



**Форма направления реферативно-библиографических сведений
о результатах научно-исследовательской, опытно-конструкторской и
технологической работы**

I. Сведения о НИОКТР

Номер государственного учета НИОКТР

Дата постановки НИОКТР на учет

AAAA-A19-119032190082-6	21/03/2019
-------------------------	------------

Наименование НИОКТР

-Механизмы клеточной дифференциации в морфогенезе и процессах восстановления
--

Руководитель НИОКТР

Фамилия, Инициалы

Ученая степень

Ученое звание

Воротеляк Е.А.	Доктор биологических наук	Член-корреспондент РАН
----------------	---------------------------	------------------------

II. Сведения об отчете

Номер государственного учета отчета

Дата постановки отчета на учет

AAAA-B20-220032090131-7	20/03/2020
-------------------------	------------

Наименование отчета

МЕХАНИЗМЫ КЛЕТОЧНОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ В МОРФОГЕНЕЗЕ И ПРОЦЕССАХ ВОССТАНОВЛЕНИЯ в рамках 50 «Биология развития и эволюция живых систем» Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 гг. (заключительный отчет)
--



Тематическая(-ие) рубрика(-и)

Индекс УДК

34.15.65; 62.33.31; 62.37.30; 34.03.37	577.21:616 577.2:591.2
--	------------------------

Коды международной классификации отраслей наук

01.00.00

Дата утверждения отчета

27/12/2019

Кол-во книг (томов)

1

Общее кол-во страниц

144

Номера книг (томов)/Кол-во страниц

1/144	2/0	3/0	4/0	5/0	6/0	7/0	8/0	9/0	10/0	11/0	12/0	13/0	14/0	15/0	16/0	17/0	18/0	19/0	20/0
-------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

Приложений

0

Таблиц

12

Иллюстраций

77

Библиография

125

Публикаций по результатам НИОКТР

12

Фамилия, инициалы

Должность

СНИЛС

Подпись

Руководитель организации-исполнителя

Васильев А. В.	Директор	00133521977	
----------------	----------	-------------	--

Место для печати

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ ИМ. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН
(ИБР РАН)

УДК 576.5

Рег. № ГЗ 0108-2019-0004

Рег. № НИОКТР АААА-А19-119032190082-6

УТВЕРЖДАЮ



Директор ИБР РАН
доктор биологических наук,
член-корреспондент РАН

А.В. Васильев

«27» декабря 2019 г.

ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

МЕХАНИЗМЫ КЛЕТОЧНОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ В МОРФОГЕНЕЗЕ И ПРОЦЕССАХ
ВОССТАНОВЛЕНИЯ

по Разделу № 50 «Биология развития и эволюция живых систем»
Программы фундаментальных научных исследований
государственных академий наук на 2013-2020 гг.

(заключительный отчет)

Руководитель НИР,
главный научный сотрудник,
доктор биологических наук,
член-корреспондент РАН

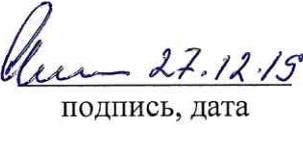
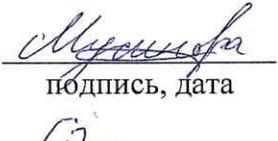
 27.12.19

Е.А. Воротеляк

подпись, дата

Москва 2019

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель, главный научный сотрудник, доктор биологических наук, член-корреспондент РАН	 27.12.19 подпись, дата	Е.А. Воротеяк (Введение, раздел 3)
Исполнители: Главный научный сотрудник, доктор биологических наук, профессор	 27.12.19 подпись, дата	В.В Терских (раздел 1)
Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук	 27.12.19 подпись, дата	Э.Б. Дашинимаев (раздел 2)
Руководитель, главный научный сотрудник, доктор медицинских наук	 27.12.19 подпись, дата	И.В. Лядова (раздел 4)
Главный научный сотрудник, доктор биологических наук	 27.12.19 подпись, дата	М.А. Александрова (раздел 5)
Старший научный сотрудник, кандидат медицинских наук	 27.12.19 подпись, дата	А.В Кузнецова (раздел 5)
Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук	 27.12.2019. подпись, дата	Я.Р. Мусинова (раздел 6)
Ведущий научный сотрудник, доктор биологических наук	 26.12.2019 подпись, дата	Е.С. Васецкий (раздел 6)
Главный научный сотрудник, доктор биологических наук, профессор	 27.12.19 подпись, дата	В.Я. Бродский (раздел 7)
Нормоконтроль, ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук	 26.12.2019 подпись, дата	Е.Б. Абрамова

РЕФЕРАТ

Отчёт 144 с., 7 разд., 77 рис., 12 таблиц, 125 источников, 12 публикации по теме
ДИФФЕРЕНЦИРОВКА, РЕГЕНЕРАЦИЯ, МОРФОГЕНЕЗ,
ТРАНСДИФФЕРЕНЦИРОВКА, ДЕРМАЛЬНАЯ ПАПИЛЛА, КЕРАТИНОЦИТЫ,
РАЗВИТИЕ, КОЖА, ЛАМИНИН, ФИБРОЕКТИН, ВОЛОСЯНОЙ ФОЛЛИКУЛ,
ИНДУЦИРОВАННЫЕ ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ КЛЕТКИ, НЕЙРАЛЬНАЯ АМИЛОИД,
КАРИОТИП, МИТОХОНДРИИ, МЕЗЕНХИМНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ,
НЕЙРАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ, ПЛАСТИЧНОСТЬ КЛЕТОЧНОГО ФЕНОТИПА,
СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ, ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ, РЕЦЕПТОР ФАКТОРА
НЕКРОЗА ОПУХОЛИ АЛЬФА, Т-ХЕЛПЕРЫ, КОЛЛАГЕН, ЯДРЫШКО, ТАТ-БЕЛОК,
ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ХРОМАТИНА, СИНДРОМ ДАУНА,
CRISPR/CAS9, ГЕННЫЙ НОКАУТ, ГЕПАТОЦИТЫ, РИТМ СИНТЕЗА БЕЛКА, СЕМАКС.

Целью данной работы является определение ключевых регуляторов (факторов) клеточной дифференцировки и морфогенеза, пластичности и перепрограммирования в моделях развития и регенерации.

Объектом исследования являются культура клеток кожи, индуцированные плюрипотентные клетки человека с нормальным кариотипом и трисомией по 21 хромосоме (синдром Дауна), а также мутантные линии индуцированных плюрипотентных клеток с делецией *TNFR1*, клетки ретинального пигментного эпителия человека, мезенхимные стромальные клетки, мышцы крыс, скаффолды коллагеновые, культура гепатоцитов крысы, компоненты внеклеточного матрикса, тканевые эквиваленты, культура В-лимфоцитов, Tat-белок, нейропротекторные пептиды семакс и HLDF-6.

Проведены исследования клеточной дифференцировки, эффектов генного нокаута, модуляции сигнальных путей и межклеточных взаимодействий в регуляции пластичности и морфогенеза в контексте онтогенеза и регенерации. Продемонстрировано влияние компонентов внеклеточного матрикса на эпидермальную и нейральную дифференцировку плюрипотентных клеток; показана способность к взаимной интеграции полученных клеток кожи в трехмерные клеточные системы; проведенный анализ транскриптомов (RNA-seq) полученных нейральных культур от доноров носителей синдрома Дауна подтвердил повышенную экспрессию генов, локализованных на 21-й хромосоме в клетках T21, а также обнаружили сдвиг экспрессии генов маркеров нейронов некоторых слоев коры головного мозга; с помощью метода CRISPR/Cas9 получены линии мутантных ИПСК человека с делециями в генах *TNFR1* и *ASIC1*; продемонстрировано, что доставка МСК в место повреждения мышцы и в виде суспензии, и на биосовместимых носителях повышает эффективность регенерации, получены новые данные по влиянию Tat белка на

культивируемые В-лимфоциты; установлено, что воздействие оФРФ на клетки РПЭ *in vitro* приводит к инактивации на ранних сроках сигнальных путей Wnt/ β -катенин и Notch, активации неканонического сигнального пути Wnt/PCP и модулированию BMP-сигналинга, что понижает уровень дифференцировки клеток; выявлены ранее неизвестные свойства нейропротекторных пептидов семакса и HLDF-6. Полученные результаты уточняют механизмы клеточной дифференцировки и пластичности, а также создают предпосылки для развития новых технологий биомедицине.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	7
ОБЩЕЕ ВВЕДЕНИЕ	8
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	10
Раздел 1. Клеточные и молекулярные механизмы морфогенеза кожи и ее придатков. Дифференцировочный и морфогенетический потенциал эпителиальных стволовых клеток.....	10
1.1 Введение	10
1.2 Материалы и методы.....	12
1.3 Результаты и обсуждение	20
1.4 Заключение.....	34
1.5 Список использованных источников.....	35
1.6 Отчетные публикации по разделу.....	37
Раздел 2. Изучение влияния вклада различных генов на метаболизм амилоида в культурах ИПСК с различным кариотипом.....	38
2.1 Введение	38
2.2 Материалы и методы.....	38
2.3 Результаты и обсуждение.....	42
2.4 Заключение.....	54
2.5 Список использованных источников.....	54
2.6 Отчетные публикации по разделу.....	55
Раздел 3. Разработка методов коррекции функции генов, связанных с заболеваниями у человека	56
3.1 Введение	56
3.2 Материалы и методы.....	57
3.3 Результаты и обсуждение	62
3.4 Заключение.....	80
3.5 Список использованных источников.....	81
3.6 Отчетные публикации по разделу.....	81
Раздел 4. Стволовые и родоначальные клетки в индивидуальном развитии. Роль стволовых и родоначальных клеток в формировании и восстановлении тканей	83
4.1. Введение	83
4. 2. Материалы и методы.....	85
4.3 Результаты и обсуждение	88
4.4. Заключение.....	97
4.5 Список использованных источников.....	98
4.6 Отчетные публикации по разделу.....	100
Раздел 5. Механизмы пластичности стволовых и прогениторных клеток в процессах регенерации различных структур нервной системы.....	101

5.1 Введение.....	101
5.2 Материалы и методы.....	102
5.3 Результаты и обсуждение	107
5.4 Заключение.....	117
5.5 Список использованных источников.....	118
5.6 Отчетные публикации по разделу.....	122
Раздел 6. Биогенез ядерных структур.....	123
6.1 Введение.....	123
6.2 Материалы и методы.....	124
6.3 Результаты и обсуждение	125
6.4 Заключение.....	130
6.5 Список использованных источников.....	130
6.6 Отчетные публикации по разделу.....	132
Раздел 7. Изучение цитологических, биохимических и физиологических механизмов прямых межклеточных взаимодействий	133
7.1 Введение.....	133
7.2 Материалы и методы.....	133
7.3 Результаты и обсуждение	134
7.4 Заключение.....	139
7.5 Список использованных источников.....	140
7.6 Отчетные публикации по разделу.....	142
ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ	143

ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

В настоящем отчёте применяют следующие термины, обозначения и сокращения с соответствующими определениями:

БСА – бычий сывороточный альбумин

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

ГПК – губка из пористого коллагена

ЖЭК – живой эквивалент кожи

ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

МСК – мезенхимные стромальные клетки

НСК – нейральные стволовые клетки

НСПК – нейральные стволовые прогениторные клетки

ППК – первичные половые клетки

ПСК – плюрипотентные стволовые клетки

ПЦР - полимеразная цепная реакция

РНК - рибонуклеиновая кислота

РПЭ - ретинальный пигментный эпителий

оФРФ – основной фактор роста фибробластов

DPBS – Dulbecco modified Phosphate Buffer Solution – фосфатно-солевой буфер

DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole – ядерный краситель

DMEM/F12 – среда для культивирования клеток

EGF – epidermal growth factor – эпидермальный фактор роста

ДМСО – диметилсульфоксид

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка

DSCR – Down syndrome critical region (критическая область синдрома Дауна)

FGF2 - фактор роста фибробластов 2

GFP – green fluorescent protein (зеленый флуоресцентный белок)

RFP – red fluorescent protein (красный флуоресцентный белок)

SIS – swine intestinal submucosa – децеллюляризованная стенка тонкой кишки свиньи

TNFαR – tumor necrosis factor alpha receptor

Th – Т-хелперы

VEGF - фактор роста сосудистого эндотелия

ОБЩЕЕ ВВЕДЕНИЕ

Изучение механизмов клеточной дифференцировки, пластичности, самоподдержания стволовых клеток в контексте развития, гисто- и морфогенезов, а также при регенерации остается ключевой проблемой современной биологии развития. Кроме того, новые знания, полученные в этой области, обосновывают применение новых биомедицинских технологий в стремительно развивающейся регенеративной медицине и других областях медицины. В то же время, исследования в области гисто- и морфогенеза, а также регенерации, клеточной пластичности, перепрограммирования, управляемой дифференцировке плюрипотентных стволовых клеток и других современных подходов клеточной и молекулярной биологии позволяют получить принципиально новые данные по фундаментальным механизмам развития и регенерации.

Для исследований в области дифференцировки, клеточной пластичности, биологии стволовых клеток, регенерации и морфогенеза используются самые различные экспериментальные модели. В данной работе в качестве объектов исследования использовали культуру клеток кожи, индуцированные плюрипотентные клетки человека с нормальным кариотипом и трисомией по 21 хромосоме (синдром Дауна), а также мутантные линии индуцированных плюрипотентных клеток с делецией TNFaR1, клетки ретинального пигментного эпителия человека, мезенхимные стромальные клетки, мышцы крыс, скаффолды коллагеновые, культура гепатоцитов крысы, компоненты внеклеточного матрикса, тканевые эквиваленты, культура В-лимфоцитов, Tat-белок, нейропротекторные пептиды семакс и HLDF-6.

Целью работы является определение ключевых регуляторов (факторов) клеточной дифференцировки и морфогенеза, пластичности и перепрограммирования в моделях развития и регенерации. Задачами на данном этапе было решение следующих вопросов: (1) исследование влияния компонентов внеклеточного матрикса на поддержание ИПСК человека и их дифференцировку в эпидермальном и нейральном направлениях, (2) оценка возможности интеграции полученных из ИПСК клеток кожи в трехмерные конструкции, (3) анализ транскриптомов (RNA-seq) нейральных культур, полученных из ИПСК от доноров носителей синдрома Дауна, (4) получение мутантных ИПСК человека с делециями в генах TNFaR1 и ASIC1, (5) оценка влияния МСК на регенерацию мышц, анализ результатов собственных исследований и данных литературы в области дифференцировки, «стволовости» и иммунологической памяти, поддерживаемой лимфоцитами CD4, (6) изучение действия оФРФ на клетки РПЭ, (7) изучение влияния экспрессии Tat белка в культивируемых В-лимфоцитах с целью выяснения механизмов

онкогенеза у ВИЧ-инфицированных пациентов, (8) определение действия нейропротекторных пептидов семакса и HLDF-6 на ритм белка в культурах гепатоцитов.

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности и актуальности выбранного направления работ.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

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

1.1 Введение

Важным событием, значительно расширившим сферу применения плюрипотентных стволовых клеток (ПСК) человека, стало получение индуцированных плюрипотентных клеток человека (ИПСК) в 2006 году [1]. Клеточные линии специализированных типов и тканеинженерные конструкции, полученные из аутологичных ИПСК, могут быть пригодными для регенеративной медицины, для моделирования заболеваний, для исследования гистогенеза тканей и морфогенеза органов, а также изучения фундаментальных механизмов дифференцировки. Получение из ИПСК линий эпидермальных и специализированных дермальных клеток позволяет исследовать эпителио-мезенхимные взаимодействия в ходе морфогенеза кожи, конструировать эквиваленты кожи изачасти придатков из прогениторных клеточных элементов, а также изучать закономерности дифференцировки клеток кожи и факторы, влияющие на ее эффективность.

Наибольшее влияние на дифференцировку ПСК оказывают следующие три группы факторов: растворимые факторы, межклеточные взаимодействия и состав внеклеточного матрикса [2]. Больше внимания традиционно уделялось изучению свойств растворимых факторов роста, цитокинов и других молекул паракринной регуляции. Однако, как показали многие исследования, внеклеточный матрикс оказывает огромное влияние на судьбу клеток, например, обеспечивает их активную пролиферацию с сохранением функционального состояния и стимулирует дифференцировку [3, 4]. Несмотря на то, что исследования свойств и роли внеклеточного матрикса в настоящее время очень популярны, многие аспекты взаимодействия внеклеточного матрикса с клетками пока остаются относительно малоизученными. Понимание роли компонентов внеклеточного матрикса в жизнедеятельности ПСК, помимо фундаментальной значимости, является важным при разработке методов их практического применения. Современные системы культивирования и дифференцировки плюрипотентных клеток, включающие питательные среды, компоненты внеклеточного матрикса, специализированные планшеты, производящиеся зарубежными компаниями, являются весьма дорогостоящими. Отечественная компания «Имтек» предоставляет спектр белков, потенциально применимых в культивировании ИПСК, стимуляции дифференцировки и для разработки

тканеинженерных конструкций. Культивирование ИПСК на таких субстратах, как ламинин, фибронектин, витронектин, коллаген I, III и IV типов, позволит выявить отдельные механизмы поддержания плюрипотентности и дифференцировки плюрипотентных клеток с одной стороны, и оптимизировать культуральные системы с другой.

Определение комплекса факторов, стимулирующих нейральную и эпидермальную дифференцировку, необходимо для реконструкции живых эквивалентов кожи (ЖЭК) при получении их из ИПСК человека. Эпидермальная дифференцировка необходима для получения зрелых кератиноцитов, в то время как нейральная дифференцировка является первой стадией в получении фибробластов дермы.

Потребность в создании ЖЭК обусловлена эффективностью технологии трансплантации аутологичных эквивалентов дермы и эпидермиса для лечения ожогов, хронических воспалений и иных повреждений покровных тканей. Перспективным направлением развития технологии является получение генетически модифицированных ЖЭК для заместительной терапии пациентов с генетическими заболеваниями кожи. Для таких целей лучше всего подходят аутологичные ЖЭК, полученные либо из клеток реципиента, выделенных из фрагмента его кожи, либо из их аналогов, сгенерированных в ходе дифференцировки аутологичных реципиенту ИПСК.

Существующие модели имеют ряд ограничений, в частности получаемые ЖЭК отличаются по своей структуре от естественного аналога и не включают многие важные структуры, такие как: волосяные фолликулы, потовые и сальные железы, меланоциты и другие кожные дериваты, имеющие большое значение для физиологии кожи. Именно поэтому следующим шагом в этой сфере является получение аутологичного ЖЭК с кожными дериватами из доступных и универсальных источников, какими могут служить ИПСК [5].

ЖЭК, полученный из дифференцированных из ИПСК клеточных линий, является репрезентативной моделью для фармакологических тестов, а также может использоваться для терапии при различных повреждениях кожного покрова и генетических заболеваниях кожи. ЖЭК также можно рассматривать как системы, создающие необходимое микроокружение для морфогенеза в них различных кожных дериватов, в частности недавно таким образом были получены зачатки волосяных фолликулов *in vitro* [6].

В настоящем исследовании было проведено комплексное исследование влияния отдельных компонентов внеклеточного матрикса отечественного производства на дифференцировку ИПСК в эпидермальном и нейральном направлениях. Кроме того, в результате дифференцировки ИПСК человека были получены и верифицированы клетки

дермальной папиллы (ДП) и кератиноциты, а также была предпринята попытка генерации ЖЭК в системе transwell при помощи полученных в ходе дифференцировки ИПСК клеток ДП и кератиноцитов, а также первичных клеток ДП и кератиноцитов в качестве исходного клеточного материала.

1.2 Материалы и методы

1.2.1 В экспериментах использовали ИПСК человека линии «Kyoto», полученные из клеточной коллекции ATCC (кат № ATCC® ACS-1023). Культивировали в среде mTeSR™1 (Stem Cell Technologies) на субстрате из матригеля в атмосфере 5% O₂, 5% CO₂. Смену культуральной среды проводили ежедневно, в стерильных условиях. По мере необходимости осуществляли пассирование клеток. При пассировании использовали три типа реагентов для открепления клеток от субстрата: диспаза, Accutase™ и ReLeSR™ а также добавляли ROCK-ингибитор в концентрации 10 мкМ.

1.2.2 В качестве контрольного матрикса и основного субстрата для культивирования клеток использовали Матригель (BD Bioscience). В экспериментах использовали компоненты внеклеточного матрикса человека производства отечественной биотехнологической фирмы «ИМТЕК» (таблица 1.1).

Таблица 1.1 - Используемые в эксперименте компоненты внеклеточного матрикса человека

Название компонента	Каталожный номер	Источник
Коллаген I	H C11	Плацента человека
Коллаген III	H C33	Плацента человека
Коллаген IV	H C44	Плацента человека
Фибронектин 1	H Fne-C	Плазма крови человека
Витронектин	H Vne-C	Плазма крови человека
Ламинин 5	H Lam-C	Плацента человека

Лиофилизированные коллагены I, III и IV растворяли в 0,1% растворе уксусной кислоты для получения стокового раствора, после чего хранили при +4°C. Для сорбции на культуральных планшетах стоковый раствор разбавляли DPBS без Ca₂₊ и Mg₂₊ до нужной концентрации, вносили в лунки планшета и инкубировали при +37°C в течение 1 часа. Лунки с сорбированным матриксом промывали культуральной средой. Стоковые растворы витронектина и ламинина получали путём растворения лиофильных белков в буфере Трис-HCl pH 7,5 (Sigma). Полученные растворы хранили при +4°C. Фибронектин поставлялся в форме уже готового стокового раствора. Для сорбции на культуральных планшетах стоковые растворы фибронектина и ламинина разбавляли DPBS без Ca₂₊ и

Mg₂⁺ до нужной концентрации, вносили в лунки планшета и инкубировали при +37°C в течение 1 часа. Лунки с сорбированным матриксом промывали культуральной средой. Сорбцию витронектина дополнительно проводили на стеклянных слайдах (Ibidi) и планшетах из неадгезивного пластика (Cellstar). Стоковый раствор разбавляли DPBS без Ca₂⁺ и Mg₂⁺ до нужной концентрации, вносили в лунки планшета и инкубировали при +37°C в течение 3 часов. Лунки с сорбированным матриксом промывали культуральной средой.

1.2.3 Для направленной дифференцировки в эпидермальном направлении использовали дифференцирующую среду на основе DK-SFM (Invitrogen) с добавлением ретиноевой кислоты в концентрации 1 мкМ, BMP-4 в концентрации 25 нг/мл. При пассировании добавляли ROCK-ингибитор в концентрации 10 мкМ. Проводили высев ИПСК на интересующие матрицы и в течение следующих 4 дней использовали для ежедневной смены дифференцирующую среду. При дальнейших сменах среды использовали DK-SFM. Спустя сутки после высева клеток на субстраты и до окончания эксперимента клетки культивировали при постоянной температуре 37°C в газовой среде, содержащей 21% кислорода и 5% углекислого газа. Успешность дифференцировки оценивали иммуноцитохимическим методом, анализируя экспрессию специфических маркеров эпидермальной дифференцировки: P63, кератинов 18 и 14, а также фактора плюрипотентности Sox2. На 1 и на 3 неделе дифференцировки клеточный материал использовали для выделения РНК в целях получения матриц кДНК и дальнейшего количественного ПЦР анализа (количественная оценка экспрессии Oct4, Nanog, Sox2, P63, K18, K5, K14, K1, K10).

1.2.4 Запуск дифференцировки в нейральном направлении осуществляли путём получения из ИПСК нейросфер. Для этого проводили высев ИПСК в чашки Петри с низкой адгезивностью (Sigma). Подмену 50% объёма среды NIK проводили через день. В состав дифференцирующей среды, помимо Neurobasal medium (Gibco), входили также: 50x Neural Induction Supplement, 200 мМ Glutamax (Gibco) и пенициллин/стрептомицин в концентрациях 0,25 мкг/мл и 10 мкг/мл соответственно. Примерно через 5 суток формировались готовые для проведения экспериментов нейросферы, которые затем переносили в лунки планшетов с нанесёнными матриксами. Смену среды осуществляли через день. Спустя сутки после посева нейросфер и до окончания эксперимента клетки культивировали при постоянной температуре 37°C в газовой среде, содержащей 5% O₂ и 5% CO₂. Успешность дифференцировки оценивали иммуноцитохимическим методом, анализируя экспрессию специфических маркеров нейральной дифференцировки Pax6, β3-tubulin и Nestin, а также маркера плюрипотентности Oct4.

1.2.5 Для выделения РНК использовали коммерческий реактив RNazol®RT (Molecular Research Center). Для очистки образца выделенной РНК от остатков геномной ДНК и дальнейшего проведения обратной транскрипции использовали специализированный коммерческий набор «QuantiTect® Reverse Transcription Kit» (Qiagen). Для проведения ОТ-ПЦР использовали набор «qPCRMix-HS SYBR+LowROX» (Евроген). Количественный ПЦР анализ проводили при помощи амплификатора LightCycler96 (Roche), с использованием праймеров, указанных в таблице 1.2. Применяли следующую программу: 10 минут при 95°C, затем 45 циклов, каждый из которых включал в себя 20 секунд при 95°C, 20 секунд при 60°C и 30 секунд при 72°C.

Таблица 1.2 - Праймеры для количественного ПЦР анализа экспрессии генов человека

Название гена	Последовательность прямого праймера	Последовательность обратного праймера
GAPDH	5'CATCAAGAAGGTGGTGAAGCAG3'	5'TCAAAGGTGGAGGAGTGGGT3'
Oct4	5'ACGACCATCTGCCGCTTTGA 3'	5'CTTCCTCCACCCACTTCTGC 3'
Sox2	5'CCCCTGTGGTTACCTCTTCCTCC3'	5'GTGCCGTTAATGGCCGTGCC3'
Klf4	5'TTGAAAGGTTTGAGACGGAACAGG3'	5'CCAGGGTCAGCTCATCCAGCA3'
Nanog	5'CAGTCCCAAAGGCAAACAAC3'	5'ATCTGCTGGAGGCTGAGGTA3'

1.2.6 Окрашивание клеток проводили непрямым иммуноцитохимическим методом. Для фиксации клеток использовали 4% раствор параформальдегида (ПФА) (Sigma-Aldrich) в DPBS без Ca₂⁺ и Mg₂⁺. Вносили в лунки раствор первичных антител и инкубировали при +4°C в течение ночи (16-18 часов). Для приготовления раствора первичных антител в соответствующем разведении (таблица 1.3) использовали 5% раствор бычьего сывороточного альбумина (Химмед) в DPBS без Ca²⁺ и Mg²⁺, в состав которого входили также: 1% TritonX-100 (AppliChem), 1% Tween 20 (AppliChem) и азид натрия (Sigma).

Таблица 1.3 - Используемые первичные антитела

Антиген	Каталожный номер	Производитель	Разведение	Подтип
Oct4	MAВ4401	Millipore	1:50	Моноклональные IgG1 мыши, клон 10H11.2
Sox2	3579	CellSignalling	1:100	Моноклональные IgG кролика, клон D6D9
Кератин 18	ab668	Abcam	1:200	Моноклональные IgG1 кролика, клон C-04
Кератин 14	ab181595	Abcam	1:500	Моноклональные IgG кролика, клон EPR17350
P63	SC8431	Santa Cruz	1:50	Моноклональные IgG2a мыши
Рах6	ab195045	Abcam	1:50	Моноклональные IgG кролика, клон EPR15858

Nestin	MAB2736	R&D systems	1:50	Поликлональные IgG мыши
β 3-tubulin	ab18207	Abcam	1:50	Поликлональные IgG кролика

Лунки промывали раствором DPBS без Ca_2^+ и Mg_2^+ 4 раза по 15 минут и вносили в них раствор вторичных антител, после чего инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 1 часа. Для приготовления раствора вторичных антител (Таблица 1.4) использовали предварительно приготовленный раствор DPBS без Ca_2^+ и Mg_2^+ содержащий 1 мг/мл DAPI (Invitrogen). Лунки промывали раствором DPBS без Ca_2^+ и Mg_2^+ 3 раза по 5 минут. Готовые к микроскопии клетки находились в растворе DPBS без Ca_2^+ и Mg_2^+ .

Таблица 1.4 - Использованные вторичные антитела

Антиген, подтип	Флюорофор	Каталожный номер	Производитель	Разведение
Donkey anti-mouse IgG (H+L) Secondary Antibody	AlexaFluor 488	A-21202	Invitrogen	1:500
Goat anti-rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody	AlexaFluor 546	A-11010	Invitrogen	1:500
Goat anti-rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody	AlexaFluor 488	A-11008	Invitrogen	1:500
Goat anti-mouse IgG (H+L) Secondary Antibody	AlexaFluor 555	A-21422	Invitrogen	1:500

1.2.7 Фазово-контрастную и флуоресцентную микроскопии колоний клеток осуществляли при помощи инвертированного микроскопа Olympus IX51, оснащенного камерой DP70. Для получения цифровых изображений использовали программное обеспечение DPcontroller и DPmanager. Оценку адгезии и роста колоний клеток проводили путём анализа фотографий, полученных при помощи фазово-контрастной микроскопии. Отличия считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$, на основании критерия Манн-Уитни.

1.2.8 Для оценки эффективности проведенной дифференцировки использовали фотографии, полученные при помощи флуоресцентной микроскопии. При анализе использовали программное обеспечение ImageJ. Для каждой фотографии анализировали долю экспрессирующих гены-маркеры ядер относительно всех присутствующих на фотографии ядер. Отличия считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$, на основании критерия Манн-Уитни.

1.2.9 Клетки ДП получали из плюрипотентных клеток через промежуточную стадию нейральных стволовых прогениторных клеток (ИПСК-НСПК). Нейральную дифференцировку индуцировали с применением среды Neurobasal (Gibco) с добавлением

Neural induction kit (Gibco) в течение 21 суток. ИПСК-НСПК дифференцировали в ИПСК-ДП под действием сыворотки. ИПСК-НСПК перемещали в среду для дифференцировки: DMEM/F12 (Панэко) с добавлением 10% ЭТС (Gibco 10270), 1мМ L-глутамина (Gibco), 1мМ антибиотика (пеницилин и стрептомицин) (Gibco) еще на 21 сутки.

После дифференцировки клеточный материал использовали для выделения РНК в целях получения матриц кДНК и дальнейшего количественного ПЦР анализа (количественная оценка экспрессии версикана, виментина, нестина, фибронектина, α ГМ, β -3-тубулин, Sox2 и Nanog).

1.2.10 В качестве контрольных культур использовали первичные клетки человека.

Биоптаты кожи были любезно предоставлены МНИОИ им П.А. Герцена - филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России с информированного согласия доноров. Кожу промывали в растворе Хэнкса (Панэко) с добавлением 1,2 % гентамицина (Gibco).

Для выделения эпидермальных кератиноцитов с биоптатов кожи удаляли дермальную ткань и помещали в 0,2% раствор диспазы и инкубировали при температуре +4° в течение 12 часов. Далее отделяли эпидермальный пласт и перекладывали в раствор трипсина (50% трипсина (Gibco) и 50 % DPBS (ПанЭко)) на 25 минут в термостат на +37°С. Эпидермальный пласт механически разбивали до формирования одноклеточной суспензии клеток. Кератиноциты культивировали на среде DMEM/F12 (ПанЭко) с добавлением 10 нг/мл EGF (Gibco), 5 мкг/мл инсулина (Gibco), 10⁻⁶ М изопретенолола (Gibco), 10% ЭТС (Gibco), 1мМ глутамина (Gibco) и антибиотика (1мМ пеницилин/ 1мМ стрептомицин) (Gibco). Через сутки культуру переводили на среду CNT-07 (CellnTec).

Для выделения клеток дермальной папиллы кожу с волосистой части головы нарезали на полоски 1-2 см шириной, затем перемещали в раствор 0,5% диспазы и инкубировали при температуре +4°С в течение 12 часов. Далее механически отделяли жировую ткань с волосяными луковицами и инкубировали в 0,2% растворе коллагеназы при +37°С до полной диссоциации жировой ткани. Луковицы высаживали центрифугированием при 200G в течении 10 минут. Далее их инкубировали в растворе 0,5% коллагеназы при +37°С в течение 3 часов. Для удаления единичных клеток проводили серию центрифугирований на низких оборотов. Выделенные ДП культивировали на среде Amniotax –II (Gibco)

Культивирование осуществляли в условиях 21% кислорода и 5% углекислого при +37°.

1.2.11 Для лентивирусной трансфекции клетки чДП и ИПСК-ДП инкубировали с вирусными частицами несущими ген красного флюоресцентного белка TagRFP (RFP)

(Евроген) в концентрации, превышающей концентрацию клеток в 10 раз, в бессывороточной среде AmnioMAX – II с добавлением полибрена (Sigma).

1.2.12 Анализ экспрессии специализированных маркеров проводили путем количественного ПЦР анализа в реальном времени.

Выделение РНК проводили реактивом RNazol (Sigma) в соответствии с рекомендациями производителя. Обратную транскрипцию проводили с использованием QuantyTest Reverse Transcription Kit (Qiagen).

Подготовка растворов для проведения ПЦР проводилась в соответствии со стандартным протоколом, описанным на сайте Thermofisher при помощи набора qPCRMix-HS SYBR+LowROX (Евроген). Финальный объем смеси на 1 реакцию составлял 25 мкл. Для проведения одной реакции использовали по 5 мкл смеси для ПЦР в реальном времени с флюоресцентным красителем SYBR green (Евроген), 0,3 мкМ прямого и обратного праймера (Евроген) (таблица 1) и 1 мкл кДНК. ПЦР проводили на системе для проведения ПЦР в реальном времени Bio-rad CFX96 C1000 Touch. Стандартизация результатов проводилась по уровню экспрессии GAPDH. Результаты нормировали с использованием калибровочной кривой, полученной на основе реакций с использованием геномной ДНК. Во всех экспериментах для стандартизации по каждому праймеру использовали контрольную ДНК в 4 концентрациях: 100, 10, 1 и 0,1 мМ.

Таблица 1.5 - Последовательности праймеров, использованных для ПЦР в реальном времени

Название гена	Последовательность праймеров
Версикан	F=CAGCTCTTTGCTGCSTATGA R=CTCCTGCCTTTCCCATCTTA
Виментин	F=TACAGGAAGCTGCTGGAAGG R=ACCAGAGGGAGTGAATCCAG
ГМА	F=AGCCAAGCACTGTCAGGAAT R=CCAGAGCCATTGTCACACAC
Фибронектин	F=GACGCATCACTTGCACCTTCT R=GCAGGTTTCCTGATTATCCT
Нестин	F=TGTGGCAAAGGAGCCTACTC R=ATGGAGCAGGCAAGAGATTC
β-3-тубулин	F=AAAAGGCTTCACAAGGGAAAGG R=TCCGAGTCGCCCACGTAGTT
CD133	F=AATCTCCCTGTTTGGTGATTT R=TTTTCTGTTTGGTGGGTTTT
GAPDH	F=CGTAGCTAGGCCTCAAGAC R=GCTGCGGGCTAATCAATTTATAG
K5	F=GCAGATCAAGACCCTCAACAAT R=CCACTTGGTGTCCAGAACCT
K10	F=CTGCTTCAGATCGACACAATGC R=GGCGCAGAGCTACCTCATT
K14	F=CCTCCTCCCAGTTCTCCTCT R=CCTCCTCCCAGTTCTCCTCT
K18	F=TGATGACACCAATATCACACGA R=GGGCTTGTAGGCCTTTTACTTC
Klf4	F=TTCTCCACGTTTCGCGTCT R=CCCAGTCACAGTGGTAAGGTTT
Nanog	F=TGTCCAAGAGAAAGCATAAGAAAA R=TGGAGGCCAAAATAGGAAGA
Oct4	F=TGTCCAAGAGAAAGCATAAGAAAA R=CTGCTGGGCATCGTAAGTATC
Sox2	F=TTGCTGCCTCTTTAAGACTAGGA R=TAAGCCTGGGGCTCAAACCT

Каждый эксперимент проводили в трех независимых повторах, полученные значения показаны в виде среднего арифметического. Доверительные интервалы представлены в виде стандартного отклонения. Проверку статистической значимости полученных выборок осуществляли при помощи непараметрического критерия Манн-Уитни, который был выбран, поскольку распределение получаемых при ПЦР в реальном времени значений отлично от нормального.

1.2.13 Для генерации ЖЭК использовались следующие клеточные линии:

- RFP-меченные, полученные из ИПСК клетки ДП;
- Полученные из первичной культуры человеческой кожи клетки дермальной папиллы (чДП);

- Кератиноциты, полученные в ходе дифференцировки ИПСК (ИПСК-Кц);
- Кератиноциты, полученные из первичной культуры человеческой кожи (чКц).

Для генерации ЖЭК был использован готовый набор для создания ЖЭК CellnTec PRFT-24, включающий набор культуральных сред и планшеты с поликарбонатовыми мембранами типа Transwell. Работа проходила в соответствии с оригинальным протоколом Full Thickness Skin Models (www.CELLnTEC.com).

Перед посадкой эпидермальные и дермальные клеточные линии культивировали в течение 2 недель на специализированных средах. Клетки ДП культивировали на CNT-PR-F (CellnTec), а кератиноциты на CNT-PR (CellnTec) в условиях 21% кислорода и 5% углекислого газа.

После предкультивирования клеточных линий клетки ДП в среде CNT-PR-F помещали на мембрану толщиной 0,22 микрона в специальной вставке (CellnTec) (по 50×10^3 клеток на вставку), через 10 дней культивирования клеток на среде CNT-PR-F (CellnTec), на сформированный дермальный слой помещали кератиноциты в среде CNT-PR-FTAL (CellnTec) (по 120×10^3 клеток на вставку). Через 3 дня среду на поверхности кератиноцитов отбирали, и эпидермальный слой начинал взаимодействовать непосредственно с воздушной средой. Еще через 12 дней мембрану с ЖЭК фиксировали.

8. Для подготовки к иммуногистохимическому анализу ЖЭК в подставках на мембране сначала промывали PBS, затем фиксировали в 4% растворе параформальдегида (Sigma) в течение часа, после чего оставляли в насыщенном 60% растворе сахарозы (Sigma) на сутки.

Мембрану с ЖЭК отделяли от подставки. В форму для заключения наливали ОСТ (Gibco) и погружали внутрь мембраны с ЖЭК клетками вверх, после чего формы замораживали в жидком азоте. Полученные блоки перемещали на -80°C . За 2 часа до начала работы на криостате, образцы перемещали на -20°C .

Окраску 10мкм срезов с ЖЭК осуществляли в соответствии со следующим протоколом. На образцы наносили PBS (Панэко) с 5% ЭТС и инкубировали 20 минут при комнатной температуре. После этого на препараты наносили раствор первых антител в соответствующем разведении (таблица 1.6) в растворе для иммуногистохимии (0,5 % Triton x100 (Sigma), 5% БСА (Sigma), несколько кристаллов азида натрия (Sigma) на PBS) и инкубировали ночь при $+4^{\circ}\text{C}$. Далее образцы промывали и вносили соответствующие вторичные антитела IgG (H+L) кролика, конъюгированные с флуорохромом Alexa 488, в разведении 1:500. Ядра докрашивали DAPI в концентрации 1мг/мл. Для заключения препаратов использовали среду TDE (Aberriog). Съемка препаратов с ЖЭК проводилась на флуоресцентном микроскопе Olympus ix73 с фотокамерой Olympus DP74.

Таблица 1.6 - Список первых антител, использованных для иммуноцитохимического выявления маркеров

Антиген	Каталожный номер	Производитель	Разведение	Подтип
Фибронектин	Ab2413	Abcam	1 : 200	Поликлональные IgG кролика
K14	Ab181595	Abcam	1 : 500	Моноклональные IgG кролика [EPR17350]
Коллаген IV	Ab6586	Abcam	1 : 100	Поликлональные IgG кролика

1.2.14 Для гистохимического окрашивания гемтоксилином и эозином срезы ЖЭК окрашивали сначала гематоксилином Майера в течение 10 минут, а затем эозином в течение 30 секунд с промежуточной промывкой в дистиллированной воде с последующим заключением в Био Маунт (BioOptica).

1.3 Результаты и обсуждение

1.3.1 Влияние компонентов внеклеточного матрикса на эффективность эпидермальной дифференцировки.

Было выявлено влияние различных субстратов на эффективность ранних этапов направленной дифференцировки ИПСК в эпидермальном направлении. На всех матриксах к окончанию эксперимента присутствовали клетки с морфологическими признаками дифференцировки в эпидермальном направлении (рисунок 1.1, 1.2). Наибольшую интенсивность роста колоний клеток, близкую к контролю, наблюдали на ламинине и фибронектине: к 7 суткам культивирования в лунках формировался сплошной слой клеток, в некоторых местах наблюдали утолщения из более, чем одного слоя клеток.

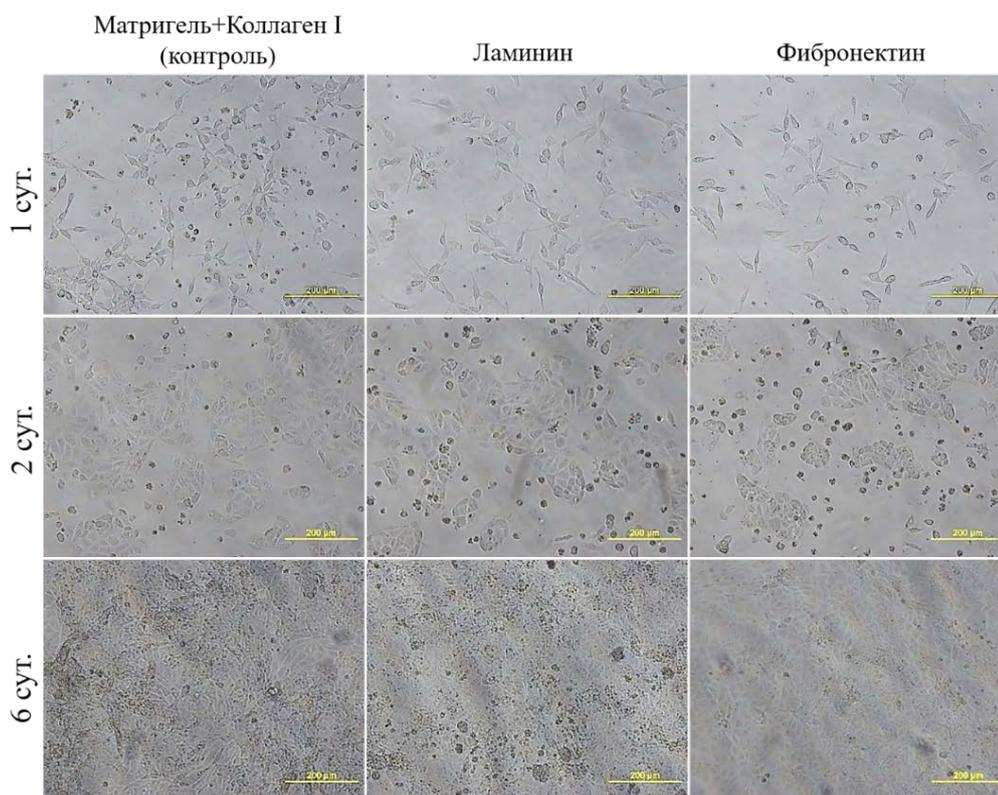


Рисунок 1.1 - Адгезия и рост колоний клеток на различных матриксах на ранних этапах эпидермальной дифференцировки. Фазово-контрастная микроскопия. Масштабный отрезок – 200мкм

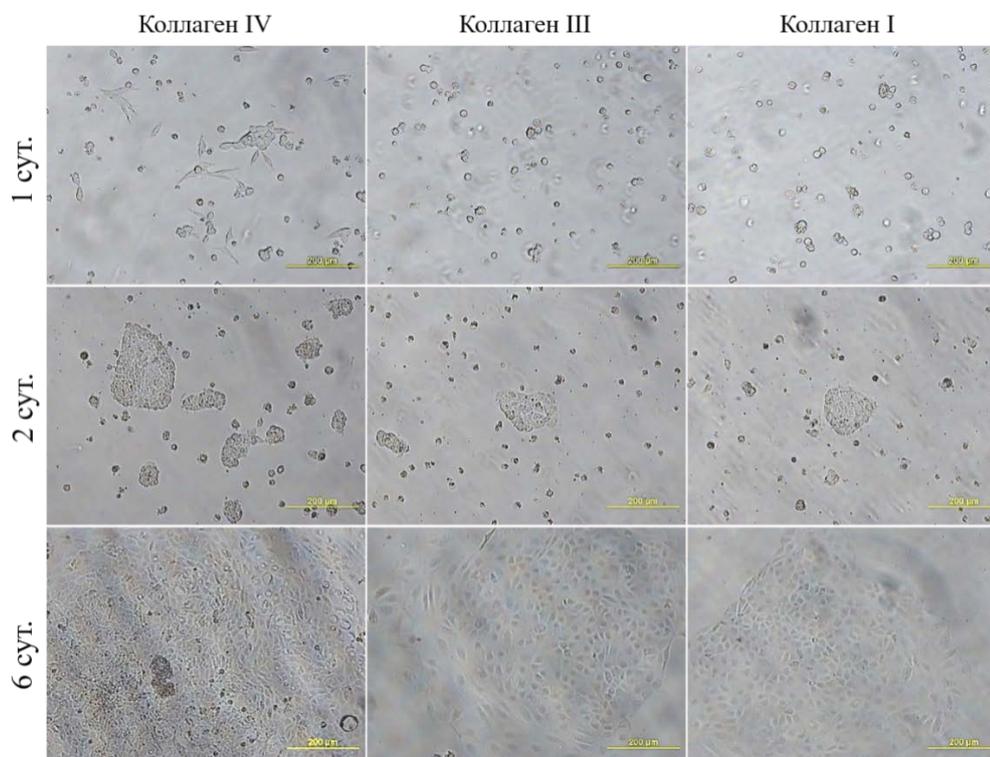


Рисунок 1.2 - Адгезия и рост колоний клеток на различных матриксах на ранних этапах эпидермальной дифференцировки. Фазово-контрастная микроскопия. Масштабный отрезок – 200мкм

При иммуноцитохимическом анализе оценивали экспрессию некоторых маркеров эпидермального пути дифференцировки: кератина 18, кератина 14 и Р63. Кроме того, анализировали экспрессию Sox2 – маркера плюрипотентности, экспрессия которого по мере протекания эпидермальной дифференцировки подавляется. На контрольном субстрате, фибронектине и коллагене III были обнаружены участки колоний, содержащие клетки с высоким уровнем экспрессии одного из ранних маркеров эпидермальной дифференцировки – кератина 18 (рисунок 1.3, 1.4). Участки с экспрессией данного маркера присутствовали также на ламинине и коллагенах IV и III, однако на данных субстратах его экспрессия была понижена. Для более позднего маркера эпидермальной дифференцировки, кератина 14, была показана его пониженная, по сравнению с контролем, экспрессия у коллагенов IV, III и I (рисунок 1.5, 1.6). При анализе экспрессии Р63, была обнаружена его пониженная, по сравнению с контролем, экспрессия для клеток на коллагене III и I (рисунок 1.7). При этом для ламинина и фибронектина процент экспрессирующих Р63 клеток примерно на 10% превышал контроль, в то время как коллаген IV практически не имел значительных отклонений от контроля. В то же время, у клеток на всех субстратах обнаружили сходную с контролем низкую экспрессию Sox2, что свидетельствовало об эффективном протекании процессов дифференцировки на всех исследуемых субстратах (рисунок 1.3, 1.4).

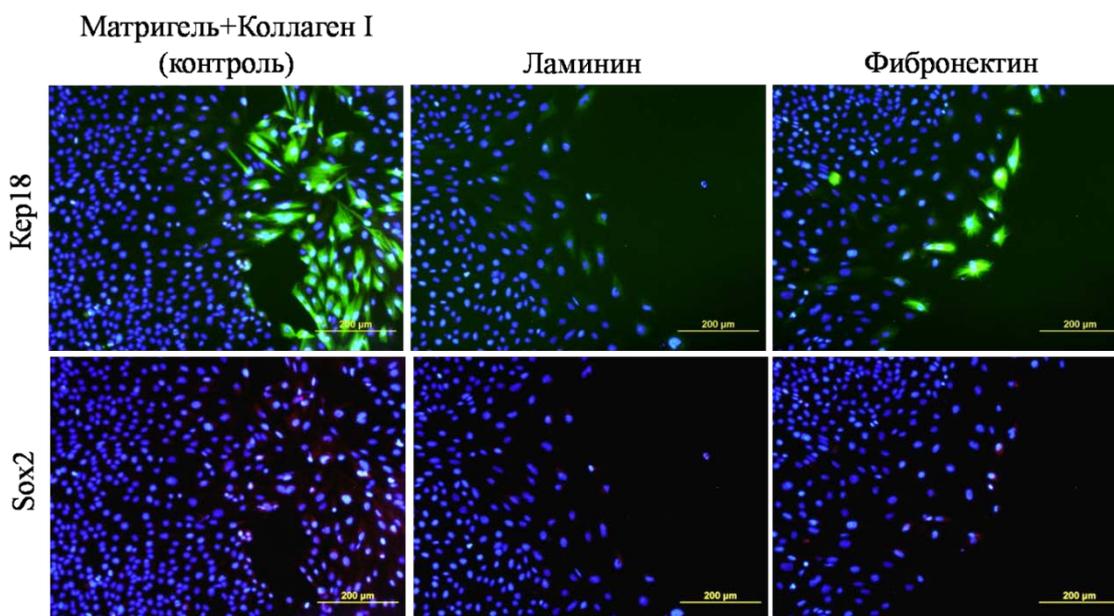


Рисунок. 1.3 - Экспрессия клетками маркера эпидермальной дифференцировки K18 и маркера плюрипотентности Sox2. Ядра дополнительно окрашены DAPI. Флуоресцентная микроскопия. Масштабный отрезок – 200 мкм

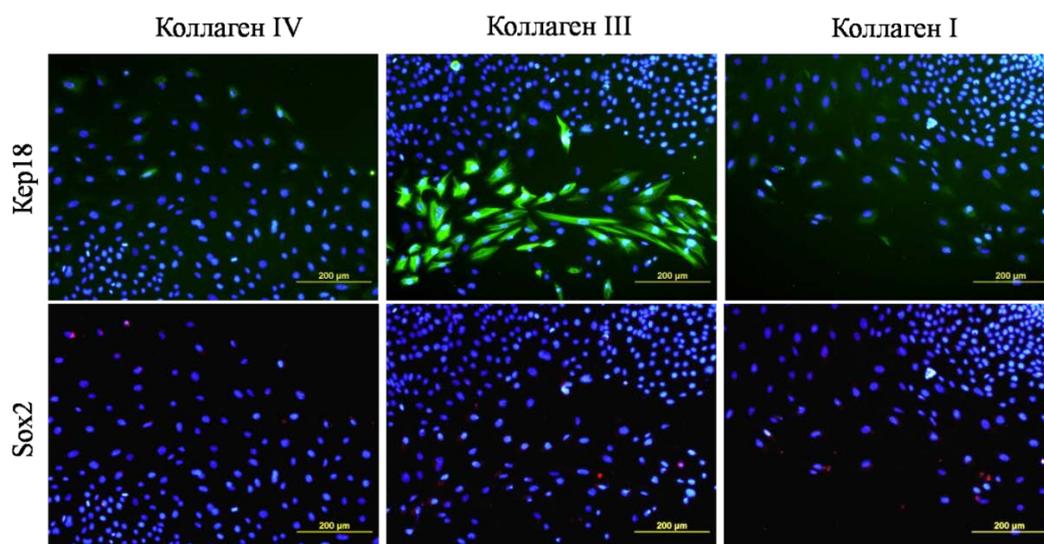


Рисунок 1.4 - Экспрессия клетками маркера эпидермальной дифференцировки K18 и контрольного гена Sox2. Ядра дополнительно окрашены DAPI. Флуоресцентная микроскопия. Масштабный отрезок – 200 мкм

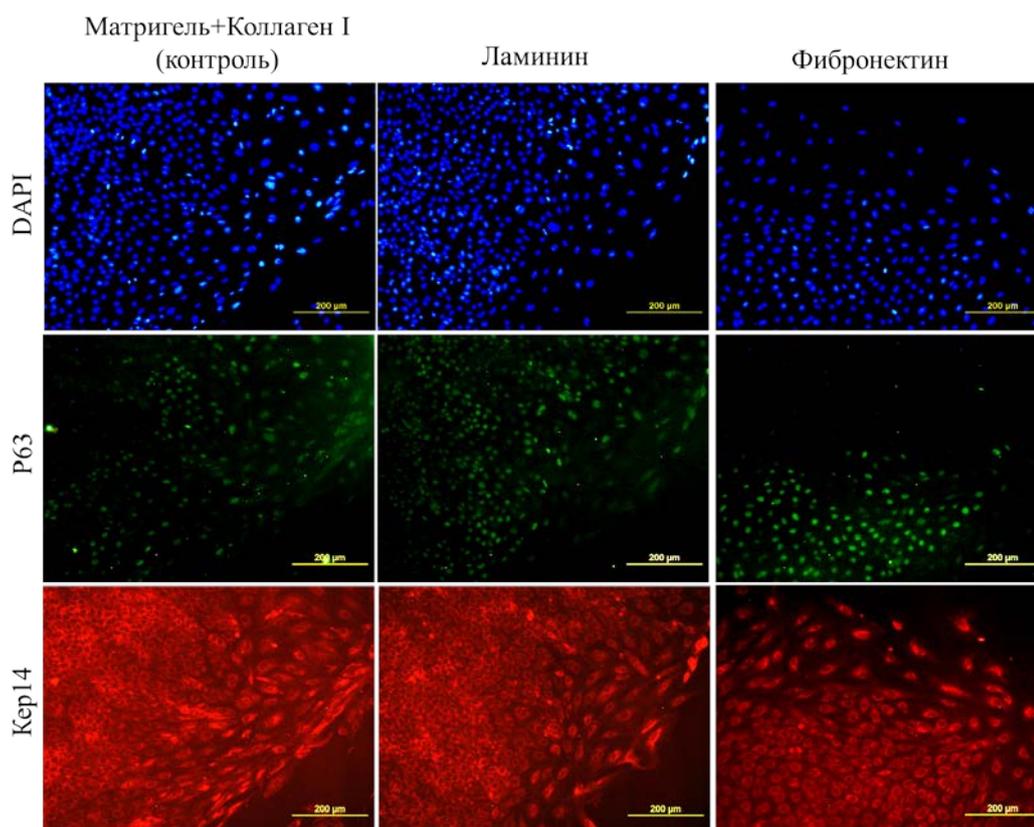


Рисунок 1.5 - Экспрессия клетками маркеров эпидермальной дифференцировки K14 и P63. Ядра дополнительно окрашены DAPI. Флуоресцентная микроскопия. Масштабный отрезок – 200 мкм

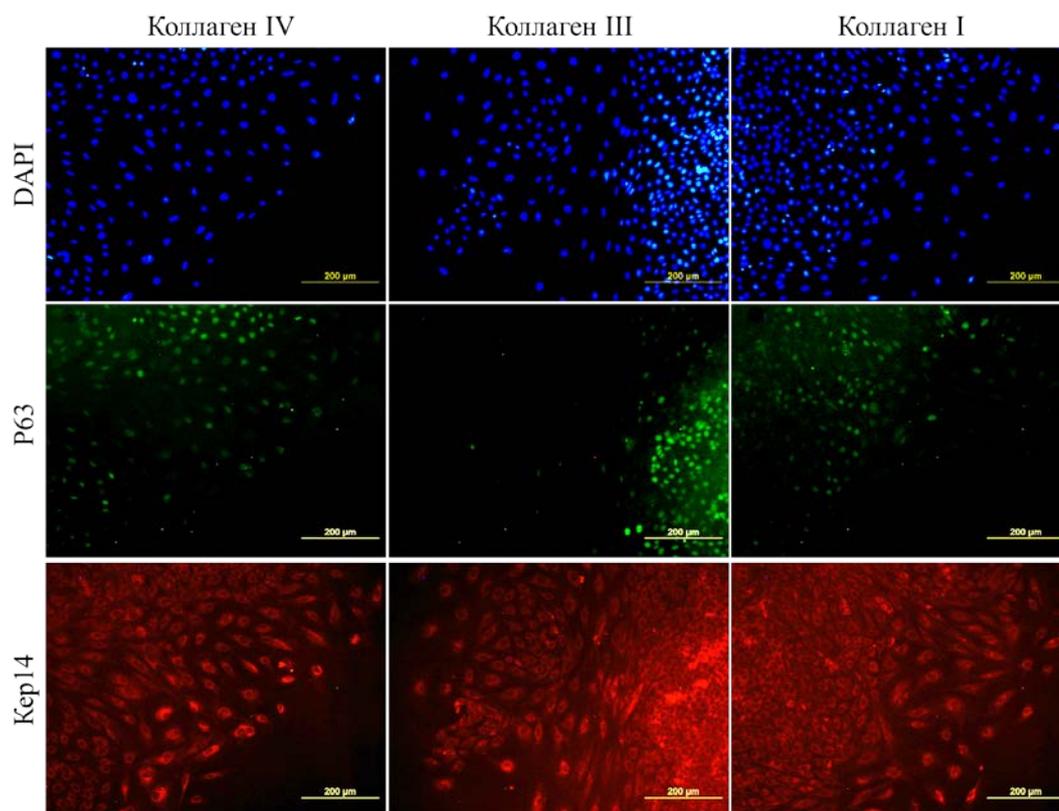


Рисунок 1.6 - Экспрессия клетками маркеров эпидермальной дифференцировки K14 и P63. Ядра дополнительно окрашены DAPI. Флуоресцентная микроскопия. Масштабный отрезок – 200мкм

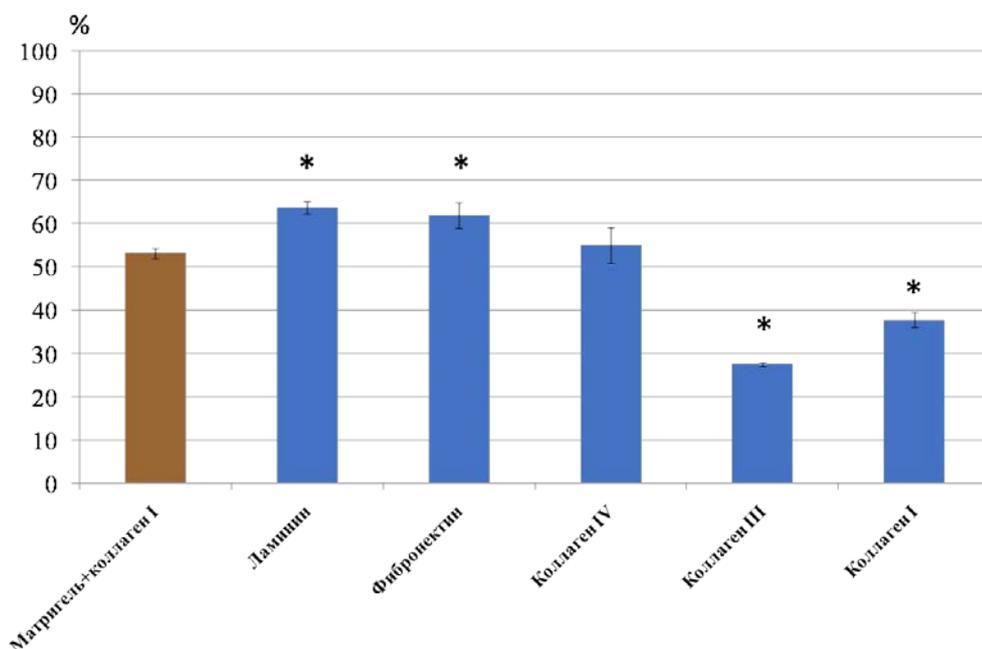


Рисунок 1.7 - Доля клеток для каждого компонента внеклеточного матрикса, экспрессирующих маркер эпидермальной дифференцировки P63. * - статистически значимое отличие при $p \leq 0,05$, Mann-WhitneyUtest

1.3.2 Определено влияние компонентов внеклеточного матрикса на эффективность ранних этапов дифференцировки ИПСК в нейральном направлении.

