

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

Reg. № 0088-2021-0016

Reg. № НИОКТР АААА-А21-121011490124-0

УТВЕРЖДАЮ
Директор ИБР РАН
доктор биологических наук,
член-корреспондент РАН

А.В. Васильев
«28» декабря 2021 г.

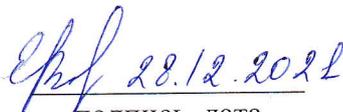
ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

МЕХАНИЗМЫ КЛЕТОЧНОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ В МОРФОГЕНЕЗЕ И ПРОЦЕССАХ
ВОССТАНОВЛЕНИЯ

(промежуточный)

Руководитель НИР,
заведующий лабораторией,
доктор биологических наук,
член-корреспондент РАН


Е.А. Воротеляк
подпись, дата

Москва 2021

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель, заведующий лабораторией, доктор биологических наук, член-корреспондент РАН



подпись, дата

Е.А. Воротеяк
(Введение, раздел 1, 2)
28.12.2021

Исполнители:
Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук



подпись, дата

Э.Б. Дашинамаев
(раздел 2)
28.12.2021

Руководитель раздела, главный научный сотрудник, доктор медицинских наук



подпись, дата

И.В. Лядова
(раздел 3)
28.12.2021

Нормоконтроль, руководитель информационно-аналитического отдела, кандидат биологических наук



подпись, дата

Е.Б. Абрамова
28.12.2021

РЕФЕРАТ

Отчёт 99 с., 3 разд., 24 рис., 8 таблиц, 101 источник, 5 отчетных публикаций по теме. РЕГЕНЕРАЦИЯ, КОЖА, РАНЫ, ИШЕМИЗИРОВАННЫЙ ЛОСКУТ, ДИСТРОФИЧЕСКИЙ БУЛЛЕЗНЫЙ ЭПИДЕРМОЛИЗ, ВОСПАЛЕНИЕ, ФИБРОЗ, ФИБРОБЛАСТЫ, КОЛЛАГЕН, ПОЛОВЫЕ КЛЕТКИ, СИНДРОМ ДАУНА, ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ, ГЕМОПОЭТИЧЕСКИЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ, ДИФФЕРЕНЦИРОВКА, LT-HSC, ФЕНОТИП, ЭКСПАНСИЯ.

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

Объекты исследования: кожа мыши, протеинкиназы некроптоза Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1 (RIPK-1) и Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3 (RIPK-3), биологический эквивалент кожи (БЭК), плюрипотентные стволовые клетки (ПСК) человека, примордиальные половые клетки (ППК), ППК-подобные клетки человека, коллаген VII типа (ген *COL7A1*), гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) мыши.

Определены паттерны экспрессии маркеров некроптоза протеинкиназ RIPK-1 и RIPK-3 на различных стадиях раневого процесса в ишемизированной кожной ране мыши;

определены эффекты трансплантации тканеинженерной конструкции «Биологический эквивалент кожи» на ишемизированную кожную рану мыши;

создана панель первичных линий фибробластов от пациентов (ФЭБ) с рецессивным дистрофическим буллезным эпидермолизом (РДБЭ) и проведено их сравнение с контрольными фибробластами от здоровых доноров (ФЗК);

обнаружена взаимосвязь между мутациями и некоторыми фенотипическими признаками ФЭБ. Основываясь на анализе имеющихся данных RNA-seq фибробластов РДБЭ, выполнен анализ экспрессии генов RT-qPCR в полученных клеточных линиях, подтвержден дифференциальный статус ряда генов и выявлены новые;

продемонстрированы нарушения дифференцировки мужских индуцированных ПСК с трисомией по 21 хромосоме (получены от пациента с синдромом Дауна) в направлении ППК;

проведён детальный анализ перспективных направлений исследований в области изучения и применения ГСК; изучены литературные данные по дифференцировке гемопоэтических стволовых клеток, методам фенотипической идентификации ГСК и протоколам экспансии ГСК *ex vivo*. На основе анализа литературы был выбран протокол, показавший наиболее эффективный результат экспансии ГСК *ex vivo*;

оптимизирована панель антител для идентификации и дальнейшей сортировки популяций ГСК; подобраны условия сортировки гемопоэтических стволовых и прогениторных клеток (ГСПК) мыши, проведены пилотные эксперименты по культивированию сортированных ГСПК в культуре *in vitro*.

