

## ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАНУДК 576.5 577.24  
№ ИНГЗ 0108-2016-0005  
№ НИОКР АААА-А16-116120810090-5

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФБГУН Институт биологии  
развития им. Н.К. Кольцова РАН  
д-р биол. наук, чл.-корр. РАН

Васильев А.В.

« 27 » декабря 20 17 г.

ОТЧЕТ  
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕТЕМА 4: «КЛЕТОЧНЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ  
ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ, РЕГЕНЕРАЦИИ И МОРФОГЕНЕЗА,  
ТРАНСДИФФЕРЕНЦИРОВКА»

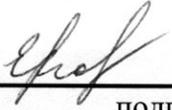
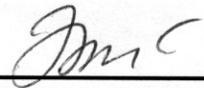
(заключительный)

Руководитель темы  
д-р биол. наук  
чл.-корр. РАН  
Воротеляк Е.А.Руководитель темы  
д-р биол. наук  
Григорян Э.Н.

Москва 2017

## СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

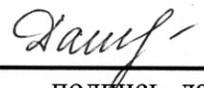
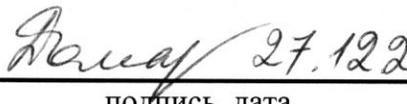
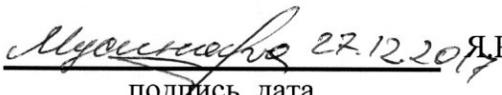
Руководители темы:

Доктор биологических наук,  
член-корреспондент РАН, зав.  
лаб.  
27.12.2017  
подпись, датаЕ.А. Воротеляк  
(введение, раздел 1-3)Доктор биологических наук,  
зав. лаб.  
27.12.17  
подпись, датаЭ.Н. Григорян (раздел 7,  
10)

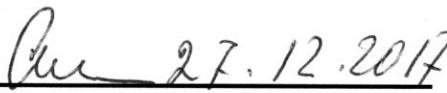
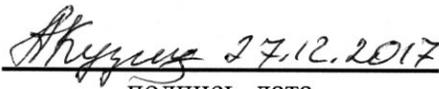
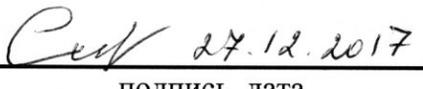
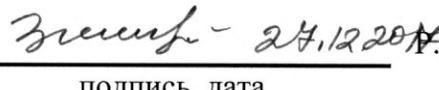
Исполнители темы:

Доктор биологических наук,  
профессор, г.н.с..  
27.12.2017  
подпись, дата

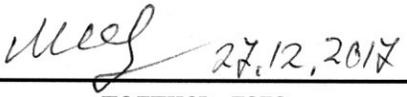
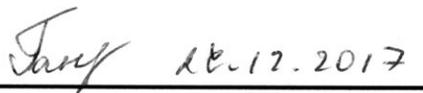
В.В. Терских (раздел 1)

Кандидат биологических наук,  
с.н.с.  
27.12.2017  
подпись, датаБ. Дашинимаев  
(раздел 2)Доктор биологических наук,  
зав. лаб.  
27.12.2017  
подпись, датаЕ.И. Домарацкая (раздел  
4)Кандидат биологических наук,  
с.н.с.  
27.12.2017  
подпись, дата

Я.Р. Мусинова (раздел 5)

Доктор биологических наук,  
г.н.с.  
27.12.2017  
подпись, датаМ.А. Александрова  
(раздел 6)Кандидат медицинских наук,  
с.н.с.  
27.12.2017  
подпись, датаА.В. Кузнецова (раздел  
6)Кандидат биологических наук,  
с.н.с.  
27.12.2017  
подпись, датаВ.Н. Самирский (раздел  
7, 9)Доктор биологических наук,  
профессор, г.н.с.  
27.12.2017  
подпись, дата

Т.Д. Зиновьева (раздел 7)

Кандидат биологических наук,  
с.н.с.  
27.12.2017  
подпись, датаЮ.В. Маркитантова  
(раздел 7)Доктор биологических наук,  
в.н.с.  
27.12.2017  
подпись, дата

И.Г. Панова (раздел 7)

Кандидат биологических наук,  
с.н.с.

Михеев 27.12.2017  
подпись, дата

А.С. Микаелян (раздел  
8)

Доктор биологических наук,  
г.н.с.

Урал 27.12.2017  
подпись, дата

И.В. Урываева (раздел 8)

Кандидат биологических наук,  
н.с.

Радугина 27.12.2017  
подпись, дата

Е.А. Радугина (раздел  
10)

Доктор биологических наук,  
профессор, г.н.с.

В.Я. Бродский 27.12.2017  
подпись, дата

В.Я. Бродский (раздел  
11)

Нормоконтроллер

Борисова 27.12.2017  
подпись, дата

О.В. Борисова

## РЕФЕРАТ

Отчёт 94 с., 11 разд., 42 рис., 3 таб., публикаций по теме - 16

Ключевые слова – дифференцировка, регенерация, морфогенез, трансдифференцировка, развитие, кожа, волосяной фолликул, индуцированные плюрипотентные клетки, нейральная дифференцировка, полимеразная цепная реакция, нормировка, половая дифференцировка, нервный гребень, нейральный трансплантат, жизнеспособность, интеграция трансплантата, модель трансплантации в головной мозг и область поврежденного периферического нерва, канцерогенез, ткани глаза, печень, ткани хвоста, грызуны, интерфазные пренуклеолярные тельца (иПНТ), хвостатые амфибии, мезенхимные стволовые клетки, нейральные прогениторы, пластичность клеточного фенотипа, факторы космического полета, тепловой шок, сигнальные пути, транскрипционные факторы, глутаминовая кислота, культура гепатоцитов, ядрышко.

Объектом исследования являются культуры клеток кожи человека, культуры клеток ретинального пигментного эпителия человека, культуры гепатоцитов крысы, первичные культуры гепатоцеллюлярной карциномы мыши, мезенхимные стволовые клетки костного мозга крысы, культура гепатоцитов крысы, регенерирующие органы хвостатых амфибий, глаз позвоночных животных, мозг мозвоночных животных.

Целью данной работы является изучение клеточных и молекулярных механизмов дифференцировки, регенерации, морфогенеза и трансдифференцировки на моделях биологии развития и клеточной биологии.

Исследованы клеточные и молекулярные механизмы дифференцировки, регенерации и морфогенеза и трансдифференцировки в разнообразных моделях *invitroi invivo*.

Разработана модель для изучения морфогенеза придатков кожи. Показано, что клетки человека могут индуцировать морфогенез волосяных фолликулов при трансплантации их в безволосую кожу человека. На модели нейральной дифференцировки индуцированных плюрипотентных клеток разработаны методы нормализации результатов при проведении ПЦР. Разработан новый протокол дифференцировки индуцированных плюрипотентных клеток человека в половые клетки. Изучены молекулярные механизмы пластичности клеток ретинального эпителия человека *in vitro*. Показано, что регенераторная пластичность этих клеток рекрутирует механизмы плюрипотентности, в частности активацию экспрессии мРНК генов KLF4, SOX2, NANOG. Исследовано участие экзогенных стволовых и прогениторных клеток в регенерации ткани мозга мышей *in vivo*. Изучены связанные с педоморфозом молекулярные характеристики (работа сигнальных путей и транскрипционных факторов (ТФ)) клеток - источников регенерации сетчатки и хрусталика глаза у хвостатых амфибий. Показано их высокое, однако неполное соответствие таковым «молодого» клеточного

фенотипа. Продолжено изучение экспрессии ТФ семейства *Vsx* в ходе развития сетчатки кур. Выявлен ее дифференциальный пространственно-временной характер. Начато изучение влияния вызванных доксорубицином двойных разрывов ДНК на свойства мезенхимных стволовых клеток костного мозга крысы - дифференцировку, пролиферацию, регенераторный потенциал. Исследована экспрессия белков теплового шока в процессе морфогенеза хвоста, роговицы и хрусталика у амфибий в условиях измененного гравитационного вектора (2g, 1g, low g) и теплового шока. Впервые изучены процессы морфогенеза глаза у тритона *Pleurodeles waltl* в ходе развития. Молекулярно-биологические аспекты развития стекловидного тела (СТ) и окружающих его тканей глаза позвоночных с использованием спектроскопии поглощения и флуоресценции позволило разработать использование в качестве спектрально-флуоресцентного зонда на альбумины разных позвоночных один из скварилиевых красителей (СКК). Продемонстрирован миогенный потенциал мезенхимных стволовых клеток костного мозга. Изучена смена клеточного фенотипа первичных культур гепатоцеллюлярной карциномы мыши под воздействием фактора индукции эпителио-мезенхимного перехода TGF- $\beta$  и провоспалительного цитокина IL-6. Изучено влияние нервного нейротрансмиттера на кинетику синтеза белка в гепатоцитах старых крыс.

Полученные результаты создают предпосылки для развития новых технологий в биологии развития и биомедицине.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

РЕФЕРАТ .....	4
ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ .....	8
ОБЩЕЕ ВВЕДЕНИЕ .....	9
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	14
Раздел 1. Клеточные и молекулярные механизмы морфогенеза кожи и ее придатков. Дифференцировочный и морфогенетический потенциал эпителиальных стволовых клеток .....	14
1.1 ВВЕДЕНИЕ .....	14
1.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	14
1.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ .....	15
1.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	17
Раздел 2 Нейральная дифференцировка индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека .....	18
2.1 ВВЕДЕНИЕ .....	18
2.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	19
2.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ .....	22
2.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	34
2.5 СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....	35
Раздел 3. Управляемое изменение дифференцировочного статуса клеток, в том числе с помощью генетического манипулирования и с использованием систем для микроманипулирования .....	36
3.1 ВВЕДЕНИЕ .....	36
3.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	37
3.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ .....	39
3.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	45
3.5 СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
Раздел 4. Стволовые мезенхимные клетки в индивидуальном развитии. Роль мезенхимных стромальных клеток (МСК) в формировании мышечной ткани и ее восстановлении после поврежден.....	46
4.1 ВВЕДЕНИЕ .....	46
4.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	47
4.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ .....	48
4.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	53
4.5 СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
Раздел 5. Биогенез ядерных структур.....	54
5.1 ВВЕДЕНИЕ .....	54
5.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	54
5.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ .....	54

5.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	55
4.5 СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
Раздел 6. Механизмы пластичности стволовых и прогениторных клеток в процессах регенерации различных структур нервной системы.....	56
6.1 ВВЕДЕНИЕ.....	56
6.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	57
6.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	60
6.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	67
Раздел 7. Клеточные, молекулярно-генетические и эпигенетические механизмы развития и регенерации тканей глаза позвоночных животных и человека .....	68
7.1 ВВЕДЕНИЕ.....	68
7.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	68
7.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	69
7.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	71
Раздел 8. Молекулярные механизмы канцерогенеза и регенерации печени .....	73
8.1 ВВЕДЕНИЕ.....	73
8.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	73
8.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	74
8.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	77
Раздел 9. Влияние двойных разрывов ДНК и эпигенетических факторов на регенерационный потенциал и дифференцировку мезенхимных стволовых клеток костного мозга.....	79
9.1 ВВЕДЕНИЕ.....	79
9.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	79
9.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	79
9.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	80
Раздел 10. Молекулярные механизмы изменений регенерационных процессов у позвоночных животных под влиянием факторов внешней среды .....	81
10.1 ВВЕДЕНИЕ.....	81
10.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	81
10.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	82
10.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	83
Раздел 11. Изучение цитологических, биохимических и физиологических механизмов прямых межклеточных взаимодействий .....	84
11.1 ВВЕДЕНИЕ.....	84
11.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	84
11.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	84
11.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	87
ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	88
Приложение 1.....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>



## ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

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

АФП - альфа-фетопротеин

ВКМ - внеклеточный матрикс

ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография

ГЦК - гепатоцеллюлярная карцинома

ДП – дермальная папилла

иПНТ – интерфазные пренуклеолярные тельца

м-РНК - матричная рибонуклеиновая кислота

НП - нейральные прогениторы

ПЦР - полимеразная цепная реакция

РПЭ - ретинальный пигментный эпителий

СА - сывороточный альбумин

СК - стволовые клетки

СКК - скварилиевый краситель

СОД - супероксиддисмутаза

СТ - стекловидное тело

ТФ - транскрипционные факторы

ЭДТА - Этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭМП – эпителий-мезенхимный переход

Hsp70 и Hsp90 -белки теплового шока

FGF2 - фактор роста фибробластов 2

## ОБЩЕЕ ВВЕДЕНИЕ

Дифференцировка, регенерация и морфогенез охватывают широчайший спектр биологических явлений в процессах развития и восстановления живых организмов. Тканевая дифференцировка и морфогенез становятся в последнее время одними из центральных задач клеточной биологии и биологии развития. Особое значение изучение этих проблем приобретает в связи с развитием клеточных технологий и технологий использования стволовых клеток. Реализация результатов исследований позволит добиться качественно нового уровня лечения многих социально значимых заболеваний, таких как травмы (ожоги, трофические язвы, дефекты опорно-двигательного аппарата, недостаток тканей после удаления опухолей и др.), сахарный диабет, цирроз печени. Биология стволовых клеток и клеточные технологии, основанные на применении стволовых клеток в медицинской практике, занимают ведущее место в современных биомедицинских исследованиях и отмечены Нобелевской премией в 2012 году. Приоритет отдается получению пациент-специфических плюрипотентных стволовых клеток, способных дифференцироваться в клетки практически всех тканей организма. Использование клеток взрослого организма позволяет исключить работу с эмбриональными стволовыми клетками и, таким образом, избежать этических проблем. Планируется использование индуцированных плюрипотентных стволовых клеток для моделирования болезней, скрининга лекарственных препаратов и проверки токсичности. В ближайшие годы ожидается широкомасштабное использование индуцированных плюрипотентных клеток выращивания отдельных органов и их частей для научных исследований и трансплантации.

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

Для исследований в области дифференцировки, регенерации и морфогенеза используются самые различные экспериментальные модели. В данной работе в качестве объектов исследования использовали кожу человека и ее придатки, систему дифференцировки индуцированных плюрипотентных клеток в нейральном направлении и в направлении половых клеток, ретинальный эпителий, модели регенерации сетчатки и хрусталика глаза у хвостатых амфибий и кур, процесс морфогенеза хвоста, роговицы и

хрусталика у амфибий в условиях измененного гравитационного вектора (2g, 1g, low g) и теплового шока, процессы регенерации и трансдифференцировки в тканях глаза тритона

Изучены молекулярные механизмы пластичности клеток ретинального эпителия человека *in vitro*. Показано, что регенераторная пластичность этих клеток рекрутирует механизмы плюрипотентности, в частности активацию экспрессии РНК генов KLF4, SOX2, NANOG. Исследовано участие экзогенных стволовых и прогениторных клеток в регенерации ткани мозга мышей *in vivo*. При трансплантации прогениторных клеток из неокортекса трансгенных GFP-мышей в интактный мозг установлены переживание, гетерохрония развития в нейроны и глию клеток разного уровня дифференцировки. Изучены эпидермальные клетки нервного гребня человека, обнаружено длительное их переживание при трансплантации в интактный мозг мыши.

Изучены связанные с педоморфозом молекулярные характеристики (работа сигнальных путей и транскрипционных факторов (ТФ)) клеток - источников регенерации сетчатки и хрусталика глаза у хвостатых амфибий. Показано их высокое, однако неполное соответствие таковым «молодого» клеточного фенотипа. Продолжено изучение экспрессии ТФ семейства *Vsx* в ходе развития сетчатки кур. Выявлен ее дифференциальный пространственно-временной характер. В тканях глаза человека в раннем пренатальном развитии выявлена роль стекловидного тела и его компонентов в частности альбумина, альфа-фетопротейна и каротиноидов, в морфогенезе тканей глаза. Определены изменения их концентраций. Начато изучение влияния вызванных доксорубицином двойных разрывов ДНК на свойства мезенхимных стволовых клеток костного мозга крысы - дифференцировку, пролиферацию, регенераторный потенциал.

Результаты свидетельствуют о том, что белки теплового шока, а также FGF2 и Shh принимают участие в трансляции физического воздействия в процессе морфогенеза. Изучены механизмы регуляции входа в клеточный цикл гепатоцитов при регенерации печени мыши. В моделях повреждения/регенерации печени прослежена пространственно-временная экспрессия участников клеточной репликации - генов *Ki67* и циклинов.

Стволовые клетки мозга, трансдифференцировка мультипотентных клеток ретинального пигментного эпителия (РПЭ) глаза взрослого человека в нейральном направлении *in vitro*, трансплантация являются перспективными направлениями современных исследований. В рамках темы исследуются фундаментальные вопросы активации пролиферации и клеточный цикл эндогенных стволовых клеток мозга. Экспериментально изучаются способы интеграции экзогенных стволовых и прогениторных клеток при их трансплантации в нормальный и поврежденный мозг, ведется поиск оптимизации возраста доноров, способов введения, а также клеточные ответы в мозге

реципиента. Культуры клеток РПЭ глаза взрослого человека, полученные в ходе исследования, дают возможность изучать пластичность фенотипа этих клеток и регуляторов этого феномена; использовать их для изучения внутриклеточных механизмов пролиферативной ретинопатии и макулярной дистрофии глаза; для поиска и новых биологически активных веществ и скрининга лекарственных препаратов. Выявленные нами и другими специалистами фундаментальные основы биологии нейральных стволовых клеток, дают возможность управления их пролиферацией и дифференцировкой, а также создания на этой базе новых клеточных технологий.

Исследование молекулярно-генетических механизмов эпиморфной регенерации у животных базируется на ранее полученной информации о клеточных и тканевых событиях и на использовании современных методов, в частности ПЦР и иммунохимии. В качестве моделей исследования мы используем ткани глаза тритона (животного, обладающего высокой регенерационной способностью) в норме и на ранних этапах регенерации сетчатки и хрусталика. Хорошо разработанные модели и применение методов молекулярной биологии позволили охарактеризовать широкий спектр сигнальных, регуляторных молекул и ТФ, а также белков теплового шока и их рецепторов, ответственных за изменения клеточного фенотипа, лежащие в основе регенерации. Так, есть основания считать, что FGF2-сигналинг и HSPs в норме поддерживая жизнеспособность тканей глаза, при регенерации участвуют как в ее запуске, так и прогрессе. Данные по экспрессии белков FGF2-сигнального пути и HSPs в другой модели - регенерации хвоста - также свидетельствуют об участии этих «молекул спасения» на ранних этапах восстановления мышц, позвоночника и спинного мозга.

Изучение клеточных и молекулярных механизмов развития и регенерации сетчатки у позвоночных животных проводится на моделях развития и регенерации сетчатки глаза других амфибий, птиц, грызунов (крыса, мышь) и человека в сравнительном аспекте с учетом процессов молекулярной регуляции. Методами молекулярной биологии и иммунохимии в системах *in vivo* и *in vitro* исследуется экспрессия ТФ из семейств: Pax, Prox, Six, Sox, Rx, Otx, Pitx, Vsx, компонентов сигнальных путей FGF, TGF, Wnt; белков клеточной пролиферации: GNL3, Ki67, PCNA и стресса - HSP70 и HSP90. Показано, что исследованные молекулярные регуляторы находятся в сети взаимодействий, работают на ранних и поздних этапах развития/регенерации сетчатки и обладают при этом дифференциальной экспрессией и многофункциональностью.

Впервые изучены процессы морфогенеза глаза у тритона *Pleurodeleswalti* в ходе развития. В клетках - предшественниках нейронов эмбриональной сетчатки выявлена работа транскрипционных факторов «глазного поля», а в созревающих нейронах обнаружена и

описана их дифференциальная экспрессия. Полученные на низших позвоночных животных данные актуальны для поиска способов стимуляции восстановления сетчатки и других тканей глаза и понимания механизмов их нарушений в развитии глаза высших позвоночных и человека.

Молекулярно-биологические аспекты развития стекловидного тела (СТ) и окружающих его тканей глаза позвоночных с использованием спектроскопии поглощения и флуоресценции позволило разработать использование в качестве спектрально-флуоресцентного зонда на альбумины разных позвоночных один из скварилиевых красителей (СКК). Методами УФ-спектрофотометрии и ВЭЖХ обнаружено присутствие каротиноидов (лютеина) в стекловидном теле (СТ) плодов человека и показано, что возрастная динамика содержания каротиноидов совпадает с динамикой альбумина. Впервые показано присутствие окисленных форм лютеина в тканях глаза человека в пренатальном развитии. Параллельно с исследованием СТ изучена морфология окружающих СТ тканей глаза плодов человека в развитии и описана динамика экспрессии ряда белков, специфичных для клеточных типов сетчатки позвоночных, и сигнальных молекул.

Традиционно активно исследуется влияние условий измененного гравитационного вектора и других физических факторов (в частности теплового шока) на регенерацию у амфибий. Неоднократно показаны изменения регенерации хрусталика (ускорение, синхронизация) в реальных космических полетах. В лабораторных условиях впервые найдена и разработана модель, позволяющая изучать изменения морфогенеза при регенерации хвоста, в том числе спинного мозга и позвоночника, в зависимости от дозы гравитации. Определены клеточные механизмы явления, а также роль белков теплового шока (HSPs) и Shh-сигнального пути в этом процессе. Эти исследования позволяют определять участников процесса трансляции физического, неспецифического воздействия. Простота и изученность моделей (формообразование хрусталика, изменение формы регенерирующего хвоста *Urodela*), хорошая воспроизводимость результатов позволят в будущем расширить спектр молекул - потенциальных участников контроля морфогенеза тканей при изменении внешних условий.

Модели регенерации печени, примененные в экспериментах, а также давно и тщательно изучаемые клеточные механизмы ее восстановления позволили подойти к молекулярным исследованиям для характеристики процесса инициации гепатоцитами входа в пролиферативный цикл - ключевого события регенерации тканей, в частности печени. Определение участников процесса, последовательность их работы и соотношение на разных этапах клеточного цикла - задача экспериментальной биологии развития, также как и все перечисленные выше разделы темы, имеют непосредственное отношение и значения для

понимания способов увеличения регенераторного потенциала клеток, стимуляции процессов восстановления.

Таким образом, использование самых разнообразных моделей для исследования процессов морфогенеза, регенерации

## ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

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

### 1.1 ВВЕДЕНИЕ

Изучение морфогенеза кожи осложнено необходимостью моделирования трехмерных условий. Наиболее ценным подходом, позволяющим приблизить исследование механизмов морфогенеза кожи человека к условиям *in vivo*, является ксенотрансплантация человеческой кожи иммунодефицитным мышам. В работе опробовали модель пересадки кожи человека мышам *nude* для исследования морфогенеза волосяного фолликула человека. В качестве человеческой кожи использовали кожу крайней плоти; ее использование особенно актуально для выявления трихогенных свойств клеток, поскольку не содержит эндогенных волосяных фолликулов. В работе исследовали постнатальные клетки дермальной папиллы человека. Для регенерации волоса необходимо комбинирование клеток дермальной папиллы с эпителиальными клетками кожи. Для этого мы использовали кератиноциты человека, полученные из крайней плоти.

### 1.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Крайнюю плоть человека трансплантировали мышам линии *nude*. Кусочек кожи человека подготавливали следующим образом: промывали в растворе Хэнкса с добавлением антибиотика и антимикотика, и разрезали на две части размером примерно 10 на 10 мм, лишнюю дерму срезали, чтобы толщина кусочка кожи была не больше 5 мм. Готовый кусочек помещали в 2% раствор ЭДТА на 2,5 ч при 37 °С для ослабления связей между дермой и эпидермисом. Было опробовано два способа трансплантации кусочка кожи человека мышам, с использованием лоскута из кожи мыши для закрытия кожи человека (Рисунок 1.1) и без. В первом случае на коже мыши делали три разреза, соответствующие размерам кожи человека, оставляя четвертую сторону нетронутой для создания лоскута. Кожу человека помещали на сформированную рану, накладывали швы для прикрепления кожи человека к коже мыши. В кусочек кожи человека инъецировали клетки. Сверху кожу человека накрывали лоскутом из кожи мыши и крепили с помощью швов. Рану покрывали пластырем Tegaderm и оставляли на два месяца для приживания трансплантата и регенерации волосяных фолликулов. Лоскут выполнял функцию предохранения трансплантата от высыхания, через 2 недели лоскут подвергся некрозу и кожа человека оказывалась снаружи. В случае безлоскутной трансплантации, на коже мыши делали четыре

разреза, соответствующие размерам кожи человека, который крепили с помощью швов со всех сторон, далее в кусочек кожи человека инъецировали клетки и покрывали рану пластырем Tegaderm. Через 2 месяца мышей умерщвляли, извлекали трансплантат, который замораживали в парах жидкого азота для дальнейшего изучения на криосреззах.

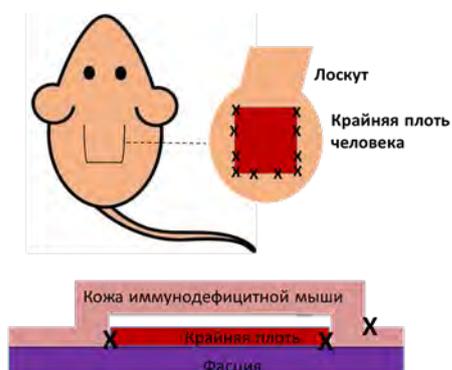


Рисунок 1.1- Схема трансплантации кожи человека мышце с использованием лоскутной методики.

### 1.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Трансплантаты крайней плоти человека, пересаженные на спину иммунодефицитных мышей, оценивали на предмет целостности и сохранения трансплантата в течение двух месяцев. Клеточные суспензии, вводимые в трансплантат, проверяли на способность индуцировать формирование волосяных фолликулов. Были опробованы две методики трансплантации: с использованием лоскута из мышинной кожи и без. Сначала мы проводили трансплантации без использования лоскута (Рисунок 1.2а). Через две недели после трансплантации, мы обнаружили, что кожа человека значительно сокращалась в размерах, эпидермис был сухим и открепленным от дермы (Рис. 2б). Мы предположили, что это происходит из-за высыхания трансплантата, поскольку имели проблемы с сохранением перевязочного материала на мыши. При проведении гистологического анализа через 2 месяца мы не обнаружили структуры кожи, имеющие человеческое происхождение, эпидермис был сформирован кератиноцитами мыши (Рисунок 1.2в).

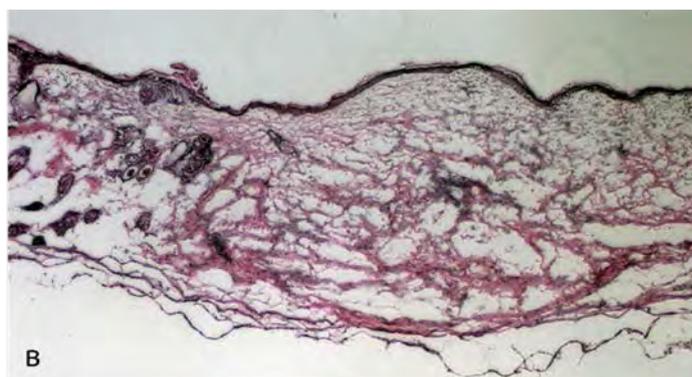


Рисунок 1.2 - Безлоскутная трансплантация. а-день трансплантации, б-через 2 недели, в-гистологический анализ трансплантата через 2 месяца, гематоксилин-эозин..

Лоскутная методика (Рисунок 1.3а,б) позволила сохранить трансплантат увлажненным, что способствовало его сохранению. Через 4 недели после трансплантации, трансплантат выглядел целостным, и совсем немного сконтрактировавшимся (Рисунок 1.3в). Гистологическое исследование через 2 месяца выявило, что человеческая кожа хорошо интегрировалась в кожу мыши, сохранялся человеческий эпидермис, что было подтверждено морфологией клеток (Рисунок 1.3г) и окрашиванием на белок клеточного ядра человека Human Nuclei (Рисунок 1.4).



Кожа человека

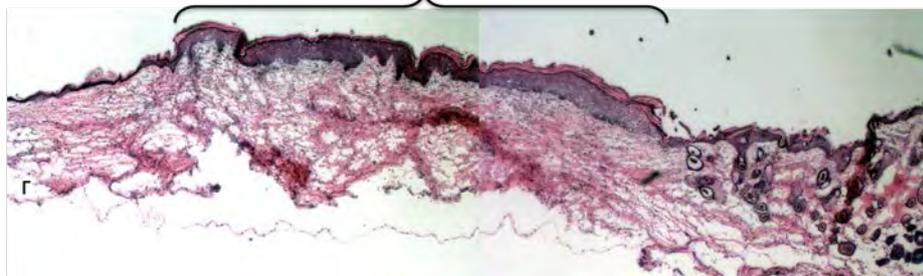


Рисунок 1.3 - Трансплантация с использованием лоскута кожи мыши. а,б - день трансплантации, в - через 4 недели, г – гистологический анализ трансплантата через 2 месяца, гематоксилин-эозин.

Кожа человека

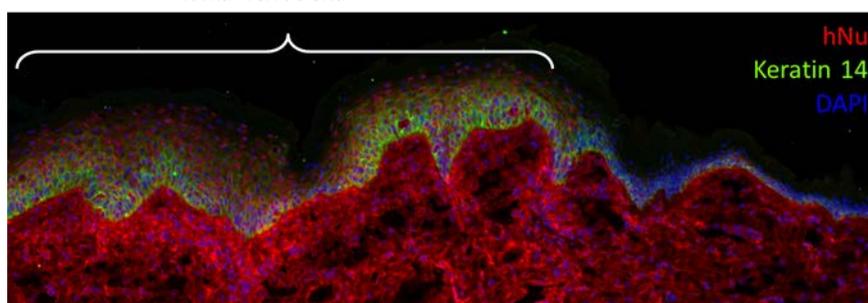


Рисунок 1.4. Окраска трансплантата с помощью антител к Human Nuclei.