На всех субстратах к окончанию эксперимента (7 суток) присутствовали клетки, имеющие морфологические признаки дифференцировки в нейральном направлении. Наибольшую долю адгезировавших к субстрату нейросфер, близкую к 100% у контроля, наблюдали у ламинина и фибронектина (рисунок 1.8). На коллагене IV адгезировало около 50% нейросфер, клетки из адгезировавших нейросфер также впоследствии проявляли признаки нейральной дифференцировки (рисунок 1.9). На коллагенах III и I адгезировало менее 10% нейросфер, наблюдались лишь одиночные клетки проявляющие признаки нейральной дифференцировки.

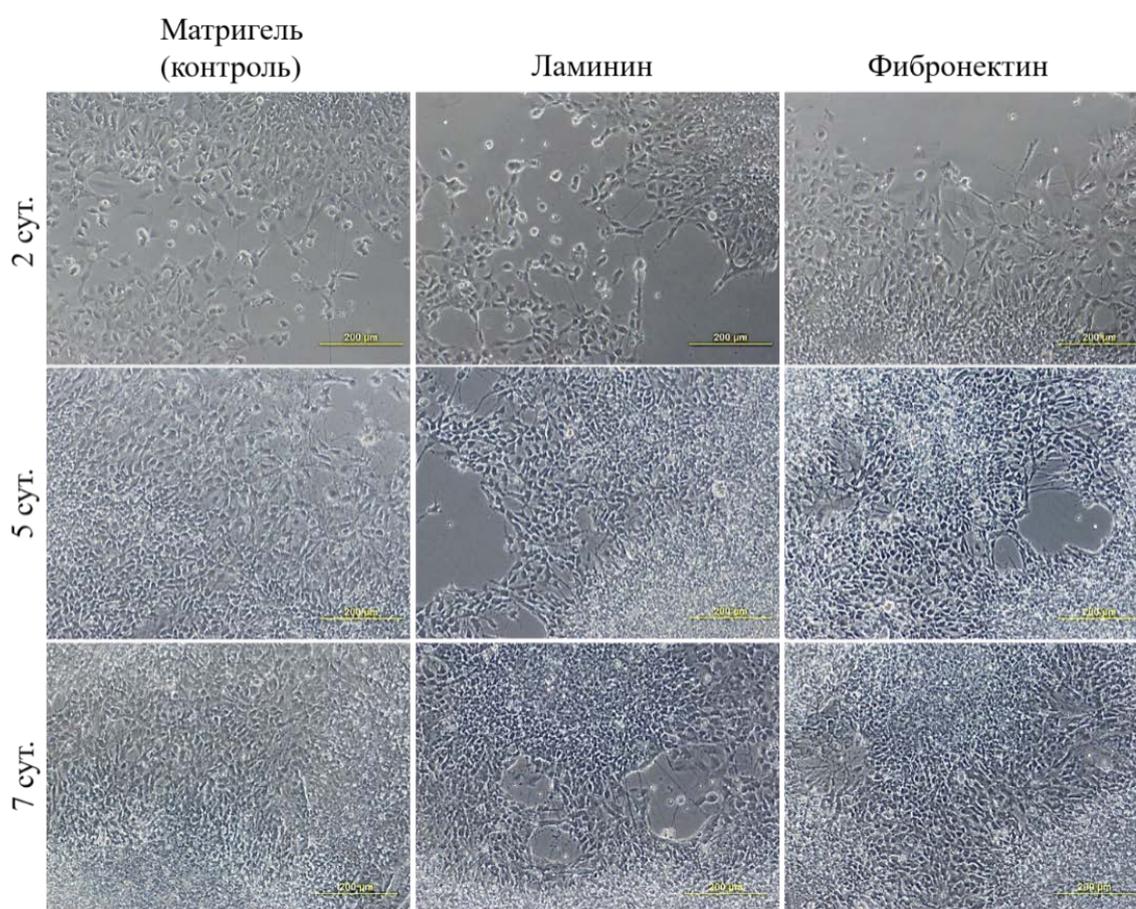


Рисунок 1.8 - Адгезия и рост колоний клеток на различных матриксах на ранних этапах нейральной дифференцировки. Фазово-контрастная микроскопия. Масштабный отрезок – 200мкм

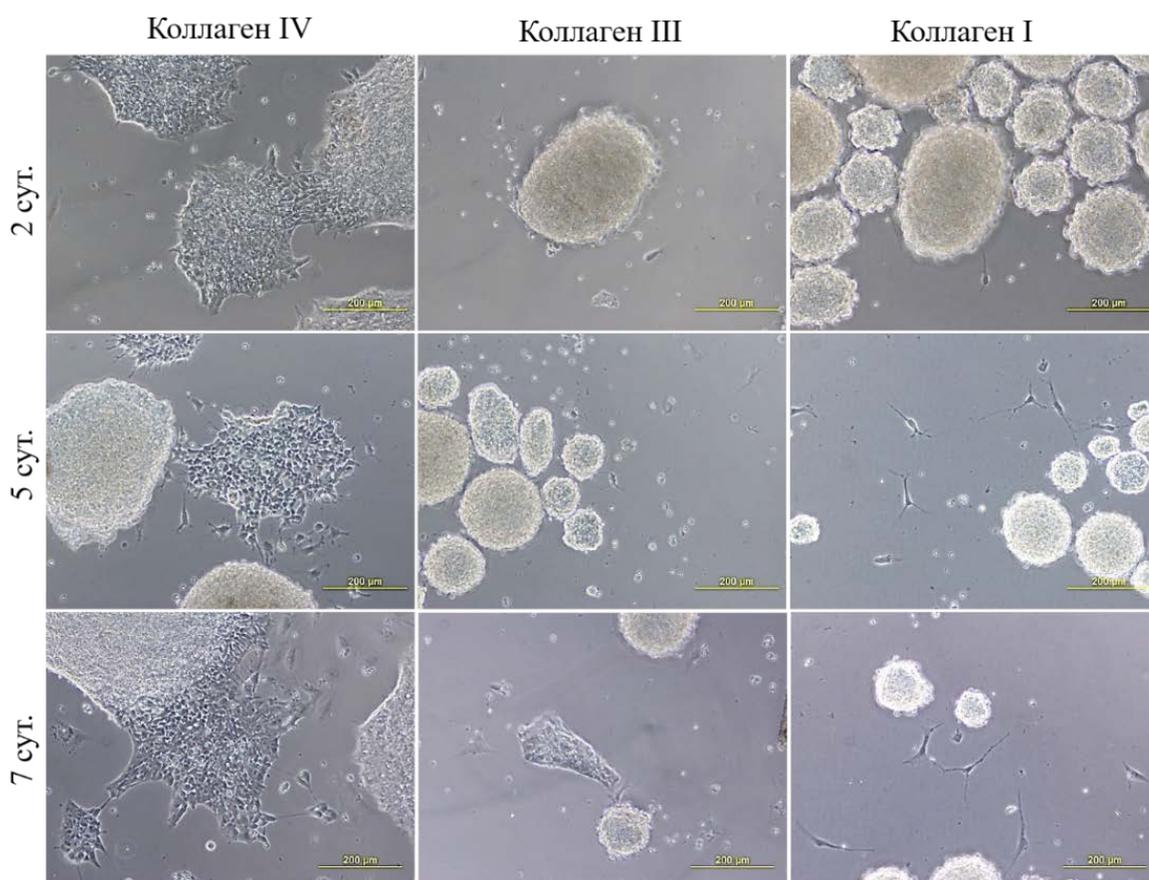


Рисунок 1.9 - Адгезия и рост колоний клеток на различных матриксах на ранних этапах нейральной дифференцировки. Фазово-контрастная микроскопия. Масштабный отрезок – 200 мкм

Для субстратов, способных к поддержанию роста клеток на начальных этапах нейральной дифференцировки, проанализировали экспрессию некоторых маркеров данного типа дифференцировки: Pax6, β -tubulin-III и Nestin. Также проанализировали экспрессию Oct4, которая при протекании дифференцировки клеток в нейральном направлении должна быть подавлена. Для клеток на всех субстратах было показано подавление экспрессии маркера плюрипотентности Oct4 и сходная с контролем экспрессия маркеров нейральной дифференцировки Pax6, Nestin и β -tubulin-III (рисунок. 1.10, 1.11, 1.12). Поскольку первые дни дифференцировки нейральной дифференцировки протекают в сформированных нейросферах, способность исследуемых субстратов поддерживать и стимулировать миграцию дифференцирующихся клеток определяет успешность применения данных субстратов. В данном случае, лучшими субстратами для нейральной дифференцировки оказались ламинин и фибронектин.

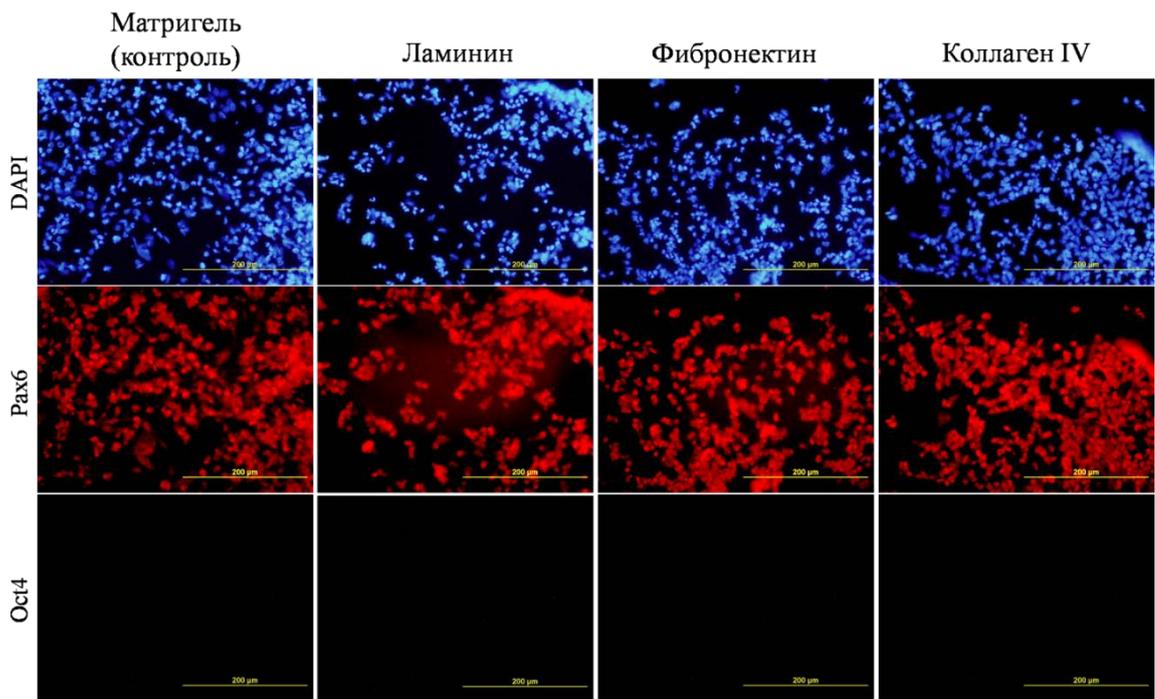


Рисунок 1.10 - Экспрессия клетками маркера нейральной дифференцировки Pax6 и маркера плюрипотентности Oct4. Флуоресцентная микроскопия. Масштабный отрезок – 200 мкм

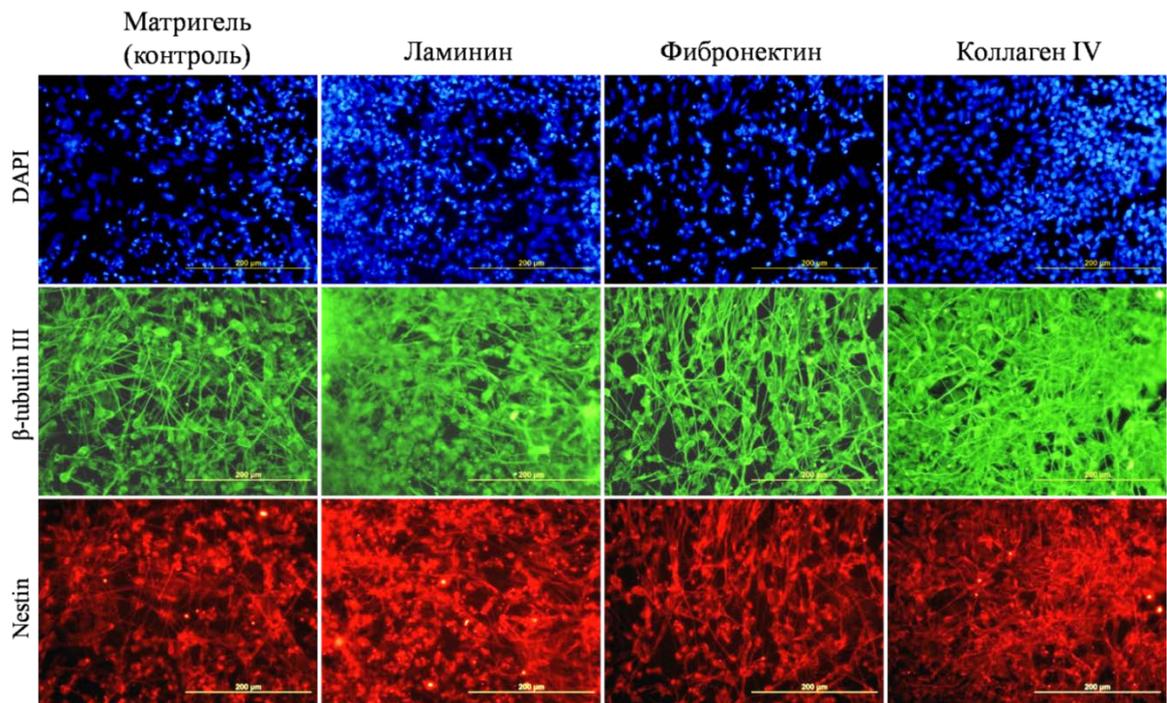


Рисунок 1.11 - Экспрессия клетками маркеров нейральной дифференцировки β -tubulin III и Nestin. Флуоресцентная микроскопия. Масштабный отрезок – 200 мкм

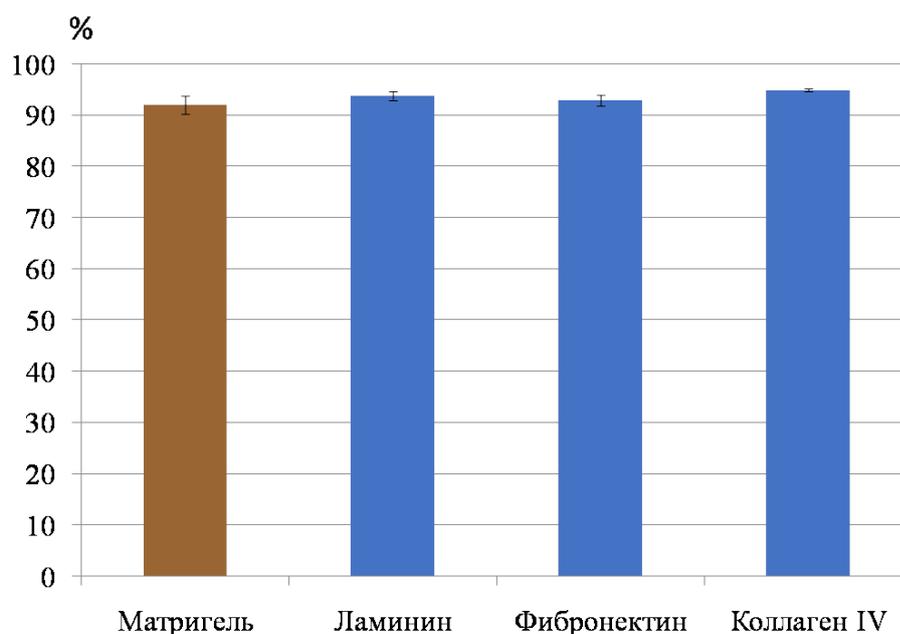


Рисунок 1.12 - Доля клеток для каждого компонента внеклеточного матрикса, экспрессирующих маркер нейральной дифференцировки Рахб. * - статистически значимое отличие при $p \leq 0,05$, Mann-Whitney Utest

1.3.3 Получение ткане-инженерных конструкций из клеток кожи, дифференцированных из ИПСК

В ходе дифференцировки ИПСК через промежуточную стадию ИПСК-НСПК были получены клетки ДП. Промежуточная стадия ИПСК-НСПК была получена при помощи культивирования ИПСК под воздействием факторов в составе Neural Induction Kit в течение 3 недель. Затем НСПК дифференцировали в ИПСК-ДП при помощи культивирования в среде на базе DMEM/F12 с добавлением сыворотки в течение 3 недель. После этого клетки приобретали характерный для клеток ДП фенотип фибробластов. Изменение фенотипа клеток в ходе дифференцировки в ИПСК-ДП можно видеть на рисунке 1.13.

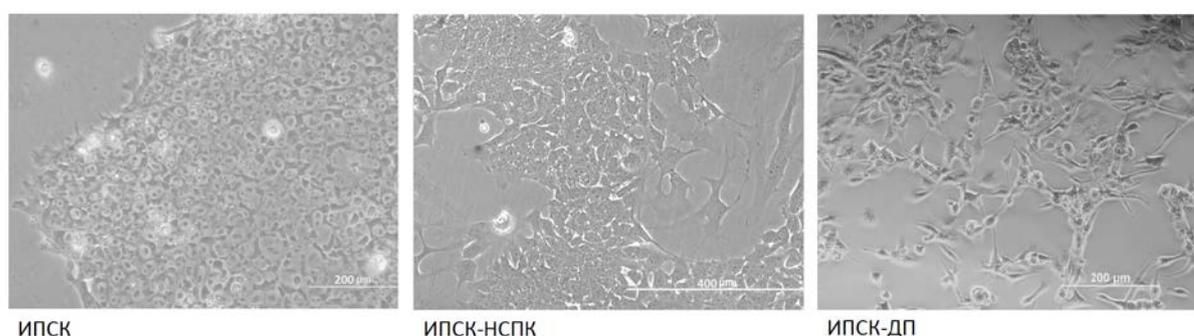


Рисунок 1.13 - Клетки на разных стадиях дифференцировки ИПСК в ходе получения ИПСК-ДП. Слева – ИПСК, по центру – ИПСК-НСПК, полученные в ходе нейральной дифференцировки ИПСК, справа – ИПСК-ДП, полученные в ходе дермальной дифференцировки ИПСК-НСПК. Прижизненная съемка. Фазовый контраст. Масштабные отрезки 200 мкм на изображениях слева и справа и 400 мкм по центру.

Определяли экспрессию специализированных маркеров методом количественного ПЦР анализа (рисунки 1.14, 1.15).

Клетки ИПСК-ДП снижали экспрессию маркеров плюрипотентности (Sox2, Nanog) и НСПК (Sox2, Нестин, β -3-тубулин), что также является свидетельством положительного результата дифференцировки в дермальном направлении, что показано на рисунке 1.14. Экспрессия специализированных маркеров повышалась у ИПСК-ДП (рисунок 1.15).

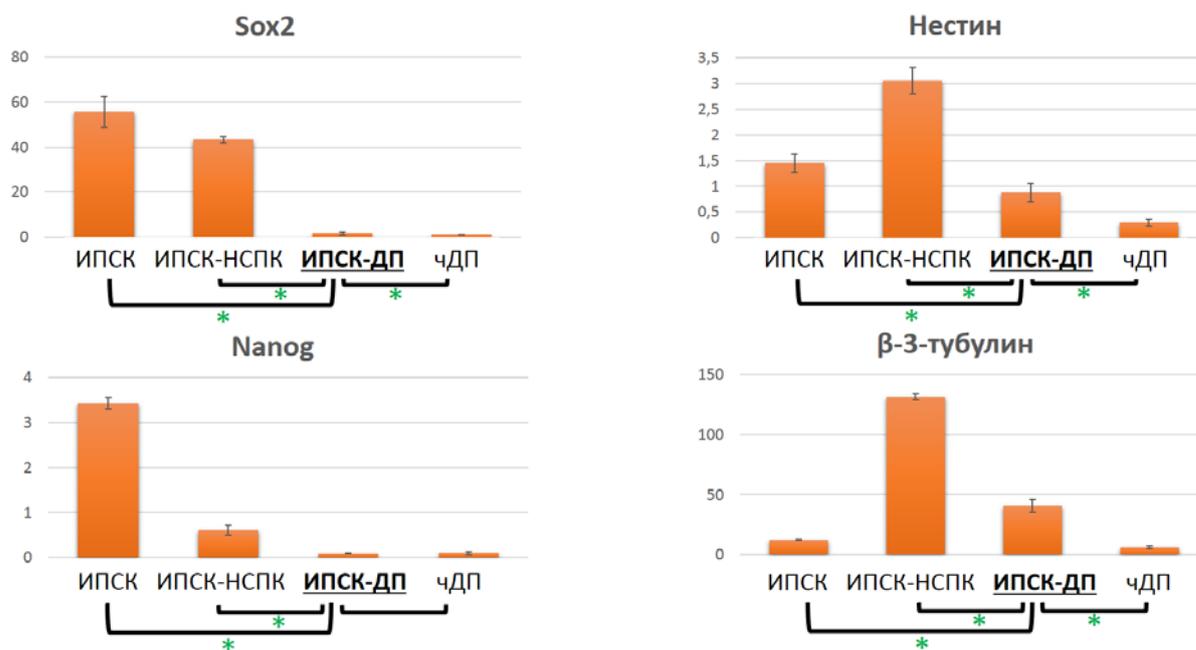
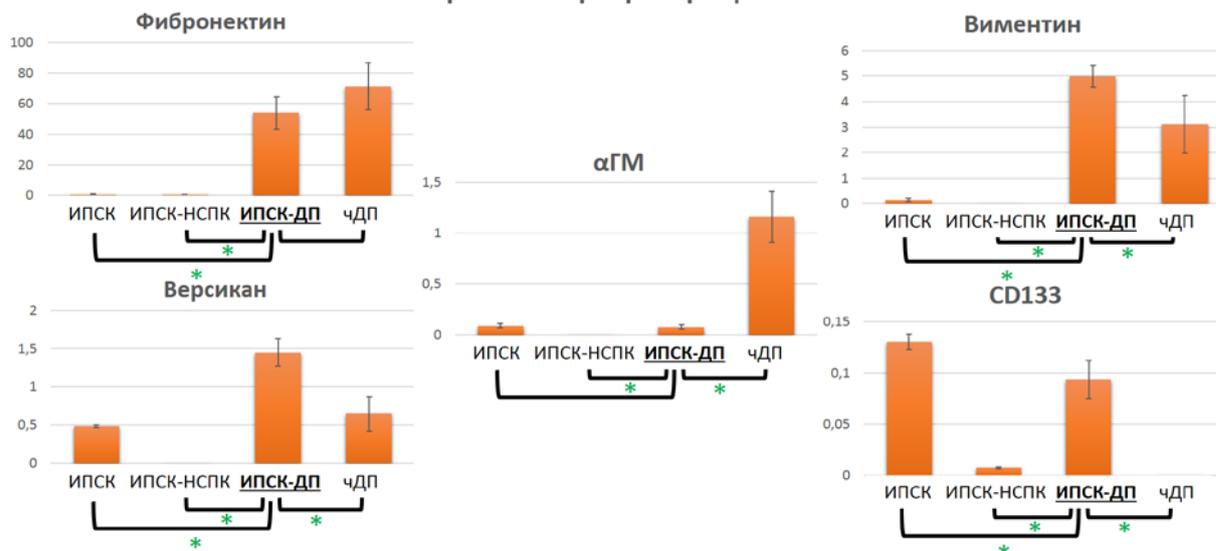


Рисунок 1.14. - Уровень экспрессии маркеров плюрипотентности (Sox2, Nanog) и НСПК (Sox2, Нестин, β -3-тубулин) на основе данных количественного ПЦР анализа у ИПСК (отрицательный контроль 1), ИПСК-НСПК (отрицательный контроль 2), ИПСК-ДП (экспериментальная группа) и чДП (положительный контроль). * - статистически значимое различие, $p \leq 0,05$, критерий Манн-Уитни. Данные нормировали в соответствии с уровнем экспрессии GAPDH

Результаты qPCR Экспрессия маркеров фибробластов



* Статистически значимое различие, $p \leq 0,05$

Рисунок 1.15 - Уровень экспрессии маркеров фибробластов, фибронектина, виментина, версикана, αГМ и CD133 на основе данных количественного ПЦР анализа у ИПСК (отрицательный контроль 1), ИПСК-НСПК (отрицательный контроль 2), ИПСК-ДП (экспериментальная группа) и ЧДП (положительный контроль). * - статистически значимое различие, $p \leq 0,05$, критерий Манн-Уитни. Данные нормировали в соответствии с уровнем экспрессии GAPDH

Фенотип и экспрессия маркеров ДП у полученных в ходе дермальной дифференцировки клеток согласуется с литературными данными [7].

В ходе дифференцировки ИПСК были получены эпидермальные клетки. Данные экспрессии генов, представленные на рисунке 1.16, полученные при помощи количественного ПЦР анализа, продемонстрировали очень низкий относительно отрицательного контроля (ИПСК) уровень экспрессии маркеров плюрипотентности, Oct4, Nanog и Sox2 у ИПСК-Кц. На рисунке 1.17 представлены результаты ПЦР в реальном времени, которые показывают, что в экспериментальной группе удалось зафиксировать экспрессию маркеров кератиноцитов, P63, K18, K10, K5, K14 и K1.

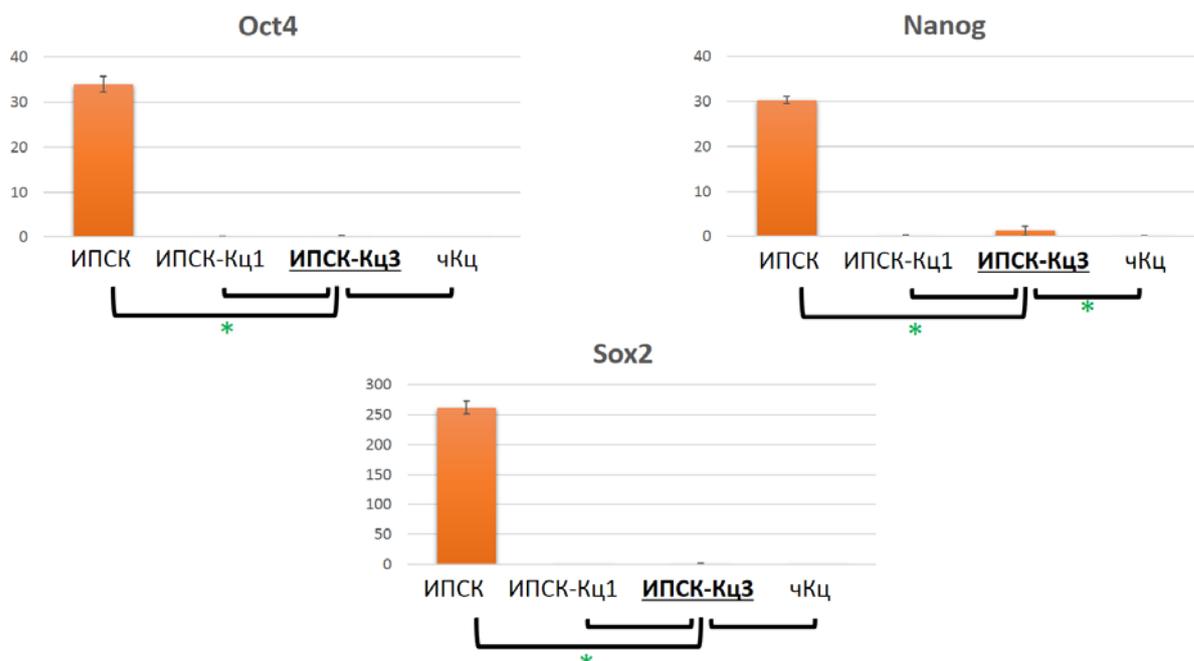


Рисунок 1.16 - Уровень экспрессии маркеров плюрипотентности, Oct4, Nanog, Sox2 на основе данных количественного ПЦР анализа у ИПСК (отрицательный контроль 1), ИПСК-Кц1 (ИПСК-Кц на первой неделе дифференцировки) (отрицательный контроль 2), ИПСК-Кц2 (экспериментальная группа, ИПСК-Кц на третьей неделе дифференцировки) и чКц (положительный контроль). * - статистически значимое различие, $p \leq 0,05$, критерий Манн-Уитни. Данные нормировали в соответствии с уровнем экспрессии GAPDH

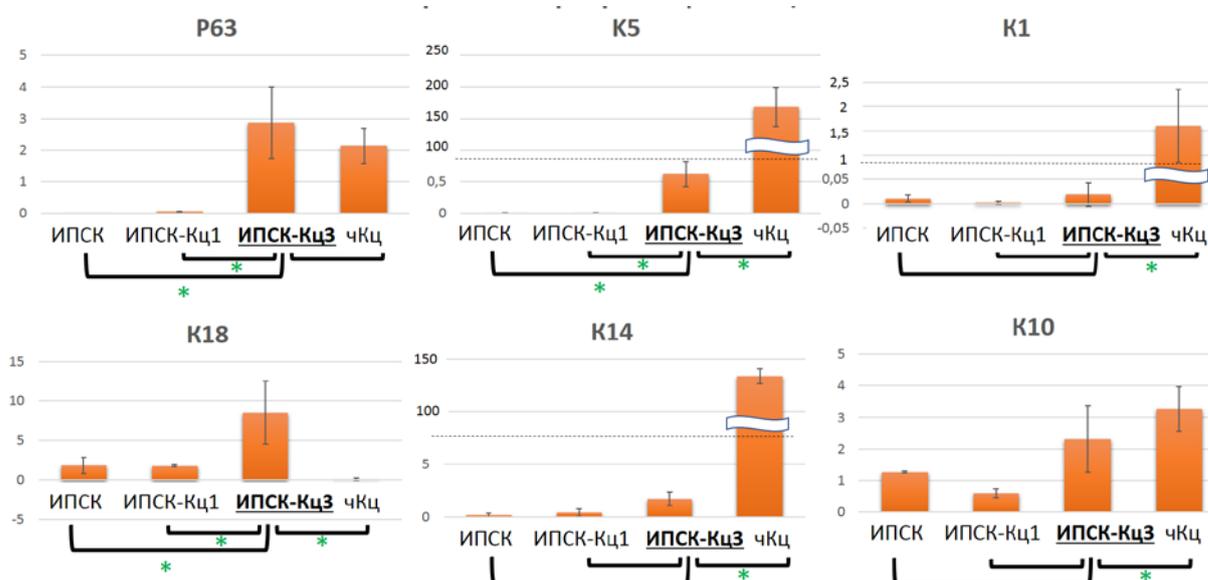


Рисунок 1.17 - Уровень экспрессии маркеров кератиноцитов, P63, K18, K5, K14, K1, K10. на основе данных количественного ПЦР анализа у ИПСК (отрицательный контроль 1), ИПСК-Кц1 (ИПСК-Кц на первой неделе дифференцировки) (отрицательный контроль 2), ИПСК-Кц2 (экспериментальная группа, ИПСК-Кц на третьей неделе дифференцировки) и чКц (положительный контроль). * - статистически значимое различие, $p \leq 0,05$, критерий Манн-Уитни. Данные нормировали в соответствии с уровнем экспрессии GAPDH

Фенотип и экспрессия маркеров кератиноцитов у полученных в ходе эпидермальной дифференцировки клеток согласуется с литературными данными [8].

Полученные в работе линии использовали для получения ЖЭК. Для оценки способности полученных клеточных линий инкорпорироваться в ЖЭК, сравнивали полученные результаты с контрольными первичными клеточными линиями кожи человека. Анализ проводили с использованием криосрезов. (рисунок 1.18).

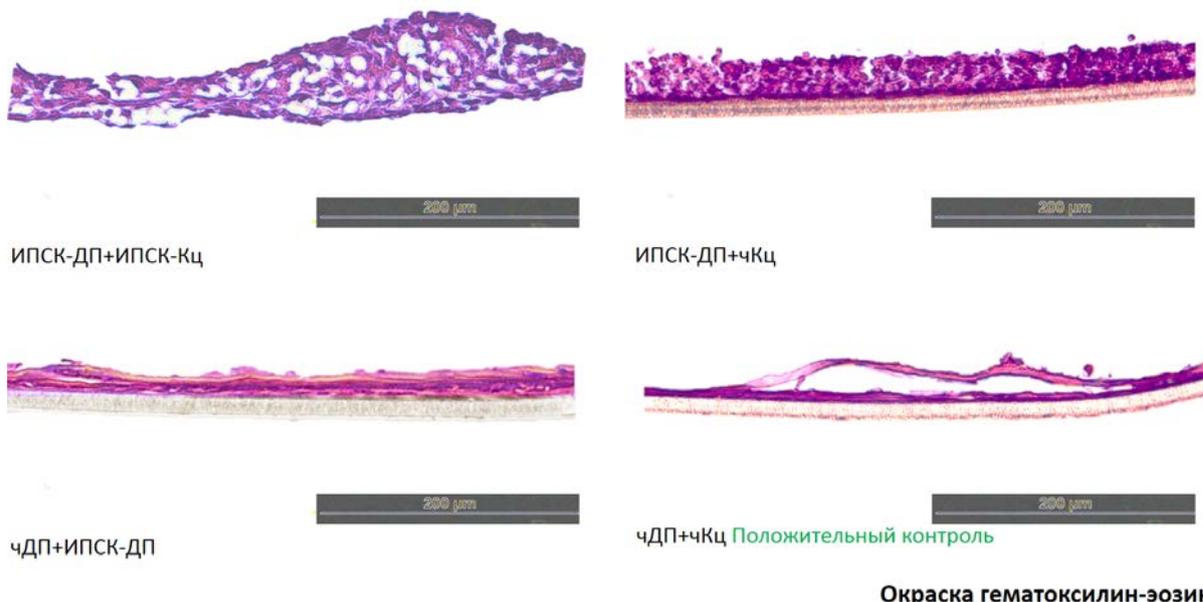


Рисунок 1.18 - Окраска полученных ЖЭК (образованных группами ИПСК-ДП+ИПСК-Кц; ИПСК-ДП+чКц; чДП+ИПСК-Кц; чКц+чКц) гематоксилином и эозином. Широкопольная микроскопия. Масштабный отрезок 200 мкм

Иммуногистохимическое выявление маркера кератиноцитов базального слоя, К14, показало успешную интеграцию кератиноцитов в системы, где в качестве дермального слоя использовали чДП. В то же время в системах, где в качестве источника дермального слоя применяли ИПСК-ДП, экспрессии К14 обнаружено не было, что говорит о несовместимости полученных в ходе дифференцировки дермальной и эпидермальных клеточных линий в рамках данной модели и неспособности ИПСК-ДП формировать ЖЭК, т.к. кератиноциты, как ИПСК-Кц, так и чКц согласно нижепредставленным данным интегрировались в трехмерную систему. Результаты иммуногистохимического выявления К14 в ЖЭК показаны на рисунке 1.19.

Иммуногистохимическое выявление маркеров фибробластов, фибронектина и коллагена IV типа в сформированных ЖЭК продемонстрировало наличие этих маркеров во всех сформированных эквивалентах, за исключением коллагена IV типа в системе чДП+ИПСК-Кц, как показывают рисунки 1.20 и 1.21.

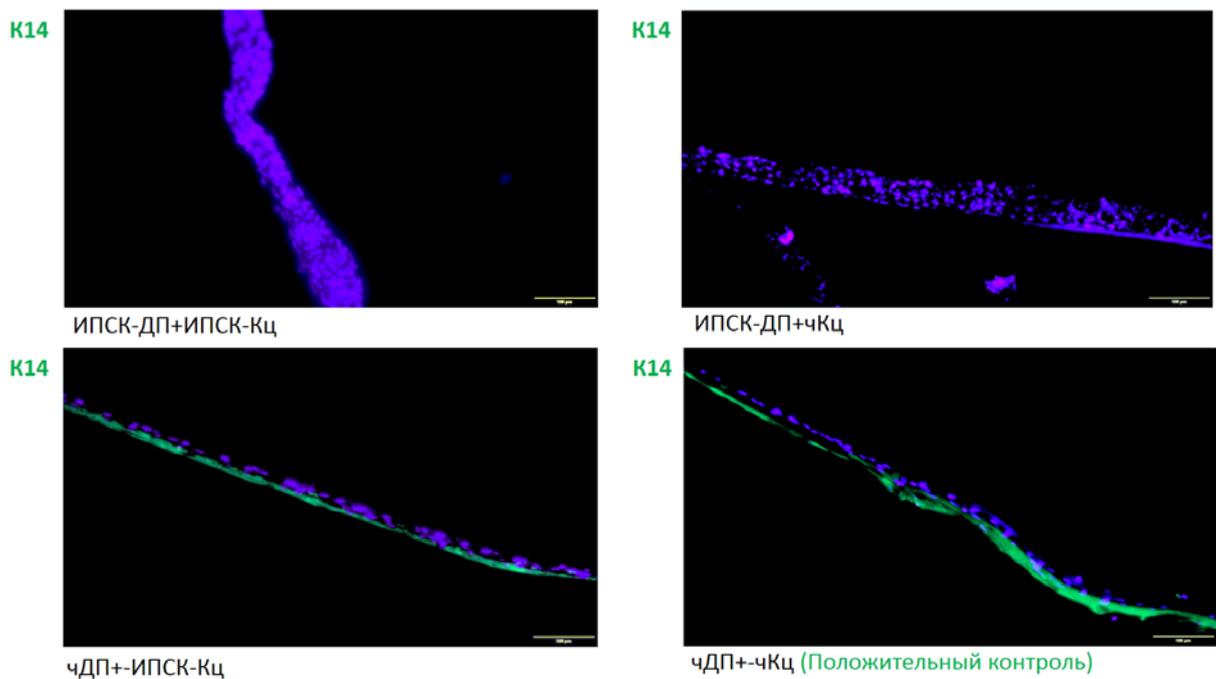


Рисунок 1.19 - Иммуногистохимическое выявление K14 в полученных из сформированных ЖЭК (образованных группами ИПСК-ДП+ИПСК-Кц; ИПСК-ДП+чКц; чДП+ИПСК-Кц; чКц+чКц) срезах. Ядра окрашены DAPI. Флуоресцентная микроскопия. Масштабный отрезок 100 мкм

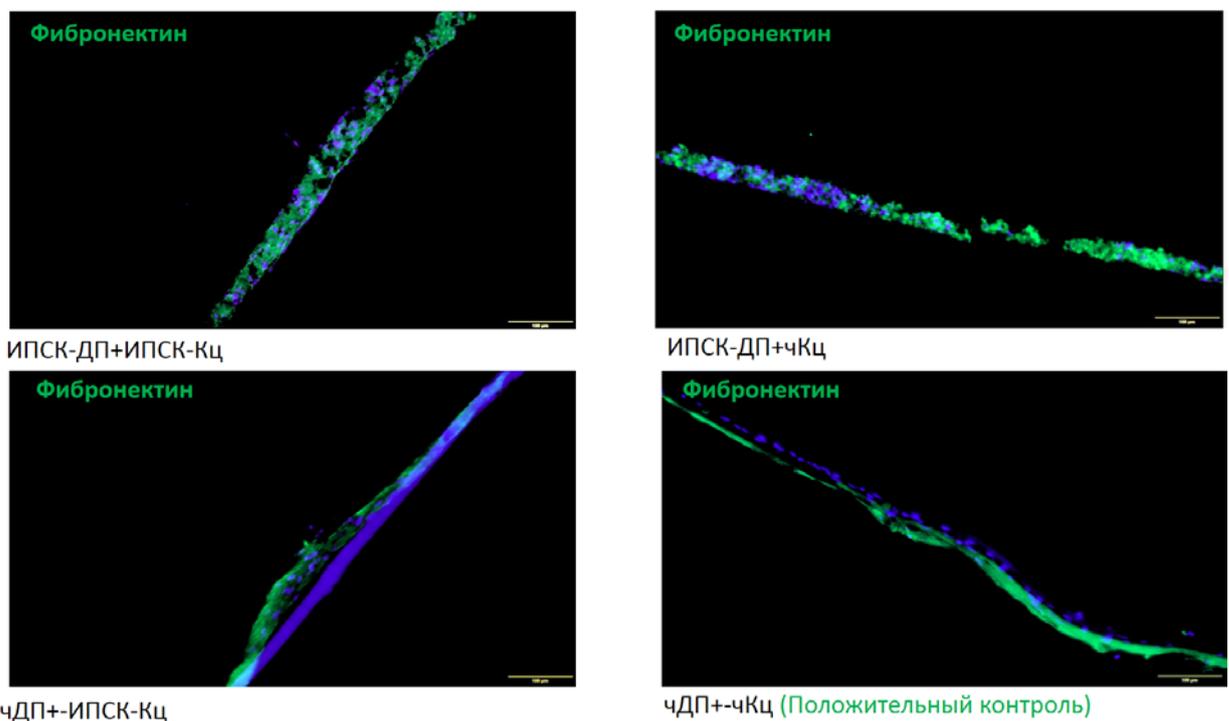


Рисунок 1.20 - Иммуногистохимическое выявление фибронектина IV в полученных из сформированных ЖЭК (образованных группами ИПСК-ДП+ИПСК-Кц; ИПСК-ДП+чКц; чДП+ИПСК-ДП; чКц+чКц) срезах. Ядра окрашены DAPI. Флуоресцентная микроскопия. Масштабный отрезок 100 мкм

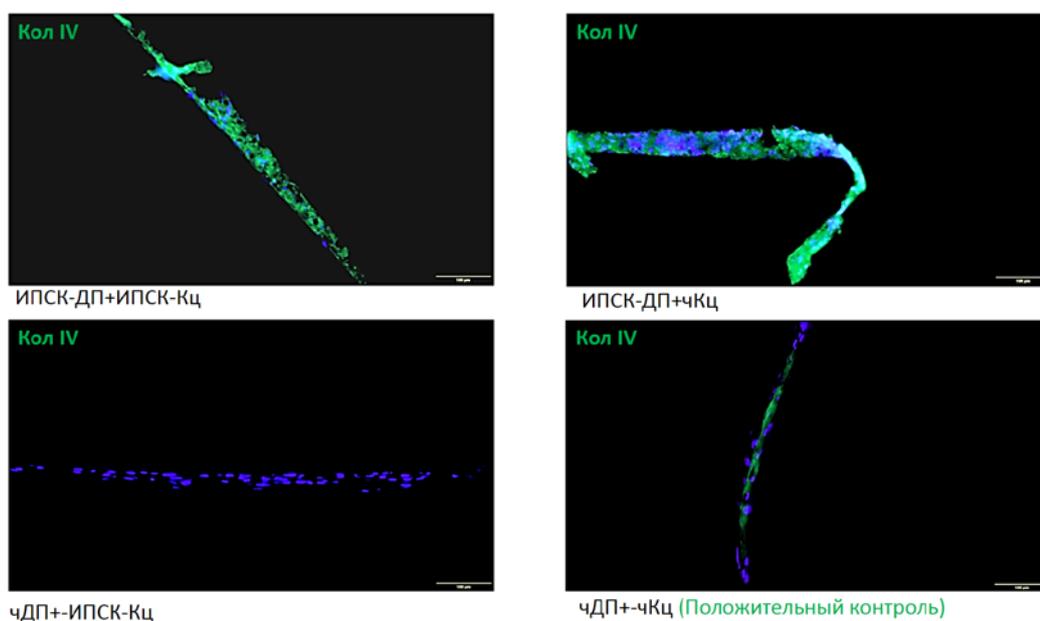


Рисунок 1.21 - Иммуногистохимическое выявление коллагена IV (кол IV) в полученных из сформированных ЖЭК (образованных группами ИПСК-ДП+ИПСК-Кц; ИПСК-ДП+чКц; чДП+ИПСК-Кц; чКц+чКц) срезах. Ядра окрашены DAPI. Флуоресцентная микроскопия. Масштабный отрезок 100 мкм

По имеющимся на момент написания литературным данным подобных трехмерных эквивалентов из ИПСК-ДП и ИПСК-Кц, сгенерированных на базе системы transwell, описано не было, в то же время система чДП+чКц продемонстрировала себя хуже, чем аналогичная, полученная по другому протоколу на базе системы с коллагеновой губкой, описанная в литературных данных. В последней наблюдалась интенсивная пролиферация клеток и эпидермальная стратификация [9].

1.3.4 Эпигенетическая регуляция кератинового локуса.

По результатам анализа проведенных на предыдущих этапах исследований эпигенетической регуляции кератинового локуса подготовлено две публикации [10, 11]. Полученные данные позволяют предположить, что участки Enh1 и Enh2 являются регуляторными элементами, управляющими экспрессией внутри локуса кератиновых генов. Дальнейшее исследование архитектуры этих областей, а также пространственной организации и эпигенетического статуса локуса (в том числе в других линиях кератиноцитов) позволит раскрыть механизмы переключения экспрессии кератиновых генов и идентифицировать белковые факторы, ответственные за этот процесс.

1.4 Заключение

Исследовано влияние компонентов внеклеточного матрикса на поддержание ИПСК и их дифференцировку в эпидермальном и нейральном направлениях [12]. Лучшее поддержание роста колоний на ранних этапах как эпидермальной так и нейральной

дифференцировок обеспечивали ламинин и фибронектин, в меньшей степени – коллаген IV, что согласуется с другими научными данными, согласно которым ламинин и фибронектин могут играть важную роль в миграции и поддержании дифференцировки клеток [13, 14]. На коллагенах I и III при эпидермальной дифференцировке наблюдали формирование небольшого числа единичных колоний малого размера. При нейральной дифференцировке на них обнаруживали только редкие одиночные клетки. При этом во многих работах была показана важная роль коллагена I в протекании многих процессов дифференцировки [8, 15]. Возможно, что плохая адгезия и рост колоний дифференцирующихся клеток на коллагенах в данной работе обусловлены изучением только ранних этапов дифференцировки. При анализе эффективности протекания эпидермальной дифференцировки активную экспрессию специфических маркеров наблюдали у клеток на ламинине и фибронектине, в меньшей степени – на коллагене IV. Для коллагенов III и I была показана значительно меньшая, по сравнению с контролем, экспрессия локализованного в ядре маркера P63 и цитоплазматического маркера кератина 14. При проведении нейральной дифференцировки наблюдали активную экспрессию маркеров нейральной дифференцировки на всех компонентах внеклеточного матрикса, способных обеспечивать адгезию дифференцирующихся клеток в составе нейросфер: коллагене IV, фибронектине и ламинине.

Результаты проведенного исследования подтверждают целевой фенотип у полученных клеточных линий и их способность к взаимной интеграции в трехмерные клеточные системы. Этот факт позволяет утверждать, что разработанные методы и полученные клеточные линии потенциально могут быть использованы для создания трехмерных эквивалентов кожи или дериватов кожи *in vitro*. Для достижения этого результата требуются дальнейшие исследования, направленные, в частности, на усовершенствование протокола эпидермальной дифференцировки и получение аналогов линии фибробластов кожи человека из ЧИПСК.

1.5 Список использованных источников

1. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // *Cell*. - 2006. - Vol. 126. - P. 663 – 676.
2. Higuchi A., Ling Q.D., Ko Y.A., Chang Y., Umezawa A. Biomaterials for the feeder-free culture of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells // *Chemical reviews*. - 2011. - Vol. 111. - P. 3021 - 3035.
3. Ma W., Tavakoli T., Derby E., Serebryakova Y., Rao M.S., Mattson M.P. Cell-extracellular matrix interactions regulate neural differentiation of human embryonic stem cells.

Cell-extracellular matrix interactions regulate neural differentiation of human embryonic stem cells // BMC developmental biology. - 2008. - Vol. 8. - P. 90.

4. Rodin, S., Domogatskaya, A., Ström, S., Hansson, E. M., Chien, K. R., Inzunza, J., & Tryggvason, K. Long-term self-renewal of human pluripotent stem cells on human recombinant laminin-511 // Nature biotechnology. - 2010. - Vol. 28. - P. 611.

5. Guo et al. Building a microphysiological skin model from induced pluripotent stem cells. // Stem cell research and therapy. – 2013. – Vol. 4, №1. – P. 1 – 15.

6. Abaci et al. Tissue engineering of human hair follicles using a biomimetic developmental approach. // Nature Communications. – 2018. – Vol. 9, №5301. – P. 1 – 11.

7. Gnedeva et al. Derivation of Hair-Inducing Cell from Human Pluripotent Stem Cells. // PLoS ONE. – 2015. – Vol. 10, № 1. – P. 1 – 16.

8. Kogut et al. Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells into a Keratinocyte Lineage. // Methods of Molecular Biology. – 2014. – Vol. 1195. – P. 1 – 12.

9. Higgins et al. Multifaceted role of hair follicle dermal cells in bioengineered skins. // Dermatology. – 2017. – Vol. 176, № 5. – P. 1259 – 1269.

10. Kalabusheva E., Ulianov S., Terskikh V., Razin S., Vorotelyak E. Identifying the regulatory elements at the keratin type I and II locus 12q13.13 using C-TALE method during human epidermal skin keratinocytes differentiation // Journal of Investigative Dermatology. - 2019. - Vol. 139. - Is. 9. Supl. S. - P. S251 - S251. WOS:000485661500211.

