контаминирующих эритроцитов. Суспензию клеток центрифугировали при 300 g 10 мин, осадок ресуспендировали в среде DMEM, 20% FBS и фильтровали через нейлоновый фильтр с размером пор 100µm для удаления дебриса, затем высевали в культуральные

флаконы. Через сутки неприкрепившиеся клетки отмывали PBS. ADAS культивировали в среде DMEM/F12 (Gibco), 10% FBS, 2 mM GlutaMAX, 50 U/ml пенициллина, 50 ug/ml стрептомицина (Gibco), среду меняли каждые 3 суток, пассировали по достижении 90% монослоя.

#### ***Адипогенная дифференцировка.***

ADAS и BMSC высевали в 12-луночные плата в плотности  $5 \times 10^3$  клеток/см<sup>2</sup> и трансфицировали DUX4-, DUX4с- или контрольным вектором. Через 24 часа после трансфекции среду меняли на индукционную среду следующего состава: DMEM, 10% FBS, 0,5 mM isobutylmethylxantine (Sigma), 1 uM dexamethasone (Sigma), 10 uM insulin (Sigma), 0.2 mM indomethacin (Sigma). Смену среды осуществляли каждые 3 суток. Через 21 суток клетки фиксировали в растворе 4% параформальдегида PBS, липидные капли выявляли гистохимическим окрашиванием Oil Red O (Sigma). Для количественного анализа связавшийся краситель Oil Red O элюировали 100% изопропанолом в течение 5 мин, поглощение измеряли при 492 nm и нормализовали на количество клеток; 100% изопропанол использовали как контроль; эксперименты были поставлены в 4 повторностях.

#### ***Трансфекция.***

ИМ $8 \times 10^4$  были ресуспендированы в 400 мкл соответствующей среды, смешаны с 80 мкл OptiMEM (Gibco #31985062), содержащей 240 ng плазмидной DNA и 0.24 мкл Lipofectamine 2000 (Invitrogen, #11668-019) и высеяны в 1 лунку 12-луночного плата ( $2,1 \times 10^4$  клеток/см<sup>2</sup>); среду меняли через 6 ч после трансфекции. Эффективность трансфекции составила около 40%. МСК человека  $2 \times 10^4$  сажали в 1 лунку 12-луночного плата ( $5 \times 10^3$  клеток/см<sup>2</sup>) и трансфицировали 1 μg плазмидной DNA и 1 мкл Lipofectamine 2000™ (Invitrogen), согласно инструкции производителя, среду меняли через 6 часов после трансфекции. Эффективность трансфекции составила 80–90%.

Для гиперэкспрессии DUX4 и DUX4с использовали плазмиды pCI-Neo-DUX4 (Gabriels J, 1999) и pCI-Neo-DUX4с (Ansseau E, 2009), содержащие открытые рамки считывания для генов человека DUX4 и DUX4с под контролем CMV промотера (любезно предоставлены Alexandra Belayew и Frederique Coppée, University of Mons, Belgium). Контрольные плазмиды: pCI-Neo (Promega), phrGFP (Stratagene).

#### ***Иммунофлуоресцентное окрашивание.***

Через 24 ч после трансфекции миобласты или МСК были фиксированы в 2% PFA (Euromedex) в PBS в течение 5 мин, пермбилизованы в 0,5% triton X-100 (Sigma-Aldrich) в PBS 5 мин, блокированы в 5% BSA (Euromedex) в PBS в течение 1 ч, инкубируются с антителами против DUX4 clone 9A12 (Dixit M, 2007) (предоставлены Alexandra Belayew, University of Mons, Belgium), разведенными 1:50; кроличьими антителами против CXCR4 (Abcam #ab 2074),

разведенными 1:100 или антителами против SDF1 (CXCL12) (Abcam #ab 9797), разведенными 1:200. Вторичные антитела конъюгированы с флуорофорами Alexa Fluor (LifeTechnologies).

#### **RT-PCR.**

Тотальную RNA выделяли, используя Trizol (Invitrogen) по инструкции производителя. Обратную транскрипцию делали, используя 100 ng очищенной RNA и транскриптазу Revertaid Hminus Reverse (Fermentas #EP0451). cDNA разводили в 10 раз и 2 мкл смешивали с праймерами (300 nM— конечная концентрация) Fast Start Universal SYBR Green Mastermix (ROX) (Roche #04913850001) в конечном объеме 20 мкл. Реакцию ставили на приборе Step One plus (Applied Biosystems). Последовательность праймеров (Invitrogen): SDF1-F2 5'-GAACGCCAAGGTCGTGGTCGT; SDF1-R2 5'-TCTGTAGCTCAGGCTGACGGGC; CXCR4-F1 5'-AAAGTACCAGTTTGCCACGGC; CXCR4-R1 5'-GCATGACGGACAAGTACAGGCT; GAPDH-F2 5'-TCATTTCTGGTATGACAACGA; GAPDH-R2 5'-TACATGGCAACTGTGAGGAG; реакцию ставили в триплетах, для анализа данных использовали метод DDct.

#### **Анализ миграции.**

Анализ проводили в 24-луночных системах трансвелл с размером пор 8  $\mu\text{m}$ .  $2 \times 10^5$  миобластов ресуспендировали в 600  $\mu\text{L}$  ростовой среды, содержащей 1% FBS и высевали в нижнюю камеру трансвелл-системы;  $5 \times 10^4$  МСК ресуспендировали в 200 мкл ростовой среды, содержащей 1% FBS и высевали во вставки трансвелл-системы, которую помещали над нижней камерой, заполненной 600 мкл среды без сыворотки. Через сутки после пассирования клетки в верхней и/или нижней камере были трансфицированы как описано ранее. Через 6 часов после смены среды для трансфекции вставки с МСК помещали над нижней камерой с миобластами и культивировали 24 часа при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. При необходимости антитела против CXCR4 (Abcam, #ab10403) или SDF1 (CXCL12) (Abcam, #ab9797) добавляли в среду в концентрации 10  $\mu\text{kg/ml}$  и 4  $\mu\text{kg/ml}$ . Вставки через 24 часа вынимали, ватной палочкой удаляли немигрированные клетки с внутренней поверхности мембраны. Клетки на нижней стороне мембраны фиксировали 4% раствором параформальдегида, окрашивали DAPI и подсчитывали под флуоресцентным микроскопом. Все эксперименты были повторены трижды в дубликатах. Использовали следующие контрольные антитела: rabbit IgG control (AB-105-C, R&D systems) и mouse IgG2b isotype control (MAB004, R&D systems).

#### **Иммуноферментный анализ SDF1 $\alpha$ .**

$3 \times 10^6$  миобластов пассировали в 10 см чашки Петри и через 24 ч трансфицировали 8  $\mu\text{g}$  плазмидной DNA, используя JetPEI по инструкции производителя (Poly plus transfection), соотношение плазмиды: Jet PEI было 1:2; среду меняли через 24 ч после трансфекции. Для подсчета секретированного CXCL12 среду собирали через 48 ч после трансфекции, центрифугировали при 10 000 rpm 10 мин и концентрировали в 20 раз, используя 15 ml концентраторы (5 KDa MWCO)

(Agilent Technologies). Для расчёта внутриклеточного CXCL12 клеточные лизаты были получены в 500 мкл буфера RIPA и разведены в 10 раз перед постановкой ИФА. Пробы анализировали в триплетах, используя набор human SDF 1 $\alpha$  ELISA Kit (Abcam #ab100637).

#### ***Получение культур ИПСК.***

Синтез и упаковку лентивирусных конструкций с генами Oct4, Sox2, c-Myc, KLF4 осуществляли в компании Евроген (ООО «Евроген», Россия). Клетки амниотической жидкости культивировали на среде Чанга с добавлением 10% FBS, за сутки перед трансфекцией рассаживали в чашки Петри Ø 6см, примерно 100 тыс. клеток в одну чашку. Далее проводили ко-трансфекцию четырьмя конструкциями Oct4, Sox2, c-Myc, KLF4. Через сутки вирусный сток сливали и наливали полную ростовую среду для AFS с добавлением 20 ng/mlbFGF. Примерно 7 суток наблюдали рост колоний клеток с морфологией ES клеток, после чего меняли среду на mTeSR1 (Stem Cell Technologies). Примерно через 14 суток колонии с ярко-выраженной морфологией плюрипотентных стволовых клеток механически переносили в отдельные лунки 24-луночного планшета и культивировали как отдельные линии ИПСК на среде mTeSR1. Пластик покрывали раствором матригеля (1/40 в DMEM/F12) (BD Bioscience). Для пассивирования применяли раствор Диспазы 1 мкг/мл в DMEM/F12 (Stem Cell Technologies)

#### ***Дифференцировка ИПСК в нейральном направлении.***

За сутки перед индукцией дифференцировки ИПСК высевали в чашки Петри Ø 6см, примерно 100 тыс.клеток в одну чашку. На следующий день среду mTeSR1 меняли на среду для индукции нейральной дифференцировки Neural Induction Medium (Stem Cell Technologies). Через 7–10 суток наблюдали появление характерных нейральных розеток. Нейральные розетки селективно снимались с пластика при помощи Neural Rosette Selection Reagent (Stem Cell Technologies) и пересаживались в отдельную чашку Петри Ø 6 см, покрытую матригелем (1/40 в DMEM/F12). Нейральные предшественники культивировались на среде Neural Proliferation Medium (Stem Cell Technologies) в течение 1–3 пассажей. Перед терминальной нейрональной дифференцировкой клетки-предшественники рассеивались в пластиковую культуральную посуду, покрытую матригелем, в плотности 20 тыс. клеток/см<sup>2</sup>. Через сутки среду меняли на Neural Differentiation Medium (Stem Cell Technologies) и в дальнейшем культивировали только на ней. После 28–42 суток в дифференцировке клетки выводили из эксперимента и анализировали.

#### ***Иммуоцитохимия.***

Перед окраской антителами клетки промывали один раз раствором PBS, после чего фиксировали 4%-м параформальдегидом 15 мин при комнатной температуре. Далее промывали 3 раза раствором PBS и окрашивали последовательно первичными и вторичными антителами, растворенными в блокирующем растворе (PBS + 10%FBS + 0,1% Tryton-X-100). Перед съемкой

препараты докрашивали раствором DAPI (1 мкг/мл в PBS). Фотографирование производили на инвертированном флуоресцентном микроскопе Olympus СКХ41.

### **Количественный ПЦР.**

Тотальную РНК выделяли с помощью RN easy Mini Kit (Qiagen, #74106) согласно инструкции производителя. Обратную транскрипцию проводили с помощью набора MMLVRT Kit (Евроген, #SK021) с использованием олиго (dT)15-праймеров. ПЦР в реальном времени проводили с использованием набора qPCRmix-HS-SYBR + LowRox (Евроген, #PK156L), с помощью прибора 7500 real-time PCRSystem (AppliedBiosystems). Последовательности праймеров, примененных в данной работе, приведены в Таблице 1. Нормировку результатов проводили методом, описанным Vandesompele с соавт. [12], с использованием праймеров к следующим генам: GAPDH, АСТВ, UBC.

Таблица 1. Последовательности праймеров, использованных в работе.

Ген	Прямой праймер, 5' — > 3'	Обратный праймер, 5' — > 3'
GAPDH	TGCACCACCAACTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATGAG
бАСТ	CTGGAACGGTGAAGGTGACA	AAGGGACTTCCTGTAACAATGCA
UBC	ATTTGGGTCGCGGTTCTTG	TGCCTTGACATTCTCGATGGT
APP	CAAGCAGTGCAAGACCCATC	AGAAGGGCATCACTTACAAACTC
BACE1	TCTGTTCGGAGGGAGCATGAT	GCAAACGAAGGTTGGTGGT
BACE2	TGCCTGGGATTAATGGAATGG	CAGGGAGTCGAAGAAGGTCTC
PSEN1	ACAGGTGCTATAAGGTCATCCA	CAGATCAGGAGTGCAACAGTAAT
PSEN2	TCACTCTGTGCATGATCGTGG	GTGAATGGCGTGTAGATGAGC
PSENE1	CTGGAGCGAGTGTCCAATGAG	GCGCCAGACATAGCCTTTGAT
CD147	CTCCCAGAGTGAAGGCTGTG	ACTCTGACTTGCAGACCAGC
DYRK	AAGAAGCGAAGACACCAACAG	TTTCGTAACGATCCATCCACTTT
TMED10	TGGAGGCGAAAAATTACGAAGA	CTAGGCGTCGCAGCTCTAC
RCAN1	GCGTGGTGGTCCATGTATGT	TGAGGTGGATCGGCGTGTA
CREB	ССАСТГТААСГГТГССААСТ	GCTGCATTGGTCATGGTTAATGT
ETS2	CAGTCTGGTGAACGTGAATCTG	CGGAGGTGAGGTGTGAATTTT
MAPT	TTTGGTGGTGGTTAGAGATATGC	CCGAGGTGCGTGAAGAAATG

OCT4	ACCCACACTGCAGCAGATCA	CACACTCGGACCACATCCTTCT
SOX2	TGCGAGCGCTGCACAT	GCAGCGTGTACTTATCCTTCTTCA
NANOG	ACAACCTGGCCGAAGAATAGCA	GGTCCCAGTCGGGTTCAC
DPPA4	GACCTCCACAGAGAAGTCGAG	TGCCTTTTTCTTAGGGCAGAG
NESTIN	CTGCTACCCTTGAGACACCTG	GGGCTCTGATCTCTGCATCTAC
β-III-TUB	AGCAAGAACAGCAGCTACTTCGT	GATGAAGGTGGAGGACATCTTGA
NSE	CCCTGTATCGCCACATTGC	GCCACCATTGATCACGTTGA
GFAP	AGGTCCATGTGGAGCTTGAC	GCCATTGCCTCATACTGCGT

### ***Вестерн-блот.***

Вестерн-блот использовали для количественного определения внутриклеточного содержания изоформ бета-амилоида бА-40 и бА-42. Лизис клеток проводили с использованием буфера RIPA (150 мМ NaCl, 50 мМ Трис, 1% TritonX-100). Полученные растворы тотального белка смешивали с буфером Лэмли (Bio-Rad, #1610737) в соотношении один к одному и нагревали в течение 5 минут при температуре 98°C. Для электрофореза использовали готовые полиакриламидные гели фирмы Bio-Rad, кат.номер #4568123. Электрофорез проводили в течение одного часа при напряжении в 140 В. Перенос выполняли на PVDF-мембраны (Bio-Rad, #1704156) с помощью Trans-Blot Turbo Blotting System (Bio-Rad) в течение 30 минут при напряжении в 25 В. Затем мембраны отмывали в буфере TBST (10 мМ Трис, 140 мМ NaCl, 0,1% Tween-20, pH 8,0) 3 раза в течение 5 минут. Затем в течение часа при комнатной температуре проводили блокирование мембраны в 5% растворе обезжиренного молока (Bio-Rad, #1706404) в TBST. После мембрану окрашивали раствором первичных антител в течение одного часа при комнатной температуре. После отмывки в TBST переходили к окрашиванию в течение часа при комнатной температуре вторичными антителами из набора ECL Western Blotting System (Amersham, #RPN2108). Для проявления мембраны использовали ELC Western Blotting System (Amersham, #RPN2108), фотографирование мембран осуществляли с помощью Chemi-DocMP Imaging System (Bio-Rad). Количественный анализ проводили с помощью программного обеспечения Image Lab Software 5.2.1 (Bio-Rad) согласно инструкции производителя.

### ***Иммуноферментный анализ (ИФА).***

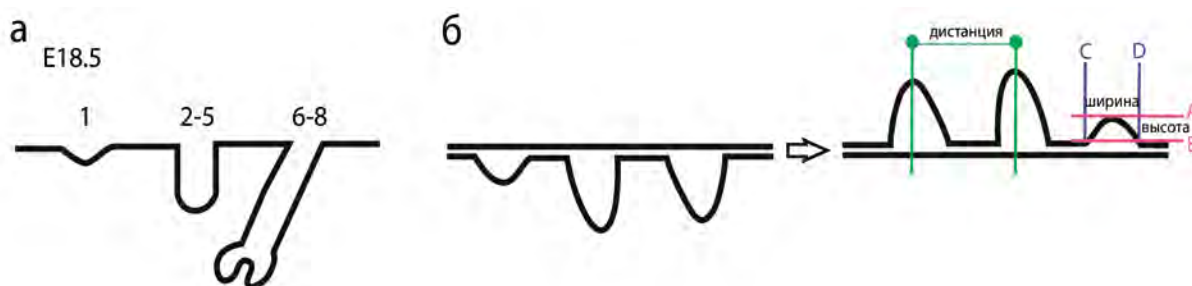
ИФА использовали для количественного определения секретируемого содержания изоформ бА-42 бета-амилоида в кондиционированных клеточных средах. Для проведения ИФА использовали коммерческие наборы (Cusabio, #CSB-E08299H) согласно инструкции производителя.

## Раздел 1. Клеточные и молекулярные механизмы морфогенеза кожи и ее придатков. Дифференцировочный и морфогенетический потенциал эпителиальных стволовых клеток.

### 1.2. Морфогенез волосяных фолликулов в эмбриогенезе

Получены новые данные относительно эмбрионального морфогенеза волосяных фолликулов различных типов у мышей *we/wewal/wal*, для которых характерно облысение вскоре после рождения. Проведен сравнительный анализ паттерна закладки волосяных фолликулов в сравнении с мышами C57Bl6. Впервые показано, что у эмбрионов мутантных животных происходит задержка закладки фолликулов первой волны, имеются нарушения стратификации многослойного эпидермиса. Впервые показано, что в ходе закладки остевых волос у данных животных нарушен процесс компактизации эпителиальных клеток, что приводит к развитию аномальных плакод.

