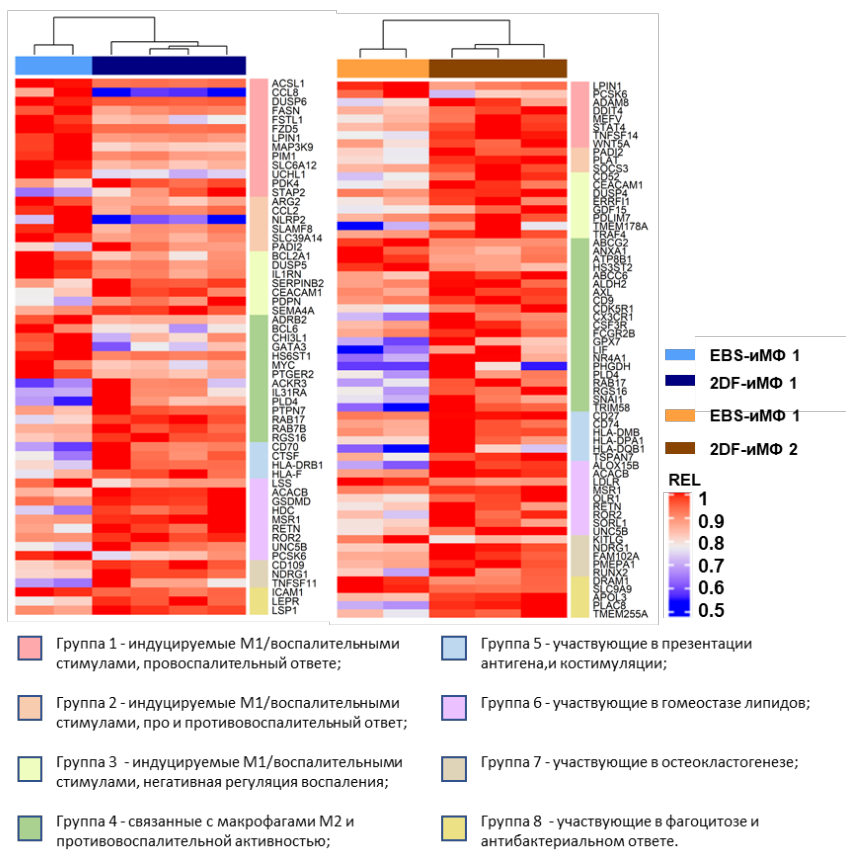


Получение макрофагов человека из индуцированных плюрипотентных клеток (иПСК) является актуальной, перспективной и быстроразвивающейся областью. Этот метод привлекает исследователей своей стандартизируемостью, масштабируемостью, возможностью получать генномодифицированные макрофаги. В мире макрофаги, полученные из иПСК, активно используются для моделирования наследственных заболеваний, ассоциированных с нарушенной функцией макрофагов (например, хроническая гранулематозная болезнь, болезнь Танжера и др.), скрининга лекарственных препаратов (например, противотуберкулезных), моделирования взаимодействий фагоцит-патоген, а также для разработки подходов к макрофагальной клеточной терапии ряда заболеваний (опухолевых, инфекционных, врожденных). Активное использование иМФ в настоящее время и еще большие перспективы их применения в дальнейшем ставят вопрос о разработке методов получения стандартизуемых и хорошо охарактеризованных популяций иМФ. Однако, в настоящее время для получения иМФ ученые используют разные протоколы, существенно различающиеся по многим параметрам, что поднимает вопрос об идентичности получаемых популяций клеток и возможности экстраполяции получаемых результатов.