11. Golov A.K., Ulianov S.V., Luzhin A.V., Kalabusheva E.P., Kantidze O.L., Flyamer I.M., Razin S.V., Gavrilov A.A. C-TALE, a new cost-effective method for targeted enrichment of Hi-C/3C-seq libraries // Methods. - 2019. - Vol. 170. - P. 48 - 60. DOI: 10.1016/j.ymeth.2019.06.022. (WoS, Scopus) – Q1-Q2/

12. Ognivtsev A., Kalabusheva E., Osidak E., Domogatsky S., Vorotelyak E. The influence of extracellular matrix on human pluripotent cell stemness and differentiation // FEBS OPEN BIO. - 2019. - Vol. 9. - Is. 1. – P. 22-006. - P. 221. WOS:000486972403076.

13. Takayama K., Mitani S., Nagamoto Y., Sakurai F., Tachibana M., Taniguchi Y., Sekiguchi K., Mizuguchi H. Laminin 411 and 511 promote the cholangiocyte differentiation of human induced pluripotent stem cells // Biochemical and biophysical research communications. - 2016. - Vol. 474. - P. 91 - 96.

14. Vega M. E., Schwarzbauer J. E. Collaboration of fibronectin matrix with other extracellular signals in morphogenesis and differentiation // Current opinion in cell biology. - 2016. - Vol. 42. - P. 1 - 6.

15. Mizuno M., Fujisawa R., Kuboki Y. Type I collagen-induced osteoblastic differentiation of bone-marrow cells mediated by collagen- $\alpha 2\beta 1$ integrin interaction // Journal of cellular physiology. - 2000. - Vol. 184. - P. 207 - 213.

1.6 Отчетные публикации по разделу

1. Ognivtsev A., **Kalabusheva E.**, Osidak E., Domogatsky S., **Vorotelyak E.** The influence of extracellular matrix on human pluripotent cell stemness and differentiation // FEBS OPEN BIO. - 2019. - Vol. 9. - Is. 1. – P. 22-006. - P. 221. WOS:000486972403076. (WoS) – Q4.
2. **Kalabusheva E.**, Ulianov S., **Terskikh V.**, Razin S., **Vorotelyak E.** Identifying the regulatory elements at the keratin type I and II locus 12q13.13 using C-TALE method during human epidermal skin keratinocytes differentiation // Journal of Investigative Dermatology. - 2019. - Vol. 139. - Is. 9. - P. S251 - S251. (WoS) – Q1
3. Golov A.K., Ulianov S.V., Luzhin A.V., **Kalabusheva E.P.**, Kantidze O.L., Flyamer I.M., Razin S.V., Gavrilov A.A. C-TALE, a new cost-effective method for targeted enrichment of Hi-C/3C-seq libraries // Methods. - 2019. - Vol. 170. - P. 48 - 60. DOI: 10.1016/j.ymeth.2019.06.022. (WoS, Scopus) – Q1-Q2

Раздел 2. Изучение влияния вклада различных генов на метаболизм амилоида в культурах ИПСК с различным кариотипом

2.1 Введение

Синдром Дауна – самая распространённая форма геномной патологии (как правило, трисомия 21-й хромосомы), ведущая к тяжёлым порокам развития. Частота синдрома Дауна среди новорожденных в среднем равна 1:700. Синдром Дауна является острой медицинской и социальной проблемой, так как люди с синдромом Дауна требуют повышенного внимания и медицинского ухода, поскольку помимо ярко выраженного снижения когнитивных способностей, пациенты имеют высокий риск врождённых пороков сердца, миелоидных лейкозов (самая крупная популяция людей с наследственной предрасположенностью), раннего развития болезни Альцгеймера, катаракты, пороков ЖКТ, снижения иммунитета. Синдром Дауна активно изучается и наблюдаемый при нём фенотип широко описан, однако остаются неясными многие молекулярные аспекты этого состояния. Так, например, до сих пор не выяснены многие сигнальные и метаболические нарушения, появляющиеся в следствие трисомии 21-й хромосомы. Очевидно, что наличие лишней 21-й хромосомы вызывает т.н. дисбаланс экспрессии генов, заключающийся в перекосе уровней экспрессии различных сигнальных путей и каскадов, которые «тонко» настроены в клетках с нормальным кариотипом. Одним из перспективных методов изучения такого дисбаланса экспрессии генов может стать изучение т.н. «транскриптомов» - то есть совокупности всех, экспрессирующихся с генома в данный момент в клетках.

2.2 Материалы и методы

2.2.1 Реагенты и расходные материалы, использованные в исследовании

- mTeSR1 (#85850, Stem Cell Technologies, Канада)
- ROCK ингибитор (Y27632, Sigma-Aldrich, США)
- mTeSR1 5x Supplement (#85852, Stem Cell Technologies, Канада)
- Аккутаза (#830100, CLS Cell Lines Service, Германия)
- Раствор DPBS (#P060p, ПанЭко, Россия)
- Matrigel (#356234, BD Biosciences, США)
- Среда для криозаморозки плюрипотентных стволовых клеток mFreSR (#05854, Stem Cell Technologies, Канада)
- Neural Induction Medium (#A1647801, Gibco, США)
- Neurobasal Medium (#21103-049, Stem Cell Technologies, Канада)

- DMEM (#11960-044, Gibco, США)
- DMEM/F12 (#11320-074, Gibco, США)
- EGF (PeproTech, США)
- bFGF (#PHG0261, Invitrogen, США)
- N2 добавка (#17504044, Invitrogen, США)
- B27 добавка (#17504044, Invitrogen, США)
- β-меркаптоэтанол (#M3148-100ML, Sigma-Aldrich, США)
- Пируват натрия (#11360-039, Gibco, США)
- Пенициллин/стрептомицин (PenStrep) (#15070-063, Gibco, США)
- Глутамакс (#35050-038, Gibco, США)
- Диспаза (#07923, Stem Cell Technologies, Канада)

Составные среды, использованные в работе:

- Среда для культивирования нейральных стволовых клеток человека (NPM):
DMEM + DMEM / F12 (1:1), B27 supplement (1x), 1 mM GlutaMax, 1 mM пирувата натрия, 25 нг/мл EGF, 25 нг/мл bFGF, пенициллин-стрептомицин (50 ЕД/мл; 50 мкг/мл).
- Среда для терминальной дифференцировки в нейроны (N2B27):
DMEM / F12 + Neurobasal Medium (1:1), N2-supplement, B27-supplement, 0.1 mM βMercaptoethanol, mM GlutaMax, 1 mM пирувата натрия, пенициллинстрептомицин (50 ЕД/мл; 50 мкг/мл).
- Приготовление раствора для покрытия матригелем:
Смешать DMEM/F12 + Matrigel (BD Biosciences, США) в соотношении 50:1 (все манипуляции производить на льду, пока все растворы холодные, т.к. матригель полимеризуется при комнатной температуре), далее разлить по аликвотам и заморозить при -20°C. Размороженную аликвоту хранить при +4°C, допускается многократное применение раствора.
- Покрытие культурального пластика матригелем:
Раствор матригеля налить в культуральную посуду исходя из соотношения 1 мл на 10 см², инкубировать в течении 1 часа при +37°C, после чего слить и промыть 1 раз свежей средой
- DMEM/F12. Использовать незамедлительно.
Все манипуляции с живыми клеточными культурами производились в стерильных условиях внутри ламинарных шкафов 2-го уровня биобезопасности, соблюдая принятые правила асептики при работе с культурами клеток человека и животных.

2.2.2 Культивирование ИПСК

IPS-KYOU – линия ИПСК человека, полученная в лаборатории Синъе Яманак (университет Киото, Япония), лентивирусной инфекцией репрограммирующих факторов Oct4, Sox2, c-Мус, KLF4 в фибробласты кожи взрослого человека. Линия IPS-KYOU была приобретена в клеточной банке (ACS-1023™, ATCC, США). ИПСК культивировались в чашках Петри d=60мм, покрытых матригелем (1/50 в DMEM/F12) (BD Bioscience) в среде mTesR1 (Stem Cell Technologies) при 37°C в CO₂-инкубаторе с 5% CO₂ и при влажности 100%. При достижении 80% конfluenceности клетки пассировали. Для этого ИПСК снимали аккутазой (CLS Cell Lines Service, Германия), разбавляли в растворе DPBS (ПанЭко, Россия) и центрифугировали при 400 g в течение 5 минут в центрифуге Eppendorf Centrifuge 5702. Супернатант удаляли, а клеточный осадок ресуспендировали в среде mTeSR1, содержащей 5 мкМ ROCKi (Y27632, Sigma-Aldrich, США). Для криоконсервирования клеток использовали среду FresR (Stem Cell Technologies, Канада).

2.2.3 Нейральная дифференцировка

За день до начала нейральной дифференцировки, ИПСК были посажены в d=6 см чашки Петри в количестве около 10⁶ клеток на чашку в среде mTeSR1. На следующий день, среда была заменена на нейральную индукционную среду (PSC Neural Induction Medium, Thermo Fisher Scientific), приготовленную заранее. Клетки культивировались в этой среде в течение 3-х пассажей в d=6 см чашках Петри, покрытых матригелем (1/40 в DMEM/F12) (BD Bioscience). Затем нервные стволовые клетки (НСК) культивировались в нейральной пролиферативной среде (NPM, DMEM/F12 (3/1)), с добавлением B27, bFGF (10нг/мл), EGF 10 нг/мл, пирувата натрия и пенициллина/стрептомицина как минимум в течение 3 пассажей.

Для терминальной дифференцировки нейронов из НСК, клетки пересаживали на покрытие матригелем чашки в количестве 20*10³ клеток/см²: d=6 см чашки Петри для дальнейшего выделения РНК, d=3 см чашки Петри для съемки флуоресцентной и в фазовом контрасте, 8-луночные слайды Ibidi Chamber Slides для иммуноцитохимического исследования. Клетки культивировали без пересева в дифференцировочной среде N2B27 с добавлением 1000x ROCKi и 1000x Forskolin на протяжении 14-ти и 21-го дня дифференцировки нейронов. Дифференцирующимся нейронам для флуоресцентной фотосъемки дополнительно добавляли 1000x ингибитор гамма-секретазы (Sigma, США).

2.2.4. Выделение тотальной РНК

Для выделения тотальной РНК из исследуемых клеток применяли набор «Rneasy Mini Kit» (Cat# 74106) фирмы «Qiagen» для выделения тотальной РНК на колонках. Для выделения тотальной РНК использовали порядка 2*10⁶ клеток. Концентрацию РНК в полученном растворе измеряли с помощью спектрофотометрического анализа с

использованием спектрофотометра Implen NanoPhotometer P-Class P360. Определяли оптическую плотность раствора РНК при облучении ультрафиолетом с длиной волны 260 нанометров. Контроль за чистотой образца осуществляли с помощью измерения оптической плотности исследуемого раствора при облучении ультрафиолетом с длинами волн 230 и 280 нанометров. Для образцов РНК, не содержащих органических примесей, отношение оптических плотностей на длинах волн 260 и 230 нанометров должно быть не менее 1.8. Для образцов РНК, не содержащих примесей солей и фенола, отношение оптических плотностей на длинах волн 260 и 280 нанометров должно быть не менее 1.8.

2.2.5 Подготовка проб к анализу транскриптомов (RNA-Seq) культур нейронов.

Из образцов тотальной РНК полученных из культур терминально дифференцированных нейральных культур, были сделаны библиотеки для NGS секвенирования, при помощи коммерческих наборов от фирмы New England Biolabs:

1) Набор NEBNext Ultra II Directional для приготовления библиотек РНК для платформы Illumina, с частицами для очистки (24), арт. E7765 S

2) Модуль NEBNext® для выделения поли(A)+ мРНК магнитными шариками (24 реакции) (Реактивы для пробоподготовки по разработанному протоколу при секвенировании нового поколения (NGS)), арт. E7490 S

3) Набор олигонуклеотидов NEBNext® Multiplex для платформы Illumina® с комплектом праймеров No1 (24 реакции) (Реактивы для пробоподготовки по разработанному протоколу при секвенировании нового поколения (NGS)), арт. E7335 S

Все процедуры были выполнены по инструкциям, предложенным производителем наборов.

После получения библиотек, прочтение библиотек было заказано в фирме GeneWIZ (США) на приборе Illumina HiSeq 2500. Всего было проанализировано шесть библиотек, с глубиной прочтения не менее 20 миллионов парноконцевых ридов на образец. После прочтения библиотек, были получены файлы формата fastQ, которые были далее подвергнуты биоинформатической обработке.

2.2.6 Анализ дифференциальной экспрессии генов.

Для картирования и нормализации ридов была использован метод HISAT2 -> featureCounts pipeline, с плагином Stringtie. Данный метод использует сборку человеческого генома hg38.

Считывания (риды) последовательностей ДНК были «очищены» от последовательностей адаптеров с помощью метода Trimmomatic. Считывания были приведены в соответствие с эталонным геномом человека hg38 по программе HISAT2 Суммы ридов были оценены с помощью функции «Суммы» из пакета Subread. Данные

были отфильтрованы (не менее 5 подсчетов как минимум в двух образцах) и обработаны с последовательной UQ и sRUV-нормализацией. Дифференциально экспрессированные гены были выведены с помощью программы DESeq2. Во всех дифференциальных анализах с помощью DESeq2 мы использовали следующий дизайн: дизайн ~ линия ячеек + тип ячейки, чтобы учесть, как линию ячеек, так и тип ячейки. Мы рассматривали, что гены дифференциально ап-регулированы, если P-значение < 0.05, скорректированное по Беньямини-Хохбергу, и $\log_2\text{fold} > 1$. Аналогично, мы рассматривали, что гены дифференциально даун-регулированы, если P-значение < 0.05 и $\log_2\text{fold} < -1$. Для анализа таблиц экспрессии был использован открытый он-лайн сервис GOrilla (<http://cbl-gorilla.cs.technion.ac.il/>).

2.3 Результаты и обсуждение

2.3.1 Дизайн эксперимента

Ранее, в предыдущих работах по проекту, нами были получены несколько линий ИПСК человека, в т.ч. с трисомией 21-й хромосомы (T21, синдром Дауна). По отработанным ранее протоколам направленной дифференцировки, нами был получен ряд нейральных культур, содержащих смешанные популяции нейронов, глиальных клеток и нейральных предшественников. Ранее нами было показано, что нейральные культуры с T21 обладают гиперсекрецией бета-амилоида (bA-40 и bA-42) по сравнению со здоровым контролем с нормальным кариотипом. В ходе проведения эксперимента нами был выделено ряд образцов тотальной РНК из нейральных культур, из которых нами были сделаны библиотеки для NGS секвенирования т.н. транскриптомов (RNA-seq). Данные библиотеки были отсеквенированы и далее подвергнуты биоинформатической обработке.

Была поставлена следующая цель исследования - проанализировать транскриптомы различных культур клеток выращенных *in vitro* (фибробласты, ИПСК, нейральные клетки), полученных от доноров с T21 в сравнении со здоровым контролем и попытаться найти признаки воспроизведения патологических механизмов характерных для биологии синдрома Дауна.

2.3.2 Анализ транскриптомов нейральных культур, полученных от доноров с T21 в сравнении со здоровым контролем

Всего в анализе участвовало 4 культуры фибробластов (2 – с T21, 2 – с нормальным кариотипом), 4 культуры ИПСК (2 – с T21, 2 – с нормальным кариотипом), 8 культур нейральных клеток (4 – с T21, 4 – с нормальным кариотипом). Сравнительный анализ дифференциально экспрессированных генов (DEX гены), показал, что в нейронах выявлено 7998 таких дифференциально экспрессированных транскриптов, в ИПСК - 2280, в фибробластах – 1155 (рисунок 2.1). Анализ распределения DEX генов по хромосомам,

показал, что в целом во всех трех культурах, данные гены распределены по всем хромосомам равномерно (рисунок 2.2). Исключение составляет 21-я хромосома, что очевидно и может служить контролем метода. Анализ распределения стороны изменения экспрессии (понижена или повышена) показал, что для фибробластов и ИПСК это также примерно равно, а для нейронов наблюдается существенный перекоп в сторону UP-регулируемых генов (рисунок 2.2). На данный момент времени, у нас нет гипотез, почему именно в нейральных культурах может наблюдаться данный феномен.

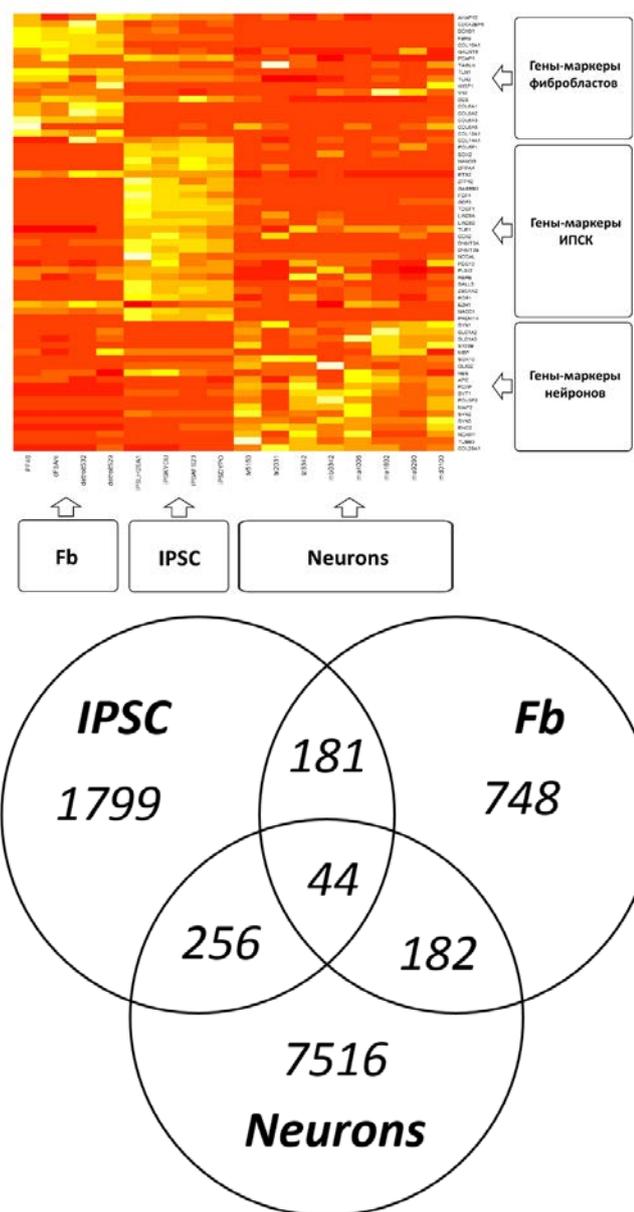


Рисунок 2.1 - Анализ транскриптомных данных различных культур клеток (фибробласты, ИПСК, нейроны), полученных от доноров с синдромом Дауна в сравнении с донорами с нормальным кариотипом. Вверху – тепловая карта, иллюстрирующая экспрессию генов маркеров фибробластов, ИПСК и нейронов

На пересечении всех трех подмножеств DEX генов, для всех трех культур, находятся 44 гена. Нами были проанализирован список этих генов (интересно, что ни один из этих генов не находится на 21-й хромосоме), далее мы подобрали праймеры для оценки уровня экспрессии методов ПЦР в реальном времени, и провели анализ. В итоге мы нашли 11 генов, изменение экспрессии которых подтверждается при помощи количественного ОТ-ПЦР (рисунок 2.3).

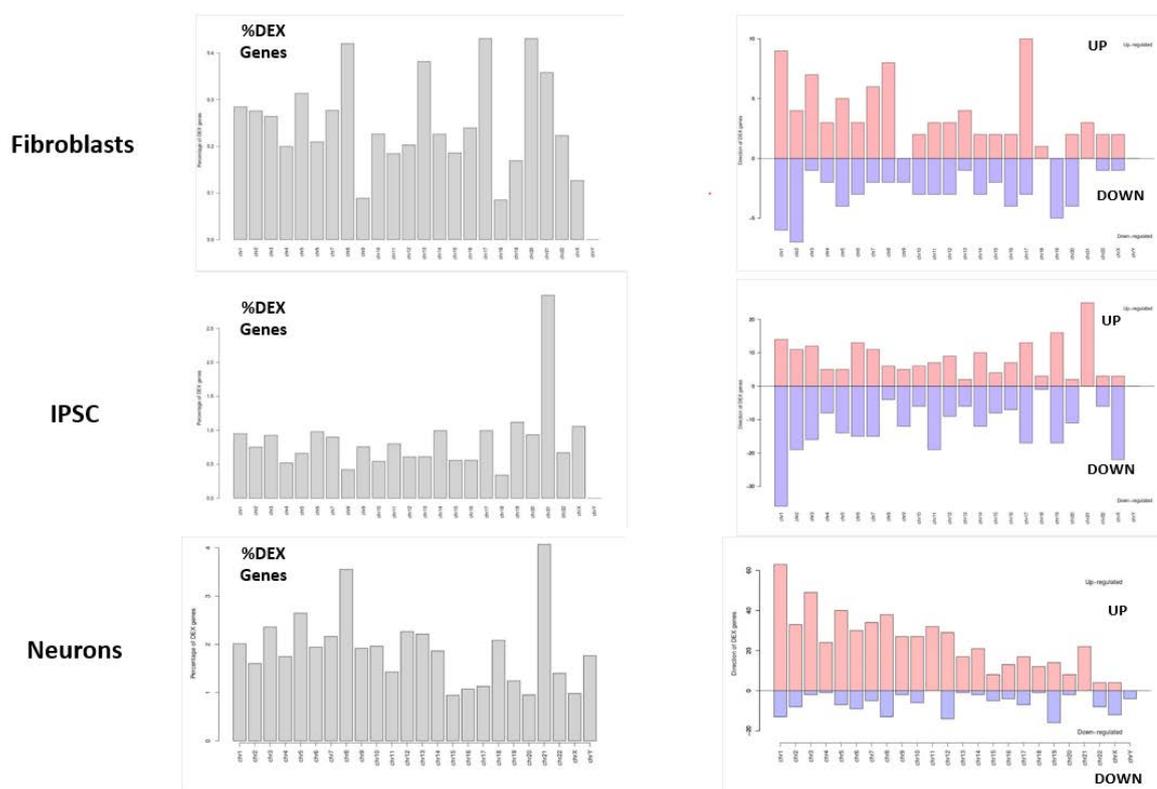


Рисунок 2.2 - Распределение дифференциально экспрессированных генов по хромосомам (слева), с иллюстрацией в какую сторону изменена экспрессия, повышенная (up) или пониженная (down) (справа)

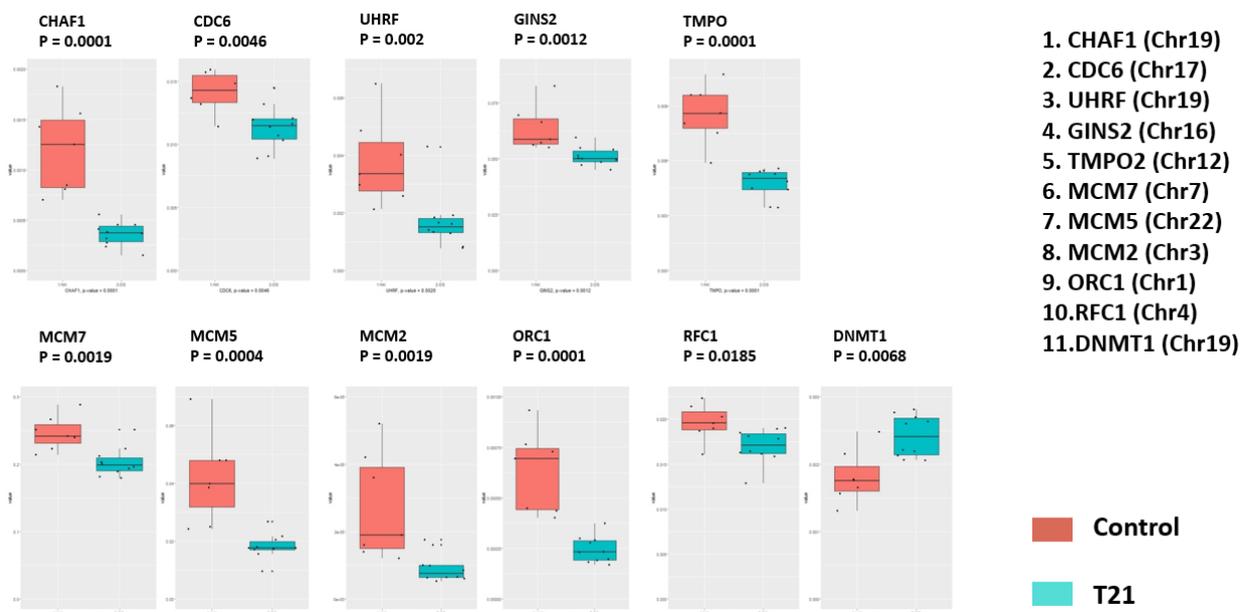


Рисунок 2.3 - Оценка дисбаланса экспрессии генов – измерение уровня экспрессии генов-маркеров методом ОТ-ПЦР в реальном времени

Интересен тот факт, что большая часть этих генов участвует в процессах репликации ДНК и поддержания состояния хроматина, и для большинства из них (10 из 11) показано снижение их уровня экспрессии в T21 клетках. Данное явление может указывать на то, что в клетках с триплицированной 21-й хромосомы, сдвинуты механизмы поддержания нормальной архитектуры хроматина ядерной ДНК, что может быть причиной возникающего дисбаланса экспрессии генов при синдроме Дауна (СД). В то же время, равновероятно, данное явление может быть просто следствием замедленной пролиферации клеток с T21 (и соответственно снижением экспрессии генов, вовлеченных в этот процесс), возникающей как раз из-за вышеупомянутого дисбаланса генов при СД. Для точного выяснения этих механизмов, требуется новые исследования.

Далее, нами был проанализирован ряд исследований, посвященным изучению транскриптомов клеток с T21 в сравнении со здоровым контролем, и чьи «сырые» данные можно было скачать с открытых источников. Данные исследования представлены в таблице 2.1 [1, 2, 3].

Таблица 2.1 - Список использованных данных различных транскриптомов, включая данное исследование.

<i>##</i>	<i>datasets</i>	<i>experiment design</i>	<i>data</i>	<i>SRA</i>
1	this study (rdm_Neuro)	4+4 (tri- and disomic ipsc derived neurons, different people)	NEBNext Ultra II / HiSeq1500 PE	TBA
2	this study (rdm_fibro & rdm_ipsc)	2+2+2+2 (tri- and disomic fibroblasts and ipsc, different people)	NEBNext Ultra II / HiSeq1500 SE	TBA
3	(Gonzales_ipsc & Gonzales_Neuro) Gonzales et al. 2018. [1]	3+3+3+3 (trisomic and isogenic artificial disomic controls ipsc & neurons)	TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit (polyA) / HiSeq 2000 SE (100-115 bp)	SRP113668
4	(Hibaoui_ipsc) Hibaoui et al. 2014. [2]	3+4 (trisomic and disomic ipsc from discordant twin pair)	TruSeq RNA Sample Preparation kit (S-930-2001) / HiSeq 2000 100 bp PE	SRP032928
5	(Sullivan_fibro) Sullivan et al. 2016.. [3]	12 age- and gender-matched human fibroblasts from down and healthy people, fibroblasts; 2 replicates per sample	TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit / HiSeq 2000 SE	SRP072769

После обработки всех сырых данных, нами был поставлен внутренний контроль качества обработки ридов. Для этого мы оценили количества ридов картируемых на 21-ю хромосому, оказалось, что количество прочтений на 21-ой хромосоме больше у образцов, полученных из клеток больных людей во всех экспериментах (рисунок 2.4).

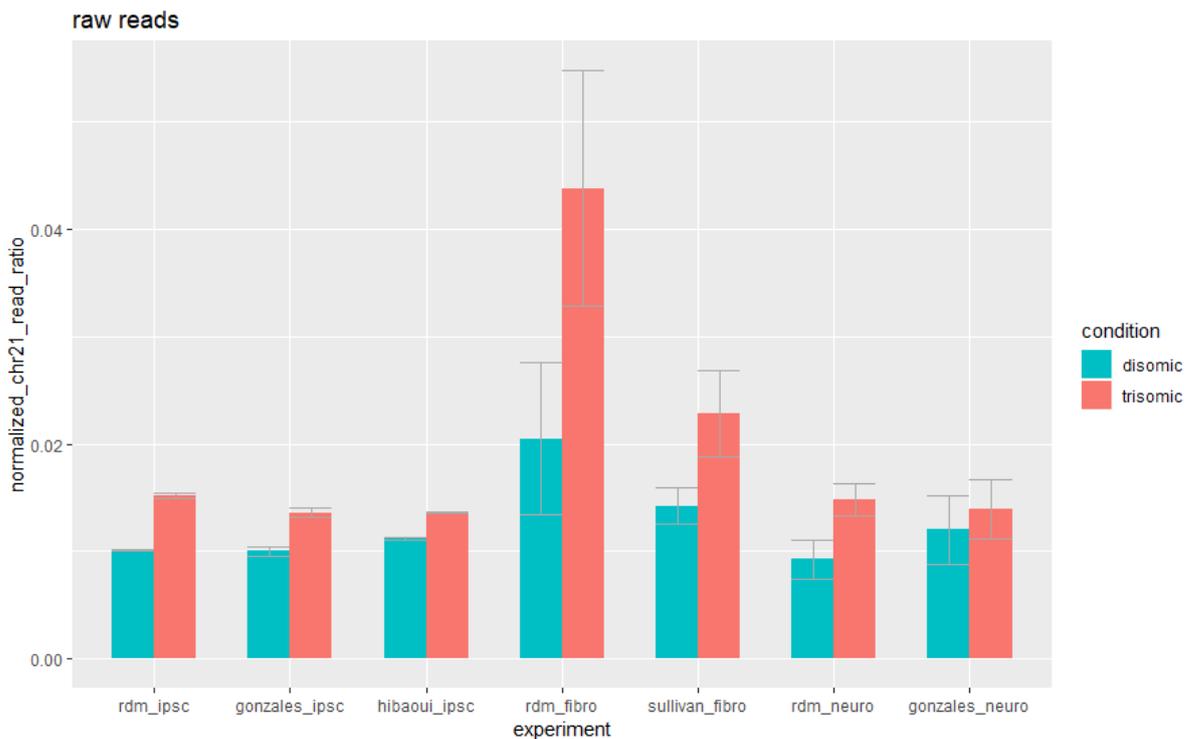


Рисунок 2.4 - Внутренний контроль, оценка количества ридов, приходящихся на 21-ю хромосому

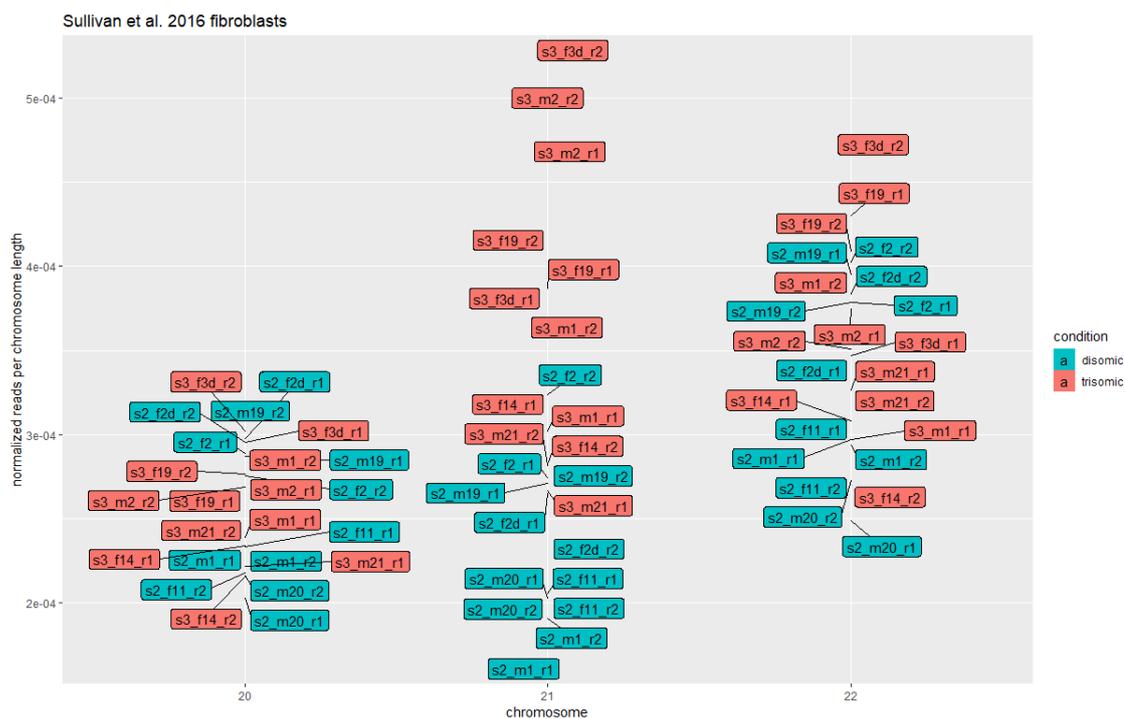


Рисунок 2.5 - Внутренний контроль, оценка количества ридов, приходящихся на 20-ю, 21-ю и 22-ю хромосому в исследовании Sullivan_fibro

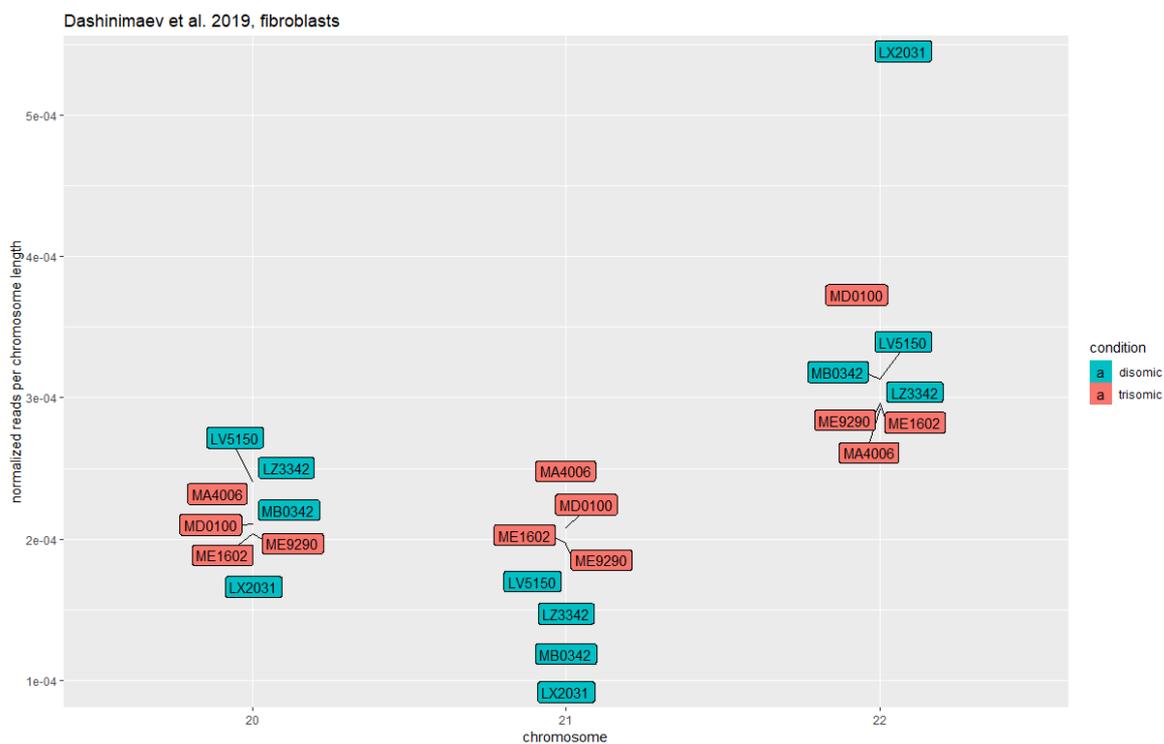


Рисунок 2.6 - Внутренний контроль, оценка количества ридов приходящихся на 20-ю, 21-ю и 22-ю хромосому в данном исследовании

Также был проведен внутренний контроль оценки количества ридов приходящихся на каждую хромосому, в каждом исследовании. Мы наблюдаем ожидаемый эффект увеличения количества ридов, приходящихся на 21-ю хромосому в клетках с T21 по сравнению с клетками с нормальным кариотипом, чего не наблюдалось для 20-й или для 22-й хромосомы. Репрезентативные выборки представлены на рисунках 2.5 и 2.6.

Далее для каждого исследования были посчитаны и найдены дифференциально экспрессированные гены (не на 21-й хромосоме), разница в экспрессии которых была максимальная между T21 клетками и здоровым контролем, во всех трех клеточных типах, во всех исследованиях. Результаты представлены на рисунке 2.7.

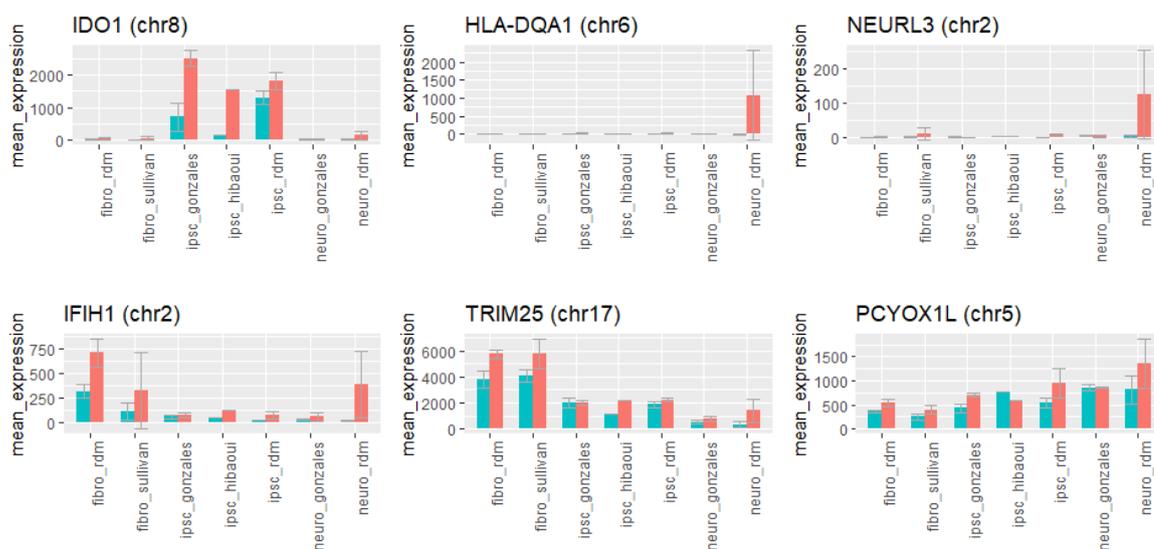


Рисунок 2.7 - Топовые гены из числа дифференциально-экспрессируемых генов во всех трех клеточных типах, во всех исследованиях, не на 21-ой хромосоме (design = ~ celltype+condition)

Проведенный анализ по кластеризации тотальных транскриптомов всех исследований (получение матрицы расстояний между образцами), ожидаемо показал, что образцы очень хорошо разделяются не только по типу (все фибробласты ложатся с фибробластами, а ИПСК с ИПСК), но и между исследованиями. Таким образом, все фибробласты данного исследования отличались от фибробластов исследования Sullivan et al. [3], а все ИПСК данного исследования, отличаются от ИПСК исследования Gonsales et al. [1] (рисунок 2.8). Данный эффект можно объяснить, тем что в каждой лаборатории приняты собственные методы культивирования данных клеток, выделения РНК, пробоподготовки библиотек для секвенирования и само секвенирование. В сумме это накладывает свой отпечаток, или «подчерк» на все результаты, выходящие из каждой конкретной лаборатории, которые становятся видны в том числе и таким образом. Тем не менее, отличия не настолько большие чтобы можно было спутать фибробласты с ИПСК. Группировка результатов методом главных компонент (principal component analysis, PCA) показывает, что в принципе мы видим неплохую группировку результатов полученных фибробластов и ИПСК (рисунок 2.9).

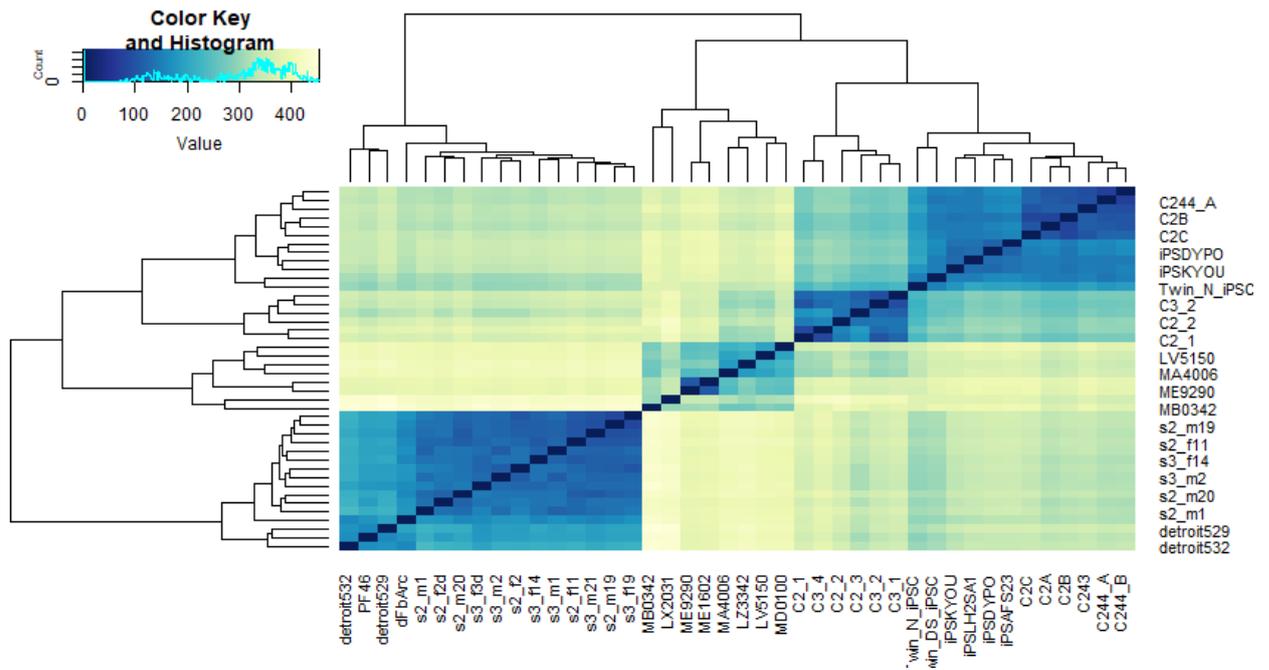


Рисунок 2.8 - Матрица расстояний между образцами (variance stabilizing transformation, vst из DEseq2)) всех исследований, всех образцов

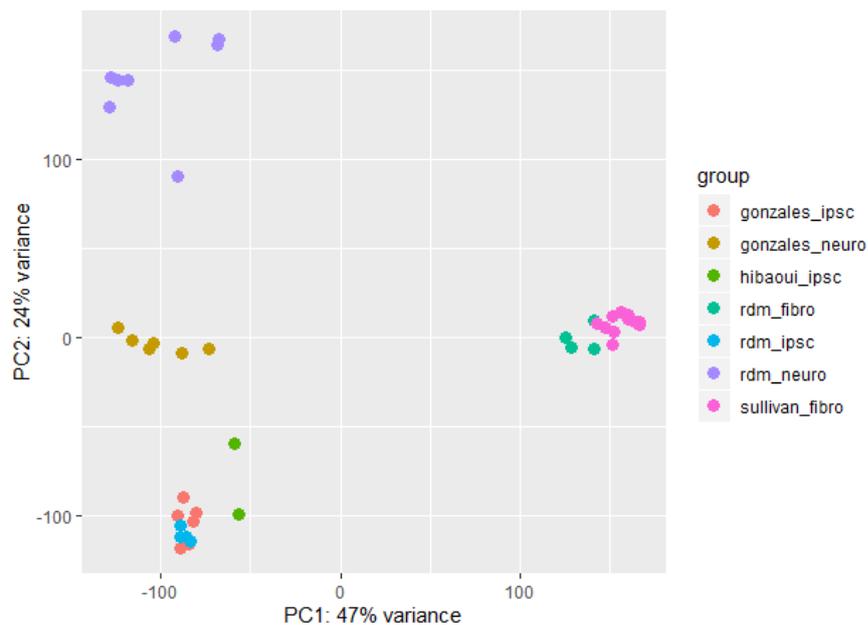


Рисунок 2.9 - PCA - группировка по экспериментам (variance stabilizing transformation)

Данный эффект не очень хорошо воспроизводится на нейронах в данном исследовании и исследовании Gonsales et al. [1], однако это может быть объяснено разницей в дифференцировочных протоколах. Поскольку из ИПСК могут быть получены нейроны совершенно разных типов, а также учитывая различную эффективность дифференцировки (загрязнение культур недифференцированными нейробластами или глиальными клетками), разница в транскриптомах может быть значительно большей, чем в образцах ИПСК или фибробласты, которые представляют из себя гораздо более

гомогенные культуры. Проведенный аналогичный анализ-сравнение по признаку T21 против нормального кариотипа показывает, что разница между данными транскриптомами не настолько большая, чтобы различать их в разные группы (рисунок 2.10)

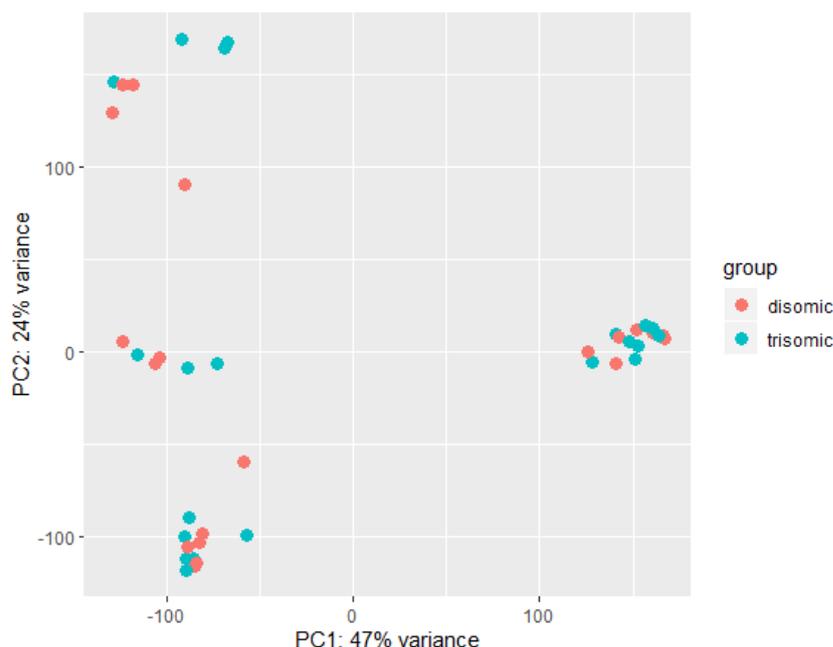


Рисунок 2.10 - PCA — группировка по количеству хромосом (variance stabilizing transformation)

Далее нами был проведен анализ на уровень экспрессии маркеров нейронов различных типов головного мозга (Ex1-Ex8, In1-In8), на всех исследуемых образцах всех исследований, в сравнении с T21 клетки против здорового контроля (рисунок 2.11, 2.12). В конечном итоге, нами были получены данные, что нейроны с T21 экспрессируют значительно больше маркеров Ex6 подтипа, чем нейроны с нормальным кариотипом. Поскольку Ex6 нейроны, характерны для глубокого слоя коры L6 головного мозга, мы можем предположить, что у людей с синдромом Дауна может быть более развиты глубокие слои коры головного мозга по сравнению со здоровыми людьми. Проведенный анализ научной литературы показал, что морфометрические измерения головного мозга людей с синдромом Дауна также показывают что при данном синдроме страдают в основном внешние слои коры головного мозга, при этом сама толщина коры в целом больше чем людей с нормальным кариотипом, что может быть видимо объяснено компенсаторными механизмами [4, 5].

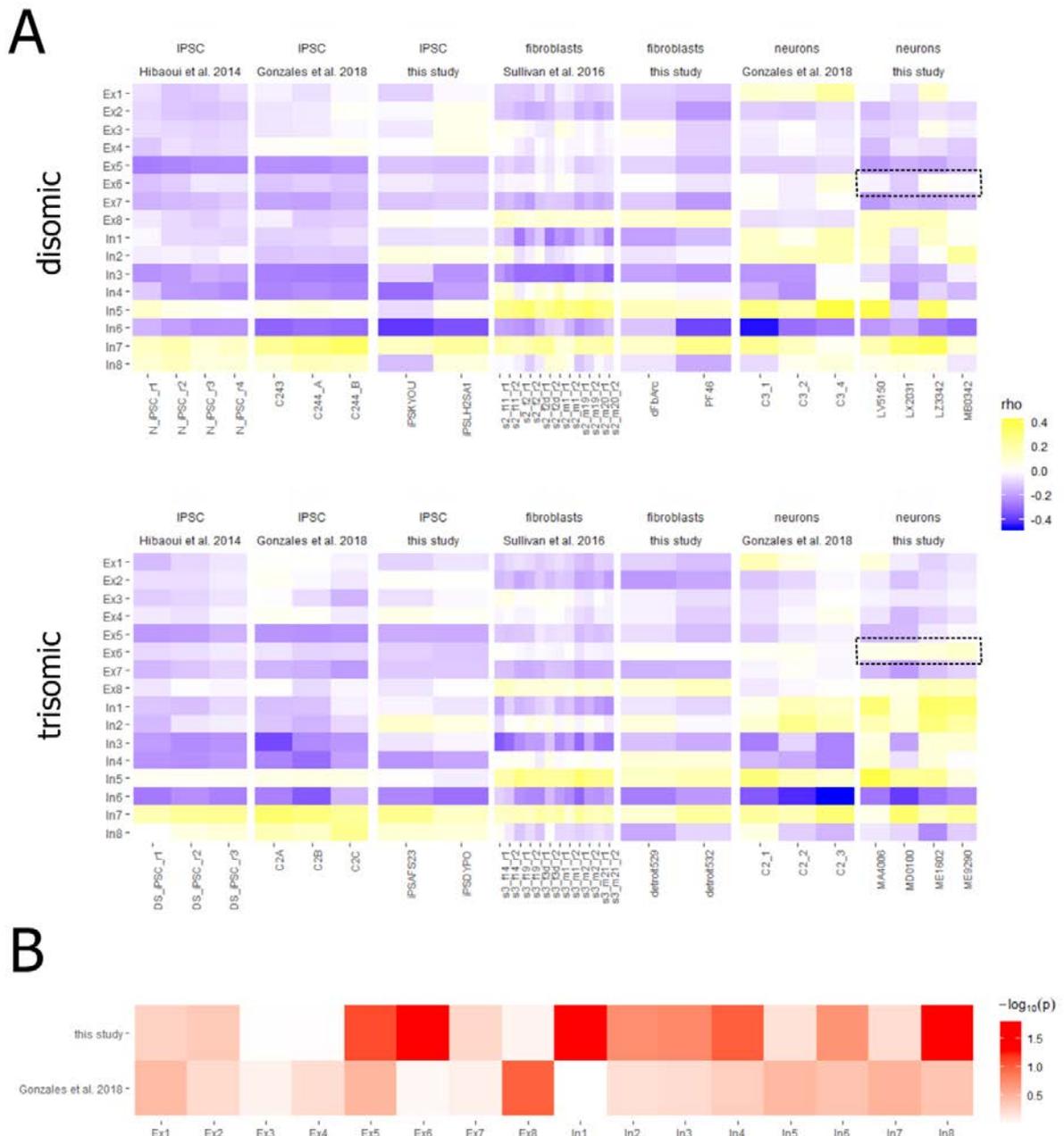


Рисунок 2.11 - Результаты анализа экспрессии маркеров нейронов различных типов головного мозга (Ex1-Ex8, In1-In8)

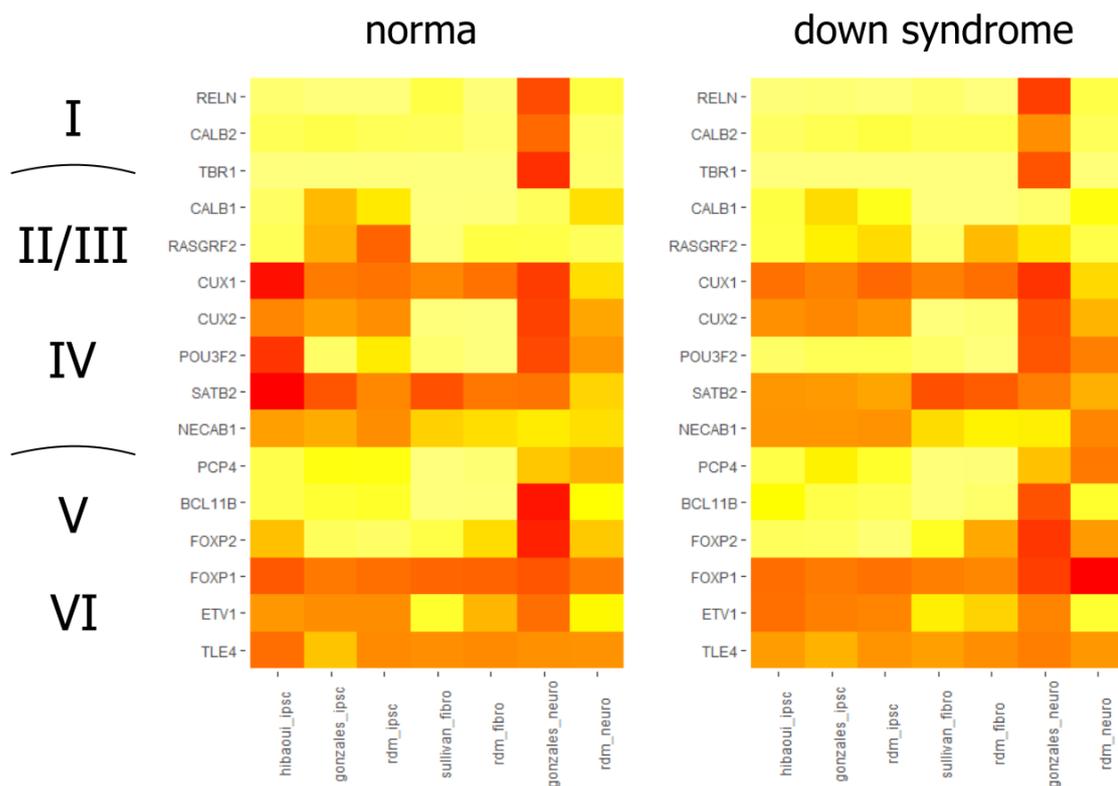


Рисунок 2.12 - Результаты анализа экспрессии маркеров нейронов различных слоев коры головного мозга T21 клетки против здорового контроля

Таким образом, нами были получены данные о том, что при помощи анализа транскриптомом нейронов, выращенных в условиях чашки Петри *in vitro*, полученных дифференцировкой из ИПСК с T21, в сравнении с аналогичными клетками с нормальным кариотипом, мы можем наблюдать некоторые патологические признаки характерные для людей с синдромом Дауна.