В эмбриогенезе кожи спины мыши на E18.5 при нормальном развитии закладываются все 4 типа ВФ. В литературе описано время закладки для каждого типа волос. Остевые ВФ закладываются в первую волну морфогенеза на E14 и на E18.5 представляют собой самые длинные зачатки ВФ на поздних стадиях морфогенеза 6-8. Шиловидные и пуховые ВФ закладываются во вторую волну морфогенеза на E16-17 и на E18.5 представляют собой зачатки ВФ на средних стадиях морфогенеза 2-5. ВФ типа зиг-заг закладываются последними в третью волну морфогенеза на E18-P1 и на E18.5 представляют собой плагоды, соответствующие стадии 1 (рис. 1.1.1а).

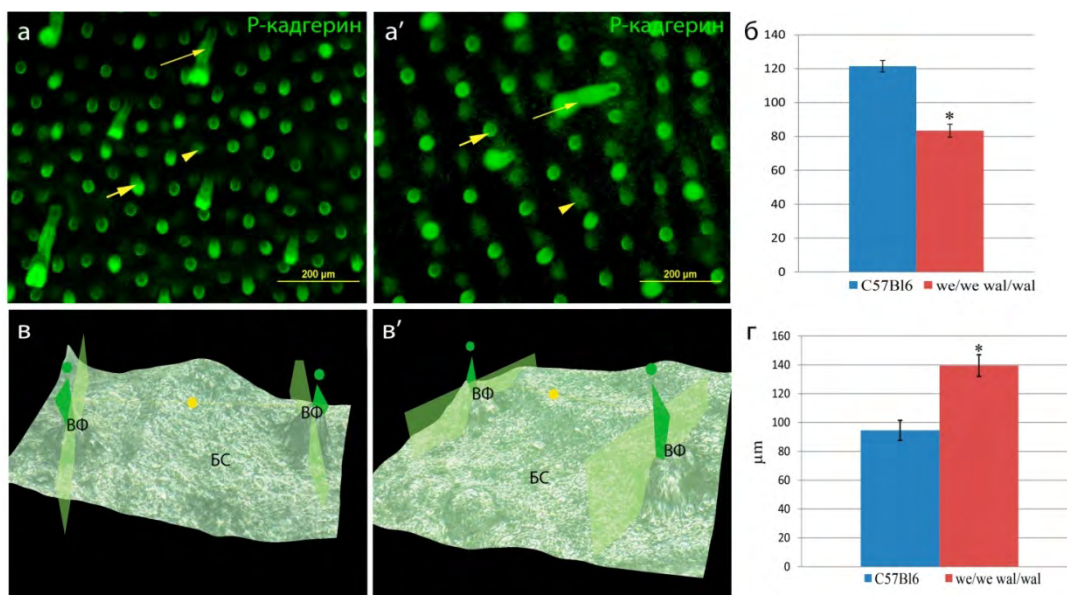


**Рис. 1.1.1** Схема тотального препарата эпидермиса E18.5. а) Схема эпидермиса мыши с указанием стадий развития разных типов ВФ на E18.5; б) Схема анализа тотального препарата эпидермиса при микрофотографировании с помощью светового микроскопа Keyence VHX-1000. О - остевые, Ш - шиловидные, П - пуховые, З - зиг-заг.

Анализ тотального препарата эпидермиса E18.5, окрашенного антителами против Р-кадгерина, с помощью флуоресцентного микроскопа позволяет отчетливо различить все 3 волны закладки ВФ как в диком типе, так и у мутантов. Зачатки ВФ ярко экспрессируют Р-кадгерин и выдаются над межфолликулярным эпидермисом. Остевые ВФ представляют собой самые длинные

зачатки на поздних стадиях морфогенеза. Шиловидные и пуховые ВФ определяются в виде «столбиков» средней величины (средние стадии морфогенеза). Зиг-заг ВФ являются плакодами, которые представляют собой плотно упакованные клетки базального слоя выпуклой формы, ярко экспрессирующие Р-кадгерин (ранние стадии морфогенеза) (рис. 1.1.2а, а'). При этом на тотальном препарате эпидермиса мутантов *we/wewal/wal* плакоды были большего размера по сравнению с диким типом (рис. 1.1.2а'). Подсчет ВФ на тотальном препарате показал, что число ВФ в эпидермисе мутантов *we/wewal/wal* в 1.5 раза меньше по сравнению с диким типом ( $83 \pm 3.82$  SEM у мутантов по сравнению с  $121 \pm 3.36$  SEM в контроле) (рис. 1.1.2б).

Чтобы оценить плотность распределения зачатков ВФ мы подсчитали расстояние (дистанцию) между вершущками соседних ВФ (соответственно самая проксимальная часть растущего фолликула в нативном эпидермисе) (рис. 1.1.1б) в 3D проекции тотального препарата эпидермиса, которое получили с помощью светового микроскопа Keyence VHX-1000, используя его программное обеспечение (рис. 1.1.2в, в'). Если ВФ располагаются близко друг к другу, следовательно, дистанция между ними меньше и плотность на единицу площади выше. Подсчет среднего значения показал, что расстояние между ВФ в эпидермисе мутантов почти в 1.5 раза больше, чем между нормальными фолликулами ( $139.51 \pm 7.51$  SEM у мутантов по сравнению с  $94.55 \pm 6.94$  SEM в контроле,  $\mu\text{m}$ ) (рис. 1.1.2г).



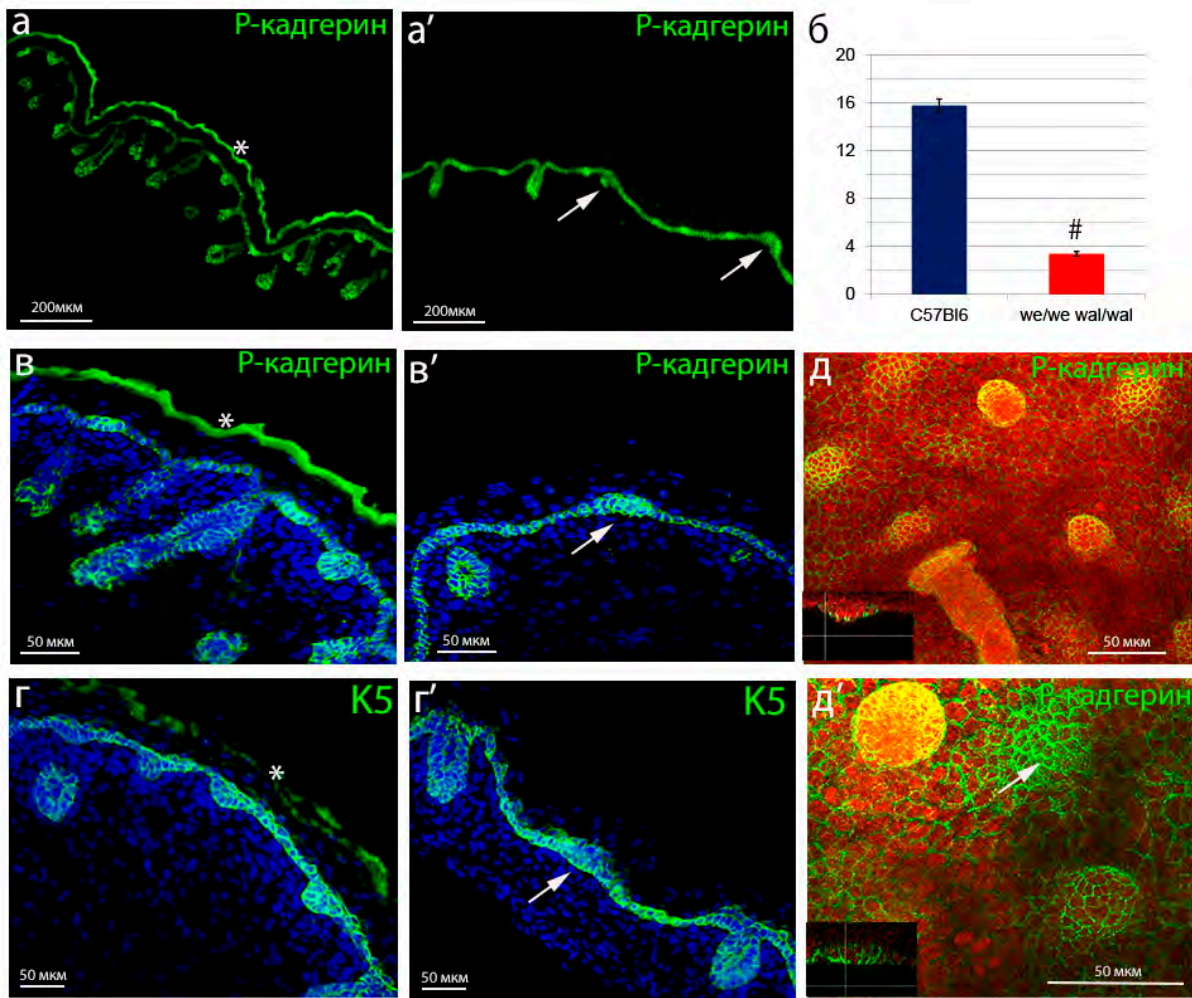
**Рис. 2.** Характеристика плотности распределения ВФ в эпидермисе E18.5. а, в) эпидермис C57Bl6; а', в') эпидермис *we/wewal/wal*; б) подсчет ВФ на тотальных препаратах эпидермиса, среднее значение; г) среднее расстояние между соседними ВФ; а, а') иммуногистохимия, окраска антителами против Р-кадгерина, флуоресцентная микроскопия; в, в') световая микроскопия, фиксированный препарат, контрастированный осмием.



Для проверки среднего значения дистанции был произведен дополнительный подсчет расстояния между ВФ на флуоресцентных снимках. Результат подтвердил увеличение дистанции в 1.5 раза между ВФ в эпидермисе *we/wewal/wal* по сравнению с C57Bl6. Таким образом, ВФ в эпидермисе мутантов распределены редко, что подтверждает разницу в их количестве по сравнению с диким типом. Не смотря на разницу в количестве ВФ, анализ тотального препарата эмбрионального эпидермиса *we/wewal/wal*, окрашенного антителами против Р-кадгерина с помощью флуоресцентной микроскопии показывает наличие всех трех волн индукции ВФ.

Гистологические срезы, окрашенные эпителиальными маркерами Р-кадгерином и цитокератином 5 (K5), дают возможность оценить морфологию базального слоя и зачатков ВФ на разных стадиях развития. Р-кадгерин – трансмембранный белок, который относится к кальцийзависимым молекулам межклеточной адгезии, необходимым для формирования межклеточных контактов кератиноцитов в эпидермисе. Р-кадгерин экспрессируется в эмбриональном и постнатальном эпидермисе. Цитокератин 5 (K5) – цитоплазматический белок промежуточных филаментов, экспрессирующийся в митотически активных (пролиферирующих) кератиноцитах базального слоя и зачатков ВФ. Мы провели сравнительный анализ паттерна экспрессии Р-кадгерина и K5 в эмбриональном эпидермисе у мутантных мышей *we/wewal/wali* мышей дикого типа C57Bl6.

В норме экспрессия Р-кадгерина ограничена базальным слоем кератиноцитов. Высокий уровень экспрессии (яркое свечение после окраски антителами) отмечают в плакодах и антериальной части зачатков ВФ. При анализе паттерна экспрессии Р-кадгерина у мутантных мышей *we/wewal/wal* были обнаружены утолщения базального слоя (рис. 1.1.3а', в'). Утолщения базального слоя также обнаруживались при анализе экспрессии K5 на срезах эмбриональной кожи мутантных мышей *we/wewal/wal* (рис. 1.1.3г'). На срезах кожи было видно, что ВФ у мутантов гораздо меньше, чем в диком типе (рис. 1.1.3а, а'). Мы произвели подсчет зачатков ВФ на гистологических срезах. За ВФ принимали инвагинированные участки базального слоя с морфологией, характерной для ВФ. Аномальные утолщения, наблюдаемые в базальном слое эпидермиса мутантов, в расчет не принимали вследствие их неопределенной морфологии. Подсчет среднего числа ВФ на гистологических срезах показал, что ВФ у мутантов в 4.6 раз меньше по сравнению с нормой ( $3.38 \pm 0.19$  SEM ВФ у мутантов по сравнению с  $15.77 \pm 0.54$  SEM ВФ в поле зрения в контроле, n=48) (рис. 1.1.3б).



**Рис. 1.1.3.** Эпителиальные маркеры E18.5. а, в, г) срез кожи C57Bl6; а', в', г') срез кожи *we/wewal/wal*; б) подсчет ВФ на срезах, среднее число ВФ в поле зрения; д) тотальный препарат эпидермиса C57Bl6; д') тотальный препарат эпидермиса *we/wewal/wal*; д, д') масштабная проекция, врезка – оптический срез, конфокальная микроскопия; а, а', в, в', д, д') иммуногистохимия, окраска антителами против Р-кадгерина, флуоресцентная микроскопия г, г') иммуногистохимия, окраска антителами против кератина 5, флуоресцентная микроскопия; в, в', г, г') ядра докрашены DAPI; д, д') ядра докрашены ТОТО-3. Стрелка – утолщения базального слоя; \* – автофлуоресценция рогового слоя; # – статистически достоверно,  $p < 0,05$

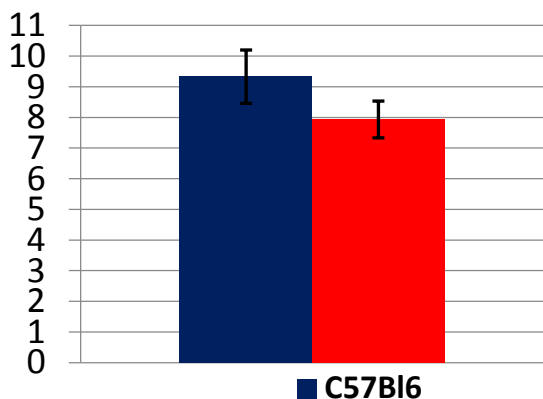
Мы подсчитали число ВФ двумя способами: на тотальном препарате и на гистологических срезах. На тотальном препарате число ВФ в эпидермисе мутанта в среднем в 1.5 раза меньше, чем в норме. На срезах оказалось, что число ВФ в эпидермисе мутанта в среднем в 4.6 раза меньше, чем в норме. Разница в результатах подсчета ВФ, полученная на тотальном препарате и гистологических срезах, объясняется тем, что на тотальных препаратах плотно упакованные базальные клетки (вид сверху) принимали за плакоды ВФ. На срезах кожи данные плотно

упакованные базальные клетки не инвагинировали и не образовывали четкую структуру, напоминающую зачатки ВФ (вид сбоку), поэтому в расчет не принимались.

Это несоответствие особенно ясно проявляется при анализе конфокальных снимков мутантного эпидермиса и сравнения его с нормальным. На масштабной проекции эпидермиса C57Bl6, агрегаты ярко светящихся после окраски антителами к Р-кадгерину клеток принимали за плагоды. Оптические срезы данных плакод позволяли убедиться в этом предположении, так как на них видна четкая инвагинация базальных кератиноцитов, образующих плагоды (рис. 1.1.3д). На максимальной проекции эпидермиса *we/wewal/wal* мы обнаружили скопления ярко светящихся, плотно упакованных клеток, похожих на плагоды при наблюдении сверху. Однако, на оптических срезах было видно, что инвагинация у клеток, образующих данную структуру отсутствует и Р-кадгеринэкспрессируется в нескольких слоях кератиноцитов (рис. 1.1.3д').

Отсутствие инвагинации некоторых плакод объясняет недостаток малых значений высот (до 4 мкм) при анализе тотального препарата эпидермиса с помощью светового микроскопа Keyence VHX-1000. Мутантные ВФ на ранних стадиях развития вследствие отсутствия инвагинации не образуют достаточного объема после подготовки препарата для световой микроскопии и не обнаруживаются как выпуклости базального слоя.

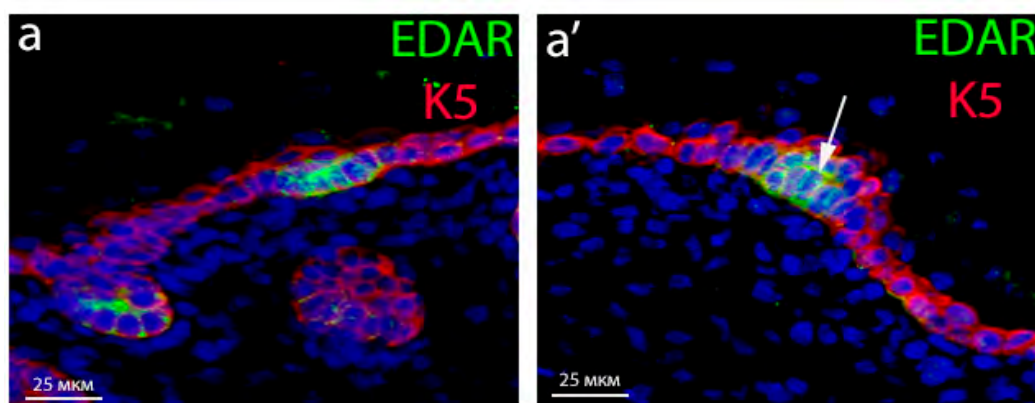
Следует также обсудить меньшее число ВФ в коже мутантов на E18.5. Данный факт может быть объяснен двояко. Либо на E18.5 происходит задержка образования ВФ, а в раннем постнатальном периоде закладывается недостающее количество ВФ и их число становится равным дикому типу. Либо у мутантов закладывается меньшее число ВФ и недостающие ВФ так и не формируются. Мы попытались ответить на этот вопрос и посчитали число ВФ на гистологических срезах кожи P1. Количество ВФ на P1 у мутантов практически сравнимо с нормой (рис. 1.1.4). Этот результат дает нам возможность предположить, что морфогенез ВФ у мутантов, скорее всего, замедлен.