Через 2 месяца оценивали свойство инъецированных клеток индуцировать формирование волосяных фолликулов. Клетки дермальной папиллы человека в смеси с кератиноцитами из

крайней плоты были способны формировать волосяные фолликулы в нашей системе (Рис. 5а). Эпителий волосяных фолликулов был сформирован клетками человека, что было подтверждено окраской клеток антителами к Human Nuclei (Рисунок 1.5б)

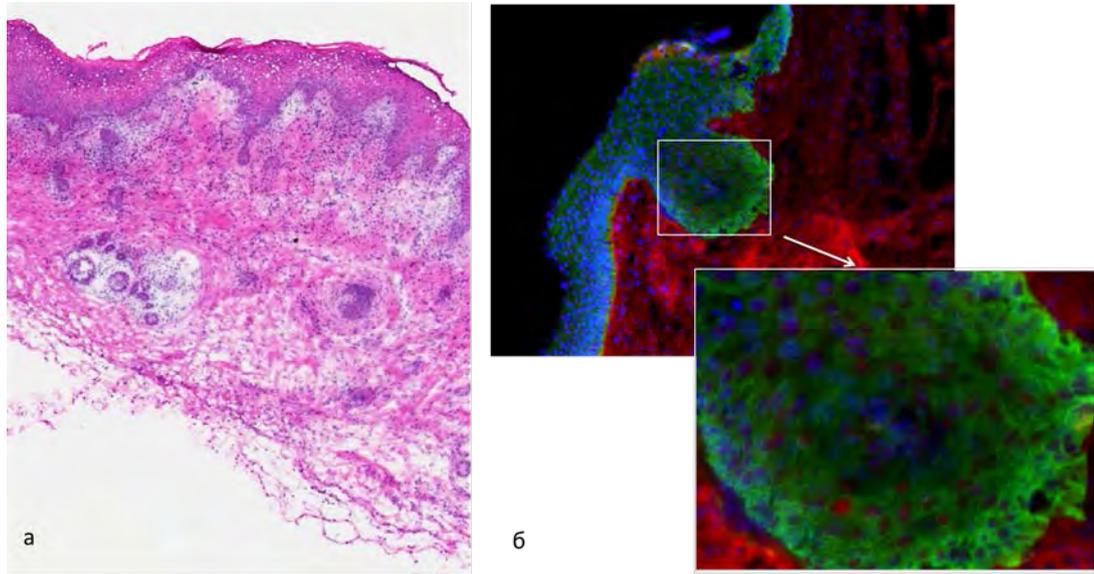


Рисунок 1.5 - Формирование волосяных фолликулов в трансплантате при инъекции клеток дермальной папиллы. а – гистологический анализ трансплантата через 2 месяца, гематоксилин-эозин; б – иммуногистологический анализ трансплантата, окраска антителами к кератину 14 (зеленый), к Human Nuclei (красный).

#### 1.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашем исследовании мы подтвердили, что мыши линии nude являются оптимальной моделью для сохранения трансплантата кожи человека, по крайней мере, в течение двух месяцев. Клетки человека могут индуцировать морфогенез волосяных фолликулов при трансплантации их в безволосую крайнюю плоть человека.

## Раздел 2 Нейральная дифференцировка индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека

### 2.1 ВВЕДЕНИЕ

Ранее было получено несколько линий ИПСК от разных доноров, включая носителей наследственных заболеваний, в т.ч. с трисомией 21-й хромосомы (синдром Дауна). При помощи отработанных протоколов направленной дифференцировки ИПСК человека в нейральном направлении, были получены несколько культур терминально дифференцированных нейронов (4 – от здоровых разных доноров и 4 – от разных доноров с синдромом Дауна). Для корректного анализа степени нейральной дифференцировки мы решили применить метод ОТ-ПЦР в реальном времени. Данный метод является распространенным методом количественного анализа уровней экспрессии генов-маркеров. Существует несколько подходов к нормировке результатов, однако наиболее распространенным является способ с использованием генов домашнего хозяйства. Данный метод основан на допущении, что гены домашнего хозяйства экспрессируются на одном уровне во всех типах клеток. Однако, было показано, что между разными типами клеток уровень экспрессии гена домашнего хозяйства может отличаться даже в десять раз. Так же, уровень экспрессии генов домашнего хозяйства в клетках одного типа, полученных из разных источников, может отличаться в 3-4 раза. Также может быть проблематичным использование данного метода при работе с гетерогенными клеточными культурами, так как различные компоненты гетерогенной культуры могут иметь различные профили экспрессии генов домашнего хозяйства. Таким образом, использование одного гена домашнего хозяйства для точной нормировки результатов пцр-анализа в реальном времени не достаточно. Особенно остро данный вопрос встает при работе с клетками, полученными трансдифференцировкой из ИПСК. Для отслеживания процесса дифференцировки приходится сравнивать уровни экспрессии генов в ИПСК и клетках другого типа, метаболизм, а следовательно и профиль экспрессии генов домашнего хозяйства, в которых может значительно отличаться.

В 2002 году в статье [6] был предложен алгоритм нормировки результатов пцр-анализа в реальном времени с использованием сразу нескольких генов домашнего хозяйства. Для нормировки предлагалось использовать следующие 10 генов (ACTB, B2M, GAPD, HMBS, HPRT1, RPL13A, SDHA, TBP, UBC, YWHAZ). Однако, иногда для нормировки приходится использовать и другие гены, например, гены, кодирующие актин, тубулины и так далее [5]. Таким образом, вопрос оптимальной группы генов домашнего хозяйства, из которых можно было выбрать гены для нормировки в конкретном эксперименте, оставался

открытым. В 2013 году в статье [1] были приведены результаты транскриптомного анализа, направленного на поиск генов домашнего хозяйства, и на отбор из найденных генов наиболее стабильно экспрессирующихся в различных типах клеток. В итоге было выбрано 11 генов (C1orf43, CHMP2A, EMC7, GPI, PSMB2, PSMB4, RAB7A, REEP5, SNRNP3, VCP, VPS29), среди которых не оказалось ни одного гена из статьи [6].

В данной работе мы показали, что используя 9 генов из статьи [6] (ACTB, B2M, GAPD, HMBS, HPRT1, RPL13A, SDHA, UBC, YWHAZ) и 7 генов из статьи [1] (C1orf43, EMC7, GPI, PSMB4, REEP5, SNRNP3, VCP) можно точно нормировать результаты пцр-анализа в реальном времени для ИПСК, полученных из них нейтральных предшественников, а так же зрелых нейрональных культур. Стабильность экспрессии некоторых генов домашнего хозяйства позволяет сравнивать и различные типы клеток между собой, позволяя отслеживать прохождение дифференцировки в нейтральном направлении с помощью пцр в реальном времени. Также мы отобрали шесть генов с наиболее стабильной экспрессией в рассмотренных культурах клеток.

Создание трехмерных нейроэктодермальных органоидов, является новым перспективным подходом для моделирования связанных с головным мозгом заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера (БА), поскольку трехмерная структура этих органоидов может поддерживать лучшую дифференцировку и созревание полученных нейронных клеток по сравнению с двухмерными культурами. В этой работе мы также применили подобный подход и получили органоиды для моделирования БА *in vitro*. Мы использовали ИПСК от доноров с синдромом Дауна (трисомия 21-й хромосомы, T21), которые входят в группу риска возникновения ранней формы БА. Мы сравнили секрецию двух различных изоформ бета-амилоида, уровня апоптоза и профили экспрессии различных генов-маркеров ассоциированных с БА, в органоидах с T21 и с нормальным кариотипом. Также мы сравнили экспрессию генов маркеров нейронной дифференцировки в 2D и 3D условиях для сравнения эффективности дифференцировки в обоих случаях. В конечном итоге мы определили признаки начальных стадий болезни Альцгеймера, таких как гиперсекреция бета-амилоида (изоформы 40 и 42) и гиперэкспрессия ряда генов, связанных с БА.

## 2.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### *Получение культур ИПСК*

Синтез и упаковку лентивирусных конструкций с генами Oct4, Sox2, c-Myc, KLF4 осуществляли в компании Евроген (ООО «Евроген», Россия). Клетки амниотической жидкости культивировали на среде Чанга с добавлением 10% FBS, за сутки перед

трансфекцией рассаживали в чашки Петри Ø 6см, примерно 100 тыс. клеток в одну чашку. Далее проводили ко-трансфекцию четырьмя конструкциями Oct4, Sox2, c-Мус, KLF4. Через сутки вирусный сток сливали и наливали полную ростовую среду для AFS с добавлением 20ng/ml bFGF. Примерно 7 суток наблюдали рост колоний клеток с морфологией ES клеток, после чего меняли среду на mTeSR1 (Stem Cell Technologies). Примерно через 14 суток, колонии с ярко-выраженной морфологией плюрипотентных стволовых клеток механически переносили в отдельные лунки 24-луночного планшета и культивировали как отдельные линии ИПСК на среде mTeSR1. Пластик покрывали раствором матригеля (1/40 в DMEM/F12) (BD Bioscience). Для пассирования применяли раствор Диспазы 1 мкг/мл в DMEM/F12 (Stem Cell Technologies)

#### *Дифференцировка ИПСК в нейральном направлении*

За сутки перед индукцией дифференцировки ИПСК высевали в чашки Петри Ø 6см, примерно 100 тыс.клеток в одну чашку. На следующий день среду mTeSR1 меняли на среду для индукции нейральной дифференцировки Neural Induction Medium (Stem Cell Technologies).Через 7-10 суток, наблюдали появление характерных нейральных розеток. Нейральные розетки селективно снимались с пластика при помощи Neural Rosette Selection Reagent (Stem Cell Technologies) и пересаживались в отдельную чашку Петри Ø6см, покрытую матригелем (1/40 в DMEM/F12). Нейральные предшественники культивировались на среде Neural Proliferation Medium (Stem Cell Technologies) в течение 1-3 пассажей. Перед терминальной нейрональной дифференцировкой, клетки-предшественники рассеивались в пластиковую культуральную посуду, покрытую матригелем, в плотности 20 тыс. клеток/см<sup>2</sup>. Через сутки среду меняли на Neural Differentiation Medium (Stem Cell Technologies) и в дальнейшем культивировали только на ней. После 28-42 суток в дифференцировке, клетки выводили из эксперимента и анализировали.

#### *Иммуоцитохимия*

Перед окраской антителами, клетки промывали один раз раствором PBS, после чего фиксировали 4%-м параформальдегидом 15 мин при комнатной температуре. Далее промывали 3 раза раствором PBS и окрашивали последовательно первичными и вторичными антителами, растворенными в блокирующем растворе (PBS + 10%FBS + 0,1% Tryton-X-100). Перед съемкой препараты докрасивали раствором DAPI (1 мкг/мл в PBS). Фотографирование производили на инвертированном флуоресцентном микроскопе Olympus CKX41.

#### *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».

#### *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 1,8 микрограмм полученной ранее РНК.

#### *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 «7500 Real-Time PCR System» фирмы «Applied Biosystems». Праймеры подбирались с помощью PrimerBlast. 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.

#### *Оценка стабильности экспрессии гена домашнего хозяйства*

Данная оценка основана на том, что отношение уровней экспрессии двух идеальных генов домашнего хозяйства есть константа для всех образцов вне зависимости от условий эксперимента и типа исследуемых клеток. Однако, определенное экспериментально, данное соотношение различается в зависимости от исследуемых образцов. Чем оно больше, тем сильнее рассматриваемые гены меняют уровни экспрессии друг относительно друга, чем оно меньше, тем стабильнее уровни экспрессии рассматриваемых генов. Чтобы количественно оценить стабильность экспрессии одного гена, можно вычислить для него попарную вариацию соотношения уровня экспрессии по отношению ко всем остальным анализируемым генам. Усреднив полученные значения мы получим оценку стабильности экспрессии, обозначаемую буквой M. (Для удобства используют двоичный логарифм соотношений уровней экспрессии вместо соотношений уровней экспрессии. Более подробно с описанием данного метода можно ознакомиться в [6]).

#### *Определение достаточного для нормировки результатов набора генов*

Для этого мы последовательно вычислили среднее геометрическое уровней экспрессии  $U_i = \sqrt[i]{(U_1 * \dots * U_i) / i}$ , где  $i \in [2; 16]$  для от 2 до 16 наиболее стабильноэкспрессирующихся генов домашнего хозяйства для каждой культуры клеток.

Величина  $U_i$  называется нормировочным фактором. Для оценки влияния добавления каждого последующего гена домашнего хозяйства к набору генов, используемых при нормировке, мы вычислили стандартное отклонение двоичного логарифма отношения уровней экспрессии  $V_{i;i+1} = \text{st.dev}(\left[ \log_2 \frac{U_{1i}}{U_{(1;i+1)}}; \dots; \log_2 \frac{U_{ki}}{U_{(k;i+1)}} \right])$ , где  $i \in [2; 16]$ ,  $k$  обозначает номер образца, используемого в анализе. Величина  $V_{i;i+1}$  показывает, как сильно влияет на нормировочный фактор добавление еще одного гена. Размерность данной величины — циклы ПЦР. Если влияние  $(i+1)$ -го гена невелико (меньше 0,15), то считается, что набора из  $i$  генов достаточно для точной нормировки. Величина  $V_{i;i+1}$  является «разбросом» величины нормировочного фактора, выраженным в долях цикла ПЦР. Эту величину можно использовать для оценки точности нормировки результатов по  $i$  генам.

## 2.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### *1. Определение оптимального набора генов домашнего хозяйства для нормализации результатов количественного ОТ-ПЦР в реальном времени*

В данной работе были использованы следующие группы клеток: фибробласты (3 культуры), плюрипотентные клетки (5 культур ИПСК и 1 культура ЭСК), нейральные предшественники (7 культур), полученные из ИПСК, а так же зрелые нейрональные культуры (7 культур), полученные из нейральных предшественников.

В ходе работы были подобраны праймеры к генам C1orf43, EMC7, GPI, PSMB4, REEP5, SNRPD3, VCP. Для определения уровней экспрессии генов ACTB, B2M, GAPD, HMBS, HPRT1, RPL13A, SDHA, UBC, YWHAZ были использованы праймеры из статьи [6].

Таблица 1 -Подобранные с помощью Primer-Blast праймеры.

C1orf43	ACGCCTTTCAAGGGTGTACG
	CAAAGACCCCTGTCCCATAGC
EMC7	AAAGGAGGTAGTCAGGCCGT
	GTTGCTTCACACGGTTTTCCA
GPI	CCGCGTCTGGTATGTCTCC
	CCTGGGTAGTAAAGGTCTTGGA
PSMB4	CATTCCGTCCACTCCCGATT
	CGAACTTAACGCCGAGGACT
REEP5	ACTGCATGACTGACCTTCTGG
	AGTCCGATGACACCAAGAGC
SNRPD3	CATTGAAGCAGAGGACAACATGA

	TCTTTAACATGGGTGCGTTCTT
VCP	GTGTTGGGGTGCCATTTGAA
	ATCACCAACCAGGGGATGTT

Таблица 2 - Праймеры, взятые из статьи [6]..

ACTB	CTGGAACGGTGAAGGTGACA
	AAGGGACTTCCTGTAACAATGCA
B2M	TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCT
	TCTCTGCTCCCCACCTCTAAGT
GAPDH	TGCACCACCAACTGCTTAGC
	GGCATGGACTGTGGTCATGAG
HMBS	GGCAATGCGGCTGCAA
	GGGTACCCACGCGAATCAC
HPRT1	TGACACTGGCAAAACAATGCA
	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT
RPL13A	CCTGGAGGAGAAGAGGAAAGAGA
	TTGAGGACCTCTGTGTATTTGTCAA
SDHA	TGGGAACAAGAGGGCATCTG
	CCACCACTGCATCAAATTCATG
UBC	ATTTGGGTCGCGGTTCTTG
	TGCCTTGACATTCTCGATGGT
YWHAZ	ACTTTTGGTACATTGTGGCTTCAA
	CCGCCAGGACAAACCAGTAT

Далее мы определили уровни экспрессии всех 16 генов домашнего хозяйства во всех рассматриваемых культурах клеток. Мы оценили стабильность их экспрессии, воспользовавшись подходом, предложенным в [6]. Мы оценили стабильность экспрессии генов домашнего хозяйства для следующих групп клеток: фибробласты, плюрипотентные клетки, нейральные предшественники, зрелые нейральные культуры, все культуры. Результаты представлены в Таблице 3.

Таблица 3 - Оценка стабильности экспрессии M.

Фибробласты		Плюрипотентные стволовые клетки		Нейральные предшественники		Нейрональные культуры		Все культуры	
HMBS	0,53	YWHAZ	0,65	REEP5	0,65	PSMB4	0,66	PSMB4	0,94

PSMB4	0,54	GAPDH	0,67	PSMB4	0,66	C1orf43	0,73	GAPDH	0,97
SDHA	0,54	C1orf43	0,77	HMBS	0,67	GAPDH	0,77	C1orf43	0,99
GAPDH	0,55	REEP5	0,79	YWHAZ	0,71	HPRTI	0,77	HMBS	1,02
RPLI3A	0,57	ACT	0,79	C1orf43	0,73	VCP	0,82	YWHAZ	1,04
EMC7	0,57	SNRPD3	0,82	SDHA	0,78	YWHAZ	0,83	REEP5	1,10
HPRTI	0,58	HMBS	0,84	GAPDH	0,79	HMBS	0,85	HPRTI	1,11
C1orf43	0,59	EMC7	0,84	UBC	0,81	REEP5	0,87	EMC7	1,11
REEP5	0,62	HPRTI	0,85	ACT	0,87	SDHA	0,88	ACT	1,13
VCP	0,64	PSMB4	0,86	EMC7	0,87	GPI	0,91	SDHA	1,15
B2M	0,64	SDHA	0,91	HPRTI	0,92	EMC7	0,92	SNRPD3	1,23
YWHAZ	0,73	UBC	0,93	VCP	0,98	SNRPD3	0,92	VCP	1,24
ACT	0,77	VCP	0,96	SNRPD3	1,07	RPLI3A	0,98	GPI	1,28
GPI	1,14	RPLI3A	0,99	B2M	1,10	UBC	1,02	RPLI3A	1,40
UBC	1,19	GPI	1,09	GPI	1,13	ACT	1,03	UBC	1,48
SNRPD3	1,23	B2M	1,11	RPLI3A	1,51	B2M	1,19	B2M	1,83

Из данной таблицы видно, что для каждой группы клеток наиболее стабильной экспрессией обладают разные гены, однако, стоит отметить, что такие гены как PSMB4, GAPDH, HMBS, C1orf43, REEP5 и YWHAZ чаще всего входят в пятерку генов с наиболее стабильной экспрессией.

Затем, мы определили достаточный для нормировки результатов ПЦР в реальном времени набор генов для каждой группы клеток (Рисунок 2.1).

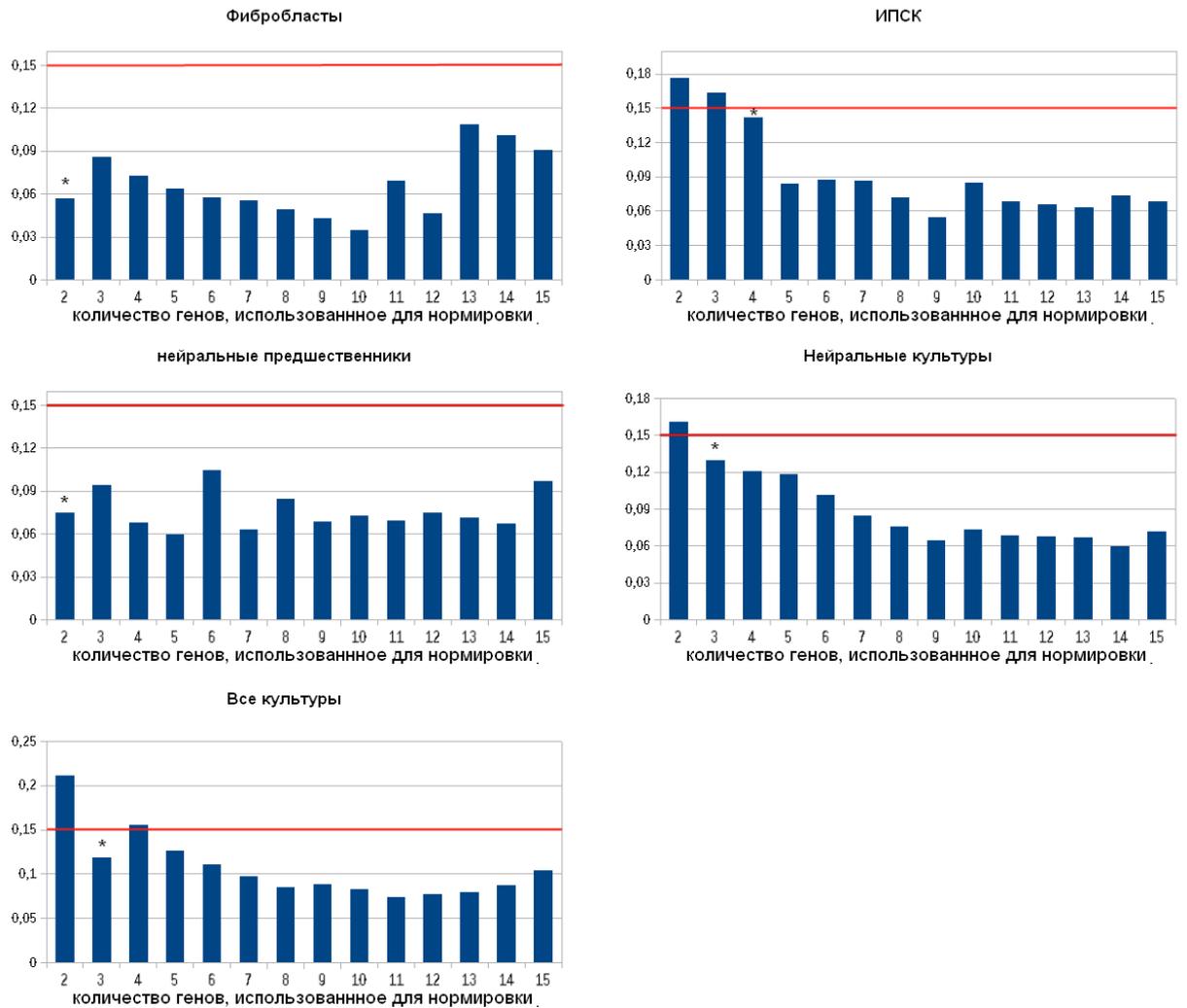


Рис. 2.1 - Точность нормировки для разных групп клеток.

Мы видим, что для точной нормировки результатов ПЦР для фибробластов и нейральных стволовых клеток достаточно всего двух генов домашнего хозяйства — HMBS и PSMB4 для фибробластов, REEP5 и PSMB4 для нейральных стволовых клеток. Группы культур ПСК (YWHAZ, GAPDH, C1orf43, REEP5), нейрональные культуры (PSMB4, C1orf43, GAPDH) и все культуры вместе взятые (PSMB4, GAPDH, C1orf43) требуют трех или четырех генов для точной нормировки. Скорее всего это связано с гетерогенностью данных групп клеточных культур. Дело в том, что культуры ИПСК могут содержать примеси дифференцированных культур, процесс репрограммирования до плюрипотентного состояния является стохастическим [4], [3], что может отражаться и на профиле экспрессии генов домашнего хозяйства, нейрональные культуры содержат в себе субпопуляции различных типов нейронов, глии и некоторое количество недифференцированных клеток [2].

Удивляет, что при работе с ПСК приходится использовать 4 гена домашнего хозяйства, тогда как для нормировки результатов для всех культур достаточно всего 3 генов.

На наш взгляд, это связано с тем, что индивидуальные различия культур ПСК «сглаживаются» при добавлении в анализ большого количества культур. Так, используемые при вычислении V2-3 значения логарифмов отношений средних уровней экспрессии PSMB4, GAPDH к PSMB4, GAPDH, C1orf43 имеют наибольшее стандартное отклонение в группе ПСК. К тому же между минимальным и максимальным значением в группе ПСК укладываются значения для 14 из 17 неплюрипотентных культур (в соответствии с рисунком 2.2).

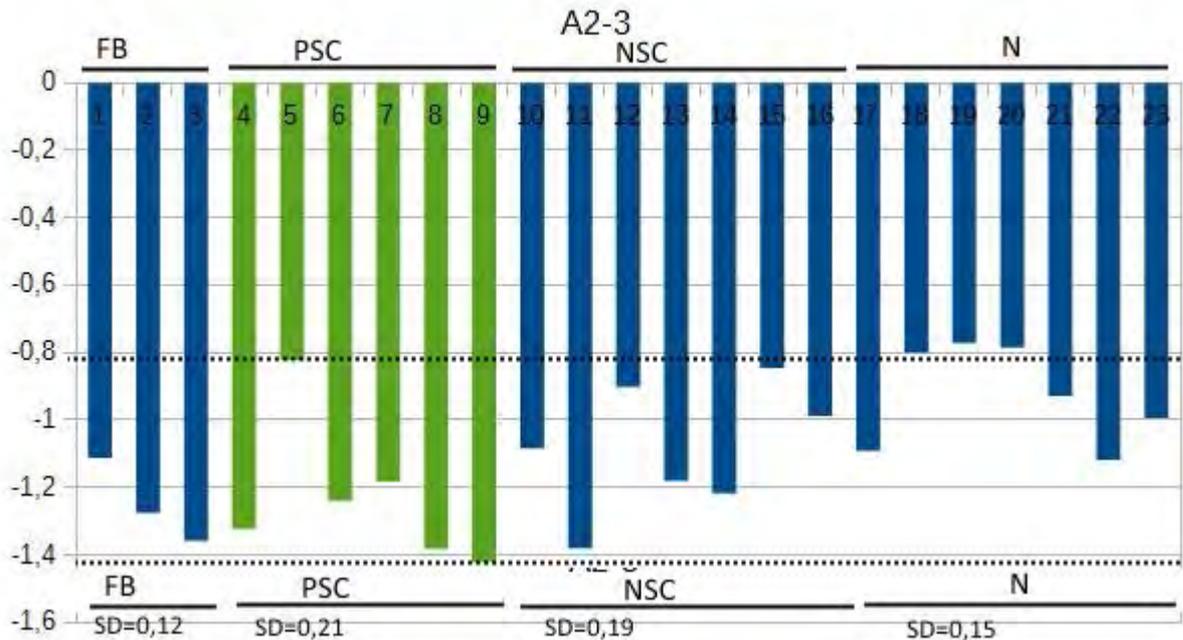


Рисунок 2.2 - Двоичный логарифм отношений средних уровней экспрессии PSMB4, GAPDH к PSMB4, GAPDH, C1orf43 в рассматриваемых культурах клеток.

Также стоит обратить внимание, что большее количество культур позволяет аккуратнее оценить точность нормировки. В силу того, что значение V3-4 для ПСК составляет 0,16 при пороговом значении 0,15 повышение точности оценки V3-4 даже всего на 6,5% может позволить получить значение V3-4 ниже порогового 0,15 и использовать для корректной нормировки всего три гена вместо четырех.

Чтобы окончательно убедиться в справедливости использования для нормировки результатов ПЦР всех культур трех генов PSMB4, GAPDH, C1orf43, мы вычислили значения V2-3 и V3-4 (в качестве четвертого гена использовали HMBS) для каждой «подгруппы» (в соответствии с рисунком 2.3). Так как каждая из подгрупп в отдельности (фибробласты, ПСК, нейральные стволовые клетки, нейральные культуры) нормируется с точностью не более 0,15 цикла по трем генам, мы заключаем, что

использование PSMB4, GAPDH и C1orf43 для нормировки результатов для всех культур корректно.

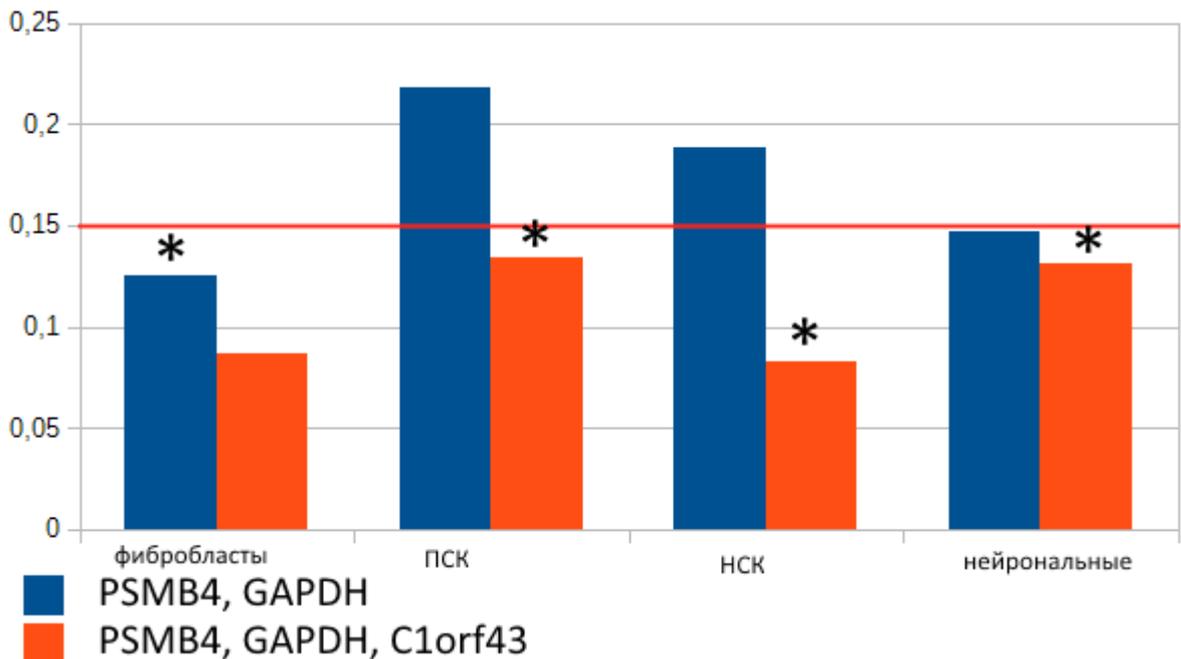


Рисунок 2.3 - Точность нормировки при использовании пары PSMB4 и GAPDH, тройки PSMB4 и GAPDH, C1orf43 для фибробластов, ПСК, НСК, нейрональных культур.

Обратим внимание, что для точной нормировки для каждой группы генов были использованы различные комбинации из шести генов: C1orf43, GAPDH, HMBS, PSMB4, YWHAZ, REEP5. В связи с тем, что использование 16 генов для определения оптимального набора генов домашнего хозяйства для нормировки результатов пцр является достаточно трудоемким, мы попробовали ограничиться работой только с шестью генами. Мы показали, что использование всего шести генов C1orf43, GAPDH, HMBS, PSMB4, YWHAZ, REEP5 позволяет получить результаты, не уступающие по точности нормировки, полученным при работе с 16 генами (Рисунок 2.4). В связи с этим, мы предлагаем начинать работу по поиску оптимального набора генов для нормировки результатов ПЦР с шести генов: C1orf43, GAPDH, HMBS, PSMB4, YWHAZ, REEP5.

