



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

I. Сведения о НИОКТР

Номер государственного учета НИОКТР

Дата постановки НИОКТР на учет

AAAA-A19-119101690033-6	16/10/2019
-------------------------	------------

Наименование НИОКТР

-Разработка биомедицинских технологий для диагностики, профилактики и коррекции социально значимых заболеваний
--

Руководитель НИОКТР

Фамилия, Инициалы

Ученая степень

Ученое звание

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

II. Сведения об отчете

Номер государственного учета отчета

Дата постановки отчета на учет

AAAA-B20-220032090142-3	20/03/2020
-------------------------	------------

Наименование отчета

РАЗРАБОТКА БИОМЕДИЦИНСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ, ПРОФИЛАКТИКИ И КОРРЕКЦИИ СОЦИАЛЬНО ЗНАЧИМЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ по Программе Президиума РАН № 18 «Инновационные разработки в биомедицине». (заключительный отчет)

Тематическая(-ие) рубрика(-и)

Индекс УДК

34.15.49; 34.15.23; 34.19.19; 34.23.29; 34.45.05	577.24
--	--------

Коды международной классификации отраслей наук

01.06.CU; 01.06.DR; 01.06.HY

Дата утверждения отчета

27/12/2019

Кол-во книг (томов)

1

Общее кол-во страниц

104

Номера книг (томов)/Кол-во страниц

1/104	2/0	3/0	4/0	5/0	6/0	7/0	8/0	9/0	10/0	11/0	12/0	13/0	14/0	15/0	16/0	17/0	18/0	19/0	20/0
-------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

Приложений

0

Таблиц

3

Иллюстраций

55

Библиография

103

Публикаций по результатам НИОКТР

10

Фамилия, инициалы

Должность

СНИЛС

Подпись

Руководитель организации-исполнителя

Васильев А. В.

Директор

00133521977

Место для печати

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

УДК 576.5: 577.25; 602.6:59; 602.6:612

Рег. мнемокод ГЗ 0088-2019-0013

Рег. № ГЗ FFEE-2019-0013

Рег. № НИОКТР АААА-А19-119101690033-6

УТВЕРЖДАЮ

Директор ИБР РАН
доктор биологических наук,
член-корреспондент РАН



А.В. Васильев

«27» декабря 2019 г.

ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

РАЗРАБОТКА БИМЕДИЦИНСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ,
ПРОФИЛАКТИКИ И КОРРЕКЦИИ СОЦИАЛЬНО ЗНАЧИМЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

по Программе Президиума РАН № 18 «Инновационные разработки в биомедицине».
(заключительный отчет)

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

 27.12.19

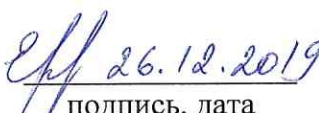
Е.А. Воротеляк

подпись, дата

Москва 2019

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

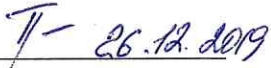
Руководитель:

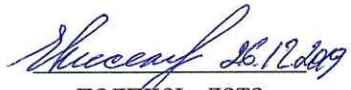
Зав. лабораторией, чл.-корр. РАН, доктор биологических наук  26.12.2019 Е.А. Воротеляк (введение, раздел 2-3)
подпись, дата

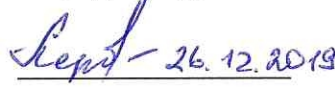
Исполнители:

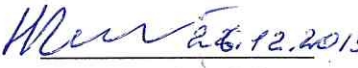
Ведущий научный сотрудник, доктор биологических наук  26.12.2019 Е.С. Васецкий (раздел 1)
подпись, дата

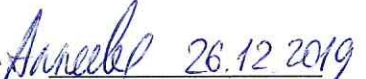
Ведущий научный сотрудник, доктор биологических наук (НИИ ФХБ им. А.Н.Белозерского МГУ)  26.12.2019 Б.В. Черняк (раздел 1)
подпись, дата

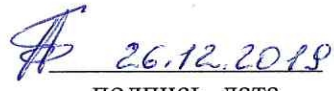
Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук (НИИ ФХБ им. А.Н.Белозерского МГУ)  26.12.2019 Е.Н. Попова (раздел 1)
подпись, дата

Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук  26.12.2019 Е.В. Киселева (раздел 1)
подпись, дата

Аспирант ИБР РАН  26.12.2019 О.О. Сербина (раздел 1)
подпись, дата

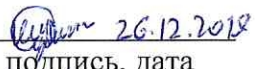
Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук  26.12.2019 Н.Г. Гурская (раздел 2)
подпись, дата

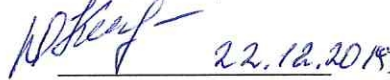
Научный сотрудник, кандидат биологических наук  26.12.2019 Е.В. Алпеева (раздел 2)
подпись, дата

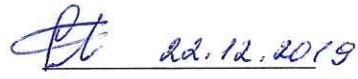
Младший научный сотрудник  26.12.2019 А.К. Бейлин (раздел 2)
подпись, дата

Инженер-исследователь  26.12.2019 О.В. Борисова (раздел 2)
подпись, дата

Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук  26.12.2019 Б. Дашинимаев (раздел 3,4)
подпись, дата

Научный сотрудник, кандидат биологических наук  26.12.2019 К.К. Сухинич (раздел 3,4)
подпись, дата

Аспирант ИБР РАН  22.12.2019 Ю.С. Колесова (раздел 3)
подпись, дата

Младший научный сотрудник, кандидат биологических наук  22.12.2019 А.В. Косых (раздел 3)
подпись, дата

Главный научный сотрудник,
доктор биологических наук

 26.12.2019
подпись, дата

И.С. Захаров (раздел 4)

Ведущий научный сотрудник,
доктор биологических наук

 26.12.2019
подпись, дата

В.Е. Дьяконова (раздел 4)

Старший научный сотрудник,
кандидат биологических наук

 26.12.2019
подпись, дата

Д.В. Богуславский (раздел 4)

Старший научный сотрудник,
кандидат биологических наук

 26.12.2019
подпись, дата

Д.Д. Воронцов (раздел 4)

Старший научный сотрудник,
кандидат биологических наук

 26.12.2019
подпись, дата

Т.И. Дьяконова (раздел 4)

Старший научный сотрудник,
кандидат биологических наук

 26.12.2019
подпись, дата

Т.А. Коршунова (раздел 4)

Главный научный сотрудник,
доктор биологических наук

 26.12.2019
подпись, дата

Д.А. Сахаров (раздел 4)

Научный сотрудник,
кандидат биологических наук

 26.12.2019
подпись, дата

И.А. Чистопольский
(раздел 4)

Старший научный сотрудник,
кандидат биологических наук

 26.12.2019
подпись, дата

А.Ю. Кулибин (раздел 5)

Научный сотрудник,
кандидат биологических наук

 26.12.2019
подпись, дата

Е.А. Малолина (раздел 5)

Научный сотрудник

 26.12.2019
подпись, дата

А.А. Цитрина (раздел 5)

Инженер-исследователь

 26.12.2019
подпись, дата

В.А. Почаев (раздел 5)

Старший научный сотрудник,
кандидат биологических наук

 26.12.2019
подпись, дата

Н.Н. Буторина (раздел 6)

Научный сотрудник,
кандидат биологических наук

 26.12.2019
подпись, дата

О.Н. Шевелева (раздел 6)

Старший лаборант

 26.12.2019
подпись, дата

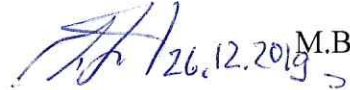
Т.А. Тортунова (раздел 6)

Аспирант ИБР РАН

 26.12.2019
подпись, дата

А.Н. Новокрещенова
(раздел 6)

Зав. лабораторией, академик
РАН,
доктор биологических наук

 26.12.2019 М.В. Угрюмов (раздел 7)
подпись, дата

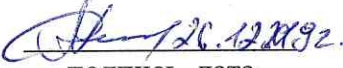
Старший научный сотрудник,
кандидат биологических наук

 26.12.2019 Т.С. Пронина (раздел 7)
подпись, дата

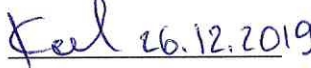
Научный сотрудник,
кандидат биологических наук

 26.12.2019 А.Р. Ким (раздел 7)
подпись, дата

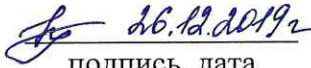
Научный сотрудник,
кандидат биологических наук

 26.12.2019 Л.К. Дильмухаметова
(раздел 7)
подпись, дата

Научный сотрудник,
кандидат биологических наук

 26.12.2019 А.А. Колачева (раздел 7)
подпись, дата

Научный сотрудник,
кандидат биологических наук

 26.12.2019 Ю.О. Никишина (раздел 7)
подпись, дата

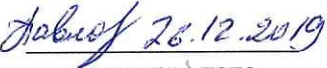
Младший научный сотрудник,
кандидат биологических наук

 26.12.2019 А. Р. Муртазина (раздел 7)
подпись, дата

Младший научный сотрудник

 26.12.2019 В.В. Сафандеев (раздел 7)
подпись, дата

Старший лаборант

 26.12.2019 Е.Н. Павлова (раздел 7)
подпись, дата

Старший лаборант

 26.12.2019 В.Е. Блохин (раздел 7)
подпись, дата

Инженер-исследователь

 26.12.2019 С.А. Сурков (раздел 7)
подпись, дата

Инженер-исследователь

 26.12.2019 К.М. Рябинкина (раздел 7)
подпись, дата

Нормоконтроллер:

Ведущий научный сотрудник,
кандидат биологических наук

 Е.Б. Абрамова
подпись, дата
26.12.2019

РЕФЕРАТ

Отчёт 104 с., 55 рис., 3 таб., 7 разд., 103 ист., публикаций по теме – 10

Ключевые слова: ЛИЦЕ-ПЛЕЧЕ-ЛОПАТОЧНАЯ МЫШЕЧНАЯ ДИСТРОФИЯ, МИОДИСТРОФИЯ ЛАНДУЗИ-ДЕЖЕРИНА, БУЛЛЕЗНЫЙ ЭПИДЕРМОЛИЗ, РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА, CRISPR/CAS9, ЦИТОКЕРАТИН 5, ИММОТАЛИЗОВАННЫЕ КЕРАТИНОЦИТЫ ЧЕЛОВЕКА, НЕЙРАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ, КОНДУИТ, ТРАВМЫ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ НЕРВОВ, ИНДУЦИРОВАННЫЕ ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ, КЛЕТКИ СЕРТОЛИ, МУЖСКОЕ БЕСПЛОДИЕ, ЭКЗОСОМЫ, МЕЗЕНХИМНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ, БОЛЕЗНЬ ПАРКИНСОНА, НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИЯ

Объекты исследования – иммортализованные миобласты человека; клетки кожи человека от здоровых доноров и пациентов с буллезным эпидермолизом (БЭ), генетические конструкции для геномного редактирования клеток человека; тканеинженерная конструкция на основе желатинового сосудистого протеза и нейральных клеток; культура нейронов человека, экспрессирующих кальциевый флуоресцентный индикатор GCaMP6s; популяция Сертоли-подобных клеток (СПК) в мужских гонадах; экзосомы, полученные от мезенхимных стромальных клеток (МСК) костного мозга, жировой ткани и скелетных мышц; ткани предсердий и желудочков сердца мышей; самцы мышей линии C57Bl/6 в возрасте 2-2.5 месяцев.

Цель работы – разработка новых подходов для лечения социально значимых заболеваний человека, в том числе, выяснение причин дефектов миогенеза при мышечной дистрофии; разработка принципиально новой генетической конструкции, предназначенной для коррекции симптомов БЭ; разработка новой биомедицинской технологии лечения травмы периферических нервов, основанной на использовании стволовых клеток различного генеза; разработка нового подхода в клеточной терапии мужского бесплодия; поиск оптимального источника экзосом для стимуляции восстановления мышечной ткани; поиск биохимических, физиологических и морфологических маркеров доклинической стадии болезни Паркинсона при исследовании на нейротоксических МФТП-моделях данного заболевания у мышей *in vivo*.

Результаты работы и их новизна:

- впервые показано, что миобласты больных лице-плече-лопаточной дистрофией стимулируют пролиферацию МСК, а также влияют на синтез и секрецию белков внеклеточного матрикса в норме и в условиях воспаления.

- получены новые линии клеток человека, моделирующие простой БЭ (ПБЭ) *in vitro*. Разработаны направляющие РНК для системы редактирования генома на основе CRISPR/Cas9, позволяющие вносить целевые изменения в ген KRT5, мутации в котором вызывают ПБЭ. Разработан протокол получения эквивалентов кожи из мутантных клеток для оценки их способности реконструировать базальную мембрану.
 - отработана модель травмы периферического нерва у мышей; создана новая биоинженерная конструкция на основе сосудистого протеза из желатинового гидрогеля и нейральных клеток, которая способна поддерживать функциональное восстановление после повреждения периферического нерва.
 - физиологическая активность нейронов визуализирована с использованием трансгенных нейральных культур с флуоресцентным кальциевым индикатором GCaMP6s. Показаны существенные различия в генной экспрессии нейронов, полученных из НСК разного возраста.
 - популяция СПК впервые исследована на разных этапах эмбрионального и постнатального развития мыши; по происхождению СПК близки к КС и могут быть использованы в качестве их замены в клеточных технологиях воспроизведения сперматогенеза.
 - площадь воспаления в поврежденной мышце уменьшается при введении экзосом от МСК костного мозга; экзосомы от МСК жировой ткани усиливают ангиогенез, а экзосомы от фибробластов интактных мышц положительно влияют на миогенез.
 - МФТП-модели болезни Паркинсона у мышей достаточно корректно воспроизводят характерные для больных патологические процессы в сердце, что позволяет использовать эти модели для соответствующих исследований и для разработки ранней диагностики болезни Паркинсона.
- Полученные результаты имеют важное фундаментальное значение и создают предпосылки для развития новых биомедицинских технологий.

СОДЕРЖАНИЕ

ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	9
ОБЩЕЕ ВВЕДЕНИЕ	12
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	14
Раздел 1. Молекулярная и клеточная терапия лице-плече-лопаточной мышечной дистрофии (ЛПЛМД, или FSHD).....	14
1.1 ВВЕДЕНИЕ	14
1.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	15
1.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	19
1.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	29
1.5 СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ	30
1.6 ОТЧЕТНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО РАЗДЕЛУ	33
Раздел 2 Разработка биомедицинской технологии коррекции симптомов буллезного эпидермолиза, основанной на генетической коррекции аутологичных клеток.....	34
2.1 ВВЕДЕНИЕ	34
2.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	35
2.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	46
2.5 СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	46
2.6 ОТЧЕТНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО РАЗДЕЛУ	47
Раздел 3. Разработка новой биомедицинской технологии лечения травмы периферических нервов, основанной на использовании стволовых клеток различного генеза	49
3.1 ВВЕДЕНИЕ	49
3.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	50
3.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	53
3.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	56
3.5 СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	57
3.6 ОТЧЕТНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО РАЗДЕЛУ	58
РАЗДЕЛ 4. ФОРМИРОВАНИЕ МЕДИАТОРНОГО РАЗНООБРАЗИЯ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ НЕРВНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА <i>IN VITRO</i>	59
4.1 ВВЕДЕНИЕ	59
4.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	60
4.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	61
4.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	69
4.5 СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ	69
4.5. ОТЧЕТНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО РАЗДЕЛУ	70
Раздел 5. Разработка методики коррекции дефектов сперматогенеза <i>ex vivo</i> с использованием популяции активно пролиферирующей в культуре клеток Сертоли взрослого организма.....	71

5.1 ВВЕДЕНИЕ	71
5.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	72
5.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	72
5.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	78
5.5 СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ	78
5.6 ОТЧЕТНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО РАЗДЕЛУ	79
Раздел 6. Экспериментальный отбор клеточных источников экзосом с целью разработки эффективных препаратов.....	80
6.1 ВВЕДЕНИЕ	80
6.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	81
6.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	82
6.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	88
6.5 СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	88
6.6 ОТЧЕТНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО РАЗДЕЛУ	90
РАЗДЕЛ 7. ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ ПРОЯВЛЕНИЙ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА КАК ВАЖНАЯ ЗАДАЧА ТРАНСЛЯЦИОННОЙ МЕДИЦИНЫ ДЛЯ СОЗДАНИЯ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ И ПРЕВЕНТИВНОЙ ТЕРАПИИ.....	91
7.1 ВВЕДЕНИЕ	91
7.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	92
7.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	95
7.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	100
7.5 СПИСОК ЦИТИРУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ	101
7.6 ОТЧЕТНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО РАЗДЕЛУ	102
ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ	103

ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

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

ACTb — бета-актин

Amh – Anti-Müllerian hormone

BMP — костный морфогенетический белок

Cdh1 – Cadherin-1

CRISPR/Cas9 – система редактирования генома

DAPI — 4',6-diamidino-2-phenylindole, 4',6-диамидино-2-фенилиндол

DCX — антитела anti-Doublecortin

Dmrt1 – Doublesex and mab-3 related transcription factor 1

FACS – fluorescent activating cell sorting – сортинг клеток по флуоресценции

FCS – fetalная телячья сыворотка (fetal calf serum)

FSHD - facioscapulohumeral dystrophy

GAPDH — глицеральдегид трифосфат дегидрогеназа

Gata4 – GATA Binding Protein 4

GCaMP – генетически кодируемый кальциевый индикатор на кальмодулина и зеленого флуоресцентного белка

GFAP — глиальный фибриллярный кислый белок

GFP — green fluorescent protein, зелёный флуоресцентный белок

GLAST – глутаматный транспортер

HaCaT – линия immortalized кератиноцитов

KRT5 – кератин 5

Krt8 – Keratin 8

L-ДОФА – L-диоксифенилаланин;

MBP — антитела anti-Myelin basic protein

miR – микроРНК (microRNA)

MSI1 — РНК-связывающий белок MUSASHI1

NANOG — гомеобоксный белок NANOG

NCAM — адгезионная молекула нейральных клеток

NES — нестин

NEUN — нейрональный ядерный антиген

NF — антитела Anti-Neurofilament heavy polypeptide

NTA – анализ траекторий наночастиц (nanoparticle tracking analysis)

OCT4 — октамер-4 связывающий транскрипционный фактор OCT4.

PAX6 — парный боксовый белок PAX6TUBB3 — бета-3 тубулин
 Pax8 – Paired-box gene 8
 PSA-NCAM – полилилизированная молекула адгезии нервных клеток
 SMAD – семейство белков-преобразователей сигналов
 SOX2 — SRY-бокс 2 белок
 Sox9 – SRY-Box transcription factor 9
 TGFb — трансформирующий ростовой фактор бета
 TH — тирозин гидроксилаза
 Trf – transferrine
 Wt1 – Wilms tumor protein 1
 БЭ – буллёзный эпидермолиз
 БП – болезнь Паркинсона
 ВБЭ - врожденный буллезный эпидермолиз
 ВКМ - внеклеточный матрикс
 ВКП – внеклеточное пространство
 ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
 ГАМК – гамма аминomásляная кислота
 ДГБА – 3,4-дигидроксибензиламин
 иПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки
 ИТС – инсулин-трансферрин-селенит
 ЖТ – жировая ткань
 КМ – костный мозг
 КС – клетки Сертоли
 ЛПЛМД - Лице-плече-лопаточная мышечная дистрофия
 М – мышцы
 МСК – мезенхимные стромальные клетки
 МФТП – 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин
 НСК — нейральные стволовые клетки
 ПБЭ – простой буллёзный эпидермолиз
 ПП клетки – промежуточные прогениторные клетки
 ПЦР — полимеразная цепная реакция
 Сертоли-подобные клетки – минорная популяция клеток, экспрессирующих маркеры клеток Сертоли, способная, в отличие от зрелых клеток Сертоли извитых канальцев, к активной пролиферации в условиях культуры
 СК - стволовые клетки

СПК – Сертоли-подобные клетки

ТГ – тирозингидроксилаза

ТФ - транскрипционные факторы

ЭДТА – этилендиаминтетраацетат

ЭСК — эмбриональные стволовые клетки

ОБЩЕЕ ВВЕДЕНИЕ

Развитие современных биомедицинских технологий позволяет разрабатывать новые подходы для лечения и профилактики социально значимых заболеваний человека и, таким образом, обеспечить переход к высокотехнологичной и персонализированной медицине. Это достигается, в том числе, использованием генетического редактирования, клеточных технологий, моделированием заболеваний в клеточных культурах и на лабораторных животных. В то же время, исследования в области патогенеза заболеваний способствуют получению новых данных относительно фундаментальных процессов на клеточном и молекулярном уровнях, которые обеспечивают нормальное функционирование тканей и органов человека и животных.

Для исследований в области биомедицины в настоящее время применяются самые различные экспериментальные модели и подходы молекулярной и клеточной биологии, геномной инженерии, генетики, биоинформатики, моделирование на животных, использование биоимиджинговых систем и многое другое. В данной работе в качестве объектов исследования использован широкий спектр моделей. В частности, использованы клеточные линии и компоненты их секретомы, а именно: линии immortalized клеток от здоровых доноров (миообласты, кератиноциты) и доноров, имеющих врожденные заболевания (миодистрофия Ландузи-Дежерина), нейральные стволовые клетки человека, дифференцированные из индуцированных плюрипотентных клеток, а также генетически модифицированные клеточные линии, полученные в ходе работы (эпидермальные кератиноциты, несущие мутацию в гене, кодирующем кератин 5; нейральные стволовые клетки, несущие ген кальциевого индикатора GCaMP6), а также экзосомы от мезенхимных стромальных клеток (МСК) костного мозга, жировой ткани и фибробластов нормальных мышц. Разработаны и изучены генетические конструкции, пригодные для геномного редактирования клеток человека, а также тканеинженерный эквивалент кожи человека. На лабораторных животных (мыши) разработана и использована для исследований модель травмы периферического нерва, исследована популяция Сертоли-подобных клеток (СПК) в мужских гонадах, использована модель Болезни Паркинсона (БП).

Цель работы – разработка новых подходов для лечения социально значимых заболеваний человека. В рамках поставленной цели на данном этапе решались следующие задачи: выяснение причин дефектов миогенеза при мышечной дистрофии; разработка генетической конструкции, предназначенной для коррекции симптомов БЭ; разработка новой биомедицинской технологии лечения травмы периферических нервов, основанной на использовании стволовых клеток различного генеза; разработка нового подхода в

клеточной терапии мужского бесплодия; поиск оптимального источника экзосом для стимуляции восстановления мышечной ткани; поиск биохимических, физиологических и морфологических маркеров доклинической стадии болезни Паркинсона при исследовании на нейротоксических МФТП-моделях данного заболевания у мышей *in vivo*.

Использованные подходы можно разделить на две группы. Первая предполагала исследование молекулярно-клеточных механизмов возникновения патологий и способов их моделирования и идентификации. Это, прежде всего, исследование характера и роли взаимодействия МСК и миобластов в патогенезе лице-плече-лопаточной мышечной дистрофии (Ландузи-Дежерина), разработка клеточных и тканевых моделей простого БЭ, изучению возможных нарушений в тканях сердца на моделях доклинической и ранней клинической стадии БП у животных, визуализация кальциевой активности нейронов с помощью трансгенных клеточных линий. Вторая группа подходов подразумевала поиск клеточных источников регенерации и разработку современных технологий коррекции и восстановления структур и функций организма – дизайн генно-инженерных конструкций и гидовых РНК для коррекции мутаций, вызывающих БЭ, с помощью системы CRISPR/Cas9; восстановление повреждения периферического нерва с помощью желатинового протеза, населенного нейральными клетками; оценка степени эффективности и безопасности использования СПК вместо КС для коррекции мужского бесплодия путем изучения происхождения и дифференцировки СПК в ходе развития мужской гонады мыши, выяснение эффекта экзосом, полученных от МСК, на регенерацию мышечной ткани.

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности и актуальности выбранного направления работ.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

РАЗДЕЛ 1. МОЛЕКУЛЯРНАЯ И КЛЕТОЧНАЯ ТЕРАПИЯ ЛИЦЕ-ПЛЕЧЕ-ЛОПАТОЧНОЙ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ (ЛПЛМД, ИЛИ FSHD)

1.1 ВВЕДЕНИЕ

Лице-плече-лопаточная мышечная дистрофия (ЛПЛМД, или FSHD) - это аутосомно-доминантное заболевание с распространенностью вплоть до 1 случая на 8000 чел [1]. Клинические особенности FSHD, как правило, касаются мышц лица и верхних конечностей, но могут с возрастом каудально прогрессировать, поражая мышцы живота и нижних конечностей и ступней [2]. Основная форма лице-плече-лопаточной дистрофии (facioscapulohumeral dystrophy - FSHD1) является результатом комбинации трех мутаций в коротком плече хромосомы 4 (4q35): уменьшение количества D4Z4 повторов и двух полиморфизмов, 4qA161 и 4qA. Полиморфный сайт 4qA161 содержит инсулятор, необходимый для контроля активности генов DUX4, DUX4c, FRG1, FRG2, ANT1 и др. в локусе 4q35. Повышенная экспрессия этих генов, в особенности DUX4 приводит к болезни. При этом молекулярные и клеточные механизмы заболевания до конца не изучены.

Гистологический анализ биопсии мышц FSHD и исследования MPT выявили воспалительные иммунные ответы при прогрессировании заболевания [3-5]. Исследования MPT доказывают, что воспалительный ответ в мышцах предшествует жировой дегенерации мышц [6, 7]. Скелетная мышца включает, помимо миогенных клеток-предшественников (сателлитных клеток), несателлитные стволовые клетки, включая МСК, интерстициальные стволовые клетки, положительные по экспрессии медиатора стресса PW1 и отрицательные по PAX7, называемые PICs (PW1 + / PAX7-интерстициальные клетки), фибро/адипогенные предшественники/мезенхимальные стволовые клетки, популяции мышечных боковых клеток и резидентные перициты мышц. Все эти популяции мезенхимальных клеток в физиологических условиях участвуют в регенерации мышц. Но при хроническом воспалении или постоянном повреждении мышц они могут дифференцироваться в адипоциты или способствовать мышечному фиброзу [8-10].

Окислительный стресс, связанный с продукцией активных форм кислорода (АФК) в митохондриях, является характерной особенностью FSHD [11]. Недавнее исследование показало многообещающие эффекты диеты, обогащенной антиоксидантами, на состояние пациентов с FSHD [12]. Об участии митохондрий в патогенезе FSHD свидетельствует повышение уровня экспрессии, по меньшей мере, одного митохондриального белка, ANT1 [13]. Также была продемонстрирована синергия между окислительным стрессом и

воспалением в мышцах у лиц, страдающих FSHD [14]. В этой связи актуальным является исследование антиоксидантов на миобласты FSHD.

Цель работы - понять механизмы возникновения дефектов миогенеза под действием генов, вовлеченных в FSHD и использовать полученные знания для разработки подходов к лечению этого заболевания.

Задачи, поставленные на 2019 год:

1. Исследовать влияние миобластов от больных и здоровых доноров на пролиферативную активность и синтез внеклеточного матрикса мультипотентных стромальных клеток;
2. Исследовать влияние МСК на дифференцировку миобластов от больных и здоровых доноров;
3. Исследовать влияние антиоксидантной обработки на транскрипционные профили миобластов, экспрессирующих DUX4.

1.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1.2.1 Работа проводилась на immortalized миобластах человека линии MB135 и immortalized миобластах человека линии MB135 с индуцибельной экспрессией DUX4-fl (линия MB135-DUX4). Обе линии любезно предоставлены Стефаном Дж. Тепскоттом, исследовательский центр Фреда Хатчинсона, Северный Сиеэтл [15].

Для исследования взаимодействия МСК и миобластов использовали четыре культуры immortalized миобластов: две от здоровых и две от больных ЛПЛМД доноров. Иммутизация миобластов проводилась по стандартному протоколу в Институте миологии (Париж). В качестве контроля использовали культуры первичных миобластов от больных и здоровых доноров. Также в работе использовали МСК, выделенные из жировой ткани. Первичные миобласты и МСК были взяты из УНУ «Коллекция клеточных культур» ИБР РАН.

В отдельных опытах были использованы первичные культуры миобластов здоровых людей и больных миодистрофией Ландузи-Дежерина (таблица 1.1) из коллекции института Гюстава Роше (Франция).

Таблица 1.1 - Перечень первичных культур миобластов, использованных в работе

Клеточная культура	Фенотип	Число D4Z4 повторов	Возраст	Пол
NO46	здоровый	-	31	М
N039	здоровый	-	23	Ж
MO43	МДЛД, атрофичные миотубулы	7	41	М
MO48	МДЛД, дезорганизованные миотубулы	6	39	М
MO51	МДЛД, атрофичные миотубулы	7	32	Ж
MO53	МДЛД, атрофичные миотубулы	7	46	М
MO54	МДЛД, дезорганизованные миотубулы	4	25	М
FSHD10	МДЛД, дезорганизованные миотубулы	4	20	Ж

В работе использовали стандартные методы клеточной и молекулярной биологии.

1.2.2 Культивирование клеток. МСК культивировали во флаконах с поверхностью роста клеток 75 и 150 см² в среде для пролиферации, состоящей из α -MEM (Панэко), 10% FBS (HyClone) и добавок: инсулин-трансферин-селенит (Gibco), Glutamax (Gibco). Миобласты культивировали во флаконах с поверхностью роста клеток 75 и 150 см² в среде для пролиферации, состоящей из 4 частей DMEM (Панэко) и 1 части среды 199 (Gibco) с добавлением 15% FBS, 0,01M HEPES (Gibco), 1XGlutamax, 10 мг/л bFGF (Peprotech), 0,1 мкМ/л дексаметазона (Sigma) и 50 Ед./мл пенициллина, 50мкг/мл стрептомицина (Gibco) Клетки культивировали в CO₂-инкубаторе при 37°C, 5% CO₂. МСК пассировали по достижении монослоя, миобласты пассировали по достижению 50% монослоя с помощью растворов Версена (Панэко) и 0,05% трипсина-EDTA (Gibco).

1.2.3 Кондиционирование среды культивирования. Миобласты по достижению 50% монослоя отмывали трижды средой без сыворотки, затем заливали содержащую 2% FBS среду α -MEM и культивировали в течение 48 часов. Затем собирали среду из-под клеток в стерильные пробирки, центрифугировали 10 мин при 3000g для удаления возможных клеток и клеточного дебриса, супернатант хранили при -20°C.

1.2.4 Анализ пролиферативной активности МСК. Клетки пассировали в 6 луночные плата в количестве $2 \cdot 10^5$ клеток на лунку, через сутки клетки отмывали от сыворотки стерильным PBS и заливали среду без сыворотки. Через 48 часов сывороточной депривации МСК переводили на кондиционированные миобластами среды. В качестве контролей использовали среду, содержащую 2% и 10% FBS. Через 24 часа клетки снимали

с пластика и оценивали количество пролиферирующих клеток методом проточной цитометрии.

1.2.5 Проточная цитометрия. Суспензию МСК отмывали от фермента в PBS центрифугированием в течение 10 мин при 300g. Клетки фиксировали в растворе Cytofix (BD Biosciences) в течение 20 мин при +4°C, отмывали трижды BPS. После последней отмывки клетки ресуспендировали в первых антителах против Ki-67 (маркер пролиферирующих клеток), разведенных в блок-растворе в соотношении 1/100 и инкубировали в течение ночи при +4°C. Затем трижды отмывали от первых антител PBS, после последней отмывки клетки ресуспендировали во вторых антителах, конъюгированных с флуорохромом Alexa и инкубировали в течение 60 мин в темноте. Для контроля неспецифического связывания вторых антител использовали пробы без первых антител. Отмывали от вторых антител и анализировали пробы на проточном цитометре Attune NxT.

1.2.6 Анализ эффективности дифференцировки миобластов в присутствии МСК. Для оценки влияния МСК на дифференцировку миобластов в смешанной культуре клетки пассировали в высокой плотности (100% монослой) в 6 луночные планшеты. Через 24 часа после посадки клетки промывали дважды раствором PBS (Панэко) и наливали дифференцировочную среду, состоящую из DMEM, 2% лошадиной сыворотки, 1XGlutamax. В течение дифференцировки среду не меняли. Анализ проводили на 5-е сутки дифференцировки. Культуры окрашивали красителями Jenner-Giemsa (по Velica, 2011). В результате окрашивания можно наблюдать не ярко окрашенные миобласты и интенсивно окрашенные пурпурные миотубулы. Препараты исследовали на инвертированном микроскопе Olympus IX51 с камерой Olympus DP70 и делали фотографии не менее 5 полей зрения с 1 препарата. Подсчет количества ядер и количества миотубул проводили при помощи программного обеспечения ImageJ. Расчет индекса слияния миобластов проводили по формуле: $FI = \frac{\text{количество ядер в миотубулах}}{\text{общее количество ядер}} * 100\%$.

1.2.7 *In vitro* модель фиброза. МСК от трех доноров высевали в 12-луночные планшеты в питательной среде с добавлением 10% FBS и культивировали в течение ночи до 80-100% монослоя. После промывки бессывороточной средой добавляли свежую среду с добавлением 2% FBS и клетки культивировали в течение 24 часов. Затем среду меняли на свежую с добавлением 2% FBS и 10 нг/мл TGFβ или кондиционированной миобластами среды с добавлением 2% FBS. Клетки культивировали в течение 48 часов и фиксировали в метаноле в течение ночи при -20 и тщательно промывали один раз PBS. Затем клетки окрашивали 0,1% Picro-Sirius Red (Abcam) в течение 60 минут при

комнатной температуре, трижды промывали 0,1% уксусной кислотой. Клетки, окрашенные Picro-Sirius Red, фотографировали с помощью светового микроскопа Olympus IX51 и подсчитывали количество окрашенных клеточных узелков.

1.2.8 Биохимический анализ коллагена в культурах МСК проводили с использованием протокола набора для определения коллагена QuickZyme (QuickZyme Biosciences). Для анализа готовили клеточные экстракты: клетки промывали раствором PBS, затем выливали в 0,5 М уксусную кислоту и инкубировали в течение ночи при +4°C на орбитальном шейкере. Этот экстракт центрифугировали в течение 10 минут при 3000 g, +4°C. Затем супернатант и среду из клеток разводили в 2 раза и анализировали. Для количественной оценки концентрации коллагена в клеточном экстракте и среде связанную краску извлекали и измеряли оптическую плотность элюатов при $\lambda = 540$ нм (отсекающий фильтр 630 нм) с помощью планшетного фотометра StatFax.

1.2.9 Образцы для RNA-seq готовили в трех биологических повторах. При приготовлении каждого образца часть клеток отбирали для измерения уровня внутриклеточных АФК (измеряли методом проточной цитофлуориметрии с использованием CM-H2DCFDA), оставшиеся клетки лизировали и выделяли мРНК с помощью набора Quick-RNA MiniPrep (Zymo Research) в соответствии с инструкциями производителя. Пробы заливали 3 объемами 96% спирта и до отправки на секвенирование хранили при -70°C.

1.2.10 Анализ дифференциальной экспрессии. Анализ каунтов, полученных в результате высокопроизводительного секвенирования, проводился с помощью пакета DESeq2 программы R [16]. Значимо дифференциально экспрессируемыми (DEGs – differentially expressed genes) считались гены с $P\text{-value}_{\text{adj}} < 0.05$, $|\text{Fold Change}| > 2$ и средним каунтом более 100 (для отсекания мало экспрессируемых генов). $P\text{-value}_{\text{adj}}$ – p-value с поправкой Бенджамини-Хохберга на множественные сравнения. Выявление оверпредставленных групп генов среди DEGs проводилось по базе данных GeneOntology (<http://geneontology.org/>) методом ORA (Overrepresentation Enrichment Analysis) с помощью сервиса WebGestalt [17].

1.2.11 Уровень экспрессии мРНК определяли методом обратной транскрипции ПЦР в реальном времени. Лизис клеток и выделение РНК из лизатов проводили набором Quick-RNA MiniPrep (Zymo Research) по инструкции производителя. Последовательности использованных в работе праймеров представлены в таблице 1.2.

1.2.12 Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка проводилась в программе GraphPad Prism.

Статистическую значимость определяли, используя Н-критерий Краскела — Уоллиса и последующий тест Данна для множественных сравнений (* - $p \leq 0,05$; ** - $p \leq 0,001$; *** - $p \leq 0,0001$; **** - $p \leq 0,00001$).