Рис 1. Отличие в транскриптоме иМФ, полученных в EBS- и 2DF-протоколах



Нами проведено первое в мире сравнительное исследование иМФ, полученных с использованием двух разных протоколов, наиболее часто используемых для получения иМФ. Впервые обнаружены существенные различия между получаемыми иМФ по провоспалительной активности, экспрессии генов, участвующих в презентации антигенов, липидном гомеостазе. С помощью РНК-секвенирования впервые детально исследованы траектории дифференцировки иМФ. Охарактеризованы общие и специфичные для каждого протокола дифференцировки динамические паттерны экспрессии генов (Рис.1). Предложена модификация одного из описанных в литературе протоколов дифференцировки иМФ, позволяющая получать популяции иМФ многократно - не менее 3 месяцев дифференцировки (вместо исходно предложенного однократного сбора образованных иМФ). Полученные результаты важны для

понимания механизмов дифференцировки макрофагов, выявления наиболее значимых генов, участвующих в этом процессе, а также для развития методов получения иМФ и макрофагальной клеточной терапии различных заболеваний. Проведен анализ литературы, связанной с генерацией иМФ, выделены основные области и перспективы применения иМФ. Работа выполнена в рамках проекта РФФ № 19-75-20176.

Lyadova I, Vasiliev A. Macrophages derived from pluripotent stem cells: prospective applications and research gaps // Cell & Bioscience. 2022; 12(1):96. <https://doi.org/10.1186/s13578-022-00824-4>. Q1.

Anna Klepikova, Tatiana Nenasheva, Olga Sheveleva, Elena Protasova, Daniil Antonov, Anastasiia Gainullina, Evgeniia Chikina, Olga Sakovnich, Tatiana Gerasimova, Irina Nikitina, Dmitry Shevalie, Irina Lyadova. iPSC-derived macrophages: the differentiation protocol affects cell immune characteristics and differentiation trajectories // Int. J. Mol. Sci. doi.org/10.3390/ijms232416087 Q1.

Выделение живых дофаминергических нейронов, меченных флуоресцентным лигандом переносчика дофамина, из черной субстанции мыши как новый инструмент фундаментальных и прикладных исследований.

Дофаминергические нейроны (ДН) nigrostriарной системы являются центральным звеном регуляции моторной функции, а их гибель приводит к развитию болезни Паркинсона (БП). Камнем преткновения для изучения молекулярных механизмов, происходящих в ДН, при работе с тканью черной субстанции (ЧС) является отсутствие инструментов для анализа экспрессии большинства генов, кодирующих белки, участвующие в нейротрансмиссии, нейродегенерации и нейропластичности, поскольку их экспрессия свойственна также и другим клеткам ЧС. В связи с этим, нами был разработан метод выделения ДН из ЧС мыши с использованием двух флуоресцентных красителей, DRAQ5 (ядерный краситель) и ингибитора обратного захвата дофамина GBR-12909, связанного с флуорофором BODOPY (окрашивание ДН) (Рис. 1). С помощью количественной ПЦР мы получили доказательства одинаковых изменений в экспрессии специфических генов в отсортированных ДН и в гомогенате ЧС на модели БП по сравнению с контролем.