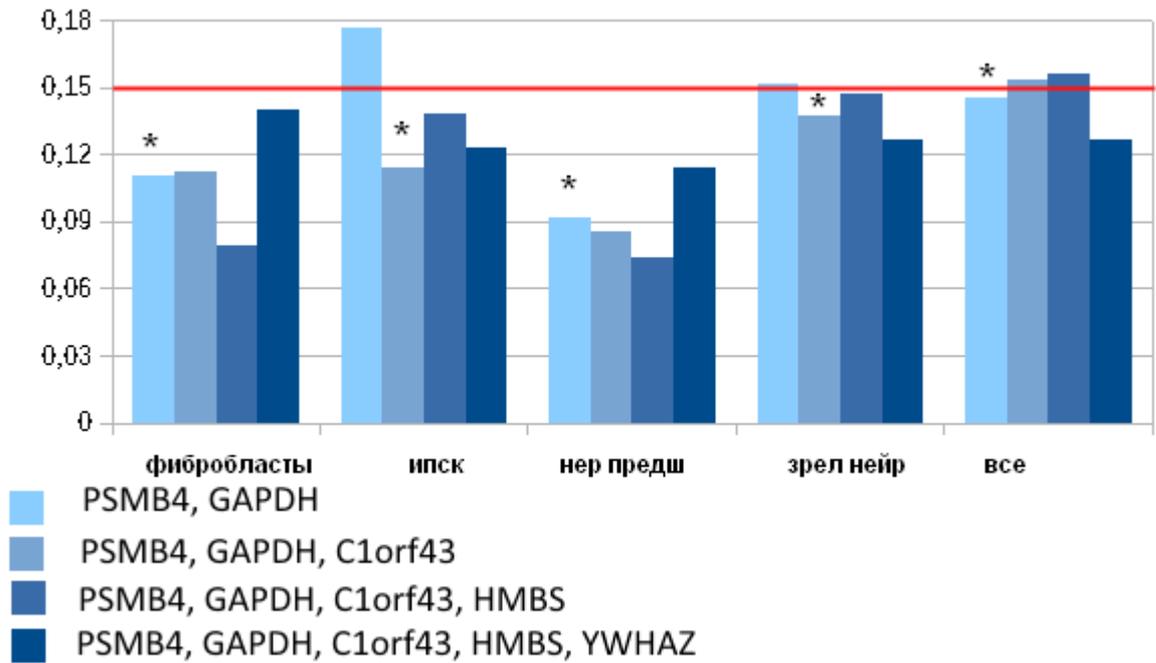


Рисунок 2.4 - Точность нормровки при использовании шести генов для поиска оптимального набора нормировочных генов.

В заключении для каждой культуры клеток мы определили уровни экспрессии генов GAPDH, C1orf43, PSMB4, а так же среднего от PSMB4 и GAPDH; PSMB4, GAPDH и C1orf43 относительно наиболее оптимального набора генов для группы «все клетки»: GAPDH, ACT, HMBS, HPRT1, SDHA, YWHAZ, C1ORF, EMC7, PSMB4, REEP5, SNRPD3. Уровни экспрессии генов, откалиброванные по одному образцу фибробластов представлены на Рисунках 2.5а и 2.5б.

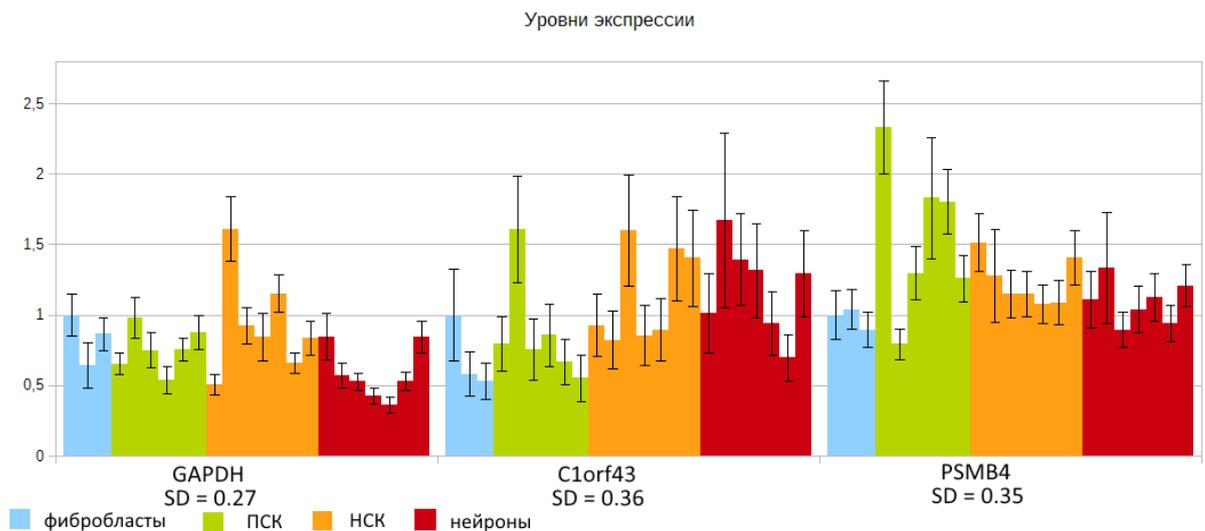


Рисунок 2.5а - Уровни экспрессии GAPDH, C1orf43, PSMB4. Для удобства полученные значения были откалиброваны по одной культуре фибробластов. Синим цветом показаны фибробласты, зеленым — ПСК, оранжевым — НСК, красным — нейрональные культуры.

## Уровни экспрессии

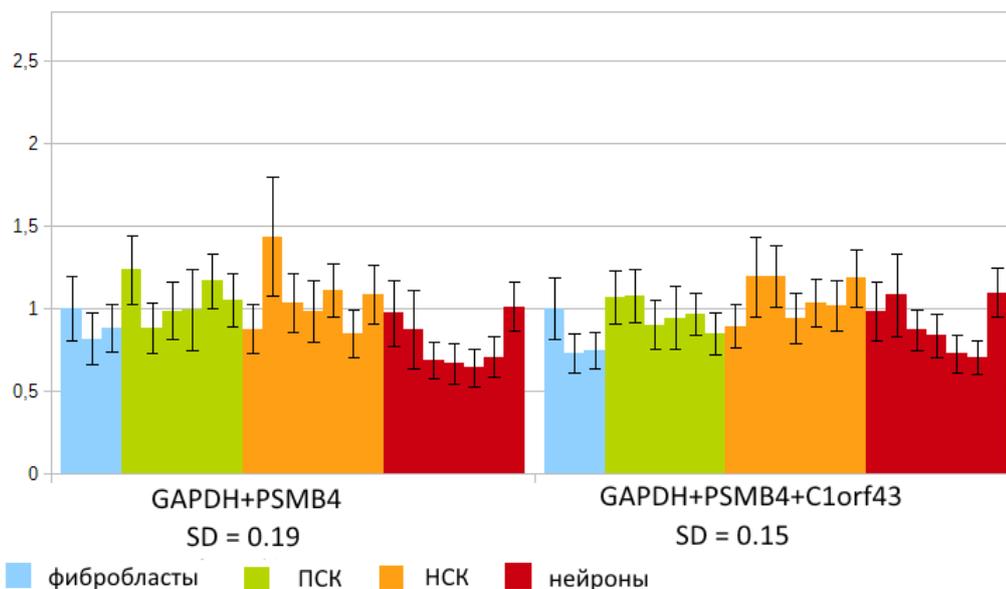


Рисунок 2.5б - Средние уровни экспрессии наборов GAPDH и PSMB4, GAPDH и PSMB4 и C1orf43 во всех культурах клеток, использованных в данной работе, нормированные по генам GAPDH, ACT, HMBS, HPRT1, SDHA, YWHAZ, C1ORF, EMC7, PSMB4, REEP5, SNRPD3. Для удобства полученные значения были откалиброваны по одной культуре фибробластов. Синим цветом показаны фибробласты, зеленым — ПСК, оранжевым — НСК, красным — нейрональные культуры.

Гистограммы на Рисунках 2.5а и 2.5б наглядно демонстрируют преимущество использования нескольких генов домашнего хозяйства для нормировки результатов ПЦР. Уменьшение стандартного отклонения уровня экспрессии среднего от GAPDH, PSMB4, C1orf43 до 15% еще раз подтверждает корректность «общей» нормировки результатов пцр в нашей работе.

### 2. Создание и культивирование трехмерных нейроэктодеральных органоидов из ИПСК, в том числе от доноров с синдромом Дауна

В этом исследовании мы использовали две линии клеток IPS, полученные из клеточного банка ATCC: IPS-DYP (трисомия хромосомы 21) и IPS-KYOU (нормальный кариотип). Мы сравнили экспрессию плюрипотентных маркеров в этих клеточных линиях с помощью иммуноцитохимии и qRT-PCR. Как показано на Рисунке 2.6, уровни экспрессии плюрипотенсивных основных генов OCT4, SOX2, NANOG, LIN28 и плюрипотенсивные маркеры DPPA4 и TDGF1 сходны в обеих клеточных линиях. Он может указывать равную дифференцировочную способность линий IPS-DYP и IPS-KYOU.

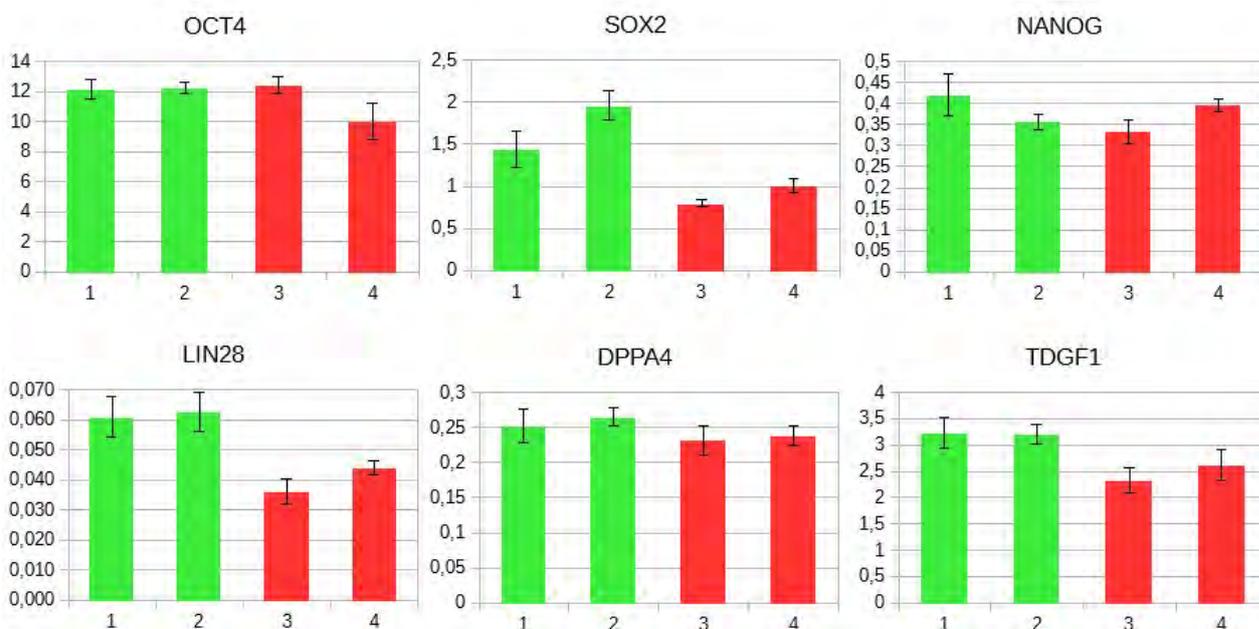


Рисунок 2.6 - Уровни экспрессии генов OCT4, SOX2, NANOG, LIN28, DPPA4 и TDGF1 в линиях IPS-KYOU (зеленый) и IPS-DYP (красный). Были выполнены два биологических повтора. Гены GAPDH, PSMB4, HMBS, C1ORF43 использовались для нормализации данных qRT-PCR.

Затем из указанных линий ИПСК нами были получены трехмерные нейроэктодермальные органоиды. В то же время мы производили двумерные нейронные культуры из ИПСК для сравнения различий в 2D и 3D-условиях. На Рисунке 2.7 представлена схема эксперимента. Мы отслеживали нейронную дифференцировку клеток при помощи анализа на иммуноцитохимию и qRT-PCR. Полученные данные отражены на Рисунке 2.8. Мы показали, что 3D-органоиды экспрессируют Nestin, hNCAM, TUBB3 и GFAP. Динамика экспрессии нейронных маркеров TUBB3, NSE, PAX6, GFAP и MART1 и маркеры плюрипотентности SOX2, OCT4, TDGF1 указывают на успешную нейральную дифференцировку как в 2D, так и в 3D условиях. Как правило, мы наблюдали экспрессию нейронных маркеров и снижение экспрессии маркеров плюрипотентности во время дифференцировки.

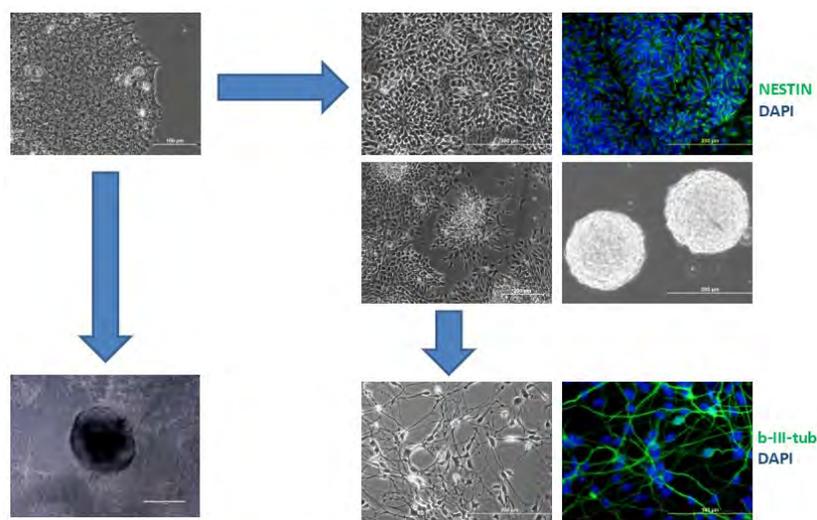


Рисунок 2.7 - Схема эксперимента

Далее мы измерили экспрессию нейронных маркеров в трехмерных органоидах, полученных из клеток с нормальным кариотипом и клетками от доноров с синдромом Дауна (T21). Мы наблюдали сопоставимые профили экспрессии этих генов в обеих культурах (Рисунок 2.9). Повышенный уровень экспрессии гена маркера глиальной дифференцировки GFAP и снижение уровня генов PAX6 и TUBB3 у нормальных органоидов могут свидетельствовать о том, что относительная доля глиальных клеток в этих культурах несколько увеличивалась, тогда как доля нейрональных клеток была несколько уменьшена по сравнению с органоидами DS. Тем не менее, мы рассматриваем оба типа органоидов, подобных и подходящих для сравнения гальдам AD.

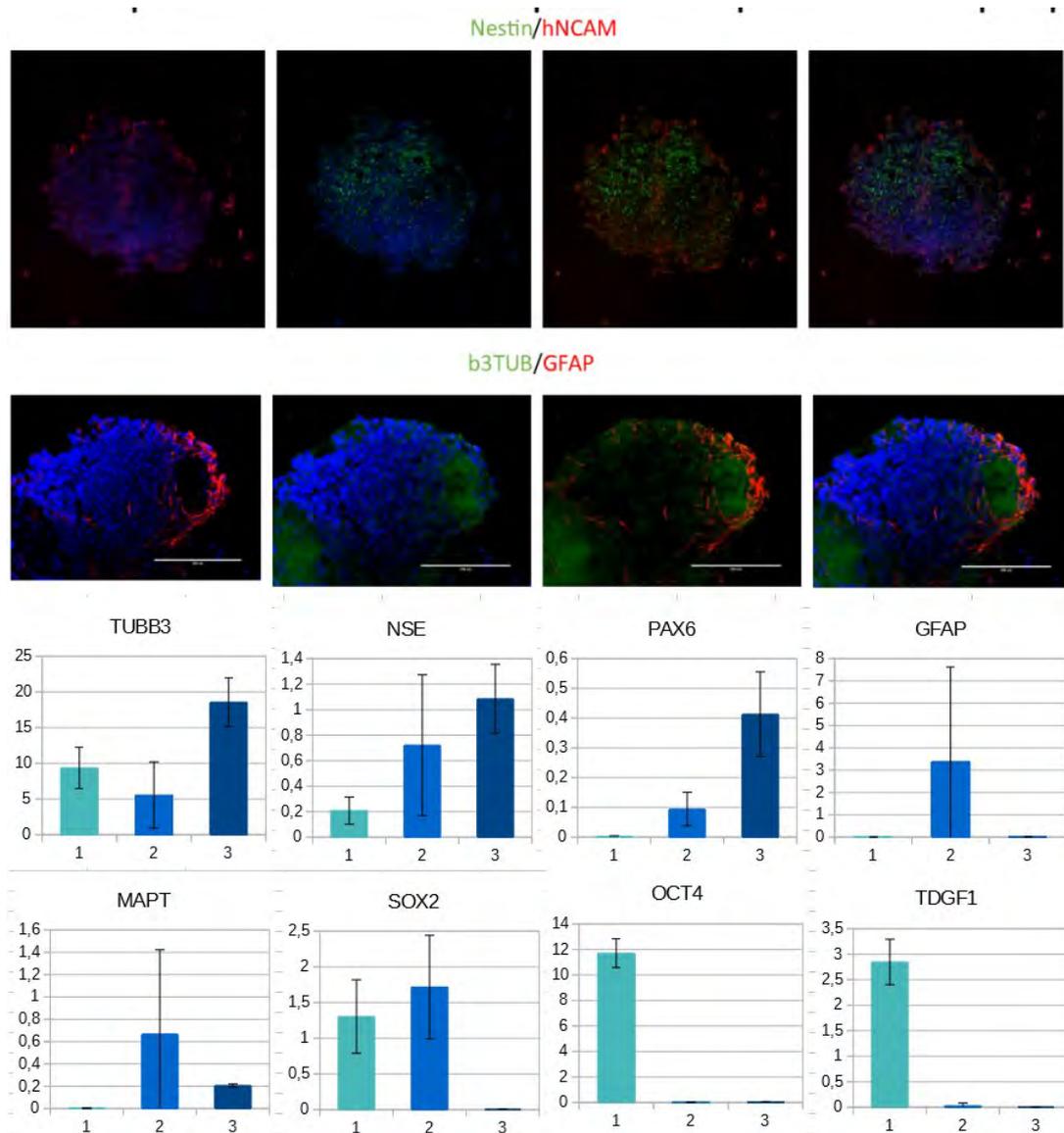


Рисунок 2.8 - Иммуноцитохимическое окрашивание органоидов антителами против нейронных маркеров Nestin, hNCAM, TUBB3, GFAP. Гистограммы отражают динамику уровня экспрессии мРНК во время дифференцировки в нейральном направлении. Экспрессия нейронных маркеров TUBB3, NSE, PAX6, GFAP и MAPT и маркеров плюрипотентности SOX2, OCT4, TDGF1 показаны в клетках IPS (лазурный), 2D-нейронных культурах (синий) и трехмерных органоидах (темно-синий).

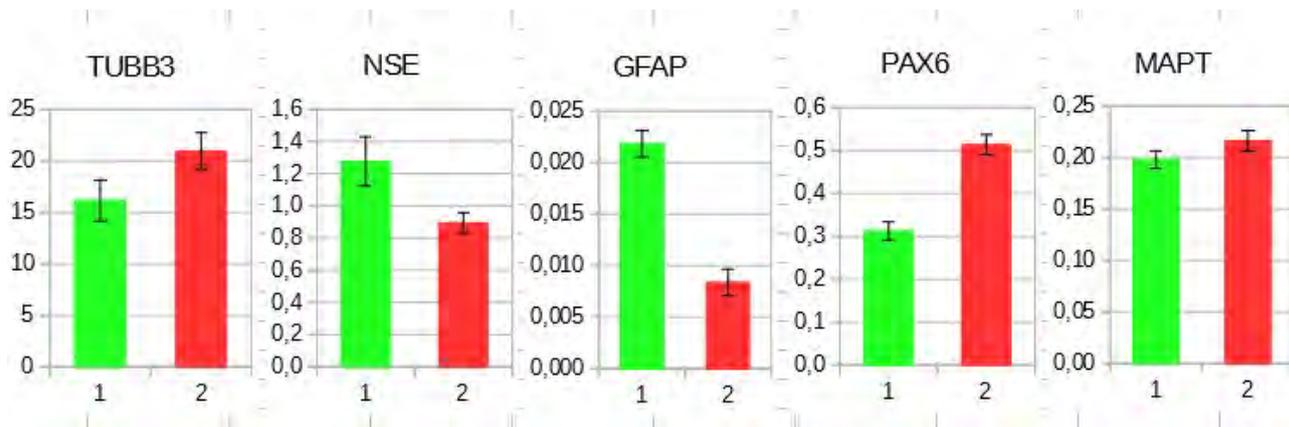


Рисунок 2.9 - Экспрессия нейронных маркеров TUBB3, NSE, PAX6, GFAP и MAP2 в трехмерных органоидах, полученных из клеток с нормальным кариотипом (зеленым) и DS-клетками (красный).

После этого мы решили пронаблюдать и сравнить уровни секреции в культуральную среду двух различных изоформ бета-амилоида (bA-40 и bA-42), являющиеся основными маркерами ранних этапов болезни Альцгеймера (Рисунок 2.10). Также мы измерили уровни апоптоза, определяя апоптотные клетки при помощи метода TUNEL (Рисунок 2.11). При помощи метода количественного ПЦР мы определили профили экспрессии различных генов-маркеров ассоциированных с БА (Рисунок 2.12). В конечном итоге мы определили признаки начальных стадий болезни Альцгеймера, таких как гиперсекреция бета-амилоида (изоформы 40 и 42), повышенный апоптоз и гиперэкспрессия ряда генов, связанных с БА.

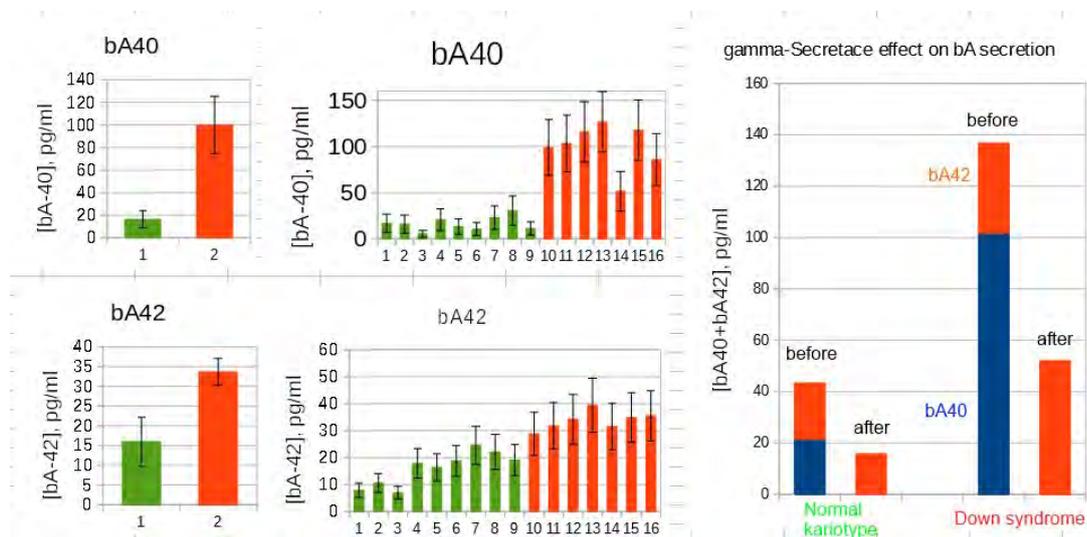


Рисунок 2.10 - Уровень секреции бета-амилоида, обеих изоформ. Клетки с нормальным кариотипом отмечены на гистограммах зеленым, клетки с T21 - красным.



Рисунок 2.11 - Уровень апоптоза в органоидах измеренный методом TUNEL. Клетки с нормальным кариотипом отмечены на гистограммах зеленым, клетки с T21 - красным.

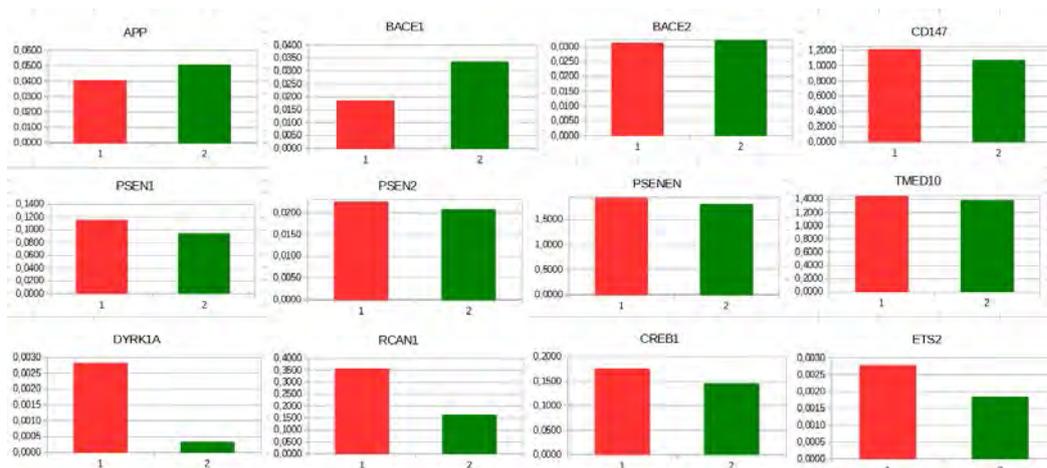


Рисунок 2.12 - Профили экспрессии различных генов-маркеров ассоциированных с БА. Клетки с нормальным кариотипом отмечены на гистограммах зеленым, клетки с T21 - красным.

## 2.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом мы экспериментально подтвердили возможность использования генов C1orf43, EMC7, GPI, PSMB4, REEP5, SNRPD3, VCP, приведенных в статье [1] для нормировки результатов количественного ОТ-ПЦР в реальном времени. Так же оказалось, что результаты даже для групп культур клеток разного типа могут быть отнормированы точно с использованием всего трех генов. Полученные нами данные позволяют корректно оценивать точность нормировки при работе с ПСК и полученными из них культурами. Мы надеемся, что это позволит расширить корректное использование пцр в реальном времени для исследования и характеристики ПСК и различных дифференцированных культур. Возможно, подобранный нами набор из шести генов C1orf43, GAPDH, HMBS, PSMB4, YWHAZ, REEP5 будет полезен при работе и с клетками других типов.

Трехмерные нейроэктодермальные органоиды является новым перспективным подходом для моделирования нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера (БА). Трехмерная структура этих органоидов обеспечивает корректную дифференцировку и созревание полученных нейронов по сравнению с двухмерными

культурами. Применив данный подход для анализа органоидов из клеток с трисомией 21 хромосомы и сравнив их с органоидами с нормальным кариотипом, мы определили признаки начальных стадий болезни Альцгеймера, таких как гиперсекреция бета-амилоида (изоформы 40 и 42), повышенные темпы апоптоза и гиперэкспрессия ряда генов, связанных с БА.

## 2.5 СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Eisenberg E., Levanon E.Y. Human housekeeping genes, revisited // Trends in Genetics. 2013. № 10 (29). С. 569–574.
2. Li R. [идр.]. Induced pluripotency and direct reprogramming: A new window for treatment of neurodegenerative diseases // Protein and Cell. 2013. № 6 (4). С. 415–424.
3. Niwa H., Miyazaki J., Smith A.G. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. // Nature genetics. 2000. № 4 (24). С. 372–6.
4. Scheper W., Copray S. The molecular mechanism of induced pluripotency: a two-stage switch. // Stem cell reviews. 2009. № 3 (5). С. 204–23.
5. Thellin O. [идр.]. Housekeeping genes as internal standards: Use and limits // Journal of Biotechnology. 1999. № 2-3 (75). С. 291–295.
6. Vandesompele J. [идр.]. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. // Genome biology. 2002. Т. 3. № 7. RESEARCH0034 с.

### Раздел 3. Управляемое изменение дифференцировочного статуса клеток, в том числе с помощью генетического манипулирования и с использованием систем для микроманипулирования

#### 3.1 ВВЕДЕНИЕ

Первичные половые клетки являются предшественниками гамет, которые могут сливаться с образованием зиготы, обладающей способностью генерировать совершенно новый организм с передачей генетической и эпигенетической информации следующему поколению. Однако до сих пор мало информации, касательно понимания эмбриогенеза раннего развития первичных половых клеток человека (hPGCs), поскольку ранние человеческие эмбрионы недоступны для исследования по очевидным причинам. Отсутствует воспроизводимая и эффективная *in vitro* модель hPGC, которая бы воспроизводила дифференцировку из эмбриональных стволовых клеток человека (hESC) или индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (hiPSCs). Поэтому для того, чтобы точно понять механизмы спецификации и формирования hPGCs, существует потребность в разработке *in vitro* подобной модели.

Получение первичных половых клеток человека *in vitro* началось с их спонтанной дифференцировки из hESCs (Clark et al., 2004; Tilgner et al., 2008; Kee et al., 2009). Тем не менее, систематические подходы к идентификации и характеристике hPGCs были ограничены из-за низкого выхода человеческих первичных половых клеток. Впоследствии был разработан совершенно иной подход к определению *in vitro* человеческих первичных половых клеток (hPGCLC), и это можно считать первым полностью задокументированным протоколом дифференцировки клеток (Irie et al., 2014). В этой работе было определено, что SOX17 и PRDM1 являются ключевыми регуляторными факторами, которые определяют hPGCLC на ранних этапах спецификации. Полученные *in vitro* hPGCLCs могли быть очищены с использованием поверхностных маркеров EpCAM и INTEGRIN $\alpha$ 6, тогда как транскриптом hPGCLCs была похожа на транскриптом аналогичных клеток приматов (Sasaki et al., 2015).

В данной работе мы описываем полностью определенную и контролируемую процедуру дифференцировки, без использования сред с сывороткой, которая в итоге позволяет получать hPGCLCs с высокой эффективностью, путем дифференцировки из hESC и hiPSCs *in vitro*. В этом протоколе мы достигаем дифференцировки hPGCLC через ранний мезодермальный переход, протекающий через индукцию рекомбинантным человеческим костным морфогенетическим белком (BMP4) клеток hPSC. Полученные клетки были

дополнительно индуцированы в направлении мейотического деления, что доказывает обоснованность протокола генерации hPGCLC.

### 3.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

#### *Культура клеток.*

Лагаркова Н.А. любезно предоставила женскую линию клеток hESC, а женская линия клеток hiPSC (hiPSC-KYOU) была куплена в клеточном банке ACCT. Обе линии hPSC культивировали на полной среде mTeSR1 (SCT) в культуральной посуде с покрытием Matrigel (BD Biosciences) при 37°C, 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>. Для прохождения или для дальнейших индукционных процедур клетки обрабатывали Dispase (1 мг / мл, SCT). Для генерации равных по размеру эмбрионных телес EB, состоящих из приблизительно 4000 ячеек / EB, мы использовали среду AggreWell (SCT 05893) и AggreWell 800 (SCT) в соответствии с протоколом производителя.