Таблица 1.2 - Последовательности праймеров, использованных в работе

Ген	Последовательности праймеров	Температура отжига, °C	Эффективность	Длина ампликона
<i>Rpl</i>	CATCTCCTTCTCGGCATCAAACC CTGTTGTCAATGCCTC	59	1.00	153
<i>ZSCAN4</i>	ATGTCATTGTTTCATCTCACCTTG TTCATCTTTCATATCCTT	51	0.87	126
<i>PITX1</i>	TCCACCAAGAGCTTCACCTTCGG TGAGGTTGTTGATGTTG	59	0.87	166
<i>MT1</i>	ATGGACCCCAACTGCTCCAGCC CTGGGCACACT	59	0.87	143
<i>MT1A</i>	CTTCCACGTGCGCCTTATAGGCA GCWCTTCTTGCAGGAGG	59	0.90	165
<i>MT1E</i>	CATTCTGCTTTCCAAGTGCCTGG CAGCWCTTCTTGCAGGAGG	59	1.11	171
<i>MT1F</i>	GTCCACCACGCCTTCCACGCAG CWCTTCTTGCAGGAGG	59	1.12	174
<i>MT1G</i>	ACTCCGCCTTCCACGTGCAGCA GCWCTTCTTGCAGGAGG	59	0.87	174
<i>MT1L</i>	TCGCCTCTCCCGTCATTTAGCAG GGCTGTCCCCA	61	0.86	230
<i>MT1M</i>	CCGTCCGGGTGGGCCTAGCAGC WCTTCTTGCAGGAGG	59	0.80	166
<i>MT1X</i>	GCTCCACGCTTTTCATCTGTCGC AGCWCTTCTTGCAGGAGG	61	0.95	169
<i>MT2A</i>	AAAGGGGCGTCGGACAAGTGAA CGGTCACGGTCAGGGTTG	59	1.02	121
<i>MT4</i>	GACAAGTGCAGTGCACAACCA CGATGGATGGCTTTCATGGG	60	0.90	152

1.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные нами результаты в 2018 г указывали на способность МСК мигрировать в пораженные мышцы. В этой связи необходимо исследовать роль МСК в очаге пораженных мышц. Для этого мы использовали подход прямого и опосредованного сокультивирования двух типов клеток – МСК и миобластов.

1.3.1 Влияние FSHD миобластов на МСК. Исследовали влияние миобластов на пролиферативную активность МСК. Для этого МСК подвергали сывороточной депривации в течение 48 часов, затем клетки заливали кондиционированной миобластами средой и через 24 часа анализировали количество пролиферирующих клеток по экспрессии маркера пролиферации – Ki67 методом проточной цитометрии. В качестве

контроля использовали среду, содержащую 2% сыворотки, в качестве положительного контроля – среду, содержащую 10% сыворотки. Количество МСК, экспрессирующих маркер пролиферации Ki-67, было в 1,5 раза выше при воздействии кондиционированных сред от FSHD миобластов по сравнению со здоровыми миоблестами (рисунок 1.1). Таким образом, immortalized, а также первичные миоблесты от доноров FSHD могут стимулировать пролиферацию МСК в пораженных мышцах.

Затем в модели фиброза *in vitro* мы проанализировали влияние миобластов на формирование фиброзных узелков МСК. МСК культивировали в среде с 10% FBS до 80-100% монослоя. Затем клеткам заливали среду, содержащую 2% FBS и 10 нг / мл TGFβ1 или кондиционированные миоблестами среды на 24 часа. Окрашенные Picro-Sirius Red узелки фиброза фотографировали и подсчитывали. TGFβ-индуцированное образование фиброзных узелков МСК было широко распространено во всей культуре (рисунок 1.2б). Среда, кондиционированная миоблестами, в любом случае увеличивала интенсивность окрашивания Picro-Sirius Red с несколькими клеточными агрегатами по сравнению с культурой МСК не подвергшейся воздействию. Однако среда, кондиционированная FSHD миоблестами, стимулировала образование узелков примерно в 2 раза больше, чем среда из под нормальных миобластов (рисунок 1.2а). Когда TGFβ добавляли вместе со средами, кондиционированными миоблестами, разница между количеством фиброзных узелков, индуцированных кондиционированной средой нормальными или миоблестами FSHD, нивелировалась (рисунок 1.3).

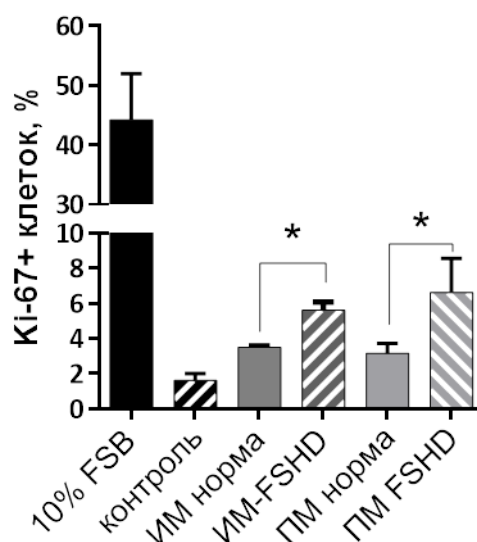


Рисунок 1.1 - Влияние миобластов на пролиферацию МСК. ИМ – immortalized миоблесты, ПМ – первичные миоблесты (* $p < 0,05$)

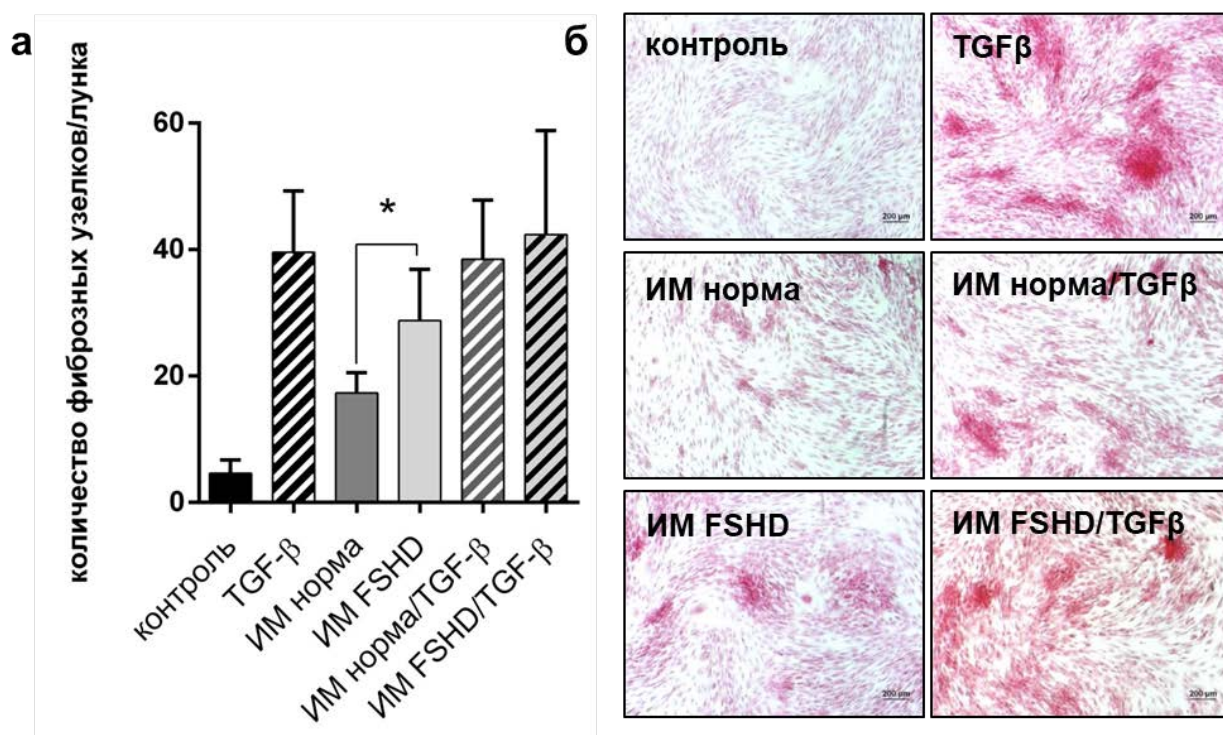


Рисунок 1.2 - Влияние миобластов на способность формировать фиброзные узелки: а – гистограмма количества фиброзных узелков под действием TGF β 1 и кондиционированных иммортализованных миобластиками (ИМ) от здоровых (норма) или больных (FSHD) доноров (* $p < 0,05$); б – репрезентативные фотографии культур МСК под действием кондиционированных миобластиками сред

Мы провели также иммуноцитохимический анализ экспрессии белков внеклеточного матрикса (фибронектина и коллагена 1 типа) под действием кондиционированных миобластиками сред (рисунок 1.3). TGF β 1 вызывал значительное увеличение фибронектина во внеклеточном матриксе, кондиционированная FSHD миобластиками увеличивала синтез фибронектина по сравнению с кондиционированной нормальными миобластиками средой (рисунок 1.3). Однако очевидной разницы в экспрессии коллагена мы этим методом не выявили, поскольку антитела окрасили только внутриклеточный коллаген (рисунок 1.3). Поэтому анализ количества коллагена мы провели биохимическим методом. МСК в течение пяти дней культивировали в среде, кондиционированной миобластиками, либо в кондиционированной миобластиками среде с добавлением TNF α , в качестве контроля были МСК без воздействия. Содержание растворимого коллагена анализировали как в лизате клеток, так и в среде. Различий в количестве коллагена в лизатах контрольных МСК и культивированных в кондиционированной нормальными миобластиками среде мы не выявили ($7,70 \pm 1,22$ мкг/мл по сравнению с контролем $8,27 \pm 0,00$ мкг/мл). Однако в лизатах МСК, культивированных в кондиционированной FSHD миобластиками, было больше: $10,53 \pm 1,44$ мкг / мл против

контроля $8,27 \pm 0,00$ мкг / мл (рисунок 1.4а). Миобласты не влияли на количество коллагена в среде в нормальных условиях (рисунок 1.4б).

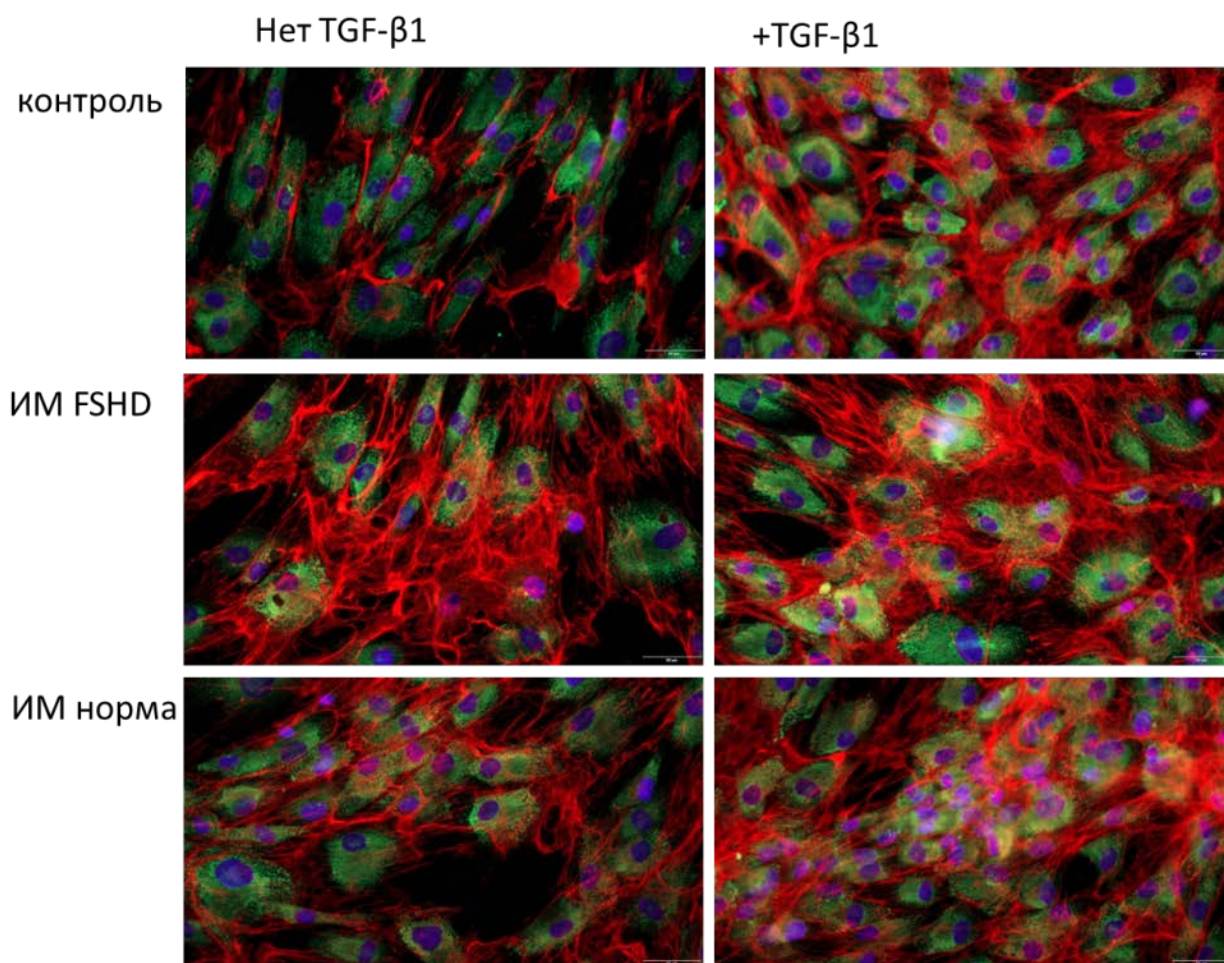


Рисунок 1.3 - Иммунофлуоресцентное окрашивание МСК на коллаген 1 типа (зеленый) и фибронектин (красный), ядра докрашены DAPI

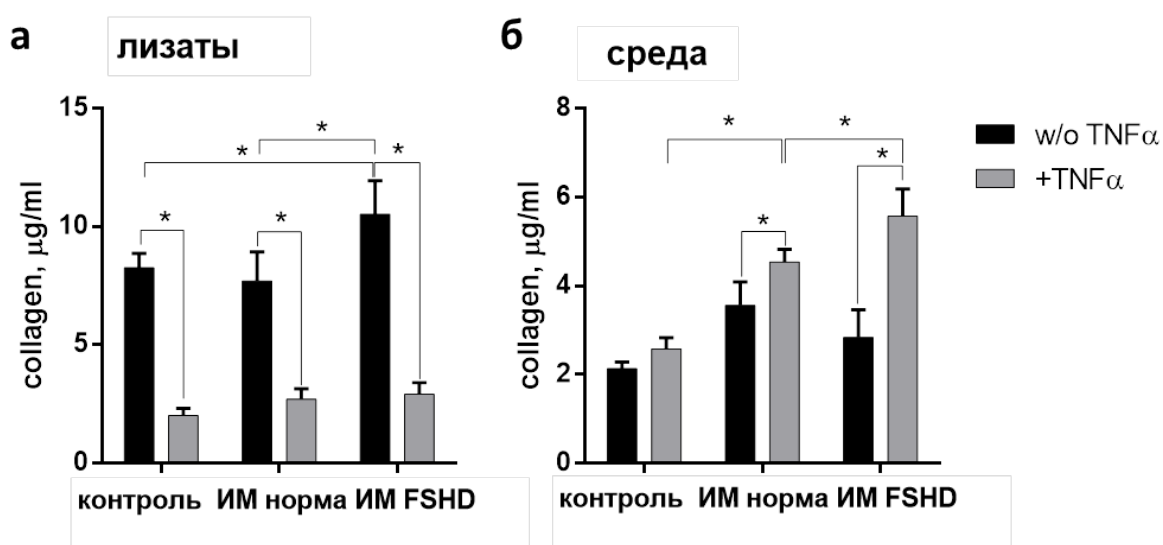


Рисунок 1.4 - Влияние кондиционированных миобластами сред на количество коллагена в лизатах (а) и в среде культивирования (б) МСК (* $p < 0,05$)

При моделировании условий воспаления (добавление в среду культивирования $TNF\alpha$) мы выявили в контроле и эксперименте снижение количества коллагена в лизатах и резкое увеличение количества коллагена в среде, что свидетельствует о секреции коллагена (рисунок 1.4). При этом секреция коллагена МСК была достоверно больше в случае действия кондиционированных миобластами сред по сравнению с контролем. Однако кондиционированная FSHD миобластами среда в большей мере стимулировала секрецию коллагена по сравнению со здоровыми миобластами (рисунок 1.4б).

Таким образом, миобласты от доноров FSHD стимулируют синтез коллагена и его секрецию в условиях воспаления в МСК.

1.3.2 Влияние МСК на дифференцировку миобластов.

Мы предположили, что мигрировавшие в очаг пораженных мышц МСК могут не только синтезировать внеклеточный матрикс, но и влиять на дифференцировку миобластов. Поэтому мы оценили качество дифференцировки миобластов при прямом сокультивировании с МСК. Сравнили влияние количества МСК в смешанной культуре на слияние миобластов (рисунок 1.5).

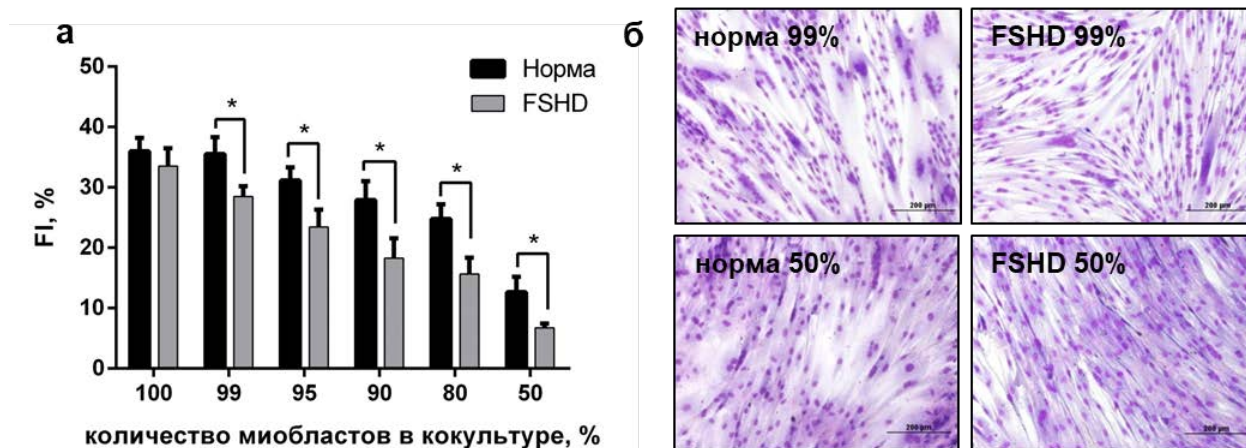


Рисунок 1.5 - Влияние МСК на дифференцировку миобластов: а – диаграмма изменения индекса слияния (FI) миобластов в зависимости от содержания МСК в смешанной культуре, б – репрезентативные фотографии дифференцированных миобластов в смешанной культуре

МСК мешают слиянию миобластов как здоровых, так и FSHD. Однако FSHD миобласты оказались значительно чувствительнее к присутствию МСК. Так в культуре с 10% МСК индекс слияния нормальных миобластов снизился в 1,3 раза, а у FSHD миобластов – в 1,8 раза.

1.3.3 Изучение роли гена DUX4 в генерации окислительного стресса и повреждений ДНК в мышечных клетках в патогенезе ЛПЛМД, а также использование митохондриально-направленных антиоксидантов для коррекции патологических изменений в клетках *in vitro*

Мы исследовали влияние антиоксидантной обработки на транскрипционные профили миобластов, экспрессирующих DUX4. Результаты, полученные нами в 2018 году, показывали, что 4 дневная предобработка миобластов, постоянно экспрессирующих DUX4 на низком уровне (MB135-DUX4), антиоксидантами, как классическими (Trolox, Tempol, NAC), так и митохондриально-направленным (SkQ1) существенно восстанавливает их способность к формированию нормальных миотубул. При этом добавление антиоксидантов только в дифференцировочную среду не приводило к восстановлению миогенеза. Поэтому мы сочли целесообразным подготовить следующие образцы для RNA-seq:

1. контрольные миобласты MB135
2. миобласты MB135-DUX4
3. миобласты MB135, обработанные 4 дня Tempol (100мкМ)
4. миобласты MB135, обработанные 4 дня SkQ1 (20нМ)
5. миобласты MB135-DUX4, обработанные 4 дня Tempol (100мкМ)
6. миобласты MB135-DUX4, обработанные 4 дня SkQ1 (20нМ)

Образцы готовили в трех биологических повторах. При приготовлении каждого образца часть клеток отбирали для измерения уровня внутриклеточных АФК (измеряли методом проточной цитофлуориметрии с использованием CM-H2DCFD). Результаты измерения АФК в образцах соответствовали представленным нами в предыдущем отчете.

1.3.4 Результаты транскриптомного анализа. Из 14557 детектированных генов дифференциально экспрессированными в паре MB135/MB135-DUX4 оказались 377 генов (199 понижены и 178 повышены).

Большинство дифференциально экспрессированных белок-кодирующих генов имели отношение к регуляторным и метаболическим процессам, а также процессам развития многоклеточного организма, организации компонентов клетки и клеточной коммуникации. Кодлируемые ими белки были преимущественно трансмембранными, имели ядерную локализацию или принадлежали везикулярной мембранной системе.

Определение оверпредставленных терминов GO показало, что среди DEGs значимо больше ожидаемого представлены гены, вовлеченные в организацию внеклеточных структур, развитие соединительной ткани, а также негативной регуляции клеточного роста и развития (рисунок 1.6).

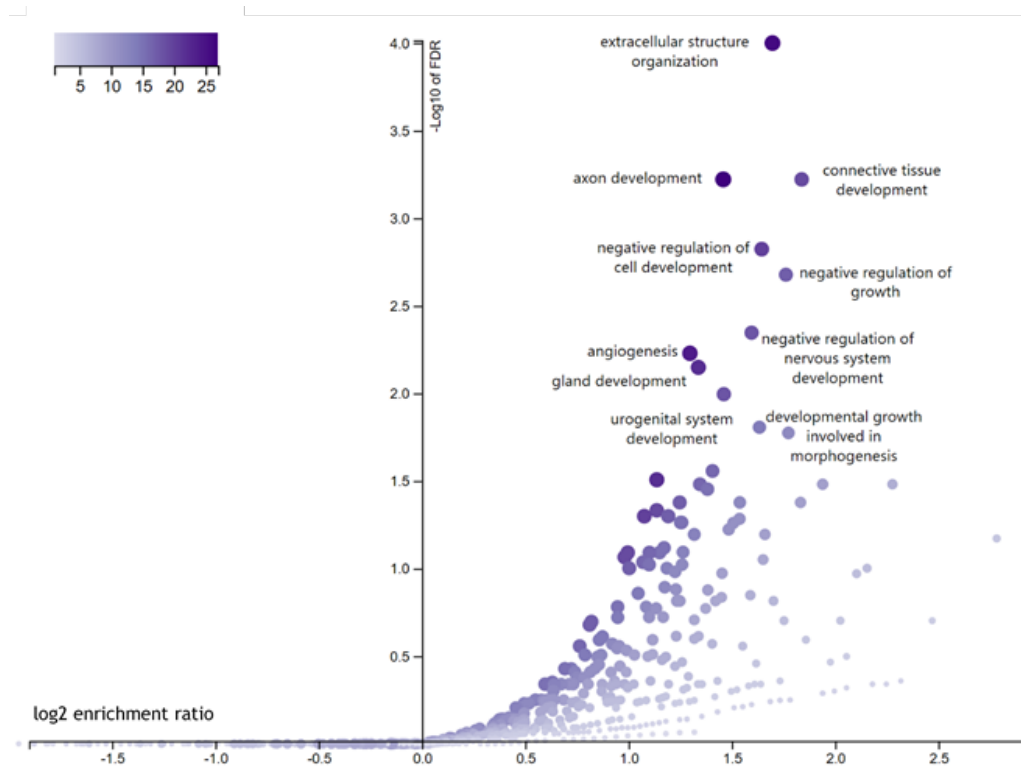


Рисунок 1.6 - Оверпредставленные термины GO среди дифференциально экспрессированных генов в паре MB135/MB135-DUX4 ($FDR \leq 0.05$)

Обработка миобластов MB135-DUX4 антиоксидантами приблизила профиль их экспрессии к контролю. Количество дифференциально экспрессированных генов в парах MB135/MB135-DUX4 + антиоксиданты заметно снизилось по сравнению с контрольной парой MB135/MB135-DUX4 (рисунок 1.7).

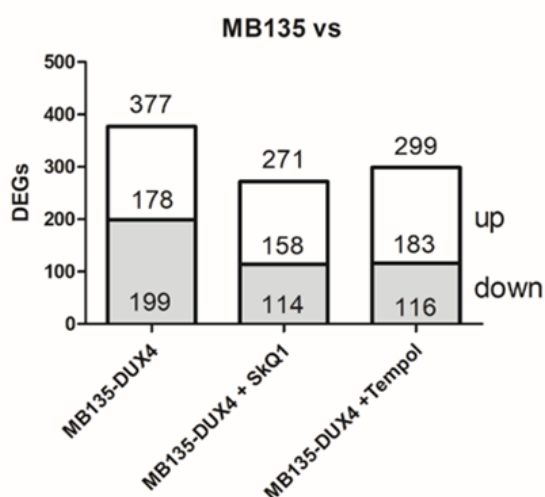


Рисунок 1.7 - Количество дифференциально экспрессированных генов в парах MB135/MB135-DUX4, MB135/MB135-DUX4+SkQ1 и MB135/MB135-DUX4+Tempol

Суммарно, антиоксиданты приблизили к контролю экспрессию 187 генов. Большинство из них (156 генов) были чувствительны к обоим использованным веществам, но некоторые были уникальны для SkQ1 (16 генов) и Tempol (15 генов). На

рисунке 1.8 представлены термины GO, оказавшиеся оверпредставленными среди 156 генов, дифференциальная экспрессия которых исчезла от обоих антиоксидантов.

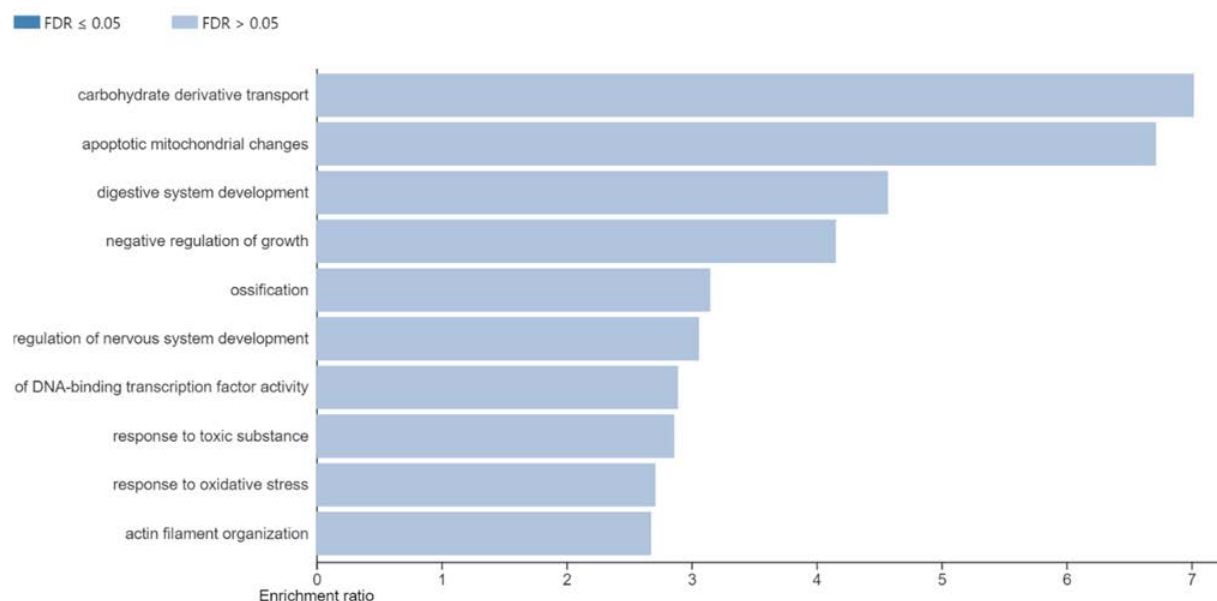


Рисунок 1.8 - Оверпредставленные термины GO среди чувствительных к антиоксидантной обработке генов

Среди генов, попавших в оверпредставленные GO-термины, нас заинтересовала часто встречающаяся группа генов металлотионеинов, которые могут иметь отношение к негативной регуляции клеточного роста, а также к ответу на токсичные вещества. Среди генов, не попавших в оверпредставленные группы, экспрессия которых также пришла в норму после антиоксидантной обработки, нас заинтересовал ген PITX1, вовлеченный в патогенез МДЛД [17, 18] и описанный ранее как прямая мишень DUX4 [19]. Влияние антиоксидантов на экспрессию данных генов было оценено методом обратной транскрипции ПЦР в реальном времени.

1.3.5 Верификация данных транскриптомного анализа для генов металлотионеинов. Экспрессия генов металлотионеинов была определена как на иммортализованных клетках MB135 и MB135-DUX4, так и на ряде первичных клеточных культур миобластов здоровых доноров и больных МДЛД. Использовались праймеры к изоформам MT1 и MT2, характерные для большинства тканей, в том числе мышечных. В качестве отрицательного контроля использовался ген MT4, который, согласно литературе, экспрессируется только в эпителии.

В случае MT1 были поставлены RT-PCR с праймером MT1, поднимающим все варианты первой изоформы, а также с праймерами, поднимающими каждый вариант первой изоформы в отдельности (MT1A, MT1E, MT1F, MT1M, MT1L, MT1X). В случае MT2 существует единственный вариант – MT2A.

На первичных культурах результаты получились трудно интерпретируемыми. Уровень MT1 и MT2A оказался повышен по сравнению с контролем у одних больных и понижен у других (рисунок 1.9). Антиоксидантная обработка повышала экспрессию обеих изоформ в большинстве образцов, однако для отдельных культур (например, MO54), это было не верно. В результатах для отдельных вариантов изоформы MT1, тоже не прослеживалось явной тенденции (графики для них не показаны). В культурах MB135 и MB135-DUX4, обработанных и не обработанных антиоксидантами, экспрессия MT1 варьировала от опыта к опыту (рисунок 1.10).

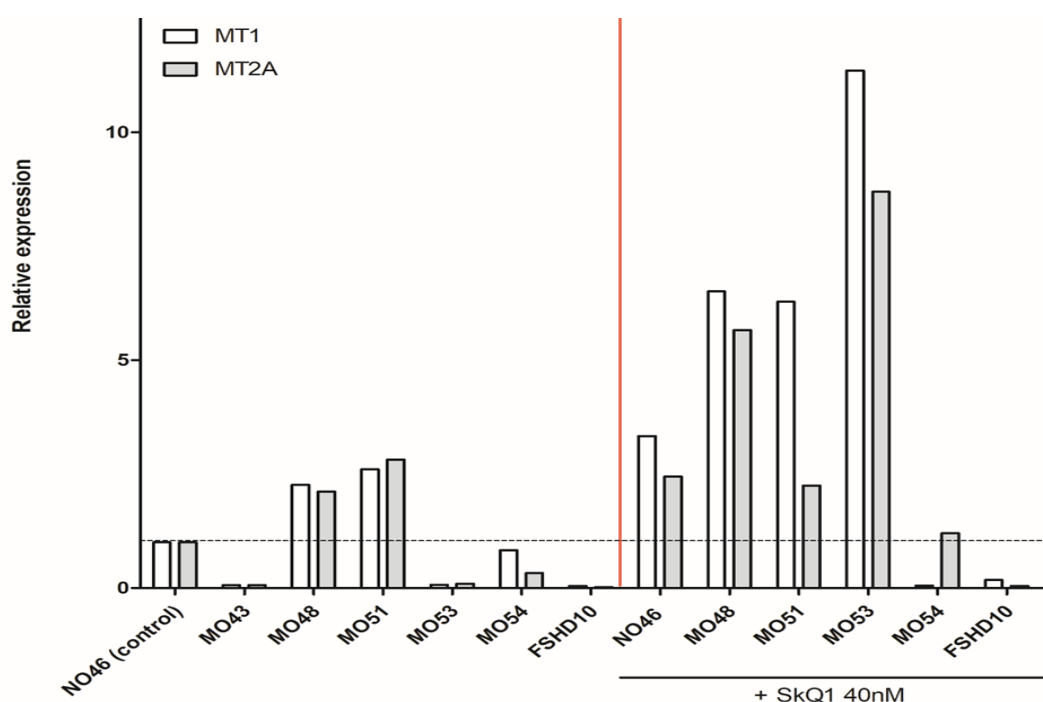


Рисунок 1.9 – Экспрессия MT1 и MT2A в первичных культурах миобластов больных МДЛД (MO43-54, FSHD10), не обработанных и обработанных SkQ1 в течение 4 суток. За единицу принят уровень экспрессии в необработанных первичных миобластах здорового донора (NO46). Данные представлены в виде средних значений

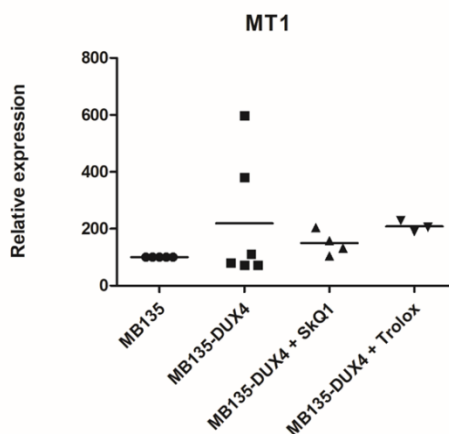


Рисунок 1.10 - Экспрессия MT1 в immortalized культурах миобластов MB135 и MB135-DUX4, не обработанных и обработанных антиоксидантами в течение 4 суток. Данные представлены в виде средних значений. Точки соответствуют отдельным экспериментам

Вероятно, экспрессия металлотионеинов динамична, поэтому уловить тенденцию не удастся, или же связи между МДЛД, экспрессией DUX4 и металлотионеинами вовсе не существует, а в транскриптах они выявились случайно ввиду той же динамичности

1.3.6 Верификация данных транскриптомного анализа для гена PITX1. Оценка экспрессии мРНК PITX1 методом обратной транскрипции ПЦР в реальном времени подтвердила данные транскриптомного анализа. Экспрессия PITX1 в клетках MB135-DUX4 оказалась значительно выше, чем в клетках MB135, а при обработке антиоксидантами приближалась к контролю (рисунок 1.11).

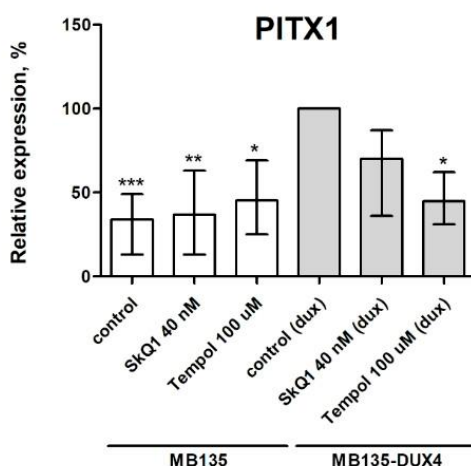


Рисунок 1.11 - Экспрессия PITX1 в обработанных и не обработанных антиоксидантами миобластах MB135 и MB135-DUX4

В первичных миобластах больных также наблюдалась тенденция к повышению уровня PITX1 по сравнению со здоровым контролем (рисунок 1.12)

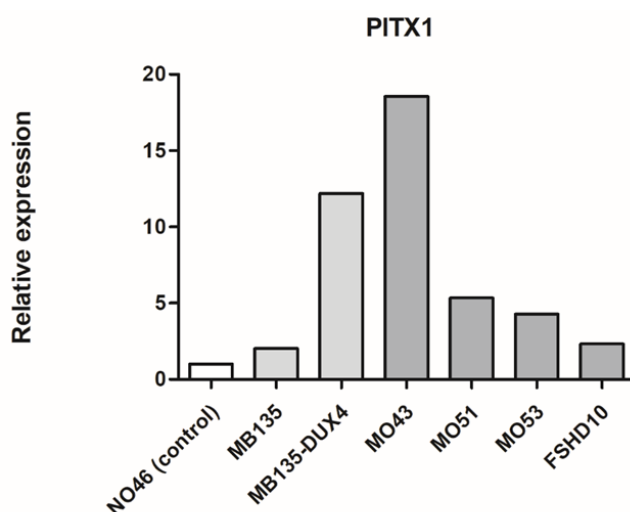


Рисунок 1.12 - Экспрессия PITX1 в первичных культурах миобластов больных МДЛД (MO43-53, FSHD10) и immortalized культурах MB135 и MB135-DUX4. Данные представлены в виде средних значений. За единицу принят уровень экспрессии в первичных миобластах здорового донора (NO46)

PITX1 вовлечен в патогенез МДЛД. Его экспрессия в мышцах мышей приводит к развитию мышечной атрофии [18, 19]. Ранее сообщалось, что PITX1 является прямой транскрипционной мишенью DUX4 [20]. Было также сообщение, ставящее под сомнение такую возможность [21]. Наши данные не проясняют этот аспект, но позволяют предположить, что существует редокс-чувствительный механизм регуляции экспрессии PITX1, и что этот механизм, вероятно, обеспечивает повышение экспрессии PITX1 в клетках с низкоуровневой экспрессией DUX4.

1.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Было исследовано взаимодействие МСК и миобластов в *in vitro* модели ЛПЛМД. Показано, что миобласты от больных доноров стимулируют пролиферацию МСК, а также влияют на синтез и секрецию белков внеклеточного матрикса в норме и в условиях воспаления [22, 23]. С другой стороны, МСК мешают слиянию миобластов и формированию миотубул. Но миобласты с фенотипом ЛПЛМД более чувствительны к присутствию МСК, чем нормальные миобласты. Выявленные взаимные влияния МСК и миобластов расширяют наше представление о клеточных механизмах развития фиброза мышц при ЛПЛМД [24].