**Рис. 1.1.4.** Подсчет ВФ на срезах P1. Среднее число ВФ в поле зрения, разница статистически не достоверна,  $p=0,21$

Чтобы определить, являются ли утолщения базального слоя мутантов ранней стадией образования ВФ или относятся к межфолликулярному эпидермису, мы проанализировали экспрессию маркера плакод, рецептора к эктодисплазину (EDAR) в эпидермисе у мутантных мышей *we/wewal/wal* в сравнении с диким типом C57Bl6.

В норме EDAR экспрессируется в инвагинирующих кератиноцитах плакоды и проксимальной части зачатков ВФ (рис. 1.1.5а). У мутантов экспрессия EDAR детектируется в нескольких слоях плотно упакованных кератиноцитов, образующих плакodu. При этом видно, что инвагинация кератиноцитов плакоды у мутантов отсутствует (рис. 1.1.5а'). Паттерн экспрессии EDAR в эпидермисе мутантов свидетельствует о том, что обнаруженные утолщения базального слоя представляют собой начальные стадии формирования ВФ.



**Рис. 1.1.5.** Экспрессия маркера плакод EDAR E18.5. а) срез кожи C57Bl6; а') срез кожи *we/wewal/wal*. Иммуногистохимия, флуоресцентная микроскопия, одновременная окраска антителами против кератина 5 и EDAR, ядра докрашены DAPI. Стрелка – утолщения базального слоя

Аномальная морфология некоторых мутантных плакод предполагает, что закладка ВФ у мутантов на E18.5 происходит с нарушением поляризации и инвагинации базальных кератиноцитов на ранних стадиях развития ВФ.

EDAR является рецептором к EDAA1. Связь лиганда с рецептором приводит к транслокации транскрипционного фактора NF-κB в ядро и активации его сигналинга в развивающихся плакодах ВФ. Мы обнаружили, что EDAR экспрессируется во всех типах ВФ на E18.5, следовательно можно предполагать, что сигнальный путь NF-κB активируется во всех типах ВФ. Тем не менее, известна зависимость развития остевых, зиг-заг и ВФ хвоста от *Eda/Edar/NF-κB* сигналинга, отсутствие которого не влияет на развитие вибрисс и шиловидных ВФ спины.

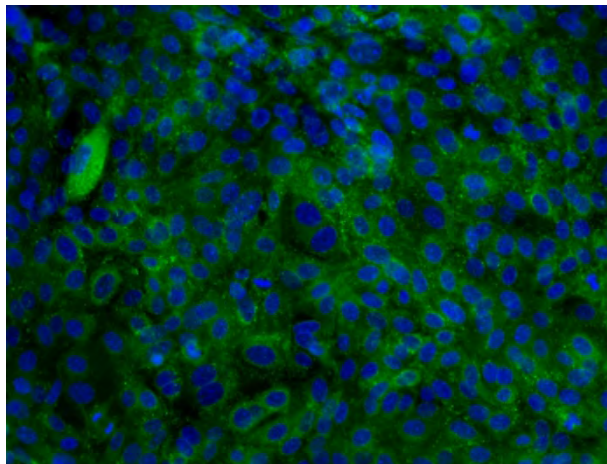
Мутации, инактивирующие гены *Eda/Edar/NF-κB* сигнального пути или супрессия активности NF-κB приводят к блокированию ранних стадий формирования остевых и зиг-заг ВФ,

но не влияют на развитие шиловидных ВФ и вибрисс. При этом с другой стороны, сверхэкспрессия EDAA1 приводит к формированию плакод ВФ увеличенного размера, дополнительных зубов и молочных желез. Аналогично, обработка эксплантатов эмбриональной кожи рекомбинантным EDAA1 оказывает дозозависимое влияние и вызывает увеличение размера плакод, вплоть до слияния соседних плакод.

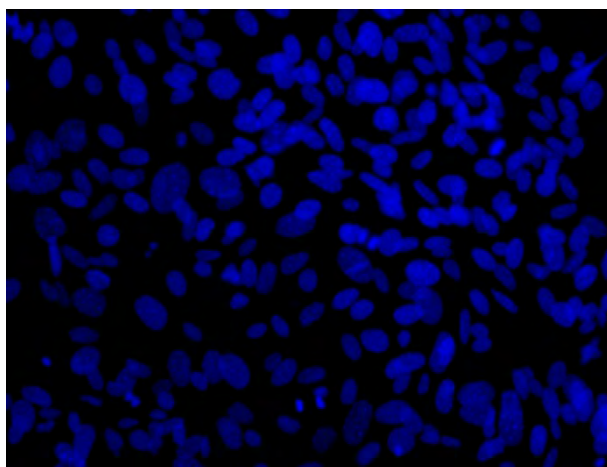
Учитывая с одной стороны задержку развития мутантных ВФ, а с другой - аномальную морфологию плакод, возможно имеет место некоторое нарушение сигнального пути Eda/ Edar/ NF-κB. Предположительно, это может быть вызвано двумя причинами: либо недостаточный синтез какого-либо из участников этого пути влияет на количество ВФ; либо, избыточный синтез EDAA1 определяет больший размер мутантных плакод, обнаруженных на тотальном препарате эпидермиса мутантов. Но следует отметить, что глобальных нарушений сигнального пути Eda/ Edar/ NF-κB не происходит, так как все типы ВФ у зрелых особей *we/wewal/wal* были обнаружены и описаны выше.

## 1.2. Исследование Sca-1<sup>+</sup> и Sca-1<sup>-</sup> культур клеток поднижнечелюстной слюнной железы мыши.

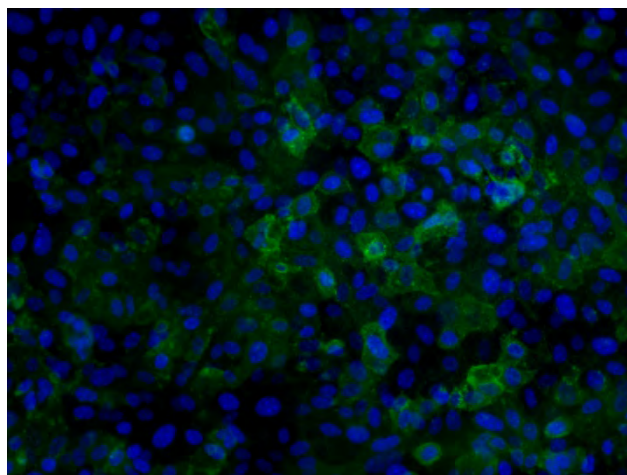
Методом флуоресцентного сортирования были получены Sca-1<sup>+</sup> (Рис.1.2.1) и Sca-1<sup>-</sup> (Рис. 1.2.2 ) культуры клеток поднижнечелюстной слюнной железы мыши линии C57Black (Рис. 1.2.3).



**Рис. 1.2.1.** Иммунофенотипическая окраска Sca-1<sup>+</sup>-культуры по Sca-1. Синим — ядра клеток (DAPI), зеленым — Sca-1 (AlexaFluor 488).

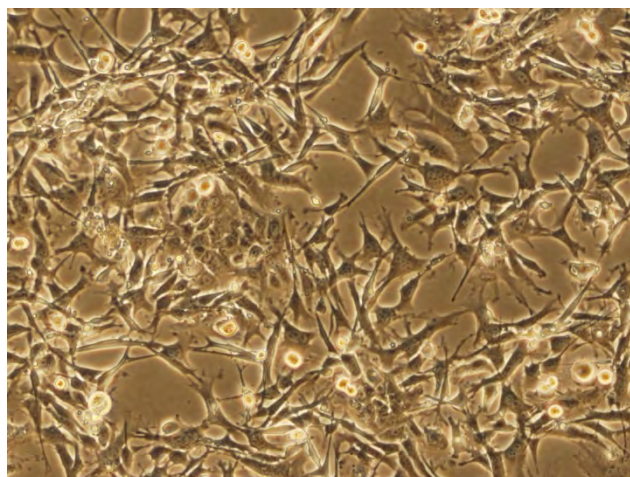


**Рис. 1.2.2.** Иммунофенотипическая окраска Sca-1<sup>-</sup>-культуры по Sca-1. Синим — ядра клеток (DAPI), зеленым — Sca-1 (AlexaFluor 488).



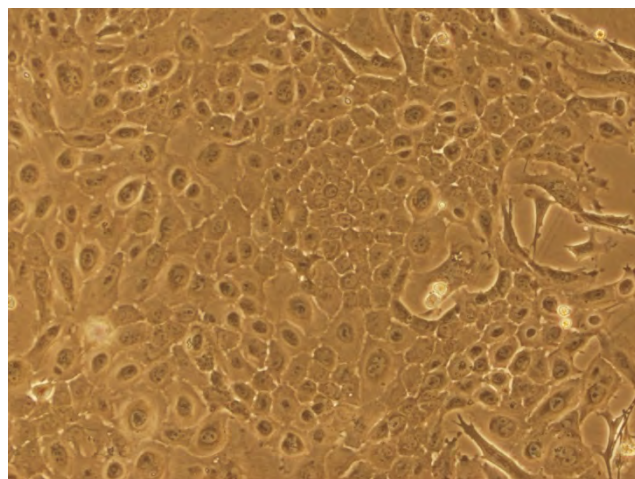
**Рис. 1.2.3.** Иммунофенотипическая окраска культуры клеток поднижнечелюстной слюнной железы мыши линии C57Black по Sca-1. Синим — ядра клеток (DAPI), зеленым — Sca-1 (AlexaFluor 488).

Культуры были исследованы по морфологии, скорости роста, морфогенетическому потенциалу в сравнении с исходной культурой. Было показано, что скорость удвоения клеточной популяции для исходной культуры составляет около  $34 \pm 6$  часов, для Sca-1<sup>+</sup> культуры около  $25 \pm 3$  часов, а для Sca-1<sup>-</sup> культуры — около  $45 \pm 5$  часов. Морфологически Sca-1<sup>-</sup> клетки представлены эпителиальными клетками, которые не образуют плотных колоний. Данные клетки по морфологии вытянуты или имеют множество отростков (Рис. 1.2.4). При формировании плотного монослоя Sca-1<sup>-</sup> клетки растут в несколько слоев, верхний слой нарастает на нижнем.



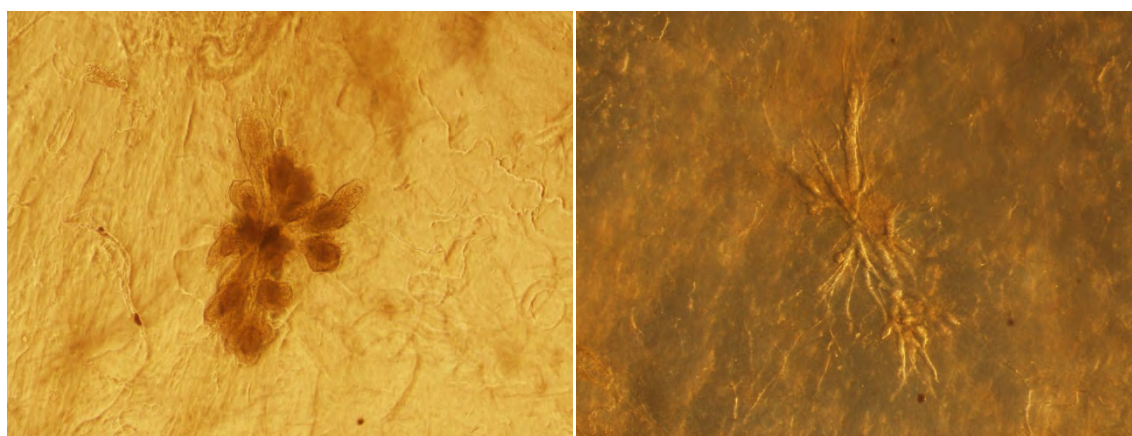
**Рис. 1.2.4.** Морфология Sca-1<sup>-</sup> культуры. Фазовый контраст.

Sca-1<sup>+</sup> культура представлена полигональными клетками, формирующими плотные колонии, клетки имеют множество клеточных контактов (Рис. 1.2.5). В плотном монослое Sca-1<sup>+</sup> клетки не растут в несколько слоев.



**Рис. 1.2.5.** Морфология Sca-1<sup>+</sup> культуры. Фазовый контраст.

Морфогенетический потенциал клеток исследовали в трехмерных условиях при культивировании в коллагеновом геле. В течение 20 дней наблюдали процесс морфогенеза культур в коллагеновом геле при редкой плотности клеток (за морфогенезы принимали объемные структуры, образующиеся в геле). Было показано, что на  $5 \times 10^4$  клеток в исходной культуре на первом пассаже образуется  $8,8 \pm 1,35$  морфогенезов за 14 дней и  $9,8 \pm 1,4$  морфогенезов за 20 дней наблюдения. В Sca-1<sup>+</sup> культуре на первом пассаже на  $5 \times 10^4$  клеток образуется  $17,5 \pm 3,5$  морфогенезов за 14 дней и  $19,2 \pm 3,1$  морфогенезов за 20 дней наблюдения. В то время как в Sca-1<sup>-</sup> культуре эти цифры составляют  $5 \pm 2$  и  $8,7 \pm 2$  соответственно. Морфогенетические структуры отличались и по строению: в Sca-1<sup>+</sup> культуре они имели четкий центр с отходящими от него трубочками, на концах трубочек были утолщения. В Sca-1<sup>-</sup> культуре морфогенезы не имели четкого центра, трубочки были длиннее и не имели утолщений на концах (рис. 1.2.6).



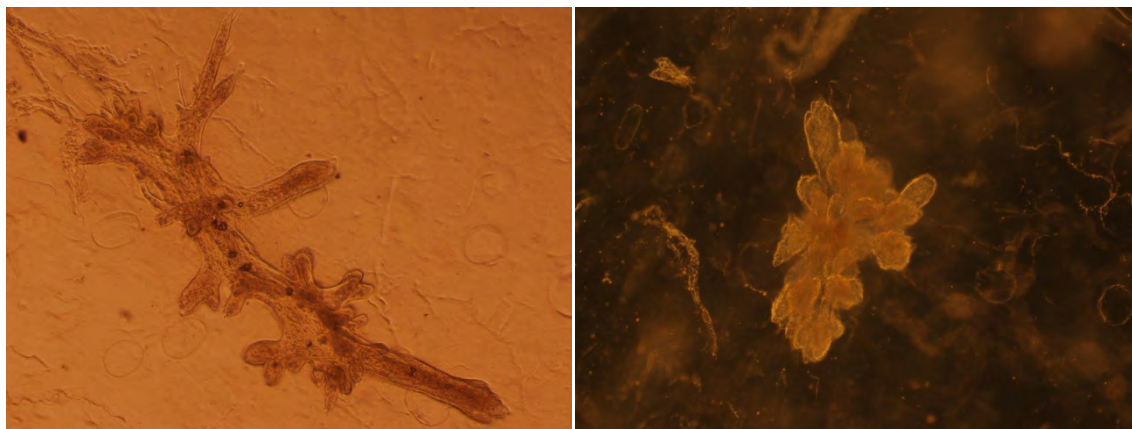
А

Б

**Рис. 1.2.6.** Световая микроскопия. А — морфогенетическая структура в Sca-1<sup>+</sup> культуре, Б — морфогенетическая структура в Sca-1<sup>-</sup> культуре.

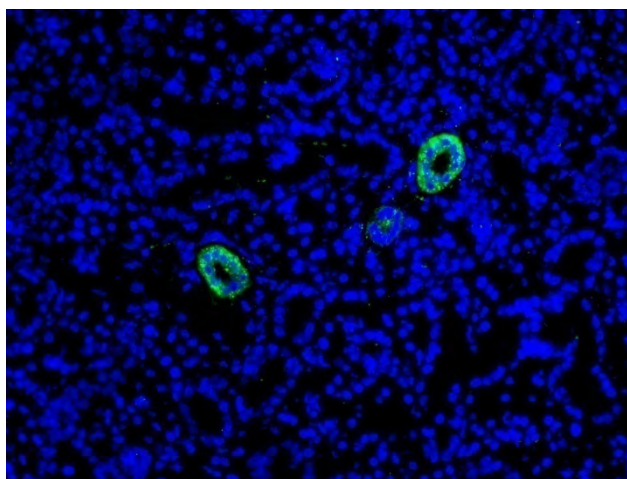


В исходной культуре наблюдались морфогенетические структуры обоих видов (Рис.1.2.7).



**Рис. 1.2.7.** Два типа морфогенетических структур в исходной культуре клеток поднижнечелюстной слюнной железы мыши линии C57Black. Световая микроскопия.

Таким образом, исследованные  $Sca-1^+$  и  $Sca-1^-$  культуры клеток, полученные из поднижнечелюстной слюнной железы мыши, различаются по морфологии, скорости роста и морфогенетическому потенциалу при культивировании *in vitro*: культура  $Sca-1^+$  клеток проявляет значительно больший морфогенетический потенциал в трехмерных условиях культивирования и имеет более высокую скорость удвоения клеточной популяции при культивировании на пластике. Окрашивание криосрезов поднижнечелюстной слюнной железы мыши по маркеру Sca-1 выявило четкую локализацию  $Sca-1^+$  клеток в некоторых протоках с небольшим просветом (Рис. 1.2.8).