#### *Дифференцировка hPGCLC от женских человеческих ESCs / iPSCs.*

Обычное культивирование проводили в чашках Петри, покрытых Matrigel. В двумерной культуре клетки не диссоциировали до состояния одной клетки, а содержались в небольших колониях, состоящих из 50-200 клеток. После посева эти клетки поддерживали в среде mTeSR1, дополненной 5-кратной добавкой и 5 мкМ ROCKi (Y27632, Abcam ab120129) в течение ночи при 37°C, 5% O<sub>2</sub> и 5% CO<sub>2</sub>. На следующий день клетки индуцировали 50 нг/мл АСТА (Gibco, PHC9564) и 10 мкМ ROCKi, добавляя их в базальную среду (DK15), состоящую из DMEM / F12 (Gibco, 21331020), 15% KSR (Gibco, 10828010), 0,1 мМ NEAA (Gibco, 11140035), 2 мМ GlutaMax (Gibco, 35050038), 1 мМ пирувата натрия (Gibco, 1160039) и 0,1 мМ 2-бетамаркаптоэтанола (Sigma, M3148) в течение 36-42 часов. Через 2 дня индукции АСТА культуру клеток поддерживали в DK15, содержащем 100 мкг / мл BMP4 (Gibco, PHC9534), 20 нг / мл rhLIF (Invitrogen, PHC9481) и 20 мкМ ROCKi в течение 6 дней. Дифференцировка в EB выполнялась на чашках Петри с ультранизким связыванием (Corning, 7007), после генерации EB с набором AggreWell. Генерированные EB с лунок набора AggreWell переносили в чашки Петри и индуцировали с помощью АСТА 50 нг / мл и 10 мкМ ROCKi в течение 36-42 часов. Далее EB были иницированы с BMP4 100ng / mL и поддерживались в течение 6 дней в среде DK15 с BMP4 100ng / mL и 20 мкМ ROCKi.

#### *Индукция ранних стадий мейоза hPGCLC.*

EB-hPGCLCs переносили в 96-луночные ультранизкие крепёжные пластины u-bottom. 10-20 EB-hPGCLC помещали в каждую лунку и подвергали воздействию индукционной среды для мейоза, состоящей из 2 мкМ ретиноевой кислоты, 20 нг / мл rhLIF, 100 нг / мл

EGF, 10 нг / мл SCF, 3% FBS, 0,1 мМ NEAA ( Gibco, 11140035), 2 мМ GlutaMax (Gibco, 35050038), 1 мМ пирувата натрия (Gibco, 1160039) и 0,1 мМ 2-бетамаркаптоэтанола (Sigma, M3148) в DMEM / F12 (Gibco, 21331020). Среда менялась каждые 2 дня, причем индукция мейоза длилась 15 дней.

#### *Иммуноцитохимия*

Перед окраской антителами, клетки промывали один раз раствором PBS, после чего фиксировали 4%-м параформальдегидом 15 мин при комнатной температуре. Далее промывали 3 раза раствором PBS и окрашивали последовательно первичными и вторичными антителами, растворенными в блокирующем растворе (PBS + 10%FBS + 0,1% Tryton-X-100). Перед съемкой препараты докрашивали раствором DAPI (1 мкг/мл в PBS). Изображения были получены с помощью конфокальной микроскопии на приборе ZEISS LSM 880, часть изображений была обработана в пакете программ ImageJ.

#### *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».

#### *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 1,8 микрограмм полученной ранее РНК.

#### *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 «7500 Real-Time PCR System» фирмы «Applied Biosystems». Праймеры подбирались с помощью PrimerBlast. 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.

### 3.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

#### *1. rhActA и rhBMP4 индуцируют дифференцировку в ранние hPGCLC в клеточной культуре invitro с высокой эффективностью*

Для первичной оценки возможности дифференцировки женских клеток hPSC в hPGCLC, мы использовали систему культивирования в двухмерном виде, чтобы далее систематически наблюдать и оптимизировать условия индукции hPGCLC. Культуры плюрипотентных стволовых клеток hPSC были высеяны на Matrigel, и со следующего дня они были подвергнуты активации при помощи белка ActinA (ActA) в течение 2 дней (с этого момента они будут называться 2dActA). Затем культуру клеток, индуцированную 2dActA, обрабатывали рекомбинантным костным морфогенетическим белком 4 человека (BMP4) в течение следующих 6 дней (с этой точки они будут называться d6 BMP4) (Рисунок 3.1). Мы обнаружили, что периферические клетки в каждой колонии реагируют на стимул дифференцировки лучше, чем клетки находящиеся в центре, где морфология клеток остается неизменной в присутствии ActA и BMP4. На периферии колоний клетки трансформируются в «сплюсненную» морфологию посредством увеличения отношения площади цитоплазмы к ядру (Рис.1) а также увеличивая свою миграционную способность. Центральные же клетки оставались «маленькими» и оставались в центре их колоний. Они были отрицательными по маркеру SSEA1, но положительны по маркеру NANOS3) (Рисунок 3.1). Морфологические и поведенческие изменения, а также позитивное окрашивание на SSEA1 позволяют нам предполагать, что существует при дифференцировке в hPGCLC клетки испытывают потребность в пространстве вокруг себя. Поэтому мы увеличили дисперсию колоний по поверхности Матригеля и далее высевали клетки в небольшие колонии, чтобы обеспечить центральным клеткам большую возможность для развития характеристик первичных половых клеток.

Следующим шагом оптимизации протокола генерации hPGCLC стало сравнение двух концентраций 100 мкг / мл и 50 нг / мл индуктора BMP4. Мы использовали качественный подход для анализа влияния этих концентраций BMP4 на 50 нг / мл и 100 нг / мл . На флуоресцентное окрашивание для раннего маркера поверхности зародышевой клетки SSEA1, и оценивали SSEA1-позитивные клетки и интенсивность окрашивания SSEA1 ) (Рисунок 3.1). Мы наблюдали, что клетки SSEA1 + значительно увеличивались в количестве с BMP4 100ng/ml, причем интенсивность окрашивания увеличивалась по сравнению с BMP4 50 нг/мл, при этом увеличение было значительным. Чтобы проверить повышение эффективности дифференцировки, мы провели анализ FACS и подтвердили качественные результаты эффективности hPSC в том, что дифференцировка с использованием BMP4 на 100 нг / мл в течение 6 дней увеличивала процент клеток SSEA1 + с 40% до 78%. Таким

образом, оптимизация протокола дифференциации, основанная на клеточном поведении (с использованием небольших колоний и широкой дисперсии колоний на подложке) и концентрации индуктора BMP4 в 100 нг / мл, привела к значительному увеличению выхода дифференцировки клеток SSEA1 +.

После оптимизации условий дифференцировки на адгезивной культуре мы провели анализ экспрессии генов hPSC с использованием индукции ActA через 2 дня (2d) и индукции BMP4 на 3-й день (d3) и 6-й день (d6), чтобы наблюдать динамику экспрессии генов hPSC в течение периода, в течение которого они дифференцировались в hPGCLC. Анализ экспрессии соответствующих маркеров показал, что при индукции 2d ActA hPSC увеличивали экспрессию основных маркеров плюрипотентности OCT4, NANOG и KLF4 и маркеров наивной плюрипотентности, PRDM14 и DAZL, тогда как ген SOX2 подвергался небольшой подавлению) (Рисунок 3.1). Ген эпигенетического регулятора DNMT3B реагировал на индукцию с повышением синтеза мРНК, возможно, пытаясь контролировать транскрипционную регуляцию всего генома. С другой стороны, активировались ранние маркеры-регуляторы первичных половых клеток PRDM1 и NANOS3, а поверхностные маркеры первичных половых клеток SSEA1 и cKIT были усилены индукцией ActA) (Рисунок 3.1). Анализ индукции d3 BMP4 экспрессии гена hPSC показал, что весь набор факторов транскрипции плюрипотентности, OCT4, SOX2, NANOG и PRDM14 были подавлены; тогда как, наоборот, индуцированные BMP4 hPSC сохраняли высокие уровни экспрессии генов ранних регуляторов зародышевых клеток PRDM1 и NANOS3 и поверхностного маркера SSEA1. Кроме всего прочего, мы наблюдали снижение регуляции DNMT3B в d3 BMP4-индуцированных hPSCs. В совокупности 2d ActA индукция hPSCs изменила статус экспрессии генов, вызывая стволовые клетки для выхода из своего плюрипотентного статуса на границу области, где уже дополнительный внешний сигнал от BMP4 подталкивал их к дифференцировке в hPGCLC. Анализ экспрессии генов hPSC, индуцированных d3 BMP4, показал репликацию плюрипотентности, усиление всех ранних маркеров первичных половых клеток и миграционное поведение, подтвердив таким образом, что эти индуцированные женские hPSC были фенотипически ранними мигрирующими hPGCLC.

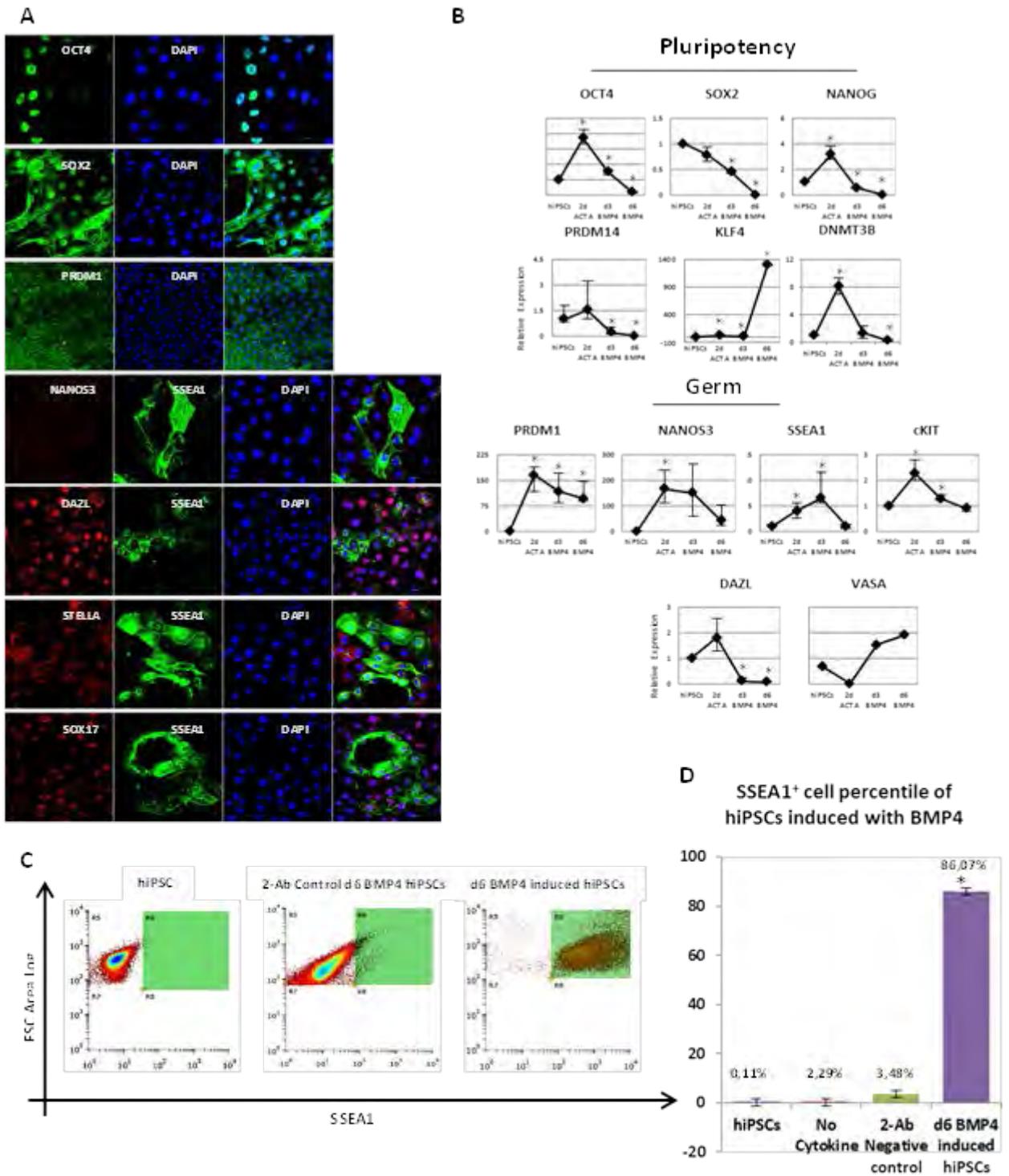


Рис. 1. Индукция hiPSCs в ранние hPGCLC In vitro.

A. Анализ с использованием поверхностного маркера SSEA1 hiPSCs, отрицательного контроля 2oAb и индуцированных d6 BMP4 hiPSC на адгезивной подложке.

B. Процентная доля hiPSCs, цитокина, 2oAb и d6 BMP4-индуцированных SSEA1<sup>+</sup> клеток на клейкой подложке, полученной из анализа FACS. Полоски ошибок указывают +/- SEM, n = 3 повтора.

C. Иммунофлуоресцентное окрашивание маркеров плюрипотентности OCT4, SOX2, NANOG и маркеров зародышевых клеток SOX17, DAZL, STELLA, PRDM1, NANOS3 и SSEA1 индуцированных d6 BMP4 hiPSC на клеющем субстрате. Ядра были окрашены DAPI (синий). Шкала шкалы 50 мкм и 100 мкм.

## 2. Индукция ранних стадий мейоза в hPGCLCs.

Далее мы провели тест на дальнейшую проверку hPGCLC, полученных по протоколу дифференцировки из hPSC. Для этого мы продолжали дифференцировку генерируемых *in vitro* hPGCLC с индукцией мейоза с использованием ретиноевой кислоты (RA). Во-первых, мы подошли к проблеме путем оптимизации условий индукции мейоза *in vitro* путем культивирования клеток SSEA1 +, полученных при сортировке двумерной системы культивирования) (Рисунок 3.2). Мы применяли 2 мкМ РА в течение 15 дней для инициирования мейотического инициирования. Было обнаружено, что RA индуцированные SSEA1 + клетки реагировали на индукцию с экспрессией STRA8 в колокализации с VASA. Добавление rhLIF, EGF и SCF в среду индукции мейоза увеличивало устойчивость клеток, индуцированных RA, которые активно размножались и пассировались несколько раз после сортировки (данные не представлены).

Кроме того, на основе ранее полученных данных анализа FACS индуцированных BMP4 hPSC в EBs мы предположили, что индукция мейоза d6 hPGCLCs в EBs (EB-hPGCLC) без разрушения 3D-конструкции может обеспечить лучшие ниши для мейотического инициирования и трансформировать EBs в структуры яичника или фолликула, поскольку 78% EB-клеток были SSEA1 +. В течение периода индукции мейоза EB-hPGCLCs мы наблюдали, что органоидоподобные структуры не прилипают друг к другу, образуя крупные сфероиды даже в очень ограниченных пространствах. Такое поведение может соответствовать состоянию мигрирующих первичных половых клеток, оседающих на гонадальном гребне *in vivo*, чтобы стать поздними непереходными первичными половыми клетками. Кроме того, после 8 дней индукции RA дифференцированные EB-hPGCLC начали набухать и приобретать яркий цвет. На 12-й день индукции мейоза мы обнаружили, что внутри распухшей и осветленной органоидоподобной структуры появляется группа клеток, образующих темную область) (Рисунок 3.2). После 15 дней индукции мейоза EB-hPGCLCs мы выявили положительные маркеры инициации мейоза, такие как STRA8 и SCP1, и маркеры поздних половых клеток половых органов: VASA и DAZL. Через 15 дней индукции мейоза EB-hPGCLCs трансформировались в структуры яичника, увеличивая их внеклеточную матричную сетку, имитируя человеческие яичники класса А при рождении (Lintern-Moore S., et al., 1974). Иммунофлуоресцентный анализ подтвердил экспрессию DAZL и VASA в колокализации с мейотическими маркерами STRA8 и SCP1, обеспечивая физиологическую способность генерировать гаплоидные зародышевые клетки. VASA был локализован в цитоплазме дифференцированных клеток. Кроме того, анализ экспрессии генов клеток, индуцированных мейозом, показал повышение активности маркеров поздних маркеров роста VASA и KLF4 и экспрессии генов из piRNA, регулирующих белки PIWIL1,

который экспрессируется в середине pachytene, и PIWIL4, экспрессия которых была обнаружена в ооцитах человека (Sasaki et al., 2003).

В отличие от hPSC, млекопитающие de novo DNA methyltransferase DNMT3B были подавлены в мейотически активированных клетках. Ген cKIT сохранил стабильный уровень транскрипции мРНК. Удивительно, но несмотря на то, что NANOS3 является ранним маркером зародышевых клеток, он по-прежнему выражается клетками, подверженными мейотипированию. Полученный мейотический фенотип был подтвержден выражениями PIWIL1 и PIWIL4 в сосуществовании с VASA, тогда как DNMT3B был подавлен, поддерживая характерное деметилирование всего гена, обнаруженное в зародышевых клетках, и с наличием STRA8 и SCP1 в индуцированном мейозом EB- hPGCLCs) (Рисунок 3.2).

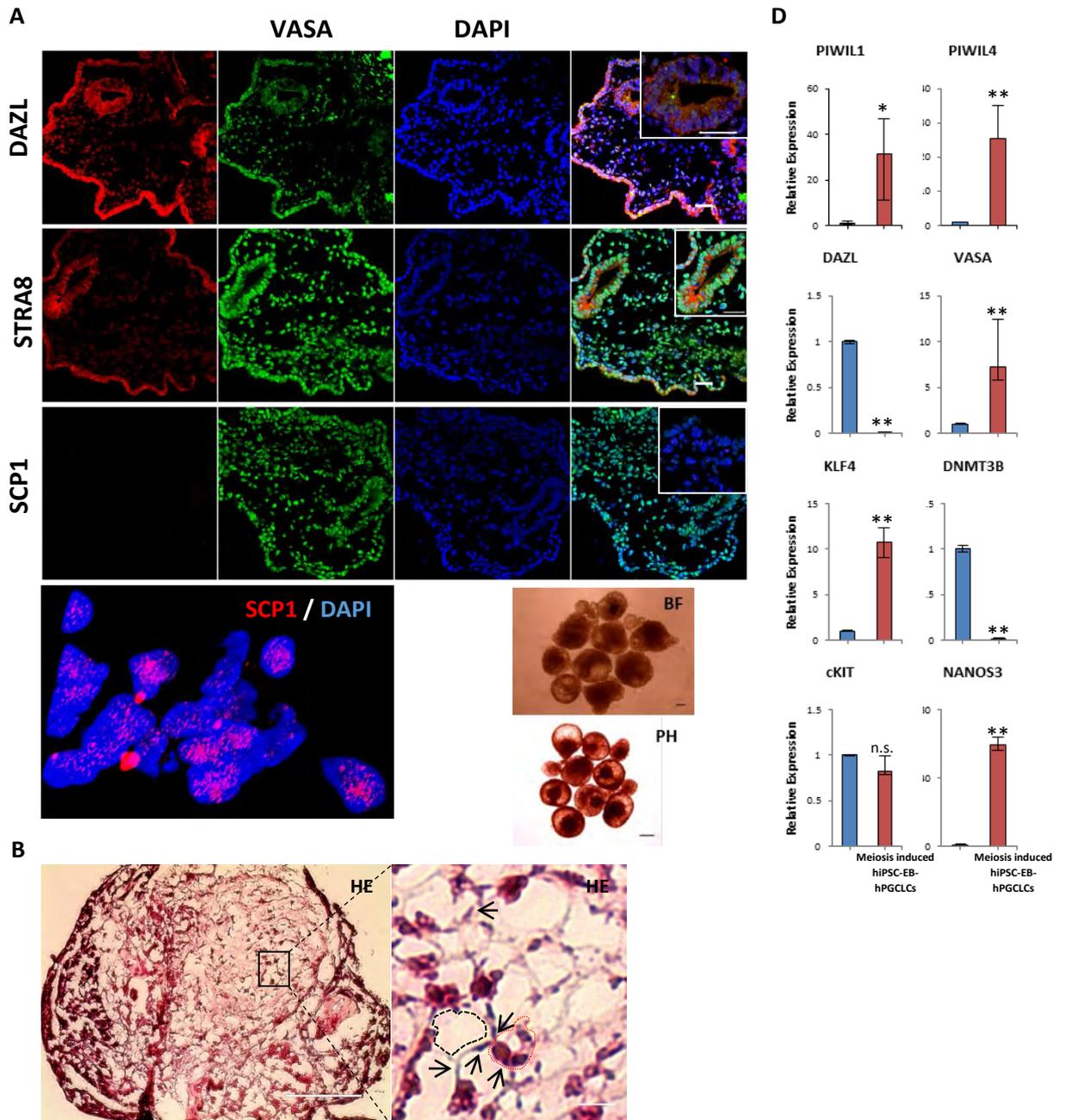


Рисунок 2. Индукция мейоза с RA d6 BMP4 EB-PGCLC.

- A. А. Иммунофлуоресцентное окрашивание 15-дневных RA-индуцированных hiPSC-EB-hPGCLC для DAZL, STRA8, SCP1 в колокализации с VASA. Масштабные бары - 50 мкм и 100 мкм.
- B. В. Ярко-полевые (верхние левые), фазовые контрастные (верхние правые) и гематоксилиновые и эозиновые (нижние) изображения 15-дневных RA-индуцированных EB-hPGCLC. Стрелки указывают на окрашенное гематоксилином ядро (синее). Круговые черные штрихи обозначают геометрическую форму, состоящую из ячеек. Красная пунктирная линия окружает область кластеризованных клеток. Масштабные бары - 50 мкм и 100 мкм.
- C. С. Профиль экспрессии мРНК hiPSCs и 15-дневные RA-индуцированные EB-hPGCLC. Полоски ошибок

Рисунок 3.2

### 3.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Многие фундаментальные вопросы касательно развития человеческих первичных половых клеток (hPGCs) по-прежнему остаются без ответа. Поэтому не прекращаются исследования в этой области, предпринимаются попытки *in vitro* дифференцировки в hPGCs из плюрипотентных стволовых клеток человека (hPSCs). Чтобы разработать эффективный и воспроизводимый протокол дифференциации hPSC в человеческие первичные половые - подобные клетки (hPGCLC), которые далее будут способны генерировать гаплоидные клетки, мы применили последовательный протокол индукции во время раннего мезодермального перехода клетки двух линий женских эмбриональных и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. BMP4-индуцированные hPSC показали значительные изменения в их профилях экспрессии в различные маркеры первичных половых клеток PRDM1 и NANOS3, VASA и DAZL,. Кроме того, по мере того как они приобретали структуру яичника, индуцированные ретиноевой кислотой hPGCLC, входили в стадию раннего мейотического инициирования, экспрессируя STRA8 и демонстрируя прогрессию к пахитене профазы I, что подтверждается экспрессией PIWIL1 и PIWIL4. Эта воспроизводимая *in vitro* модель получения hPGCLC обеспечивает возможность дальнейшего изучения молекулярных и эпигенетических механизмов, участвующих в спецификации hPGC.

## Раздел 4. Стволовые мезенхимные клетки в индивидуальном развитии. Роль мезенхимных стромальных клеток (МСК) в формировании мышечной ткани и ее восстановлении после повреждения

### 4.1 ВВЕДЕНИЕ

4.1.1. *Исследование способности МСК из костного мозга дифференцироваться в клетки скелетных мышц под влиянием индукторов in vitro и возможность участия МСК в формировании миотуб путем слияния с миобластами.*

Мезенхимные стромальные клетки (МСК) представляют собой уникальную клеточную популяцию. Они способны к дифференцировке в клетки скелетных тканей (костной и хрящевой), жировой ткани, а по некоторым данным и к дифференцировке в миогенном направлении (Labarge a.Blau, 2002). МСК входят в состав практически всех тканей организма, где занимают периваскулярную зону и отождествляются с перицитами. В качестве клеток-резидентов они участвуют в формировании микроокружения и поддерживают гомеостаз тканей, продуцируя широкий спектр цитокинов, хемокинов, ростовых факторов и молекул внеклеточного матрикса (Caplan, 2009; Linder et al., 2010).

В настоящее время МСК рассматриваются в качестве наиболее перспективного ресурса для клеточной терапии. МСК выступают как короткодистантные универсальные регуляторы физиологической и репаративной регенерации, стимулируют пролиферацию клеток, ангиогенез, улучшают течение воспаления и предотвращают избыточное рубцевание. Полученные в последние годы экспериментальные данные свидетельствуют о том, что стимуляция регенерации поврежденных мышц может быть достигнута с помощью введения МСК (Natsu et al., 2004; Shi et al., 2009; Winkler et al., 2012; Andrade et al., 2015).

4.1.2. *Исследование биологической совместимости МСК с коллагенсодержащими скаффолдами и способность МСК к их заселению.*

Культивирование стволовых клеток на носителях (скаффолдах) с последующей их имплантацией в место дефекта является одним из наиболее перспективных направлений клеточной трансплантологии. Имплантация клеток с деградируемыми материалами биологической природы может существенно повысить эффективность восстановления функций жизненно важных органов и тканей (Шумаков, Севастьянов, 2003; Yannas a.Tzeranis, 2010; Шехтер и др., 2015). Поэтому исследования материалов, имитирующих свойства биологических структур, весьма актуальны и востребованы в настоящее время. Коллаген является одним из наиболее перспективных материалов для производства скаффолдов. Будучи нативным белком коллаген оптимально подходит в качестве скаффолда для заселения клеток, обеспечивая рост и развитие ткани (Chevallay a.Herbage, 2000).

Поскольку, как было показано, МСК усиливают миогенную активность мышечных клеток, доставка МСК и их дериватов (кондиционированной среды или микровезикул) в область повреждения скелетной мышцы может способствовать восстановлению ткани. В этой связи становится актуальным создание тканеинженерных конструкций на основе заселения МСК коллагенсодержащих скаффолдов.

Целью работы было исследование:

- механизма участия МСК в миогенной дифференцировке *in vitro* (1) путем непосредственной дифференцировки МСК в миогенные клетки под действием индукционных факторов (дексаметазона и азацитидина) и факторов, выделяемых миообластами, а также (2) посредством слияния МСК с миообластами.
- биосовместимости МСК и ряда коллагенсодержащих скаффолдов для создания тканеинженерных конструкций, заселяемых МСК.

## 4.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

4.2.1. Клетки костного мозга выделяли, промывая диафизы бедренных и большеберцовых костей средой  $\alpha$  MEM, и культивировали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в среде  $\alpha$  MEM с 10-15% сыворотки плодов коровы с добавлением L-глутамина, антибиотика-антимикотика и пенициллина-стрептомицина. Плотность посева составляла 1-5x10<sup>6</sup> клеток/мл. Среду сменяли через 7 суток.

Для проверки возможности дифференцировки МСК в миогенном направлении МСК 2-го пассажа (концентрация 5x10<sup>4</sup> или 1x10<sup>5</sup> кл/мл) культивировали 4 недели в индукционных средах, содержащих 5-азацитидин и дексаметазон (индукционная среда 1 – среда DMEM с добавлением 10 мкМ 5-азацитидина однократно, 20% FCS, смена среды через одни сутки и последующее культивирование с 5% лошадиной сыворотки, индукционная среда 2 - среда DMEM с добавлением 2% сыворотки плодов коровы, 10 нг/мл EGF, 10нг/мл PDGF, 1% ITS+1, 50 мкг/мл 2-фосфо-L-аскорбата натрия и 3 мкМ 5-азацитидина, индукционная среда 3 - 0,1  $\mu$ М дексаметазона, 50  $\mu$ М гидрокортизона, 5% лошадиной сыворотки). Кроме того, проводили в течение 8-10 суток совместное культивирование через полупроницаемые мембраны (метод trans-well) МСК с клетками, полученными из мышц зародышей крысы, (концентрация МСК – 1x10<sup>5</sup> кл/мл, концентрация мышечных клеток - 2,5x10<sup>4</sup> кл на 1см<sup>2</sup>).

Для проверки возможного слияния МСК и миобластов МСК предварительно трансфецировали GFP с помощью лентивирусной конструкции. Мечение МСК проводили путем аденовирусной инфекции. Вирусы (титр 1x10<sup>7</sup>) добавили в матрасы с клетками (по 2

мл на матрас), держали 2 часа при 370С, затем добавили среду  $\alpha$ MEM с 10% FCS, инкубировали сутки, затем производили смену среды. На 5-е сутки количество светящихся клеток составляло около 80%, наблюдалось формирование плотного монослоя. Полученные таким образом GFP+ МСК культивировали с первичными миобластами из зародышей или новорожденных крысят в концентрациях  $1 \times 10^5$  кл/мл для МСК и  $1 \times 10^4$  кл/мл для клеток из мышц до образования миотуб.

Для оценки паракринного влияния МСК на миогенез проводили сокультивирование МСК с первичными миобластами через полупроницаемые мембраны (в таких же концентрациях как при совместном культивировании) или культивировали миобласты в среде, кондиционированной МСК (50% предварительно центрифугированной и профильтрованной через фильтр 0,22 мкм среды от культуры МСК 2 пассажа, содержащихся 1 сутки без сыворотки, и 50% DMEM с 10% FCS). Параллельно проводили такой же эксперимент с использованием вместо МСК фибробластов из кожи зародышей. В *in vitro* экспериментах использовались методы иммуноцитохимического анализа (окрашивание на MyoD для обнаружения дифференцировки в миогенном направлении), трансфекции (вирусными частицами, содержащими GFP), окрашивание азур-эозином и последующий подсчет образовавшихся миотуб.

4.2.2. Для анализа взяты пять образцов скаффолдов, изготовленных на базе Отдела современных биоматериалов Института регенеративной медицины I МГМУ им. Сеченова – децеллюляризованная сублимированная дерма коров (ДДК), уплотненная губка из реконструированного щелочнорастворенного коллагена дермы коров (биодерм, БД), пленка из разволокненного коллагена дермы коров (белкозин, БЛК), плёнка из щелочнорастворенного коллагена дермы коров (ПЩРК) и децеллюляризованный подслизистый слой тонкой кишки свиньи (SIS). Используемые матрицы имели разную структуру, однако основой всех исследуемых материалов был коллаген. Исследование биосовместимости проводили с использованием мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (МСК), выделенных из костного мозга и жировой ткани самцов крыс породы Вистар и костного мозга самцов мышей Balb/c. Клетки выделяли согласно стандартным протоколам. Все образцы скаффолдов засеивали клетками в количестве от  $8 \times 10^4$  до  $6 \times 10^5$ . Клетки культивировали 4-24 суток в среде DMEM с добавлением 20% фетальной телячьей сыворотки.

## 4.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

4.3.1. При культивировании МСК в средах, индуцирующих миогенную дифференцировку (дексаметазоне и азацитидине), миогенной дифференцировки МСК не происходило. При совместном культивировании МСК и мышечных клеток, разделенных полупроницаемой мембраной, МСК также не дифференцировались в миогенном направлении (Рисунок 4.1).

В мышцах, где слияние клеток происходит в процессе нормального миогенеза, слияние клеток КМ происхождения с резидентными миотубами весьма вероятно. Однако как показали наши эксперименты по совместному культивированию меченных GFP МСК с первичными миобластами, слияние МСК с ними и образование меченых миотуб – крайне редкое событие (Рисунок 4.2).