Также был проведен транскрипционный анализ нормальных миобластов и миобластов с фенотипом ЛПЛМД, а также миобластов с фенотипом ЛПЛМД, обработанных антиоксидантами. Была выявлена дифференциальная экспрессия 377 генов (199 понижены и 178 повышены). Обработка миобластов MB135-DUX4 антиоксидантами приблизила их транскрипционный профиль к контролю. Количество дифференциально экспрессированных генов в парах MB135 - MB135-DUX4 + Tempol и MB135 - MB135-DUX4 + SkQ1 заметно снизилось по сравнению с контрольной парой MB135 - MB135-DUX4. Суммарно, антиоксиданты приблизили к контролю экспрессию 187 генов. Большинство из них (156 генов) были чувствительны к обоим антиоксидантам, но некоторые были уникальны для SkQ1 (16 генов) и Tempol (15 генов). Методом ПЦР-РВ были подтверждены результаты транскрипционного анализа для гена PITX1. Экспрессия PITX1 в клетках MB135-DUX4 оказалась значительно выше, а при обработке антиоксидантами приближалась к контролю.

Миобласты от больных доноров стимулируют пролиферацию МСК в 1,5 раза по сравнению с миобластиками от здоровых доноров.

- 1) Миобласты от больных доноров по сравнению с миобластами от здоровых доноров стимулируют синтез коллагена и фибронектина в МСК в нормальных условиях, а в условиях воспаления стимулируют секрецию коллагена;
- 2) МСК мешают миогенной дифференцировке миобластов как больных, так и здоровых доноров. Но миобласты от больных доноров более чувствительны к присутствию МСК, чем миобласты от здоровых доноров;
- 3) Транскриптомный анализ миобластов нормальных и с фенотипом ЛПЛМД выявил дифференциальную экспрессию 377 генов (199 понижены и 178 повышены). Обработка миобластов с фенотипом ЛПЛМД антиоксидантами позволяет нормализовать их транскрипционный профиль;
- 4) Верификация результатов транскриптного анализа для группы генов металлотионеинов и ген P1TX1 методом ПЦР-РВ показала, что экспрессия генов металлотионеинов динамична и вариабельна. Результаты для гена P1TX1 были подтверждены методом ПЦР-РВ;
- 5) Экспрессия P1TX1 в клетках с экспрессией DUX4 значительно выше контрольных миобластов. Обработка миобластов с экспрессией DUX4 антиоксидантами приводила к снижению уровня экспрессии P1TX1.

1.5 СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Deenen J.C., Arnts H., van der Maarel S.M., Padberg G.W., Verschuuren J.J., Bakker E., Weinreich S.S., Verbeek A.L., van Engelen B.G. Population-based incidence and prevalence of facioscapulohumeral dystrophy // *Neurology*. -2014. –Vol. 16, № 83 - P. 1056 - 1059.
2. Tawil R., van der Maarel S.M., Tapscott S.J. Facioscapulohumeral dystrophy: the path to consensus on pathophysiology//*Skelet Muscle*. –2014. -Vol. 10, № 4 - P. 12.
3. Hørslev S, Ørngreen MC, Hertz JM, Vissing J, Krag TO Muscle regeneration and inflammation in patients with facioscapulohumeral muscular dystrophy // *Acta Neurol Scand*. - 2013. – Vol. 128. – P. 194 – 201.
4. Tasca G, Pescatori M, Monforte M, Mirabella M, Iannaccone E, Frusciante R, Cubeddu T, Laschena F, Ottaviani P, Ricci E. Different molecular signatures in magnetic resonance imaging-staged facioscapulohumeral muscular dystrophy muscles // *PLoS One* m – 2012. Vol. 7(6):e38779. doi: 10.1371/journal.pone.0038779.
5. Frisullo G, Frusciante R, Nociti V, Tasca G, Renna R, Iorio R, Patanella AK, Iannaccone E, Marti A, Rossi M, Bianco A, Monforte M, Tonali PA, Mirabella M, Batocchi AP, Ricci E. CD8(+) T cells in facioscapulohumeral muscular dystrophy patients with inflammatory features

- at muscle MRI // J Clin Immunol. – 2011. - Apr;31(2). - P. 155 - 66. doi: 10.1007/s10875-010-9474-6.
6. Dahlqvist JR, Andersen G, Khawajazada T, Vissing C, Thomsen C, Vissing J. Relationship between muscle inflammation and fat replacement assessed by MRI in facioscapulohumeral muscular dystrophy // J Neurol - 2019.- May;266(5). – P. 1127 -1135. doi:10.1007/s00415-019-09242-y.
 7. Tasca G, Monforte M, Corbi M, Granata G, Lucchetti D, Sgambato A, Ricci E. Muscle Microdialysis to Investigate Inflammatory Biomarkers in Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy // Mol Neurobiol – 2018.- Apr;55(4). – P. 2959 - 2966. doi: 10.1007/s12035-017-0563-x.
 8. Uezumi A, Fukada S, Yamamoto N, Takeda S, Tsuchida K. Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle // Nat Cell Biol. – 2010. - Feb;12(2). – P. 143 - 52. doi: 10.1038/ncb2014.
 9. Klimczak A, Kozłowska U, Kurpisz M. Muscle Stem/Progenitor Cells and Mesenchymal Stem Cells of Bone Marrow Origin for Skeletal Muscle Regeneration in Muscular Dystrophies // Arch Immunol Ther Exp (Warsz) - 2018. - Oct;66(5). – P. 341 - 354. doi:10.1007/s00005-018-0509-7.
 10. Sciorati C, Clementi E, Manfredi AA, Rovere-Querini P. Fat deposition and accumulation in the damaged and inflamed skeletal muscle: cellular and molecular players // Cell Mol Life Sci – 2015. - Jun;72(11). – P. 2135 - 56. doi:10.1007/s00018-015-1857-7.
 11. Turki A., Hayot M., Carnac G., et al. Functional muscle impairment in facioscapulohumeral muscular dystrophy is correlated with oxidative stress and mitochondrial dysfunction // Free Radical Biology & Medicine – 2012. – Vol. 53(5). - P. 1068 – 1079. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.06.041.
 12. Passerieux E., Hayot M., Jausse A., Carnac G., Gouzi F., Pillard F., Picot M.C., Böcker K., Hugon G., Pincemail J., Defraigne J.O., Verrips T., Mercier J., Laoudj-Chenivesse D. Effects of vitamin C, vitamin E, zinc gluconate, and selenomethionine supplementation on muscle function and oxidative stress biomarkers in patients with facioscapulohumeral dystrophy: a double-blind randomized controlled clinical trial // Free Radic Biol Med. - 2015. - Vol. 81. - P. 158 - 169.
 13. Laoudj-Chenivesse D., Carnac G., Bisbal C., Hugon G., Bouillot S., Desnuelle C., Vassetzky Y., Fernandez A. Increased levels of adenine nucleotide translocator 1 protein and response to oxidative stress are early events in facioscapulohumeral muscular dystrophy muscle // J Mol Med (Berl). - 2005. - Vol. 83, № 3 - P. 216 - 224.

14. Denny AP, Heather AK. Are Antioxidants a Potential Therapy for FSHD? A Review of the Literature // *Oxid Med Cell Longev* – 2017. – 2017:7020295. doi: 10.1155/2017/7020295.
15. Jagannathan S., Shadle S.C., Resnick R., Snider L., Tawil R.N., van der Maarel S.M., Bradley R.K., and Tapscott S.J. Model systems of DUX4 expression recapitulate the transcriptional profile of FSHD cells // *Hum. Mol. Genet.* - 2016. - Vol. 25, № 20 - P. 4419 - 4431.
16. Love MI., Huber W. & Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 // *Genome Biol* – 2014. – Vol. 15, № 550. URL: <http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13059-014-0550-8> (дата обращения 2019-11-25).
17. Wang J, Vasaikar S, Shi Z, Greer M & Zhang B WebGestalt 2017: a more comprehensive, powerful, flexible and interactive gene set enrichment analysis toolkit. // *Nucleic Acids Research.* – 2017. - Vol. 45. - P. 130 – 137. URL: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkx356> (дата обращения 2019-11-25).
18. Pandey SN, Cabotage J, Shi R, Dixit M, Sutherland M, Liu J, Muger S, Harper SQ, Nagaraju K & Chen Y-W Conditional over-expression of PITX1 causes skeletal muscle dystrophy in mice // *Biol. Open* 1 – 2012. – № 1. - P. 629 – 639. URL: <http://bio.biologists.org/cgi/doi/10.1242/bio.20121305> (дата обращения 2019-11-25).
19. Pandey SN, Lee YC, Yokota T & Chen YW Morpholino treatment improves muscle function and pathology of Pitx1 transgenic mice // *Mol. Ther.* – 2014. – Vol. 22. – P. 390 – 396.
20. Dixit M, Ansseau E, Tassin A, Winokur S, Shi R, Qian H, Sauvage S, Mattéotti C, Van Acker AM, Leo O, Figlewicz D, Barro M, Laoudj-Chenivresse D, Belayew A, Coppée F & Chen YW DUX4, a candidate gene of facioscapulohumeral muscular dystrophy, encodes a transcriptional activator of PITX1 // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 2007. - Vol. 104. - P. 18157 - 18162.
21. Zhang Y, Lee JK, Toso EA, Lee JS, Choi SH, Slattery M, Aihara H & Kyba M DNA-binding sequence specificity of DUX4 // *Skelet. Muscle* - 2016. - Vol. 6, № 8 URL:<http://www.skeletalmusclejournal.com/content/6/1/8> (дата обращения 2019-11-25).
22. Сербина О.О., Киселева Е. В. Васецкий Е. С. Миобласты от доноров с ЛЛПМД стимулируют МСК к профибротической активности. // XVIII Конференция-школа с международным участием «Актуальные проблемы биологии развития»: сборник тезисов. - 2019. - С. 88.
23. Сербина О.О., Киселева Е. В. Васецкий Е. С. МСК способствуют профибротическим изменениям мышечной ткани при ЛЛПМД. // IV Национальный

конгресс по регенеративной медицине, Гены и клетки – 2019. - Т. XIV, Приложение. - С. 210.

24. Dib C., Zakharova V., Popova E., Kiseleva E.V., Chernyak B.V., Lipinski M., Vassetzky Y.S. DUX4 Pathological Expression: Causes and Consequences in Cancer // Trends in Cancer - 2019. DOI: 10.1016/j.trecan.2019.03.001.

1.6 ОТЧЕТНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО РАЗДЕЛУ

1. Dib C., Zakharova V., Popova E., **Kiseleva E**, Chernyak B, Lipinski M., **Vassetzky Y.S.** DUX4 Pathological Expression: Causes and Consequences in Cancer//Trends in Cancer. – 2019. – Vol. 5(5). – P. 268 - 271. DOI: 10.1016/j.trecan.2019.03.001. (WoS, Scopus) – Q1.

РАЗДЕЛ 2 РАЗРАБОТКА БИМЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ КОРРЕКЦИИ СИМПТОМОВ БУЛЛЕЗНОГО ЭПИДЕРМОЛИЗА, ОСНОВАННОЙ НА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ АУТОЛОГИЧНЫХ КЛЕТОК

2.1 ВВЕДЕНИЕ

Врожденный буллезный эпидермолиз (ВБЭ) – это гетерогенная группа редких генодерматозов, при которых наблюдается высокая чувствительность к небольшим механическим воздействиям. Клинически заболевание проявляется в виде появления пузырей и эрозий, возникающих на коже и слизистых оболочках после незначительной травмы или даже без нее. Эти поражения возникают вследствие генетически обусловленных дефектов структурных белков кожи, обеспечивающих интраэпидермальные или дермоэпидермальные связи [1]. К основным типам ВБЭ относят простой буллезный эпидермолиз (ПБЭ), пограничный буллезный эпидермолиз (ПоБЭ) и дистрофический буллезный эпидермолиз (ДБЭ); последний подразделяется на доминантный ДБЭ (ДДБЭ) и рецессивный ДБЭ (РДБЭ). Отдельно выделяют синдром Киндлер [2].

Для каждого из типов болезни были выявлены гены, мутации в которых ответственны за приобретение фенотипа ВБЭ. В настоящее время известно, как минимум 18 генов структурных белков кожи и более 1000 мутаций в них, ассоциированных с развитием клинических проявлений того или иного типа ВБЭ [3, 4, 5]. Для обеих форм ДБЭ – это повреждения гена COL7A1, кодирующего коллаген VII типа (C7), для ПоБЭ – это мутации генов, вовлеченных в образование ламинина 322 и интегрина $\alpha 6\beta 4$, а также гена COL17A1, для ПБЭ – повреждения генов KRT5 и KRT14, а также PLEC.

Эффективной терапии больные ВБЭ не получают в силу генетической природы данного заболевания [6]. Однако в настоящее время появляются методы, позволяющие подойти ближе к решению вопроса об эффективном и доступном лечении ВБЭ [7]. Основные исследуемые варианты терапии ВБЭ можно условно разделить на две группы стратегий – *ex vivo* и *in vivo*. Стратегия *ex vivo* включает в себя культивирование первичных клеточных линий, полученных из биоптатов кожи больного, генетическую коррекцию культивируемых клеток и аутологичную трансплантацию трансгенного эквивалента кожи. Важным условием успеха функциональной терапии является наличие в первичных культурах эпидермальных стволовых клеток, поскольку генетическая коррекция этих клеток имеет решающее значение для обеспечения долговременного терапевтического эффекта от аутологической трансплантации. Получение иПСК из соматических дифференцированных клеток кожи больных обеспечивает неограниченный ресурс для последующей генетической модификации, дифференцировки и пополнения

популяции генетически корреktированных клеток. Генетическая терапия аутологичных клеток пациентов с ВБЭ может быть выполнена с помощью разных методов. Наиболее перспективные из них – замещение гена с помощью вирусов, редактирование генов с помощью программируемых нуклеаз и РНК-терапия. Коррекция мутаций предполагает доставку экзогенной кассеты, модифицирующей ген, в клетки-мишени. Низкая эффективность доставки генетического материала в клетки является важным фактором, ограничивающим эффективность методов функциональной терапии *ex vivo*. По способу доставки методы делятся на группы, использующие вирусные системы и невирусные искусственные векторные системы.

В связи с редкостью заболевания и гетерогенностью его проявлений, клинические испытания новых способов лечения сильно затруднены, а животные модели дороги и обладают низкой воспроизводимостью результатов на людях. В такой ситуации различные клеточные модели обладают преимуществом, т.к. создаются из клеток человека, позволяют создавать персонализированный подход и получать статистически достаточное количество данных при сравнительно небольших затратах. Использование immortalized клеточных линий позволяет упростить процедуру культивирования и повысить воспроизводимость результатов, что особенно важно на первых этапах разработки новых методов лечения. Используемая в данной работе линия immortalized кератиноцитов человека HaCaT является хорошо известной и изученной. Данные клетки во многом отражают свойства базальных кератиноцитов, что позволяет использовать их в качестве модельного объекта. Полученные в данной работе линии HaCaT с мутациями в гене *krt5* показывают свойства сходные с теми, что были показаны для кератиноцитов полученных от больных ПБЭ. Такая модель позволит в будущем оценивать свойства разрабатываемых генетических конструкций, методов их доставки в клетки и эффективность исправления мутаций, перед тем как использовать их на сильно ограниченном донорском материале.

2.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.2.1 Создание модели ПБЭ в HaCaT. Врожденный БЭ принадлежит к группе неизлечимых генодерматозов, единственная доступная терапия, применяемая в настоящее время является симптоматическим лечением. В связи с этим использование генетической терапии с применением программируемых нуклеаз (TALEN доменов и систем CRISPR/Cas9) открывает новые перспективы создания эффективного лечения этой группы заболеваний

Культуры клеток. В работе на данном этапе мы использовали immortalized кератиноциты человека HaCaT RT3. Клетки содержались в CO₂-инкубаторе с 5% CO₂ при 37°C и насыщающей влажности. В качестве культуральной среды использовалась DMEM/F12 (ПанЭко) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (HyClone), 1% GlutaMAX (Gibco) и 1% смеси антибиотиков PenStrep (Gibco). Для культивирования использовалась культуральная посуда фирмы Corning. Пассирование осуществлялось с применением раствора Версена (ПанЭко) и раствора Трипсин-ЭДТА (Gibco).

Клонирование направляющих РНК. В экспериментах по редактированию krt5 мы использовали 4 разные специфические гидовые РНК (sgRNA), комплементарные фрагментам седьмого экзона krt5, предварительно проверенные на модели клеток, стабильно экспрессирующих Cas9, и соответствующие фрагментам нуклеотидной последовательности данного экзона krt5. С помощью онлайн ресурса crispr.mit.edu были выбраны следующие последовательности синтетических олигонуклеотидов для получения специфических направляющих РНК:

Направляющая РНК 1: agctggccctggacgtgga

Направляющая РНК 2: cagcagcttgcggttaagt

Направляющая РНК 3: cctccagcagcttgcggttaagt

Направляющая РНК 4: gccacttaccgcaagctgc

Для получения нокаута (KO) по krt5 мы использовали 5 разных специфических гидовых РНК:

Направляющая РНК KO1: CACACTTGACTGGCGAGACA

Направляющая РНК KO2: TCCTCACCTCTGGATGCTG

Направляющая РНК KO3: AGTGCTGATGGATATCCTCT

Направляющая РНК KO4: AGGATATCCATCAGCACTAG

Направляющая РНК KO 5: AAGTGTGTCCTCCGGAGCG

Из них наибольшую активность показали KO1 и KO5.

Для геномного редактирования использовали нуклеазу spCas9.

Используемые плазмиды:

pSpCas9-IRES-EGFP (Evrogen)

pLentiCRISPRv2 GFP

pSpCas9n(BB)-2A-EGFP (Addgene #48140)

pU6-sgRNA

pAL2-T (Evrogen)

Культура клеток и трансфекция. Для временной трансфекции клеток использовали липофекцию с помощью липофектамина 2000 и 3000 (Thermo Fisher Scientific) и электропорацию на приборе MicroPulserElectroporator (Bio-Rad).

Проточная цитофлюорометрия. Для отбора трансфицированных клеток использовали метод проточной цитофлюорометрии, отбирая EGFP+ клетки, поскольку плазмиды с Cas9 содержали также ген, кодирующий EGFP. Отобранные клоны мы выращивали до получения 10^6 клеток и анализировали на эффективность процесса редактирования. Отдельно проводили отбор единичных клонов методом предельных разведений.

Молекулярно-генетические методы анализа

1) Выделение геномной ДНК. Геномную ДНК выделяли с помощью стандартного метода экстракции фенол хлороформом и последующим осаждением изопропаноловым спиртом.

2) Полимеразная цепная реакция. Состав реакционной смеси: матрица – 100 нг; праймеры (10 мМ) – по 0,5 мкл; 10хПЦР буфер (100 мМ KCl, 200 мМ Трис-HCl, pH 8,8, 100 мМ (NH₄)₂SO₄; 0,1% Triton X-100) – 2 мкл; смесь dNTP (10 мМ каждого) – 0,5 мкл; Taq-полимераза (5 ед./мкл) – 0,5 мкл; MilliQ H₂O – до 20 мкл.

Амплификацию проводили на термоциклере S1000 (Bio-Rad) с использованием следующей программы – предварительная денатурация 95°C, 30 с, далее от 20 до 30 циклов (в зависимости от задачи): 1. Денатурация 95°C, 10 с 2. Отжиг праймеров, 30 с 3. Элонгация 72°C, 60 с/1 т.п.н.

Анализ эффективности редактирования.

1) Идентификация мутаций. Для идентификации мутаций (делеций и инсерций) выделяли геномную ДНК из смеси клонов, полученных из суммарной популяции клеток, прошедших стадию отбора на проточном цитофлюориметре. Проводили амплификацию с помощью набора ПЦР ScreenMix (Евроген) по протоколу производителя. Использовали олигонуклеотидные праймеры, специфические к krt5: gaaactcagaaggagacacc; aagtcactgatctcatgtatgtgtg.

2) Качественный анализ активности системы CRISPR/Cas9 в целевых сайтах. Анализ с помощью эндонуклеазы I фага T7 проводили, как описано ранее [8]. Продукт ПЦР денатурировали при 95°C, затем снижали температуру до 25°C со скоростью 0,3°C/с. Образовавшиеся гетеродуплексы подвергали гидролизу с помощью эндонуклеазы I фага T7 (T7 Endonuclease I, New England Biolabs, M0302S). Результаты анализа оценивали с помощью электрофореза в 3% агарозном геле.

После селекции отдельных клонов методом предельных разведений (требовалось от 2 до 4 недель роста в культуральных плашках), выделяли ДНК и анализировали как описано выше.

3) Секвенирование ДНК. Секвенирование образцов ДНК некоторых выборочных клонов проводили методом Сэнгера после клонирования фрагментов ДНК в вектор pALT2. Мы использовали также анализ с помощью высокопроизводительного секвенирования HiSeq. на приборе Illumina. Было получено более 300000 прочтений и произведен биоинформатический анализ с помощью пакета программ CRISPResso.

Поиск пограничных стрессовых условий культивирования. Для создания стрессового воздействия на сеть промежуточных филаментов использовали осмотический шок. Для поиска границы стрессовых условий был проведен скрининг восстановления сети цитокератина 5 в клетках НАСАТ “дикого типа” после воздействия гиперосмотическим раствором мочевины в течении 5 минут в диапазоне концентраций от 200 мМ до 5 М и временем релаксации от 5 минут до 4 часов.

Оценка миграционной активности. Для оценки миграционной активности клеток НАСАТ использовали тест на заживление раны. Для этого на 96-луночное плато с плоским дном высаживали клетки в количестве, необходимом для образования монослоя, в равном количестве между группами, и по четыре повторности в каждой группе. После прикрепления клеток к пластику путем механического воздействия создавали полосу без клеток в центре лунки. Далее плато переносили в инкубационную камеру автоматического микроскопа и съемку “раны” производили каждый час на протяжении двух суток. Полученные в результате фотографии заживления раны обрабатывали полуавтоматически с помощью программы ImageJ Wound Healing Tool и полученные данные анализировались с применением статистических методов в программе OriginLab.

Иммуноцитохимическое окрашивание. Для иммуноцитохимического анализа клетки фиксировали 10% формалином по стандартному протоколу. Окраска антителами производилась по стандартному протоколу в соответствии с рекомендациями производителя антител. В работе использовались антитела против цитокератина 5 (Abcam, ab207351), антитела против белка Cas9 (Sigma-Aldrich, SAB4200701) и ядерный краситель DAPI (Biotium, 40011)

Микроскопическое исследование. Микроскопический анализ препаратов и фотографирование производилось с помощью конфокального микроскопа Zeiss LSM 800 и автоматического микроскопа EVOS FL Auto.

2.2.2 Создание ЖЭК из клеток с мутациями моделирующими ПБЭ. В специальные подставки для мультилуночных культуральных плат, позволяющих разделить пространство лунки на два компартмента с помощью полупроницаемой мембраны, высаживались иммортализованные человеческие фибробласты. Фибробласты культивировались в течение недели для создания дермального эквивалента. На поверхность этого дермального эквивалента высаживались полученные ранее HaCaT несущие мутации моделирующие ПБЭ, после чего среда в верхней камере убиралась и клетки оставляли расти в течение двух недель в жидкостно-воздушной системе. В конце этого срока ЖЭК фиксировали и получали гистологические срезы методом криотомии. Далее производили окраску срезов гематоксилин-эозином или иммунофлуоресцентными маркерами.

2.2.3 Отбор пациентов с врожденным буллезным эпидермолизом (ВБЭ) простого типа. Для секвенирования выделяли ДНК из образцов периферической крови, полученной у данной группы людей. ДНК выделяли по стандартным протоколам с помощью фенол-хлороформовой экстракции, без очищения на колонках. Анализ проводился на секвенаторе IlluminaNextSeq500 методом парно-концевого чтения. Для обработки результатов секвенирования использовали сборку последовательностей человеческого генома hg38, базы данных “1000 геномов”, а также OMIM, HGMD и ClinVar.

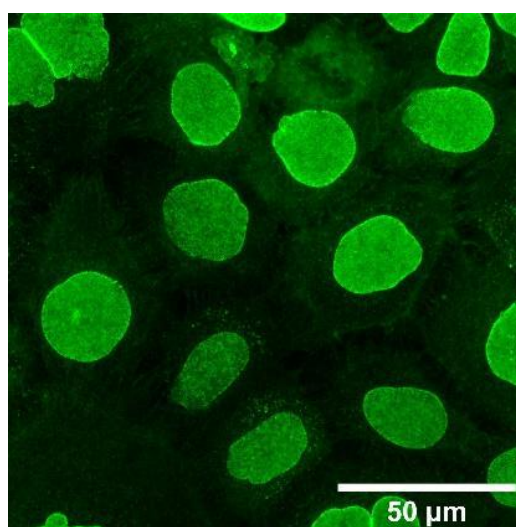
2.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

2.3.1 Целью данной работы была разработка модельной системы ВБЭ с нарушенной сетью цитокератинов, а также с полным её отсутствием. Мы использовали CRISPR/Cas9 систему для введения двуцепочечных разрывов в ДНК, получение инсерций и делеций (indels) в гене *krt5* происходило за счет функционирования механизма NHEJ в клетках. Клетки HaCaT RT3 были выбраны в качестве модели, поскольку они легко культивируются и трансфецируются, экспрессируют цитокератины базального слоя кожи (в частности, KRT5), способны к образованию 3D структур подобных многослойным эквивалентам кожи. Для направленного введения изменений мы выбрали экзон 7 гена *krt5*, точнее его фрагмент, содержащий консервативный мотив аминокислот KLLEGE, а для получения нокаута экзон 1 гена *krt5*.

Геномное редактирование проводили с помощью трансфекции плазмидами, содержащими Cas9, и плазмидами, кодирующими направляющие РНК. После трансфекции и отбора клеток с помощью проточной цитофлуорометрии смесь клонов анализировали на наличие фенотипических изменений в паттернах экспрессии цитокератина 5 с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания. Анализ выявил

наличие в смеси клеток с агрегацией цитокератина 5 в нормальных условиях. Данные клетки были выделены методом предельных разведений в гомогенные линии и заново проанализированы иммунофлуоресцентным анализом, а также отсекуированы для установления природы мутаций. Миграционная активность данных клеток была оценена в сравнении с нормальными HaCaT. Получение и отбор нокаутных клеток производили по такой же схеме.

Редактированием генома с помощью системы CRISPR/Cas9 были получены линии клеток с «нокаутом» *krt5*, *krt5*(-/-). Вопрос о том, можно ли использовать в данном случае термин «нокаут» является дискуссионным, поскольку в геноме данных клеток ген *krt5* присутствует, но внесение однонуклеотидной инсерции делает невозможным его экспрессию. То, что KRT5 в этих клетках не экспрессируется, было показано нами иммуноцитохимической окраской и Вестерн блот-анализом с моноклональными антителами, специфическими к KRT5 человека. Результаты секвенирования этого клона подтвердили инсерцию 1 нуклеотида (insC) после «Старт кодона», кодирующего метионин, транслируемая последовательность мутантного клона состоит из 15 аминокислотных остатков и преждевременного стоп кодона, приводящего к деградации мРНК. Полученная линия HaCaT *krt5*(-/-) моделирует вариант «loss of function» мутации в immortalized кератиноцитах человека и может быть использована в дальнейшем для разработки подходов генетической терапии. Среди мутаций БЭ простого типа была обнаружена такая мутация, которая встречается в природной человеческой популяции и является летальной формой, содержащей нокаут гена *krt5* (рисунок 2.1) [9].



1)
Рисунок 2.1 - Клетки HaCaT с нокаутом цитокератина 5. Иммунофлуоресцентное окрашивание антителами против цитокератина 5. Видна только автофлуоресценция ядер клеток и слабое неспецифическое окрашивание других цитокератинов. Конфокальная микроскопия

Выравнивание аминокислотных остатков KRT5(WT) и пептида, соответствующего «нокаутной» последовательности (Mut).

Mut MSSPVKCVLPERGQS *

WT MSRQSSVSFRSGGSR.....

В результате скрининга условий стрессового воздействия на цитокератиновую сеть в клетках HACAT “дикого типа” были подобраны условия воздействия гиперосмотическим раствором мочевины, приводящие к разрушению цитокератиновой сети во всех клетках без их существенной гибели и открепления от пластика. При определенной концентрации мочевины (1M) спустя 2 часа после воздействия сеть цитокератина 5 восстанавливалась во всех клетках “дикого типа”.

Данные условия стресса были применены к мутантным клеткам HACAT, в которых ранее были обнаружены мутации в *krt5*, но которые не показывали агрегации цитокератина 5 в предыдущих условиях культивирования. В части клеток было обнаружено разрушение цитокератиновой сети, что показало гетерогенность популяции. При этом мутантный белок накапливался в предположительно мембранных структурах, чего ранее не наблюдалось в других линиях мутантных HACAT.

Таким образом, мы получили инструмент, которым можно быстро и удобно выявить наличие даже небольших нарушений в способности цитокератинов к восстановлению после стресса (рисунок 2.2).

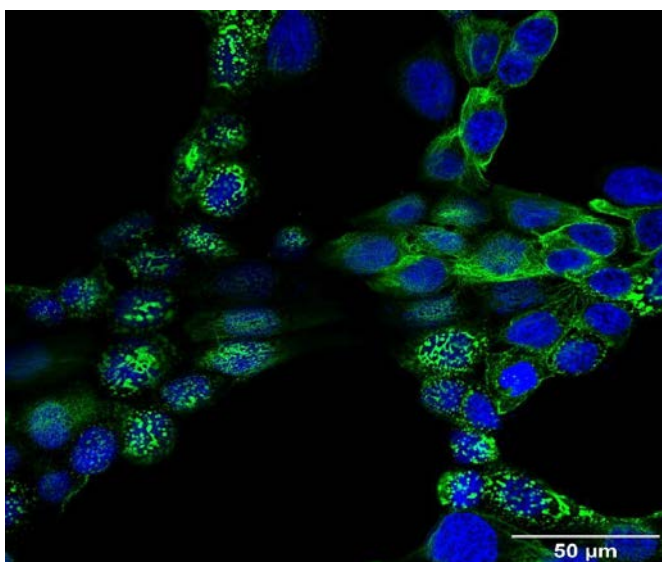


Рисунок 2.2 - Результат применения оптимизированных условий осмотического стресса. В клетках, где ранее не наблюдалась агрегация цитокератина 5, выявлен новый паттерн распределения мутантного цитокератина 5 после стресса, а также выявлена гетерогенность популяции, которая показывает наличие в популяции клеток “дикого типа” с нормально восстановившейся сетью цитокератина 5. Иммунофлуоресцентное окрашивание антителами против цитокератина 5 (зеленый) и DAPI (синий). Конфокальная микроскопия

При повторном анализе полученных ранее библиотек HAcAT после редактирования экзона 7 гена *krt5* с целью внесения мутаций, характерных для ПБЭ, в них были обнаружены клетки, показывающие агрегацию цитокератина 5 в интерфазных клетках при нормальных условиях культивирования. При секвенировании по Сэнгеру были выявлены как инсерции, так и делеции в той области гена, которая подвергалась редактированию с помощью системы CRISPR/Cas9. Данные клетки были отобраны из библиотек и уже в качестве гомогенных клонов заново проанализированы иммунофлуоресцентной окраской на цитокератин 5 и мутации в отобранных клонах были подтверждены секвенированием. Все мутации были гетерозиготные, наличие фенотипических проявлений свидетельствовало о доминантном характере проявлений данных мутаций. Данные секвенирования, а именно “контекст” в области мутации, легли в основу разработки стратегии коррекции генетических нарушений, то есть выбора метода геномного редактирования для устранения конкретной мутации (рисунок 2.3).

Данные клетки были заражены лентивирусом, несущим кДНК для экспрессии белка Cas9 под лентивирусным промотором, для последующей генетической коррекции данных клеток (рисунок 2.4). Такие клетки являются удобной модельной системой для генотерапии, т.к. обладают четким фенотипическим признаком. Мутации, приводящие к агрегации цитокератинов, позволяют создать в будущем модели ПБЭ с прижизненной визуализацией нарушений сети промежуточных филаментов. Модели могут быть использованы как для изучения особенностей патологического процесса, так и для скрининга терапевтических препаратов ПБЭ. Геномное редактирование на данной модели, как подход к генотерапии, также может быть использовано для проверки эффективности различных систем на основе CRISPR/Cas9 для лечения генодерматозов.

Выравнивание аминокислотных остатков фрагмента 2В домена KRT5(WT-”дикий тип”) и его мутантных вариантов (MUT1 и MUT2), обнаруженных в клонах HAcAT, показывающих агрегацию в нормальных условиях:

```
WT  MARLLREYQELMNTKLALDVMARLLREYQELMNTKLALDVEIATYRKLLGEEEC
MUT1 MARLLREYQELMNTKLALDVMARLLREYQELMNTKLALDVEIATYRKLPGGRG
MUT2 MARLLREYQELMNTKLAWPWTWRSPLTASC..... LEGEEC
```

На схеме красным обозначены инсерции, пробелами - делетированные участки последовательности.

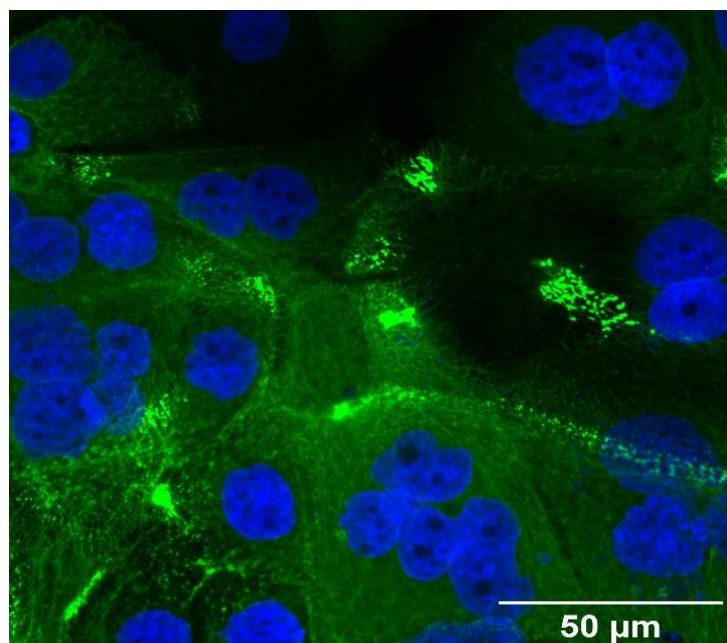


Рисунок 2.3 - Клетки HaCaT с мутацией в гене цитокератина 5 приводящей к образованию агрегатов цитокератина 5 в интерфазных клетках в нормальных условиях культивирования. Иммунофлуоресцентное окрашивание антителами против цитокератина 5 (зеленый) и DAPI (синий). Конфокальная микроскопия

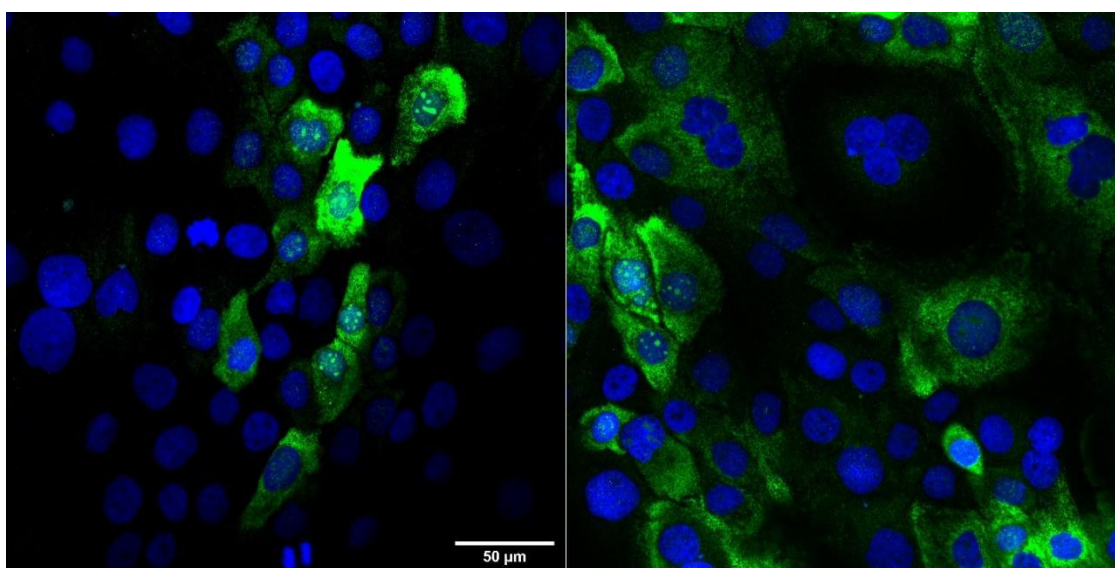


Рисунок 2.4 -Иммуноцитофлуоресцентное окрашивание антителами против Cas9 (зеленый) и DAPI (синий) клеток HaCaT «дикого типа» (слева) и несущих мутацию в гене KRT5 (справа) до проведения селекции. Сейчас данные клетки получены в виде гомогенных постоянных линий

Для кератиноцитов, полученных от пациентов с ПБЭ, было показано увеличение скорости миграции в культуральных условиях [10]. Для проверки наличия данного свойства у полученных нами клонов HaCaT, мы использовали тест на ранозаживление. Было проанализировано более 10 клонов, несущих мутации в гене *krt5*, однако, только последние обнаруженные нами клоны, показывающие агрегацию цитокератина 5 в нормальных условиях культивирования, показали статистически значимые отличия в

сравнении в клетками HaCaT “дикого типа” вне зависимости от числа пройденных пассажей (рисунок 2.5). Обнаружение данного функционального признака у полученных нами мутантных клеток подтверждает пользу HaCaT как модельной системы для ПБЭ, и позволит более полно оценивать восстановление функции цитоскелета после проведения редактирования мутаций [11].

