

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

УДК 576.5

Рег. № ГЗ 0108-2019-0004

Рег. № НИОКТР АААА-А19-119032190082-6

УТВЕРЖДАЮ

Директор ИБР РАН
доктор биологических наук,
член-корреспондент РАН

А.В. Васильев

«29» декабря 2020 г.



ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

МЕХАНИЗМЫ КЛЕТОЧНОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ В МОРФОГЕНЕЗЕ И ПРОЦЕССАХ
ВОССТАНОВЛЕНИЯ

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

(заключительный отчет)

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

Е.А. Воротеляк
29.12.2020

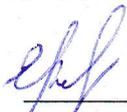
Е.А. Воротеляк

подпись, дата

Москва 2019

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

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


29.12.2020
подпись, дата

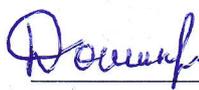
Е.А. Воротеяк
(Введение, раздел 3)

Исполнители:
Главный научный сотрудник, доктор
биологических наук, профессор


29.12.2020
подпись, дата

В.В Терских (раздел 1)

Старший научный сотрудник, кандидат
биологических наук


29.12.2020
подпись, дата

Э.Б. Дашинимаев
(раздел 2)

Руководитель, главный научный
сотрудник, доктор медицинских наук


29.12.2020
подпись, дата

И.В. Лядова (раздел 4)

Главный научный сотрудник, доктор
биологических наук


29.12.2020
подпись, дата

М.А. Александрова
(раздел 5)

Старший научный сотрудник, кандидат
медицинских наук


29.12.2020
подпись, дата

А.В Кузнецова (раздел 5)

Старший научный сотрудник, кандидат
биологических наук


29.12.2020
подпись, дата

Я.Р. Мусинова (раздел 6)

Ведущий научный сотрудник, доктор
биологических наук


29.12.2020
подпись, дата

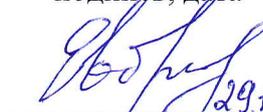
Е.С. Васецкий (раздел 6)

Главный научный сотрудник, доктор
биологических наук, профессор


29.12.2020
подпись, дата

В.Я. Бродский (раздел 7)

Нормоконтроль, ведущий научный
сотрудник, кандидат биологических
наук


29.12.2020
подпись, дата

Е.Б. Абрамова

РЕФЕРАТ

Отчёт 153 с., 7 разд., 62 рис., 3 таблицы, 194 источников, 30 отчетных публикаций по теме

РЕГЕНЕРАЦИЯ, МОРФОГЕНЕЗ, ЭПИДЕРМИС, КЕРАТИНОЦИТЫ, КУЛЬТУРА КЛЕТОК, КОЖА, БАЗАЛЬНАЯ МЕМБРАНА, ВОЛОСЯНОЙ Фолликул, АНАГЕН, КАТАГЕН, RIPK КИНАЗЫ, ИНДУЦИРОВАННЫЕ ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ КЛЕТКИ, МЕЗЕНХИМНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ, ЭКЗОСОМЫ, МЫШЦЫ, ЦЕРЕБРАЛЬНЫЕ ОРГАНОИДЫ, СЕТЧАТКА, ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ, СИГНАЛЫ ЯДЕРНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ, СЕРДЕЧНЫЙ ТРОПОНИН, ФИБРИЛЛАРИН, CRISPR/CAS9, ГЕННЫЙ НОКАУТ, ГЕПАТОЦИТЫ, ИШЕМИЯ, РИТМ СИНТЕЗА БЕЛКА

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

Объекты исследования: культура клеток кожи человека и мыши; кожа человека и мыши; реконструированный эпидермис; индуцированные плюрипотентные клетки человека, экспрессирующие элементы системы TetON-NGN2, а также флуоресцентный кальциевый индикатор GCamp6s; экспрессирующие химерные белки dCas9-SunTug + scFv-GCN4-VP64 или dCas9-VP160 линии фибробластов 1608hT; клетки ретинального пигментного эпителия человека; церебральные органоиды; периферические нервы и головной мозг мышей; мезенхимные стромальные клетки; мышцы крыс; полученные от мезенхимных стромальных клеток экзосомы; нейропротекторные пептиды семакс и HLDF-6, а также пептид, имитирующий N-конец PAR1.

Продемонстрирована экспрессия RIPK киназ при физиологической регенерации волосяного фолликула человека и мыши, исследован характер пролиферации и дифференцировки эпидермальных кератиноцитов в реконструированном эпидермисе человека, подтвердивший его полную идентичность нативному эпидермису;

созданы новые клеточные модели на основе индуцированных плюрипотентных клеток, экспрессирующих транскрипционный фактор NGN2 под индуцибельным тетрациклиновым промотером для эффективной нейральной дифференцировки, а также флуоресцентный кальциевый индикатор GCamp6s для наблюдений за электрической активностью нейронов;

на основе системы CRISPR с помощью активирующих систем удалось активировать экспрессию регулирующего гаметогенез гена *DAZL* и генов плюрипотентности *OCT4* и *SOX2*;

показано, что экзосомы являются основным агентом, определяющим антифибротические свойства мезенхимных стромальных клеток, положительно влияют на миогенез;

получены первые данные о возможности индуцировать экспрессию пронейтральных маркерных молекул в клетках ретинального пигментного эпителия;

продемонстрировано, что участки нуклеотид-связывающих белков прокариот содержат мотивы, способные функционировать в качестве сигналов ядерной локализации;

исследованы противовоспалительное и цитопротекторное действие неканонического синтетического пептида-агониста PАР1 при ишемии и воспалении;

показан организующий эффект пептидов семакс и HLDF-6 на кинетику синтеза белка в гепатоцитах *in vivo*.

Полученные результаты вносят значительный вклад в понимание механизмов механизмы клеточной дифференцировки и пластичности, регенерации тканей и способов ее стимуляции, а также создают предпосылки для развития новых технологий в биомедицине.

СОДЕРЖАНИЕ

ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ.....	7
ОБЩЕЕ ВВЕДЕНИЕ.....	9
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	111
РАЗДЕЛ 1 КЛЕТОЧНЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ МОРФОГЕНЕЗА КОЖИ И ЕЕ ПРИДАТКОВ. ДИФФЕРЕНЦИРОВОЧНЫЙ И МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК.....	111
1.1 Введение.....	111
1.2 Материалы и методы.....	122
1.3 Результаты и обсуждение.....	16
1.4 Заключение.....	26
1.5 Список использованных источников.....	26
1.6 Отчетные публикации по разделу.....	311
РАЗДЕЛ 2 НЕЙРАЛЬНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК (ИПСК) ЧЕЛОВЕКА.....	322
2.1 Введение.....	322
2.2 Материалы и методы.....	333
2.3 Результаты и обсуждение.....	39
2.4 Заключение.....	500
2.5 Список использованных источников.....	500
2.6 Отчетные публикации по разделу.....	511
РАЗДЕЛ 3 УПРАВЛЯЕМОЕ ИЗМЕНЕНИЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВОЧНОГО СТАТУСА КЛЕТОК С ПОМОЩЬЮ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАНИПУЛИРОВАНИЯ И С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИСТЕМ ДЛЯ МИКРОМАНИПУЛИРОВАНИЯ.....	522
3.1 Введение.....	522
3.2 Материалы и методы.....	533
3.3 Результаты и обсуждение.....	611
3.4 Заключение.....	700
3.5 Список использованных источников.....	711
3.6 Отчетные публикации по разделу.....	711
РАЗДЕЛ 4 СТВОЛОВЫЕ МЕЗЕНХИМНЫЕ КЛЕТКИ В ИНДИВИДУАЛЬНОМ РАЗВИТИИ. РОЛЬ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК (МСК) В	

ФОРМИРОВАНИИ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ И ЕЕ ВОССТАНОВЛЕНИИ ПОСЛЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ. АНАЛИЗ ПЕРСПЕКТИВНЫХ НАПРАВЛЕНИЙ ИССЛЕДОВАНИЙ В ОБЛАСТИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ И СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК.....	733
4.1. Введение.....	733
4. 2. Материалы и методы.....	755
4.3 Результаты и обсуждение.....	78
4.4. Заключение.....	855
4.5 Список использованных источников.....	855
4.6 Отчетные публикации по разделу.....	87
РАЗДЕЛ 5 МЕХАНИЗМЫ ПЛАСТИЧНОСТИ СТВОЛОВЫХ И ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК В ПРОЦЕССАХ РЕГЕНЕРАЦИИ РАЗЛИЧНЫХ СТРУКТУР НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ.....	89
5.1 Введение.....	89
5.2 Материалы и методы.....	922
5.3 Результаты и обсуждение.....	1000
5.4 Заключение.....	1122
5.5 Список использованных источников.....	1133
5.6 Отчетные публикации по разделу.....	11717
РАЗДЕЛ 6 БИОГЕНЕЗ ЯДЕРНЫХ СТРУКТУР.....	11919
6.1 Введение.....	11919
6.2 Материалы и методы.....	11919
6.3 Результаты и обсуждение.....	12121
6.4 Заключение.....	12626
6.5 Список использованных источников.....	12727
6.6 Отчетные публикации по разделу.....	12828
РАЗДЕЛ 7 ИЗУЧЕНИЕ ЦИТОЛОГИЧЕСКИХ, БИОХИМИЧЕСКИХ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ ПРЯМЫХ МЕЖКЛЕТОЧНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ.....	12929
7.1 Введение.....	12929
7.2 Материалы и методы.....	1300

7.3 Результаты и обсуждение.....	1333
7.4 Заключение.....	1444
7.5 Список использованных источников.....	1455
7.6 Отчетные публикации по разделу.....	14949
ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	1511

ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

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

BDNF - нейротрофический фактор мозга

CRISPR/Cas - бактериальный адаптивный иммунитет

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

DAZL - РНК-связывающий белок DAZL (делеция при азооспермии)

DMEM/F12 – среда для культивирования клеток

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

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

DTT – Дитиотреитол-ДЛ

EGF – epidermal growth factor – эпидермальный фактор роста

FBL - фибрилларин

FGF - фактора роста фибробластов

FGF2 - фактор роста фибробластов 2

GCamp6 - химерные флуоресцентны белки

GFP – green fluorescent protein (зеленый флуоресцентный белок)

MMLV - генетически модифицированная обратная транскриптаза (ревертаза)

NGN2 - транскрипционный фактор

NLS - сигнал ядерной локализации

RFP – red fluorescent protein (красный флуоресцентный белок)

RIPK-1 (англ. Receptor interacting protein kinase-1) – маркер некроптоза

RIPK-3 (англ. Receptor interacting protein kinase-3) – маркер некроптоза

ROCK- ингибитор Rho-ассоциированной протеинкиназы

SARS-CoV-2 - коронавирус, вызывающий COVID-19

sgRNA - система редактирования генома

SIS (англ. swine intestinal submucosa) – децеллюляризованная стенка тонкой кишки свиньи

SWI (англ. Susceptibility weighted imaging) - магнитная восприимчивость

Th – Т-хелперы

TNFaR – tumor necrosis factor alpha receptor

VEGF - фактор роста сосудистого эндотелия

АПС - протеин С в активированной форме

БЦЖ - вакцина против туберкулёза

ВСА - внутренняя сонная артерия

ВФ - волосяной фолликул

ГАМК – гамма-аминомасляная кислота
ГАМК-ергические - ГАМК-ергические нейроны
ГПК - губка из пористого коллагена
ГЭБ - гематоэнцефалического барьера
ИИ - ишемический инсульт
ИПСК - индуцированные плюрипотентные стволовые клетки
ИЦХ - иммуноцитохимическое исследование
кПЦР - количественная ПЦР в реальном времени
КС - кондиционированные среды
МСК - мезенхимные стромальные клетки
НСА – наружная сонная артерия
ОСА - общую сонная артерия
ПАР - протеаза активирующий фактор
ППК – первичные половые клетки
ПСК – плюрипотентные стволовые клетки
РПЭ - ретинальный пигментный эпителий
РЭ – реконструированный эпидермис
СВЗ – субвентрикулярная зона
ФТ - фототромбоз
ЭМП – эпителио-мезенхимный переход
ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка

ОБЩЕЕ ВВЕДЕНИЕ

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

Для исследований в области регенерации, морфогенеза, клеточной дифференцировки и пластичности, биологии стволовых клеток, в том числе плюрипотентных, используются самые различные экспериментальные модели. В данной работе в качестве объектов исследования использовали следующие биологические модели: культура клеток кожи человека и мыши; кожа человека и мыши; реконструированный эпидермис; индуцированные плюрипотентные клетки человека, экспрессирующие элементы системы TetON-NGN2, а также флуоресцентный кальциевый индикатор GCamp6s; линии фибробластов 1608hT, экспрессирующие химерные белки dCas9-SunTug + scFv-GCN4-VP64 или dCas9-VP160; клетки ретинального пигментного эпителия человека; церебральные органоиды; периферические нервы и головной мозг мышей; мезенхимные стромальные клетки; мышцы крыс; экзосомы, полученные от мезенхимных стромальных клеток; нейропротекторные пептиды семакс и HLDF-6, а также пептид, имитирующий N-конец PAR1.

Целью работы является определение ключевых регуляторов (факторов) клеточной дифференцировки и морфогенеза, пластичности и перепрограммирования в моделях развития и регенерации. На данном этапе работы ставились следующие задачи: (1) определить паттерн экспрессии протеинкиназ RIPK-1 и RIPK-3 в клетках ВФ мыши и человека; (2) проанализировать активность и пластичность стволовых клеток волосяного фолликула в ходе физиологической и репаративной регенерации, реэпителизации и формирования фолликулов *de novo* в контексте воспалительного микроокружения; (3) получение линий ИПСК человека, несущих генетические конструкции, позволяющие осуществлять быструю и эффективную дифференцировку в нейроны, а также прижизненное наблюдение за электрической активностью в них; (4) разработка

молекулярно-генетических систем для стимуляции экспрессии целевых генов на основе системы CRISPR; (5) изучение влияния мезенхимных стромальных клеток и их экзосом на регенерацию мышц; (6) изучение действия кондиционированных сред регенератов сетчатки тритона на клетки ретинального пигментного эпителия человека *in vitro*; (7) выявление возможных механизмов происхождения сигналов ядерной локализации белков; (8) исследование противовоспалительного и цитопротекторного действия неканонического синтетического пептида-агониста ПАР1 при ишемии и воспалении (9) подтвердить *in vivo* эффект организации ритма синтеза белка пептидами семакс и HLDF-6. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности и актуальности выбранного направления работ.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

РАЗДЕЛ 1 КЛЕТОЧНЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ МОРФОГЕНЕЗА КОЖИ И ЕЕ ПРИДАТКОВ. ДИФФЕРЕНЦИРОВОЧНЫЙ И МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

1.1 Введение

Биология кожи и ее придатков интенсивно изучается на протяжении многих лет. Исследования в этой области дали обширные и значимые результаты, раскрывающие механизмы многих процессов, имеющих общебиологическое значение. Среди них — регуляция клеточной пролиферации, дифференциации, трансформации, стволовые клетки и их ниши, эпителио-мезенхимные взаимодействия, морфогенез, регенерация, заболевания кожи и многие другие. Кожа представляет собой сложный орган, состоящий из эпидермиса, дермы, подкожной жировой клетчатки и придатков кожи, включая волосяной фолликул, сальную и потовую железы. Создание эквивалента кожи основано на самопроизвольной организации клеток кожи: фибробластов и кератиноцитов *in vitro*, формирующих структуру, подобную коже. Эпидермис — наружный слой кожи, который является первым защитным барьером организма. Гомеостаз эпидермиса, как известно, поддерживается за счет баланса между пролиферацией базальных клеток и дифференцировкой/стратификацией супрабазальных. Важную роль в процессах корнизации играют ферменты, катализирующие сшивку белков в кератиноцитах — трансглутаминазы [1]. В модели реконструированного эпидермиса, подобно нативному эпидермису, формируются все слои кератиноцитов, находящихся на разных стадиях дифференцировки. Учитывая, что в фармацевтической и косметологической промышленности растет число применяемых синтетических соединений и составов, и ранее испытания на животных были единственным способом оценить потенциал веществ и смесей в их способности наносить вред коже, в настоящее время модели реконструированного эпидермиса позволяют производить оценку токсичности *in vitro*. Модель реконструированного эпидермиса позволяет определять коррозионный и раздражающий потенциал определенных ингредиентов, что необходимо для их классификации и маркировки [2].

Волосяной фолликул (ВФ) — мини-орган млекопитающих, структура которого подвержена на протяжении жизни циклическим изменениям. Во время фазы телогена ВФ пребывает в состоянии метаболического покоя в виде небольшой группы клеток, в период фазы роста — анагена — его кератиноциты пролиферируют и дифференцируются,

формируя полноценный ВФ, а в катагене происходит частичная регрессия структуры ВФ. Запрограммированная клеточная гибель является неотъемлемой частью нормальной жизнедеятельности ВФ. Так, инволюция волосяной луковицы в катагене происходит путем апоптоза кератиноцитов [3], а волосяной стержень формируется благодаря особому типу клеточной гибели – ороговению, которому подвергаются клетки внутреннего корневого влагалища [4]. Однако, механизмы этих процессов до сих пор до конца неизвестны: изучены далеко не все компоненты сигнальных путей апоптоза [5] и ороговения [4], а также их точки пересечения. В связи с этим, мы исследовали ВФ на предмет экспрессии маркеров ещё одного типа программируемой клеточной гибели – некроптоза, участниками которого являются RIPK-1 (англ. Receptor interacting protein kinase-1) и RIPK-3 (англ. Receptor interacting protein kinase-3) [6]. В неактивном состоянии в составе многокомпонентных белковых комплексов RIPK-1 может способствовать выживанию клетки. Однако в результате, например, ингибирования ИКК α/β - и ТВК1/ИКК ϵ -зависимого фосфорилирования, становится возможной реализация киназной активности RIPK-1, что приводит к клеточной гибели [7]. Активность RIPK-3 зависит от RIPK-1, однако данных в пользу того, что RIPK-1 фосфорилирует RIPK-3, нет. Вероятно, RIPK-1 и RIPK-3 активируются путем аутофосфорилирования, однако детали данного процесса не изучены [6, 8].

Таким образом, целью работы было (1) разработать методику получения тканеинженерного реконструированного эпидермиса (РЭ) человека *in vitro*, охарактеризовать стратифицированные слои кератиноцитов по наличию экспрессии белков-маркеров соответственно структуре нативного эпидермиса человека; (2) определить паттерн экспрессии RIPK-1 и RIPK-3 в клетках ВФ мыши и человека; (3) проанализировать активность и пластичность стволовых клеток волосяного фолликула в ходе физиологической и репаративной регенерации, реэпителизации и формирования фолликулов *de novo* в контексте воспалительного микроокружения.

1.2 Материалы и методы

1.2.1 Выделение первичных кератиноцитов человека

Первичные клеточные культуры были выделены из биоптатов кожи, полученных после круговой пластики лица с информированного согласия пациентов. Образцы транспортировали в среде DMEM (ПанЭко) с добавлением 4мМ глутамин (Sigma) и 0,05 мг/мл гентамицина (ПанЭко). Далее все операции производили в стерильных условиях с применением стандартных методов асептики. Для предотвращения контаминации клеточных культур биоптат кожи промывали раствором Хэнкса (ПанЭко) с добавлением

0,15 мг/мл гентамицина. Затем биоптат кожи помещали в 0,1% раствор диспазы (Gibco) в среде ДМЕМ и инкубировали при 4°C в течение 12-14 часов. Далее с помощью пинцета эпидермис отделяли от дермы. Для выделения базальных кератиноцитов эпидермис погружали в раствор 0,25% трипсина с ЭДТА (Gibco) и инкубировали при 37°C в течение 15 мин с последующим интенсивным встряхиванием и осаждением на центрифуге при 400g в течение 5 мин. Осадок ресуспендировали в культуральной среде для первичных кератиноцитов (CnT-07 (Cell'n'Tech)) и высевали на культуральный пластик (Corning), предварительно покрытый коллагеном I типа.

1.2.2 Выделение первичных фибробластов человека

Для выделения фибробластов дерму погружали в 0,2% раствор коллагеназы (Worthington) в среде ДМЕМ, измельчали с помощью глазных ножниц до фрагментов размером менее 1 мм³ и инкубировали при 37°C в течение 3-4 часов. Полученную взвесь осаждали центрифугированием при 400g в течение 5 минут. Осадок ресуспендировали в культуральной среде для первичных фибробластов (DMEM с добавлением 10% ЭТС (Capricorn), GlutaMAX-I (Gibco), пирувата натрия (Gibco), пенициллина и стрептомицина (Gibco) в соотношении 1:1 со средой AmnioMAX-II (Gibco)) и высевали на культуральный пластик. Первичные фибробласты человека использовали в качестве фидерного слоя для базальных кератиноцитов.

1.2.3 Культивирование кератиноцитов и фибробластов в 2D-условиях

Кератиноциты культивировали на пластике, покрытом коллагеном. Первичные фибробласты культивировали на пластике без покрытия. Культуры клеток содержали в инкубаторе с 5% CO₂ и насыщающей влажностью при 37°C. Культуры пассировали по достижении клетками 70% конфлюэнтности в соотношении 1:3. Смену среды осуществляли через каждые 2 дня.

1.2.4 Создание и культивирование 3D реконструированного эпидермиса человека *in vitro*

Для культивирования клеток на границе среда-воздух использовали мембранные вставки для мультилуночных планшетов с диаметром пор 0.4 мкм (SPL). Фибробласты высевали на мембрану в среде для первичных фибробластов и культивировали 7 дней в погруженном состоянии. Смену среды осуществляли через каждые 2-3 дня. Кератиноциты высевали поверх фибробластов и культивировали 3 дня в погруженном состоянии в среде CnT-07. Далее заменяли среду на таковую для стратификации кератиноцитов (CnT-Airlift (Cell'n'Tech)) и культивировали 3 дня в погруженном состоянии. Далее создавали условия культивирования на границе среда-воздух (рисунок 1.1). Культивирование продолжали в

течение 2 недель. Смену среды осуществляли через каждые 2-3 дня. Сформировавшиеся эквиваленты фиксировали и замораживали для дальнейших исследований.

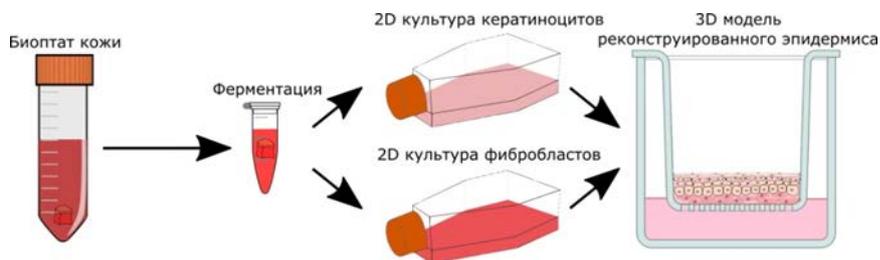


Рисунок 1.1 - Процесс создания 3D РЭ

1.2.5 Получение криосрезов

Для гистологического исследования РЭ фиксировали в 10% забуференном формалине (BioVitrum) в течение суток, после чего промывали PBS (БиолоТ) 3 раза в течение 1 часа и проводили через 15% и 30% растворы сахарозы (Sigma-Aldrich) на PBS в течение 2 суток. Далее РЭ заключали в среду для формирования криоблоков (Tissue-Tek, SAKURA) и охлаждали в гексане при -40°C . Криоблоки РЭ хранили при -70°C . Нативную кожу человека после промывки в физрастворе погружали в среду для формирования криоблоков и охлаждали в парах азота, криоблоки хранили при -70°C . Для гистологического и иммуногистохимического (ИГХ) анализа использовали срезы толщиной 5 мкм, полученные на криостате (Microm HM 525, Thermo Scientific). Полученные срезы высушивали при комнатной температуре в течение суток, срезы нативной кожи человека перед окраской фиксировали в 10% забуференном формалине в течение 10 мин, промывали 3 раза по 5 мин DPBS (ПанЭко).

1.2.6 Гистологическое исследование

Для морфологического анализа срезы окрашивали гематоксилин-эозином (BioVitrum) по стандартному протоколу и заключали в витрогель (BioVitrum).

1.2.7 Иммуногистохимическое исследование

Срезы инкубировали с первичными антителами, разведенными в блокирующем растворе (PBS, 10% ЭТС, 0.3% TRITON X-100 (Sigma)) во влажной камере при $+4^{\circ}\text{C}$ в течение 12-14 ч. Далее применяли вторые антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена ImmPRESS REAGENT KIT (MP-7402 и MP-7401) по стандартному протоколу, ядра клеток докрашивали гематоксилином. Окрашенные срезы заключали в витрогель.

1.2.8 Список использованных в работе первичных антител

Anti-Keratin 10 (Santa Cruz Biotechnology, sc23877); anti-Keratin 14 (Abcam, ab181595); anti-Loricrin (Abcam, ab24722); anti-Ki67 (Abcam, ab16667); anti-Laminin 5 (Abcam, ab14509); anti-Plectin abcam (Abcam, ab32528).

1.2.9 Микроскопия

Съемка гистологических препаратов осуществляли на микроскопе Keyence BZ-9000 с постобработкой фотографий с использованием программного обеспечения Fiji.

1.2.10 Исследование экспрессии RIPK киназ в коже и волосяных фолликулах

В эксперименте были использованы 18 самцов мышей линии C57b/6 в возрасте 6-8 недель. Все манипуляции с мышами осуществляли под общим наркозом и с одобрения Комиссии по биоэтике ИБР РАН. В эксперименте были использованы 18 самцов мышей линии C57b/6 в возрасте 6-8 недель. Синхронизацию цикла ВФ проводили путем депиляции воском стандартного участка кожи спины животного на стадии телогена [9]. Для этого воск плавил до жидкой консистенции на водяной бане, затем наносили на выбранный участок кожи спины, дожидались застывания, а затем резким движением срывали застывший воск против роста волос. Перед манипуляциями мышей вводили в состояние общего наркоза при помощи препарата авертин. Мышей выводили из эксперимента на 0, 5, 7, 10, 18, 25 сутки после депиляции путем дислокации шейных позвонков.

Кожа человека была получена после операции по круговой подтяжке лица из МНИОИ им. П.А. Герцена с информированного согласия пациентов.

Предназначенные для иммуногистохимического исследования биопсии кожи заключали в OCT Cryomount (HistoLab, Gothenburg, Sweden) и замораживали в жидком азоте. Криосрезы толщиной 10 мкм подготавливали по стандартной методике на криостате SM1900 (Leica Microsystems, Германия). Далее после высушивания на протяжении ночи их фиксировали 4% параформальдегидом, трижды промывали в PBS, инкубировали с блок-раствором, содержащим 10%-ю сыворотку животного-производителя вторичных антител, после чего инкубировали с первичными антителами на протяжении ночи. Далее, после трехкратного промывания, на препараты наносили вторичные антитела (Alexa Fluor 488) на два часа, затем, после промывания в PBS наносили раствор DAPI и заключали в среду Vectashield.

Иммуногистохимическое исследование проводили с помощью антител против RIPK-1, RIPK-3, Keratin 15 (Krt15) и Versican на серийных срезах. Препараты анализировали на микроскопах моделей BZ-9000E (Keyence) и IX73 (Olympus).

Стадию цикла ВФ определяли согласно методике Muller-Rover [3]

1.3 Результаты и обсуждение

1.3.1 Гистологическое исследование показало формирование многослойной структуры эпидермиса в модели РЭ.

Кератиноциты в эквиваленте подвергаются стратификации и дифференциации. На препарате хорошо различим слой базальных кератиноцитов, которые имеют кубическую форму, расположены в основании эпидермиса на базальной мембране. Над базальным слоем расположен слой шиповатых кератиноцитов, далее гранулярный слой и роговой слой (рисунок 1.2). В нашей модели РЭ наблюдается около 8-10 слоев жизнеспособных клеток. В роговом слое насчитывается около 10 слоев терминально дифференцированных кератиноцитов, в конечном итоге сходящихся с его поверхности (рисунок 1.2А).

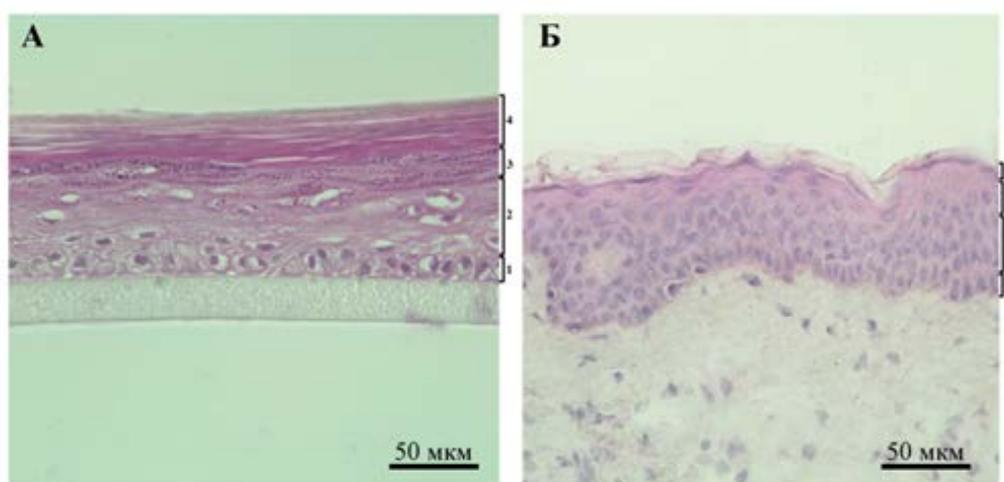


Рисунок 1.2 - Структура эпидермиса А - РЭ, Б - кожа человека
1 - базальный слой; 2- шиповатый слой; 3- гранулярный слой; 4- роговой слой.
Окраска гематоксилином и эозином, x400.

ИГХ исследование экспрессии маркера пролиферирующих клеток Ki 67 позволило выявить пролиферирующие кератиноциты, которые преимущественно детектируются в базальном слое, что соответствует литературным данным относительно эпидермиса [10] (рисунок 1.3). Проллиферирующие клетки базального слоя проходят серию морфологических и биохимических изменений, которые завершаются формированием мертвых, уплощенных, энуклеированных чешуек рогового слоя. Чешуйки рогового слоя – это терминально дифференцированные кератиноциты, скрепленные вместе липидами. Роговой слой РЭ подобно роговому слою нативной кожи является функциональным барьером.

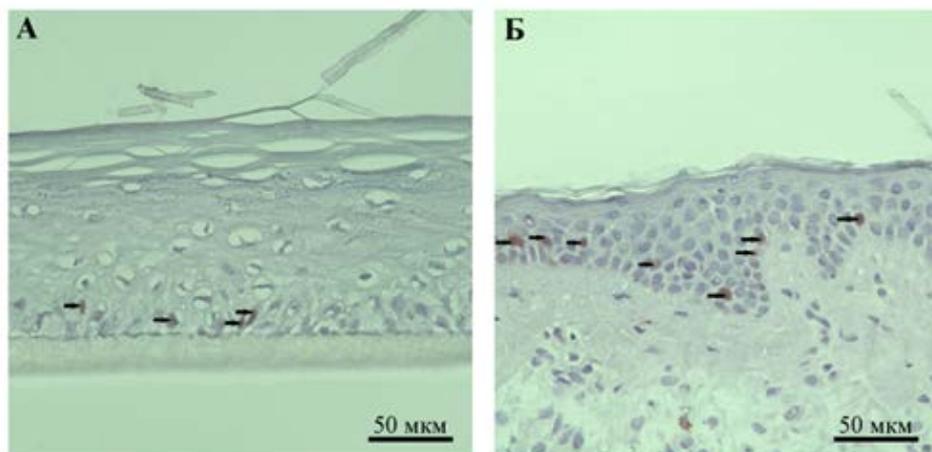


Рисунок 1.3 - Проплиферация базальных клеток в РЭ
 А - РЭ, Б - кожа человека. Стрелка указывает на пролиферирующие ядра.
 ИГХ исследование, x400.

Базальная мембрана важна в поддержании пролиферации базальных кератиноцитов и сохранении эпидермальных стволовых клеток. Она определяет полярность базальных кератиноцитов. Поляризация выражается в неоднородном распределении мембранных белков базальных кератиноцитов и асимметрии макродоменов плазматической мембраны. В клетке базального кератиноцита выделяют два мембранных домена: апикальный и базолатеральный. Последний граничит с базальной мембраной. Это свойство базальных кератиноцитов называют апико-базальной асимметрией.

Интегриновые рецепторы связывают клетки с базальной мембраной и способствуют сохранению пролиферативного статуса базальных кератиноцитов [11, 12]. Считается, что снижение экспрессии интегринов приводит к откреплению клеток от базальной мембраны и их дифференцировке.

ИГХ исследование экспрессии плектина в РЭ показало наличие этого белка в зоне прикрепления базальных кератиноцитов к базальной мембране (рисунок 1.4 В, В'). Плектин является линкерным белком между кератиновым филаментами кератиноцитов и интегрином $\alpha\beta4$ в структуре гемидесмосом. Молекулы интегрин $\alpha\beta4$ прочно закрепляют клетки на базальной мембране, связываясь с ее компонентами, преимущественно с ламинином 5 ($\alpha3\beta3\gamma2$) [13]. Базальные кератиноциты РЭ активно синтезируют ламинин 5, на что указывает наличие его экспрессии в эквивалентах (рисунок 1.4 А, А'). Таким образом, базальные кератиноциты в РЭ сохраняют пролиферативную активность, экспрессируют белки базальной мембраны и формируют гемидесмосомы, контакты, которые обеспечивают их надежное сцепление с белками внеклеточного матрикса. ИГХ исследование экспрессии ламинина 5 подтвердило наличие правильно сформированной базальной мембраны в РЭ.

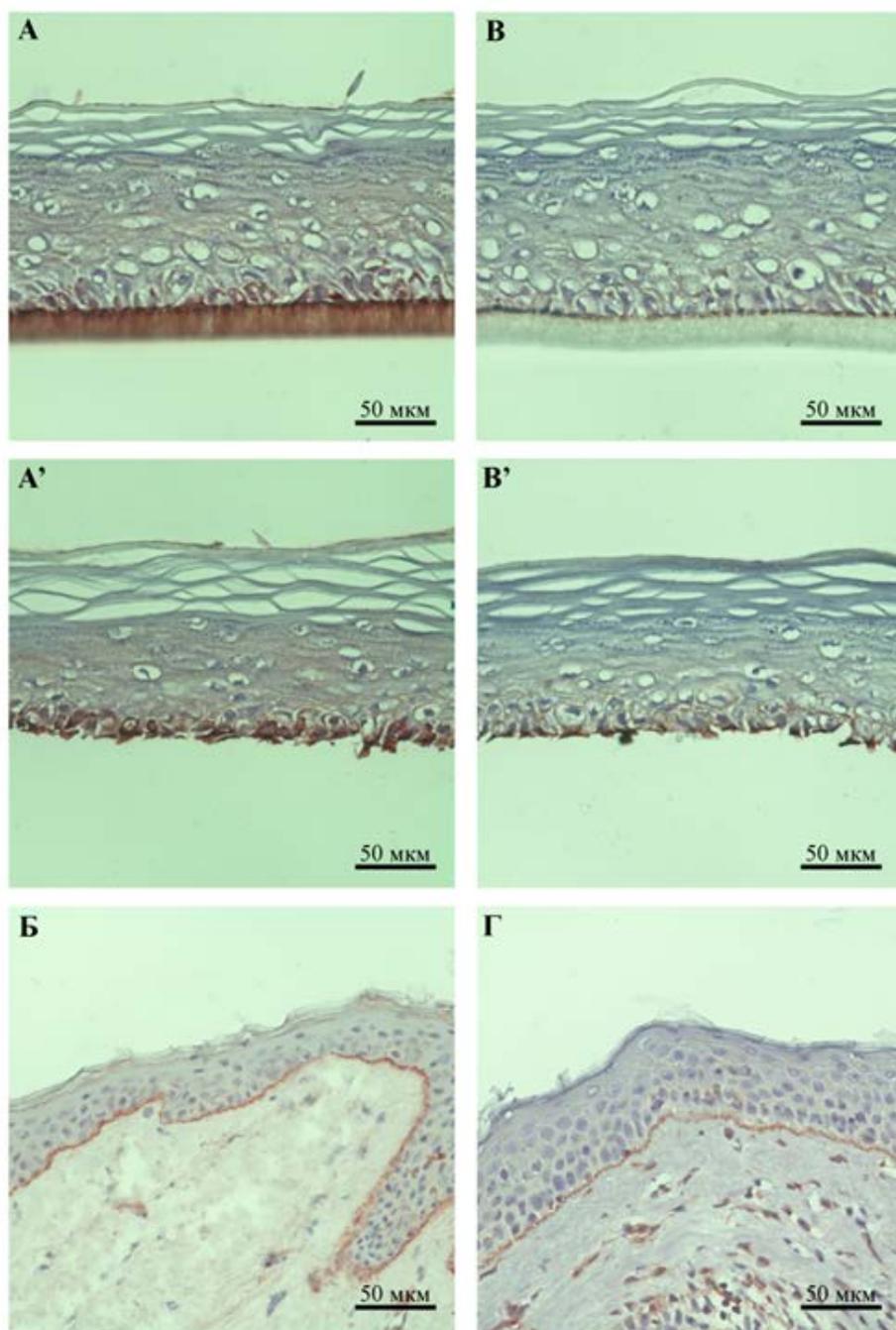


Рисунок 1.4 - Идентификация зоны базальной мембраны и гемидесмосом в РЭ. Экспрессия ламинина 5 (А, А', Б). Экспрессия плектина (В, В', Г). А, А', В, В' - РЭ; Б, Г - кожа человека. ИГХ исследование, x400. Положительные по маркерам зоны окрашены коричневым.

Прогрессия дифференцировки кератиноцитов хорошо наблюдается при ИГХ исследовании экспрессии белков – маркеров дифференцировки кератиноцитов: цитокератинов 14 и 10, лорикрина (рисунок 1.5.). Базальные и мало дифференцированные супрабазальные кератиноциты экспрессируют кератин 14 (рисунок 1.5 А). Кератиноциты, находящиеся на ранних стадиях дифференцировки и располагающиеся в верхних супрабазальных слоях, экспрессируют маркер ранней дифференцировки кератин 10

(рисунок 1.5 Б). Кератиноциты гранулярного слоя характеризуются экспрессией маркера поздней дифференцировки лорикрина. Экспрессирующие лорикрин кератиноциты граничат с терминально дифференцированными кератиноцитами рогового слоя (рисунок 1.5 В). Экспрессия маркеров дифференцировки, соответствующая нативному эпидермису, доказывает функциональность РЭ.

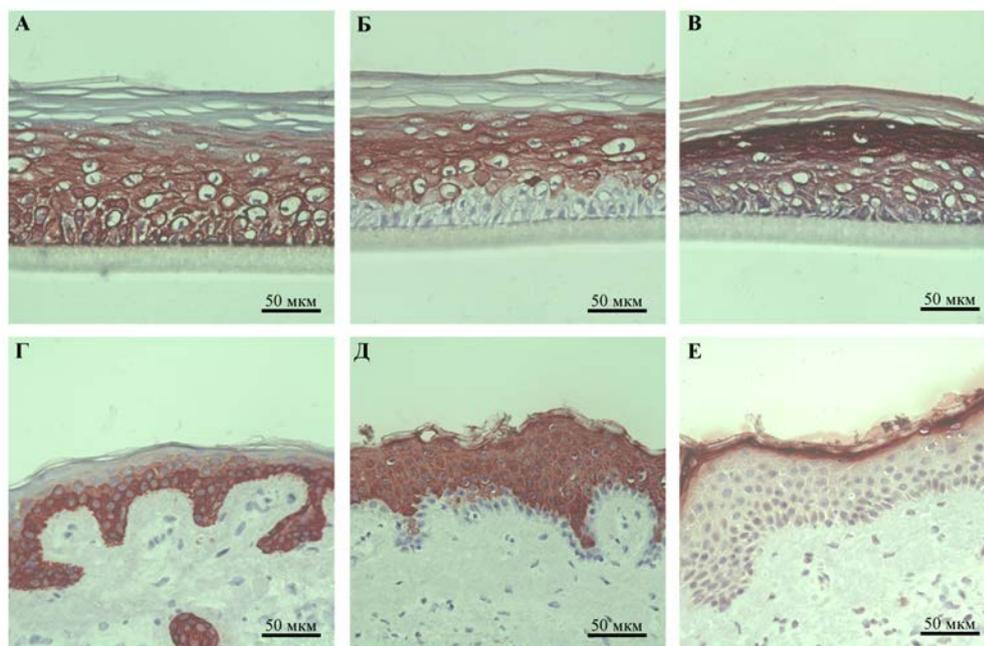


Рисунок 1.5 - Дифференциация и стратификация эпидермиса в РЭ
 Экспрессия цитокератина 14 (А, Г); цитокератина 10 (Б, Д); лорикриина (В, Е). А, Б, В - РЭ; Г, Д, Е - кожа человека. ИГХ исследование, х400. Положительные по маркерам зоны окрашены коричневым.

Эквиваленты кожи являются довольно простым тканевым конструктом, но тем не менее, разрабатывались они на протяжении многих лет. Биоинженерная кожа всегда вызывала большой интерес как в качестве модельной системы биологии и патологии кожи и для тестирования терапевтических средств и косметологических продуктов. Учитывая существующий дефицит и ряд ограничений применения донорской кожи, эквиваленты кожи крайне востребованы для увеличения эффективности заживления ран при различных поражениях кожи (механические повреждения, термические, химические ожоги, не поддающиеся лечению длительно незаживающие раны) [14, 15]. Многие заменители кожи являются коммерческими продуктами и могут содержать различный вариант биоразлагаемого матрикса, как самостоятельный элемент или в сочетании с клеточным компонентом [16, 17]. Основной целью применения эквивалентов кожи, как правило, является разрешение ранозаживления, его ускорение и предотвращение формирования рубцов. Ранее мы показали, что, например, коллагеновый гель, заселенный клетками кожи, в качестве трансплантата на мышинной модели способствует уменьшению

воспаления и эффективному заживлению ран: активной васкуляризации грануляционной ткани, ремоделированию дермы в месте раны и быстрой эпителизации [18]. Кроме того, ряд моделей кожи разработаны для развития исследований и тестирования фармакологических косметологических препаратов, изобретены различные аналоги органов, в том числе, так называемые «органы-на чипах» [19].

Создание эквивалента кожи основано на самопроизвольной организации клеток кожи: фибробластов и кератиноцитов *in vitro*, формирующих структуру подобную коже. В модели РЭ, подобно нативному эпидермису, формируются все слои кератиноцитов, находящихся на разных стадиях дифференцировки. Базальные кератиноциты РЭ пролиферируют, экспрессируют белки базальной мембраны и формируют гемидесмосомы - прочные контакты, крепко удерживающие их на базальной мембране и опосредующие поляризованное состояние базальных кератиноцитов. Модель РЭ позволяет анализировать особенности экспрессии и секреции отдельных белков, в совокупности с особенностями процессов пролиферации, стратификации и дифференцировки на уровне эпидермального гомеостаза.

Получение тканеинженерных эпидермальных эквивалентов кожи важно для выявления механизмов патогенеза генодерматозов. Изменения в структуре и паттерне экспрессии структурных белков кожи влекут за собой нарушения межклеточных взаимодействий. Для их визуализации и анализа удобно использовать модели эквивалентов кожи. Эпидермальные эквиваленты из культивируемых клеток больных применяются для оценки воздействия генотерапии как на кератиноциты, так и на фибробласты. Модели эпидермальных эквивалентов использовались для оценки генетической коррекции гена SPIND5 при синдроме Нидертонна, приводящего к нарушениям кератинизации [20]; для коррекции гена COL7A1 при дистрофическом буллезном эпидермолизе [21], коррекции KRT10 при эпидермолитическом ихтиозе [22]. Эпидермальные эквиваленты используются для тестирования новых лекарственных препаратов. Например, на эквивалентах кожи из культивируемых клеток больных разными формами генодерматозов был показан терапевтический эффект от применения аминогликозидов, амелиоративный эффект от интра-дермальных инъекций рекомбинантных белков, как в случае с COL7A1 [23]. Показан позитивный эффект от воздействия гентамицина, генецитина и других лекарственных препаратов, обеспечивающих трансляцию мРНК с предварительными стоп-кодонами, это частый тип патологических мутаций, приводящий либо к деградации транскрипта, либо к появлению укороченных нефункциональных форм белка. «Проскакивание» предварительных стоп-кодонов, в ряде случаев, в зависимости от расположения мутации, приводит к появлению

белка и частичному восстановлению нормального физиологического состояния клетки [24, 25, 26, 27].

Трехмерная природа эквивалентов кожи позволяет моделировать различные патологические состояния кожи такие как, например, атопический дерматит [28], псориаз [29] и генодерматозы [30] за счет включения в эквиваленты клеток пациентов, гиперпигментацию [31] за счет включения в эквиваленты меланоцитов [38], клеток Лангерганса [32].

В онкологии модели кожи используются для изучения ранних стадий развития меланом [33]. Очень активно эквиваленты кожи используются в исследованиях трансдермальной доставки лекарств и других фармакологических субстанций. Также эквиваленты кожи могут быть использованы для изучения влияния различных факторов и фармакологических агентов на биогенез и реэпителизацию кожи *in vitro* [34], регуляцию дифференцировки кератиноцитов, абсорбцию и иммунотоксичность, реакцию кожи на коррозирующие вещества, раздражители и аллергены [35], а также способность кератиноцитов сокращать (сокращать) матрикс или рану [36], для оценки фототоксичности [37]. Более того, среда при культивировании на границе раздела фаз, может быть собрана для анализа выбрасываемых в неё клетками медиаторов и/или метаболитов, что обеспечивает количественный и объективный результат в сравнении с такими субъективными параметрами как эритемы и отеки *in vivo*.



Рисунок 1.6 - Сферы применения модели РЭ

В последнее время все большую значимость приобретают исследования роли микробиома в регуляции гомеостаза различных органов и их систем [38]. Кожа также имеет свой микробиом, который участвует в поддержании иммунитета и барьерной функции этого органа. РЭ *in vitro* может являться инструментом для изучения эпителиального и кожного микробиома. Учитывая, что в фармацевтической и косметологической промышленности растет число применяемых синтетических соединений и составов, и ранее испытания на животных были единственным способом

оценить потенциал веществ и смесей в их способности наносить вред коже, в настоящее время модели РЭ позволяют производить оценку токсичности *in vitro*. РЭ плотно контактирует со стенками лунки, формируя эпидермальный барьер, за счет этого предотвращается утечка жидких тестируемых веществ вдоль внутренней стенки. РЭ позволяет определять коррозионный и раздражающий потенциал определенных ингредиентов, что необходимо для их классификации и маркировки [15, 39, 40]. Скрининг веществ-раздражителей кожи проводится по стандартам, утвержденным организацией экономического сотрудничества и развития (ОЭСР) [15, 41]. Таким образом, модель РЭ находит применение в качестве тест-системы в области клеточной биологии, регенеративной медицины, старении и заболеваний кожи, разработки лекарств и косметических средств и других областях (рисунок 1.6).

1.3.2 Гистологический анализ кожи мышей после депиляции показал, что ВФ находились в телогене на 0 и 25 сутки, в раннем анагене на 5 сутки, в зрелом анагене на 7 и 10 сутки, а в катагене на 18 сутки.

Было обнаружено, что в клетках ВФ экспрессия RIPK-1 в раннем анагене (5 сутки) была выражена слабо (рисунок 1.7 А). Экспрессия RIPK-1 значительно усиливалась по мере наступления зрелого анагена (рисунок 1.7 В) и последующего перехода ВФ в катаген (рисунок 1.7 С).

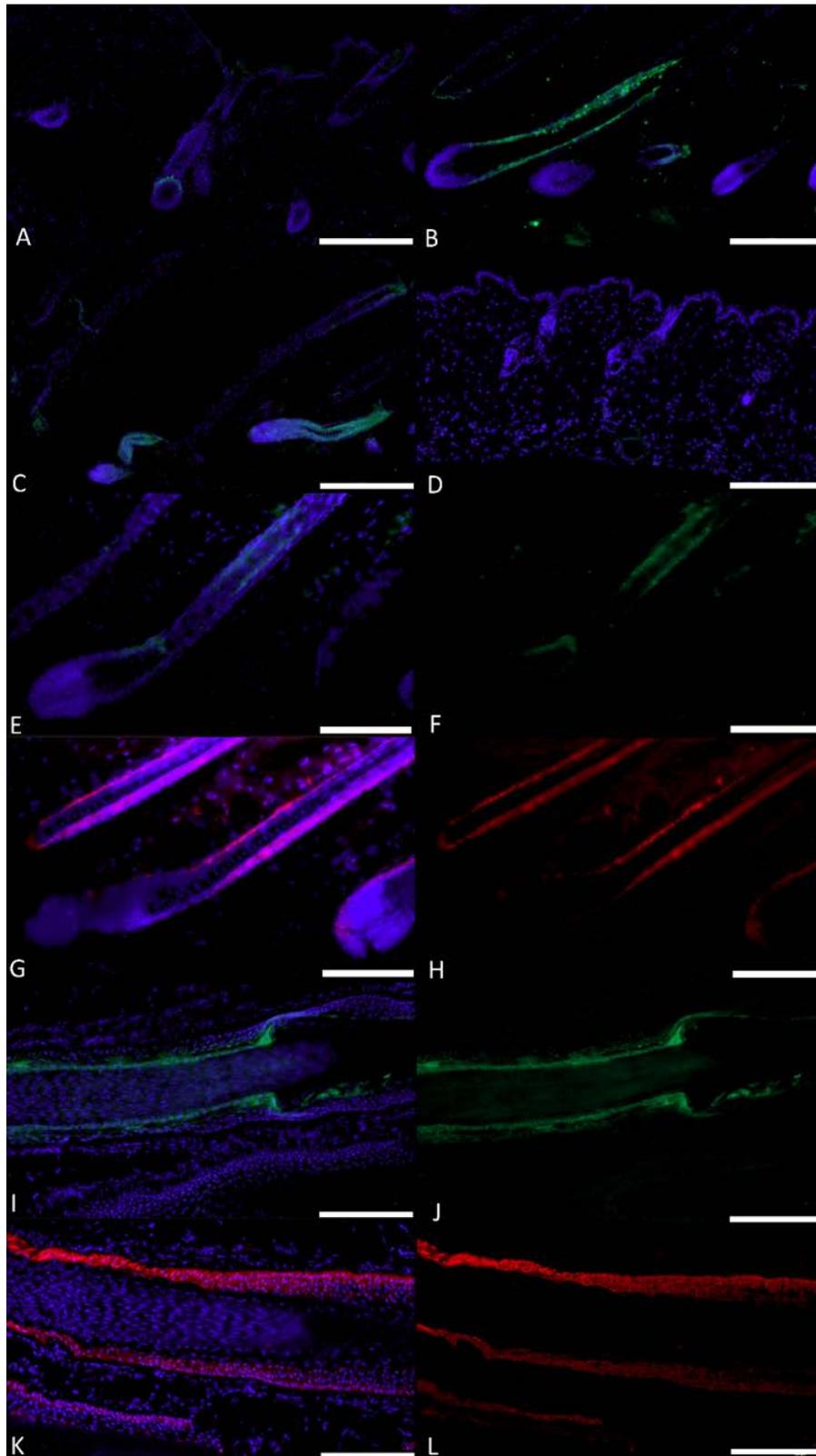


Рисунок 1.7 - ВФ мыши, окрашивание антителами против RIPK-1, (А – ранний анаген, В – зрелый анаген, С – катаген, D – телоген); ВФ мыши на стадии среднего анагена, серийные срезы, окрашивание антителами против RIPK-1 (Е – с DAPI, F – без DAPI) и против Krt15 (G – с DAPI, H – без DAPI); ВФ человека, серийные срезы, окрашивание антителами против RIPK-1 (I – с DAPI, J – без DAPI) и против Krt15 (K – с DAPI, L – без DAPI)
 Масштабные отрезки: А, В, С, D, I, J, K, L – 200 мкм; E, F, G, H – 100 мкм

Максимальная выраженность экспрессии RIPK-1 приходилась на поздний анаген и катаген (10 и 18 сутки соответственно).

В телогене экспрессии RIPK-1+ в кератиноцитах не выявлено (рисунок 1.7 D). Для определения локализации RIPK-1+ клеток был проведен анализ серийных срезов, окрашенных антителами против RIPK-1 и против маркера наружного корневого влагалища Krt15. Данный анализ показал, что RIPK-1+ клетки находились во внутреннем корневом влагалище ВФ (рисунок 1.7 E – H).

Также, как уже было сказано выше, было проведено иммуногистохимическое окрашивание серийных срезов ВФ человека антителами против Krt15, в результате чего была обнаружена экспрессия RIPK-1 в кератиноцитах внутреннего корневого влагалища ВФ человека (I – L).

Экспрессию RIPK-3 в ВФ мыши также наблюдали на стадиях анагена (5, 7, 10 сутки) (рисунок 1.2 A и B) и катагена (18 сутки) (рисунок 1.8 C). Усиления экспрессии RIPK-3 по мере приближения катагена, в отличие от RIPK-1, отмечено не было; выраженность экспрессии RIPK-3 на 5, 7 и 10 сутки была без значимых изменений. В телогене RIPK-3+ кератиноцитов обнаружено не было (рисунок 1.8 D).

Для определения RIPK-3+ компартментов фолликула был проведен анализ серийных срезов, окрашенных антителами против RIPK-3, Krt15 и против маркера дермальной папиллы (мезенхимный регулятор цикла ВФ) – Versican [42]. Данный анализ подтвердил наличие RIPK-3+ клеток в наружном и внутреннем корневых влагалищах (рисунок 1.8 E – H), а также в дермальной папилле (рисунок 1.9 A, B, E, F). Кроме того, экспрессия RIPK-3 присутствовала в интерфолликулярном эпидермисе (ИФЭ) (рисунок 1.8 A и C).

Экспрессия RIPK-3 была обнаружена в клетках ВФ не только мыши, но и человека, в том числе в дермальной папилле (рисунок 1.9 C, D, G, H).