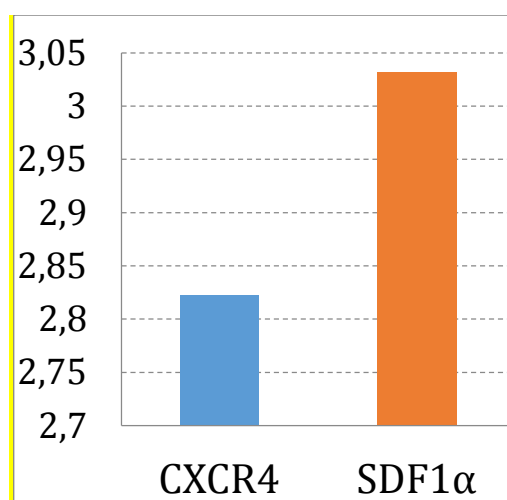


**Рис. 1.2.8.** Иммунофенотипическая окраска криосрезов поднижнечелюстной слюнной железы мыши по маркеру Sca-1. Синим — ядра клеток (DAPI), зеленым — Sca-1 (AlexaFluor 488).

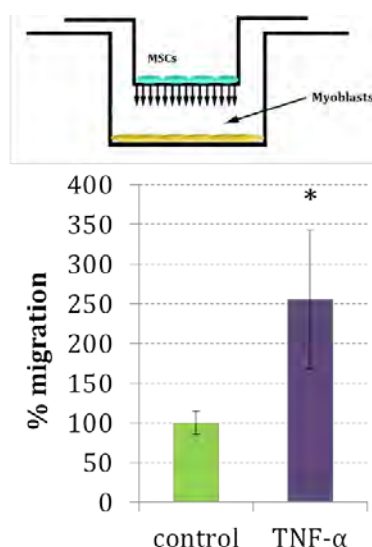
По всей видимости, данные протоки могут представлять собой нишу стволовых клеток поднижнечелюстной слюнной железы.

## Раздел 2. Исследование молекулярных и клеточных механизмов развития патологических процессов мышечной дистрофии Ландузи-Дежерина.

В биопсиях мышечной ткани, полученных от больных МДЛД, показано увеличение уровня экспрессии хемокина SDF1 $\alpha$  и его рецептора CXCR4 в 3 раза (Рис. 2.1). В первичных культурах миобласты от больных доноров имеют профибротический фенотип. В этих клетках по сравнению с клетками от здоровых доноров увеличена экспрессия мРНК белков VEGF-A, FGFb, TGF $\beta$ 1, SDF1 $\alpha$  и CXCR4, тогда как уровень экспрессии коллагена 1 типа одинаков. Показано, что миобласты от больных доноров экспрессируют также DUX4 и SDF1 $\alpha$ . В модели воспаления *in vitro* (обработка миобластов 20 ng/ml TNF $\alpha$ ) выявлена усиленная миграция мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) к миобластам (Рис 2.2).

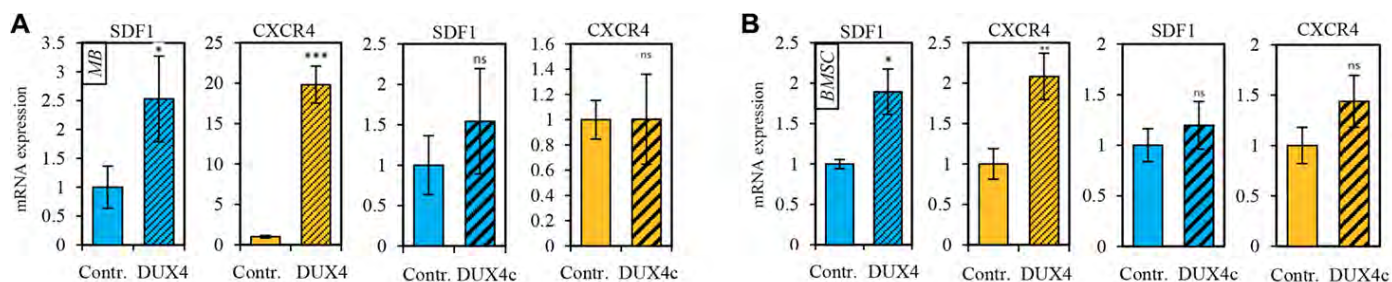


**Рис. 2.1.** Отношение экспрессии генов CXCR4 и SDF1 в биопсиях мышечной ткани от больных и здоровых доноров (дистрофия/норма)

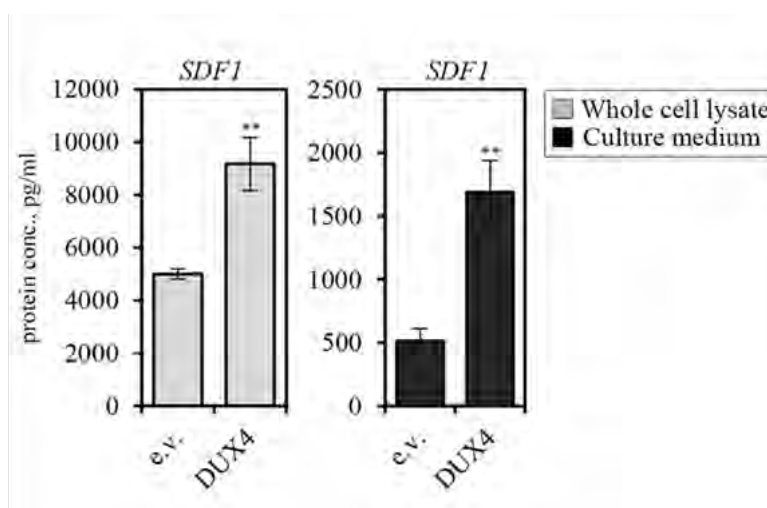


**Рис. 2.2.** Миграция МСК к миобластам при моделировании воспаления *in vitro* (обработка миобластов 20 нг/мл TNF- $\alpha$ ).

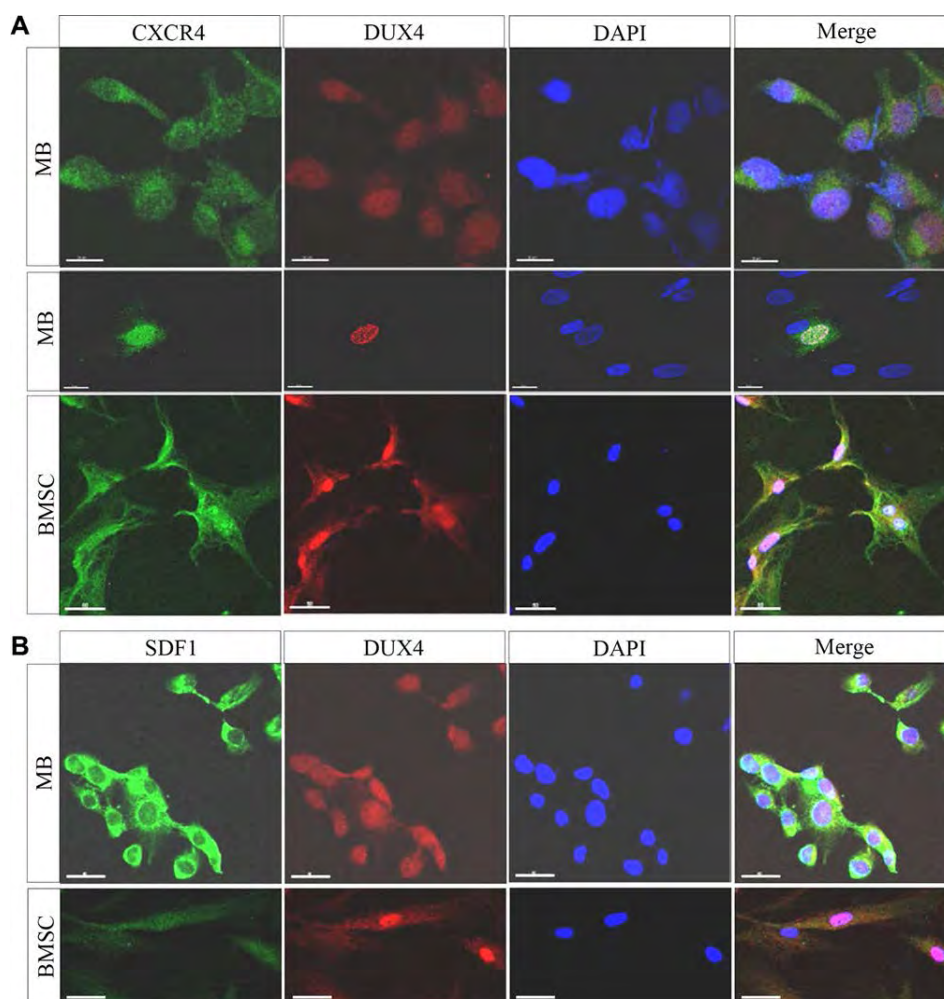
Анализ экспрессии показал, что гиперэкспрессия DUX4, но не DUX4с в миобластах человека вызывает усиление экспрессии мРНК в 2,5 раза SDF1 и в 20 раз CXCR4 (Рис. 2.3 А). В МСК человека показано, что гиперэкспрессия DUX4, но не DUX4с вызывает усиление экспрессии SDF1и CXCR4 в 2 раза (Рис. 2.3 В). Методом иммуоферментного анализа показано, что гиперэкспрессия DUX4 стимулирует не только синтез, но и секрецию SDF1 (Рис. 2.4).



**Рис. 2.3.** Влияние гиперэкспрессии DUX4 на изменение экспрессии мРНК SDF1 и CXCR4 в миобластах человека (А) и МСК человека (В).



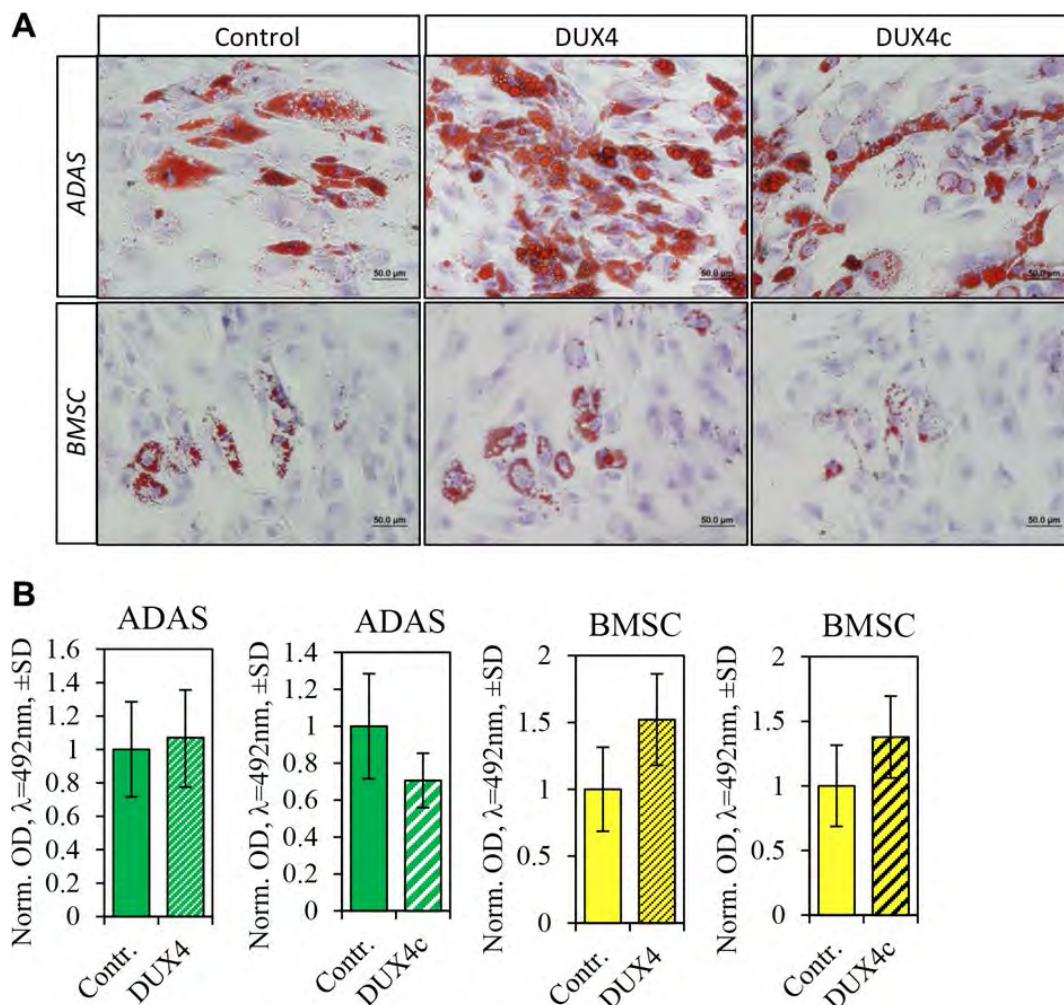
**Рис. 2.4.** Гиперэкспрессия DUX4 стимулирует синтез и секрецию SDF1 миобластами человека.



**Рис. 2.5.** Иммуноцитохимическое окрашивание на CXCR4 (A) и SDF1 (B) трансфицированных DUX4 миобластов и МСК человека.

Иммуноцитохимическое окрашивание на уровне белка подтвердило результаты ПЦР в реальном времени (Рис. 2.5).

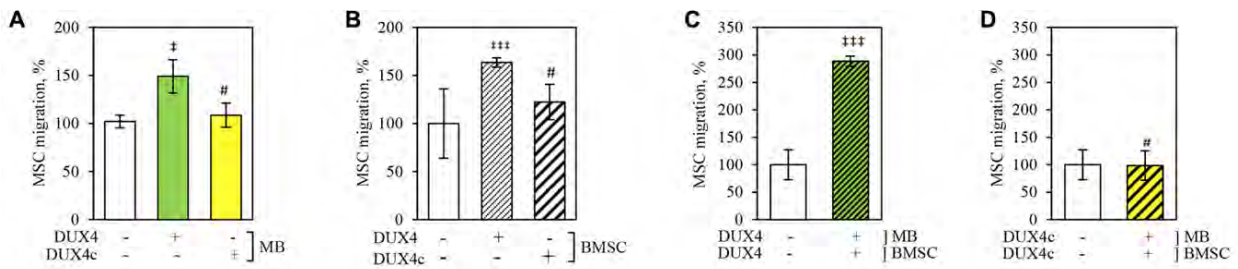
В нашей работе мы показали, что гиперэкспрессия DUX4 и DUX4с не стимулирует адипогенную дифференцировку МСК (Рис. 2.6).



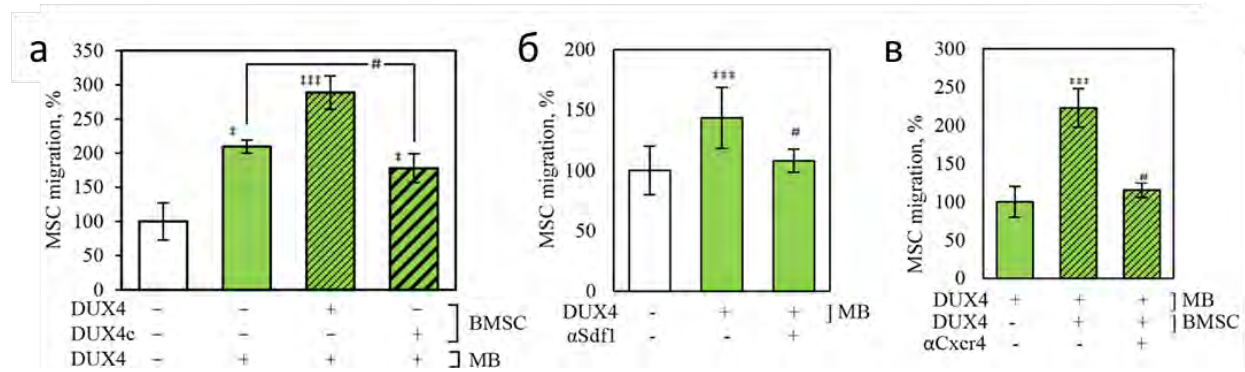
**Рис. 2.6.** Адипогенная дифференцировка МСК не зависит от гиперэкспрессии DUX4 и DUX4с. А — морфология дифференцированных МСК, окрашивание OilRedO; В — количественный анализ накопления нейтральных жиров в дифференцированных МСК.

Анализ в системе трансвелл показал, что гиперэкспрессия в миобластах DUX4, но не DUX4с усиливает на 50% миграцию не трансфицированных МСК (Рис. 2.7 А). Гиперэкспрессия в МСК DUX4, но не DUX4с усиливает их миграцию на 70% к интактным миобластам (Рис. 2.7 В). В случае гиперэкспрессии DUX4 в обоих типах клеток миграция МСК к миобластам возрастает почти в 3 раза (Рис. 2.7 С).