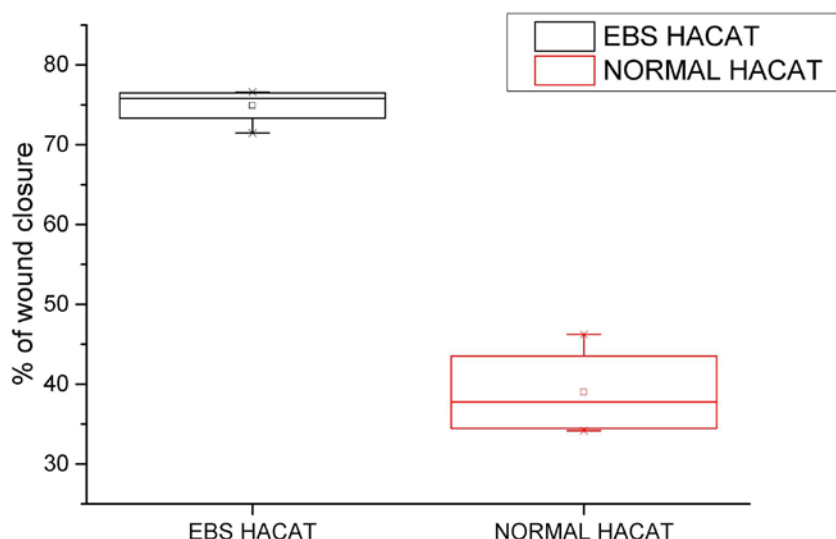


Рисунок 2.5 - Оценка миграционной активности мутантного клона HaCaT с мутацией в гене *ltr5* в сравнении с клетками HaCaT “дикого типа”. Использование U-критерия Манна — Уитни показывает, что различия между двумя выборками значимы (P-value = 0,02857)

2.3.2 По результатам проведенных ранее экспериментов было принято решение об отказе от использования коллагенового геля, т.к. его применение приводило к неоднородности ЖЭК, что ограничивает его применение для анализа. Также была использована культуральная среда другого состава.

В результате из HaCaT “дикого типа” удалось получить ЖЭК толщиной 8-10 слоёв (ранее было 5-6 слоёв). Однако протокол нуждается в совершенствовании, т.к. фибробласты, образующие дермальный эквивалент, практически не видны на срезах. При этом их наличие желательно для более наглядной визуализации области базальной мембраны (рисунки 2.6 и 2.7)

ЖЭК из HaCaT, моделирующих ПБЭ, также был успешно получен и по морфологии сопоставим с ЖЭК из HaCaT “дикого типа”, хотя можно отметить заметное снижение уровня экспрессии цитокератина 5 в мутантных клетках в сравнении с “диким типом”. Агрегация цитокератина 5 в клетках заметна при прямом наблюдении в микроскоп, однако, плохо передается при фотосъемке вследствие плотного расположения клеток в ЖЭК и малой величины агрегатов. Необходимо в дальнейшем разработать

методику для лучшей визуализации нарушений цитокератиновой сети в клетках в составе ЖЭК.

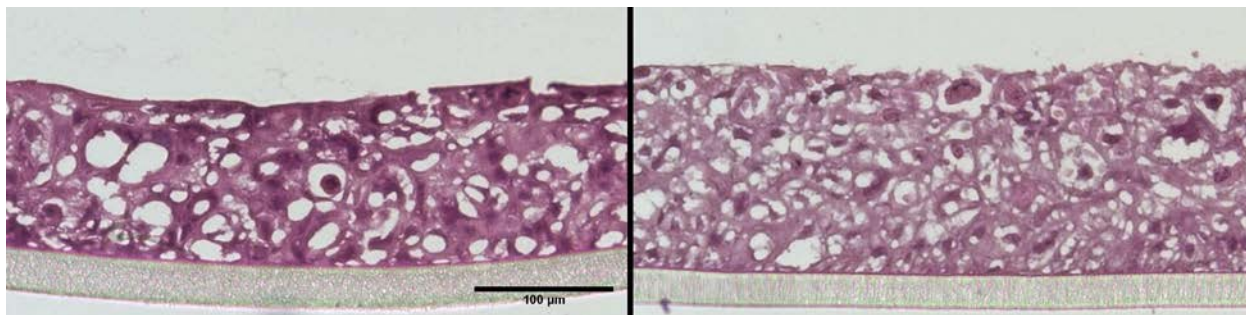


Рисунок 2.6 - ЖЭК из клеток NaCaT “дикого типа” (слева) и моделирующих ПБЭ (справа).
Окраска гематоксилин-эозин. Световая микроскопия

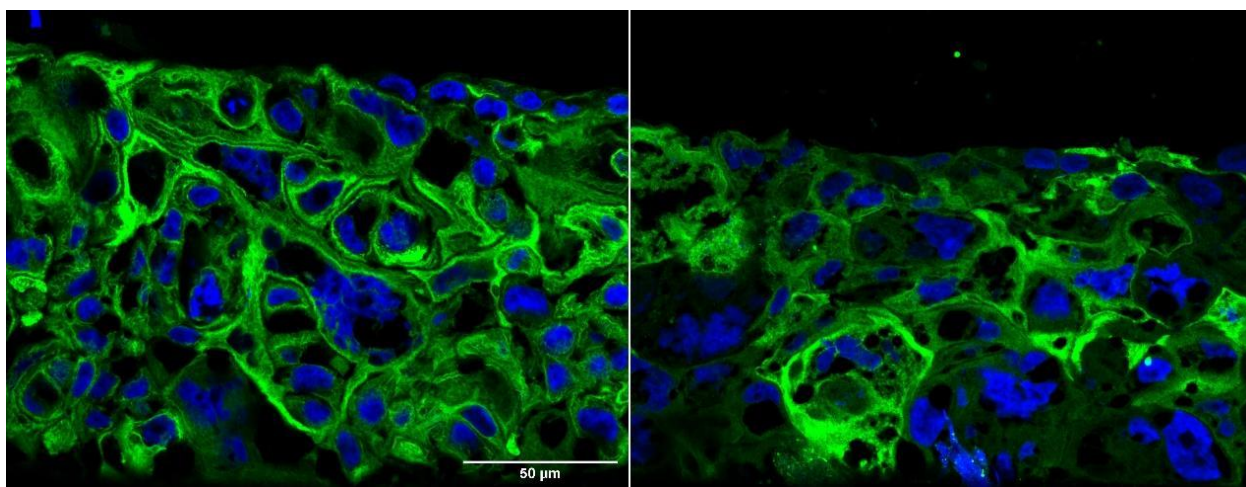


Рисунок 2.7 - ЖЭК из клеток NaCaT “дикого типа” (слева) и моделирующих ПБЭ (справа).
Окраска антителами против цитокератина 5 (зеленый) и ядерным красителем DAPI (синий).
Конфокальная микроскопия

2.3.3 Предварительный диагноз был установлен на основе визуального осмотра пациентов и был неточным, т.к. предполагали RDEB, рецессивную форму дистрофического буллезного эпидермолиза.

Для секвенирования отобрали образцы ДНК четырех человек, членов семьи, в которой родился ребенок с ВБЭ. Было проведено полноэкзомное секвенирование на базе 20000 генов. Был выявлен описанный ранее как патогенный вариант нуклеотидной последовательности в экзоне 1 krt14 [12]. Для оценки клинической релевантности использовали базы данных OMIM, база данных по патогенным вариантам HGMD. По совокупности сведений выявленный вариант нуклеотидной последовательности с миссенс-мутацией c.356T>C (p.Met119Thr) следует расценивать как патогенный, являющийся причиной заболевания. Было получено несколько клеточных культур [13].

2.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1) Полученные линии HaCaT с нокаутом гена *krt5* являются удобной моделью для дальнейших исследований ПБЭ, а также моделируют недавно открытые реальные случаи ПБЭ.

2) Новые мутантные линии HaCaT показывают четкие фенотипические изменения в структуре сети цитокератинов в интерфазных клетках при нормальных условиях культивирования, что позволяет легко отличать мутантные клетки от клеток дикого типа.

3) Клетки HaCaT с нарушенной сетью цитокератина 5 в нормальных условиях показывают значительное увеличение скорости миграции в сравнении с нормальными клетками HaCaT, что является признаком, характерным для кератиноцитов, получаемых от пациентов с ПБЭ.

4) Мы получили трехмерную модель ПБЭ в условиях *in vitro*, которая будет полезна для дальнейшего анализа различных вариантов терапии ПБЭ.

5) Проведенное исследование позволило установить точный диагноз простой формы ВБЭ, выявить возникновение установленной патологической мутации *de novo*, подтвердить отсутствие данной мутации у родителей и родной сестры больного ребенка, определить доминантный характер наследования данной мутации.

2.5 СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Has C., Bruckner-Tuderman L. The genetics of skin fragility // Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. – 2014. – Vol. 15. – P. 245–268.
2. Fine J.D., Eady R.A., Bauer E.A. et al. The classification of inherited epidermolysis bullosa (EB): report of the third international consensus meeting on diagnosis and classification of EB // J. Am. Acad. Dermatol – 2008. - Vol. 58, № 6 - P. 931 – 950.
3. Uitto J., Bruckner-Tuderman L., Christiano A.M., McGrath J.A., Has C., South A.P., Kopelan B., Robinson E.C. Progress toward treatment and cure of epidermolysis bullosa: Summary of the DEBRA international research symposium EB2015 // J. Invest. Dermatol – 2016. - Vol. 136, № 2 - P. 352 – 358.
4. Lee J.Y.W., Liu L., Hsu C.K., Aristodemou S., Ozoemena L., Ogboli M., Moss C., Martinez A.E., Mellerio J.E., McGrath J.A. Mutations in KLHL24 add to the molecular heterogeneity of epidermolysis bullosa simplex // J. Invest. Dermatol – 2017. - Vol. 137, № 6 - P. 1378 – 1380.
5. McGrath J.A. Recently identified forms of epidermolysis bullosa // Ann. Dermatol -2015. - Vol. 27. - P. 658 – 666.

6. Cohn H.I., Teng J.M. Advancement in management of epidermolysis bullosa // Curr. Opin. Pediatr – 2016. - Vol. 28, № 4 - P. 507 – 516.
7. Mavilio F., Pellegrini G., Ferrari S., Di Nunzio F., Di Iorio E., Recchia A., Maruggi G., Ferrari G., Provasi E., Bonini C., Capurro S., Conti A., Magnoni C., Giannetti A., De Luca M. Correction of junctional epidermolysis bullosa by transplantation of genetically modified epidermal stem cells // Nat. Med – 2006. - Vol. 12, № 2 - P. 1397 – 1402.
8. Deepak Reyon, Shengdar Q. Tsai, Cyd Khayter, Jennifer A. Foden, Jeffry D. Sander, and J. Keith Joung. FLASH Assembly of TALENs Enables High-Throughput Genome Editing // Nat Biotechnol - 2012 May; 30(5): 460–465.
9. Vahidnezhad H, Youssefian L, Daneshpazhooh M, Mahmoudi H, Kariminejad A, Fischer J, Christiansen J, Schneider H, Guy A, Liu L, McGrath JA, Has C, Uitto J. Biallelic KRT5 mutations in autosomal recessive epidermolysis bullosa simplex, including a complete human keratin 5 "knock-out". // Matrix Biol - 2019 Oct;83:48-59.
10. Marina Spörrer, Ania Prochnicki, Regine C. Tölle, Alexander Nyström, Philipp R. Esser, Melanie Homberg, Ioannis Athanasiou, Eleni Zingkou, Achim Schilling, Richard Gerum, Ingo Thievensen, Lilli Winter, Leena Bruckner-Tuderman, Ben Fabry, Thomas M. Magin, Jörn Dengjel, Rolf Schröder, and Dimitra Kiritsi. Treatment of keratinocytes with 4-phenylbutyrate in epidermolysis bullosa: Lessons for therapies in keratin disorders.// EBioMedicine -. 2019 Jun; 44: 502–515.
11. Beilin A., Gurskaya N., Vorotelyak E. Establishing a model of epidermolysis bullosa simplex via CRISPR/Cas9 editing in HaCaT cells // FEBS OPEN BIO. - 2019. - Vol. 9. - Is. 1. - P-25 - 008. - P. 237. WOS:000486972403125. (WoS) – Q4.
12. Shemanko CS, Mellerio JE, Tidman MJ, Lane EB, Eady RA. Severe palmo-plantar hyperkeratosis in Dowling-Meara epidermolysis bullosa simplex caused by a mutation in the keratin 14 gene (KRT14). // J Invest Dermatol - 1998, Nov; 111(5):893-5.
13. Beilin A., Evtushenko N., Murashkin N., Savostyanov K., Fisenko A., Ambarchyan E., Vorotelyak E., Gurskaya N. The new cell cultures from dystrophic epidermolysis bullosa patients in Russia // Journal of Investigative Dermatology. - 2019. - Vol. 139. - Is. 9. Supl. S. - P. S267 -S267. (WoS) – Q1.

2.6 ОТЧЕТНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО РАЗДЕЛУ

1. **Beilin A.**, Evtushenko N., Murashkin N., Savostyanov K., Fisenko A., Ambarchyan E., **Vorotelyak E.**, Gurskaya N. The new cell cultures from dystrophic epidermolysis bullosa patients in Russia // Journal of Investigative Dermatology. - 2019. - Vol. 139. - Is. 9. Supl. S. - P. S267 -S267. (WoS) – Q1.

2. **Beilin A.**, Gurskaya N., **Vorotelyak E.** Establishing a model of epidermolysis bullosa simplex via CRISPR/Cas9 editing in HaCaT cells // FEBS OPEN BIO. - 2019. - Vol. 9. - Is. 1. - P-25 - 008. - P. 237. WOS:000486972403125. (WoS) – Q4.

РАЗДЕЛ 3. РАЗРАБОТКА НОВОЙ БИМЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ ЛЕЧЕНИЯ ТРАВМЫ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ НЕРВОВ, ОСНОВАННОЙ НА ИСПОЛЬЗОВАНИИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА

3.1 ВВЕДЕНИЕ

Повреждение периферических нервов верхних и нижних конечностей является одним из самых распространенных и тяжелых видов травм. Этот тип травмы может привести к длительной потере работоспособности с высокой частотой хронической нетрудоспособности пострадавшего. В настоящее время существует несколько подходов к лечению повреждения периферических нервов. При незначительных травмах выполняется микрохирургическое сшивание нервов. Принципы тонкой микрохирургии периферического нерва были независимо описаны Курцем и Смитом в 1964 году и стали «золотым стандартом» [1]. Эти принципы по-прежнему актуальны и чаще всего применяются в медицинской практике, но их нельзя использовать в случае протяженных травм. В таких случаях предпочтительным методом лечения является аутологическая трансплантация нерва, однако, такой подход имеет ряд недостатков. Это требует двойного хирургического вмешательства и приводит к потере чувствительности донорских тканей. Кроме того, часто возникают осложнения из-за образования рубцов и процессов дегенерации пересаженного нерва. Следовательно, необходимо искать другие способы лечения таких повреждений, а также способы длительного поддержания регенерации нервов после трансплантации. Потенциальными подходами является тканевая инженерия и клеточная терапия. На данный момент существует значительное разнообразие кондуитов (сосудистых протезов) для имплантации. Кондуиты можно разделить на две группы: биологического происхождения и созданные на основе синтетических материалов [2]. К первой группе относятся децеллюляризированные нервы и мышцы, вены, фибрин и коллаген. Вторая группа включает силикон, полигликолевую кислоту, гидрогель поливинилового спирта и т.д. [2]. Кроме того, кондуиты могут быть разделены на биоразлагаемые и нет. Однако использование полых кондуитов также имеет ограничение. В клинической практике полые кондуиты применяются только для восстановления нервов малого диаметра с повреждением менее 3 см [3]. Более того, есть данные, которые показывают, что полые кондуиты имеют более низкий регенеративный потенциал, чем аутоотрансплантат [2]. Но другие исследования показали, что хитозановые полые кондуиты, используемые для восстановления периферических нервов, имели те же результаты, что и трансплантат аутологичного нерва [4]. Другой подход заключается в использовании кондуитов в качестве носителя для различных типов клеток. Таким образом, можно использовать культуры собственных шванновских клеток, однако этот

подход требует вырезания здорового нерва у пациента и длительного культивирования клеток. Альтернативой является использование различных стволовых клеток, таких как мезенхимальные стволовые клетки из разных источников, нейральные стволовые клетки и клетки-предшественники, стволовые клетки нервного гребня и т.д. Было показано, что использование этих клеток может привести к значительным улучшениям и даже к функциональному восстановлению [5]. Однако, несмотря на результаты, проблема лечения повреждений периферических нервов все еще сохраняется, и необходимо изучать развитие имплантированных клеток и их влияние на регенерацию. Хорошо известно, что фетальные нейральные стволовые клетки являются «золотым стандартом» в области нейротрансплантации, когда мы говорим о центральной нервной системе [6]. В настоящее время цельные фрагменты фетального неокортекса и спинного мозга редко используются для восстановления поврежденных периферических нервов, и мало что известно об их взаимодействии с тканью реципиента и их судьбе после имплантации. Однако они являются интересным объектом для сравнения с другими типами клеток. Следует отметить, что в экспериментах с фетальной нервной тканью цельные фрагменты или клеточная суспензия непосредственно вводятся в нервы [7, 8, 9]. Мы предполагаем, что клеточная имплантация для регенерации нервов является более перспективным инструментом, если используется как часть трехмерной биоинженерной конструкции (кондуита).

Целью данного проекта является разработка новой биомедицинской технологии лечения травмы периферических нервов, основанной на использовании стволовых клеток различного генеза.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Отработка модели травмы периферического нерва;
2. Разработка биоинженерной конструкции, состоящей из кондуита и клеточного материала;
3. Проведение анализа эффективности данной технологии при имплантации в поврежденный нерв *in vivo*.

3.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.2.1 Животные и получение ткани. Все протоколы, манипуляции с животными одобрены комиссией по биоэтике ИБР им. Н.К. Кольцова РАН в соответствии с правилами лабораторной практики в РФ (приказ МЗ РФ от 19.06.2003г. №267). Исследование проводили на мышах C57Bl/6 и трансгенных гетерозиготных мышах C57BL/6-Tg (ACTB-EGFP)10sb/J (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine, USA). Для

получения датированной беременности к самкам линии C57Bl/6 подсаживали самца линии C57Bl/6-Tg (ACTB-EGFP)^{1osb/J}. Утро обнаружения вагинальной пробки было обозначено как E0.5. Ткань неокортекса эмбрионов GFP мышей была получена на стадии E19.5, ткань спинного мозга на стадии E14.5.

3.2.2 Получение желатинового гидрогеля. Желатиновый гидрогель получали путем смешивания раствора глутарового альдегида и желатина из свиной кожи (Sigma), затем заливали в форму вокруг иглы 21G и обезвоживали в течение ночи. После этого кондуиты промывали большим количеством деионизированной воды и помещали в PBS с гентамицином (25 мкг/мл). Диаметр просвета канала кондуита составлял 0,8 мм, а толщина стенки 0,4 мм. Кондуиты были разрезаны на фрагменты длиной 5 мм.

3.2.3 Имплантация. Взрослых мышей C57Bl/6 ($n = 24$) анестезировали внутрибрюшинной инъекцией хлоралгидрата (Sigma-Aldrich, США, 300 мг/кг). Иммуносупрессия не проводилась. Рабочая поверхность была выбрита, и был вскрыт правый седалищный нерв. Животные были рандомно распределены по следующим пяти группам. 1) Группа «Cortex» ($n = 5$). В кондуит инъецировали фетальный неокортекс мышей. Нерв перерезали, и его концы помещали в кондуит на 1мм с каждой стороны. Швы не накладывали. 2) Группа «Spin» ($n = 5$). Процедура была такой же, за исключением того, что инъецировали фетальный спинной мозг. 3) Группа "Tube" ($n = 5$). Процедура была такой же, но канал кондуита был пустым. 4) Группа «Control» ($n = 5$). Нервы просто перерезали, а кончики оставляли друг перед другом. 5) Группа "Sham" ($n = 4$). Нервы были обнажены, но не перерезаны (рисунок 3.1). После операции вводили кетопрофен (5 мг на кг). Через восемь недель после операции мышей умерщвляли путем внутрибрюшинного введения смертельной дозы хлоралгидрата (Sigma-Aldrich, США).

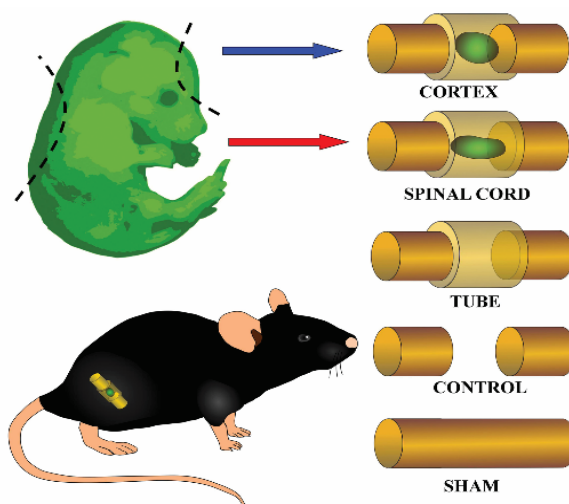


Рисунок 3.1. - Схема эксперимента. Выделяли фрагмент неокортекса или спинного мозга эмбриона GFP мыши и помещали в желатиновый гидрогелевый кондуит после чего имплантировали в разрезанный нерв взрослой мыши

3.2.4 Иммуногистохимия. Нервы удаляли и после фиксировали в 4% параформальдегиде в 0,1 М PBS в течение 24 часов, трижды промывали PBS и переносили в 30% сахарозу на PBS. Продольные серийные срезы толщиной 14 мкм были получены с помощью криостата (Leica CM1900). На каждый нерв приходилось по 6 срезов, расположенных на расстоянии 98 мкм друг от друга. Срезы инкубировали в течение часа при комнатной температуре в блок-растворе: смесь 5% нормальной козьей сыворотки (Sigma-Aldrich®), 0,3% Triton x-100 (Triton®) и 0,01 М PBS (pH 7,4). Затем срезы инкубировали в течение ночи при + 4°C в смеси блок-раствора и первичных антител. Использовали следующие антитела: Anti-Neurofilament heavy polypeptide (rabbit polyclonal, 1: 200, Abcam), anti-GFP antibodies (chicken polyclonal, 1:500, Molecular Probes), Anti-S100 (rabbit polyclonal, 1: 500, Abcam), anti-Doublecortin (rabbit polyclonal, 1: 500, Abcam), anti-NeuN (rabbit polyclonal, 1: 500, Abcam), anti-Myelin basic protein (rabbit polyclonal, 1: 800, Abcam). Затем срезы промывали и инкубировали в течение двух часов в смеси 0,3% Triton x-100 (Triton®), 0,01 М PBS (pH 7,4) и следующих различных вторичных антител: Goat Anti-Chicken IgY H & L (Alexa Fluor® 488, 1: 600, Abcam), Goat Anti-Rabbit IgG H & L (Alexa Fluor® 594, 1: 600, Abcam). Срезы промывали PBS и ядра окрашивали путем инкубации в течение 10 минут при комнатной температуре в растворе DAPI (2 мкг/мл, Sigma). Гистологические микрофотографии были получены с помощью флуоресцентного микроскопа BZ-9000E (Keyence, Япония).

3.2.5 Оценка плотности нервных волокон. Для оценки плотности нервных волокон на продольных срезах был предложен следующий метод. Изображения продольных срезов с положительной иммуногистохимической реакцией к NF, были разделены на зоны: проксимальная часть нерва «prox», проксимальная часть трубки «tr», средняя часть трубки «t_mid», дистальная часть трубки «td», дистальная часть нерва «dist». Используя ImageJ, среднее значение серых пикселей было измерено в десяти областях каждой зоны и проанализировано.

3.2.6 Оценка мышечной массы. Икроножные мышцы мышей вырезали и взвешивали. Оценивали отношение веса икроножной мышцы здоровой конечности и поврежденной.

3.2.7 Оценка функционального восстановления. Восстановление двигательной функции оценивали с помощью анализа ходьбы по специальной дорожке через 2, 5 и 8 недель после операции на основе протокола, описанного Inseeta [9].

3.2.8 Статистический анализ. Данные представлены в виде среднего $\pm$ SE. Сравнения в нескольких группах анализировали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и ANOVA с вложенными данными, с последующим

post hoc тестом Тьюки. Статистический анализ был выполнен с использованием программного обеспечения R studio. Значение p , менее 0,05, считалось значимым д.

3.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.3.1 Клетки фетального неокортекса могут переживать до 8 недель и дифференцироваться. Для анализа закономерностей развития трансплантатов фетальной нервной ткани и их регенеративных эффектов после повреждения нерва был проведен следующий эксперимент. Целые фрагменты неокортекса или спинного мозга эмбриона GFP-мыши вводили в желатиновые гидрогелевые кондуиты, которые соединялись с концами перерезанного седалищного нерва (см. методы). Гистологическое и микроскопическое исследование нервов проводили через 8 недель после операции. Срастание нерва произошло во всех группах. Кондуиты были заключены в капсулу из соединительной ткани. Клетки GFP⁺ были обнаружены только в группе «Cortex», преимущественно в части нерва перед кондуитом. Можно предположить, что донорские клетки мигрировали из трансплантата ткани (рисунок 3.2). Клетки образовывали группы и имели отростки. Клеток трансплантата спинного мозга обнаружено не было. Иммуногистохимическое исследование показало, что единичные клетки экспрессировали NF и NeuN, что характерно для стадии E19,5. Большая часть клеток дифференцировалась в глиальном направлении, что подтверждается иммуногистохимическим окрашиванием на GFAP и S100 β . Мы не обнаружили DCX и MBP положительных клеток. Интересно, что мы обнаружили не только сосуды в нервах, но и то, что некоторые клетки экспрессировали α SMA (рисунок 3.3).

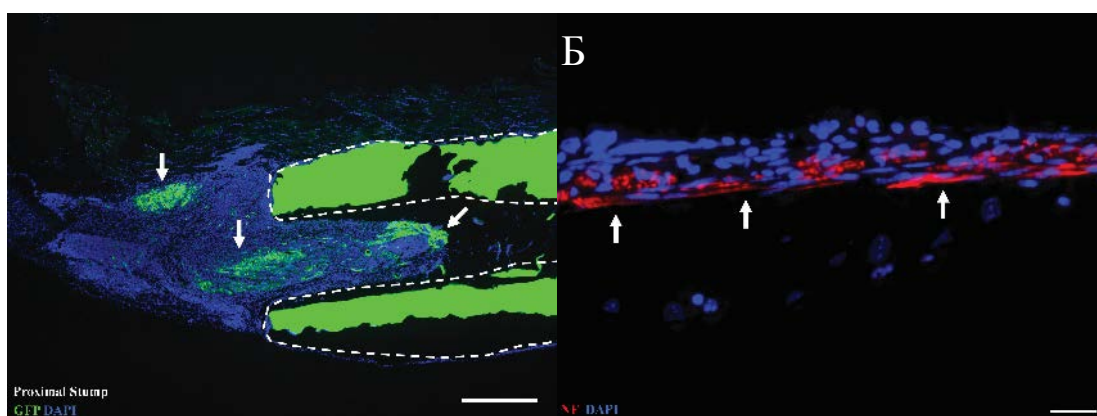


Рисунок 3.2 – А: GFP⁺ клетки фетального неокортекса мыши, мигрирующие в проксимальный участок нерва. Масштабный отрезок: 500 мкм. Б: нервные волокна с положительной иммуногистохимической реакцией к NF, прорастающие через соединительнотканную капсулу, окружающую кондуит. Масштабный отрезок: 20 мкм

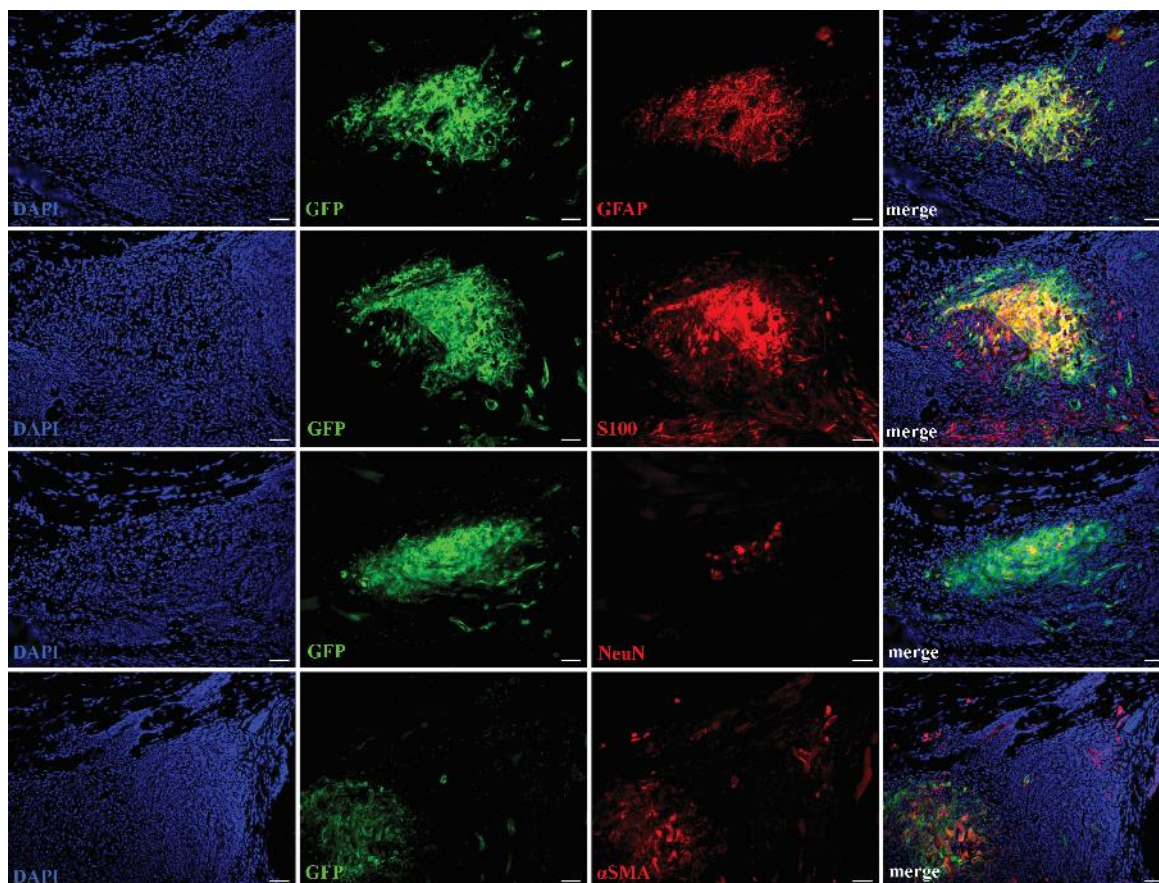


Рисунок 3.3 - Дифференцировка GFP⁺-клеток фетального неокортекса мыши через 8 нед после имплантации. Клетки дифференцировались в астроциты (GFAP⁺, S100β⁺), нейроны (NeuN⁺), некоторые клетки были положительны к маркеру сосудов αSMA⁺. Масштабный отрезок: 50 мкм

3.3.2 Желатиновый гидрогелевый конduit играет роль моста для прорастающих нервов. Мы обнаружили, что нервные волокна реципиента прорастают через конduit, что подтверждается иммуногистохимическим окрашиванием к NF. Интересный факт, что волокна были выявлены и в соединительнотканной оболочке вокруг кондуита (рисунок 3.2). Высокая экспрессия маркера S100β подтвердила, что в регенерирующем через конduit нерве множество шванновских клеток (рисунок 3.4). Также мы обнаружили слабую экспрессию MBP.

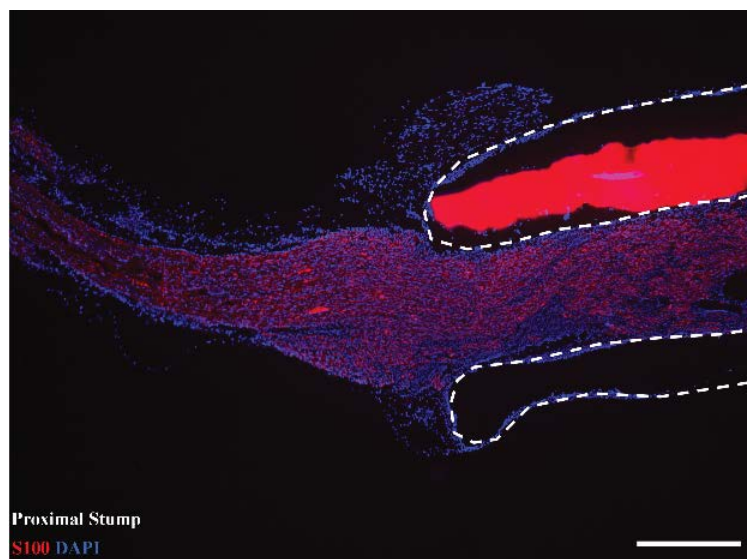


Рисунок 3.4. - Шванновские клетки в прорастающем через конduit нерве. Конduit отмечен пунктиром. Масштабный отрезок: 500 мкм

3.3.3 Плотность нервных волокон возрастает по мере прорастания через конduit.

Для оценки регенерации нерва исследовали плотность прорастающих нервных волокон. Для этого оценивали значение серых пикселей (gray value) в следующих зонах: проксимальная часть нерва, проксимальная часть кондуита, средняя область кондуита, дистальная область кондуита, дистальная область нерва. В группе с пустым кондуитом была достоверная разница между частью в кондуите и за его пределами ($p < 0,0005$). В других группах распределение плотности было более сложное, но сохранением основной тенденции увеличения плотности волокон в кондуите (рисунок 3.5).

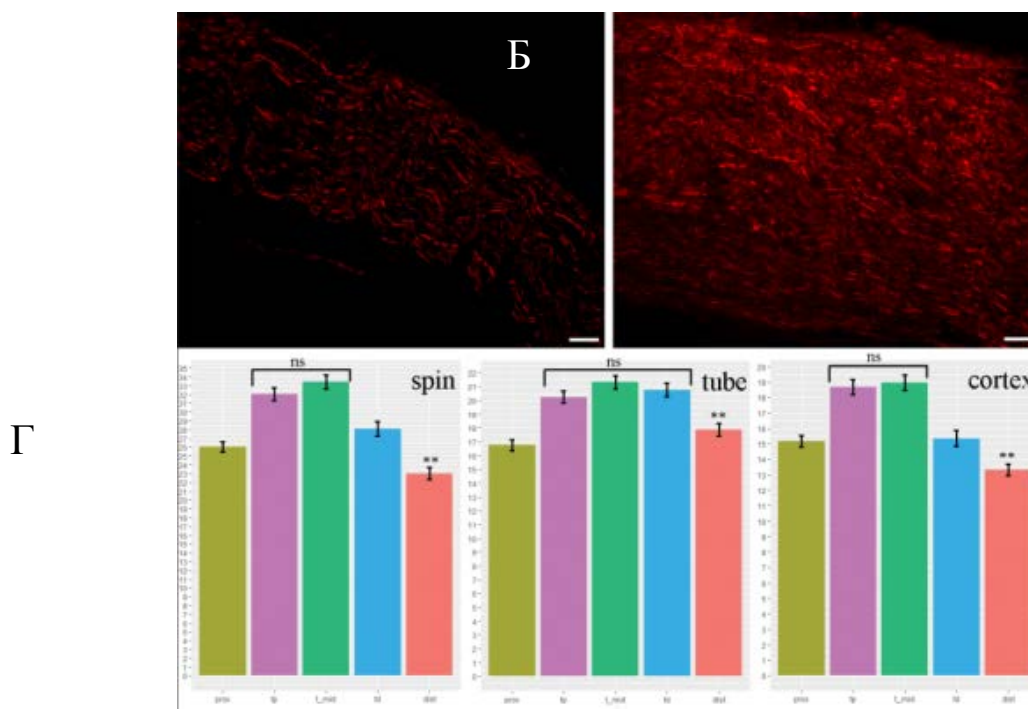


Рисунок 3.5 - Низкая (А) плотность нервных волокон в нерве за пределами кондуита и высокая (Б) в кондуите. Масштабный отрезок: 50 мкм. Г: количественный анализ, достоверно подтверждающий разницу между плотностью в различных участках. $**p \leq .0005$

3.3.4 Фетальная нервная ткань не восстанавливает мышечную атрофию. Для оценки мышечной атрофии взвешивали икроножные мышцы через 8 недель после операции. Была выявлена достоверная разница между ложнооперированными мышцами и остальными группами ($p > 0.0005$). Однако конduit и нервная ткань не повлияли на мышечную атрофию (рисунок 3.6).