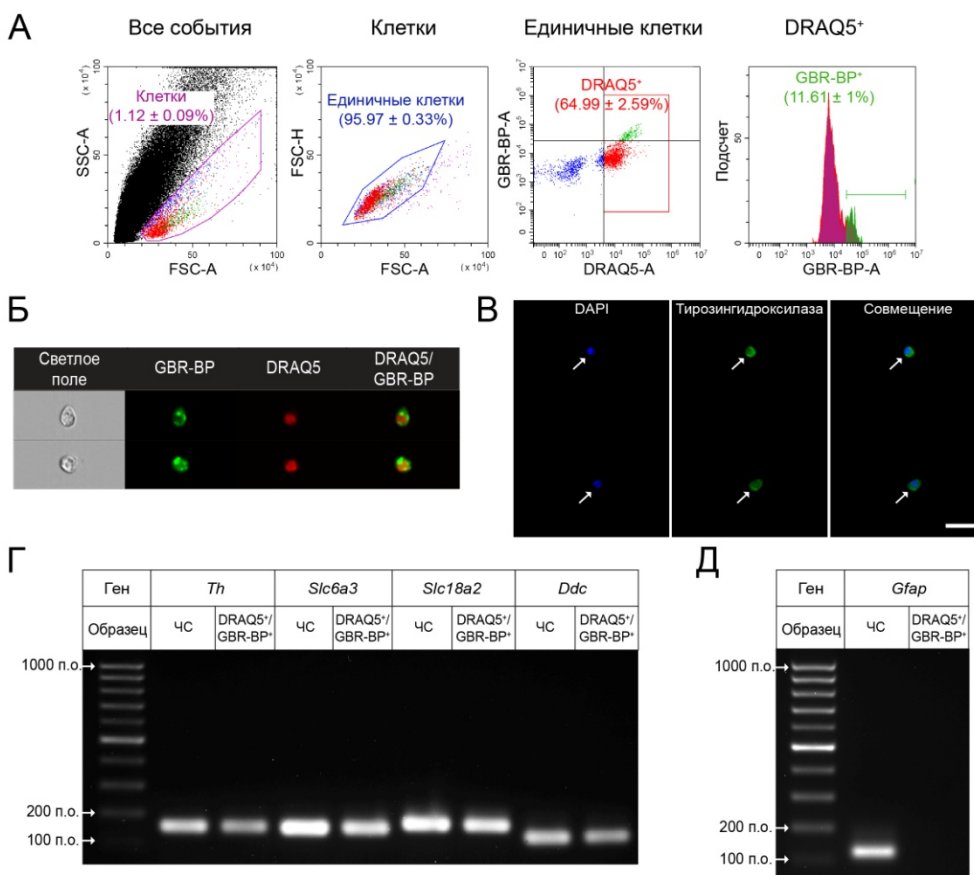


Рис. 1. Выделение популяции клеток, окрашенных DRAQ5 и GBR-BP, из черной субстанции (ЧС) мыши и доказательство того, что выделенные клетки являются дофаминергическими нейронами. (А) Последовательность выделения популяции клеток, окрашенных DRAQ5 и GBR-BP, из суспензии клеток ЧС мыши. События – все детектируемые цитометром/сортером частицы суспензии. (Б) Изображения клеток, окрашенных DRAQ5 и GBR-BP. (В) Иммуногистохимическое выявление тирозингидроксилазы (ТГ) в отсортированных клетках. Масштабный отрезок = 20 мкм. (Г) Экспрессия генов белков-маркеров дофаминергических нейронов: ТГ (*Th*), транспортера дофамина (*Slc6a3*), везикулярного транспортера моноаминов 2 (*Slc18a2*) и декарбоксилазы ароматических L-аминокислот (*Ddc*) в гомогенате ЧС, а также в отсортированных клетках. (Д) Экспрессия гена глиального фибриллярного кислого белка (*Gfap*) в гомогенате ЧС, а также в отсортированных клетках.

Разработанный метод выделения популяции ДН ЧС открывает широкие перспективы для изучения молекулярных механизмов функционирования этих нейронов в норме и при патологии. Кроме того, этот метод может быть легко адаптирован для изоляции ДН из ЧС других видов животных, включая нечеловекообразных обезьян.

Важнейший практический результат 2022 - лаборатория клеточной биологии Воротеляк Е.А.

Совместно с МНИОИ им. П.А. Герцена была разработана методика реконструкции слизистой гортаноглотки с использованием преламинированных пекторальных лоскутов с аналогом эпителия слизистой оболочки из аутологических эпителиальных пластов. Девяти пациентам выполнена реконструкция гортаноглотки с использованием разработанной методики. Для создания биоинженерных лоскутов аутологичные эпителиальные клеточные пласты выращенные *in vitro* из клеток кожи (рис.1), были преламинированы на фасции большой грудной мышцы (рис.2). Через две недели преламинации лоскуты «на ножке» мобилизовали от грудной стенки и перемещали на область дефекта, ориентируя эпителием в просвет глотки. Во всех случаях у пациентов было восстановлено пероральное питание. Многослойный плоский эпителий на фасции пекторального лоскута выявлен в 67% случаев через 2 недели после преламинации, в 89% случаев через 4 недели после реконструкции и в 100% случаев через 3, 6, 12, 24 месяцев после реконструкции (рис).