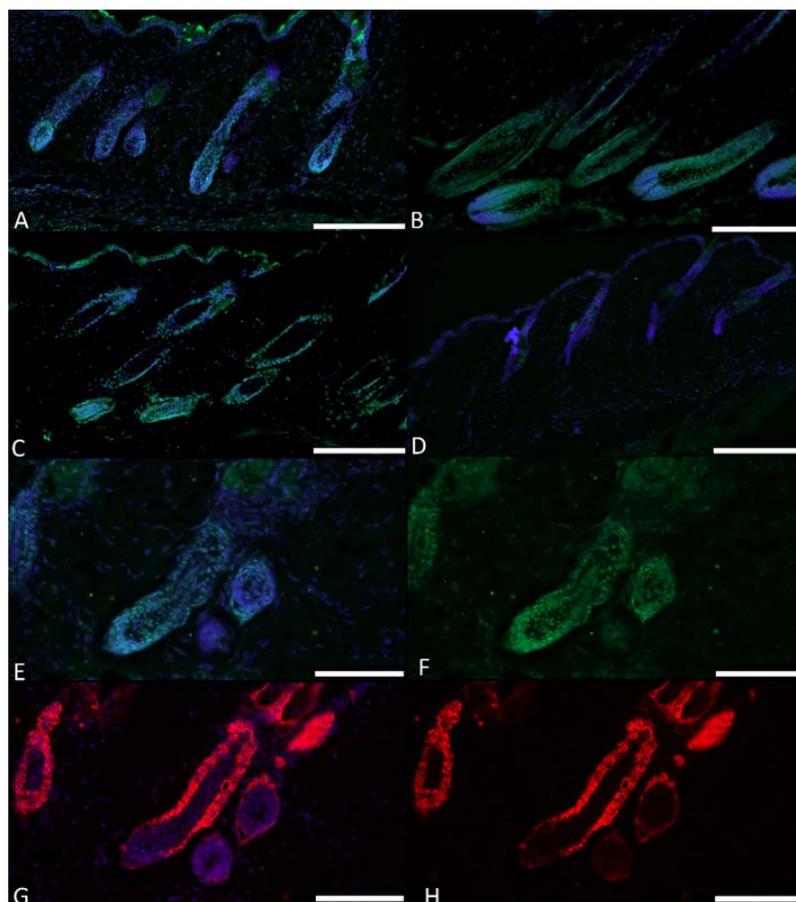


Рисунок 1.8 - ВФ мыши, окрашивание антителами к RIPK-3, X20 (А – ранний анаген, В – зрелый анаген, С – катаген, D – телоген); ВФ мыши на стадии раннего анагена, серийные срезы, X40, окрашивание антителами против RIPK-3 (Е – с DAPI, F – без DAPI) и антителами против Krt15 (G – с DAPI, H – без DAPI). Масштабные отрезки: А, В, С, D – 200 мкм; Е, F, G, H – 100 мкм.

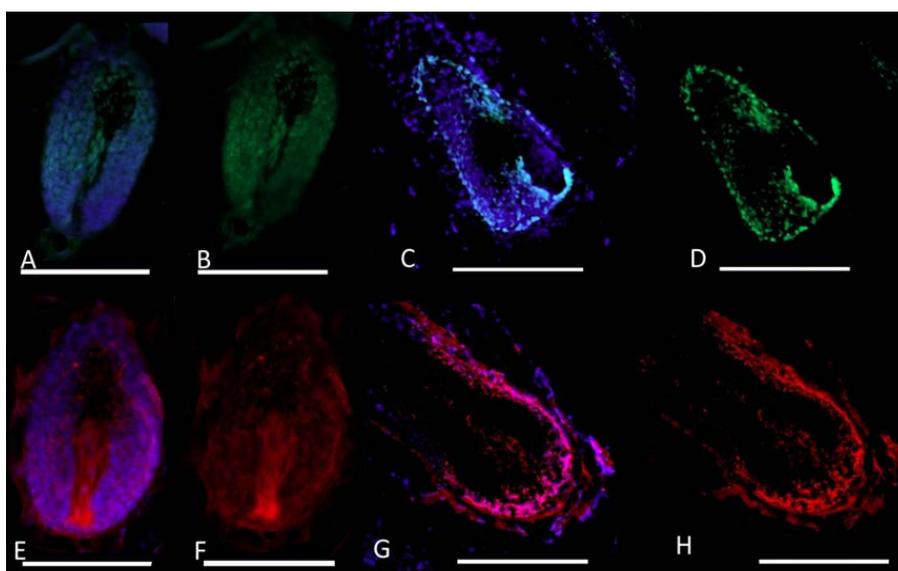


Рисунок 1.9 - ВФ мыши на стадии среднего анагена, серийные срезы, окрашивание антителами против RIPK-3 (А – с DAPI, В – без DAPI) и антителами против Versican (Е – с DAPI, F – без DAPI); ВФ человека, серийные срезы, окрашивание антителами против RIPK-3 (С – с DAPI, D – без DAPI) и антителами против Versican (G – с DAPI, H – без DAPI). Масштабные отрезки: А, В, Е, F – 100 мкм; С, D, G, H – 200 мкм.

1.4 Заключение

Таким образом, разработана модельная система РЭ человека *in vitro*. В составе РЭ формируется 8-10 слоев жизнеспособных клеток и около 10 слоев уплощенных корнеоцитов рогового слоя. Экспрессия маркеров пролиферации и дифференцировки кератиноцитов РЭ соответствует структуре нативного эпидермиса; таким образом, процесс стратификации и дифференцировки в РЭ протекает аналогично. Полученные данные обосновывают применение модели РЭ в фундаментальных и прикладных исследованиях в области биологии кожи в норме и при патологии.

В коже мыши и человека впервые обнаружена экспрессия маркеров некроптоза RIPK-1 и RIPK-3, которые могут играть существенную, но пока не изученную роль в жизнедеятельности ВФ [43]. Предполагается проведение исследований RIPK-1 и RIPK-3 с точки зрения их участия в различных сигнальных каскадах, обеспечивающих циклические изменения ВФ.

Проанализированы имеющиеся в настоящее время литературные данные по активности и пластичности эпидермальных стволовых клеток волосяного фолликула в регенеративных процессах и ее связи с воспалительным микроокружением [44]. Подчеркивается взаимосвязь между воспалением, рубцеванием и регенерацией фолликулов как показателем полного заживления ран. Принимая во внимание доступные данные, мы также делаем вывод, что может существовать предполагаемая взаимосвязь между активацией стволовых клеток, воспалением и компонентами путей запрограммированной клеточной гибели.

Дополнительно проведены работы по моделированию пролиферативной витреоретинопатии с использованием культуры фибробластов кожи Коллекция клеточных культур для биотехнологических и биомедицинских исследований (общебиологического и биомедицинского направления) [45].

1.5 Список использованных источников

1. Chermnykh E.S., Alpeeva E.V., Vorotelyak E.A. Transglutaminase 3: The Involvement in Epithelial Differentiation and Cancer//Cells. – 2020. – Vol. 9. – Is. 9. – Art. No 1996. DOI: 10.3390/cells9091996.
2. Бейлин А.К., Риппа А.Л., Шаробаро В.И, Гурская Н.Г., Воротеляк Е.А. Реконструированный эпидермис человека *in vitro* - модель для фундаментальных и прикладных исследований кожи человека//Вестник дерматологии и венерологии. – 2020. – Т. 96. – № 2. – С. 24-34. DOI: 10.25208/vdv1107.

3. Müller-Röver S., Foitzik K., Paus R. et al. A comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages//*Journal of Investigative Dermatology*. – 2001. - Vol. 117(1). - P. 3 - 15. doi:10.1046/j.0022-202x.2001.01377.x
4. Eckhart L., Lippens S., Tschachler E., et al. Cell death by cornification//*Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. – 2013. - Vol. 1833(12). - P 3471 - 3480. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.06.010.
5. Tong X. Keratin 17 modulates hair follicle cycling in a TNF -dependent fashion//*Genes Dev*. – 2006. - Vol. 20(10). - P. 1353 - 1364. doi:10.1101/gad.1387406.
6. Raju S, Whalen D, Mengistu M et al. Kinase domain dimerization drives RIPK3-dependent necroptosis//*Sci Signal*. – 2018. - Vol. 11(544):eaar2188. doi:10.1126/scisignal.aar2188.
7. Delanghe T, Dondelinger Y, Bertrand M. RIPK1 Kinase-Dependent Death: A Symphony of Phosphorylation Events. *Trends Cell Biol*. – 2020. - Vol. 30(3). - P. 189 - 200. doi:10.1016/j.tcb.2019.12.009.
8. Cho Y, Challa S, Moquin D et al. Phosphorylation-Driven Assembly of the RIP1-RIP3 Complex Regulates Programmed Necrosis and Virus-Induced Inflammation//*Cell*. – 2009. - Vol. 137(6). – P. 1112 - 1123. doi:10.1016/j.cell.2009.05.037
9. Paus R., Stenn K., Link R. Telogen skin contains an inhibitor of hair growth//*British Journal of Dermatology*. – 1990. - Vol. 122(6). - P. 777 - 784. doi:10.1111/j.1365-2133.1990.tb06266.x.
10. Ando M., Kawashima T., Kobayashi H., Ohkawar A. Immunohistological Detection of Proliferating Cells in Normal and Psoriatic Epidermis Using Ki-67 Monoclonal Antibody//*J Dermatol Sci*. – 1990. - Vol. 1(6). - P. 441 - 446. doi: 10.1016/0923-1811(90)90014-5.
11. Watt F.M. Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation// *EMBO J*. – 2002. - Vol. 21(15). - P. 3919 - 26. doi: 10.1093/emboj/cdf399.
12. Fuchs E., Raghavan S. Getting under the skin of epidermal morphogenesis//*Nat Rev Genet*. – 2002. - Vol. 3(3). - P. 199 - 209. doi: 10.1038/nrg758
13. Риппа А.Л., Воротеляк Е.А., Васильев А.В., Терских В.В. Роль интегринов в формировании и гомеостазе эпидермиса и придатков кожи//*Acta Naturae*. – 2013. - Vol. 5(4 (19)). - P. 24 - 36.
14. Vig K., Chaudhari A., Tripathi S., et al. Advances in Skin Regeneration Using Tissue Engineering//*Int J Mol Sci*. – 2017. - Vol. 18(4). doi:10.3390/ijms18040789

15. Pedrosa T. do N., Catarino C.M., Pennacchi P.C., et al. A new reconstructed human epidermis for in vitro skin irritation testing//*Toxicol In Vitro*. – 2017. - Vol. 42. - P. 31 - 37. doi:10.1016/j.tiv.2017.03.010
16. Kallis P.J., Friedman A.J., Lev-Tov H. A Guide to Tissue-Engineered Skin Substitutes//*J Drugs Dermatol*. – 2018. - Vol. 17(1). - P. 57 – 64.
17. Rippa A.L., Kalabusheva E.P., Vorotelyak E.A. Regeneration of Dermis: Scarring and Cells Involved//*Cells*. – 2019. - Vol. 8(6). doi:10.3390/cells8060607
18. Chermnykh E., Kalabusheva E., Vorotelyak E. Extracellular Matrix as a Regulator of Epidermal Stem Cell Fate //*Int J Mol Sci*. – 2018. - Vol. 19(4). doi:10.3390/ijms19041003
19. Алпеева Е.В., Сидоренкова А.Ф., Воротеяк Е.А. Экспериментальные клеточные системы: от органов в чашке Петри до “органов-на-чипах”//*Вестник Московского университета. Серия 16. Биология*. – 2017.
20. Di W.-L., Larcher F., Semenova E., et al. Ex-vivo gene therapy restores LEKTI activity and corrects the architecture of Netherton syndrome-derived skin grafts//*Mol Ther*. – 2011. - Vol. 19(2). - P. 408 - 416. doi:10.1038/mt.2010.201
21. Takashima S., Shinkuma S., Fujita Y., et al. Efficient Gene Reframing Therapy for Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa with CRISPR/Cas9//*J Invest Dermatol*. – 2019. - Vol. 139(8). - P. 1711 - 1721.e4. doi:10.1016/j.jid.2019.02.015.
22. March O.P., Lettner T., Klausegger A., et al. Gene Editing-Mediated Disruption of Epidermolytic Ichthyosis-Associated KRT10 Alleles Restores Filament Stability in Keratinocytes //*J Invest Dermatol*. – 2019. - Vol. 139(8). - P. 1699 - 1710.e6. doi:10.1016/j.jid.2019.03.1146.
23. Woodley D.T., Keene D.R., Atha T., et al. Injection of recombinant human type VII collagen restores collagen function in dystrophic epidermolysis bullosa//*Nat Med*. – 2004. - Vol. 10(7). - P. 693 - 695. doi:10.1038/nm1063.
24. Gómez-Grau M., Garrido E., Cozar M., et al. Evaluation of Aminoglycoside and Non-Aminoglycoside Compounds for Stop-Codon Readthrough Therapy in Four Lysosomal Storage Diseases//*PLoS One*. – 2015. - Vol. 10(8). doi:10.1371/journal.pone.0135873.
25. Matalonga L., Arias Á., Tort F., et al. Effect of Readthrough Treatment in Fibroblasts of Patients Affected by Lysosomal Diseases Caused by Premature Termination Codons//*Neurotherapeutics*. – 2015. - Vol. 12(4). - P. 874 - 886. doi:10.1007/s13311-015-0368-4.

26. Woodley D.T., Cogan J., Hou Y., et al. Gentamicin induces functional type VII collagen in recessive dystrophic epidermolysis bullosa patients//*J Clin Invest.* – 2017. - Vol. 127(8). - P. 3028 - 3038. doi:10.1172/JCI92707.
27. Lincoln V., Cogan J., Hou Y., et al. Gentamicin induces LAMB3 nonsense mutation readthrough and restores functional laminin 332 in junctional epidermolysis bullosa//*Proc Natl Acad Sci USA.* – 2018. - Vol. 115(28). - P. E6536-E6545. doi:10.1073/pnas.1803154115.
28. Yuki T., Tobiishi M., Kusaka-Kikushima A., Ota Y., Tokura Y. Impaired Tight Junctions in Atopic Dermatitis Skin and in a Skin-Equivalent Model Treated with Interleukin-17//*PLoS ONE.* – 2016. - Vol. 11(9):e0161759. doi:10.1371/journal.pone.0161759.
29. Barker C.L., McHale M.T., Gillies A.K., et al. The development and characterization of an in vitro model of psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2004; 123(5):892-901. doi:10.1111/j.0022-202X.2004.23435.x.
30. Jung J.P., Lin W.-H., Riddle M.J., Tolar J., Ogle B.M. A 3D in vitro model of the dermoepidermal junction amenable to mechanical testing//*J Biomed Mater Res A.* – 2018. - Vol. 106(12). - P. 3231 - 3238. doi:10.1002/jbm.a.36519.
31. Swope V.B., Supp A.P., Schwemberger S., Babcock G., Boyce S. Increased expression of integrins and decreased apoptosis correlate with increased melanocyte retention in cultured skin substitutes. *Pigment Cell Res.* 2006. - Vol. 19(5). - P. 424 - 433. doi:10.1111/j.1600-0749.2006.00325.x.
32. Nissan X., Larribere L., Saidani M., et al. Functional melanocytes derived from human pluripotent stem cells engraft into pluristratified epidermis//*Proc Natl Acad Sci USA.* – 2011. - Vol. 108(36). - P. 14861 - 14866. doi:10.1073/pnas.1019070108.
33. Facy V., Flouret V., Régnier M., Schmidt R. Reactivity of Langerhans cells in human reconstructed epidermis to known allergens and UV radiation//*Toxicol In Vitro.* – 2005. - Vol. 19(6). - P. 787 - 795. doi:10.1016/j.tiv.2005.03.018.
34. Meier F., Nesbit M., Hsu M.Y., et al. Human melanoma progression in skin reconstructs : biological significance of bFGF//*Am J Pathol.* – 2000. - Vol. 156(1). - P. 193 - 200. doi:10.1016/S0002-9440(10)64719-0 .
35. Kiesewetter L., Littau L., Walles H., Boccaccini A.R., Groeber-Becker F. Reepithelialization in focus: Non-invasive monitoring of epidermal wound healing in vitro//*Biosens Bioelectron.* – 2019. - Vol. 142:111555. doi:10.1016/j.bios.2019.111555.
36. Netzlaff F., Lehr C.-M., Wertz P.W., Schaefer U.F. The human epidermis models EpiSkin, SkinEthic and EpiDerm: an evaluation of morphology and their suitability for testing

phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport//Eur J Pharm Biopharm. – 2005. - Vol. 60(2). - P. 167 - 178. doi:10.1016/j.ejpb.2005.03.004.

37. Chakrabarty K.H., Heaton M., Dalley A.J., et al. Keratinocyte-driven contraction of reconstructed human skin//Wound Repair Regen. – 2001. - Vol. 9(2). - P. 95 - 106. doi:10.1046/j.1524-475x.2001.00095.x.

38. Portes P., Pygmalion M.J., Popovic E., Cottin M., Mariani M. Use of human reconstituted epidermis Episkin for assessment of weak phototoxic potential of chemical compounds//Photodermatol Photoimmunol Photomed. – 2002. - Vol. 18(2). - P. 96 - 102. doi:10.1034/j.1600-0781.2002.180207.x.

39. Чаплин А.В., Ребриков Д.В., Болдырева М.Н. Микробиом Человека. Вестник Российского Государственного Медицинского Университета. – 2017. - № 2. - С. 5 – 13.

40. Hoffmann J., Heisler E., Karpinski S., et al. Epidermal-skin-test 1,000 (EST-1,000)--a new reconstructed epidermis for in vitro skin corrosivity testing//Toxicol In Vitro. – 2005. - Vol. 19(7). - P. 925 - 929. doi:10.1016/j.tiv.2005.06.010.

41. Jung K.-M., Lee S.-H., Jang W.-H., et al. KeraSkin-VM: a novel reconstructed human epidermis model for skin irritation tests//Toxicol In Vitro. - 2014. - Vol. 28(5). - P. 742 - 750. doi:10.1016/j.tiv.2014.02.014.

42. Yang C, Cotsarelis G. Review of hair follicle dermal cells//J Dermatol Sci. – 2010. - Vol. 57(1). - P. 2 - 11. doi:10.1016/j.jdermsci.2009.11.005

43. Krause K., Foitzik K. Biology of the hair follicle: the basics//Semin Cutan Med Surg. - 2006. - Vol. 25(1). - P. 2 - 10. doi:10.1016/j.sder.2006.01.002

43. Моргун Е.Н., Позднякова Е.Д., Воротеляк Е.А. Экспрессия протеинкиназ ripk-1 и ripk-3 в клетках волосяного фолликула мыши и человека//ДАН. Науки о жизни. – 2020. – Т. 494. – С. 61–64. – R Morgun E.I., Pozdniakova E.D., Vorotelyak E.A. Expression of Protein Kinases RIPK-1 and RIPK-3 in Mouse and Human Hair Follicle//Doklady Biochemistry And Biophysics. –2020. – Vol. 494. – Is. 1. – P. 252-255. DOI: 10.1134/S1607672920050105.

44. Morgun E.I., Vorotelyak E.A. Epidermal Stem Cells in Hair Follicle Cycling and Skin Regeneration: A View From the Perspective of Inflammation//Front. Cell Dev. Biol. – 2020. . – Art. No 581697. DOI: 10.3389/fcell.2020.581697.

45. Khoroshilova-Maslova I.P. , Leparskaya N.L., Alpeeva E.V., Voroteliak E.A. Melfalan in the treatment of proliferative vitreoretinopathy (experimental study)(Article) [Melfalan pri lechenii proliferativnoi vitreoretinopatii (eksperimental'noe issledovanie)]//Vestnik oftalmologii. – 2020. – Vol. 136. – Is. 4. – P. 19-25. DOI: 10.17116/oftalma202013604119.

1.6 Отчетные публикации по разделу

1. **Бейлин А.К., Риппа А.Л., Шаробаро В.И, Гурская Н.Г., Воротеляк Е.А.** Реконструированный эпидермис человека *in vitro* - модель для фундаментальных и прикладных исследований кожи человека//Вестник дерматологии и венерологии. – 2020. – Т. 96. – № 2. – С. 24-34. DOI: 10.25208/vdv1107.
2. **Моргун Е.Н., Позднякова Е.Д., Воротеляк Е.А.** Экспрессия протеинкиназ ripk-1 и ripk-3 в клетках волосяного фолликула мыши и человека//ДАН. Науки о жизни. – 2020. – Т. 494. – С. 61–64. – R. - **Morgun E.I., Pozdniakova E.D., Vorotelyak E.A.** Expression of Protein Kinases RIPK-1 and RIPK-3 in Mouse and Human Hair Follicle//Doklady Biochemistry And Biophysics. –2020. – Vol. 494. – Is. 1. – P. 252-255. DOI: 10.1134/S1607672920050105. - Q4.
3. **Khoroshilova-Maslova I.P. , Leparskaya N.L., Alpeeva E.V., Voroteliak E.A.** Melfalan in the treatment of proliferative vitreoretinopathy (experimental study) [Melfalan pri lechenii proliferativnoi vitreoretinopatii (eksperimental'noe issledovanie)]//Vestnik oftalmologii. – 2020. – Vol. 136. – Is. 4. – P. 19-25. DOI: 10.17116/oftalma202013604119.- S
4. **Chermnykh E.S., Alpeeva E.V., Vorotelyak E.A.** Transglutaminase 3: The Involvement in Epithelial Differentiation and Cancer//Cells. – 2020. – Vol. 9. – Is. 9. – Art. No 1996. DOI: 10.3390/cells9091996. – Q2.
5. **Morgun E.I., Vorotelyak E.A.** Epidermal Stem Cells in Hair Follicle Cycling and Skin Regeneration: A View From the Perspective of Inflammation//Front. Cell Dev. Biol. – 2020. . – Art. No 581697. DOI: 10.3389/fcell.2020.581697. – Q1.

РАЗДЕЛ 2 НЕЙРАЛЬНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК (ИПСК) ЧЕЛОВЕКА

2.1 Введение

Нейрон — электрически возбудимая клетка, которая предназначена для приема, обработки, хранения, передачи и вывода информации с помощью электрохимических сигналов. Нейроны могут соединяться один с другим, формируя нервные сети, поэтому нейроны являются основными структурными и функциональными единицами нервной системы. Изучение сетевой специфической физиологической активности нейронов человека является актуальной задачей современной клеточной биологии и нейрофизиологии, поскольку многие нейродегенеративные или психоневрологические заболевания могут быть связаны с нарушениями работы именно нервной сетевой активности.

В связи с труднодоступностью первичного биоматериала, изучение нейронов человека затруднено. Хорошая новость заключается в том, что эти ограничения отпадают благодаря индуцированным плюрипотентным стволовым клеткам (ИПСК), которые могут быть получены из легкодоступных клеток кожи человека [1, 2]. ИПСК - стволовые клетки, полученные из соматических клеток взрослого организма путем репрограммирования. ИПСК сходны с эмбриональными стволовыми клетками и могут продуцировать клетки взрослого организма всех типов [3]. В последние годы, в связи с постоянно обновляющимися методами и углублением исследований в этой области, работы с участием ИПСК активно развиваются.

Возможно получить нейроны человека, индуцируя дифференцировку ИПСК в нервные клетки и с последующим культивированием *in vitro* [4]. Также в связи с развитием технологии химерных флуоресцентных белков – кальциевых индикаторов, таких как GCaMP6, можно измерять специфическую физиологическую активность нейронов при помощи флуоресцентной прижизненной микроскопии. Хотя флуоресцентное окрашивание и морфологическое наблюдение могут первоначально идентифицировать природу нейронов, зрелость нейронов *in vitro* плохо определяется по экспрессии специфических маркеров. Обнаружение корректного мембранного потенциала и правильной специфической сетевой активности является более надежным методом определения зрелости нейронов.

В нашей работе были получены линии ИПСК человека, экспрессирующие элементы системы TetON-NGN2 для быстрой дифференцировки в нейроны, а также флуоресцентный кальциевый индикатор GCaMP6s. Нами были получены «доказательства

принципа» («proof-of-principle») работы системы путем измерением активности индуцированных нейронов, при помощи прижизненной флуоресцентной цейтраферной съемки.

2.2 Материалы и методы

2.2.1 Реагенты и расходные материалы, использованные в исследовании

- Набор для выделения плазмидной ДНК Plasmid Midiprep 1.0 (#BC021, Евроген, Россия)
- Агароза (#A9539-500G, Sigma-Aldrich, США)
- 50x TAE Buffer (#B49, Thermo Fisher Scientific, США)
- N2 добавка (#17504044, Invitrogen, США)
- B27 добавка (#17504044, Invitrogen, США)
- mTeSR1 (#85850, Stem Cell Technologies, Канада)
- mTeSR1 5x Supplement (#85852, Stem Cell Technologies, Канада)
- ROCK ингибитор (Y27632, Sigma-Aldrich, США)
- Раствор DPBS (#P060p, ПанЭко, Россия)
- Matrigel (#356234, BD Biosciences, США)
- Среда для криозаморозки плюрипотентных стволовых клеток mFreSR (#05854, Stem Cell Technologies, Канада)
- DMEM (#11960-044, Gibco, США)
- DMEM/F12 (#11320-074, Gibco, США)
- β-меркаптоэтанол (#M3148-100ML, Sigma-Aldrich, США)
- Пируват натрия (#11360-039, Gibco, США)
- Neurobasal Medium (#21103-049, Stem Cell Technologies, Канада)
- Пенициллин/стрептомицин (PenStrep) (#15070-063, Gibco, США)
- GlutaMax
- Триптон (#T793-1kG Fluka, Германия)
- Дрожжевой экстракт (#Y1625-1KG, Fluka, Германия)
- Ампициллин (Биосинтез, Россия)
- Составные среды, использованные в работе:
Среда для терминальной дифференцировки ИПСК в нейроны (N2B27):
DMEM / F12 + Neurobasal Medium (1:1), N2-supplement, B27-supplement, 0.1 mM βMercaptoethanol, mM GlutaMax, 1 mM пирувата натрия, пенициллинстрептомицин (50 ЕД/мл; 50 мкг/мл).
- Приготовление раствора для покрытия матригелем:

Смешивали DMEM/F12 + Matrigel (BD Biosciences, США) в соотношении 50:1 (все манипуляции производились на льду, пока все растворы холодные), далее разливали по аликвотам и хранили при -20°C.

- Покрытие культурального пластика матригелем:

Раствор матригеля наливали в культуральную посуду исходя из соотношения 1 мл на 10 см², инкубировали в течении 1 часа при +37°C, после чего сливали и промывали 1 раз свежей средой.

Все манипуляции с живыми клеточными культурами производились в стерильных условиях внутри ламинарных шкафов 2-го уровня биобезопасности, соблюдая принятые правила асептики при работе с культурами клеток человека и животных.

2.2.2 LB (Luria-Bertani) жидкая среда и производство питательной среды

В эксперименте нам было необходимо культивировать бактерии E.coli, для которых необходима своя питательная среда LB. В таблице 2.1 представлен состав одного литра жидкой среды LB.

Таблица 2.1 - Рецепт 1 л среды LB

Вещество	Количество
NaCl	10г
Триптон (Fluka, Германия)	10г
Дрожжевой экстракт (Fluka, Германия)	5г
Раствор NaOH (4М)	Разведение в 1000 х
H ₂ O	До 1 л

Далее среду автоклавировали и держали в стерильных условиях.

В случае приготовления полужидких сред в чашках Петри, к среде LB добавляли бактериологический агар из расчета 2г на 100мл среды и автоклавировали. При остывании раствора до примерно 50 градусов, в среду добавляли антибиотик селекции, и разливали по 10см чашкам Петри в стерильных условиях.

2.2.3 Культивирование ИПСК

IPS-KYOU – линия ИПСК человека, полученная в лаборатории Синъе Яманак (университет Киото, Япония) с помощью лентивирусной инфекции репрограммирующими факторами Oct4, Sox2, c-Мус, KLF4 фибробластов кожи взрослого человека. Линия IPS-KYOU была приобретена в клеточном банке (ACS-1023™, ATCC, США).

Линия IPS-KYOU-GCamp6s ранее была получена в нашей лаборатории и представляет генномодифицированную линию IPS-KYOU, в которую был введен трансген GCamp6s под промотором CAG, при помощи транспозазы Sleeping Beauty.

ИПСК культивировались в чашках Петри d=60мм, покрытых матригелем (1/50 в DMEM/F12) (BD Bioscience) в среде mTesR1 (Stem Cell Technologies) при 37°C в CO₂-инкубаторе с 5% CO₂ и при влажности 100%. При достижении 80% конfluence клетки пассировали. Для этого ИПСК снимали аккутазой (Gibco, США), разбавляли в растворе DPBS (ПанЭко, Россия) и центрифугировали при 400 g в течении 5 минут в центрифуге Eppendorf Centrifuge 5702. Супернатант удаляли, а клеточный осадок ресуспендировали в среде mTeSR1, содержащей 5 мкМ ROCKi (Y27632, Sigma-Aldrich, США). Для криоконсервирования клеток использовали среду FresR (Stem Cell Technologies, Канада).

2.2.4. Трансформация плазмид в *E.coli*

В работе мы использовали две плазмиды rtTA-N144 и TRET-hNgn2-UBC-PuRo, полученные из депозитория addgene (Plasmid #66810, Plasmid #61474) (рисунок 2.1). Данные лентивирусные векторы предназначены для управляемой экспрессии трансгена Ngn2 в клетках мишенях при помощи добавления индуктора Тетрациклина (или Доксциклина). Вектор rtTA-N144 является вспомогательным, поскольку кодирует постоянно экспрессирующийся трансактиватор rtTA необходимый для работы всей системы.

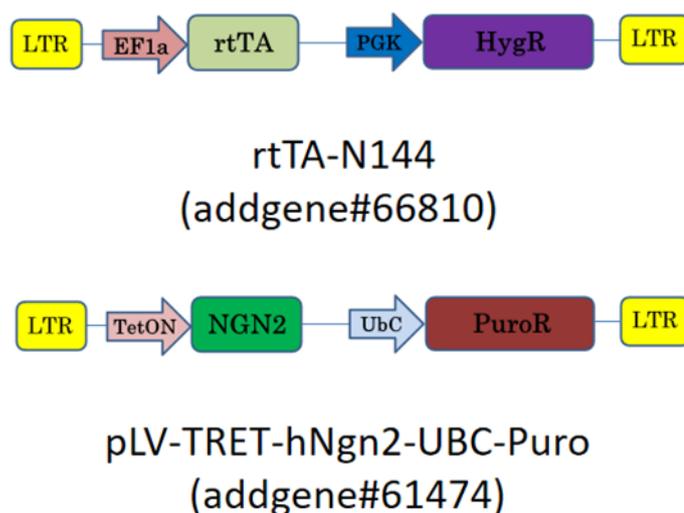


Рисунок 2.1 - Принципиальная схема кассет экспрессии двух плазмид rtTA-N144 и TRET-hNgn2-UBC-PuRo

Компетентные клетки XL1-Blue (Евроген) трансформировали по стандартному протоколу для химической трансформации, предложенному производителем. Чашки

Петри с бактериями помещали в суховоздушный термостат и инкубировали в течении 14-16 ч при 37°C.

Далее бактерии выращивали в ночной культуре: в 50-мл центрифужные пробирки наливали по 25 мл LB с ампициллином в конечной концентрации 100 мкг/л, носиком забирали 3 колонии из чашки Петри и переносили их в пробирку. Инкубировали в орбитальном шейкере с функцией термостатирования на скорости перемешивания 250 об/мин при +37°C в течение ночи.

2.2.5 Выделение плазмидной ДНК из клеток(*E.coli*)

Выделение плазмидной ДНК производили с помощью набора для выделения плазмидной ДНК на колонках Plasmid Midiprep (Евроген) по стандартному протоколу производителя. Концентрацию ДНК в растворе определяли с помощью спектрофотометра Implen NanoPhotometer P-Class P360.

2.2.6 Анализ при помощи реакции рестрикции

Чтобы убедиться в том, что полученная ДНК содержит исследуемые плазмиды, проводили рестрикционный анализ. Для этого готовили три образца: 1. отрицательный контроль, содержащий ДНК, но без рестриктаз, 2. ДНК и первая рестриктаза, 3. ДНК и обе рестриктазы. В реакцию добавляли 1 мкг образца ДНК, буфер для рестрикции Orange DNA Loading Dye (6X) 1 мкл, рестриктазы по 1 мкл и доводили H₂O до объема 10 мкл. Смесь инкубировали при 37°C в течение 1-2 часа.

2.2.7 Электрофорез в агарозном геле

Продукты реакции рестрикции должны быть разделены на 1% агарозном геле. Агарозу (Sigma) растворяли в трис-ацетатном буфере TAE Buffer (Thermo Fisher Scientific), доведенном до рабочей концентрации, и расплавляли в микроволновой печи. Когда температура расплавленного геля достигала 50- 60°C, добавляли раствор EtBr 10 мг/мл (5мкл раствора в 50мл расплавленной агарозы). Раствор охлаждали приблизительно до 37°C. Тёплый гель заливали в специальную форму до достаточного погружения зубцов гребёнки. Через час застывания геля при комнатной температуре, гребёнку аккуратно вынимали. В камеру для электрофореза Mini-Sub Cell GT Cell (Bio-Rad) помещали форму с застывшим агарозным гелем и наполняли её 1x TAE. Образцы наносили по 2 мкл в лунку. В качестве маркера использовали FastRuler High Range DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). Камеру закрывали, присоединяли электроды к источнику тока и устанавливали напряжение 90 В. Электрофорез проводили при помощи PowerPac HC High-Current Power Supply (Bio-Rad) в течение часа. Гель анализировали при помощи фотографирования на системе гель-документации Gel Doc XR (Bio-Rad), используя программу Image Lab 6.0.

2.2.8 Лентивирусная упаковка

Вирусы не имеют самостоятельных механизмов репликации, поэтому нужны клетки, чтобы их наработать. Обычно используются клетки НЕК293Т (или некоторые другие варианты этой линии). До трансфекции клетки НЕК293Т высевали в приблизительно по 0,5 млн клеток в 3 см культуральные чашки (или лунки 6-луночного планшета), и на следующий день после посева клетки находились приблизительно на 40-50% монослоя.

Для упаковки лентивирусов мы использовали систему третьего поколения (плазмиды pLP1, pLP2, pVSVG). Сначала мы упаковывали лентивирусный, векторный плазмидный и вирусные упаковочные векторы в липосомы при помощи реагента Lipfectamin2000 (Invitrogen, США) по протоколу, предложенному производителем. Обычное соотношение используемых векторов было: плазмиды pLP1 – 4 мкг, pLP2- 2 мкг, pVSVG – 1мкг, вектор интереса- 4 мкг. Мы использовали бессывороточную среду OPTI-MEM во время формирования липосом. Бессывороточная среда OPTI-MEM способствует образованию комплексов ДНК и катионных липосом и повышает эффективность трансфекции. Смесь для трансфекции добавляли по каплям в среду к клеткам. После добавления раствора мы осторожно вращали планшет, чтобы перемешать среду и равномерно распределить смесь для трансфекции по всему объему. Инкубировали в клетки с комплексами в течение 4 часов. После инкубации мы осторожно аспирировали среду и добавляли 2 мл полной ростовой среды. Клетки НЕК293Т упаковывают вирусные частицы и высвобождают их в культуральную среду. Через 48 часов культивирования среду (вирусные частицы) собирали и стерилизовали через 0,45 мкм фильтр.

2.2.9 Трансдукция ИПСК

Собранный супернатант, содержащий упакованные лентивирусы, без дополнительных инкубаций и длительного хранения, сразу же наливали на клетки ИПСК, смешивая в соотношении 2мл супернатанта + 2 мл полной ростовой среды mTeSR1. Добавляли полибрен в конечной концентрации 5мкг/мл. На следующий день осуществляли смену среду на полную ростовую среду mTeSR1, содержащей 5 мкМ ROCKi (Y27632, Sigma-Aldrich, США).

2.2.10 Клеточный проточный флуоресцентный сортинг

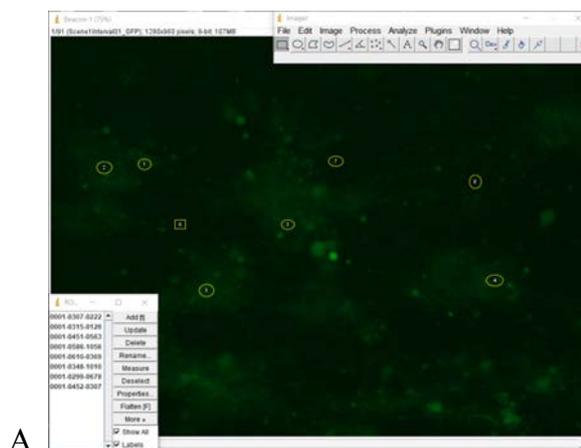
Поскольку ИПСК со временем могут замалчивать введенные трансгены, в частности кассету с GCamp6s, для обогащения GCamp6s+ клеток использовали проточный цитофлуориметер с функцией сортирга Bio-Rad S3e (Bio-Rad, США) с установленным программой ProSort (Bio-Rad, США).

2.2.11 Нейральная дифференцировка

За день до индукции нейральной дифференцировки, ИПСК рассаживали в $d=3$ см чашки Петри в количестве около 400 тыс. клеток на чашку в среде mTeSR1. Далее проводили инкубацию с доксициклином в течении 4 суток в той же среде mTeSR1 – индукция дифференцировки ИПСК в нейроны. Затем проводили инкубацию с арабинозид-цитозинном (AraC, конечная концентрация 0.1мкг/мл) в течении 1 суток – для того чтобы уничтожить делящиеся ИПСК, которые не ушли в дифференцировку. Затем среду меняли на среду для поддержания нейронов N2B27 – в течении минимум 3х суток до созревания нейронов.

2.2.12 Микросъемка в фазовом контрасте и в флуоресцентном микроскопе

Микросъемка производилась на флуоресцентном микроскопе (EVOS FL AUTO, Life Technologies). Клетки при этом находились в среде FluoroBrite™ DMEM (Cat#A1896701, Gibco, США), среду меняли за 30-60 мин перед съемкой. С помощью программы ImageJ мы выполняли обработку изображений и вычисляли интенсивность флуоресценции. Последовательность фотографий цейтраферной флуоресцентной съемки загружалась в программу ImageJ. Кружками выделялись небольшие области интересующих значений (ROI) на каждой из выбранных клеток (рисунок 2.2 А). Далее программа помогает количественно рассчитать среднюю яркость всех пикселей в выбранной области (рисунок 2.2 В). Затем можно было использовать программу Excel для обработки и визуализации полученных данных (рисунок 2.2 С).



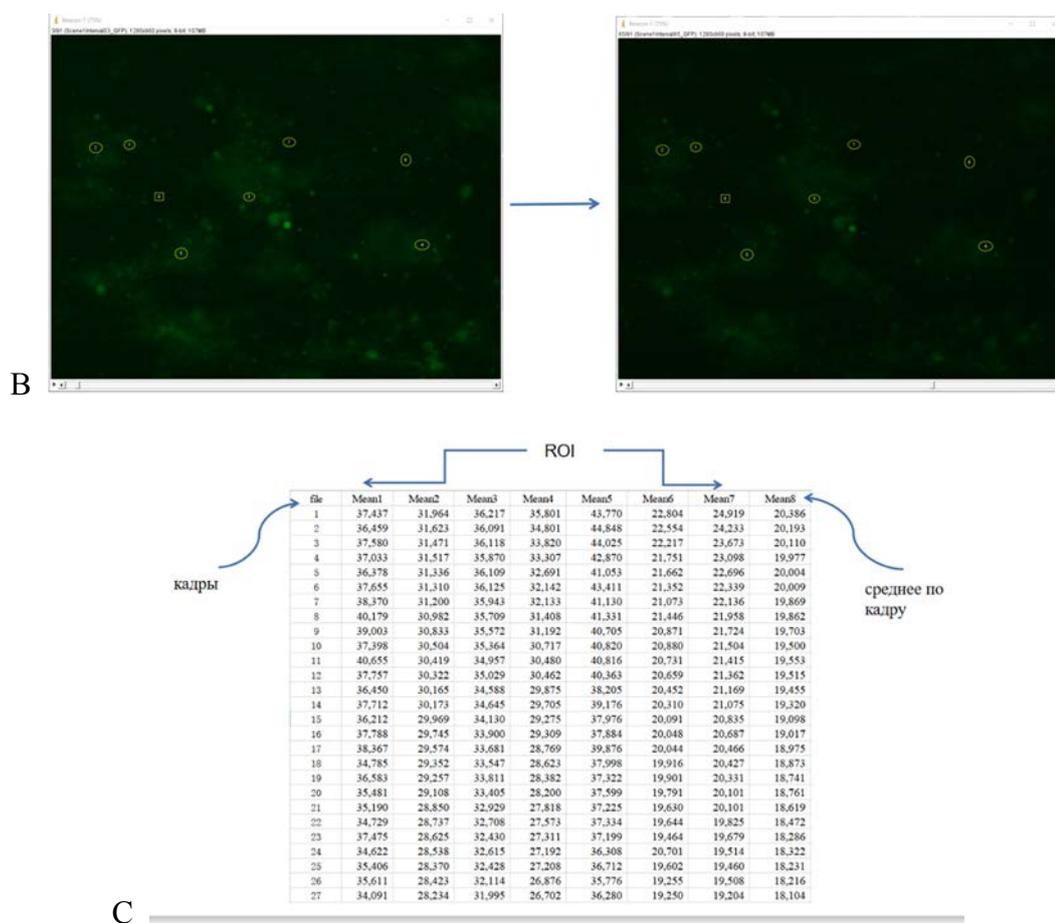


Рисунок 2.2 - Пример обчёта данных, полученных в результате флуоресцентной центрифужной съёмки в программах ImageJ и Excel
 А – выбор областей интересующих значений (ROI), стрелочки указывают на выбранные области. В – Выбранные ROI сохраняют свое положение на всей последовательности кадров (сравнение 3-го и 65-го кадров). С – Таблица полученных данных

2.3 Результаты и обсуждение

2.3.1 Обзор литературы. Постановка задачи.

Мы провели анализ имеющейся литературы по нейральной дифференцировке ИПСК человека, в результате чего был написан литературный обзор на тему «Нейральные стволовые клетки человека и методы их получения из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток *in vitro*» [5]. В результате был выбран наиболее перспективный метод получения нейронов из ИПСК, а именно направленная дифференцировка методом управляемой экзогенной экспрессии транскрипционного фактора NGN2.

Целью данного раздела работы стала разработка удобной модели изучения сетевой специфической физиологической активности нейронов на основе ИПСК с введенным трансгеном флуоресцентного кальциевого индикатора GCaMP6s.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- 1) Нарботать лентивирусные плазмиды rtTA-N144 и pLV-TRET-hNgn2-UBC-PuRo.

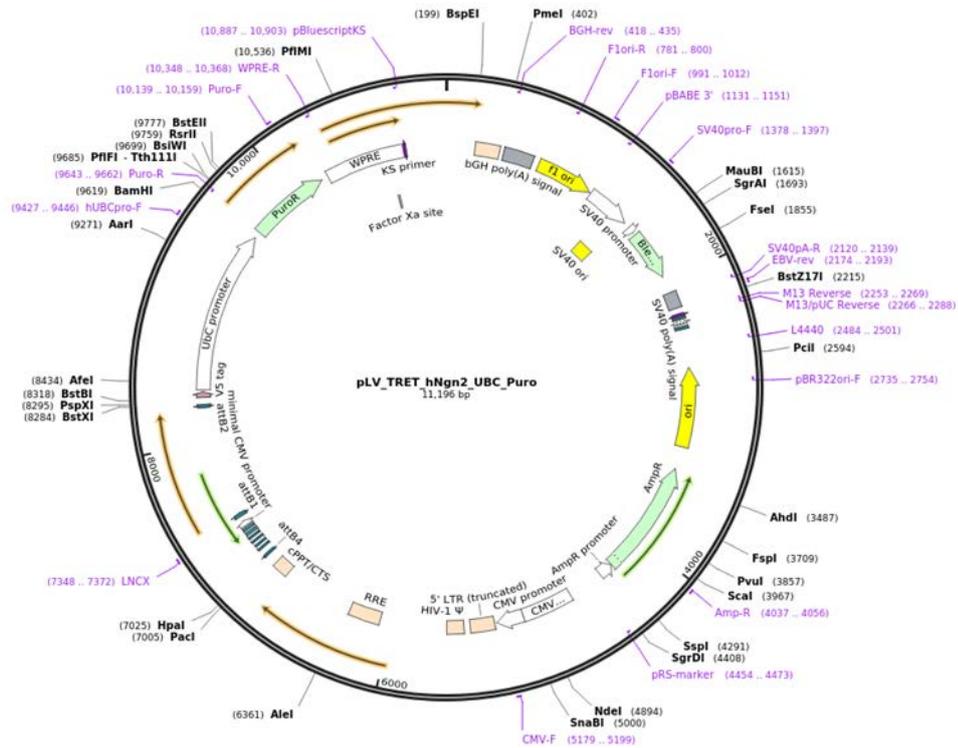


Рисунок 2.4 - Карта плазмиды pLV-TRET-hNgn2-UBC-Puro

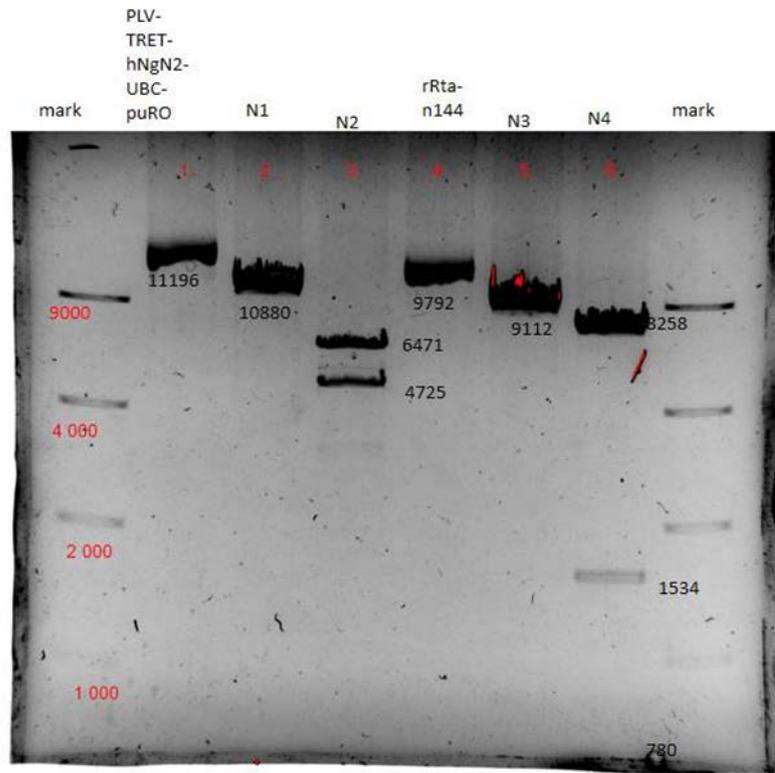


Рисунок 2.5 - Результаты электрофореза в агарозном геле для подтверждения подлинности плазмиды N1: PLV-TRET-hNgn2-UBC-puRO + EcoRI. N2: PLV-TRET-hNgn2-UBC-puRO + BamHI+NdeI. N3: rTA-N144+EcoRI. N4: rTA-N144+KpnI+EcoRI. KpnI и NdeI, EcoRI и BamHI – специфические ферменты рестрикции

Все полученные фрагменты были расположены на ожидаемых расстояниях друг от друга. Таким образом, мы подтвердили, что полученные нами генетически конструкции пригодны для дальнейшей работы.

2.3.3 Получение ИПСК, экспрессирующих GCamp6

Лентивирусные плазмиды были упакованы в лентивирусные частицы, была осуществлена трансдукция частицами клеток линии IPSC-KYOU-Gcamp6s (линия экспрессирует трансген GCamp6s и была получена в нашей лаборатории ранее) и проведена селекция антибиотиками пурамицином (1мкг/мл) и гигромицином (100мкг/мл) в течение 4-х недель. Полученная после селекции линия клеток получила название IPS-GCamp6s-TetON-NGN2 (рисунок 2.6).

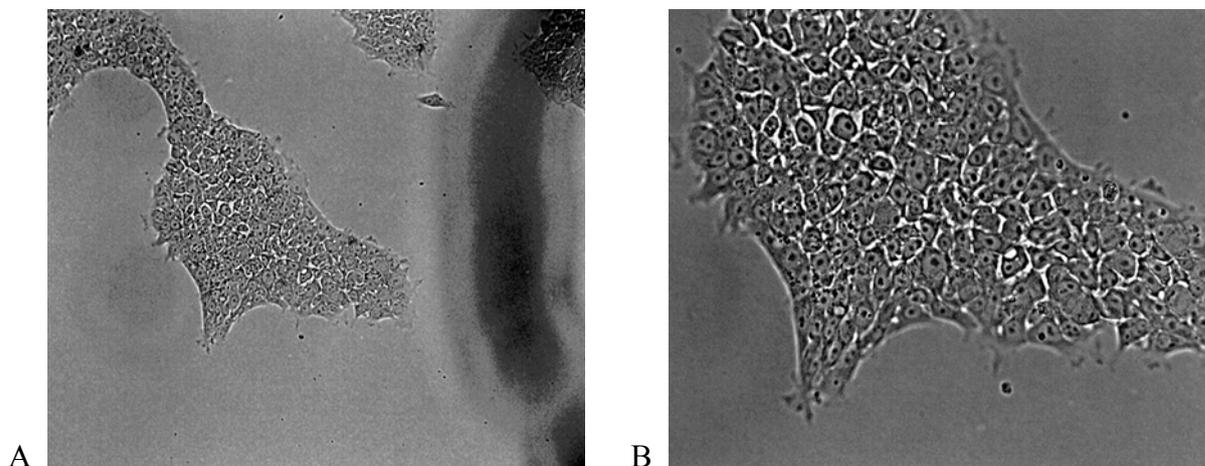


Рисунок 2.6 - Линия клеток IPS-GCamp6s-TetON-NGN2
А – фазовый контраст, 200х, В – фазовый контраст, 400х.

Полученная нами линия IPS-GCamp6s-TetON-NGN2 после селекции в целом сохранила свойство экспрессировать GCamp6s, однако значительная доля клеток потеряла сигнал (рисунок 2.7).

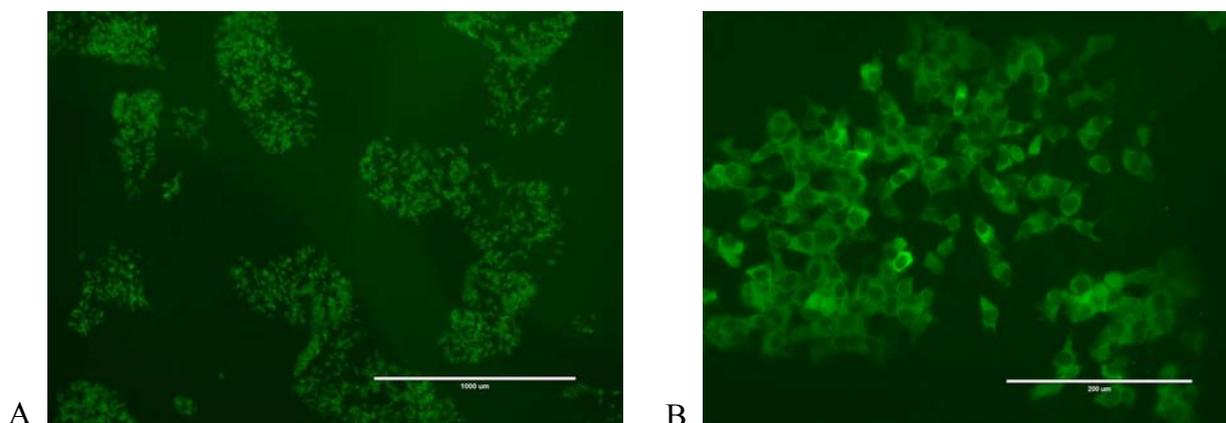


Рисунок 2.7 –Флуоресценция GCamp6s в зеленом спектре
А - длина шкалы 1 мм, В - длина шкалы 200 мкм

Для обогащения популяции GCamp6s+ клеток, был применен клеточный проточный флуоресцентный сортинг с отбором клеток, флуоресцирующих в диапазоне 495-555 нм (рисунки 2.8 и 2.9).

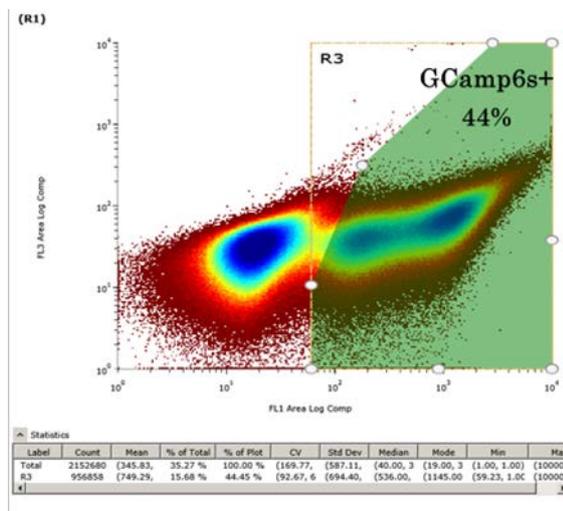


Рисунок 2.8 - Двухмерная точечная диаграмма распределения клеток по флуоресценции в диапазоне 495-555 нм (FL1) и диапазоне 610-635 нм (FL2). 44% - доля клеток, флуоресцирующих в диапазоне 495-555 нм.