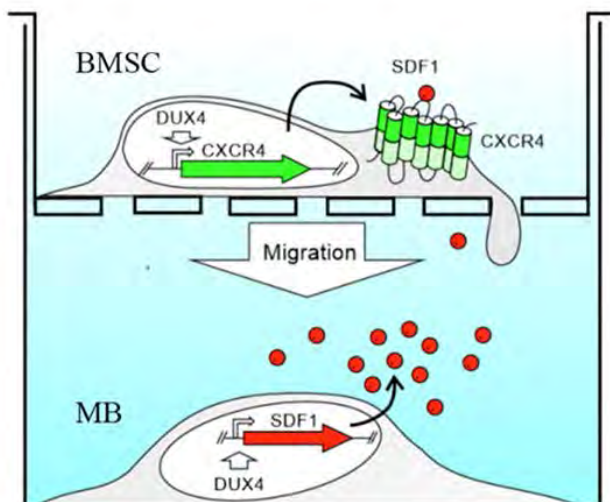
Используя нейтрализующие антитела, мы показали, что усиление миграции МСК к миобластам при гиперэкспрессии DUX4 обусловлена не только усилением секреции SDF1 миобластами (Рис. 2.8 б), но и повышением чувствительности МСК к этому фактору за счет рецептора CXCR4 (Рис. 2.8 в).



**Рис. 2.7.** Гиперэкспрессия DUX4, но не DUX4c стимулирует миграцию МСК к миобластам.



**Рис. 2.8.** Исследование механизма миграции МСК (а) с использованием нейтрализующих антител к SDF1 (б) и CXCR4 (в).



**Рис. 2.9.** Схема механизма влияния гиперэкспрессии DUX4 на миграцию клеток.

Таким образом, в работе показано, что гиперэкспрессия DUX4 приводит к увеличению экспрессии рецептора CXCR4 (C-X-C motifReceptor 4) и его лиганда CXCL12 (C C-X-Cmotifligand

12, также известный как SDF1) в иммортализованных миобластах человека. В модельных экспериментах показано, что мезенхимальные стволовые клетки костного мозга человека (СККМ) мигрируют более эффективно к иммортализованным миобластам с гиперэкспрессией DUX4 по сравнению с контрольной группой; была также увеличена эффективность миграции DUX4 трансфицированных СККМ. Антитела против SDF1 и CXCR4 ингибировали положительный эффект гиперэкспрессии DUX4 на миграцию СККМ. Предполагается, что DUX4 контролирует миграцию СККМ через рецептор CXCR4 (Рис. 2.9).

### **Раздел 3. Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) из клеток дермальной папиллы и клеток амниотической жидкости человека.**

Отработаны протоколы трансфекции лентивирусных конструкций генов транскрипционных факторов Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc в культивируемые клетки иммортализованных фибробластов кожи человека. Выделены и охарактеризованы несколько линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека. Отработаны методы анализа плюрипотентных клеток: иммунофлуоресцентный анализ, ОТ-ПЦР, тест на образование эмбрионидных телец, тест на образование тератом в иммунодефицитных животных.

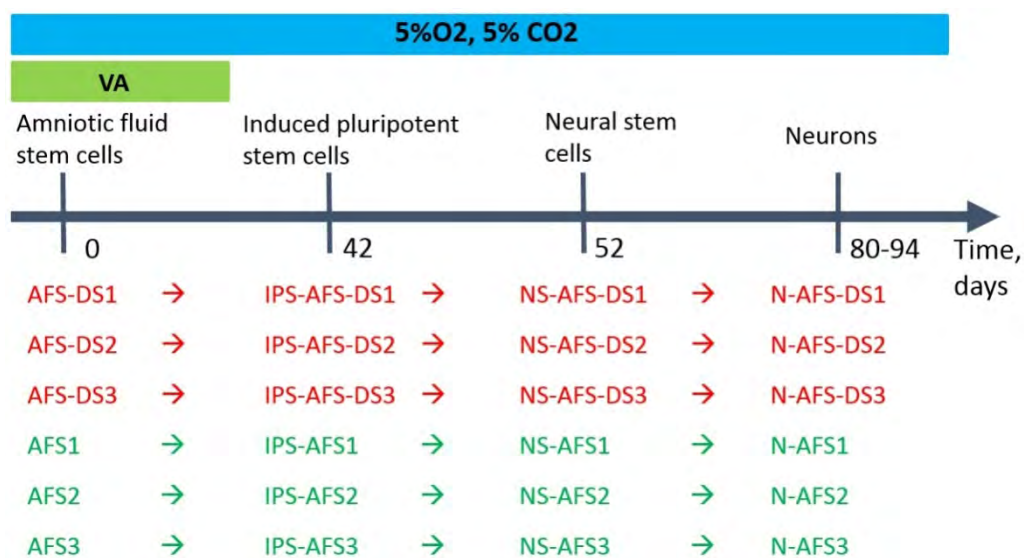
Проведено репрограммирование соматических клеток человека разного типа до плюрипотентного состояния. Были опробованы методы, включающие лентивирусную трансфекцию генов, репрессирующих факторов OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC, NANOG, hTERT в различных комбинациях, а также трансфекцию мРНК генов репрессирующих факторов OCT4, SOX2, NANOG, hTERT. В результате были подобраны оптимальные условия и протоколы репрограммирования клеток до плюрипотентного состояния. Были получены несколько линий ИПСК клеток человека из различных источников, в том числе из фибробластов кожи, клеток дермальной папиллы, клеток амниотической жидкости, клеток ретинального пигментного эпителия. Разработана технология получения индуцированных плюрипотентных клеток, которая может быть применена для получения клеточных линий для использования в регенеративной медицине.

Подобраны оптимальные условия и протоколы дифференцировки ИПСК человека в зрелые нейроны. Разработана технология получения пациент-специфичных нейральных клеток, включая нейральные стволовые клетки и терминально дифференцированные зрелые нейроны, которые могут быть в дальнейшем использованы для фундаментальных исследований и целей регенеративной медицины. На полученных ранее клеточных линиях ИПСК человека отработаны различные протоколы нейральной дифференцировки. Были опробованы методы, включающие двухстадийную дифференцировку, с получением нейральных стволовых клеток, и последующей терминальной дифференцировкой. Начальную индукцию дифференцировки вызывали ингибированием BMP-сигнального пути и стимулированием специфическими ростовыми факторами, такими как SHH, BDNF, NGF. Полученные культуры экспрессировали маркеры зрелых нейронов: MAPT, NCAM, SYN, SYP, NSE, TH. Кроме этого, полученные культуры нейронов были проанализированы на функциональную активность: измерение трансмембранного потенциала и спонтанную активность.

Для получения культур нейральных клеток от доноров с СД и здорового контроля с нормальным кариотипом, мы репрограммировали шесть культур клеток амниотической жидкости человека (культуры AFS-1, AFS-2, AFS-3 от здоровых доноров и культуры AFS-DS1, AFS-DS2, AFS-DS3 от доноров с СД) до плюрипотентного состояния (Рис. 3.1). Мы выбрали культуры

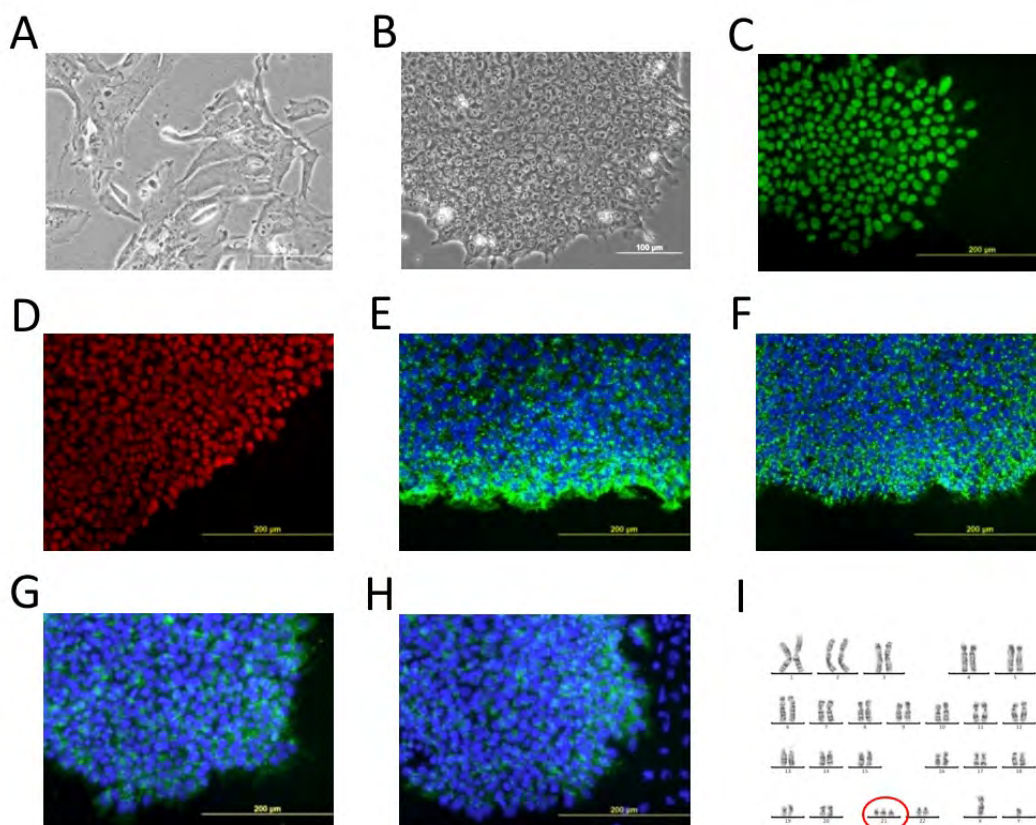


клеток амниотической жидкости (Рис. 3.2А) в качестве изначального материала исследования, из-за высокой эффективности репрограммирования, а также из-за доступности биоматериала, поскольку данные клетки широко используются для амниотического анализа кариотипа при подозрении на наличие СД у плода. Репрограммирование проводили по классической схеме используя в качестве репрограммирующих агентов лентивирусные конструкции с «коктейлем Яманаки» (Oct4, Sox2, c-Мyc, KLF4).



**Рис. 3.1.** Схема эксперимента. Клетки амниотической жидкости были репрограммированы до состояния индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, которые далее были дифференцированы сначала в нейральные стволовые клетки, а затем в нейроны. Всего мы репрограммировали три линии от доноров с СД и три линии от здоровых доноров.

Репрограммирование проходило в условиях низкого кислорода (5%) и в присутствии 1мкМ вальпроевой кислоты (Рис. 3.1), что по литературным данным увеличивает выход ИПСК. В результате мы получили три линии ИПСК с СД (IPS-AFS-DS1, IPS-AFS-DS2, IPS-AFS-DS3) и три линии ИПСК с нормальным кариотипом (IPS-AFS1, IPS-AFS2, IPS-AFS3). Все полученные культуры клеток демонстрировали морфологию характерную для плюрипотентных стволовых клеток (Рис. 3.2 В), то есть эпителиальный тип клеток, с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением и в виде плотных колоний. Полученные клетки положительно окрашивались на маркеры плюрипотентных стволовых клеток: Oct4 (Рис. 3.2 С), Sox2 (Рис. 3.2 D), SSEA3 (Рис. 3.2 E), SSEA4 (Рис. 3.2 F), Tra-1-60 (Рис. 3.2 G), Tra-1-81 (Рис. 3.2 H). Также мы провели анализ кариотипа клеток (Рис. 3.2 I) по результатам которого удостоверились в наличии трисомии по 21-й хромосоме у культур, полученных от доноров с СД, а также в отсутствии дополнительных хромосомных aberrаций, которые могли возникнуть в ходе процесса репрограммирования.

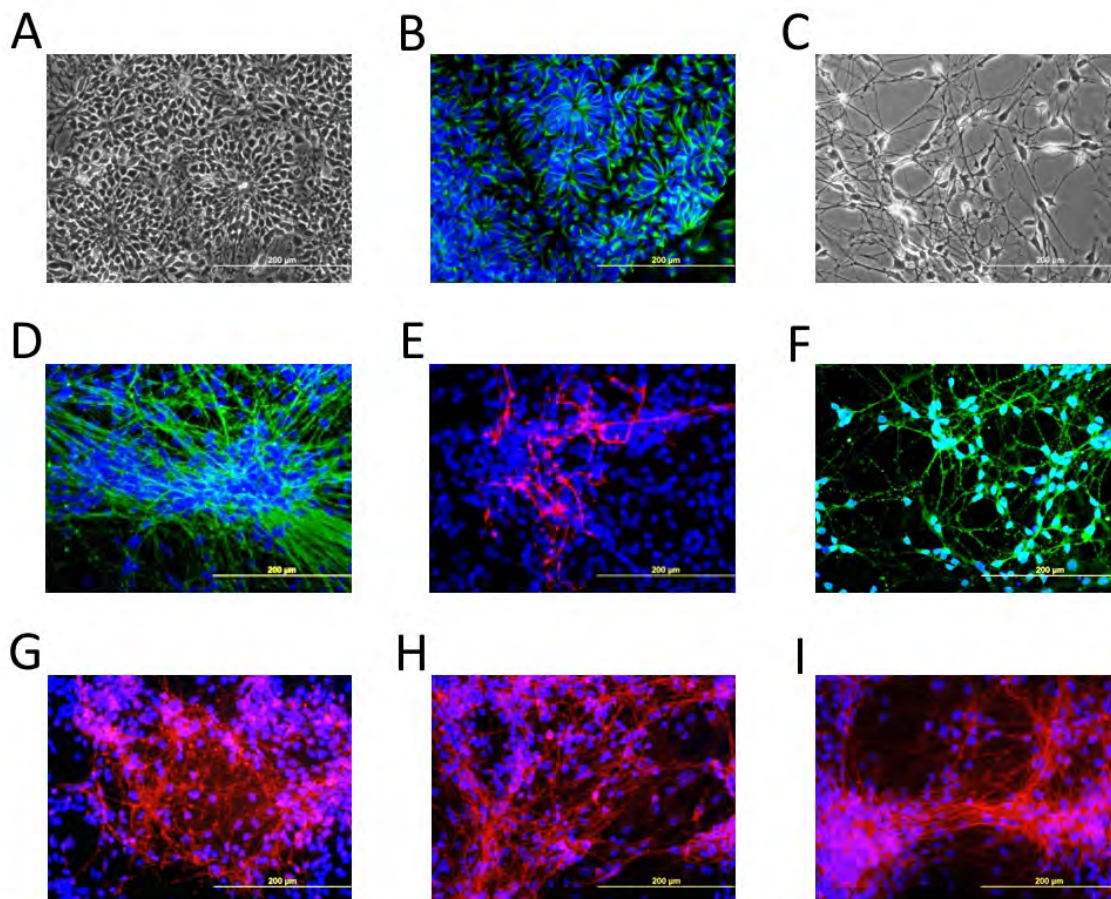


**Рис. 3.2.** Репрограммирование до состояния ИПСК на примере линии AFS-DS3. А — морфология клеток AFS-DS3; В — морфология клеток IPS-AFS-DS3; С — окрашивание антителами против Oct4; D — окрашивание антителами против Sox2; E — окрашивание антителами против SSEA3; F — окрашивание антителами против SSEA4; G — окрашивание антителами против TRA-1-60; H — окрашивание антителами против TRA-1-81; I — кариотип культуры IPS-AFS-DS1; (Длина шкалы на А и В — 100мкм, на С,D,E,F,G,H — 200мкм)

### ***Дифференцировка культур ИПСК в нейральном направлении.***

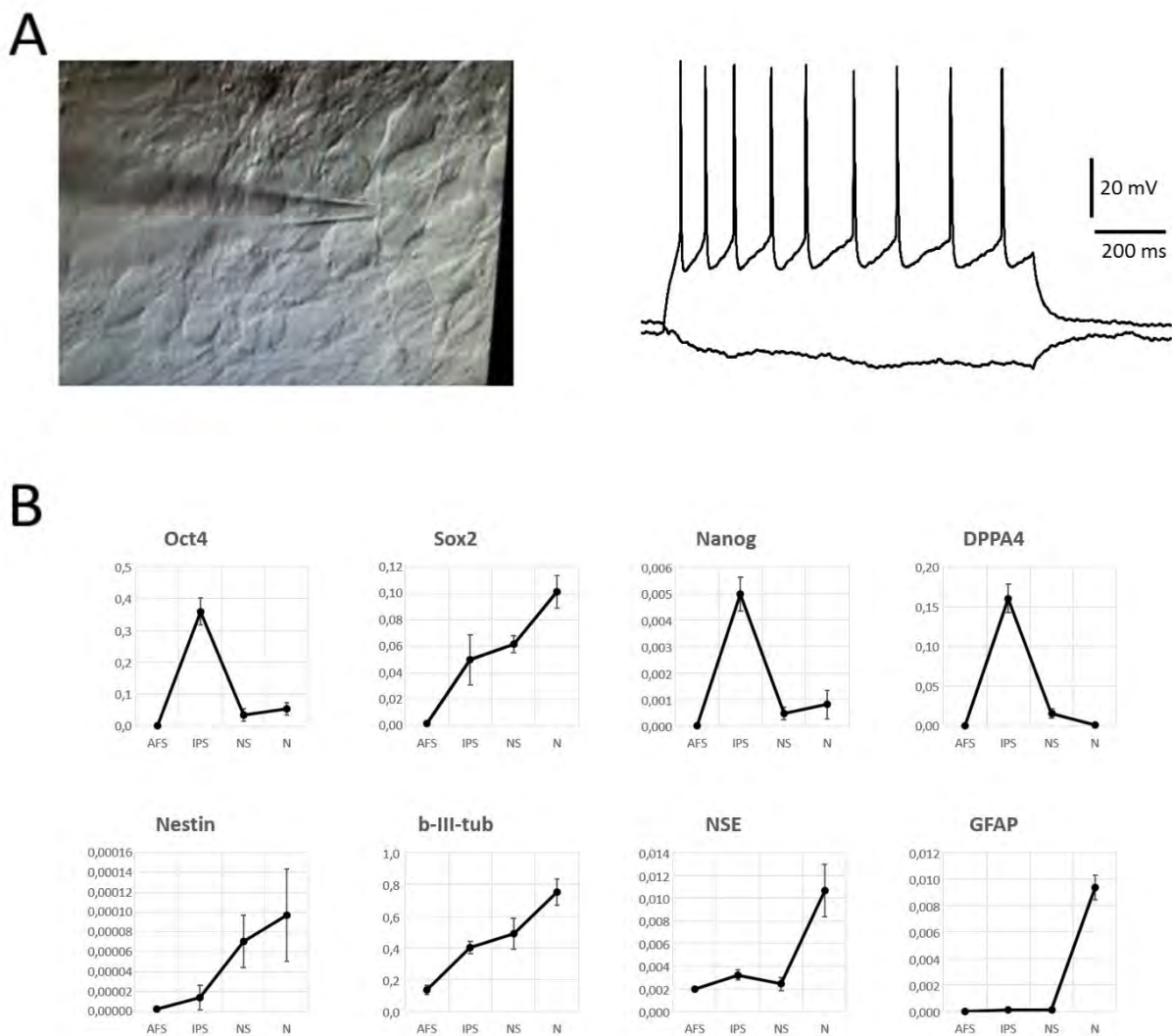
Далее мы провели направленную нейральную дифференцировку полученных линий ИПСК. Дифференцировку проводили в два этапа (Рис. 3.1). Во время первого этапа мы проводили индукции нейральной дифференцировки, с образованием т.н. нейральных розеток (Рис. 3.3 А), состоящих из низкодифференцированных нейральных стволовых клеток, интенсивно окрашиваемых на белок Nestin (Рис. 3.3 В). После селективного выделения и экспансии нейральных предшественников, клетки рассеивали в низкой плотности и проводили второй, терминальный этап дифференцировки, с получением культур полноценных зрелых нейронов (Рис. 3.3С). В результате мы получили три культуры нейронов от доноров с СД (N-AFS-DS1, N-AFS-DS2, N-AFS-DS3) и три культуры нейронов от здоровых доноров (N-AFS1, N-AFS2, N-AFS3). Полученные культуры нейронов интенсивно окрашивались на нейрональные маркеры такие как beta-III-tubulin (Рис. 3.3 D), micro tubule associated protein tau (MAPT) (Рис. 3.3 F),