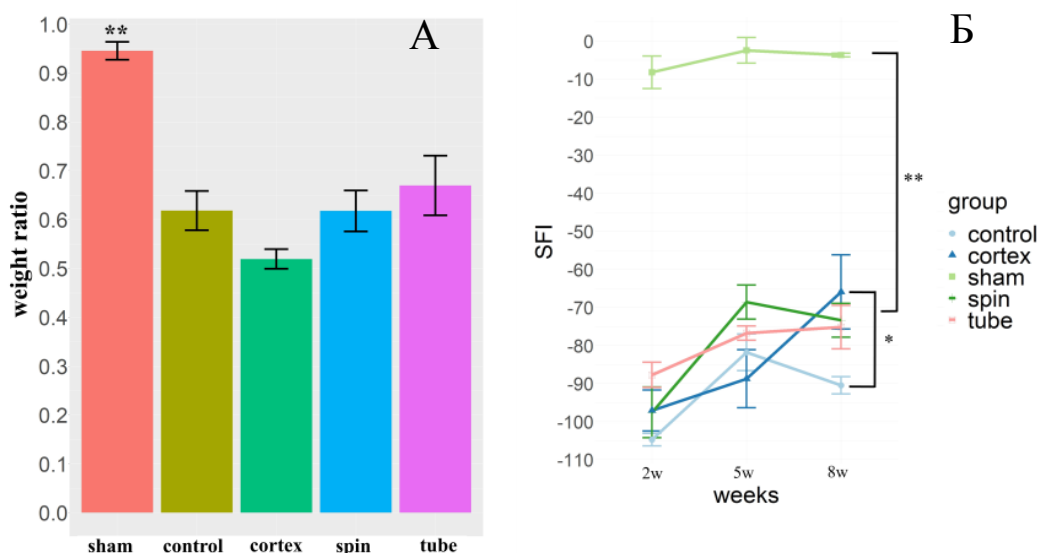


Рисунок 3.6. - А: имплантация биоинженерной конструкции не приводит к изменению атрофии икроножной мышцы. Б: Индекс седалищного нерва свидетельствует о функциональном восстановлении в случае трансплантации биоинженерной конструкции. $*p \leq .05$, $**p \leq .0005$

3.3.5 Биоинженерная конструкция может стимулировать функциональное восстановление. Для исследования функционального восстановления использовали оценку функции седалищного нерва (SFI) через 3,5 и 8 недель (рисунок 3.6). Для этого анализировали походку мышей. Ложно оперированные мыши отличались статистически достоверно на протяжении всего эксперимента ($p < 0,0001$). В других группах разница появилась только через 8 недель после операции. Группа "Cortex" достоверно отличалась от контрольной группы.

3.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе проведена разработка биоинженерного кондуита и оценка возможности его применения. Были сделаны следующие выводы:

- 1 На основе желатинового гидрогеля разработан конduit, который не отторгается через 8 недель после имплантации.
- 2 Перерезанные нервные волокна прорастают через конduit.

3 Конduit может быть носителем клеток нервной ткани. Клетки эмбрионального неокортекса, но не спинного мозга, обнаруживаются через 8 недель после трансплантации.

4 Трансплантированные клетки дифференцируются преимущественно в глиальном направлении.

5 Плотность волокон в кондуите выше, чем за его пределами.

6 Биоинженерная конструкция стимулирует функциональное восстановление. Можно предположить, что это связано с паракринным действием трансплантированных клеток.

Результаты данной работы были опубликованы в рецензируемых научных журналах. [11,12].

3.5 СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Grinsell D., Keating CP. Peripheral nerve reconstruction after injury: a review of clinical and experimental therapies// *BioMed Res Int* – 2014; 698256. DOI: 10.1155/2014/698256
2. Daly W., Yao L., Zeugolis D., Windebank A., Pandit A. A biomaterials approach to peripheral nerve regeneration: bridging the peripheral nerve gap and enhancing functional recovery// *J R Soc Interface*. – 2012. – Vol. 9, № 67 – P. 202 – 21
3. de Ruiter G.C., Malessy M.J., Yaszemski M.J., Windebank A.J., Spinner R.J. Designing ideal conduits for peripheral nerve repair// *Neurosurg Focus*. – 2009 – Vol. 26, №2:E5. DOI: 10.3171/FOC.2009.26.2.E5.
4. Shapira Y., Tolmasov M., Nissan M. et al. Comparison of results between chitosan hollow tube and autologous nerve graft in reconstruction of peripheral nerve defect: An experimental study // *Microsurgery*. – 2016. – Vol. 36, №8 – P. 664 – 671. DOI: 10.1002/micr.22418.
5. Gonzalez-Perez F., Hernández J., Heimann C., Phillips J.B., Udina E., Navarro, X. Schwann cells and mesenchymal stem cells in laminin- or fibronectin- aligned matrices and regeneration across a critical size defect of 15 mm in the rat sciatic nerve // *JNeurosurg Spine*. – 2018. - Vol. 28, №1 – P. 109 – 118. DOI: 10.3171/2017.5.SPINE161100
6. Fricker R.A., Kuiper J.H., Gates M.A. Transplanting intact donor tissue enhances dopamine cell survival and the predictability of motor improvements in a rat model of Parkinson's disease // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7, № 10 e47169. DOI: 10.1371/journal.pone.0047169.
7. Xiong G., Ozaki N., Sugiura Y. Transplanted embryonic spinal tissue promotes severed sciatic nerve regeneration in rats // *Arch HistolCytol*. – 2009. – Vol. 72, № 2. – P. 127 – 38.

8. Petrova ES. Neurons with Different Neurotransmitters in Embryonic Neocortical Allografts in the Rat Sciatic // Nerve. *Izv Akad Nauk. Ser Biol.* – 2016. - № 2. - P. 128 - 35.
9. Petrova ES., Isaeva EN. Effect of embryonic anlage allografts of the rat spinal cord on growth of regenerating fibers of the recipient nerve // *IzvAkadNaukSer Biol.* – 2014. - № 6 – P. 549 - 56.
10. Inserra MM., Bloc, DA., Terris DJ. Functional indices for sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the mouse // *Microsurgery.* – 1998. – Vol. 18, №2 – P. 119 - 24.
11. Sukhinich K., Dashinimaev E., Vorotelyak E., Aleksandrova M. Fetal nervous tissue grafts injected in gelatin hydrogel conduits promote peripheral nerve regeneration // *FEBS OPEN BIO.* – 2019. - Vol. 9. - Is. 1. - P. 25-010. - P. 237. WOS:000486972403127. (WoS) – Q4.
12. Sukhinich K.K., Dashinimaev E.B., Vorotelyak E.A., Aleksandrova M.A. Regenerative effects of solid neural tissue grafts located in gelatin hydrogel conduit for treatment of peripheral nerve injury // *Human Gene Therapy.* – 2019. – Vol. 30. – Is. 11. A135-A135. P395. WOS:000495173100381. (WoS) – Q1-Q2.

3.6 ОТЧЕТНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО РАЗДЕЛУ

1. **Sukhinich K., Dashinimaev E., Vorotelyak E., Aleksandrova M.** Fetal nervous tissue grafts injected in gelatin hydrogel conduits promote peripheral nerve regeneration // *FEBS OPEN BIO.* – 2019. - Vol. 9. - Is. 1. - P. 25-010. - P. 237. WOS:000486972403127. (WoS) – Q4.
2. **Sukhinich K.K., Dashinimaev E.B., Vorotelyak E.A., Aleksandrova M.A.** Regenerative effects of solid neural tissue grafts located in gelatin hydrogel conduit for treatment of peripheral nerve injury // *Human Gene Therapy.* – 2019. – Vol. 30. – Is. 11. A135-A135. P395. WOS:000495173100381. (WoS) – Q1-Q2.

РАЗДЕЛ 4. ФОРМИРОВАНИЕ МЕДИАТОРНОГО РАЗНООБРАЗИЯ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ НЕРВНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

4.1 ВВЕДЕНИЕ

Нейрогенез – многоступенчатый процесс развития нейронов из клеток предшественников. Наиболее активно нейрогенез протекает в эмбриональном периоде, когда формируются все типы нейронов организма, тем не менее, он продолжается в течение раннего постнатального периода, а также и во взрослом мозге. В качестве клеток предшественников выступают мультипотентные НСК, которые способны к самообновлению и к дифференцировке в различные типы клеток, такие как нейроны, астроциты и олигодендроциты. Нейрогенез млекопитающих активно изучается до сих пор, и еще очень многое остается неясным. В связи большим числом нейродегенеративных заболеваний человека, которые все чаще начинают развиваться уже в молодом возрасте, и необходимостью разработки подходов к лечению травм центральной и периферической нервной системы, потребность в исследовании механизмов нейрогенеза человека возрастает. Поскольку изучение нейрогенеза человека затруднено по этическим причинам, были разработаны различные подходы к моделированию нейрогенеза *in vitro* и *in vivo*, нацеленные на детальное изучение определенных этапов или процессов нервной системы. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) – стволовые клетки, полученные из соматических клеток взрослого организма путем генетического репрограммирования. При создании определенных условий такие клетки способны дифференцироваться в различные клетки организма, в том числе и в НСК. Такая модельная система предоставляет новые возможности для изучения нейрогенеза, а также молекулярных путей развития нейродегенеративных расстройств, и позволяет создавать инструменты для скрининга лекарственных препаратов. На сегодняшний день существуют несколько протоколов получения НСК и их производных *in vitro* из ИПСК. Эти протоколы в основном используются для получения нейронов от пациентов с различными заболеваниями нервной системы и изучения развития патологии, однако, корректность дифференцировки нейронов *in vitro* должным образом не изучена. Наиболее распространенным способом получения НСК из ИПСК является DUAL SMAD-ингибирование двух сигнальных путей – BMP4 и TGFb-опосредованных сигнальных путей.

Целью данной работы являлось изучение НСК, полученных DUAL SMAD-дифференцировкой из ИПСК в течение длительного времени культивирования (15 пассажей), с целью определения отличий получаемых культур терминально

дифференцированных нейронов, корректности дифференцировки при помощи нескольких независимых методов.

4.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн эксперимента. Целью данной работы является создание модели для изучения нейрогенеза человека *in vitro* на основе ИСПК человека с возможностью регистрации флуоресцентного кальциевого сигнала. Были поставлены следующие задачи:

- 1) получить линии ИСПК, стабильно экспрессирующие GCaMP6;
- 2) дифференцировать полученные линии ИСПК в НСК;
- 3) направить НСК с различной длительностью культивирования в нейральную дифференцировку;
- 4) сравнить нейрогенез в нейральных культурах, полученных от НСК с разной длительностью культивирования;
- 5) протестировать полученную модельную систему на способность визуализации кальциевой активности.

Для разработки модели нейрогенеза *in vitro* с возможностью визуализации кальциевого сигнала планировалось получить НСК из линий ИСПК со встроенным в геном клеток геном флуоресцентного кальциевого индикатора GCaMP6, а затем получить нейроны, экспрессирующие этот белок.

После получения ИСПК, стабильно экспрессирующих GCaMP6, была проведена их дифференцировка в НСК. Далее часть клеток НСК направляли в спонтанную дифференцировку (нейрогенез) на 3-м, 7-м и 11-м пассажах и следили за течением нейрогенеза в развивающихся нейральных культурах, полученных от НСК с разной длительностью культивирования. Производили микросъемку культур в фазовом контрасте и морфологическую оценку клеток на разных этапах дифференцировки, окраску антителами полученных нейральных культур на 14-й день нейрогенеза, а на 21-й – выделение РНК для дальнейшего получения кДНК и оценки уровней экспрессии различных маркерных генов методом ПЦР в реальном времени.

Получение культур клеток, их анализ методами морфологической оценки и иммунофлуоресцентного окрашивания были проведены на первом этапе работы в 2018 г. На втором этапе работы был сделан анализ полученных культур методами ПЦР, методами кальциевого имаджинга и анализ транскриптомов.

Для тестирования модели нейрогенеза на возможность визуализации спонтанной кальциевой активности нейронов, а также их кальциевых ответов на различные стимулы,

проводили цейтраферную флуоресцентную съемку нейральных культур с добавлением различных стимулирующих веществ.

4.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

4.3.1 Определение уровней относительной экспрессии в ИПСК и НСК различных генов методом ПЦР в реальном времени. Уровни экспрессии интересующих нас генов анализировали относительно трех выбранных генов домашнего хозяйства: GAPDH, Actin-beta, PSMB4. Уровень относительной экспрессии генов плюрипотентности *OCT4* и *NANOG* во всех культурах НСК на разных пассажах оказался незначительным, по сравнению с таковой в трансгенных линиях ИПСК, из которых культуры НСК были получены (рисунок 1 А, Б). Из трех линий ИПСК линия №3 имела самый высокий уровень относительной экспрессии исследуемых генов плюрипотентности.

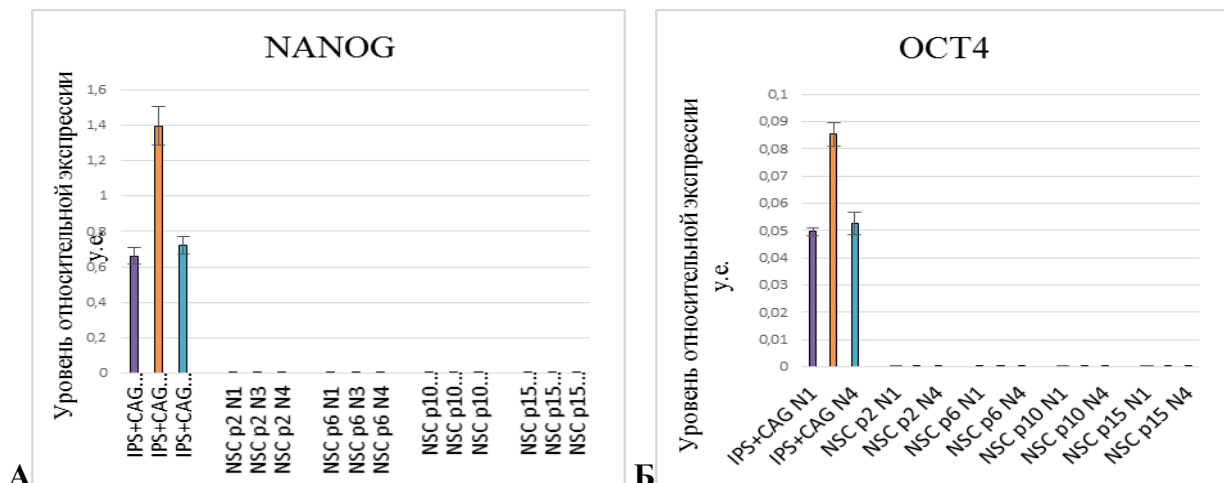


Рисунок 4.1 - Уровень относительной экспрессии генов плюрипотентности в трех линиях трансгенных ИПСК, а также в трех линиях НСК на пассажах 2, 6, 10 и 15. N 1, 3, 4 – номер линии: 1 – желтый, 3 – зеленый, 4 – синий. IP5+CAG – трансгенные линии ИПСК с GCamp6s под промотером CAG. NSC – нейральные стволовые клетки, p – номер пассажа (2, 6, 10, 15)

Динамика изменений уровней относительной экспрессии генов-маркеров нейральных предшественников в трех культурах НСК оказалась несколько различной. В линии НСК №1 гены *PAX6*, *NESTIN*, *MSI1* демонстрировали постепенное снижение уровней экспрессии от 2-го к 15-му пассажу. В НСК №3 только *PAX6*, *NESTIN* показали снижение экспрессии, в то время как экспрессия *MSI1* такой тенденции не продемонстрировала. В линии НСК №4 *NESTIN*, *MSI1* снижались к 15-му пассажу, а *PAX6*, наоборот, повышался. Экспрессия *SOX2* во всех трех линиях имела максимум на 6-м пассаже.

При усреднении данных, полученных от всех трех линий НСК, уровни относительной экспрессии генов *PAX6*, *NESTIN* и *MSI1* в НСК снижались от 2-го к 15-му

пассадам, а экспрессия *Sox2* имела максимум на 6-м пассаже, после чего снижалась (рисунок 4.2 А-Г).

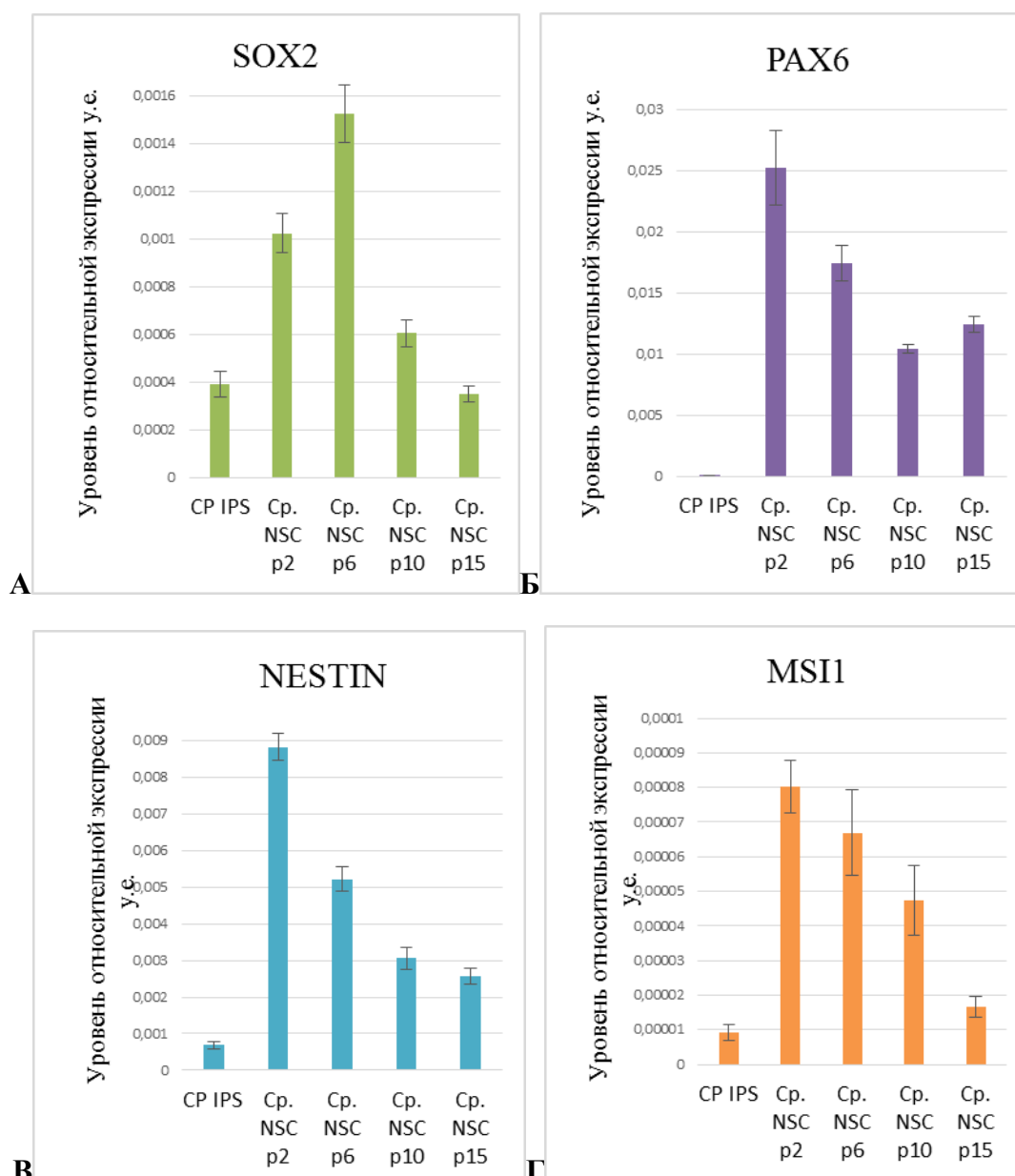


Рисунок 4.2 - Усредненный уровень относительной экспрессии генов-маркеров нейральных предшественников по трем линиям трансгенных ИПСК, а также по трем линиям НСК на пассажах 2, 6, 10 и 15. CP – усредненный уровень экспрессии по трем линиям. IPS – трансгенные линии ИПСК с GCamp6s под промотором CAG. NSC – нейральные стволовые клетки, p – номер пассажа (2, 6, 10, 15)

В результате полученных данных, мы сделали вывод о том, что разные линии ИПСК, как и разные линии НСК, отличались по уровню относительной экспрессии генов-маркеров плюрипотентности и нейральных предшественников. Кроме того, мы наблюдаем тенденцию к снижению экспрессии исследуемых генов с увеличением номера пассажа [1, 2].

4.3.2 Определение уровней относительной экспрессии различных генов методом ПЦР в реальном времени в НСК и нейральных культурах. Поскольку для анализа методом количественного ПЦР мы использовали РНК из НСК, выделенную на 2-м, 6-м и 10-м пассажах, а отправили нервные стволовые клетки в спонтанную дифференцировку на 3-м, 7-м и 11-м пассажах, то образцы НСК получили обозначения p2, p6, p10, а нейральные культуры обозначались как p3, p7, p11.

На 21-й день культивирования нейральные культуры №3 полученные из НСК на разных пассажах, демонстрировали схожий или более высокий уровень экспрессии генов *PAX6*, *NESTIN*, *MSI1* и *SOX2*, чем НСК, из которых они были дифференцированы. При сравнении нейральных культур №3, дифференцированных от НСК 3-го, 7-го и 11-го пассажей, оказалось, что уровень относительной экспрессии гена *PAX6* был минимальным у культуры от 7-го пассажа НСК, тогда как *NESTIN* значительно не изменялся. Экспрессия *MSI1* была максимальной у культуры от 3-го пассажа НСК, а *SOX2* продемонстрировал плавное повышение уровня экспрессии к культуре от 11-го пассажа.

Уровень относительной экспрессии гена *Pax6* во всех нейральных культурах №4 оказался выше, чем в НСК, из которых они были дифференцированы. Однако уровни *NESTIN* и *MSI1* были выше, только в нейральной культуре от 7-го пассажа НСК, а в культурах от 3-го и 11-го экспрессии этих генов оказались схожими или ниже таковых в НСК 2-го и 10-го пассажей. Уровни экспрессии *SOX2* во всех нейральных культурах №4 и НСК соответствующих пассажей были сопоставимы.

При сравнении уровней экспрессии генов-маркеров нейральных предшественников между нейральными линиями №4, полученными из НСК от 3-го, 7-го и 11-го пассажей, оказалось, что экспрессия *PAX6*, *NESTIN*, *MSI1* и *SOX2* была максимальной у культуры от 7-го пассажа НСК.

Уровни относительной экспрессии нейральных маркеров *TUBB3*, *DCX*, *TH* и *GABBR1* почти во всех нейральных культурах оказались выше, чем в НСК, из которых они были дифференцированы. Однако экспрессия *MAP2* такой тенденции не продемонстрировала (рисунок 4.3 А-Д).

Сравнение нейральных линий №3, полученных из НСК от 3-го, 7-го и 11-го пассажей показало повышенную экспрессию *TUBB3* и *MAP2* в культурах от НСК с 3-го и 11-го пассажей. Уровень *DCX* и *GABBR1* было максимальным в культурах от НСК с 3-го пассажа, в то время как *TH* показал постепенное повышение с максимумом в культуре от НСК с 11-го. Уровень относительной экспрессии *TUBB3* и *MAP2* в нейральных культурах №4 оказался максимальным в культуре от НСК с 7-го пассажа, а *DCX* и *GABBR1* был

максимальным в культуре от НСК с 3-го пассажа, а в последующих культурах показал снижение. Экспрессия *TH* была максимальной в культуре от 7-го пассажа НСК.

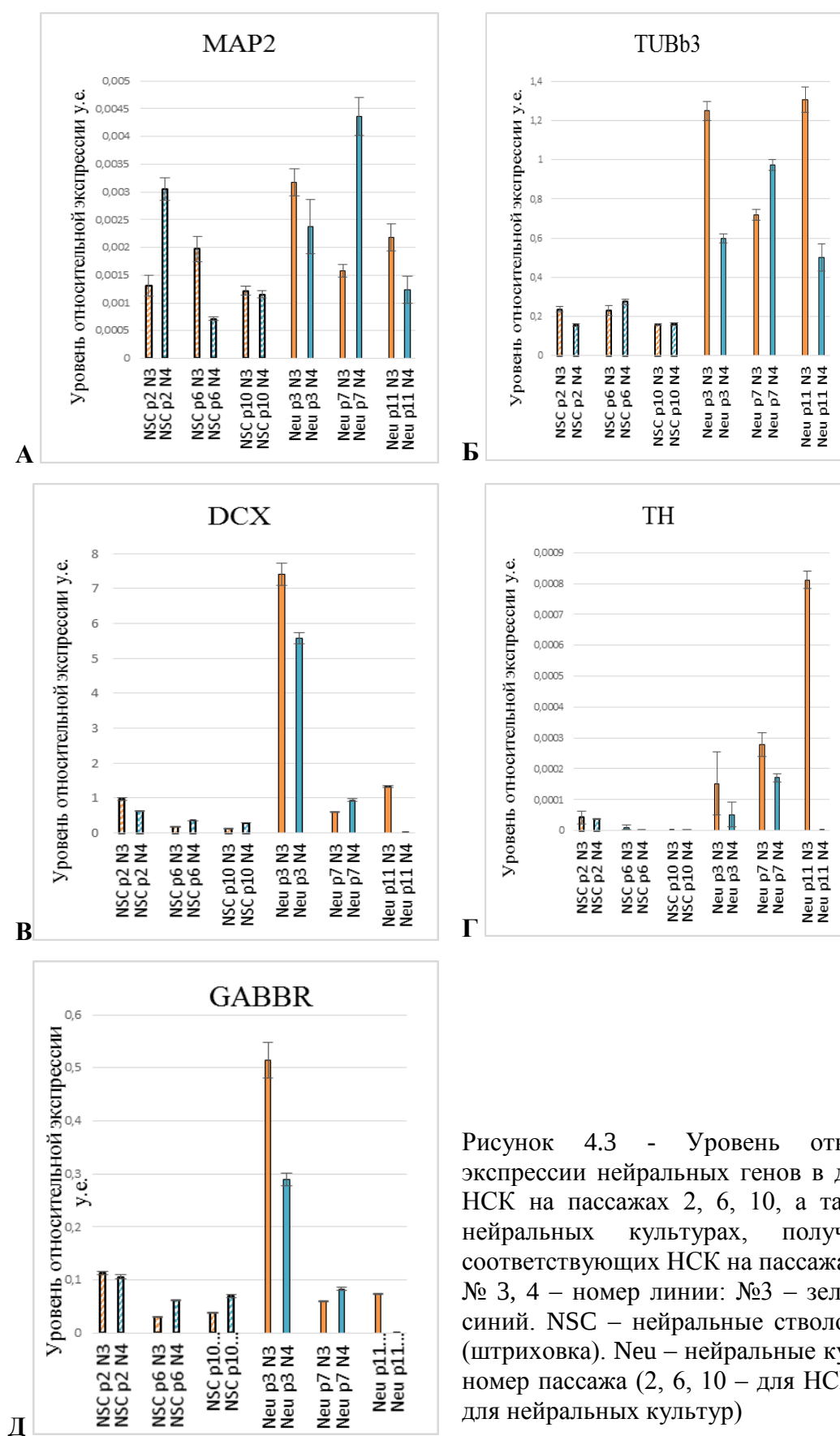


Рисунок 4.3 - Уровень относительной экспрессии нейральных генов в двух линиях НСК на пассажах 2, 6, 10, а также в двух нейральных культурах, полученных от соответствующих НСК на пассажах 3, 7, 11. № 3, 4 – номер линии: №3 – зеленый, №4 – синий. NSC – нейральные стволовые клетки (штриховка). Neu – нейральные культуры, p – номер пассажа (2, 6, 10 – для НСК; 3, 7, 11 – для нейральных культур)

Таким образом, мы показали, что спонтанно дифференцированные нейральные культуры на 21-й день дифференцировки продолжают экспрессировать гены-маркеры НСК на достаточно высоком уровне, что говорит о том, что в этих культурах присутствуют нейральные стволовые клетки. Одновременно с этим мы видим значительное повышение экспрессии маркеров нейронов, что указывает на процесс терминальной дифференцировки нейронов.

4.3.3 Визуализация кальциевой активности с помощью кальциевого имиджинга.
Поскольку нейральные культуры №3 демонстрировали более яркий флуоресцентный сигнал GCaMP6s, чем культуры №4, для экспериментов с визуализацией кальциевой активности была выбрана нейральная культура №3.

Проведена серия экспериментов по регистрации флуоресцентного кальциевого сигнала в нейральных культурах №3 с воздействием различных веществ – стимуляторов и ингибиторов нейрофизиологической активности. Пикротоксин - неконкурентный антагонист или ингибитор ГАМК-рецепторов [3], с его помощью мы снимали фоновое ГАМК-опосредованное ингибирование активности нейронов. Глутаминовая кислота – важнейший возбуждающий нейромедиатор, который при взаимодействии с ионотропными глутаматными NMDA-, AMPA- и каинатными рецепторами приводит к поступлению кальция в клетку и возбуждению нейронов. Кинуреновая кислота – антагонист ионотропных рецепторов к глутамату NMDAR, AMPA, каинатных рецепторов [4].

В культуре наблюдается слабая спонтанная нейрофизиологическая активность, которая выражается в вспышках флуоресценции GCaMP6s. При добавлении пикротоксина в среднем мы не наблюдали значимого увеличения частоты и интенсивности вспышек.

При добавлении глутаминовой кислоты в конечной концентрации 10 мкМ нейральная культура, как правило, дает яркий флуоресцентный ответ, что свидетельствует о том, что клетки в культуре не только имеют вышеперечисленные рецепторы, но и способны к ответу на воздействие данного нейромедиатора. После добавления кинуреновой кислоты наблюдалась повышенная активность клеток, которая проявлялась в виде кратковременных несинхронных вспышек GCaMP6s (кальциевых спаек), после чего сигнал гаснет.

Интенсивность флуоресценции была количественно измерена с помощью программы ImageJ с пакетом плагинов Fiji. В конечном итоге описанную динамику кальциевых ответов можно проследить на графике зависимости интенсивности свечения выбранной точки (клетки) от времени (кадра) (рисунок 4.4). Каждая кривая представляет собой одну клетку, изменяющую интенсивность флуоресценции в течение времени.

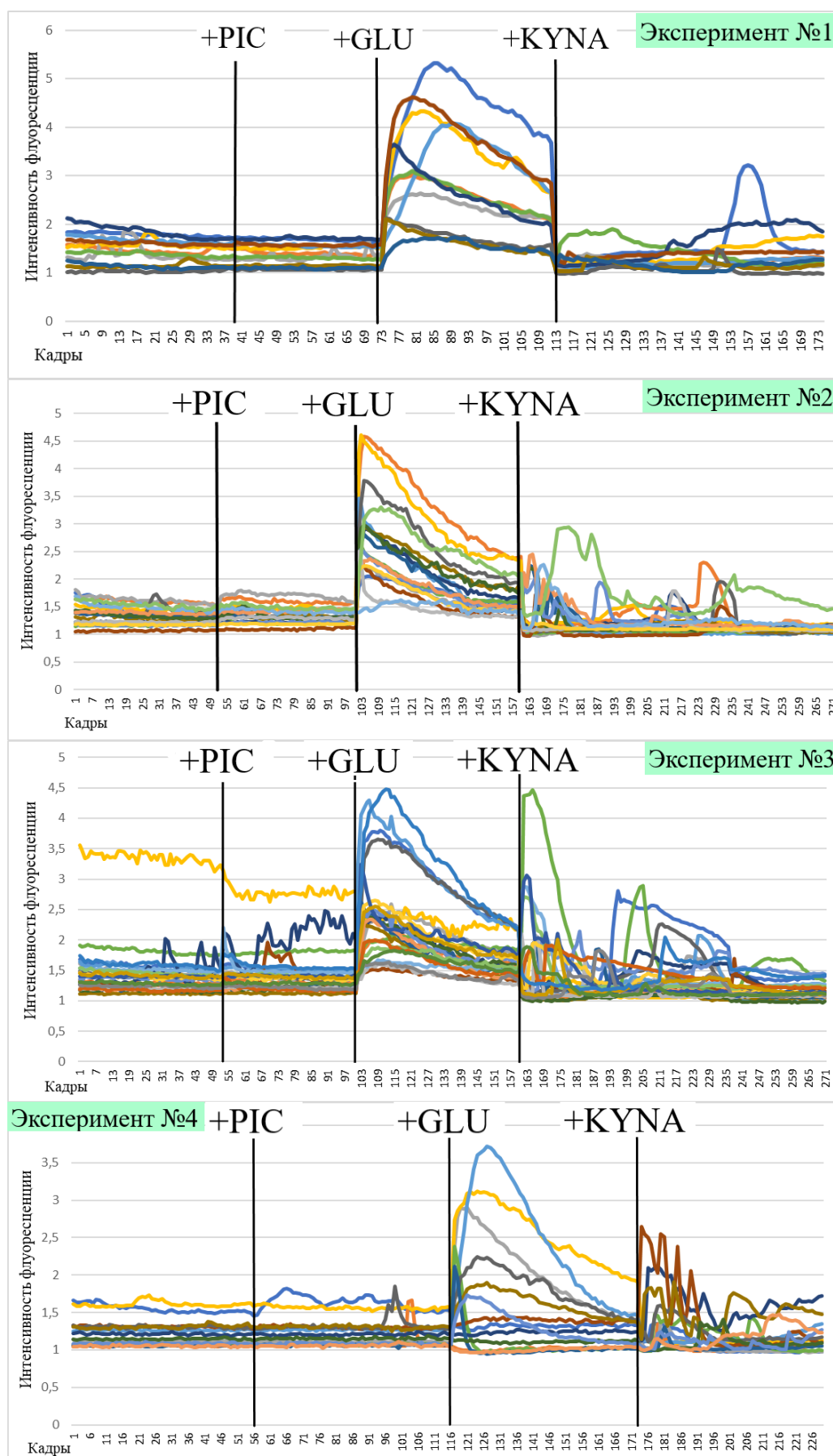


Рисунок 4.4 - Репрезентативная выборка результатов измерения кальциевого ответа в нейральных культурах при добавлении различных веществ

Графики представляют собой зависимость интенсивности флуоресцентного сигнала (по вертикали) от номера кадра (по горизонтали) (кадр раз в 6 секунд). На графиках видны редкие пики спонтанной активности клеток до добавления веществ. При добавлении возбуждающего медиатора – глутаминовой кислоты, практически у всех выбранных клеток происходит резкое увеличение флуоресценции с последующим медленным снижением. Добавление кинуреновой кислоты вызывает хаотичную активность клеток с последующим прогрессирующим затуханием флуоресцентного сигнала. На основе полученных данных мы можем утверждать, что данная модель способная к корректному воспроизведению кальциевой активности нейральных культур.

4.3.4 Анализ транскриптомов (RNA-seq) культур нейронов, полученных из НСК разного возраста. Используя образцы тотальной РНК, выделенной из культур терминально дифференцированных нейральных культур, нами были сделаны библиотеки для NGS секвенирования. т.н. транскриптомов (RNA-seq) – совокупности всех мРНК транскриптов культур. Для сравнения были взяты образцы на 3-м, 7-м и 11-м пассажах клонов НСК №2 и №3. В дальнейшем были промаркированы как образцы s1a, s1b, s2a, s2b, s3a, s3b, где 1,2,3 – это точки пассажей (3,7,11 соответственно), а, b – это клон №2 и №3 соответственно.

Анализ транскриптомов методом главных компонент (рисунок 4.5) показал, что положение шести образцов на дот-плоте соответствует некому ступенчатому процессу, поскольку траектории точек по мере пассирования (s1a -> s2a -> s3a и s1b->s2b->s3b) сходятся из изначально разных положений в одну область. Данный факт может показывать то, что, несмотря на изначально разные свойства двух клонов клеток (и разные культуры нейронов, которые были получены из них), в дальнейшем при пассировании они дают более схожие нейроны, чем на первых пассажах, что может указывать на некий процесс, протекающий одинаково для обоих клонов. Анализ тепловой карты кластеризации сравнения шести образцов транскриптомов (рисунок 4.6) показывает, что точки №1 отстоят дальше по своим свойствам от точек 2 и 3, что в принципе подтверждается анализом методом главных компонент. Это может указывать на то, что основной процесс изменения культур лежит как раз между 3-м и 7-м пассажем, чем между 7-м и 11-м. При анализе посчитанных таблиц экспрессии генов (нормированных по методу TPM, Transcripts Per Kilobase Million) были найдены дифференциально экспрессированные гены между крайними точками 1 и 3. Анализ состава дифференциально экспрессированных генов, методом генной онтологии (Gene Ontology Analysis) (рисунок 4.7) показывает наличие нескольких групп генов с негативной

регуляцией, характерных для нервной ткани (таких как GABA receptor signaling, Neural crest differentiation и WNT signaling pathway).