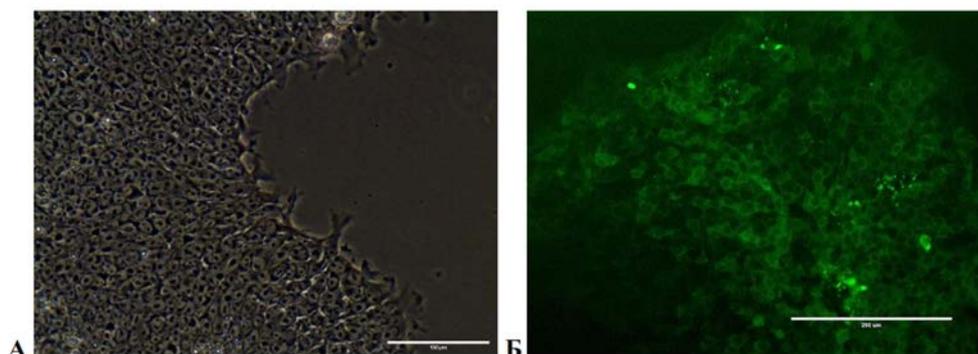
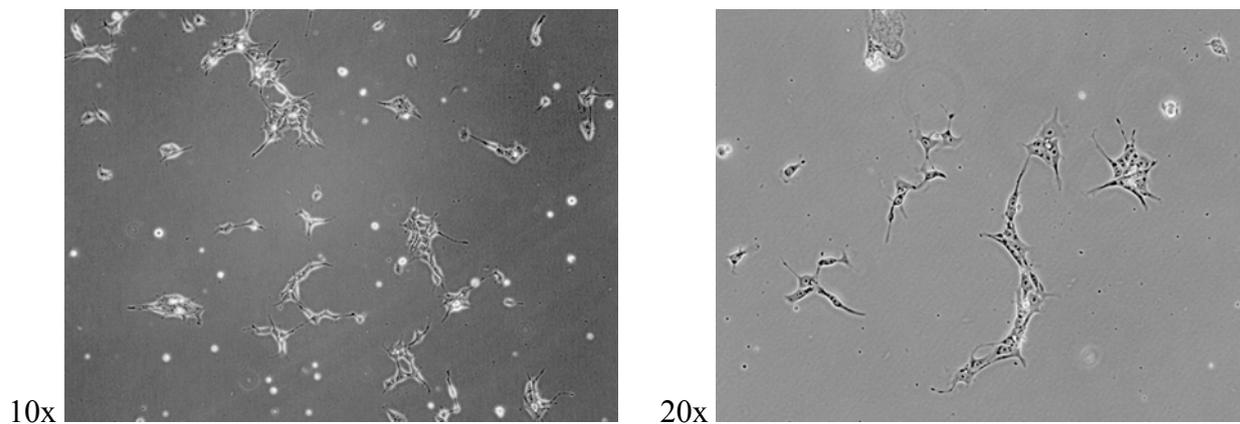


Рисунок 2.9 - Линия iPS-RYOU CAG-GCamp6s после сортирга
 А – фазовый контраст, 40х, длина шкалы 100 мкм; Б – флуоресценция GCamp6s в зеленом спектре, шкала 200 мкм.

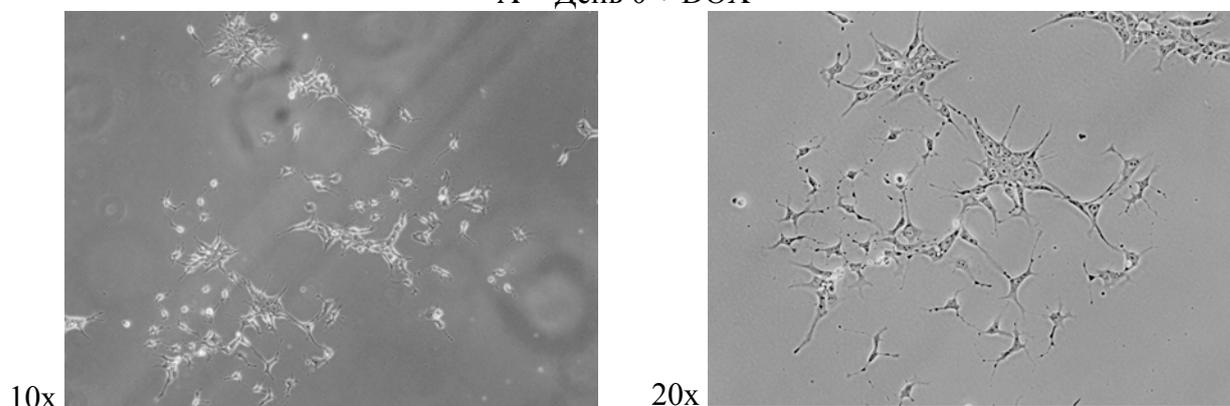
2.3.4 Дифференцировка ИПСК в нейральном направлении

Далее мы провели тест по дифференцировке клеток линии IPS-GCamp6s-TetON-NGN2 в нейральном направлении. После инкубации с доксициклином в течение 4 суток мы наблюдали индукцию дифференцировки ИПСК в нейроны. В первый день мы видим только ИПСК, на следующий день, кроме ИПСК, появляются клетки с изменяющейся морфологией. Далее с течением времени, происходит увеличение количества нервных клеток, а их морфология все больше напоминает нейроны. На день 4 мы видим, что аксоны нейронов уже значительной длины, однако в популяции остаются недифференцированные ИПСК, которые продолжают делиться и могут в дальнейшем получить пролиферативное преимущество перед нейронами. Для их элиминации была проведена инкубация с арабинозид-цитозинон (AraC, 0.1мкг/мл) в течение 1 суток. Затем

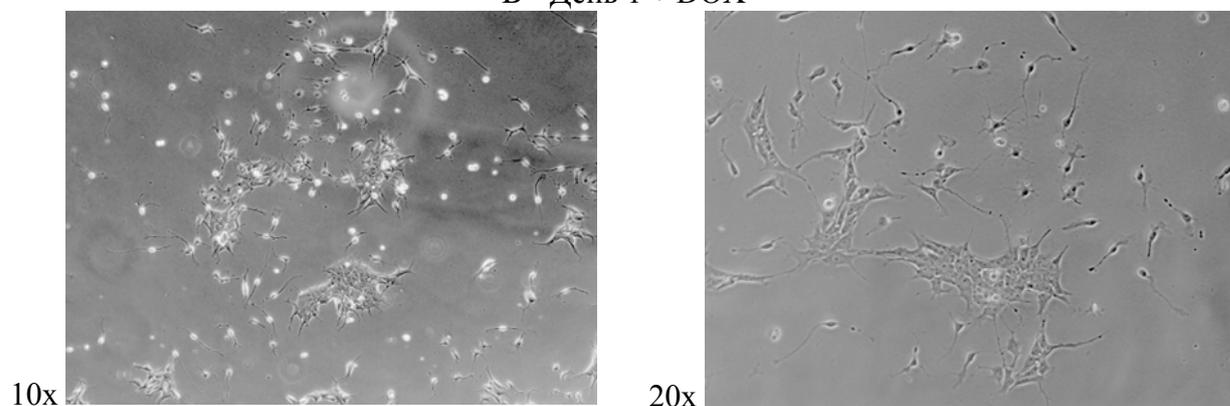
клетки культивировали в среде N2B27 – в течение минимум 3х суток до получения зрелых нейронов (рисунок 2.10).



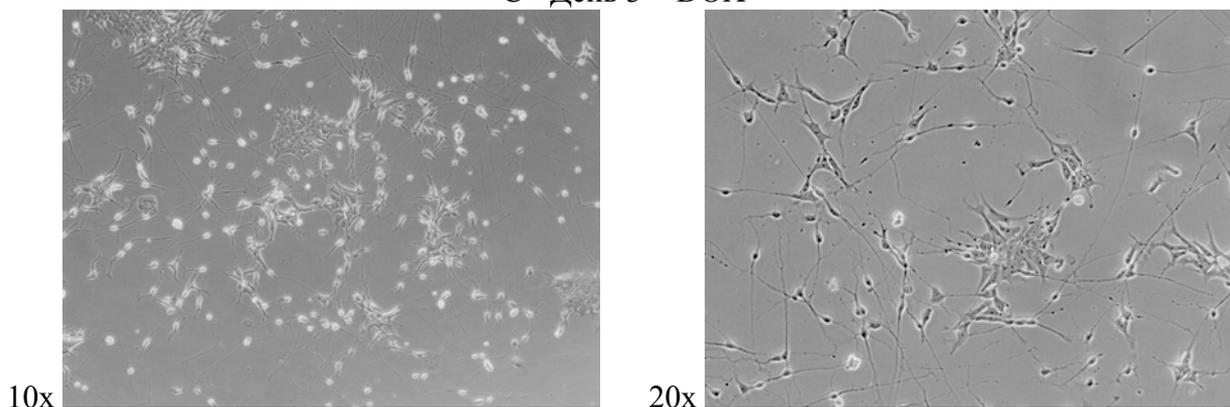
А - День 0 + DOX



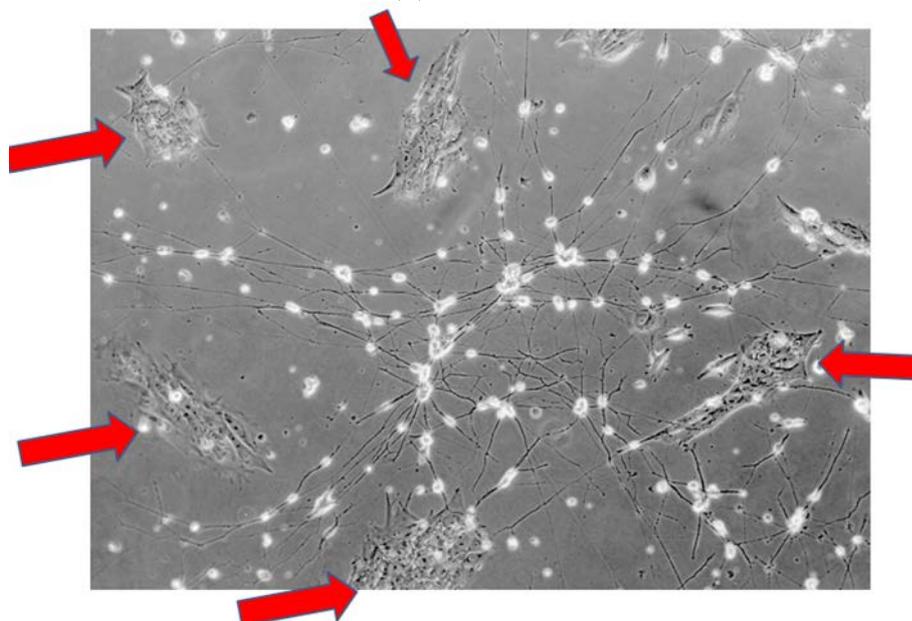
В - День 1 + DOX



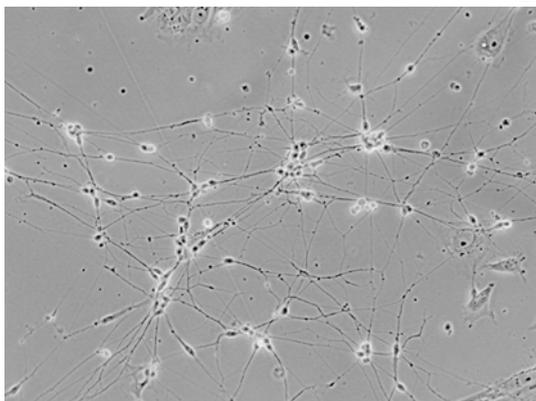
С - День 3 + DOX



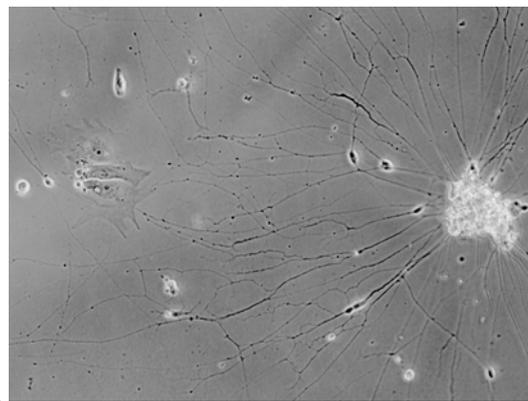
D - День 4 + DOX



E - Инкубация с AraC (0.1мкг/мл) в течение 1 суток – элиминация недифференцированных ИПСК



10x



20x

F -Инкубация с средами N2B27 в течение 3 суток – почти все ИПСК исчезают, получение зрелых и чистых нервные клетки

Рисунок 2.10 - Процесс индукции нейральной дифференцировки ИПСК - (A-F)
Красными стрелками отмечены недифференцированные ИПСК на стадии «День 5» - (E)

2.3.5 Визуализация активности нейронов с помощью кальциевого имиджинга

Дальнейшим этапом работы стало подтверждение возможности полученных индуцированных нейронов к сохранению экспрессии GCamp6s и к генерации специфической нейронной активности, которую можно было бы зарегистрировать при помощи флуоресцентной микроскопии.

После получения нейронов по вышеописанному протоколу, при помощи флуоресцентной микроскопии мы удостоверились, что полученные клетки сохраняют экспрессию GCamp6s (рисунок 2.11), по крайней мере значительная их часть (по предварительным оценкам более 90%).

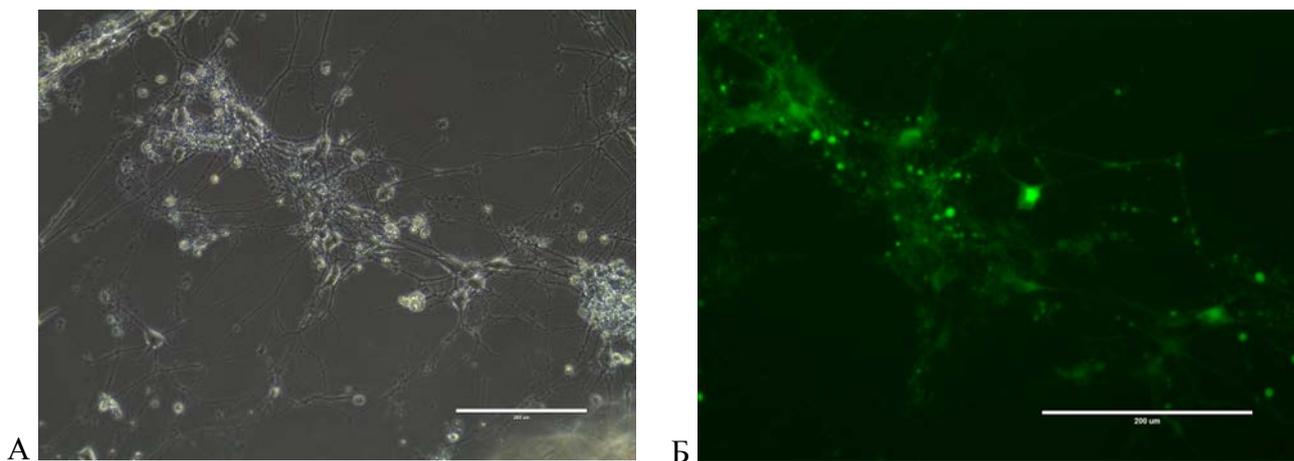


Рисунок 2.11 - А – морфология нейронов, фазовый контраст, длина шкалы 200мкм, Б - флуоресценция в зеленом спектре GCaMP6s+ клеток, флуоресценция, длина шкалы 200мкм

Далее в полученной культуре нейронов мы провели цейтраферную флуоресцентную съемку нескольких полей зрения. Съемка производилась в течение 30 минут, с частотой 1 кадр в 20 секунд. Несмотря на далеко неоптимальные условия проведения эксперимента (аутофлуоресценция среды, недостаточная частота съемки), нам удалось получить доказательства работы всей системы – мы зарегистрировали клетки с изменяющейся интенсивностью флуоресценции (рисунок 2.12). Обработка серии изображений в программе ImageJ (рисунок 2.13) позволила нам получить количественные данные, представленные в виде кривых интенсивности флуоресценции некоторых клеток в зависимости от времени (рисунок 2.14). Для нормализации данных и нивелирования эффекта «выгорания» флуоресценции, полученные значения ROI с каждого кадра были разделены на среднюю яркость всех пикселей соответствующего кадра.

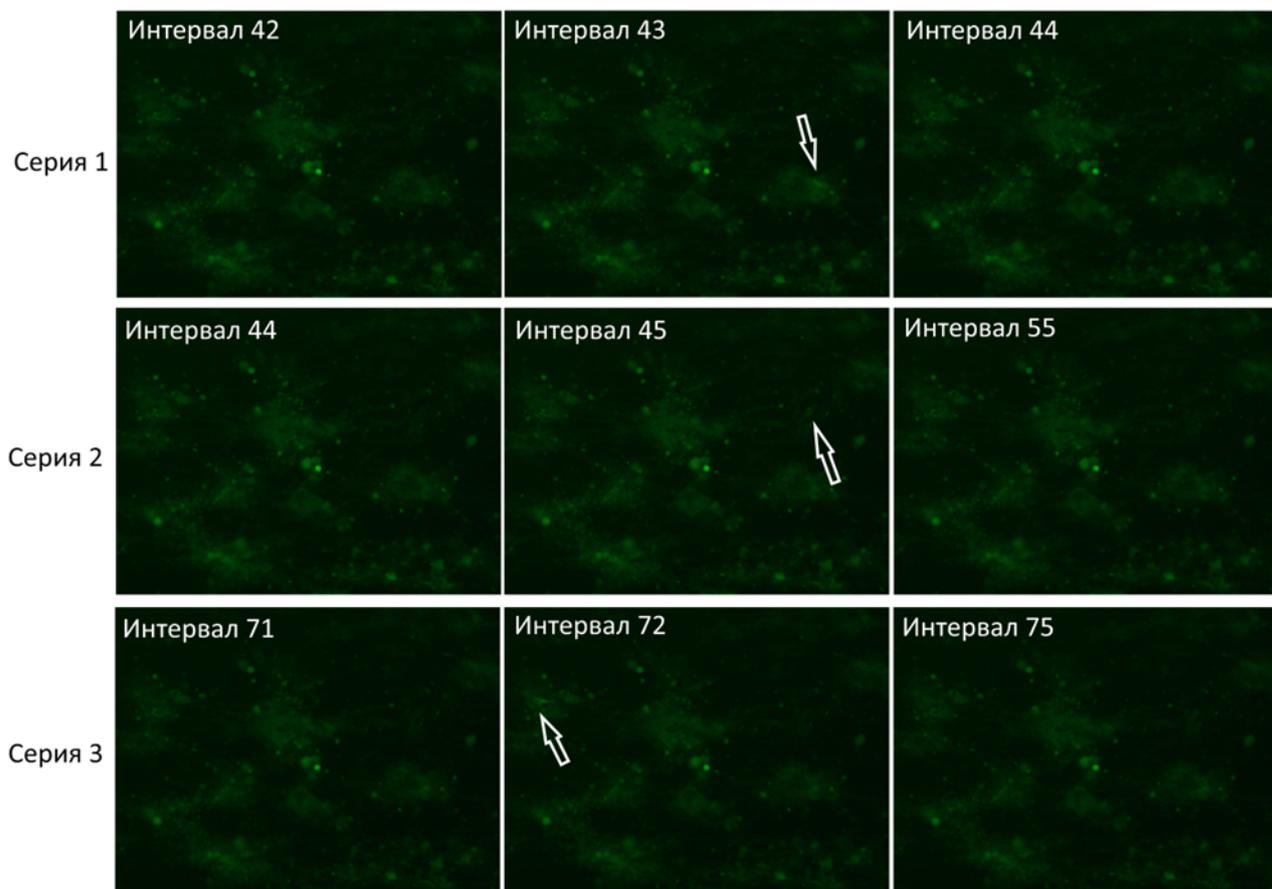


Рисунок 2.12 - Изменение флуоресценции GCamr6b в течении цейтраферной съемки в некоторых нейронах (отмечены белыми стрелками)
Съемка производилась с интервалами в 20 секунд. Увеличение 200X

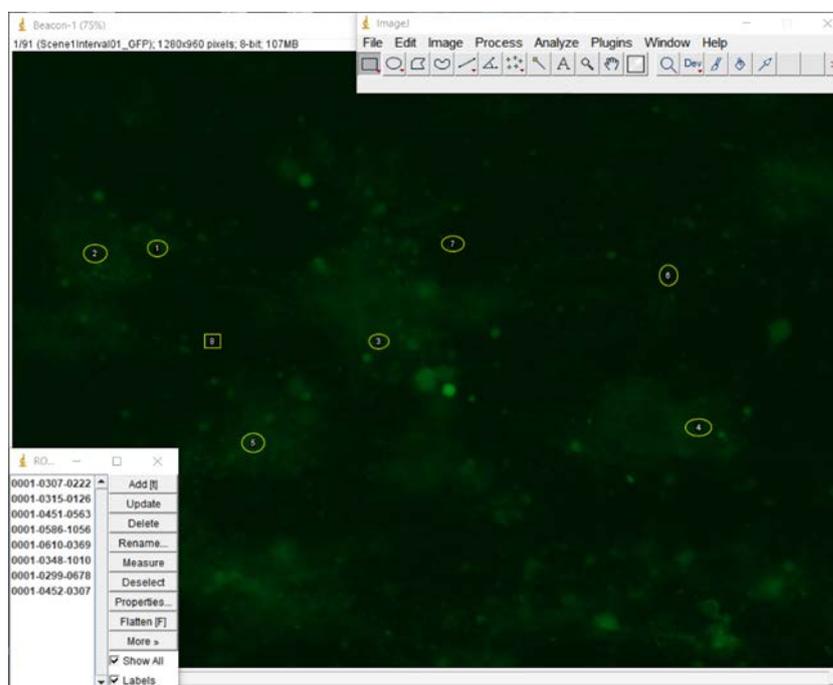


Рисунок 2.13 - Обработка изображений в программе Image J
Кружками выделены области интереса – некоторые нейроны, которые изменяют интенсивность флуоресценции

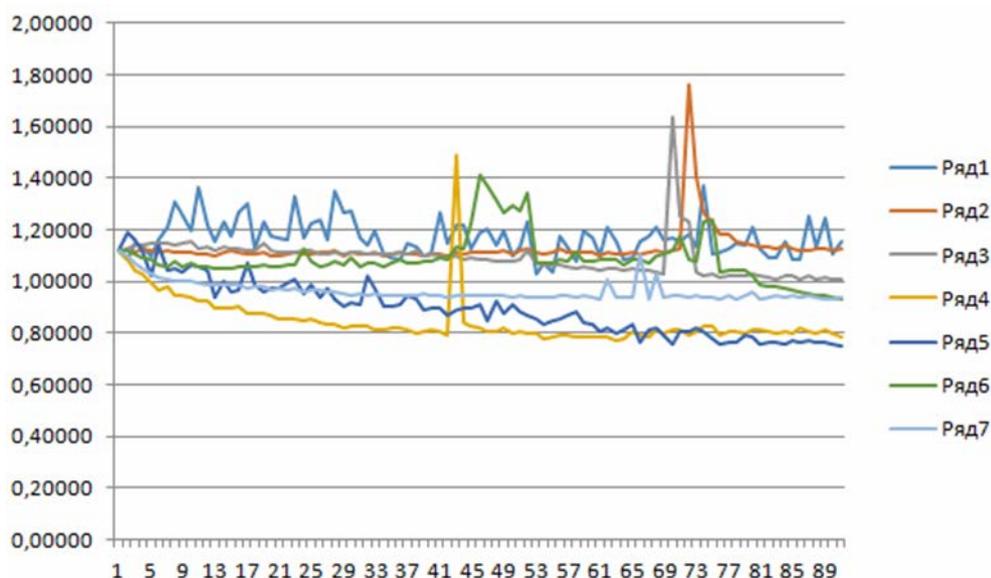


Рисунок 2.14 - График интенсивности флуоресценции в зависимости от времени для некоторых клеток, получаемой на основе нормализованных значений для каждой ROI Ряд 1-7: Серийный номер выбранной области измерения (каждый номер соответствует одной клетке). По оси абсцисс – время, каждый интервал - 20 секунд, по оси ординат – интенсивность флуоресценции в относительных условных единицах.

Из полученного графика видно, что мы можем наблюдать в культуре клеток как постоянно осциллирующие клетки, так и клетки, которые одновременно разряжаются, что приводит к возникновению пиков флуоресценции. Все это позволяет нам считать, что разработанная нами система визуализации специфической нейрофизиологической активности нейронов человека *in vitro* работает корректно.

2.3.7 Обсуждение

Таким образом, нам удалось получить линию индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека с тремя трансгенами – GCaMP6s под промотором CAG (постоянная экспрессия), rtTA под промотором EF1a (постоянная экспрессия) и Ngn2 под промотором TetON (экспрессия, индуцируемая доксициклином). Данные клетки могут быстро (в течение 8-9 дней) и эффективно генерировать нейроны человека в культуре *in vitro*. Получаемые нейроны обладают специфической нейронной активностью, которую мы можем регистрировать при помощи цейтраферной флуоресцентной съемки. Данные клетки могут быть использованы для дальнейших исследований спонтанной сетевой активности нейронов человека в различных условиях. Это может стать фундаментом для скрининга лекарственных средств или исследования функций специфических нейральных генов. Полученная нами модель имеет множество преимуществ по сравнению с классическими моделями изучения нейронов и их активности, основанными, как правило, на культурах первичных клеток, получаемых из мозга эмбрионов лабораторных животных – крыс и мышей:

1) Получаемые клетки – человеческие, а не животные, что может быть крайне важно при изучении лекарственных средств.

2) Получаемые клетки – из одной клеточной линии, следовательно, на протяжении многих циклов экспериментов можно работать на клетках с одним генетическим бэкграундом, в отличие от ситуации с нейронами, получаемыми от разных особей, которые могут быть разного пола и находиться в разных условиях.

3) Разработанный нами протокол получения нейронов быстрый, эффективный, относительно простой и дешевый, легко масштабируемый, не требует наличия вивария и опыта препарирования животных и эмбрионов.

4) Получаемые клетки уже содержат генетически кодируемый кальциевый индикатор нейронной активности и не требуют дополнительных окрасок при помощи химических индикаторов типа Fluo4, которые могут также вносить ошибки в измерения (например, в случае использования разных партий по-разному приготовленных стоков и т.д.)

Также, стоит, конечно, упомянуть, что по сравнению с другими методами существует и ряд недостатков, к которым следует отнести – необходимость опыта культуральной работы с ИПСК, необходимость доступа к клеточному сортеру (для обогащения GCamp6s+ клеток в процессе культивирования) и, по всей видимости, узкий спектр типов получаемых нейронов (тогда как нейроны из эмбрионов крысы можно получать из разных отделов мозга и разного возраста).

В настоящий момент в научной литературе описано достаточно мало случаев получения нейронов человека с экспрессией генетически кодируемых кальциевых сенсоров. В работе Vertkin I с соавт. [6] описан метод измерения специфической активности при помощи транзientной плазмидной экспрессии GCamp6. В работе Vöföly G с соавт. [7] описан метод получения уже стабильной линии ИПСК человека с экспрессией GCamp6, однако авторы пользовались другим методом индукции нейральной дифференцировки – а именно DUAL SMAD ингибированием, с получением промежуточных нейральных предшественников. Данный метод характеризуется тем, что при терминальной дифференцировке таких предшественников, возникают слишком широкие спектры нейральных клеток, включая клетки глии (в основном астроциты) и недифференцированные нейробласты. Разработанный же нами метод предполагает на выходе практически чистую популяцию именно зрелых нейронов. Учитывая данные факты, мы считаем, что полученная нами модель имеет очень хорошие перспективы и при должном дальнейшем развитии исследований, результаты могут быть оформлены в отдельную научную публикацию

К сожалению, ввиду пандемии COVID-19 с последующим карантином и остановкой всех экспериментальных работ, нам не удалось в рамках работ по данному проекту успеть сделать все запланированные тесты и эксперименты по оптимизации метода. По всей видимости, это станет целью для наших дальнейших работ.

2.4 Заключение

Таким образом можно заключить что полученные нами клетки трансгенной линии плюрипотентных стволовых клеток человека IPS-GCamp6s-TetON-NGN2 могут воспроизводимо и быстро дифференцироваться в нейроны. Получаемые таким образом нейроны сохраняют способность экспрессировать ген флуоресцентного кальциевого индикатора GCamp6s. Трансгенные нейральные культуры, несущие GCamp6s, способны воспроизводимо демонстрировать кальциевую активность нейронов.

2.5 Список использованных источников

1. Takahashi, K. and Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors [J]//Cell. - 2006. – Vol. 126. - P. 663 - 676.
2. Takahashi, K., et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors [J]//Cell. – 2007. – Vol. 131. - P. 861 - 872.
3. Evans M.J., Kaufman M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos//Nature. - 1981. – Vol. 292. - № 5819. - P. 154 – 156.
4. Ying, Q.L. et al. Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture [J]//Nature biotechnology. – 2003. – Vol. 21. – P. 183 - 186.
5. Galiakberova A.A., Dashinimaev E.B. Neural Stem Cells and Methods for Their Generation From Induced Pluripotent Stem Cells in vitro//Front Cell Dev Biol. - 2020 Oct 8. – Vol. 8:815. doi: 10.3389/fcell.2020.00815. PMID: 33117792; PMCID: PMC7578226.
6. Vertkin I., Ben-Yosef D.. Imaging of Somatic Ca²⁺ Transients in Differentiated Human Neurons//Methods Mol Biol. – 2019. – Vol. 1942. – P. 123 - 129. doi:10.1007/978-1-4939-9080-1_10.
7. Vőfély G., Berecz T., Szabó E., et al. Characterization of calcium signals in human induced pluripotent stem cell-derived dentate gyrus neuronal progenitors and mature neurons, stably expressing an advanced calcium indicator protein//Mol Cell Neurosci. – 2018. – Vol. 88. – P. 222 - 230. doi:10.1016/j.mcn.2018.02.003.

2.6 Отчетные публикации по разделу

1. Galiakberova A.A., **Dashinimaev E.B.** Neural Stem Cells and Methods for Their Generation from Induced Pluripotent Stem Cells in vitro//Frontiers in Cell and Developmental biology. – 2020. DOI: 10.3389/fcell.2020.00815. – Q1

РАЗДЕЛ 3 УПРАВЛЯЕМОЕ ИЗМЕНЕНИЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВОЧНОГО СТАТУСА КЛЕТОК С ПОМОЩЬЮ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАНИПУЛИРОВАНИЯ И С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИСТЕМ ДЛЯ МИКРОМАНИПУЛИРОВАНИЯ

3.1 Введение

Стремительное развитие молекулярной биологии предоставило исследователям множество различных инструментов для изучения функций генов методом обратной генетики - от гена к фенотипу. Все их условно можно разделить на две группы: системы для репрессии и для активации транскрипции. Репрессию транскрипции чаще всего осуществляют с помощью внесения в ген инактивирующих мутаций или посредством подавления экспрессии на уровне транскрипции (блок транскрипции) или трансляции (РНК-интерференция). Самым широко распространенным методом активации транскрипции является внесение в клетку экзогенных копий гена под контролем “сильных” промоторов с помощью плазмидных или вирусных векторов. Однако экспрессия с таких экзогенных конструкторов может во много раз превышать нативный максимальный уровень экспрессии, что может исказить результаты эксперимента.

Настоящим прорывом для генной инженерии стало открытие бактериального адаптивного иммунитета CRISPR/Cas и создание на его базе системы для направленного редактирования генома CRISPR/Cas9. За последние 10 лет появилось множество вариантов этой системы, в том числе позволяющих изменять экспрессию определенных генов без непосредственного изменения нуклеотидной последовательности. Эти системы используются как для репрессии (CRISPR interference, CRISPRi), так и для активации (CRISPR activation, CRISPRa) транскрипции. Такие достоинства как оперирование непосредственно с эндогенными генами, широкий спектр возможных модификаций, простота использования и дешевизна делают системы CRISPRi/a крайне перспективными как для фундаментальных исследований функций генов, так и для прикладных задач.

Мы решили исследовать возможность использования данных систем для управляемого изменения дифференцировочного статуса клеток на примере активации гена DAZL. РНК-связывающий белок DAZL является важным регулятором гаметогенеза у большинства позвоночных, включая человека. Его функции разнообразны, начиная от регуляции экспрессии других генов, в том числе генов плюрипотентности, и заканчивая клеточным транспортом. Хотя молекулярные механизмы работы DAZL изучены плохо, достоверно известно, что они сильно зависят от белков, с которыми DAZL взаимодействует. Спектр функций белка DAZL хорошо охарактеризован лишь в предшественниках половых клеток. В то же время известно, что, у всех позвоночных в

отличии от других генов семейства, тоже вовлеченных в гаметогенез, DAZL начинает экспрессироваться уже на стадии эмбриональных стволовых клетках (ЭСК). Более того, уже известно, что в ЭСК присутствует две изоформы DAZL, т.н. «короткая» и «длинная», в соотношении 1:1, тогда как в предшественниках половых клеток экспрессируется преимущественно «длинная» изоформа. Эти данные позволяют предположить, что функции DAZL в ЭСК и в половых клетках как минимум могут отличаться, если не вовсе быть противоположными. Таким образом, для полноты понимания генных регуляторных сетей, управляющих процессом дифференциации гамет, необходимо изучать активность гена DAZL и его продуктов в контексте ЭСК в сравнении с контекстами в соматических и половых клетках. В частности, особый интерес представляет взаимоотношения DAZL и генов плюрипотентности в связи с развитием такой технологии как создание ИПСК и поиском новых факторов, облегчающих репрограммирование клеток.

3.2 Материалы и методы

3.2.1 Работа с клеточными культурами

Работу проводили на следующих линиях клеток:

- Иммутиализованные фибробласты кожи человека 1608hT. Линия была любезно предоставлена д.б.н. Егоровым Е. Е. (ИМБ РАН);
- HEK293TN. Линия была любезно предоставлена Юлией Спивак (ИВНД РАН).

Клеточные линии культивировали в среде DMEM («ПанЭко», Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки FBS («Hyclone», США), GlutaMAX («Gibco», США), пирувата натрия («Gibco», США), антибиотиков PenStrep («Gibco», США) – далее полная ростовая среда. Клетки культивировали в инкубаторе в условиях 5% CO₂, 5% O₂ и +37°C. Через каждые три дня проводили замену среды. По достижению монослоя рассеивали клетки в соотношении 1/3 – 1/20.

Для снятия клеток сливали старую среду, от остатков среды промывали клетки раствором Версена («ПанЭко», Россия), добавляли 0,05% трипсин-ЭДТА («Gibco», США) и ставили клетки в термостат на +37°C до полного отделения клеток от пластика, затем ресуспендировали в свежей полной ростовой среде.

Заморозку клеток проводили в полной ростовой среде с добавлением 10%DMSO путем градиентного понижения температуры: +4°C – 15 минут, -20°C – 1 час, -72°C – 12 часов, -195°C (жидкий азот) – длительное хранение.

3.2.2 Активация экспрессии генов с помощью систем CRISPRa

Для активации генов интереса использовали системы CRISPRa dCas9-SunTag-VP64 и dCas9-VP160.

3.2.2.1 Подбор sgRNA для систем dCas9-SunTag

Подбор последовательностей sgRNA к гену DAZL производили с помощью следующих онлайн ресурсов:

- 1) Eukaryotic promoter database (<https://epd.epfl.ch/>)
- 2) Геномный браузер Ensembl (<http://www.ensembl.org/>)
- 3) CRISPOR.TEFOR.NET. (<http://crispor.tefor.net/>)

В процессе анализа структуры промоторов гена DAZL, было установлено что ген имеет два альтернативных промотора, которые предположительно инициируют экспрессию двух разных изоформ. Поэтому мы подобрали по две sgRNA к каждому из промоторов в регионе от -400 до -50 пн от точки инициации транскрипции (рисунок 3.1).

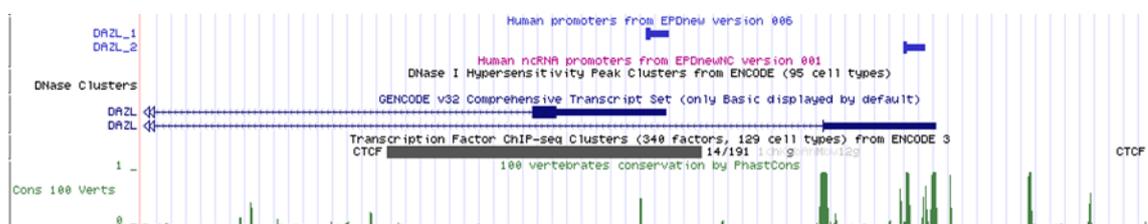


Рисунок 3.1 - Области гена DAZL, к которым производили подбор sgRNA
Красными кружками обведены промоторы.

Для контроля специфичности работы системы мы также синтезировали т.н. «нулевую» sgRNA, для которой не определено ни одного участка в геноме человека. Последовательности sgRNA для активации генов SOX2, OCT4, NANOG были взяты нами из статьи [1], последовательность sgRNA для активации гена CXCR4 была взята из статьи [5] (таблица 3.1). Олигонуклеотидные последовательности с адаптерными последовательностями, оптимизированными для клонирования, заказывали в фирме «Евроген» (Россия).

Таблица 3.1 - Последовательности sgRNA

Мишень	Последовательность sgRNA
DAZL-S (короткий транскрипт)	1: GAGGGGCGGAGGC GCGTGAGT 2: GCGCCCCGCCAGCCTCATTC
DAZL_L (длинный транскрипт)	1: GCAGGGAGGTGGCTCCTGCGC 2: GTGGTATCGGCCTCAGCCAA
OCT4	1: GGGGGGAGAACTGAGGCCGA 2: GTCTGTGGGGGACCTGCACTG
SOX2	1: GGTGGCTGGCAGGCTGGCTCT 2: GCAAACCCGGCAGCGAGGCT
CXCR4	GCAGACGCGAGGAAGGAGGGCGC
«Нулевая» sgRNA	GTTCTCTTGCTGAAAGCTCGA

3.2.2.2 Клонирование sgRNA в плазмиды

Клонирование sgRNA производили в лентивирусный вектор pLKO5.sgRNA.EFS.tRFP («Addgene», США; #57823). Для этого сначала проводили рестрикцию плазмиды рестриктазой BsmBI («New England Biolabs», США) по протоколу, предложенному производителем.

Готовый для лигирования вектор был очищен при помощи электрофореза в 1% агарозном геле и выделен из геля набором «Clean up standart» («Евроген», Россия; #BC022).

Для переотжига (формирования двухцепочечного дуплекса-вставки) и последующего фосфорилирования, кодирующие sgRNA олигонуклеотиды смешивали в составе:

- 10x T4 буфер («New England Biolabs», США) – 1мкл
- T4 киназа («New England Biolabs», США) – 1 мкл
- Стерильная вода – 7 мкл
- Прямая sgRNA-кодирующая последовательность (100пМ/мкл) – 1 мкл
- Обратная sgRNA-кодирующая последовательность (100пМ/мкл) – 1 мкл

Затем пробы загружали в амплификатор и инкубировали при следующих условиях:

- 1) +30°C – 30 минут
- 2) +93°C – 5 минут
- 3) +20°C – 1 минута
- 4) Понижение температуры на 5°C/минута до +4°C
- 5) +4°C – конец программы

Далее мы использовали стратегию одновременного клонирования множества вставок sgRNA в одной реакции. В связи с большим количеством вставок, данная стратегия позволила нам существенно сэкономить на чашках Петри с LB-агаром и компетентных клетках. Также стоит упомянуть, что каждая вставка может быть успешно клонирована по отдельности.

Перед этапом лигирования все фосфорилированные олигонуклеотиды смешивали и полученную смесь разводили в воде без нуклеаз в 250 раз. Для лигирования смешивали следующие компоненты:

- 2x T7 буфер («NEB») – 10 мкл
- T7 лигаза («NEB») - 1 мкл
- pLKO5.sgRNA.EFS.tRFP (100нг/мкл) – 1 мкл
- Разведенная смесь всех фосфорилированных олигонуклеотидов – 1 мкл
- Стерильная вода – 7 мкл

Далее пробы загружали в амплификатор и инкубировали при следующих условиях:

- 1) 3 цикла:
 1. +16°C – 10 минут
 2. +10°C – 10 минут
- 2) +4°C – конец программы

Трансформацию полученными векторами компетентных клеток *E.coli* XL1-Blue («Евроген», Россия; #СС001) проводили по стандартному протоколу химической трансформации, предложенным производителем. Данный протокол основан на способности компетентных бактерий при химическом шоке образовывать на короткое время микроскопические поры, достаточные для проникновения внутрь клетки молекул ДНК.

Трансформанты высаживали на чашках Петри на 1,5% LB агаре с добавлением селективного антибиотика ампицилина (100 мкг/мл). Все чашки инкубировали в суховоздушном термостате 14-16 часов при +37°C. В качестве контроля специфичности лигирования для трансформации использовали линеаризованную плазмиду без добавления фосфорилированных олигонуклеотидов – такие трансформанты не экспрессируют ген устойчивости к ампицилину (поскольку плазида не может лигироваться из-за некомплементарных выступающих концов) и, соответственно, не образуют колонии на селективной среде. Далее выросшие колонии индивидуально отбирали, переносили на другую чашку и нумеровали. Для идентификации вставки отобранные бактерии наращивали в маленьком объеме 5 мл в течение 14-16 часов при +37°C и 250 оборотах/минуту в термостатируемом орбитальном шейкере, выделяли из культур плазмиды (подробнее про выделение в разделе 3.2.3 Выделение плазмид) и отправляли на скрининг с помощью секвенирования по Сэнгеру в фирму «Евроген» (Россия).

3.2.2.3 Выделение плазмид

Используя колонии, выбранные по результатам скрининга, ставили бактериальные культуры в большом объеме (50 – 100 мл) жидкого LB и ампициллином в конечной концентрации 100 мкг/мл. Культуры инкубировали 14-16 часов при +37°C и 250 оборотах/минуту в термостатируемом орбитальном шейкере.

Выделение плазмид производили с помощью наборов «Plasmid Miniprep» (#BC021S) и «Plasmid Midiprep 2.0» (#BC124) компании «Евроген» (Россия) согласно протоколу производителя. Принцип метода, реализованного в данных наборах, основан на щелочном лизисе клеток в условиях, позволяющих сохранить плазмидную ДНК интактной. ДНК при этом осаждается на силиконовой мембране спин-колонки, а примеси

удаляются промыванием. После проведения всех процедур очищенная плазмидная ДНК элюируется с мембраны. Полученные плазмиды разделяли на алиquotы и хранили при -20 С. Концентрацию выделенной ДНК измеряли на приборе NanoPhotometer P-Class P360 («Implen», Германия) с использованием Lid-фактора 50. Чистоту ДНК определяли по подсчитанным прибором соотношениям оптической плотности при длинах волн A260/A280 (загрязнение фенолом и примесями солей) и A260/A230 (загрязнение органическими примесями).

3.2.2.4 Конструирование лентивирусных векторов

Для доставки трансгенов и sgRNA в клетки использовали лентивирусную упаковочную систему третьего поколения, где компоненты вируса содержатся в трех отдельных плаزمидках:

- pLP1 - gag, pol;
- pLP2 - rev;
- pVSVG – env.

Сборку и наращивание вирусов проводили в клетках линии HEK293TN. Доставку плазмид, кодирующих компоненты вируса и плазмиды с трансгеном, проводили путем липофекции посредством реактива «Lipofectamin 2000» («Invitrogen», США) по протоколу производителя с использованием среды OPTI-MEM («Gibco», США). Типовое соотношение количеств плазмид и липофектамина для трансфекции 600тыс. клеток в одной лунке 6-луночного планшета, было следующее:

- pLP1 – 4 мкг;
- pLP2v – 2 мкг;
- pVSVG - 1 мкг;
- Вектор интереса – 6 мкг;
- Lipofectamin 2000 – 10 мкл;

Через 4 часа после начала липофекции, среду меняли на полную ростовую среду, после чего начиналось накопление лентивирусных частиц в супернатанте.

Через 72 часа после липофекции отбирали клеточную среду и пропускали ее через фильтр с диаметром пор 45 мкм. Полученный очищенный от упаковочных клеток супернатант, содержащий лентивирусные частицы, непосредственно после сбора использовали сразу для трансдукции, без заморозки или концентрирования.

3.2.2.5 Трансдукция фибробластов

При достижении монослоя, фибробласты снимали и рассаживали в лунки шести луночного плато в конечной концентрации 600.000 клеток на лунку в минимальном количестве среды (500мкл). Сразу же, к суспензии клеток добавляли 2 мл вирусного

супернатанта и полибрен («Sigma», США) в конечной концентрации 10 мкг/мл для увеличения эффективности трансдукции. На следующий день полностью меняли среду с остатками лентивирусных частиц на полную ростовую среду.

На этапах создания клеточных линий с конститутивной экспрессией компонентов систем CRISPRa использовали плазмиды, кодирующие трансгены компонентов системы под сильными промоторами, лежащие между LTR повторами для интеграции в вирусный геном и далее в геном хозяина (рисунок 3.2). Следующие плазмиды использовали для доставки трансгенов в клетки:

- 1) Создание 1608hT-ST-VP64
 - pHRdSV40-dCas9-10xGCN4_v4-P2A-BFP (Addgene, США; #60903)
 - pHRdSV40-scFv-GCN4-sfGFP-VP64-GB1-NLS (Addgene, США; #60904)
- 2) Создание 1608hT- VP160
 - pLJM-dCas9-VP160 (синтез плазмиды был заказан в компании «Евроген»,

Россия

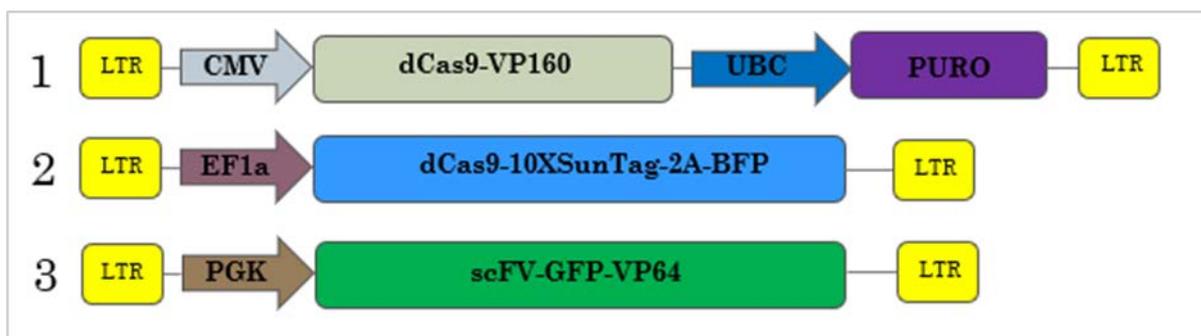


Рисунок 3.2 - Генетические конструкции для экспрессии компонентов систем CRISPRa
 1 – система активации dCas9-VP160 с селективным геном устойчивости к пурамицину; 2,
 3 – компоненты системы активации dCas9-ST-VP64, слитые с флуоресцентными белками
 BFP и GFP

Трандуцированные конструкцией pLJM-dCas9-VP160 клетки инкубировали в присутствии пурамицина в 1 мкг/мл для отбора успешно трансдуцированных клеток.

Для создания 1608hT-ST-VP64 две плазмиды доставляли в клетки с помощью двух последовательных лентивирусных трансдукций. После каждой трансдукции отбирали успешно трансдуцированные клетки по соответствующему флуоресцентному сигналу посредством флуоресцентной сортировки клеток.

3.2.2.6 Флуоресцентная сортировка клеток

Для создания клеточной линии 1608hT-ST-VP64 с конститутивной экспрессией компонентов систем CRISPRa, а также для последующего отбора клеток, успешно трансдуцированных векторами с sgRNA, через 96 часов после трансдукции или при достижении трансдуцированными клетками монослоя осуществляли сортировку клеток на

приборе S3 Cell Sorter («Bio-Rad», США) при помощи программы «ProSort v1.5.0.15» для отбора клеток с красной или зеленой флуоресценцией (RFP и GFP, соответственно, red/green fluorescent protein). Прибор S3 Cell Sorter («Bio-Rad», США) не имеет технического оснащения для отбора клеток с синей флуоресценцией (BFP, blue fluorescent protein), поэтому для него мы использовали сортер FACS ARIA III («BD», США), при любезной помощи Дмитрия Староверова (ИБХ РАН).

Сортированные клетки высаживали на чашки Петри с полной ростовой средой, на следующий день полностью меняли среду далее и инкубировали при обычных условиях.

3.2.2.7 Иммуногистохимическое окрашивание клеток.

Для того, чтобы убедиться, что созданные нами линии клеток экспрессируют dCas9, проводили иммуногистохимическое окрашивание. Для этого сначала промывали клетки раствором DPBS, затем фиксировали клетки в 4% параформальдегиде в течение 15 минут при комнатной температуре. Зафиксированные клетки трижды тщательно отмывали раствором DPBS, затем наносили первичные антитела против Cas9 (#SAB4200701-100UL, «Sigma», США, разведение 1:100) в блок-растворе (10% FBS и 0.1% Tryton-X-100 в PBS) и инкубировали в течение ночи при +4°C. После инкубации клетки тщательно отмывали от первичных антител раствором DPBS, наносили вторичные антитела (для клеток 1608hT-VP160 использовали Alexa Fluor 488 с зеленой флуоресценцией, для 1608hT-ST-VP64 - Alexa Fluor 594 с красной флуоресценцией в связи с наличием в клетках GFP в составе scFv-GFP-VP64) в блок-растворе (1:1000) и инкубировали в течение 1 часа при 37°C. После второй инкубации клетки отмывали в DPBS и окрашивали ядра с помощью 15 минутной инкубации в DAPI (6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, 0,2 мкг/мл в PBS). В качестве контроля специфичности антител использовали вариант окрашивания, где вместо первичных антител обрабатывали клетки только блок-раствором. Окрашенные клетки исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа EVOS FL AUTO («LifeTechnologies», США).

3.2.3 Анализ экспрессионной активности трансдуцированных клеток

Экспрессию генов оценивали с помощью метода ПЦР в реальном времени. Полученные данные анализировали по методу ΔC_t и $2\Delta C_t$, где в качестве контрольного образца использовались клетки, трансдуцированные «нулевой» sgRNA. Нормализацию результатов проводили по экспрессии гена домашнего хозяйства GAPDH.

3.2.3.1 Выделение тотальной РНК

Перед выделением тотальной РНК клетки предварительно снимали с подложки с помощью 0,05% раствора трипсин-EDTA («Gibco», США). Выделение РНК производили из клеточной суспензии с помощью реагента ExtractRNA («Евроген», Россия; # BC032) по

соответствующему протоколу. Реагент является аналогом тризола и работает по тому же принципу: реагент лизирует клетки, сохраняя целостность тотальной РНК. Последующие добавление хлороформа и разделение фаз приводит к разделению белков, ДНК и РНК в разных фазах. Образцы выделенной тотальной РНК хранили в воде без нуклеаз при температуре -80°C.

Для удаления остатков геномной ДНК по 1мкг полученной тотальной РНК обрабатывали ДНКазой I («New England BioLabs», США) согласно протоколу производителя. Процесс включает в себя инкубацию РНК с ДНКазой I в соответствующем буфере и последующую инактивацию ДНКазы I с помощью ЭДТА.

Концентрацию выделенной РНК измеряли на приборе NanoPhotometer P-Class P360 («Implen», Германия) с использованием Lid-фактора 10. Чистоту РНК определяли по подсчитанным прибором соотношениям оптической плотности при длинах волн A260/A280 (загрязнение фенолом и примесями солей) и A260/A230 (загрязнение органическими примесями).

3.2.3.2 Синтез первой цепи кДНК

На матрице, обработанной ДНКазой, синтезировали первую цепь кДНК с помощью набора MMLV RT kit («Евроген», Россия; #SK021). Для этого готовили смесь следующих продуктов для каждого образца:

- РНК смесь после обработки ДНКазой – 11 мкл (полный объем смеси)
- Праймер Oligo(dT) - 1 мкл

Смесь перемешивали и инкубировали 2 минуты при 70°C, а затем еще 2 минуты на льду. Далее к каждому образцу добавляли заранее приготовленную смесь:

- 5x буфер – 4 мкл
- dNTP – 2 мкл
- DTT – 2 мкл
- MMLV ревертаза – 1 мкл (100U)

Смесь аккуратно перемешивали пипетированием и инкубировали при следующих условиях:

- 1) 42°C – 1 час
- 2) 70°C – 10 минут

Готовые образцы первой цепи кДНК хранили при температуре -20°C.

3.2.3.3 ПЦР в реальном времени

Для ПЦР в реальном времени использовали праймеры, перечисленные в таблице 3.2. Праймеры для амплификации генов DAZL и CXCR4 подбирали с помощью интернет

ресурса NCBI/ Primer BLAST, последовательности праймеров для генов OCT4, SOX2 и NANOG взяты из статьи Weltner et al., 2018 [1].

Таблица 3.2 - Праймеры, использованные для ПЦР

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер
DAZL	GCCCTGCAATCAGGAAACAAA	GAAACTGTGGTGGAGGAGGA
OCT4	ACCCACACTGCAGCAGATCA	CACACTCGGACCACATCCTTCT
SOX2	TGCGAGCGCTGCACAT	GCAGCGTGTACTTATCCTTCTTCA
NANOG	ACAACCTGGCCGAAGAATAGCA	GGTCCCAGTCGGGTTTCAC
CXCR4	ACGCCACCAACAGTCAGAG	AGTCGGGAATAGTCAGCAGGA
GAPDH	TGCACCACCAACTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATGAG

Для ПЦР в реальном времени использовали готовую коммерческую смесь qPCRmix-HS-SYBR («Евроген», Россия; #PK147L). Состав реакционной смеси на одну реакцию:

- 5x qPCRmix-HS-SYBR – 4 мкл
- Прямой праймер (5mM) – 1 мкл
- Обратный праймер (5mM) – 1 мкл
- Стерильная вода – 13 мкл
- кДНК матрица – 1 мкл

Для амплификации использовали следующую программу:

- 1) 95°C – 5 минут
- 2) 37 циклов:
 - a. 95°C – 15 секунд
 - b. 60°C – 30 секунд (на данном этапе проводилась детекция сигнала)
 - c. 72°C – 30 секунд
- 3) Melt curve: от 65° C до 95° C с шагом 0,5° C

3.3 Результаты и обсуждение

3.3.1 Обзор литературы. Постановка задачи.

Мы проанализировали имеющуюся литературу по существующим на данный момент системам активации генов на основе CRISPR/Cas9, в результате которой был написан литературный обзор на тему «Cell Reprogramming With CRISPR/Cas9 Based Transcriptional Regulation Systems». Данный обзор был опубликован в журнале *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* [2]. В результате анализа данных литературы нами были выбраны две системы активации генов dCas9-VP160 (1-поколение) и dCas9-SunTag-VP64

(2-е поколение), так как мы планировали сравнить эффективность работы систем первого поколения с системами второго поколения, они обе могут работать с гидовыми РНК одного типа.