Поскольку одной из важнейших характеристик, контролирующих адекватное прохождение нейрогенеза и развития нейропластичности, является корректное функционирование митохондрий, нами было принято решение, также изучить некоторые аспекты взаимосвязи синдрома Дауна и дисфункции митохондрий. Уже было показано, что дисфункциональные митохондрии и митохондриально-зависимая активация внутриклеточных каскадов стресса являются критическими иницирующими событиями во многих нейродегенеративных или нейроразвивающихся заболеваниях человека, включая синдром Дауна [6-8]. Поэтому терапевтические стратегии, направленные на митохондрии, могут иметь большой потенциал для новых схем лечения в синдроме Дауна. В рамках работы по настоящему проекту нами, был детально изучен один из ключевых факторов функционирования митохондрий в клетках человека - фактор инициации митохондриальной трансляции 3 (IF3mt), который играет ключевую роль в синтезе белков в митохондриях. По результатам анализа нами был подготовлена научная публикация [9],

в которой мы суммировали существующие на данный момент информацию касательно IF3mt, а также обсудили взаимосвязь и IF3mt и некоторых нейродгенеративных заболеваний человека.

2.4 Заключение

Таким образом, можно заключить, что анализ транскриптомов различных типов клеток, выращенных в условиях чашки Петри *in vitro*, в том числе полученных от доноров-носителей наследственных заболеваний, дает дополнительные возможности для проведения более полных исследований данных патологий. Проведенный нами анализ транскриптомов (RNA-seq) полученных нейтральных культур от доноров носителей синдрома Дауна, подтвердил повышенную экспрессию генов, локализованных на 21-й хромосоме в клетках T21, а также мы обнаружили сдвиг экспрессии генов маркеров нейронов некоторых слоев коры головного мозга, что может отражать существующую клиническую картину с патологией развития головного мозга пациентов с синдромом Дауна. Данные наблюдения позволяют нам рассматривать выращенные *in vitro* нейтральные культуры с T21 как удобный инструмент моделирования развития слоев коры головного мозга людей с синдромом Дауна.

2.5 Список использованных источников

1. Gonzales P.K., Roberts C.M., Fonte V., Jacobsen C., Stein G.H., Link C.D. Transcriptome Analysis of Genetically Matched Human Induced Pluripotent Stem Cells Disomic or Trisomic for Chromosome 21 // PloS One. - 2018. – Vol. 13, № 3. –P. e0194581.
2. Hibaoui Y., Grad I., Letourneau A., Sailani M.R., Dahoun S., Santoni F.A., Gimelli S., et al “Modelling and Rescuing Neurodevelopmental Defect of Down Syndrome Using Induced Pluripotent Stem Cells from Monozygotic Twins Discordant for Trisomy 21 // EMBO Molecular Medicine. - 2014. – Vol. 6, № 2. – P. 259 – 77. Ссылки в тексте нет
3. Sullivan K.D., Lewis H.C., Hill A.A., Pandey A., Jackson L.P., Cabral J.M., Smith K.P., et al. Trisomy 21 Consistently Activates the Interferon Response // eLife. - 2016. – Vol. 5 (July).
4. Wisniewski K.E. Down syndrome children often have brain with maturation delay, retardation of growth, and cortical dysgenesis // Am J Med Genet Suppl. – 1990. – Vol. 7. – P. 274 - 81.
5. Lee N.R., Adeyemi E.I., Lin A., Clasen L.S., Lalonde F.M., Condon E., Driver D.I., Shaw P., Gogtay N., Raznahan A. Dissociations in Cortical Morphometry in Youth with Down Syndrome: Evidence for Reduced Surface Area but Increased Thickness // Cerebral Cortex. - 2016. – Vol. 26. – Is. 7. – P. 2982 – 2990.

6. Valenti D., Braidy N., De Rasmio D., Signorile A., Rossi L., Atanasov A.G., Volpicella M., Henrion-Caude A., Nabavi S.M., Vacca R.A. Mitochondria as pharmacological targets in Down syndrome // *Free Radic Biol Med.* – 2018. – Vol. 114. – P. 69 - 83. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.08.014. Epub 2017 Aug 31.
7. Couser N.L., Marchuk D.S., Smith L.D., Arreola A., Kaiser-Rogers K.A., Muenzer J., Pandya A., Gucsavas-Calikoglu M., Powell C.M. Co-occurring Down syndrome and SUCLA2-related mitochondrial depletion syndrome // *Am J Med Genet A.* – 2017. – Vol. 173(10). - P. 2720 - 2724. doi: 10.1002/ajmg.a.38351. Epub 2017 Jul 27.
8. Parra V., Altamirano F., Hernández-Fuentes C.P., Tong D., Kyrychenko V., Rotter D., Pedrozo Z., Hill J.A., Eisner V., Lavandero S., Schneider J.W., Rothermel B.A. Down Syndrome Critical Region 1 Gene, Rcan1, Helps Maintain a More Fused Mitochondrial Network // *Circ Res.* - 2018. – Vol. 122(6). - P. e20-e33. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311522. Epub 2018 Jan 23.
9. Chicherin I.V., Baleva M.V., Levitskii S.A., Dashinimaev E.B., Krasheninnikov I.A. Mitochondrial Translation Initiation Factor 3: Structure, Functions, Interactions, and Implication in Human Health and Disease // *Biochemistry-Moscow.* - 2019. - Vol. 84. - Is. 10. - P. 1143 - 1150. DOI: 10.1134/S0006297919100031. (WoS, Scopus) – Q4 - Чичерин И.В., Балева М.В., Левицкий С.А., Дашинимаев Э.Б., Крашенинников И.А. Третий фактор инициации трансляции в митохондриях: структура, функции и взаимодействия и роль в здоровье и болезнях человека // *Биохимия.* - 2019. - Т. 84, № 10. - С. 1401 - 1409

2.6 Отчетные публикации по разделу

Chicherin I.V., Baleva M.V., Levitskii S.A., **Dashinimaev E.B.**, Krasheninnikov I.A. Mitochondrial Translation Initiation Factor 3: Structure, Functions, Interactions, and Implication in Human Health and Disease // *Biochemistry-Moscow.* - 2019. - Vol. 84. - Is. 10. - P. 1143 - 1150. DOI: 10.1134/S0006297919100031. (WoS, Scopus) – Q4 - Чичерин И.В., Балева М.В., Левицкий С.А., **Дашинимаев Э.Б.**, Крашенинников И.А. Третий фактор инициации трансляции в митохондриях: структура, функции и взаимодействия и роль в здоровье и болезнях человека // *Биохимия.* - 2019. - Т. 84, № 10. - С. 1401 - 1409. DOI: 10.1134/S0320972519100038. (РИНЦ).

Раздел 3. Разработка методов коррекции функции генов, связанных с заболеваниями у человека

3.1 Введение

Среди нейродегенеративных повреждений мозга в настоящее время инсульт является одной из самых острых социально-медицинских проблем. Перспективными методами, которые обеспечивают регенерацию тканей после инсульта, могут стать технологии на базе аутологичных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК). Трансплантации нейральных стволовых клеток, полученных из ИПСК методом направленной дифференцировки, потенциально могут остановить деграцию нервной ткани и значительно ускорить процессы регенерации. Одним из преимуществ использования ИПСК является их способность к дифференцировке в различные типы клеток. На данный момент с помощью отработанных методов получения, культивирования и модификации данных клеток (редактирования генома) возможно создание линий с различными новыми свойствами. Такой геномной модификацией может стать нокаут генов рецепторов TNFaR1 и ASIC1a. TNFaR1 является основным рецептором фактора некроза опухоли (Tumor Necrosis Factor, TNF), который является важнейшим многофункциональным провоспалительным цитокином. Активация TNFaR1 запускает программу апоптоза в клетке. ASIC1 является трансмембранным белком, важнейшим составляющим комплексов pH-чувствительных ионных каналов (Acid-sensing ion channels (ASICs)). Данные каналы являются рецепторами-активаторами различных внутриклеточных систем (в т. ч. апоптоза) в ответ на ацидоз (пониженный pH). Поскольку инсульты сопровождаются воспалительным и ацидозным шоком в зонах поражения нервной ткани, инактивирование генов TNFaR1 и ASIC1 в вводимых клетках может повысить вероятность их выживания и приживления после трансплантации. Получение таких нокаутных нейральных стволовых клеток человека (с последующей возможностью дифференцировки в нейроны или глию) также может служить основой для фундаментальных исследований данных генов, их продуктов и основой для систем скрининга лекарственных средств против инсульта.

Цель проекта - Получение нейральных стволовых клеток человека с редактированным геномом (нокаут генов рецепторов TNFaR1 и ASIC1) при помощи системы CRISPR/Cas9.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- Подобрать последовательности гидовых РНК системы CRISPR/Cas9 для нокаута генов TNFaR1 и ASIC1a, путем создания значимых делеций в белок-кодирующей

последовательности гена. Клонировать соответствующие генетические конструкции для экспрессии подобранных гидовых РНК.

- Провалидировать подобранные гидовые РНК на клеточной линии фибробластов человека (1608hT-Cas9) с постоянной экспрессией Cas9.
- Получить линии индуцированных плюрипотентных клеток человека с нокаутом генов рецепторов TNFaR1 и ASIC1a.
- Получить нейральные стволовые клетки из нокаутных ИПСК путем направленной дифференцировки.

3.2 Материалы и методы

3.2.1 Материалы

3.2.1.1 Реагенты

- BD Matrgiel (BD Biosciences, Cat#356234)
- mTeSR1 (Stem Cell Technologies, Cat#85850)
- Диспаза Dispase II (Life Technologies, Cat#17105041)
- Рок-ингибитор Y-27632 dihydrochloride (Abcam, Cat#ab120129)
- DMEM/F12 (ПанЭко, Cat# C470п)
- PBS (ПанЭко, Cat#P060п)
- 5-кратный ПЦР Мастер-микс ScreenMix-HS (Евроген, Cat# PK143L)
- FresR (Stem Cell Technologies, Cat# 05859)
- Gene Pulser® Electroporation Buffer (Bio-Rad, Cat# 1652677)
- Пенициллин/стрептомицин 100-кратный (Gibco, Cat#15140-122)
- Вода свободная от нуклеаз (Qiagen, Cat#129114)
- Набор для выделения плазмидной ДНК Plasmid Miniprep (Евроген, Cat#BC021)
- Набор для очистки ДНК Cleanup Standard (Евроген, Cat#BC022)
- Лизис-буфер для скрининга ИПСК (Добавьте протеиназу К в буфер ТЕ, до конечной концентрации 0,2мг/мл. Разделите по аликвотам по 500 мкл, далее хранить аликвоты при -20°C. Разморозив одну аликвоту, ее не следует перезамораживать, хранить не более 3 суток при +4°C.)

3.2.1.2 Вектора

pCas9-IRES-EGFP. Синтез данной генетической конструкции был осуществлен на заказ в компании Евроген (Россия).

pU6-gRNA. Данная генетическая конструкция была любезно предоставлена в наше пользование профессором Скрыбиным Б. В. (Центр трансгенных животных, университета г.Мюнстера).

Последовательности и карты векторов приведены в Приложении.

3.2.1.3 Антитела

В работе использовались моноклональные мышинные антитела к антигенам:

SOX2 (Millipore, MAB2018)

PAX6 (Millipore, MAB5552)

NESTIN (Millipore, MAB5326)

Для последующей окраски использовались вторичные антитела против мышинных IgG конъюгированные с флуоресцентным красителем Alexa488 (Life Technologies, США)

3.2.2 Методы

3.2.2.1 Культура клеток.

Линия клеток hiPSC-KYOU с нормальным кариотипом была куплена в клеточном банке ATCC, линия фибробластов кожи человека 1608-hT. Линия ИПСК культивировали в среде mTeSR1 (#85850, Stem Cell Technologies, Канада) в культуральной посуде с покрытием Matrigel (#356234, BD Bioscience, США) при 37°C, 5% O₂, 5% CO₂, фибробласты культивировали в среде DMEM с добавлением 10%FBS (Hyclone, США), при 37°C, 5% CO₂. Для пассажа клетки обрабатывали Dispase (1 мг / мл, SCT) или 0,05% трипсин-ЭДТА (Gibco, Life Technologies, США), ресуспендировали в PBS, осаждали центрифугированием (200g, 5мин, RT), осадок ресуспендировали в mTeSR1/ DMEM, и рассевали в необходимой плотности.

3.2.2.2 Дифференцировка ИПСК в нейральном направлении.

После посева ИПСК поддерживали в среде mTeSR1, дополненной 5-кратной добавкой 5 мкМ ROCKi (Y27632, Abcam ab120129 при 37°C, 5% O₂ и 5% CO₂ в течение трёх суток. Затем клетки переводили на среду NIK (PSC Neural Induction Medium, ThermoFisher # A1647801), состоящую из Neurobasal medium (1x), NIK supplement (50x), GlutaMax (100x), PenStrep (100x) для дифференцировки в нейральные стволовые клетки. После трёх пассажей на среде NIK культуру клеток поддерживали на среде NPM Neural Proliferation Medium (#05751, Stem Cell Technologies, Канада), состоящую из DMEM + DMEM / F12 (Gibco, 21331020) в равной пропорции, B27 supplement (1x), 1 мМ GlutaMax (Gibco, 35050038), 1 мМ пирувата натрия (Gibco, 1160039), PenStrep (100x), 100 нг/мл EGF, bFGF (PeproTech, США). После трёх пассажей на NPM, клетки вводили в терминальную нейрональную дифференцировку - на среде N2B27, состоящую из DMEM / F12 (Gibco, 21331020) + Neurobasal Medium (Stem Cell Technologies, Канада) в равной пропорции, N2- supplement (Gibco, США), B27-supplement (Gibco, США), β-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, США), 1 мМ GlutaMax (Gibco, 35050038), 1 мМ пирувата натрия (Gibco, 1160039), PenStrep (100x) в течение 14-21 дней.

3.2.2.3 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 (1:100) и вторичными антителами (1:1000), растворенными в блокирующем растворе (PBS + 10%FBS + 0,1% Tryton-X-100). После каждой окраски клетки трижды промывали PBS. Перед съемкой препараты докрасивали раствором DAPI (1 мкг/мл в PBS). Изображения были получены с помощью флуоресцентной микроскопии на приборе EVOS FL Auto («Life Technologies»)

3.2.2.4 Выделение геномной ДНК

Для выделения геномной ДНК использовали порядка $1-3 \cdot 10^6$ клеток. Клетки снимали с чашек трипсином, центрифугировали 5 мин при 1500 об/мин, осадок ресуспендировали в 500 мкл лизирующего буфера (1 М Tris, 5 М NaCl, 0,5 М EDTA, 10% SDS, 100x Proteinase K, pH=8.0) и инкубировали при +37°C в течение 1-2 ч для прохождения лизиса клеток. Лизат клеток экстрагировали фенолом, центрифугировали 2 мин 10 тыс. об/мин, затем экстрагировали хлороформом, повторяли центрифугирование 2 мин 10 тыс.об/мин, затем мягко экстрагировали изопропанолом (в этот момент геномная ДНК выпадает из раствора в виде полупрозрачного клубка нитей) и повторяли центрифугирование 2 мин 10 krpm. Выделенную ДНК подсушивали и растворяли в чистой воде свободной от нуклеаз.

3.2.2.5 Выделение геномной ДНК из малого количества клеток

Клетки осаждались в пробирках при помощи центрифугирования (режим 10005000g) в течение 5 минут. Удаляли супернатант, по возможности отбирая почти всю жидкость. Ресуспендировали тщательно клетки в 10-20 мкл лизирующего буфера (буфер TE + протеиназа К). Добавляли протеиназу К в буфер TE, до конечной концентрации 0,2мг/мл. Разделяли по 500 мкл, далее хранили аликвоты при -20°C. Далее помещали пробирки в амплификатор, настроенный на следующую программу:

- +56°C – 2 часа
- +95°C – 10 минут
- +4°C - ∞

Основной смысл использования такого усеченного протокола выделения геномной ДНК (а не стандартного протокола с очисткой на фенол-хлороформе), это необходимость проведения быстрого скрининга клонов в течение 1-3 дней.

3.2.2.6 Выделение тотальной РНК

Для выделения тотальной РНК из исследуемых клеток применяли набор «Rneasy Mini Kit» (Cat#74106) фирмы «Qiagen» для выделения тотальной РНК на колонках согласно инструкции производителя. Для выделения тотальной РНК использовали порядка 106 клеток. Примеси геномной ДНК удаляли с помощью «RNase free DNase Set» (Cat# 79254) фирмы «Qiagen». Концентрацию РНК в полученном растворе измеряли с помощью спектрофотометрического анализа с использованием спектрофотометра «BioPhotometer plus» фирмы «Eppendorf».

3.2.2.7 Обратная транскрипция

Для обратной транскрипции полученной РНК использовали набор «Обратная транскриптаза MMLV» (Cat# SK022) фирмы «Евроген» согласно инструкции производителя. В качестве праймеров использовались olig(dT)-праймеры. В реакцию синтеза кДНК вносили 2 микрограмма полученной ранее РНК.

3.2.2.8 ПЦР в реальном времени

Для проведения ПЦР в реальном времени использовали 5x реакционную смесь «HS-SYBR+ROX» (Cat# PK149L) фирмы «Евроген». ПЦР-анализу подвергалась кДНК, полученная в ходе обратной транскрипции. В данной работе использовали амплификатор «BioRad термоциклер CFX96» фирмы «BioRad». Праймеры подбирались с помощью программы PrimerBlast (таблица 3.1). Эффективность ПЦР определяли с помощью построения стандартной кривой, специфичность амплификации по кривой плавления. Для определения относительных уровней экспрессии исследуемых генов использовался $\Delta\Delta C_t$ метод.

Таблица 3.1 - Последовательность праймеров для анализа уровня экспрессии гена TNFR1

Название	Последовательность 5'-3'	Температура отжига
TNFR1_for TNFR1_rev	TCCTGTAGTAACTGTAAGAAAAGCC AAATGACCAGGGGCAACAGC	60.0°C

3.2.2.9 Клонирование

Для геномного редактирования ИПСК с T21 мы использовали систему CRISPR/Cas9, гидовые РНК подбирались с помощью он-лайн ресурсов pubmed.gov, ensembl.org, csispr.mit.edu (в настоящий момент не работает, заменой может служить crispor.tefor.net). Гидовые РНК были фосфорилированы с помощью T4 полинуклеотидкиназы (NEB) и клонированы в вектор pU6-BbsI-gRNA, предварительно обработанный рестриктазой BbsI (NEB).

3.2.2.10 Нокаутирование генов ASIC1a и TNFaR1

Синтез плазмиды кодирующей белок Cas9 вместе с флуоресцентным белком EGFP был заказан нами в компании «Евроген».

Доставка генетических конструкторов, кодирующих элементы системы редактирования, осуществлялась с помощью электропорации на приборе (BioRad Gene Pulser X Cell). После электропорации, ИПСК высевали на чашки, покрытые матригелем, фибробласты высевали на чашку с DMEM. Эффективность трансфекции составляла в среднем 2%. Через 48 часов проводился клеточный сортинг на приборе BioRad S3e Cell sorter, на котором отбирали популяцию клеток с зеленой флуоресценцией. После сортинга клеточную культуру подвергали клонированию малым разведением. Для этого в 6-см чашку Петри, покрытую матригелем (в случае ИПСК) высевали порядка 500-1000 клеток в среде mTesr1. Через две недели клоны изолировали и проводили скрининг. Для первичной детекции делеций проводился ПЦР анализ наличия делетированных ампликонов, а также T7E1 анализ, который также позволяет оценить наличие мутантных аллелей. Далее для выбранных клонов проводили секвенирование аллелей.

3.2.2.11 ПЦР анализ

Для проведения ПЦР использовали амплификатор «Термоциклер C100 Touch» компании «BioRad». ПЦР проводили в микропробирках на 200 мкл; для амплификации использовали готовые наборы «ScreenMix» производства компании «Евроген». Температуру отжига для каждого праймера определяли с помощью программы Primer Blast, а также определяли опытным путем. Температурно-временные параметры амплификации для праймеров включали предварительную денатурацию при 95°C (5 мин.), 30 циклов, состоящих из денатурации при 95°C (30 с.), отжига праймеров при соответствующей для них температуре (таблица 3.2) – 30 сек., элонгации 72°C (50 с.); финальный досинтез 72°C (5 мин.).

Таблица 3.2 - Используемые в работе праймеры для анализа результатов работы системы CRISPR/Cas9

Название	Последовательность 5'-3'	Температура отжига
ASIC1_132_for ASIC1_132_rev	ACGCTATGGAAAGTGCTACA CACACAGGCAGGTA CT CGTC	61.2°C
TNFR1_for TNFR1_rev	AGGATGTCCAACAATCTGTGT CAGGTCAC TTCTCCTCACC	65.0°C

Результаты амплификации регистрировали после электрофоретического разделения в 1,5% агарозном геле с добавлением бромистого этидия в гель-документирующей системе «Chemi Doc™ MP Imaging System» компании «BioRad».

Размер продукта ПЦР измеряли, используя маркеры молекулярного веса FastRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder 10-200 п.н. (Thermo Scientific). Для проверки контаминации реакционной смеси и эффективности ПЦР в каждый эксперимент включали отрицательный контроль (вода, свободная от ДНК и РНК).

3.2.2.12 T7E1 анализ

Для проведения T7E1 анализа была выполнена амплификация интересующего локуса фрагмента гена. Использовалась 5x реакционная смесь «ScreenMix» (Cat#PK041S) фирмы «Евроген». ПЦР-анализу подвергалась геномная ДНК, выделенная из клеток после процедуры редактирования генома. Далее проводили денатурацию ампликонов при 95°C 2 минуты, затем быструю ренатурацию, снижая температуру на 1°C каждые 10 секунд до 85°C, затем медленную ренатурацию охлаждением до 25°C. Ренатурированные ампликоны подвергались рестрикции с 1 ед. T7E1 эндонуклеазы (#M0302L New England Biolabs) в течение 30 мин при 37°C. Далее проводился электрофорез в 2% агарозном геле с добавлением бромистого этидия для детекции делеций. Факт редактирования фиксировали по появлению дополнительных полос при электрофорезе, идущих ниже основного ампликона дикого типа.

3.3 Результаты и обсуждение

3.3.1 Подбор последовательностей гидовых РНК. Создание генетических конструкций.

Для проведения нокаута ASIC1a и TNFaR1 мы изучили структуру каждого гена. Нами было решено, сделать нокауты, таким образом, чтобы обеспечить сдвиг рамки считывания кодирующей последовательности гена. Сдвиг происходит при появлении делеции участка гена или инсерции некой последовательности в ген, длина которой будет не кратна трем.

Как было описано ранее, при появлении двуцепочечных разрывов в ДНК клетка активирует два из известных механизмов репарации. Достаточно много исследователей разрабатывают протоколы для проведения нокаутов, рассчитывая на негомологичное соединение концов при появлении разрывов ДНК (NHEJ). Возникающий спектр мутаций при этом достаточно широк, действительно в случае хорошо подобранной и работающей гидовой РНК, часто возникают делеции, вплоть до 20-30 нуклеотидов (хотя чаще 3-5 нуклеотида). По теории вероятности 2/3 этих мутаций будет не кратна трем и будет вызывать желаемый нокаут гена. Однако, по нашему мнению, будет правильнее и быстрее использовать стратегию заданной делеции, которая будет достаточно большой (30-70 нуклеотидов), и при этом будет заведомо не кратна трем.

Для этого мы выбрали две гидовые РНК, с помощью которых мы получили делецию больших размеров. Таким образом, мы считаем, что наш подход увеличит точность метода, и получающиеся спектр вариантов мутации при этом резко сузится.

На базе платформы DESKGEN.com и ensemble.org мы изучили структуру и изоформы генов ASIC1a и TNFaR1 для выбора конкретного участка в гене, который наиболее консервативен (рисунок 3.1, 3.2).

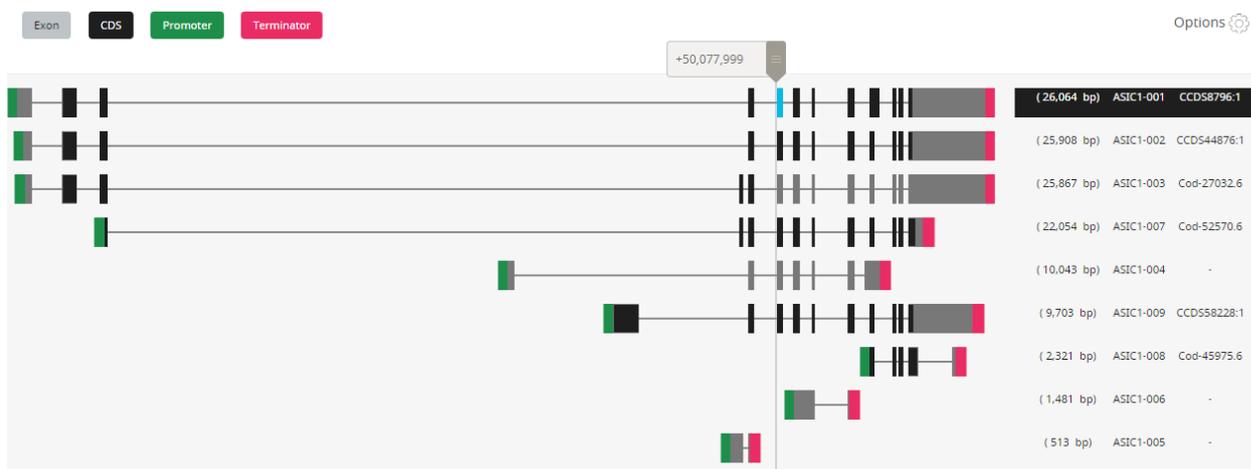


Рисунок 3.1 - Изоформы гена ASIC1a. Deskgen.com. На рисунке изображены варианты транскриптов гена ASIC1a, серыми квадратиками обозначены экзоны гена черными – кодирующая часть, зеленым – промотеры, красным - терминаторы, прямой линией обозначена некодирующая часть гена. В верхней части рисунка можно видеть окошко с координатой выбранного экзона для создания в этой области комплиментарных гидовых РНК. В данном случае это область 7 экзона (согласно программе Deskgen.com)

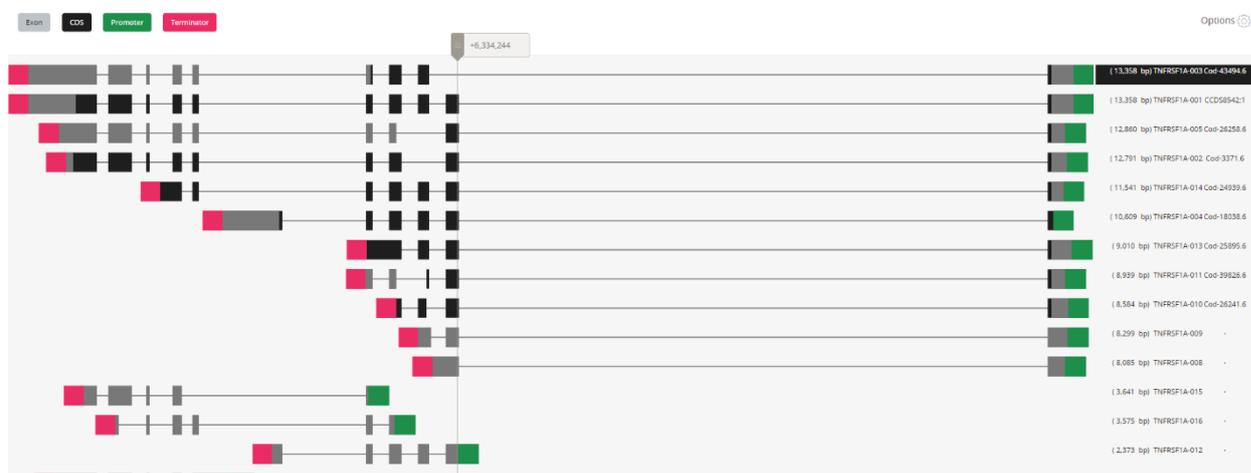


Рисунок 3.2 - Изоформы гена TNFaR1. Deskgen.com. На рисунке изображены варианты транскриптов гена TNFaR1, серыми квадратиками обозначены экзоны гена черными – кодирующая часть, зеленым – промотеры, красным - терминаторы, прямой линией обозначена некодирующая часть гена. В верхней части рисунка можно видеть окошко с координатой выбранного экзона для создания в этой области комплиментарных гидовых РНК. В данном случае это область 5 экзона (согласно программе Deskgen.com)

Нами были выбраны экзоны, которые входят в состав максимального большого количества изоформ. Для гена ASIC1a была выбрана область 7 экзона, для гена TNFaR1 –

область 5 экзона. По нашему мнению, это экзоны, которые кодируют самые «важные» части белка – активный центр, места связывания и т.д. После того как мы определили желаемый экзон, примерное расположение и размер делеции, нами был осуществлен подбор нескольких вариантов гидовых РНК.

Для подбора мы использовали ресурс crispr.mit.edu (сейчас не работает, приемлемые альтернативы – crispor.tefor.net), который позволяет сразу распределить оптимальные варианты, учитывая возможные off-target эффекты. Были подобраны по 3 пары гидовых РНК, которые вызывают делеции в 37 и 40 нуклеотидов (таблицы 3.3, 3.4). Важно то, что данные делеции не кратны трем. Были заказаны олигонуклеотиды, которые при отжиге формируют дуплексы с липкими концами для дальнейшего клонирования в плазмиды.

Таблица 3.3 - Гидовые РНК для гена ASIC1a

gRNA-6	TCAGCCGCGGCCGCCCATCTCGG
gRNA-9	TGAAGGGTGGGACGGGCAATGGG
gRNA-11	ATGAAGGGTGGGACGGGCAATGG

Таблица 3.4 - Гидовые РНК для гена TNFaR1

gRNA-1	GGCACAACCTTCGTGCACTCCAGG
gRNA-2	CCCCAGATTGAGAATGTTAAGGG
gRNA-5	ACCCCAGATTGAGAATGTTAAGG

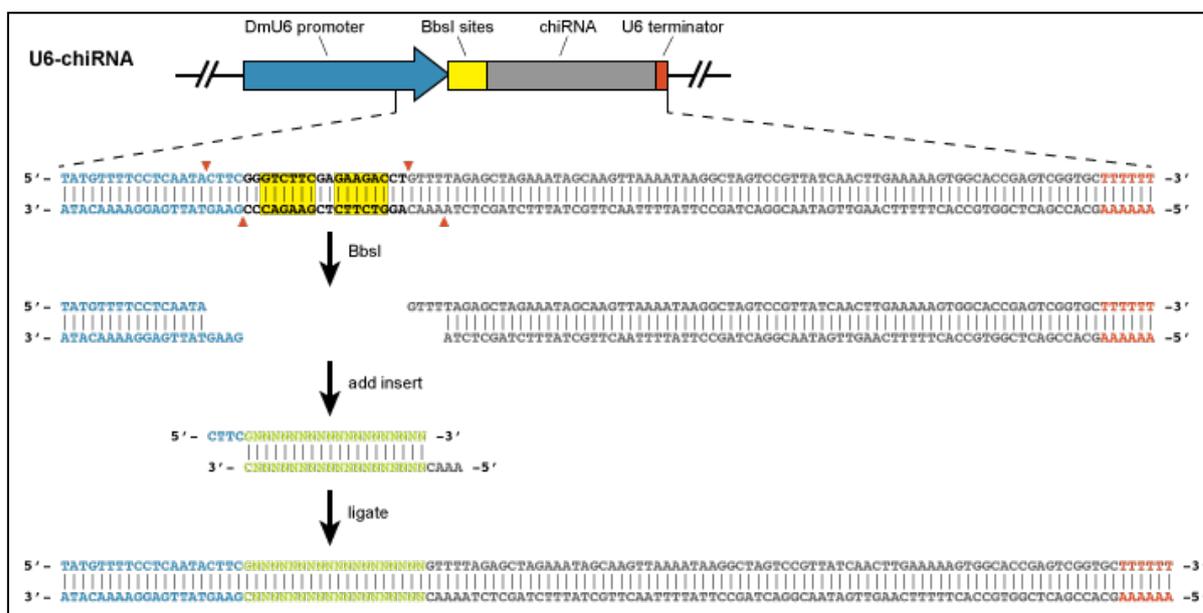


Рисунок 3.3 - Принципиальная схема клонирования. На данном рисунке изображена схема проведения клонирования полученных дуплексов гДНК, кодирующих гРНК, в вектор pU6-gRNA. Проводилась рестрикция по сайтам BbsI (выделено желтым) и последующее лигирование участка гДНК (зеленым)

Нами было осуществлено клонирование последовательностей гидовых РНК в соответствующие плазмидные конструкции pU6-gRNA, предназначенные для экспрессии в эукариотических клетках (рисунок 3.3).

3.3.2 Валидация конструкций на линии фибробластов кожи человека с постоянной экспрессией Cas9

В работе мы используем стратегию котрансфекции нескольких плазмид одновременно методом электропорации. Валидацию генетических конструкций мы проводили на линии клеток фибробластов с постоянной экспрессией Cas9, поэтому данную линию мы котрансфецировали плазмидами, одна из которых несла гидовую РНК, вторая – флуоресцентный белок Tag-RFP.

После котрансфекции мы сортировали клетки по флуоресцентному маркеру. Данный этап работы позволяет отсеять нетрансфецированные клетки и таким образом увеличить вероятность «выхода» мутантных клеток. Эффективность трансфекции в среднем составила 2,7 % (однако, после сортировки фракция трансфецированных клеток 100%). На рисунке 3.4 можно видеть фракцию клеток, которую мы отбирали по флуоресцентному сигналу.

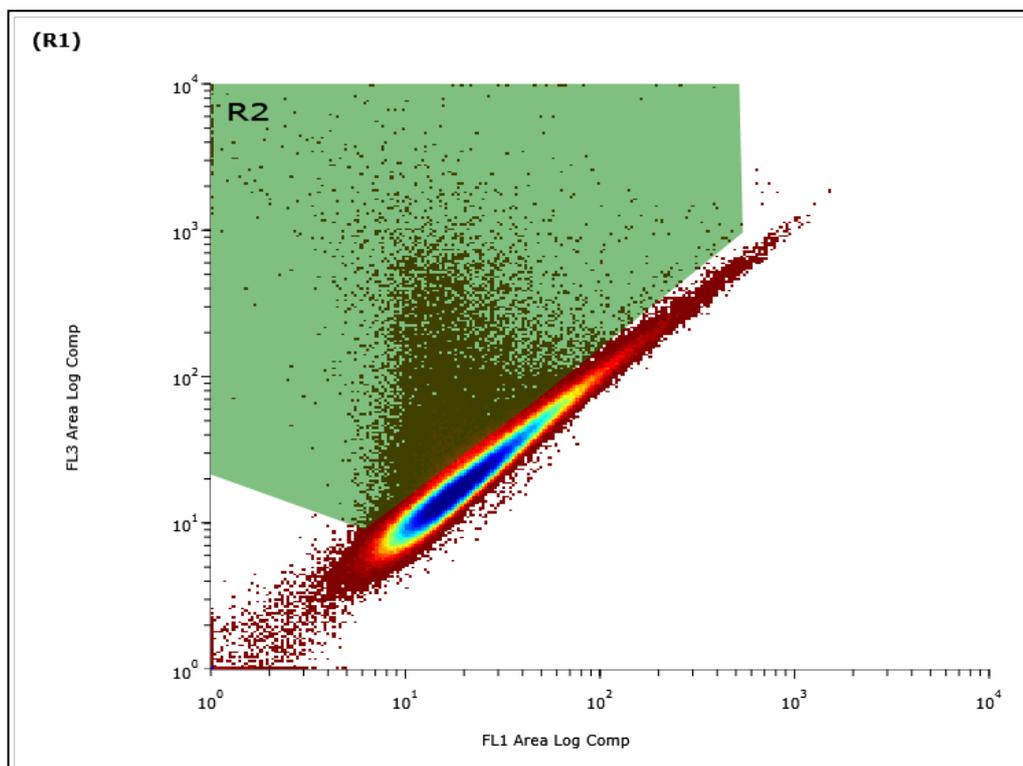


Рисунок 3.4 - Результаты сортировки фибробластов 1608-hT. На рисунке представлен результат сортировки фибробластов с постоянной экспрессией Cas9 по флуоресцентному маркеру RFP. Точками отмечены клетки, зеленая выделенная область отражает фракцию клеток, которая была отобрана. Эффективность трансфекции клеток составила 2,7 %

Из клеток после сортировки была выделена геномная ДНК стандартным методом с очисткой фенол-хлороформом. Полученные пробы ДНК были использованы в последующем ПЦР анализе с соответствующими праймерами для генов ASIC1a и TNFR1. Для оценки эффективности работы геномной РНК, нами проводился анализ полученного спектра мутации, возникающих в точке разрезания геномной ДНК посредством комплекса CRISPR/Cas9. Комплекс вызывает двуцепочечный разрыв, что активирует механизмы репарации клетки. Это приводит к возникновению как инсерций, так и делеций разного размера, которые могут сохраняться.

Оценить наличие мутаций можно при помощи T7E1 анализа. T7-эндонуклеаза делает разрыв в местах, содержащих вторичные структуры (шпильки). Так как в образцах ДНК содержались, как мутантные формы, так и формы дикого типа, при переотжиге (reannealing), это способствовало образованию таких структур. В дальнейшем ампликоны подвергались T7E1 анализу. На рисунках 3.5 и 3.6 можно видеть продукты T7E1 анализа, а именно расщепленные ампликоны, в пробах 1 и 2 для ASIC1a; также 9 и 11 для TNFR1. Полученные результаты позволили заключить о эффективной работе данных конструкций с геномными РНК, которые в дальнейшем мы использовали в парах для создания делеций ДНК в ИПСК человека.

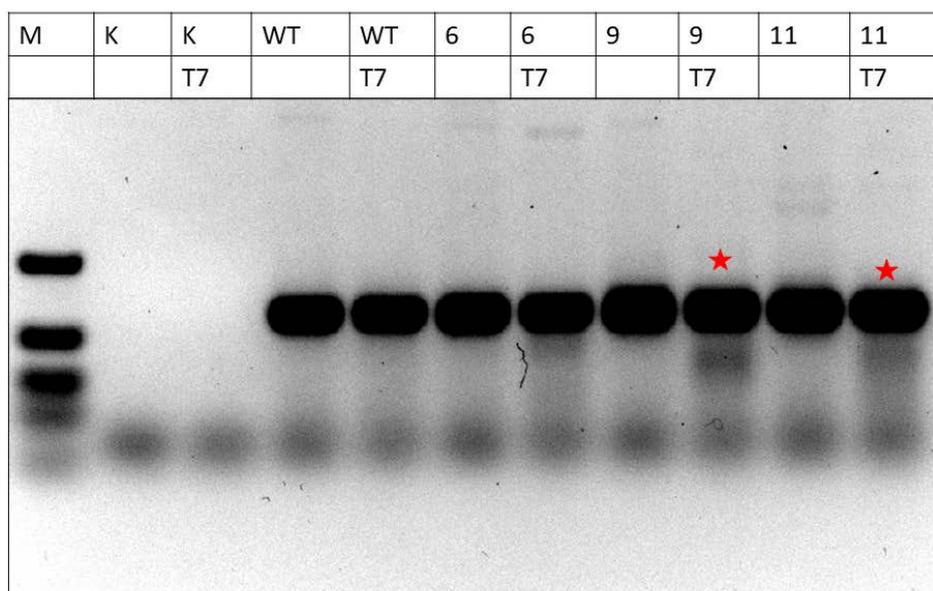


Рисунок 3.5 - Результаты работы гидовых РНК для гена ASIC1a. На рисунке изображен результат электрофрезы в 3% агарозном геле. Нанесены образцы амплифицированной ДНК дикого типа (WT), а также образцы из клеток, трансфицированных конструктами, которые несут гРНК. Звездочками отмечены образцы, которые были выбраны для дальнейшей работы с ИПСК

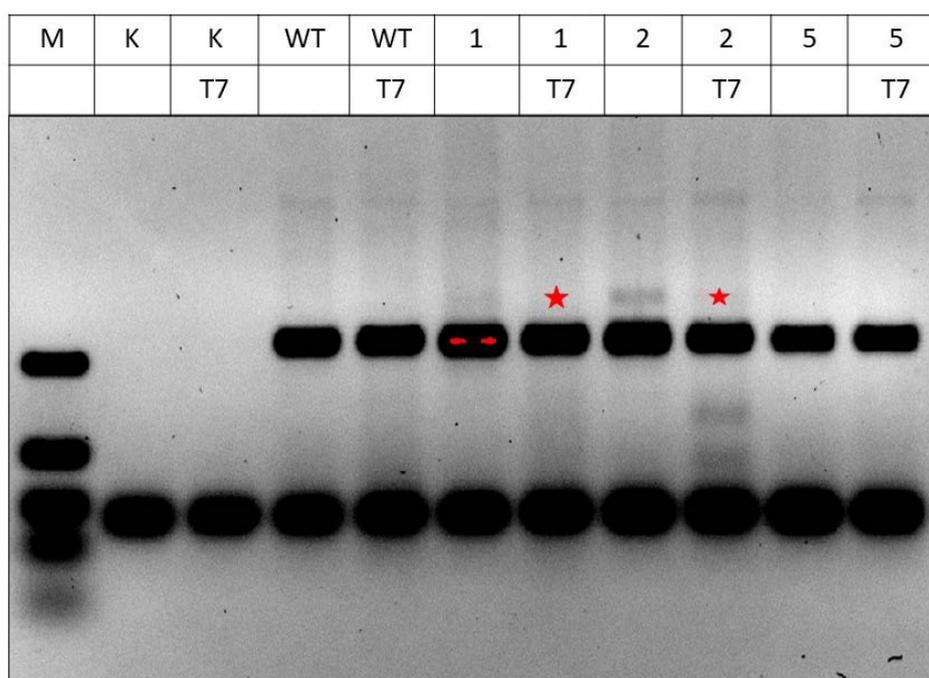


Рисунок 3.6 - Результаты работы гидовых РНК для гена TNFaR1. На рисунке изображен результат электрофрезы в 3% агарозном геле. Нанесены образцы амплифицированной ДНК дикого типа (WT), а также образцы из клеток, трансфицированных конструктами, которые несут гРНК. Звездочками отмечены образцы, которые были выбраны для дальнейшей работы с ИПСК

3.3.3 Нокаутирование генов TNFaR1 и ASIC1 в ИПСК человека

Для котрансфекции ИПСК мы использовали три плазмидные конструкции. Самый большой конструктор (8,3 т.п.н.) несет кассету для экспрессии Cas9 белка и зеленого флуоресцентного белка EGFP (через IRES2 переход), остальные две плазмиды малого размера (3,5 т.п.н.) несут рU6-промотор с гидовой РНК, каждая свой вариант, который

был провалидирован ранее на фибробластах человека. При контрансфекции всех трех плазмид методом электропорации, с последующим клеточным сортированием по наличию флуоресценции EGFP, с большой вероятностью (более 80%) оказывается, что среди таких клеток большинство имеют сразу все три конструкта. По нашему мнению, этот подход весьма эффективен, так как мы при прохождении плазмиды большего размера, в нашем случае это плазида с флуоресцентным маркером, вероятность попадания плазмид меньшего размера, которые несут геновые РНК, близка к 100 %.

Эффективность трансфекции для клеток с потенциальным нокаутом одного из генов составляла 3-8%, для клеток с потенциальным двойным нокаутом около 1% (рисунок 3.7, 3.8, 3.9). Причиной низкой эффективности может быть сложность обеспечения попадания сразу всех 5 плазмид одновременно в клетку, чтобы обеспечить появление двух делеций сразу, что вызывает необходимость увеличивать количество плазмидной ДНК в электропорирующем буфере.

Учитывая низкую эффективность трансфекции ИПСК, для увеличения вероятности нахождения мутантных клонов необходимо отделить интактные клетки от целевых трансфицированных клеток с помощью сортирования по флуоресцентному маркеру.

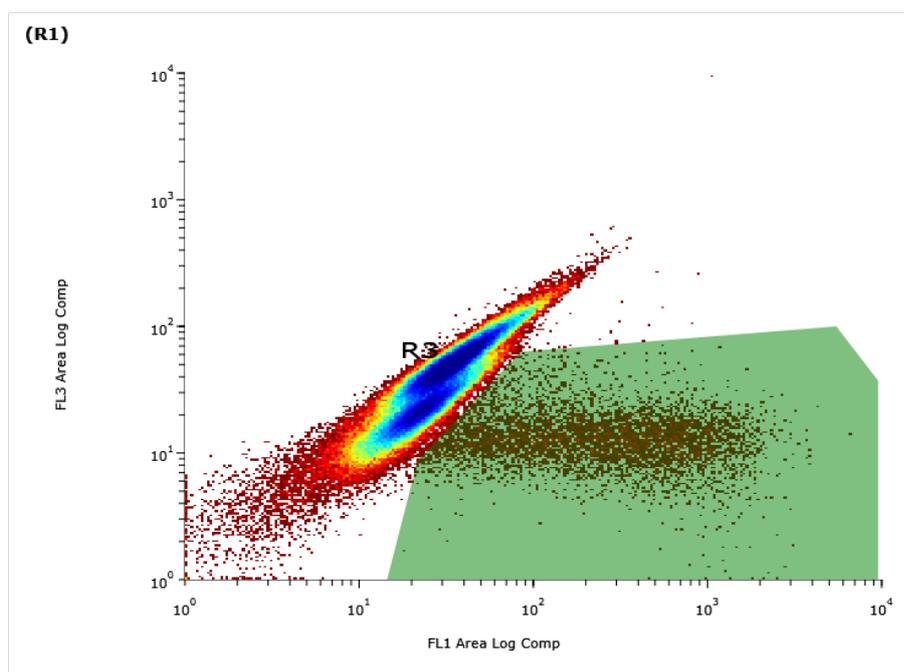


Рисунок 3.7 - Результаты сортирования клеток с потенциальным нокаутом TNFR1. На рисунке представлен результат сортирования ИПСК с потенциальным нокаутом по флуоресцентному маркеру GFP. Точками отмечены клетки, зеленая выделенная область отражает фракцию клеток, которая была отобрана. Эффективность трансфекции клеток составила 3,8 %

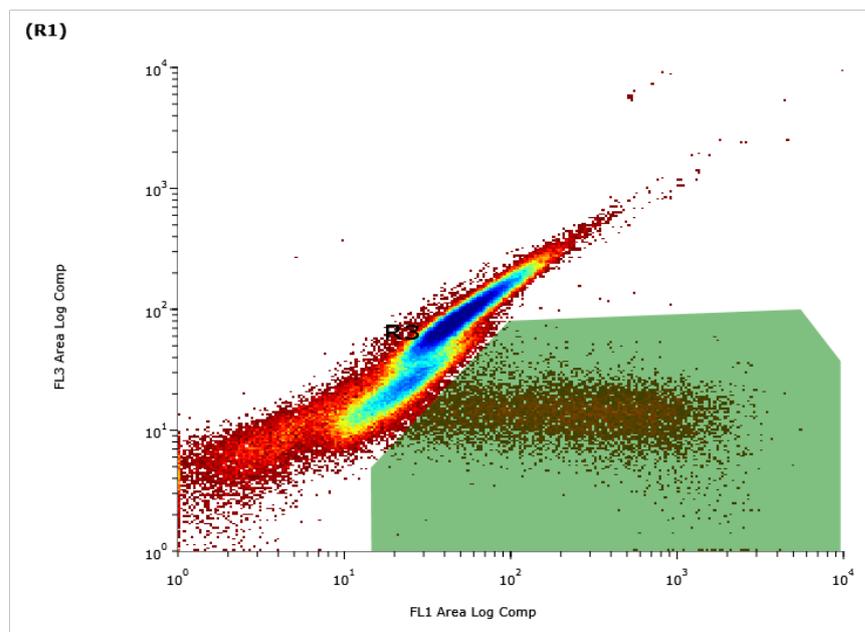


Рисунок 3.8 - Результаты сортировки клеток с потенциальным нокаутом гена ASIC1a. На рисунке представлен результат сортировки ИПСК с потенциальным нокаутом по флуоресцентному маркеру GFP. Точками отмечены клетки, зеленая выделенная область отражает фракцию клеток, которая была отобрана. Эффективность трансфекции клеток составила 5,8 %

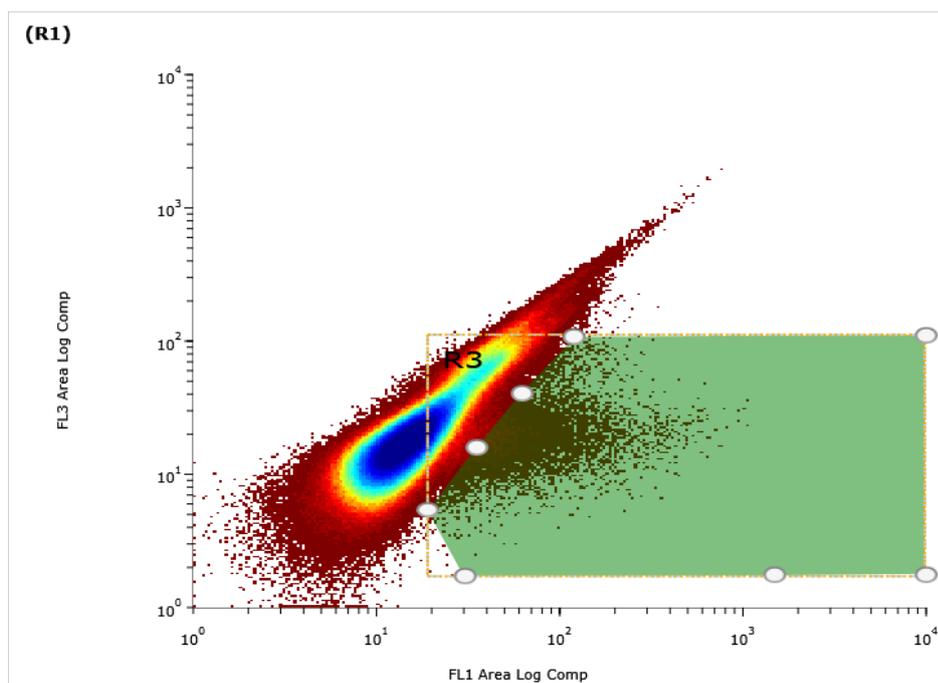


Рисунок 3.9 - Результаты сортировки клеток с потенциальным двойным нокаутом генов ASIC1a и TNFR1. На рисунке представлен результат сортировки ИПСК с двойным потенциальным нокаутом по флуоресцентному маркеру GFP. Точками отмечены клетки, зеленая выделенная область отражает фракцию клеток, которая была отобрана. Эффективность трансфекции клеток составила 1 %

После сортировки и выращивания клонов ИПСК проводился скрининг на наличие делеции. Для каждого вида нокаута были проанализированы 24 клон. Использовался протокол быстрого выделения ДНК из малого количества клеток.

По результатам мы нашли по 2 гомозиготных клона для каждого вида нокаута (рисунок 3.10), которые выращивали до 4-6 млн. клеток. Полученные клетки криоконсервировали. Затем клетки каждой линии были подвержены лизису и выделению геномной ДНК стандартным методом с фенол-хлороформом для постановки подтверждающего анализа наличия делеций в генах с помощью ПЦР.

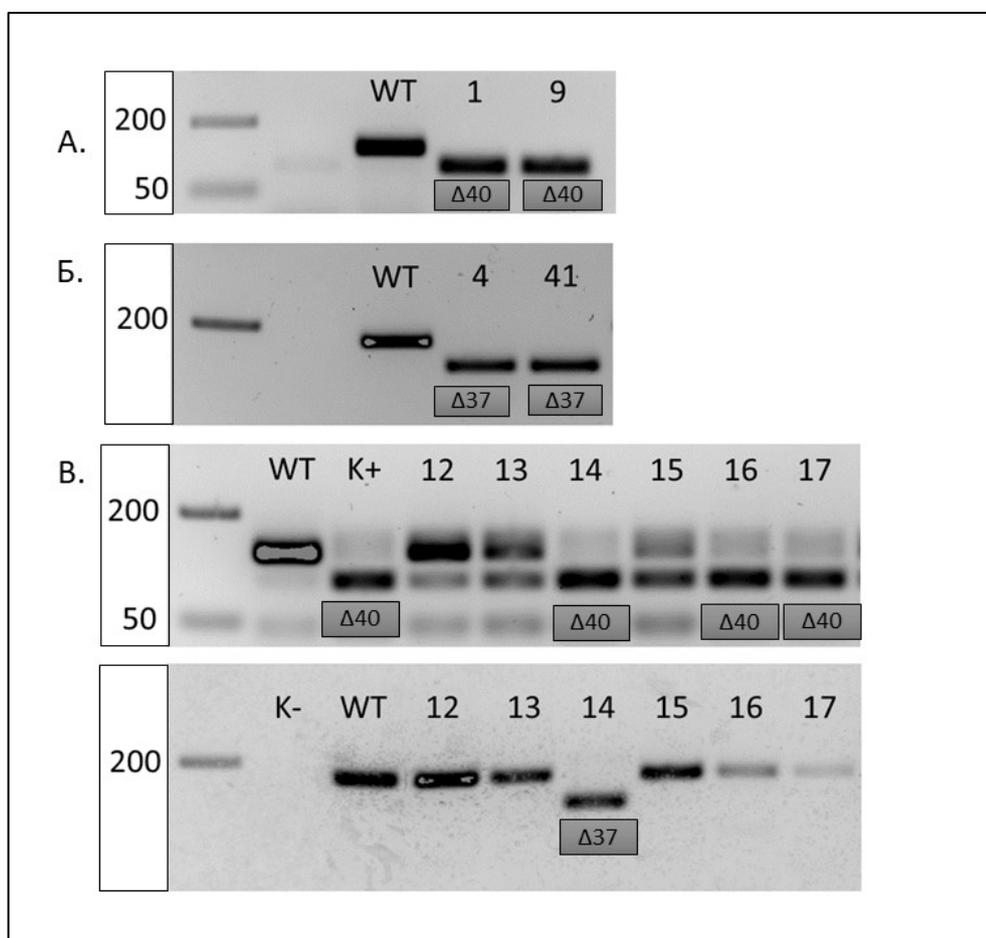


Рисунок 3.10 - Результат анализа наличия делеций в геномной ДНК нокаутных линий ИПСК. На рисунке изображен результат электрофореза в 3% агарозном геле. Нанесены образцы амплифицированной ДНК дикого типа (WT), а также образцы из ИПСК с нокаутами по гену ASIC1a (А), TNFaR1 (Б) и двойным нокаутом генов (В). Звездочками отмечены образцы, которые были выбраны для дальнейшей работы с ИПСК. В серых квадратиках отмечены образцы с делециями 37 и 40 п.н. (K+) - положительный контроль, (K-) - отрицательный контроль (образец без матрицы ДНК)

Наличие делеций было подтверждено с помощью секвенирования по Сенгеру. (рисунок 3.11, 3.12). Делеции в генах ASIC1a и TNFR1 составили 37 и 40 п.н. соответственно. Таким образом, нами были получены линии ИПСК человека, содержащие запланированные мутации со потенциальным сдвигом рамки считывания.