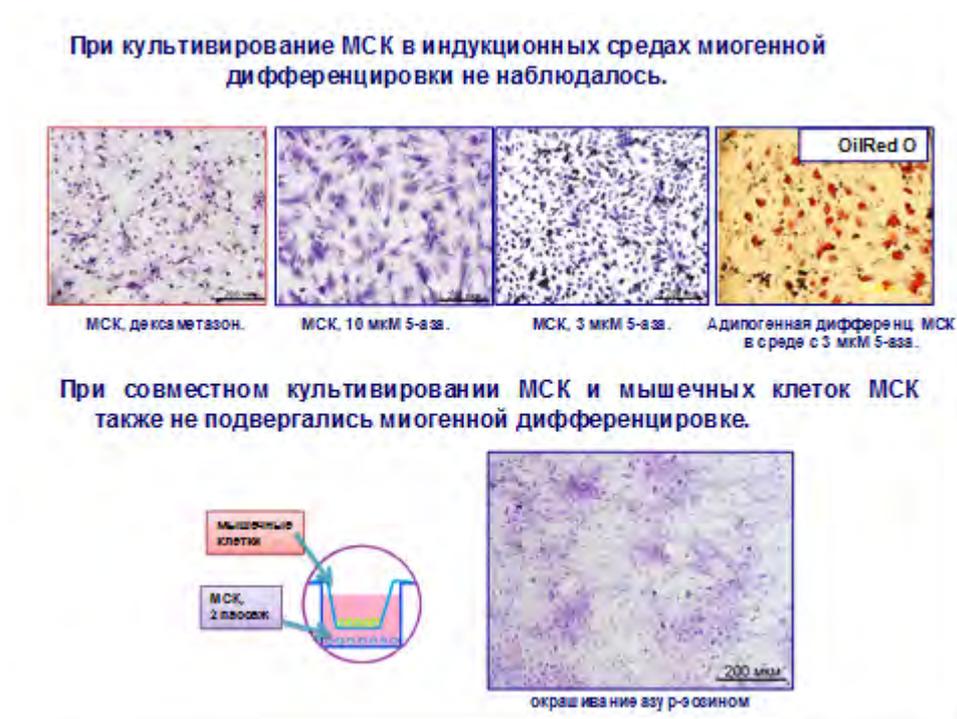


Рисунок 4.1 - МСК не дифференцируются в миогенном направлении в условиях культивирования с индукторами и мышечными клетками.

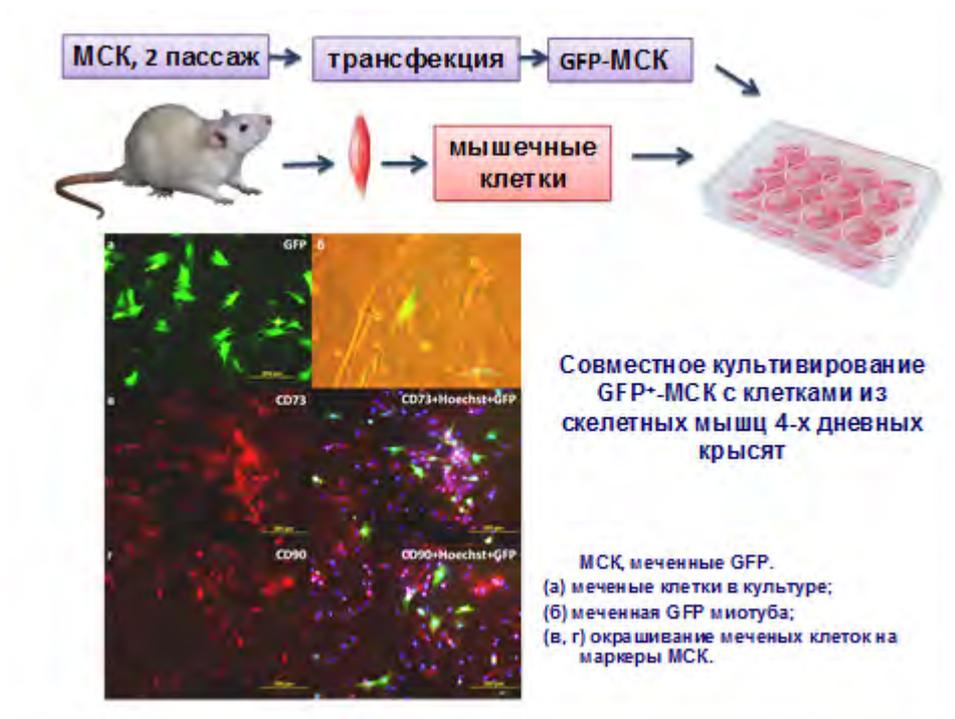
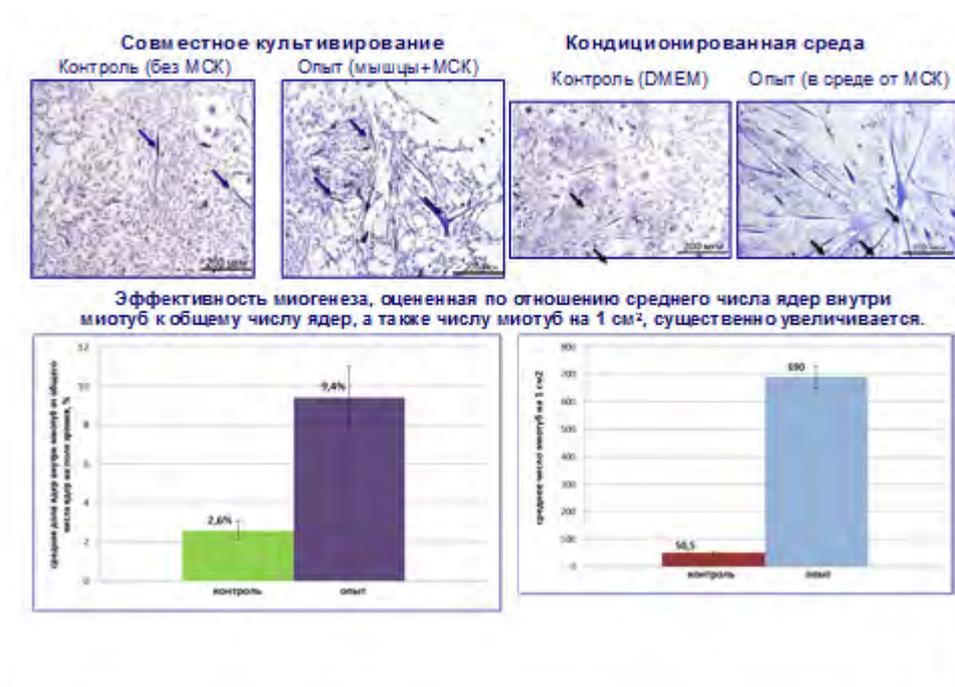


Рисунок 4.2 - Отсутствие миогенной дифференцировки при культивировании МСК в средах, содержащих индуктору миогенеза.

В то же время МСК усиливали миогенную активность мышечных клеток в условиях *in vitro* посредством паракринного влияния. Это происходило в системе trans-well, когда эффекторными клетками оказывались мышечные клетки, а МСК помещались во вставки (среднее число ядер внутри миотуб по отношению к общему числу ядер в поле зрения увеличивается). Тот же эффект достигался при культивировании мышечных клеток в среде, кондиционированной МСК (число миотуб на ед. площади многократно возрастало) (Рисунок 4.3).



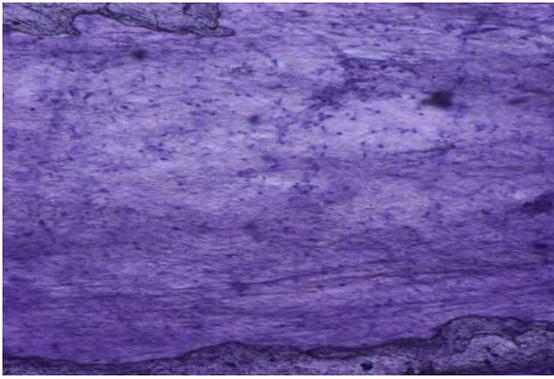
### Рисунок 4.3 - Стимуляция миогенеза при совместном культивировании миобластов с МСК и при воздействии кондиционированной МСК среды.

Следует отметить, однако, что частота трансдифференцировки МСК может быть низкой в отсутствие повреждения ткани. Показано, что при повреждении мышц или при облучении, когда происходит гибель резидентных миогенных стволовых клеток (сателлитов), МСК могут вступать на путь миогенной дифференцировки (Labarge a. Blau, 2002). При совместном культивировании МСК с клетками линии C2C12 и последующим их культивировании в присутствии индукторов миогенеза наблюдалось слияние GFP+МСК и миобластов с частотой 38 случаев на 1000 клеток (Shi et al., 2004). Слияние МСК с мышечными волокнами происходило и при введении МСК в поврежденную кардиотоксином мышцу.

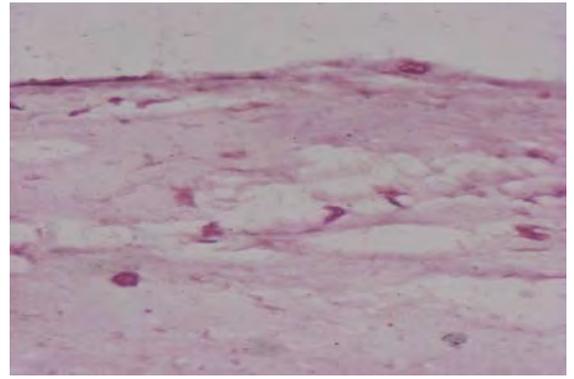
4.3.2. Успешное культивирование МСК на коллагенсодержащих скаффолдах животного происхождения зависело от их структуры и состава.

При культивировании МСК на ПЩРК (плёнке из щелочнорастворенного коллагена дермы) были нестабильные результаты. Небольшие, а в некоторых экспериментах довольно значительные по размерам группы сильно распластанных клеток, распределялись неравномерно по площади скаффолда (Рисунок 4.4). Скорость деградации этого скаффолда была высока, что создает значительные трудности для переноса биологического материала в область повреждения. Негативные результаты получены для ДДК (децеллюляризированная сублимированная дерма) и БД (уплотненная губка из реконструированного щелочнорастворенного коллагена дермы) (Рисунок 4.5). В порах скаффолда БД наблюдали многочисленные клетки, однако они были округлой формы, не прикреплялись к поверхности и не пролиферировали. Заселение клеток в ДДК отмечено не было. По-видимому, структура пор скаффолда не соответствует необходимым условиям приживания клеток. В скаффолде БЛК (белкозин, пленка из разволокненного коллагена дермы) клетки располагались поодиночке, редкими небольшими группами на поверхности и в толще скаффолда (Рисунок 4.6 А).

Наиболее перспективным материалом для создания тканеинженерных конструкций оказался SIS (децеллюляризированный подслизистый слой тонкой кишки). Клетки из костного мозга крысы либо мыши, как и клетки, полученные из жировой ткани крысы, успешно прикреплялись к скаффолду, располагались небольшими кластерами и более крупными группами на его поверхности и в подповерхностном слое (Рисунок 4.6 Б). Содержание клеток в скаффолде значительно увеличивалась в течение 24 суток (Рисунок 4.7). Это говорит о способности МСК сохранять пролиферативную активность и о хорошей биосовместимости с материалом скаффолда SIS.

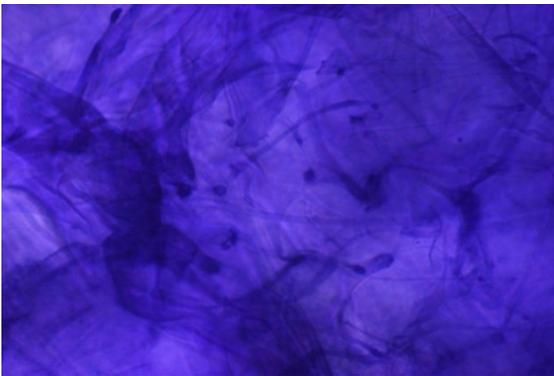


А

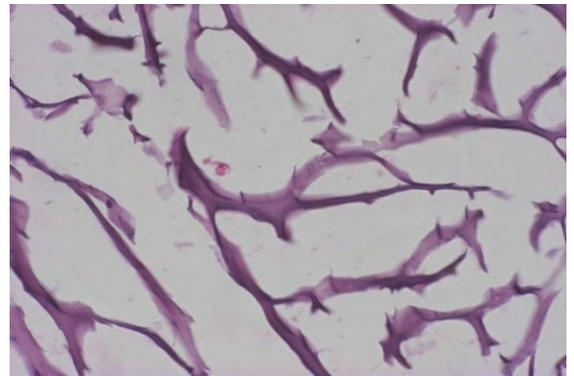


Б

Рисунок 4.4 - Заселение скаффолда ПЩРК мезенхимными стромальными клетками.  
 А - МСК из жировой ткани крысы, 4-е сутки. Б – МСК из костного мозга крысы, 10-е сутки.  
 Увел. Ок. x10, Об.х4. Окраска гематоксилин-эозин.

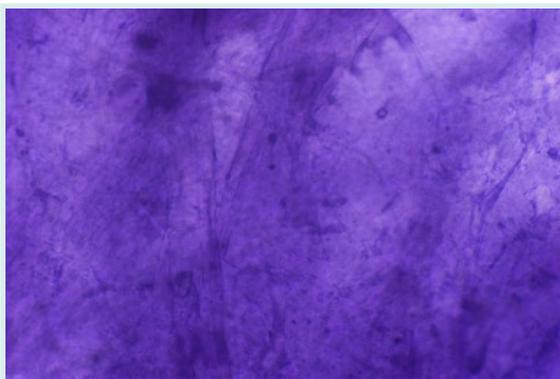


А



Б

Рисунок 4.5 - Заселение скаффолдов БД и ДДК мезенхимными стромальными клетками,  
 10-е сутки, костный мозг крысы. Увел. Ок. x10, Об.х4.  
 Окраска гематоксилин-эозин. А – БД, Б – ДДК.



А



Б

Рисунок 4.6 - Заселение скаффолдов БЛК и SIS мезенхимными стромальными клетками,  
 4-е сутки. Окраска гематоксилин-эозин. Увел. Ок. x10, Об.х4. А – БЛК, МСК  
 из жировой ткани крысы. Б – SIS, МСК из костного мозга крысы

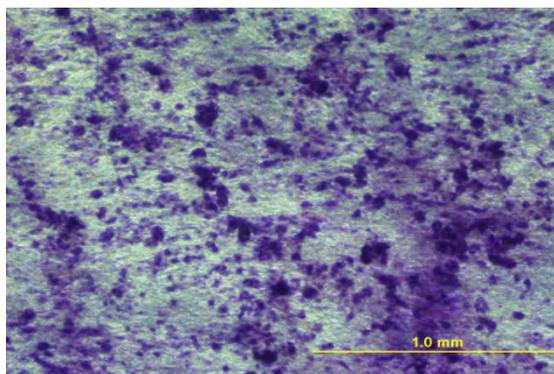


Рисунок 4.7 - Заселение скаффолда SIS мезенхимными стромальными клетками, 24-е сутки. Увел. Ок. x10, Об.х4. Окраска гематоксилин-эозин.

#### 4.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. МСК из костного мозга крысы, по-видимому, не обладают миогенными потенциальностями и не могут участвовать в образовании миотубов путем слияния с мышечными клетками.
2. МСК усиливают миогенную активность мышечных клеток в условиях *in vitro* посредством паракринного влияния.
3. Наиболее перспективным материалом для создания тканеинженерных конструкций с использованием МСК оказался SIS (децеллюляризированный подслизистый слой тонкой кишки), который мы планируем использовать для доставки МСК в область повреждения скелетной мышцы.

## Раздел 5. Биогенез ядерных структур

### 5.1 ВВЕДЕНИЕ

Исследовали механизмы формирования и разрушения ядрышек и специфического типа ядерных телец, пренуклеолярных телец, в гипотоническом стрессе. Ядерные тельца являются динамическими структурами, поддерживающими постоянный обмен веществ с нуклеоплазмой. Между тем механизмы их формирования и разрушения до сих пор остаются малоизученными. Интерфазные пренуклеолярные тельца (иПНТ) и ядрышки являются частными вариациями ядерных телец, для формирования которых необходимы специфические ядерные молекулы РНК. Эта общая черта делает эти объекты наиболее удобными для изучения.

### 5.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе используются методы, перечисленные ниже.

### 5.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

иПНТ моделировали, перенося клетки линии HeLa в гипотонический раствор. Их выявляли по наличию белка B23, который регулирует биогенез рибосом, отвечает за стабильность генома, и др., который конъюгировали с белком EGFP. иПНТ возникали после 5 минут инкубации и исчезали примерно через 30 минут после возвращения в изначальные условия. Белок B23 при этом перемещался из иПНТ в нуклеоплазму, а затем в ядрышки. Методом конфокальной съемки и FRAP удалось установить, что этот процесс не обусловлен слиянием иПНТ с ядрышками, и, вероятно, обусловлен диффузией.

Для исследования роли молекул РНК в поддержании и разрушении иПНТ использовали окрашивание SYTO RNASelect. Результаты показывают, синтез РНК не происходит в иПНТ, все молекулы РНК в этих структурах формируются до гипотонического шока. Ингибирование синтеза РНК

подавляет формирование ИПНТ. Ингибирование РНК полимеразы Пи III типа не оказывает влияния на формирование ИПНТ, что свидетельствует о рибосомальной природе РНК в ИПНТ.

Методом FISH доказали, что в ИПНТ протекает процессинг рибосомальных РНК. Ингибирование ферментативной активности приводит к увеличению времени жизни ИПНТ, следовательно, созревание рибосомальных РНК и их постепенное удаление регулирует срок жизни ИПНТ.

Ингибируя синтез рРНК показали, что замедляется распад ИПНТ. Ингибирование синтеза В23 имеет противоположный эффект.

#### 5.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предполагается, что альтерации во времени жизни ИПНТ основаны не на изменении скорости созревания рРНК, а на изменении в экспорте пре-рибосом. Однако, данная гипотеза должна быть подтверждена в будущих исследованиях.

## Раздел 6. Механизмы пластичности стволовых и прогениторных клеток в процессах регенерации различных структур нервной системы

### 6.1 ВВЕДЕНИЕ

Регенеративный потенциал клеток центральной нервной системы весьма ограничен, поэтому актуальной проблемой регенеративной медицины является замена потерянных клеток трансплантацией и репрограммирование соматических клеток в нейральные (Verbuchen, 2010). Для восстановления сетчатки глаза интерес представляют клетки ретинального пигментного эпителия (РПЭ), играющие ключевую роль в обеспечении функции, гомеостаза и регенерации сетчатки. Клетки РПЭ способны к репрограммированию или трансдифференцировке в нейроны, которая, однако, в разной степени проявляется в различных классах позвоночных (Chiba, 2014; Григорян, 2015). У низших позвоночных после повреждения сетчатки РПЭ репрограммируются в клетки, подобные стволовым клеткам нейроэпителия, потомки которых дифференцируются во все нервные клетки, включая фоторецепторы, пигментный эпителий и полностью восстанавливают функцию сетчатки. Одним из ключевых регуляторов де- и трансдифференцировки РПЭ у низших позвоночных с высокой способностью к регенерации является bFGF (Sakaguchi et al., 1997; Григорян и др., 2013). У птиц и млекопитающих репрограммирование РПЭ происходит в раннем эмбриональном развитии только под влиянием bFGF, а у взрослых особей при инсерции пронейральных генов Pax6 (Azuma et al., 2005), Neurogenin (Yan et al., 2015). У человека трансдифференцировка РПЭ в нейрональные клетки происходит лишь на ранних этапах эмбриогенеза. Однако у взрослых людей, внешне стабильная популяция клеток РПЭ обнаруживает пластичность при воздействии патологических индукторов *in vivo*, и клетки репрограммируются в фибробластоподобные, что вызывает повреждение сетчатки и, как следствие, нарушение зрения (Sparrow et al., 2014). В тоже время, если клетки РПЭ взрослого человека поместить *in vitro*, они демонстрируют свойства латентных прогениторов - своеобразных мультипотентных клеток, которые в определенных условиях дифференцируются в нейральные и мезенхимные клетки (Кузнецова и др., 2010; Salero et al., 2012). Ранее мы показали, что клетки РПЭ человека *in vitro* утрачивают пигментацию, теряют специфические маркеры РПЭ (RPE65), дедифференцируются, экспрессируют маркеры стволовых (OCT4, NANOG) и нейральных клеток сетчатки (PROX1, PAX6, Musashi-1,  $\beta$ III тубулин). Однако репрограммирование клеток РПЭ человека *in vitro* поддерживается кратковременно, что ставит вопрос о поиске факторов для его стимуляции и поддержания. В связи с этим, целью исследования было изучение механизмов репрограммирования РПЭ человека *in vitro* под влиянием bFGF, который является ключевым

при трансдифференцировке РПЭ у низших позвоночных, эмбрионов птиц и млекопитающих, он также координирует развитие нейронов сетчатки и поддерживает статус многих типов стволовых и плюрипотентных клеток.

Низкая регенеративная способность ЦНС является серьезным препятствием на пути к восстановлению нормального функционирования мозга при травмах и нейродегенеративных заболеваниях. Однако известно, что развивающийся мозг обладает значительно большей пластичностью по сравнению со зрелым мозгом, где клетки радиальной глии уже не пролиферируют, новые нейроны не рождаются и не мигрируют, создаются сложные сети отростков клеток и аксоны достигают максимальной длины. Тем не менее, конститутивный нейрогенез во взрослом мозге присутствует в зонах расположения нейральных стволовых клеток. Одним из многообещающих подходов для восстановления ЦНС является нейротрансплантация, т.е. пересадка тканей донора в мозг реципиента. В данной работе для трансплантации использовалась неокортикальная ткань эмбрионов GFP-мышей разной степени развития в виде диспергированных клеток и клеточных 3D агрегатов. Это позволяет изучить с фундаментальных позиций, как пластичность взрослого мозга, так и пластичность трансплантированной эмбриональной нервной ткани, миграцию клеток и их распределение в условиях микроокружения, которое считается не подходящим для регенерации.

На данный момент для клинического исследования наиболее актуальным материалом для трансплантации являются мезенхимальные стволовые клетки. Прижизненное изучение путей их миграции необходимо для понимания механизмов их положительного влияния на регенеративные способности и пластичность мозга реципиента. Общепринятым и удобным для перенесения в клиническую практику методом для такого изучения является магнитно-резонансная томография (МРТ). Для *in vivo* визуализации трансплантированных в мозг МСК могут использоваться суперпарамагнитные наночастицы оксида железа (III) (superparamagnetic iron oxide (SPIO) particles (SPIO)). В данной работе проводилось исследование различных техник МРТ для прижизненной визуализации трансплантированных непосредственно в мозг МСК или путем внутриартериального введения.

## 6.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### *Культивирование клеток.*

В исследовании использовали линию клеток ARPE-19 пигментного эпителия сетчатки взрослого человека. Линия любезно предоставлена О.Ю. Плетьюшкиной (НИИ Физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ). Для стабилизации культуры клетки

после размораживания субкультивировали в течение 3-х пассажей в ростовой среде DMEM/F12 (Sigma-Aldrich, США), дополненной 10% ЭТС (Gibco, США), L-глутамином (2 мМ, Sigma-Aldrich, США), 100 Ед/мл пенициллином и 100 мкг/мл стрептомицином (Pan Biotech, Германия), при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Пассирование клеток проводили смесью 0,25% трипсина (Gibco, Invitrogen) и 0,48 мМ версена (Gibco, Invitrogen) в соотношении 1:3 (v/v). Для оценки действия bFGF его по 20 нг/мл в ростовую среду того же состава, но с разным содержанием ЭТС (0% или 1%). Клетки ARPE-19 в концентрации 0,5-0,7x10<sup>4</sup>/см<sup>2</sup> высаживали в культуральные флаконы для адгезивных культур T-25 Greiner CELLSTAR® (Greiner Bio-One GmbH, Германия) (1% ЭТС) или флаконы для суспензионных культур T-25 Greiner CELLSTAR® (без ЭТС). Контролем служили клетки, культивированные без bFGF. Наблюдение за поведением клеток проводили на микроскопе Olympus CKX31 цифровой камерой DP70 (Япония) через 24, 48, 72 и 120 ч. В течение 120 ч культивирования смену среды не проводили.

*Морфометрический анализ сферических клеточных агрегатов.*

Размеры клеточных агрегатов оценивали по изображениям в формате "jpg" с помощью программы "ImageJ1.48" (Wayne Rasband, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA). Для контрольной и опытной групп использовали по 3-5 фотографии независимых полей с масштабным увеличением ×100 (objective 10, eyepiece 10), было подсчитано не менее 250 объектов (клеток и клеточных агрегатов). Для оценки статистической значимости различий между группами использовали t-критерий Стьюдента. Различия считали значимыми для p<0,01.

*Оценка пролиферативной активности клеток (MTT-тест).*

Клетки ARPE-19 рассеивали в 96-луночные планшеты (Greiner bio-one, Германия) в концентрациях 0,3x10<sup>4</sup>/см<sup>2</sup>, 0,6x10<sup>4</sup>/см<sup>2</sup>, 1,2x10<sup>4</sup> кл/см<sup>2</sup>, 2,4x10<sup>4</sup> кл/см<sup>2</sup>, 4,8x10<sup>4</sup> кл/см<sup>2</sup>. Инкубировали клетки 24 ч в среде DMEM/F12 с 1% ЭТС в отсутствии (контроль) и в присутствии 20 нг/мл bFGF при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. За 3 часа до окончания инкубации в каждую лунку добавляли стоковый раствор 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромида (MTT) (5 мг/мл, Sigma-Aldrich) в соотношении 1:10. По окончании инкубации удаляли супернатант, добавляли 100 мкл ДМСО (Applichem, Германия) и ресуспендировали осадок. Анализ оптической плотности проводили на планшетном анализаторе «StatFax 2100» (Awareness Technology INC, США) при 545 нм и корректирующем фильтре 630 нм. Для вычисления средних значений оптической плотности (при числе повторов n=8) и стандартных отклонений было применено программное обеспечение Excel 2007 (Microsoft Corporation, USA). Для оценки статистической значимости различий между группами использовали t-критерий Стьюдента. Воздействие bFGF на пролиферативную активность

клеток считали выявленным при установлении различий на уровне значимости  $p < 0,01$ . Пролиферацию клеток (%) вычисляли следующим образом: пролиферация клеток (%) =  $([OD] \text{ bFGF} / [OD] \text{ контроль}) \times 100$ , где OD - среднее значение оптической плотности относительного образца при 545 нм.

*Иммуноцитохимическое исследование клеток.*

Оценку дифференцировки клеток проводили методом ИЦХ, культивируя клетки на круглых стеклах в 24-луночных планшетах (CellStar, Германия). Клетки в концентрации  $0,5-0,8 \times 10^4 / \text{см}^2$  высаживали в отсутствие (контроль) и в присутствии 20 нг/мл bFGF в среде DMEM/F12 с 1 % ЭТС в лунки планшетов и культивировали в течение 24, 48 и 120 ч. Затем клетки отмывали от культуральной среды ФСБ и фиксировали 4% раствором параформальдегида (Sigma-Aldrich, США) на ФСБ в течение 5 мин. Препараты хранили в смеси глицерина и этиленгликоля при температуре  $-20^\circ\text{C}$  до проведения ИЦХ окраски.

Окраску клеток проводили иммунофлуоресцентным методом, используя первичные антитела против коннексина 43 (Cx43, C6219, LOT: 102K4859 1:200; кроличьи поликлональные, Sigma-Aldrich) и  $\beta$ III тубулина (ab7751 LOT: 754961 1:200; мышинные моноклональные, Abcam, США) и вторичные антитела, меченные Alexa Fluor® 488 или 594 флуорохромами (1:300, Molecular Probes, USA). Препараты опытной и контрольной групп обрабатывали параллельно для последующего сравнительного анализа и заключали в среду с ядерным красителем DAPI (Vectashield®, Vector Laboratories, USA). Оценку результатов ИЦХ реакций и фотографирование проводили на микроскопе OlympusCKX31 (Япония) с цифровой камерой DP70 (Япония) или микроскопе Opton (Германия) с цифровой камерой Olympus SP-350.

*Количественный ПЦР в реальном времени (кПЦР).*

Выделение тотальной РНК из культивированных клеток проводили с TRI® Reagent (Sigma-Aldrich, США) в соответствии с инструкцией производителя. Синтез кДНК проводили с помощью набора RevertAid H Minus Kit (Fermentas, Литва) в объеме 20 мкл, используя 1 мкг тотальной РНК, обработанной ДНКазой.

Методом кПЦР оценивали изменения уровня экспрессии мРНК следующих генов: *MITF*, *OTX2*, *PAX6*,  $\beta$ III тубулина (*TUBB3*), *NANOG*, *OCT4*, *SOX2* (праймеры и зонды ДНК-Синтез, Москва, Россия), *KLF4*. В качестве эндогенного контроля использовали глицеральдегид-3фосфатдегидрогеназу (*GAPDH*) (праймеры и зонд ДНК-Синтез). Программа для ПЦР включала: 1 цикл денатурации при  $95^\circ\text{C}$  3 мин, 40 циклов денатурации при  $95^\circ\text{C}$  15 сек и совмещенный этап отжига-синтеза при  $60^\circ\text{C}$  1 мин. Пороговый цикл определяли, применяя программное обеспечение 7500 Software v2.0.1 (Applied Biosystems). Экспрессию каждой мРНК определяли постановкой двух ПЦР реакций, в двух повторах.

Результаты представлены как средние значения  $\pm s$  (стандартное отклонение). Для оценки статистической значимости различий между группами использовали t-критерий Стьюдента. Различия считались достоверными при уровне значимости  $p < 0,01$ .

В работе, направленной на фундаментальное исследование пластичности мозга, материалом для трансплантации послужили суспензии клеток или фрагменты неокортекса эмбрионов трансгенных GFP мышей (Okabe M., 1997) на стадиях развития Э-12.5, Э-14.5, Э-19.5. Суспензии клеток (из расчета 500 тыс. клеток в 1.5мкл раствора Хэнкса на мышшь) или фрагменты ткани (3D-тканевые трансплантаты) трансплантировали в стриатум реципиента. Иммуногистохимическое исследование проводили с помощью антител: Anti-GFP (маркер клеток донора); anti-GFAP (маркер глиальных клеток); anti-NeuN (маркер зрелых нейронов); anti-Ki67 (маркер пролиферирующих клеток); anti-DCX (маркер незрелых нейронов); anti-TH (маркер тирозингидроксилазных клеток и волокон). Для визуализации и получения микрофотографий использовали флуоресцентный микроскоп Keyence BZ-9000E и лазерный сканирующий конфокальный микроскоп Leica TCS SP5.

Для исследования способов прижизненной визуализации трансплантированных клеток МСК, а также подходов к внутриартериальному введению использовались самцы белых крыс линии Wistar. Для трансплантации использовались суспензии МСК, выделенные из плаценты человека. Клетки метили суперпарамагнитными наночастицами оксида железа (III) диаметром 0,5-0,99 мкм с флуоресцентной меткой Dragon Green. МРТ производили на МР-томографе ClinScan (BrukerBioSpin) с частотой 300 МГц и индукцией магнитного поля 7 Тесла. Визуализация клеток проводилась с помощью флуоресцентного микроскопа Keyence BZ-9000E и сканирующего конфокального микроскопа Nikon A1R MR+.