В качестве мишени для активации нами был выбран ген *DAZL*, поскольку этот ген является перспективным для нужд репрограммирования клеток человека. Несмотря на то, что функции гена *DAZL* традиционно связывают с половыми клетками, экспрессия гена *DAZL* была также обнаружена еще и в плюрипотентных стволовых клетках, но его функции в данном типе клеток все еще не установлена. В рамках проведения работ по данному проекту на предыдущем этапе было проведено исследование по дифференцировке ИПСК в первичные половые клетки. Мы применили протокол последовательной индукции через мезодермальную стадию дифференцировки женских ИПСК. Индуцированные ранние мезодермальные клетки показали значительные изменения в своих профилях экспрессии ранних (*PRDM1* и *NANOS3*) и поздних (*VASA* и *DAZL*) зародышевых маркеров. Кроме того, используя ретиноевую кислоту, мы индуцировали первичные половые клетки в эмбрионных тельцах и выявили положительное окрашивание для раннего мейотического маркера инициации *STRA8*. Несмотря на то, что попытки найти поздние мейотические клетки не увенчались успехом, мы считаем, что полученная нами воспроизводимая модель *in vitro* для получения первичных половых клеток, дает возможность изучить молекулярные механизмы, участвующие в спецификации половых клеток. Результаты работы были в текущем году обобщены, проанализированы и опубликованы [3].

На текущем этапе целью работы было изучение влияния активации гена *DAZL* на экспрессию генов плюрипотентности в фибробластах кожи человека.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- 1) Создание линий человеческих фибробластов кожи с конститутивной экспрессией компонентов систем активации CRISPRa (*dCas9-VP160* и *dCas9-SunTag-VP64*);
- 2) Активация экспрессии гена *DAZL* в фибробластах кожи человека с помощью CRISPRa (*dCas9-VP160* и *dCas9-SunTag-VP64*)
- 3) Анализ изменения уровней экспрессии генов плюрипотентности в фибробластах кожи человека при активном гене *DAZL*

Первой задачей стало создание двух клеточных линий, экспрессирующих главные компоненты этих систем – белок *dCas9-VP160* в одной линии, белки *dCas9-SunTag* и *scFv-VP64* в другой линии. Для этого мы использовали лентивирусную доставку в клетки конструкторов, содержащих помимо необходимых трансгенов гены, кодирующие белки для

последующей селекции успешно трансдуцированных клеток (белок, обеспечивающий устойчивость к пуромицину или флуоресцентные белки).

Последний важный компонент систем CRISPRa, обеспечивающий специфическую активацию генов – это sgRNA. Для доставки в клетки sgRNA мы также выбрали лентивирусную трансдукцию. Во время упаковки в вирионы мы использовали следующие комбинации кодирующих sgRNA плазмид:

- 1) DAZL-S (sgRNA№1+sgRNA№2)
- 2) DAZL-L (sgRNA№1+sgRNA№2)
- 3) DAZL-S (sgRNA№1+sgRNA№2) + DAZL-L (sgRNA№1+sgRNA№2)
- 4) DAZL-S (sgRNA№1+sgRNA№2) + OCT4 (sgRNA№1+sgRNA№2) + SOX2 (sgRNA№1+sgRNA№2)
- 5) OCT4 (sgRNA№1+sgRNA№2) + SOX2 (sgRNA№1+sgRNA№2)
- 6) «Нулевая» sgRNA
- 7) CXCR4

Так как кодирующие sgRNA плазмиды несли в себе ген красного флуоресцентного белка, далее с помощью флуоресцентного сортирования по наличию красного сигнала мы оценивали эффективность трансдукции и отбирали клетки для дальнейшей работы (рисунок 3.3).

Активация экспрессии гена влияет на количество его мРНК в клетке, поэтому для последующего анализа мы выделяли тотальную РНК из отобранных клеток и проводили ОТ-ПЦР в реальном времени.

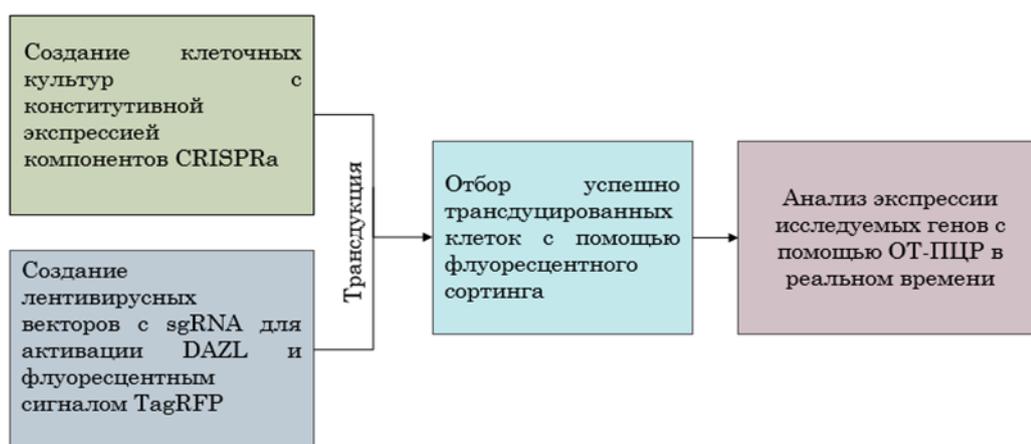


Рисунок 3.3 - Дизайн эксперимента по активации генов с помощью систем CRISPRa

3.3.2 Создание линий клеток с конститутивной экспрессией компонентов системы CRISPRa

На базе клеточной линии фибробластов 1608hT мы получили две линии, экспрессирующие на постоянной основе химерные белки dCas9-SunTug + scFv-GCN4-VP64 или dCas9-VP160. Клеточные линии получили названия 1608hT-ST-VP64 и 1608hT-VP160, соответственно. Чтобы удостовериться, что компоненты системы успешно экспрессируются, мы проверили наличие флуоресцентных сигналов в клетках 1608hT-ST-VP64 (рисунок 3.4), а также дополнительно провели иммуногистохимическое окрашивание антителами к dCas9. Окрашивание продемонстрировало четкий сигнал, причем сильнее всего он был в ядре, что свидетельствует о наибольшей концентрации белка именно там (рисунок 3.5), т.к. химерные белки содержали участки NLS (nuclear localization signal). Компоненты системы CRISPRa должны находиться именно в ядре, так как они осуществляют активацию транскрипции через непосредственное связывание с ДНК. Таким образом, полученные линии демонстрируют наличие экспрессии и ядерной локализации dCas9-SunTug, и dCas9-VP160, что является необходимым условием для работы CRISPRa.

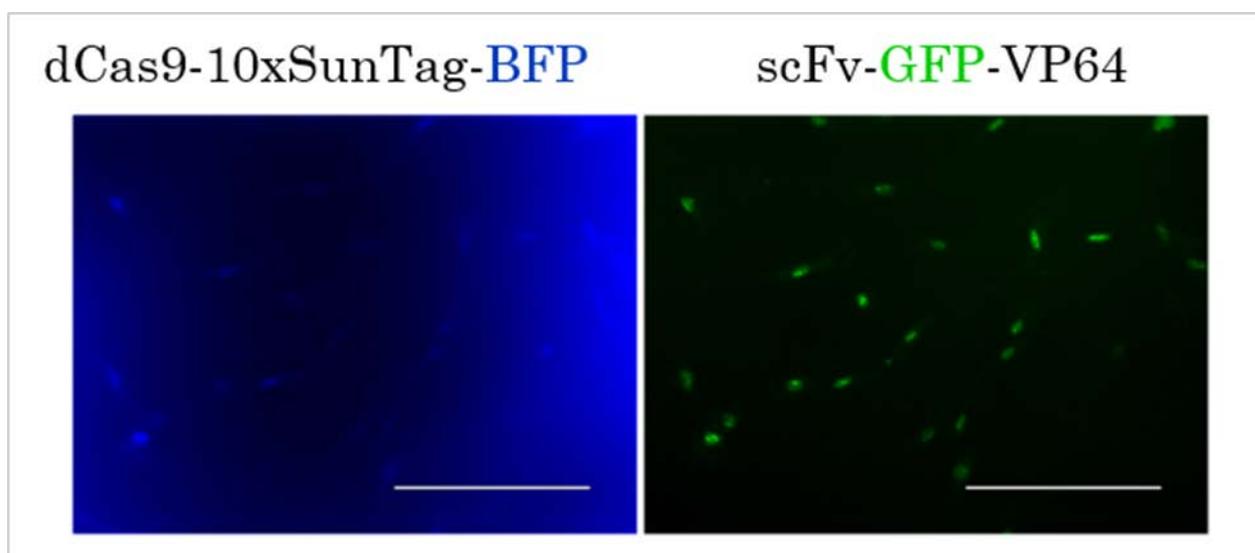


Рисунок 3.4 - Флуоресценция белков-компонентов системы dCas9-ST-VP64 в клетках 1608hT-ST-VP64

Синяя флуоресценция указывает на экспрессию BFP в составе химерного комплекса dCas9-10XSunTag, зеленая флуоресценция указывает на экспрессию GFP в составе химерного комплекса scFv-GFP-VP64. Длина шкалы – 200мкм.

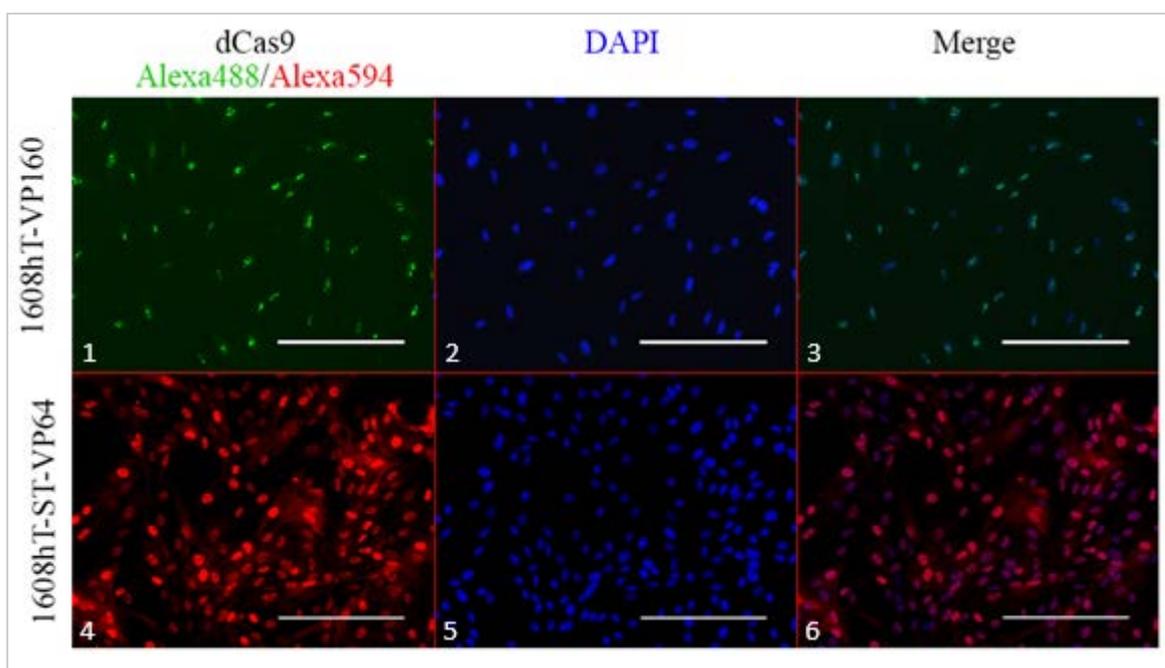


Рисунок 3.5 - Иммуногистохимическое окрашивание антителами к dCas9. Зеленая и красная флуоресценция на фрагментах 1 и 4 указывают на присутствие белка dCas9 в клетках. На фрагментах 2 и 5 окрашены клеточные ядра. Фрагменты 3 и 6 показывают преимущественно ядерную локализацию белка dCas9. Длина шкалы – 200мкм.

Для проверки работоспособности систем CRISPRa мы решили провести активацию экспрессии гена CXCR4 с помощью sgRNA, продемонстрировавшей свою эффективность в работе Tanenbaum et al. 2014 [4]. CXCR4 – это хемокиновый рецептор, играющий важную роль в индукции хемотаксиса. В норме ген CXCR4 не экспрессируется в фибробластах кожи. Действительно, результаты qPCR показали отсутствие экспрессии CXCR4 как в интактных клетках 1608hT-ST-VP64 и 1608hT-VP160, так и в трансдуцированных «нулевой» sgRNA. Хорошо видимая активация экспрессии произошла в клетках обеих линий, трансдуцированных единственной sgRNA для активации CXCR4, причем уровень экспрессии в клетках 1608hT-ST-VP64 оказался примерно в 3,5 раз выше, чем в 1608hT-VP160 (рисунок 3.6). Успешная активация CXCR4 в обеих линиях свидетельствует о том, что системы активации CRISPRa работают и данные линии могут быть использованы для активации транскрипции разных генов, в частности DAZL.

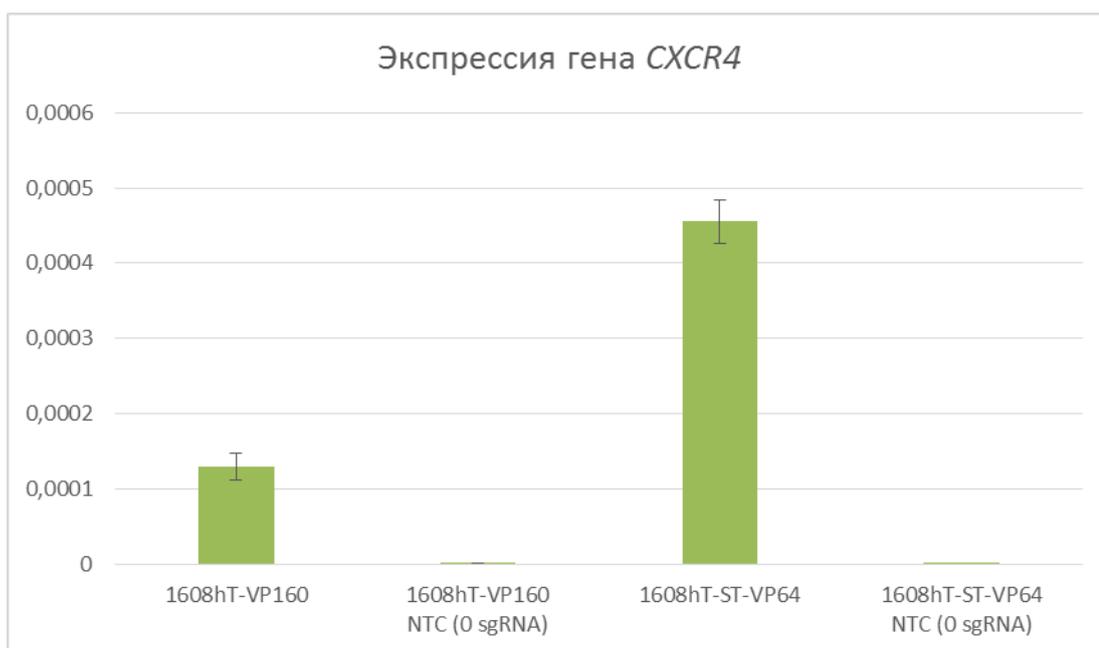


Рисунок 3.6 - Экспрессия гена *CXCR4* после активации CRISPRa

В обеих клеточных линиях в образцах с sgRNA к *CXCR4* появилась экспрессия этого гена, в то время как образцы, обработанные контрольной 0 sgRNA, не продемонстрировали активацию гена. Данные были обработаны по методу Δ Ct, референсный ген – *GAPDH*

3.3.3 Активация экспрессии генов *DAZL*, *SOX2* и *OCT4* с помощью системы dCas9-VP160

Исходя из предположения, что экспрессия гена *DAZL* может индуцировать или усилить уже имеющуюся экспрессию генов плюрипотентности, мы провели серию экспериментов по трансдукции в клетки 1608hT-VP160 разных комбинаций векторов, кодирующих sgRNA, включающих в себя не только sgRNA для активации *DAZL*, но и к таким генам плюрипотентности как *SOX2* и *OCT4*. Мы выбрали именно эти гены для дополнительной активации ввиду их ведущей роли в процессе становления и поддержания плюрипотентности [5].

Эффективность трансдукции составила около 70%, эффективность определяли при помощи наличия флуоресцентного TagRFP сигнала при последующем сортинге (рисунок 3.7).

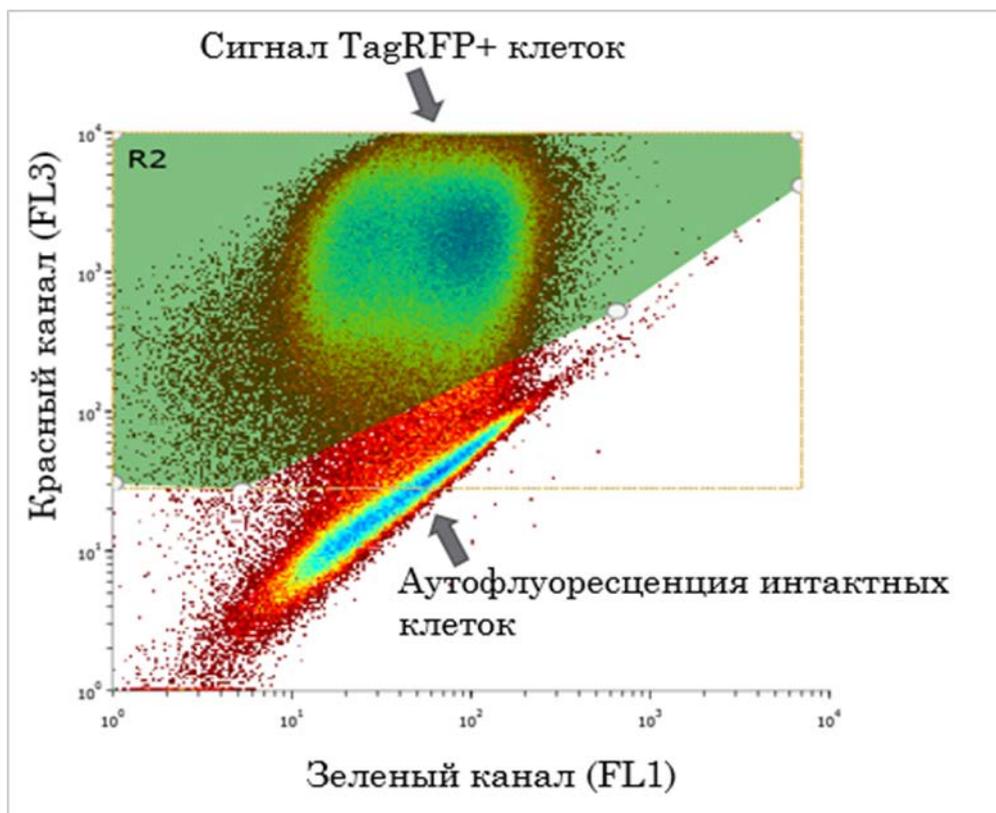


Рисунок 3.7 - Флуоресцентная сортировка трансдуцированных клеток 1608hT-VP160
 В примерно 70% всех трансдуцированных клеток присутствовал TagRFP сигнал, свидетельствующий об успешной трансдукции.

После сортировки и наращивания клеток, из каждого образца была выделена тотальная РНК, и был проведен количественный анализ уровня экспрессии исследуемых генов, методами qPCR.

В клетках, трансдуцированных сочетаниями sgRNA *DAZL-S* + *SOX2* + *OCT4* и *SOX2* + *OCT4* мы увидели значительное достоверное увеличение уровня экспрессии гена *SOX2*, примерно в 4-12 раз, и слабую активацию *OCT4*. Для других исследованных генов мы не обнаружили достоверной активации (рисунок 3.8).

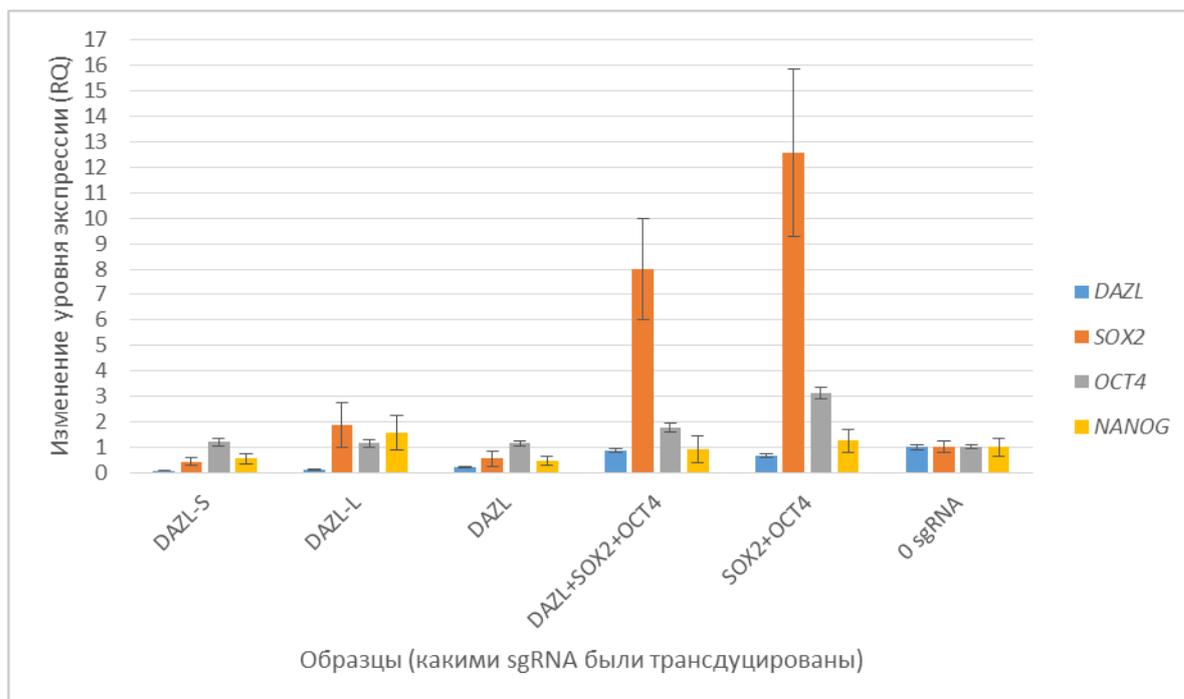


Рисунок 3.8 - Изменение уровней экспрессии исследуемых генов после активации dCas- VP160. На оси абсцисс обозначено каким набором sgRNA трансдуцирован образец. Данные были обработаны по методу $\Delta\Delta Ct$, референсный ген – *GAPDH*, контрольный образец – клетки, трансдуцированные 0 sgRNA.

3.3.4 Активация экспрессии генов *DAZL*, *SOX2* и *OCT4* с помощью системы dCas9-SunTag-VP64

Как и в экспериментах по активации экспрессии с помощью системы dCas9-VP160, при трансдукции мы использовали те же сочетания sgRNA к *DAZL* и генам плюрипотентности. Эффективность трансдукции оказалась достаточно высокой, около 95% всех клеток продемонстрировали наличие флуоресцентного TagRFP сигнала, поэтому в данном случае мы не проводили клеточный сортинг.

Во всех трех образцах, обработанных комбинациями гидовых РНК *DAZL-S*, *DAZL-L* или *DAZL* мы обнаружили небольшое, но достоверное увеличение уровня экспрессии *DAZL*. Наиболее успешно трансактивация прошла в образце с *DAZL-S* – там уровень экспрессии возрос примерно в два раза. Интересно, что активация *DAZL* не повлияла существенно на транскрипцию *SOX2* и *OCT4*, но при этом вызвала некоторое небольшое повышение уровня экспрессии *NANOG* (рисунок 3.9).

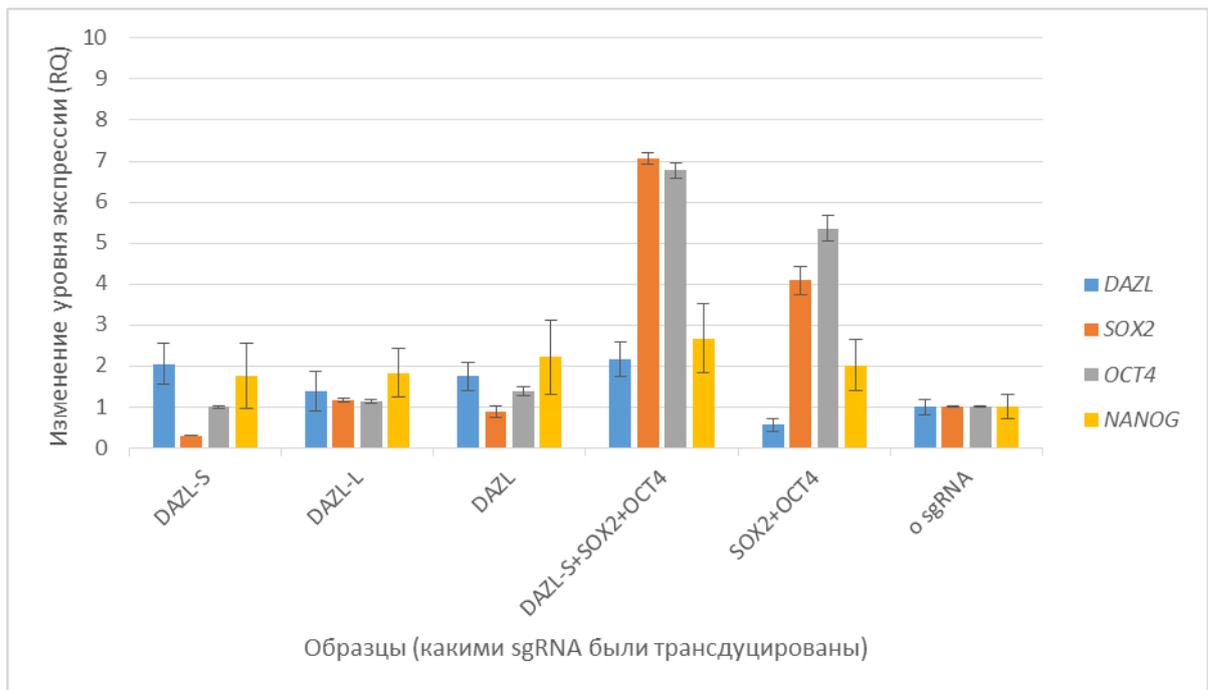


Рисунок 3.9 - Изменение уровней экспрессии исследуемых генов после активации dCas-SunTag-VP64

На оси абсцисс обозначено каким набором sgRNA трансдуцирован образец. Данные были обработаны по методу $\Delta\Delta Ct$, референсный ген – *GAPDH*, контрольный образец – клетки, трансдуцированные 0 sgRNA.

Образец, трансдуцированный *SOX2 + OCT4* продемонстрировал повышение уровня экспрессии генов-мишеней в 4 и 5 раз, соответственно, а также двухкратное увеличение экспрессии гена *NANOG*. Это объясняется тем, что димер *Sox2-Oct4* является активатором транскрипции *NANOG* [6].

В клетках, трансдуцированных комбинацией *DAZL-S + SOX2 + OCT4* мы увидели экспрессию *SOX2*, *OCT4* и *NANOG*, достоверно превосходящую экспрессию этих генов в образце *SOX2 + OCT4*, наряду с двухкратным увеличением экспрессии *DAZL*. Относительно генов *SOX2* и *OCT4* нельзя точно сказать, способствует ли *DAZL* активации обоих генов или какого-то одного из них ввиду существования сложных механизмов взаимной регуляции у исследуемых генов [7]. Экспрессия *NANOG* могла возрасти по сравнению с экспрессией в образце *SOX2 + OCT4* как благодаря непосредственной активации *DAZL*, так и из-за увеличения уровня транскрипции *SOX2* и *OCT4*. Обобщая, можно предположить, что белок *DAZL* так или иначе способствует транскрипции *SOX2*, *OCT4* и *NANOG*, что может свидетельствовать о его потенциальной регуляторной роли в процессе поддержания плюрипотентности.

Интересно, что обе использованные системы, dCas-SunTag-VP64 и dCas9-VP160, смогли усилить экспрессию *SOX2* и *OCT4*, но при этом только посредством dCas-SunTag-VP64 удалось активировать экспрессию *DAZL*. Мы предполагаем, что такой эффект в

первую очередь связан со структурными и эпигенетическими особенностями исследуемых генов. На эффективность даже искусственно активированной транскрипции влияет множество факторов, например, метилирование ДНК, модификации гистонов, положение относительно нуклеосом и тд. Таким образом, гены с различными характеристиками отвечают на трансактивацию по-разному, и, соответственно для активации некоторых генов нужны более мощные системы или системы с принципиально другим механизмом трансактивации [8].

Важным фактором для успешной активации также является хорошо подобранные последовательности sgRNA. Возможно, подбор других, более «удачных» sgRNA и общее увеличение их количества на одну мишень в будущем позволит провести более эффективную активацию гена *DAZL*.

В связи со сложной эпидемиологической обстановкой и последующего карантина в Москве, к сожалению, мы не смогли поставить достаточное количество дополнительных экспериментов и проанализировать состав транскриптов *DAZL* (его изоформ), полученных в ходе трансактивации. Мы предполагаем, что именно короткая изоформа *DAZL* может оказаться ответственной за усиление активации генов плюрипотентности, и проверка данной теории станет одной из задач нашей будущей работы.

Дополнительно был проведен анализ литературы по имеющимся в настоящее время работам в области моделирования раннего развития эмбрионов мыши и человека *in vitro* [9]. Обсуждаемые подходы позволяют исследовать развитие эмбриона, в том числе человека, на самых ранних этапах, что может быть использовано при анализе активности генов раннего развития.

3.4 Заключение

1) Были созданы линии человеческих фибробластов с конститутивной экспрессией компонентов систем активации CRISPRa (dCas9-VP160 и dCas9-SunTag-VP64). Обе системы продемонстрировали свою работоспособность и могут быть использованы для активации любых других генов.

2) Система dCas9-SunTag-VP64 способна активировать транскрипцию гена *DAZL* в соматических клетках человека, но для достижения лучшего эффекта ее нужно оптимизировать с учетом особенностей структуры гена.

3) Трансактивация *DAZL* в соматических клетках человека по всей видимости способствует активации экспрессии таких генов плюрипотентности как *SOX2*, *OCT4* и *NANOG*, что делает ген дополнительной потенциальной мишенью в экспериментах по репрограммированию соматических клеток в iPSC.

3.5 Список использованных источников

1. Weltner J, Balboa D, Katayama S, Bernaldo de Siqueira M, Krjutškov K, Jouhilahti EM, Trokovic R, Kere J, Otonkoski T. Human pluripotent reprogramming with CRISPR activators// Nat Commun. - 2018 Jul. - Vol. 6. - № 9(1):2643. doi: 10.1038/s41467-018-05067-x..
2. Shakirova K.M., Ovchinnikova V.Y., Dashinimaev E.B. Cell Reprogramming With CRISPR/Cas9 Based Transcriptional Regulation Systems//Front Bioeng Biotechnol. - 2020 Jul 28. - Vol. 8:882. doi: 10.3389/fbioe.2020.00882.
3. Abdyev V.K., Sant D.W., Kiseleva E.V., Spangenberg V.E., Kolomiets O.L., Andrade N.S., Dashinimaev E.B., Vorotelyak E.A., Vasiliev A.V. In vitro derived female hPGCLCs are unable to complete meiosis in embryoid bodies//Exp Cell Res. – 2020 Nov 5. - Vol. 397(2):112358. doi: 10.1016/j.yexcr.2020.112358. Epub ahead of print..
4. Chavez A. et al. Comparison of Cas9 activators in multiple species//Nature methods. – 2016. – Vol. 13. – №. 7. – P. 563.
5. Tanenbaum M.E. et al. A protein-tagging system for signal amplification in gene expression and fluorescence imaging//Cell. – 2014. – Vol. 159. – №. 3. – P. 635 - 646.
6. Narayan S. et al. OCT4 and SOX2 work as transcriptional activators in reprogramming human fibroblasts//Cell reports. – 2017. – Vol. 20. – №. 7. – P. 1585 - 1596.
7. Rodda D.J. et al. Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2//Journal of Biological Chemistry. – 2005. – Vol. 280. – №. 26. – P. 24731 - 24737.
8. Chew J.L. et al. Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells//Molecular and cellular biology. – 2005. – Vol. 25. – №. 14. – P. 6031 - 6046.
9. Измайлова Л.Ш., Воротеяк Е.А., Васильев А.В. Моделирование раннего развития эмбрионов мыши и человека *in vitro*//Онтогенез. – 2020. – Т. 51. – № 5. – С. 323 - 337.

3.6 Отчетные публикации по разделу

1. **Izmailova L.Sh.1, Vorotelyak E.A.1, Vasiliev A.V.2** In Vitro Modeling of the Early Development of Mouse and Human Embryos//Russian Journal of Developmental Biology. – 2020. – Vol. 51. – No. 5. – P. 271-282. DOI: 10.1134/S1062360420050045. – Q4.
2. Abdyev V.K., Sant D.W., **Kiseleva E.V.**, Spangenberg V.E., Kolomiets O.L., Andrade N.S., **Dashinimaev E.B.2, Vorotelyak E.A., Vasiliev A.V.** *In vitro* derived female hPGCLCs are unable to complete meiosis in embryoid bodies//Experimental Cell Research. – 2020. – Art. No 112358. DOI: 10.1016/j.yexcr.2020.112358. – Q2

3. Shakirova K.M., Ovchinnikova V.Y., **Dashinimaev E.B.** Cell Reprogramming With CRISPR/Cas9 Based Transcriptional Regulation Systems//Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2020. – Vol. – 8. – Art. No 882. DOI: 10.3389/fbioe.2020.00882 – Q2.

РАЗДЕЛ 4 СТВОЛОВЫЕ МЕЗЕНХИМНЫЕ КЛЕТКИ В ИНДИВИДУАЛЬНОМ РАЗВИТИИ. РОЛЬ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК (МСК) В ФОРМИРОВАНИИ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ И ЕЕ ВОССТАНОВЛЕНИИ ПОСЛЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ. АНАЛИЗ ПЕРСПЕКТИВНЫХ НАПРАВЛЕНИЙ ИССЛЕДОВАНИЙ В ОБЛАСТИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ И СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

4.1. Введение

В 2020 году в лаборатории клеточных и молекулярных основ гистогенеза были продолжены исследования по нескольким ранее начатым направлениям, включающим изучение механизмов клеточной дифференцировки и межклеточных взаимодействий, а также закономерностей формирования и функционирования тканевых систем в индивидуальном развитии. Одним из ключевых направлений в исследованиях лаборатории было изучение тканеспецифических стволовых клеток, обеспечивающих формирование организма, а также физиологическую и репаративную регенерацию его тканей и органов. МСК рассматриваются в качестве универсальных регуляторов тканевого гомеостаза. Их преимущества в экспериментальной работе связаны с относительной легкостью выделения и культивирования, со способностью к направленной миграции в поврежденные ткани и продукции широкого спектра биологически активных молекул, а также с присущими им иммуносупрессивными свойствами. В настоящее время эффективным подходом к восстановлению поврежденной ткани является клеточная терапия с использованием МСК. Остаётся актуальной проблема получения более детальной характеристики МСК. Лучшее понимание механизмов МСК-опосредованной репарации тканей помогут еще больше повысить терапевтическую эффективность этих клеток [1, 2]. МСК - это негемопоэтические стромальные стволовые клетки, имеющие множество источников, таких как костный мозг, надкостница, стенки сосудов, жировая ткань, мышцы, сухожилия, периферическое кровообращение, пуповинная кровь, кожа и зубные ткани. Они способны к самоподдержанию и дифференцировке в мезенхимальные ткани, а также способствуют их регенерации. МСК, начиная от незрелых плюрипотентных клеток и заканчивая более дифференцированными мультипотентными клетками, широко используются для стимуляции восстановления тканей и органов после повреждения. Известно, что благоприятное воздействие МСК из разных источников неодинаково с точки зрения восстановления или реконструирования поврежденных тканей [3]. МСК, полученные из различных источников, отличаются по своим биологическим характеристикам и обладают различной способностью секретировать множество специфических цитокинов, факторов роста и хемокинов играющих решающую роль в

восстановлении тканей и поддерживающих как их приживание, так и трофические функции (аутокринные и паракринные). Исследования показали, что взаимодействие между хемокиновыми рецепторами и их лигандами, манипулирование экспрессией специфических рецепторов, может регулировать миграцию МСК и играть решающую роль в нацеливании воздействия МСК на место повреждения [4]. При лечении дефектов различных тканей с использованием скаффолдов, МСК, заполняют пористый каркас и культивируются *in vitro*, после чего эту конструкцию пересаживают в дефект. Все это означает использование самых разных материалов для скаффолдов (коллаген, полимеры, биокерамика, биостекло, деминерализованный костный матрикс и т. д.), с различными свойствами, различными клетками (дифференцированными или стволовыми клетками) и различными методами размещения и удержания стволовых клеток в этих материалах. Коллаген нашел широкое применение в биомедицинских технологиях. Такие преимущества, как биосовместимость, способность к адгезии, волокнистая структура и хорошая сочетаемость с другими материалами, позволяют использовать данный материал для получения скаффолдов в тканевой инженерии. Наиболее часто используемым является коллаген 1-го типа. Путем обработки нативного коллагена можно получить большое разнообразие его форм для дальнейшего изготовления скаффолдов: от пористых губок до волокнистых решеток. Даже в форме коллагеновых покрытий биоматериалов, коллаген способствует первоначальному прикреплению, стабильному росту и выживанию стволовых клеток [5]. Несмотря на многолетние исследования, посвященные свойствам коллагена и его применению в биомедицине, данный материал не потерял актуальность и продолжает быть востребованным в целях создания новых биоматериалов. МСК играют важную роль в восстановлении скелетных мышц после травм и заболеваний. Количество клинических исследований, в которых МСК используются для регенерации опорно-двигательного аппарата, растет с каждым годом. Понимание закономерностей дифференцировки МСК в скелетные мышцы жизненно важно для разработки безопасных и эффективных протоколов и терапевтических приёмов. В процессе восстановления повреждённой мышцы участвуют как резидентные МСК, так и приходящие из костного мозга в ответ на повреждение. МСК способствуют выживанию, пролиферации и дифференцировке миогенных клеток в повреждённых мышцах, стимулируют ангиогенез, оказывают противовоспалительное и антифибротическое действие. Помимо известных ранее сателлитных клеток, было описано несколько различных типов миогенных клеток-предшественников, способных регенерировать скелетную мышечную ткань как *in vitro*, так и *in vivo*. Одной из таких популяций являются так называемые "боковые популяции" клеток [6, 7]. По некоторым данным, МСК способны к миогенной дифференцировке и

слиянию с клетками мышц, однако ведущую роль в регенерации играет паракринная секреция ими регуляторных молекул [6]. Экзосомы из МСК могут снижать апоптоз и некроз у грызунов после ишемического повреждения их сердца, мозга, легких, печени и почек [8]. Кроме того, экзосомы могут уменьшить воспаление и способствовать пролиферации клеток во время восстановления тканей. Они несут регуляторные белки, мРНК и миРНК и обладают способностью увеличивать синтез коллагена и ангиогенез за счет увеличения экспрессии мРНК и высвобождения проангиогенных факторов и регуляторных белков, которые играют важную роль в правильном remodelировании тканей и предотвращении деградации внеклеточного матрикса. Различные исследования показали влияние экзосом на улучшение исхода заживления кожных ран, формирование рубцовой ткани, восстановление сухожилий, дегенеративные заболевания костей, и мышечную дистрофию Дюшенна [9, 10]. Изучение различных аспектов формирования внеклеточных везикул и их регуляторного влияния на клетки является актуальной общебиологической задачей и открывает большие перспективы для их использования в клинической практике. Целью данного этапа работы было изучение совместимости МСК с рядом носителей, влияния МСК и экзосом из МСК на регенерацию мышечной ткани, а также ряд дополнительных исследований.

4. 2. Материалы и методы

4.2.1. Выделение МСК.

4.2.1.1 В работе использовали самцов и самок крыс Вистар массой 200-300 г, а также самцов мышей BALB/c массой 22-24 г, полученных из питомника лабораторных животных "Столбовая" (Московская область). Содержание животных и экспериментальные процедуры осуществляли в соответствии с рекомендациями комиссии по биоэтике Института биологии развития им. Н.К.Кольцова РАН. Костный мозг крыс и мышей выделяли в асептических условиях из бедренных и большеберцовых костей, промывая диафизы средой α -MEM (HyClone), суспензировали с помощью шприца и пропускали через нейлоновый фильтр. Фрагменты подкожной и висцеральной жировой ткани крыс измельчали и инкубировали в 0.075% растворе коллагеназы I (Sigma-Aldrich) в течение 60 мин при 37°C, периодически встряхивая, после чего выделенные клетки отмывали двукратным центрифугированием в ФСБ.

Все клетки культивировали по стандартной методике в CO₂-инкубаторе при 37°C и 5% CO₂ в среде α -MEM с 10% ЭТС и добавлением L-глутамина, антибиотика-антимикотика и пенициллина-стрептомицина (все реактивы — HyClone), пассируя с

использованием 0.25% раствора трипсин-ЭДТА ("БиолоГ"), до достижения 90-100% конфлюэнтности. Для посева на скаффолды использовали клетки 2-го пассажа.

4.2.1.2 Заселение клеток в скаффолды. Предварительно стерилизованные в среде α -MEM с добавлением антибиотика-антимикотика и пенициллина-стрептомицина коллагеновые скаффолды диаметром 8 мм помещали в 48-луночные планшеты. На каждый скаффолд высевали 10^6 клеток в 200-300 мкл культуральной среды, инкубировали 30-50 мин при 37°C и 5% CO₂, после чего добавляли стандартную ростовую среду (α -MEM с 10% ЭТС, добавлением L-глутамина, антибиотика-антимикотика и пенициллина-стрептомицина). Скаффолды с клетками культивировали в течение 4-24 сут со сменой среды через каждые 3 сут. Было исследовано несколько типов носителей, любезно предоставленных Е.В. Истрановой, сотрудницей Института регенеративной медицины Первого МГМУ им. И.М. Сеченова.

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

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

4.2.1.3 Индукция остеогенной дифференцировки. Для индукции дифференцировки скаффолды засеивали клетками костного мозга крысы, предварительно прошедшими один пассаж *in vitro*. В лунки, содержавшие скаффолды с клетками, добавляли остеогенную среду: α -MEM с 5% ЭТС, 10—8 М дексаметазона (Sigma), 50 мкг/мл 2-фосфо-L-аскорбата натрия (Fluka) и 10 мМ β -глицерофосфата натрия (Sigma). Контролем служили клетки, культивируемые на скаффолдах в среде α -MEM с 5% ЭТС.

4.2.1.4 Анализ результатов. Ежедневное прижизненное наблюдение за культурами клеток осуществляли методом фазово-контрастной световой микроскопии с помощью инвертированного микроскопа AxioObserver Z1 (Carl Zeiss). По окончании культивирования скаффолды фиксировали 10% формалином, заливали в парафиновую смесь "Гистомикс" ("БиоВитрум") и готовили срезы толщиной 5 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином. Для оценки результатов индукции остеогенеза на срезах скаффолдов, фиксированных формалином, проводили цитохимическое выявление щелочной фосфатазы с помощью реакции азосочетания прочного красно-фиолетового FRV с нафтолом AS-BI с использованием коммерческого набора согласно протоколу производителя (Sigma). Препараты анализировали с помощью светового микроскопа АНЗ-RFCA, оснащённого цифровой камерой DP50-CU (Olympus).

4.2.2 Выделение экзосом

4.2.2.1. Клетки для получения экзосом выделяли из костного мозга, жировой ткани и мышц задних конечностей половозрелых крыс Wistar. Для выделения клеток из поврежденных мышц за 4 суток до взятия материала мышцу травмировали путем глубокого разреза с последующим наложением швов. Клетки костного мозга вымывали из диафизов бедренных и большеберцовых костей средой DMEM, а клетки жировой ткани, интактных и поврежденных мышц выделяли обработкой тканевых фрагментов 0,2%-ным раствором коллагеназы (40 мин при 37°C). 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 1×10^4 – 1×10^5 клеток/мл.

4.2.2.2 Кондиционированную среду собирали от клеток 2-го, 3-го и 4-го пассажей следующим образом. По достижении 70-90% конfluence среды 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 2000 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.

4.2.2.3 Экзосомы выделяли с помощью ультрацентрифугирования полученной среды в течение 1,5 ч при 110 000g и 4°C. Общее содержание белка в образцах определяли методом Брэдфорда [11]. Распределение частиц по размеру 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. Результаты измерений подвергали статистической обработке, достоверность различий оценивали по критерию Манна-Уитни.

4.2.3. Децеллюляризация зубов.

Зубы выделяли у 1,5 месячных самцов крыс Wistar. Срезали коронковую часть 3-го моляра и помещали в 10%-й додецилсульфат натрия (SDS; Sigma) в деионизированную воду (w/v), непрерывно встряхивали в шейкере (MaxQ, Thermo Scientific, США) в течение 32 ч при 25°C и меняли каждые 8 ч. Остаточный SDS удаляли постоянным качанием в шейкере со стерильной деионизированной водой при температуре 25°C в течение 4 ч. Затем образцы помещали в 1% Тритон X-100 (Сигма) в деионизированную воду (Вт/в) с непрерывным встряхиванием при 25°C в течение 2 ч, обрабатывали 0,02 мг/мл ДНКазы I (Сигма) и 20 мг/мл РНКазы (Сигма) в течение 1 ч при 37°C с последующей тепловой инактивацией при 75°C в течение 3 мин. Наконец, децеллюляризованный графт

промывали PBS в течение 2 ч и помещали в PBS, содержащий 10 мг/мл стрептомицина, 10 000 ЕД/мл пенициллина G и 25 мкг/мл Амфотерицина В (Gibco, Carlsbad, CA, USA), на 12 ч стерилизации. Изготовленный скаффолд засеивали МСК пульпы зуба человека, любезно предоставленными А.А. Ивановым, сотрудником МГСМУ им. А.И. Евдокимова.

4.3 Результаты и обсуждение

4.3.1. Клиническое применение МСК требует детального изучения механизмов, контролирующих их рост и дифференцировку. Совершенствование методических подходов, создание новых тканеинженерных конструкций даёт возможность не только разработать наиболее эффективную модель для исследования процесса заселения МСК в биоматериал, их пролиферации и дифференцировки, но и получить наилучший результат для восстановления поврежденных тканей. Одним из наиболее перспективных материалов для производства скаффолдов, является коллаген. Обладая такими свойствами, как биосовместимость, способность обеспечивать адгезию клеток, волокнистая структура и хорошая сочетаемость с другими материалами, низкая токсичность и антигенность, высокая механическая прочность, коллаген нашёл широкое применение в тканевой инженерии. Исследования, проведённые с применением коллагенсодержащих скаффолдов позволили обобщить накопленные данные и сделать выводы о наиболее эффективных для заселения МСК биоматериалах (рисунки 4.1, 4.2 и 4.3). На основании полученных результатов можно предположить, что микроархитектура ГКП и sis оптимальна для поддержания роста и остеогенной дифференцировки МСК костного мозга крыс [12].

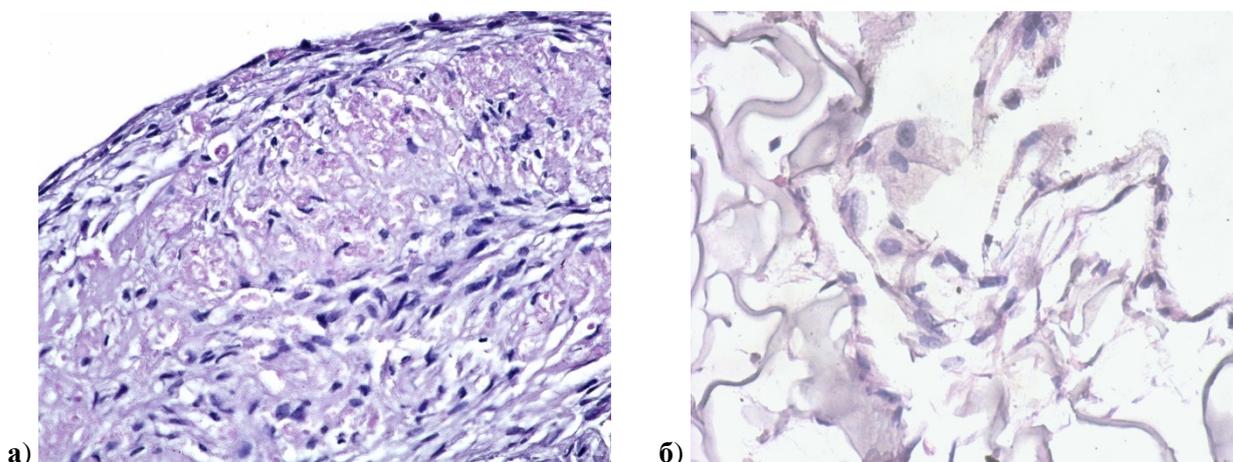


Рисунок 4.1 - Поперечные срезы скаффолдов, заселенных МСК костного мозга крысы, после 24 суток культивирования
а) – sis, увел: об.х10, ок.х10; б) – ГКП, увел: об. х20, ок.х10. Окрашивание гематоксилин-эозином.

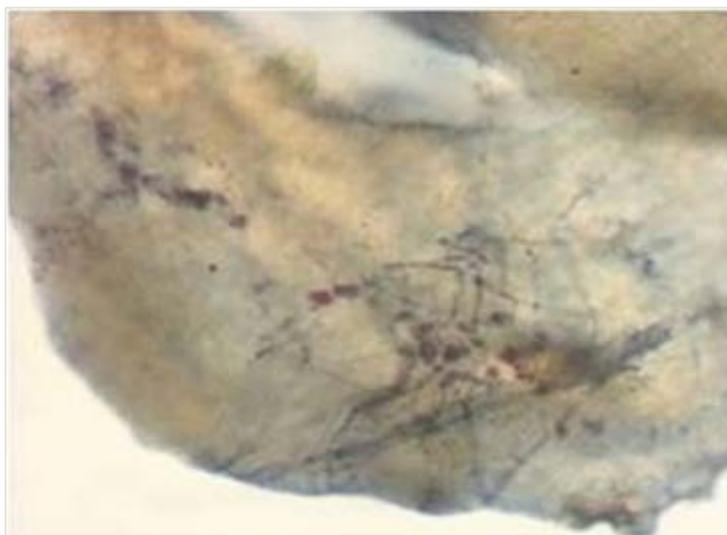


Рисунок 4.2 - Поперечный срез скаффолда sis, заселенного МСК костного мозга крысы, после 24 суток культивирования
Увел: об.х20, ок.х10. Реакция на щелочную фосфатазу. Докрашивание гематоксилин-эозином.



Рисунок 4.3 - Тотальный препарат скаффолда ГКП, заселенный МСК костного мозга крысы, после 24 суток культивирования
Увел: об. х20, ок.х20. Реакция на щелочную фосфатазу. Докрашивание гематоксилин-эозином.

Последние разработки в области костных имплантов посвящены приданию скаффолдам, остеоиндуктивных свойств путем введения в их состав компонентов, стимулирующих миграцию, пролиферацию и дифференцировку клеток. Одним из перспективных источников получения клеточного материала для заселения скаффолдов для тканевой инженерии кости служит МСК пульпы зуба. Для успешного заселения и культивирования МСК нами были изучены возможности применения в качестве скаффолда децеллюляризованный матрикс зуба (рисунок 4.4). Результаты заселения и длительного культивирования МСК показали спонтанную остеогенную дифференцировку мезенхимных стволовых клеток на децеллюляризованном матриксе зуба, что делает

возможным его использование в виде естественного аллогraftа при лечении резорбции альвеолярной костной ткани [13].

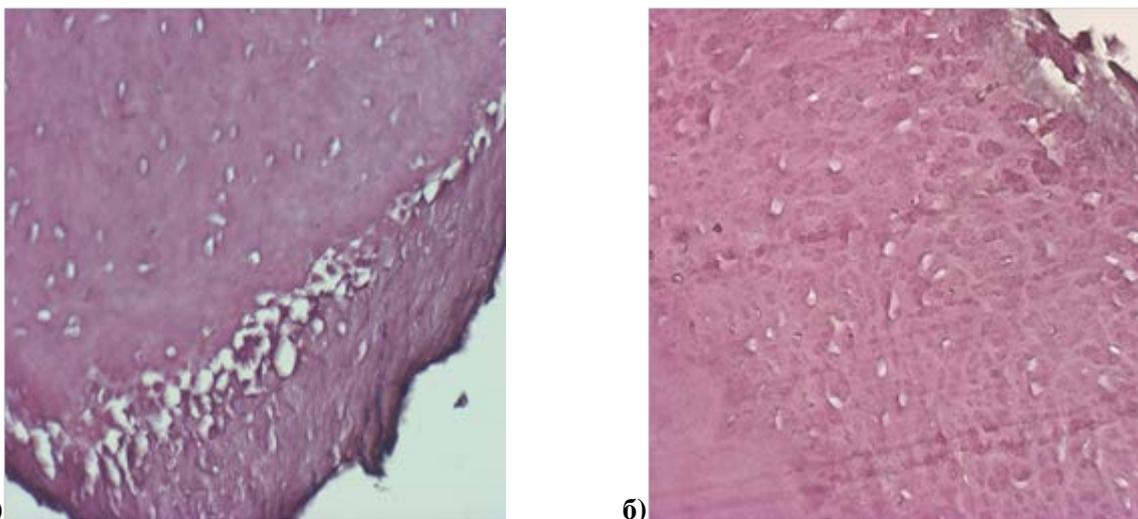


Рисунок 4.4 - Поперечные срезы скаффолдов, заселенных МСК пульпы зуба человека, после 7 и 21 суток культивирования
а) – 7 сут, увел: об.х20, ок.х10; б) – 21 сут., увел: об. х20, ок.х10. Окрашивание гематоксилин-эозином.

Полученные ранее экспериментальные данные свидетельствуют о том, что стимуляция мышечной регенерации может быть достигнута с помощью введения МСК в область повреждения.

При анализе участия МСК в регенерации мышечной ткани нами показано, что МСК костного мозга крысы не проявляют потенций к миогенной дифференцировке *in vitro* под влиянием соответствующих индукторов и крайне редко сливаются с миобластами при совместном культивировании, однако выделяемые ими факторы стимулируют дифференцировку миогенных клеток. Отмечено, что *in vivo* при совместной трансплантации с измельченной мышечной тканью МСК усиливают миогенез и ангиогенез, а при введении в травмированную мышцу улучшают течение восстановительного процесса, как и кондиционированная ими среда. Установлен паракринный механизм влияния МСК на регенерацию скелетных мышц [14].