Полученные результаты вносят значительный вклад в понимание механизмов клеточной дифференцировки и пластичности, реализации генотипа в клеточном фенотипе, регенерации тканей и способов ее стимуляции, а также создают основы для развития новых технологий в биомедицине.

СОДЕРЖАНИЕ

ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ.....	6
ОБЩЕЕ ВВЕДЕНИЕ.....	8
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	10
Раздел 1 Клеточные и молекулярные механизмы морфогенеза эпителиев. Дифференцировочный и морфогенетический потенциал эпителиальных стволовых клеток.....	10
1.1 Репарация в модели длительно незаживающей раны.....	10
1.1.1 Введение.....	10
1.1.2 Материалы и методы.....	12
1.1.3 Результаты и обсуждение.....	19
1.2 Отличительные особенности (сигнатура) дермальных фибробластов пациентов с дистрофическим буллезным эпидермолизом.....	33
1.2.1 Введение.....	33
1.2.2 Материалы и методы.....	34
1.2.3 Результаты и обсуждение.....	41
1.3 Заключение.....	56
1.4 Список использованных источников.....	58
1.5 Отчетные публикации по разделу.....	63
Раздел 2 Исследование механизмов дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток человека, в том числе при помощи методов генетического манипулирования.....	64
2.1 Введение.....	64
2.2 Материалы и методы.....	65
2.3 Результаты и обсуждение.....	70
2.4 Заключение.....	74
2.5 Список использованных источников.....	74
2.6 Отчетные публикации по разделу.....	74
Раздел 3. Гемопоэтические стволовые клетки: идентификация, экспансия и дифференцировка в различных моделях.....	75
3.1 Введение.....	75
3.2 Материалы и методы.....	76
3.3 Результаты и обсуждение.....	80
3.4 Заключение.....	93
3.5 Список использованных источников.....	94
3.6 Отчетные публикации по разделу.....	97
ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	98

ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

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

АФК - активные формы кислорода

БМКП - биомедицинские клеточные продукты

БЭК - биологический эквивалент кожи

ВБЭ - врожденный буллезный эпидермолиз

ВМЕС –эндотелиальные клетки костного мозга

ВФ - волосяной фолликул

ГСПК– гематопозитические стволовые и прогениторные клетки

ИГХ - иммуногистохимия

ИПСК - индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

ИФЭ - интерфолликулярный эпителий

КМ- костный мозг

МСК - мезенхимные стволовые/стромальные клетки

ППК - первичные половые клетки

ПЦР - полимеразная цепная реакция

РНК - рибонуклеиновая кислота

РСОМ - растровая сканирующая оптоакустическая мезоскопия (метод)

СД – синдром Дауна

ФЗК/ФНС - первичные дермальные фибробласты от здоровых пациентов

ФСБ - фосфатно-солевой буферный раствор

ФЭБ/ФЕВ - первичные дермальные фибробласты от пациентов с РДБЭ/RDEB

чиПСК - человеческие индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭСК - эмбриональные стволовые клетки

ЭТ - эмбрионидные тельца

BSA – бычий сывороточный альбумин

СМР – Common Myeloid Progenitor cell

CRISPR/Cas9 – clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein 9

FACS – fluorescent-activated cell sorting (флуоресцентно -активированная клеточная сортировка)

FCS – fetal bovine serum (фетальная сыворотка телят)

FN - фибронектин
Gel - желатин
GMP – Granulocyte-Monocyte Progenitor cell
G-CSF – колониестимулирующий фактор гранулоцитов
HSC, ГСК – гематопозитические стволовые клетки
IPSX – insulin-transferrin-selenium-ethanolamine
LSK – Lin- c-Kit⁺ Sca-1⁺ мышинные клетки
LT—HSC - long-term HSC – долгосрочно-репопулирующие ГСК
ST – HSC –short-term HSC – краткосрочно- репопулирующие ГСК
MACS – магнитно-активированная клеточная сортировка
MEP – Megakaryocyte–Erythroid Progenitor cell
MPP – Multipotent Progenitor cell
PB – периферическая кровь
PLL –поли-L- лизин
PVA – поливиниловый спирт
RDEB - рецессивная форма буллезного дистрофического эпидермолиза (РДБЭ)
RIPK-1 (англ. Receptor interacting protein kinase-1) – маркер некроптоза
RIPK-3 (англ. Receptor interacting protein kinase-3) – маркер некроптоза
RNP – рибонуклеопротеин
SCF – фактор стволовых клеток
SPLSK – боковая популяция LSK
SR1 – белок StemRegnin1
S/P/G –стрептомицин-пенициллин- глутамин
TGF- β – трансформирующий ростовой фактор - β
TPO – тромбопоэтин
VPA – вальпроевая кислота

ОБЩЕЕ ВВЕДЕНИЕ

Изучение механизмов дифференцировки стволовых клеток, реализации клеточной пластичности и участия этих процессов в морфогенезе и регенерации тканей является одной из центральных задач современной биологии развития.