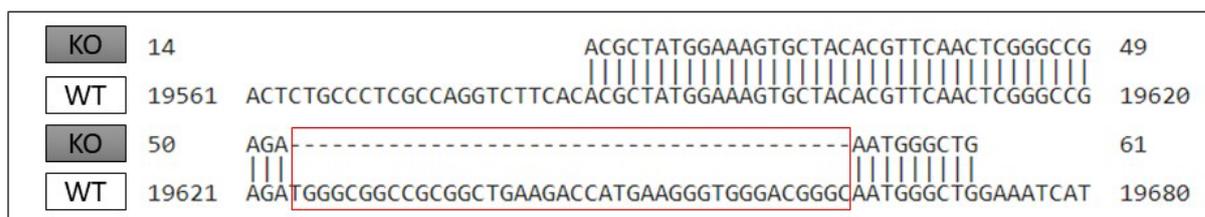


Рисунок 3.11 - Результаты секвенирования образца на наличие делеции в гене ASIC1a. На рисунке представлено выравнивание полученного секвенированного образца на последовательность ДНК гена ASIC1a из базы NCBI с помощью Needleman-Wunsch Global Align. Красным квадратом выделена область делеции



Рисунок 3.12 - Результаты секвенирования образца на наличие делеции в гене TNFaR1. На рисунке представлено выравнивание полученного секвенированного образца на последовательность ДНК гена TNFaR1 из базы NCBI с помощью Needleman-Wunsch Global Align. Красным квадратом выделена область делеции

3.3.4 Анализ транскриптов генов ASIC1a и TNFR1

С помощью метода Dual SMAD ингибирования, были получены культуры нейтральных стволовых клеток из полученных линий ИПСК с нокаутами генов ASIC1a и TNFR1.

Нокауты генов, обеспечивающие сдвиг рамки считывания, часто нарушают транскрипцию генов. Нами были получены образцы тотальной РНК из линий нейтральных стволовых клеток дикого типа и линий с нокаутами для анализа наличия транскриптов генов ASIC1a и TNFR1. Была проведена обратная транскрипция по oligo-dT праймерам и получены библиотеки кДНК для каждой линии. Данные ПЦР анализа показали, что транскрипты генов присутствуют, но несут делеции такие же, что и геномная ДНК (рисунок 3.13). С большой вероятностью это может указывать на то, что матричная РНК данных генов транскрибируется, несмотря на наличие делеций, но так как она содержит преждевременные стоп-кодона трансляция функциональных белков не происходит.

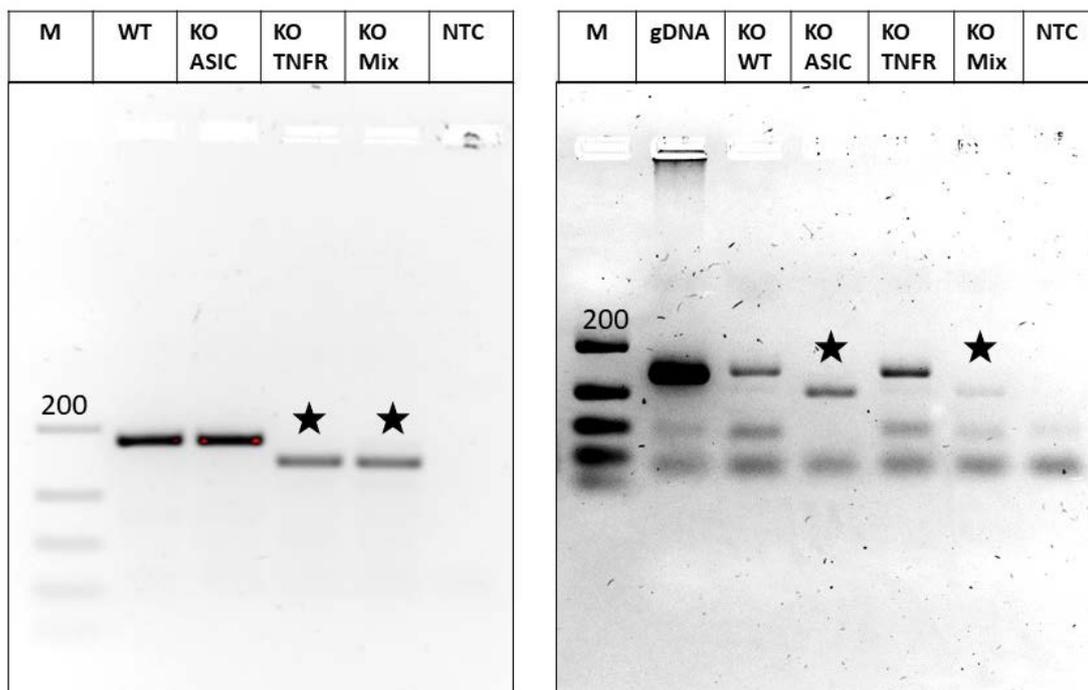


Рисунок 3.13- Результаты анализа транскриптов генов TNFaR1(слева) и ASIC1a (справа). На рисунке изображен результат электрофореза в 3% агарозном геле. Нанесены образцы амплифицированной кДНК дикого типа (WT), а также образцы из ИПСК с нокаутами по гену ASIC1a, TNFaR1. Звездочками отмечены образцы кДНК, которые несут делецию, сходную с делецией в геномной ДНК

Для доказательства того, что вызванные мутации в исследуемых генах все же нарушают их экспрессию, нами был проведен ПЦР-анализ в реальном времени на примере гена TNFR1 (рисунок 3.14). Данный эксперимент подтвердил, что количество транскриптов в нокаутных линиях достоверно снижено. Полученный результат указывает на то, что мутантная РНК может деградировать при помощи систем контроля качества мРНК, таких как NMD, но механизм транскрипции, по-видимому, не нарушается.

Также был проведен аналогичный эксперимент для гена ASIC1a, но вследствие технических проблем с подбором праймеров (был проведен анализ 3 пар праймеров) и условий ПЦР, результаты были недостоверны, однако мы наблюдали косвенные признаки понижения уровня экспрессии гена в мутантных ASIC1a (данные не приведены).

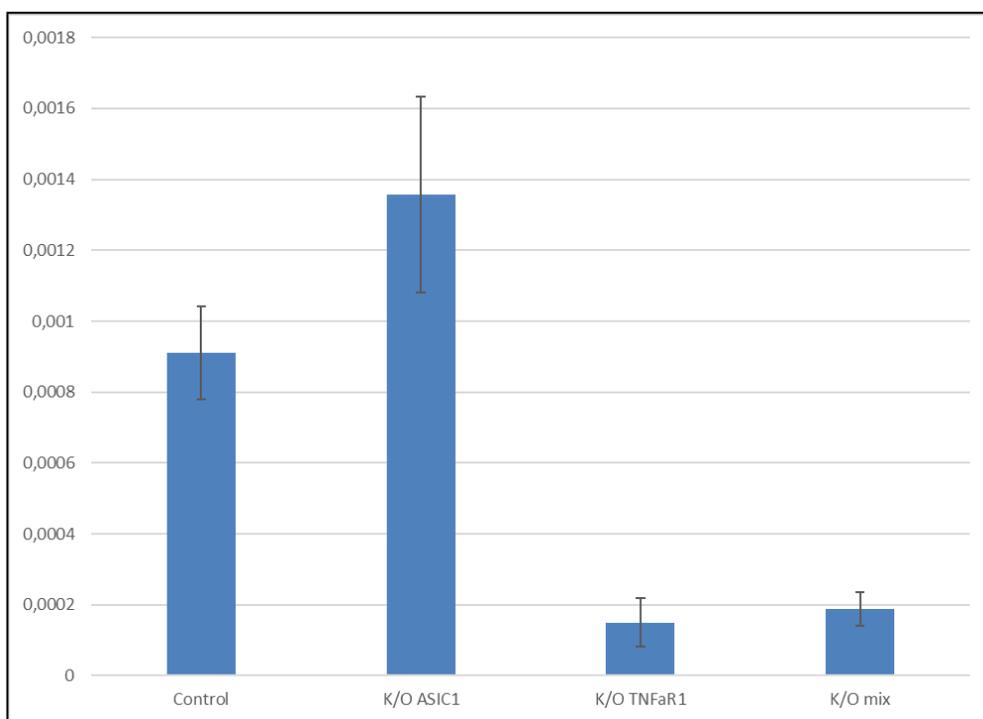


Рисунок 3.14 - Экспрессия гена TNFR1 в линиях дикого типа и в линиях с нокаутами генов ASIC1a и TNFR1. На данном графике представлены результаты ПЦР в реальном времени с образцами кДНК дикого типа и нокаутных линий нейральных стволовых клеток. Данные были обработаны по методу $\Delta\Delta C_t$, референсный ген – GAPDH.

3.3.5 Получение нейральных стволовых клеток из ИПСК с нокаутами генов ASIC1a и TNFR1

Далее мы предприняли попытку посмотреть, каким образом наличие делеций в генах ASIC1a и TNFR1 может отразиться на дифференцировке ИПСК в нейральные стволовые клетки.

Было проведено иммунохимическое окрашивание полученных культур на маркеры нейральных стволовых клеток (рисунок 3.15, 3.16, 3.17, 3.18). Нейральные стволовые клетки окрашивались на маркеры: Nestin, Pax6 и Sox2, как и клетки дикого типа. По данным иммуноокрашивания можно заключить, что нокауты генов ASIC1a и TNFR1 и двойной нокаут генов ASIC1a и TNFR1 не влияют на фенотипические свойства клеток и на их способность к дифференцировке в нейральные стволовые клетки.

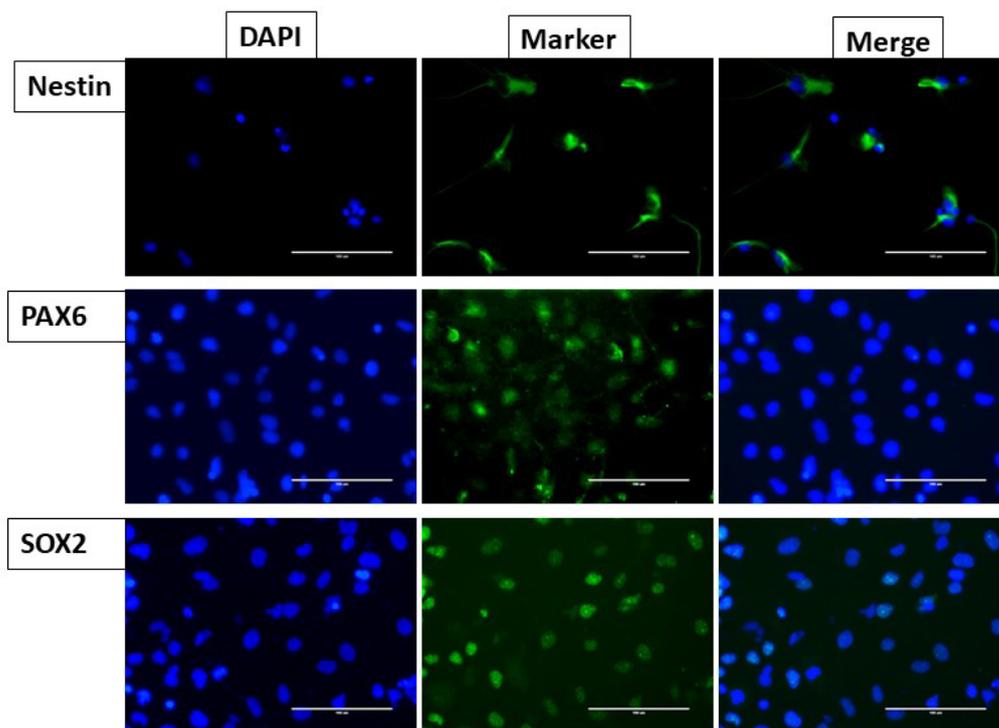


Рисунок 3.15 - Иммуноокрашивание образцов линии с нокаутом ASIC1a на маркеры нейральных стволовых клеток. Шкала составляет 100 мкм. Все образцы окрашивались на DAPI (синий), а также на маркеры Nestin, Pax6 и Sox2 (зеленый)

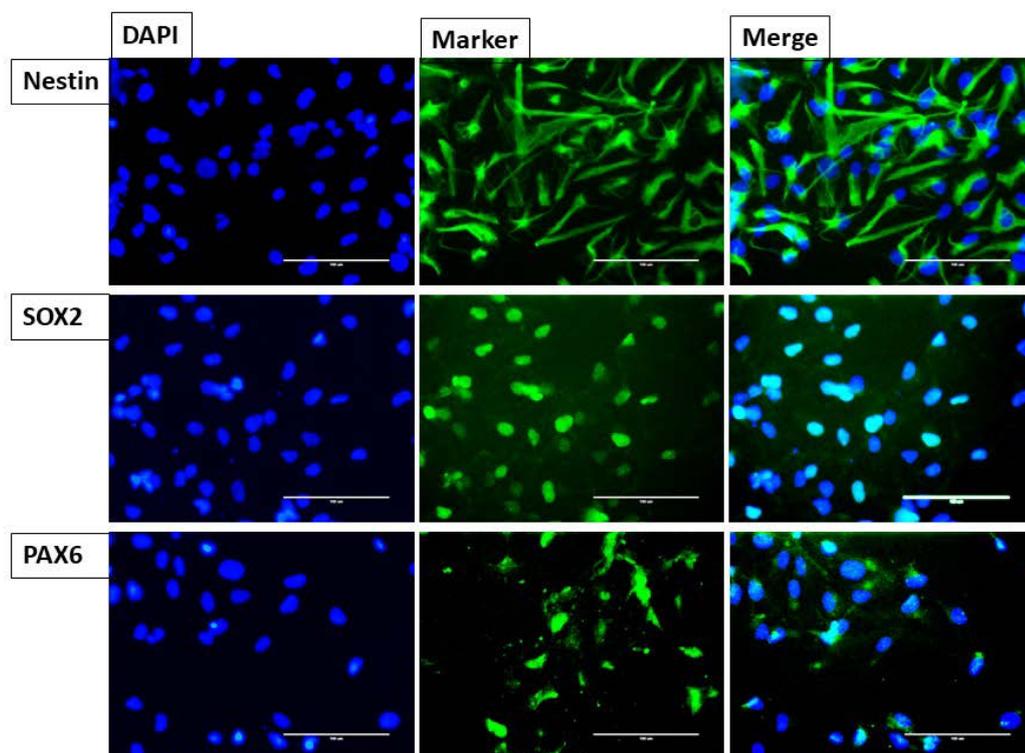


Рисунок 3.16 - Иммуноокрашивание образцов линии с нокаутом TNFaR1 на маркеры нейральных стволовых клеток. Шкала составляет 100 мкм. Все образцы окрашивались на DAPI (синий), а также на маркеры Nestin, Pax6 и Sox2 (зеленый)

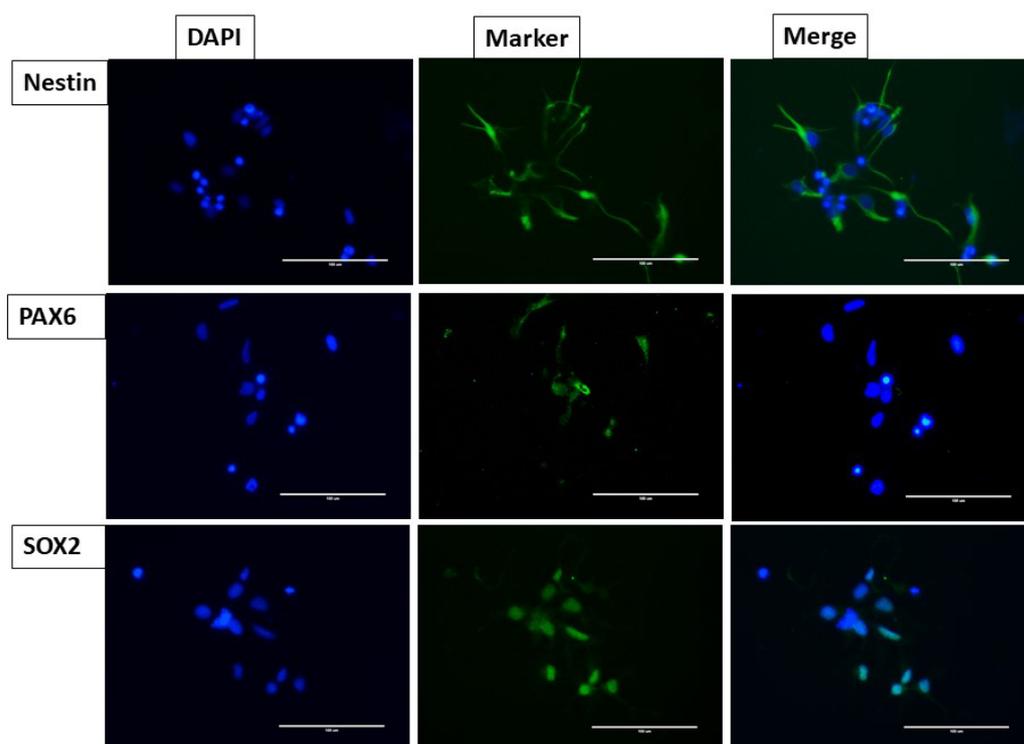


Рисунок 3.17 - Иммуноокрашивание образцов линии с двойным нокаутом генов ASIC1a и TNFaR1 на маркеры нейральных стволовых клеток. Шкала составляет 100 мкм. Все образцы окрашивались на DAPI (синий), а также на маркеры Nestin, Pax6 и Sox2 (зеленый)

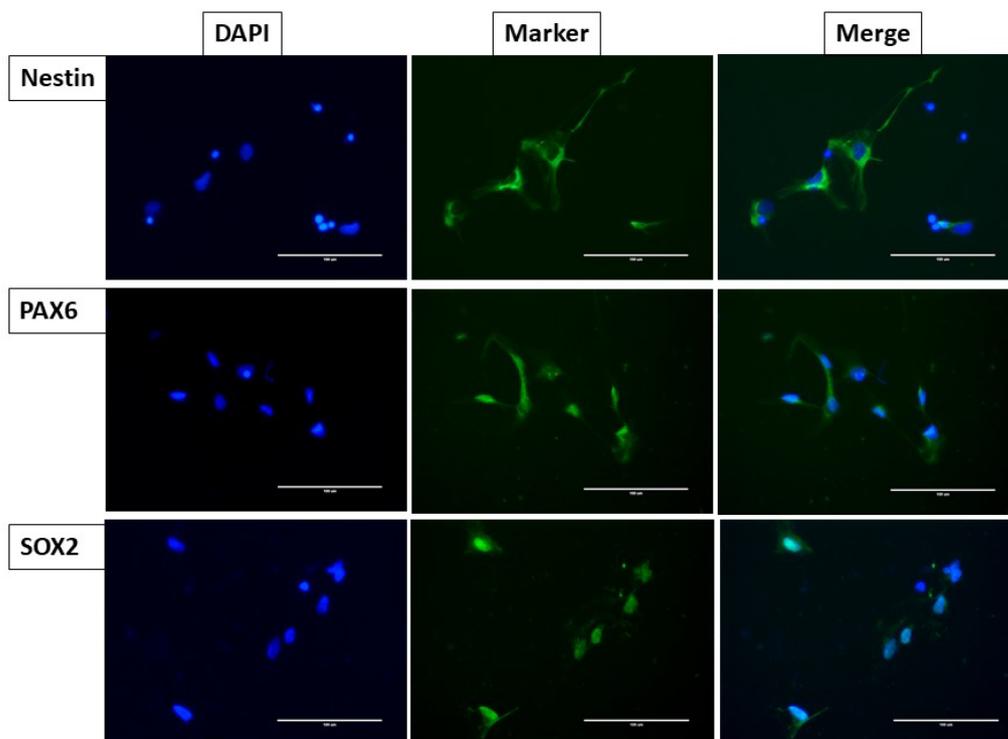


Рисунок 3.18 - Иммуноокрашивание образцов линии дикого типа на маркеры нейральных стволовых клеток. Шкала составляет 100 мкм. Все образцы окрашивались на DAPI (синий), а также на маркеры Nestin, Pax6 и Sox2 (зеленый)

Полученные линии клеток были протестированы на пролиферативную активность. Культуры клеток культивировались в двух условиях: с ингибитором ROCK-киназ (Y-

27632) и без ингибитора. Ингибитор ROCK-киназ используется в стандартном культивировании клеток для подавления апоптоза и повышения пролиферативной активности клеток. Полученные данные отражены на графике рисунка 3.19.

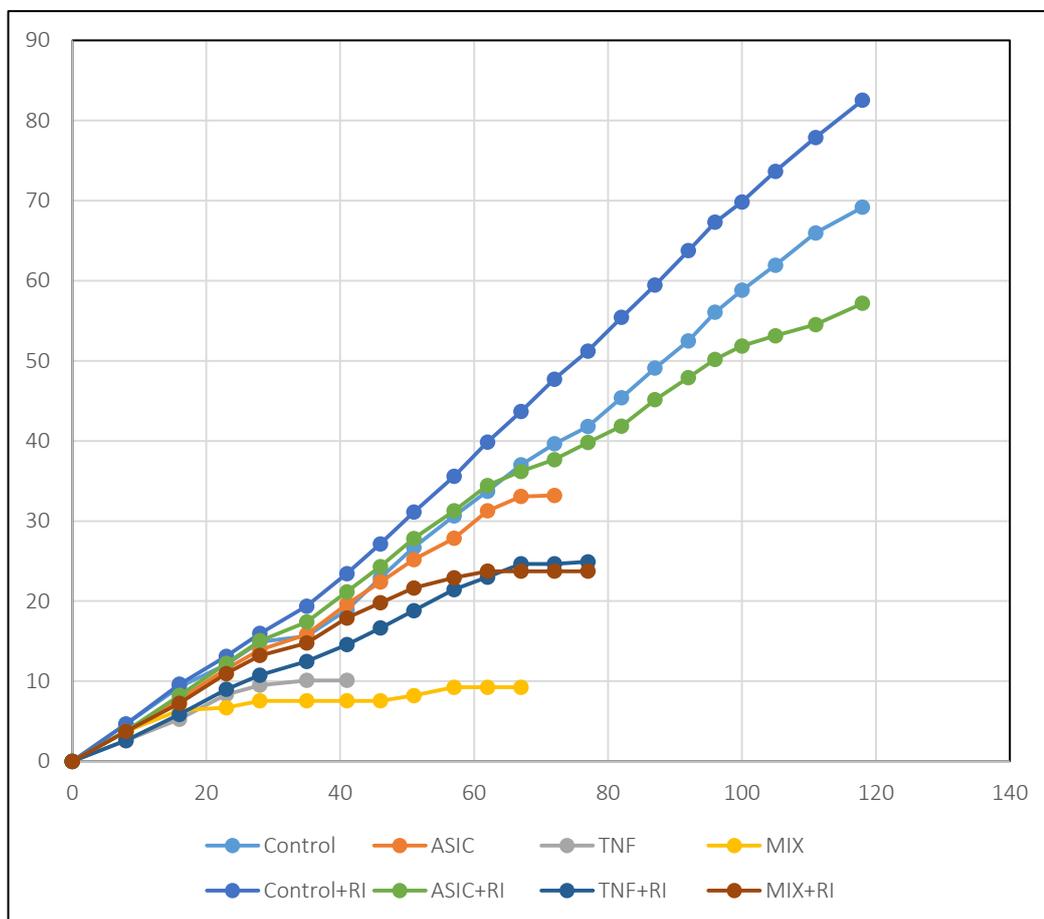


Рисунок 3.19 - Пролиферативная способность линий нейральных стволовых клеток. Точками на графике обозначены пассажи клеток. Были проанализированы клетки без RI (ингибитор ROCK-киназ) и с RI

Можно заключить, что в исследуемом промежутке времени (21 пассаж) большинство полученных линий достигают предела Хейфлика в отличие от клеток дикого типа, что может служить доказательством отсутствия процессов злокачественной трансформации. Также можно отметить, что нокаут гена TNFR1 сильно влияет на пролиферативную активность клеток (отрицательно). Это может говорить о функциональной важности гена, в процессе нейральной дифференцировки и пролиферации нейральных предшественников. Обращая внимание на снижение пролиферативной активности, стоит указать, что все клетки не склонны к неконтрольному росту, что говорит о необходимости их дальнейшего изучения для использования с целью регенерации тканей.

3.3.6. Подбор условий корректного измерения уровней экспрессии генов методом цифрового капельного ПЦР.

Одним из важных видов анализа, при изучении процесса нейральной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток является измерение уровней экспрессии генов нейральных маркеров. Обычно в данных случаях используется метод ОТ-ПЦР, в сочетании с ПЦР в реальном времени. Однако ПЦР в реальном времени имеет ряд ограничений, которые могут иметь важное значение при измерении уровней экспрессии с незначительными колебаниями (30-50%). Поэтому нами были подобраны условия для корректного измерения уровней экспрессии нейральных генов NES и PAX6 методом цифрового капельного ПЦР. Для этого был поставлен эксперимент с постадиной дифференцировкой ИПСК в НСК методом DUAL SMAD ингибирования (рисунок 3.20), в течении которых выделялась РНК и впоследствии измерялись уровни экспрессии NES и PAX6 методом цифрового капельного ПЦР (рисунок 3.21)

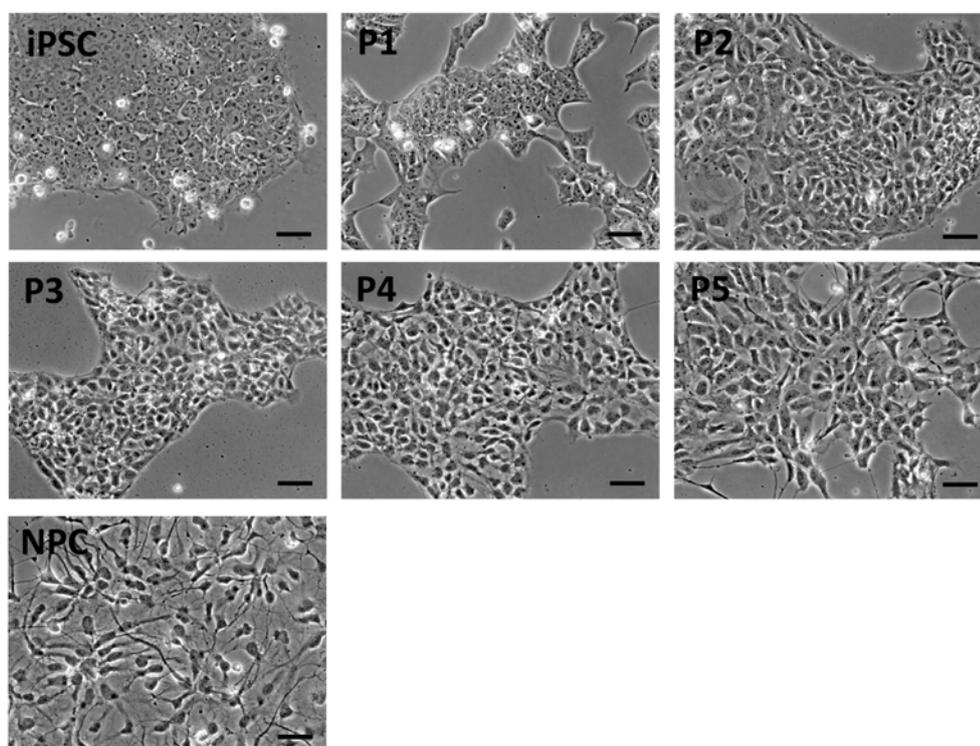


Рисунок 3.20 - Изменения в морфологии клеток во время процесса дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC) в нейральные стволовые (прогениторные) клетки (NPC). P1,P2, P3,P4,P5 – последовательные стадии процесса. Размер шкалы – 50мкм

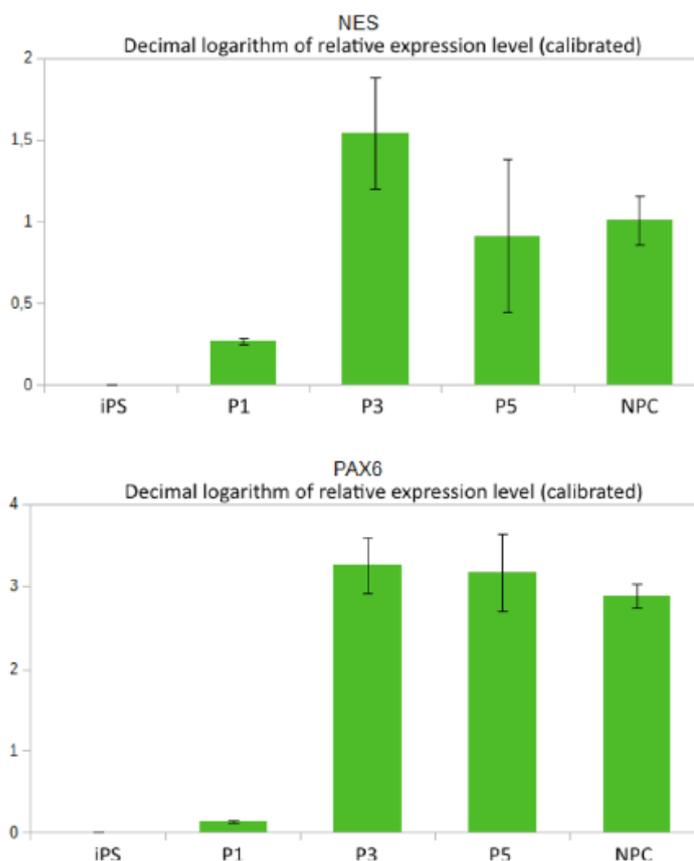


Рисунок 3.21 - Относительный уровень экспрессии генов нейральных маркеров NES и PAX6 в клетках на разной стадии дифференцировки (P1, P3, P5), измеренный методом цифрового капельного ПЦР. Уровень экспрессии выражен в относительных единицах

В результате нами было показано, что метод цифрового капельного ПЦР вполне пригоден для измерения колебаний уровня экспрессии генов нейральных маркеров во время процесса дифференцировки ИПСК в НСК. Результаты работы были опубликованы в рецензируемом научном журнале [1].

Кроме того, по результатам предыдущих этапов работы по получению первичных половых клеток (ППК) человека из ИПСК были обобщены сведения по истории вопроса исследований ППК человека *in vitro*, основные существующие модели и направления развития этой области [2]. По экспериментальной части работы готовится публикация.

3.3.6. Обсуждение

На сегодняшний день технологий на базе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (ИПСК) позволяют создавать аутологичные иммуносовместимые линии, как стволовых, так и тканеспецифических прогениторных линий клеток. Регенеративная биомедицина активно развивается в данном направлении, разрабатываются методы клеточных трансплантаций для помощи пациентам с нейродегенеративными повреждениями. Известно, как минимум два случая лечения пациентов клетками, дифференцированными из аутологичных ИПСК – при лечении

макулярной дистрофии и болезни Паркинсона [3, 4]. В нейробиологии существует проблема культивирования и выращивания клеток нейральной линии. Преимуществом данной технологии ИПСК является возможность культивирования и получения больших количеств клеток, поскольку в ИПСК активна теломераза, и для ИПСК отсутствует предел Хейфлика. Возможность проведения генного редактирования является вторым и не менее важным преимуществом. Для линий ИПСК человека существует много отработанных методов клонирования предельным разведением, а с помощью различных систем редактирования генома, таких как TALEN или CRISPR/Cas9 можно проводить редактирование генома ИПСК человека. Данное направление может стать первым этапом в создании новых подходов к лечению наследственных заболеваний. Результатом редактирования генома ИПСК также является получение линий с новыми свойствами, которые могут стать фундаментом для изучения функции различных генов. ИПСК можно дифференцировать *in vitro* в широкий спектр клеток и тканей [5, 6, 7, 8]. В связи с этим можно проводить исследования по влиянию тех или иных модификаций в разных модельных системах. В данной работе при помощи системы CRISPR/Cas9 нами были сделаны линии ИПСК и нейральных стволовых клеток человека с нокаутами генов ASIC1a и TNFaR1. Выбранные нами гены являются ключевыми в процессах воспаления и ацидоза при острых нейродегенеративных состояниях головного мозга, таких как инсульт [9]. Условия для нокаута генов ASIC1a и TNFaR1 были подобраны успешно, что подтверждает наличие запланированных делеций как в геномной ДНК, так и в транскриптах генов. В итоге было получено по две мутантных гомозиготных линии ИПСК (и НСК) для каждого вида нокаута. При помощи количественного ПЦР нами было показано, что, несмотря на присутствие мРНК нокаутированных генов, их экспрессия сильно снижена. Мы предполагаем, что делеции генов не влияют на сам механизм транскрипции, но транскрипты с делециями разрушаются посредством системы деградации мРНК, таких как NMD. При получении нейральных стволовых клеток из мутантных ИПСК, было выявлено, что нокауты генов ASIC1a и TNFaR1 и двойной нокаут генов ASIC1a и TNFaR1 не блокируют нейральную дифференцировку. Таким образом, можно заключить, что данные гены не участвуют в транскрипционных каскадах, связанных с дифференцировкой, как минимум в нейральном направлении. С высокой вероятностью нокаут генов ASIC1a и TNFaR1 не повлияет на эффективность получения прогениторных клеток для последующего использования в регенеративной медицине. Линии НСК с нокаутами генов ASIC1a и TNFaR1 были проанализированы на пролиферативную активность. Нами было подтверждено, что все линии достигают предела Хейфлика и не подвержены бесконтрольному росту, что с высокой вероятностью

может указывать на отсутствие способности к злокачественной трансформации. Было отмечено, что нокаут гена TNFaR1 по всей видимости негативно влияет на пролиферативную активность клеток линий НСК. Данное явление возможно объясняется тем, что данный рецептор, помимо активации каспазного пути, участвует также в антиапоптотических механизмах, в том числе индуцируют экспрессию провоспалительных генов, которые способствуют пролиферации [10]. В клетках дикого типа, при отсутствии нарушений в структуре гена, рецептор TNFaR1 в основном работает на пролиферацию клеток, а его нокаут соответственно снижает темпы деления клеток. В целом наблюдаемая особенность клеток с нокаутом TNFaR1, говорит о возможности использования данных клеток в клеточной терапии инсультов, поскольку в этом случае вводимые клетки не будут бесконтрольно делиться и при этом могут обеспечивать регенерацию тканей за счет паракринных эффектов. Для подтверждения нашей теории требуются дополнительные исследования. Полученные нами линии ИПСК человека с нокаутами генов ASIC1a и TNFaR1, могут служить модельной системой для фундаментального изучения свойств рецепторов ASIC1a и TNFaR1. Методами направленной дифференцировки из ИПСК можно получать совершенно различные культуры клеток – нейроны, кардиоциты, эндотелиальные клетки и т.д., в целом данная система (вместе с контрольной культурой клеток дикого типа) может быть также использовано в качестве тест-систем скрининга новых лекарственных средств, нацеленных на указанные рецепторы (например, препаратов для реабилитации пациентов после инсультов).

3.4 Заключение

- 1) Успешно подобраны гидовые РНК для проведения редактирования генома ИПСК человека
- 2) Получены 6 линий мутантных ИПСК человека с делециями в генах TNFaR1 и ASIC1
- 3) Показано, что полученные делеции не влияют на правильную дифференцировку ИПСК в нейральные стволовые клетки
- 4) Гены с нокаутом транскрибируются, делеция гена TNFaR1 резко снижает уровень экспрессии
- 5) Показано, что полученные делеции не влияют на правильную дифференцировку ИПСК в нейральные стволовые клетки
- 6) Нокаут TNFaR1 влияет на пролиферативные свойства нейральных стволовых клеток

3.5 СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Artyuhov A.S., Dashinimaev E.B., Mescheryakova N. V., Ashikhmina A.A., Vorotelyak E. A., Vasiliev A.V. Detection of small numbers of iPSCs in different heterogeneous cell mixtures with highly sensitive droplet digital PCR // *Molecular Biology Reports*. - 2019. - Vol. - 46. - Is. 6. - P. 6675 - 6683. DOI: 10.1007/s11033-019-05100-2. (WoS, Scopus) – Q3.
2. Abdyev V.K., Dashinimayev E B., Neklyudova I.V., Vorotelyak E A., Vasiliev A.V. Modern Technologies Deriving Human Primordial Germ Cells *in vitro* // *Biochemistry (Moscow)*. - 2019. - Vol. 84. –v № 3. - P. 220 - 231. DOI: 10.1134/S0006297919030040.
3. Chakradhar, S. An eye to the future: Researchers debate best path for stem cell-derived therapies // *Nat Med*. – 2016. Fev. - Vol. 22, № 2. - P. 116 - 9. doi: 10.1038/nm0216-116.
4. Cyranoski D. Reprogrammed' stem cells implanted into patient with Parkinson's disease // *Nature*. – 2018. - Vol. 557(7707). – P. 619 - 620. doi: 10.1038/d41586-018-05278-8.
5. Muratore C.R., Srikanth P., Callahan D.G., Young-Pearse T.L. Comparison and optimization of hiPSC forebrain cortical differentiation protocols // *PLoS One*. - 2014 - Vol. 9, № 8. – P. e105807. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105807>.
6. Gong J., Fields M.A., Moreira E.F., Bowrey H.E., Gooz M., Ablonczy Z., Del Priore L.V. Differentiation of Human Protein-Induced Pluripotent Stem Cells toward a Retinal Pigment Epithelial Cell Fate // *PLoS One*. – 2015. - Vol. 10, № 11. - P. e0143272. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143272>.
7. Leach L.L. et al. Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Retinal Pigmented Epithelium: A Comparative Study Between Cell Lines and Differentiation Methods // *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* - 2016. - Vol. 32, № 5. - P. 317 – 330.
8. Roy-Chowdhury N. et al. Hepatocyte-like cells derived from induced pluripotent stem cells. // *Hepatol. Int.* - 2017. - Vol. 11, № 1. - P. 54 – 69.
9. Simon R.P. Acidotoxicity trumps excitotoxicity in ischemic brain // *Arch Neurol.* – 2006, Oct. - Vol. 63, № 10. - P. 1368 - 71. <https://doi.org/10.1001/archneur.63.10.1368>
10. van Horssen R., Ten Hagen T.L., Eggermont, A.M. TNF-alpha in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility // *Oncologist*. – 2006. – Vol. 11, № 4. - P. 397 - 408. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.11-4-397>.

3.6 Отчетные публикации по разделу

1. Artyuhov A.S., **Dashinimaev E.B.**, Mescheryakova N. V., Ashikhmina A.A., **Vorotelyak E. A.**, **Vasiliev A.V.** Detection of small numbers of iPSCs in different heterogeneous cell mixtures with highly sensitive droplet digital PCR // *Molecular Biology*

Reports. - 2019. - Vol. - 46. - Is. 6. - P. 6675 - 6683. DOI: 10.1007/s11033-019-05100-2. (WoS, Scopus) – Q3.

Abdyev V.K., **Dashinimayev E B.**, Neklyudova I.V., **Vorotelyak E A.**, **Vasiliev A.V.** Modern Technologies Deriving Human Primordial Germ Cells *in vitro* // Biochemistry (Moscow). - 2019. - Vol. 84. –v № 3. - P. 220 - 231. DOI: 10.1134/S0006297919030040. (WoS, Scopus) – Q4.

Раздел 4. Стволовые и родоначальные клетки в индивидуальном развитии. Роль стволовых и родоначальных клеток в формировании и восстановлении тканей

4.1. Введение

4.1.1. Роль мезенхимных стромальных клеток в восстановлении мышечной ткани после ее повреждения

В течение последних десятилетий активно разрабатываются методы клеточной терапии, в частности трансплантации стволовых клеток (СК), в том числе мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, с целью замещения в организме поврежденных клеток и тканевых структур и восстановления функций различных органов. Это вызвано расширением знаний в относительно молодом разделе клеточной биологии – биологии стволовых клеток. Для поддержания роста и дифференцировки клеток в процессе реконструкции ткани часто используются специальные носители – матриксы, или скаффолды, чаще всего представляющие собой трехмерную сеть губчатой структуры. Основная функция скаффолдов состоит в обеспечении механического каркаса для клеток. Скаффолды через некоторое время после имплантации в организм хозяина полностью исчезают, деградируют (в зависимости от скорости роста ткани), а в месте дефекта останется только новая ткань. Возможно внедрение матрикса с уже частично сформированной новой тканью («биокомпозит»). Безусловно, после имплантации, такая тканеинженерная конструкция должна сохранить свои структуру и функции в течение периода времени, достаточного для восстановления нормально функционирующей ткани в месте дефекта, и интегрироваться с окружающими тканями. Совершенствование методов создания тканеинженерных конструкций даёт возможность не только разработать наиболее адекватную модель для заселения мезенхимных стромальных клеток (МСК) в биоматериал, их пролиферации и дифференцировки, но и получить наилучший результат для восстановления поврежденных тканей. В настоящее время одним из наиболее эффективных подходов к восстановлению повреждённой ткани является клеточная терапия с использованием мезенхимных стромальных клеток (МСК).

МСК могут рассматриваться в качестве универсальных регуляторов тканевого гомеостаза и могут играть важную роль в восстановлении скелетных мышц после травм и заболеваний. В этом процессе участвуют, как резидентные МСК, так и приходящие из костного мозга в ответ на повреждение. По некоторым данным МСК способны к миогенной дифференцировке и слиянию с клетками мышц, однако ведущую роль в регенерации играет паракринная секреция ими регуляторных молекул. МСК способствуют выживанию, пролиферации и дифференцировке миогенных клеток в

повреждённых мышцах, стимулируют ангиогенез, оказывают противовоспалительное и антифибротическое действие.

Эффективность регенерации мышц с помощью МСК может быть повышена путем совершенствования способов доставки клеток в ткань, улучшения их выживаемости или усиления паракринной активности. В частности, для повышения концентрации МСК в месте повреждения разрабатываются методы их трансплантации на искусственных носителях, или скаффолдах. Скаффолды предоставляют клеткам поверхность для адгезии, что способствует поддержанию пролиферативной и дифференцировочной активности имплантируемых клеток. Одним из наиболее перспективных материалов для создания скаффолдов является коллаген. Благодаря своим уникальным свойствам (биосовместимости, адгезивности, волокнистой структуре, хорошей сочетаемости с другими материалами, низкой токсичности и антигенности) коллаген нашёл широкое применение в тканевой инженерии. В связи с этим, целью исследований 2019 г. являлось сравнение эффективности влияния МСК, полученных из разных источников, на регенерацию скелетных мышц при разных способах доставки – в виде суспензии клеток или в комплексе с коллаген-содержащими носителями – и выявление наиболее подходящего вида коллагенового носителя для заживления мышц.

4.1.2 Анализ перспективных направлений исследований в области дифференцировки гемопоэтических и стволовых клеток

Стволовые клетки характеризуются двумя основными свойствами - способностью к самоподдержанию и дифференцировке в другие клеточные типы. В зависимости от дифференцировочного потенциала стволовые клетки делят на тотипотентные, плюрипотентные, мультипотентные, олигопотентные и унипотентные. До недавнего времени исследования в области регенеративной медицины были в значительной степени сосредоточены на изучении мезенхимных стволовых (стромальных) клеток, относящихся к группе мультипотентных. В последние годы отмечается всплеск исследований в области плюрипотентных клеток, в частности, индуцированных плюрипотентных клеток, что обусловлено разработкой методов их получения, генетической модификации и широкими возможностями их клинического применения. Однако, на наш взгляд, большие перспективы связаны и с другими популяциями стволовых клеток, как обладающими мультипотентностью, так и имеющими более ограниченный дифференцировочный потенциал, а также с изучением понятия и биологических основ «стволовости» в принципе и применению этого понятия по отношению к другим популяциям клеток, не обладающих плюри- или мульти-потентностью.

В связи с этим мы поставили задачу расширить круг исследований, проводимых в разделе 4, дополнив его анализом гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) и их потомков. Анализ, проведенный в 2019 г., был направлен на анализ «стволовости» субпопуляций лимфоцитов CD4 – клеток, традиционно рассматриваемых как высоко дифференцированные.

4. 2. Материалы и методы

4.2.1.1 Объектом исследования являлись половозрелые самцы крыс породы Wistar, из тканей которых выделяли все культуры клеток для исследований и на которых проводили опыты *in vivo*. Средняя масса тела животных составляла 200-300г. Животные содержались в стандартных условиях вивария с доступом к сухому корму и воде *ad libitum*. Выведение из эксперимента осуществляли помещением животных в пары хлороформа.

4.2.1.2 Исследования *in vivo* проводились на модели разреза икроножной мышцы крыс. Перед операцией животных вводили в наркоз внутривенной инъекцией хлоралгидрата, 400 мг/кг. Над икроножной мышцей производили разрез кожи. На оголенную икроножную мышцу тонкими ножницами наносился глубокий поперечный разрез, после чего на кожу накладывали швы и обрабатывали рану йодом.

4.2.1.3 МСК выделяли из жировой ткани, костного мозга и мышц крыс по стандартным методикам. Для выделения жировых и мышечных МСК образцы тканей измельчались и помещали в 0,075% раствор коллагеназы (Serva, Польша) в среде DMEM с добавлением антибиотика и антимикотика на 40 минут при 37°C. После инкубации с коллагеназой клетки отмывали от загрязнений несколькими этапами центрифугирования на скорости 1000g с поэтапной сменой среды и ресуспендированием. Для получения МСК поврежденных мышц на икроножные мышцы крыс наносили поперечный разрез, аналогично получению модели механического повреждения, после чего накладывали швы. Отбор ткани для выделения клеток производился через 4 суток, далее выделение продолжали по описанной выше методике. Для получения костномозговых МСК костный мозг вымывали средой DMEM из диафизов больших берцовых и бедренных костей крыс при помощи тонкого шприца.

Клетки сажали в концентрации $2-5 \cdot 10^5$ кл/мл в 15мл среды DMEM с добавлением 10% FBS, 1% антибиотика и антимикотика и 1% глутамин. Через сутки после получения первичной культуры меняли среду культивирования на свежую, затем рассеивали клетки на следующие пассажи по мере достижения конfluence монослоя. Снятие клеток с пластика для пассирования производили теплым раствором трипсина-Версена 1:3.

4.2.1.4 Доставку МСК в места повреждения мышц осуществляли разными способами: в форме инъекции и на коллагеновых носителях.

Путем инъекции клетки вводили в суспензии со средой культивирования при помощи инсулинового шприца. Концентрация клеток в суспензии - $5 \cdot 10^5$ кл/мл, объем дозы – 20 мкл. Введение осуществляли непосредственно после нанесения разреза икроножной мышцы, инъекция производилась в стенки поврежденной мышцы и дно раны. В правую лапу лабораторного животного вводили опытные образцы, в левую лапу вводили равный объем физраствора без клеток в качестве контроля.

Для заселения носителей клетками МСК культивировались вместе с носителями в ячейках 24-луночного планшета в течение 14 суток. Концентрация клеток в лунке - $1 \cdot 10^6$ кл/мл, объем суспензии – 1 мл на лунку. Смену питательной среды производили каждые 3 дня. Процесс обрастания носителей клетками наблюдали в инвертированный микроскоп. Носители, заселенные клетками, помещали в разрез мышцы сразу после его нанесения. Было исследовано несколько типов носителей, любезно предоставленных Е.В. Истрановой, сотрудницей Института регенеративной редицины Первого МГМУ им. И.М. Сеченова.

Белкозин – носитель из реорганизованных волокон коллагена, представляющий собой довольно плотную пленку. Является ингредиентом мясной промышленности, используется для изготовления колбасных белковых оболочек. Данный носитель был выбран для исследования ввиду его низкой стоимости при составе, типичном для биомедицинских скаффолдов, что, предположительно, делает его подходящим биосовместимым агентом для доставки клеток.

SIS (swine intestinal submucosa) – децеллюляризованная стенка тонкой кишки свиньи. Представляет собой рыхловолоконистую пленку из сплетенных волокон коллагена.

ГПК (губка из пористого коллагена) – губка из реорганизованных коллагеновых волокон. Данный носитель отличается от прочих трехмерной структурой и повышенной мягкостью и пористостью.

Каждый тип носителя с клетками был имплантирован пяти животным в правую лапу. Контролем являлась левая лапа того же животного, на который наносили такой же разрез мышцы и наносили швы, не вводя дополнительных веществ.

4.2.1.5 Образцы мышц после опытов *in vivo* отбирали для гистологического исследования через 14 суток после введения МСК и фиксировали нейтральным формалином двое суток при $+4^{\circ}\text{C}$. Подготовку образцов, получение срезов и окрашивание проводили по стандартной методике. Срезы толщиной 4 мкм окрашивали гематоксилином

и эозином. Просмотр и съемку препаратов проводили на микроскопах Olympus IX51 с камерой Olympus DP50-CU и Kayence BZ-9000.

4.2.2 Т-лимфоциты отвечают за развитие антиген-специфичного иммунного ответа. Выделяют две основные субпопуляции Т-лимфоцитов – лимфоциты CD4 (Т-хелперы, Th) и CD8 (цитотоксические). Основная роль лимфоцитов Th в иммунном ответе связана с продукцией цитокинов, влияющих на активность и миграцию в место развития иммунного ответа других клеток иммунной системы. В зависимости от профиля продуцируемых цитокинов лимфоциты Th классифицируют на Т-хелперы 1 типа (Th1), 2 типа (Th2), 17 типа (Th17) и др. Разные популяции Th выполняют различные функции. В частности, при инфекциях Th1 обеспечивают протекцию от внутриклеточных бактерий, Th2 – от внеклеточных паразитов, в частности, от гельминтов, Th17 – от внеклеточных бактерий и грибов. Перечисленные популяции Th относятся к популяциям эффекторных лимфоцитов – т.е. представляют собой клетки, готовые к осуществлению своих функций. Эффекторные лимфоциты Th образуются из так называемых «наивных» лимфоцитов в результате распознавания последними соответствующего антигена. При распознавании антигена наивные лимфоциты, несущие антиген-специфичный рецептор, пролиферируют и дифференцируются в эффекторные клетки. Направление дифференцировки при этом определяется микроокружением дифференцирующегося Т-лимфоцита. Формирование эффекторного лимфоцита приводит к развитию иммунного ответа, элиминации патогена (антигена), стиханию иммунного ответа и уменьшению пула эффекторных лимфоцитов соответствующей антигенной специфичности. При этом в организме сохраняется пул так называемых клеток иммунологической памяти – лимфоцитов, несущих Т-клеточный рецептор соответствующей специфичности, участвовавших в первичном иммунном ответе и способных при повторном контакте с этим же антигеном развивать более быстрый и эффективный иммунный ответ. Формирование пула лимфоцитов памяти является основой постинфекционного и вакцин-индуцированного иммунитета. При этом обычно предполагается, что клетка иммунологической памяти должна обладать теми же функциональными свойствами (принадлежать к той же популяции Th), что и эффекторные лимфоциты, защищающие от соответствующего патогена. Например, если иммунитет против внутриклеточных инфекций обеспечивается лимфоцитами Th1, то и клетка иммунологической памяти должна принадлежать к этой же функциональной популяции лимфоцитов. В связи с этим разработка вакцин против инфекций направлена на индукцию Т-клеточного ответа того же типа, который необходим для защиты против соответствующего патогена.

4.3 Результаты и обсуждение

4.3.1.1 Морфология поврежденной мышцы в контроле

На 14-е сутки, при заборе образцов тканей для гистологического анализа, швы на месте пореза у большинства крыс затягивались и выглядели хорошо заживающими. При вскрытии лапы можно было отметить на икроножных мышцах покраснения в областях, где наносился разрез. По этим покраснениям визуально определяли область повреждения и отбирали ее для анализа. На микроскопическом уровне повреждения выражались в следующем: в области пореза скапливалось большое количество воспалительных клеток, в большинстве – нейтрофильных гранулоцитов и макрофагов (рисунок 4.1). Ближе к центру поврежденной области наблюдалось развитие грануляционной ткани – скопления клеток соединительной ткани, фибробластов и миофибробластов. В грануляционной ткани обнаруживались кровеносные сосуды и прорастающие мышечные волокна. Растущие мышечные волокна определяли по центральному расположению ядра, которое является характерной особенностью растущего волокна из-за предшествующего процесса слияния миобластов, при котором ядра смещаются в центр.

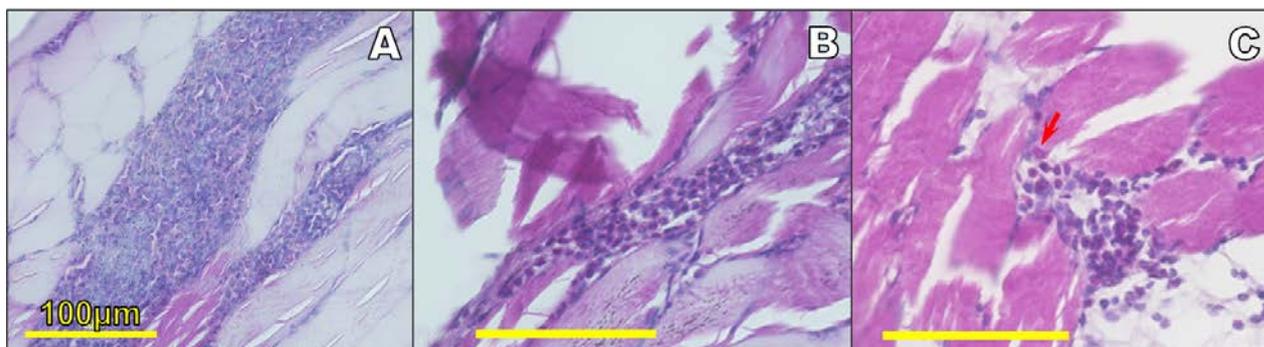


Рисунок 4.1 - Срезы икроножной мышцы через 14 суток после нанесения разреза, контроль. А. Участок зоны воспаления. Между мышечными волокнами присутствует скопление воспалительных клеток, в частности нейтрофилов. В, С. Фрагменты зоны воспаления. Видны отдельные клетки, имеющие полиморфные ядра, некоторые имеют ядра в виде бублика, характерные для крысиных нейтрофилов

4.3.1.2 Влияние суспензии МСК на регенерацию мышц

По литературным данным, в вопросе применения МСК в регенеративной медицине принято мнение, что доставка клеток на биоразлагаемых носителях способствует их выживаемости и поддержанию функциональности [1, 2]. Первой частью нашего эксперимента с трансплантацией МСК было введение клеток в суспензии, без дополнительных модификаций. Клетки инъецировали в стенки поврежденной мышцы инсулиновым шприцом в концентрации $5 \cdot 10^6$ кл/мл. На 14 сутки после инъекции МСК в области введения присутствовало воспаление, в центре поврежденной области формировалась грануляционная ткань, насыщенная нейтрофилами. Слегка, но

незначительно, увеличилась площадь воспаления после введения МСК по сравнению с контролем. Это может быть связано с аллогенностью трансплантата, так как животные получали клетки, выделенные из ткани других крыс, но также может быть и следствием самого повреждения. На границе воспаленной зоны и не поврежденной мышечной ткани обнаруживались признаки регенеративных процессов: в грануляционную ткань прорастали сосуды и молодые мышечные волокна. Сосуды выглядели округлыми, тонкостенными и часто содержали эритроциты в просветах. Растущие мышечные волокна выглядели утолщенными на концах и на границе с грануляционной тканью несли множественные центрально расположенные ядра. Ядра в составе волокон выглядели слегка увеличенными и имели светлую окраску, что может свидетельствовать о высокой транскрипционной активности. В большинстве ядер было заметно одно плотное ядрышко.