Synapsin1 (Рис. 3.3 G), Synaptophysin (Рис. 3.3 H), Neural cell adhesion molecule (hNCAM) (Рис. 3.3 I). Также незначительная доля клеток (0,1–5%) окрашивалась на маркер глиальных клеток GFAP (Рис. 3.3 E). Во время проведения экспериментов по дифференцировке ИПС клеток, мы не заметили значимой разницы в эффективности нейральной дифференцировки между культурами клеток с СД и здоровым контролем.



**Рис. 3.3.** Дифференцировка в нейроны на примере линии NS-AFS-DS3. А — морфология нейральных розеток NS-AFS-DS3; В — окрашивание розеток антителами против Nestin; С — морфология нейронов NS-AFS-DS3; D — окрашивание антителами против b-III-tubulin; E — окрашивание антителами против GFAP; F — окрашивание антителами против MAP2; G — окрашивание антителами против Synapsin1; H — окрашивание антителами против Synaptophysin; I — окрашивание антителами против hNCAM. (Длина шкалы на всех фотографиях — 200 мкм.)

Дифференцировку клеток мы подтвердили также при помощи анализа уровней экспрессии генов-маркеров плюрипотентных стволовых клеток (таких как Oct4, Sox2, Nanog, DPPA4) и нейральных клеток (Nestin, b-III-tubulin, Neuron specific enolase (NSE), GFAP) (Рис. 3.4 B).



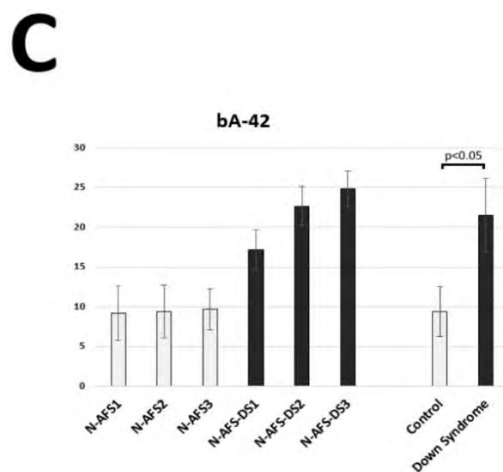
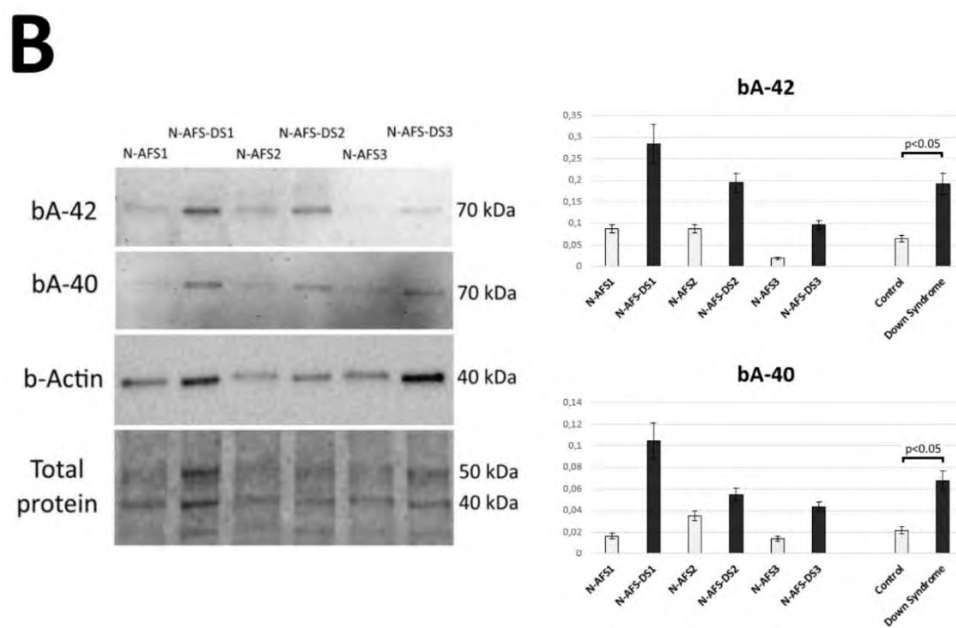
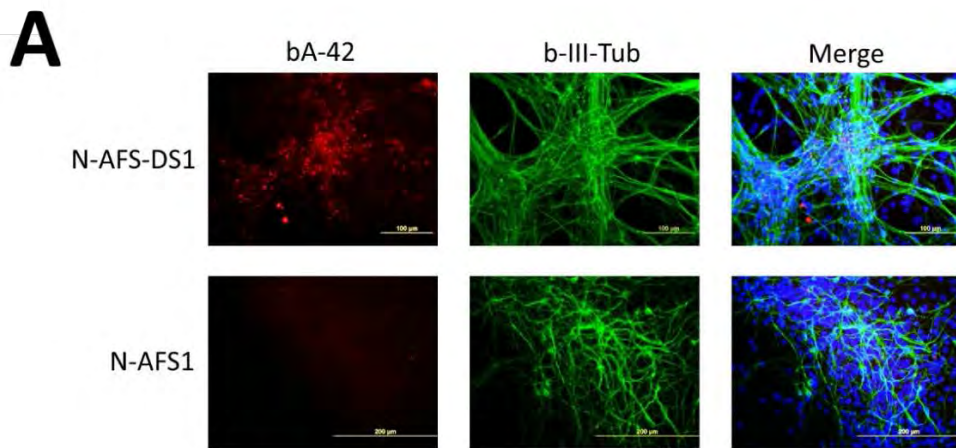
**Рис. 3.4. А** — Тестирование на нейрофизиологическую активность методом патч-клампа, на примере культуры N-AFS-DS1. Справа представлен типичный пример записи электрофизиологического ответа клетки на гиперполяризацию и деполяризацию мембраны. Деполяризация вызывает серию спайков, характерных для зрелых нейронов. **В** — Анализ экспрессии генов маркеров плюрипотентных стволовых клеток (Oct4, Sox2, Nanog, DPPA4) и нейральных клеток (Nestin, b-III-tub, NSE, GFAP) в четырех различных стадиях репрограммирования клеток — стадии клеток амниотической жидкости (AFS), индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (IPS), нейральных стволовых клеток (NS), нейронов (N), методом ОТ-ПЦР в реальном времени. (На примере культур AFS-DS1, IPS-AFS-DS1, NS-AFS-DS1, N-AFS-DS1.)

В результате этого анализа мы наблюдали характерный достоверный пик экспрессии маркеров плюрипотентности на стадии репрограммирования в ИПСК с последующим падением на стадиях нейральных стволовых клеток и нейронов. Исключение составил только ген Sox2, для

которого уже известно и показано, что он экспрессируется на высоком уровне в нейральных клетках [23]. Уровни экспрессии нейральных маркеров достоверно повышались на стадиях нейральных стволовых клеток и нейронов. Для того, чтобы окончательно удостовериться в нейрональной природе исследуемых клеток, мы провели ряд тестов на наличие специфической нейронной активности методом патч-клампа. Тесты показали способность мембраны полученных нейронов к образованию потенциалов действия, характерных для зрелых нейронов. (Рис. 3.4 А).

### ***Нейральные клетки от доноров с СД демонстрируют патологические признаки БА в культуре in vitro.***

Удостоверившись в нейрональной природе исследуемых клеток, мы провели ряд экспериментов, направленных на обнаружение признаков патологического метаболизма бета-амилоида в нейронах доноров с СД и взаимосвязи с БА. Общеизвестным маркером подобных процессов является накопление патологической изоформы бета-амилоида с длиной 42 а.о. (bA-42), которая в отличие от обычной изоформы длиной 40 а.о. (bA-40) обладает повышенной склонностью к агрегации и выпадению в осадок, что в дальнейшем приводит к образованию бета-амилоидных бляшек. При помощи окрашивания моноклональными антителами против bA-42 препаратов с нейронами доноров с СД мы обнаружили наличие интенсивно окрашиваемых гранул бета-амилоида, концентрирующихся в зонах скопления нейронов (Рис. 3.4 А). Окрашивание препаратов с клетками со здоровым контролем, подобных скоплений не выявило, хотя присутствовало слабое фоновое окрашивание клеток и единичные гранулы (Рис. 3.4 А). Мы провели анализ концентрации внутриклеточных изоформ бета-амилоида bA-40 и bA-42, методами количественного Вестерн-Блота с нормировкой интенсивности бендов по тотальному белку. Полученные данные показали, что нейроны доноров с СД в среднем обладают повышенным содержанием обеих изоформ бета-амилоида, хотя также стоит отметить высокую гетерогенность полученных результатов — клетки культуры N-AFS-DS1 показали результат, превышающий средний контрольный в 3–3,5 раза, в то время как другие клетки культур N-AFS-DS2 и N-AFS-DS3 — примерно в 1,5–2 раза. (Рис. 3.4 В). При помощи метода иммуноферментного анализа ELISA мы измерили концентрации патологической изоформы бета-амилоида bA-42, которые клетки секретировали в культуральную среду. Результаты эксперимента показали повышенную секрецию bA-42 в культурах нейральных клеток с СД по сравнению с контролем (Рис. 3.4 С). Примечательно также, что и в данном эксперименте, мы наблюдали значимые различия в секреции bA-42 как между сравниваемыми группами клеток, так и между культурами внутри группы с СД.

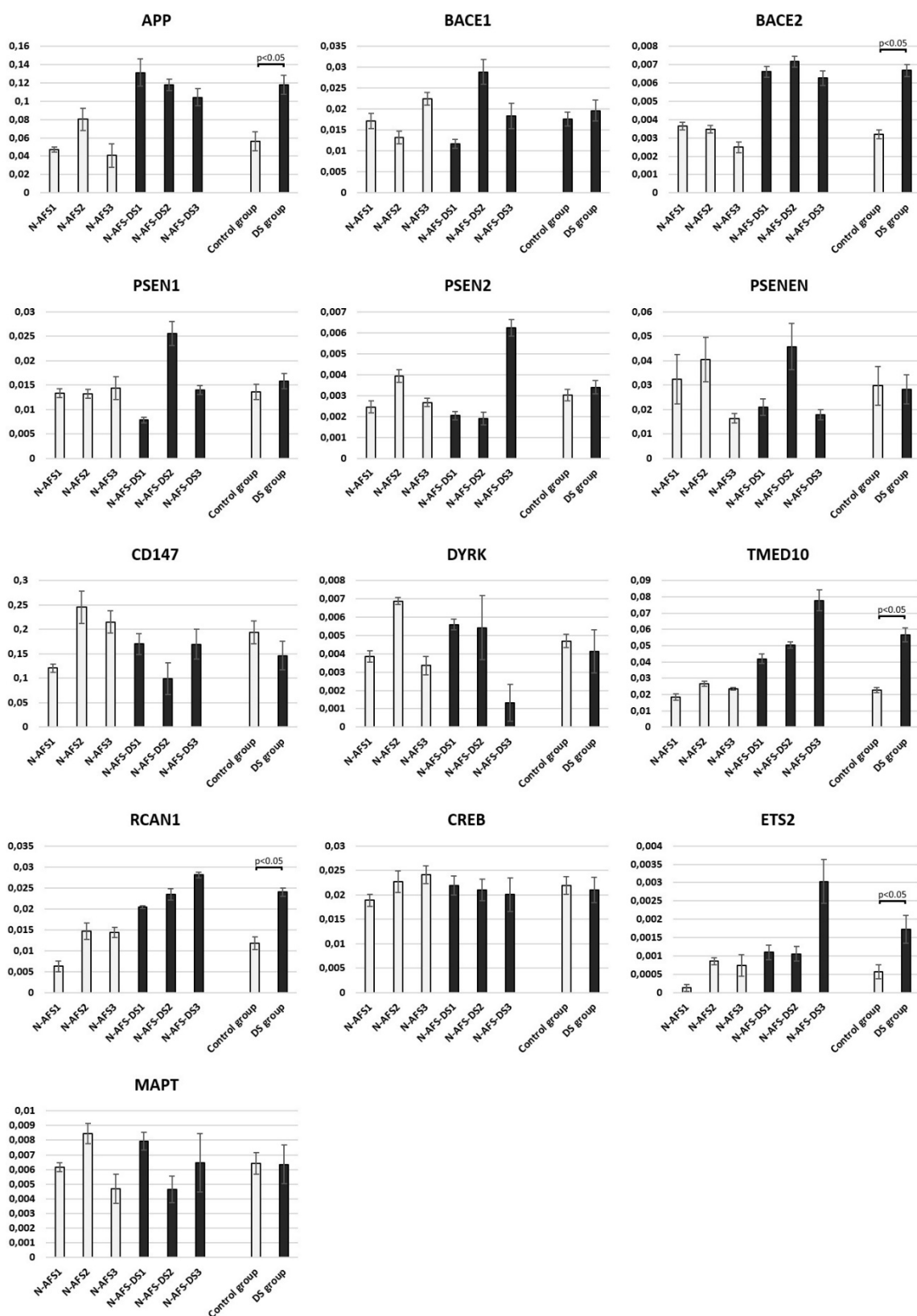


**Рис. 3.5.** Анализ полученных культур на наличие признаков патологического метаболизма бета-амилоида. А — Окрашивание антителами против bA-42 и b-III-tubulin культур нейронов N-AFS-DS1 и N-AFS1. В культурах нейронов с СД наблюдается накопление гранул бета-амилоида. В

— Анализ содержания внутриклеточного bA-42 и bA-40 методом количественного Вестерн-блота. С — Анализ количества секретируемого в культуральную среду bA-42 методом ELISA.

### ***Анализ уровней экспрессии генов, связываемых с БА.***

Пронаблюдав таким образом наличие признаков патологического метаболизма бета-амилоида в культурах нейтральных клеток с СД, далее, при помощи метода ОТ-ПЦР в реальном времени, мы решили оценить в них уровни экспрессии генов, традиционно связываемых с БА. В данный список генов входят гены участников метаболизма бета-амилоида: ген белка-предшественника амилоида (APP), ген бета-секретазы 1-го типа (BACE1), ген бета-секретазы 2-го типа (BACE2), и генов компонентов гамма-секретазы PSEN1, PSEN2, PSENEN. Также мы включили в список анализа гены белков компонентов-регуляторов гамма-секретазы: CD147 (он же EMMPRIN) и TMED10 (он же P23), гены белков находящихся в специфическом регионе 21 хромосомы DownSyndromeCriticalRegion и связываемых с БА: DYRK (Dual-specificity tyrosine-regulated kinases), RCAN1 (regulator of calcineurin 1), ETS2 (v-etsavian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2) и гены белков связываемых с нейрональной дифференцировкой и БА: CREB (cAMP responsive element binding protein 1) и MAPT (microtubule-associated protein tau). Анализируя результаты измерений, мы столкнулись со значительным разбросом уровней экспрессии, так, например, мы наблюдали значительную достоверную разницу между линиями клеток как между группами сравнения (СД и здоровый контроль), так и внутри групп (Рис. 3.5). Данный эффект, по нашему мнению, связан с индивидуальными особенностями каждой линии клеток и состоянием культуры нейронов в момент выделения РНК при том, что для каждой точки мы брали результаты усреднения по как минимум трем различным независимым экспериментам. По этой причине, мы установили критерий различия в уровне экспрессии гена, только если усредненные уровни групп сравнения будет достоверно различаться между собой с уровнем  $p < 0,05$ . Таким образом, в результате проведенного анализа, мы установили, что из 13-и исследованных генов, уровни экспрессии только 5-х генов (APP, BACE2, TMED10, RCAN1, ETS2) достоверно отличались в нейронах СД от здорового контроля (Рис. 3.5). Примечательным является факт, того что четверо из этих генов находятся на 21-й хромосоме, а также то что усредненная экспрессия этих генов была всегда выше в клетках с СД, причем в каждом случае более чем в два раза.