Исследование процессов регенерации тканей, в том числе кожи, имеет безусловную важность, как с точки зрения фундаментальной науки, так и прикладных разработок. В частности, идентификация новых механизмов регуляции морфогенеза и регенерации с участием белков некроптоического комплекса актуальна в плане фундаментальных исследований регуляции морфогенеза и межклеточных взаимодействий и, в тоже время, может наметить новые мишени и подходы для лечения патологий. Исследование реализации генотипа в клеточном фенотипе, а также влияния патологического генотипа на реализацию программы клеточной дифференцировки особенно актуально для врожденных патологий, лечение многих из которых в настоящее время носит лишь симптоматический характер. В то же время генетический характер заболеваний и современное развитие генно-инженерных и клеточных технологий требует от исследователей в области регенеративной медицины разработки современных модельных систем для изучения патогенеза и создания методов специфического воздействия на мутации. Это свидетельствует об актуальности и фундаментальной значимости проблемы, лежащей в основе исследования, и подходов к изучению механизмов патологий на основе клеточного моделирования. Одной из самых востребованных моделей в настоящее время является модель дифференцировки ПСК человека, в том числе в направлении половых клеток. Фундаментальные процессы дифференцировки первичных половых клеток (ППК) человека в раннем эмбриогенезе плохо изучены, как в связи с недоступностью работы на человеческих эмбрионах, так и с отсутствием корректных клеточных моделей раннего развития ППК *in vitro*. Исходя из этого, представляется весьма актуальным создание корректной клеточной модели, отражающей дифференцировку плюрипотентных стволовых клеток человека в ППК.

Целью работы является определение ключевых регуляторов (факторов) клеточной дифференцировки и морфогенеза, пластичности и перепрограммирования в моделях развития и регенерации. На данном этапе ставились следующие задачи: (1) определить влияние трансплантации тканеинженерной конструкции «Биологический эквивалент кожи» (БЭК) на динамику процесса ранозаживления в модели ишемизированной кожной раны у мыши; (2) определить паттерны экспрессии маркеров некроптоза протеинкиназ RIPK-1 и RIPK-3 на различных стадиях раневого процесса в ишемизированной кожной

ране мыши; (3) изучить особенности дифференцировки ПСК в мезодерму и ее производные; (4) провести анализ перспективных направлений исследований в области изучения и применения ГСК; (4) отработать методы фенотипической идентификации ГСК в экспериментах на мышах. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности и актуальности выбранного направления работ.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Раздел 1 Клеточные и молекулярные механизмы морфогенеза эпителиев. Дифференцировочный и морфогенетический потенциал эпителиальных стволовых клеток

1.1 Репарация в модели длительно незаживающей раны

1.1.1 Введение

Изучение процессов регенерации тканей, в том числе кожи, имеет безусловную важность, как с точки зрения фундаментальной науки, так и прикладных разработок. В норме процесс регенерации кожного повреждения завершается полным восстановлением структуры и функций кожи, однако, в случае присоединения инфекции, гипоксии или иммунной дисфункции, рана может приобрести статус длительно незаживающей [1], характеризующейся избыточным воспалением, повышенным уровнем протеолитической активности и уменьшением отложения матрикса [2]. Регенерация длительно незаживающей раны происходит с теми же стадиями, что и ранозаживление в норме, однако, со значительной задержкой в фазе воспаления [3]. К факторам, вызывающим хронизацию раны, относят диабет, сосудистую недостаточность, истощение, пожилой возраст, местную инфекцию, а также некроз вследствие сдавливания [3, 4]. В зависимости от генеза заболевания выделяют такие типы длительно незаживающих ран, как пролежни, диабетические язвы, а также ишемизированные длительно незаживающие раны. Такие раны трудно поддаются консервативной терапии.