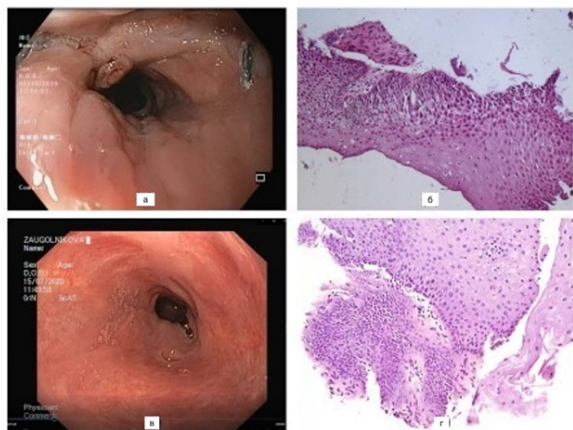


Рисунок 1. Подготовка клеточного трансплантата: культура аутологических кератиноцитов больного через 4 недели культивирования: (а) фазовый-контраст; (б) иммунофлуоресцентное обнаружение специфического маркера кератиноцитов - sk14 (зеленое окрашивание); специфического эпидермального фактора транскрипции p63 (красное окрашивание), ядра окрашены DAPI (синее окрашивание). Готовый к использованию трансплантат, внешний вид (в) Микрофотография кератиноцитов человека, выращенных на поверхности матрицы выращенных на поверхности матрикса, выявление жизнеспособных клеток с помощью витального красителя Calcein AM (зеленое окрашивание) (г).

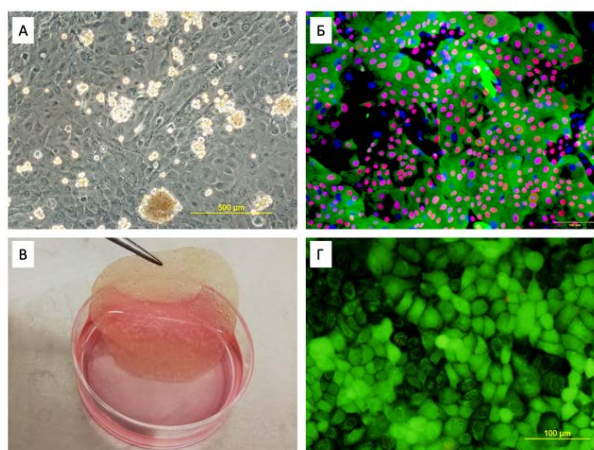
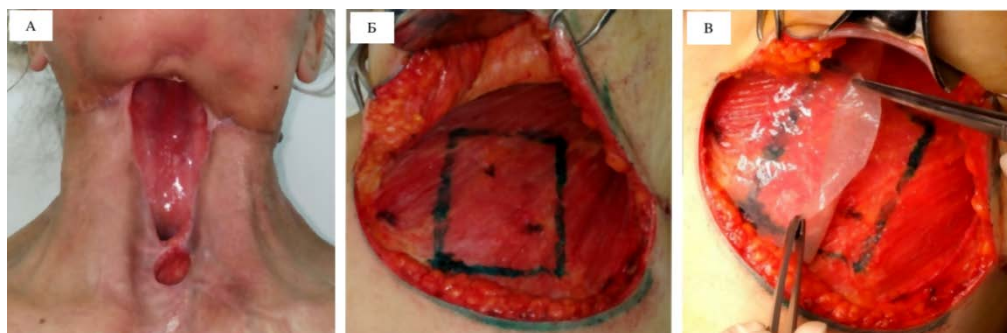


Рисунок 2. (а) Пациентка с фарингостомой после комбинированного лечения рака гортани IVA стадии; (б) хирургический доступ для преламинации; (в) имплантация пласта эпителиальных клеток на фасцию большой грудной мышцы.

Рис. 3. (а) Видеофарингоскопия через 4 недели после фарингопластики; (б) Гематоксилин и эозин (ГиЭ), при 100-кратном увеличении показан многослойный плоский эпителий; (в) видеофарингоскопия через 24 месяца после фарингопластики; (г) Гематоксилин и эозин (ГиЭ), при 100-кратном увеличении показан многослойный плоский эпителий с пролиферацией базальных слоев.



Публикация:

1. И.В. Ребрикова, Е.А. Воротеляк, О.С. Рогова, А.П. Поляков, А.В. Мордовский, М.В. Ратушный, А.Д. Каприн, А.В. Васильев. Реконструкция гортаноглотки с использованием аутологических тканеинженерных эпителизованных лоскутов // Вестник трансплантологии и искусственных органов -2022. №4, С. 135 – 145. Q4.