**Рис. 3.6.** Анализ уровней экспрессии генов, традиционно связываемых с БА, в полученных культурах нейронов, методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Из тринадцати проанализированных генов достоверно отличный результат в сравнении групп СД и здорового контроля только у генов APP, BACE2, TMED10, RCAN1, ETS2.



#### **Раздел 4. Стволовые мезенхимные клетки в индивидуальном развитии.**

Показано, что популяции мезенхимных стромальных клеток (МСК) из селезенки зародышей и половозрелых крыс различаются по эффективности клонирования, экспрессии поверхностных антигенов CD73, CD90 и CD105 и остео- и адипогенным потенциам, что связано, вероятно, с затуханием миелопоэза и переходом к лимфопоэзу селезенки в постнатальном онтогенезе. Впервые в селезенке зародышей крысы обнаружены клетки, спонтанно дифференцирующиеся в миогенном направлении *in vitro*. Мышечная природа миотуб подтверждена маркерами скелетных мышц *myod*, десмин и миозин 2 типа и экспрессией генов *myod*, *myf5*, *myf6* и м-кадгерина, а функциональную зрелость - присутствием кластеров никотиновых холинорецепторов на их поверхности.

МСК из кости 20-суточных плодов крысы с зачатком костного мозга по эффективности клонирования в сотни раз превосходят таковые из костного мозга 10 дневных животных. Потенции к адипогенезу МСК из обоих источников сопоставимы, однако, МСК из кости плода обладают меньшей способностью к остеогенезу по сравнению костномозговыми МСК. Анализ экспрессии маркера миогенных клеток *myoD* в немышечных органах (селезенке, тимусе, сердце, желудке и кишечнике) в эмбриональном развитии крысы выявил присутствие единичных *myoD*-положительных клеток на 16 сутки в сердце, а на 20-е сутки — в сердце, кишечнике, тимусе и селезенке. На всех исследованных сроках миогенные клетки в желудке отсутствовали.

#### Исследование свойств мезенхимных стромальных клеток (МСК) плаценты и тимуса.

В плаценте и тимусе плодов крысы выявлены клоногенные стромальные клетки, частично удовлетворяющие критериям мезенхимных стромальных клеток (МСК) по фенотипу и потенциам. МСК из плаценты имели фенотип CD73+CD90+CD105+ и не дифференцировались в остео- и адипогенном направлениях; в ходе индивидуального развития эффективность их клонирования снижалась. МСК из тимуса были CD90+CD73- и обладали адипогенными, но не остеогенными потенциами.

Полученные результаты в совокупности с ранее полученными характеристиками МСК из других источников (костного мозга и селезенки) расширяют представления о формировании популяции МСК в онтогенезе и могут быть учтены при выборе источников МСК для клинического применения.

#### Оценка способности клеток из эмбриональных тканей к спонтанному миогенезу.

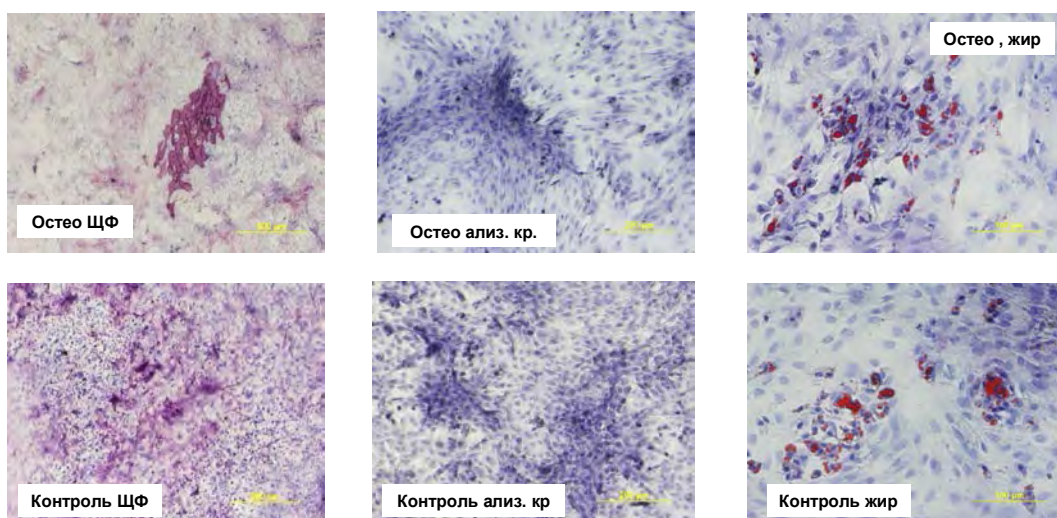
Впервые показано, что в первичных культурах стромальных клеток из сердца и кишечника 16-суточных зародышей, а также из тимуса и селезенки 20-суточных плодов крыс спонтанно образуются скелетно-мышечные миотубы, экспрессирующие маркер миогенной дифференцировки *MyoD*. Зрелые миотубы, экспрессирующие миозин, присутствуют только в культурах стромальных клеток из селезенки. Данные ПЦР-анализа выявили экспрессию м-РНК *MyoD* и м-

кадгерина в культурах клеток из исследуемых органов. Эти результаты, а также присутствие MyoD-положительных клеток в немышечных органах зародыша *in situ*, обнаруженное ранее, указывают на новую, нестандартную локализацию предшественников скелетных мышц в организме млекопитающих.

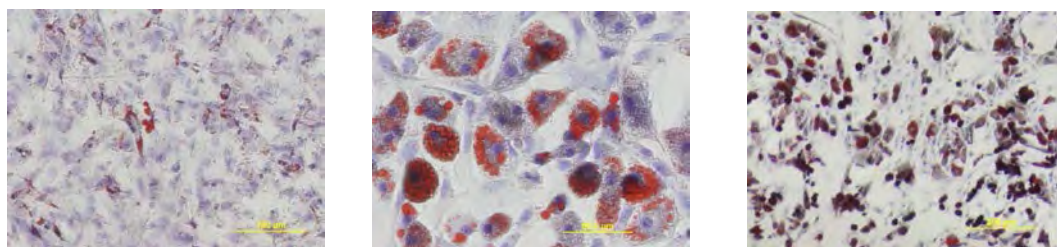
Характеристика МСК, присутствующих в различных тканях в пре- и постнатальном развитии.

Показано, что, несмотря на чрезвычайно высокую эффективность клонирования клеток из кожи и мышц плодов крыс 20-суток развития, содержание в этих тканях МСК, отвечающих каноническим характеристикам, не велико. Об этом свидетельствует слабая экспрессия (или в ряде случаев ее отсутствие) антигенов клеточной поверхности, характерных для МСК, неспособность к терминальной дифференцировке в остеогенном направлении клеток из мышц и кожи, а также слабые адипогенные потенции клеток из кожи (Рис. 4.1., 4.2.). Вместе с тем, развивающаяся мышечная ткань характеризуется сильно выраженными адипогенными потенциями, что свидетельствует, по-видимому, о высокой численности фибroadипогенных предшественников в популяции мезенхимных клеток.

**МСК из мышц. Остеогенные потенции, 14 сутки индукции**

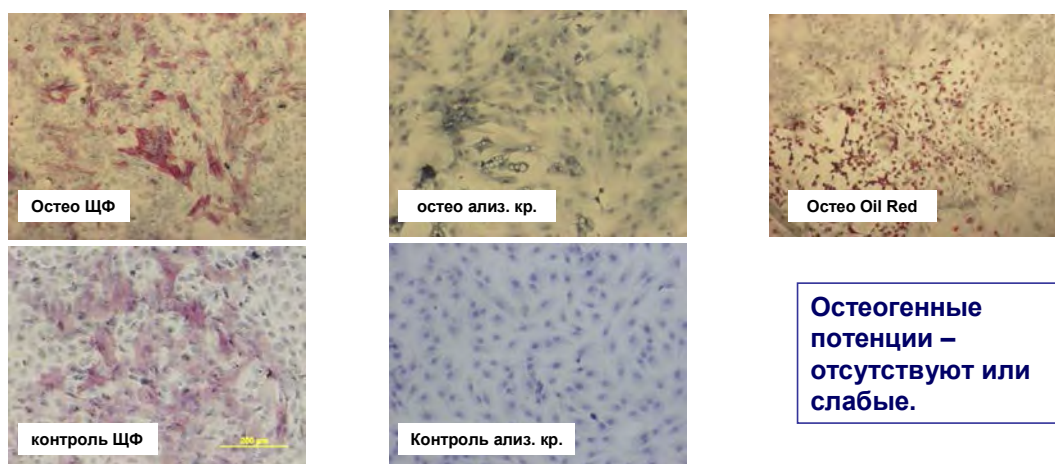


**МСК из мышц. Адипогенные потенции, 12-13 сутки индукции**

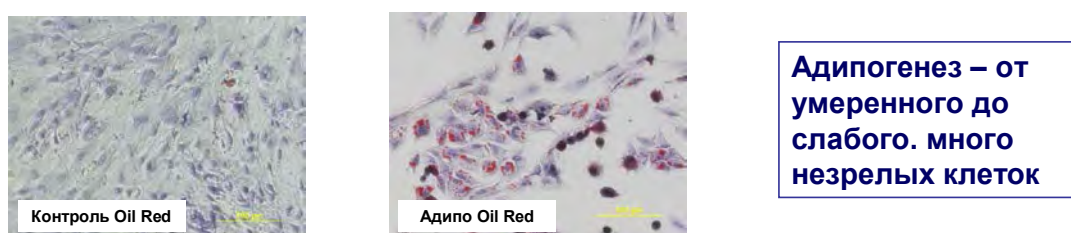


**Рис. 4.1.** Дифференцировочный потенциал МСК мышц

### МСК из кожи. Остеогенные потенции, 11 сутки индукции



### МСК из кожи. Адипогенные потенции, 10 сутки индукции



**Рис. 4.2.** Дифференцировочный потенциал МСК из других источников

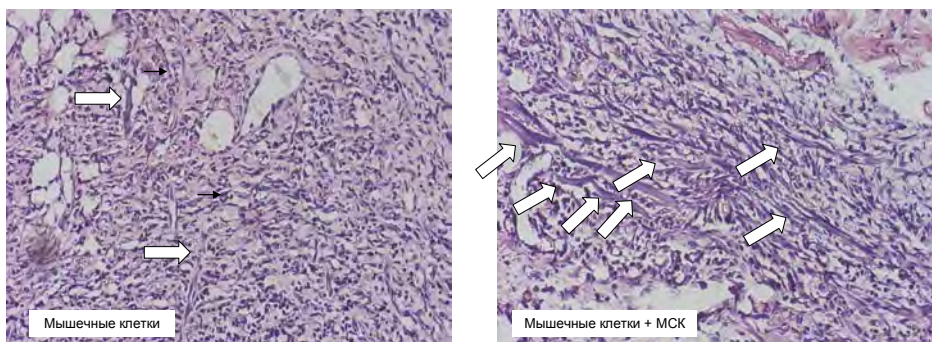
### Влияние МСК и их секреторных продуктов на восстановление мышечной ткани после повреждения.

На модели механического повреждения мышечной ткани показано, что введенные в область повреждения МСК оказывают положительное влияние на ход регенерации: уменьшают частоту фиброза (а иногда и его площадь), способствуют образованию сосудов и формированию зрелых мышечных волокон, в ряде случаев уменьшают площадь воспаления (табл 1., 2) Положительным действием обладает и кондиционированная среда, когда она вводится многократно или после лиофилизации, повышающей концентрацию ее содержимого (Рис. 4.3, 4.5, 4.6).

Табл. 4.1. Уменьшение площади воспаления и площади фиброза при отложенном введении МСК.

14 сутки	Частота фиброза	Площадь фиброза	Площадь воспаления
Контроль	100%	3,3%	7,9%
МСК	100%	0,7% (дост.p≤0,05)	0,7% (дост.p≤0,01)
Кож. фб.	100%	3%(отл. не дост.)	8,3%(отл. не дост.)

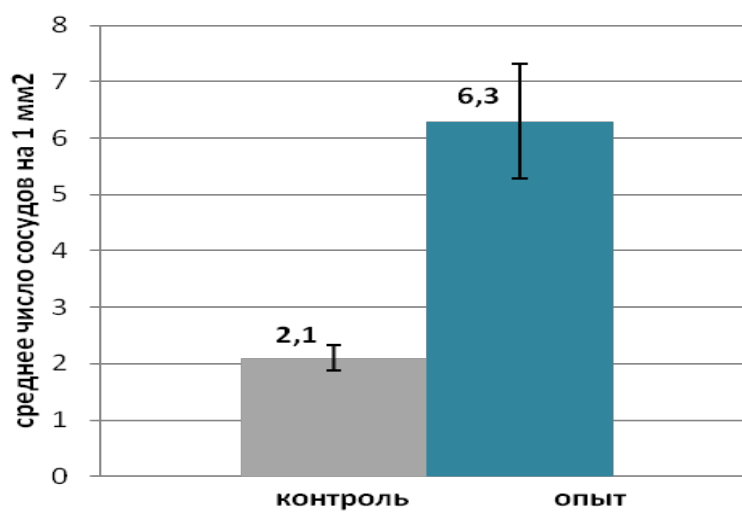
**Введение суспензии клеток из измельченных мышц совместно с МСК активирует миогенез.**



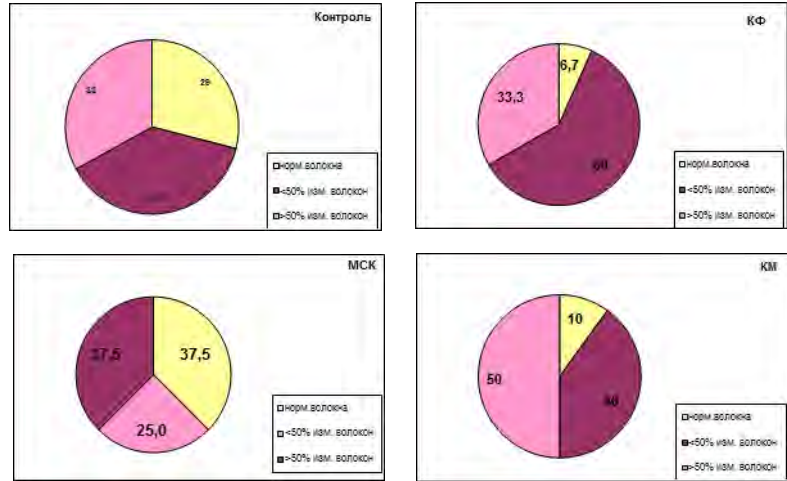
5 сутки после введения клеточной взвеси.

Число и размер вновь образованных миотуб увеличивается, и их образование происходит на 2 сут раньше по сравнению с контрольными образцами (7 сут без введения МСК).

**Рис. 4.3.**



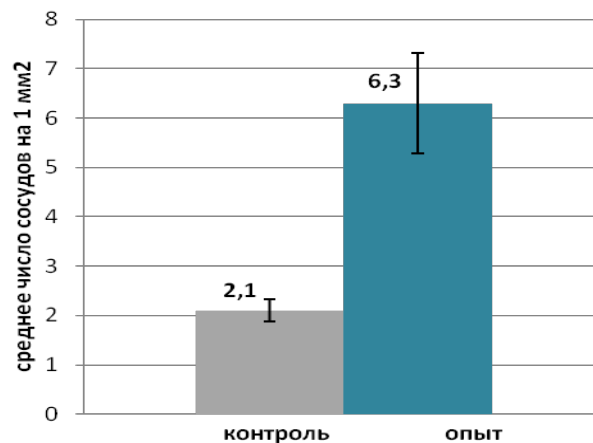
**Рис. 4.4.** Стимуляция ангиогенеза



**Рис. 4.5.** Увеличение относительного содержания нормальных волокон в поврежденной скелетной мышце

Табл. 4.2. Многократное введение среды, кондиционированной МСК, уменьшает площадь воспаления в поврежденной скелетной мышце.

<b>Контроль</b>	100%	1,06%	20,1%
<b>МСК КС (многокр.)</b>	80%	0,96% (не дост.)	6,52% (дост. $p \leq 0,05$ )



**Рис 4.6** Многократное введение среды, кондиционированной МСК, уменьшает площадь воспаления в поврежденной скелетной мышце

## **Заключение.**

В рамках данной темы получены новые фундаментальные результаты в области изучения механизмов морфо- и гистогенеза.