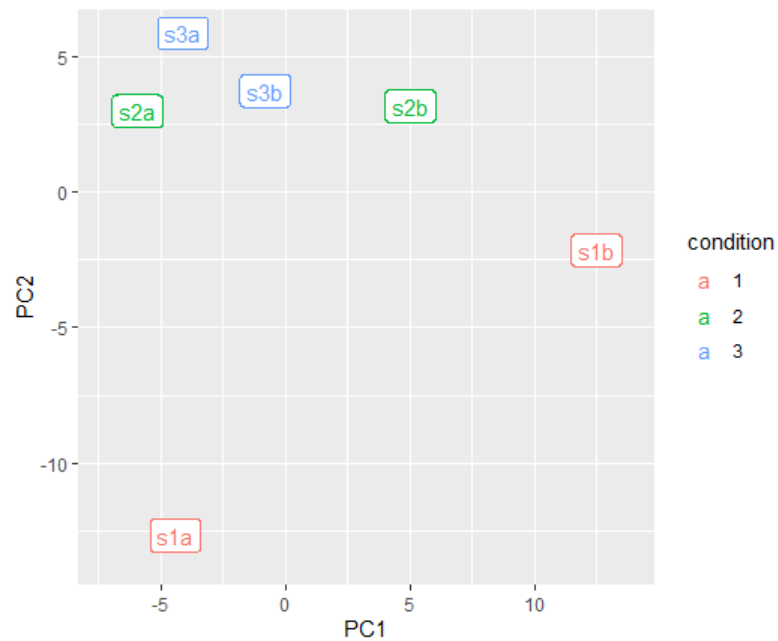


Рисунок 4.5 - Разложение шести образцов транскриптомов методом главных компонент (PC1, PC2)

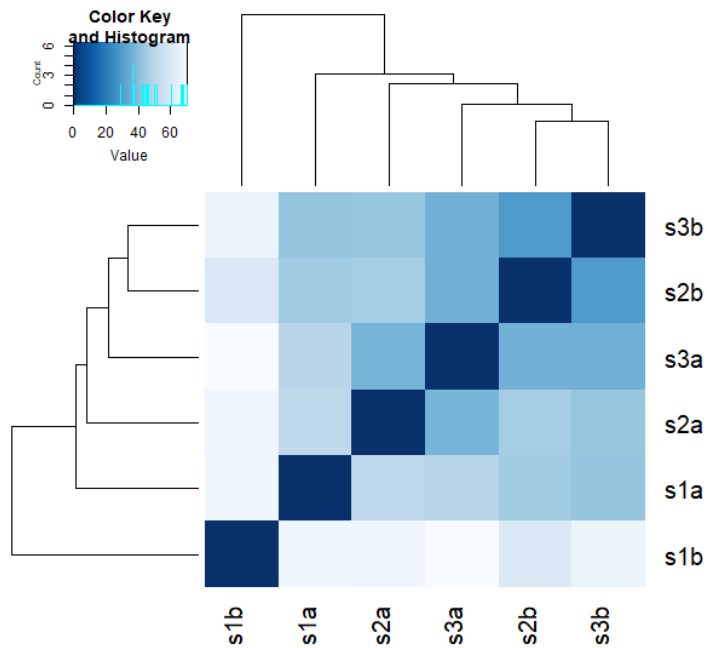


Рисунок 4.6 - Тепловая карта кластеризации сравнения шести образцов транскриптомов

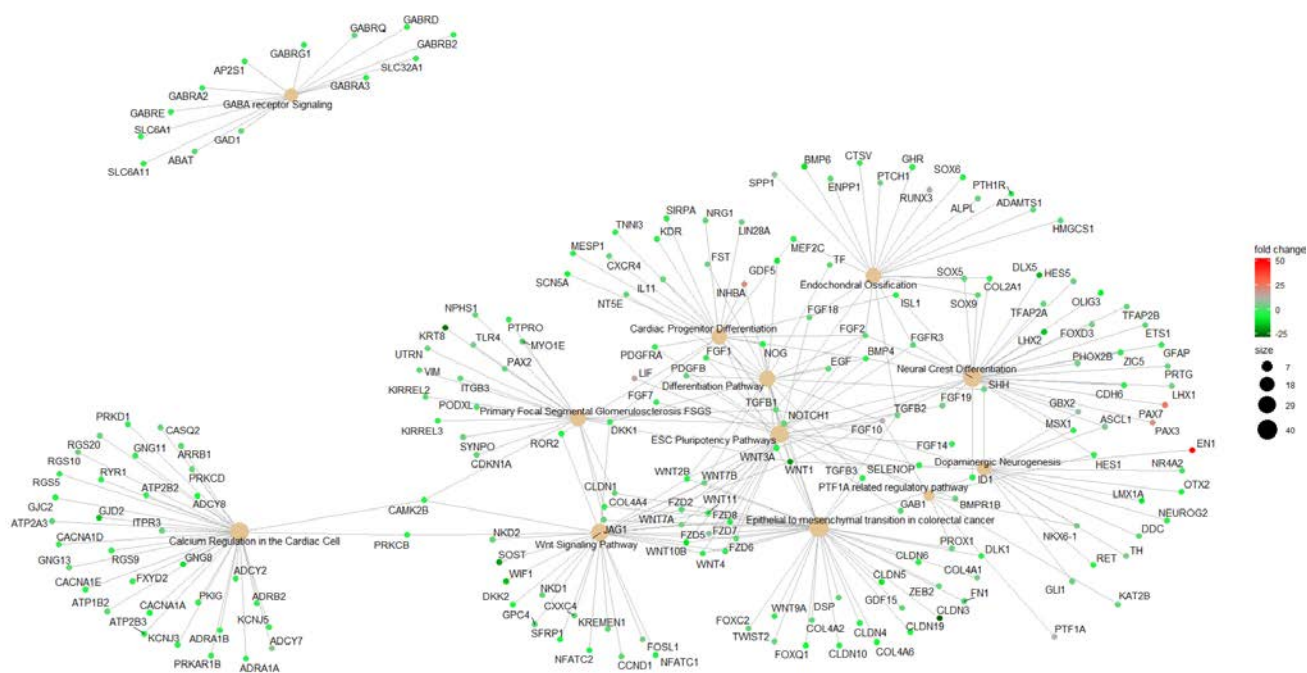


Рисунок 4.7 - Анализ состава дифференциально экспрессированных генов (верхние 36 позиций с минимальным-value) между тремя разными группами (А,В,С) методом геной онтологии (Gene Ontology Analysis)

Все эти данные могут указывать на то, что по мере пассирования НСК истощают свой потенциал генерации нейронов в культуре *in vitro*, что сказывается на свойствах получаемых из них терминально дифференцированных нейронов и, что в целом может отражать некоторые аспекты нейрогенеза *in vivo* [1, 2].

4.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

- 1) Линии ИПСК, полученные клонированием из одного стока, обладают разными характеристиками, которые проявляются и в дифференцированных из них культурах НСК и в их дериватах.
- 2) В процессе пролиферации НСК в культуре *in vitro* происходит истощение нейродифференцировочного потенциала.
- 3) Трансгенные нейральные культуры с GCarm6s способны к визуализации кальциевой активности нейронов.

4.5 СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Zakharov I., Dashinimaev E., Sukhinich K., Dyakonova V. Neurotransmitter systems in cultures of human neurons derived from IPSCs // FEBS OPEN BIO. - 2019. - Vol. 9. - Is. 1. – P. 22 - 007. - P. 221. WOS:000486972403077. (WoS) – Q4.
2. Дашинамаев Э.Б., Сухинич К.К., Дьяконова В.Е., Богуславский Д.В., Захаров И.С. Транскриптомный анализ экспрессии генов нейротрансмиттерных систем в культурах

нейронов человека, полученных из ИПС клеток // Материалы VIII научно-практической конференции с международным участием «Генетика – фундаментальная основа инноваций в медицине и селекции»: (Ростов-на-Дону, 26–29 сентября 2019 г.); Южный федеральный университет. – Ростов-на-Дону; Таганрог: Издательство Южного федерального университета, 2019. – 254 с. ISBN 978-5-9275-3236-0

3. Akaike N., Hattori K., Oomura Y., Carpenter D.O. Bicuculline and picrotoxin block gamma-aminobutyric acid-gated Cl⁻ conductance by different mechanisms // *Experientia*. - 1985. - Vol. 41. - №1. - P. 70 – 71.

4. Elmslie K.S., Yoshikami D. Effects of kynurenate on root potentials evoked by synaptic activity and amino acids in the frog spinal cord // *Brain Res.* - 1985. - Vol. 330. - №. 2. - P. 265 – 272.4.

4.5. ОТЧЕТНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО РАЗДЕЛУ

Zakharov I., Dashinimaev E., Sukhinich K., Dyakonova V. Neurotransmitter systems in cultures of human neurons derived from iPSCs // *FEBS OPEN BIO.* - 2019. - Vol. 9. - Is. 1. P-22-007. P. 221. WOS:000486972403077. (WoS) – Q4.

РАЗДЕЛ 5. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОРРЕКЦИИ ДЕФЕКТОВ СПЕРМАТОГЕНЕЗА *EX VIVO* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОПУЛЯЦИИ АКТИВНО ПРОЛИФЕРИРУЮЩИЙ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК СЕРТОЛИ ВЗРОСЛОГО ОРГАНИЗМА

5.1 ВВЕДЕНИЕ

По данным ВОЗ, в мире около 15% пар страдает бесплодием и в 50% случаев причиной бесплодия является мужской фактор [1]. В 10% случаев мужского бесплодия нарушения сперматогенеза настолько значительны, что в яичках отсутствуют сперматозоиды, т.е. наблюдается необструктивная азооспермия [2]. Существующие методы лечения таких нарушений, как правило, неэффективны. В настоящее время разрабатываются различные методы поддержания сперматогенеза *in vitro*, такие как воспроизведение всех этапов сперматогенеза из эмбриональных стволовых клеток или индуцированных плюрипотентных стволовых клеток и завершение дифференцировки половых клеток, полученных из яичек с различными патологиями, в клеточной или органной культуре [2, 3, 4]. Общим для всех этих методов является необходимость контактного взаимодействия дифференцирующихся половых клеток с клетками Сертоли (КС), соматическими клетками, поддерживающими сперматогенез в мужских гонадах млекопитающих [5]. Это является лимитирующим фактором, так как для клеточных технологий подходят только недифференцированные КС из гонад неполовозрелых организмов, способные к пролиферации и формированию комплексов с половыми клетками. Кроме того, часто повреждение КС и является причиной необструктивной азооспермии [6].

В недавних исследованиях нами было продемонстрировано, что в яичках половозрелых млекопитающих присутствует популяция Сертоли-подобных клеток (СПК), способная пролиферировать в культуре [7]. СПК экспрессируют многие гены, характерные для КС, такие как *Sox9*, *Wt1*, *Nr5a1*, *Dmrt1*, *Gata4*, *Trf* и другие, хотя не всегда на таком же высоком уровне. СПК могут принимать участие в формировании семенных канальцев *de novo* в условиях 3D и 2D-культуры и взаимодействовать с половыми клетками [8-9]. Предполагается, что СПК могут заменить недифференцированные КС в различных клеточных технологиях. На предыдущем этапе Проекта была разработана среда для культивирования СПК, способствующая повышению экспрессии генов, характерных для КС, в первую очередь *Dmrt1*, транскрипционного фактора, принимающего участие в поддержании дифференцировки и функционирования КС [8, 10]. Чтобы оценить степень эффективности и безопасности использования СПК вместо КС, необходимо было установить происхождение этих клеток и проследить их дифференцировку в ходе развития мужской гонады.

5.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование происхождения формирования и дифференцировки Сертоли-подобных клеток. Работа была проведена на самцах мышей линии C57Bl/6 разных возрастов и эмбрионах. Все эксперименты с животными проводили в соответствии с нормами Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях, а также Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных Комиссии по биоэтике ИБР РАН.

Для выделения соматических клеток яичек половозрелых и неполовозрелых мышей и поддержания их в культуре использовали методики, описанные в работах [7-8]. Для выделения эмбриональных клеток ткань инкубировали в смеси коллагеназы IV типа (4 мг/мл), гиалуронидазы I-S (2 мг/мл) и ДНКазы I типа (0,04%) в течение 1 ч при 37°C. Эмбриональные клетки растили в той же среде и при тех же условиях, что и клетки от неполовозрелых мышей. Культуры фиксировали 4% параформальдегидом и проводили иммуноцитохимический анализ. Для проведения иммуногистохимического анализа яичек готовили либо парафиновые срезы по стандартной методике, либо тотальные препараты (whole mount). Для окраски были использованы первичные антитела к Amh (Santa Cruz sc-6886), Cdh1 (BD Bioscience 610181 и 560064), Dmrt1 (Santa Cruz sc-377167), Krt8 (Abcam ab53280), Pax8 (Abcam ab53490), Sox9 (Millipore AB5535), Wt1 (Abcam ab89901) и соответствующие им вторичные антитела с флуоресцентными метками Alexa Fluor (Thermo Fisher Sci). Образцы фотографировали на эпифлуоресцентном микроскопе Leica DMI6000 и на конфокальном микроскопе Leica TCS SP5. Для анализа фотографий и проведения подсчетов использовали программное обеспечение Cell Profiler.

5.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для локализации СПК в яичках половозрелых мышей было проведено иммунофлуоресцентное окрашивание срезов яичек на белки, характерные для СПК в культуре, а именно: транскрипционный фактор PAX8, белок межклеточных контактов CDH1 и цитоскелетный белок KRT8 (рисунок 5.1А). Единственными соматическими клетками, положительно окрашивающимися на эти маркеры, оказались клетки эпителия сети яичка, или rete testis, системы сообщающихся полостей и каналов, по которой сперматозоиды транспортируются из извитых семенных канальцев, в которых идет развитие половых клеток, в выносящие канальцы и далее в придаток яичка эпидидимис (Рисунок 5.1Б). PAX8 и CDH1 экспрессировали все клетки сети, в то время как KRT8 не детектировался в части клеток [11].

Для локализации СПК в яичках половозрелых мышей было проведено иммунофлуоресцентное окрашивание срезов яичек на белки, характерные для СПК в культуре, а именно: транскрипционный фактор PAX8, белок межклеточных контактов CDH1 и цитоскелетный белок KRT8 (рисунок 5.1А). Единственными соматическими клетками, положительно окрашивающимися на эти маркеры, оказались клетки эпителия сети яичка, или *rete testis*, системы сообщающихся полостей и каналов, по которой сперматозоиды транспортируются из извитых семенных канальцев, в которых идет развитие половых клеток, в выносящие канальцы и далее в придаток яичка эпидидимис (рисунок 5.1Б). PAX8 и CDH1 экспрессировали все клетки сети, в то время как KRT8 не детектировался в части клеток [11].

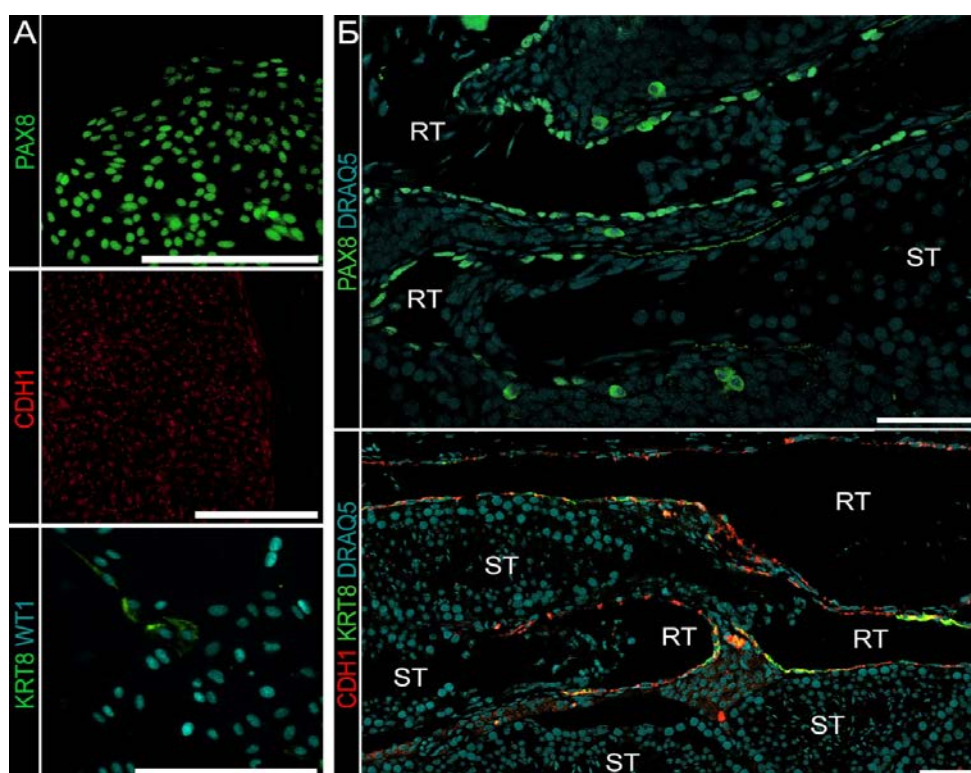


Рисунок 5.1 - А - иммунофлуоресцентная окраска на PAX8, CDH1 и KRT8 в культуре СПК мыши, Б - эти же маркеры в клетках эпителия *rete testis* (RT). ST – извитой семенной каналец. Ядра клеток окрашены антителами к WT1 на (А) и ядерным красителем DRAQ5 на (Б). Масштаб: 200 мкм (А), 50 мкм (Б)

Чтобы установить время появления СПК в семенниках был проведен скрининг культур, полученных из яичек мышей разных возрастов. Колонии СПК, экспрессирующие PAX8, CDH1 и KRT8, были обнаружены в культурах от животных всех возрастов, начиная с рождения. Поэтому далее был проведен анализ культур клеток мужских эмбриональных гонад. Эмбриональные комплексы гонада-мезонефрос разделяли на три части: мезонефрос, мезонефрический регион гонады (находящийся на границе гонада-мезонефрос) и целомический регион гонады (находящийся ближе к целомическому эпителию и не

соприкасающийся с мезонефросом), и культивировали отдельно клетки из этих компартментов (рисунок 5.2А). Выяснилось, что впервые колонии СПК появляются на 14.5 сут эмбрионального развития (E14.5), причем только в культурах, выделенных из мезонефрического региона гонады. Они экспрессируют маркеры КС WT1 и SOX9 (рисунок 5.2 Б-Г), маркер СПК PAX8 (рисунок 5.2Г) и слабо, в отличие от КС, окрашиваются на DMRT1 (рисунок 5.2Б, В). маркер СПК PAX8 (рисунок 5.2Г) и слабо, в отличие от КС, окрашиваются на DMRT1 (рисунок 5.2Б, В).

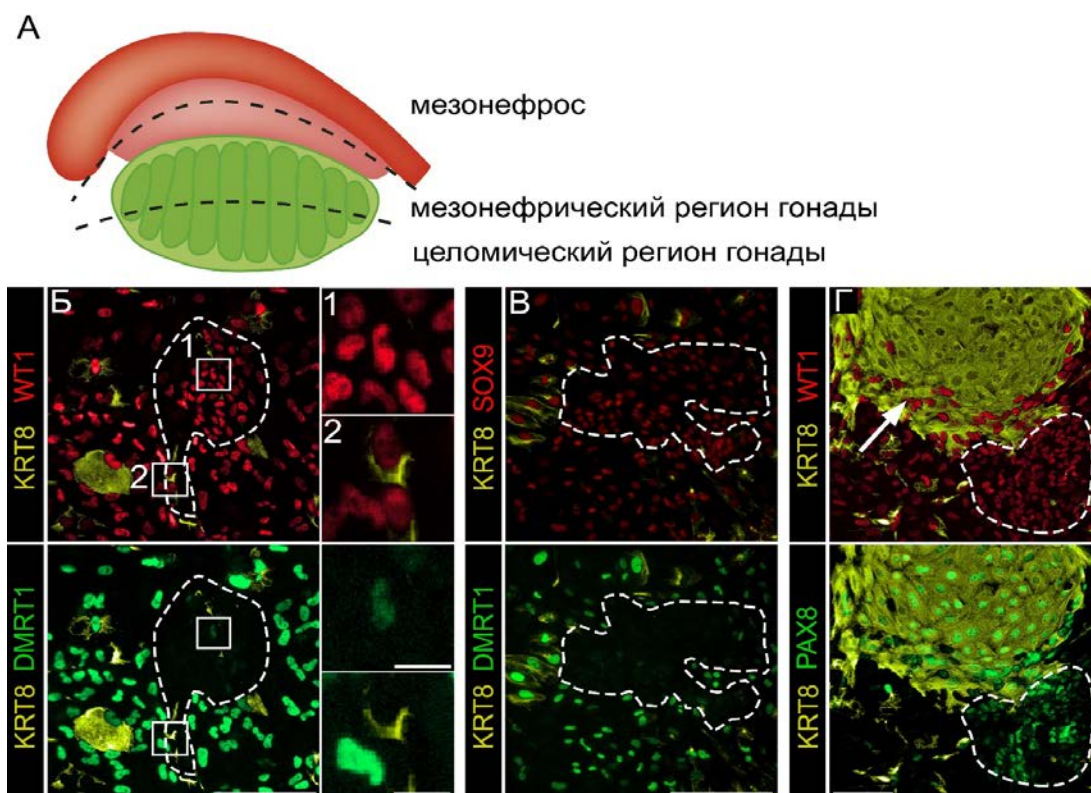


Рисунок 5.2 - А – схема регионов комплекса гонада-мезонефрос, Б-Г – тройная иммунофлуоресцентная окраска культур из мезонефрического региона гонады на E14.5. Пунктиром ограничены колонии СПК. 1, 2 – увеличенные изображения фрагментов колонии СПК. Масштаб: 100 мкм (Б-Г), 15 мкм (1, 2)

На этот срок окраска на KRT8 характерна как для КС, так и для СПК (рисунок 5.2Б-Г). Встречающиеся в культуре из мезонефрического региона гонады WT1+SOX9+PAX8+ клетки с очень ярким KRT8 сигналом также присутствуют в культуре клеток мезонефроса и, по-видимому, являются клетками эпителия мезонефрических канальцев (рисунок 5.2Г, стрелка). Они не окрашиваются на маркер КС DMRT1.

Иммунофлуоресцентный анализ мужских гонад на разные сроки эмбрионального развития показал, что сеть яичка в виде плотных тяжей клеток, слабо окрашивающихся на SOX9 и PAX8, можно идентифицировать уже на E12.5 (рисунок 5.3А). Клетки сети непосредственно примыкают к КС в семенных тяжах, также экспрессирующим SOX9, но не окрашивающимся антителами к PAX8. На E13.5 тяжи сети становятся более

оформленными и разветвленными, в них усиливается экспрессия SOX9 и PAX8, в то же время окраска на DMRT1 и AMH, характерная для КС в семенных тяжах (testis cords), отсутствует. Тяжи сети примыкают к семенным тяжам, будущим извитым семенным канальцам, состоящим из КС и соединяющимся друг с другом в виде арок на границе гонада-мезонефрос (рисунок 5.3Б).

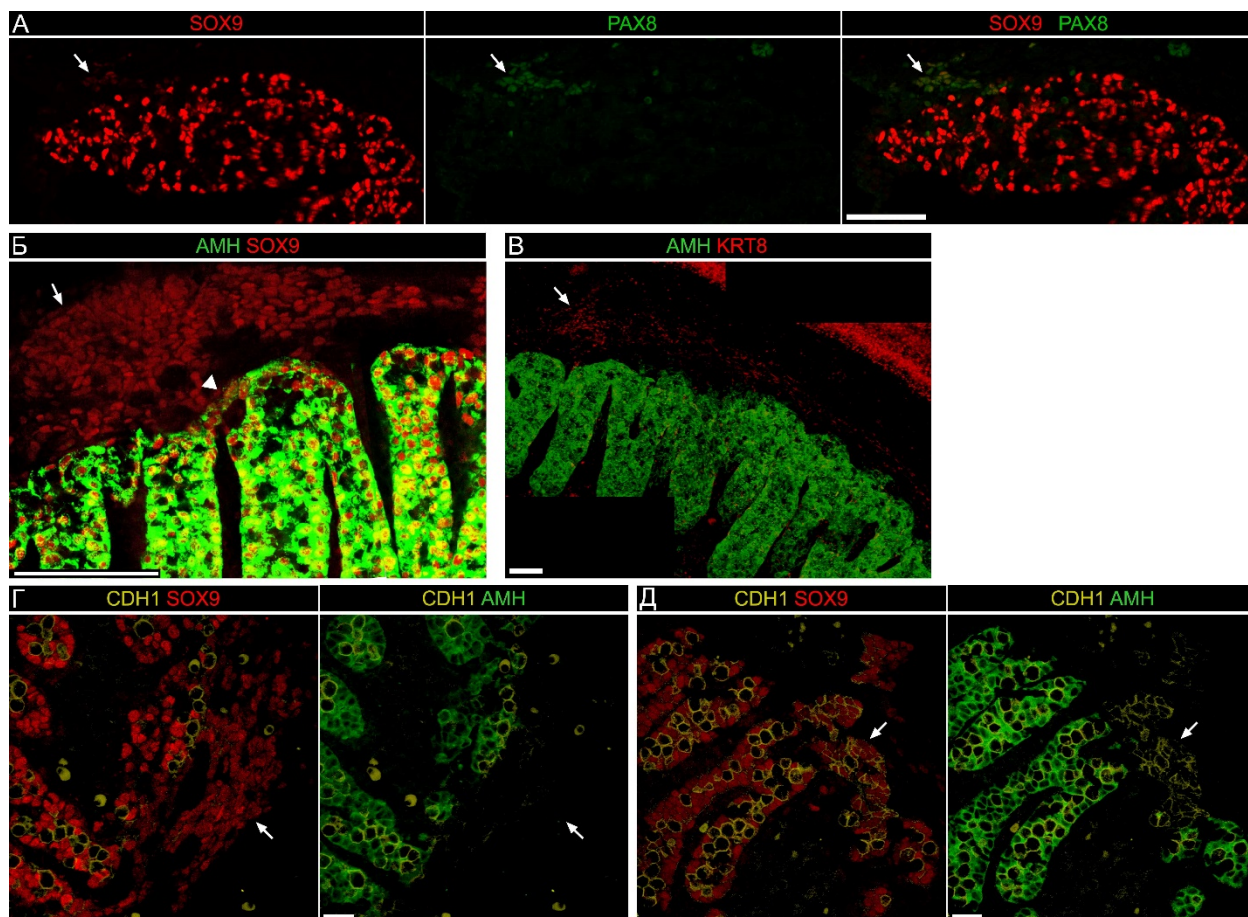


Рисунок 5.3 - Иммунофлуоресцентная окраска эмбриональных мужских гонад на E12.5 (А), E13.5 (Б-Г), E14.5 (Д). Стрелки указывают на сеть яичка, треугольник – на место соединения семенных тяжей друг с другом у границы гонада-мезонефрос на E13.5. Масштаб: 75 мкм (А), 100 мкм (Б), 50 мкм (В), 20 мкм (Г, Д)

На этот и последующие сроки сеть яичка положительно окрашивается на маркер СПК, KRT8, который также присутствует в эмбриональных КС (рисунок 5.3В). В сети на E13.5 отсутствует еще один маркер СПК, CDH1 (рисунок 5.3Г), на этом срок единственными CDH1+ клетками в гонаде являются половые клетки. CDH1 появляется в сети яичка на E14.5 (рисунок 5.3Д), что совпадает с появлением колоний СПК в культуре. Также на этот срок наблюдается исчезновение АМН из участков семенных тяжей на границе гонада-мезонефрос и формирование из них тяжей *rete testis* (рисунок 5.4А), а также появление там клеток со смешанным фенотипом: АМН+РАХ8+ (рисунок 5.4Б) и АМН-DMRT1+ (рисунок 5.4В). То есть в это время происходит трансдифференцировка части КС в клетки сети яичка и появление популяции СПК, сочетающей в себе свойства, с одной стороны, КС, а с другой стороны, клеток сети яичка.

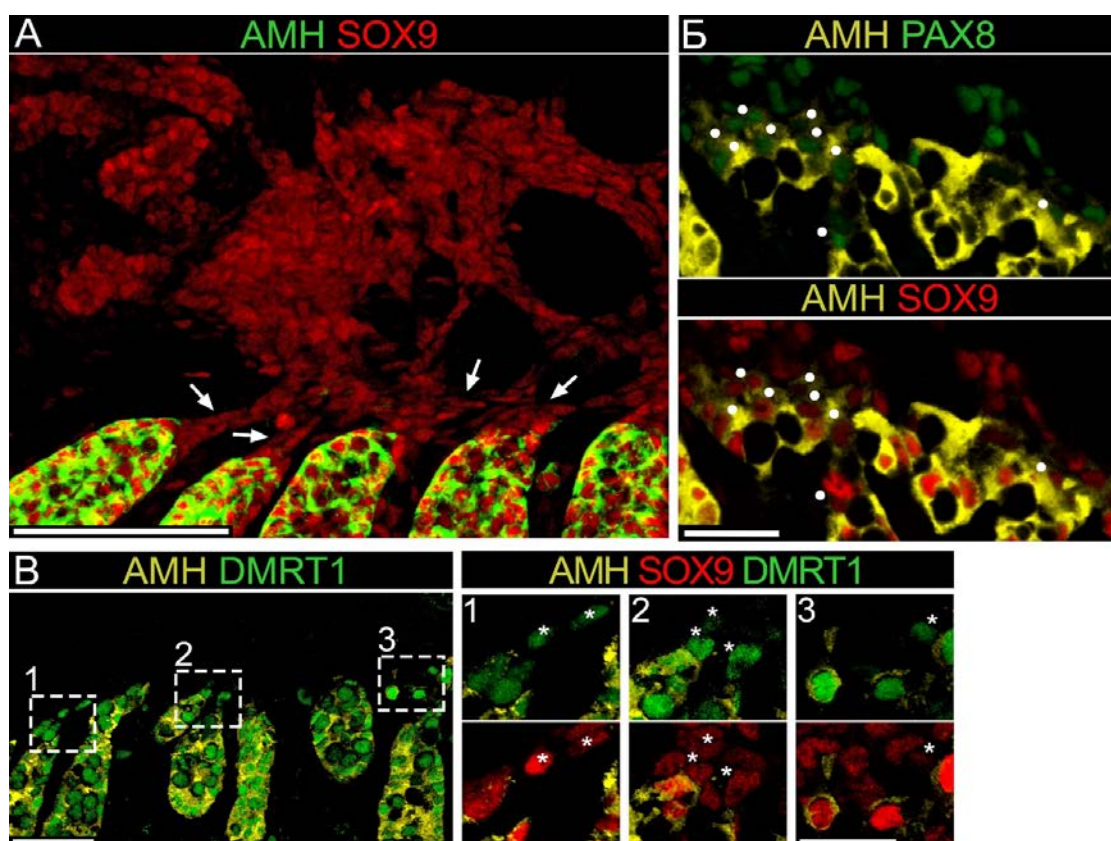


Рисунок 5.4 - Иммунофлуоресцентная окраска эмбриональных мужских гонад на E14.5. Стрелки указывают на тяжи *rete testis*, сформировавшиеся из КС семенных тяжей; точки – на АМН+РАХ8+, звездочки – на АМН-DMRT1+ клетки на границе гонада-мезонефрос и в тяжах *rete testis*. 1-3 – увеличенные изображения клеток с (В). Масштаб: 100 мкм (А), 25 мкм (Б, 1-3), 50 мкм (В)

Дальнейший иммунофлуоресцентный анализ яичек мышей на разные сроки постнатального развития показал, что часть клеток сети яичка продолжает экспрессировать *Dmrt1* и *Amh*, гены, специфические для КС, в течение длительного времени после того, как произошла трансформация КС в клетки сети у границы гонада-

мезонефрос [11]. Доля DMRT1+ клеток среди клеток *rete testis*, идентифицируемых по одновременной окраске на CDH1 и SOX9, растет в ходе постнатального развития, достигая максимума на 9 сут, а затем резко снижается с появлением мейотических половых клеток, на 12 сут (рисунок 5.5А, Б). Также в составе сети яичка у неполовозрелых животных присутствуют AMH+ клетки (рисунок 5.5В). Экспрессия AMH исчезает как из извитых семенных канальцев, так и из сети яичка, в ходе созревания, приблизительно в то же время, что и DMRT1.

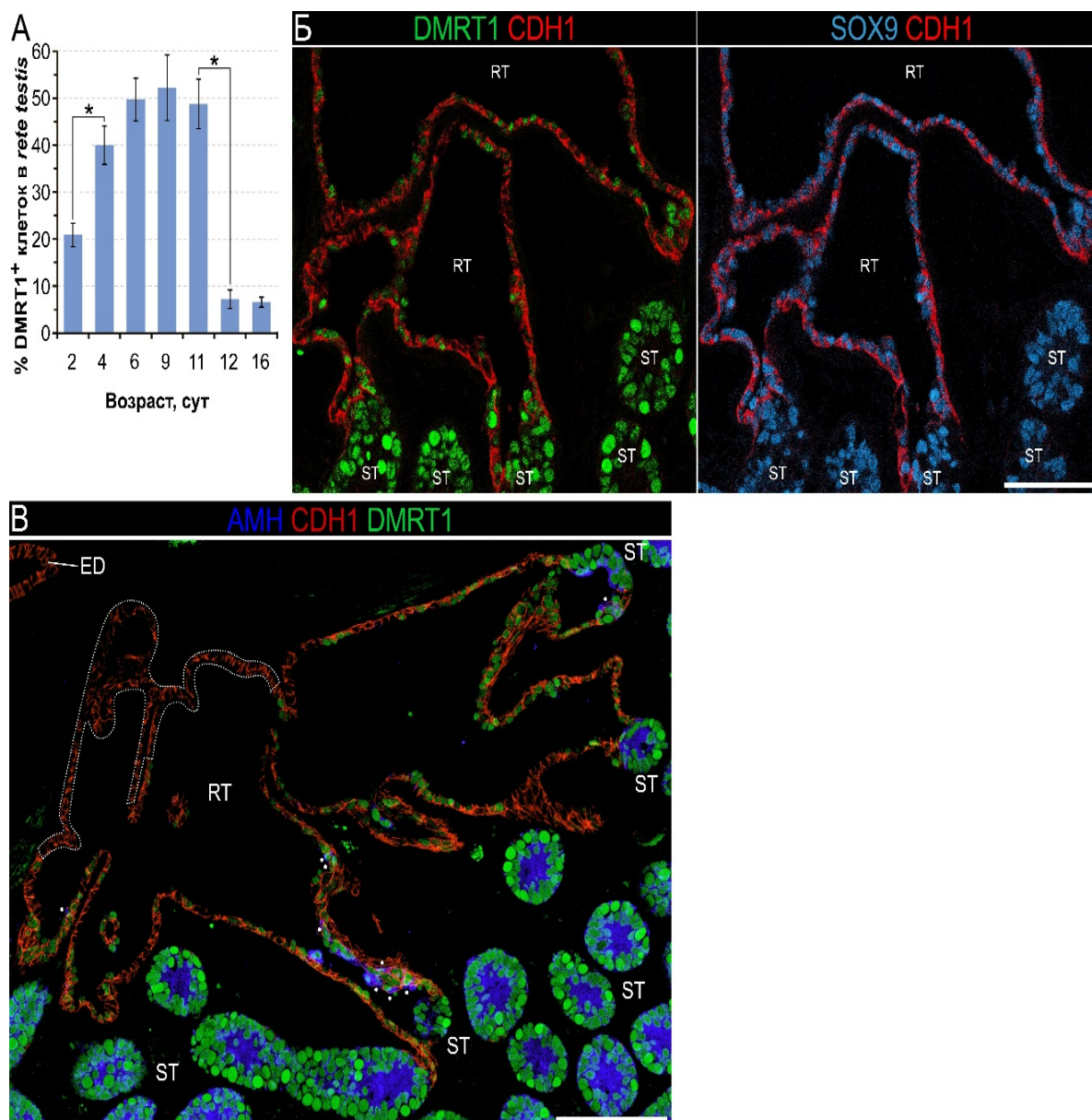


Рисунок 5.5 - А – Доля DMRT1+ клеток в сети яичка у мышей разных возрастов. * $P < 0.001$. Данные представлены в виде среднее от 3-4 животных $\pm$ стандартная ошибка среднего. Б, В – иммунофлуоресцентная окраска яичек 6-суточных мышей. RT – *rete testis*, ST – извитой семенной каналец, ED – efferent ducts, выносящие каналцы. Точками обозначены AMH+ клетки в сети яичка. Масштаб: 50 мкм (Б), 100 мкм (В)

5.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные данные позволяют заключить, что популяция СПК формируется в яичках на границе гонада-мезонефрос в эмбриональном развитии, между E13.5 и 14.5, и локализуется в сети яичка *rete testis*. По-видимому, часть клеток сети происходит из мезонефроса, в то время как оставшиеся, в число которых входят СПК, являются потомками КС, сочетающими в себе экспрессию мезонефрических маркеров и маркеров КС. Таким образом, СПК можно рассматривать как видоизмененные КС, сохранившие часть недифференцированных свойств этих клеток, такие как пролиферация в культуре, а значит могут быть эффективно использованы в различных клеточных технологиях как замена КС.