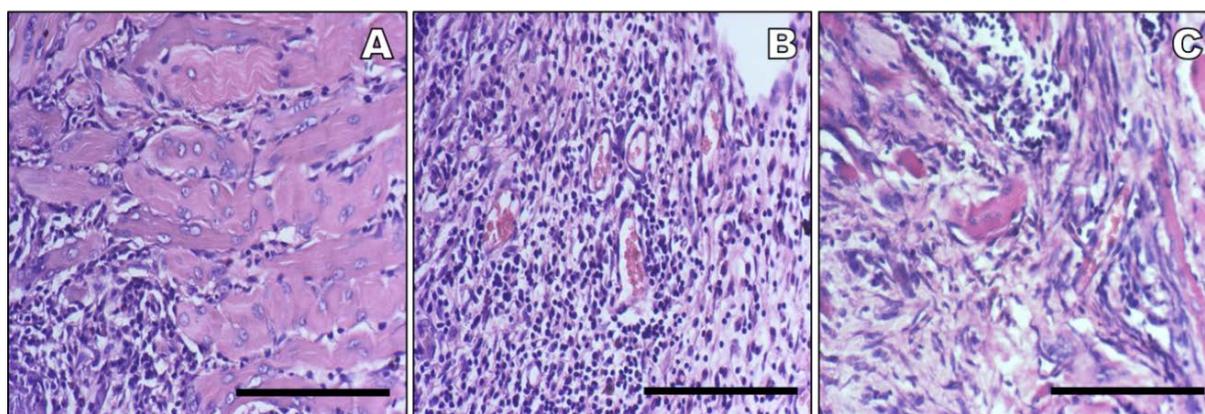


Рисунок 4.2 - Признаки регенерации скелетной мышцы на тканевом уровне. А. - Регенерирующие мышечные волокна с центрально расположенными ядрами. Концы растущих волокон проникают в грануляционную ткань. Ядра волокон светлые с заметным ядрышком. В. - Кровеносные сосуды в грануляционной ткани. С. - Сосуды и мышечные волокна, прорастающие в соединительную ткань. Масштабный отрезок - 100 μ m

Введение МСК из разных источников оказало различное влияние на васкуляризацию и миогенез в области повреждения. Количество новых сосудов и мышечных волокон возросло после введения КМ-МСК, которые дали результаты, достоверно отличающиеся от контроля. В то же время введение ЖТ-МСК способствовало только усилению миогенеза, но увеличения числа сосудов выявлено не было. Этот результат позволяет предположить, что МСК из разных источников имеют разные механизмы воздействия на клеточные процессы, вероятно, из-за выделения разных растворимых факторов.

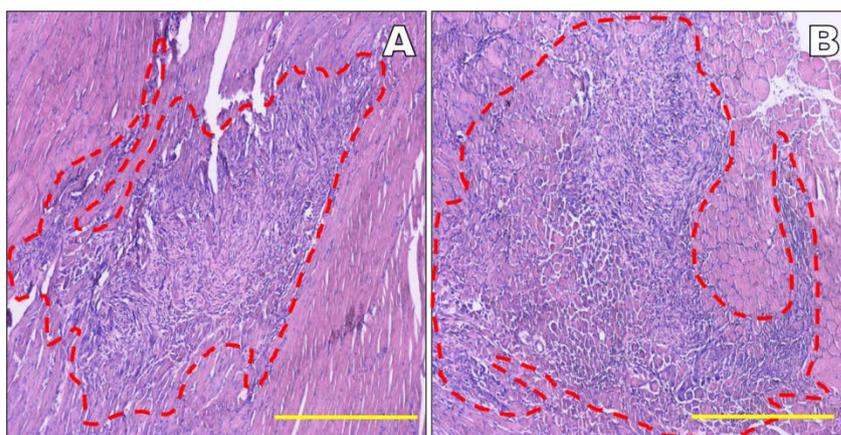


Рисунок 4.3 - Воспаление в области повреждения мышцы. А. Контрольная рана после введения физраствора. В. Рана после введения суспензии ЖТ-МСК. Масштабный отрезок 500 μm

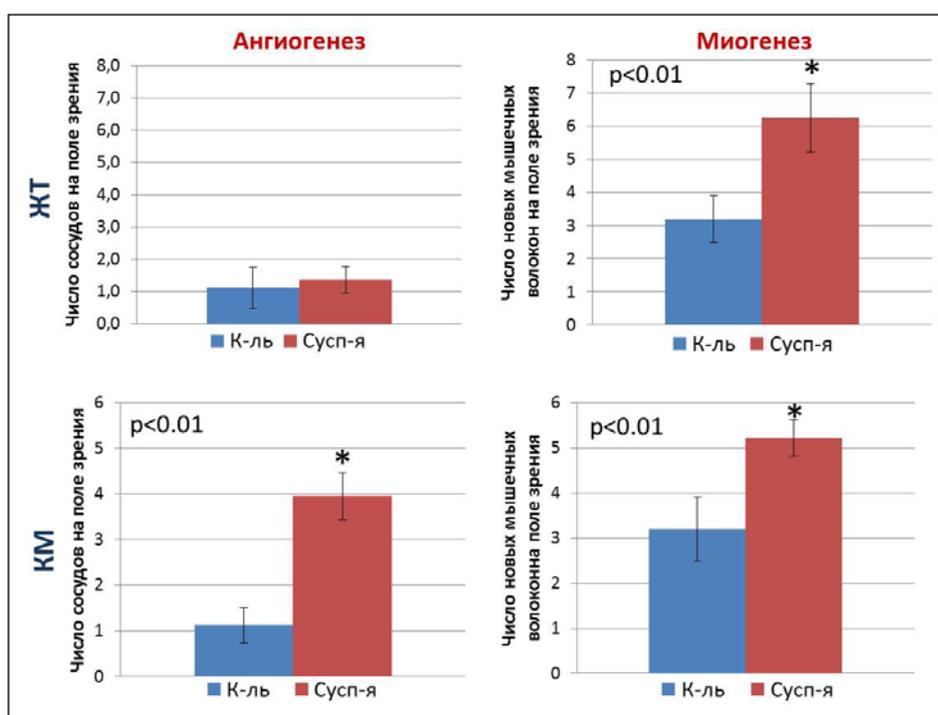


Рисунок. 4.4 - Количество кровеносных сосудов и растущих мышечных волокон в области заживления мышц после инъекции суспензий ЖТ-МСК (верхний ряд) и КМ-МСК (нижний ряд). При введении КМ-МСК наблюдается значительное усиление ангиогенеза, и миогенеза, в то время как ЖТ-МСК в данном опыте повлияли только на миогенез.

По результатам опыта с доставкой МСК в поврежденную мышцу *in vivo* можно сделать несколько выводов. Во-первых, при введении в виде суспензии МСК, выделенные из жировой ткани и костного мозга, оказали различное влияние на регенерацию. Действительно, в литературе, посвященной сравнительному анализу МСК из разных тканевых источников, описываются различия в эффективности влияния клеток на регенерацию тканей. С одной точки зрения, эти различия описываются разными потенциалами к дифференцировке по тому или иному пути после имплантации МСК в ткань [3], однако, если учесть преобладающее значение паракринного влияния МСК,

различия стоит выявлять в секретах МСК из разных источников. С полученными нами результатами согласуются результаты другого исследования [4], которое показало, что КМ-МСК при введении в мышцу стимулируют ангиогенез активнее, чем ЖТ-МСК, но при этом не дифференцируются и не интегрируются в ткань реципиента. Примером разницы секретомов может послужить различие в экспрессии ЖТ- и КМ-МСК генов таких факторов роста как остеопонтин и CXCL12, которые, как считается, способствуют росту сосудов и выделяются КМ-МСК [5], но практически не выделяются ЖТ-МСК без специальной стимуляции [6]. Таким образом, подтверждается значение различий секрета между видами МСК. Именно такими различиями можно объяснить и полученный нами результат, согласно которому КМ-МСК больше, чем ЖТ-МСК, способствуют ангиогенезу. В то же время эти виды МСК проявили примерно одинаковое положительное влияние на миогенез, что также находит подтверждения в литературе [7].

4.3.1.3 Проверка биосовместимости новых коллагеновых носителей

После опытов с введением МСК в виде суспензии мы перешли к доставке МСК на коллагеновых носителях, однако, перед этим потребовалась проверка двух новых носителей, оказавшихся в арсенале лаборатории, на биосовместимость. Этими носителями были губка из недубленого коллагена (НД) и губка из пористого коллагена (ГПК). Чтобы оценить их биоразлагаемость, носители, не заселенные клетками, были имплантированы в поврежденную мышцу сразу после нанесения разреза с последующим наложением швов. В данном опыте образцы мышц для гистологического исследования забирали на сроках 3, 7 и 14 суток после операции, чтобы сравнить динамику заживления ткани вокруг скаффолдов.

Через 3 и 7 суток вокруг обоих носителей развилось достаточно сильное воспаление, ткани были насыщены воспалительными клетками. На этих этапах разницы между носителями отмечено не было. Однако исследование через 14 суток показало, что в то время как носитель НД еще присутствовал в ткани, его структура была отчетливо видна, и вокруг носителя сохранялись крупные скопления нейтрофилов, носитель ГПК на 14 суток почти полностью деградировал, и на срезах удалось обнаружить лишь его небольшие фрагменты. При этом интенсивность воспаления вокруг ГПК слегка снизилась через 14 суток. В связи с полученными данными, именно ГПК помимо двух других носителей был выбран для дальнейших опытов с доставкой МСК в мышцы *in vivo*.

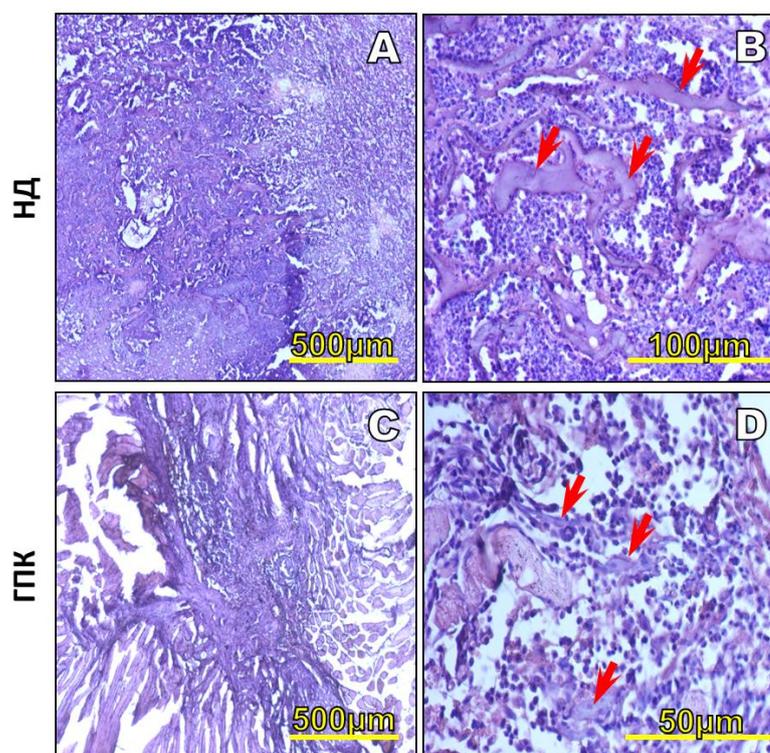


Рисунок 4.5 - Срезы икроножных мышц после имплантации носителей НД и ГПК на 14 сутки после имплантации. Вокруг обоих носителей развилось интенсивное воспаление (А, С), однако вокруг ГПК оно несколько меньше по площади. Фрагменты носителей указаны стрелками на рисунках В, D

4.3.1.4 Исследование регенерации скелетных мышц после имплантации коллагеновых носителей, заселенных МСК

Носители Белкозин, SIS и ГПК заселяли МСК из двух источников и имплантировали в мышцы. При заборе ткани для гистологического исследования вырезали куски размером около 10x10мм. При отборе тканей для анализа место имплантации носителей первично определяли по покраснению и наличию рубца в месте повреждения. Особенно отчетливо были видны места имплантации носителей Белкозина и SIS, в то время как ГПК было труднее обнаружить в мышце визуально. Мышцы с имплантированными Белкозином и SIS также были уплотнены в месте повреждения, что может быть связано с началом фибротизации ткани.

Имплантация всех носителей в рану вызывала выраженное воспаление, сохраняющееся до 14 суток. Наиболее интенсивное воспаление вызвали носители Белкозин и SIS, вероятно, из-за их плотной, трудно проницаемой для клеток структуры. Дальше от носителей, на периферии воспаленной области наблюдалась грануляционная ткань с аморфными скоплениями и тяжами фибробластоподобных клеток. На границе грануляционной ткани и не поврежденной мышечной ткани также обнаруживались сосуды и растущие мышечные волокна.

Так как Белкозин является довольно плотной пленкой из реорганизованных волокон коллагена, его структура оказалась наименее подходящей для прикрепления и проникновения в него клеток. На срезах видно, что ткани реципиента не проникают глубже поверхности носителя, и носитель оказывается заключенным в капсулу, что свидетельствует о его низкой биоразлагаемости. SIS имеет более рыхлую структуру, чем Белкозин, и на 14 сутки он выглядел более разволокненным и содержал клетки на поверхности и в подповерхностных слоях. Тем не менее, воспаление вокруг SIS все равно было весьма интенсивным. В области воспаления после имплантации SIS и Белкозина обнаруживались аморфные скопления ткани, напоминающие гранулемы (рисунок 4.6).

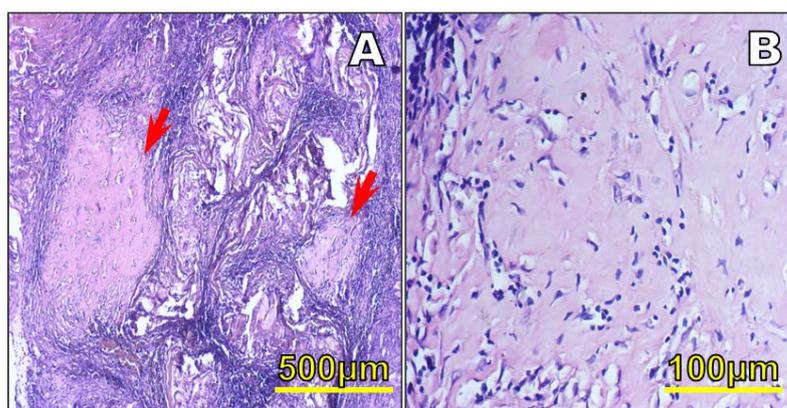


Рисунок 4.6 - Плотные соединительнотканые скопления в зоне воспаления после имплантации носителя SIS. А. Общий вид; скопления указаны стрелками. В. Фрагмент

Признаки регенерации мышцы обнаруживались на периферии зоны воспаления вокруг Белкозина и SIS, мышечные волокна и сосуды прорастали в грануляционную ткань в основном снаружи. В отличие от SIS и Белкозина, являющихся пленками, ГПК имел наиболее мягкую и рыхлую трехмерную структуру и почти полностью деградировал в ткани на 14 сутки. Область имплантации ГПК прорастала соединительной тканью реципиента, и растущие мышечные волокна и сосуды обнаруживались не только на периферии области повреждения, но и в ее центре. Средняя площадь воспаления, вызванного ГПК, была меньше, чем у Белкозина и SIS. Вид носителей через 14 суток после имплантации представлен на рисунке (рисунок 4.7)

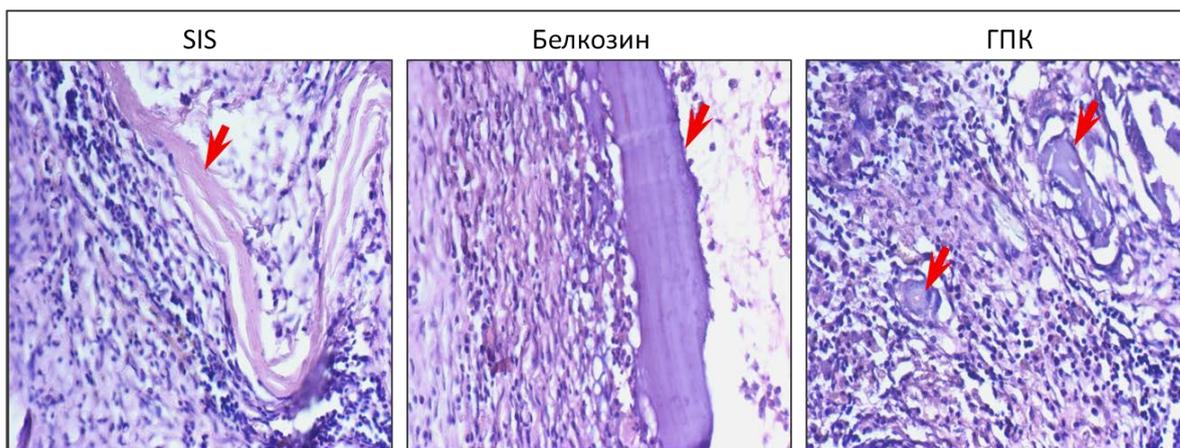


Рисунок 4.7 - Морфология коллагеновых носителей, имплантированных в разрез икроножной мышцы, через 14 суток после операции. Фрагменты носителей указаны стрелками. Носитель SIS в ткани несколько истончился и стал распадаться на волокна. Структура Белкозина осталась практически неизменной. Однако носитель ГПК почти полностью деградировал во всех образцах, и удавалось найти только его мелкие фрагменты

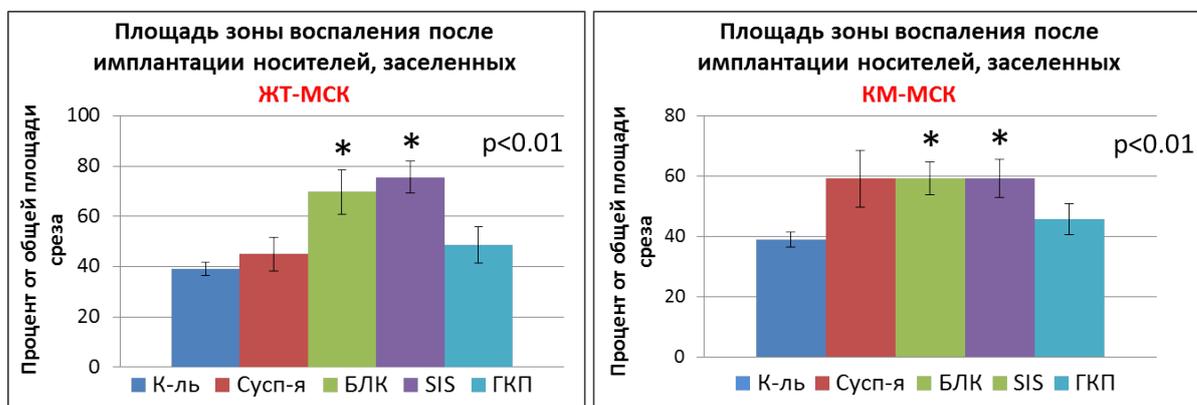


Рисунок 4.8 - Площади воспаления после имплантации коллагеновых носителей, заселенных МСК из разных источников, в поврежденную мышцу. Воспаленная зона при имплантации Белкозина и SIS значительно обширнее, по сравнению с контролем

Площадь воспаления различалась при имплантации разных носителей с МСК, однако, трудно сказать, зависела ли сила реакции от типа МСК, которые были доставлены, так как принципиальная разница заметна только между разными носителями. На рисунке 4.8. представлены процентные доли областей воспаления от общей площади среза, которые были измерены для всех носителей, а также в контрольных образцах и после введения в мышцы суспензии. Белкозин и SIS вызвали наиболее интенсивные воспалительные реакции, независимо от вида доставляемых клеток. Различия по площадям воспаления для них достоверно отличаются от контроля. Однако некоторые различия наблюдаются и между МСК из разных источников относительно площадей воспаления, вызванных введением суспензий: суспензия КМ-МСК вызвала несколько более интенсивное воспаление, чем ЖТ-МСК. Различия не являются достоверными, однако площадь воспаления при введении суспензии КМ-МСК часто сравнима с

воспалением от Белкозина и SIS. Неясно, можно ли обосновать такое различие свойствами вводимых клеток, так как в литературе не встречаются данные о разной иммуногенности МСК из разных тканевых источников. Наконец, носитель ГПК при доставке обоих видов МСК вызвал воспаление, лишь незначительно превосходящее по интенсивности таковое в контроле.

Количество новообразованных сосудов и мышечных волокон на границе зоны имплантации также различалось между носителями и между МСК из двух источников (рисунок 4.9). При введении суспензии ЖТ-МСК было отмечено небольшое увеличение количества растущих мышечных волокон, но количество сосудов было примерно одинаковым в контроле и в опыте. При доставке ЖТ-МСК на носителях, наибольшее количество сосудов было обнаружено в грануляционной ткани вокруг Белкозина, а наибольшее количество растущих мышечных волокон – вокруг SIS. Доставка же КМ-МСК на носителях не оказала значительного воздействия на ангиогенез, так как количество новообразованных сосудов не превосходило их количество после введения суспензии. Однако и для ЖТ-МСК, и для КМ-МСК общим результатом является увеличение числа растущих мышечных волокон после доставки клеток на носителях SIS и ГПК.

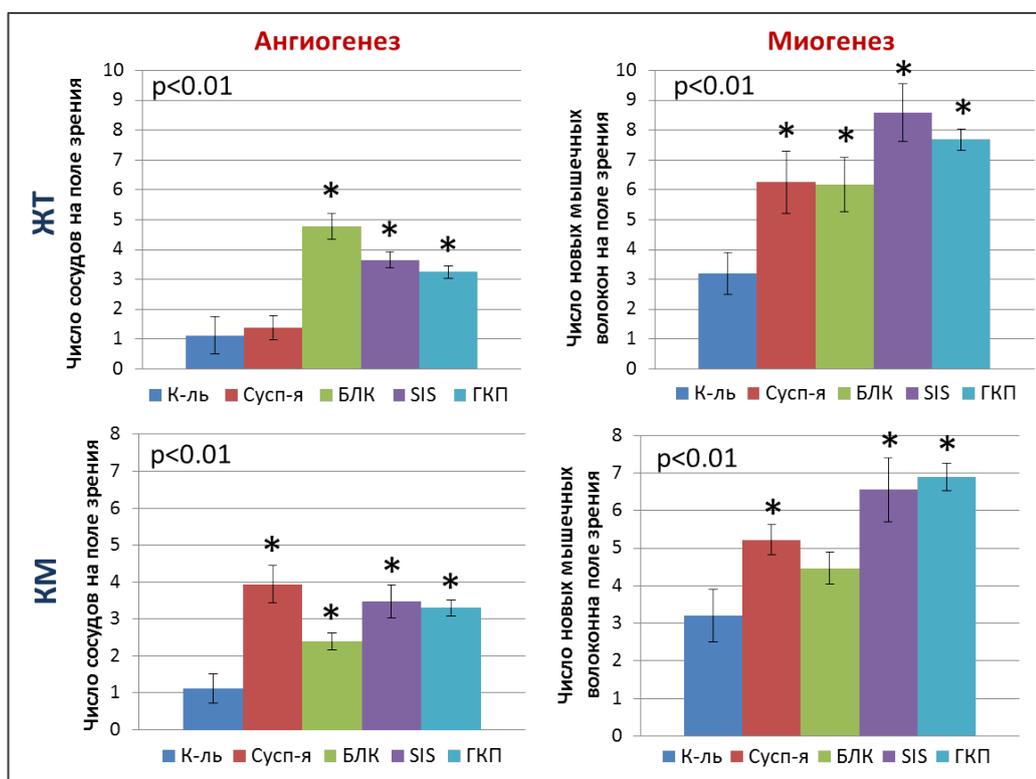


Рисунок 4.9 - Количество кровеносных сосудов и растущих мышечных волокон в области заживления мышц после имплантации носителей, заселенных ЖТ-МСК (верхний ряд) и КМ-МСК (нижний ряд). Достоверность различий указана относительно контрольной группы

При доставке МСК на носителях показатели регенерации в одних случаях немного повысились, в других случаях разницы между применением носителей и суспензии клеток почти не оказалось. Назначение носителей при доставке клеток – обеспечение их выживаемости в месте трансплантации. Носители предоставляют клеткам структурированную поверхность для адгезии, что способствует пролиферации, дифференцировке и синтетической активности клеток [8]. По результатам нашего эксперимента, применение носителей лишь немного усилило регенерацию мышечной ткани. Можно предположить, что это связано с крайне интенсивной воспалительной реакцией, развивающейся вокруг имплантированных носителей. Воспаление является необходимым для заживления ран процессом, стимулирующим регенерацию тканей за счет активации соответствующих клеточных процессов под действием воспалительных медиаторов. Однако чрезмерное воспаление может оказать обратный эффект и привести к аномалиям при реорганизации ткани, фибротизации и снижении ее функциональности [9]. В случае затяжного присутствия нейтрофилов, апоптотических остатков воспалительных клеток и инородных тел в месте поражения, восстановление тканевого гомеостаза оказывается недостижимым, что приводит к хроническому воспалению [10]. В описанном опыте воспаление было довольно сильным и продолжительным, и, вероятно, это могло привести к повреждению имплантированных МСК и снижению их регенеративного потенциала, что сказалось на активности ангиогенеза и миогенеза.

4.3.2 Приведенная выше классификация популяций Th основана на различиях в эффекторных функциях дифференцированных антиген-специфичных Т-лимфоцитов. Другие классификации учитывают дифференцировочный статус клетки, который тесно связан с поверхностным фенотипом клеток и особенностями их хоминга в различные ткани. По совокупности этих признаков в популяции лимфоцитов CD4 выделяют кластеры: наивные (TN), стволовые клетки памяти (TSCM), клетки центральной памяти (TSM), транзиторные клетки памяти (TTM), эффекторные клетки памяти (TEM) и клетки (TTE/TEMRA) [11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18]. Детальный анализ популяции TEM, проведенный, в том числе, в наших исследованиях [19] показывает, что клетки, принадлежащие к популяции TEM, в свою очередь, могут достигать различной степени дифференцировки, что можно оценить, определяя экспрессию на поверхности клетки рецепторов CD27 и CD28: «ранние» эффекторы имеют фенотип CD27+CD28+, «поздние» - CD27-CD28+, терминально-дифференцированные - CD27-CD28- (при этом они начинают экспрессировать другие маркеры, в частности, маркеры клеток NK). Согласно модели линейной дифференцировки, клетки CD4 последовательно дифференцируются «вдоль» перечисленных кластеров. При этом менее дифференцированные клетки являются более

длительно живущими, обладают большей способностью к самообновлению и большей мультипотентностью (с точки зрения возможности дифференцировки в различные функциональные популяции Th) [6, 20, 21, 22].

Приведенные выше классификации Th на основе их функциональной активности (Th1, Th2, Th17 и т.д.) и дифференцировочного статуса (TN, TSCM, TCM, TTM и т.д.) обычно рассматриваются отдельно, без взаимосвязи друг с другом. Однако наши предшествующие исследования выявили различия в степени дифференцировки различных популяций Th. В частности, нами была показана высокая степень дифференцировки «классических» Th1 и существенно более низкая – «неклассических» Th1 [23]. Нами была также показана возможность дифференцировки «неклассических» Th1 в «классические», но не наоборот [23]. Работы других авторов показали возможность дифференцировки Th17 в «неклассические» Th1, их высокую жизнеспособность и высокую способность Th17 к самообновлению (сравнимую с популяцией TSCM) [17, 24, 25, 26, 27, 28]. Проведенный нами в 2019 г. анализ собственных данных и данных литературы позволил заключить, что различные популяции Th характеризуются различной степенью дифференцировки (а следовательно – и жизнеспособностью) и различной степенью пластичности (т.е., различной способностью к переходу в другие функциональные состояния, применительно к Т-лимфоцитам – различной «мультипотентностью»). Поскольку иммунологическая память тесно связана со способностью клетки к длительной персистенции и самообновлению, можно полагать, что разные популяции Th обладают разным потенциалом к поддержанию иммунологической памяти и как следствие - что поддержание иммунологической памяти и развитие эффективного ответа к одному тому же патогену может обеспечиваться разными популяциями Th. Последнее обеспечивается пластичностью отдельных популяций Th и тем, что они при повторном контакте с антигеном могут давать начало клеткам с другой эффекторной активностью. Например, показано, что Th17, образованные при вакцинации, дифференцируются в Th1 при последующей инфекции. Таким образом, отдельные популяции Th обладают такими характеристиками как длительное время жизни, способность к самоподдержанию и способность к дифференцировке в разные эффекторные клетки («мультипотентность»), т.е., основными характеристиками стволовых клеток.

4.4. Заключение

4.4.1.1 Доставка МСК в место повреждения мышцы и в виде суспензии, и на биосовместимых носителях повышает эффективность регенерации;

4.4.1.2. Наиболее подходящим носителем является ГПК, так как он обеспечил наилучшую пространственную организацию для роста ткани;

4.4.2 В целом, в 2019 г. нами был проведен анализ результатов собственных исследований и данных литературы в области дифференцировки, «стволовости» и иммунологической памяти, поддерживаемой лимфоцитами CD4, по итогам которого была высказана гипотеза, связывающая протективный потенциал Т-хелперных лимфоцитов с их низкой степенью дифференцировки и «стволовостью» (а не с функциональной активностью в момент первичного иммунного ответа, как часто считается), которая была опубликована в журнала «Frontiers in Immunology» [29].

4.5 Список использованных источников

1. Furuta T., et al.. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Promote Fracture Healing in a Mouse Model // *Stem Cells Transl. Med.* - 2016. - Vol. 5, № 12. - P. 1620 – 1630
2. Keshkar S., Azarpira N., Ghahremani M.H. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: novel frontiers in regenerative medicine // *Stem Cell Res. Ther.* - 2018. - Vol. 9, № 1. - P. 63.
3. Xu L., et al. Tissue source determines the differentiation potentials of mesenchymal stem cells: a comparative study of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue // *Stem Cell Res. Ther.* - 2017. - Vol. 8, № 1. - P. 275.
4. Bortolotti F. и др. In vivo therapeutic potential of mesenchymal stromal cells depends on the source and the isolation procedure. // *Stem cell reports.* - 2015. - Vol. 4, № 3. С. 332 – 9.
5. Maeda Y. и др. CXCL12 and osteopontin from bone marrow-derived mesenchymal stromal cells improve muscle regeneration. // *Sci. Rep.* - 2017. - Vol. 7, № 1. - P. 3305.
6. Rodríguez T.M, et al. Effect of TGF- β 1 Stimulation on the Secretome of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells. // *Stem Cells Transl. Med.* - 2015. - Vol. 4, № 8. - P. 894 – 8.
7. Pokrywczynska M., et al. Does the Mesenchymal Stem Cell Source Influence Smooth Muscle Regeneration in Tissue-Engineered Urinary Bladders? // *Cell Transplant.* - 2017. - Vol. 26, № 11. - P. 1780 – 1791.
8. Davies B.M., et al. Repairing damaged tendon and muscle: are mesenchymal stem cells and scaffolds the answer? // *Regen. Med.* - 2013. - Vol. 8, № 5. - P. 613 – 630.
9. Tidball J.G. Regulation of muscle growth and regeneration by the immune system // *Nat. Rev. Immunol.* - 2017. - Vol. 17, № 3. - P. 165 – 178.
10. Freire M.O., Van Dyke T.E. Natural resolution of inflammation // *Periodontol.* 2000. - 2013. - Vol. 63, № 1. - P. 149 – 164.

11. Caccamo N., Joosten S.A., Ottenhoff T.H.M., Dieli F. Atypical Human Effector/Memory CD4⁺ T Cells With a Naive-Like Phenotype // *Front Immunol.* – 2018. - Vol. 9. - P. 2832. doi:10.3389/fimmu.2018.02832.
12. Kaech S.M., Wherry E.J., Ahmed R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development // *Nat Rev Immunol.* – 2002. - Vol. 2. - P. 251.
13. Sallusto F., Lenig D., Förster R., Lipp M., Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions // *Nature.* – 1999. - Vol.401. - P. 708.
14. Lanzavecchia A., Sallusto F. Progressive differentiation and selection of the fittest in the immune response // *Nat Rev Immunol* – 2002. - Vol. 2. - P. 982.
15. Mahnke YD, Brodie TM, Sallusto F, Roederer M, Lugli E. The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets // *Eur J Immunol.* – 2013. - Vol. 43. - P. 2797. doi: 10.1002/eji.201343751.
16. Gasper D.J, Tejera M.M., Suresh M. CD4 T-Cell Memory Generation and Maintenance // *Crit Rev Immunol.* – 2014. - Vol. 34. - P. 121.
17. Sallusto F. Heterogeneity of Human CD4(+) T Cells Against Microbes. *Annu Rev Immunol.* – 2016. - Vol. 34. - P. 317. doi: 10.1146/annurev-immunol-032414-112056.
18. Sallusto F., Cassotta A., Hoces D., Foglierini M., Lanzavecchia A. Do memory CD4 T cells keep their cell-type programming: plasticity versus fate commitment? T-cell heterogeneity, plasticity, and selection in humans // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* – 2018. - Vol. 10. - P. a029421. doi: 10.1101/cshperspect.a029421.
19. Kapina M.A., Shepelkova G.S., Mischenko V.V., Sayles P., Bogacheva P.V., Winslow G., Apt A.S., Lyadova I.V. CD27^{lo} CD4⁺ T lymphocytes that accumulate in the mouse lung tissue during mycobacterial infection differentiate from CD27^{hi} precursors in situ, produce IFN- γ , and protect the host against TB infection // *J. Immunol.* – 2007. - Vol. 178. - P. 976–985.
20. Lugli E., Dominguez M.H., Gattinoni L., Chattopadhyay P.K., Bolton D.L., Song K., et al. Superior T memory stem cell persistence supports long-lived T cell memory // *J Clin Invest.* – 2013. - Vol. 123. - P. 594. doi: 10.1172/JCI66327.
21. Gattinoni L., Lugli E., Ji Y., Pos Z., Paulos C.M., Quigley M.F., Almeida J.R., et al. A human memory T cell subset with stem cell-like properties // *Nature medicine.* – 2011. - Vol. 17, № 10. - P. 1290. doi:10.1038/nm.2446.
22. Riou C., Yassine-Diab B., Van Grevenynghe J., Somogyi R., Greller L.D., Gagnon D., et al. Convergence of TCR and cytokine signaling leads to FOXO3a phosphorylation and drives the survival of CD4⁺ central memory T cells // *J Exp Med.* – 2007. - Vol. 204. - P. 79. doi: 10.1084/jem.20061681.

23. Nikitina I.Y., Panteleev A.V., Kosmiadi G.A., Serdyuk Y.V., Nenasheva T.A., Nikolaev A.A., Gorelova L.A., Radaeva T.V., Kiseleva Y.Y., Bozhenko V.K., Lyadova I.V. Th1, Th17, and Th1Th17 Lymphocytes during Tuberculosis: Th1 Lymphocytes Predominate and Appear as Low-Differentiated CXCR3+CCR6+ Cells in the Blood and Highly Differentiated CXCR3+/-CCR6- Cells in the Lungs // *J Immunol* – 2018. - Vol. 200. - P. 2090 - 2103.
24. Basdeo S.A., Cluxton D., Sulaimani J., Moran B., Canavan M., Orr C., et al. Ex-Th17 (Nonclassical Th1) Cells Are Functionally Distinct from Classical Th1 and Th17 Cells and Are Not Constrained by Regulatory T Cells // *J Immunol*. – 2017. - Vol. 198. - P. 2249. doi: 10.4049/jimmunol.1600737.
25. Lexberg M.H., Taubner A., Albrecht I., Lepenies I., Richter A., Kamradt T., et al. IFN- γ and IL-12 synergize to convert in vivo generated Th17 into Th1/Th17 cells // *Eur J Immunol*. – 2010. - Vol. 40. - P. 3017. doi: 10.1002/eji.201040539.
26. Kurschus F.C., Croxford A.L., Heinen A.P., Wörtge S., Ielo D., Waisman A. Genetic proof for the transient nature of the Th17 phenotype // *Eur J Immunol*. – 2010. - Vol. 40. - P. 3336. doi: 10.1002/eji.201040755.
27. Muranski P., Restifo N.P.. Essentials of Th17 cell commitment and plasticity // *Blood*. – 2013. - Vol. 121. - P. 2402. doi: 10.1182/blood-2012-09-378653.
28. Wacleche V.S., Landay A., Routy J.P., Ancuta P. The Th17 Lineage: From Barrier Surfaces Homeostasis to Autoimmunity, Cancer, and HIV-1 Pathogenesis // *Viruses*. – 2017. - Vol. 9. - P. 303. doi: 10.3390/v9100303
29. Lyadova I, Nikitina I. Cell Differentiation Degree as a Factor Determining the Role for Different T-Helper Populations in Tuberculosis Protection // *Front Immunol*. – 2019. - Vol. 8, № 10. - P. 972. doi: 10.3389/fimmu.2019.00972.

4.6 Отчетные публикации по разделу

1. Lyadova I, Nikitina I. Cell Differentiation Degree as a Factor Determining the Role for Different T-Helper Populations in Tuberculosis Protection // *Frontiers in Immunology*. – 2019. - Vol. 8, № 10. - P. 972. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00972. (WoS, Scopus) – Q1.

Раздел 5. Механизмы пластичности стволовых и прогениторных клеток в процессах регенерации различных структур нервной системы

5.1 Введение

5.1.1 В нервной системе взрослых млекопитающих и человека регенерация практически отсутствует. В настоящее время разрабатываются подходы, направленные на индукцию нейральных стволовых клеток (НСК), репрограммирование астроцитов и других ненейральных клеток, способных к конверсии, и нейротрансплантацию малодифференцированных клеток [1]. Из перечисления видно, что все типы клеток высокопластичны и, или находятся в не дифференцированном состоянии, или могут его приобретать. Так, в сетчатке глаза, обладающие высокой пластичностью клетки ретинального пигментного эпителия (РПЭ), играют ключевую роль в развитии многих заболеваний, приводящих к нарушению зрения и даже слепоте. Клеточные культуры РПЭ позволяют изучать факторы и сигнальные пути, координирующие клеточные и молекулярные механизмы клеточных взаимодействий в условиях патологии. В настоящем исследовании изучали регуляторное влияние оФРФ на сигнальные пути Wnt-, BMP- и Notch в неиммортилизованной культуре клеток РПЭ взрослого человека *in vitro*. Целью работы было определить внутриклеточные механизмы влияния оФРФ на регуляцию Wnt-, BMP- и Notch-сигнальных путей в клетках РПЭ взрослого человека *in vitro*. Методами морфометрии, иммуноцитохимии и РТ-ПЦР установлены механизмы понижения уровня дифференцировки клеток РПЭ взрослого человека на ранних сроках действия оФРФ, включающие: инактивацию Wnt/ β -катенин- и Notch-сигнальных путей, активацию неканонического Wnt/PCP-сигнального пути и модулирование BMP-сигналинга, что открывает пути для поиска молекул-регуляторов пластичности РПЭ при патологии.

Для решения проблем регенерации в мозге изучаются эффекты малодифференцированных нейральных клеток при их трансплантации во взрослый мозг грызунов. Особое место среди недифференцированных клеточных комплексов занимают нейральные органоиды - трехмерные конструкции нейронов и глии, выращенные из ИПСК *in vitro*, которые имеют сходство с микро мозгом по экспрессии генов, типам клеток и организации, однако у них короткий жизненный цикл из-за отсутствия кровоснабжения. Цель работы получение 3-D кортикальных органоидов *in vivo* в живом мозге, путем трансплантации малодифференцированных клеток в латеральный желудочек мозга взрослых мышей, где возможно возникновение сосудистых анастомозов и васкуляризация. В текущем году отработаны базовые подходы (подбор клеток и методы

трансплантации) для получения 3-D органоидов с целью изучения их васкуляризации, клеточной организации и связей.

5.1.2 Низкая регенеративная способность ЦНС является серьезным препятствием на пути к восстановлению нормального функционирования мозга при травмах и нейродегенеративных заболеваниях. Известно, что эмбриональный мозг имеет большую способность к регенерации. Одним из способов изучения закономерностей и механизмов регенерации в эмбриональном мозге является создание церебральных органоидов *in vitro*. Органоиды – это трехмерные комплексы нейронов и глии, выращенные *in vitro*, способные к самоорганизации и имеющие сходство с миниатюрным мозгом по экспрессии генов, типам клеток и цитоархитектонике [2]. На данный момент основная часть церебральных органоидов имитирует развитие неокортекса, также получены органоиды среднего мозга, гипоталамуса, мозжечка и других отделов [3]. Однако их жизненный цикл ограничивается коротким временным интервалом из-за отсутствия кровоснабжения. В настоящей работе отрабатываются методические подходы для получения 3-D кортикальных органоидов *in vivo* путем трансплантации недифференцированных клеток в латеральный желудочек мозга взрослых мышей с целью изучения их васкуляризации, клеточной организации и связей.

5.2 Материалы и методы

5.2.1 Культура клеток. Использовали неиммortalизованную клеточную линию РПЭ человека, выделенную из глазного яблока взрослого донора в возрасте 50 лет [4]. Для экспериментов использовали клетки РПЭ 4-ого пассажа, которые высаживали на поверхность культуральных флаконов для адгезивных культур T-25 Greiner CELLSTAR® (Greiner Bio-One GmbH, Германия) в концентрации 10^4 кл./см² и культивировали в течение 24, 48 и 72 ч. Для оценки действия оФРФ его добавляли в количестве 20 нг/мл в ростовую среду, состоящую из культуральной среды DMEM/F12 (1 : 1), L-глутамин (2 mM, Sigma-Aldrich, США), 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Pan Biotech, Германия) и 1% ЭТС (Gibco, США), культивировали клетки при 37°C и 5% CO₂. Контролем служили клетки, культивированные без оФРФ. В течение всего срока культивирования среду не меняли. Клетки фотографировали с помощью микроскопа Olympus (Япония) с цифровой камерой DP70 (Olympus, Япония).

Ранее нами выполнен морфометрический анализ для выявления различий клеток по размеру и форме [4]. В настоящей работе мы проанализировали размер ядер и ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО). Для этого в программе ImageJ1.51j8 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, США) на изображениях случайных полей зрения

(формат JPEG, размер изображения 1360 × 1024 пикселей), полученных при увеличении объектива микроскопа 20×, вручную с помощью мыши обводили каждую клетку, исключая двуядерные и те клетки, края которых соприкасались с границами изображения. Затем в тех же клетках обводили ядра. Для каждого срока культивирования анализировали от 30 до 60 клеток. Программа автоматически рассчитывала площади проекций клетки и ядра на подложке (далее площадь клетки и площадь ядра соответственно). Площади клетки и ядра были рассчитаны в пикселях без перевода в метрические единицы измерения, поскольку для анализа важны не абсолютные значения, а относительные. ЯЦО для каждой клетки каждого срока рассчитывали как отношение площади ядра к разнице между площадью клетки и площадью ядра. Статистическую обработку полученных показателей, вычисление средних значений, ошибки среднего и коэффициента детерминации (R^2 , достоверность аппроксимации) проводили с помощью программы Excel 2007 (Microsoft Corporation, США). Достоверность различий средних величин устанавливали с помощью *t*-критерия Стьюдента при уровне значимости $P < 0.05$.

Иммуноцитохимический (ИЦХ) анализ. Клетки высаживали на круглые покровные стекла (CellStar, Германия) в 24-луночные планшеты (Greiner Bio-One GmbH, Германия) в концентрации 10^4 кл./см² и культивировали в течение 24, 48 и 72 ч в отсутствие (контроль) или в присутствии оФРФ, после чего фиксировали в течение 15 мин 4%-ным параформальдегидом (Sigma-Aldrich). В работе использовали первичные антитела (Abcam, Великобритания) к BMP2 (ab14933, кроличьи, 1:150), BMP7 (ab54904, мышьиные, 1:150), β -катенину (ab32572, кроличьи, 1:200), и антитела Sigma-Aldrich к BMP4 (SAB2700755, кроличьи, 1:100), Wnt7a (HPA015719, кроличьи, 1:100), разведенные в 0.1%-ном растворе БСА (Sigma-Aldrich, США). Препараты экспериментальной и контрольной групп клеток РПЭ обрабатывали параллельно для последующего проведения сравнительного анализа. ИЦХ-анализ препаратов включал: блокировку неспецифического связывания 1%-ным БСА в течение 20 мин, инкубацию с первичными антителами при 4 °С в течение ночи, связывание первичных антител с соответствующими вторичными антителами, мечеными Alexa Fluor® 488 или 594 флуорохромами, (Molecular Probes, США) в течение 40 мин при комнатной температуре, заключение в среду с ядерным красителем DAPI (Vectashield®, Vector Laboratories, США). Фотографирование препаратов проводили с помощью микроскопа Olympus (Япония) с цифровой камерой DP70 Olympus (Япония). Интенсивность флуоресцентного сигнала и число клеток (ядер) оценивали с помощью программы ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, США) на цифровых изображениях препаратов (RGB, формат JPEG) с разрешением 1360 × 1024 пикселей. Для этого цветные изображения конвертировали в 8-битные,

преобразовывая, таким образом, их в полутоновые с оттенками серого цвета (значения яркости таких изображений варьируют в диапазоне значений от 0 до 255, где черные пиксели имеют значение 0, а белые – 255), далее для сегментирования областей свечения устанавливали порог (Threshold) с помощью автоматического регулятора Triangle и выбирали темный фон (Dark background). Затем для измерения суммы яркостей выделенных пикселей, характеризующих интенсивность флуоресценции, использовали величину Integrated Density. Для количественной оценки интенсивности флуоресценции по каждому маркеру анализировали не менее 300 клеток каждой группы для каждого срока, используя 7—20 микрофотографий независимых полей зрения, полученных при увеличении объектива микроскопа 20×. Статистическую обработку полученных показателей, вычисление средних значений и ошибки среднего проводили с помощью программы Excel 2007 (Microsoft Corporation, США). Для оценки статистической значимости различий между группами использовали *t*-критерий Стьюдента. Различия считали достоверными при уровне значимости $P < 0.05$.

Количественная ПЦР в реальном времени (кПЦР). Выделение тотальной РНК из культуры клеток проводили с TRI® Reagent (Sigma-Aldrich) в соответствии с инструкцией фирмы производителя. Для этого лизирующий раствор заливали во флаконы T25 через 24, 48 и 72 ч после посадки клеток РПЭ в среду с оФРФ или без него (контроль) и их фотографирования. Синтез кДНК проводили с помощью набора RevertAid H Minus Kit (Fermentas, Литва) в объеме 20 мкл, используя 1 мкг тотальной РНК, обработанной ДНКазой.

С помощью кПЦР оценивали изменения уровня экспрессии мРНК следующих генов, кодирующих транскрипционные факторы и сигнальные белки: CTNNB1, GSK3B (праймеры и зонды от ДНК-Синтез, Россия), NOTCH1, JAGGED1 (JAG1), HEY1, HES1, NOGGIN, BMP2, BMP4, BMPR2 (Applied Biosystems, США). В качестве эндогенного контроля использовали глицеральдегид-3фосфатдегидрогеназу (GAPDH) (праймеры и зонд от ДНК-Синтез, Россия). Смесь реагентов для кПЦР (25 мкл) включала в себя 2 мМ MgCl₂, 200 мкМ dNTPs, 1 ед Maxima HS Taq-полимеразы (Fermentas, Латвия), 5 мкл разведенной кДНК (эквивалентной 4 нг исходной тотальной РНК), 250 нМ праймеров и 250 нМ зонда (таблица 5.1). кПЦР проводили на приборе ABI Prism 7500 PCR system (Applied Biosystems, США). Программа для ПЦР включала: 1 цикл денатурации при 95°C 3 мин, 40 циклов денатурации при 95°C 15 с и совмещенный этап отжига-синтеза при 60°C 1 мин. Пороговый цикл определяли, приняв программное обеспечение 7500 Software v2.0.1 (Applied Biosystems, США).

Таблица 5.1 – Список праймеров для количественной ПЦР в реальном времени

Ген (номер по базе данных)	Последовательность праймеров прямого (F) и обратного (R); зонд или номер по каталогу	Размер ампликона, п.н.
<i>GAPDH</i> (NM_001289746)	F-5'-GAAGGT GAAGGTCGGAGTC-3' R-5'-GAAGATGGT GATGGGATTTTC-3' Зонд 5'-FAM-CCATCAATGACCCCTTCATTGACC-BHQ1-3'	220
<i>CTNNB1</i> (NM_001330729.1)	F – 5'-CCTCTGATAAAGGCTACTGTTGG-3' R – 5'-GCACGAACAAGCAACTGAACT-3' Зонд 5'-FAM-CGAAATCTTGCCCTTTGTCCCGC-BHQ1-3'	115
<i>GSK3B</i> (NM_001146156.1)	F – 5'-CAAATTAAGGCACATCCTTGGA-3' R – 5'-GCAGACGGCTACACAGTGCA-3' Зонд 5'-FAM-CTTCCGACCCCGAACTCCACC-BHQ1-3'	78
<i>JAG1</i> (NM_000214.2)	Hs01070032_m1	72
<i>NOTCH1</i> (NM_017617.3)	Hs01062014_m1	80
<i>HEY1</i> (NM_001040708.1, NM_012258.3)	Hs01114113_m1	82
<i>HES1</i> (NM_005524.3)	Hs00172878_m1	78
<i>NOGGIN</i> (NM_005450.4)	Hs00271352_s1	88
<i>BMP2</i> (NM_001200.2)	Hs00154192_m1	60
<i>BMP4</i> (NM_001202.3, NM_130850.2, NM_130851.2)	Hs00370078_m1	58
<i>BMPR2</i> (NM_001204.6)	Hs00176148_m1	69

Экспрессию каждой мРНК определяли постановкой ПЦР в двух повторах. Обработка данных qPCR включала в себя усреднение значений Ct для повторных точек в эксперименте и расчет значений относительной экспрессии исследуемых генов методом $\Delta\Delta Ct$ для каждого образца с использованием значения Ct по гену GAPDH в качестве нормирующего. Результаты представлены как средние значения и их ошибка. Для оценки статистической значимости различий между группами использовали t-критерий Стьюдента. Различия считали достоверными при уровне значимости $P < 0.05$.

5.2.2 Для получения датированной беременности, самок линии C57BL/6 ссаживали с самцом линии C57BL/6-Tg(АСТВ-EGFP)1Osb/J [5]. Жизнеспособным является только гетерозиготное потомство. У мышей этой линии ген GFP находится под промотером бета-актина. GFP синтезируется во всех тканях, за исключением волос и эритроцитов. Показано, что GFP не является токсичным для организма [5]. Самок для ссадки подбирали, основываясь на эстральном цикле. Для этого у самок брали вагинальный мазок и смотрели на клеточный состав. Если в мазке обнаруживались одни чешуйки (безъядерные и ороговевшие клетки), то самка находится на стадии эструса и подходила для ссадки с самцом. Утро на следующий день после ссадки принималось за Э0.5. Эмбрионы извлекали на сроках Э14.5 после цервикальной дислокации самки. В растворе Хэнкса (gibco®) выделяли сенсомоторную часть неокортекса. Выделенный неокортекс диссоциировали в растворе аккутазы (Sigma-Aldrich®) путем пипетирования с последующим центрифугированием для осаждения клеток. Затем отбирали супернатант и ресуспендировали осадок в растворе Хэнкса, после чего повторно центрифугировали, отбирали супернатант, добавляли раствор Хэнкса и снова ресуспендировали. Подсчет клеток проводили в камере Горяева. Для оценки жизнеспособности клеток использовали витальный краситель пропидий йодид (10 мкг/мл). Жизнеспособность клеток составляла 75-80%. Трансплантация проводилась из расчета 500 тыс. клеток в полутора микролитрах раствора Хэнкса на мышшь.

Все экспериментальные процедуры выполнялись в соответствии с требованиями комиссии ИБР РАН по биоэтике.

Для нейротрансплантации использовали взрослых 4-5 месячных самок мышей линии C57BL/6 (n=60) в качестве реципиентов. Животных наркотизировали хлоралгидратом (350 мг/кг) и помещали на стереотаксический столик. Готовили операционное поле. Бормашиной просверливали отверстие по координатам: от брегмы +0.5 мм, латерально 0.5 мм. Суспензию клеток вводили, используя микрошприц (Hamilton), в течение 3 минут, после чего иглу медленно вынимали. Затем рану ушивали. Иммуносупрессию животным не проводили.

По завершении эксперимента животных усыпляли высокой дозой хлоралгидрата через 30 суток после трансплантации. Проводили транскардиальную перфузию. Для этого кровеносную систему промывали 0.01М фосфатным буфером (PBS) через канюлю в течение 7 минут, затем 4% параформальдегидом на фосфатном буфере (0.01М, рН7.4) в течение 10 минут. Мозг извлекали и сутки хранили в растворе 4% параформальдегида на фосфатном буфере (0.01М, рН7.4). Затем мозг отмывали в 0.01М фосфатном буфере и переносили в криопротектор – 30% сахарозу на PBS. Фронтальные срезы мозга толщиной

40 мкм получали на микротоме с замораживающим столиком, после чего срезы монтировали на предметные стекла.

5.3 Результаты и обсуждение

5.3.1 Морфология клеток. Культуры клеток РПЭ 4-ого пассажа состояли из непигментированных и слабопигментированных полигональной формы эпителиоподобных и вытянутой формы фибробластоподобных клеток, что свидетельствует об их дедифференцировке *in vitro* (рисунок 5.1 а). После однократного воздействия оФРФ в клетках выявлялись морфологические отличия от контрольных клеток, которые имели место во всех временных точках. Значительную выраженность изменений культуры отмечали во временном интервале 48—72 ч, которая и заключалась в увеличении числа клеток вытянутой (фибробластоподобной) формы и формировании «рыхлых» колоний из хаотично расположенных клеток (рисунок 5.1 а).