В течение последних десяти лет особое внимание ученых привлекают внеклеточные везикулы, секретируемые стволовыми клетками. 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. Результаты проведенного нами 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, 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*. Судя по результатам проведенных экспериментов, МСК из костного мозга крысы, по-видимому, не обладают потенциями к миогенной дифференцировке под влиянием индукторов и имеют слабую способность к слиянию с миобластами, однако стимулируют дифференцировку клеток мышечной ткани посредством паракринного влияния (рисунок 4.5). При введении в поврежденную мышцу МСК положительно влияют на ход восстановительного процесса – способствуют уменьшению частоты фиброза (а иногда и его площади), образованию сосудов, формированию зрелых мышечных волокон и в ряде случаев уменьшают площадь зоны воспаления. Очевидно, что благотворное влияние МСК на регенерацию мышечной ткани связано с их паракринной функцией, так как многократное введение кондиционированной ими среды или введение ее после лиофилизации, повышающей концентрацию содержимого, оказывает положительный эффект.

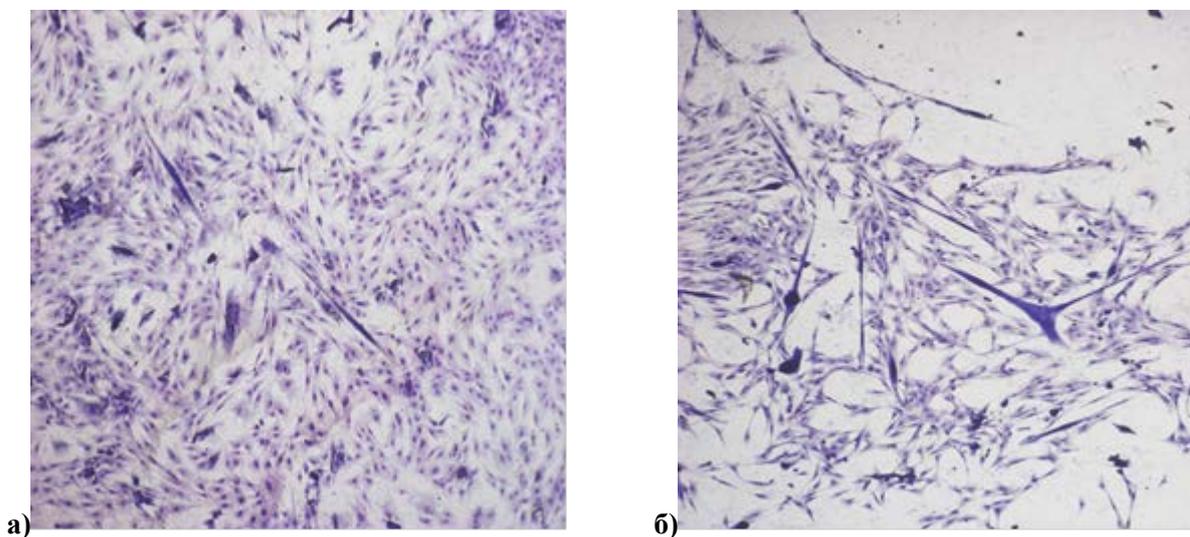


Рисунок 4.5 - Влияние секреторных продуктов МСК на дифференцировку миобластов
а) – культура клеток мышц в отсутствие МСК; б) – клетки мышц при непрямом сокультивировании с МСК. Окраска гематоксилин-эозином; ув.: об. $\times 10$, ок. $\times 10$.

В модели фиброза *in vitro* все экзосомы демонстрировали положительный эффект и при применении в низкой концентрации вызывали уменьшение количества и размера фиброзных узелков (рисунок 4.6). Этот результат коррелирует с предположениями о том,

что экзосомы, на самом деле, являются основным агентом, определяющим антифибротические свойства МСК. Однако, избыток экзосом, вносимых в клеточную культуру, нарушает клеточный гомеостаз.

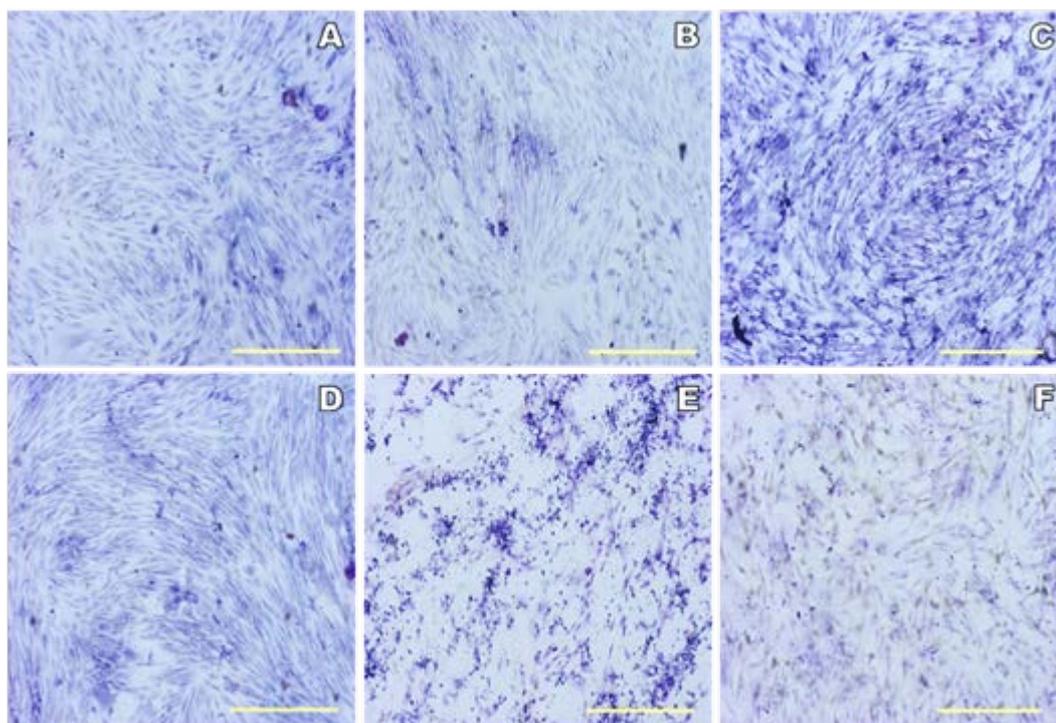


Рисунок 4.6 - Культура фибробластов скелетных мышц после инкубации с профибротическим Tgf β и экзосомами из различных источников
А - AT-MSCexo; В - BM-MSCexo; С - M-MSCexo; D - IM-MSCexo в концентрации 50 мкг/мл и E - BM-MSCexo и F. AT-MSCexo в концентрации 200 мкг/мл. Масштабная линейка 200 мкм.

Учитывая очевидное положительное влияние экзосом как на миогенез (рисунок 4.7), так и на фиброз *in vitro*, мы предполагаем, что экзосомы могут служить новым терапевтическим средством для заживления повреждений скелетных мышц и регенерации тканей [15].

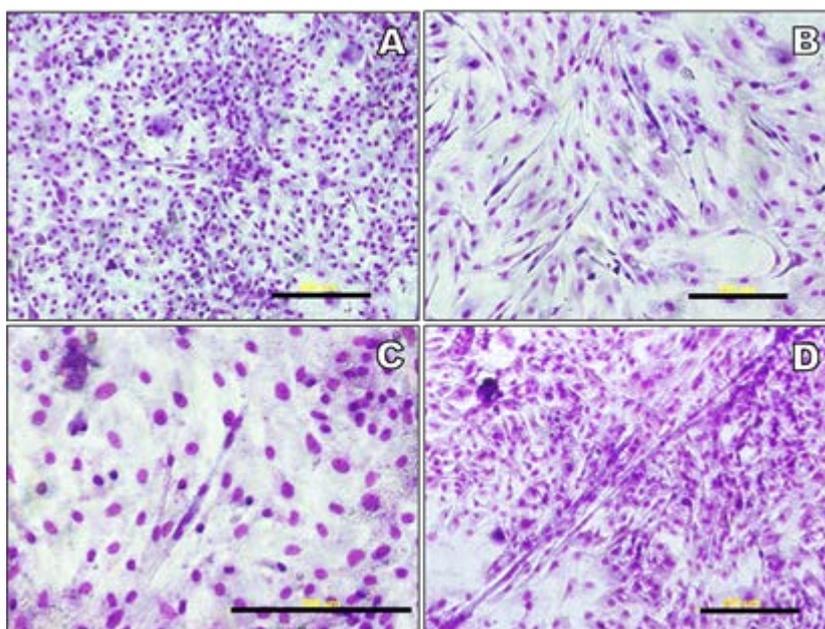


Рисунок 4.7 - Морфология клеточного слоя миобластов и миотуб

А - культура миобластов в контрольных лунках. Миобласты звездчатой или округлой формы. В - миотубы после добавления М-МССехо. Миотубы помечены стрелками. Окружающие миобласты, в основном, удлинены. С - Миотуба в лунке АТ-МССехо, несущая 5 ядер. D - пучок миотуб, образовавшийся после добавления ВМ-МССехо. Масштабная линейка 200 мкм.

4.3.2. Оценена также возможность использования МСК как «носителей» для доставки в организм антигенов, против которых желательна выработка антител (вакцинация) на примере вируса гепатита. Вирус гепатита С является одной из основных причин хронических заболеваний печени и приводит к циррозу и гепатокарциноме. Несмотря на обширные исследования, вакцины против ВГС до сих пор нет. Чтобы индуцировать иммунный ответ у мышей DBA/2J против HCV нами были получены модифицированные МСК, одновременно экспрессирующие пять неструктурных белков HCV (САИТ NS3-NS5B). Врожденный иммунный ответ на МСК был выше, чем на иммунизацию ДНК с плазмидой, кодирующей те же белки, и на немодифицированные МСК. МСК вызывают усиленную фагоцитарную активность, пролиферацию лимфоцитов и выработку интерферонов I и II типов [16].

4.3.3. В 2020 г. вскоре после появления новой коронавирусной инфекции COVID-19, вызванной коронавирусом SARS-CoV-2, рядом специалистов была высказана точка зрения о возможном протективном эффекте вакцины БЦЖ против инфекции COVID-19. В связи с важностью понимания механизмов протективного иммунитета против данной инфекции и наличием у нас большого опыта работы в области иммунологии туберкулеза и БЦЖ-индуцированного иммунного ответа, отдельное внимание было уделено анализу взаимосвязи между вакцинацией БЦЖ и распространенностью/смертностью от COVID-19. Проведено сравнение динамики роста заболеваемости и смертности от COVID-19 в странах с разной политикой по вакцинации БЦЖ (по состоянию на конец апреля 2020 г.),

показана более медленная динамика роста заболеваемости и смертности в странах с обязательной БЦЖ-вакцинацией всего населения (рисунок 4.8). Проанализирована возможная роль других факторов (помимо вакцинации БЦЖ), которые могут влиять на распространенность/смертность от COVID-19 и создавать видимость наличия взаимосвязи «COVID-19 – BCG». Впервые высказана гипотеза о возможной роли латентной туберкулезной инфекции в поддержании гетерологичного «тренированного» противовирусного иммунитета в странах с обязательной политикой БЦЖ-вакцинации. Результаты анализа опубликованы в статье [17].

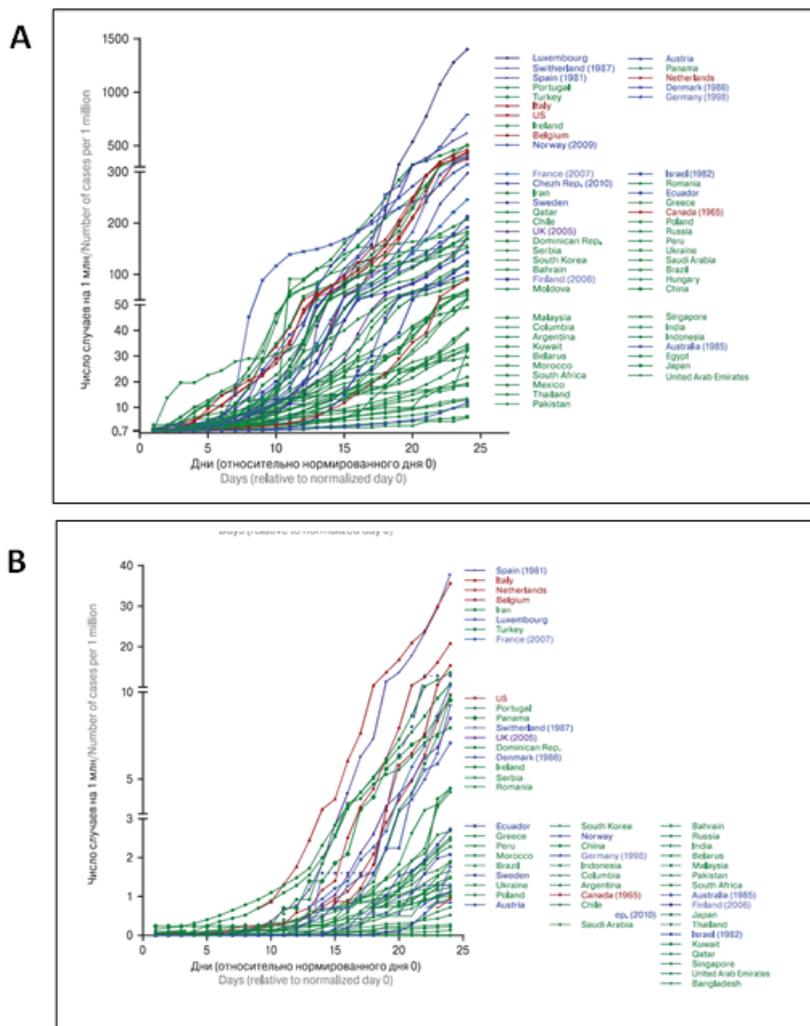


Рисунок 4.8. Динамика показателей заболеваемости (А) и смертности (Б) от COVID-19 по странам

В анализ включены страны с общим количеством случаев более 2000 по состоянию на 21 апреля 2020 г. Данные нормированы относительно первого дня, в который количество случаев COVID-19 в стране превысило 0,7 на миллион популяции. Красный цвет — страны, не применявшие политику обязательной БЦЖ-вакцинации для всего населения; синий цвет — страны, ранее применявшие, но отменившие политику обязательной БЦЖ-вакцинации (в скобках указан год прекращения вакцинации); зеленый

цвет — страны, применяющие политику обязательной БЦЖ-вакцинации в настоящее время. Страны перечислены в порядке убывания количества случаев (смертности) COVID-19 в каждом из трех сегментов стран.

4.4. Заключение

На основании полученных результатов можно сделать следующие выводы:

1. Микроархитектура коллагенсодержащих скаффолдов ГКП и *sis* оптимальна для поддержания роста и остеогенной дифференцировки МСК костного мозга крыс.

2. Длительное культивирование МСК показало спонтанную остеогенную дифференцировку мезенхимных стволовых клеток на децеллюляризованном матриксе зуба, что делает возможным его использование в виде естественного аллогraftа при лечении резорбции альвеолярной костной ткани.

3. Экзосомы являются основным агентом, определяющим антифибротические свойства МСК, положительно влияют на миогенез и могут служить новым терапевтическим средством для заживления повреждений скелетных мышц и регенерации тканей.

4.5 Список использованных источников

1. Rashedi I., Talele N., Wang X-H., Hinz B., Radisic M., Keatin A. Collagen scaffold enhances the regenerative properties of mesenchymal stromal cells//PLOS ONE .- 2017. - Vol. 12. - № 10. - P. 3 - 31.

2. Sukhanov Yu.V., Vorotelyak E.A., Lyadova I.V., Vasiliev A.V. Mesenchymal Stem Cell Therapy-Is the Vessel Half Full or Half Empty?//Russian Journal of Developmental Biology. – 2020 – Vol. 51. – Is. 4. – P. 267-270. DOI: 10.1134/S1062360420040104.

3. Kangari P., Talaei-Khozani T., Razeghian-Jahromi I., Razmkhah M. Mesenchymal stem cells: amazing remedies for bone and cartilage defects//Stem Cell Res Ther. - 2020. - Vol. 11. - № 1. - P. 492 - 547.

4. Heirani-Tabasi A., Naderi-Meshkin H., Matin M.M., Mirahmadi M., Shahriyari M., Ahmadiankia N., Sanjar Moussavi N., Bidkhorji H.R., Raeesolmohaddeseen M., Bahrami A.R. Augmented migration of mesenchymal stem cells correlates with the subsidiary CXCR4 variant//Cell Adh Migr. – 2018. - Vol. 12. - № 2. - P. 118 - 126.

5. Mochizuki M., Sagara H., Nakahara T. Type I collagen facilitates safe and reliable expansion of human dental pulp stem cells in xenogeneic serum-free culture//Stem Cell Res Ther. - 2020. - Vol. 14. - № 1. - P. 267 - 291.

6. Čamernik K., Barlič A., Drobnič M., Marc J., Jeras M., Zupan J. Mesenchymal Stem Cells in the Musculoskeletal System: From Animal Models to Human Tissue Regeneration? //J.Stem Cell Rev Rep. - 2018. - Vol. 14. - № 3. - P. 346 - 369.
7. Chiu C.H., Chang T.H., Chang S.S., Chang G.J., Chen A.C.Y., Cheng C.Y., Chen S.C., Fu J.F., Wen C.J., Chan Y.S. Application of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells for Muscle Healing After Contusion Injury in Mice//Am J Sports Med. – 2020. - Vol. 48. - № 5. - P. 1226 - 1235.
8. Spees J.L., Lee R.L., Gregory C.A. Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function//StemCell Res.Ther. - 2016. - Vol. 31. - Suppl 7. - № 1. - P. 125 - 161.
9. Connor D.E., Paulus J.A., Dabestani P.J., Thankam F.K., Dilisio M.F., Gross R.M., Agrawal D.K. Therapeutic potential of exosomes in rotator cuff tendon healing//J Bone Miner Metab. - 2019. - Vol. 37. - № 5. - P. 759 - 767.
10. Shi Y., Kang X., Wang Y., Bian X., He G., Zhou M., Tang K. Exosomes Derived from Bone Marrow Stromal Cells (BMSCs) Enhance Tendon-Bone Healing by Regulating Macrophage Polarization //Med Sci Monit.- 2020. - Vol. 5. - № 26. - P. 1 - 16.
11. Kruger N.J. The Bradford method for protein quantitation// Methods Mol. Biol. - 1994. - Vol. 32. - P. 9 - 15
12. Butorina N.N., Payushina O.V., Sheveleva O.N., Novokreshchenova A.N., Domaratskaya E.I., Istranov L.P., Istranova E.V. Experimental Study of the Possibility of Culturing of Mesenchymal Stromal Cell and Induction of Osteogenic Differentiation on Collagen-Based Scaffolds of Various Modifications//Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2020. – Vol. 169. – Is. 1. – P. 162 - 168. DOI: 10.1007/s10517-020-04843-4. (WoS, Scopus)
13. Ivanov A. A., Latyshev A. V., Butorina N.N., Domaratskaya E.I., Danilova T.I., Popova O.P. Decellularized Tooth Matrix//Bulletin Exp Biol Med. – 2020. – Vol. 169. – № 4. – P. 512 – 515. DOI 10.1007/s10517-020-04920-8. – Q4. Иванов А.А., Латышев А.В., Буторина Н.Н., Домарацкая Е.И., Данилова Т.И., Попова О.П. Остеогенный потенциал децеллюляризованного матрикса зуба//Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2020. – Т. 169. – № 4. – С. 499 - 503. (РИНЦ).
14. Sheveleva O.N.1, Payushina O.V., Butorina N.N., Domaratskaya E.I. The Myogenic Potential of Mesenchymal Stromal Cells and Their Effect on Skeletal Muscle Regeneration//Biology Bulletin. – 2020. – Vol. 47. – № 5. – P. 455 - 465.
15. Novokreshchenova A.N., Butorina N.N., Payushina O.V., Sheveleva O.N., Domaratskaya E.I. Mesenchymal stromal cell derived exosomes, their characteristics and effects on fibrosis and myogenesis in vitro//Biochemistry (Moscow), Supplement

Series A: Membrane and Cell Biology. – 2020. – Vol. 14. – Iss.4. – P. 289-297. DOI: 10.1134/S1990747820100013. – S

16. Masalova O.V., Lesnova E.I., Klimova R.R., Momotyuk E.D., Kozlov V.V., Ivanova A.M., Payushina O.V., Butorina N.N., Zakirova N.F., Narovlyansky A.N., Pronin A.V., Ivanov A.V., Kushch A.A. Genetically Modified Mouse Mesenchymal Stem Cells Expressing Non-Structural Proteins of Hepatitis C Virus Induce Effective Immune Response//Vaccines. – 2020. – Vol. 8 (1) – P. 62. DOI:10.3390/vaccines8010062.

17. Lyadova I. V., Staricov A.A. COVID-19 and BCG vaccine: is there a link? Russian Journal of Infection and Immunity. – 2020. DOI: 10.15789/2220-7619-CAB-1472.

4.6 Отчетные публикации по разделу

1. **Butorina N.N., Payushina O.V., Sheveleva O.N., Novokreshchenova A.N., Domaratskaya E.I.,** Istranov L.P., Istranova E.V. Experimental Study of the Possibility of Culturing of Mesenchymal Stromal Cell and Induction of Osteogenic Differentiation on Collagen-Based Scaffolds of Various Modifications//Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2020. – Vol. 169. – Is. 1. – P. 162 -168. DOI: 10.1007/s10517-020-04843-4. (WoS, Scopus) – Q4.

2. Ivanov A. A., Latyshev A. V., **Butorina N.N., Domaratskaya E.I.,** Danilova T.I., Popova O.P. Decellularized Tooth Matrix//Bulletin Exp Biol Med. – 2020. – Vol. 169. – № 4. – P. 512 – 515. DOI 10.1007/s10517-020-04920-8. – Q4. - Иванов А.А., Латышев А.В., Буторина Н.Н., Домарацкая Е.И., Данилова Т.И., Попова О.П. Остеогенный потенциал децеллюляризованного матрикса зуба//Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2020. – Т. 169. – № 4. – С. 499 - 503. (РИНЦ).

3. **Sheveleva O.N., Payushina O.V., Butorina N.N., Domaratskaya E.I.** The Myogenic Potential of Mesenchymal Stromal Cells and Their Effect on Skeletal Muscle Regeneration//Biology Bulletin. – 2020. – Vol. 47. – N 5. – P. 455 - 465. DOI: 10.1134/S106235902005009X. – Q4 – 0,75.

4. **Novokreshchenova A.N., Butorina N.N., Payushina O.V., Sheveleva O.N., Domaratskaya E.I.** Mesenchymal stromal cell derived exosomes, their characteristics and effects on fibrosis and myogenesis *in vitro*//Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology. – 2020. – Vol. 14. – Iss.4. – P. 289-297. DOI: 10.1134/S1990747820100013. – S

5. **Sukhanov Yu.V., Vorotelyak E.A., Lyadova I.V., Vasiliev A.V.** Mesenchymal Stem Cell Therapy-Is the Vessel Half Full or Half Empty?//Russian Journal of Developmental Biology. – 2020 – Vol. 51. – Is. 4. – P. 267-270. DOI: 10.1134/S1062360420040104. – Q4
6. **Lyadova I.V.,** Staricov A.A. COVID-19 and BCG vaccine: is there a link? Russian Journal of Infection and Immunity. – 2020. DOI: 10.15789/2220-7619-CAB-1472. – Q
7. Masalova O.V., Lesnova E.I., Klimova R.R., Momotyuk E.D., Kozlov V.V., Ivanova A.M., Payushina O.V., **Butorina N.N.1**, Zakirova N.F., Narovlyansky A.N., Pronin A.V., Ivanov A.V., Kushch A.A. Genetically Modified Mouse Mesenchymal Stem Cells Expressing Non-Structural Proteins of Hepatitis C Virus Induce Effective Immune Response//Vaccines. – 2020. –Vol. 8 (1) – P. 62. DOI: 10.3390/vaccines8010062. – Q1.

РАЗДЕЛ 5 МЕХАНИЗМЫ ПЛАСТИЧНОСТИ СТВОЛОВЫХ И ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК В ПРОЦЕССАХ РЕГЕНЕРАЦИИ РАЗЛИЧНЫХ СТРУКТУР НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

5.1 Введение

Дегенеративные заболевания или травмы в структурах нервной системы часто не имеют эффективного лечения после потери нервных клеток. Регенеративные клеточные подходы предлагают стратегии, направленные на восстановление функции, которые включают использование различных типов клеток доноров, или клеток, полученных перепрограммированием *in vitro* и *in vivo*, что достигается путем де- и трансдифференцировки клеток. Очевидно, что клеточные и молекулярные процессы, необходимые для поддержания регенерации, могут использовать только те же механизмы, которые работают при развитии нервной ткани, но адаптированные к пространству нового микроокружения и времени. Поэтому понимание закономерностей развития необходимо для построения стратегий регенерации в нервной системе. Формирование ЦНС человека представляет собой особую проблему, решение которой ограничивается не только сложностью её морфофункциональной и молекулярной организации, отличающейся от приматов и грызунов, но и набором допустимых методов и животных модельных систем для исследования. За последние годы были достигнуты значительные успехи в разработке методов культивирования 3D-органоидов мозга человека. Несомненное преимущество органоидов, полученных из эмбриональных или индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека, состоит в том, что в них воспроизводятся уникальные особенности развития человеческого мозга, которые отсутствуют в развивающемся мозге грызунов. Этой теме посвящен обзор «Церебральные органоиды: модель развития мозга». [1]. В нем рассматриваются последние данные в разработке методов культивирования церебральных органоидов мозга человека, представляющих 3D-культуры, где благодаря самоорганизации нервной ткани, воспроизводятся уникальные особенности ранних этапов развития человеческого мозга. В обзоре обсуждаются вопросы: технологии получения церебральных органоидов, их морфофункциональные характеристики, биологические конструкции из органоидов, роль органоидов в изучении природы патологических нарушений мозга человека. Можно ожидать, что исследования 3D-органоидов – уникальной модели развития мозга человека приведет к более глубокому пониманию фундаментальных механизмов эмбрионального нейрогенеза, развития заболеваний и персонализированному лечению расстройств ЦНС.

Стратегические подходы к проблеме регенерации в сетчатке млекопитающих и человека рассматриваются в обзоре «Репрограммирование дифференцированного ретинального пигментного эпителия млекопитающих и человека: современные достижения и перспективы». [2]. Основной причиной ряда дегенеративных заболеваний глаза человека, сопровождающихся потерей зрения, является нарушение гомеостатической и функциональной целостности сетчатки и ретинального пигментного эпителия (РПЭ). Несмотря на значительные успехи, достигнутые за последние десятилетия, в разработке новых методов лечения указанной патологии, сохраняется ряд осложнений при использовании хирургических способов коррекции зрения и пока непреодолимых ограничений в применении современных подходов, например, генной терапии и генной инженерии. Одним из перспективных подходов к лечению дегенеративных заболеваний сетчатки может оказаться подход, основанный на использовании регенеративных способностей собственных эндогенных клеток с высокой пластичностью, в частности клеток РПЭ и Мюллеровской глии. В настоящее время клетки РПЭ позвоночных вызывают огромный интерес в качестве источника новых фоторецепторов и других нейральных клеток в деградирующей сетчатке *in vivo*. В связи с этим исследуются возможности их прямого репрограммирования генетическими, эпигенетическими, химическими методами и их комбинацией. В обзоре сделан акцент на исследованиях по генетически-направленному репрограммированию клеток РПЭ позвоночных в нейроны сетчатки, с подробным анализом используемых генов в качестве основных репрограммирующих факторов, сравнительным анализом и экстраполяцией экспериментальных данных с животных на человека. Кроме того, обзор затрагивает работы по использованию альтернативный генетически-направленному репрограммированию подходов – химическиопосредованного с применением коктейлей из терапевтических низкомолекулярных соединений и микроРНК. В целом, результаты исследований указывают на сложность процесса репрограммирования клеток РПЭ человека в нейроны сетчатки. Однако, учитывая результаты по репрограммированию клеток позвоночных, на доступность клеток РПЭ человека для различных векторов, доставляющих в клетки разнообразные молекулы: транскрипционные факторы, химерные эндонуклеазы, рекомбинантные белки и низкомолекулярные соединения, можно предположить наиболее оптимальный набор факторов для успешной конверсии клеток РПЭ человека в нейроны сетчатки.

5.1.1 Изучение действия кондиционированных сред (КС) регенератов сетчаток тритона на клетки РПЭ человека *in vitro*

Сетчатка глаза взрослых млекопитающих и человека в отличие от хвостатых амфибий (*Urodela*) не способна к полноценной регенерации *in vivo*. Известно, что восстановление сетчатки низших позвоночных, индуцированное удалением исходной сетчатки или перерезкой зрительного нерва, происходит за счет клеток РПЭ. Последние после этапов дедифференцировки и пролиферации дифференцируются в нейроны, фоторецепторы и глиальные клетки, которые формируют полноценную сетчатку. В отличие от клеток тритонов клетки РПЭ человека после этапов дедифференцировки и пролиферации дифференцируются в фибробластоподобные клетки, которые участвуют в образовании фиброзных неоваскулярных мембран, приводящих к тракционной отслойке сетчатки и к нарушению зрения [3]. Ранее показано, что сетчатка глаза тритона является индуктором регенерации хрусталика [4] и продуцентом факторов, в частности семейства фактора роста фибробластов (FGF), способных индуцировать и стимулировать регенерацию хрусталика из пигментированных клеток радужки глаза этих животных. Наряду с другими тканями задней стенки глаза сетчатка тритонов является источником FGF2 – ключевого фактора, запускающего сигнальные пути, ответственные за де- и трансдифференцировку клеток РПЭ [5, 6]. В связи со сказанным, было высказано предположение о том, что сигнальные факторы, выделяемые регенератами сетчаток тритонов, могут участвовать в стимуляции регенерационного ответа клеток РПЭ человека. Цель работы состояла в изучении морфологических и молекулярных изменений в клетках РПЭ человека *in vitro* под влиянием сред, кондиционированных регенерирующими в условиях органотипического культивирования сетчатками взрослых тритонов.

5.1.2 Трансплантаты фетальных нервных тканей и плацентарных МСК человека в регенерации различных отделов нервной системы

Регенеративные способности центральной и периферической нервной системы значительно отличаются. В ПНС такая возможность есть, в то время как в ЦНС такая возможность практически отсутствует [7]. Травмы и нейродегенеративные заболевания нервной системы приводят к тяжелым последствиям даже в хорошо регенерирующей ПНС. При этом до сих пор отсутствует эффективное лечение. Одним из возможных подходов является клеточная терапия. Фетальные клетки считаются "золотым стандартом" в области нейротрансплантации [8]. Наиболее применимым и широко используемым типом клеток на данный момент являются МСК [9]. Однако практически отсутствуют данные о развитии малодифференцированных клеток фетальной ЦНС после пересадки в отделы зрелой ПНС. Также недостаточно исследовано поведение МСК после

трансплантации в неповрежденный мозг. Данные проблемы имеют не только фундаментальное, но и прикладное терапевтическое значение. Поэтому, в настоящей работе проводится исследование развития фрагментов фетального неокортекса и спинного мозга мышей в составе трехмерной биоинженерной конструкции (кондуита) после имплантации в перерезанный периферический нерв. Также проводится исследование пролиферативной активности в субвентрикулярной зоне (СВЗ) реципиента и распределения МСК из плаценты человека после стереотаксической и внутриартериальной трансплантации здоровым крысам.

5.2 Материалы и методы

5.2.1 Культивирование клеток. В работе использовали линию клеток РПЭ взрослого человека ARPE-19, депонированную в УНУ "Коллекция клеточных культур для биотехнологических и биомедицинских исследований (общебиологического и биомедицинского направления)" ИБР РАН. Клетки культивировали при 37° С и 5% CO₂ в ростовой среде, состоящей из культуральной среды DMEM/F12 (Sigma-Aldrich, США), L-глутамина (2 мМ; Sigma-Aldrich, США), 100 Ед/мл пенициллина и 100мкг/мл стрептомицина (PanBiotech, Германия), ЭТС (Gibco, США) и КС регенератов сетчаток тритонов. КС добавляли к ростовой среде в соотношении 1:1 с конечной концентрацией 1% ЭТС (Gibco, США). В качестве контроля использовали клетки, культивированные без добавления КС, но с 1% ЭТС. Изменения морфологии клеток изучали с помощью инвертированного микроскопа "Olympus СКХ31" (Япония) через 24, 48, 72 и 120 ч после посадки клеток. В течение всего срока культивирования среду не меняли. Фотографии получали с помощью микроскопа "Olympus" с цифровой камерой DP70.

Получение КС от регенерирующих сетчаток тритонов. Работа выполнена с соблюдением международных принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным. Использовали взрослых половозрелых тритонов *Pleurodeles waltl* в возрасте от 6 мес до 1 года, разводимых в аквариальной ИБР РАН. Тритонов наркотизировали в растворе MS-222 (1:1000, Sigma-Aldrich, США) в течение 10 - 15 мин до полной иммобилизации животного. Выделение глаз проводили в стерильных условиях с помощью микрохирургических инструментов. С помощью бинокулярной лупы выделяли сетчатку, полностью свободную от других тканей глаза задней стенки глаза (пигментного эпителия, хороидальной и склеральной оболочек). Образцы 2-х сетчаток помещали в стеклянные флаконы с 5 мл ростовой среды, состоящей из культуральной среды 199 (Биолот, Россия) и стерильной бидистиллированной воды в соотношении 70% среды 199 и 30% воды, 1М HEPES, 80 мг/л гентамицина сульфата и 10%-ной ЭТС.

Сетчатки культивировали в темноте при температуре 22—24 °С в мини-роллере RM-1 (Elmi, Латвия) при скорости вращения 60 об/мин. Через 120 ч культивирования меняли среду на ростовую среду того же состава, но без ЭТС и культивировали ещё 48 ч. Далее полученную КС стерилизовали через 0.22-µm фильтры (Millipore, США), аликвотировали, хранили при -70°C. В работе использовали КС только от целых, не разрушенных регенерирующих сетчаток тритона.

Морфометрический анализ. Для оценки морфологических изменений клетки ARPE-19 высаживали в культуральные флаконы для адгезивных культур T-25 Greiner CELLSTAR® (GreinerBio-OneGmbH, Германия). После культивирования в течение 24, 48, 72 и 120 ч в присутствии КС или без нее (контроль) клетки фотографировали с помощью микроскопа Olympus (Япония) с цифровой камерой DP70 (Olympus, Япония). Затем из клеток выделяли тотальную РНК (см. ниже). Поскольку через 120 ч клетки достигали конфлюэнтного монослоя, что затрудняло проведение адекватного морфометрического исследования, оценку морфологии клеток ARPE-19 проводили на сроках 24, 48 и 72 ч по изображениям случайных полей зрения (формат JPEG, размер изображения 1360 x 1024 пикселей). С помощью графического планшета и стилуса в программе ImageJ1.51j8 (Wayne Rasband, National Institute of Health, США) на изображениях вручную обводили каждую клетку, исключая двуядерные клетки и те, края которых соприкасались с границами изображения. Для каждого срока анализировали от 150 до 300 клеток, используя 4—16 микрофотографий независимых полей зрения с масштабным увеличением ×200. Программа автоматически рассчитывала площади проекций клетки на подложке (далее площадь клетки). Площади клеток были рассчитаны в пикселях без перевода в метрические единицы измерения, поскольку для анализа были важны не абсолютные значения, а относительные. Дополнительно в программе CellsCount11f (Россия) проводили подсчет клеток. Для каждого срока анализировали от 1000 до 2000 клеток, используя 10—20 микрофотографий независимых полей зрения с масштабным увеличением ×100.

Оценку пролиферативной активности клеток РПЭ проводили с помощью МТТ-теста по стандартной методике. Клетки высаживали на поверхность 96-луночных планшетов в концентрации $1 \times 10^4 / \text{см}^2$ и культивировали в течение 24 ч в отсутствие (контроль) и в присутствии КС. Анализ оптической плотности окрашенного раствора проводили на планшетном анализаторе “StatFax 2100” (Awareness Technology Inc, США) при 545 нм и корректирующем фильтре 630 нм. Исследования проведены в двух повторах по 16 повторностей на одно разведение вещества или контрольную группу. Для вычисления средних значений оптической плотности окрашенных растворов и

стандартных отклонений применяли программное обеспечение Excel 2013 (Microsoft Corporation, США). Пролиферативную активность клеток (%) оценивали по изменению средних значений оптической плотности растворов по отношению к контролю, принятому за 100%.

Иммуноцитохимическое исследование (ИЦХ). Клетки высаживали на круглые покровные стекла (CellStar, Германия) в 24-луночные планшеты (Greiner Bio-One GmbH, Германия) и после культивирования в отсутствие (контроль) или в присутствии КС через 24, 48, 72 ч фиксировали в течение 6 мин 4% раствором параформальдегида (Sigma-Aldrich, США). Препараты хранили в смеси глицерина и этиленгликоля при -20°C до проведения ИЦХ окрашивания. Дифференцировку клеток оценивали по иммунофлуоресценции, используя первичные антитела к коннексину 43 (Cx43, C6219, кроличьи, 1:200, Sigma-Aldrich, США), цитокератину 8 (CK8, Mob 054-05, мышинные, 1:40, Diagnostic BioSystems, США), OTX2 (AV32439, 1:100, кроличьи, Sigma-Aldrich, США), β III-тубулину (ab7751, мышинные, 1:200, Abcam, Великобритания), нейрофиламентам средней и тяжёлой фракции (N2912, мышинные, 1:400, Sigma-Aldrich, США), β -катенину (ab32572, кроличьи, 1:200, Abcam, Великобритания), фибронектину (ab23750, кроличьи, 1:100, Abcam, Великобритания), виментину (ab8978, мышинные, 1:100, Abcam, Великобритания), коллагену типа I (ab34710, кроличьи, 1:100, Abcam, Великобритания), разведенные в 0.1% растворе БСА (Sigma-Aldrich, США). Препараты экспериментальной и контрольной групп клеток ARPE-19 обрабатывали параллельно для последующего проведения сравнительного анализа. ИЦХ-окрашивание проводили по стандартной методике с использованием вторичных антител, меченных флуорохромами AlexaFluor 488 или 594 (1:300; Molecular Probes, США). Фотографирование клеток проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Keyence BZ-9000E (Япония). Интенсивность флуоресцентного сигнала и число клеток (ядер) оценивали с помощью программы ImageJ на цифровых изображениях препаратов (RGB, формат TIFF) с разрешением 1360×1024 пикселей по методике, описанной нами ранее [10]. Для маркерных белков Cx43, OTX2, фибронектин, коллаген I типа и β III-тубулин вычисляли количественный индекс (QI) интенсивности флуоресценции по отношению средних значений интенсивности флуоресцентного сигнала (IntDen, в пикселях) к количеству клеток (ядер) ARPE-19 [11]. Для CK8 подсчитывали долю положительно окрашенных клеток, используя программу CellsCount11f (Россия). Для каждого срока анализировали от 400 до 900 клеток, используя 8—12 микрофотографий независимых полей зрения с масштабным увеличением $\times 200$. В случае β -катенина, локализующегося по цитоплазматической мембране и в цитоплазме, подсчитывали клетки, имеющие цитоплазматическое распределение гранул β -катенина,

используя ту же программу. Для каждого срока анализировали от 300 до 700 клеток, используя 4—7 микрофотографий независимых полей зрения с масштабным увеличением $\times 200$. Определяли число клеток, не содержащих гранул β -катенина и содержащих единичные или множество гранул этого белка.

Количественная ПЦР в реальном времени (кПЦР). Подготовку проб, а также выделение тотальной РНК из культур клеток и кПЦР проводили по методике, описанной нами ранее [10, 12, 13]. Методом кПЦР оценивали изменения уровня экспрессии мРНК следующих генов транскрипционных факторов, сигнальных белков и маркеров дифференцировки: *OCT4*, *NANOG*, *PAX6*, *OTX2*, *MITF*, *KRT18*, β III-тубулин (*TUBB3*), *COL1A1*, *CTNNB1*, *GSK3B*, *KLF4*, *SPP1*, *RUNX2*, *FGF2*, *FGFR1*, *SMAD4*, *SMAD5*, *IGFR1* (праймеры и зонды ДНК Синтез, Россия), *NES*, *BMP2*, *BMP4*, *CCND1* (циклин D1) (Applied Biosystems, США). В качестве эндогенного контроля использовали ген «домашнего хозяйства» *GAPDH* (праймеры и зонд ДНК Синтез, Россия). Пороговый цикл определяли, применяя программное обеспечение “LightCycler® 96 Application Software Version 1.1” (Roche, Швейцария). Количество мРНК каждого исследованного гена в образцах оценивали в 3-х повторностях. Обработка данных кПЦР включала усреднение значений *Ct* для повторных точек в эксперименте, расчет значений относительной экспрессии исследуемых генов методом $\Delta\Delta C_t$ для каждого образца с использованием значения *Ct* по гену *GAPDH* в качестве нормирующего.

Статистический анализ. Статистическую обработку полученных показателей, вычисление средних значений и ошибки среднего проводили с помощью программы Excel 2013 (Microsoft Corporation, США). Достоверность различий средних величин устанавливали с помощью *t*-критерия Стьюдента при уровне значимости $P < 0.01$ или $P < 0.05$.

5.2.2 Животные. Эксперименты по регенерации периферического нерва проводили на мышах C57Bl / 6 и трансгенных гетерозиготных мышах C57BL / 6-Tg (ACTB-EGFP)1Osb / J [14]. Датированную беременность получали, ссаживая самок линии C57Bl / 6 и самца линии C57Bl / 6-Tg (ACTB-EGFP)1osb / J. Утро обнаружения вагинальной пробки, было принято, как E0.5. Ткань неокортекса эмбрионов трансгенных GFP мышей была получена на стадии E19.5, ткань спинного мозга на стадии E14.5. Животные были случайно распределены по следующим пяти группам. 1) Группа «Cortex» (n = 5). В кондуит инъецировали фетальный неокортекс мышей. 2) Группа «Spin» (n = 5). В кондуит инъецировали фетальный спинной мозг. 3) Группа "Tube" (n = 5). Канал кондуита был пустым. 4) Группа «Control» (n = 5). Нервы только перерезали. 5) Группа "Sham" (n = 4).

Нервы были обнажены, но не перерезаны. Все экспериментальные процедуры выполнены в соответствии с требованиями комиссии ИБР РАН по биоэтике.

Эксперименты по регенерации ЦНС проводили на самцах крыс Вистар (n=51). Все манипуляции с животными были одобрены этическим комитетом РНИМУ им. Н.И. Пирогова. Животные случайным образом были разделены на экспериментальные группы: 1-я - крысы со стереотаксическим введением МСК (n=26, из них у n=5 была оценена пролиферация в СВЗ); 2-я - крысы с внутриартериальным введением МСК (n=11, из них у n=5 была оценена пролиферация в СВЗ); 3-я - крысы с стереотаксическим введением физиологического раствора (n=5); 4-я - крысы с внутриартериальным введением физиологического раствора (n=3); 5-я - интактные крысы (у n=5 была оценена пролиферация в СВЗ).

Клетки для трансплантации. МСК выделяли из нормальной плаценты человека (срок гестации 38-40 нед) по стандартному протоколу [15]. Фрагменты плаценты промывали раствором Хенкса ("ПанЭко"), пипетировали и инкубировали с 0.1% раствором коллагеназы I (Gibco) (30 мин, 37°C). Полученную суспензию осаждали (300g, 10 мин), супернатант отбирали, ресуспензировали осадок в полной ростовой среде. Клетки культивировали в среде DMEM/F-12 с добавлением 2 мМ глутамин, 100 Ед/мл пенициллина, 0.1 мг/мл стрептомицина (Gibco) и 10% ЭТС (HyClone) в стандартных условиях (37°C, 5% CO₂) в культуральных флаконах 75 см² в течение 3 сут. Неадгезивные клетки удаляли путём замены среды. При достижении 80% плотности монослоя клетки пассировали с использованием 0.25% раствора трипсин-ЭДТА (Gibco). Субкультивирование проводили с коэффициентом посева 1:4.

Мечение клеток. Флюоресцентное мечение проводили с использованием следующих меток: суперпарамагнитные микрочастицы оксида железа (SPIO, MC03F Bangs Laboratories, средний диаметр 0.50-0.99 мкм), несущие флюоресцентный краситель Dragon Green (lex=480 нм, lem=520 нм), мембранный липофильный краситель RKN26 (Sigma-Aldrich; lex=551 нм, lem=567 нм). Для экспериментов использовали два варианта флюоресцентно-меченных клеток: клетки, несущие только частицы железа с меткой Dragon Green, а также клетки, дополнительно меченные RKN26. Мечение МСК частицами оксида железа проводили при достижении плотности монослоя 80-90%. Клетки инкубировали с частицами (5 мкл суспензии частиц на 1 мл ростовой среды) в течение 12 ч в стандартных условиях, после чего дважды промывали раствором Хенкса для удаления частиц, которые не были захвачены клетками. Затем МСК снимали с культурального флакона путём трипсинизации. Для мечения красителем RKN26 клетки снимали с пластика, промывали бессывороточной ростовой средой, центрифугировали (500g, 5 мин),

супернатант удаляли, МСК ресуспензировали в 1 мл раствора Diluent C, добавляли 1 мл раствора Diluent C, смешанный с 4 мкл РКН26, и инкубировали 5 мин. Реакцию мечения останавливали добавлением равного объёма ЭТС.

Конduit. Желатиновый гидрогель для кондуита получали путем смешивания раствора глутарового альдегида и желатина из свиной кожи (Sigma) и заливки в форму. Затем кондуиты промывали большим количеством деионизированной воды и помещали в PBS с гентамицином (25 мкг / мл).

Трансплантация. Трансплантацию у мышей осуществляли следующим образом. После анестезии выделяли периферический нерв у взрослых мышей C57Bl / 6 (n = 24). В конduit инъецировали фетальную ткань мышей. Нерв перерезали и его концы помещали в конduit.

Операции на крысах выполнялись под ингаляционной анестезией изофлураном (1.5-2%, 98% атмосферного воздуха) с премедикацией атропина сульфатом 0.05 мг/кг в 1 мл физ. раствора (ФР) внутривентриально и местным подкожным обезболиванием 0.1 мл 0.5% раствором бупивакаина. Для внутримозгового введения МСК крыс фиксировали в стереотаксической установке с компьютерной навигационной системой AngleTwo (Leica), разрезали кожу, скальпировали череп и с помощью бора формировали трепанационное отверстие диаметром 1 мм по следующим координатам от брегмы: +0.6 мм AP (переднезаднее направление), +3.5 мм ML (медиально-боковое), -4.5 мм VD (вентрально-дорсальное). Трансплантат (3x10⁵ МСК или только ФР) в объёме 15 мл вводили в область стриатума правого полушария со скоростью 3 мкл/мин с помощью шприца Hamilton 500 мкл, закреплённого в микроинжекторе (KD Scientific). Через 5 мин после введения иглу медленно извлекали, рану ушивали. Для внутриартериального введения после разреза по средней линии шеи выделяли правую общую (ОСА), наружную (НСА) и внутреннюю (ВСА) сонную артерию, на крылонёбную артерию накладывали лигатуру. Через разрез на НСА в ОСА на 5-8 мм вставляли полиуретановый микрокатетер (Braintree Scientific, MTV 1, внешний диаметр 0.33 мм), заполненный ФР. Трансплантат (5x10⁵ МСК или ФР) в объёме 1 мл вводили с помощью микроинжектора со скоростью 100 мкл/мин. После окончания введения катетер извлекали, лигатуру вокруг "пенька" НСА туго затягивали, рану зашивали прерывистым узловым швом. После всех манипуляций внутримышечно вводили 0.2 мл раствора гентамицина, животных помещали в подогреваемую клетку (37°C), где они выходили из наркоза.

MPT. Динамическое МР-исследование проводили на МР-томографе с индукцией магнитного поля 7 Тл для малых лабораторных животных ClinScan (Bruker BioSpin) с использованием поверхностной четырёхсегментной приёмной катушки для мозга крыс.

Во время исследования животные находились под ингаляционной анестезией, как описано выше. МР-протокол состоял из получения анатомических T2-взвешенных изображений (на основе импульсной последовательности Turbo Spin Echo с восстанавливающим импульсом и частотным подавлением сигнала жировой ткани; турбо-фактор=9; TR/TE=4000/46 мс; количество усреднений=2; область обзора 37*29.6 мм; толщина среза 0.5 мм; размер матрицы 320*256). Для визуализации меченных микрочастицами оксида железа МСК использовались изображения, взвешенные по магнитной восприимчивости — Susceptibility weighted imaging (SWI) (на основе импульсной последовательности трёхмерного градиентного эха с компенсацией потока, очищающим импульсом и частотным подавлением сигнала жировой ткани; TR/TE=50/19,1 мс; угол=15; количество усреднений=1; область обзора 30*20.6 мм; толщина среза 0.5 мм; размер матрицы 256*176). При внутриартериальном введении дополнительно получали диффузионно-взвешенные изображения с построением карт измеряемого коэффициента диффузии молекул воды для выявления возможных эмболических осложнений и связанных с ними участков острого цитотоксического отёка вещества мозга (на основе эхопланарной импульсной последовательности с частотным подавлением сигнала жировой ткани, TR/TE=9000/33 мс; b-факторы=0 и 1000 с/мм²; количество диффузионных направлений=6; количество усреднений=3; область обзора 30*19.5 мм; толщина среза 1.0 мм; размер матрицы 86*56).

Гистология и иммуногистохимия. Через 8 недель периферические нервы выделяли 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. Для оценки распределения и миграции МСК гистологическое исследование проводили на 1, 2, 3, 7, 15-е сутки, а для оценки пролиферации эндогенных клеток в СВЗ — на 15-е сутки. Животных усыпляли летальной дозой хлоралгидрата и проводили транскардиальную перфузию 4% параформальдегидом на фосфатном буфере (0.01 М PBS pH 7.4). Мозг извлекали и помещали на 24 ч в раствор 4% параформальдегида, затем получали фронтальные срезы мозга толщиной 50 мкм с помощью вибратора (Thermo Scientific, micron HM 650v). Для выявления клеток, меченных SPIO, использовали окраску по Перлсу (качественная реакция на железо). Для этого препараты инкубировали 10 мин в 2% растворе ферроцианида калия и 2% соляной кислоты, затем отмывали в дистиллированной воде и докрашивали ядра нейтральным красным. 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 ° С 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), anti-alpha SMA antibody (1:500; Abcam), anti-Rat Blood-Brain Barrier Antibody (1:100; BioLegend), anti-Ki67 (1:200; 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), а также вторичных козьих антител к иммуноглобулинам кролика (1:500; Alexa Fluor 647 или Alexa Fluor 594; Sigma-Aldrich) или мыши (1:500; Alexa Fluor 647; Sigma-Aldrich). 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), а также лазерного сканирующего конфокального микроскопа Nikon A1R MP+.

Дальность миграции. Для оценки дальности миграции трансплантированных клеток измеряли расстояние (в мкм) между первоначальным местом трансплантации и клетками, расположенными на наибольшем расстоянии от него.

Оценка пролиферации. Для оценки пролиферативной активности клеток реципиента в СВЗ подсчитывали Ki-67+-клеток в правом полушарии. Для этого выбирали 4-6 срезов на участке от +0.8 до -0.8 от брегмы (из передней, средней и задней части СВЗ соответственно); на каждом срезе с помощью конфокального микроскопа выполняли сканирование трёх областей. Полученные таким путем Z-стеки анализировали с помощью плагина Cellcounter программы Fiji. Такой подход позволил подсчитать количество клеток во всём объёме каждого среза толщиной 50 мкм.

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

Оценка функционального восстановления. Восстановление двигательной функции оценивали с помощью анализа ходьбы по дорожке через 2, 5 и 8 недель после операции на основе протокола, описанного Inserra и соавт. [16].

Статистический анализ. Использовали программные пакеты SPSS Statistics 23.0. (IBM) и R software 3.5.3. (R Foundation for Statistical Computing). Данные представлены в виде среднего ± SE. Сравнения в нескольких группах анализировали с помощью

однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и ANOVA с вложенными данными, с последующим post hoc тестом Тьюки. Также применялся двухфакторный дисперсионный анализ и критерий Манна—Уитни. Статистический анализ был выполнен с использованием программного обеспечения R studio. Нулевую гипотезу отвергали при $p < 0.05$.

5.3 Результаты и обсуждение

5.3.1 Результаты морфологического и морфометрического исследований показали изменения в морфологии клеток ARPE-19, проявляющиеся в изменении формы и увеличении их размеров в течении 120 ч культивирования после воздействия КС регенератов сетчаток тритонов (рисунок 5.1).

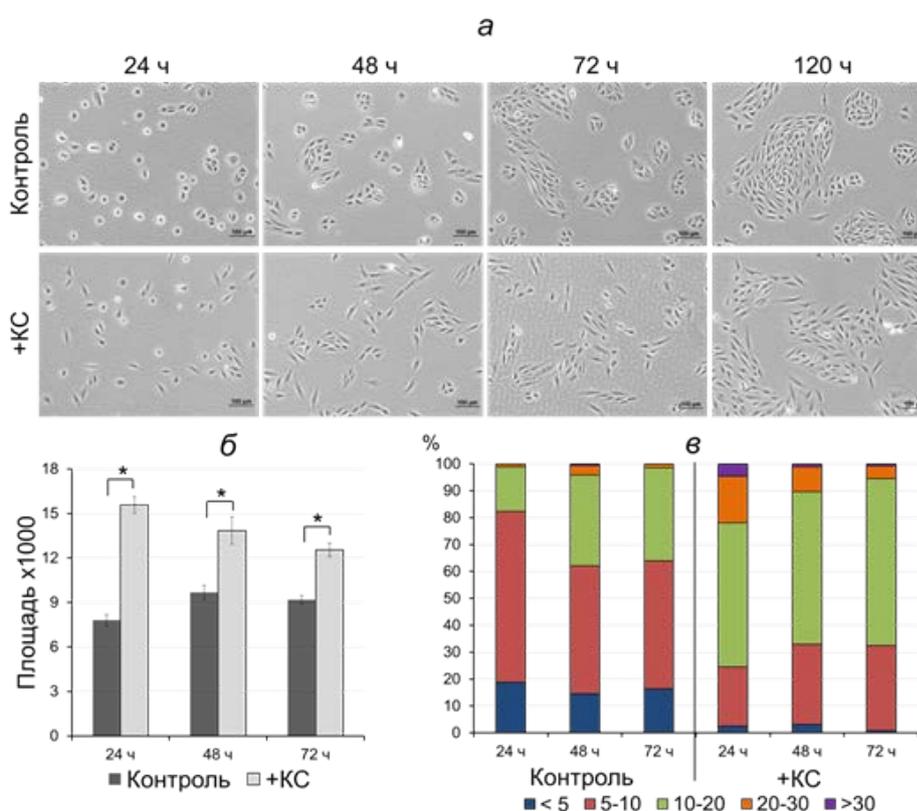


Рисунок 5.1 – Изменение морфологии (а) и морфологических параметров (б, в) клеток ARPE-19 в различные временные промежутки после добавления в среду культивирования КС регенератов сетчаток тритонов

а – фазовый контраст; **б** – средние значения площади клеток в отсутствие (контроль, черные столбики) и в присутствии КС (серые столбики) в пикселях и их ошибки (вертикальные отрезки), * $p < 0.01$; **в** – распределение клеток по размеру площади в пикселях x1000, в %.