### 6.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

*Характеристика морфологии клеток ARPE-19 в различных условиях культивирования.*

В присутствии сыворотки клетки ARPE-19 также как и клетки из первичного материала (Кузнецова и др., 2010) формировали адгезивную культуру, гетерогенную по морфологии. Концентрация ЭТС (1 или 10%) не оказывала значимого влияния на рост и дифференцировку клеток ARPE-19: они имели схожие темпы роста и идентичную морфологию. В центре плотно упакованных колоний располагались клетки полигональной формы, а по периферии – вытянутые веретеновидные. Кроме них встречались фибробластоподобные клетки и единичные клетки с вытянутыми отростками. При посадочной концентрации  $0,7 \times 10^4$  кл/см<sup>2</sup> плотность клеток достигала 80-90% культуральной

поверхности через 5-6 суток культивирования. В местах плотного монослоя в среде с ЭТС на поверхности распластанных клеток наблюдалось образование сферических клеточных агрегатов. Формирование подобных агрегатов наблюдали ранее на поверхности монослоя первичной культуры клеток РПЭ человека (Кузнецова и др., 2010; Kuznetsova, Aleksandrova, 2017).

При пассировании и переводе клеток ARPE-19 на бессыворотную среду после добавления bFGF, через 72 ч отмечено образование сферических агрегатов из 2-4 клеток, которые прикреплялись к неадгезивному пластику. Через 120 ч отмечено двукратное увеличение процентного содержания агрегатов по сравнению с контролем, а также увеличение среднего размера агрегатов и изменение их распределения по размеру в пользу фракции  $> 500 \text{ мкм}^2$ .

Образование подобных агрегатов описано ранее для клеток РПЭ взрослого человека (Кузнецова и др., 2010; Kuznetsova et al., 2017; Milyushina et al., 2011) и плодов человека 9-11.5 недель развития (Milyushina et al., 2012). Образование клетками ARPE-19 сферических агрегатов, что может свидетельствовать о присутствии клеток со свойствами плюри- и/или мультипотентности (Akrami et al., 2009; Taranova et al., 2006).

При добавлении bFGF в среду с 1% ЭТС через 24 ч отмечалось изменение морфологии клеток и структуры колоний по сравнению с контролем: клетки становились менее вытянутыми, наблюдалось формирование рыхлых колоний. Такую морфологию клетки сохраняли вплоть до 72 ч культивирования, через 120 ч – в их морфологии происходили существенные изменения. Часть клеток сохраняла полигональную форму, в то время как около 20% клеток приобретали вытянутую форму и формировали длинные аксоноподобные отростки. Подобные изменения в морфологии клеток ARPE-19 наблюдали Сагг с соавт. (2011) при использовании фенретинида, активатора нейральной дифференцировки.

*Увеличение пролиферации клеток под действием bFGF (МТТ-тест).*

Мы определили оптимальную минимальную посадочную концентрацию клеток ARPE-19 —  $0,6 \times 10^4 \text{ кл/см}^2$ , при которой отмечено достоверное увеличение пролиферативной активности клеток под влиянием bFGF, и показали, что пролиферация клеток увеличивается приблизительно на 20% по сравнению с контролем) (Рисунок 6.1). При высокой посадочной концентрации ( $4,8 \times 10^4 \text{ кл/см}^2$ ) рост клеток замедлялся, что вероятно связано с контактным торможением. Полученные результаты подтверждают ранее полученные данные о том, что экзогенный bFGF стимулирует пролиферацию клеток РПЭ линии D407 человека и первичной культуры РПЭ свиньи (Schwegler et al., 1997).

*Иммуноцитохимический анализ маркеров дифференцировки.*

ИЦХ исследование клеток ARPE-19 с антителами к Cx43 (коннексин 43, ключевой белок щелевых контактов) и  $\beta$ III тубулину (маркер ранней фазы дифференцировки нейронов сетчатки: колбочек, горизонтальных, амакриновых и ганглиозных клеток) показало, что эти белки экспрессировались и в контрольной, и в опытной группе клеток. Однако интенсивность окрашивания и распределение числа клеток, несущих эти маркеры, менялось со временем культивирования. Так, через 24 ч после добавления bFGF существенной разницы в экспрессии Cx43 и  $\beta$ III тубулина по сравнению с контролем не выявлено: во всех клетках наблюдалась слабая интенсивность сигнала на  $\beta$ III тубулин, а на их поверхности в местах контакта с соседними клетками – Cx43-положительное окрашивание (Рисунок 6.2 а, г). Через 48 ч наблюдалось снижение интенсивности окрашивания на Cx43 и появление ламеллярного окрашивания на  $\beta$ III тубулин (Рисунок 6.2 д), через 120 ч – выявлялось усиление иммунофлуоресцентного сигнала на  $\beta$ III тубулин, в том числе в клетках с длинными аксоноподобными отростками, а Cx43-положительное окрашивание определялось на поверхности лишь небольшого числа клеток (Рисунок 6.2 е).

Полученные данные свидетельствуют, что клетки ARPE-19, которые в норме представляют собой эпителиоподобные клетки и экспрессируют Cx43 под влиянием bFGF утрачивают эпителиальную и приобретают нейрональную дифференцировку (Рисунок 6.4 б, в). Известно, что Cx43 играет важную роль в дифференцировке РПЭ (Kojima et al., 2008). Нокдаун Cx43 в клетках человека, трансфицированных конструкцией, несущей крысиный Cx43, ингибировал дифференцировку, тогда как гиперэкспрессия Cx43 индуцировала дифференцировку клеток РПЭ в условиях дедифференцировки.

*Анализ экспрессии генов плюрипотентности и дифференцировки методом кПЦР.*

Чтобы выявить изменения в дифференцировке клеток ARPE-19 под действием bFGF был проведен кПЦР для определения экспрессии генов инициаторов плюрипотентности *OCT4*, *NANOG*, *SOX2*, *KLF4* и генов *MITF*, *OTX2*, *PAX6* и *TUBB3* - специфичных для РПЭ и нейральных клеток.

Профиль экспрессии мРНК в контроле характеризуется отсутствием *SOX2* и чрезвычайно низким уровнем экспрессии маркеров плюрипотентности *OCT4* и *NANOG* за исключением *KLF4*. В то же время можно отметить высокий уровень экспрессии как маркеров РПЭ дифференцировки (*MITF*, *PAX6*), так и маркера нейральной дифференцировки *TUBB3*. Таким образом, можно полагать, что изначально дедифференцированные клетки ARPE-19 обладают способностью к дифференцировке в нейроноподобные клетки и в РПЭ.

Анализ результатов кПЦР через 24 ч после воздействия bFGF показал, что в клетках существенно увеличивался уровень экспрессии мРНК *KLF4*, в то время как экспрессия всех остальных исследованных генов менялась незначительно ((Рисунок 6.3).

Возрастание экспрессии *KLF4* через 48 ч после воздействия bFGF сопровождалось значимым падением экспрессии *PAX6*, *MITF* и *OTX2* – специфических маркеров дифференцировки РПЭ. Наивысший уровень экспрессии мРНК *KLF4* наблюдался через 72 ч после добавления bFGF, далее он резко падал к 120 ч (Рисунок 6.2), что сопровождалось возвратом экспрессии *PAX6*, *MITF* и *OTX2* к базовому уровню и трехкратным ростом экспрессии мРНК *TUBB3*. Полученные данные свидетельствуют о начале процесса дифференцировки клеток по двум путям – РПЭ и нейральном. Экспрессия мРНК генов плюрипотентности *OCT4* и *NANOG* находилась на одном уровне с контролем и значимо не менялась. мРНК *SOX2* в клетках не детектировалась, что, по-видимому, связано с взаимоисключающим высоким уровнем экспрессии *TUBB3* (Taranova et al., 2006).

Результаты кПЦР в целом согласуются с данными морфологического и ИЦХ анализа показавшими, что линия ARPE-19 гетерогенна по составу клеток. Под влиянием bFGF часть клеток сохраняет эпителиальные свойства, они экспрессируют Сх43 и не изменяют характера дифференцировки в течение всего времени эксперимента. В то время как другие утрачивают экспрессию маркера РПЭ Сх43, экспрессируют βШтубулин, имеют длинные аксоноподобные отростки и трансдифференцируются по нейральному пути (Рисунок 6.2 е).

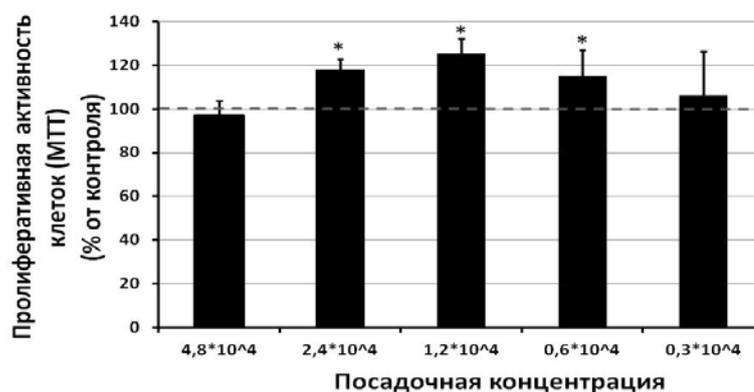


Рисунок 6.1 - Пролиферативная активность клеток ARPE-19 при разной посадочной концентрации клеток (МТТ-тест).

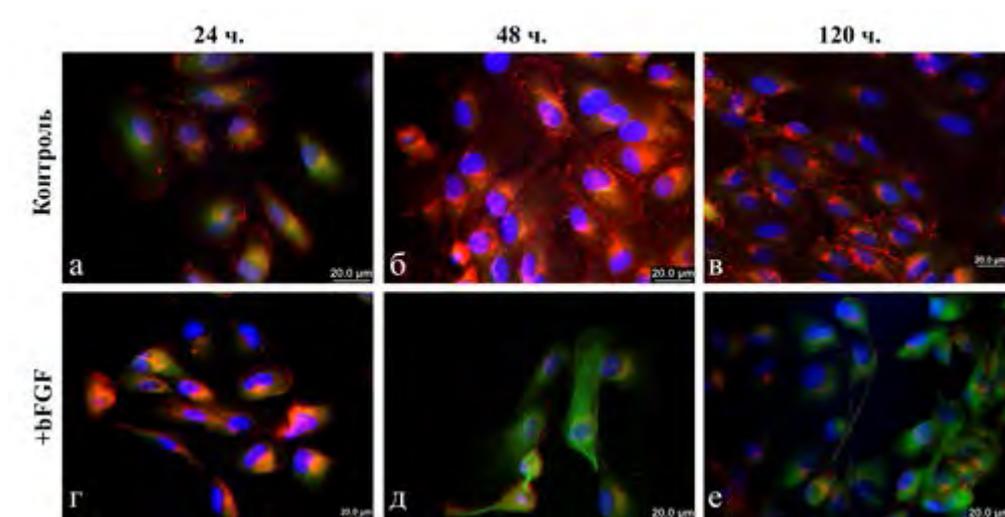


Рисунок 6.2 - Иммуноцитохимическая характеристика клеток ARPE-19 через 24 ч (а, г), 48 ч (б, д) и 120 ч (в, е) после инкубации с bFGF. Иммунофлуоресцентный метод. Двойное окрашивание на Sx43 (красное свечение) и βIII тубулин (зеленое свечение). Ядра окрашены DAPI (синее свечение).

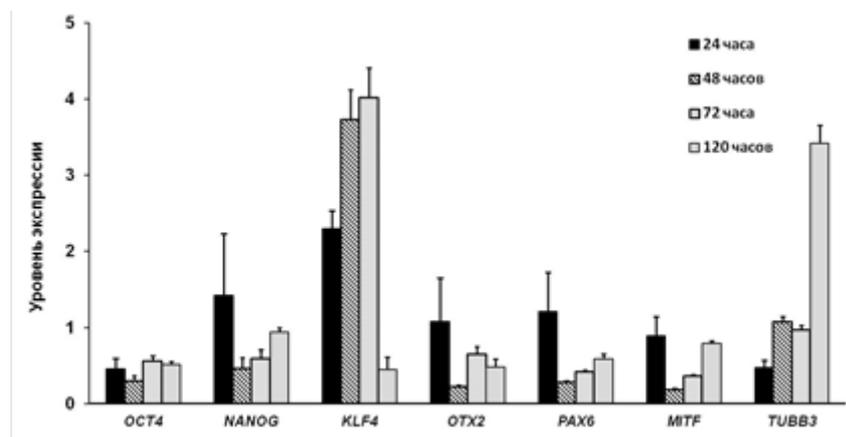


Рисунок 6.3 - Влияние bFGF на экспрессию мРНК генов дифференцировки и плюрипотентности клеток ARPE-19. Изменение экспрессии показано относительно контрольной культуры клеток ARPE-19 с временем культивирования 24, 48, 72, 120 ч соответственно. Планки погрешности соответствуют значениям стандартных отклонений.

Фундаментальное исследование регенерации ЦНС показало следующее. Использование трансплантатов, полученных от доноров разных стадий развития, а также трансплантатов двух типов позволило выявить особенности развития клеточных и 3D-тканевых трансплантатов неокортекса различной степени дифференцировки. Показано, что в интактном мозге успешно развиваются как трансплантаты ткани, в которой только начался процесс генерации нейронов (Э12,5), так и ткани, в которых этот процесс близок к завершению (Э19,5). Клетки трансплантатов дифференцировались в глиальном направлении уже через 7 суток после операции (ткань эквивалентна Э19,5), что является ускорением глиальной дифференцировки. При этом нейрональная дифференцировка проходит с задержкой. Это может быть связано с процедурой трансплантации или влиянием

микроокружения взрослого мозга. Клетки трансплантатов неокортекса (Э12,5, Э14,5) активно пролиферировали через 7 суток после операции, хотя в эквивалентной по возрасту ткани эмбриона 19,5 суток развития клетки выходят из фазы пролиферации. Клетки пересаженной ткани неокортекса донора приобретали морфологию зрелых нейронов и астроцитов. На дендритах нейронов формируются шипики, что говорит о возможности установления этими клетками синаптических контактов (Рисунок 6.4). Наиболее обширная миграция трансплантированных клеток наблюдалась от 3D-тканевого трансплантата неокортекса в менее зрелом состоянии (Э12,5 и Э14,5). Клетки мигрировали вдоль волокон мозолистого тела и стриатума, вдоль сосудов, под оболочками и первому слою коры, также наблюдалась миграция клеток в паренхиму стриатума и неокортекса реципиента. Характерный глиальный рубец вокруг пересаженной ткани не образовывался, однако наблюдалось усиление глиальной реакции. Крайне интересным является наблюдение реципрокного роста волокон между донором и реципиентом. Основными путями роста отростков клеток трансплантатов были следующие: дорсальная часть стриатума (под мозолистым телом); I, V-VI слой неокортекса; волоконные тракты стриатума; капсула интерна. Такой паттерн отростков и плотные сети были характерны для 3D-тканевых трансплантатов неокортекса любого срока развития. Суспензионные трансплантаты подобные сети формировали только через 60 дней после операции. В свою очередь в ткань донора, которая находилась в стриатуме реципиента, вращали тирозингидроксилазные волокна, однако плотность вращающихся волокон была не столь значительна, как в окружающей ткани.

Прикладное исследование методов и режимов для визуализации при внутримозговом и внутриартериальном введении МСК выявило следующее. Наиболее чувствительным и подходящим для визуализации МСК (меченных SPIO) трансплантированных в мозг либо введенных в артерию был МР-режим SWI (Рисунок 6.5). Данный режим позволял визуализировать до ста клеток при внутримозговом введении и единичные клетки при внутриартериальном. Были выявлены пути миграции мезенхимальных стволовых клеток в трех основных направлениях: вдоль мозолистого тела в сторону субвентрикулярной зоны; вдоль мозолистого тела латеральнее зоны введения (46%); по сосудам в пределах полушария, в которое производилась трансплантация. Оптимальными параметрами для минимизации риска осложнений от внутриартериального введения МСК были следующие: введение  $5 \times 10^5$  МСК в 1 мл буферного раствора со скоростью 100 мкм / мин.

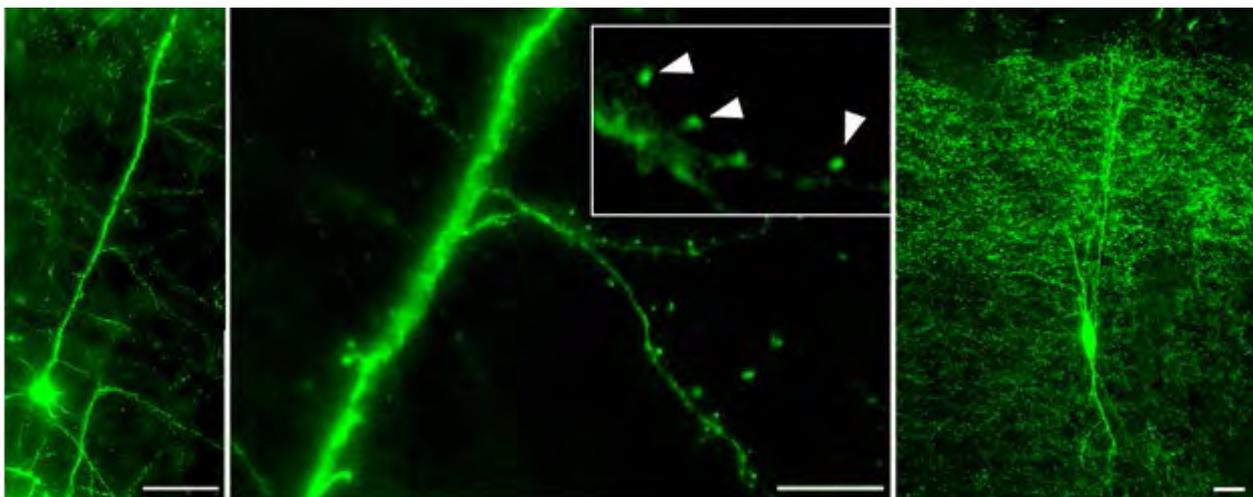


Рисунок 6.4 - Миграция и морфология клеток. А – мигрировавшая в кору реципиента клетка суспензионного трансплантата неокортекса Э12,5 через 30 суток после операции приобретает морфологию пирамидного нейрона. Б – дендрит соответствующего пирамидного нейрона. Во врезке шипики на дендрите (белые треугольники). В – мигрировавшая в стриатум клетка суспензионного трансплантата с морфологией интернейрона. Масштабный отрезок: А – 50 мкм, Б – 10 мкм, В – 20 мкм.

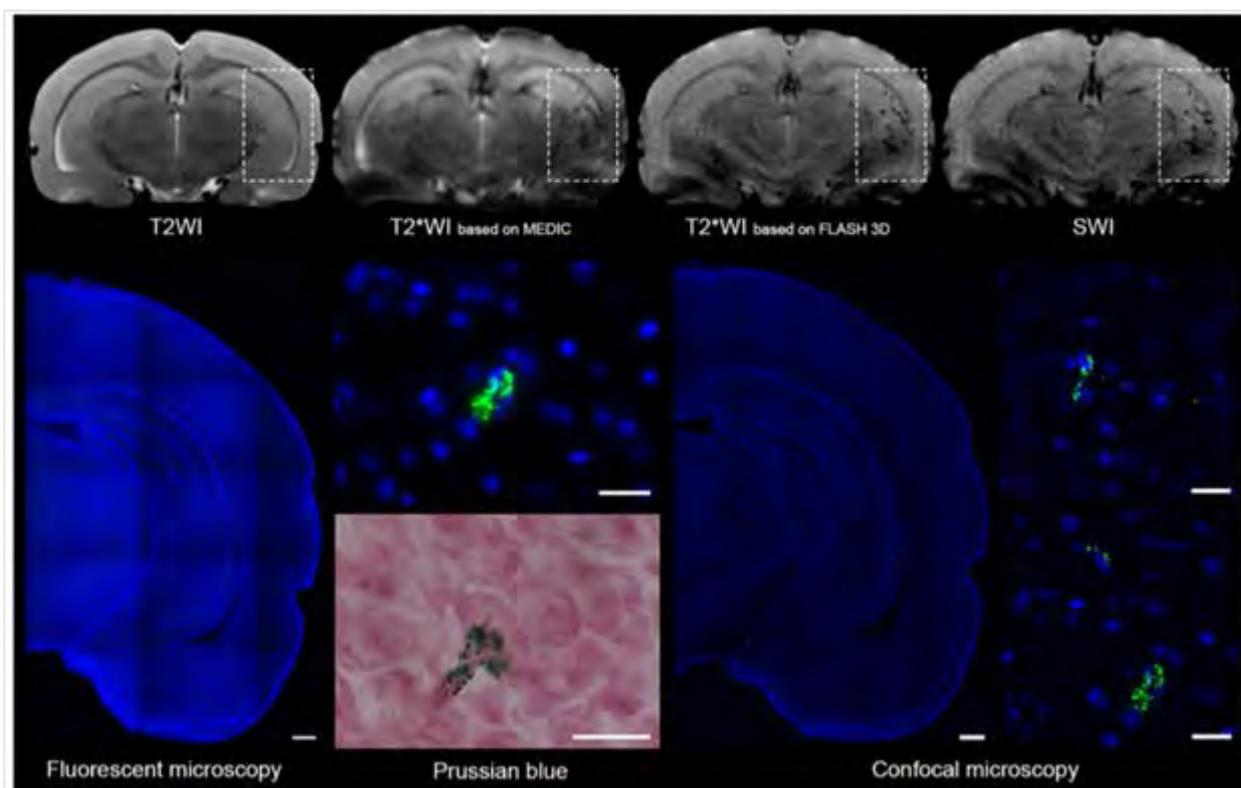


Рисунок 6.5 - МР-изображения и микрофотографии мозга крыс после внутриартериального введения  $5 \times 10^5$  МСК, меченных суперпарамагнитными наночастицами оксида железа (III). Верхний ряд: различные виды МР-режимов. Пунктиром выделена области мозга, в которых были обнаружены клетки. Нижний ряд: флуоресцентная, конфокальная и светлополюсная микроскопия срезов мозга, подтверждающая данные МРТ. Масштабный отрезок на панорамных изображениях полушарий 500мкм, на большом увеличении 50 мкм.

## 6.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ключевую роль в поддержании гомеостаза и функционирования нейронов сетчатки глаза играют клетки пигментного эпителия (ПЭ). При возрастной макулярной дистрофии у человека ПЭ репрограммируется в фибробластоподобные клетки, вызывающие нарушение зрения и слепоту. Изучение молекулярно-генетических механизмов показало, что клетки ПЭ человека дедифференцируются, активируют гены плюрипотентности и приобретают способность к дифференцировке по нейральному и мезенхимному пути. Обнаружено, что стимулятором нейральной дифференцировки клеток ПЭ является эволюционно консервативный фактор bFGF, который может быть перспективен для реконструкции сетчатки при возрастной макулярной дистрофии человека (Рис.6.1, 6.2, 6.3).

Исследование показало, что трансплантация низкодифференцированных клеток как нейрального, так и мезенхимного происхождения является перспективной для регенерации взрослого мозга. Трансплантированные клетки нейрального генеза мыши мигрируют, дифференцируются и интегрируются в мозг взрослого реципиента. МСК человека в целом обладают сходным поведением, они способны мигрировать по парехиме и сосудам, что можно визуализировать МРТ в определенном режиме.

## Раздел 7. Клеточные, молекулярно-генетические и эпигенетические механизмы развития и регенерации тканей глаза позвоночных животных и человека

### 7.1 ВВЕДЕНИЕ

Ранее были изучены клеточные механизмы развития и регенерации сетчатки и некоторых других тканей глаза низших и высших позвоночных. Выявлены последовательность событий, особенности пролиферативной активности и дифференцировки клеток по мере развития сетчатки, радужки, хрусталика глаз высших позвоночных. Те же параметры охарактеризованы для регенерации сетчатки и хрусталика у низших позвоночных. Определены потенциальные внутренние клеточные источники для регенерации сетчатки у птиц, млекопитающих и человека. Это стало основой широкомасштабного изучения молекулярных основ развития/регенерации как у низших, так и высших позвоночных и человека. Определены основные регуляторные факторы процессов - молекулы сигнальных каскадов и их мишени, а также транскрипционные факторы.

Интегрины, трансмембранные белки, играют важную роль в адгезии клеток к внеклеточному матриксу и участвуют в регуляции миграции, пролиферации и дифференцировке практически всех типов клеток. Интегриновые рецепторы формируются за счет взаимодействия одной альфа и одной бета субъединиц. В хрусталике глаза мыши экспрессируется целый ряд интегринов, однако полный их спектр не изучен. В настоящей работе изучали экспрессию альфа и бета интегринов в хрусталике мыши в ходе эмбрионального развития до и после тканеспецифического нокаута бета-1 интегрин.

### 7.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы различные животные (тритоны, куры, мыши и/или их зародыши). Применяли как интактный материал, так и различные способы повреждения тканей глаза (удаление, отслойка сетчатки, удаление хрусталика). Использовали СТ глаза человека и его плодов. Все процедуры проводились в соответствии с правилами биоэтики, а материал получали из лицензированных источников. Основными методами изучения явились: рутинная гистология, иммуногистохимия, ПЦР анализ, включая ПЦР в реальном времени. При работе со СТ использовали методы физико-химии, УФ-спектрофотометрию и ВЭЖХ. На 2017 год были сформулированы следующие задачи: Изучение экспрессии транскрипционных факторов семейства *Vsx* в ходе ретиногенеза у кур (отв. исп. Зиновьева Р.Д.). Изучение специфических, ассоциированных с педоморфозом, молекулярных

характеристик пигментного эпителия сетчатки и радужки глаза *Urodela* для объяснения высокой способности этих животных к регенерации сетчатки и хрусталика (отв. исп. Григорян Э.Н., Маркитантова Ю.В.). Исследование экспрессии и клеточной локализации коллаген-связывающих интегринов в хрусталике глаза у зародышей мыши. Использовали трансгенных мышей с геном Cre-рекомбиназы под контролем промотора гена альфаА-кристаллина и мышей-гибридов (C57BL6 × 129)F1 со вставками сайтов LoxP по обе стороны от экзона 3 гена бета-1 интегрин ("The Jackson Laboratory", Bar Harbor, США) (отв. исп. Смирский В.Н.). ПЦР проводили с использованием специфических праймеров и стандартного набора реактивов для амплификации ("Qiagen", США). Продукты амплификации разделяли электрофорезом в агарозном геле в трис-ЭДТА-боратном буфере в присутствии бромистого этидия. Иммунофлуоресцентный анализ проводили по стандартной методике на криостатных срезах толщиной 14 мкм, фиксированных смесью ацетон-метанол (1:1) при -20°C. Использовали вторичные антитела к IgG крысы, конъюгированные с флуорохромом AlexaFluor 568 ("Molecular Probes", США, 1:200). Ядра клеток окрашивали специфичным для ДНК красителем Draq5 ("Biostatus Limited", Великобритания, 1:3000). Срезы заключали в забуференный глицерин (90%, трис-HCl буфер, pH 8.0), содержащий 0.1% р-фенилендиамина. Иммунофлуоресцентную реакцию анализировали с помощью конфокального микроскопа Zeiss LSM 510 ("Carl Zeiss Inc.", Германия). Качественная и количественная оценки альбумина в СТ, хрусталике и сетчатке в пренатальном развитии глаза человека (отв. исп. Панова И.Г.).

### 7.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучены специфические, ассоциированные с педоморфозом, клеточные и молекулярные характеристики ретинального пигментного эпителия и радужки глаза низших позвоночных хвостатых амфибий (*Urodela*). В соответствии с ранее полученными данными определены особенности цитоскелета этих клеток, клеточных контактов и ВКМ, способные обеспечить быструю трансформацию фенотипа этих клеток, их репрограммирование в нейральном направлении. Проанализирован широкий спектр ТФ, работа сигнальных путей, являющиеся пререквизитом для регенерации сетчатки и хрусталика и объясняющие высокие способности этих животных к полноценной регенерации сетчатки и хрусталика. Опубликована статья, в которой обобщены полученные результаты по экспрессии регуляторных генов на ранних стадиях репрограммирования *in vivo* (natural reprogramming) клеток РПЭ глаза при регенерации сетчатки у взрослого тритона. Выявление внутренних клеточных свойств, необходимых для репрограммирования, направлены на поиск

эффективных подходов для получения методами клеточных технологий регенерационного резерва с заданными свойствами и стимуляции восстановления тканей глаза у высших позвоночных (отв. исп. Григорян Э.Н., Маркитантова Ю.В.).

В онтогенезе мыши изучена роль интегринов в период формирования отделов (эпителия, ядра) хрусталика. С помощью ПЦР проанализирована экспрессия мРНК альфа-1, -2, -10 и -11 интегринов в хрусталике 16-суточных зародышей, новорожденных и взрослых мышей. В результате на всех сроках в тканях хрусталика выявлена экспрессия всех интересующих интегринов, однако обнаруживались отличия в их распределении. У взрослых мышей альфа-1 и альфа-11 интегрины экспрессируются преимущественно в эпителии, тогда как альфа-2 и альфа-10 интегрины – в поверхностных волокнах хрусталика. Данные свидетельствуют о роли интегринов в морфогенезе хрусталика, об их участии в дифференцировке эпителиальных клеток и созревании волокон.

У кур изучена экспрессия гомеобоксных генов *Vsx1/Chx10-1* и *Vsx2/Chx10*, относящихся к семейству *Vsx* (Visual system homeobox), в ходе морфогенеза сетчатки глаза кур. Выявлена корреляция активности генов *Vsx1/Chx10-1* и *Vsx2/Chx10* с дифференцировкой биполяров внутреннего ядерного слоя формирующейся сетчатки. Определена локализация соответствующих белков в биполярных клетках сетчатки, в контроле дифференцировки которых эти факторы с высокой вероятностью принимают участие. При этом не исключается роль исследованных генов в других процессах, сопровождающих ретиногенез, в частности клеточной миграции, установлении финального клеточного местоположения в сетчатке и установлении нейральных связей с окружением.

Помимо изучения молекулярно-генетических особенностей формирования разных тканей глаза в онтогенезе птиц и грызунов, исследованы некоторые аспекты формирования глаза развивающегося человека. В исследованиях процессов роста и дифференцировки тканей глаза человека в раннем пренатальном развитии изучены молекулярные события, указывающие на роль стекловидного тела в морфогенезе сетчатки, хрусталика, тканей переднего отдела глаза. Особое внимание сосредоточено на компонентах стекловидного тела (альбумин, альфа-фетопроtein и каротиноиды (ксантофиллы)). Выяснено, что они присутствуют не только в стекловидном теле, но также в в тканях, окружающих стекловидное тело (сетчатке и хрусталике). Измерены изменения концентрации альбумина и альфа-фетопроteина. Между 17 и 24 неделями концентрации АФП и СА в стекловидном теле имеют высокие значения, хотя на протяжении этого времени уже происходит постепенное снижение их концентрации, при этом скорость снижения концентрации АФП превышает таковую СА. После 24 недели наблюдается более резкое снижение концентрации обоих белков.