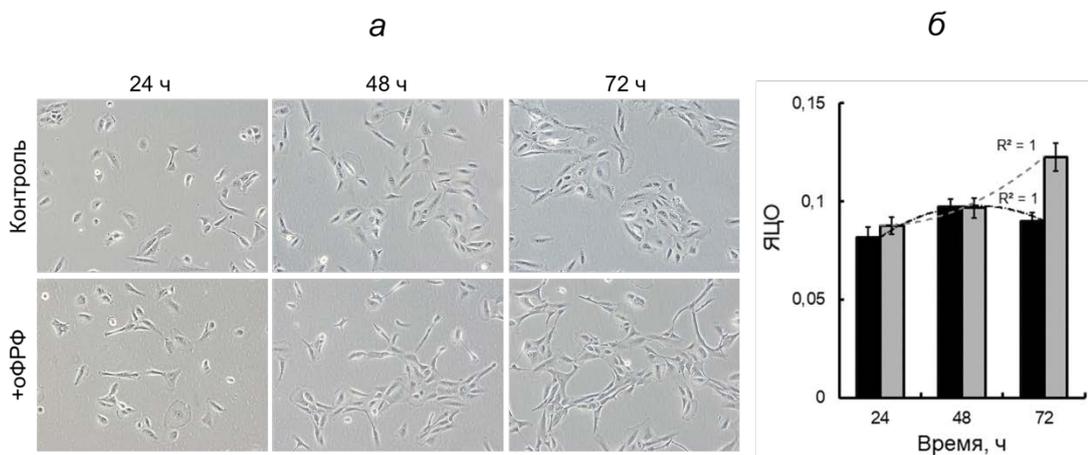


Рисунок 5.1 – Культура (а) и ядерно-цитоплазмическое отношение (ЯЦО, б) клеток ретинального пигментного эпителия (РПЭ) глаза взрослого человека в отсутствие (контроль) и в присутствии оФРФ через 24, 48 и 72 ч после начала его действия. Концентрация оФРФ 20 нг/мл. В течении всего срока культивирования среду не меняли, а – фазовый контраст, об.: 10^x . б: черные столбики – контроль, светлые столбики – оФРФ; вертикальные отрезки – ошибки среднего; полиномиальный тип линии тренда второй степени в контроле (черная штриховая линия) и в присутствии оФРФ (светлая штриховая линия); коэффициент детерминации $R^2=1$

Результаты количественного анализа показали снижение средних значений площади и ядер клеток РПЭ по сравнению с контролем через 72 ч после воздействия оФРФ (таблица 5.2), что говорит в пользу появления клеток меньшего размера. Соотношение между площадью ядра и цитоплазмы в клетках РПЭ после воздействия оФРФ сдвигалось в сторону уменьшения части цитоплазмы (таблица 5.2) [6]. Коэффициент детерминации составил 100 % ($R^2 = 1$) в обеих группах, что свидетельствует о высокой достоверности аппроксимации и говорит о закономерной изменчивости

показателей (рисунок 5.1 б). Степень влияния времени культивирования на ЯЦО в клетках РПЭ после воздействия оФРФ значительная и имеет разное направление: в контрольной группе она направлена на уменьшение ЯЦО, а в экспериментальной – на увеличение.

Таблица 5.2 – Морфометрические показатели клеток ретинального пигментного эпителия

Группа	Время, ч	Площадь клеток, пиксели	Площадь ядер, пиксели	Соотношение ядра к цитоплазме
Контроль	24	28121.55 ± 1904.17	2125.05 ± 144.37	1:12
	48	23188.98 ± 1867.84	2059.34 ± 85.17	1:10
	72	26228.15 ± 1831.32	2167.24 ± 108.23	1:11
+оФРФ	24	24321.65 ± 2197.15	1960.81 ± 102.75	1:11
	48	22393.10 ± 2687.68	1972.39 ± 108.26	1:10
	72	12087.71 ± 1289.20 ^a	1320.11 ± 85.66 ^a	1:8

Для выявления влияния оФРФ на регуляцию Wnt-, Notch- и BMP-сигнальных путей в клетках РПЭ взрослого человека *in vitro* провели ИЦХ-анализ и кПЦР на их основные маркеры.

Анализ маркеров Wnt-сигналинга. Исследование с антителами к β-катенину, белку адгезионных контактов и центральному медиатору канонического Wnt-сигнального пути, показало снижение интенсивности окрашивания по цитоплазматической мембране и цитоплазме экспериментальных клеток РПЭ через 24, 48 (данные не приведены) и 72 ч (рисунок 5.2 а) после воздействия оФРФ по сравнению с контрольными клетками тех же сроков, что говорит об ослаблении межклеточной адгезии и объясняет появление «рыхлых» колоний. Количественная оценка относительной интенсивности флуоресцентного сигнала подтвердила визуальную оценку и показала, что интенсивность сигнала была значительно ниже на сроке 24 ч (рисунок 5.2 б) по сравнению с контролем, затем во временном интервале 48—72 ч отмечали ее некоторое увеличение, которое не достигало контрольных значений (рисунок 5.2 б), при этом она была значимо ниже на сроке 72 ч.

По данным кПЦР через 72 ч после воздействия оФРФ в клетках РПЭ отмечено снижение уровня мРНК *CTNNB1* (ген β-катенина) более чем в 1.5 раза и снижение уровня мРНК *GSK3B* (ген киназы гликогенсинтазы-3β, GSK3β) в 1.9 раза по сравнению с контролем (рисунок. 5.2, в).

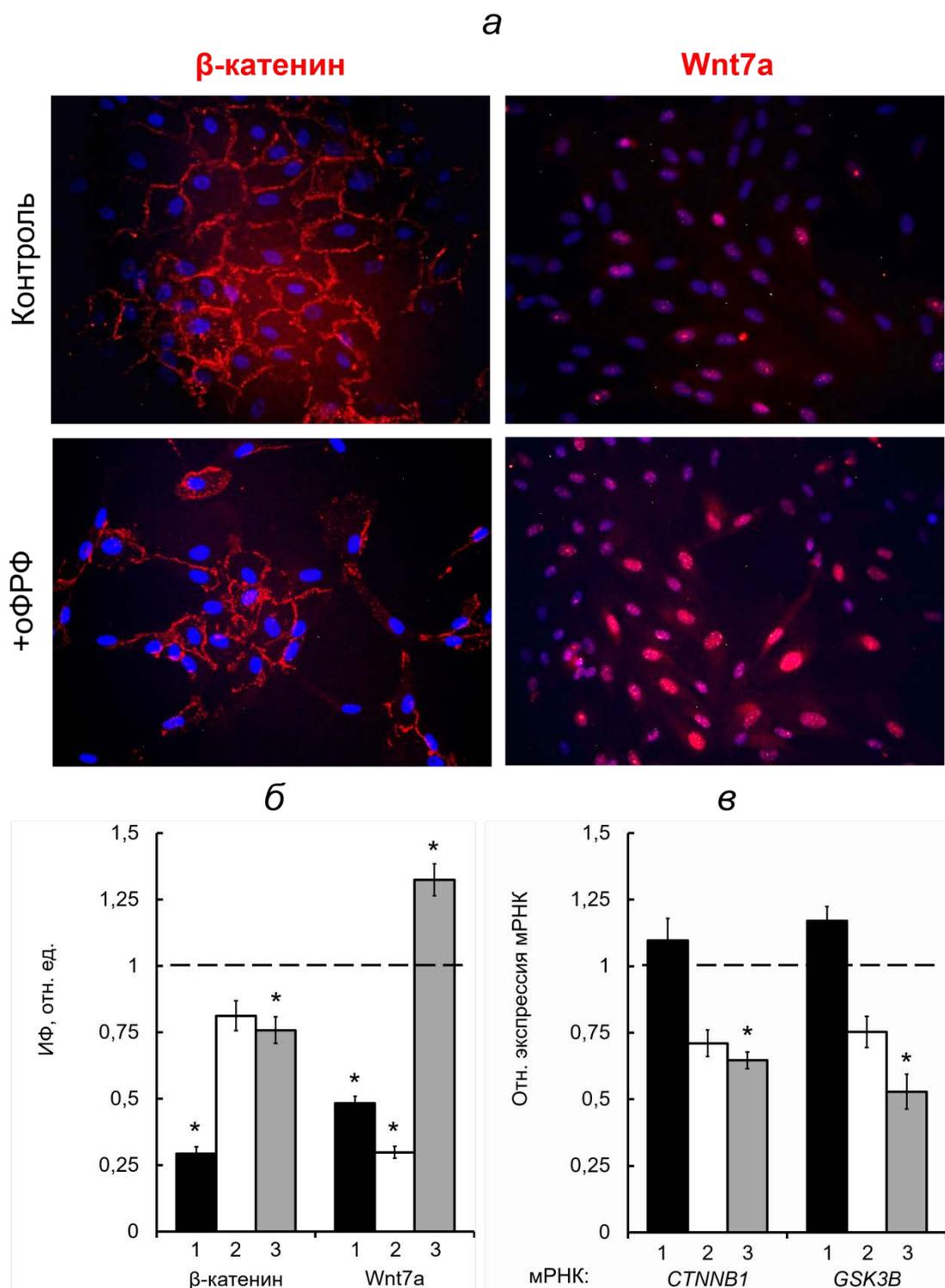


Рисунок 5.2 – Анализ маркеров Wnt-сигналинга в клетках РПЭ в контроле и после добавления в среду 20 нг/мл оФРФ. *а* – иммуно-флуоресценция клеток РПЭ, окрашенных на β-катенин и Wnt7a через 72 ч после введения оФДФ, об.;20^х ; *б* – интенсивность флуоресцентного сигнала (ИФ) на β-катенин и Wnt7a через 24 (столбец 1), 48 (2) и 72 (3) ч после добавления в среду оФРФ; *в* – экспрессия мРНК генов *CTNNB1* и *GSK3B*, участников канонического сигнального пути Wnt/β-катенин, в те же сроки после добавления в среду оФРФ. Здесь и на рисунках 6.3 и 6.4: изменения ИФ (*б*) и экспрессии (*в*) показаны относительно контрольных клеток РПЭ (в отсутствии оФРФ) на тех же сроках культивирования; вертикальные отрезки – ошибки среднего; различия в исследуемых образцах РПЭ по сравнению с контролем считали значимыми по t-критерию Стьюдента при *P < 0.05

Известно, что неканонический Wnt/PCP-сигнальный путь задействован в обеспечении и поддержании планарной клеточной полярности, он стимулируется под действием лигандов Wnt7a и Wnt11 [7]. В клетках РПЭ Wnt7a имел околядерную цитоплазматическую локализацию. После воздействия оФРФ отмечено ослабление интенсивности свечения на Wnt7a во временном интервале 24—48 ч с последующим усилением интенсивности окрашивания на сроке 72 ч (рисунок 5.2, а, б) по сравнению с контролем (рисунок 5.2, а, б).

Анализ BMP-сигнального пути. ИЦХ-исследование клеток РПЭ с антителами к костным морфогенетическим белкам BMP2, BMP4 и BMP7 показало, что все эти белки детектируются в цитоплазме контрольных клеток на всех сроках культивирования. На рисунке 5.3, а представлены данные окрашивания соответственно на BMP2, BMP4 и BMP7 контрольных клеток на сроке 72 ч.

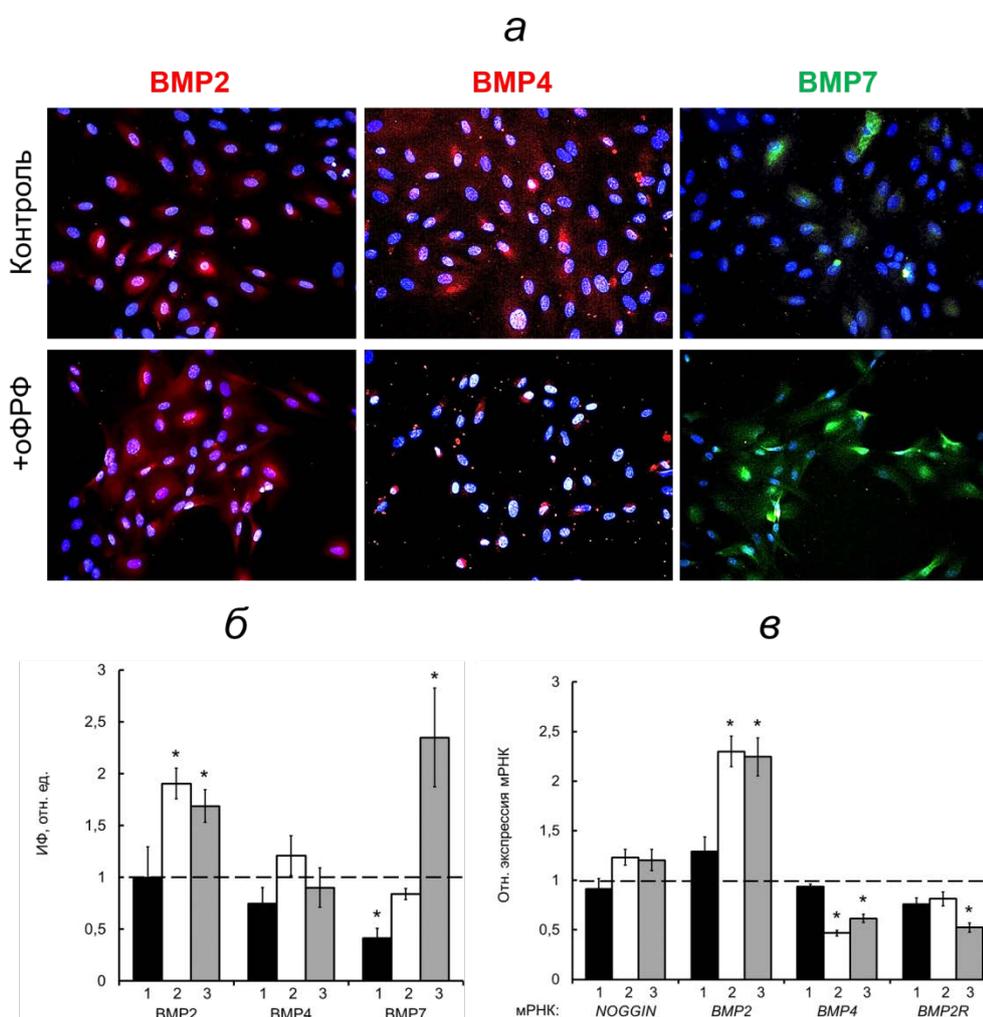


Рисунок 5.3 – Анализ маркеров BMP-сигнального пути в клетках РПЭ в контроле и после добавления в среду 20 нг/мл оФРФ, а – Иммунофлуоресценция клеток РПЭ, окрашенных на BMP2, BMP4 и BMP7 через 72 ч после введения оФРФ, об.: 20^x; б – интенсивность флуоресцентного сигнала (ИФ) на BMP2, BMP4 и BMP7 через 24 (столбец 1), 48 (2) и 72 (3) после добавления в среду оФРФ; в – экспрессия мРНК генов *NOGGIN*, *BMP2*, *BMP4*, и *BMP2R* в те же сроки после добавления в среду оФРФ

Количественная оценка относительной интенсивности флуоресцентного сигнала антител к белкам семейства BMP в экспериментальной группе в целом подтвердила визуальную оценку и показала, что под действием оФРФ интенсивность свечения антител к BMP2 была значительно выше по сравнению с контролем в промежутке 48–72 ч (рисунок 5.3, б), тогда как интенсивность сигнала на BMP4 не изменялась (рисунок 5.3, б). При этом отмечали изменение локализации BMP4 на околядерную (рисунок 5.3, а). Относительная интенсивность флуоресцентного сигнала антител к BMP7 была ниже на сроке 24 ч (рисунок 5.3, б), затем она увеличивалась и через 72 ч была выше (рисунок 5.3, б) по сравнению с контрольными клетками.

По данным кПЦР через 48 ч после воздействия оФРФ в клетках РПЭ отмечено увеличение уровня мРНК *BMP2* в 2.3 раза и снижение уровня мРНК *BMP4* в 2 раза по сравнению с контролем (рисунок 5.3, в). Через 72 ч тенденция изменения экспрессии мРНК указанных генов сохранялась: наблюдали увеличение мРНК *BMP2* в 2.2 раза и снижение уровня мРНК *BMP4* в 1.6 раза по сравнению с контролем (рисунок 5.3, в). Кроме того, в этот временной интервал отмечено снижение уровня мРНК *BMP2* в 1.9 раза (рисунок 5.3, в). Стоит отметить, что уровень экспрессии мРНК *NOGGIN*, кодирующего белок-антагонист лигандов BMP, не изменялся на всех сроках культивирования (рисунок 5.3, в).

Анализ экспрессии генов Notch сигнального пути. По данным кПЦР через 24 ч после воздействия оФРФ в клетках РПЭ отмечено снижение уровня экспрессии мРНК *NOTCH1*, рецептора Notch сигнального пути, в 1.6 раза (рисунок 5.4).

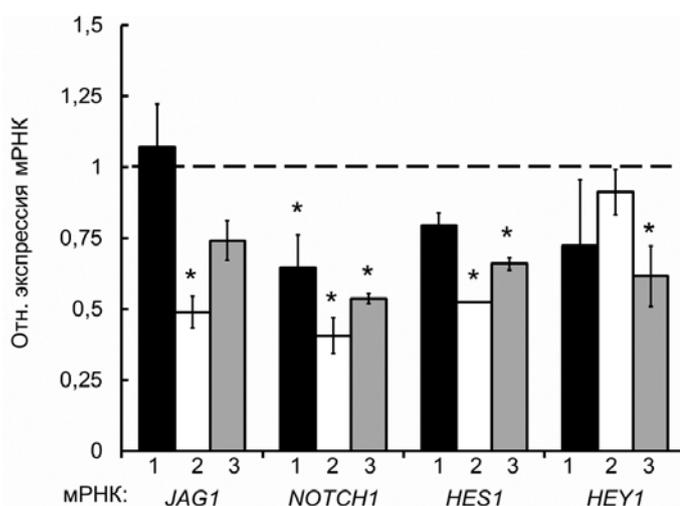


Рисунок 5.4 – Экспрессия мРНК генов Notch-сигнального пути в клетках РПЭ через 24 (1), 48 (2) и 72 (3) ч после добавления в среду оФРФ

Через 48 ч наблюдали снижение уровней мРНК лиганда *JAG1* в 2 раза, *NOTCH1* – в 2.5 раза и целевого гена *HES1* (репрессора транскрипции) – в 1.9 раза (рисунок 5.4). Через

72 ч снижались уровни мРНК рецептора *NOTCH1* в 1.9 раза и целевых генов *HES1* и *HEY1* соответственно 1.5 и 1.6 раза (рисунок 5.4).

В обсуждении следует отметить, что ФРФ- и Wnt-сигнальные пути пересекаются в различных клеточных процессах, протекающих в ходе эмбриогенеза, нейрогенеза, карциногенеза. Сигналы ФРФ передаются по трем сигнальным путям: PI3K/AKT, MAPK/ERK и PLC γ , а сигналы Wnt – по каноническому и неканоническим путям. Внутриклеточная серинтреониновая киназа GSK3 β является ключевым компонентом регуляции ФРФ-зависимого PI3K/AKT- и канонического Wnt-сигнальных путей [8]. Активация ФРФ-сигнального пути приводит к фосфорилированию β -катенина. Хотя точный механизм фосфорилирования β -катенина с помощью передачи сигналов ФРФ остается неясным, известно, что через PI3K/AKT-сигнальный путь происходит подавление E-кадгерина, что в свою очередь приводит к высвобождению β -катенина из комплекса E-кадгерин-- β -катенин-- α -катенин. Далее GSK3 β в комплексе с белками APC—аксин—казеинкиназа I связывает и фосфорилирует β -катенин, что приводит впоследствии к его утилизации при помощи убиквитин-протеасом [9,10]. Благодаря этому механизму в отсутствие Wnt-стимуляции цитоплазматическая концентрация β -катенина поддерживается на низком уровне. В связи с этим наблюдаемое нами через 24 ч после воздействия оФРФ резкое снижение концентрации β -катенина в клетках РПЭ при отсутствии его ядерной локализации и сохранение экспрессии мРНК гена *CTNNB1* свидетельствуют о деградации белка. Об отсутствии транслокации в ядро говорит и снижение пролиферативной активности клеток РПЭ, поскольку для активации транскрипции генов, чьи продукты участвуют в процессах деления, необходимо взаимодействие β -катенина с транскрипционными факторами (TCF/LEF) [11]. Снижение цитоплазматического окрашивания на β -катенин на сроке 24 ч после воздействия оФРФ согласуется со снижением окрашивания клеток на Wnt7a на этом же сроке, что поддерживается данными об участии Wnt7a в петле положительной обратной связи с экспрессией E-кадгерина. Так, в ряде работ [12, 13] показано, что потеря Wnt7a в клетках рака легкого приводит к снижению экспрессии E-кадгерина, к переключению экспрессии на N-кадгерин и развитию ЭМП.

Далее во временном интервале 48–72 ч после воздействия оФРФ мы наблюдали в клетках некоторое увеличение концентрации β -катенина по сравнению с временной точкой 24 ч, но не достигавшее контрольного значения. Значимое снижение интенсивности свечения антител к β -катенину при одновременном снижении экспрессии мРНК *CTNNB1* по сравнению с контролем на сроке 72 ч свидетельствует уже об изменении транскрипционной регуляции синтеза мРНК β -катенина. На этом же сроке

после воздействия оФРФ отмечали усиление интенсивности окрашивания на Wnt7a, которое было выше, чем в контроле. Данные согласуются с работами из литературы [12, 13], в которых физиологические уровни Wnt7a положительно регулируют экспрессию E-кадгерина в клетках через усиление экспрессии β -катенина. Ранее нами на клеточных культурах РПЭ человека показано, что добавление в среду культивирования рекомбинантного белка человека Wnt7a приводило к кратковременному (до 24 ч) усилению экспрессии клетками E-кадгерина и β -катенина [14]. В то же время следует отметить, что хотя Wnt7a и усиливает экспрессию β -катенина в клетках, передачу сигнала он осуществляет не через путь β -катенина. Как уже было отмечено выше, Wnt7a является лигандом неканонического Wnt/PCP-сигнального пути, который контролирует активность малых ГТФ-аз Rac и Rho [15]. Rac-зависимый сигнальный каскад связан с индукцией киназной активности JNK, а Rho-зависимая ветвь сигнального каскада – с активацией Rho-ассоциированной киназы ROCK. Путь клеточной поляризации вовлечен в регуляцию процесса модификации структур актинового цитоскелета, благодаря чему оказывает значительное влияние на поляризацию и подвижность клеток [15]. С данным утверждением согласуется выявленное нами во временном промежутке 48—96 ч повышение средних значений коэффициентов поляризации (вытянутости) клеток [4].

На сроке 72 ч после воздействия оФРФ по сравнению с контролем отмечено значимое снижение экспрессии мРНК *GSK3B*. Мультифункциональная киназа *GSK3 β* регулирует многие разнообразные клеточные процессы, включая пролиферацию, дифференцировку и апоптоз. Ее активность регулируется сериновым (ингибирующим) и тирозиновым (стимулирующим) фосфорилированием. *GSK3 β* регулирует активность многих разнообразных белков, включая метаболические и цитоскелетные белки, факторы трансдукции и транскрипции, и сама в свою очередь зависит от большого количества внеклеточных стимулов [16]. *GSK3 β* наиболее известна в качестве негативного регулятора канонического Wnt- и ФРФ-зависимого PI3K/AKT-сигнальных путей. На экспериментальной модели травматической пролиферативной витреоретинопатии, вызванной у кроликов с помощью интравитреальных инъекций клеток ARPE-19, показано подавление в сетчатке экспрессии *GSK3 β* и активирование канонического Wnt- и PI3K/AKT- сигнальных путей, что способствовало последующей пролиферации фибробластов, метаболическим изменениям, синтезу коллагена и развитию ЭМП [17]. Показано, что через 48 ч после воздействия инсулиноподобного фактора роста в клетках ARPE-19 снижалась транскрипция и трансляция β -катенина и *GSK3 β* с одновременным увеличением циклина D1 и пролиферации клеток, что авторы связывают с транслокацией β -катенина в ядра клеток и говорят об активации канонического Wnt-сигнального пути. В

связи со сказанным, в нашем исследовании наблюдаемые через 72 ч после воздействия оФРФ снижение экспрессии мРНК *GSK3B* и *CTNNB1* и ослабление интенсивности флуоресцентного сигнала на β -катенин также можно связать с активацией канонического Wnt-сигнального пути на данном сроке. В пользу последнего утверждения говорят увеличение экспрессии генов-маркеров плюрипотентности (*KLF4*, *OCT4*, *NANOG*) на сроке 72—120 ч и пролиферативной активности клеток РПЭ (120 ч) [4].

Известно, что в контроле и координации роста, размера и деления клеток, а также их количества участвуют различные сигнальные пути, в том числе Wnt-сигнальный путь [11] и такие оФРФ-опосредованные сигнальные каскады, как PI3K/AKT и MAPK/ERK [18]. В настоящей работе в клетках РПЭ через 72 ч после воздействия оФРФ выявлено снижение средних значений площади ядер клеток по сравнению с контролем, что дополнительно к ранее выявленному снижению средних значений площади клеток говорит в пользу появления клеток меньшего размера. Кроме того, расчет соотношения между площадью ядра и цитоплазмы в клетках РПЭ после воздействия оФРФ выявил сдвиг в сторону значимого уменьшения части цитоплазмы по сравнению с контролем, где, наоборот, наблюдали ее увеличение. Известно, что маленький размер клеток коррелирует со стволовостью и, наоборот, увеличение размера клеток положительно коррелирует с дифференцированным фенотипом [18]. Полученные данные вместе с ранее выявленными различиями размера и формы клеток, а также с результатами об увеличении количества клеток РПЭ на сроке 120 ч под действием оФРФ [4] говорит об отложенном действии фактора на пролиферативную активность клеток.

Канонический Wnt-сигнальный путь вовлечен в регуляцию не только пролиферации, но и дифференцировки, а также в поддержание популяции СК. Воздействие оФРФ в высокой дозе (100 нг/мл) на СК, изолированные из пульпы выпавших молочных зубов человека, способствовало через активацию сигналов ERK1/2 снижению в клетках экспрессии β -катенина, что приводило к подавлению их дифференцировки. В другой работе [19] на клональных линиях эмбриональных СК (ЭСК) человека с интегрированным репортером TCF-GFP с использованием активатора и ингибитора канонического Wnt-сигнального пути продемонстрировано разнообразие клеток по эндогенной активности Wnt-сигналинга, уровень которой в отдельных клетках коррелировал с различиями клоногенного потенциала и склонности к дифференцировке. Так, ЭСК с высоким уровнем активности Wnt при дифференцировке преимущественно образовывали эндо- и мезодермальные клетки, тогда как ЭСК с низким уровнем – в первую очередь нейроэктодермальные клетки. Результаты этих авторов согласуются с данными работ, в которых инактивирование канонического Wnt-сигналинга или

активирование MAPK/ERK-сигнального пути приводило к де- и трансдифференцировке РПЭ в нейральную сетчатку. Так, блокада Wnt/ β -катенин сигнального пути у генетически модифицированных мышей приводила к трансдифференцировке клеток РПЭ в клетки нейральной сетчатки, что подтверждалось снижением РПЭ-специфичных маркеров (в частности, *Mitf* и *Otx2*) и эктопической экспрессией маркеров, специфичных для нейральной сетчатки (*Chx10* и *Rx*) [20].

Таким образом, наши исследования свидетельствуют об инактивации сигнального пути Wnt/ β -катенин на ранних сроках (24—72 ч) действия оФРФ, что приводит к подавлению пролиферации и понижению дифференцировочного статуса клеток РПЭ взрослого человека, и об активации его на более поздних сроках (72—120 ч), что ведет к усилению пролиферации малодифференцированных клеток.

Сигналы TGF β /BMP передаются по каноническому (Smad-зависимому) и неканоническим – MAPK/ERK и Jagged/Notch-опосредованным путям. Таким образом, BMP- и ФРФ-сигнальные пути имеют общее влияние на клеточные процессы через MAPK/ERK-сигнальный путь [21]. Известно, что белки семейства BMP, в первую очередь BMP4 и BMP7, определяют раннюю специализацию клеток РПЭ из нейроэпителия. Увеличение окрашивания на BMP7 на сроке 72 ч в нашем исследовании может свидетельствовать об его участии в поляризации клеток, поскольку существуют работы, демонстрирующие участие BMP7 в этом процессе. Так, BMP7 способствует ингибированию ЭМП, что проявляется восстановлением эпителиального фенотипа клеток и увеличением экспрессии E-кадгерина [14].

Добавление экзогенных BMP2 и BMP4 подавляло пролиферацию клеток ARPE-19, играя роль негативных регуляторов роста [22]. Кроме того вырабатываемый фидерными клетками BMP4 участвовал в подавлении активности внеклеточной рецепторной киназы ERK и p38 MAPK ЭСК мышей, что способствовало поддержанию клеток в плюрипотентном состоянии. В нашей работе увеличение экспрессии мРНК *BMP2* под воздействием оФРФ может свидетельствовать об участии эндогенного BMP2 в подавлении пролиферации клеток РПЭ. Об этом же свидетельствуют данные полученные нами ранее, когда увеличение экспрессии мРНК *BMP2* сопровождалось снижением пролиферативной активности клеток РПЭ через 24 ч после добавление в среду культивирования рекомбинантного белка человека Wnt7a [23]. Подавление экспрессии мРНК *BMP4* может свидетельствовать о понижении уровня дифференцировки клеток РПЭ в сторону нейроэпителия.

Таким образом, оФРФ модулирует экспрессию белков семейства BMP, в результате чего происходит подавление пролиферации, понижение уровня дифференцировки и поляризация клеток РПЭ на ранних сроках.

Роль Notch-сигнального пути в ЭМП клеток РПЭ, в отличие от других тканей, исследуется не так давно. Блокирование Notch-сигнального пути в клетках ARPE-19 нокаутом по Notch1 существенно подавляло экспрессию гена-мишени *HES1*, что сопровождалось ингибированием миграции и пролиферации клеток [24]. Похожее действие на клетки ARPE-19 и РПЭ, полученные из индуцированных плюрипотентных клеток, вызывал трихостатин А (ингибитор гистоновой деацетилазы HDAC), он блокировал все три ветви TGF β -сигнального пути, подавляя пролиферацию клеток и ЭМП.

Известно, что Notch-сигнальный путь перекрестно взаимодействует с Wnt-сигнальным путем. Так, активация канонического Wnt-сигнального пути в гематопозитических СК приводила к индукции роста *in vitro* и восстановлению их *in vivo*, что сопровождалось повышением экспрессии гена *Notch1*. Установлено, что общим регулятором этих сигнальных путей является киназа GSK3 β . Однако остается неясным, как последняя контролирует активность Notch1 [25]. В нашем исследовании на культуре клеток РПЭ человека снижение экспрессии мРНК генов Notch сигнального пути (*JAG1*, *NOTCH1*, *HES1* и *HEY1*) наблюдалось во временном промежутке 24—72 ч, при этом на сроке 24—48 ч экспрессия мРНК *GSK3B* не изменялась по сравнению с контролем, снижение же уровня мРНК *GSK3B* отмечалось лишь через 72 ч после воздействия фактора. Учитывая выше сказанное, наши данные свидетельствуют в пользу утверждения об отрицательной регуляции киназой GSK3 β сигналов Notch, что требует дальнейшего подтверждения на более поздних сроках наблюдения.

Таким образом, опираясь на полученные результаты и данные литературы, можно предположить, что снижению экспрессии генов Notch сигнального пути в клетках РПЭ человека на ранних сроках связано с инактивацией канонического Wnt-сигналинга в результате воздействия оФРФ.

5.3.2 Отработывали введение клеток в полость бокового желудочка мозга взрослых мышей. Однако не во всех экспериментах трансплантированные клетки были обнаружены в полостях желудочков мозга. Единичные трансплантаты, обнаруженные нами на гистологических срезах показали следующее. Клетки в желудочке мозга формируют сферическую тканевую конструкцию, напоминающую кортикальный органоид. Через 30 суток в нем сформировалась ламинарная нейрональная структура. На периферии сферы был сформирован малоклеточный слой, напоминающий I слой коры, за ним располагался

четкий слой довольно крупных нейронов, далее, ближе к центру, слоистость не определялась (рисунок 5.5).

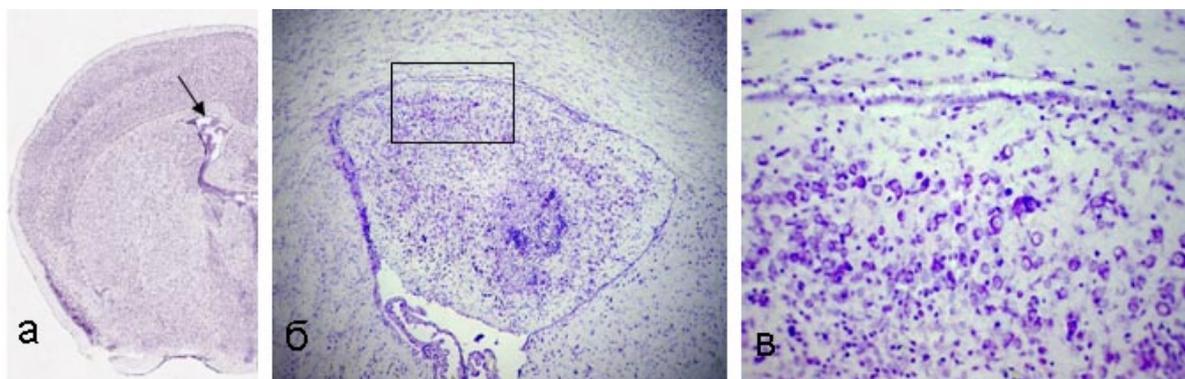


Рисунок 5.5 - Получение нейральных органоидов в латеральном желудочке мозга. а- срез мозга в области латерального желудочка - стрелка; б- развитие кортикального органоида из малодифференцированных эмбриональных клеток; в- выделенная область, видна ламинарная организация кортикального органоида (Крезилвиолет)

В центральной области органоида можно видеть отдельные зоны с некротическими клетками. По периферии органоид довольно плотно прилегает к эпендимной выстилке бокового желудочка, но не соприкасается с хороидом, что указывает на возможность васкуляризации непосредственно от вентрикулярной и субвентрикулярной зоны. Известно, что когда суспензию ткани среднего мозга Э14 крыс трансплантировали в латеральные желудочки мозга взрослых крыс, то через 3-12 недель трансплантаты плотно прилегали к паренхиме мозга реципиента, причем слой эпендимных клеток в этой области исчезал и граница становилась неразличимой. Авторы отмечают, что в центре трансплантата группируются нервные клетки, а по периферии слой астроцитов, а в целом организация трансплантата напоминала зрелый неокортекс [5].

Таким образом, предварительные эксперименты свидетельствуют, что стереотаксическая трансплантация позволяет получать сфероидные структуры в боковых желудочках мозга, однако требуется более тщательная методическая разработка для получения стабильных результатов.

5.4 Заключение

5.4.1 В заключение следует сказать, что однократное (кратковременное) воздействие оФРФ на дедифференцированные *in vitro* клетки РПЭ приводит к инактивации на ранних сроках сигнальных путей Wnt/ β -катенин и Notch, активации неканонического сигнального пути Wnt/PCP и модулированию BMP-сигналинга, что понижает уровень дифференцировки клеток. Полученные результаты уточняют внутриклеточные механизмы дедифференцировки клеток РПЭ под влиянием оФРФ [27].

5.4.2 Органоиды, полученные из ЭСК или индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека 5 (hiPSCs), представляют собой оригинальные модели клеточных культур для изучения механизмов развития и заболеваний [26]. Органоиды, разных моделей тканей (кишечные, печени, мозга, почки) удивительным образом повторяют развитие эпителиальных структур [28- 30]. Однако они остаются неполными и короткоживущими, так в них отсутствуют сосудистая сеть, стромальные компоненты и резидентные иммунные клетки. В отдельных работах кокультивируют МСК с церебральными органоидами *in vitro* для создания подобия сосудов [31], но не кровоснабжения. Мы полагаем, что полноценное обеспечение трофики сфероидов возможно только *in vivo* при непосредственном врастании капилляров из окружающей ткани. На данном этапе в исследовании отработывается метод трансплантации малодифференцированных эмбриональных нейральных клеток в латеральный желудочек мозга взрослых мышей для получения стабильных кортикальных сфероидов с целью изучения их васкуляризации и развития.

5.5 Список использованных источников

1. Григорян Э. Н., Маркитантова Ю.В., Авдонин П. П., Радугина Е. А. Исследование регенерации у амфибий в эпоху молекулярно-генетических подходов и методов // Генетика. - 2013. – Т. 49 (1). – С. 55 - 72. Grigoryan E.N., Markitantova Y. V., Avdonin P.P., Radugina E.A. Study of regeneration in amphibians in age of molecular-genetic approaches and methods. Russ // J. Genet. – 2013. – Vol. 49(1). – P. 46 – 62. Doi: 10.1134/S1022795413010043.
2. Lancaster M.A., Renner M., Martin C.A., Wenzel D., Bicknell L.S., Hurles M.E., Homfray T., Penninger J.M., Jackson A.P, Knoblich J.A. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly // Nature. - 2013. - Vol. 501, №7467. - P. 373 - 379.
3. Grenier K., Kao J., Diamandis P. Three-dimensional modeling of human neurodegeneration: brain organoids coming of age // Mol Psychiatry. – 2019. doi.org/10.1038/s41380-019-0500-7.
4. Кузнецова А. В., Куринов А. М., Ржанова Л. А., Александрова М. А. Механизмы дедифференцировки клеток ретинального пигментного эпителия глаза взрослого человека *in vitro*. Морфологический и молекулярно-генетический анализ // Цитология. – 2018. – Т. 60(12). – С. 996 – 1007. Kuznetsova A. V., Kurinov A. M., Rzhanova L. A. Aleksandrova M. A. Mechanisms of dedifferentiation of the adult human retinal pigment epithelial cells *in vitro*:

morphological and molecular-genetic analysis // *Tsitologiya*. – 2018. – Vol. 60(12). – P. 996 – 1007.

5. Oertel J., Samii M., Walter G.F. Fetal allogeneic dopaminergic cell suspension grafts in the ventricular system of the rat: Characterization of transplant morphology and graft-host interactions // *Acta Neuropathologica*. - 2004. - Vol. 107 (5). - P. 421 – 427.

6 Kuznetsova A.V., Kurinov A.M., Rzhanova L.A., Aleksandrova M.A. Mechanisms of Dedifferentiation of Adult Human Retinal Pigment Epithelial Cells in vitro. Morphological and Molecular Genetic Analysis // *Cell and Tissue Biology*. - 2019. - Vol. 13(2). - P. 107 - 119. DOI: 10.1134/S1990519X19020068.

7. Bikkavilli R. K., Avasarala S., Van Scoyk M., Arcaroli J., Brzezinski C., Zhang W., Edwards M. G., Rathinam M. K. K., Zhou T., Tauler J., Borowicz S., Lussier Y.A., Parr B.A., Cool C. D., Winn R. A. Wnt7a is a novel inducer of β -catenin-independent tumor-suppressive cellular senescence in lung cancer // *Oncogene*. – 2015. – Vol. 34. – P. 5317 – 5328. Doi: 10.1038/onc.2015.2.

8. Lee H. C., Lim S., Han J. Y. Wnt/ β -catenin signaling pathway activation is required for proliferation of chicken primordial germ cells in vitro // *Sci. Rep.* – 2016. – Vol. 6. – P. 34510. Doi: 10.1038/srep34510.

9. Исаева А. В., Зима А. П., Шабалова И. П., Рязанцева Н. В., Васильева О. А., Касоян К. Т., Саприна Т. В., Латыпова В. Н., Берёзкина И. С., Новицкий В. В. β -Катенин: структура, функции и роль в опухолевой трансформации эпителиальных клеток // *Вестник РАМН*. – 2015. – Т. 70 (4). – С. 475 - 483. Doi: 10.15690/vramn.v70.i4.1415. Isaeva A. V., Zima A. P., Shabalova I. P., Ryazantseva N. V., Vasil'eva O. A., Kasoayn K. T., Saprina T. V., Latypova V. N. Berezkina I. S., Novitskii V.V. 2015. β -Catenin: structure, function and role in malignant transformation of epithelial cells // *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk (Annals of the Russian Academy of Medical Sciences)*. – 2015. – Vol. 70 (4). – P. 475 - 483

10. Staal F.J.T. Wnt signalling meets epigenetics. // *Stem Cell Investig.* – 2016. – Vol. 3, - P. 38. Doi: 10.21037/sci.2016.08.01.

11. Cho I. H., Park S. J., Lee S. H., Nah S.K., Park H.Y., Yang J. Y., Madrakhimov S. B., Lyu J., Park T.K. The role of Wnt/ β -catenin signaling in the restoration of induced pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelium after laser photocoagulation // *Lasers Med Sci.* – 2019. - Vol. 34(3). - P. 571 - 581 Doi: 10.1007/s10103-018-2631-5.

12. Ohira T., Gemmill R.M., Ferguson K., Kusy S., Roche J., Brambilla E., Zeng C., Baron A., Bemis L., Erickson P., Wilder E., Rustgi A., Kitajewski J., Gabrielson E., Bremnes R., Franklin W., Drabkin H.A. WNT7a induces E-cadherin in lung cancer cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2003. – Vol. 100. – P. 10429 – 1034. Doi: 10.1073/pnas.1734137100.

13. Kim T.-H., Moon J.-Y., Kim S.-H., Paik S. S., Yoon H.J., Shin D. H., Park S. S., Sohn J. W. Clinical significance of aberrant Wnt7a promoter methylation in human non-small cell lung cancer in Koreans // *J. Korean Med. Sci.* – 2015. – Vol. 30. – P. 155 - 161. Doi: 10.3346/jkms.2015.30.2.155.
14. Кузнецова А. В., Куринов А. М., Ченцова Е. В., Макаров П. В., Александрова М. А. Влияние hrWnt7a на клетки ретинального пигментного эпителия человека *in vitro* // *Клет. техн. биол. мед.* – 2015. – Т. 2. – С. 78 – 84. Kuznetsova A. V., Kurinov A. M., Chentsova E.V., Makarov P. V., Aleksandrova M. A. Effect of hrWnt7a on human retinal pigment epithelial cells *in vitro* // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2015. – Vol. 159 (4). – P. 534 - 540.
15. Куликова К. В., Кибардин А. В., Гнучев Н. В., Георгиев Г. П., Ларин С. С. Сигнальный путь Wnt и его значение для развития меланомы // *Соврем. технол. мед.* – 2012. – Т. 3. – С. 107 – 112. Kulikova K. V., Kibardin A. V., Gnuchev N. V., Georgiev G. P., Larin S. S. 2012. Wnt signaling pathway and its significance for melanoma development // *Sovremennye Tehnologii v Medicine.* – 2012. – Vol. 3. – P. 107 – 112.
16. Medina M., Wandosell F. Deconstructing GSK-3: the fine regulation of its activity // *Int. J. Alzheimers. Dis.* – 2011. – P. 479249. Doi: 10.4061/2011/479249.
17. Zhang C., Su L., Huang L., Song Z.-Y. GSK3 β inhibits epithelial-mesenchymal transition via the Wnt/ β -catenin and PI3K/Akt pathways // *Int. J. Ophthalmol.* – 2018. – Vol. 11 (7). – P. 1120 – 1128. doi: 10.18240/ijo.2018.07.08.
18. Li Q., Rycaj K., Chen X., Tang D. G. Cancer stem cells and cell size: A causal link? *Semin // Cancer Biol.* – 2015. – Vol. 35. – P. 191 – 199. Doi: 10.1016/j.semcancer.2015.07.002
19. Blauwkamp T. A., Nigam S., Ardehali R., Weissman I. L., Nusse R. Endogenous Wnt signalling in human embryonic stem cells generates an equilibrium of distinct lineage-specified progenitors // *Nat. Commun.* – 2012. – Vol. 3. – P. 1070. Doi: 10.1038/ncomms2064.
20. Fujimura N., Taketo M. M., Mori M., Korinek V., Kozmik Z. Spatial and temporal regulation of Wnt/beta-catenin signaling is essential for development of the retinal pigment epithelium // *Dev. Biol.* – 2009. – Vol. 334. – P. 31 – 45. Doi: 10.1016/j.ydbio.2009.07.002.
21. Chen X., Xiao W., Wang W., Luo L., Ye S., Liu Y.. The complex interplay between ERK1/2, TGF β /Smad, and Jagged/Notch signaling pathways in the regulation of epithelial-mesenchymal transition in retinal pigment epithelium cells // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9 (5). – P. e96365. Doi: 10.1371/journal.pone.0096365.
22. Mathura J. R., Jafari N., Chang J. T., Hackett S. F., Wahlin K. J., Della N. G., Okamoto N., Zack D.J., Campochiaro P.A. Bone morphogenetic proteins-2 and -4: negative growth regulators in adult retinal pigmented epithelium // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2000. – Vol. 41. – P. 592 – 600.

23. Kuznetsova A. V., Aleksandrova M. A., Kurinov A. M., Chentsova E. V., Makarov P. V. Plasticity of adult human retinal pigment epithelial cells // *Int. J. Clin. Exp. Med.* – 2016. – Vol. 9. – P. 20892 – 20906.
24. Liu W., Jin G., Long C., Zhou X., Tang Y., Huang S., Kuang X., Wu L., Zhang Q., Shen H. Blockage of Notch signaling inhibits the migration and proliferation of retinal pigment epithelial cells // *Sci. World J.* – 2013. - P. 178708. Doi: 10.1155/2013/178708.
25. Zheng L., Conner S. D. Glycogen synthase kinase 3 β inhibition enhances Notch1 recycling. *Mol. Biol. Cell.* – 2018. – Vol. 29. – P. 389 – 395. Doi: 10.1091/mbc.E17-07-0474.
26. Lee C.T., Bendriem R.M., Wu W.W., Shen R.F. 3D brain Organoids derived from pluripotent stem cells: promising experimental models for brain development and neurodegenerative disorders // *J Biomed Sci.* - 2017. - Vol. 24(1). - P. - 59. doi: 10.1186/s12929-017-0362-8.
27. Kuznetsova A.V., Rzhanova L.A., Kurinov A.M., Aleksandrova M.A. Effect of basic fibroblast growth factor on signaling pathways in adult human retinal pigment epithelial cells // *Cell and Tissue Biology.* - 2019. - Vol. 13, № 4. - P. 292 - 304. DOI: 10.1134/S1990519X19040059 28.
28. Spence J.R., Mayhew C.N., Rankin S.A., Kuhar M.F., Vallance J.E., Tolle K., Hoskins E.E., Kalinichenko V.V., Wells S.I., Zorn A.M., Shroyer N.F., Wells J.M. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro // *Nature.* - 2011. - Vol. 470, № 7332. - P. 105 - 109.
29. Takebe T., Sekine K., Enomura M., Koike H., Kimura M., Ogaeri T., Zhang R.R., Ueno Y, Zheng Y.W., Koike N., Aoyama S., Adachi Y., Taniguchi H. Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant // *Nature.* - 2013. - Vol. 499, №7459. - P. 481 – 484.
30. Takasato M., Er P.X., Chiu H.S., Maier B., Baillie G.J., Ferguson C., Parton R.G., Wolvetang E.J., Roost M.S., Lopes S.M., Little M.H. Kidney organoids from human iPS cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis // *Nature.* - 2015. - Vol. 526, №7574. - P. 564 - 568.
31. Wörsdörfer P., Dalda N., Kern A., Krüger S., Wagner N., Kwok C.K., Henke E., Ergün S. Generation of complex human organoid models including vascular networks by incorporation of mesodermal progenitor cells // *Sci Rep.* – 2019. – Vol. 9. – P. 15663. doi: 10.1038/s41598-019-52204-7.

5.6 Отчетные публикации по разделу

1. Kuznetsova A.V., Kurinov A.M., Rzhanova L.A., Aleksandrova M.A. Mechanisms of Dedifferentiation of Adult Human Retinal Pigment Epithelial Cells in vitro. Morphological and Molecular Genetic Analysis // Cell and Tissue Biology. - 2019. - Vol. 13(2). - P. 107 - 119. DOI: 10.1134/S1990519X19020068.
2. Kuznetsova A.V., Rzhanova L.A., Kurinov A.M., Aleksandrova M.A. Effect of basic fibroblast growth factor on signaling pathways in adult human retinal pigment epithelial cells // Cell and Tissue Biology. 2019. - 2019. - Vol. 13, № 4. - P. 292 - 304. DOI: 10.1134/S1990519X19040059.

Раздел 6. Биогенез ядерных структур

6.1 Введение

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) инфицирует несколько типов клеток человека (Т-лимфоциты, макрофаги, астроциты), приводя к развитию синдрома приобретенного иммунодефицита человека (СПИД). Комбинированная антиретровирусная терапия (сART) позволяет сдерживать развитие вирусной инфекции однако на фоне проводимой терапии могут развиваться различные осложнения, включая развитие онкологических заболеваний [1]. Интересно, что у ВИЧ-инфицированных пациентов наблюдается повышенная частота встречаемости трех В-клеточных лимфом (лимфома Беркитта, лимфома Ходжкина и диффузная В-крупноклеточная лимфома) [2-4], хотя данные об инфицировании В-лимфоцитов в литературе отсутствуют. Было показано, что один из потенциальных механизмов онкогенеза у ВИЧ-инфицированных пациентов связан с действием Tat белка ВИЧ, который способен проникать в неинфицированные клетки [5-11]. Однако точный механизм действия Tat белка на неинфицированные клетки точно не установлен. Так, с использованием моделей *ex vivo* было показано, что Tat белок изменяет трехмерную организацию клеточного ядра, что может приводить к сближению определенных локусов, а как следствие, к появлению определенных мутаций [12]. Мутациям в В-лимфоцитах может способствовать вызываемая Tat активация AICDA, фермент, вовлеченный в индукцию двунитевых разрывов при созревании генов иммуноглобулинов [13]. Кроме того, так же *ex vivo* показано, что Tat белок вызывает продукцию активных форм кислорода, что также может вести к хромосомным aberrациям [14]. Однако все эти данные получены на переживающих В-лимфоцитах, полученных от доноров. Как следствие, все эти эффекты могут быть связаны с кратковременными эффектами Tat белка, которые могут компенсироваться, в той или иной, защитными степени клеточными реакциями. Поэтому для выяснения механизмов генезиса В-клеточных лимфом необходимо использовать и модели с длительным действием Tat белка на В-лимфоциты. Мы используем для этой цели клетки линии RPMI 8866, экспрессирующие Tat белок, слитый с EGFP.

Таким образом, целью работы было выяснение механизмов онкогенеза у ВИЧ-инфицированных пациентов. Для решения поставленной цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить влияние экспрессии Tat белка в культивируемых В-лимфоцитах на анафазное расхождение хромосом.

2. Оценить влияние экспрессии Tat белка на прохождение клеточного цикла культивируемыми В-лимфоцитами.

3. Оценить влияние экспрессии Tat белка на гибель культивируемых В-лимфоцитов.

4. Изучить влияние экспрессии Tat белка на рост культивируемых В-лимфоцитов на модели длительного культивирования клеточных линий.

6.2 Материалы и методы

В работе использовали клетки RPMI 8866, а также три линии, полученные из этой культуры (с экспрессией EGFP, Tat-EGFP и TatC22A-EGFP). Клетки культивировали в среде RPMI с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Gibco), пирувата, аланин-глутамин и смеси антибиотиков и антимикотика.

qRT-PCR

Образцы РНК были выделены с помощью набора для выделения РНК Rneasy mini kit (Qiagen). Эксперименты были выполнены в трех биологических повторностях. Концентрация и качество РНК были измерены на приборе спектрофотометре NanoPhotometer (Implen). ОТ-ПЦР в режиме “реального времени” проводился на приборе CFX-96 Touch Real-Time PCR Detection System (BioRad). Для постановки реакции обратной транскрипции был использован набор iScript cDNA Synthesis kit (BioRad) с режимом 460С 20 мин и 950С 1 мин, образцы были разведены водой в 5 раз и были амплифицированы с набором “Набор реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green I” (Синтол). Суммарный объем реакционной смеси 25 мкл (2.5 мкл 10х ПЦР буфера с Sybr-Green I, 2.5 mM MgCl₂, 2.5 mM dNTP, 0.5 мкл Taq-полимеразы, 10 pmol каждого праймера и 5 мкл кДНК разведенной в 5 раз). Режим амплификации: денатурация 95°C 3 мин и 40 циклов (95°C 10 сек, 62°C 15 сек, 72°C 30 сек). Для оценки экспрессии TAT-белка использовались праймеры (TAT1F 5`-CTAGACTAGAGCCCTGGAAGCA-3`; TAT1R 5`-TGAGGAGGTCTTCGTCGCT-3`). Каждый образец амплифицировали в трех повторностях. Нормализацию проводили с тремя референсными генами (UBC2_forward 5`- GTCGCAGCCGGGATTTGGGT-3`; UBC2_reverse 5`-GTCAGACAGGGTGCGCCCAT-3`;

YWHAZ_forward 5`-ACTTTTGGTACATTGTGGCTTCAA-3`;

YWHAZ_reverse 5`-CCGCCAGGACAAACCAGTAT-3`;

HPRT2_forward 5`-TGTAATGACCAGTCAACAGGGGACA-3`;

HPRT2_reverse 5`-TCCAACACTTCGTGGGGTCCT-3`).

Относительное количество кДНК рассчитывалось по методу Δ -C(t). $Q=2^{C(t)_{\min}-C(t)_n}$ где C(t)_n – среднее значение C(t) для каждого образца, C(t)_{min} – минимальное среднее значение для всей выборки. Нормализация уровня экспрессии TAT-белка проводилась используя геометрическое среднее значение трех референсных генов как фактора нормализации NF.

Для получения хромосомных препаратов клетки инкубировали с нокодазолом 4 часа, затем фиксировали в смеси спирта и уксусной кислоты (3:1). Хромосомные препараты готовили по стандартной методике и окрашивали либо красителем Гимзы, либо использовали для выявления хромосом 1, 2 и 4 с помощью хромосомных проб фирмы. Для фотографирования использовали систему автоматического фотографирования. Полученные фотографии анализировали визуально.

Для характеристики стадий клеточного цикла и определения доли subG1 клеток проводили прижизненное окрашивание красителем Хекст 33342. Для выявления апоптозов также использовали красители TMRE, аннексины и CellEvent (все производства Thermo, окрашивание по инструкции производителя). Проточную цитофлуориметрию проводили на FACSAria SOPR.