По данным литературы известно, что по мере увеличения размера клеток увеличивается содержание рибосом и скорость синтеза белка [17]. Забегая вперед, следует отметить, что об увеличении синтетической активности клеток ARPE-19 на сроке 24-48 ч

после воздействия КС свидетельствуют увеличение экспрессии гена коллагена I типа *COL1A1* и усиление иммуноокрашивания на белок внеклеточного матрикса фибронектин.

Кроме этого, результаты ИЦХ исследования показали снижение интенсивности окрашивания клеток на белок щелевых контактов РПЭ Сх43 (рисунок 5.2) и перераспределение β -катенина (рисунок 5.3) по сравнению с контролем.

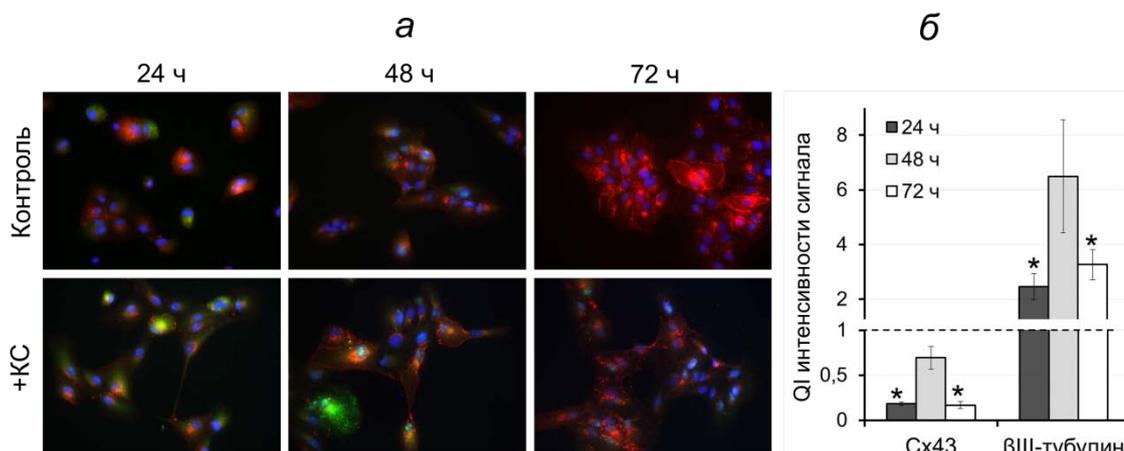


Рисунок 5.2 - Анализ изменения Сх43 и β III-тубулина в клетках ARPE-19 через 24, 48 и 72 ч после воздействия КС

а – двойное иммунофлуоресцентное окрашивание на Сх43 (красная флуоресценция) и β III-тубулин (зеленая флуоресценция). Ядра окрашены DAPI (синяя флуоресценция). Об.: 40х. б – количественный индекс (QI) интенсивности флуоресцентных сигналов. Вертикальные отрезки – ошибки среднего, * $p < 0.05$.

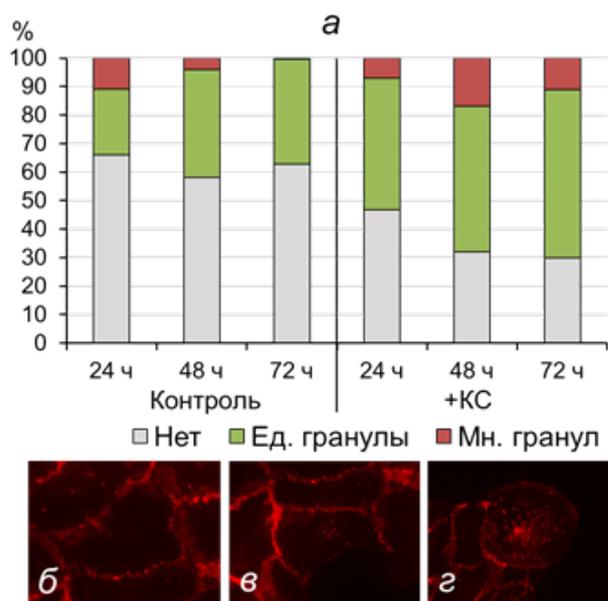


Рисунок 5.3 - Количественный анализ клеток ARPE-19 на цитоплазматическое распределение гранул β -катенина (а) и примеры иммунофлуоресцентного окрашивания на β -катенин (красное свечение), демонстрирующие отсутствие (б), единичные (в) и множество гранул (г) в цитоплазме

а – число клеток, не содержащих гранул (Нет, серый цвет) и содержащих единичные (Ед., зеленый цвет) или множество (Мн., красный цвет) гранул через 24, 48 и 72 ч после добавления в среду КС по сравнению с контролем, в %

Так, во временном отрезке 24-48 ч отмечалось увеличение доли клеток, имеющих внутриклеточную локализацию β -катенина. Поскольку β -катенин является не только центральным медиатором канонического Wnt-сигнального пути, но и белком адгезионных контактов, данное наблюдение совместно с результатами окраски на Сх43 говорит об

ослаблении межклеточной адгезии и объясняет появление «рыхлых» колоний под действием КС.

Снижение экспрессии *OTX2*, маркера предшественников РПЭ, и *BMP4*, участвующего в определении ранней специализации клеток РПЭ из нейроэпителителя [18], через 24 ч после воздействия КС (рисунок 5.4) наряду с ослаблением межклеточных контактов свидетельствует о частичной потере эпителиальной дифференцировки на данном сроке.

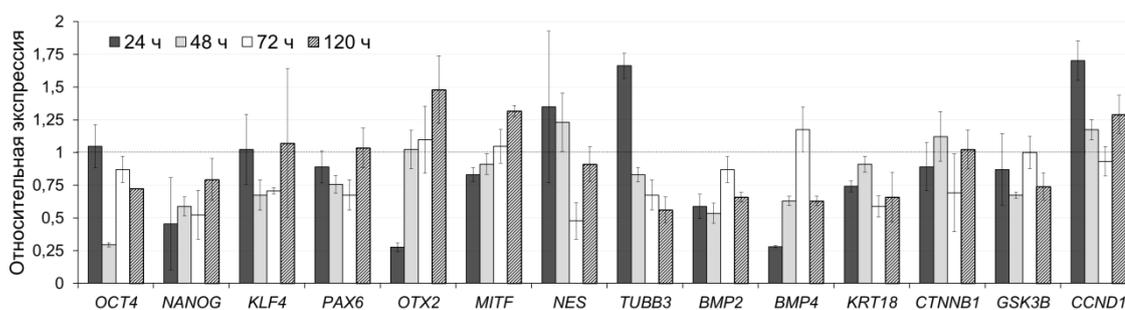


Рисунок 5.4 - Изменение профиля экспрессии генов *OCT4*, *NANOG*, *KLF4*, *PAX6*, *OTX2*, *MITF*, *NES*, *TUBB3*, *BMP2*, *BMP4*, *KRT18*, *CTNNB1*, *GSK3B*, *CCND1* в клетках ARPE-19 под действием КС регенератов сетчаток тритонов в различные промежутки времени относительно соответствующего контроля (в отсутствии КС), принятого за единицу (штриховая линия)

Снижение интенсивности окрашивания на β -катенин по цитоплазматической мембране в клетках ARPE-19 сопровождалось сохранением уровня экспрессии его гена (*CTNNB1*) одновременно со снижением уровня экспрессии *GSK3B* (рисунок 5.4). В отсутствие Wnt-сигнализации *GSK3 β* препятствует стабилизации и накоплению β -катенина в цитоплазме. При активации Wnt сигнального пути накопленный β -катенин мигрирует в ядро, где взаимодействует с мишенями Wnt, регулирующими экспрессию многих генов [19].

В клетках ARPE-19, как уже было сказано выше, под действием КС наблюдалось увеличение экспрессии гена коллагена I типа *COL1A1*, но усиления синтеза белка при ИЦХ окрашивании не выявлено. Однако отмечено усиление иммуноокрашивания на фибронектин. Рассматриваемые вместе эти изменения указывают на возможную активацию эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) клеток РПЭ и активацию канонического Wnt-сигнального пути. Связь между ЭМП и активацией Wnt/ β -катенинового пути показана при эмбриональном развитии и регенерации [20, 21]. Нарушение межклеточных контактов и перестроение цитоскелета, о чем свидетельствуют изменения в морфологии клеток и появление «рыхлых колоний», являются одними из ранних событий ЭМП [22]. Клетки, подвергшиеся ЭМП, приобретают мезенхимоподобный фенотип, характеризующийся экспрессией соответствующих белков цитоскелета (в частности виментина) и повышенным отложением белков внеклеточного

матрикса, включая коллаген I типа и фибронектин [23, 24]. ИЦХ окрашивание на виментин не выявило значимых различий между контрольной и экспериментальной группой. Однако виментин не является надёжным показателем для выявления ЭМП в культуре РПЭ, поскольку различные виды эпителия экспрессируют его в культуре [25]. Кроме того, виментин экспрессируется в регенерирующих после повреждения тканях, поскольку процесс регенерации часто связан с возвращением клеток к менее дифференцированному фенотипу [26].

Для исключения остеогенной дифференцировки под влиянием КС, исследовали кПЦР экспрессию генов *SPP1*, *RUNX2* и показали отсутствие транскрипции *SPP1* в клетках ARPE-19 в контроле и под воздействием КС, и снижение уровня экспрессии мРНК *RUNX2* под воздействием КС (рисунок 5.5).

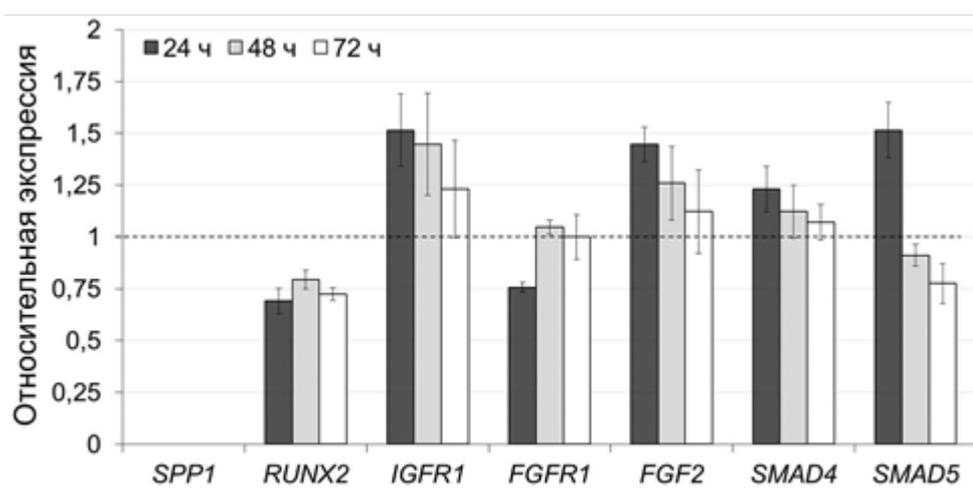


Рисунок 5.5 - Изменение профиля экспрессии генов *SPP1*, *RUNX2*, *IGFR1*, *FGFR1*, *FGF2*, *SMAD4*, *SMAD5* в клетках ARPE-19 под действием КС регенератов сетчаток тритонов в различные промежутки времени относительно соответствующего контроля (в отсутствии КС), принятого за единицу (штриховая линия)

Как и РПЭ низших позвоночных, РПЭ человека может быть репрограммирован в нейральном направлении [27, 28], однако для этого требуются дополнительные манипуляции, в то время, как у низших позвоночных трансдифференцировка РПЭ является естественным процессом. У низших позвоночных трансдифференцировка происходит через стадию специфических мультипотентных клеток, сохраняющих некоторые свойства РПЭ. В процессе трансдифференцировки клетки РПЭ низших позвоночных демонстрируют признаки ЭМП – теряют пигментацию, в них снижается экспрессия маркеров РПЭ, увеличивается подвижность и пролиферация [29]. У млекопитающих признаки ЭМП проявляются в клетках РПЭ как при различных патологиях глаз, так и при восстановлении РПЭ после воздействия лазера [20, 24]. Таким образом, наблюдаемые нами эффекты КС на клетки ARPE-19 могут свидетельствовать о начале ЭМП, который, однако, не имеет завершённого характера из-за однократного

воздействия КС. По мере снижения концентрации КС клетки возвращаются к исходному состоянию.

Одновременно с событиями ЭМП в культуре наблюдались признаки, характерные для нейральной и эпителиальной дифференцировок, что, вероятно, связано с выделением двух субпопуляций. Увеличение доли СК8-положительных клеток после воздействия КС на фоне общего снижения эпителиальных маркеров говорит о поддержании небольшого пула клеток ARPE-19 в исходном состоянии (рисунок 5.6).

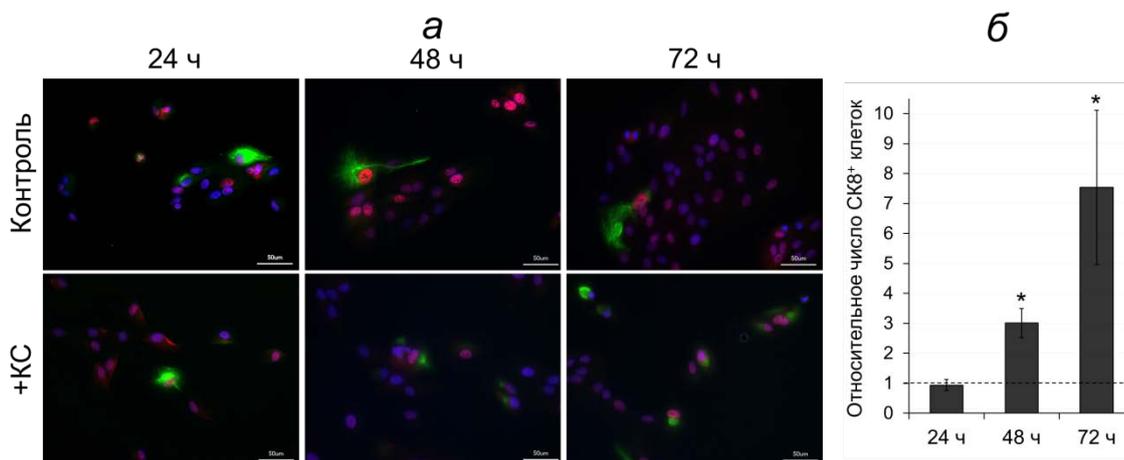


Рисунок 5.6 – Анализ изменения OTX2 и СК8 в клетках ARPE-19 через 24, 48 и 72 ч после воздействия КС

а – двойное иммунофлуоресцентное окрашивание на OTX2 (красная флуоресценция) и СК8 (зеленая флуоресценция). Ядра окрашены DAPI (синяя флуоресценция). Об.: 40х.

б – изменение количества СК8+-положительных клеток по отношению к контролю, принятому за единицу. Вертикальные отрезки – ошибки среднего, *р < 0.05.

В пользу попытки клеток выйти в нейральную дифференцировку свидетельствуют повышение уровня экспрессии гена *TUBB3*, усиление иммуноокрашивания на белок β III-тубулин на фоне понижения экспрессии *BMP2* и *BMP4* (рисунок 5.4). Ингибирование передачи сигналов BMP играет центральную роль во время нейральной индукции у млекопитающих [30]. Однако затем, ввиду краткосрочного воздействия КС, во временном промежутке 72—120 ч наблюдалось снижение транскрипции маркеров нейрональной дифференцировки (*TUBB3*, *NES*, *PAX6*) и увеличение транскрипции маркеров предшественников РПЭ (*OTX2*, *MITF*), что, вероятно, связано с возвратом клеток к исходной дифференцировке (рисунок 5.4). Изменений в иммуноокрашивании против нейрофиламентов не наблюдалось вероятно из-за короткого времени воздействия дифференцировочного фактора. О попытке изменения дифференцировки на раннем сроке после воздействия КС и возврате к исходной говорит и характер изменения размера клеток по сравнению с контролем. Максимальные различия в площади клеток

наблюдались на сроке 24 ч, которые постепенно уменьшались с течением времени культивирования (рисунок 5.1 б, в).

Тот факт, что клетки ARPE-19 под действием КС подвергаются ЭМП и совершают попытку выйти в нейральную дифференцировку, предполагает, что фактор(ы), присутствующий(ие) в КС регенератов сетчаток тритонов, способны обеспечить триггер для инициирования этих процессов. Подобные факторы, по мнению [31], могут принадлежать ряду различных типов биомолекул, включая белки, липиды, нуклеиновые кислоты и полисахариды. Проведя ряд экспериментов по выявлению природы дедифференцировочного сигнала по отношению к кардиомиоцитам мышцы в экстракте регенерирующих конечностей тритона, исследователи [31] показали его белковую природу. Данные о составе секрета регенерирующей *in vitro* сетчатке глаза тритона пока отсутствуют. Однако нам известно, что на первой неделе органотипического культивирования *in vitro* изолированных тотальных сетчаток тритона в них, по данным ПЦР, происходит значительное возрастание экспрессии мРНК гена *Fgf2* [32]. *FGF2*, член FGF-сигнального пути, функционирует на самых ранних стадиях эмбрионального развития [33], в том числе развития глаза, способствуя специализации нейроэпителлия в сетчатку [34]. Основными молекулами, стимулирующими трансдифференцировку РПЭ в клетки сетчатки при регенерации у тритона являются FGF2 и IGF-1 [35]. Самостоятельно IGF-1 не способен вызвать изменения в РПЭ, скорее всего он участвует в повышении эффективности передачи сигнала FGF2 [35]. В нашем исследовании мы наблюдали увеличение уровней экспрессии мРНК *IGF1* и *FGF2* в клетках ARPE-19 под действием КС (рисунок 5.5), что свидетельствует о консервативности механизмов трансдифференцировки РПЭ у позвоночных и возможном присутствии IGF-1 и FGF2 в КС.

Важным участником контроля пролиферации и дифференцировки клеток является KLF4. Значение KLF4 показано при спецификации эпителиальных клеток и созревании нейронов [36, 37]. В нашем исследовании ингибирование экспрессии *KLF4* положительно коррелировало со снижением экспрессии генов-маркеров дифференцировки РПЭ (*OTX2*, *VMP4*, *KRT18*) через 24-72 ч после воздействия КС (рис. 5.1.4). Кроме того, на этом же сроке мы наблюдали снижение пролиферативной активности клеток ARPE-19 по сравнению с контролем (рисунок 5.7).

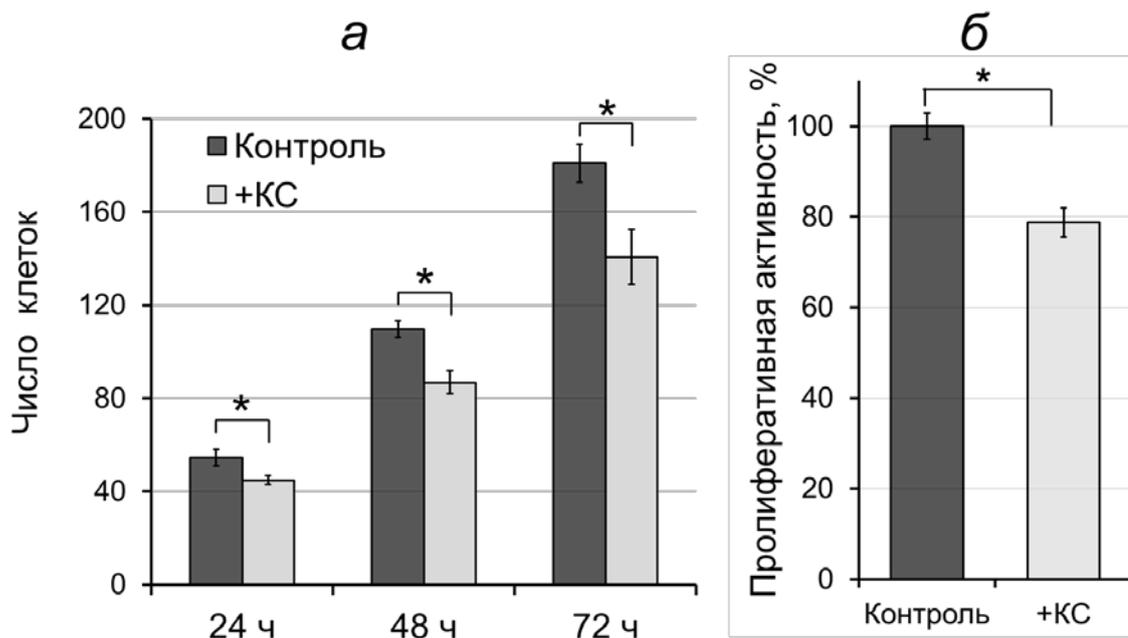


Рисунок 5.7 - (а) - среднее число клеток ARPE-19 на микрофотографиях независимых полей зрения (CellsCount11f) в разные промежутки времени после добавления в среду КС (серые столбики) по сравнению с контролем (черные столбики) и их ошибки (вертикальные отрезки), а также (б) - пролиферативная активность клеток (МТТ-тест) в % через 24 ч после добавления в среду КС (серый столбик) по сравнению с контролем (черный столбик), * $p < 0.01$

Снижение пролиферации совпадало со снижением уровня экспрессии *KLF4*. В наших предыдущих исследованиях показана связь между повышением экспрессии *KLF4* и усилением пролиферации после воздействия FGF2 как в иммортализованной [12], так и в неиммортализованных культурах клеток РПЭ [13]. Усиление пролиферации клеток ARPE-19 и повышение уровня экспрессии *KLF4* наблюдалось через 24 ч после воздействия FGF2, в то время как в первичных клетках РПЭ в первые 48 ч пролиферативная активность была снижена при неизменном уровне *KLF4*, а повышение уровня пролиферации и экспрессии *KLF4* происходило только через 72 ч после воздействия FGF2. Такое различие, вероятно, связано с разной чувствительностью линейных и первичных клеток на одинаковую концентрацию фактора [38]. По всей видимости, в зависимости от контекста *KLF4* может регулировать клеточный цикл либо негативно [36, 39], либо позитивно [40]. Ещё один белок, контекстзависимо влияющий на пролиферативный ответ и дифференцировку – *BMP2* [41, 42]. Если сопоставлять результаты падения пролиферативной активности клеток ARPE-19 человека (рис. 5.7 б) и данные кПЦР, показавшие снижение уровня экспрессии мРНК *BMP2* в интервале 24-72 ч (рис. 5.4), то можно отметить их прямую корреляцию. Отсутствие пролиферативного эффекта, отмеченное ранее при использовании КС и экстрактов из регенерирующих конечностей тритона в работах [43, 44], и подтвержденное в нашем исследовании, может быть связано с тем, что для активации пролиферации требуется больше времени. Так, в

экспериментах Yasumigo и соавт. (2017) [29] клетки РПЭ тритона входили в клеточный цикл между 5 и 10 днём после ретиноэктомии, а полная регенерация сетчатки занимала более 65 суток.

В качестве основного фактора, влияющего на клетки РПЭ человека, мы предполагаем FGF2. Однако в КС могут присутствовать и другие активные молекулы, а также концентрация FGF2 может быть недостаточна для того, чтобы стимулировать пролиферативный ответ.

5.3.2 Регенерация периферических нервов после травм по-прежнему остается сложной фундаментальной и клинической проблемой. Многообещающее решение – терапия стволовыми клетками. В этом исследовании мы проанализировали развитие цельных трансплантатов фетальной нервной ткани, расположенных в желатиновых гидрогелевых кондуитах, и их влияние на регенерацию нервов после перерезки. Мы обнаружили, что гидрогелевый конduit подходит для регенерации нервов и что трансплантаты фетального неокортекса могут выжить, дифференцироваться и стимулировать функциональное восстановление после повреждения нерва. Через восемь недель после операции гистологическое исследование показало, что после имплантации выжили только клетки цельного трансплантата фетального неокортекса. Другие работы показали, что клетки спинного мозга также могут выжить [45, 46]. Однако в этом эксперименте цельные трансплантаты или клеточная суспензия вводились непосредственно в нервы, тогда как в нашем исследовании использовали кондуиты из желатинового гидрогеля в качестве носителя. Примечательно, что трансплантированные клетки неокортекса в основном располагались внутри проксимальной части нерва реципиента. Можно предположить, что клетки мигрировали в эту часть нерва и выжили благодаря кровоснабжению и более предпочтительному микроокружению по сравнению с тем, что находится внутри кондуита. Иммуногистохимическое исследование продемонстрировало дифференцировочный потенциал фетальных клеток неокортекса после трансплантации в микросреду периферического нерва. Мы показали, что большинство клеток дифференцировалось в астроциты (GFAP+) и лишь единичные клетки дифференцировались в нейроны (NeuN+) (рисунок 5.8). Это может быть связано с тем, что мы использовали фетальный неокортекс на стадии E19.5, которая является моментом завершения нейрогенеза. В результате зрелые нейроны в основном не выживали после трансплантации.

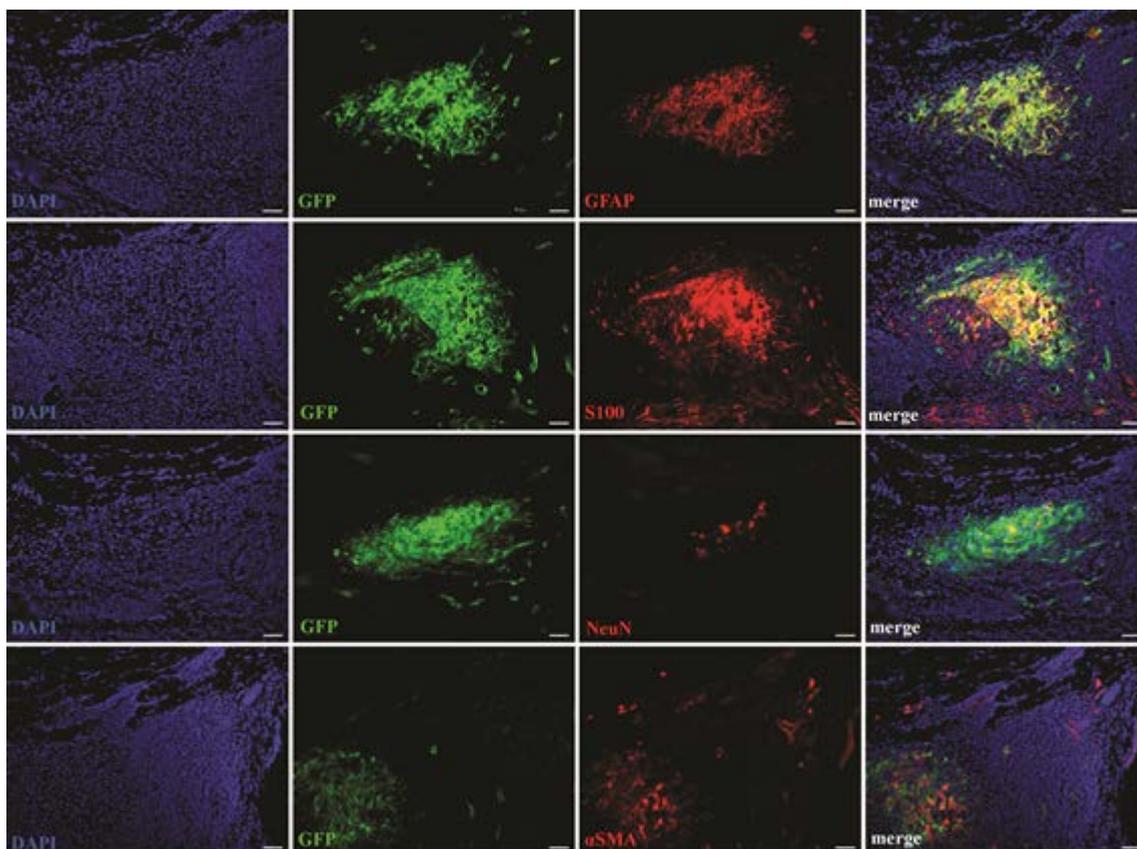


Рисунок 5.8 - Дифференцировка GFP+ клеток фетального неокортекса мыши через 8 недель после имплантации

Клетки дифференцировались в астроциты (GFAP+, S100β+), нейроны (NeuN+), некоторые клетки были положительны к маркеру сосудов αSMA+. Масштабный отрезок: 50 мкм.

Показано, что ГАМК-ергические, NO-ергические, холинергические и катехоламин-ергические нейроны сохраняются в цельном трансплантате фетального неокортекса в седалищном нерве после имплантации [47]. В этой работе, в отличие от нашей, использовались эмбрионы крысы E14, это стадия развития, когда нейрогенез еще активен. Мы также обнаружили клетки GFP + / S100 +. Хорошо известно, что S100B экспрессируется, в частности, астроцитами и шванновскими клетками [48]. Мы также обнаружили, что некоторые из трансплантированных клеток экспрессировали αSMA и обычно располагались вокруг кровеносных сосудов. Мы показали, что канал из желатинового гидрогеля подходит для прямого повторного роста волокон и миграции шванновских клеток. В другой работе миграция шванновских клеток в гидрогелевом кондуите была не столь выражена, возможно, из-за того, что расстояние между перерезанными участками нерва было больше [49]. В нашем эксперименте икроножные мышцы не восстанавливались после атрофии (рисунок 5.9). Но в другой работе анализ веса мышц показал, что трансплантаты фетального спинного мозга поддерживали мышечный вес по сравнению с контролем [46].

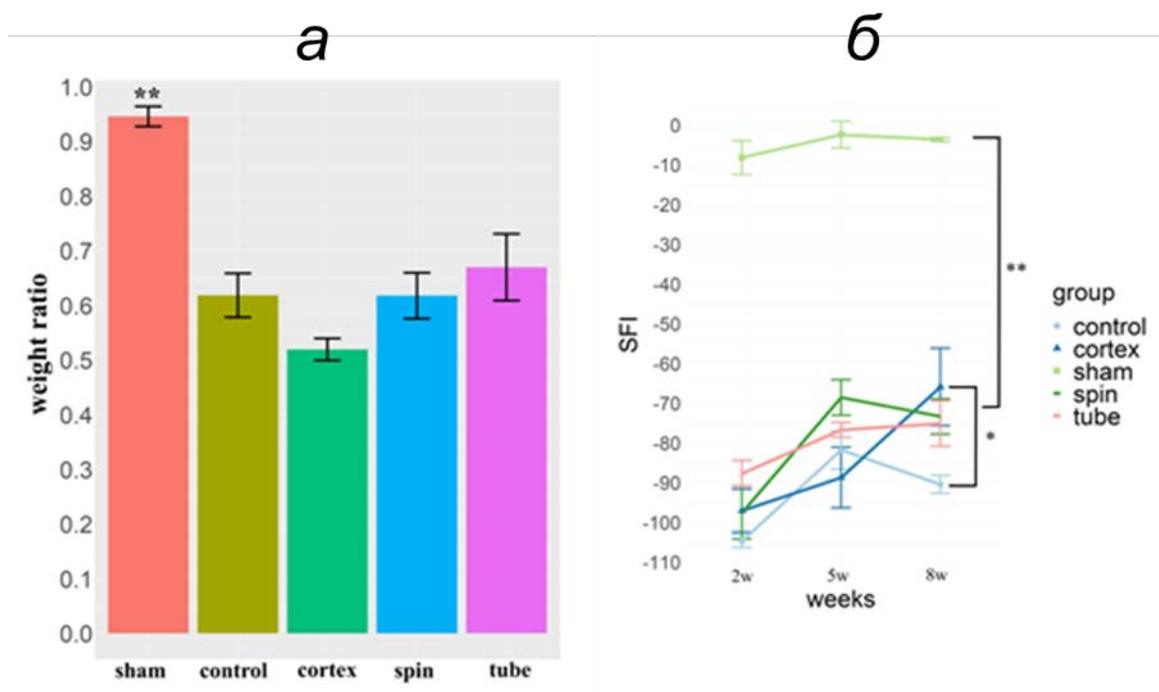


Рисунок 5.9 – а - имплантация кондуита не приводит к изменению атрофии икроножной мышцы; б - индекс седалищного нерва свидетельствует о функциональном восстановлении в случае имплантации кондуита. * $p \leq .05$, ** $p \leq .0005$.

Возможно, это связано с тем, что в настоящей работе использовались клетки неокортекса поздней стадии развития E19.5. Мы также показали возможность функционального восстановления через 8 недель по сравнению с «контрольной» группой (рисунок 5.9). Положительный эффект может быть связан с тем, что пересаженные клетки большей частью дифференцировались в астроциты. Известно, что астроциты экспрессируют BDNF и S100B, которые оказывают трофическое действие на нейроны, снижают реактивность микроглии и улучшают регенерацию после травмы [50].

В другой работе проводили сравнительный анализ распределения и миграции МСК, полученных из плаценты человека, после их стереотаксической и внутриартериальной трансплантации в головной мозг здоровых крыс, а также оценку влияния трансплантации МСК на пролиферативную активность клеток (предположительно нейральных стволовых клеток) в СВЗ боковых желудочков, которая, как известно, является нейрогенной зоной [51]. МСК, меченные магнитными микрочастицами оксида железа (SPIO), конъюгированными с зелёным флуоресцентным белком, вводили стереотаксически в область правого стриатума. Для оценки миграции клеток проводили МРТ-исследование в динамике с 1-х по 15-е сутки, данные подтверждали гистологическим исследованием. На всех сроках с помощью МРТ и гистологического исследования удавалось точно локализовать трансплантат, который

располагался по ходу введённой в мозг иглы в коре, мозолистом теле и стриатуме (рисунок 5.10)

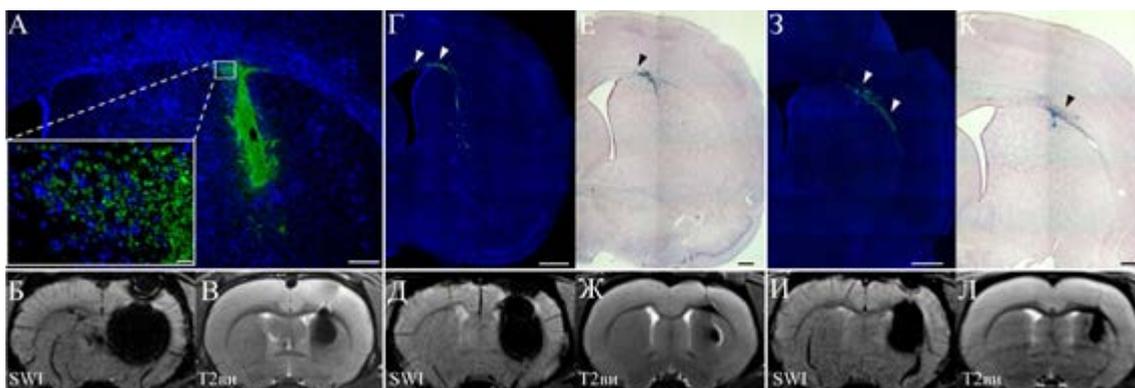


Рисунок 5.10 - Миграция МСК после внутримозгового введения здоровым крысам. Данные МРТ и гистологического исследования срезов головного мозга на 1-е (а-в) и 15-е (г-л) сутки после трансплантации. Эпифлюоресцентная микроскопия (а), МР-изображение в SWI-режиме (б, д, и), T2-ВИ (в, ж, л), конфокальная микроскопия (г, з), светопольная микроскопия: окрашивание по Перлсу (е, к). а — зелёная флюоресценция соответствует SPIO-меченым клеткам. МСК располагаются компактно в стриатуме, единичные клетки мигрируют от трансплантата в паренхиму мозга. Миграция медиально и латерально по мозолистому телу. б, в — гипоинтенсивная область соответствует зоне трансплантации МСК. г, д — пример миграции SPIO-меченных клеток по мозолистому телу в сторону бокового желудочка. МСК визуализируются в контакте с СВЗ. е — синее окрашивание соответствует местам скопления SPIO. ж — снижение интенсивности сигнала в области мозолистого тела соответствует миграции МСК. з, и, к — пример миграции SPIO-меченных клеток по мозолистому телу латерально от трека введения. л — снижение интенсивности сигнала в области мозолистого тела соответствует миграции МСК латерально от трека введения.

В коре и стриатуме основная масса трансплантированных клеток локализовалась компактно вдоль трека введения иглы, и лишь единичные клетки мигрировали в паренхиму мозга. Сходное расположение трансплантата было описано в работе [52], где также практически не наблюдалась миграция МСК в зоне базальных ядер после введения в здоровый мозг. Однако в нашем эксперименте дальняя миграция наблюдалась в области мозолистого тела, причём как медиально от зоны введения (по направлению к боковому желудочку), так и латерально от зоны введения. Статистически достоверной разницы в дальности миграции клеток вдоль мозолистого тела между этими направлениями не выявлено. Кроме того, нам удалось показать, что на всех исследуемых сроках значительная часть трансплантированных клеток визуализировалась вокруг церебральных сосудов с их внешней стороны как в области стриатума, так и в мозолистом теле. Вероятно, аксоны белого вещества и сосуды являются направляющими для миграции МСК [53]. Подобное явление было отмечено и при трансплантации других типов стволовых клеток [54]. При внутриартериальной трансплантации меченые клетки вводились через правую внутреннюю сонную артерию (ВСА). Сразу после введения в правую ВСА клетки распределялись в ипсилатеральном полушарии: основная масса в

моторной и сенсорной коре, области гиппокампа, а также в стриатуме, таламусе, гипоталамусе. Единичные клетки визуализировались также в контралатеральном полушарии, чаще в коре лобной доли и ростральной части стриатума. Вероятно, основной вклад в распределение клеток вносят особенности анатомии мозговых сосудов. Согласно данным гистологического исследования и МРТ в динамике количество меченых МСК в головном мозге постепенно уменьшалось, и к 3-м суткам трансплантированные клетки не обнаруживались. После внутриартериального введения большая часть МСК находилась внутри церебральных сосудов, что подтверждается данными иммуногистохимического исследования (рисунок 5.11).

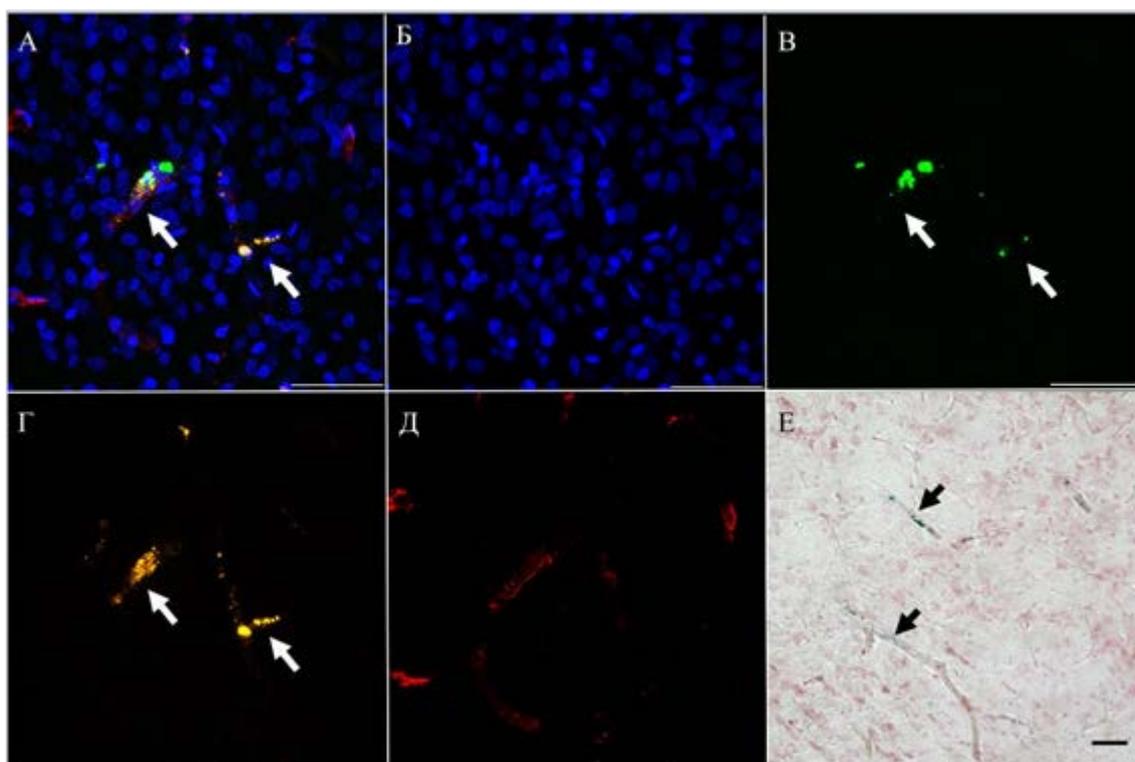


Рисунок 5.11 - Распределение и миграция МСК по церебральным сосудам после внутриартериальной трансплантации здоровым крысам
Через 24 ч после введения МСК, меченные SPIO и липофильным мембранным красителем РКН26, визуализируются внутри церебральных сосудов в контакте с внутренней частью их стенки. а — совмещённое изображение б-д: DAPI+SPIO+РКН26+EBA (anti-Rat Blood-Brain Barrier Antibody); б — DAPI; в — SPIO; г — РКН26; д — EBA. е — окрашивание по Перлсу; стрелками отмечены трансплантированные клетки внутри сосудов

Учитывая тесный контакт трансплантированных МСК со стенкой мозговых сосудов, нельзя исключить, что единичные клетки могут проходить через ГЭБ в паренхиму мозга. Способность к миграции МСК через ГЭБ показана в ряде работ, выполненных на монослойных культурах эндотелия церебральных сосудов [55]. Проллиферативный ответ эндогенных клеток в СВЗ оценивали через 15 сут после трансплантации МСК. В конце эксперимента пролиферирующие клетки выявляли путём иммуногистохимического окрашивания антителами к Ki67 — антигену в ядре клеток во

всех фазах клеточного цикла, кроме G₀, который используется как маркер пролиферации [45]. Согласно полученным данным, только стереотаксическая трансплантация физраствора усиливала пролиферацию клеток в СВЗ. Это можно расценить как ответ на травму от введения иглы и дополнительного объёма. Данные о том, что нейротравма усиливает пролиферацию, были неоднократно получены ранее [56].

5.4 Заключение

Работа по воздействию КС, полученных из регенерирующих сетчаток тритона, на клетки ARPE-19 человека, является первой в попытке обнаружить изменения дифференцировки этих клеток, в частности, в сторону нейронального пути развития. Полученные первые свидетельства о возможности с помощью КС уже в первые сутки культивирования индуцировать экспрессию пронейральных маркерных молекул требуют дальнейшего изучения, как и определение активных, действующих в этом направлении молекул «секретома» амфибий. Кроме того, данные о том, что в постнатальных клетках РПЭ *in vitro* процессы дедифференцировки и ЭМП идут параллельно, свидетельствуют о необходимости ЭМП для установки мультипотентности клеток РПЭ. Таким образом, данные дают основания для продолжения исследований по выявлению механизмов, блокирующих последующую дифференцировку в ретинальные клетки и активирующих дифференцировку в фибробластоподобные клетки.

В работе по трансплантации фетальной нервной ткани в составе желатин-гидрогелевого кондуита в перерезанный седалищный нерв показано, что желатин-гидрогелевый кондуит подходит для регенерации нервов. Мы показываем, что клетки фетального неокортекса могут выжить до 8 недель. Трансплантированные клетки дифференцируются в основном в глиальном направлении. Клетки фетального неокортекса в кондуите могут стимулировать функциональное восстановление после перерезки нерва. Можно предположить, что положительный эффект явился результатом паракринного воздействия астроцитов.

Результаты работы по трансплантации МСК из плаценты человека в мозг здоровой крысы показывают способность клеток мигрировать на довольно значительное расстояние от точки, в которой они оказались в момент введения. Возможность перемещения МСК и скорость зависят от особенностей ткани, в которой происходит миграция: если по мозолистому телу клетки перемещаются на значительные расстояния, то в стриатуме и коре практически остаются в месте введения, хотя и здесь они способны перемещаться и концентрироваться периваскулярно. При внутриартериальной трансплантации во внутреннюю сонную артерию незначительная часть трансплантированных МСК

задерживалась в просвете небольших артерий и капилляров мозга (от нескольких минут до 2 сут) и визуализировалась также в контакте с церебральными сосудами, однако с их внутренней стороны.

5.5 Список использованных источников

1. Сухнич К.К., Александрова М.А. Церебральные органоиды: модель развития мозга //Онтогенез. – 2020. – Т. 51. - № 4. - С. 275 – 291.
2. Ржанова Л.А., Кузнецова А.В., Александрова М.А. Репрограммирование дифференцированного ретинального пигментного эпителия млекопитающих и человека: современные достижения и перспективы//Онтогенез. – 2020. – Т. 51. - № 4. - С. 254 – 274.
3. Sparrow J.R., Hicks D., Hamel C.P. The retinal pigment epithelium in health and disease//Curr. Mol. Med. - 2010. - Vol. 10. - № 9. - P. 802 – 823.
4. Eguchi G. Cellular and molecular background of wolffian lens regeneration//Cell Differ. Dev. - 1988. - Vol. 25 Suppl. - P. 147 – 158.
5. Walsh N., Valter K., Stone J. Cellular and subcellular patterns of expression of bFGF and CNTF in the normal and light stressed adult rat retina//Exp. Eye Res. - 2001. - Vol. 72. - № 5. - P. 495 – 501.
6. Yafai Y., Iandiev I., Lange J., et al. Basic fibroblast growth factor contributes to a shift in the angioregulatory activity of retinal glial (müller) cells//PLoS One. - 2013. - Vol. 8. - № 7. - P. e68773.
7. Nagappan P.G.,Chen H., Wang D. Neuroregeneration and plasticity: a review of the physiological mechanisms for achieving functional recovery postinjury//Mil.Med.Res – 2020. - Vol.7 - №1.
8. Nelander J., Grealish S., Parmar M. Human foetal brain tissue as quality control when developing stem cells towards cell replacement therapy for neurological diseases//Neuroreport. - 2013. - Vol. 24. - № 18. - P. 1025 – 30.
9. Wei X., Yang X., Han Z., Qu F., Shao L., Shi Y. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy//Acta. Pharmacol. Sin. - 2013. - Vol.34. - № 6. - P.747 - 754.
10. Kuznetsova A. V., Rzhanova L.A., Kurinov A.M., Aleksandrova M.A. Effect of basic fibroblast growth factor on signaling pathways in adult human retinal pigment epithelial cells//Cell tissue biol. -2019b. - Vol. 13. - № 4. - P. 292 – 304.
11. Takeuchi A., Fukazawa S., Chida K., et al. Semi-automatic counting of connexin 32s immunolocalized in cultured fetal rat hepatocytes using image processing//Acta Histochem. - 2012. - Vol. 114. - № 4. - P. 318 – 326.

12. Shafei E. V., Kurinov A.M., Kuznetsova A. V., Aleksandrova M.A. Reprogramming of human retinal pigment epithelial cells under the effect of bFGF in vitro//Bull. Exp. Biol. Med. - 2017. - Vol. 163. - № 4. - P. 574 – 582.
13. Kuznetsova A. V., Kurinov A.M., Rzhanova L.A., Aleksandrova M.A. Mechanisms of dedifferentiation of adult human retinal pigment epithelial cells in vitro. Morphological and molecular genetic analysis//Cell tissue biol. - 2019a. - Vol. 13. - № 2. - P. 107 – 119.
14. Okabe M., Ikawa M., Kominami K., Nakanishi T., Nishimune Y. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells//FEBS Lett. - 1997. - Vol.407, - № 3. - P. 313 - 319.
15. Namestnikova D., Gubskiy I., Kholodenko I., Melnikov P., Sukhinich K., Gabashvili A., Vishnevskiy D., Soloveva A., Abakumov M., Vakhrushev I., Lupatov A., Chekhonin V., Gubsky L., Yarygin K. Methodological aspects of MRI of transplanted superparamagnetic iron oxide-labeled mesenchymal stem cells in live rat brain//PLoS One. - 2017. - Vol. 12, - № 10. ID e0186717. doi: 10.1371/journal.pone.0186717
16. 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.
17. Mueller R.L. Genome biology and the evolution of cell-size diversity//Cold Spring Harb. Perspect. Biol. - 2015. - Vol. 7. - № 11.
18. Wordinger R.J., Clark A.F. Bone morphogenetic proteins and their receptors in the eye//Exp. Biol. Med. (Maywood). - 2007. - Vol. 232. - № 8. - P. 979 – 992.
19. Cadigan K.M. TCFs and Wnt/ β -catenin Signaling//More than One Way to Throw the Switch. : Elsevier Inc., - 2012. - № 1. - P. 1 – 34.
20. Han J.W., Lyu J., Park Y.J., et al. Wnt/ β -catenin signaling mediates regeneration of retinal pigment epithelium after laser photocoagulation in mouse eye//Investig. Ophthalmol. Vis. Sci. - 2015. - Vol. 56. - № 13. - P. 8314 – 8324.
21. Bosada F.M., Devasthali V., Jones K.A., Stankunas K. Wnt/ β -catenin signaling enables developmental transitions during valvulogenesis//Dev. - 2016. - Vol. 143. - № 6. - P. 1041–1054.
22. Miyazono K. Transforming growth factor- β signaling in epithelial-mesenchymal transition and progression of cancer//Proc. Japan Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci. - 2009. - Vol. 85. - № 8. - P. 314 – 323.
23. Feist R.M., King J.L., Morris R., et al. Myofibroblast and extracellular matrix origins in proliferative vitreoretinopathy//Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. - 2014. - Vol. 252. - № 2. - P. 347 – 357.

24. Che D., Zhou T., Lan Y., et al. High glucose-induced epithelial-mesenchymal transition contributes to the upregulation of fibrogenic factors in retinal pigment epithelial cells//*Int. J. Mol. Med.* - 2016. - Vol. 38. - № 6. - P. 1815 – 1822.
25. Pieper F.R., Klundert F.A. Van de, Raats J.M., et al. Regulation of vimentin expression in cultured epithelial cells//*Eur. J. Biochem.* - 1992. - Vol. 210. - № 2. - P. 509 – 519.
26. Witzgall R., Brown D., Schwarz C., Bonventre J. V. Localization of proliferating cell nuclear antigen, vimentin, c-Fos, and clusterin in the postischemic kidney. Evidence for a heterogenous genetic response among nephron segments, and a large pool of mitotically active and dedifferentiated cells//*J. Clin. Invest.* - 1994. - Vol. 93. - № 5. - P. 2175 – 2188.
27. Salero E., Blenkinsop T.A., Corneo B., et al. Adult human RPE can be activated into a multipotent stem cell that produces mesenchymal derivatives//*Cell Stem Cell.* - 2012. - Vol. 10. - № 1. - P. 88 – 95.
28. Li S., Zhang H., Wang A., et al. Differentiation of adult human retinal pigment epithelial cells into dopaminergic-like cells in vitro and in the recipient monkey brain//*Mol. Med.* - 2019. - Vol. 25. - № 1. - P. 1 – 10.
29. Yasumuro H., Sakurai K., Toyama F., et al. Implications of a multi-step trigger of retinal regeneration in the adult newt//*Biomedicines.* - 2017. - Vol. 5. - № 2.
30. Di-Gregorio A., Sancho M., Stuckey D.W., et al. BMP signalling inhibits premature neural differentiation in the mouse embryo//*Development.* - 2007. - Vol. 134. - № 18. - P. 3359 – 3369.
31. McGann C.J., Odelberg S.J., Keating M.T. Mammalian myotube dedifferentiation induced by newt regeneration extract//*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 2001. - Vol. 98. - № 24. - P. 13699 – 13704.
32. Markitantova Y. V., Novikova Y.P., Poplinskaya V.A., Grigoryan E.N. Expression of FGF2 and Nucleostemin in models of retinal regeneration in the newt under conditions of 3D organotypic culture//*EC Ophthalmol.* - 2019. - Vol. 12. - P. 1 – 9.
33. Dorey K., Amaya E. FGF signalling: diverse roles during early vertebrate embryogenesis//*Development.* - 2013. - Vol. 137. - № 22. - P. 3731 – 3742.
34. Bharti K., Nguyen M.-T.T., Skuntz S., et al. The other pigment cell: specification and development of the pigmented epithelium of the vertebrate eye//*Pigment Cell Res.* - 2006. - Vol. 19. - № 5. - P. 380 – 394.
35. Mitsuda S., Yoshii C., Ikegami Y., Araki M. Tissue interaction between the retinal pigment epithelium and the choroid triggers retinal regeneration of the newt *Cynops pyrrhogaster*//*Dev. Biol.* - 2005. - Vol. 280. - № 1. - P. 122 – 132.