5.5 СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Jungwirth A., Diemer T., Dohle G.R., Kopa Z., Krausz C., Tournaye H. Guidelines on Male Infertility: European Association of Urology – 2016. Url.: <http://www.uroweb.org/guidelines/online-guidelines>.
2. Yang S., Ping P., Meng M., Li P., Tian R. et al. Generation of haploid spermatids with fertilization and development capacity from human spermatogonial stem cells of cryptorchid patients // Stem Cell Reports – 2014. – Vol. 3, №4. – P. 663 – 675.
3. Saitou M., Miyauchi H. Gametogenesis from Pluripotent Stem Cells // Cell Stem Cell – 2016. – Vol. 18, №6. – P. 721 – 735.
4. Zhou Q., Wang M., Yuan Y., Wang X., Fu R., Wan H. Complete meiosis from embryonic stem cell-derived germ cells in vitro // Cell Stem Cell – 2016. – Vol. 18, № 3. – P. 330 – 340.
5. Sertoli Cell Biology; Eds Skinner M.K., Griswold M.D. – San Diego and London: Elsevier Academic Press.– 2005. – P. 512
6. Sharpe R.M., McKinnell C., Kivlin C., Fisher J.S. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood // Reproduction. – 2003. – Vol. 125, № 6 – P. 769 – 784.
7. Kulibin A.Y., Malolina E.A. Only a small population of adult Sertoli cells actively proliferates in culture // Reproduction. – 2016. – Vol. 152, №4 – P. 271 – 281.
8. Кулибин А.Ю., Малолина Е.А. Комплекс низкомолекулярных ингибиторов YAC увеличивает уровень экспрессии Dmrt1 в клетках Сертоли транзиторной зоны семенника мыши в культуре // Гены и клетки. – 2018. – Т. 14, № 3. – С. 75 – 81. DOI: 10.23868/201811037. (РИНЦ)

9. Малолина Е.А., Кулибин А.Ю. Создание модели сокультивирования Сертоли-подобных клеток мыши со сперматогониальными клетками // Клеточные технологии в биологии и медицине. - 2019. - № 2. - С. 133 - 138.
10. Кулибин А.Ю., Малолина Е.А. Характеристика минорной популяции активно пролиферирующих в культуре клеток Сертоли из транзиторной зоны яичка взрослых мышей // Молекулярная медицина. – 2017. – Т. 15, № 6 – С. 28 – 31.
11. Malolina E.A., Kulibin A.Yu. The rete testis harbors Sertoli-like cells capable of expressing DMRT1 // Reproduction. – 2019. – Vol. 158. – P 399 – 413.

5.6 ОТЧЕТНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО РАЗДЕЛУ

1. **Malolina E.A., Kulibin A.Yu.** The rete testis harbors Sertoli-like cells capable of expressing DMRT1 // Reproduction. – 2019. – Vol. 158. – P 399 – 413. DOI 10.1530/REP-19-0183. (WoS, Scopus) – Q1.

РАЗДЕЛ 6. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ ОТБОР КЛЕТОЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ ЭКЗОСОМ С ЦЕЛЬЮ РАЗРАБОТКИ ЭФФЕКТИВНЫХ ПРЕПАРАТОВ

6.1 ВВЕДЕНИЕ

В течение последних десяти лет особое внимание ученых привлекают внеклеточные везикулы, секретируемые стволовыми клетками. Недавние исследования показали терапевтический потенциал экзосом, полученных из секрета различных клеток (например, стволовых клеток и клеток-предшественников), в поврежденных тканях, таких как, почка, сердечная мышца, печень, легкое и кожные раны [1, 2, 3, 4, 5, 6]. Внеклеточные везикулы, и в том числе экзосомы, рассматриваются как важные медиаторы межклеточной коммуникации, имитирующие эффект клеток, от которых они произошли, благодаря наличию в них функциональных РНК и белков [7].

Мезенхимные стромальные клетки (МСК) обладают способностью секретировать широкий спектр биологически активных молекул - цитокинов, хемокинов, ростовых факторов и молекул внеклеточного матрикса. Благодаря этой способности МСК оказывают положительный терапевтический эффект при восстановлении многих тканей и органов: головного мозга [6], кожи [8], сердца [9, 10], почек [11], печени [12] и скелетных мышц [13, 14, 15, 16]. На модели механического повреждения мышц у крыс было показано, что суспензия МСК при имплантации в место повреждения оказывают положительное воздействие на заживление мышцы, уменьшают фиброз и усиливают ангиогенез и миогенез, при этом их действие обусловлено преимущественно паракриной секрецией [5]. Основными компонентами секрета МСК являются внеклеточные везикулы, которые содержат в себе различные белки и РНК. Поскольку эффект от введения везикул во многом сопоставим с эффектом от введения самих клеток, представляется перспективным применение экзосом от МСК в качестве терапевтического средства для регенерации скелетных мышц. Стромальные клетки выделяют из самых разных тканей – из костного мозга, жировой ткани, пупочного канатика, скелетных мышц и кожи. Свойства стромальных клеток, в том числе и их секретом, значительно варьируют в зависимости от источника, из которого они получены. Например, при оценке проангиогенных свойств МСК из костного мозга, жировой ткани, скелетных мышц и кожи было показано, что при пассировании, необходимом для получения достаточного количества клеток для терапии, способность к стимуляции ангиогенеза сохраняется только у МСК из костного мозга [17]. Изучение биологических свойств стромальных клеток в зависимости от их происхождения создает возможность для использования таргетной терапии, при которой выбор источника клеток будет важным фактором при оценке их регенеративного потенциала для данной поврежденной ткани.

В экспериментах *in vitro* нами были исследованы экзосомы от МСК из костного мозга и жировой ткани, а также от фибробластов из intactных и поврежденных мышц крысы. Было показано, что по содержанию микроРНК, регулирующих развитие и регенерацию мышечной ткани, экзосомы от МСК из костного мозга превосходили выделенные из остальных исследованных источников. Было установлено присутствие в этих везикулах miR494, влияющей на дифференцировку миоцитов, miR181, стимулирующей миогенную дифференцировку и регулирующей регенерацию мышц, miR27b, способствующей дифференцировке сателлитных клеток. Наиболее выраженный антифибротический эффект в экспериментах *in vitro* оказывали экзосомы от МСК костного мозга и фибробластов intactных мышц, при этом первые еще и усиливали дифференцировку миогенных клеток. МСК из жировой ткани так же обладали стимулирующим воздействием на миогенез *in vitro*. Основываясь на полученных данных, для экспериментов *in vivo* в настоящем проекте применялись экзосомы, полученные из костного мозга, жировой ткани и intactных мышц.

6.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

6.2.1 Клетки для получения экзосом выделяли из костного мозга половозрелых крыс Wistar. Для получения МСК костный мозг вымывали средой DMEM из диафизов больших берцовых и бедренных костей крыс при помощи тонкого шприца. Фибробласты получали из мышц задних конечностей половозрелых крыс Wistar. Жировые МСК получали из фрагментов жира с области живота и бедер крыс. Фрагменты мышц и жировой ткани обрабатывали 0,2%-ным раствором коллагеназы (40 мин при 37°C) для получения клеточных суспензий. Выделенные клетки культивировали в среде DMEM с 10% фетальной телячьей сыворотки (FCS) до образования монослоя, после чего снимали раствором трипсина с ЭДТА и пересеивали с плотностью $1 \times 10^4 - 1 \times 10^5$ клеток/мл.

6.2.2 Кондиционированную среду собирали от клеток 2-го, 3-го и 4-го пассажей. По достижении 70-90% конфлюэнтности среду заменяли на бессывороточную DMEM, к которой добавляли 2% 50-кратного инсулин-трансферрин-селенита (ИТС). Через 2 суток среду собирали и центрифугировали в течение 30 мин при 2 000 g и 4°C для очистки от клеточного дебриса, супернатант повторно центрифугировали в течение 30 мин при 10 000 g и 4°C для удаления крупных везикул и пропускали через фильтр с размером пор 0,22 мкм.

6.2.3 Экзосомы выделяли с помощью ультрацентрифугирования полученной среды в течение 1,5 ч при 110 000g и 4°C. Полученные пробы характеризовали по содержанию белка и концентрации частиц в образце. Общее содержание белка в образцах определяли

методом Брэдфорда [18]. Распределение частиц по размеру и их количество в пробах оценивали методом анализа траекторий наночастиц (NTA) с использованием прибора NanoSight LM10 HS-BF (Nanosight Ltd, Великобритания), оснащенного лазерным источником с длиной волны 405 нм мощностью 65 мВт и высокочувствительной камерой типа EMCCD Andor Luca, и программного обеспечения Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) Version 2.3 Build 0033.

6.2.4 Влияние экзосом на заживление мышечной раны *in vivo* оценивали на модели пореза икроножной мышцы крысы. Перед операцией животных вводили в наркоз внутривенной инъекцией хлоралгидрата, 400 мг/кг. Над икроножной мышцей производили разрез кожи. На оголенную икроножную мышцу тонкими ножницами наносился глубокий поперечный разрез, после чего на кожу накладывали швы. Экзосомы с концентрацией общего белка 100 мкг/мл вводили в область повреждения мышцы инсулиновым шприцем на 3 суток после нанесения раны. Контролем служило введение физраствора без экзосом. Фиксацию проводили нейтральным формалином двое суток при $+4^{\circ}\text{C}$ через 14 суток после введения экзосом. Срезы получали по стандартной методике.

6.2.5 Срезы мышц толщиной 4 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Просмотр и съемку препаратов проводили на микроскопах Olympus IX51 с камерой Olympus DP50-CU и Kayence BZ-9000. Площадь зон воспаления измеряли в программе ImageJ. Результаты измерений подвергали статистической обработке, достоверность различий оценивали по критерию Манна-Уитни.

6.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

6.3.1 Характеристика полученных проб экзосом. Анализ образцов везикул, выделенных из сред, кондиционированных МСК костного мозга и фибробластами мышечной ткани, показал присутствие в них частиц экзосомального размера. Средний диаметр частиц в образцах составлял 115-124 нм для экзосом от МСК костного мозга, 110-129 нм для экзосом от МСК из жировой ткани и 130-144 нм для экзосом от фибробластов мышечной ткани (таблица 6.1). По средней концентрации частиц образцы экзосом от МСК костного мозга и фибробластов мышц практически не отличались. Средняя концентрация частиц для изучаемых образцов составила $0,66-1 \times 10^{11}$ част/мл. Количество везикул, полученных от МСК из жировой ткани было меньше, чем в других образцах, - $0,42 \pm 0,06 \times 10^{11}$ част/мл. Типичные графики распределения частиц по размеру в образцах, полученных из исследуемых источников, приведены на рисунках 6.1, 6.2 и 6.3.

Таблица 6.1 - Примеры измерения количества частиц и размера везикул в полученных образцах экзосом

Источник клеток	Содержание везикул, $\times 10^{11}$ частиц/мл	Размер везикул, мкг/мл
Костный мозг	0,66 $\pm$ 0,07	124 $\pm$ 9
Жировая ткань	0,42 $\pm$ 0,06	129 $\pm$ 8
Мышечная ткань	0,69 $\pm$ 0,08	144 $\pm$ 12

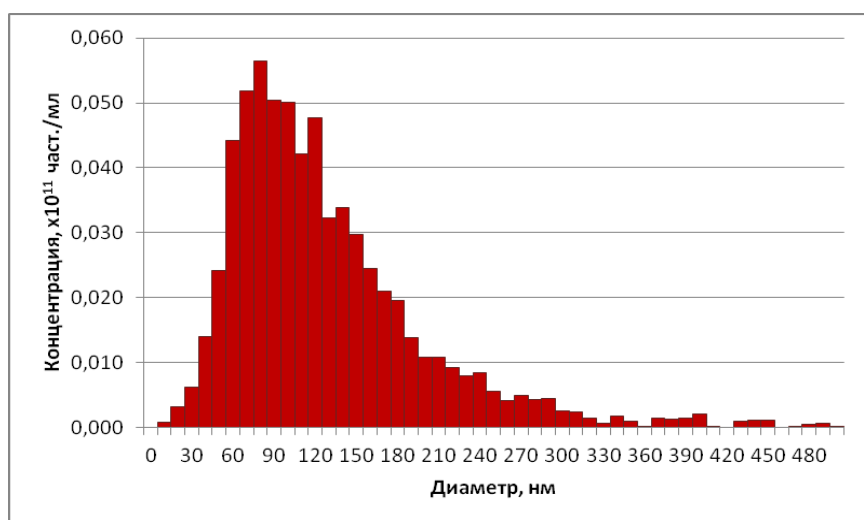


Рисунок 6.1 - NTA-анализ образцов экзосом от КМ-МСК

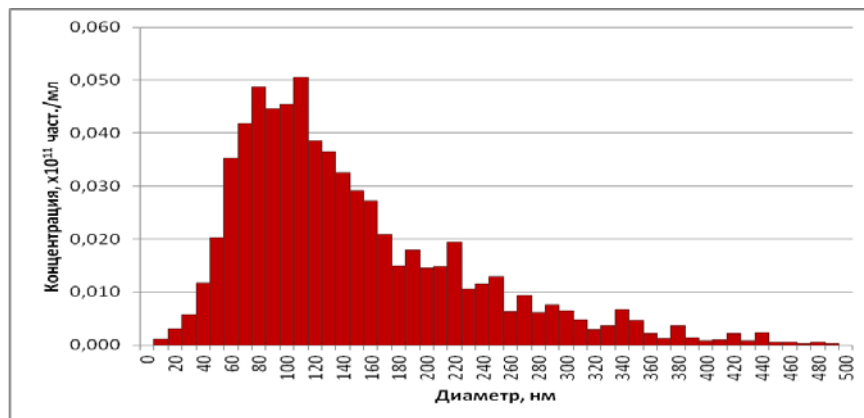


Рисунок 6.2 - NTA-анализ образцов экзосом от фибробластов интактных мышц 2-го пассажа

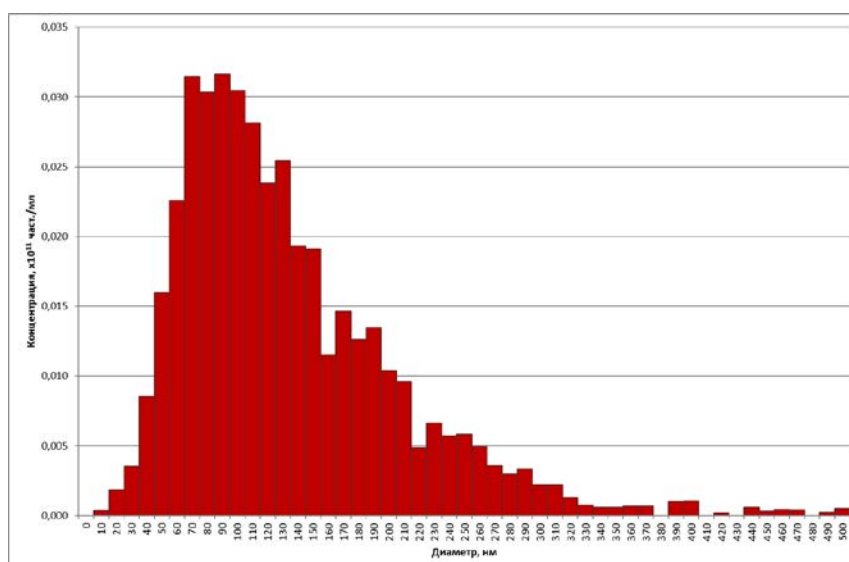


Рисунок 6.3 - NTA-анализ образцов экзосом от ЖТ-МСК

6.3.2. Влияние экзосом на регенерацию мышц *in vivo*. При фиксации животных на 14 сутки после повреждения наблюдалось полное затягивание ран, место нанесения повреждения невозможно было выявить невооруженным глазом. При исследовании гистологических срезов обнаружено, что воспалительный процесс находился на финальных стадиях. В областях воспаления почти отсутствовала грануляционная ткань. В зоне повреждения выявлялись признаки регенерации - новообразованные мышечные волокна с центральным расположением ядер и сосуды.

Сравнение площади областей воспаления в опытных и контрольных образцах, показало, что незначительное снижение площади воспаления происходит только при введении экзосом от КМ-МСК (рисунок 6.4 и 6.5).



Рисунок 6.4 - Площади областей воспаления, при введении физ. раствора (контроль), экзосом от ЖТ-МСК, экзосом от КМ-МСК и экзосом от фибробластов из мышц

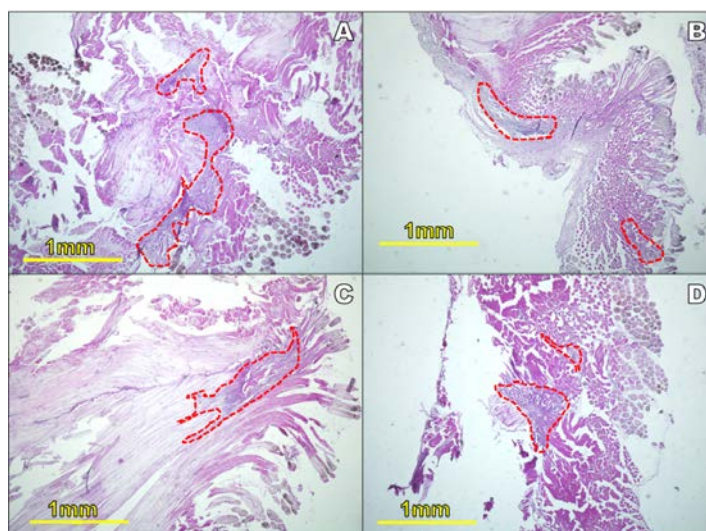


Рисунок 6.5 - Срезы икроножных мышц после инъекции экзосом из разных источников через 14 суток после введения, общий вид мест повреждения. Красными пунктирами отмечены области воспаления. **А.** Контроль, порез мышцы, заживавший без введения экзосом. **В.** После введения экзосом ЖТ-МСК; **С.** После введения КМ-МСК; **Д.** После введения М-МСК

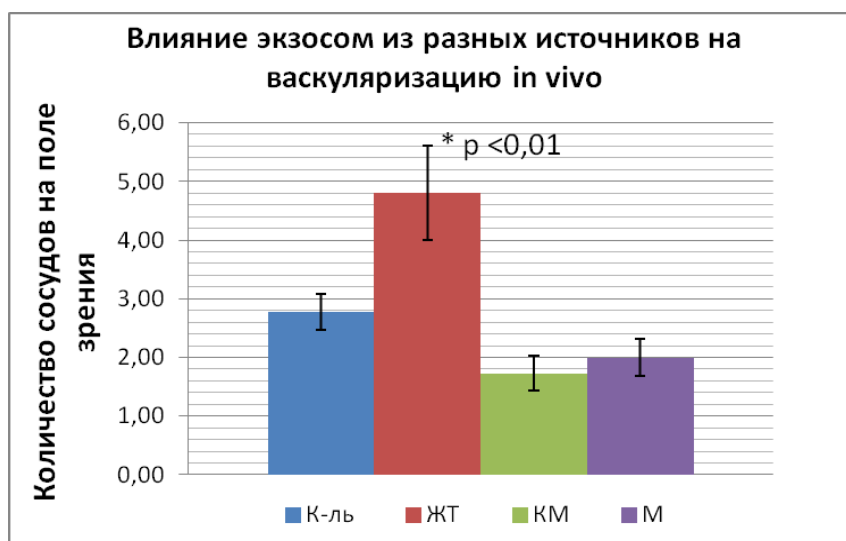


Рисунок 6.6 - Количество сосудов без введения экзосом, при введении экзосом от ЖТ-МСК, КМ-МСК и фибробластов из мышц

Регенерирующая ткань в области повреждения имела аморфную структуру, происходило замещение воспаленной ткани фибробластами, и также в центр повреждения прорастали мышечные волокна и сосуды. Количество сосудов после введения экзосом отличалось от контроля только для образца экзосом ЖТ-МСК, которые оказали положительное влияние на ангиогенез (рисунок 6.6). Для остальных источников разница с контролем оказалась не достоверна.

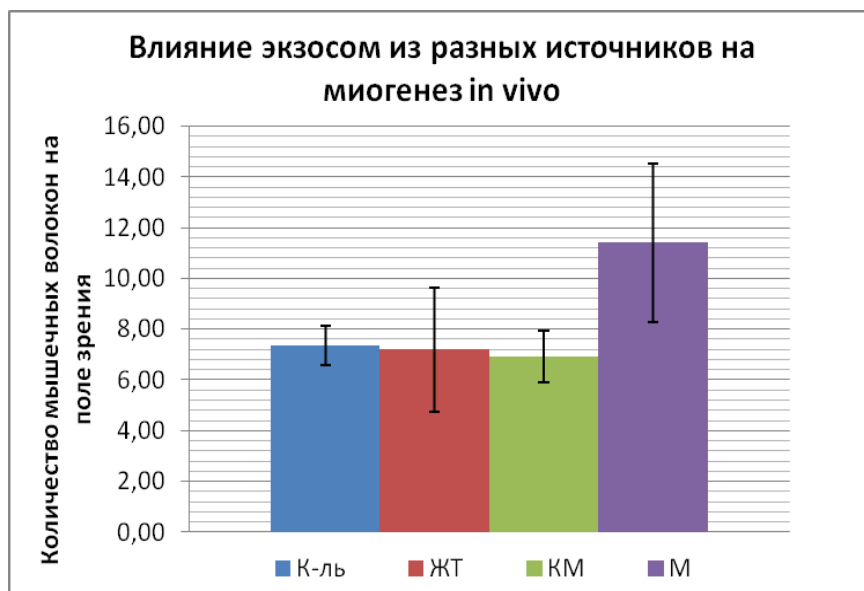


Рисунок 6.7. - Количество новообразованных мышечных волокон без введения экзосом, при введении экзосом от ЖТ-МСК, КМ-МСК и фибробластов из мышц

Усиление миогенеза, т.е. увеличение числа новообразующихся волокон, происходило при введении экзосом, полученных от фибробластов скелетных мышц (рисунок 6.7).

Таким образом, в предварительном эксперименте мы наблюдали лишь тенденцию к уменьшению воспаления при введении экзосом от КМ-МСК и усилению миогенеза при введении экзосом от фибробластов из мышц. Мы предположили, что ослабленный эффект экзосом был связан с использованием одного животного в качестве опытного и контрольного. Первоначально в одну поврежденную лапу крысы вводили контрольный образец, а в другую – опытный. Можно предположить, что экзосомы, введенные крысам в виде инъекции, попали в кровоток и распространились по организму, достигнув, в том числе, противоположной лапы, на которую наносилась контрольная рана. Был проведен повторный эксперимент, для которого мы выбрали наиболее перспективные, на наш взгляд, источники экзосом – КМ-МСК и фибробласты из мышц. Экзосомы от ЖТ-МСК не показали положительного влияния на регенерацию мышц, оказывая влияние лишь на ангиогенез.

В повторном эксперименте с разнесенными опытом и контролем экзосомы от КМ-МСК достоверно снижали площадь воспаления, не влияя при этом существенно на васкуляризацию и миогенез (рисунки 6.8, 6.9, 6.10 и 6.11). Введение же экзосом от фибробластов из мышечной ткани приводило к усилению миогенеза, не оказывая при этом влияния на воспаление и образование сосудов.

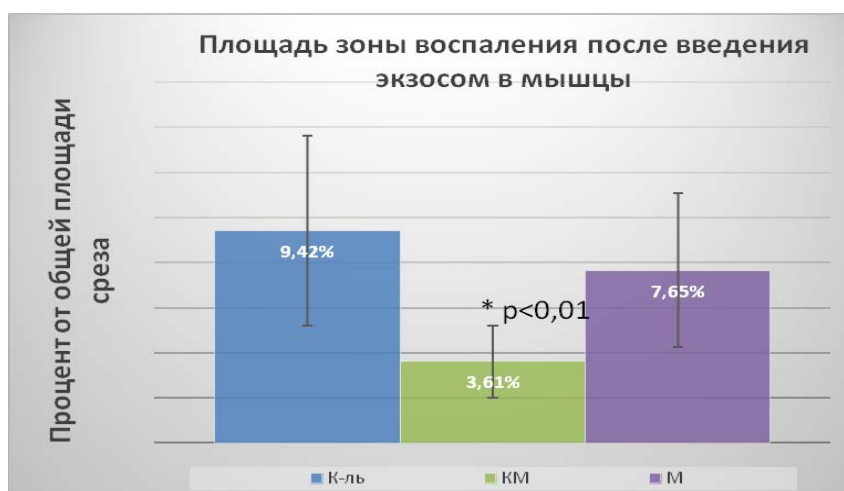


Рисунок 6.8 - Площади областей воспаления, при введении физ.раствора (контроль), экзосом от ЖТ-МСК, экзосом от КМ-МСК и экзосом от фибробластов из мышц

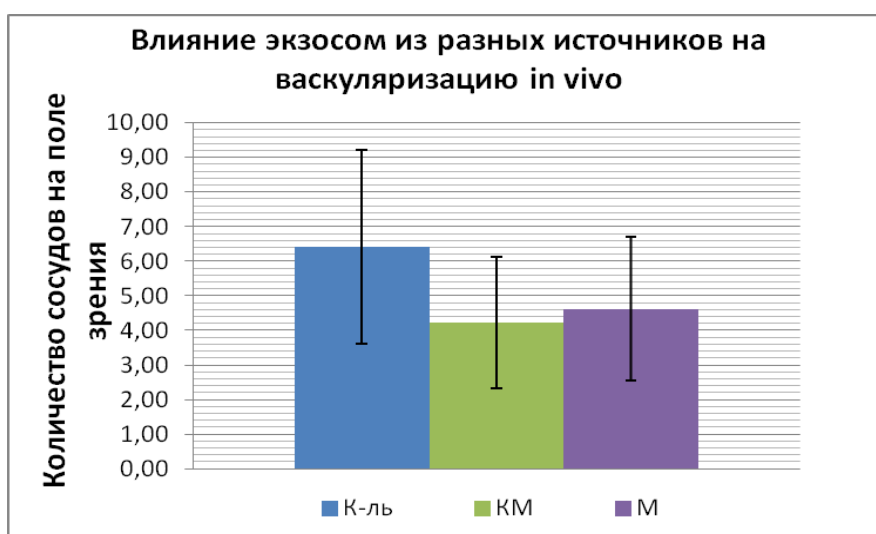


Рисунок 6.9 - Количество сосудов без введения экзосом, при введении экзосом от ЖТ-МСК, КМ-МСК и фибробластов из мышц

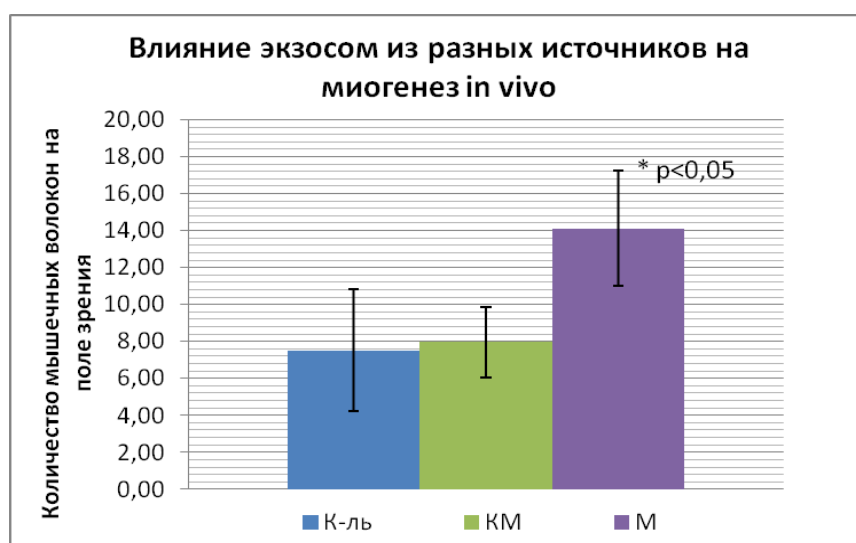


Рисунок 6.10 - Количество новообразованных мышечных волокон без введения экзосом, при введении экзосом от ЖТ-МСК, КМ-МСК и фибробластов из мышц

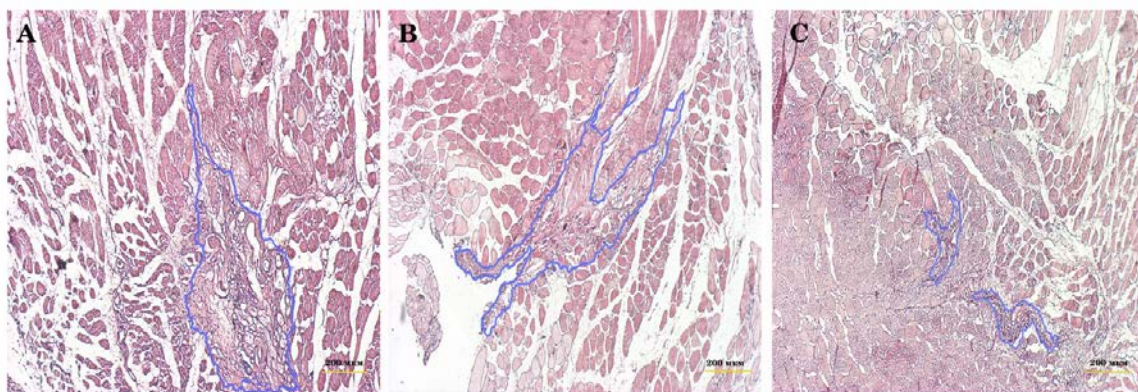


Рисунок 6.11 - Срезы икроножных мышц после инъекции экзосом из разных источников через 14 суток после введения, общий вид мест повреждения. Синими линиями отмечены области воспаления. **А.** Контроль, порез мышцы, заживавший без введения экзосом. **В.** После введения экзосом от фибробластов из мышц; **С.** После введения КМ-МСК

6.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о возможности использования экзосом от МСК костного мозга и фибробластов интактных мышц для регенерации мышечной ткани. Согласно полученным данным экзосомы из разных источников обладают разными свойствами и различным влиянием на процессы, происходящие при восстановлении мышцы после повреждения. В совокупности с результатами *in vitro* исследований, полученными нами ранее в рамках этого проекта, оптимальным источником экзосом для регенерации скелетных мышц являются, по нашему мнению, МСК костного мозга. Экзосомы из этого источника несут микроРНК, участвующие в миогенной дифференцировке, демонстрируют выраженные промиогенные и антифибротические эффекты *in vitro* и снижают воспаление *in vivo*. В дальнейшей работе перспективным представляется создание препаратов, содержащих образцы экзосом из разных источников для усиления их эффекта в совокупности *in vivo*.

Проведенное исследование находится в русле современных тенденций мировой биомедицинской науки. Его результаты открывают перспективы для использования экзосом в клинической практике при травмах и заболеваниях мышц и для таргетного использования экзосом из разных источников на разных стадиях регенерации.

6.5 СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Ju C., Shen Y., Ma G., Liu Y., Cai J., Kim I.M., Weintraub N.L., Liu N., Tang Y.J. Transplantation of Cardiac Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Promotes Repair in Ischemic Myocardium // *Cardiovasc Transl Res.* - 2018 - Oct;11(5). P. 420 - 428.
2. Grange C., Skovronova R., Marabese F., Bussolati B. Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles and Kidney Regeneration // *Cells.* – 2019. - Oct 11;8(10).

3. Damania A., Jaiman D., Teotia A.K., Kumar A. Mesenchymal stromal cell-derived exosome-rich fractionated secretome confers a hepatoprotective effect in liver injury// *Stem Cell Res Ther.* – 2018. - Feb 6; 9(1). - P. 31.
 4. Zhu Y.G., Feng X.M., Abbott J., Fang X.H., Hao Q., Monsel A., Qu J.M., Matthay M.A., Lee J.W. Human mesenchymal stem cell microvesicles for treatment of Escherichia coli endotoxin-induced acute lung injury in mice // *Stem Cells.* – 2014. - Jan; 32(1). -P. 116 - 25.
 5. Zhang B., Wang M., Gong A., Zhang X., Wu X., Zhu Y., Shi H., Wu L., Zhu W., Qian H., Xu W. HucMSC-Exosome Mediated-Wnt4 Signaling Is Required for Cutaneous Wound Healing // *Stem Cells.* – 2015. - Jul; 33(7). – P. 2158 - 68.
 6. Mori R., Kamei N., Okawa S., Nakabayashi A., Yokota K., Higashi Y., Ochi M. Promotion of skeletal muscle repair in a rat skeletal muscle injury model by local injection of human adipose tissue-derived regenerative cells. // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* - 2015. - T. 9, № 10 - C. 1150 – 60.
- Muhammad S.A. Mesenchymal stromal cell secretome as a therapeutic strategy for traumatic brain injury// *Biofactors.* – 2019. - Sep 9.
7. Sheveleva O.N., Domaratskaya E.I., Payushina O.V. Extracellular Vesicles and Prospects of Their Use for Tissue Regeneration // *Biologicheskie Membrany.* 2019. V. 36. Is. 1. P. 3-14. DOI: 10.1134/S0233475518050109. (WoS) – Q4.
 8. Zhou S.B., Chiang C.A., Liu K., Li Q.F. Intravenous transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells could effectively promote vascularization and skin regeneration in mechanically stretched skin// *Br J Dermatol.* – 2015. Vol. 172(5). - P. 1278 - 85.
 9. Shafei A.E., Ali M.A., Ghanem H.G., Shehata A.I., Abdelgawad A.A., Handal H.R., Talaat K.A., Ashaal A.E., El-Shal A.S. Mesenchymal stem cell therapy: A promising cell-based therapy for treatment of myocardial infarction// *J Gene Med.* – 2017. - Dec; 19(12).
 10. Chen Z.Y., Hu Y.Y., Hu X.F., Cheng L.X. The conditioned medium of human mesenchymal stromal cells reduces irradiation-induced damage in cardiac fibroblast cells// *J Radiat Res.* – 2018. - Sep 1;59(5) - P. 555 - 564.
 11. Tsuji K., Kitamura S., Wada J. Secretomes from Mesenchymal Stem Cells against Acute Kidney Injury: Possible Heterogeneity// *Stem Cells Int.* 2018 Dec 16;2018:8693137.
 12. Alfaifi M., Eom Y.W., Newsome P.N., Baik S.K. Mesenchymal stromal cell therapy for liver diseases// *J Hepatol.* - 2018 Jun. - Vol. 68(6). - P. 1272 - 1285.
 13. Sassoli C., Pini A., Chellini F., Mazzanti B., Nistri S., Nosi D., Saccardi R., Quercioli F., Zecchi-Orlandini S., Formigli L. Bone marrow mesenchymal stromal cells stimulate skeletal myoblast proliferation through the paracrine release of VEGF // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7(7). – P. e37512.

14. Arthur A., Zannettino A., Gronthos S. The therapeutic applications of multipotential mesenchymal/stromal stem cells in skeletal tissue repair // J Cell Physiol. - 2009 Feb. – Vol. 218(2). – P. 237 - 45.
15. Andrade B.M., Baldanza M.R., Ribeiro K.C., Porto A., Peçanha R., Fortes F.S.A., Zapata-Sudo G., Campos-de-Carvalho A.C., Goldenberg R.C.S., Werneck-de-Castro J.P. Bone marrow mesenchymal cells improve muscle function in a skeletal muscle re-injury model//PLOS One. - 2015. - V. 10. - N 6. - P. e0127561
16. Payushina O.V., Domaratskaya E.I., Sheveleva O.N. Participation of Mesenchymal Stromal Cells in Muscle Tissue Regeneration // Zhurnal Obshchei biologii. – 2019. – V. 80. – Is. 1. – P. 3-13. DOI: 10.1134/S0044459619010044. (WoS) – Q4.
17. Kozłowska U., Krawczenko A., Futoma K., Jurek T., Rorat M., Patrzalek D., Klimczak A. Similarities and differences between mesenchymal stem/progenitor cells derived from various human tissues// World J Stem Cells. - 2019 Jun 26. Vol. 11(6). - P. 347 – 374.
18. Kruger N.J. The Bradford method for protein quantitation// Methods Mol. Biol. - 1994. - Vol. 32. - P. 9 - 15.

6.6 ОТЧЕТНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО РАЗДЕЛУ

1. **Sheveleva O.N., Domaratskaya E.I., Payushina O.V.** Extracellular Vesicles and Prospects of Their Use for Tissue Regeneration // Biologicheskie Membrany. 2019. V. 36. Is. 1. P. 3-14. DOI: 10.1134/S0233475518050109. (WoS) – Q4.
2. **Payushina O.V., Domaratskaya E.I., Sheveleva O.N.** Participation of Mesenchymal Stromal Cells in Muscle Tissue Regeneration // Zhurnal Obshchei biologii. – 2019. – V. 80. – Is. 1. – P. 3-13. DOI: 10.1134/S0044459619010044. (WoS) – Q4.