Физиологическая регенерация волосяного фолликула - исключительно перспективная модель для изучения фундаментальных аспектов регенерации. Обнаруженные в нашей работе многочисленные нарушения органогенеза кожи у лысеющих в постнатальном периоде мышей *wewal/wal* свидетельствует о том, что причины, ведущие к развитию наследственного заболевания, проявляются еще в период эмбриогенеза при закладке органа. В частности, процесс нарушения клеточной дифференциации, приводящий к деформации зрелых стержней волос, обнаруживается при формировании клеток-предшественников стержня волоса в эмбриональном эпидермисе. Нарушение дифференциации в эмбриональном развитии эпидермиса проявляется также в отсутствии своевременного ороговения. И хотя к моменту рождения, шерстный покров мутантных животных выглядит почти нормально, в дальнейшем проявившиеся в эмбриогенезе дефекты развития кожи приводят к серьезным последствиям в виде облысения. Это связано с тем, что в постнатальном периоде волосяной фолликул в большой степени сохраняет и воспроизводит регуляторную сеть, складывающуюся у эмбриона. Это необходимо для полноценной регенерации в ходе многократных циклов роста-дегенерации фолликулов. Исключение составляет процесс спецификации клеток дермального конденсата в эмбриогенезе, который впоследствии, будучи дефинитивной дермальной папиллой, существует на протяжении всей жизни организма. Мы обнаружили весьма интересные изменения в эмбриональной дерме мутантных животных. Во-первых, активность маркеров дермального зачатка фолликула проявлялась широко по дерме, а не ограничивалась местом формирования фолликула, во-вторых, можно было наблюдать агрегацию клеток дермы, положительных по маркерам дермального конденсата, в отсутствие видимых признаков фолликулогенеза в эпидермисе. Полученные результаты могут быть использованы для изучения так называемых «первых сигналов» в коже, которые запускают процесс формирования придатков и ограничивают сайты морфогенеза волосяных фолликулов.

Исследование морфогенетических возможностей эпителиальных клеток определенного фенотипа позволяет выявить локализацию морфогенетически активных популяций эпителиальных клеток, ответственных за самоподдержание и регенерацию эпителиальной ткани. На примере поднижнечелюстной железы мыши исследован морфогенетический потенциал клеток с фенотипом *Sca-1+*. В железе они располагаются в протоках с малым просветом. Предполагается, что эти просветы могут быть нишей стволовых эпителиальных клеток поднижнечелюстной слюнной железы мыши.

Изучение цитогенеза мезенхимных стромальных клеток в составе стромы кроветворных органов в разные периоды онтогенеза, роль их и их производных в формировании и поддержании кроветворного микроокружения, так называемой «ниши» кроветворной стволовой клетки, является новым и перспективным направлением исследований. В рамках данного методического подхода актуально проводимое систематическое изучение популяции мезенхимных стромальных клеток в процессе эмбрионального развития, а сравнительное исследование свойств пре- и постнатальных генераций МСК (клоногенной активности, адгезивных характеристик, фенотипических особенностей и потенциалов к дифференцировке) позволяет выявлять закономерности формирования дефинитивной популяции МСК в индивидуальном развитии.

Исследование способности эпителиальных стволовых клеток к дифференцировке в различных направлениях позволяет оценить их пластичность. В связи с недостаточной изученностью системы мезенхимных стромальных клеток в онтогенезе активно исследуются изменения основных характеристик МСК (эффективность клонирования, иммунофенотип и потенциалы к дифференцировке) в зависимости от стадии развития и их локализации в зародышевых органах.

Выяснение механизмов миграции стволовых клеток в очаг развития патологических процессов при мышечной дистрофии Ландузи-Дежерина обеспечивает установление клеточных механизмов развития данной патологии.

Именно для выявления роли ММСК в патологических процессах применяется модель мышечной дистрофии, проводится комплексное исследование взаимодействия мезенхимных стромальных клеток и миобластов в норме и при моделировании патологической ситуации *invitro*, (мышечной дистрофии Ландузи-Дежерина).

Использование технологии индуцированной плюрипотентности открывает широкие возможности для моделирования заболеваний человека *in vitro*. В частности, для моделирования нейродегенеративных заболеваний типа болезни Альцгеймера возможно использование клеток, полученных от пациентов с СД. Культуры нейральных клеток от доноров с СД обладают патологическим процессингом бета-амилоида по сравнению со здоровым контролем, что выражается в конечном итоге в накоплении гранул bA-42 в скоплениях нейронов в культуре клеток *in vitro*, и, таким образом, эти нейроны воспроизводят ранние этапы БА. Культуры нейральных клеток от доноров с СД можно использовать в качестве основы для создания тест-систем скрининга лекарственных препаратов от БА, поскольку ИПС клетки обладают неограниченным пролиферативным потенциалом, что позволяет масштабировать данную модель до размеров необходимых для проведения исследований.

## Список цитированной литературы

1. Zhu CH, Mouly V, Cooper RN, Mamchaoui K, Bigot A, Shay JW, Di Santo JP, Butler-Browne GS, Wright WE. Cellular senescence in human myoblasts is overcome by human telomerase reverse transcriptase and cyclin-dependent kinase 4: consequences in aging muscle and therapeutic strategies for muscular dystrophies // *Aging cell*. 2007; 6:515–523.
2. Barro M, Carnac G, Flavier S, Mercier J, Vassetzky Y, Laoudj-Chenivesse D. Myoblasts from affected and non-affected FSHD muscles exhibit morphological differentiation defects // *J Cell Mol Med* 2010; 14:275–289.
3. Kiseleva EV, Chermnykh ES, Vorotelyak EA, Volozhinb AI, Vasiliev AV, Terskikh VV. Differentiation capacity of stromal fibroblast-like cells from human bone marrow, adipose tissue, hair follicle dermal papilla and derma // *Cell Tissue Biol*. 2009; 3:42–49.
4. Gabriels J, Beckers MC, Ding H, De Vriese A, Plaisance S, van der Maarel SM, Padberg GW, Frants RR, Hewitt JE, Collen D, Belayew A. Nucleotide sequence of the partially deleted D4Z4 locus in a patient with FSHD identifies a putative gene within each 3.3 kb element // *Gene*. 1999; 236:25–32.
5. Ansseau E, Laoudj-Chenivesse D, Marcowycz A, Tassin A, Vanderplanck C, Sauvage S, Barro M, Mahieu I, Leroy A, Leclercq I, Mainfroid V, Figlewicz D, Mouly V, et al. DUX4c is up-regulated in FSHD. It induces the MYF5 protein and human myoblast proliferation // *PLoS ONE*. 2009; doi: 10.1371/journal.pone.0007482.



## Публикации по теме

### статьи

1. BouSaada Y., Dib C., Dmitirev P., Hamade A., Carnac G., Laoudj-Chenivresse D., Lipinski M., Vassetzky Y.S. Facioscapulohumeral dystrophy myoblasts efficiently repair moderate levels of oxidative DNA damage // *Histochem. Cell Biol.* 2016. DOI: 10.1007/s00418-016-1410-2
2. Dmitriev P., Kiseleva E., Kharchenko O, Ivashkin E, Pichugin A, Dessen P, Robert T, Coppee F, Belayew A, Carnac G, Laoudj-Chenivresse D, Lipinski M, Vasiliev A, Vassetzky YS. Dux4 controls migration of mesenchymal stem cells through the Cxcr4-Sdf1 axis // *Oncotarget.* 2016 Aug 18. DOI: 10.18632/oncotarget.11368.
3. Gnedeva K., Vorotelyak E., Cimadamore F., Cattarossi G., Giusto E., Terskikh V.V., Terskikh A.V. Derivation of hair-inducing cell from human pluripotent stem cells // *PLoS One.* 2015. V. 10(1). e0116892.
4. Kosykh A., Ngamjariyawat A., Vasylovska S., Konig N., Trolle C., Lau J., Mikaelyan A., Panchenko M., Carlsson PO, Vorotelyak E., Kozlova E.N. Neural crest stem cells from hair follicles and boundary cap have different effects on pancreatic islets *in vitro* // *Int. J. Neuroscience.* 2015. V. 125 (7). P. 547-554.
5. Markozashvili D., Pichugin A., Barat A., Camara-Clayette V., Vasilyeva N., Lelièvre H., Kraus-Berthier L., Depil S., Ribrag V., Vassetzky Y.S. Histone deacetylase inhibitor abexinostat affects chromatin organization and gene transcription in mantle cell lymphoma cells // *Gene.* 2016. DOI: 10.1016/j.gene.2016.01.017.
6. Meleshina A.V., Cherkasova E.I., Shirmanova M.V., Klementieva N.V., Kiseleva E.V., Snopova L.B., Prodanets N.N., Zagaynova E.V. Influence of mesenchymal stem cells on metastasis development in mice *in vivo* // *Stem Cell Res Ther.* 2015. V. 6. P. 15.
7. Rippa A., Leonova O., Popenko V., Vasiliev A., Terskikh V., Vorotelyak E. Early stages of we/we wal/wal mouse hair morphogenesis: light and fluorescent microscopy of the whole-mount epidermis // *BioMed Research International* V. 2014 (2014), Article ID 856978, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/856978>.
8. Rippa A., Terskikh V., Nesterova A., Vasiliev A., Vorotelyak E. Hair follicle morphogenesis and epidermal homeostasis in we/we wal/wal mice with postnatal alopecia // *Histochemistry and Cell Biology.* 2015. V. 143. P. 481–496.
9. Борисов М.А., Петракова О.С., Гвазава И.Г., Калистратова Е.Н., Васильев А.В. Клеточные подходы к лечению инсулинзависимого диабета // *Acta Naturae.* 2016. Т. 8. №3(30). С. 34-48.
10. Бродский В.Я., Воротеляк Е.А., Терских В.В., Васильев А.В., Мальченко Л.А., Конченко Д.С., Дубовая Т.К., Звезда Н.Д. Дофамин дезорганизует прямые межклеточные

- взаимодействия в культурах кератиноцитов; сравнение с гепатоцитами // Онтогенез. 2016. Т. 47. № 2. С. 92-98
11. Васильев А.В., Воротеляк Е.А., Терских В.В. Ниши стволовых клеток и регенеративная медицина // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2016. Т. 102. №3. С. 241-261.
  12. Вишнякова Х.С., Попов К.В., Воротеляк Е.А., Файзуллин Р.Р., Артюхов А.С., Егоров Е.Е. Возможная роль активации аутофагии в стимуляции регенерации // Молекулярная биология. 2013. т. 47, № 5, С. 796-805.
  13. Мещерякова Н.В., Дашинимаев Э.Б., Марахова А.И. Определение цитостатического действия различных концентраций протаргола на фибробласты дермы человека // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016 №4 (17): 59-61.
  14. Мучкаева И.А., Дашинимаев Э.Б., Артюхов А.С., Мягкова Е.П., Воротеляк Е.А., Егоров Е.Е., Вишнякова Х.С., Кравченко Ю.Е., Чумаков С.П., Терских В.В., Васильев А.В. Репрограммирование клеток дермальной папиллы человека до плюрипотентного состояния. // ACTA NATURAE. 2014. Том 6. №1 (20). С. 35-44
  15. Паюшина О.В. Кроветворное микроокружение и роль мезенхимных стромальных клеток в его организации // Успехи современной биологии. 2015. Т. 135. № 1. С. 52-63.
  16. Паюшина О.В. Локализация и функции мезенхимных стромальных клеток *in vivo* // Журнал общей биологии. 2015. Т. 76. № 2. С. 161-172.
  17. Паюшина О.В., Буторина Н.Н., Шевелева О.Н., Домарацкая Е.И. Сравнительный анализ субпопуляций мезенхимных стромальных клеток костного мозга и зародышевой печени, различающихся по чувствительности к 5-фторурацилу // Известия РАН. Серия биол. 2015. № 3. С. 258-264.
  18. Паюшина О.В., Домарацкая Е.И. Гетерогенность и возможная структура популяции мезенхимных стромальных клеток // Цитология. 2015. Т. 57. № 1. С. 31-38.
  19. Паюшина О.В., Домарацкая Е.И. Мезенхимные стромальные клетки как ресурс для регенерации // Жизнь без опасностей. Здоровье. Профилактика. Долголетие, 2014, №4. С.54-64.
  20. Петракова О.С., Ашапкин В.В., Штратникова В.Ю., Кутуева Л.И., Воротеляк Е.А., Борисов М.А., Терских В.В., Гвазава И.Г., Васильев А.В. Вальпроевая кислота может увеличивать потенциал гепатоцитарной дифференцировки клеток слюнной железы // Acta Naturae. 2015. Т.7 . № 4(27). С. 87-100.
  21. Риппа А.Л., Воротеляк Е.А., Васильев А.В., Терских В.В. Роль интегринов в формировании и гомеостазе эпидермиса и придатков кожи // Acta Naturae. 2013. т. 5. №4(19), с. 24-36.

22. Роговая О.С., Петракова О.С., Гвазава И.Г., Борисов М.А., Васильев А.В. Исследование жизнеспособности культивируемых клеток человека в суспензии // Вестник Московского Университета. Серия 16: Биол. 2016. №3. С. 44-48.
23. Роговая О.С., Файзулин А.К., Васильев А.В., Кононов А.В., Терских В.В. Реконструкция эпителия уретры кролика с помощью кератиноцитов кожи // Acta Naturae. 2015. Т. 7. № 1 (24). С. 74-81.

#### **Тезисы и материалы конференций**

1. Nosova Y.N., Serkova T.P., Shevtsova E.P., Kosykh A.V., Vorotelyak E.A., Lobas A.A., Gorshkov M.V., Nazarov A.A., Milaeva E.R. Lonidamine tethered ruthenium compounds as promising anticancer agents // International symposium “Modern trends in organometallic chemistry and catalysis” dedicated to the 90th anniversary of the academician M.E. Vol’pin
2. Payushina O., Butorina N., Sheveleva O., Bukhinnik S., Kozhevnikova M., Domaratskaya E. Phenotypic and functional features of mesenchymal stromal cells in hematopoietic organs during ontogeny. BIT’s 7th Annual World Congress of Regenerative Medicine & Stem Cell, 2014. Haikou, China, November 13-16, 2014. P. 197.
3. Бочарова Т.В., Паюшина О.В., Рахманинова Д.Д., Буторина Н.Н., Березина А.А., Шевелева О.Н., Домарацкая Е.И. Анализ влияния мезенхимных стромальных клеток на регенерацию кожи на модели полнослойной кожной раны. Сборник материалов II Национального конгресса по регенеративной медицине (Москва, 3-5 декабря 2015), С. 133-134.
4. Домарацкая Е.И., Шевелева О.Н., Рамазанова С.Г. Участие мезенхимных стромальных клеток в регенерации мышечной ткани (доклад). Сборник материалов II Национального конгресса по регенеративной медицине (Москва, 3-5 декабря 2015), с. 63-64.
5. Калабушева Е.П. Реконструкция ранних стадий формирования волосяного фолликула *in vitro* // Сборник тезисов конференции «Морфогенез в индивидуальном и историческом развитии: устойчивость и вариабельность», Москва, 2015г., с. 23-24.
6. Киселева Е.В., Сидорова М.В., Горбачева Л.Р., Струкова С.М. Неканонический пептид-агонист рецептора, активируемого протеазами, подобно активированному протеину с, стимулирует заживление раны эпителиального пласта. Седьмая всероссийская конференция «Клиническая гемостазиология и гемореология в сердечно-сосудистой хирургии» (с международным участием) Москва, 29-31 января 2015. Материалы конференции, с. 200-201.
7. Паюшина О.В., Березина А.А., Буторина Н.Н., Шевелева О.Н., Домарацкая Е.И. Характеристика способности мезенхимных стромальных клеток различной органной принадлежности к дифференцировке в организме реципиента. Сборник материалов II Национального конгресса по регенеративной медицине (Москва, 3-5 декабря 2015), С. 30-31.

8. Паюшина О.В., Буторина Н.Н., Шевелева О.Н., Домарацкая Е.И. Особенности субпопуляций мезенхимных стромальных клеток, различающихся по чувствительности к 5-фторурацилу. Научные труды IV Съезда физиологов СНГ. Сочи, Дагомыс, 8–11 октября 2014. Стр. 153.
9. Паюшина О.В., Бухинник С.С., Буторина Н.Н., Березина А.А., Никонова Т.М., Шевелева О.Н., Домарацкая Е.И. Сравнительная характеристика мезенхимных стромальных клеток костного мозга на разных стадиях онтогенеза крысы. Научные труды IV Съезда физиологов СНГ. Сочи, Дагомыс, 8– 1 октября 2014. Стр. 152-153.
10. Паюшина О.В., Бухинник С.С., Буторина Н.Н., Шевелева Н.Н., Домарацкая Е.И. Сравнительная характеристика мезенхимных стромальных клеток из кроветворных органов в пренатальном и раннем постнатальном онтогенезе. Сборник материалов Всероссийской конференции с международным участием «Биотехнология — от науки к практике» (23-26 сентября 2014 г., Уфа). Т. 2, стр. 61-64.
11. Рамазанова С.Г. Влияние мезенхимных стромальных клеток на миогенез *in vitro* и *in vivo*. Сборник XXII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2015», Москва, 13-17 апреля 2015. С. 180.
12. Рамазанова С.Г., Шевелева О.Н., Паюшина О.В., Буторина Н.Н. Миогенные предшественники в немышечных органах крыс. Сборник Международной научно-практической конференции ИЦРОН, «Основные проблемы естественных и математических наук», Волгоград, 10 октября 2015. С. 75-77.
13. Шевелева О.Н., Паюшина О.В., Рамазанова С.Г., Буторина Н.Н., Домарацкая Е.И. Спонтанная миогенная дифференцировка в первичных культурах клеток различных немышечных органов зародышей. Научные труды IV Съезда физиологов СНГ. Сочи, Дагомыс, 8–11 октября 2014. Стр. 153.
14. Шевелева О.Н., Рамазанова С.Г. Влияние мезенхимных стромальных клеток на восстановление мышечной ткани после повреждения . II Национальный конгресс по регенеративной медицине, Москва, 3-5 декабря 2015 года, С. 202-203.

Отчет по теме утвержден решением Ученого совета ИБР РАН, «27\_\_» декабря 2016 г.,  
Протокол № 14