36. Li J., Zheng H., Yu F., et al. Deficiency of the Kruppel-like factor KLF4 correlates with increased cell proliferation and enhanced skin tumorigenesis//Carcinogenesis. - 2012. - Vol. 33. - № 6. - P. 1239–1246.
37. Qin S., Zhang C.-L. Role of Kruppel-like factor 4 in neurogenesis and radial neuronal migration in the developing cerebral cortex//Mol. Cell. Biol. - 2012. - Vol. 32. - № 21. - P. 4297 – 4305.
38. Alge C.S., Hauck S.M., Priglinger S.G., et al. Differential protein profiling of primary versus immortalized human RPE cells identifies expression patterns associated with cytoskeletal remodeling and cell survival//J. Proteome Res. - 2006. - Vol. 5. - № 4. - P. 862 – 878.
39. Chen X., Whitney E.M., Gao S.Y., Yang V.W. Transcriptional profiling of Kruppel-like factor 4 reveals a function in cell cycle regulation and epithelial differentiation//J. Mol. Biol. - 2003. - Vol. 326. -№ 3. - P. 665 – 77.
40. Tien Y.T., Chang M.H., Chu P.Y., et al. Downregulation of the KLF4 transcription factor inhibits the proliferation and migration of canine mammary tumor cells//Vet. J. - 2015. - Vol. 205. - № 2. - P. 244 – 253.
41. Shu B., Zhang M., Xie R., et al. BMP2, but not BMP4, is crucial for chondrocyte proliferation and maturation during endochondral bone development//J. Cell Sci. - 2011. - Vol. 124. - № 20. - P. 3428 – 3440.
42. Wang M.H., Zhou X.M., Zhang M.Y., et al. BMP2 promotes proliferation and invasion of nasopharyngeal carcinoma cells via mTORC1 pathway//Aging (Albany. NY). - 2017. - Vol.9. - № 4. - P. 1326 – 1340.
43. Kawesa S., Vanstone J., Tsilfidis C. A differential response to newt regeneration extract by C2C12 and primary mammalian muscle cells//Skelet. Muscle. -2015. - Vol. 5. - № 1. - P. 19.
44. Middleton R.C., Rogers R.G., Couto G. De, et al. Newt cells secrete extracellular vesicles with therapeutic bioactivity in mammalian cardiomyocytes//J. Extracell. Vesicles. - 2018. - Vol. 7. - № 1. - P. 1456888.
45. Xiong G, Ozaki N, Sugiura Y. Transplanted embryonic spinal tissue promotes severed sciatic nerve regeneration in rats//Arch. Histol. Cytol. - 2009. - Vol.72. - №2. - P. 127 – 138.
46. Ruven C, Li W, Li H, Wong WM, Wu W. Transplantation of embryonic spinal cord derived cells helps to prevent muscle atrophy after peripheral nerve injury//Int. J. Mol. Sci. - 2017. - Vol. 18. - № 3:E511.

47. Petrova ES. Neurons with different neurotransmitters in embryonic neocortical allografts in the rat sciatic nerve//Izv.Akad.Nauk.Ser. Biol. - 2016. - Vol.2. - P.128 – 135
48. Fricker RA, Kuiper JH, Gates MA. 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.
49. Sowa Y, Kishida T, Imura T, et al. Adipose-derived stem cells promote peripheral nerve regeneration in vivo without differentiation into schwann-like lineage//Plast. Reconstr. Surg. - 2016. - Vol. 137. 0 №2. - P. 318e – 330e.
50. Magami S, Miyamoto N, Ueno Y, et al. The effects of astrocyte and oligodendrocyte lineage cell interaction on white matter injury under chronic cerebral hypoperfusion//Neuroscience. - 2019. - Vol. 406. - P. 167 – 175.
51. Obernier K., Alvarez-Buylla A. Neural stem cells: origin, heterogeneity and regulation in the adult mammalian brain//Development. - 2019. - Vol. 146. - № 4. dev156059.
52. Coyne T.M., Marcus A.J., Woodbury D., Black I.B. Marrow stromal cells transplanted to the adult brain are rejected by an inflammatory response and transfer donor labels to host neurons and glia//Stem Cells. - 2006. - Vol. 24. - № 11. - P. 2483-2492.
53. Li J.M., Zhu H., Lu S., Liu Y., Li Q., Ravenscroft P., Xu Y.F., Huang L., Ma C.M., Bezard E., Zhao R.C., Wang R.Z., Qin C. Migration and differentiation of human mesenchymal stem cells in the normal rat brain// Neurol. Res. - 2011. - Vol. 33. - № 1. - P. 84 - 92.
54. McGinley L.M., Kashlan O.N., Chen K.S., Bruno E.S., Hayes J.M., Backus C., Feldman S., Kashlan B.N., Johe K., Feldman E.L. Human neural stem cell transplantation into the corpus callosum of Alzheimer's mice//Ann. Clin. Transl. Neurol. - 2017. - Vol. 4. - № 10. - P. 749 - 755.
55. Matsushita T., Kibayashi T., Katayama T., Yamashita Y., Suzuki S., Kawamata J., Honmou O., Minami M., Shimohama S. Mesenchymal stem cells transmigrate across brain microvascular endothelial cell monolayers through transiently formed inter-endothelial gaps//Neurosci. Lett. - 2011. - Vol. 502. - № 1. - P. 41 - 45.
56. Chang E.H., Adorjan I., Mundim M.V., Sun B., Dizon M.L., Szele F.G. Traumatic brain injury activation of the adult subventricular zone neurogenic niche // Front. Neurosci. - 2016. - Vol. 10. ID 332.

5.6 Отчетные публикации по разделу

1. **Shafei E.V.1, Rzhanova L.A.1, Novikova Y.P.1, Kurinov A.M.1, Grigoryan E.N.1, Aleksandrova M.A.1, Kuznetsova A.V.1** Response of human retinal pigment epithelial

cells to the effect of the conditioned media of newt retinal regenerates//Tsitologiya. – 2020. – Vol. 62. – Is. 9. – P. 638-653. DOI: 10.31857/S0041377120090060. - S

2. **Rzhanova L.A., Kuznetsova A.V., Aleksandrova M.A.** Reprogramming of differentiated mammalian and human retinal pigment epithelium: current achievements and prospects//Russian Journal of Developmental Biology. – 2020. – Vol. 51. – №. 4. – P. 212 – 230. DOI: 10.1134/S1062360420040062 – Q4.

3. **Sukhinich K.K.,** Namestnikova D.D., Gubskii I.L., Gabashvili A.N., Mel'nikov P.A., Vitushov E.Y., Vishnevskii D.A., Revkova V.A., Solov'eva A.A., Voitkovskaya K.S., Vakhrushev I.V., Burunova V.V., Berdalin A.B., **Aleksandrova M.A.**1, Chekhonin V.P., Gubskii L.V., Yarygin KN. Distribution and Migration of Human Placental Mesenchymal Stromal Cells in the Brain of Healthy Rats after Stereotaxic or Intra-Arterial Transplantation//Bull Exp Biol Med. – 2020. – Vol. 168. – Is. 4. – P. 542-551. DOI: 10.1007/s10517-020-04750-8. – Q4.

4. **Sukhinich K.K., Dashinimaev E.B., Vorotelyak E.A., Aleksandrova M.A.** Regenerative Effects and Development Patterns of Solid Neural Tissue Grafts Located in Gelatin Hydrogel Conduit for Treatment of Peripheral Nerve Injury//Plastic and Reconstructive Surgery – Global Open. – 2020. – Art: GOX-D-19-00596. DOI: 10.1097/GOX.0000000000002610. – Q4.

5. **Sukhinich K.K., Aleksandrova M.A.** Cerebral Organoids: A Model of Brain Development//Russian Journal of Developmental Biology. – 2020 – Vol. 51. – Is. 4. – P. 231 - 245. DOI: 10.1134/S1062360420040074. – Q4.

РАЗДЕЛ 6 БИОГЕНЕЗ ЯДЕРНЫХ СТРУКТУР

6.1 Введение

Возникновение механизма выборочного импорта ядерных белков, состоящих из комплексов ядерных пор и адапторных молекул, взаимодействующих с сигналами ядерной локализации (NLS), является одним из наиболее важных событий в эволюции эукариотических клеток. До сих пор механизм отбора этих белков, формирующих ядро, остается открытым.

В данной работе мы продемонстрировали, что участки нуклеотид-связывающих белков прокариот содержат мотивы, способные функционировать в качестве сигналов ядерной локализации. В ходе эволюции белки могли приобретать дополнительные домены, включающие в себя сигналы ядерной и ядрышковой локализации. Цитоплазматические белки могут содержать мотивы, способные функционировать в качестве сигналов ядерной локализации. Одним из механизмов функциональной инактивации таких мотивов может быть связывание белков цитоплазматическими структурами.

6.2 Материалы и методы

Белки человека, содержащие NLS, были собраны из NLSdb (<https://www.rostlab.org/services/nlsdb1/browse.php/>) и базы данных UniProt. Аннотации доменной структуры белка были получены из базы данных UniProt/Swiss-Prot.

Области между ближайшими аннотированными доменами анализировались как области вне домена. Ортологи белков человека с NLS были обнаружены в протеомах *Branchiostoma floridae*, *Danio rerio*, *Xenopus laevis*, *Pelodiscus sinensis* и *Gallus gallus* с использованием OrthoDB версии 10 (<https://www.orthodb.org/>).

Линия *Thermococcus sibiricus* любезно предоставлена Е.А. Бонч-Осмоловская. Геномная ДНК *Synechococcus sp.* и *Anabaena sp.* был предоставлен О.А. Кокшаровой и *Vibrio harveyi* Ю.В. Берцовой и А.В. Богачевым.

Гены, кодирующие целевые прокариотические белки, амплифицировали с помощью ПЦР из соответствующей геномной ДНК и вставляли в вектор pEGFP-C1 (Clontech). Мутировавшие гены прокариотических белков были получены с помощью сайт-направленного мутагенеза ПЦР. Двухцепочечные олигонуклеотиды, кодирующие предсказанные NLS прокариотических белков, вставляли в вектор pEGFP-C1 (Clontech). Фрагменты ДНК, кодирующие пептиды M9M и Vimax2, вставляли в вектор pTagRFP-C (Evrogen).

Культивирование. Клетки HeLa выращивали в среде с добавлением L-глутамина (Paneco), 10% фетальной телячьей сыворотки (HyClone) и раствора антибиотика/антимикотика (Gibco). Трансфекцию клеток выполняли с использованием реагента Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с инструкциями производителя. Изображения по меньшей мере 20 живых клеток HeLa, экспрессирующих слитые с EGFP белки, были получены в двух различных экспериментах с использованием конфокального лазерного сканирующего микроскопа Nikon C2. Отношение нуклеоплазматической концентрации EGFP к цитоплазматической концентрации EGFP (F_{nuc}/F_{cyt}) измеряли, как описано в литературе [10]. Статистический анализ и построение графиков выполняли с использованием Prism 6 (программа GraphPad).

Получение плазмид. hcTnI с SES-меткой (FGRKMDR), слитой с N- или C-концом молекулы hcTnI, использовали в качестве контроля для мониторинга стабильности hcTnI и в качестве индикатора экспрессии hcTnI. Фрагмент, кодирующий SES-метку, слитую с ORF hcTnI (UniProt P19429), был получен с помощью ПЦР и клонирован как фрагмент KpnI / NheI в вектор pcDNA6 / Myc-His A (Invitrogen) для генерации pcDNA6 / Myc-His A-Конструкции экспрессии SES-hcTnI и pcDNA6 / Myc-His A-hcTnI-SES.

Для создания плазмиды, кодирующей EGFP-hcTnI, ген hcTnI амплифицировали с помощью ПЦР с полимеразой Pfu (Thermo Scientific) из плазмиды pcDNA6 / Myc-His A-hcTnI-SES с использованием следующих олигонуклеотидов: '5-AGTCGTCGACTCATGATTCAAACCTTCTTCTTCCGTCCT TCC-3'. Продукты ПЦР расщепляли HindIII и SalI и клонировали в вектор pEGFP-C1 (Clontech). Набор для сайт-ориентированного мутагенеза с множественными мутациями Change-IT (Afymetrix) был использован для сайт-специфичного мутагенеза в соответствии с рекомендациями производителя.

Чтобы сконструировать плазмиду Lac-Z-EGFP, область, кодирующую β-галактозидазу (LacZ), амплифицировали с помощью ПЦР из плазмиды pCMV-LacZ со следующими олигонуклеотидами: 5'-АТАААААГСТТАТГТСГТТТТАСТТАТТГАССА АС'САССАГТ-3 '-АТАССАГАСТ-3'-АТАССАССАС-3' и 5'. Продукт ПЦР обрабатывали HindIII и BamHI и клонировали в вектор pEGFP-N1 (Clontech). Для конструирования плазмиды hcTnI-LacZ-EGFP мы использовали плазмиду FBL-LacZ-EGFP, которая была сконструирована ранее. Область, кодирующую hcTnI, амплифицировали из плазмиды EGFP-hcTnI с помощью ПЦР с использованием следующих праймеров: 5'-AGTCAGATCTGCCAC CATGGCTGATGGATCTAGCGATG-3' и 5'-AGTCGTCGACAATGATTC AAACCTTCTTCTTCCGT-3'. Продукты ПЦР обрабатывали

BglIII и SalI, очищали в геле и лигировали с плазмидой FBL-LacZEGFP, расщепленной BglIII и SalI. Последовательности всех конструкций проверяли секвенированием.

Получение и трансдукция лентивирусов. Клетки HEK 293 котрансфицировали созданной конструкцией лентивектора, кодирующей FBL-FLAG, и упаковывающими лентивирус плазидами с использованием реагента Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) в соответствии с инструкциями производителя. Через 48 часов после трансфекции супернатант, содержащий лентивирусы, собирали, фильтровали через фильтр 0,2 мкм и немедленно использовали для заражения реципиентных клеток HeLa. Для повышения эффективности трансдукции в среду с псевдовиральными частицами добавляли полибрен (8 мкг / мл). После заражения клетки отбирали пурамицином (1 мкг / мл).

ПЦР. Методом горячей экстракции формамидом выделяли РНК из дрожжевых клеток. Качество и количество РНК измеряли с помощью NanoPhotometer (Implen, Мюнхен, Германия). Образцы обрабатывали ДНКазой I (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Синтез первой цепи кДНК проводили с 1 мкг общей РНК с использованием набора iScript cDNA Synthesis (BioRad, Hercules, CA, USA) в соответствии с инструкциями производителя. ПЦР выполняли в термоциклере T100 (BioRad, Hercules, Калифорния, США) с использованием смеси Phusion Hot Start II High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) и праймеров, представленных в таблице S1.

Электрофорез продуктов ПЦР проводили в 1,5% агарозном геле. Гели визуализировали в системе ChemiDoc Gel Imaging System (BioRad, Hercules, CA, USA).

6.3 Результаты и обсуждение

Полученные в 2020 году результаты можно разделить на три блока.

6.3.1 Возникновение сигналов ядерной локализации (NLS) в ходе эволюции.

Возникновение системы специфического импорта белков в ядро, состоящей из комплексов ядерных пор и адапторных молекул, взаимодействующих с сигналами ядерной локализации (NLS), является одним из наиболее важных событий в эволюции эукариотических клеток. До сих пор общие принципы формирования этой сложной многокомпонентной системы и механизмы отбора белков, формирующих ядро, остаются неизученными.

Для выявления возможных механизмов происхождения NLS мы проанализировали данные о локализации NLS относительно белковых доменов у современных организмов. Примерно 45% всех NLS перекрываются с различными аннотированными доменами (19% с нуклеотид-связывающими доменами и 26% с доменами, участвующими во

взаимодействиях белок-белок); остальные 55% NLS локализируются вне аннотированных доменов. Большинство (примерно около 77%) нуклеотид-связывающих доменов, перекрывающихся с NLS, аннотированы как ДНК-связывающие домены (рисунок 6.1).

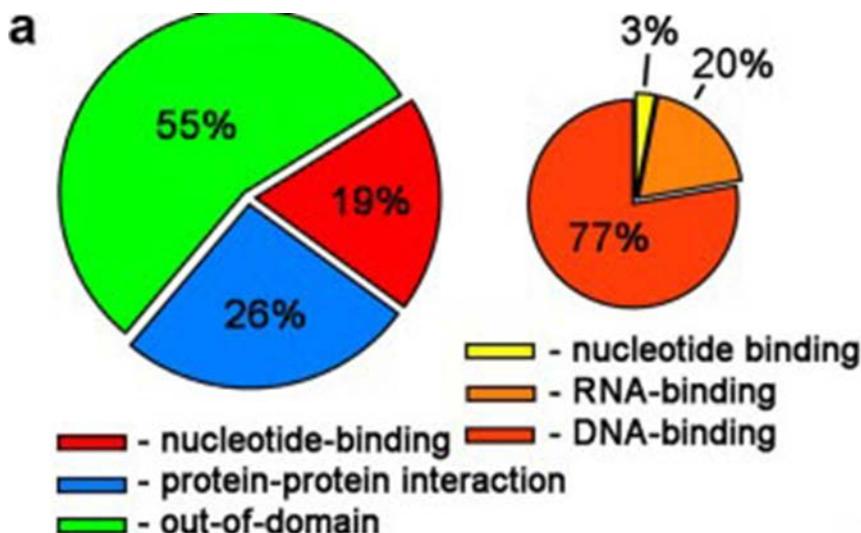


Рисунок 6.1 - Распределение NLS в зависимости от их локализации в белковых последовательностях относительно аннотированных белковых доменов

Мы выдвинули гипотезу о существовании эволюционной связи между NLS и доменами. Сравнение рассчитанного распределения IC в трех группах NLS показало, что NLS, перекрывающие аннотированные домены (как нуклеотид-связывающие домены, так и домены, участвующие во взаимодействиях белок-белок), более консервативны, чем NLS, расположенные вне аннотированных доменов. Примерно, половина всех NLS, перекрывающих нуклеотид-связывающие домены, имеет ту же степень консервативности, что и соответствующие домены (для 51% NLS это соотношение находится в интервале 0,9-1,1). Эти NLS интегрированы в нуклеотид-связывающие домены, и их эволюция может зависеть от эволюции доменов.

NLS - это короткие и структурно простые последовательности. Например, «классический» NLS имеет вырожденную консенсусную последовательность K(K/R)X(K/R) [1]. Поскольку нуклеотидсвязывающие домены обогащены положительно заряженными аминокислотами, случайное появление таких NLS в таких доменах кажется вероятным. Поскольку подобные нуклеотид-связывающие домены могут быть обнаружены в прокариотических белках, кажется вероятным, что эти домены уже содержат последовательности, которые потенциально функционируют как NLS. Если это предположение верно, то такие прокариотические белки будут накапливаться внутри ядер после экспрессии в эукариотических клетках.

Для проверки этой гипотезы мы клонировали 12 прокариотических белков, в составе которых предсказываются NLS. Шесть из этих двенадцати белков накапливались в ядре при экспрессии в клетках человека (в контрольной выборке белков без предсказываемых NLS из 15 белков только один накапливался – причем слабо – в ядре). Замена всех положительно заряженных аминокислот в каждом предсказанном NLS на аланин уменьшала накопление в ядре (F_{nuc} / F_{cyt}) всех белков, которые были классифицированы как накопленные внутри ядер (рисунок 6.2).

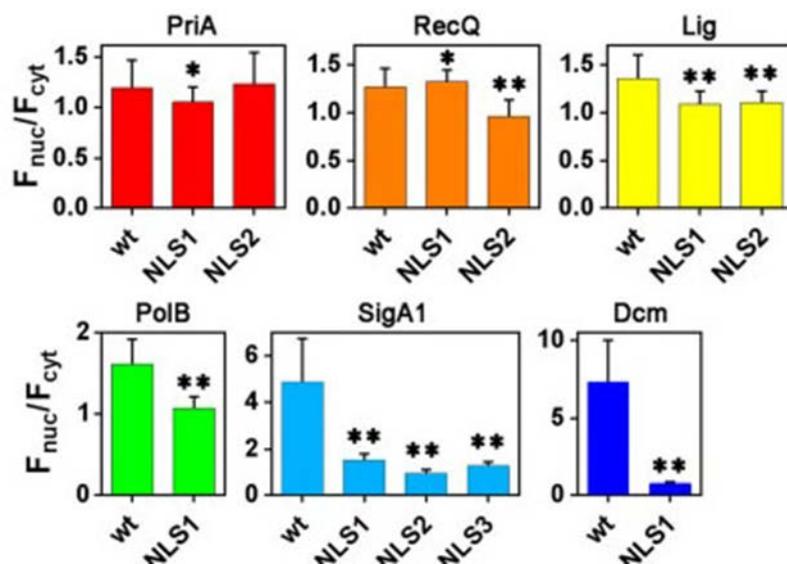


Рисунок 6.2 - Мутации в предсказанных NLS влияют на ядерное накопление (F_{nuc}/F_{cyt}) прокариотических белков

Каждое значение представляет собой среднее значение \pm стандартное отклонение. ($n > 20$).
одинарная звездочка: $p < 0,05$, двойная звездочка: $p < 0,0001$, критерий Манна-Уитни.

Таким образом, проведенный биоинформатический анализ показал, что функционально активные NLS могут быть интегрированы в нуклеотид-связывающие домены, как эукариотических, так и прокариотических белков и могут совместно эволюционировать с этими доменами. Присутствие последовательностей, подобных NLS, в ДНК-связывающих доменах прокариотических белков было подтверждено экспериментально. Эти сигнальные последовательности могли создавать преимущество для накопления этих белков в ядрах во время эволюции ядерно-цитоплазматического барьера, влияя на то, какие белки накапливались и становились компартментализованными внутри формирующегося ядра (т.е. содержание ядерного протеома).

По материалам этого исследования опубликована статья [2].

6.3.2 Сигналы ядерной локализации (NLS) в цитоплазматических белках

Накопление белков в ядре может зависеть от присутствия коротких последовательностей, которые известны как сигналы ядерной локализации (NLS). Выше представлены данные о том, что домены белков, обогащенные положительно заряженными аминокислотами, могут содержать мотивы, способные функционировать в качестве NLS. Мы предположили, что такие мотивы могли послужить основой для эволюции NLS. Однако такие мотивы есть и в цитоплазматических белках, что противоречит нашей гипотезе. Для определения наличия NLS в белках с различными клеточными локализациями мы использовали два набора данных, которые содержали цитозольные и нуклеоплазматические белки, извлеченные из базы данных UniProtKB (295 и 300 белков, соответственно). NLS были идентифицированы в 68% ядерных белках и, что удивительно, в 52% цитозольных белках.

Среди небольших белков (<40 кДа) доля белков с предсказанными NLS была одинаковой как для цитозольных, так и для нуклеоплазматических белков. Напротив, среди белков с молекулярной массой более 40 кДа доля белков с NLS была значительно больше для нуклеоплазматических белков, что указывает на то, что естественный отбор облегчает приобретение NLS в крупных ядерных белках.

Анализ показал, что доля цитоплазматических белков с предсказанным NLS относительно высока, и эти цитоплазматические белки могут потенциально накапливаться внутри ядер. Чтобы исследовать способность NLS-содержащих цитоплазматических белков переноситься в ядро, мы проанализировали ядерное накопление цитоплазматического белка сердечного тропонина I (hcTnI), накопление которого было выявлено внутри ядер при определенных условиях [3, 4].

Мы использовали иммунофлуоресценцию для анализа локализации тропонина I (сTnI) в кардиомиоцитах. Мышиный сTnI (mcTnI) был локализован в миофибрилах, но не был обнаружен внутри ядер на иммунологически определяемом уровне.

Чтобы исследовать локализацию hcTnI, экспрессируемого в различных культивируемых клетках, мы использовали hcTnI, слитый с EGFP (EGFP-hcTnI). EGFP-hcTnI накапливается преимущественно внутри ядер недифференцированных миобластов C2C12. Также мы проанализировали локализацию hcTnI, экспрессируемого в клетках HeLa, с использованием моноклональных антител, специфичных к различным эпитопам в молекуле hcTnI. Все использованные антитела выявляли hcTnI с предпочтительной локализацией внутри ядер, что указывает на то, что полноразмерный белок накапливается внутри ядер.

Чтобы определить возможный механизм ядерного импорта hcTnI, мы проанализировали локализацию hcTnI, слитого с большим белком без NLS- β -галактозидазы (LacZ) (MW>100 кДа). hcTnI-LacZ-EGFP накапливается внутри ядер большинства трансфицированных клеток, но не накапливался внутри ядрышек. Таким образом, накопление hcTnI в ядре, вероятно, опосредовано NLS.

С помощью PSORT II мы определили шесть классических NLS внутри hcTnI, некоторые из которых перекрывались друг с другом. Важно, что все предсказанные NLS были расположены внутри консервативных областей белка.

Чтобы проверить данные по PSORT II, мы проанализировали предполагаемые NLS в hcTnI с использованием сайт-направленного мутагенеза. Кроме того, мы проанализировали накопление в ядрышках мутированного hcTnI и обнаружили, что одни и те же области ответственны за накопление ядрышек и что они также действуют синергетически.

Небольшие белки могут легко проникать в комплексы ядерных пор и, следовательно, перемещаться между цитоплазмой и ядром. Мы проанализировали способность hcTnI подвергаться такому перемещению с помощью анализа слияния клеток, в котором живые клетки HeLa, трансфицированные EGFP-hcTnI, были слиты с нетрансфицированными PEG [4] клетками. Анализ показал, что hcTnI может проходить через комплексы ядерных пор путем пассивной диффузии, которая должна приводить к приблизительно равномерному распределению белка по клетке.

Однако диффузия не может привести к накоплению в ядре hcTnI, что, очевидно, зависело от присутствия NLS. Чтобы выяснить, является ли накопление hcTnI в ядре результатом активного, NLS-зависимого ядерного импорта, мы исследовали влияние истощения пула АТФ на локализацию EGFP-hcTnI внутри клеток HeLa. Кроме того, мы определили ядерное и ядрышковое накопление EGFP-hcTnI в клеточной популяции до и после истощения АТФ. Эксперименты показали, что накопление в ядре, действительно, происходит благодаря активному (энергозависимому) механизму.

Ядерный импорт белков, содержащих классические NLS, зависит от взаимодействия последовательности NLS с кариоферином- α и последующего взаимодействия кариоферина- α с адаптерной молекулой кариоферин- β [6,7]. Мы использовали ингибиторы Vimax2 [8] и M9M [9], которые связываются *in vivo* с кариоферином- α и кариоферином- β 2 соответственно.

Из полученных нами ранее данных следует, что cTnI может быть локализован либо в цитоплазматических миофибриллах в дифференцированных кардиомиоцитах, либо в ядрах недифференцированных культивируемых мышечных или неммышечных клеток. Мы

проверили гипотезу о том, что дифференциация приводит к перемещению cThI из ядра в цитоплазму.

Нами было показано, что hcTnI постепенно менял свою локализацию с ядерной на цитоплазматическую во время дифференциации клеток C2C12.

Таким образом, динамическое удержание белков внутри цитоплазматических структур может приводить к переключению между ядерной и цитоплазматической локализацией.

По материалам этого исследования опубликована статья [10].

6.3.3 Формирование сигнала ядерной локализации (NLS) путем приобретения нового домена (на примере фибрилларина, FBL)

Выше мы описали ситуации, когда NLS интегрирован в состав каких-либо доменов, т.е. ситуацию, когда NLS могут предсуществовать в белках прокариот. Однако некоторые белки, которые должны были приобрести ядерную локализацию после возникновения ядра, могли не иметь таких доменов. Логично предположить, что такие белки приобретали дополнительные домены в ходе эволюции, которые содержали NLS и, таким образом, адаптировали белок к функционированию в составе эукариотической клетки. Мы провели поиск белков с такими свойствами и остановили свое внимание на белке фибрилларине. Фибрилларин (FBL) является важным ядрышковым белком, который участвует в метилировании пре-rРНК и гистонов. Метилтрансферазный домен FBL является примером чрезвычайно консервативного белкового домена, в котором аминокислотная последовательность существенно не изменилась в процессе эволюции от архей до эукариот. Дополнительный N-концевой глицин-аргинин-богатый (GAR) домен присутствует в FBL эукариот. Мы продемонстрировали, что GAR домен участвует в функционировании FBL и интегрирует функции сигнала ядерной локализации (NLS) и сигнала ядрышковой локализации (NoLS). Метилирование остатков аргинина в GAR домене необходимо для ядерного импорта, но снижает эффективность удерживания ядрышек через NoLS. Представленные нами данные показывают, что домен GAR можно рассматривать как эволюционную инновацию, которая объединяет несколько функциональных активностей и, таким образом, адаптирует FBL к высоко компартментализированному содержимому эукариотической клетки.

По материалам этого исследования опубликована статья [11].

6.4 Заключение

1. Участки нуклеотид-связывающих белков прокариот содержат мотивы, способные функционировать в качестве сигналов ядерной локализации. Вероятно, существование

таких мотивов в белках прокариот послужило предпосылкой для происхождения данного типа сигналов и для селекции белков ядерного протеома в ходе происхождения эукариотической клетки.

2. Цитоплазматические белки могут содержать мотивы, способные функционировать в качестве сигналов ядерной локализации. Одним из механизмов функциональной инактивации таких мотивов может быть связывание белков цитоплазматическими структурами.

3. В ходе эволюции белки могли приобретать дополнительные домены, включающие в себя сигналы ядерной и ядрышковой локализации.

6.5 Список использованных источников

1. Chelsky D., Ralph R., Jonak G. Sequence requirements for synthetic peptide-mediated translocation to the nucleus//Mol Cell Biol. – 1989. - Vol. 9. – P. 2487 – 2492. doi: 10.1128/MCB.9.6.2487.
2. Lisitsyna O.M., Kurnaeva M.A., Arifulin E.A., Shubina M.Y., Musinova Y.R., Mironov A.A., Sheval E.V. Origin of the nuclear proteome on the basis of pre-existing nuclear localization signals in prokaryotic proteins//Biology Direct. – 2020. – Vol. 15. – Is. 1. 28 – P. 9. DOI: 10.1186/s13062-020-00263-6.
3. Johnston J.R., Chase P.B., Pinto J.R. Troponin through the looking-glass: emerging roles beyond regulation of striated muscle contraction//Oncotarget. – 2018. - Vol. 9. – P. 1461 – 1482.
4. Bergmann O., Bhardwaj R.D., Bernard S., Zdunek S., Barnabé-Heider F., Walsh S., et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans// Science. – 2009. - Vol. 324. – P. 98 – 102.
5. Afonina E., Stauber R., Pavlakis G.N. The human poly(A)-binding protein 1 shuttles between the nucleus and the cytoplasm//J. Biol. Chem. – 1998. - Vol. 273. – P. 13015 – 1302.
6. Lange A., Mills R.E., Lange C.J., Stewart M., Devine S.E., Corbett A.H. Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha//J. Biol. Chem. – 2007. - Vol. 282. – P. 5101 – 5105.
7. Marfori M., Mynott A., Ellis J.J., Mehdi A.M., Saunders N.F.W., Curmi P.M., et al. Molecular basis for specificity of nuclear import and prediction of nuclear localization//Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res. – 2011. - Vol. 1813. – P. 1562 – 1577.

8. Kosugi S., Hasebe M., Entani T., Takayama S., Tomita M., Yanagawa H. Design of peptide inhibitors for the importin alpha/beta nuclear import pathway by activitybased profiling// Chem. Biol. – 2008. - Vol. 15. – P. 940 – 949.

9. Cansizoglu A.E., Lee B.J., Zhang Z.C., Fontoura B.M.A., Chook Y.M. Structurebased design of a pathway-specific nuclear import inhibitor//Nat. Struct. Mol. Biol. – 2007. - Vol. 14. – P. 452 – 454.

10. Kharitonov A.V., Shubina M.Y., Nosov G.A., Musinova Y.R.3, Sheval E.V. Switching of cardiac troponin I between nuclear and cytoplasmic localization during muscle differentiation//Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research. – 2020. – Vol. 1867(2). – 118601. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2019.118601.

11. Shubina M.Y., Arifulin E.A., Sorokin D.V., Sosina M.A., Tikhomirova M.A., Serebryakova M.V., Smirnova T., Sokolov S.S., Musinova Y.R.3, Sheval E.V. The GAR domain integrates functions that are necessary for the proper localization of fibrillarin (FBL) inside eukaryotic cells//PeerJ. – 2020. – Vol. 8: – e9029. DOI: 10.7717/peerj.9029. eCollection 2020.

6.6 Отчетные публикации по разделу

1. Kharitonov A.V., Shubina M.Y., Nosov G.A., **Musinova Y.R.**, Sheval E.V. Switching of cardiac troponin I between nuclear and cytoplasmic localization during muscle differentiation//Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research. – 2020. – Vol. 1867(2). – 118601. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2019.118601.– Q2.

2. Lisitsyna O.M., Kurnaeva M.A., Arifulin E.A., Shubina M.Y., **Musinova Y.R.**, Mironov A.A., Sheval E.V. Origin of the nuclear proteome on the basis of pre-existing nuclear localization signals in prokaryotic proteins//Biology Direct. – 2020. – Vol. 15. – Is. 1. 28 – P. 9. DOI: 10.1186/s13062-020-00263-6. – Q1.

3. Shubina M.Y., Arifulin E.A., Sorokin D.V., **Sosina M.A.**, **Tikhomirova M.A.**, Serebryakova M.V., Smirnova T., Sokolov S.S., **Musinova Y.R.**, Sheval E.V. The GAR domain integrates functions that are necessary for the proper localization of fibrillarin (FBL) inside eukaryotic cells//PeerJ. – 2020. – Vol. 8: – e9029. DOI: 10.7717/peerj.9029. eCollection 2020. – Q2.

РАЗДЕЛ 7. ИЗУЧЕНИЕ ЦИТОЛОГИЧЕСКИХ, БИОХИМИЧЕСКИХ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ ПРЯМЫХ МЕЖКЛЕТОЧНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

7.1 Введение

Система гемостаза участвует в развитии, регуляции и исходе многих патологических процессов, сопряженных с воспалением. К ним относятся заболевания сердечно-сосудистой системы - инфаркт, ишемия, атеросклероз, атеротромбоз, а также инсульт, сепсис, перитонит и др. Ключевые сериновые протеазы гемостаза: тромбин и протеин С в активированной форме (АПС) - сигнальные молекулы, контролирующие свертывание крови и процессы воспаления, регенерации тканей, нейродегенерации и ряд других. Эти ферменты, взаимодействуя с рецепторами, активируемыми протеазами (ПАР), расщепляют экзодомен рецептора и освобождают новую аминокислотную последовательность - «привязанный лиганд», который активирует рецептор и индуцирует множество сигнальных путей и ответов клеток. В отличие от тромбина АПС, наряду с хорошо изученной антикоагулянтной активностью, проявляет также цитопротекторную, в том числе нейропротекторную, демонстрирует анти-воспалительные и анти-апоптотические свойства и стабилизирует барьерные функции эндотелия [1-5]. Регенеративные свойства АПС проявляются в стимуляции заживления ран и язв, а также нейрогенеза и ангиогенеза [6-9]. Взаимодействуя с одним и тем же рецептором тромбин и АПС оказывают разнонаправленное действие при экзосайтотоксичности и воспалении. Уникальный механизм активации ПАР позволяет применять пептидные аналоги «привязанного лиганда» в качестве агонистов рецепторов [10 - 12]. В настоящей работе мы использовали пептид из девяти аминокислот (АП9, NPNDKYEPF-NH₂), который имитирует N-конец PAR1, начинающийся с остатка Asn 47 и генерируемый расщеплением АПС по Arg 46. Защитные эффекты АП9 через активацию PAR1 были подтверждены *in vitro* с использованием первичных культур нейронов, тучных клеток [13, 14] и кератиноцитов человека [6]. Более того, ранее было показано, что другой пептидный агонист PAR1, TR47, который также образовался после расщепления PAR1 по Arg 46, демонстрирует общий профиль активности АПС [12]. Взятые вместе, эти данные позволяют предположить, что АП9 будет демонстрировать АПС-подобные защитные свойства

Агонистами ПАР могут быть синтетические пептиды с аминокислотной последовательностью, соответствующей «привязанному» лиганду, освобождаемому при расщеплении рецептора протеазой и имеющие разные последовательности при

расщеплении тромбином или АПС. Продолжается активный поиск средств, обладающих противовоспалительными и цитопротекторными свойствами, способных защищать клетки иммунной и нервной систем организма от гибели, стабилизировать барьерные функции эндотелия и ГЭБ, ускорять процесс регенерации тканей, в том числе нервной, после повреждения [15]. Агонисты ПАР, в том числе и синтетические пептиды, могут быть перспективными регуляторами воспаления.

Цель: исследовать противовоспалительное и цитопротекторное действие неканонического синтетического пептида-агониста ПАР1 при ишемии и воспалении, а также продолжить исследования пептидов семакс и HLDF-6 для коррекции ритмов синтеза белка и прямых межклеточных взаимодействий.

7.2 Материалы и методы

7.2.1 *Клеточная культура.* В работе использовали культивируемые аналоги тучных клеток – клетки линии RBL-2H3. Данные клетки экспрессируют рецепторы FcεRI и способны секретировать гистамин. Клетки обладают способностью к дегрануляции ряда веществ, связанных с иммунными реакциями. Клетки выращивали на культуральных флаконах 25 см² в среде α-MEM, содержащей 0.5 mM L-глутамин, 10% FBS и 100 ед/мл пенициллина/стрептомицина. Пассирование клеток осуществляли с использованием раствора Версена и 0.05% трипсина-EDTA 1 раз в 3 дня. Для экспериментов клетки культивировали на 96- и 48-луночных планшетах (по 5 × 10⁴ и 8 × 10⁴ клеток/луночка соответственно) или на чашках Петри Glass Bottom (MatTek, США) (по 8 × 10⁴ клеток/стекло) при 37°C и 5% CO₂. Воздействия исследуемыми веществами осуществляли через 24 ч после нанесения клеточной суспензии на культуральные планшеты или чашки Петри.

7.2.2 *MTT-тест.* Для оценки пролиферации или выживаемости клеток использовали MTT-тест. Водный раствор MTT добавляли в культуральную среду до конечной концентрации 0.5 мг/мл и инкубировали клетки 2 ч при 37°C, 5% CO₂. Кристаллы формазанов растворяли DMSO (Sigma). Оптическую плотность измеряли на фотометре iMark (Bio-Rad) при 530 нм. Оценивали результаты в процентах по отношению к контролю.

7.2.3 *Иммуногистохимический анализ.* Анализ экспрессии белков NSE, c-fos, ERK1/2, MAP2, NOTCH1 в нейронах коры головного мозга проводили на срезах головного мозга человека после ишемического инсульта. Материалом для исследования были образцы ткани головного мозга (поля 1–8 по Бродману) 9 пациентов, умерших в стационаре в срок от 2 до 6 сут после развития ИИ в бассейне левой средней мозговой

артерии. Контрольные образцы были получены от людей, погибших в результате несчастного случая (3 человека). Забор материала человека одобрен в рамках исследования «Закономерности изменения механизмов регуляции апоптоза нейронов в остром периоде ишемического инсульта» Межвузовским комитетом по этике, выписка из протокола заседания от 26.09.2019 №08-19. Ткани мозга человека фиксировали в 10% забуференном формалине, после отмывки от фиксатора проводили стандартную гистологическую обработку, заключали в парафин и делали срезы толщиной 5 мкм. Выявление таргетных белков проводили непрямым иммунопероксидазным иммуногистохимическим методом. Использовали моноклональные антитела к указанным белкам человека (Vision biosystems novocastra) и систему для пероксидазной детекции. Ядра клеток докрашивали гематоксилином Майера. Визуальную оценку и морфометрический анализ срезов проводили на семи неперекрывающихся полях зрения каждой из трех зон (1- зона, прилежащая к очагу некроза; 2 – зона, отдаленная от предыдущей зоны на 4-7 см; 3 – зона контрлатерального полушария, симметричной очагу инсульта).

7.2.4 *Эксперименты in vivo*. В экспериментах использовали самцов мышей массой 25-28 г в возрасте 4-5 мес. Животные содержались в стандартных условиях (температура 22°C, световой день – 12 ч) без ограничения доступа к воде и корму. Протоколы экспериментов на мышах были одобрены комитетом по биоэтике МГУ им.М. В. Ломоносова (протокол № 2018-10-25-93-0-3).

Фотоиндуцированная ишемия. Индукция ишемии осуществлялась посредством фототромбоза [16] сенсомоторной области коры левого полушария (лазерный луч фокусировали на 2,2 мм латеральнее точки bregma [17]). Для анестезии использовали смесь коммерческих препаратов «Золетил100» (Virbac Sante Animale, Франция) и «Ксила» (Interchemie werken «De Adelaar» B.V., Нидерланды) в дозах 35 и 3,5 мг/кг (в/б), соответственно. В качестве фотосенсибилизатора был выбран бенгальский розовый (Sigma Aldrich, США) в дозе 10 мг/кг, вводимый в/в посредством вживленного в яремную вену животного катетера. Тромбоз индуцировали с помощью лазерной установки ($\lambda=532$ нм, диаметр светового пучка – 3 мм, Viacho, Китай) путем освещения поверхности черепа (освещенность – 50 лк) в течение 5 мин.

Оценка неврологического статуса. Сенсомоторный дефицит определяли с помощью теста «Решетка» [18]. До и через 24 ч после индукции фототромбоза животное помещали на поверхность решетки и с помощью видеорегистратора в течение 5 мин фиксировали число случаев свободного проскальзывания конечностей в ячейки (моторные ошибки). Данный показатель для учета общей двигательной активности

животного нормировали на 100 шагов, сделанных задней ипсилатеральной поврежденному полушарию конечностью.

МРТ-метод. Прижизненная визуализация ишемического очага была выполнена методом магнито-резонансной томографии (МРТ) с использованием 7 Т томографа (BioSpec 70/30 USR, Германия) на основе T2-взвешенных изображений.

Метод окрашивания хлоридом 2,3,5-трифенилтетразолия (ТТС). Оценку объема поражения головного мозга через 24 часа после вызванной ишемии проводили с помощью окрашивания секций мозга толщиной 1 мм 1% раствором ТТС (Sigma Aldrich, США) на фосфатно-солевом буфере по стандартной методике [19]. Измерение площади ишемического очага, а также площадей каждого полушария для дальнейшего вычисления объема поражения [20] осуществлялось с помощью программы ImageJ (НИН, США).

Измерение проницаемости ГЭБ и визуализация распределения синего Эванса в мозге. Краситель Evans blue (Sigma, США) вводили внутривенно через катетер сразу после облучения (80 мг / кг, 2,2% раствор). Через 24 часа после ФТ мышам выполняли транскардиальную перфузию либо гепаринизированным PBS (40 единиц / мл) для дальнейшей экстракции красителя (n = 5 для контрольной группы и n = 21 для ишемических животных), либо гепаринизированным PBS и 10% забуференным формалином для приготовления срезов. Для оценки проницаемости ГЭБ экстракцию красителя и определение его содержания в обоих полушариях проводили в формалине при 37°C 48. Данные выражены в мкг на 100 мг ткани мозга.

Через 24 ч после постфиксации мозга с помощью микротомы с вибрирующими лезвиями Leica VT-1200S (Leica Biosystems, Германия) готовили срезы размером 100 мкм для визуализации распределения синего красителя Эванса в головном мозге. Расстояние между срезами составляло 200 мкм. Ядра окрашивали DAPI. С помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 710 (Zeiss, Германия) флуоресцентный сигнал (λ_{ex} = 555 нм для Evans blue, λ_{ex} = 405 нм для DAPI). Реконструкция фрагмента разреза выполнена с помощью программы ImageJ. Трехмерная реконструкция головного мозга была получена в программе Adobe Photoshop CC (Adobe, США) с коррекцией яркости и контрастности (не более 20% от исходных значений).

Гистологический анализ. Животным проводили транскардиальную перфузию (PBS и 10% раствор формалина) через 24 часа после ФТ. Головной мозг удаляли, фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине в течение 24 часов, заливали парафином и разрезали на срезы размером 5 мкм, окрашенные гематоксилином и эозином. Для каждого животного оценку нейронов с нормальной морфологией проводили на двух участках центральной части поражения, расположенных друг от друга не менее чем на 200 мкм.

Клетки подсчитывали в четырех неперекрывающихся полях (300×220 мкм) каждого среза как в ИН, так и в СН. Поля зрения равномерно покрывали область полутени и располагались на внешней границе ишемического ядра в поврежденном полушарии. В СН мы выбрали зеркальные области коры для подсчета клеток. Данные усреднены для каждого животного и представлены в виде относительного количества нейронов с нормальной морфологией в полутени (аналогичные показатели в СН приняты за 100%) ($n = 12$).

Иммуногистологическое окрашивание проводили в соответствии с протоколом производителя для реагента ImmPRESS (Vector Laboratories). Вкратце, срезы головного мозга животных депарафинизировали и гидратировали с помощью ксилолов и градуированного спирта. Эндогенную пероксидазную активность блокировали инкубацией в BLOXALL Blocking Solution (Vector Laboratories, Калифорния) в течение 15 мин. Для блокирования неспецифического связывания антител срезы инкубировали в течение 20 мин с 2,5% нормальной блокирующей сывороткой лошади. Затем срезы инкубировали в течение ночи при 4°C с первичным антителом против NeuN (ABN78, Millipore), промывали PBS и инкубировали 30 мин с реагентом ImmPRESS. Субстрат пероксидазы ImmPACT DAB (Vector Laboratories) и контрастный краситель гематоксилин использовали для визуализации связанных антител. NeuN-положительные клетки, а также клетки с нейрональной морфологией подсчитывали в сенсомоторной коре головного мозга. Данные представлены в виде количества клеток на 1 мм^2 . У одного и того же животного было обработано одиннадцать полей зрения срезов мозга.

Статистическая обработка. Анализ данных производили в программе GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., США). Данные представлены как сред. арифм. \pm стандарт.ошибка, различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Количество культур астроцитов для каждого воздействия было не менее 7 шт., число животных в экспериментах *in vivo* составляло 8 особей в группе. Используемые статистические критерии указаны отдельно под соответствующими рисунками. Нормальное распределения данных было подтверждено критерием Шапиро-Уилка.

7.3 Результаты и обсуждение

7.3.1. Характеристика ишемии головного мозга, вызванного фототромбозом.

Известны различные модели ишемического инсульта, основанные на различных методах ограничения мозгового кровотока. Модель фокальной ишемии, вызванная фототромбозом (ФТ), характеризуется низкой инвазивностью и обеспечивает высокую

воспроизводимость объема повреждения и точную локализацию области поражения в коре головного мозга [21, 22].

Мы сравнили два метода: магнитно-резонансная томография и окрашивание срезов головного мозга хлоридом 2,3,5-трифенилтетразолия (ТТС), для определения объема поражения, вызванного ФТ. Оба метода обеспечили точную визуализацию поражения (рисунок 7.1).

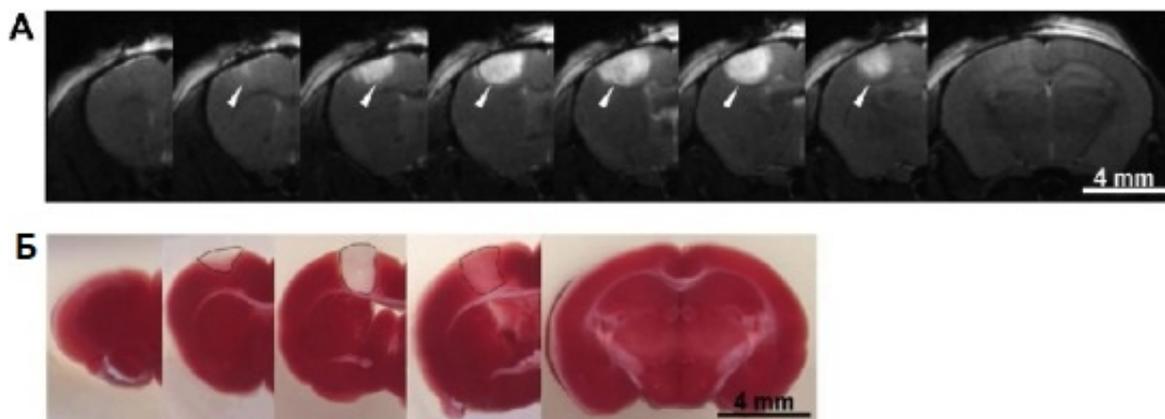


Рисунок 7.1 - Повреждение мозга через 24 ч после ишемии, вызванной ПТ
А - визуализация очага поражения с помощью МРТ (поврежденные участки отмечены треугольниками); Б - срезы мозга, окрашенные ТТС (границы поражения обведены линией).

Мы выявили значимую корреляцию между объемом повреждения, оцененным с помощью МРТ и окрашивания ТТС ($r = 0,84$). Примечательно, что столь высокое значение коэффициента корреляции было получено при относительно небольшом изменении объема повреждения (4,5–7,6 мм³ для МРТ и 4,3–9,3 мм³ для окрашивания ТТС).

Для анализа нарушения ГЭБ при ФТ мы использовали витальный краситель Эванса (Evans blue), который вводили в системный кровоток. Анализ распределения красителя Эванса выявил его диффузную локализацию внутри клеток с нарушенной плазматической мембраной, а также во внеклеточном пространстве в полутени (рисунок 7.2). В удаленных регионах поврежденного полушария краситель был обнаружен во внутриклеточных гранулах клеток, расположенных близко к поверхностным сосудам и захватывающих краситель из межклеточного пространства. В зеркальных областях СН сигнал флуоресценции синего Эванса не обнаружен.

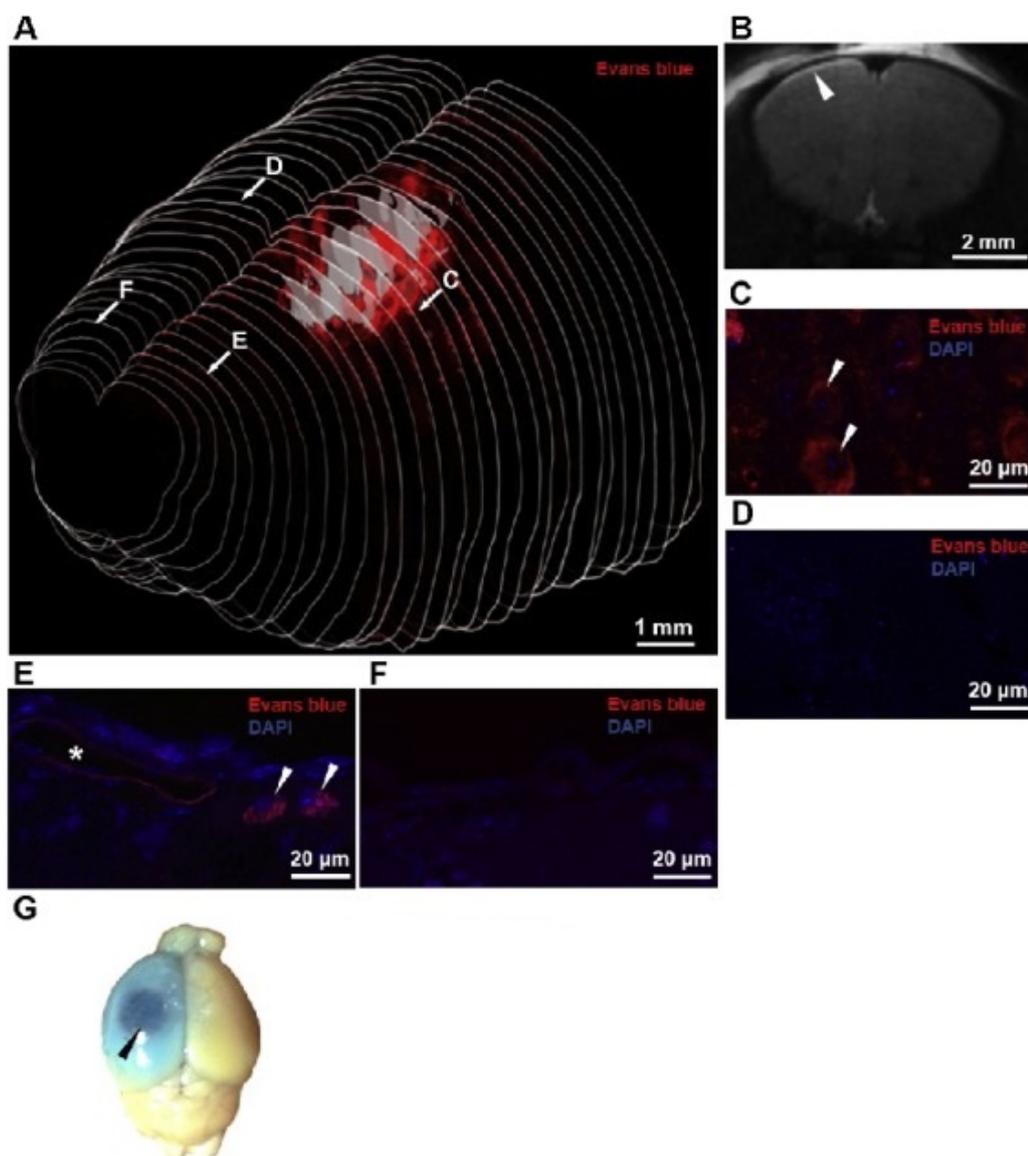


Рисунок 7.2 - Нарушение проницаемости ГЭБ через 24 часа после ФТ обнаружено с помощью синего красителя Эванса

А - 3D-распределение красителя (красный) в головном мозге, 3D-реконструкция (серые зоны - участки, где нервная ткань не сохраняется при изготовлении срезов); В - репрезентативное МРТ-изображение: срез мозга, удаленный от ишемического ядра (поверхностные повреждения отмечены треугольником); С – F - репрезентативные микрофотографии областей мозга, обозначенных буквами А: С, D - зона полутени и зеркальная область в СН соответственно, Е, F - поверхность поврежденного полушария и зеркальная область в СН соответственно; G - вид всего мозга через 24 ч после инъекции красителя Эванса и ФТ (треугольником указано поврежденное полушарие).

Мы покрасили гематоксилином и эозином срезы головного мозга, полученного через 24 ч после ФТ. На рисунке 7.3 представлены ишемическое ядро, полутень и морфологически неповрежденная область. Нас интересовала область полутени, которая характеризовалась наличием как поврежденных нейронов, так и клеток без патологических изменений, а также нарушением внеклеточного матрикса (рисунок 7.3). Эта область шириной 200–250 мкм располагалась на внешней границе ишемического

ядра, которое было полностью лишено неповрежденных клеток. Эти результаты соответствуют предыдущим исследованиям, в которых активация и пролиферация глиальных клеток наблюдались в аналогичной зоне такой же ширины после РТ [23-25]. Морфометрический анализ срезов показал значительное уменьшение нейронов с нормальной морфологией в полутени по сравнению с аналогичными областями СН ($20,35 \pm 2,79\%$ в ИС против $100,00 \pm 5,23\%$ в СН). Неповрежденными нейронами считались клетки, для которых не характерны ядерный пикноз, кариорексис, кариолизис, гиперхромия, набухание и изменение нормальной формы клеток.