Одним из перспективных направлений в лечении длительно незаживающих ран является трансплантация биомедицинских клеточных продуктов (БМКП) типа кожных эквивалентов в раневое ложе. Этот способ лечения способствует эффективному ремоделированию грануляционной ткани и устранению косметического дефекта, который является одним из последствий хронизации ран [5]. К лечению длительно незаживающих ран на сегодняшний день отсутствует единый терапевтический подход, что говорит о том, что механизмы регенерации в длительно незаживающих ранах плохо исследованы [6].

Известно, что помимо репаративных процессов неотъемлемой частью ранозаживления является запрограммированная клеточная гибель. Так путем апоптоза в ране происходит элиминация клеток, выполнивших свою функцию в ходе раневого заживления, например, таких, как нейтрофилы, макрофаги и фибробласты [7]. Нарушения этого процесса также вызывают отклонения в регенерации кожи, что может приводить к приобретению раной статуса длительно незаживающей, а также к серьезным косметическим дефектам [8]. Нарушения, связанные с процессом апоптоза, являются

одной из причин аномалий рубцевания [9]. Кроме апоптоза, есть и иные типы запрограммированной клеточной гибели, такие, как некроптоз [10]. Знания о роли этого процесса и его компонентов в ранозаживлении на данный момент ограничены. Вместе с тем есть работы, указывающие на возможное участие протеинкиназ некроптоза Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1 (RIPK-1) и Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3 (RIPK-3) в развитии рака почки, а также псориаза – патологических состояний, ассоциированных с неконтролируемой пролиферацией и дедифференциацией эпителиальных клеток [11, 12] – процессов, лежащих в основе ранозаживления. Следовательно, есть основания предполагать, что компоненты некроптоза могут участвовать в процессах, сопутствующих регенерации ишемизированной длительно незаживающей раны.

Идентификация новых механизмов регуляции морфогенеза и регенерации кожи и придатков с участием белков некроптотического комплекса актуальна в плане фундаментальных исследований биологии кожи и, в то же время, может наметить новые мишени и подходы для лечения патологий кожи.

В рамках данной работы был проведен эксперимент по трансплантации БМКП – тканеинженерной конструкции «Биологический эквивалент кожи» (БЭК), представляющий собой эпидермально-мезенхимный пласт на носителе, а также определены паттерны экспрессии маркеров некроптоза протеинкиназ RIPK-1 и RIPK-3 на различных стадиях раневого процесса в ишемизированной кожной ране мыши.

1.1.2 Материалы и методы

1.1.2.1 Клеточные культуры

Для приготовления биологического эквивалента кожи в работе были использованы клеточные культуры кератиноцитов и мезенхимальных стволовых клеток (МСК), выделенные из кожи и жировой ткани мышей линии Balb/c. Эвтаназию животных проводили путем шейной дислокации. Клетки культивировали в условиях насыщенной влажности при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂, при нормальном атмосферном давлении в CO₂ – инкубаторе (Sanyo, Япония).

Кератиноциты. Из новорожденных и трехдневных мышей вырезали кожные лоскуты, после чего трижды промывали в растворе Хэнкса (ПанЭко, Россия) с гентамицином в концентрации 80 мкг/мл. Затем кожные лоскуты инкубировали в 0,2 %-ом растворе диспазы на DMEM (ПанЭко, Россия) в течение 12 ч при 4°C. После ферментации эпидермис пинцетом отделяли от дермы по линии базальной пластинки. Полученные фрагменты эпидермиса промывали в фосфатно-буферном физиологическом растворе Дульбекко (DPBS) (ПанЭко, Россия) в течение 10 минут. Для дезагрегации клеток фрагменты эпидермиса помещали в 0,25% раствор трипсина в фосфатном солевом буфере (англ. phosphate-buffered saline, PBS) и инкубировали при 36°C в течение 10-15 мин. Далее трипсин ингибировали раствором сыворотки крупного рогатого скота (Nucloп, США) добавляя её в объёме 2% от общего объёма жидкости, затем эпидермис разбивали интенсивным пипетированием. Полученную неоднородную взвесь пропускали через 100 микронное нейлоновое сито, после чего осаждали центрифугированием. Осадок суспендировали в среде для культивирования кератиноцитов следующего состава: DMEM/F-12 (ПанЭко, Россия) (1:1) с 10% фетальной бычьей сывороткой (ФБС) (Nucloп, США), 5 мкг/мл инсулина (Sigma, США), 10-6М изопротеренола (Sigma, США), 5 мкг/мл трансферрина (Sigma, США), 10 нг/мл EGF (Sigma, США). Далее суспензию кератиноцитов высевали в предварительно покрытые раствором коллагена пластиковые культуральные флаконы (Costar, США).

Мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани. Фрагменты жировой ткани извлекали из мышей и промывали в растворе Хэнкса (ПанЭко, Россия) с гентамицином в концентрации 80 мкг/мл. Далее жировую ткань механически измельчали, после чего помещали в 0,2% раствор коллагеназы. Ферментацию проводили в течение 90 мин при 37°C, затем центрифугировали. Клеточный осадок инкубировали 10 мин при комнатной температуре в буфере для лизиса эритроцитов. После серии центрифугирований клеточную суспензию фильтровали через 100 мкм нейлоновый фильтр для удаления дебриса. После указанных манипуляций клеточную суспензию центрифугировали,

ресуспендировали в ростовой среде DMEM (ПанЭко, Россия) и высевали в стерильный культуральный флакон (Costar, США).

Изготовление биологического эквивалента кожи. В процессе изготовления БЭК коллаген-гиалуроновую пленку, использованную в качестве носителя для клеток, извлекали из упаковки в стерильных условиях, переносили в чашки Петри, после чего разрезали на кусочки размером 4×4 см. Культуру МСК жировой ткани снимали с культурального флакона при помощи смеси растворов трипсина в концентрации 0,05% в растворе Версена (ПанЭко, Россия), центрифугировали и ресуспендировали в культуральной среде α -MEM (ПанЭко, Россия), содержащей 10% ФБС. Клеточную суспензию заливали в культуральную чашку Петри с подготовленной пленкой, исходя из соотношения 0,2*10⁵ кл/см². После чего клетки инкубировали в стандартных условиях, при 37°C, 5% CO₂ в течение суток. Далее выделенные из мышей кератиноциты были сняты с поверхности культурального флакона раствором 0,05% трипсина в растворе Версена (ПанЭко, Россия), ресуспендированы в среде для кератиноцитов CNT07 (CELLnTEC, Швейцария) и высеяны на поверхность носителя с МСК. Культивирование БЭК производили на среде CNT07 (CELLnTEC, Швейцария). Клетки на носителе были готовы к этапу переноса в рану через 2-3 суток.

1.1.2.2 Хирургические манипуляции

Моделирование ишемизированной длительно незаживающей раны. Работа была проведена на самцах линии Balb/c весом 18-20 г. Животные были поделены на группы «контроль», «носитель» и «БЭК». Удаление шерсти в области операционного поля проводили кремом для депиляции (Veet, Канада). Перед манипуляциями животных вводили в состояние общего наркоза при помощи препарата авертин. Эвтаназию животных проводили с помощью передозировки наркоза. После депиляции кремом мышам наносили через трафарет прямоугольник 30×10 мм, по центру которого вырезали полнослойное циркулярное отверстие диаметром 5-7 мм. Затем по линиям, начерченным с помощью трафарета, мышам наносили полнослойные параллельные разрезы кожи и отсекали от лоскута все крупные сосуды (рисунок 1.1). Далее останавливали кровотечение с помощью нанесения на лигированные сосуды перекиси водорода, после чего перекись водорода трёхкратно вымывали с помощью стерильного 0,1% раствора гентамицина на DPBS (ПанЭко, Россия). Затем на края лоскута вворачивали внутрь и наносили по 6 швов с каждой стороны от позвоночника. После наложения швов рану промывали трёхкратно с помощью стерильного 0,1% раствора гентамицина на DPBS (ПанЭко, Россия), после чего накладывали пластырь (TegadermTM, Германия).

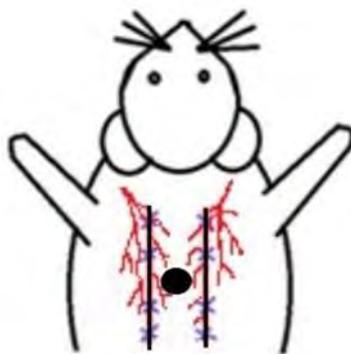


Рисунок 1.1 - Схема моделирования ишемизированной длительно незаживающей раны

Трансплантация БЭК. Трансплантация носителя и БЭК в соответствующих группах проводилась путем аппликации этих материалов на раневое ложе животных. Далее рану промывали трёхкратно с помощью стерильного 0,1% раствора гентамицина на DPBS, после чего накладывали пластырь (Tegaderm™, Германия).