Последние, как известно, ответственны за создание осмотического давления, перенос биологически активных молекул, антиоксидантную защиту в глазу высших позвоночных. Накопление подобных сведений, дающих вклад фундаментальные знания, необходимы для практической офтальмологии - разработке способов коррекции нарушений, возникающих в развитии глаза у человека.

Изучена экспрессия и клеточная локализация альфа и бета интегринов в хрусталике мыши в ходе эмбрионального развития до и после тканеспецифического нокаута бета-1 интегрин с помощью ПЦР метода и иммунофлуоресцентного анализа.

С помощью ПЦР удалось выявить снижение экспрессии альфа-1, -3, -6, -8, -10 и бета-8 интегринов в хрусталике новорожденных мышей после нокаута бета-1 интегрин. Показано, в ходе морфогенеза хрусталика спектр интегринов в целом расширяется, а дифференцировка клеток ЭХ в волокна сопровождается активацией и усилением экспрессии альфа-6, бета-8 и некоторых других интегринов.

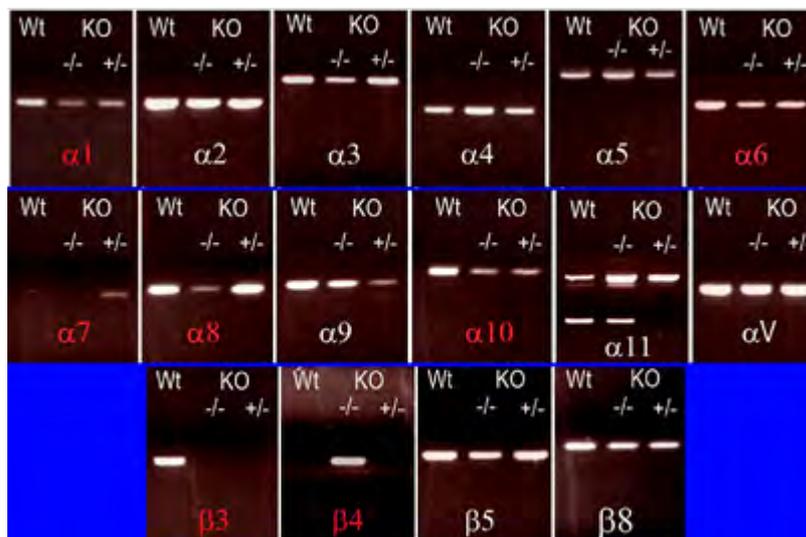


Рисунок 7.1 - ПЦР-анализ экспрессии интегринов в хрусталике новорожденных мышей Wt – мыши дикого типа, KO – трансгенные мыши: +/- гетерозиготы (  $\square$   $\beta$ 1<sup>F/+</sup>/Cre+ гомозиготы (  $\square$   $\beta$ 1<sup>F/F</sup>/Cre+). Красным выделены гены интегрины, для которых обнаружены резкие изменения уровня экспрессии в хрусталике после нокаута. кДНК, синтезированные на мРНК из хрусталика, нормировали по отношению к гену  $\square$  макроглобулина. Электрофорез в 2.5%-ном агарозном геле.

## 7.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Раздел темы объединяет сведения о молекулярных механизмах регенерации и развития тканей глаза позвоночных, полученных в 2017 году. Получена информация о роли ряда генов и сигнальных молекул в формировании тканей глаза (хрусталик, сетчатка, стекловидное тело, радужка) амфибий, птиц, млекопитающих и человека. Проанализированы молекулярные основы высокой регенераторной способности у низших позвоночных. Высказано предположение о ведущей роли ювенильного профиля генэкспрессии у

педоморфных животных. Делается вывод о ключевой роли бета-1 интегрина в формировании интегриновых рецепторов и о возможности компенсации потери бета-1 интегрина за счет других бета интегринов (прежде всего бета-5 интегрин).

Представленные результаты 2017 являются продолжением этих исследований, в конечном итоге направленных на стимуляцию регенерации тканей глаза и коррекцию аномалий их развития.

## Раздел 8. Молекулярные механизмы канцерогенеза и регенерации печени

### 8.1 ВВЕДЕНИЕ

Взаимодействие гетерогенных клеточных популяций внутри опухоли происходит через внеклеточный матрикс (ВКМ), главным небелковым компонентом которого является гиалуроновая кислота. Белки, отвечающие за синтез (гиалуронан синтетазы Has2 и Has3), связывание (рецепторы CD44 и Rhamm) и деградацию (гиалуронидазы Hyal1 и Hyal2) гиалуроновой кислоты, регулируют физико-химические свойства ВКМ, оказывая существенное влияние на выживаемость и агрессивность опухолевых клеток (Schwertfeger et al., 2015).

### 8.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

*Выделение тотальной РНК из ткани печени и клеточных культур ГЦК.* Тотальную РНК получали из образцов 10-40 мг ткани печени мыши или из 10<sup>7</sup> клеток с использованием реагента TriReagent (Sigma, США) и очищали от примесей ДНК набором «DNAse I RNAase-free» (Thermo Scientific, США), согласно протоколам производителя. Концентрацию тотальной РНК измеряли на приборе NanoDrop One (Thermo Scientific, США) при длине волны 260 нм.

*Синтез кДНК библиотек* проводили с помощью oligo(dT) праймеров и набора «MMLV Kit» по протоколу производителя (Евроген, Россия). В синтез брали 1-3 мкг тотальной РНК. Полученную кДНК хранили при -20°C.

*Полимеразная цепная реакция (ПЦР) и ПЦР в реальном времени.* Специфические праймеры к исследуемым генам конструировали на основе нуклеотидной последовательности из разных экзонов с помощью программного обеспечения Beacon Designer (Premier Biosoft, США), DNASTAR (Англия) и открытых международных баз данных NCBI и USCS (США). ПЦР проводили на приборе Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystem, США), используя набор для амплификации ДНК с Taq полимеразой (Силекс, Россия).

ПЦР в реальном времени проводили на приборе StepOnePlus (Applied Biosystems, США), используя готовую смесь для ПЦР «qPCRmix-HS SYBR+HighROX» (Евроген, Россия). Данные по экспрессии исследуемых генов были нормированы относительно гена домашнего хозяйства Gapdh.

*Статистическая обработка результатов, полученных методом ПЦР в реальном времени.* Статистическую обработку данных проводили в программах StepOne Software v2.3,

DataAssist Software v3.01, Statistica 6.0 и GraphPad Prism v5.0. Критерий Манна-Уитни использовали для выявления значимых различий.

*Вестерн-блот анализ.* Выделение тотального белка из ткани и клеточных культур проводили с помощью RIPA буфера. Белки определяли с помощью антител: альфафетопротейн (Имтек),  $\beta$ -актин (Santa Cruz),  $\alpha$ -тубулин (Santa Cruz), альбумин (Novus Biologicals) по стандартному протоколу.

*Иммуоцитохимическое маркирование клеточных культур ГЦК.* Опухолевые клетки выращивали на покровном стекле в CO<sub>2</sub> инкубаторе до конfluenceности 70-80%. Затем клетки фиксировали и проводили окрашивание антителами CD44, конъюгированными с биотином, клон IM7 (Pharmigen), HAS2 (Santa Cruz), Hoechst 33342 (Thermo Fisher) по стандартному протоколу. Анализ препаратов проводили с помощью конфокального микроскопа Leica SP5 (Leica, Германия), а также с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DMI6000 (Leica, Германия) с использованием соответствующего набора светофильтров и источников возбуждения. Обработка изображений проводилась с помощью программного пакета ImageJ.

### 8.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

11 первичных культур, выделенных из опухоли гепатоцеллюлярной карциномы мыши (ГЦК), были проанализированы на потенцию синтеза (Has2, Has3) и деградации гиалуроновой кислоты (Hyal1, Hyal2) и ее рецепторов (CD44, Rham). Повышенный уровень экспрессии генов Has2 и Has3 наблюдался в 6 культурах из 11 (4.2, 4.3, 4.6-4.9), повышенный уровень только Has2 обнаруживался в двух культурах (4.4, 4.5). Ни в одной из культур, полученных из единичных клеток (4.1sc-4.3sc), не выявлено повышенной экспрессии Has2 и Has3. Уровень экспрессии Hyal2 понижен или находится на уровне контроля во всех культурах. Уровень экспрессии Hyal1 повышен в 2-х культурах из 11, в которых также повышен Has2. Экспрессия генов CD44 и Rhamm повышена (в 7-65 и 3-24 раз, соответственно) во всех первичных культурах ГЦК (Рисунок 8.1).

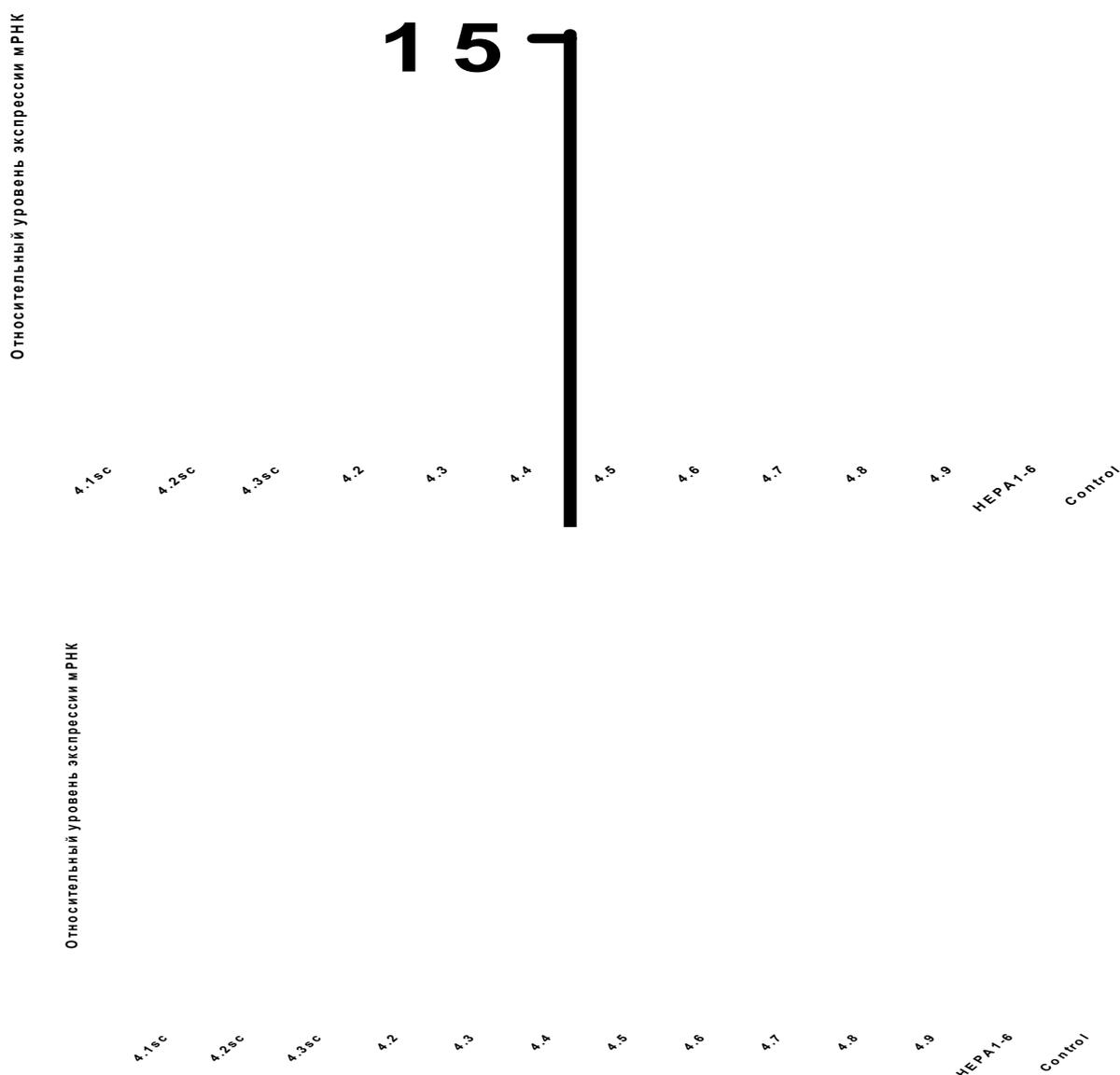


Рисунок 8.1 - Уровень экспрессии генов Has2, Has3, Hyal1, Hyal2, CD44 и Rhamm в первичных культурах ГЦК относительно нативной печени мыши. Mean $\pm$ Error.

Для анализа присутствия белков, маркеров ГЦК, были взяты 3 первичные культуры ГЦК (4.2, 4.4, 4.6), обладающие повышенной экспрессией генов vimentin, CD44, Rhamm, Has2 и одна культура, полученная из единичной клетки (4.2sc), также экспрессирующая повышенный уровень vimentin, CD44, Rhamm, но имеющая пониженный уровень Has2. В выбранных 4-х культурах ГЦК детектировали белки альфафетопротеин и альбумин, подтверждающие, что данные культуры опухолевых клеток относятся к гепатоцеллюлярной карциноме и являются потомками гепатоцитов. Кроме того, методом иммуноцитохимического маркирования показано наличие белков CD44 и Has2 в данных культурах.

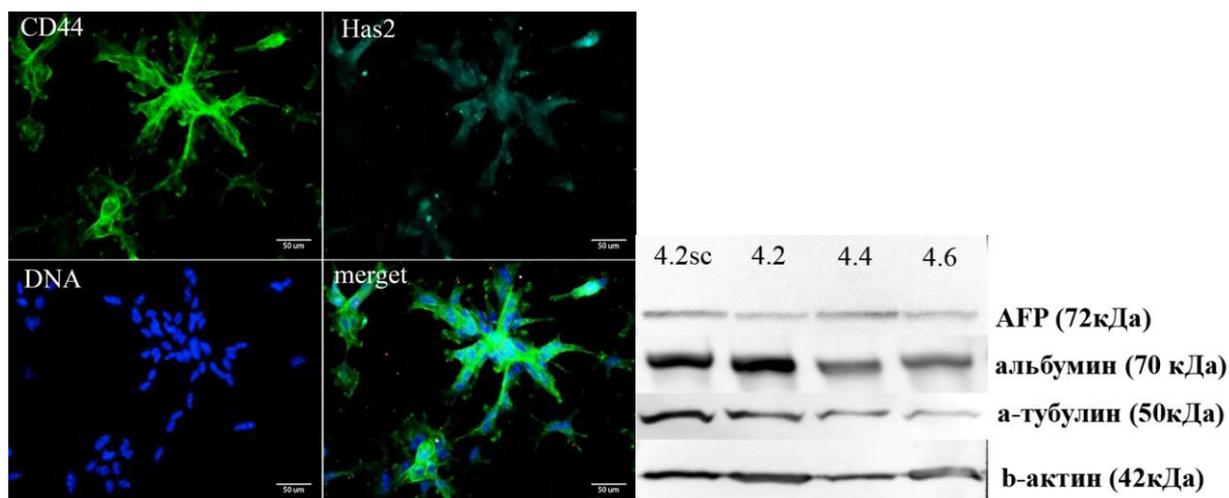


Рисунок 8.2 - Детекция белков CD44 и Has2 методом иммуноцитохимии на примере клеточной культуры 4.4 (слева). Детекция белков-маркеров ГЦК методом вестерн-блот (справа).

Полученные данные указывают на повышенный синтез гиалуроновой кислоты в матриксе большинства первичных культур ГЦК. Совместно с активацией внутриклеточных сигнальных путей, инициируемых взаимодействием гиалуронана с рецепторами CD44 и Rhamm, это указывает на способность агрегатов полученных клеточных культур к эпителио-мезенхимному переходу и направленной миграции клеток.

*Смена клеточного фенотипа первичных культур ГЦК под воздействием фактора индукции эпителио-мезенхимного перехода TGF- $\beta$  и провоспалительного цитокина IL-6.*

Были выбраны четыре культуры ГЦК 4.2sc, 4.2, 4.4, 4.6, имеющие изначально разный фенотип, выявленный по экспрессии кадгеринов (Cdh1<Cdh2 в клонах 4.2sc и 4.6, Cdh1>Cdh2 в клонах 4.4 и 4.6). В выбранных культурах повышенная экспрессия Tgf- $\beta$ 1 была обнаружена только в культуре 4.2sc, при этом рецептор Tgf- $\beta$ 1R экспрессировался во всех 4х культурах. В процессе канцерогенеза в ткани печени активируются свободные макрофаги, которые способствуют высвобождению активного TGF- $\beta$  из ВКМ, что усугубляет процесс ЭМП (Katz et al., 2013). Это может свидетельствовать о том, что раковые клетки в основном получают белок-лиганд TGF- $\beta$  из микроокружения, а не синтезируют его сами.

Экзогенное воздействие TGF- $\beta$  не изменило уровня экспрессии Tgf- $\beta$ 1R, однако вызвало повышение уровня экспрессии TGF- $\beta$ 1 в трех из четырех культур. Обнаруженные факты можно трактовать как наличие положительной обратной связи, усиливающей мезенхимный фенотип клеток. Это подтверждается также при анализе экспрессии генов Cdh1 и Cdh2 после культивирования культур с TGF- $\beta$ , а также с TGF- $\beta$  совместно с IL-6 (Рис.8.3).

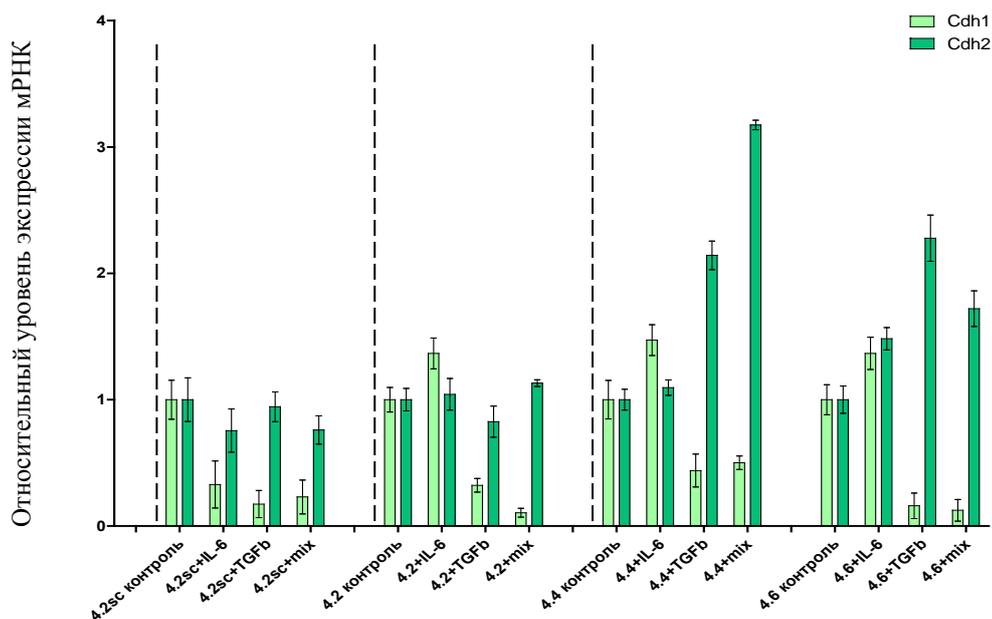


Рисунок 8.3 - Изменение уровня экспрессии Cdh1 и Cdh2 под воздействием фактора TGF-β1 и цитокина IL-6.

Данные молекулярного анализа подтверждаются обнаруженным изменением в морфологии клеток после культивирования в среде, содержащей TGF-β и IL-6. Раковые клетки, обычно формирующие конгломераты из овальных клеток с малым числом коротких отростков, начинают вытягиваться, располагаются на некотором расстоянии друг от друга, у них появляется значительно больше длинных отростков (Рисунок 8.4).

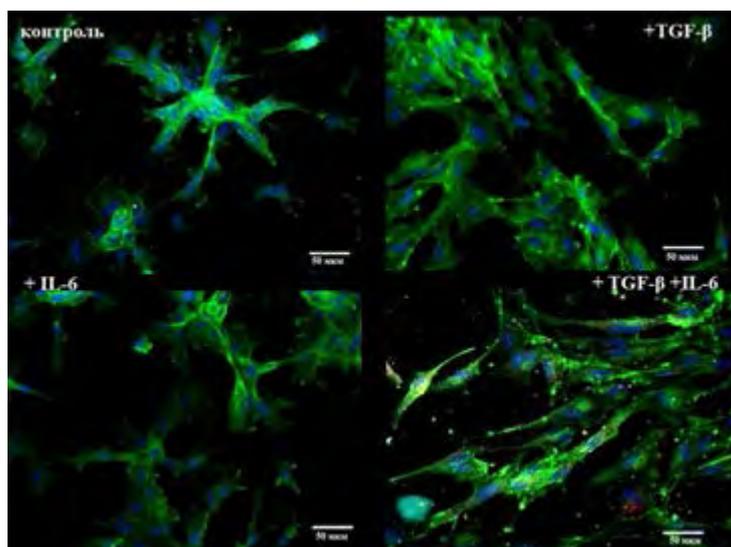


Рисунок 8.4 - Изменение фенотипа клеток под воздействием фактора TGF-β и цитокина IL-6. Первичная культура ГЦК-4.4. Детекция белка CD44.

## 8.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Детектируемый высокий уровень экспрессии гиалуронан синтаз Has2 и Has3 при сохранении уровня гиалуронидаз Hyal1 и Hyal2 в культурах ГЦК свидетельствует об увеличении продукции гиалуронана в межклеточном матриксе. Данный факт указывает на потенции различных популяций раковых клеток к эпителио-мезенхимному переходу. Активация смены фенотипа раковых клеток была подтверждена действием на культуры экзогенного фактора индукции эпителио-мезенхимного перехода TGF- $\beta$  и провоспалительного цитокина IL-6. Несмотря на это, в используемой модели ГЦК нами не было обнаружено метастазирования опухолевых клеток в другие органы и ткани мыши.

Таким образом, мы предполагаем, что вклад различных популяций раковых клеток ГЦК в прогрессию опухоли не однороден. Окружающая опухоль ткань печени, возможно, сдерживает процесс активной миграции раковых клеток. В то же время, в экспериментах *in vitro* опухолевые клетки ГЦК поддаются влиянию TGF- $\beta$  – фактора индукции эпителио-мезенхимного перехода, и приобретают потенции к метастазированию. Эта потенция также поддерживается возрастающей способностью клеток опухоли к синтезу гиалуронана – компонента внеклеточного матрикса. В комплексе эти факторы способствуют васкуляризации, инвазии и метастазированию, повышая агрессивность опухоли гепатоцеллюлярной карциномы в определенных условиях микроокружения.

## Раздел 9. Влияние двойных разрывов ДНК и эпигенетических факторов на регенерационный потенциал и дифференцировку мезенхимных стволовых клеток костного мозга

### 9.1 ВВЕДЕНИЕ

Двойные разрывы ДНК (ДЦР) являются одними из самых катастрофичных повреждений, которые могут приводить к генетической нестабильности и, как следствие, к остановке клеток на различных этапах клеточного цикла, ускоренному старению, апоптозу или злокачественной трансформации клеток. Доксорубин (ДР) вызывает ДЦР за счет интеркаляции между цепями ДНК в области репликационной вилки и/или ингибирования активности топоизомеразы II. Эффективность этого процесса в сильной степени зависит от конформации ДНК, что регулируется, в частности, уровнем ее метилирования.

Изучали действие доксорубина (ДР), индуктора образования двухцепочечных разрывов ДНК, и деметилирующего агента 5-азацитина (5-аза) на экспрессию маркера стволовости Oct4 в мезенхимных стволовых клетках (МСК).

### 9.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

МСК выделяли из костного мозга крысы по стандартной методике и культивировали в стандартной среде DMEM с низким содержанием глюкозы в 5% CO<sub>2</sub>. На третьем пассаже МСК высевали на 24-луночные планшеты, после достижения 50% конфлюентности монослоя клетки обрабатывали в течение 24 ч ДР (0.3 мкг/мл) и/или 5-аза (10 мкМ). Через 24 ч среду отбирали и добавляли полную среду. Через 1 ч выделяли тотальную РНК и анализировали экспрессию генов с помощью ПЦР в реальном времени.

### 9.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Непродолжительная инкубация с 5-аза (30 мин) резко усиливала стимулирующее действие ДР на экспрессию Oct4. Более длительное время обработки (2 ч) 5-аза аннулировало этот эффект. За увеличение экспрессии Oct4 в выбранных условиях, по-видимому, ответственен ДР, который действует на области генома, частично релаксированного под действием 5-аза.

## 9.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Стимулирующее действие 5-аза на экспрессию Oct4, по-видимому, связано с локальной релаксацией соответствующей области генома и увеличением его доступности к повреждающему действию ДР.

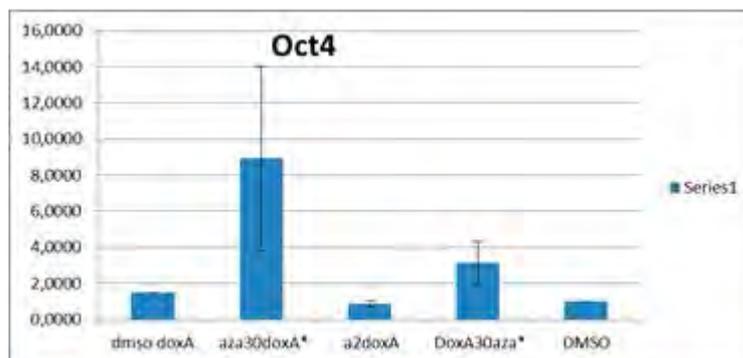


Рисунок 9.1 - Действие доксорубицина (ДР), индуктора образования двуцепочечных разрывов ДНК, и деметилирующего агента 5-азацитидина (5-аза) на экспрессию маркера стволовости Oct4 в мезенхимных стволовых клетках.

## Раздел 10. Молекулярные механизмы изменений регенерационных процессов у позвоночных животных под влиянием факторов внешней среды

### 10.1 ВВЕДЕНИЕ

Исследования влияния факторов внешней среды, в частности гравитационных векторов и доз на физиологию животных и человека, в частности восстановительные процессы, имеют фундаментальное и практическое значения для космических программ. Для изучения репаративных процессов как в обычных условиях, так и в космическом полете, мы традиционно используем хвостатых амфибии с высокой способностью к регенерации. Хрусталик глаза и хвост тритона - примеры эпиморфной регенерации, подвержены влиянию внешних факторов. Многократно было показано изменение скорости и в некоторых случаях формы регенератов в ходе космических полетов. Нами сделаны попытки объяснения выявленных изменений и в частности молекулярных участников этих процессов. Исследована экспрессия фактора роста FGF2 и его рецепторов, а также генов и белков теплового шока (HSP70, HSP90) на моделях регенерации хрусталика и хвоста у тритона. Есть основания считать, что сигнальный путь FGF2 и белки теплового шока принимают участие в регуляции регенерации этих структур у животных, экспонированных в условиях измененной гравитационной нагрузки, а также теплового шока. На 2017 г. было намечено исследование экспрессии белков теплового шока в процессе формообразования при регенерации хрусталика и хвоста у амфибий, экспонированных при разных дозах гравитации и высоких температурах.

### 10.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использовали материал (нормальные и регенерирующие ткани) тритонов, полученный в экспериментах, проведенных ранее при перегрузках (2g) на центрифуге Эймского центра НАСА и в ряде лабораторных контрольных экспериментов, а также в экспериментах с моделированием разных доз гравитации (аквариум и субстрат) и теплового шока. Материал обрабатывали с помощью методов гистологии, морфометрии, а также иммуногистохимии и ПЦР анализа. Для морфометрии применяли цифровые изображения регенератов и методы статистического анализа. Иммуногистохимическое окрашивание проводили, используя антитела к белкам FGF2, FGF2R, Hsp70, 90 и бромдеоксиуридину в сочетании с соответствующими вторичными антителами. Применяли также ингибиторы белков теплового шока после тестирования при разных способах введения и концентрациях.

### 10.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Морфометрический анализ показал, что центрифугирование изменяет форму регенерата хвоста – он приобретает выраженный загиб на вентральную сторону в той же мере, что и содержание на влажной подложке (1g). Изменение формы выразилось в изменении значения К: 0.26 в группе 2 g и 0.31 в синхронном контроле, по сравнению с 0.41 в аквариальном контроле. Обнаружились отличия морфологии оперированных глаз в группе 2 g от контролей. В группе 2 g регенерация хрусталика была ингибирована, регенерация роговицы в четверти случаев оказывалась несовершенной (Рисунок 10.1). Перегрузка в ходе центрифугирования также вызывала отслойку сетчатки разной степени выраженности. Степень отслойки сетчатки отрицательно коррелировала с прогрессом регенерации хрусталика. Иммуногистохимический анализ показал отличия в локализации и уровне представленности фактора роста FGF2 и его рецептора, FGF2R. На срезах глаза обнаруживались специфически меченые антителами против HSP70 клетки, имеющие также дифференциальное распределение. Таким образом, регенераты глаза из группы 2 g отличаются от контроля отслойкой сетчатки, в конечном итоге приводящей к замедлению регенерации хрусталика и роговицы. Отслойка сетчатки, предположительно связана с повышением внутриглазного давления под действием перегрузки. В результате нарушается выделение клетками сетчатки фактора роста FGF2, регулирующего пролиферацию клеток зачатка хрусталика. В случае регенерации хвоста условия перегрузки по сравнению с состоянием в аквариуме (как 1 g, так и 2 g) приводили к изменению морфогенеза – формирующиеся хвосты оказывались загнутыми книзу. Результаты демонстрируют важную роль гравитационной нагрузки в регенерации. Также они указывают на роль FGF2 и белков теплового шока в формировании изменений регенерации.

Проведены лабораторные исследования экспрессии белков теплового шока в процессе морфогенеза хвоста и хрусталика у амфибий в условиях измененного гравитационного вектора. Ранее была разработана модель для изучения влияния гравитационной нагрузки на формирование регенерирующего хвоста у тритонов при разных дозах g. Было обнаружено, что сходный с эффектом гравитационной нагрузки феномен воспроизводится при действии теплового шока. Показано, что фармакологическое ингибирование белков теплового шока, не оказывая существенного влияния на форму регенератов хвоста в нормальных условиях, предотвращает ее изменение в условиях измененной гравитационной нагрузки. Предполагается, что белки теплового шока могут участвовать в цепи событий,

ведущих от восприятия неспецифического физического воздействия к изменению морфогенеза.

## 10.43АКЛЮЧЕНИЕ

В ряде экспериментов, моделирующих высокие и низкие гравитационные нагрузки, удалось обнаружить влияние разных доз g на ход и результат регенерации хрусталика и хвоста у хвостатых амфибий. Высокая доза (2g) воспроизведенная на центрифуге приводила к изменению скорости и несовершенству регенерации хрусталика и роговицы, а также изменению морфогенеза хвоста. Последнее можно было наблюдать в условиях 1g и при тепловом шоке. Предполагается участие белков теплового шока, а также сигнальных путей FGF2, SHH в передаче сигналов этих физических факторов в развивающиеся/регенерирующие ткани и органы.