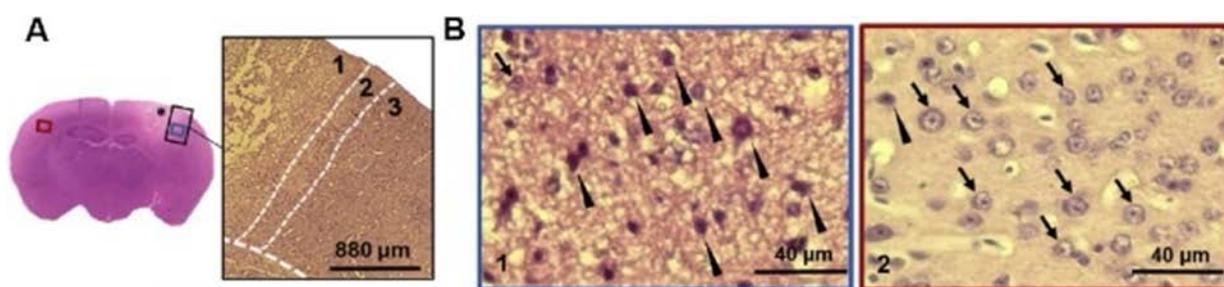


Рисунок 7.3 - Гистологический анализ срезов головного мозга мыши через 24 часа после фотортомбоза

А - общий вид гистологического среза, окрашенного гематоксилином и эозином (* - ишемическое поражение, 1 - зона ишемического поражения, 2 - полутень, 3 - морфологически неповрежденный участок); В - репрезентативные микрофотографии области полутени (1) и зеркальной зоны СН (2) после окрашивания гематоксилином и эозином (стрелки указывают клетки с нормальной морфологией, треугольниками обозначены клетки с признаками повреждения).

Чтобы отличить нейроны от глиальных клеток, учитывались только клетки с крупными ядрами сферической или яйцевидной формы и с ядрышками и зернистой окрашенной нуклеоплазмой. Мы подтвердили применимость этих критериев, используя двойное окрашивание срезов мозга гематоксилином и антителами против специфического нейронального маркера NeuN [26]. Количество нейронов в сенсомоторной коре СН, т.е. NeuN-положительных клеток с типичной ядерной морфологией, составляло $3,81 \pm 0,22 \times 10^3$ клеток/мм². Количество NeuN-положительных клеток без морфологических признаков нейронов составило $0,28 \pm 0,05 \times 10^3$ клеток/мм². Количество NeuN-отрицательных клеток с ядрами, типичными для нейронов, составило $0,29 \pm 0,04 \times 10^3$ клеток/мм². Таким образом, только $7,04 \pm 0,93\%$ всех клеток с нейрональной морфологией были NeuN-отрицательными. Ядра нейронов в зоне полутени были деформированы в результате ишемического повреждения. Однако они сохранили свои характеристики: относительно большой размер и неоднородную структуру хроматина.

Используемые в работе методы определения тяжести ишемии головного мозга мышей при фокальной фотоиндуцированной ишемии позволяют эффективно определить

объем ишемического очага, оценить увеличение проницаемости ГЭБ и количественно охарактеризовать поражение мозга на уровне отдельных нейронов через 24 ч после индукции повреждения.

7.3.2 2. Исследование влияния пептида АП9 на ишемию головного мозга мышей, вызванного фототромбозом.

Для определения объема повреждения головного мозга, который напрямую отражает тяжесть ишемии, использовали МРТ. Действие пептида АП9 было дозозависимым. АП9 в дозе 20 мг / кг (однократная инъекция за 10 мин до ФТ) вызывал статистически значимое уменьшение объема поражения, которое составило $69,92 \pm 8,21\%$ ($n = 7$) в группе, получавшей АП9, по сравнению с контрольными животными ($100,00 \pm 6,10\%$, $n = 7$) через 24 ч после индукции ФТ. Влияния АП9 в дозах 0,2 и 2 мг / кг на этот параметр, который составил $92,70 \pm 10,10\%$ ($n = 4$) и $100,90 \pm 5,96\%$ ($n = 4$) соответственно, не выявлено. Повторное введение пептида (за 10 мин до и через 1 ч после ФТ) в дозе 20 мг / кг усиливало защитный эффект его однократной инъекции и приводило к статистически значимому двукратному уменьшению объема поражения через 24 ч после тромбоза. Объем повреждения составил $48,59 \pm 6,42\%$ ($n = 7$) в группе, обработанной АП9, и $100,00 \pm 7,27\%$ ($n = 7$) в контрольной группе. Объем поражения через 96 ч после тромбоза составил $53,21 \pm 9,72\%$ в группе, получавшей АП9, относительно контрольного значения ($100,00 \pm 5,58\%$). Таким образом, результаты МРТ свидетельствовали о сохранении защитного эффекта двукратного введения АП9 в постишемическом периоде.

Патологические изменения, возникающие после индукции ишемии на клеточном уровне, оценивали по окрашиванию гематоксилин-эозином срезов мозга. Выявлено достоверное уменьшение количества нейронов без морфологических признаков повреждения в полутени по сравнению с аналогичными участками при СН через 24 ч после ФТ. Однократное введение пептида во всех трех использованных дозах (0,2, 2 и 20 мг / кг) не повлияло на долю неповрежденных нейронов в ИГ по сравнению с контрольной группой (рисунок 7.4). Две инъекции (10 мин до и 1 ч после ФТ) АП9 в дозе 20 мг / кг также не изменили относительное количество неповрежденных нейронов в ИГ. Полутень характеризовалась $26,56 \pm 5,47\%$ ($n = 5$) нейронов нормальной морфологии в контрольной группе животных и $24,85 \pm 6,74\%$ ($n = 7$) у мышей, обработанных АП9.

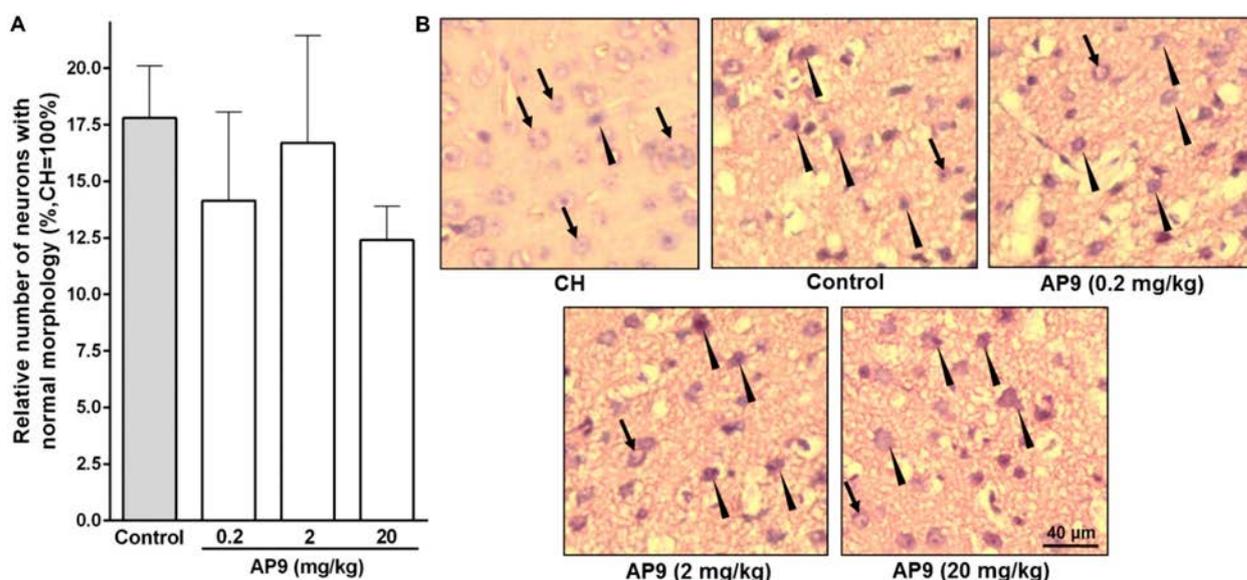


Рисунок 7.4 - Морфологические изменения нейронов через 24 часа после тромбоза у контрольных животных и мышей, получавших АП9 однократно

(а) - относительное количество поврежденных нейронов в полутени (однофакторный дисперсионный анализ); (в) - типичные микрофотографии области полутени в ИН и в зеркальной области СН (Окрашивание гематоксилином-эозином; стрелки указывают на клетки с нормальной морфологией, треугольники – на клетки с признаками повреждения).

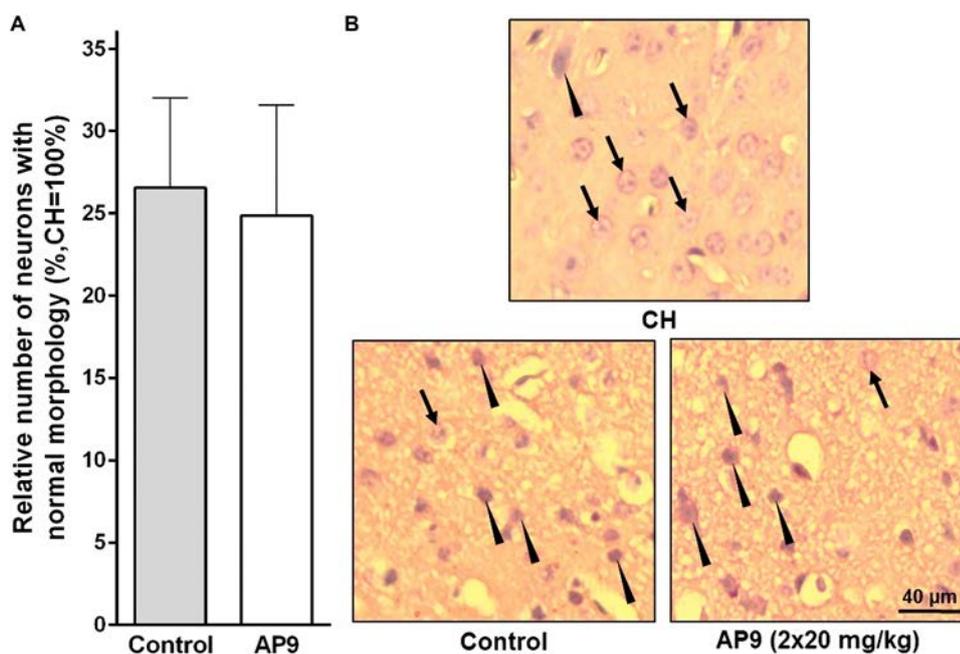


Рисунок 7.5 - Морфологические изменения нейронов через 24 часа после тромбоза у контрольных животных и мышей, получавших АП9 двукратно

(а) - относительное количество поврежденных нейронов в полутени (непарный t-критерий); (в) - типичные микрофотографии области полутени в ИН и в зеркальной области СН (Окрашивание гематоксилином-эозином; стрелки указывают на клетки с нормальной морфологией, треугольники – на клетки с признаками повреждения).

Согласно литературным данным значительная активация и пролиферация глиальных клеток наблюдается в полутени через 96 ч после индукции ПТ. Это подтверждается повышенной экспрессией GFAP в активированных астроцитах [24, 25] и Iba-1 в активированных микроглиальных клетках / макрофагах [24].

Мы также наблюдали значительное увеличение количества активированных глиальных клеток в ИГ по сравнению с СН через 96 ч после индукции тромбоза. Однако влияния двукратного введения АП9 (20 мг / кг за 10 мин до и через 1 ч после тромбоза) на эти показатели не обнаружено. Относительное количество активированных астроцитов (GFAP-положительных клеток) в полутени составляло $8,17 \pm 0,51$ ($n = 5$) и $8,55 \pm 0,37$ ($n = 6$) у контрольных и обработанных АП9 животных, соответственно. Для активированных микроглиоцитов / макрофагов (Iba-1-положительные клетки) значения составляли $6,89 \pm 1,04$ (контрольная группа, $n = 5$) и $8,52 \pm 0,96$ (экспериментальная группа, $n = 6$) (рисунок 7.6).

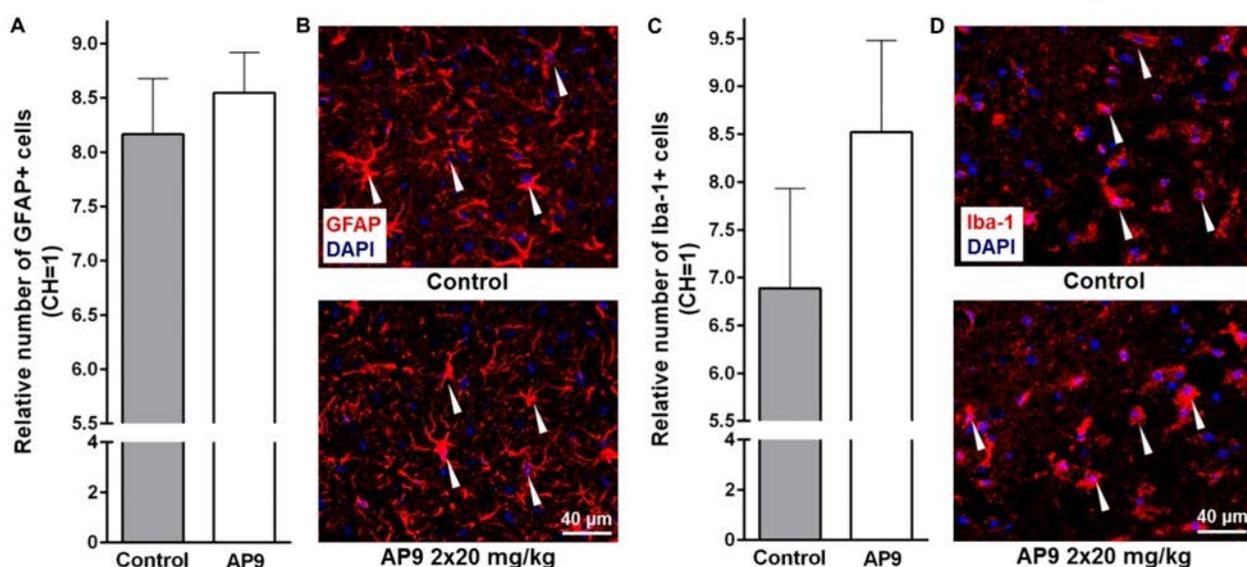


Рисунок 7.6 - Активация глиальных клеток через 96 часов после тромбоза у контрольных животных и мышей, получавших АП9 (двойная инъекция, 20 мг/кг)

(А, В) - данные иммуногистохимии при окрашивании GFAP: (А) - относительное количество активированных астроцитов (непарный t- тест) и (В) - репрезентативные микрофотографии полутени. (С, D) - данные иммуногистохимии при окрашивании Iba-1: (С) - относительное количество активированных микроглиоцитов / макрофагов (непарный t- тест) и (D) - репрезентативные микрофотографии полутени (GFAP- и Iba-1-положительные клетки отмечены треугольниками).

Мы оценили влияние пептида АП9 на изменение проницаемости ГЭБ после тромбоза с помощью красителя Эванса. Однократное введение АП9 в дозе 20 мг / кг не повлияло на содержание синего красителя Эванса в поврежденном полушарии. Этот индекс составлял $294,40 \pm 26,88\%$ ($n = 5$) и $308,60 \pm 28,98\%$ ($n = 5$) у контрольных мышей и мышей, получавших АП9, соответственно. Однако двойная инъекция АП9 (20 мг / кг за 10 мин до и через 1 час после тромбоза) продемонстрировала защитный эффект. Относительное содержание красителя в ИГ составило $382,40 \pm 18,67\%$ ($n = 6$) у контрольных животных. У мышей, получавших АП9, этот параметр статистически значимо снизился до $321,10 \pm 15,69\%$ ($n = 7$).

Для оценки вклада β -аррестина-2 в защитное действие АП9 при фототромбозе в работе использовали мышей с нокаутом этого белка. Для оценки объема поражения использовали окрашивание срезов головного мозга ТТС. Двойная инъекция АП9 (20 мг / кг, 10 мин до и 1 час после ПВ) значительно уменьшал относительный объем поражения у животных дикого типа (штамм C57BL / 6) через 24 часа после ФТ. Этот параметр составлял $70,80 \pm 8,28\%$ ($n = 9$) в обработанной группе и $100,00 \pm 9,56\%$ ($n = 10$) у контрольных мышей. Однако защитное влияние двойной инъекции АП9 у мышей β -аррестин-2 - / - не обнаружено. Объем поражения составил $100,00 \pm 11,63\%$ ($n = 8$) у контрольных β -аррестин-2 - / - животных и $89,82 \pm 6,91\%$ ($n = 8$) у β -аррестин-2 - / - мышей, получавших АП9. Таким образом, экспрессия β -аррестина-2 необходима для защитного действия АП9 при ишемии мозга, вызванной ФТ.

7.3.3 Исследование экспрессии белков c-fos, ERK1/2, MAP2, NOTCH1 в нейронах коры головного мозга человека после ишемического инсульта.

При развитии ишемического инсульта (ИИ) головного мозга происходит перераспределение морфологических и функциональных связей между нейронами, от чего зависит клиническое восстановление пациента. Выявлен ряд ключевых этапов, по которым можно судить о состоянии поврежденной клетки. Активация синтеза ERK1/2 преимущественно связана с адаптацией нейронов, дифференцировкой и спраутингом [27-29]. C-Fos играет важную роль в синаптической пластичности [30]. Локализация MAP2 влияет на процессы изменения структуры цитоскелета, регуляции транспорта веществ, необходимых для синаптической передачи сигнала [31]. Активация сигнального пути Notch1 играет важную роль в реализации процессов пространственного обучения, памяти, синаптической пластичности [32, 33].

В работе исследовали экспрессию этих белков на срезах головного мозга человека после ИИ.

Доля экспрессирующих белок c-fos нейронов была наибольшей в зоне 2 (36,4 (31,3; 42,4)%), что достоверно отличалось как от группы контроля (18,8 (15,3; 23,8)%), так и от показателей других зон (27,8 (20; 33,3)% и 32,6 (28,2; 38,1)% соответственно для зон 1 и 3) ($p < 0,01$) (рисунок 7.7 а). Показатели экспрессии ERK1/2 и MAP2 в NSE-позитивных клетках имели схожие паттерны и достоверно отличались от группы контроля (соответственно 75 (69; 78)% и 86,7 (78; 92,5)% только в образцах зоны 1 (57,1 (52,9; 61,5)% и 76,9 (68,8; 82,4)%). При этом для зон 1 и 2 были выявлены достоверные положительные корреляционные связи между долей ERK1/2 и c-fos-позитивных нейронов (для зон 1 и 2 $r = 0,277$ и $r = 0,211$ соответственно, $p < 0,01$) (рисунок 7.7 б, 7.8 а).

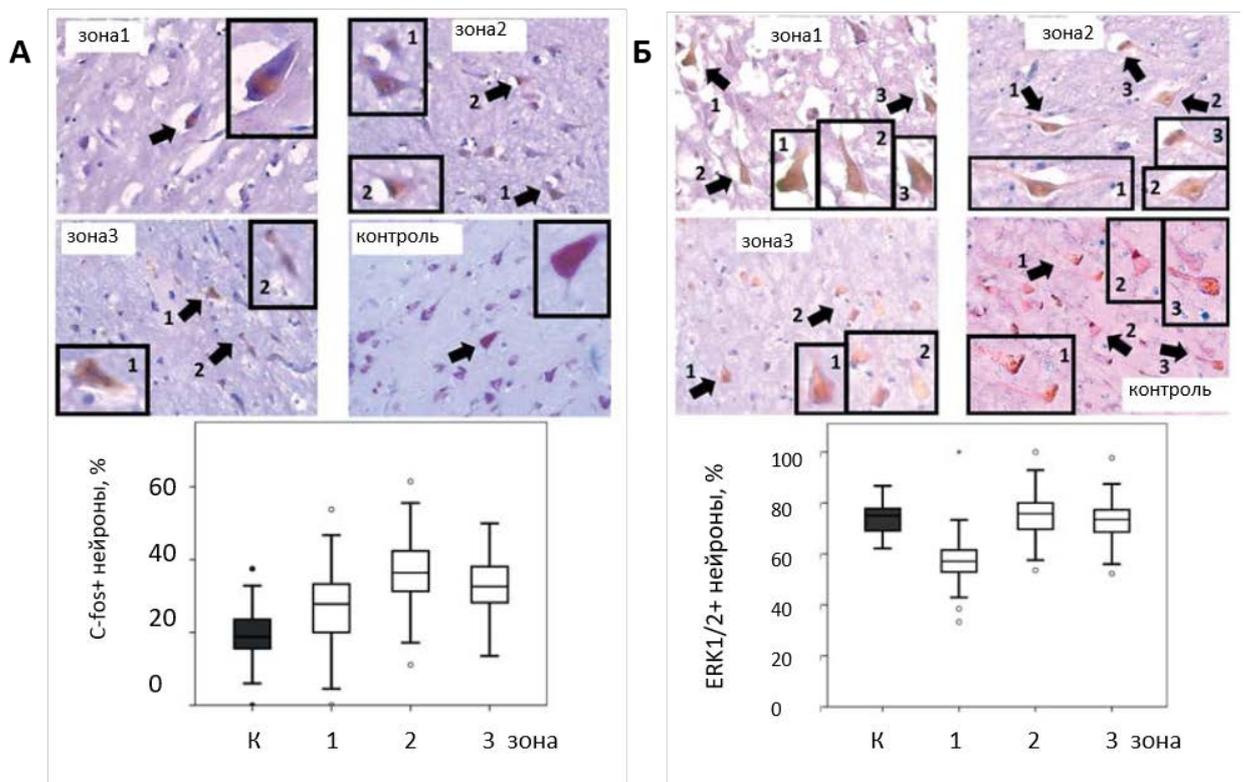


Рисунок 7.7 - Иммуногистохимический анализ нейронов, экспрессирующих c-fos (А) и ERK1/2 (Б) в мозге человека с ИИ

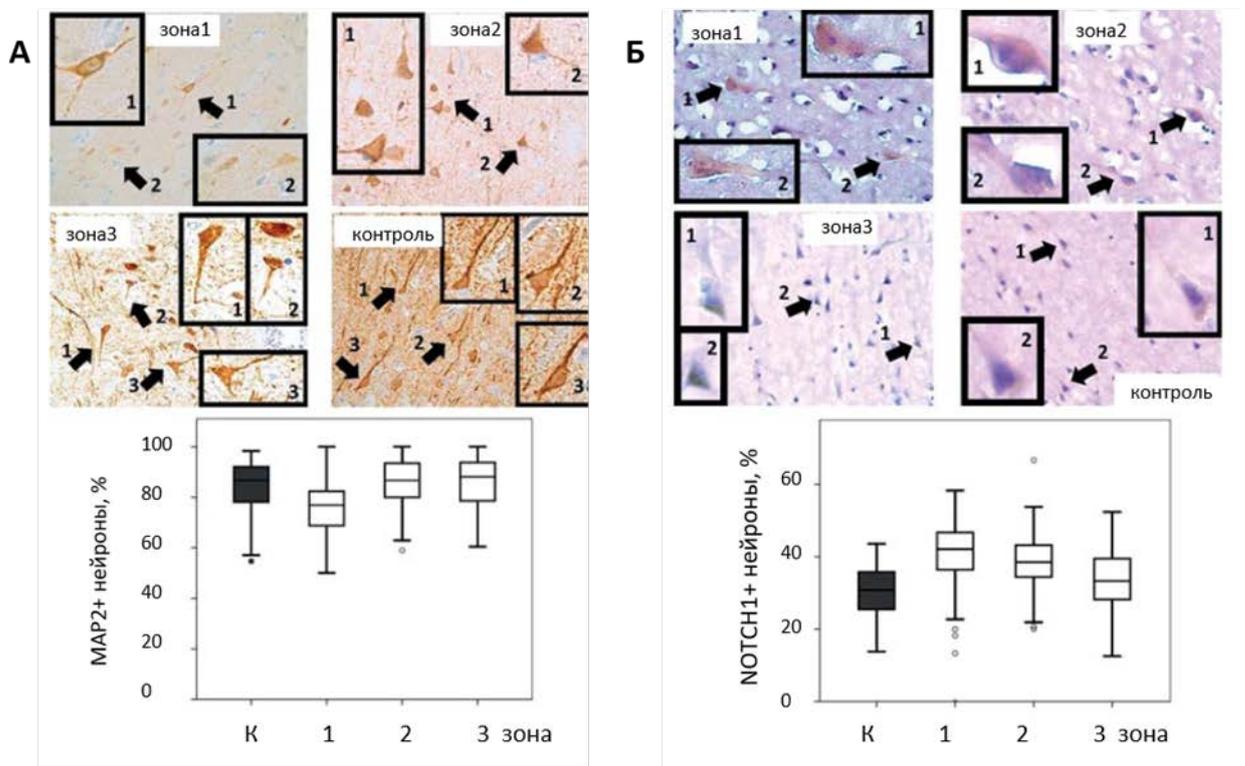


Рисунок 7.8 - Иммуногистохимический анализ нейронов, экспрессирующих MAP2 (А) и NOTCH1+ (Б) в мозге человека с ИИ

Наибольшая представленность NOTCH1-позитивных нейронов отмечалась в зоне 1 и составляла 42,1 (36,4; 46,7)%, далее их доля достоверно снижалась ($p < 0,01$) по мере удаления рассматриваемого образца от очага ишемии до 38,5 (34,4; 43,2)% в зоне 2 и до

33,3 (28,2; 39,5)% в зоне 3. Во всех исследованных зонах отличия от контрольного образца (30,8 (25,4; 35,8)%) были достоверными ($p < 0,01$) (рисунок 7.8 б).

Для острейшего периода ИИ характерно увеличение общей численной плотности и уменьшение доли поврежденных нейронов при удалении от ишемического очага, что сопровождается наибольшей долей c-fos протеин-позитивных нейронов в зоне 2, наибольшей представленностью NOTCH1-позитивных нейронов в зоне 1, меньшими долями ERK1/2- и MAP2-позитивных нейронов по сравнению с контрольными только в образцах зоны 1.

При развитии локального ишемического повреждения изменения указанных параметров затрагивают весь головной мозг. Контралатеральное очагу полушарие является зоной повышенной активации интактной ткани, тогда как участки коры, прилежащие непосредственно к очагу (зона 1) и отдаленные от него (зона 2), имеют признаки патологической активации. При этом для зоны 1 характерна повышенная ригидность (снижение диапазона адаптационного ответа ткани), а для зоны 2 — повышенная лабильность (расширение адаптационного диапазона). Поэтому ключевой мишенью для терапевтического воздействия является зона 2.

7.4.4 Влияние АПС и АП9 на выживаемость клеток линии RBL-2H3 в условиях действия эндотоксина

Активация тучных клеток в условиях воспаления может приводить не только к повышению их секреторной активности, но и сопровождаться клеточной гибелью. В наших исследованиях мы оценивали число живых клеток с помощью МТТ-теста при действии эндотоксина ЛПС (1 мкг/мл).

В процессе развития острой воспалительной реакции, вызванной инкубацией клеток в присутствии ЛПС в течение 24 часов, наблюдалось снижение уровня живых клеток в культуре. Установлено, что инкубация клеток с ЛПС приводит к снижению данного показателя на 30%. Предобработка клеток АПС (10 нМ) или АП9 (10 мкМ) предотвращала ЛПС-вызванную гибель клеток, в результате доля живых клеток не отличалась от контрольных значений. Необходимо отметить, что изолированное действие АПС и АП9 на клетки линии RBL-2H3 не изменяло уровня пролиферации клеток по сравнению с контрольной группой (рисунок 7.9).

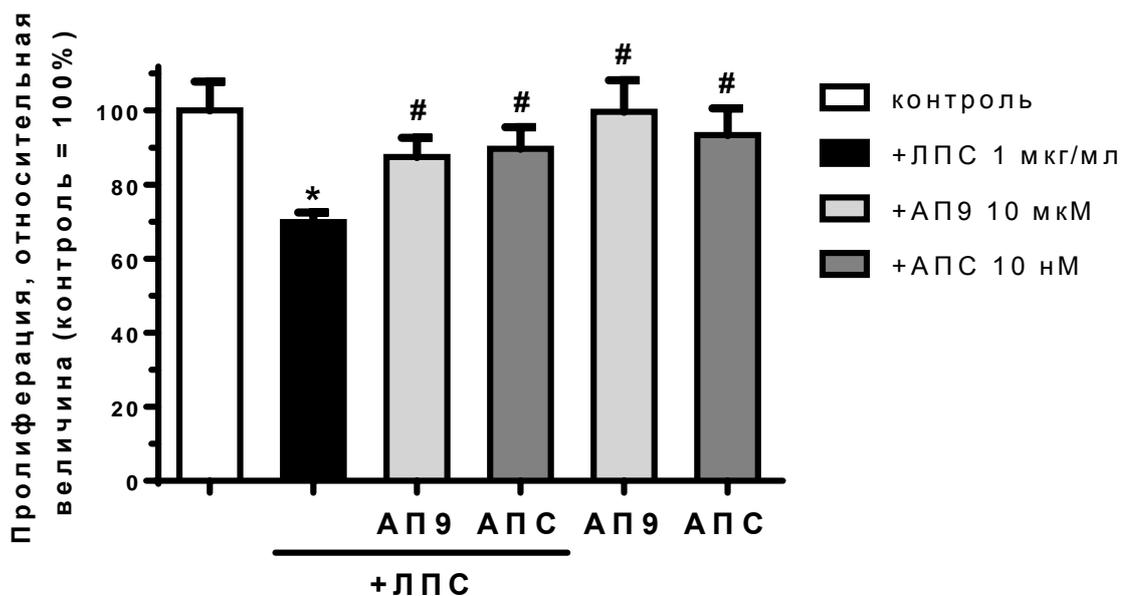


Рисунок 7.9 - Влияние АПС (10 нМ) и АП9 (10 мкМ) на выживаемость клеток линии RBL-2H3, активированных ЛПС (1 мкг/мл)

В качестве контроля выступали не активированные и не обработанные исследуемыми веществами клетки, $n = 4$. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем, # $p < 0.05$ по сравнению с группой культур клеток активированных ЛПС, но без добавления АПС и АП9. Погрешности представлены в виде SEM.

Активация RBL-2H3, вызванная эндотоксином, сопровождается снижением пролиферации и активацией секреции. АП9, подобно АПС, защищает клетки, снижая уровень секреции, стабилизируя мембрану, что и приводит к нормализации процесса пролиферации.

Таким образом, агонисты PAR1 – АПС и АП9 защищают клетки линии RBL-2H3 от токсического воздействия эндотоксина.

7.4.5 Для уточнения организующего действия пептидов Семакс и HLDF-6 на кинетику синтеза белка в гепатоцитах, в дополнение к исследованию *in vitro* [34], изучили эффекты этих пептидов *in vivo* после внутрибрюшинной их инъекции крысам разного возраста. Исследовали окологоризонтальный (ультрадианный) ритм синтеза белка, маркер прямых межклеточных отношений. Молодым, половозрелым или старым крысам внутрибрюшинно вводили пептиды – в дозах 50–100 мкг/кг. Выделяли гепатоциты и ставили редкие или плотные культуры. У молодых крыс, получивших тот или иной пептид, в их редких суточных культурах обнаружили ритм синтеза белка; у крыс того же возраста, которым инъекцировали физраствор, ритма в таких культурах не было. В плотных культурах старых крыс после введения пептида амплитуды ритма синтеза белка не отличались от ритма молодых крыс; после инъекции физраствора амплитуды ритма были вдвое ниже. Инъекция пептида взрослым крысам, получившим до этого дофамин, обнаружила нормальный для крыс этого возраста ритм синтеза белка; инъекция только

дофамина ликвидировала ритм. Регуляторный эффект пептидов сохранялся по меньшей мере 2 дня после однократного их введения крысе. Рекомендуется использование семакса или HLDF-6 для улучшения состояния старых людей, компенсации нарушений кинетики синтеза белка при старении и патологии [35].

7.4.6 В кратком обзоре суммированы данные о возможности компенсации одного из нарушений биологии клеток при старении. В культурах гепатоцитов старых крыс, сравнительно с молодыми, снижены амплитуды ритма синтеза белка. Как и другие окологосовые (ультрадианные) ритмы *in vitro*, ритм синтеза белка является маркером синхронизации клеточной популяции путем прямых межклеточных взаимодействий. Амплитуды ритма характеризуют выраженность взаимодействий. Они увеличивались после добавления в среду культур ранее выявленных сигнальных факторов организации межклеточных взаимодействий: ганглиозидов, фенилэфрина, мелатонина, глутаминовой кислоты, регуляторных пептидов. К этому же приводило введение трех последних сигнальных факторов крысе *in vivo*. Эффект сохранялся 2–3 дня. Добавление к среде культур сыворотки крови молодой крысы увеличивало амплитуды ритма не меньше, чем сигнальные факторы. Сыворотка крови старой крысы не изменяла ритм. Но сыворотка крови старой крысы, обогащенная ганглиозидами, действовала как сыворотка молодой крысы. Эти данные и сведения литературы позволяют предложить использование сигнальных факторов прямых межклеточных взаимодействий для улучшения состояния пожилых людей [36].

7.4 Заключение

Исследована экспрессия белков *c-fos*, ERK1/2, MAP2, NOTCH1 в нейронах коры головного мозга человека после ишемического инсульта. Показано, что ключевой мишенью для терапевтического воздействия является зона 2 – зона полутени [37].

Показана эффективность классического гистологического подхода и окрашивания ТТС, которые более доступны, чем МРТ и иммуногистохимические методы [38].

На мышинной модели ишемического инсульта, индуцированного фототромбозом, впервые продемонстрированы защитные свойства нового пептида-агониста ПАР1 (NPNDKYEPF-NH 2) АП9 [39, 40].

ПАР1 экспрессируется разными компонентами сосудисто-нервного аппарата: нейронами, астроцитами [41] и эндотелиальные клетки [42]. Соответственно, различные типы клеток можно рассматривать как потенциальную мишень для АП9.

Действие АП9 опосредовано его воздействием на нервно-сосудистую единицу (участок контакта ткани мозга и сосудистого русла, включая ГЭБ) и клетки мозга. Несмотря на то, что полезные эффекты АП9 были продемонстрированы на нейроны

гиппокампа в эксайтотоксических условиях *in vitro* [13], в данном исследовании АП9 не оказывал нейропротекторного действия по данным гистологического анализа.

Молекулярный механизм действия АП9 аналогичен АПС. Активация PAR1 с помощью АП9, а также АПС-опосредованное расщепление PAR1 индуцируют β -аррестин-2-зависимые цитопротективные пути [43]. С другой стороны, пептид АП9 в условиях воспаления проявляет свое противовоспалительное действие на клетки RBL2H3 – аналоги тучных клеток [44].

Исследование показывает потенциальную стратегию лечения ишемического повреждения мозга, основанную на новом классе пептидных нейропротекторов.

Пептиды также могут быть эффективны для коррекции нарушений кинетики синтеза белка при старении и патологии.

7.5 Список использованных источников

1. Mosnier, L.O., Zlokovic, B.V., and Griffin, J.H. The cytoprotective protein C pathway//Blood. – 2007. - Vol. 109(8). – P. 3161 - 72. doi: 10.1182/blood-2006-09-003004.
2. Riewald, M., Petrovan, R.J., Donner, A., and Ruf, W. Activated protein C signals through the thrombin receptor PAR1 in endothelial cells//J. Endotoxin Res. – 2003. - Vol. 9. - P. 317 – 321.
3. Esmon, C.T. The interactions between inflammation and coagulation//Br. J. Haematol. – 2005. - Vol. 131. – P. 417 – 430.
4. Gorbacheva, L.R., Storozhevykh, T.P., Pinelis, V.G., Davydova, O.N., Ishiwata, S., and Strukova, S.M. Activated protein C via PAR1 receptor regulates survival of neurons under conditions of glutamate excitotoxicity//Biochemistry (Moscow). – 2008. - Vol. 73. – P. 717 – 724.
5. Gorbacheva LR, Kiseleva EV, Savinkova IG, Strukova SM. A New Concept of Action of Hemostatic Proteases on Inflammation, Neurotoxicity, and Tissue Regeneration//Biochemistry (Mosc). - 2017 Jul. - Vol. 82(7). – P. 778 - 790. doi: 10.1134/S0006297917070033.
6. Kiseleva EV, Sidorova MV, Gorbacheva LR, Strukova SM. Peptide-agonist of protease-activated receptor (PAR 1), similar to activated protein C, promotes proliferation in keratinocytes and wound healing of epithelial layer//Biomed Khim. - 2014 Nov-Dec. - Vol. 60(6). – P. 702 - 6. Russian. doi: 10.18097/pbmc20146006702. PMID: 25552512.
7. Thiagarajan, M., Fernández, J.A., Lane, S.M., Griffin, J.H., and Zlokovic, B.V. Activated protein C promotes neovascularization and neurogenesis in postischemic brain via protease-activated receptor 1//J. Neurosci. – 2008. - Vol. 28. – P. 12788 – 12797.

8. McKelvey, K., Jackson, C.J., and Xue, M. Activated protein C: A regulator of human skin epidermal keratinocyte function//World J. Biol. Chem. – 2014. - Vol. 5. – P. 169 – 179.
9. Danese, S., Vetrano, S., Zhang, L., Poplis, V.A., and Castellino, F.J. The protein C pathway in tissue inflammation and injury: pathogenic role and therapeutic implications//Blood. – 2010. - Vol. 115. – P. 1121 – 1130.
10. Mao Y., Jin J., Kunapuli S. P. Characterization of a new peptide agonist of the protease-activated receptor-1//Biochem. Pharmacol.- -2007. - Vol. 75. – P. 438 – 447. 10.1016/j.bcp.2007.09.002.
11. Ramachandran R., Hollenberg M Proteinases and signalling: pathophysiological and therapeutic implications via PARs and more//Br. J. Pharmacol. - 2008. - Vol. 153. – P. 263 – 282. 10.1038/sj.bjp.0707507.
12. Mosnier L. O., Sinha R. K., Burnier L., Bouwens E. A., Griffin J. H. Biased agonism of protease-activated receptor 1 by activated protein C caused by noncanonical cleavage at Arg46//Blood. - 2013. - Vol. 120. – P. 5237 – 5246. 10.1182/blood-2012-08-452169.
13. Savinkova I. G., Gorbacheva L. R., Beshpalova Z. D., Pinelis V. G., Strukova S. M. Peptides analogous to tethered ligands liberated by activated protein C exert neuroprotective effects in glutamate induced excitotoxicity//Biochemistry. - 2014. - Vol. 8. – P. 116 – 120. 10.1134/S1990747813050176
14. Babkina I. I., Strukova S. M., Pinelis V. G., Reiser G., Gorbacheva L. R. New synthetic peptide protects neurons from death induced by toxic influence of activated mast cells via protease-activated receptor//Biochemistry. - 2016. - Vol. 10. – P. 126 – 134. 10.1134/S1990747816010037
15. Griffin, J.H., Zlokovic, B.V., and Mosnier, L.O. Activated protein C: biased for translation, Blood. – 2015. - Vol. 125. – P. 2898 – 2907.
16. Lee J.-K., Park M.-S., Kim Y.-S., Moon K.-S., Joo S.-P., Kim T.-S., Kim J.-H., Kim S.-H. Photochemically induced cerebral ischemia in a mouse model//Surg. Neurol. - 2007. - Vol. 67. – P. 620 – 625.
17. Franklin K.B., Paxinos G. Mouse brain in stereotaxic coordinates//2nd ed. London, Acad. Press. 2001.
18. Baskin Y.K., Dietrich W.D., Green E.J. Two effective behavioral tasks for evaluating sensorimotor dysfunction following traumatic brain injury in mice//J. Neurosci. Methods. - 2003. - Vol. 129. – P. 87 – 93.

19. Benedek A., Móricz K., Jurányi Z., Gigler G., Lévy G., Hársing L., Mátyus P., Szénási G., Albert M. Use of TTC staining for the evaluation of tissue injury in the early phases of reperfusion after focal cerebral ischemia in rats//Brain Res. - 2006. - Vol. 6. – P. 159 – 164.
20. Pialat J.-B., Cho T.-H., Beuf O., Joye E., Moucharaffie S., Langlois J.-B., Nemoz C., Janier M., Berthezene Y., Nighoghossian N., Desvergne B., Wiart M. MRI monitoring of focal cerebral ischemia in peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-deficient mice//NMR Biomed. – 2007. - Vol. 6. – P. 335 – 342.
21. Baskin Y.K., Dietrich W.D., Green E.J. Two effective behavioral tasks for evaluating sensorimotor dysfunction following traumatic brain injury in mice//J. Neurosci. Methods. - 2003. - T. 129. - C. 87 – 93.
22. Harrison T.C. и др. Displacement of sensory maps and disorganization of motor cortex after targeted stroke in mice // Stroke. - 2013. - T. 44. - C. 2300 – 2306.
23. Schroeter M., Jander S., Stoll G. Non-invasive induction of focal cerebral ischemia in mice by photothrombosis of cortical microvessels: characterization of inflammatory responses//J. Neurosci. Methods. - 2002. - T. 117. - C. 43 – 49.
24. Li H. и др. Histological, cellular and behavioral assessments of stroke outcomes after photothrombosis-induced ischemia in adult mice//BMC Neurosci. - 2014. - T. 15. - C. 1 – 13.
25. Cotrina M.L. и др. Direct comparison of microglial dynamics and inflammatory profile in photothrombotic and arterial occlusion evoked stroke//Neuroscience. - 2016. - T. 17493. - C. 1 – 12.
26. Liu F., Schafer D.P., McCullough L.D. TTC , Fluoro-Jade B and NeuN staining confirm evolving phases of infarction induced by middle cerebral artery occlusion//J. Neurosci. Methods. - 2009. - T. 179. - C. 1 – 8.
27. Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions//Microbiol Mol Biol Rev. – 2004. - Vol. 68. – P. 320 – 344. doi: 10.1128/mubr.68.2.320-344.2004.
28. Pernet V, Hauswirth WW, Di Polo A. Extracellular signal-regulated kinase 1/2 mediates survival, but not axon regeneration, of adult injured central nervous system neurons in vivo//Journal of neurochemistry. – 2005. - Vol. 93(1). – P. 72 – 83. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03002.x.
29. Kim SY, Han YM, Oh M, et al. DUSP4 regulates neuronal differentiation and calcium homeostasis by modulating ERK1/2 phosphorylation//Stem Cells and Development. – 2014. - Vol. 24(6). – P. 686 – 700. doi:10.1089/scd.2014.0434.

30. Kaczmarek L. From c-Fos to MMP-9: in control of synaptic plasticity to produce healthy and diseased mind, a personal view//Postepy Biochemii.- 2018. - Vol. 64(2). – P. 101 – 109. doi: 10.18388/pb.2018_119.
31. Samandari H, Nabavizadeh F, Ashabi G. Age-related difference in protective effect of early post-conditioning on ischemic brain injury: possible involvement of MAP-2/Synaptophysin role//Metabolic Brain Disease. – 2019. - Vol. 34(6). – P. 1771 – 1780. doi: 10.1007/s11011-019-00484-3.
32. Tu M, Zhu P, Hu S, et al. Notch1 signaling activation contributes to adult hippocampal neurogenesis following traumatic brain injury//Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research. – 2017. - Vol. 23. – P. 5480. doi: 10.12659/MSM.907160.
33. Zhang X, Yang C, Gao J, et al. Voluntary running-enhanced synaptic plasticity, learning and memory are mediated by Notch1 signal pathway in C57BL mice//Brain Structure and Function. – 2018. - Vol. 223(2). – P. 749 – 767. DOI: 10.1007/s00429-017-1521-0.
34. Brodsky V.Y., Zolotarev Y.A., Malchenko L.A., Andreeva L.A., Lazarev D.S., Butorina N.N., Kozik V.S., Myasoedov N.F. Neuroprotective Peptides Regulate Protein-Synthesis Kinetics in Hepatocytes of Different Age Rats // Russian Journal of Developmental Biology. 2019. V. 50. Is. 5. P. 268-274. DOI: 10.1134/S1062360419050035. (WoS) – Q4.
35. Brodsky V.Y., Zolotarev Y.A., Malchenko L.A., Andreeva L.A., Lazarev D.S., Butorina N.N.1, Kozik V.S., Myasoedov N.F. The Administration of Semax and HLDF-6 Peptides to Rats Regulates Protein Synthesis Rhythm in Hepatocytes and Corrects Senescent Disturbances//Russian Journal of Developmental Biology. – 2020. – Vol. 51. – Is. 2. – P. 99-105. DOI: 10.1134/S1062360420020034.
36. Brodsky V.Ya. Cell-Cell Interaction Disorders Associated with Senescence can be Repaired//Russian Journal of Developmental Biology. – 2020 – Vol. 51. – Is. 4. – P. 261-266. DOI: 10.1134/S1062360420040025.
37. Сергеева С.П., Люндуп А.В., Береговых В.В., Литвицкий П.Ф., Савин А.А., Горбачева Л.Р., Киселева Е.В., Бреславич И.Д., Куценко К. И., Шишкина Л.В. Экспрессия белков C-FOS, ERK1/2, MAP2, NOTCH1 в нейронах коры головного мозга человека после ишемического инсульта//Вестник РАМН. – 2020. – Т. 75. – № 3. – С. 226 - 233. DOI: 10.15690/vramn1295. – R
38. Galkov M., Gulyaev M., Kiseleva E., Andreev-Andrievskiy A., Gorbacheva L. Methods for detection of brain injury after photothrombosis-induced ischemia in mice: characteristics and new aspects of their application//Journal of Neuroscience Methods. – 2020. – Vol. 329. – Art. 108457. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2019.108457 (WoS, Scopus) – Q3

39. Danton, G. H., and Dietrich, W. D. The search for neuroprotective strategies in stroke//Am. J. Neuroradiol. – 2004. - Vol. 25. – P. 181 – 194.
40. Galkov M., Kiseleva E., Gulyaev M., Sidorova M., Gorbacheva L. New PAR1 Agonist Peptide Demonstrates Protective Action in a Mouse Model of Photothrombosis-Induced Brain Ischemia//Frontiers in Neuroscience. – 2020. – Vol. 14. – № Art. 335. DOI: 10.3389/fnins.2020.00335. (WoS, Scopus) – Q2
41. Junge, C. E., Lee, C. J., Hubbard, K. B., Zhang, Z., and Olson, J. J. Protease-activated receptor-1 in human brain: localization and functional expression in astrocytes//Exp. Neurol. - 2004. - Vol. 188. – P. 94 – 103. doi: 10.1016/j.expneurol.2004.02.018
42. Bartha, K., Domotor, E., Lanza, F., Adam-Vizi, V., and Machovich, R. Identification of thrombin receptors in rat brain capillary endothelial cells//J. Cereb. Blood Flow Metab. - 2000. - Vol. 20. – P. 175 – 182. doi: 10.1097/00004647-200001000-00022
43. Galkov M.D., Ivanova A.E., Gulyaev M.V., Kiseleva E.V., Savinkova I.G., Gorbacheva L.R. The Influence of β -Arrestin-2 Gene Knockout in Mice on Survival of Cultured Astrocytes Exposed to Thrombin and on the Cerebral Thrombosis Aftereffects In Vivo//Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology. – 2020. – Vol. 14. – Is. 1. – P. 17 - 23. DOI: 10.1134/S1990747819060060. (WoS, Scopus) – Q4
44. Бабкина И. И., Киселева Е. В., Горбачева Л. Р. Регуляция активированным протеином С и пептидом-агонистом ПАР1 провоспалительной активации клеток линии RBL-2H3//Биологические мембраны. – 2020. – Т. 37. – № 5. – С. 361 - 372. DOI: 10.31857/S0233475520040039. – R

7.6 Отчетные публикации по разделу

1. Сергеева С.П., Люндуп А.В., Береговых В.В., Литвицкий П.Ф., Савин А.А., Горбачева Л.Р., **Киселева Е.В.**, Бреславич И.Д., Куценко К. И., Шишкина Л.В. Экспрессия белков C-FOS, ERK1/2, MAP2, NOTCH1 в нейронах коры головного мозга человека после ишемического инсульта//Вестник РАМН. – 2020. – Т. 75. – № 3. – С. 226 - 233. DOI: 10.15690/vramn1295. – R
2. Бабкина И.И., **Киселева Е.В.**, Горбачева Л.Р. Регуляция активированным протеином С и пептидом-агонистом ПАР1 провоспалительной активации клеток линии RBL-2H3//Биологические мембраны. – 2020. – Т. 37. – № 5. – С. 361 - 372. DOI: 10.31857/S0233475520040039. – R - Babkina I.I., **Kiseleva E.V.**, Gorbacheva L.R. Regulation of Proinflammatory Activation of Cells RBL-2H3 by Activated Protein C and PAR1 Agonist Peptide//Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology. – 2020. – Vol. 14. – Is. 4. – P. 279-288. DOI: 10.1134/S1990747820030083. – S

3. Galkov M., Gulyaev M., **Kiseleva E.**, Andreev-Andrievskiy A., Gorbacheva L. Methods for detection of brain injury after photothrombosis-induced ischemia in mice: characteristics and new aspects of their application//Journal of Neuroscience Methods. – 2020. – Vol. 329. – Art. 108457. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2019.108457 (WoS, Scopus) – Q2.
4. Galkov M., **Kiseleva E.**, Gulyaev M., Sidorova M., Gorbacheva L. New PAR1 Agonist Peptide Demonstrates Protective Action in a Mouse Model of Photothrombosis-Induced Brain Ischemia//Frontiers in Neuroscience. – 2020. – Vol. 14. – № Art. 335. DOI: 10.3389/fnins.2020.00335. (WoS, Scopus) – Q2
5. **Brodsky V.Y.**, Zolotarev Y.A., **Malchenko L.A.**, Andreeva L.A., Lazarev D.S., **Butorina N.N.**, Kozik V.S., Myasoedov N.F. The Administration of Semax and HLDF-6 Peptides to Rats Regulates Protein Synthesis Rhythm in Hepatocytes and Corrects Senescent Disturbances//Russian Journal of Developmental Biology. – 2020. – Vol. 51. – Is. 2. – P. 99-105. DOI: 10.1134/S1062360420020034. (WoS, Scopus) – Q4.
6. **Brodsky V.Ya.** Cell-Cell Interaction Disorders Associated with Senescence can be Repaired//Russian Journal of Developmental Biology. – 2020 – Vol. 51. – Is. 4. – P. 261-266. DOI: 10.1134/S1062360420040025. – Q4.

ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С использованием разнообразных современных методов и экспериментальных моделей проведены исследования ряда клеточных и молекулярных регуляторов морфогенеза и регенерации, разработаны новые подходы для изучения и регуляции клеточной дифференцировки и пластичности в контексте онтогенеза и регенерации.

В коже мыши и человека впервые обнаружена экспрессия маркеров некроптоза RIPK-1 и RIPK-3, которые могут играть не изученные роли в жизнедеятельности ВФ. Предполагается проведение исследований RIPK-1 и RIPK-3 с точки зрения их участия в различных сигнальных каскадах, обеспечивающих циклические изменения ВФ. Проанализированы имеющиеся в настоящее время данные по активности и пластичности эпидермальных стволовых клеток волосяного фолликула в регенеративных процессах и ее связи с воспалительным микроокружением. Разработана модельная система реконструированного эпидермиса (РЭ) человека *in vitro*, в состав которого входят 8-10 слоев жизнеспособных клеток и около 10 слоев уплощенных корнецитов рогового слоя. Экспрессия маркеров пролиферации и дифференцировки кератиноцитов РЭ соответствует структуре нативного эпидермиса. Модель РЭ может быть использована в качестве тест-системы в области клеточной биологии, регенеративной медицины, старении и заболеваний кожи, разработки лекарств и косметических средств и других областях. Получены новые линии индуцированных плюрипотентных клеток человека, экспрессирующие элементы системы TetON-NGN2 для быстрой дифференцировки в нейроны, а также флуоресцентный кальциевый индикатор GCaMP6s. Функциональность данной генетической системы была подтверждена путем измерения активности индуцированных нейронов, при помощи прижизненной флуоресцентной цитраферной съемки. Среди преимуществ разработанной модели можно отметить следующие: (1) использованы клетки человека, что может быть крайне важно при изучении лекарственных средств; (2) получаемые нейроны имеют одинаковый генотип и могут быть получены многократно, (3) разработанный протокол получения нейронов быстрый, эффективный, относительно простой и дешевый, легко масштабируемый, не требует наличия вивария и опыта препарирования животных и эмбрионов; (4) получаемые клетки уже содержат генетически кодируемый кальциевый индикатор нейронной активности и не требуют дополнительных окрасок при помощи химических индикаторов типа Fluo4. На основе системы CRISPR-активации начата работа по созданию генетических методов управляемого изменения дифференцировочного статуса клеток на примере активации гена *DAZL*, который является важным регулятором гаметогенеза у большинства позвоночных, включая человека. Были созданы линии человеческих фибробластов с

конститутивной экспрессией компонентов систем активации CRISPRa (dCas9-VP160 и dCas9-SunTag-VP64). Обе системы продемонстрировали свою работоспособность и могут быть использованы для активации других генов. Результаты проведенного исследования на модели регенерации мышц свидетельствуют о возможности использования экзосом от мезенхимных стромальных клеток (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 ранее, оптимальным источником экзосом для регенерации скелетных мышц являются, по всей вероятности, 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*.

Также продемонстрировано, что участки нуклеотид-связывающих белков прокариот содержат мотивы, способные функционировать в качестве сигналов ядерной локализации. Также цитоплазматические белки могут содержать мотивы, способные функционировать в качестве сигналов ядерной локализации. Одним из механизмов функциональной инактивации таких мотивов может быть связыванием белков цитоплазматическими структурами. Исследована экспрессия белков c-fos, ERK1/2, MAP2, NOTCH1 в нейронах коры головного мозга человека после ишемического инсульта. Продемонстрированы защитные свойства нового пептида-агониста ПАР1. В исследованиях *in vivo* подтверждено, что пептиды семакс и HLDF-6 могут быть эффективны для коррекции нарушений кинетики синтеза белка. Эти данные и сведения литературы позволяют предложить использование сигнальных факторов прямых межклеточных взаимодействий для улучшения состояния старых людей

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

Отчет о выполнении темы № 4: «Клеточные и молекулярные механизмы дифференцировки, регенерации и морфогенеза, трансдифференцировка» Государственного задания на 2020 год был рассмотрен и утвержден на Ученом совете ИБР РАН (Протокол № 10 от 29.12.2020 г.)