Послеоперационный уход. На 3-5 сутки мышам групп «контроль», «носитель» и «БЭК» промывали раны при помощи стерильного 0,1% раствора гентамицина на DPBS (ПанЭко, Россия) под общим наркозом. Для введения мышей в медикаментозный сон использовали препарат «Изофлуран» (Baxter, США). Наркотизацию мышей осуществляли с помощью прибора SomnoSuite (Kent Scientific).

Животных выводили из эксперимента на 5, 7, 14, 21 сутки.

1.1.2.3 Пробоподготовка материала

Биоматериал, предназначенный для гистологических исследований, фиксировали в 10% формалине (Biovitrum, Швеция). Биоматериал, предназначенный для иммуногистохимических исследований, помещали в OCT Cryomount (HistoLab, Швеция) и замораживали в жидком азоте.

1.1.2.4 Гистологическое исследование

Для гистологических исследований использовали материал, зафиксированный в формалине. Материал отмывали от формалина в проточной воде на протяжении 2 часов, затем дегидратировали с помощью батареи спиртов – 70°, 90°, 100° – по 1 часу; ксилол – 15 минут; Гистомикс (Biovitrum, Швеция) (2 смены при температуре +37°C) – по 1.5 часа, после чего заключали в парафиновый блок.

Гистологические срезы толщиной 6-7 мкм получали на микротоме Microm HM 430 (ThermoFisher, США).

Для окрашивания срезы кожи депарафинировали в ксилоле и регидратировали при помощи батареи спиртов: 100°, 90° и 70° по две смены. Затем препараты были окрашены

гематоксилин-эозином и трихромом по Маллори. Заключали препараты при помощи синтетической среды «BioMount» (Biovitrum, Швеция).

1.1.2.5 Иммуногистохимическое окрашивание

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 5%-ю сыворотку животного-производителя вторичных антител, после чего инкубировали с первичными антителами на протяжении ночи. Далее, после трехкратного промывания, на препараты наносили вторичные антитела на два часа, затем, после промывания в PBS наносили раствор DAPI и заключали в среду BrightMount/Plus (Abcam, Британия).

Препараты просматривали и фотографировали при помощи микроскопов моделей BZ-9000E (Keyence, Япония) и IX73 (Olympus, Япония).

Список использованных в работе первичных и вторичных антител представлены в таблице 1.1 и таблице 1.2.

Таблица 1.1 - Используемые первичные антитела

Антиген	Каталожный номер	Производитель	Разведение	Подтип
Krt14	Ab197893	Abcam (Британия)	1:200	Моноклональные кролика
CD31	Ab56299	Abcam (Британия)	1:100	Моноклональные крысы
RIPK-1	HPA015257	Sigma, (США)	1:100	Поликлональные кролика
RIPK-3	AV31513	Sigma, (США)	1:500	Поликлональные кролика
Ki-67	Ab16667	Abcam (Британия)	1:50	Моноклональные кролика. Клон [SP6]
Vimentin	Ab24525	Abcam (Британия)	1:1000	Поликлональные курицы

Таблица 1.2 - Используемые вторичные антитела

Антиген, подтип	Флюорофор	Каталожный номер	Производитель	Разведение
Goat anti-Chicken (H+L) IgG	AlexaFluor 488	Ab150173	Abcam (Британия)	1:500
Goat Anti-Rat (H+L) IgG	AlexaFluor 488	Ab150157	Abcam (Британия)	1:600
Donkey anti-Rabbit IgG (H+L)	AlexaFluor 488	A-21206	Invitrogen (США)	1:500
Donkey anti-Rabbit IgG (H+L)	Alexa Fluor 594	A-21207	Invitrogen (США)	1:500

1.1.2.6 Выявление гибнущих клеток

Для выявления погибших клеток проводили детекцию двунитевых разрывов ДНК при помощи методики TUNEL (G3250, Promega, США) согласно инструкции производителя. Затем ядра докрашивали раствором DAPI и заключали в среду BrightMount/Plus (Abcam, Британия).