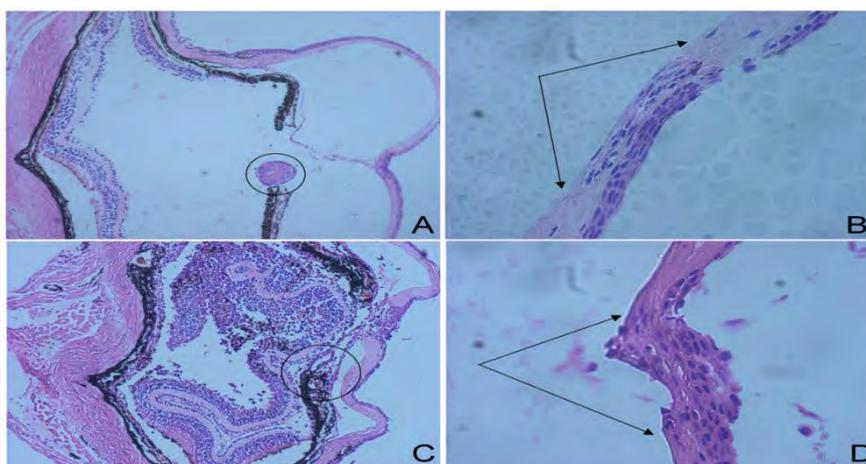


Рисунок 10.1 - Регенерация тканей глаза тритона в группах 1 g (A, B) и 2 g (C, D), 21 день п/оп. А – поздний регенерат хрусталика (в окружности); В – регенерация роговицы (зона надреза обозначена стрелками); С – ранний регенерат хрусталика (в окружности) на фоне отслойки сетчатки; D – регенерирующая роговица с несовершенной морфологией (зона надреза обозначена стрелками). Гематоксилин-эозин, увеличение 40× (A, C) и 200× (B, D).

## Раздел 11. Изучение цитологических, биохимических и физиологических механизмов прямых межклеточных взаимодействий

### 11.1 ВВЕДЕНИЕ

Прямые межклеточные взаимодействия присущи всем тканям растений и животных, включая человека. Изучены они слабо, а тема исключительно актуальна, особенно, в свете новых данных о значимости кооперации клеток внутри популяции в регуляции метаболизма, в том числе синтеза белка, активности ферментов, а также дыхания клеток. Возможность количественных исследований появилась с обоснования исполнителем настоящей темы адекватной модели. Поэтому результаты с использованием такого подхода новы. В 2017 году планировали изучить влияние ненервного нейротрансмиттера на кинетику синтеза белка в гепатоцитах старых крыс. Ранее влияние организаторов синтеза белка на старение не исследовали

### 11.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В первичных культурах гепатоцитов старых крыс Вистар исследовали кинетику синтеза белка. Подробно методы опубликованы ранее. Основные действия были следующими. Гепатоциты выделяли модифицированным нами методом. Культуры ставили на бессывороточной среде 199 с добавлением альбумина и инсулина. Для определения кинетики синтеза белка каждые 10 мин в течение 2-3 час брали пробы по 3 культуры каждая.

Каждую культуру отдельно инкубировали в среде без лейцина при добавлении к ней 3H-лейцина. Радиоактивность белков каждой культуры и свободного лейцина (кислоторастворимой фракции) измеряли на сцинтилляционном счетчике. По оригинальной формуле рассчитывали относительное включение лейцина в белки с поправкой на пул.

### 11.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Плотные культуры гепатоцитов старых крыс (возраст около 2 лет, вес 580-610 г) отличаются от гепатоцитов молодых крыс низкой амплитудой ритма синтеза белка. Внесение в среду с гепатоцитами старых крыс 0.2, 0.4 или 0.6 мг/мл глутаминовой кислоты приводит к увеличению амплитуды колебаний ритма синтеза белка примерно вдвое – до уровня молодых крыс.

Такое же действие глутаминовой кислоты на кинетику синтеза белка наблюдали *in vivo* после её введения крысе.

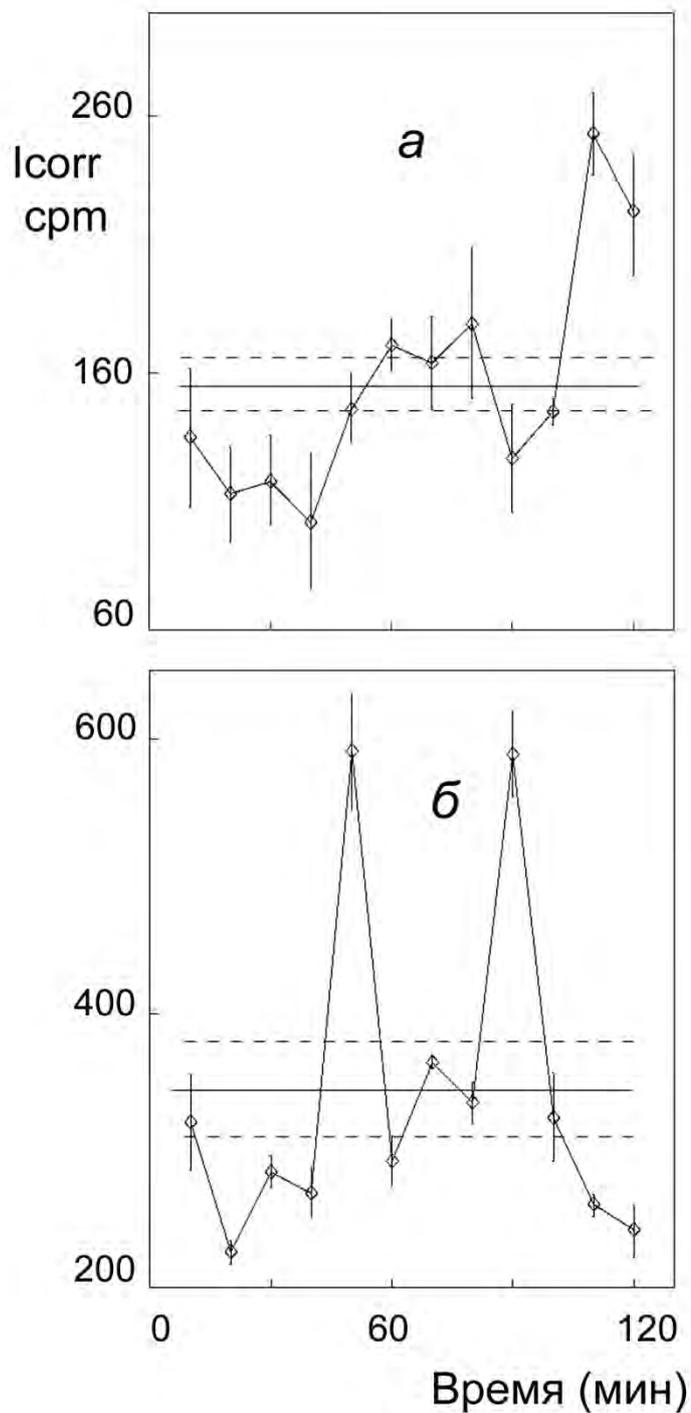


Рисунок 11.1 - Действие глутаминовой кислоты *in vivo*. Крыс кормили обычным комбикормом, смоченным глутаминовой кислотой (раствор содержал 62 мг кислоты). Через 60 мин выделили гепатоциты и поставили плотные культуры. Через сутки культуры отмыли, сменили среду и исследовали кинетику синтеза белка.  
а – крыса весом 600 г, б – крыса весом 580 г.

Блокирование метаботропных рецепторов глутаминовой кислоты альфа-метил-4-карбоксифенилглицином – МСРГ в дозе 0.01 мг/мл ликвидировало эффект глутаминовой кислоты.

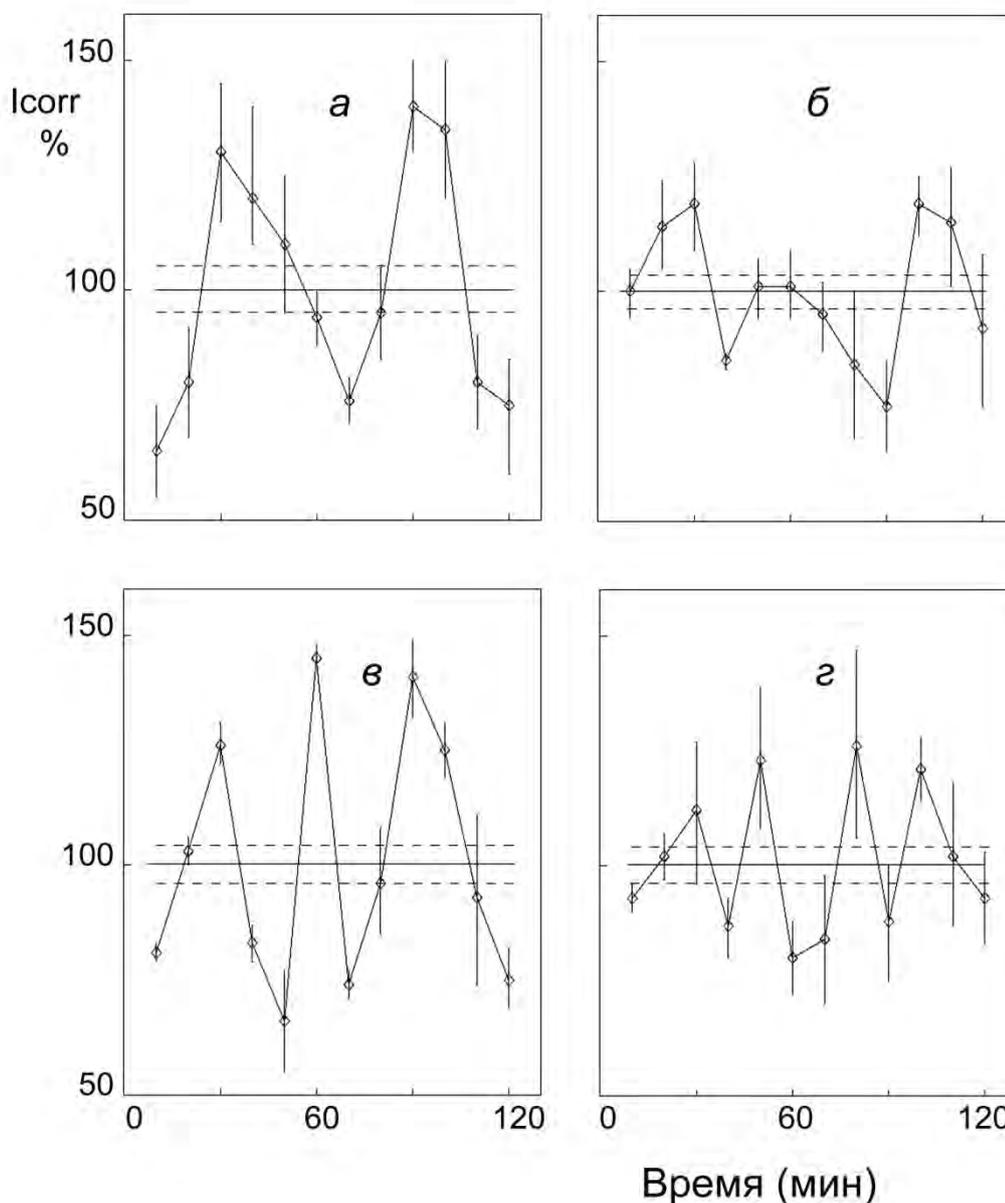


Рисунок 11.2 - Сравнение кинетики синтеза белка в культурах гепатоцитов молодой и старой крысы. а – суточные плотные культуры молодой крысы, б, в, г – сходные культуры старой крысы; б – контроль, в – в среду таких же культур внесли 0.2 мг/мл глутаминовой кислоты; г – в такие же культуры ввели 0.01 мг/мл ингибитора рецепторов глутаминовой кислоты МСРГ и 0.4 мг/мл глутаминовой кислоты Абсцисса – время (мин), ордината – Icorr в процентах от значений для каждого варианта опыта; среднее значение Icorr варианта а, б, в, или г принимали за 100%, а остальные значения – как доли этой величины.

Амплитуда колебаний ритма синтеза белка в клеточной популяции характеризует синхронизацию индивидуальных колебаний в результате прямых межклеточных взаимодействий. По данным опытов рис. 1 и 2, а также еще 6-7 сходных опытов средняя амплитуда ритма синтеза белка в плотных культурах гепатоцитов интактных старых крыс  $34 \pm 2\%$ , а после внесения глутаминовой кислоты в среду  $65 \pm 4\%$ . После кормления старых крыс комбикормом без глутаминовой кислоты амплитуда ритма синтеза белка была  $38 \pm 5\%$ , а у крыс, накормленных комбикормом с глутаминовой кислотой  $68 \pm 8\%$ .

Следовательно, глутаминовая кислота, как рецепторзависимый трансмиссер, нормализует сниженные при старении прямые межклеточные взаимодействия в гепатоцитах. В отличие от других изученных мембранных сигнальных факторов прямых межклеточных взаимодействий (ганглиозидов, норадреналина, серотонина, дофамина), глутаминовая кислота проникает в мозг и, следовательно, может влиять на взаимодействия и кинетику синтеза белка, нарушенные при старении не только в гепатоцитах и других ненервных клетках, но также и в нейронах.

## 11.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, впервые определена возможность нормализации кинетики синтеза белка при старении, используя физиологически адекватные дозы глутаминовой кислоты. Нейропротекторные свойства глутаминовой кислоты показаны давно, и ее используют в неврологической педиатрической клинике. Мы выявили влияние глутаминовой кислоты на клетки печени старых животных, что позволяет после развития этих данных рекомендовать глутаминовую кислоту для улучшения состояния старых людей. Так, для печени, объекта наших исследований, синтез белка обеспечивает основные функции органа. В печени синтезируются все белки плазмы крови. Печень – орган нейтрализации вредных продуктов, поступающих из кишечника. Нарушения синтеза белка при старении и возможность их компенсации – интересно для геронтологии. В дальнейшем существенно выяснить продолжительность эффекта глутаминовой кислоты, что запланировано на следующий год.

## ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках проведения НИР исследованы клеточные и молекулярные механизмы дифференцировки, регенерации и морфогенеза и трансдифференцировки в разнообразных моделях *invitro* и *invivo*.

Разработана модель для изучения морфогенеза придатков кожи. Показано, что клетки человека могут индуцировать морфогенез волосяных фолликулов при трансплантации их в безволосую кожу человека.

На модели нейральной дифференцировки индуцированных плюрипотентных клеток разработаны методы нормализации результатов при проведении ПЦР. Разработан новый протокол дифференцировки индуцированных плюрипотентных клеток человека в половые клетки.

Изучены молекулярные механизмы пластичности клеток ретинального эпителия человека *in vitro*. Показано, что регенераторная пластичность этих клеток рекрутирует механизмы плюрипотентности, в частности активацию экспрессии генов KLF4, SOX2, NANOG. Исследовано участие экзогенных стволовых и прогениторных клеток в регенерации ткани мозга мышей *in vivo*. При трансплантации прогениторных клеток из неокортекса трансгенных GFP-мышей в интактный мозг установлены переживание, гетерохрония развития в нейроны и глию клеток разного уровня дифференцировки. Изучены эпидермальные клетки нервного гребня человека, обнаружено длительное их переживание при трансплантации в интактный мозг мыши.

Изучены связанные с педоморфозом молекулярные характеристики (работа сигнальных путей и транскрипционных факторов (ТФ)) клеток - источников регенерации сетчатки и хрусталика глаза у хвостатых амфибий. Показано их высокое, однако неполное соответствие таковым «молодого» клеточного фенотипа. Продолжено изучение экспрессии ТФ семейства *Vsx* в ходе развития сетчатки кур. Выявлен ее дифференциальный пространственно-временной характер. В тканях глаза человека в раннем пренатальном развитии выявлена роль стекловидного тела и его компонентов в частности альбумина, альфа-фетопротеина и каротиноидов, в морфогенезе тканей глаза. Определены изменения их концентраций. Начато изучение влияния вызванных доксорубицином двойных разрывов ДНК на свойства мезенхимных стволовых клеток костного мозга крысы - дифференцировку, пролиферацию, регенераторный потенциал.

Исследована экспрессия белков теплового шока в процессе морфогенеза хвоста, роговицы и хрусталика у амфибий в условиях измененного гравитационного вектора (2g, 1g, low g) и теплового шока. Результаты свидетельствуют о том, что белки теплового шока, а также FGF2 и Shh принимают участие в трансляции физического воздействия в процессе

морфогенеза. Изучены механизмы регуляции входа в клеточный цикл гепатоцитов при регенерации печени мыши. В моделях повреждения/регенерации печени прослежена пространственно-временная экспрессия участников клеточной репликации - генов Ki67 и циклинов.

Стволовые клетки мозга, трансдифференцировка мультипотентных клеток ретинального пигментного эпителия (РПЭ) глаза взрослого человека в нейральном направлении *in vitro*, трансплантация являются перспективными направлениями современных исследований. В рамках темы исследуются фундаментальные вопросы активации пролиферации и клеточный цикл эндогенных стволовых клеток мозга. Экспериментально изучаются способы интеграции экзогенных стволовых и прогениторных клеток при их трансплантации в нормальный и поврежденный мозг, ведется поиск оптимизации возраста доноров, способов введения, а также клеточные ответы в мозге реципиента. Культуры клеток РПЭ глаза взрослого человека, полученные в ходе исследования, дают возможность изучать пластичность фенотипа этих клеток и регуляторов этого феномена; использовать их для изучения внутриклеточных механизмов пролиферативной ретинопатии и макулярной дистрофии глаза; для поиска и новых биологически активных веществ и скрининга лекарственных препаратов. Выявленные нами и другими специалистами фундаментальные основы биологии нейральных стволовых клеток, дают возможность управления их пролиферацией и дифференцировкой, а также создания на этой базе новых клеточных технологий.

Исследование молекулярно-генетических механизмов эпиморфной регенерации у животных базируется на ранее полученной информации о клеточных и тканевых событиях и на использовании современных методов, в частности ПЦР и иммунохимии. В качестве моделей исследования мы используем ткани глаза тритона (животного, обладающего высокой регенерационной способностью) в норме и на ранних этапах регенерации сетчатки и хрусталика. Хорошо разработанные модели и применение методов молекулярной биологии позволили охарактеризовать широкий спектр сигнальных, регуляторных молекул и ТФ, а также белков теплового шока и их рецепторов, ответственных за изменения клеточного фенотипа, лежащие в основе регенерации. Так, есть основания считать, что FGF2-сигналинг и HSPs в норме поддерживая жизнеспособность тканей глаза, при регенерации участвуют как в ее запуске, так и прогрессе. Данные по экспрессии белков FGF2-сигнального пути и HSPs в другой модели - регенерации хвоста - также свидетельствуют об участии этих «молекул спасения» на ранних этапах восстановления мышц, позвоночника и спинного мозга.

Изучение клеточных и молекулярных механизмов развития и регенерации сетчатки у позвоночных животных проводится на моделях развития и регенерации сетчатки глаза других амфибий, птиц, грызунов (крыса, мышь) и человека в сравнительном аспекте с учетом процессов молекулярной регуляции. Методами молекулярной биологии и иммунохимии в системах *in vivo* и *in vitro* исследуется экспрессия ТФ из семейств: Pax, Prox, Six, Sox, Rx, Otx, Pitx, Vsx, компонентов сигнальных путей FGF, TGF, Wnt; белков клеточной пролиферации: GNL3, Ki67, PCNA и стресса - HSP70 и HSP90. Показано, что исследованные молекулярные регуляторы находятся в сети взаимодействий, работают на ранних и поздних этапах развития/регенерации сетчатки и обладают при этом дифференциальной экспрессией и многофункциональностью.

Впервые изучены процессы морфогенеза глаза у тритона *Pleurodeleswattli* в ходе развития. В клетках - предшественниках нейронов эмбриональной сетчатки выявлена работа транскрипционных факторов «глазного поля», а в созревающих нейронах обнаружена и описана их дифференциальная экспрессия. Полученные на низших позвоночных животных данные актуальны для поиска способов стимуляции восстановления сетчатки и других тканей глаза и понимания механизмов их нарушений в развитии глаза высших позвоночных и человека.

Молекулярно-биологические аспекты развития стекловидного тела (СТ) и окружающих его тканей глаза позвоночных с использованием спектроскопии поглощения и флуоресценции позволило разработать использование в качестве спектрально-флуоресцентного зонда на альбумины разных позвоночных один из скварилиевых красителей (СКК). Методами УФ-спектрофотометрии и ВЭЖХ обнаружено присутствие каротиноидов (лютеина) в стекловидном теле (СТ) плодов человека и показано, что возрастная динамика содержания каротиноидов совпадает с динамикой альбумина. Впервые показано присутствие окисленных форм лютеина в тканях глаза человека в пренатальном развитии. Параллельно с исследованием СТ изучена морфология окружающих СТ тканей глаза плодов человека в развитии и описана динамика экспрессии ряда белков, специфичных для клеточных типов сетчатки позвоночных, и сигнальных молекул.

Традиционно активно исследуется влияние условий измененного гравитационного вектора и других физических факторов (в частности теплового шока) на регенерацию у амфибий. Неоднократно показаны изменения регенерации хрусталика (ускорение, синхронизация) в реальных космических полетах. В лабораторных условиях впервые найдена и разработана модель, позволяющая изучать изменения морфогенеза при регенерации хвоста, в том числе спинного мозга и позвоночника, в зависимости от дозы гравитации. Определены клеточные механизмы явления, а также роль белков теплового

шока (HSPs) и Shh-сигнального пути в этом процессе. Эти исследования позволяют определять участников процесса трансляции физического, неспецифического воздействия. Простота и изученность моделей (формообразование хрусталика, изменение формы регенерирующего хвоста *Urodela*), хорошая воспроизводимость результатов позволят в будущем расширить спектр молекул - потенциальных участников контроля морфогенеза тканей при изменении внешних условий.

Впервые определена возможность нормализации кинетики синтеза белка при старении, используя физиологически адекватные дозы глутаминовой кислоты. Нейропротекторные свойства глутаминовой кислоты показаны давно, и ее используют в неврологической педиатрической клинике.

Модели регенерации печени, примененные в экспериментах, а также давно и тщательно изучаемые клеточные механизмы ее восстановления позволили подойти к молекулярным исследованиям для характеристики процесса инициации гепатоцитами входа в пролиферативный цикл - ключевого события регенерации тканей, в частности печени. Определение участников процесса, последовательность их работы и соотношение на разных этапах клеточного цикла - задача экспериментальной биологии развития, также как и все перечисленные выше разделы темы, имеют непосредственное отношение и значения для понимания способов увеличения регенераторного потенциала клеток, стимуляции процессов восстановления.

## Публикации по теме

1. **Grigoryan E.N.**, Dvorochkin N., **Poplinskaya V.A.**, Yousuf R., Radugina E.A., Almeida E.A. The effect of hypergravity on the lens, cornea and tail regeneration in Urodela // *Acta Astronautica*. 2017. V. 138. P. 423–433. DOI: 10.1016/j.actaastro.2017.06.013. (WoS, Scopus)
2. Namestnikova D., Gubskiy I., Gabashvili A., **Sukhinich K.**, Melnikov P., Vishnevskiy D., Soloveva A., Vitushev E., Chekhonin V., Gubsky L., Yarygin K. MRI evaluation of frequent complications after intra-arterial transplantation of mesenchymal stem cells in rats // *Journal of Physics: Conf. Series*. 2017. V. 886. P. 012012. DOI: 10.1088/1742-6596/886/1/012012. (Scopus)
3. Namestnikova D., Gubskiy I., Kholodenko I., Melnikov P., **Sukhinich K.**, Gabashvili A., Vishnevskiy D., Soloveva A., Abakumov M., Vakhrushev I., Lupatov A., Chekhonin V., Gubsky L., Yarygin K. Methodological aspects of MRI of transplanted superparamagnetic iron oxide-labeled mesenchymal stem cells in live rat brain // *PLoS ONE*. 2017. V. 12. N 10. e0186717. DOI: 10.1371/journal.pone.0186717. (WoS; Scopus)
4. **Panova I.G.**, Yakovleva M.A., Tatikolov A.S., Kononikhin A.S., Feldman T.B., Poltavtseva R.A., Nikolaev E.N., Sukhikh G.T., Ostrovsky M.A. Lutein and its oxidized forms in eye structures throughout prenatal human development // *Experimental Eye Research*. 2017. V. 160. P. 31-37. DOI: 10.1016/j.exer.2017.04.008. (WoS, Scopus)
5. **Podgorny O.V.**, Lazarev V.N. Laser microdissection: A promising tool for exploring microorganisms and their interactions with hosts // *Journal of Microbiological Methods*. 2017. V. 138. P. 82-92. DOI: 10.1016/j.mimet.2016.01.001. (WoS, Scopus)
6. Tatikolov A.S., Akimkin T.M., **Panova I.G.**, Yarmoluk S.M. Spectral-fluorescent study of the interaction of the polymethine dye probe Cyan 2 with chondroitin-4-sulfate // *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2017. V. 177. P. 93–96. DOI: 10.1016/j.saa.2017.01.033. (WoS, Scopus).
7. Artyukhov A.S., **Dashinimaev E.B.**, Tsvetkov V.O., Bolshakov A.P., Konovalova E.V., Kolbaev S.N., **Vorotelyak E.A.**, **Vasiliev A.V.** New genes for accurate normalization of qRT-PCR results in study of iPS and iPS-derived cells // *Gene*. 2017. V. 626. P. 234-240. DOI: 10.1016/j.gene.2017.05.045. (WoS, Scopus)
8. **Бродский В.Я.**, **Мальченко Л.А.**, **Буторина Н.Н.**, Лазарев (Конченко) Д.С., **Звездина Н.Д.**, Дубовая Т.К. Глутаминовая кислота нормализует кинетику синтеза белка в гепатоцитах старых крыс // *Биохимия*. 2017. Т. 82. № 8. С. 1237-1242. (РИНЦ). (Brodsky V.Y., Malchenko L.A., Butorina N.N., Lazarev (Konchenko) D.S., Zvezdina N.D., Dubovaya T.K. Glutamic acid as enhancer of protein synthesis kinetics in hepatocytes from old rats // *Biochemistry (Moscow)*. 2017. V. 82. 8. P. 957-961. DOI: 10.1134/S0006297917080119. (WoS, Scopus)

9. Горбачева Л.Р., **Киселева Е.В.**, Савинкова И.Г., Струкова С.М. Новая концепция действия протеаз гемостаза на процессы воспаления, нейротоксичности и регенерации тканей // Биохимия. 2017. Т.82. № 7. С.1018-1032 (РИНЦ). (Gorbacheva L.R., Kiseleva E.V., Savinkova I.G., Strukova S.M. A new concept of action of hemostatic proteases on inflammation, neurotoxicity, and tissue regeneration // Biochemistry (Moscow). 2017. V. 82. N 7. P. 778-790. DOI: 10.1134/S0006297917070033. (WoS, Scopus)
10. Коробко Е.С., Супруненко Е.А., **Васильев А.В.** Эффективность клеточной трансплантации при репарации повреждения печени мыши // Онтогенез. 2017. Т. 48. № 1. С. 55-62. DOI: 10.7868/S0475145017010062. (РИНЦ). (Korobko E.S., Suprunenko E.A., Vasil'ev A.V. Efficiency of cell transplantation in repair of mouse liver damage // Russian Journal of Developmental Biology. 2017. T. 48. № 1. С. 49-55. DOI: 10.1134/S1062360417010064. (WoS, Scopus)
11. Мелешина А.В., Быстрова А.С., **Роговая О.С.**, **Воротеляк Е.А.**, **Васильев А.В.**, Загайнова Е.В. Тканеинженерные конструкции кожи и использование стволовых клеток для создания кожных эквивалентов (обзор) // Современные технологии в медицине. 2017. Т. 9. № 1. С. 198-220. DOI: 10.17691/stm2017.9.1.24. (РИНЦ). (Meleshina A.V., Bystrova A.S., Rogovaya O.S., Vorotelyak E.A., Vasiliev A.V., Zagaynova E.V. Tissue-engineered skin constructs and application of stem cells for creation of skin equivalents (Review) // Sovremennye Tehnologii v Medicine. 2017. V. 9. 1. P. 198-218. DOI: 10.17691/stm2017.9.1.24. (WoS, Scopus)
12. **Паюшина О.В.**, **Буторина Н.Н.**, **Шевелева О.Н.**, **Бухинник С.С.**, **Березина А.А.**, **Рамазанова С.Г.**, **Домарацкая Е.И.** Сравнительное исследование мезенхимных стромальных клеток костного мозга на разных стадиях индивидуального развития // Онтогенез. 2017. Т. 48. № 4. С. 315-324. DOI: 10.7868/S0475145017040085 (РИНЦ). (Payushina O.V., Butorina N.N., Sheveleva O.N., Bukhinnik S.S., Berezina A.A., Ramazanova S.G., Domaratskaya E.I. Comparative study of bone marrow mesenchymal stromal cells at different stages of ontogeny // Russian Journal of Developmental Biology. 2017. V. 48. 4. P. 269-277. DOI: 10.1134/S1062360417040087. (WoS, Scopus)
13. **Шафеи Е.В.**, **Куринов А.М.**, **Кузнецова А.В.**, **Александрова М.А.** Репрограммирование клеток ретинального пигментного эпителия человека под влиянием bFGF in vitro // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2017. № 2. С. 128-136. (РИНЦ). (Shafei E.V., Kurinov A.M., Kuznetsova A.V., Aleksandrova M.A. Reprogramming of human retinal pigment epithelial cells under the effect of bFGF in vitro // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2017. V. 163. 4. P. 574-582. DOI: 10.1007/s10517-017-3852-5. (WoS, Scopus)
14. Kuznetsova A.V., Aleksandrova M.A. Heterogeneity of Retinal Pigment Epithelial Cells from Adult Human Eye in Different Culturing Systems // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2017. V. 162. 4. P. 569-577. DOI: 10.1007/s10517-017-3661-x

15. **Panova I.G.**, Tatikolov A.S., Smirnova Y.A., Poltavtseva R.A., Sukhikh G.T. Albumin in the Vitreous Body, Retina and Lens of Human Fetal Eye // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2017. б/н. Р. 1-3. DOI: 10.1007/s10517-017-3673-6
16. **Домарацкая Е.И., Паюшина О.В.** Перспективы использования мезенхимных стромальных клеток для регенерации поврежденной кожи // Успехи современной биологии. 2017. Т. 137. № 1. С. 56-69. (РИНЦ) –433. DOI:10.1016/j.actaastro.2017.06.013

Отчет о выполнении темы № 4: «Клеточные и молекулярные механизмы дифференцировки, регенерации и морфогенеза, трансдифференцировка» (Инд. номер - 0108-2016-0005) Государственного задания на 2017 год был рассмотрен и утвержден на Ученом совете ИБР РАН (Протокол №9 от 06.12.2017г.)