РАЗДЕЛ 7. ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ ПРОЯВЛЕНИЙ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА КАК ВАЖНАЯ ЗАДАЧА ТРАНСЛЯЦИОННОЙ МЕДИЦИНЫ ДЛЯ СОЗДАНИЯ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ И ПРЕВЕНТИВНОЙ ТЕРАПИИ

7.1 ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Паркинсона (БП) является одним из наиболее распространенных в мире нейродегенеративных заболеваний, уступая по количеству больных только болезни Альцгеймера. Заболевание сопровождается характерными симптомами – мышечной ригидностью, постуральной неустойчивостью, тремором покоя, которые являются следствием тяжелой степени деградации нейронов нигростриатной системы головного мозга. Из-за задержки проявления указанных симптомов вследствие активации компенсаторных процессов в головном мозге, теряется своевременность, а значит, и эффективность фармакологической терапии этого заболевания. По сути, лечение БП на клинической стадии сводится только к уменьшению симптоматических проявлений для улучшения качества жизни, а на поздних стадиях – к оказанию паллиативной помощи. Эффективных методов фармакотерапии, непосредственно влияющих на патологический процесс и способных его остановить и тем более обратить вспять, в настоящее время не существует [1].

Помимо моторных нарушений, связанных с дегенерацией нигростриатной системы, при БП наблюдаются также обширные системные проявления в различных периферических органах, являющиеся следствием периферической нейродегенерации. Наиболее изученными немоторными проявлениями БП на данный момент являются нарушения функции перистальтики, обоняния и сна [2, 3]. В свою очередь, ряд более специфических и локальных дисфункций, таких как зрительные нарушения, нарушения мочеполовой системы, изменение болевой чувствительности, повышение усталости и т.д., охарактеризован пока менее подробно [4-6]. Некоторые авторы предпринимают различные попытки классификации данных признаков, например, по физиологическим проявлениям [7, 8] или по типу нервной системы, затронутой дегенеративными процессами [7].

Учитывая все сказанное, критически важным становится исследование периферических патологических процессов и проявлений БП, характерных для нее на ранних стадиях развития, которые могли бы стать ключевыми биомаркерами для ранней диагностики. Наличие надежных премоторных симптомов, которые указывали бы на начало развития БП, дало бы возможность разрабатывать нейропротекторную терапию. Такая терапия позволила бы затормозить развитие заболевания и в перспективе –

предотвратить проявление моторных симптомов до ожидаемого возраста дожития. Помимо надежности и специфичности необходимых диагностических биомаркеров, они также должны отвечать критериям простоты и доступности для выявления, если рассматривать их в перспективе применения для широкой диагностики и диспансеризации населения [1].

Текущий этап работы данного проекта посвящен изучению возможных нарушений в тканях сердца на моделях доклинической и ранней клинической стадии БП у животных. У больных с БП происходит дегенерация периферической нервной системы, что приводит к денервации сердца, подтверждаемой функциональными исследованиями [9, 10]. В качестве ключевых показателей десимпатизации сердца нами были выбраны активность и содержание белка тирозингидроксилазы (ТГ) в тканях сердца мышей, поскольку она является скорость-лимитирующим ферментом в метаболическом пути биосинтеза норадреналина и дофамина и содержится в норадренергических нейронах симпатической нервной системы. Кроме того, снижение уровня ТГ-иммунореактивности в сердце было показано на людях [11]. Очевидно, что процесс нейродегенерации сопровождается нарушением метаболических процессов, что можно обнаружить по изменению концентрации соответствующего нейромедиатора. В случае, если экспериментальные модели БП корректно воспроизводят патологические процессы, наблюдаемые в сердце больных с БП, эти модели можно использовать для поиска периферических маркеров для ранней диагностики заболевания.

7.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

7.2.1 Моделирование доклинической и ранней клинической стадий болезни Паркинсона. В работе использовали самцов мышей линии C57Bl/6 в возрасте 2-2.5 месяцев и массой 22-26 г, полученных из питомника «Пушино». Животных содержали в стандартных условиях вивария ($22 \pm 1^\circ\text{C}$, свет с 8.00 часов до 20.00 часов) со свободным доступом к пище и воде. Модель БП на доклинической стадии воспроизводили двукратным подкожным введением 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП) (Sigma, США) в разовой дозе 8 мг/кг, модель БП на ранней клинической стадии – четырехкратным подкожным введением МФТП в разовой дозе 10 мг/кг. В обоих случаях интервал между инъекциями составлял 2 часа [12]. Животным контрольных групп вводили 0.9% NaCl по аналогичным схемам.

Перед введением МФТП или NaCl мышей оценивали по показателю пройденного пути в тесте «открытое поле» в течение 6 минут с помощью установки для анализа поведения животных PhenoMaster (TSE Systems, Германия). Через 2 недели после

введения МФТП или NaCl проводилось повторное измерение моторного поведения животных.

7.2.2 Сбор биологического материала у мышей. Для оценки степени снижения уровня дофамина в нигростриатной системе экспериментальных животных, из мозга декапитированных мышей выделяли дорсальный стриатум согласно ранее описанной методике [12]. Пробы стриатума взвешивали, замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C до биохимического анализа.

7.2.3 Количественный анализ моноаминов методом ВЭЖХ с электрохимической детекцией. Все количественные измерения содержания биогенных аминов в исследуемых тканях проводили методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с электрохимической детекцией.

Пробы гомогенизировали с помощью ультразвукового гомогенизатора Labsonic M (Sartorius, Франция) в 0.1 N HClO₄ (Sigma, США), содержащих внутренний стандарт 3,4-дигидроксibenзиламин (ДГБА, Sigma), после чего центрифугировали 20 мин при 2000g.

ВЭЖХ-разделение осуществляли на обращенно-фазной колонке ReproSil-Pur, ODS-3, 4x100 мм с диаметром пор 3 мкм (Dr. Majsch GMBH, Германия) при температуре +30°C и скорости подвижной фазы 1.2 мл/мин, поддерживаемой жидкостным хроматографом LC-20ADsp (Shimadzu, Япония). В состав мобильной фазы входили: 0.1 М цитратно-фосфатный буфер, 0.3 mM октансульфат натрия, 0.1 mM ЭДТА и 9% ацетонитрил (все реактивы – Sigma), pH 2.5. Электрохимический детектор Decade II (Antec Leyden, Нидерланды) был укомплектован стеклоуглеродным рабочим электродом (+0.85 V) и Ag/AgCl электродом сравнения. Пики биогенных аминов и метаболитов идентифицировали по времени их выхода в стандартном растворе. Содержание веществ рассчитывали методом внутреннего стандарта относительно пика ДГБА, используя отношение площадей пиков в стандартной смеси и в образце с помощью программного обеспечения LabSolutions (Shimadzu).

7.2.4 Анализ содержания белка тирозингидроксилазы методом вестерн блота. Методом вестерн блота определяли количественное содержание ТГ в тканях предсердий мышей на обеих модельных стадиях развития БП. Гомогенизированную ткань разделяли методом денатурирующего электрофореза в 14%-ном полиакриламидном геле на установке для вертикального фореа (Bio-Rad, США). В ней же осуществляли дальнейший перенос разделенных веществ с геля на мембрану для последующего нанесения антител. Первичные антитела к ТГ (T1299 mouse monoclonal TH, Sigma, США) наносили на мембрану при 4°C в течение суток, после чего обрабатывали вторичными (31436 goat anti-mouse peroxidase, ThermoFisher, США) антителами с пероксидазной меткой.

Визуализацию мембран проводили на приборе ChemiDoc Touch (Bio-Rad, США), количественную обработку проводили с использованием прилагаемого программного обеспечения.

7.2.5 Определение активности тирозингидроксилазы в тканях сердца мышей.

Изменение активности фермента ТГ изучали на модели различных стадий развития БП, сопоставляя с ее активностью в контроле. Реакцию синтеза L-ДОФА из тирозина, катализируемую в организме ТГ, воспроизводили в условиях *in vitro*. В реакции проверяли активность ТГ, полученной из ткани желудочков сердца мышей, собранных у животных на модели доклинической и ранней клинической модели БП.

Поскольку реакция протекает в присутствии кофакторов, которыми в организме являются эндогенные птерины и ионы железа, для проведения реакции помимо субстрата добавлялись соответствующие вещества: тетрагидробиоптерин (DMPH_4) и сульфат железа(II)-аммония качестве источника ионов Fe^{2+} . Кроме того, чтобы исключить дальнейшее превращение L-ДОФА в дофамин, применяли 3-гидроксibenзилгидразина дигидрохлорид (NSD-1015) – ингибитор указанной реакции.

Итоговый состав реакционной смеси: тирозин – 50 мкмоль/л; NSD-1015 – 50 мкмоль/л; DMPH_4 – 50 мкмоль/л, $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ – 50 мкмоль/л; супернатант гомогената желудочка сердца – 0,01 мг ткани/мл.

Полученные значения содержания L-ДОФА после остановки реакции обрабатывали статистически и нормировали на среднее значение для контрольной группы животных.

Реакцию проводили следующим образом. В пробирке на 0,6 мл в фосфатно-солевом буфере смешивались кофакторы (DMPH_4 , железа(II)-аммония сульфат), а также NSD-1015. Полученные неполные реакционные смеси термостатировали при 37°C, оптимальной температуре для работы ТГ [13], в течение 3 минут. Далее к растворам быстро и последовательно добавлялись аликвоты субстрата (тирозина) и фермента (в виде супернатанта тканевого гомогената – источника эндогенной ТГ). Затем полученный набор из точек всех экспериментальных вариантов термостатировался при той же температуре в течение 30 минут для проведения реакции. По истечении времени реакция в пробирках останавливалась строго в той же последовательности, что и добавлялся тирозин, для соблюдения точности времени инкубации. Для остановки реакции в пробирку добавляли 50 мкл 0,1Н хлорной кислоты, содержащей 200 пмоль/мл внутреннего стандарта (ДГБА) и немедленно охлаждали в жидком азоте, после чего помещали в термостатированную ячейку хроматографа для последующего ВЭЖХ-анализа.

7.2.6 Статистический анализ. Полученные данные были проверены на соответствие нормальному распределению с помощью критерия Шапиро-Уилка. Выбросы определяли с помощью диаграммы «ящик с усами» и исключали из дальнейшего анализа. Статистический анализ результатов проводили с помощью двухстороннего непарного t-теста Стьюдента с критерием статистической значимости $p < 0,05$ в программном пакете GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, США). Данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего.

7.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

7.3.1 Воспроизведение моделей болезни Паркинсона. Для решения поставленных задач проводилось экспериментальное моделирование БП на мышах. Были использованы две модели, воспроизводящие интересующие нас стадии развития БП: доклиническую и раннюю клиническую. Обе стадии моделировались на мышах с помощью инъекций МФТП – специфического токсина нейронов nigrostriatной системы головного мозга.

Критерием успешного воспроизведения на модели доклинической либо клинической стадии БП является, во-первых, факт отсутствия/проявления симптомов двигательных нарушений, соответственно; во-вторых, степень гибели дофаминергических нейронов черной субстанции и их отростков в стриатуме, приводящая к снижению уровня дофамина в стриатуме до/ниже уровня порога (20-30% от нормы) [14].

В стриатуме мышей было показано снижение уровня дофамина на 67% на модели доклинической и на 89% - на модели клинической стадии БП. Результаты изменения уровня дофамина в стриатумах мышей в исследованных группах показаны на рисунке 7.1.

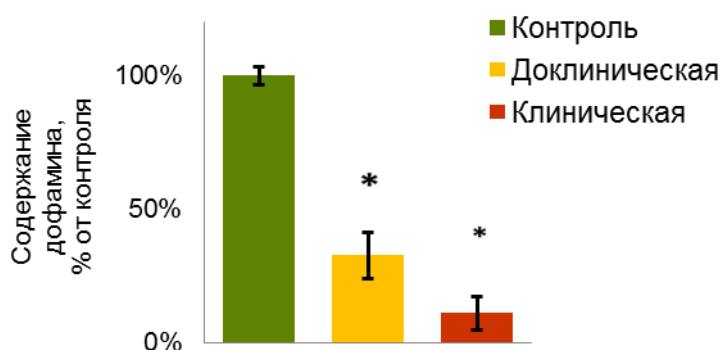


Рисунок 7.1 - Концентрация дофамина в ткани стриатума мышей на моделях доклинической и ранней клинической стадий (здесь и далее на графиках обозначены как «доклиническая» и «клиническая») болезни Паркинсона. Данные нормированы на контрольную группу. * $p < 0,05$ по отношению к контролю

Поведенческий тест «открытое поле» показал отсутствие нарушений поведения у группы животных с моделью доклинической стадии и достоверное снижение на 22,6% длины пройденного пути у мышей с ранней клинической стадией относительно контроля. Результаты теста «открытое поле» представлены на рисунке 7.2.

Таким образом, полученные данные указывают на адекватное воспроизведение моделей доклинической и ранней клинической стадий БП.

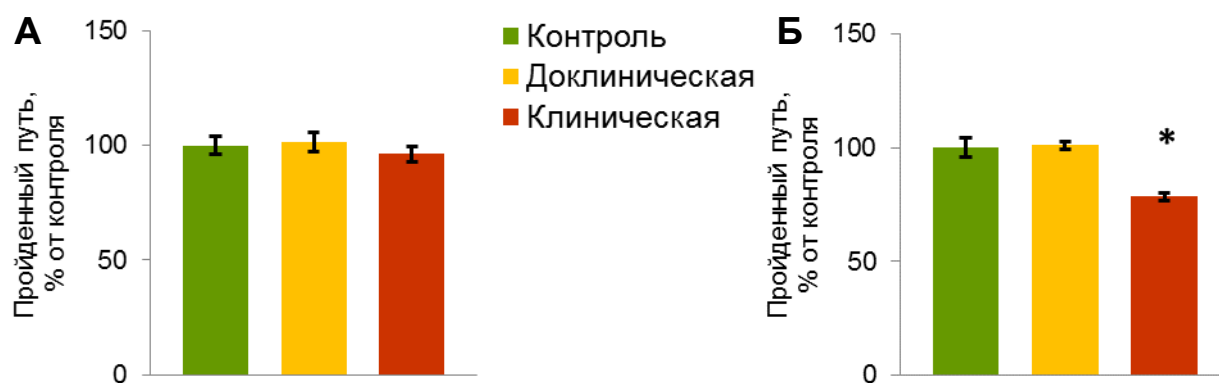


Рисунок 7.2 - Проходный путь животных, распределенных по группам, до введения МФТП (А) и через 2 недели после (Б). Данные нормированы на контрольную группу. * $p < 0,05$ по сравнению с контролем

7.3.2 Концентрация моноаминов в тканях сердца мышей. Была проанализирована концентрация моноаминов в тканях предсердий и желудочков сердца мышей на моделях обеих стадий БП. Изучалось изменение в тканях содержания норадреналина и серотонина. Концентрация обоих веществ в тканях сердца снижалась по мере развития БП – как на доклинической, так и на ранней клинической стадии. В предсердиях уровень норадреналина снижался на 61% и 74% на доклинической и клинической стадиях соответственно (рисунок 7.3А). Концентрация серотонина в предсердиях на этих стадиях падала на 51% и 63% по сравнению с контролем (рисунок 7.3Б).

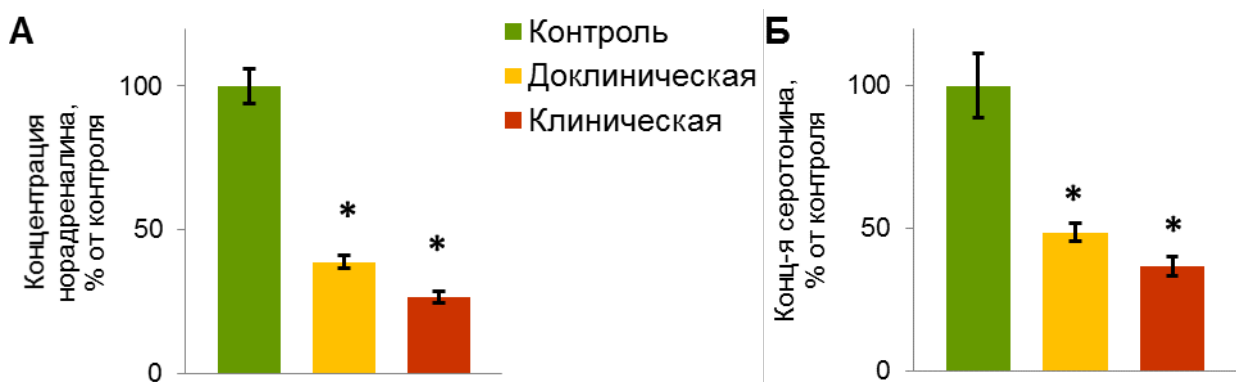


Рисунок 7.3 - Концентрация норадреналина (А) и серотонина (Б) в предсердиях на моделях болезни Паркинсона относительно контроля. * $p < 0,05$ по отношению к контролю

Похожая картина наблюдалась для обоих веществ в тканях желудочков. Было показано достоверное снижение по сравнению с контрольной группой норадреналина на модели ранней клинической стадии на 55% (рисунок 7.4А). Концентрация серотонина же

сразу опускалась на 45%, на модели доклинической стадии БП, оставаясь на этом уровне и на модели ранней клинической стадии (рисунок 7.4Б).

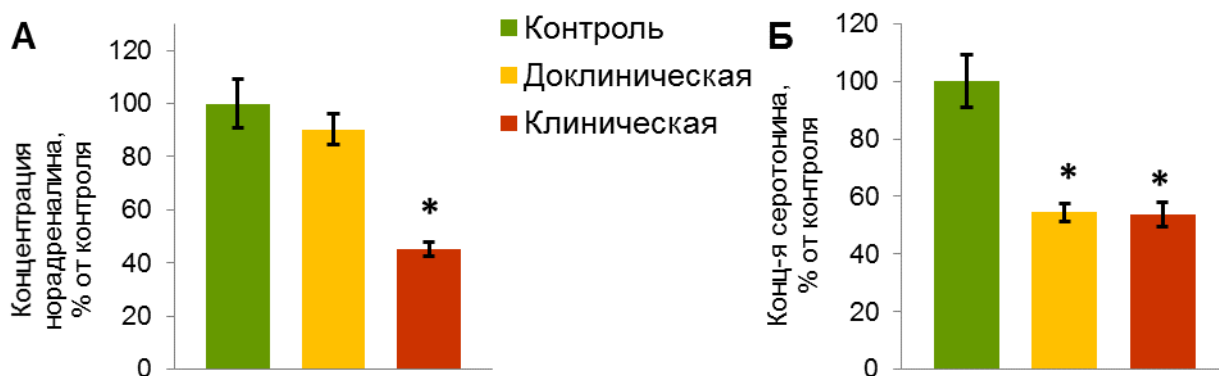


Рисунок 7.4 - Концентрация норадреналина (А) и серотонина (Б) в желудочках сердца на моделях доклинической и ранней клинической стадий болезни Паркинсона. Данные нормированы на контрольную группу. * $p < 0,05$ по отношению к контролю

7.3.3 Оценка содержания белка тирозингидроксилазы в тканях сердца мышей. В тканях предсердий на модели доклинической и ранней клинической стадий БП было обнаружено снижение уровня белка тирозингидроксилазы на 70% и 60% соответственно (рисунок 7.5).

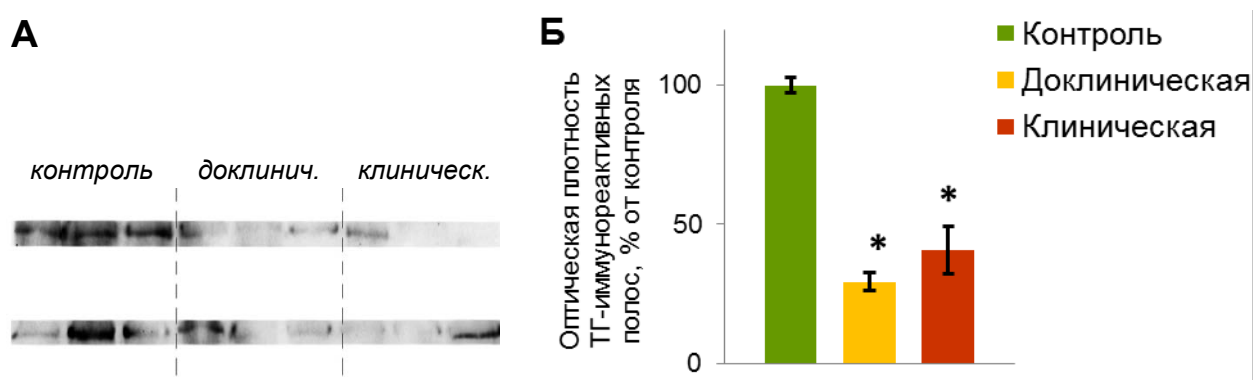


Рисунок 7.5 - Пример ТГ-иммунореактивных вестерн блот полос гомогената предсердий (А) и их оптическая плотность (Б) на моделях болезни Паркинсона. Данные нормированы на контрольную группу. * $p < 0,05$ по отношению к контролю

В желудочках сердца на модели клинической стадии БП содержание белка ТГ снижается на 40%, в то время как на модели доклинической стадии наблюдается лишь тенденция ($p < 0,15$) к снижению уровня ТГ на 25% (рисунок 7.6).

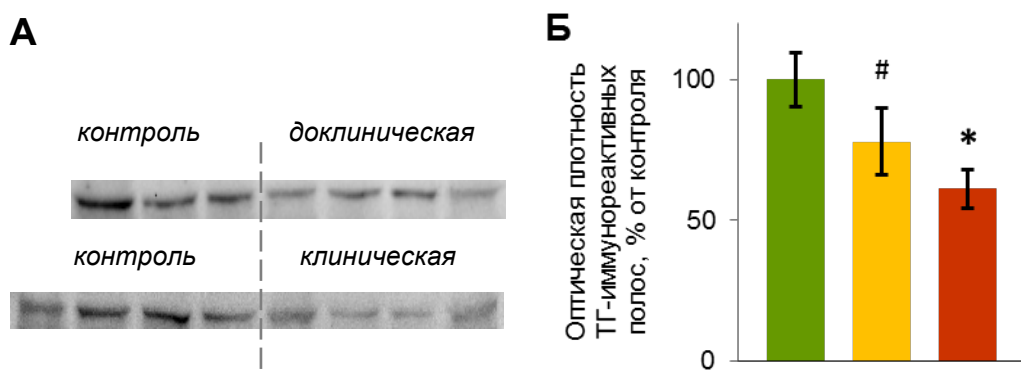


Рисунок 7.6. - Пример ТГ-иммунореактивных вестерн блот полос гомогената желудочков сердца (А) и их оптическая плотность (Б) на моделях болезни Паркинсона. Данные нормированы на контрольную группу. * $p < 0,05$, [#] $p < 0,15$ по отношению к контролю

7.3.4 Изменение активности тирозингидроксилазы в желудочках сердца.

Сравнительное исследование активности проводили путем измерения накопления L-ДОФА в реакционной смеси при инкубации. На модели ранней клинической стадии было продемонстрировано достоверное снижение активности тирозингидроксилазы, выражающееся в снижении количества вырабатываемой в реакции L-ДОФА на 23% (рисунок 7.7). На модели доклинической стадии также наблюдалось снижение на 14%, хотя и не отличающееся от контроля достоверно ($p < 0,15$).

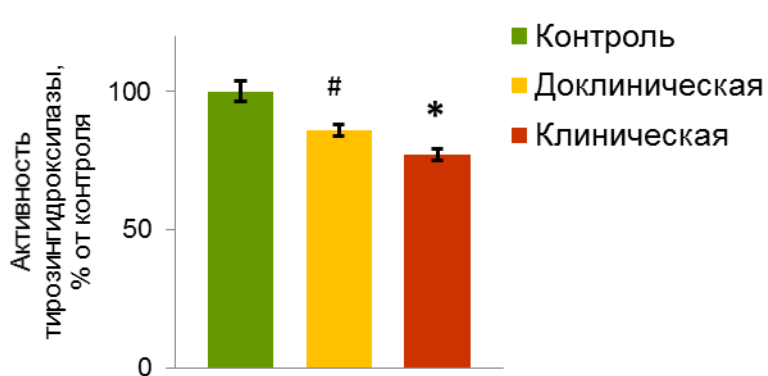


Рисунок 7.7. - Активность ТГ в желудочках сердца на моделях доклинической и ранней клинической стадий болезни Паркинсона. Данные нормированы на контрольную группу. * $p < 0,05$, [#] $p < 0,15$ по отношению к контролю дифференцировка клеток ЭХ в волокна сопровождается активацией и усилением экспрессии альфа-6, бета-8 и некоторых других интегринов

7.3.5 Использование МФТП-моделей болезни Паркинсона для воспроизведения патологии сердца. У больных с БП происходит дегенерация периферической нервной системы, что приводит к денервации ряда органов, например, желудочно-кишечного тракта и сердца [15]. Поэтому важно было проанализировать, происходит ли подобная денервация, в частности, в сердце, у мышей на моделях доклинической и ранней клинической стадий БП, и тем самым оценить, насколько адекватно использованные нами модели воспроизводят патогенез БП по этому показателю.

Ранее было показано, что при системном введении МФТП мышам в сердце снижается уровень норадреналина и дофамина, а также падает обратный захват норадреналина [16, 17, 18]. Механизмом, обуславливающим эффект МФТП на сердце, может быть его захват с помощью транспортера норадреналина в норадренергические нейроны и превращение в них в активную форму токсина МФТП+. На это указывает то, что в сердце была обнаружена наибольшая концентрация МФТП+ по сравнению с другими внутренними органами после однократного системного введения МФТП [19]. Токсическое воздействие МФТП+ на норадренергические нейроны было показано не только *in vivo*, но и в культуре, причем гибель клеток происходит по пути апоптоза [20].

В качестве показателей, характеризующих десимпатизацию сердца, мы выбрали метаболизм моноаминов, а также содержание белка ТГ и ее ферментативную активность, поскольку она является скоростью-лимитирующим ферментом в метаболическом пути биосинтеза норадреналина и содержится в норадренергических нейронах симпатической нервной системы.

7.3.6 Изменение содержания моноаминов в сердце на моделях БП. В сердце (отдельно в тканях предсердий и желудочков) было измерено содержание норадреналина и серотонина. Продемонстрированное снижение норадреналина на модели клинической стадии БП соответствует литературным данным, указывающим на норадренергическую десимпатизацию сердца у людей [10, 21]. Оно является прямым следствием развития нейродегенеративных процессов на клинической стадии. В то же время в ткани предсердий достоверное снижение уровня норадреналина у модельных животных наступало уже на досимптомной стадии, что указывает на раннее развитие десимпатизации и на возможность использования норадреналина в качестве маркера периферической нейродегенерации на доклинической стадии БП. В ткани желудочков содержание норадреналина снижалось лишь на модели клинической стадии БП, что может указывать на неодинаковую скорость дегенерации различных постганглионарных симпатических волокон.

Помимо норадреналина, в предсердиях и желудочках сердца детектировалось относительно большое количество серотонина. При этом его содержание в тканях обоих отделов и на обеих моделях БП резко снижалось по сравнению с контролем. Учитывая, что большая часть серотонина в сердце поступает из крови, в дальнейшем планируется оценить концентрацию свободного серотонина плазмы крови как потенциального биомаркера для ранней диагностики БП.

В целом, обнаруженные нами изменения концентрации моноаминов подтверждают развитие патологических процессов в сердце уже на доклинической стадии БП до возникновения моторных нарушений.

7.3.7 Изменение содержания тирозингидроксилазы и ее ферментативной активности в сердце. Падение содержания белка ТГ в предсердиях коррелирует с падением уровня норадреналина – на доклинической стадии ее количество резко снижается на 70% и остается примерно на том же уровне на клинической стадии. Это указывает на то, что снижение синтеза норадреналина происходит из-за снижения уровня ТГ вследствие десимпатизации сердца.

В желудочках снижение уровня норадреналина выражено более умеренно по сравнению с предсердиями, что может быть вызвано, помимо денервации, различием в активности фермента тирозингидроксилазы на различных стадиях БП. Полученные данные по оценке активности ТГ *in vitro* указывают на прогрессирующее снижение активности фермента, достоверно снижающееся к моменту наступления клинической стадии. Плавная тенденция по снижению активности фермента говорит о совместном вкладе десимпатизации и снижения ферментативной активности ТГ в изменение синтеза норадреналина на моделях БП.

Таким образом, полученные результаты указывают на то, что десимпатизация сердца начинается с предсердий, где ее проявления развиваются уже на модели доклинической стадии БП, в то время как в желудочках сердца наиболее яркие патологические изменения проявляются только на клинической стадии заболевания.

7.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые был проведен комплексный биохимический и молекулярно-биологический анализ состояния сердца у мышей на нейротоксических моделях доклинической и ранней клинической стадий БП. Полученные результаты указывают на то, что десимпатизация сердца начинается с предсердий, где ее проявления развиваются уже на модели доклинической стадии БП, в то время как в желудочках сердца наиболее яркие патологические изменения проявляются только на клинической стадии заболевания. Это связано как с непосредственно процессами гибели симпатических норадренергических волокон, так и с уменьшением ферментативной активности тирозингидроксилазы в выживших волокнах.

Таким образом, МФТП модели БП у мышей достаточно корректно воспроизводят характерные для больных с БП патологические процессы в сердце, что позволяет

использовать эти модели для соответствующих исследований и разработки ранней диагностики БП.

7.5 СПИСОК ЦИТИРУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Угрюмов, М.В. и другие Разработка доклинической диагностики и превентивного лечения нейродегенеративных заболеваний // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова –2015. –Т. 115, № 11. – С. 4 – 14.
2. Postuma, R.B. Nonmotor Aspects of Parkinson's Disease — How Do They Help Diagnosis? // International Review of Neurobiology – 2017. – Vol. 133. – P. 519 – 539.
3. St Louis, E.K. REM Sleep Behavior Disorder in Parkinson's Disease and Other Synucleinopathies. / E.K. St Louis [et al.] // Movement Disorders –2017. –Vol. 32. – P. 645 – 658.
4. Archibald, N.K. The retina in Parkinson's disease // Brain. – 2009. –Vol. 132. – P. 1128 – 1145.
5. Kim A. Biochemical changes in the visual system in mice models of Parkinson's disease / A. Kim [et al.] // FEBS OPEN BIO. –2019. – V. 9. – Is. 1. – P. 233. WOS:000486972403115.
6. Titova, N. The Nonmotor Features of Parkinson's Disease // International Review of Neurobiology –2017. –Vol. 132. – P. 33 – 54.
7. Jellinger, K.A. Neuropathobiology of non-motor symptoms in Parkinson disease // Journal of Neural Transmission – 2015. –Vol. 122, № 10. – P. 1429 – 1440.
8. Sauerbier, A. Nonmotor Subtyping in Parkinson's Disease // International Review of Neurobiology –2017. – Vol. 133. – P. 447 – 478.
9. Goldstein, D. S. A vesicular sequestration to oxidative deamination shift in myocardial sympathetic nerves in Parkinson's disease // Journal of Neurochemistry – 2014. – Vol. 131. – P. 219 – 228.
10. Goldstein, D. S. Dysautonomia in Parkinson Disease // Comprehensive Physiology – 2014. – P. 805 – 826.
11. Orimo, S. Sympathetic cardiac denervation in Parkinson's disease and pure autonomic failure but not in multiple system atrophy // Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry – 2002. – Vol. 73. – P. 776 – 777.
12. Kim A., Nigmatullina R., Zalyalova Z., Soshnikova N., Krasnov A., Vorobyeva N., Georgieva S., Kudrin V., Narkevich V., Ugryumov M. Upgraded Methodology for the Development of Early Diagnosis of Parkinson's Disease Based on Searching Blood Markers in

Patients and Experimental Models // Molecular Neurobiology – 2019. – Vol. 56. – P. 3437 – 3450.

13. Hirata Y., Togari A., Nagatsu T. Studies on Tyrosine Hydroxylase System in Rat Brain Slices Using High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection // Journal of Neurochemistry – 1983. – Vol. 40. – P. 1585 – 1589.

14. Ugrumov, M. V. Modeling of presymptomatic and symptomatic stages of parkinsonism in mice // Neuroscience – 2011. – Vol. 181. – P. 175 – 188.

15. Comi, C. Peripheral nervous system involvement in Parkinson's disease: evidence and controversies // Parkinsonism Relat Disord – 2014. – Vol. 20, №. 12. – P. 1329 – 1334.

16. Takats H. Significant reduction of 125I-meta-iodobenzylguanidine accumulation directly caused by 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine, a toxic agent for inducing experimental Parkinson's disease // Nucl Med Com – 2002. – Vol. 23, №. 2. – P. 161-166.

17. Fukumitsu N. Reduced 125 I-meta-iodobenzylguanidine uptake and norepinephrine transporter density in the hearts of mice with MPTP-induced parkinsonism // Nucl Med Biol. – 2006. – Vol. 33, №. 1. – P. 37 - 42.

18. Amino T. Myocardial nerve fibers are preserved in MPTP-treated mice, despite cardiac sympathetic dysfunction // Neuroscience research – 2008. – Vol. 60, №. 3. – P. 314 - 318.

19. Fuller R.W. Concentrations of MPTP and MPP+ in relation to catecholamine depletion after the oral or subcutaneous administration of MPTP to mice // Life Sci – 1989. – Vol. 45, №. 22. – P. 2077 - 2083.

20. Cano-Jaimez M. Vulnerability of peripheral catecholaminergic neurons to MPTP is not regulated by α -synuclein // Neurobiol Dis. – 2010. – Vol. 38, №. 1. – P. 92 - 103.

21. Scorza, F.A. Cardiac abnormalities in Parkinson's disease and Parkinsonism // J. Journal of Clinical Neuroscience – 2018. – Vol. 53. – P. 1 – 5.

7.6 ОТЧЕТНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО РАЗДЕЛУ

1. **Kim A., Pavlova E, Bogdanov V., Safandeev V., Ugrumov M.** Biochemical changes in the visual system in mice models of Parkinson's disease // FEBS OPEN BIO. 2019. V. 9. Is. 1. P-24-036. P.233-234. WOS:000486972403115. (WoS) – Q4.

ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С использованием широкого спектра методических подходов и экспериментальных моделей проведены исследования некоторых механизмов развития и способов коррекции заболеваний человека с использованием биомедицинских технологий. На клеточной модели мышечной дистрофии Ландузи-Дежерина выявлено взаимное влияние МСК и миобластов. Показано, что immortalized миобласты от пациентов с данным заболеванием стимулируют пролиферацию МСК, а также влияют на синтез и секрецию белков внеклеточного матрикса в норме и в условиях воспаления. При этом МСК мешают слиянию миобластов и формированию миотубул. На основе immortalized кератиноцитов человека HaCaT получены новые клеточные линии, моделирующие простой БЭ (ПБЭ) *in vitro*. Разработаны направляющие РНК для системы редактирования генома на основе CRISPR/Cas9, позволяющие вносить целевые изменения в ген KRT5, кодирующий цитокератин 5, мутации в котором вызывают ПБЭ. Разработан протокол получения эквивалентов кожи из мутантных клеток для оценки их способности реконструировать базальную мембрану. Отработана модель травмы периферического нерва у мышей; разработан кондуит (сосудистый протез) на основе желатинового гидрогеля для бесшовного соединения перерезанного нерва. Продemonstrировано, что созданная на его основе и заселенная нейральными клетками биоинженерная конструкция способна поддерживать функциональное восстановление после повреждения периферического нерва. Получены трансгенные нейральные культуры с флуоресцентным кальциевым индикатором GCaMP6s, которые визуализируют физиологическую активность нейронов. Показаны существенные различия в генной экспрессии нейронов, полученных из НСК разного возраста, что поддерживает гипотезу об истощении в культуре нейро-дифференцировочного потенциала. Популяция СПК исследована на разных этапах эмбрионального и постнатального развития мыши; продемонстрировано, что по происхождению СПК близки к КС и могут быть использованы в качестве их замены в клеточных технологиях воспроизведения сперматогенеза. Показано, что площадь воспаления в поврежденной мышце уменьшается при введении экзосом от МСК костного мозга; экзосомы от МСК жировой ткани усиливают ангиогенез, а экзосомы от фибробластов intactных мышц положительно влияют на миогенез. Проведен комплексный биохимический и молекулярно-биологический анализ состояния сердца у модельных мышей на нейротоксических моделях доклинической и ранней клинической стадий БП. Доказано, что МФТП-модели БП у мышей достаточно корректно воспроизводят характерные для больных патологические процессы в сердце, что

позволяет использовать эти модели для соответствующих исследований и для разработки ранней диагностики БП.

В целом, полученные результаты демонстрируют перспективность использования выбранных подходов и методов для коррекции врожденных и приобретенных тяжелых заболеваний человека и позволяют продвигаться в направлении практического внедрения биомедицинских технологий в здравоохранение.

Отчет о выполнении темы № 9: «Разработка биомедицинских технологий для диагностики, профилактики и коррекции социально значимых заболеваний» (№ НИОКТР АААА-А19-119101690033-6) Государственного задания на 2019 год был рассмотрен и утвержден на Ученом совете ИБР РАН (Протокол №14 от 27.12.2019 г.)