1.1.2.7 Выделение РНК, обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ)

Кусочки кожи мышей помещали в ступку с жидким азотом и измельчали при помощи пестика. Далее гомогенат переносили в ёмкость с QIAzol. Выделение РНК проводили с помощью набора miRNeasy Mini Kit для выделения тотальной РНК и микроРНК из клеток и тканей (Qiagen, Нидерланды) согласно рекомендациям фирмы производителя. К выделенной тотальной РНК добавляли 1-5 мкл ДНКазы I (Thermo Scientific, США) и равный количеству общей смеси объем 10x буфера для ДНКазы I (Thermo Scientific, США). Образцы инкубировали 60 мин при 37°C. Далее добавляли равный количеству ДНКазы объем ЭДТА (Thermo Scientific, США), пробы инкубировали 10 мин при 70°C. К образцам добавляли равный общему количеству смеси объем 5М раствора ацетата аммония (Sigma, США) и 3 объема 100% этанола (Sigma, США). Осаждение проводили в течение ночи при -70°C. После размораживания образцов осуществляли центрифугирование на максимальных скоростях в течение 20 мин. Супернатант удаляли, осадок просушивали, затем добавляли 300 мкл 70% этанола (Sigma, США). Образцы центрифугировали 4 мин на максимальных скоростях. Супернатант удаляли, осадок просушивали. Осадок ресуспендировали в 25 мкл воды свободной от ДНКаз/РНКаз (Sigma, США). Измерение концентрации РНК проводили на BioPhotometer

plus (Eppendorf, Германия). Образцы хранили при -70°C . После пересадки РНК проводили синтез кДНК с помощью набора для обратной транскрипции MMLV RT kit (Евроген, Россия) с олиго(dT)праймером согласно протоколу, предоставленному производителем. ПЦР анализ с детекцией в реальном времени проводили с применением смеси для ПЦР qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия) по инструкциям производителя на приборе LightCycler 96 (Roche, Швейцария). Для ПЦР-РВ использовали прямой праймер с последовательностью ACACGGCACTCCTTGGTATC и обратный праймер CTTGAGGCAGTAGTTCTTGGTG.

1.1.2.8 Растровая сканирующая оптоакустическая мезоскопия

Исследование динамики процесса заживления раны было выполнено с помощью мезоскопа RSOM Explorer P50 производства iThera Medical (Германия). RSOM оснащен наносекундным импульсным 532 нм лазером (2.5 нс, 1 кГц, 250 мкДж). Возбуждаемый в биологической ткани ультразвуковой сигнал детектировался широкополосным датчиком с центральной частотой 50 МГц. Непосредственно перед визуализацией раневого ложа каждое животное было анестезировано с помощью ингаляционного наркоза смесью изофлурана и кислорода в специальной камере, затем перенесено на подогреваемый столик (37°C) мезоскопа и фиксировано согласно протоколу производителя. Источник лазерного излучения и ультразвуковой датчик были расположены по центру раны несколько выше кожного покрова. Промежуток между поверхностью тела животного и датчиком был заполнен гелем для ультразвуковых исследований. Для каждого животного в каждой временной точке (3, 5, 7, 10, 14 и 21 день после хирургии) была получена серия изображений разного поля зрения (12x12 мм, 8x8 мм, 6x6 мм, 4x4 мм). Обработка изображений была проведена с помощью ПО rLabs_v1.19.04. Сигнал наколенный датчиком был разделен на два диапазона: низкочастотный (1–33 МГц) и высокочастотный (33–99 МГц). Данный подход помог разделить объекты по размеру. Так низкочастотный сигнал представляет объекты большего размера (красный цвет на изображениях), высокочастотный – объекты меньшего размера (зеленый цвет). Последующий анализ интенсивности сигнала в каждом диапазоне был выполнен с помощью свободного ПО Fiji.

1.1.2.9 Морфометрический анализ

Морфометрический анализ проводили с помощью программы ImageJ. Коэффициент сглаживания определяли соотношением средней толщины зоны ремоделирования ткани в раневом ложе к средней толщине краев ран. Подсчёт количества RIPK-3+ клеток среди Vimentin+ проводили на 6-9 полях зрения для каждого животного. Для проведения этого исследования случайно выбрали ишемизированные длительно

незаживающие раны троих животных без лечения. Поля зрения и срезы для морфометрического анализа выбирались случайно.

1.1.2.10 Статистический анализ

Статистический анализ проводили при помощи программ Origin, Excel а также языка программирования R в среде R studio. Для сравнительного анализа данных использовали дисперсионный анализ по Краскелу-Уоллису. Сравнения между группами проводили с помощью теста Данна. Различия были определены при 0,05 уровне значимости (p).