Статистическую обработку данных проводили с использованием критерия Манн-Уитни в программном пакете Prism (GraphPad).

6.3 Результаты и обсуждение

Для работы мы использовали данные анализа транскриптомов клеток, экспрессирующих Tat-EGFP, которые были предоставлены Е.В. Шевалем (НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ). Мы сосредоточились на группе генов, которые связаны с убиквитин-зависимым протеолизом (рисунок 6.1).

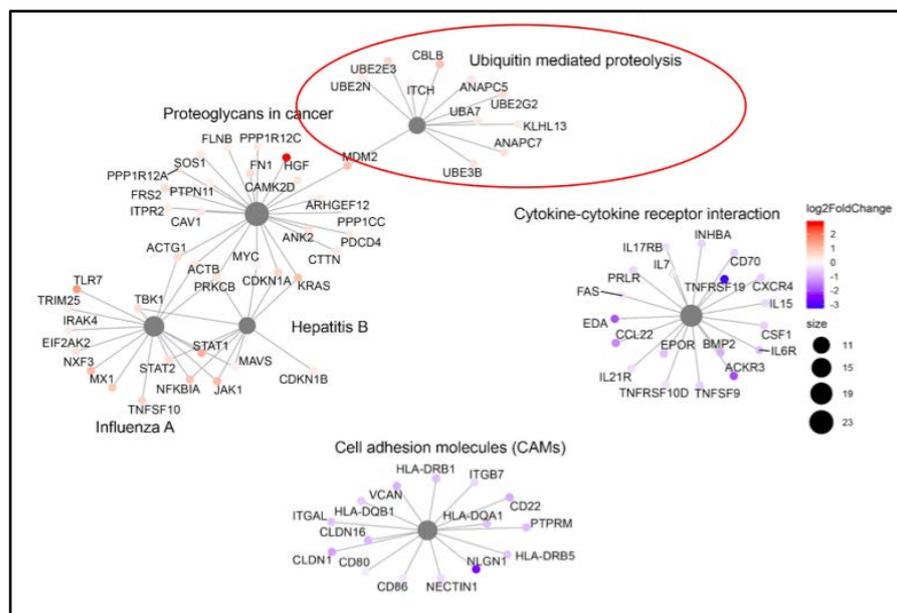


Рисунок 6.1 - Результаты анализа сигнальных путей (KEGG) в клетках, экспрессирующих Tat-EGFP (данные предоставлены Е.В. Шевалем). Красным кругом выделена группа генов, связанных с убиквитин-зависимым протеолизом

Мы обратили внимание на два гена - ANAPC5 и ANAPC7. Эти два гена кодируют субъединицы anaphase promoting complex/cyclosome (APC/C). Это E3 убиквитин лигаза, которая вовлечена в регуляцию прохождения митоза, в частности, в регуляцию анафазы. Можно было предположить, что изменения работы этого комплекса могут приводить к нарушениям расхождения хромосом, что, в свою очередь, будет вести в хромосомным aberrациям, а значит, к онкогенезу.

Прежде всего, с помощью qRT-PCR мы верифицировали данные RNA-seq для этих двух генов. Мы подтвердили, что экспрессия ANAPC5 и ANAPC7 была усилена в клетках с экспрессией Tat-EGFP (0.6 FC и 0.7 FC, соответственно). Далее мы использовали цитогенетический анализ для поиска аномалий расхождения хромосом в анафазе. Известно, что изредка в хромосомных препаратах встречаются хромосомные пластинки с преждевременно разошедшимися хроматидами. Такие пластинки были видны на препаратах, окрашенных по Гимзе, но особенно хорошо после выявления хромосом с помощью флуоресцентной *in situ* гибридизации (рисунок 6.2).

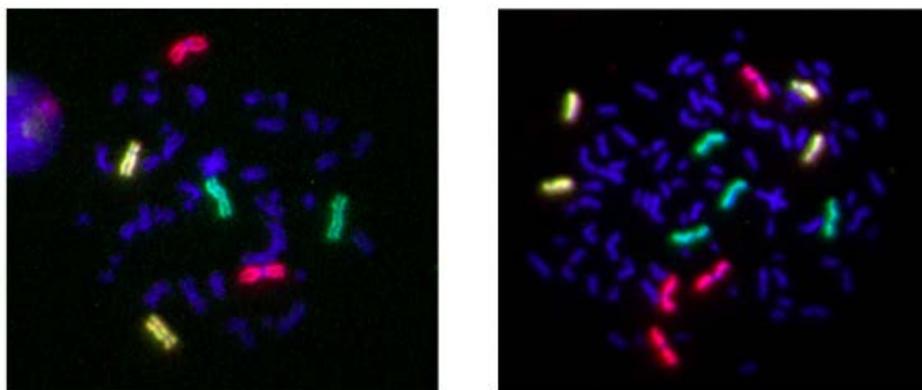
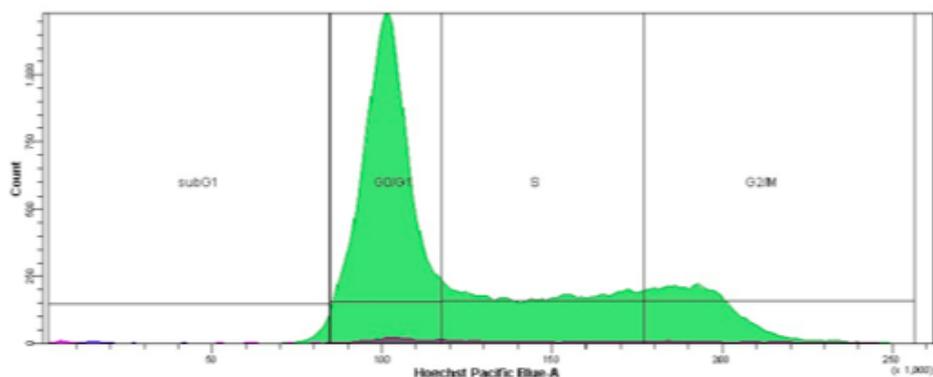


Рисунок 6.2 - Хромосомные пластинки с нормальными хромосомами (справа) и с преждевременно разошедшимися хромосомами (слева). В первом случае каждая из хромосом состоит из двух хроматид. В последнем случае число хромосом (хроматид) вдвое больше, чем в нормальной хромосомной пластинке. С помощью гибридизации выявлены три хромосомы (красная, зеленая и желтая окраска), остальные хромосомы окрашены DAPI (синяя окраска).

Мы проанализировали хромосомные пластинки из клеток (контрольные и экспрессирующие Tat-EGFP), которые росли после заморозки в течении 3-х месяцев. оказалось, что в культуре клеток экспрессирующих Tat-EGFP процент хромосомных пластинок с преждевременным расхождением хромосом был существенно выше, по сравнению с контрольной культурой (1,12% и 5,04 %, соответственно). После получения этих данных мы повторили эксперимент, результаты были сходными.

Таким образом, эти данные подтверждают, что происходит нарушения в анафазном расхождении хромосом, которые могут быть связаны с повышенной экспрессией ANAPC5 и ANAPC7 либо других ферментов, вовлеченных в протеолиз.

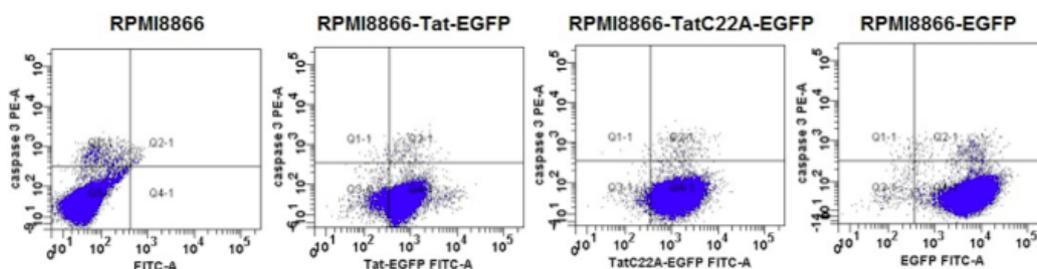
Следующей задачей, которая была поставлена в 2019 году, было изучение влияния экспрессии Tat белка на общее состояние клеток. Предыдущие работы показали, что Tat белок не оказывает сильного эффекта на прохождение клеточного цикла и на апоптоз. Прежде всего, мы повторили эти эксперименты с использованием переданных нам культур. Для измерения прохождения клеточного цикла мы проводили стандартный анализ долей клеток на разных стадиях клеточного цикла с использованием проточной цитофлуориметрии. Результаты представлены на рисунке 6.3, все отличия между культурами были статистически недостоверны.



	RPMI8866	Tat-EGFP	TatC22A-EGFP	EGFP
G0/G1	52.7±8.1	54.8±6.0	53.9±7.0	56.6±9.8
S	20.3±4.7	21.3±3.5	20.9±3.5	19.4±5.0
G2/M	18.2±4.8	16.4±4.0	16.3±4.8	17.7±5.4

Рисунок 6.3 - Пример кривой распределения клеток по количеству ДНК и пороги для выделения стадий клеточного цикла (G0/G1, S и G2/M) с помощью проточной цитофлуориметрии. Данные по результатам трех независимых экспериментов (среднее и стандартное отклонение) приведены в таблице. Все отличия были статистически недостоверны (критерий Манн-Уитни, $p > 0.05$)

Затем мы оценили долю апоптических клеток в тех же культурах. Мы использовали несколько методов оценки (доля клеток subG1, активация каспазы 3, аннексин, TMRE). Эти методы позволяют выявлять клетки на разных этапах апоптоза (например, TMRE оценивает падение митохондриального потенциала, т.е. одно из самых ранних событий, которое, по сути, предшествует апоптозу, а subG1 позволяет оценить число уже погибших клеток). Использование нескольких методов повышает надежность такого анализа. Данные приведены на рисунке 6.4.



Method	RPMI8866	Tat-EGFP	TatC22A-EGFP	EGFP
Caspase 3	4.14±1.60	4.13±0.96	5.53±2.15	4.20±0.80
AnV+PI-	2.9±0.62	2.68±0.84	1.7±1.24	3.6±1.99
AnV+PI+	5.43±1.43	4.07±1.95	6.3±0.82	5.75±0.83
TMRE	3.97±1.33	3.51±2.17	4.38±0.97	3.61±2.37
sub-G1	4.6±2.0	4.0±2.7	5.7±3.9	2.8±0.8

Рисунок 6.4. - Экспрессия Tat белка не влияет на уровень апоптозов в культуре. Вверху пример эксперимента с каспазой 3. Внизу - результаты измерений по трем независимым экспериментам для каждого из четырех использованных методов детекции апоптических клеток (среднее и стандартное отклонение). Все отличия были статистически недостоверны (критерий Манн-Уитни, $p > 0.05$).

Мы не наблюдали изменений в содержании апоптических клеток ни в одной из культур (все отличия были статистически недостоверны).

Таким образом, в культурах с которыми мы работали не наблюдалось каких-либо сильных изменений поведения клеток в плане пролиферации и их гибели. Однако нельзя было исключить, что Tat белок оказывает слабый эффект (или его эффект частично компенсируется клеткой). Для проверки этого эксперимента мы проанализировали процент клеток с экспрессией Tat-EGFP на протяжении длительного культивирования. Мы предполагали, что если Tat белок оказывает пусть и слабое воздействие, то постепенно он будет теряться из клеток (это спонтанный процесс), а затем постепенно клеток с потерей гена Tat-EGFP будут вытеснять исходные клетки из культуры. На рисунке 6.5 представлен один из двух поставленных экспериментов.

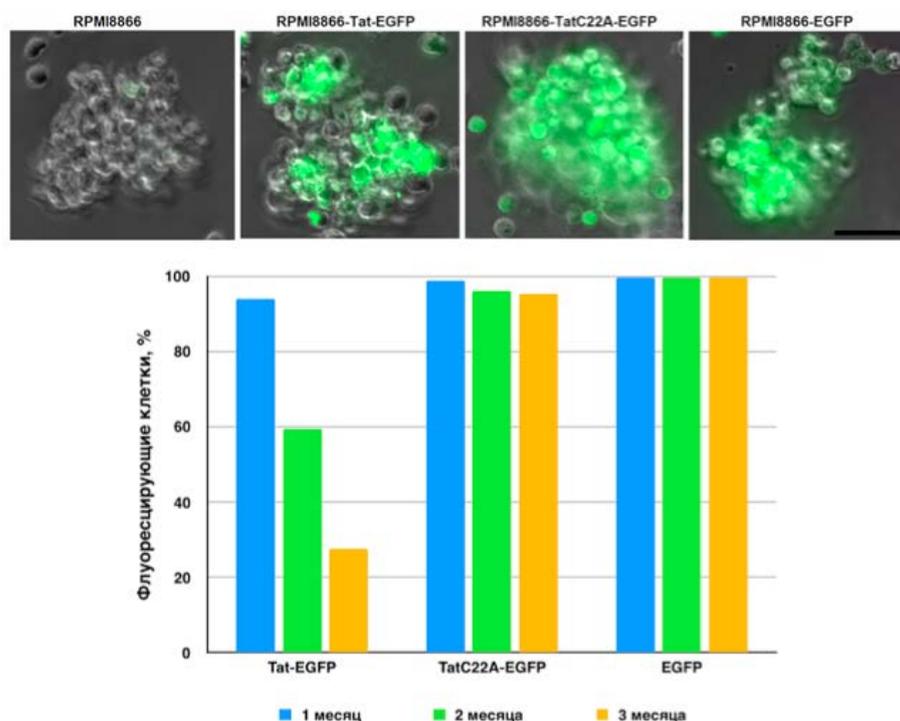


Рисунок 6.5 - Вытеснение клеток, экспрессирующих Tat-EGFP. Верхние панели - фотография клеток после 3-х месяцев культивирования. Видно, что в культуре с экспрессией Tat-EGFP происходит вытеснение флуоресцирующих клеток (наложение фазового контраста и флуоресценции EGFP). Нижняя панель - результат обсчета результатов экспериментов по данным проточной цитофлуориметрии. Наиболее интенсивная потеря наблюдается в случае Tat-EGFP, слабая - в случае экспрессии мутантной формы Tat-EGFP (C22A). При экспрессии EGFP вытеснение флуоресцирующих клеток не детектировалось

Данные работы показали, что только в культуре клеток, экспрессирующих Tat-EGFP происходит быстрое вытеснение исходных клеток. При экспрессии EGFP нам не удалось наблюдать даже слабого вытеснения за 3 месяца наблюдения. В качестве дополнительного контроля мы использовали клетки, которые экспрессировали мутантную форму Tat белка (замена C22A, приводящая к инактивации трансактиваторной активности Tat белка). Экспрессия этого мутанта не сопровождалась таким драматическим снижением процента флуоресцирующих клеток, как в случае немутантного Tat белка.

Сейчас у нас получены данные по двум независимым экспериментам. В настоящее время мы поставили третий эксперимент. Он доведен до 2-х месяцев, на этой точке данные совпадают с двумя первыми экспериментами. Мы планируем довести третий эксперимент до 6 месяцев. Кроме того, на сроке в 3 месяца, когда мы планируем отсортировать и раздельно проанализировать свойства клеток с экспрессией Tat белка и клеток, потерявших Tat белок. В частности, нас интересует наличие в клетках с потерей экспрессии Tat белка хромосом с преждевременным расхождением хроматид (т.е. восстановится ли нормальная картина).

Описанные выше результаты работы в 2019 году опубликованы в двух печатных работах [15, 16].

6.4 Заключение

Таким образом, проведенные в 2019 году исследования позволили выявить несколько новых деталей влияния Tat белка на культивируемые В-лимфоциты, причем, эти изменения могут иметь прямое отношение к развитию В-клеточных лимфом. Прежде всего, мы нашли способ экспериментальной проверки предположения, сделанного при анализе транскриптома клеток, экспрессирующих Tat-EGFP, а именно, то что в этих клетках может быть нарушено анафазное расхождение хроматид. Интересно, что данные о преждевременном расхождении хроматид были получены при анализе ВИЧ-инфицированных клеток [17, 18]. Преждевременное расхождение может приводить к появлению анеуплоидных клеток, поэтому этот эффект может иметь прямое отношение к онкогенезу.

Кроме того, мы показали, что клетки без экспрессии Tat белка способны вытеснять клетки с экспрессией Tat белка из культуры. Это говорит о том, что Tat белок влияет на функционирование клеток. При этом нам не удалось обнаружить какого-то яркого эффекта Tat белка на прохождение клеточного цикла и на апоптоз. Т.е. эффект был слабый. Но он может иметь значение, так как онкогенез протекает не быстро, именно такой слабый эффект и может вести к развитию лимфом.

6.5 Список использованных источников

1. Nunnari, G., Smith J.A., Daniel R. HIV-1 Tat and AIDS-associated cancer: targeting the cellular anti-cancer barrier? // *J Exp Clin Cancer Res.* – 2008. - Vol. 27(1). - P. 3.
2. Carbone A., Cesarman E., Spina M., Gloghini A., Schulz T.F. HIV-associated lymphomas and gamma-herpesviruses // *Blood.* – 2009. - Vol. 113(6). - P. 1213 - 24.

3. Grogg, K.L., Miller R.F., and Dogan A. HIV infection and lymphoma // *J Clin Pathol.* – 2007. - Vol. 60(12). - P. 1365 – 1372.
4. Gloghini, A., Dolcetti R., and Carbone A. Lymphomas occurring specifically in HIV-infected patients: from pathogenesis to pathology // *Semin. Cancer Biol.* - 2013. - Vol. 23. - P. 457 – 467.
5. Kundu R.K., Sangiorgi F., Wu L.Y., Pattengale P.K., Hinton D.R., Gill P.S., Maxson R. Expression of the human immunodeficiency virus-Tat gene in lymphoid tissues of transgenic mice is associated with B-cell reduction // *Blood.* – 1999. - Vol. 94(1). - P. 275 - 82.
6. Smith J.R., Henderson W.W., Rosenbaum J.T., Neuwelt E.A., Moses A.V. Cultured human endothelial cells expressing HIV-1 Vpu and Tat support the expansion of malignant B cells from primary central nervous system lymphoma // *Br J Ophthalmol.* - 2008. - Vol. 92(2). - P. 297 - 299.
7. Altavilla G., Trabanelli C., Merlin M., Caputo A., Lanfredi M., Barbanti-Brodano G., Corallini A. Morphological, histochemical, immunohistochemical, and ultrastructural characterization of tumors and dysplastic and non-neoplastic lesions arising in BK virus/tat transgenic mice // *Am J Pathol.* - 1999. - Vol. 154(4). - P. 1231 - 1244.
8. Corallini A., Altavilla G., Pozzi L., Bignozzi F., Negrini M., Rimessi P., Gualandi F., Barbanti-Brodano G. Systemic expression of HIV-1 tat gene in transgenic mice induces endothelial proliferation and tumors of different histotypes // *Cancer Res.* - 1993. - Vol. 53(22). - P. 5569 -5575.
9. Huynh D., Vincan E., Mantamadiotis T., Purcell D., Chan C.K., Ramsay R. Oncogenic properties of HIV-Tat in colorectal cancer cells // *Curr HIV Res.* - 2007. - Vol. 5 (4). - P. 403 - 409.
10. Altavilla G., Caputo A., Trabanelli C., Brocca Cofano E., Sabbioni S., Menegatti M.A., Barbanti-Brodano G., Corallini A. Prevalence of liver tumours in HIV-1 tat-transgenic mice treated with urethane. *Eur J Cancer.* - 2004. - Vol. 40 (2). - P. 275 - 283.
11. Vogel J., Hinrichs S.H., Napolitano L.A., Ngo L., Jay G. Liver cancer in transgenic mice carrying the human immunodeficiency virus tat gene // *Cancer Res.* - 1991 . - Vol. 51 (24). - P. 6686 - 90.
12. Germini D., Tsfasman T., Klibi M., El-Amine R., Pichugin A., Iarovaia O.V., Bilhou-Nabera C., Subra F., Bou Saada Y., Sukhanova A., Boutboul D., Raphaël M., Wiels J., Razin S.V., Bury-Moné S., Oksenhendler E., Lipinski M., Vassetzky Y.S. HIV Tat induces a prolonged MYC relocalization next to IGH in circulating B-cells // *Leukemia.* - 2017. - Vol. 31(11). - P. 2515 - 2522.

13. Sall F.B., El Amine R., Markozashvili D., Tsfasman T., Oksenhendler E., Lipinski M., Vassetzky Y., Germini D. HIV-1 Tat protein induces aberrant activation of AICDA in human B-lymphocytes from peripheral blood // *J Cell Physiol.* - 2019 Jan 31. doi: 10.1002/jcp.28219.
14. El-Amine R., Germini D., Zakharova V.V., Tsfasman T., Sheval E.V., Louzada R.A.N., Dupuy C., Bilhou-Nabera C., Hamade A., Najjar F., Oksenhendler E., Lipinski M., Chernyak B.V., Vassetzky Y.S. HIV-1 Tat protein induces DNA damage in human peripheral blood B-lymphocytes via mitochondrial ROS production // *Redox Biol.* - 2018 . - Vol. - P. 97 - 108.
15. Gorbacheva M., Valyaeva A., Potashnikova D., Arifulin E., Vassetzky Y., Musinova Y. HIV-1 Tat induces cell type-specific expression of host genes in B-cells // *FEBS OPEN BIO.* - 2019. - Vol. 9. - Is. 1. – P. 35-157. WOS:000486972406001. (WoS) – Q4.
16. Kurnaeva M.A., Sheval E.V., Musinova Y.R., Vassetzky Y.S. Tat basic domain: A "Swiss army knife" of HIV-1 Tat? // *Reviews in Medical Virology.* - 2019. - Vol. 29(2). – P. e2031. DOI: 10.1002/rmv.2031. (WoS, Scopus) – Q1.
17. Shimura M., Tokunaga K., Konishi M., Sato Y., Kobayashi C., Sata T., Ishizaka Y. Premature sister chromatid separation in HIV-1-infected peripheral blood lymphocytes // *AIDS.* – 2005. - Vol. 19(13). – P. 1434 - 1438.
18. Shimura M., Toyoda Y., Iijima K., Kinomoto M., Tokunaga K., Yoda K., Yanagida M., Sata T., Ishizaka Y. Epigenetic displacement of HP1 from heterochromatin by HIV-1 Vpr causes premature sister chromatid separation // *J Cell Biol.* – 2011, - Vol. 194(5). – P. 721 - 35. doi: 10.1083/jcb.201010118.J.

6.6 Отчетные публикации по разделу

1. Gorbacheva M., Valyaeva A., Potashnikova D., Arifulin E., **Vassetzky Y., Musinova Y.** HIV-1 Tat induces cell type-specific expression of host genes in B-cells // *FEBS OPEN BIO.* - 2019. - Vol. 9. - Is. 1. – P. 35-157. WOS:000486972406001. (WoS) – Q4.
2. Kurnaeva M.A., Sheval E.V., **Musinova Y.R., Vassetzky Y.S.** Tat basic domain: A "Swiss army knife" of HIV-1 Tat? // *Reviews in Medical Virology.* - 2019. - Vol. 29(2). – P. e2031. DOI: 10.1002/rmv.2031. (WoS, Scopus) – Q1.

Раздел 7. Изучение цитологических, биохимических и физиологических механизмов прямых межклеточных взаимодействий

7.1 Введение

В отчетном году планировалось выполнить две темы: 1) влияние сигнальных факторов ритма синтеза белка на заживление ран; 2) первые исследования регуляторных пептидов в организации ритма синтеза и белка при прямых межклеточных взаимодействиях. Первая тема, совместная с лабораторией клеточной биологии, была завершена. Оформлена и опубликована статья. В работе, продолжавшейся ряд лет, получены данные об ускорении средних стадий заживления ран в модельной системе в культуре и *in vivo* при нанесении раны мышам под влиянием мелатонина [1].

Основная работа отчетного года, совместна с отделом Н.Ф. Мясоедова в Институте молекулярной генетики РАН, посвящена изучению двух регуляторных пептидов, синтезированных в этом отделе. Нейротрансмиттеры крови, усиливая межклеточные взаимодействия, организуют окологосударственный ритм синтеза белка в популяциях различных клеток (*in vitro* и *in vivo*) [2, 3]. Среди транзиттеров-организаторов, синтезирующихся и функционирующих вне нервной системы, обнаружили норадреналин, серотонин и их производные. В последнее время было показано такое же действие глутаминовой кислоты. В настоящей работе вместо транзиттеров исследовали пептиды, учитывая их стабильность и регуляторную активность.

Гептапептид семакс – многоцелевое лекарство с выраженными нейропротекторными свойствами [4-8]. Также ноотропный пептид HLDF-6 прошел доклинические испытания [9-12]. Их влияние на органы вне нервной системы не было известно, также как и влияние на синтез белка. Особое внимание мы уделили действию пептидов на синтез белка, нарушенный при старении. Нейротрофические болезни и другие патологии мозга происходят обычно во второй половине жизни человека, часто в старости. Действие пептидов на нормальные ткани при старении не известны. Входит ли в известные лечебные эффекты исследуемых пептидов также исправление старческих нарушений межклеточных взаимодействий? Происходит ли в результате их действия нормализация кинетики синтеза белка в клетках старых животных?

Использована наша оригинальная модель исследования прямых межклеточных взаимодействий – окологосударственный ритм синтеза белка в клеточной культуре.

7.2 Материалы и методы

Опыты поставлены на старых (2–2,5 года, вес 480–600 г) и молодых (3–4 мес, вес 150–250 г) крысах самцах Вистар. Исследовали действие пептидов семакс и HLDF-6 на первичные плотные и редкие культуры гепатоцитов.

Методы выделения гепатоцитов, их культивирования и исследования кинетики синтеза белка многократно рассмотрены ранее (например, Бродский и др., 2006). Гепатоциты выделяли из печени при перфузии сначала бескальциевыми растворами Хенкса с HEPES («Sigma», США) и 0,5 mM EGTA, а затем HEPES с 0,05%-ной коллагеназой («Sigma», США). Для культивирования гепатоцитов использовали среду 199 без сыворотки («ПанЭко», Россия): к среде добавляли 0,2 мг/мл альбумина для клеточных культур («Sigma», США) и 0,5 мкг/мл инсулина («Sigma», США); газовая смесь – 10% CO₂ и 90% воздуха. Для получения плотных культур, суспензии, содержавшие ~1 × 10⁶/мл гепатоцитов, наливали в чашки Петри со стеклами, покрытыми коллагеном. Редкие культуры получали из той же суспензии гепатоцитов при разведении ее примерно в 10 раз. Через 2 ч стекла культуры (каждая на отдельном стекле) отмывали от не прикрепившихся клеток и их обломков. Через 24 ч среду меняли на нормальную, свежую среду. В течение 2 ч каждые 10 мин последовательно отбирали пробы по три культуры (три стекла) каждая.

Культуры каждой пробы инкубировали одновременно в течение 10 мин при 37°С в среде 199 без лейцина («ПанЭко», Россия) с внесенным в нее меченым 3H-лейцином (ИМГ РАН, 25–30 мкКи/мл, специфическая молярная активность 70–100 Ки/ммоль). Затем культуры промывали холодным физиологическим раствором с избытком немеченого лейцина и обрабатывали 5%-ной хлорной кислотой в течение 60 мин, после чего промывали спиртом, белки растворяли гуанином (бензетониум хлорид; «Sigma», США). Включение 3H-лейцина в белки и радиоактивность свободного лейцина (кислоторастворимая фракция) измеряли на сцинтилляционном счетчике Tri-Carb 2810TR («Perkin Elmer», США). Для каждой культуры рассчитывали относительное к кислоторастворимой фракции включение лейцина в белки I_{согг}. Такие относительные величины нормализуют культуры по числу клеток, а также по небольшой вариабельности температуры в течение опыта.

Пептиды семакс и HLDF-6 растворяли в физиологическом растворе. Использовали концентрации пептидов, рекомендованные для медицинской практики. Учитывали различия в весе человека и крысы, уменьшая пропорционально весу конкретной крысы дозу лекарства.

7.3 Результаты и обсуждение

Предварительно, исследовали влияние разных доз пептидов на кинетику синтеза белка в редких культурах гепатоцитов молодой крысы. Показана эффективность доз 10 и 50 мкг/кг веса крысы. В редких культурах в свежей среде ритма синтеза белка нет.

Добавление в среду с такими культурами одного или другого пептида на 15 мин с последующим отмыванием культур и переносом их в свежую нормальную среду привело к обнаружению ритма синтеза белка. Следовательно, гепатоциты организуются ноотропными пептидами при прямых межклеточных взаимодействиях, синхронизируя колебания интенсивности синтеза белка. Результат – ритм синтеза белка.

Далее особое внимание обратили на амплитуды ритма синтеза белка. Величина амплитуды любого ритма характеризует выраженность межклеточной кооперации: чем больше амплитуды, тем согласованнее работают клетки. В отличие от редких культур, в плотных культурах старых крыс ритм есть и в контроле. В контрольных культурах ритм характеризовался низкими амплитудами. Добавление в среду 50 мкг/кг семакса увеличило амплитуды примерно вдвое (рисунок 7.1). Таким же было действие другого пептида – HLDF-6 (рисунок 7.2).

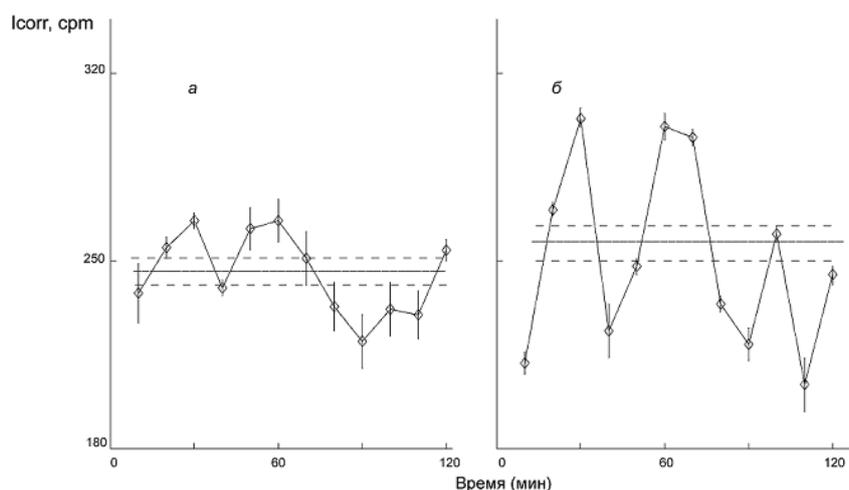


Рисунок 7.1 - Влияние пептида семакс на кинетику синтеза белка в первичных суточных плотных культурах гепатоцитов старой крысы; а) Контроль, культуры в нормальной среде; суточные культуры отмывали, и переносили на 15 мин в свежую среду, затем, культуры отмывали еще раз и в свежей среде исследовали кинетику синтеза белка; б) такие культуры после отмывания переносили в среду с 50 мкг/кг семакса на 15 мин; затем отмывали и переносили в свежую среду без семакса, в которой исследовали синтез белка. Здесь и далее: сплошная прямая линия – средний уровень синтеза белка (средняя арифметическая) (срм) для всех культур варианта опыта, в данном случае 36 культур, каждая на отдельном стекле; пунктирные прямые линии выше и ниже средней \pm ошибка этой средней.

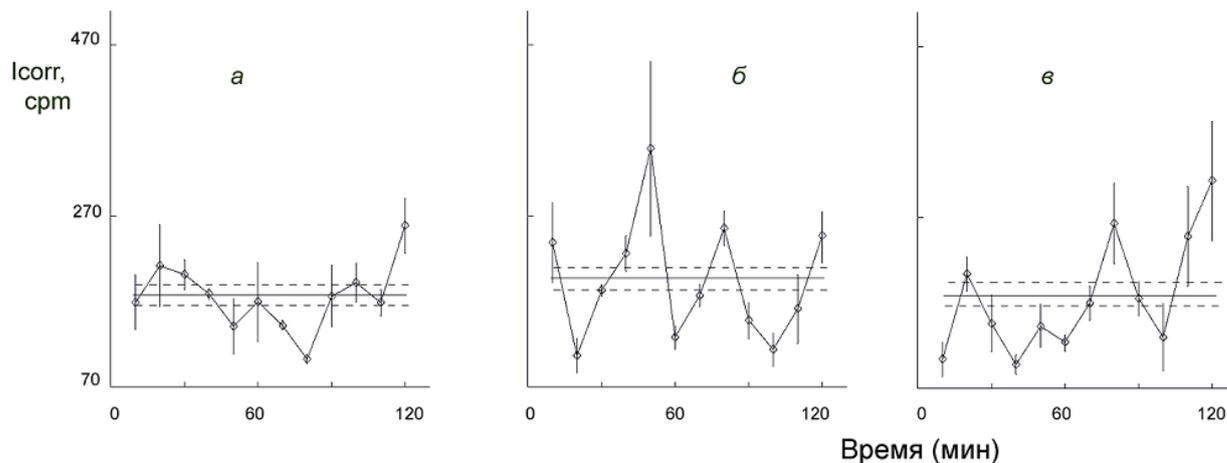
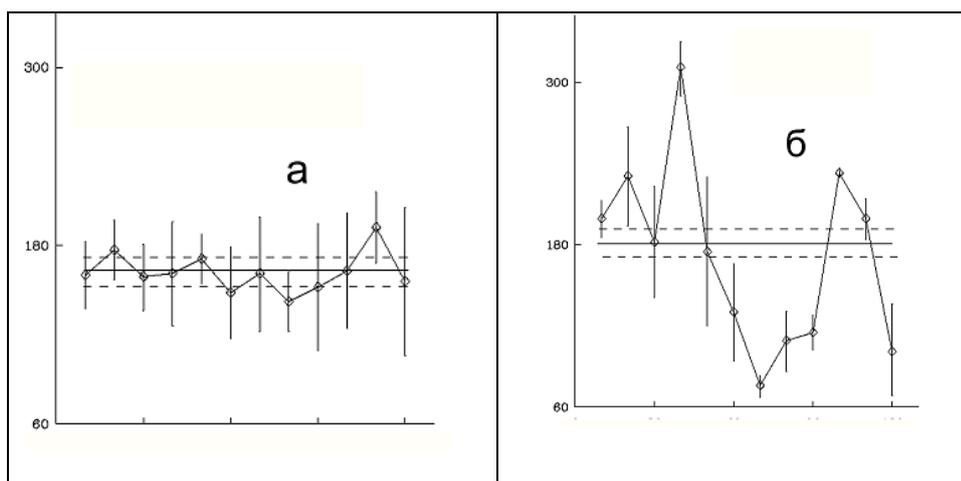


Рисунок 7.2 - Кинетика синтеза белка в плотных суточных культурах гепатоцитов старой крысы сразу после 15 мин воздействия 30 мкг/кг HLDF-6 и еще через сутки: а) суточный контроль – отмытые культуры перенесли на 15 мин в свежую среду, еще раз отмыли и исследовали кинетику синтеза белка; б) такие же культуры через 15 мин действия пептида HLDF-6; в) такие культуры еще через сутки после действия пептида

В исследованиях пептида HLDF-6 учитывали данные о его влиянии на глутаматную рецепторную систему нервных клеток [11].

В контроле редких культурах, как многократно было показано ранее, ритм не регистрировался. После внесения пептида HLDF-6 обнаружили ритм с высокими амплитудами. Ритм полностью ликвидировался в среде с антагонистом метаботропных глутаминовых рецепторов вместе с HLDF-6 (рисунок 7.3).



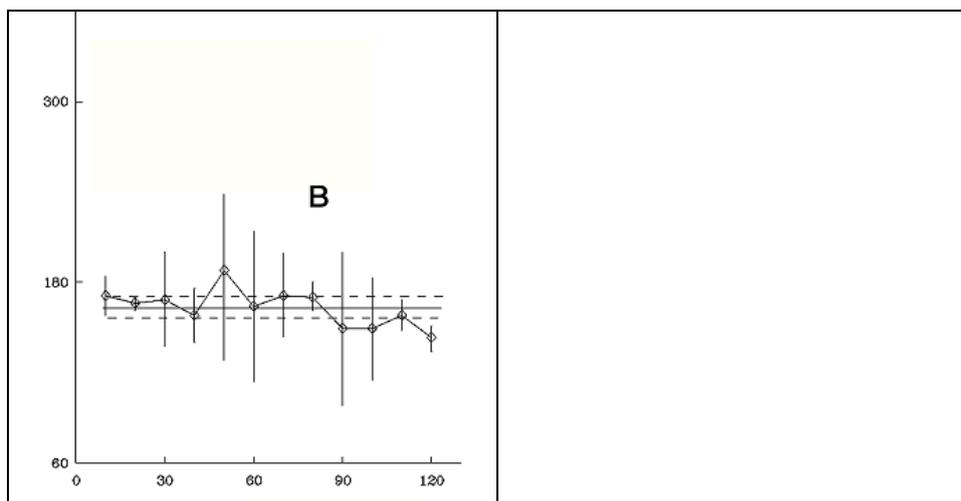


Рисунок 7.3 - Влияние антагониста метаботропных рецепторов глутаминовой кислоты MCPG на изменения кинетики синтеза белка пептидом HLDF-6 в редких культурах гепатоцитов молодой крысы; а) Контроль: суточные редкие культуры отмыли и перенесли в свежую среду на 20 мин, еще раз отмыли и через 20 мин исследовали синтез белка; б) клетки отмыли, перенесли в свежую среду, куда внесли 30 мкг/кг HLDF-6, перенесли в свежую среду и через 20 мин исследовали; в) в среду внесли 50 мкМ MCPG на 5 мин и затем 30 мкг/кг HLDF-6 на 15 мин, отмыли, перенесли в свежую среду и через 20 мин исследовали синтез белка. По оси абсцисс – радиоактивность, имп/мин; по оси ординат – время, мин.

Влияние пептида HLDF-6 через рецепторы позволяет предполагать включение затем цепи процессов, организующих ритм синтеза белка. Ключевым этапом этой регуляции является по нашим данным [3] активация протеинкиназ – С и А. После ингибирования активности протеинкиназ препаратом Н7 (1-(5-изохинолинсульфонил)-5-метилпиперазин дигидрохлорид) пептид семакс не влиял на кинетику синтеза белка в плотных культурах старой крысы (рисунок 7.4). В контроле, как и ранее, пептид семакс увеличил амплитуды ритма синтеза белка в культурах гепатоцитов старой крысы. Вместе с ингибитором семакс не действовал. Такой же эффект наблюдали при использовании пептида HLDF-6 вместе с Н7 на кинетику синтеза белка в плотных культурах старой крысы.

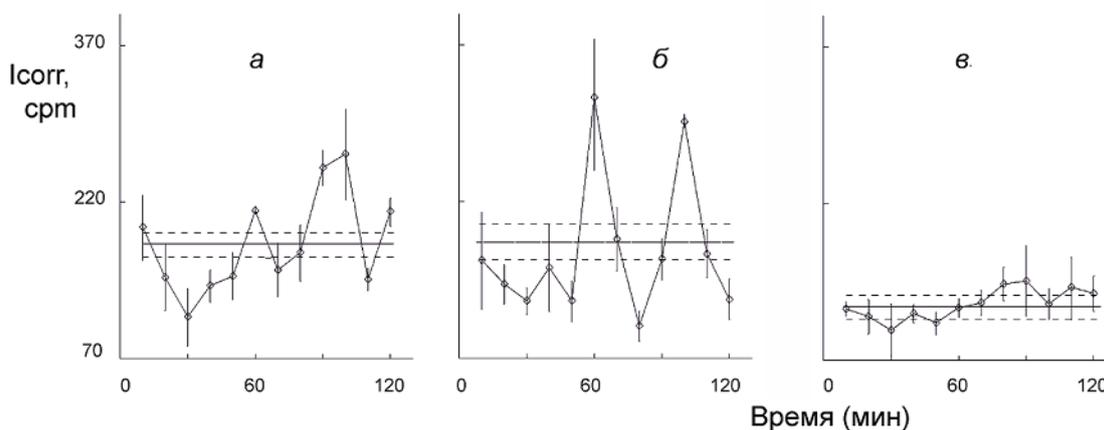


Рисунок 7.4 - Влияние ингибитора протеинкиназ H7 и пептида семакса на кинетику синтеза белка в плотных культурах старой крысы; а) Контроль – отмытые суточные культуры перенесли в свежую среду на 75 минут и исследовали синтез белка; б) в среду отмытых культур через 60 мин добавили 50 мкг/кг семакса на 15 мин и исследовали синтез белка; в) в таком же режиме исследовали действие 40 мкМ H7 и семакса

Весь материал культуры привел к следующим значениям амплитуд ритма синтеза белка в плотных культурах старых крыс:

Контроль – $44 \pm 3\%$

Семакс – $91 \pm 8\%$

HLDF-6 – $86 \pm 7\%$

Пептиды высоко достоверно повышали амплитуды ритма синтеза белка в плотных культурах старых крыс, то есть усиливали межклеточную кооперацию в организации кинетики синтеза белка. Отношение значений амплитуд пептид/контроль было 2, и для семакса и для HLDF-6. По нашему тесту, амплитудам ритма синтеза белка [3], пептиды восстанавливали прямые межклеточные взаимодействия у старых крыс до уровня молодых животных.

Сохраняется ли организующая кинетику синтеза белка функция изученных пептидов какое-то время после однократного их действия на гепатоциты? Как и ранее, в среду отмытых суточных плотных культур старой крысы внесли пептид HLDF-6, после чего также, как в других опытах, культуры отмыли и перенесли в свежую среду. Затем сразу, как ранее, или через сутки исследовали кинетику синтеза белка без пептида (контроль) или с пептидом. Такие культуры оставили еще на сутки в нормальной среде. Из этих данных следует, что эффект HLDF-6 сохраняется по меньшей мере сутки после действия пептида. В другом опыте показано, что также сутки сохранялось действие семакса.

7.4 Заключение

Таким образом, в настоящей работе впервые выявлены ранее неизвестные свойства исследуемых нейропротекторных пептидов семакса и HLDF-6 [13]. Главный результат – нормализация пептидами кинетики синтеза белка, нарушенной при старении животных. Показано, что пептиды влияют не только на нервную систему, но также на клетки печени. Пептиды усиливают кооперацию гепатоцитов в организации ритма синтеза белка. Это видно на плотных культурах, где ритм есть и в контроле. По изменениям амплитуд межклеточная кооперация при действии пептидов усиливается вдвое. Еще более демонстративны действия пептидов на редкие культуры, где в контроле нет ритма.

Биохимический механизм межклеточной кооперации – стимуляция метаболитных рецепторов с последующим включением цепи процессов в цитоплазме клеток с активацией протеинкиназ. Тогда как клинический эффект пептидов требует многих дней лечения, организация ими межклеточных взаимодействий следует за быстрым (порядка 15 мин) сигналом и действует как триггер, вызывая цепь процессов в цитоплазме клеток. Такое действие однократного сигнала сохраняется, по меньшей мере, сутки.

Влияние регуляторных пептидов на синтез белка – значимое их свойство. Как известно, синтез белка обновляет структуры и восстанавливает функции всех клеток. Для гепатоцитов печени, объекта наших исследований метаболизм белков – важнейшая специальная органная функция. В печени синтезируются белки плазмы крови. Специфические ферменты гепатоцитов осуществляют детоксикацию. В печени синтезируется и утилизируется гликоген.

Заслуживает внимания и возможность нормализации кинетики синтеза белка, пострадавшей после приема некоторых лекарственных средств. Так, дофамин, широко используемый для улучшения сосудисто-сердечной недостаточности, ликвидирует ритм синтеза белка в печени, поджелудочной железе, почках [3]. Прием семакса или HLDF-6 через день после назначения дофамина может восстановить кинетику синтеза белка во внутренней среде организма.

Организация кинетики синтеза белка может быть существенным компонентом лечебного действия исследуемых пептидов. В дальнейшем следует выяснить эффекты исследуемых регуляторных пептидов после введения их крысе. При подтверждении основных выводов об их влиянии на клеточные культуры можно рекомендовать пептиды семакс и HLDF-6 для улучшения состояния старых людей и для купирования действия некоторых лекарственных средств, дезорганизующих кинетику синтеза белка.

7.5 Список использованных источников

1. Vorotelyak E.A., Malchenko L.A., Rogovaya O.S., Lazarev D.S., Butorina N.N., Brodsky V.Y. Melatonin Stimulates Epithelium Migration in Wound Models In Vitro and In Vivo // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. - 2019. - V. 168. - Is. 1. - P. 242-246. DOI: 10.1007/s10517-019-04683-x. (WoS, Scopus) – Q4.
2. Бродский В.Я. Околочасовые метаболические ритмы // *Биохимия*. - 2014. - Т. 79, №6. - С. 621–634.
3. Бродский В.Я. Биохимия прямых межклеточных взаимодействий. Сигнальные факторы организации клеточных популяций // *Биохимия*. - 2018. - Т. 83, №8. - С. 1130–1147.
4. Мясоедов Н.Ф., Гривенников И.А. Нейропептиды и их аналоги в регуляции функций нервной системы млекопитающих, включая человека. От синтеза и изучения механизмов их действия до создания лекарственных средств нового поколения // В книге «Проблемы и перспективы молекулярной генетики». - 2004. М. «Наука», - Т. 2, - С. 195 – 236.
5. Левицкая Н.Г., Глазова Н.Ю., Себенцова Е.А., Манченко Д.М., Виленский Д.А., Андреева Л.А., Каменский А.А., Мясоедов Н.Ф. Исследование спектра физиологической активности аналога АКТГ4-10 гептапептида семакс // *Нейрохимия*. - 2008. - Т. 25, № 1. - С. 111 - 118.
6. Левицкая Н.Г., Виленский Д.А., Себенцова Е.А., Андреева Л.А., Каменский А.А., Мясоедов Н.Ф. Влияние семакса на эмоциональное состояние белых крыс в норме и на фоне действия холецистокинина-тетрапептида // *Известия РАН. Сер. биол.* - 2010. - № 2. - С. 231 - 237.
7. Иванов А.В., Бобынцев И.И., Шепелева О.М., Крюков А.А., Андреева Л.А., Мясоедов Н.Ф. Влияние АКТГ4-7-PGP (семакса) на морфофункциональное состояние гепатоцитов в условиях хронического эмоционально-болевого стресса // *Бюл. Эксп. Биол. Мед.* - 2017. - Т. 163, № 1. - С. 123 - 127.
8. Dmitrieva V.G., Povarova O.V., Skvortsova V.I., Limborska S.A., Myasoedov N.F., Dergunova L.V. Semax and Pro-Gly-Pro Activate the Transcription of Neurotrophins and Their Receptor Genes after Cerebral Ischemia // *Cell Mol Neurobiol.* - 2010. - Vol. 30, № 1. - P. 71 - 79.
9. Васильева Е.В., Золотарев Ю.А., Ковалев Г.И. Влияние ноотропных препаратов на метаболитные глутаматные рецепторы мозга мышей BALB/c и C57BL/6 // *Нейрохимия*. - 2013. - Т. 30, № 2. - С. 135 – 148.
10. Золотарев Ю.А., Ковалёв Г.И., Дадаян А.К., Козик В.С., Кондрахин Е.А., Васильева Е.В., Липкин В.М. Исследование фармакокинетики и фармакодинамики амидной формы

нейропротекторного пептида HLDF-6 с использованием равномерно меченных изотопами водорода соединений // В книге Нейродегенеративные заболевания: от генома до целостного организма под ред. М.В. Угрюмова. - 2014. М. Научный мир. - С. 763 – 777.

11. Zolotarev Y.A., Kovalev G.I., Kost N.V., Voevodina M.E., Sokolov O.Y., Dadayan A.K., Kondrakhin E.A., Vasileva E.V., Bogachuk A.P., Azev V.N., Lipkin V.M., Myasoedov N.F. Anxiolytic activity of the neuroprotective peptide HLDF-6 and its effects on brain neurotransmitter systems in BALB/c and C57BL/6 mice // J Psychopharmacol. - 2016. - Т. 30, № 9. - P. 922 – 935.

12. Bogachouk A.P., Storozheva Z.I., Solovjeva O.A., Sherstnev V.V., Zolotarev Y.A., Azev V.N., Rodionov I.L., Surina E.A., Lipkin V.M. Comparative study of the neuroprotective and nootropic activities of the carboxylate and amide forms of the HLDF-6 peptide in animal models of Alzheimer's disease // Psychopharmacol. - 2016. - Vol. 30, № 1. - P. 78 - 92.

13. Brodsky V.Y., Zolotarev Y.A., Malchenko L.A., Andreeva L.A., Lazarev D.S., Butorina N.N., Kozik V.S., Myasoedov N.F. Neuroprotective Peptides Regulate Protein-Synthesis Kinetics in Hepatocytes of Different Age Rats // Russian Journal of Developmental Biology. - 2019. - Vol. 50. - Is. 5. - P. 268 - 274. DOI: 10.1134/S1062360419050035. (WoS) – Q4.

Бродский В.Я., Золотарев Ю.А., Мальченко Л.А., Андреева Л.А., Лазарев Д.С., Буторина Н.Н., Козик В.С., Мясоедов Н.Ф. Нейропротекторные пептиды регулируют кинетику синтеза белка в гепатоцитах крыс разного возраста // Онтогенез. - 2019. - Т. 50, № 5. - С. 340 - 347. DOI: 10.1134/S0475145019050033. (РИНЦ)

7.6 Отчетные публикации по разделу

1. **Brodsky V.Y.**, Zolotarev Y.A., **Malchenko L.A.**, Andreeva L.A., Lazarev D.S., **Butorina N.N.**, Kozik V.S., Myasoedov N.F. Neuroprotective Peptides Regulate Protein-Synthesis Kinetics in Hepatocytes of Different Age Rats // Russian Journal of Developmental Biology. - 2019. - Vol. 50. - Is. 5. - P. 268 - 274. DOI: 10.1134/S1062360419050035. (WoS) – Q4. Бродский В.Я., Золотарев Ю.А., Мальченко Л.А., Андреева Л.А., Лазарев Д.С., Буторина Н.Н., Козик В.С., Мясоедов Н.Ф. Нейропротекторные пептиды регулируют кинетику синтеза белка в гепатоцитах крыс разного возраста // Онтогенез. - 2019. - Т. 50, № 5. - С. 340 - 347. DOI: 10.1134/S0475145019050033. (РИНЦ)
2. **Vorotelyak E.A.**, **Malchenko L.A.**, **Rogovaya O.S.**, Lazarev D.S., **Butorina N.N.**, **Brodsky V.Y.** Melatonin Stimulates Epithelium Migration in Wound Models In Vitro and In Vivo // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. - 2019. - Vol. 168. - Is. 1. - P. 242 - 246. DOI: 10.1007/s10517-019-04683-x. (WoS, Scopus) – Q4

ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С использованием разнообразных методов и экспериментальных моделей проведены исследования клеточной дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток человека, пластичности и морфогенеза в контексте онтогенеза и регенерации.

Исследовано влияние компонентов внеклеточного матрикса на поддержание ИПСК и их дифференцировку в эпидермальном и нейральном направлениях. Лучшее всего поддержание роста колоний на ранних этапах как эпидермальной, так и нейральной дифференцировок обеспечивали ламинин и фибронектин, в меньшей степени – коллаген IV. Получены дермальные и эпидермальные клетки путем дифференцировки из ИПСК. Результаты проведенного исследования подтверждают их целевой фенотип и способность к взаимной интеграции в трехмерные конструкции. Разработанные методы и полученные клеточные линии потенциально могут быть использованы для создания трехмерных эквивалентов кожи или дериватов кожи *in vitro*. Для достижения этого результата требуются дальнейшие исследования, направленные, в частности, на усовершенствование протокола эпидермальной дифференцировки и получение аналогов линии фибробластов кожи человека из ИПСК человека. Проведенный анализ транскриптомов (RNA-seq) полученных из ИПСК нейральных культур от доноров носителей синдрома Дауна, подтвердил повышенную экспрессию генов, локализованных на 21-й хромосоме в клетках T21, а также позволил обнаружить сдвиг экспрессии генов маркеров нейронов некоторых слоев коры головного мозга, что может отражать существующую клиническую картину с патологией развития головного мозга пациентов с синдромом Дауна. Данные наблюдения позволяют рассматривать выращенные *in vitro* нейральные культуры с T21 как удобный инструмент моделирования развития слоев коры головного мозга людей с синдромом Дауна. С помощью метода CRISPR/Cas9 получено 6 линий мутантных ИПСК человека с делециями в генах TNFaR1 и ASIC1, показано влияние этих делеций на клеточную пролиферацию и дифференцировку: делеции не влияют на правильную дифференцировку ИПСК в нейральные стволовые клетки, в то время как нокаут TNFaR1 влияет на пролиферативные свойства нейральных стволовых клеток. На модели повреждения мышцы крыс подтверждено, что доставка МСК в место повреждения мышцы и в виде суспензии, и на биосовместимых носителях (на основе коллагена или децеллюляризованная стенка тонкой кишки свиньи) повышает эффективность регенерации мышечной ткани. По итогам анализа литературы и собственных исследований на предыдущих этапах работы была высказана гипотеза, связывающая протективный потенциал Т-хелперных лимфоцитов с их низкой степенью дифференцировки и «стволовостью» (а не с функциональной активностью в момент

первичного иммунного ответа, как часто считается). Продемонстрирована инактивация на ранних сроках сигнальных путей Wnt/ β -катенин и Notch, активация неканонического сигнального пути Wnt/PCP и модулирование BMP-сигналинга при воздействии оФРФ на культуру клеток РПЭ человека, что уточняет внутриклеточные механизмы дедифференцировки клеток РПЭ. Получены новые сведения относительно влияния Tat белка на культивируемые В-лимфоциты, причем, эти изменения могут иметь прямое отношение к развитию В-клеточных лимфом. Впервые выявлены ранее неизвестные свойства исследуемых нейропротекторных пептидов семакса и HLDF-6 – пептиды усиливают кооперацию гепатоцитов в организации ритма синтеза белка. При подтверждении основных выводов об их влиянии на клеточные культуры можно рекомендовать пептиды семакс и HLDF-6 для улучшения состояния старых людей и для купирования действия некоторых лекарственных средств, дезорганизирующих кинетику синтеза белка.

В целом, полученные данные позволят в дальнейшем на основе фундаментальных результатов о механизмах клеточной дифференцировки, пластичности и морфогенеза разработать модели заболеваний человека, определить существенные механизмы их патогенеза и предложить новые методы диагностики и лечения.

Отчет о выполнении темы № 4: «Клеточные и молекулярные механизмы дифференцировки, регенерации и морфогенеза, трансдифференцировка» (Инд. номер - АААА-А19-119032190082-6) Государственного задания на 2019 год был рассмотрен и утвержден на Ученом совете ИБР РАН (Протокол №14 от 27.12.2019 г.)