1.1.3 Результаты и обсуждение

1.1.3.1 Характеристика раневого процесса методами гистологии и иммуногистохимии

Гистологический анализ показал, что фаза воспаления в вышеописанной модели длится до 5 суток с момента нанесения раны. На этой стадии раневое ложе мышей всех групп характеризовалось инфильтрацией воспалительными клетками. Далее следовала фаза пролиферации – 7-14 сутки ранозаживления. Во время этой стадии было отмечено постепенное формирование грануляционной ткани в раневом ложе. На 21 сутки наступала фаза реэпителизации и ремоделирования рубца. Большинство ран животных всех групп характеризовалось зрелым рубцом и наличием сформированного эпителия. Проведенный гистологический анализ позволил подробно охарактеризовать и сравнить состояние ран животных всех групп согласно стадиям ранозаживления. В качестве критериев оценки эффективности лечения раны при помощи БМКП были предложены следующие параметры: васкуляризация раневого ложа, инфильтрация воспалительными клетками раневого ложа, состояние зоны ремоделирования ткани в раневом ложе, а также количество ВФ по краям раны [13].

Стадия воспаления.

Как уже было сказано выше, задержка раневого процесса на фазе воспаления и чрезмерный воспалительный ответ лежат в основе приобретения раной статуса длительно незаживающей [14]. Избыточная инфильтрация раневого ложа нейтрофилами является ключевым фактором в развитии хронического воспаления и может рассматриваться в качестве гистологического биомаркера длительно незаживающих ран [4]. На 5 сутки раневое ложе многих мышей из группы «контроль» было заполнено воспалительным инфильтратом. Также была отмечена миграция воспалительных клеток в жировую ткань и соединительнотканную фасцию под раневым ложем и по краям раны. Кроме того, была обнаружена существенная деградация эпидермиса и дермы по краям раны, а также участки погибших клеток (рисунок 1.2 б). Рана многих мышей из группы «носитель» имела схожую гистологическую картину (рисунок 1.2 в). В то же время, у большинства мышей из группы «БЭК» была отмечена умеренная инфильтрация раневого ложа, а также жировой ткани и фасции всей раневой области воспалительными клетками (рисунок 1.2 г). Статистический анализ показал тенденцию к снижению площади воспалительного инфильтрата раневого ложа мышей группы «БЭК» (рисунок 1.2 а). Исходя из этого, можно сделать предположение об иммуномодулирующем эффекте БЭК благодаря наличию в его составе МСК.

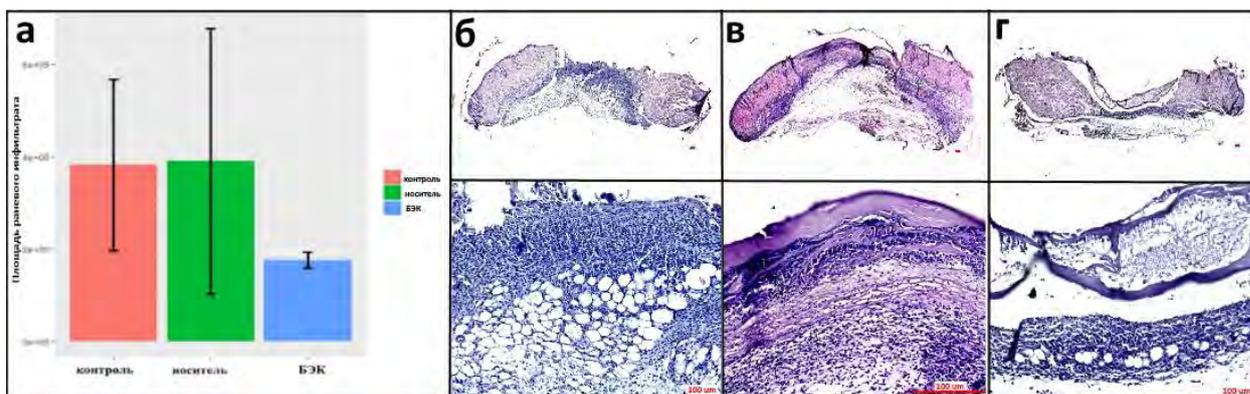


Рисунок 1.2 - Регенерация длительно незаживающей раны
Стадия воспаления, а) график, иллюстрирующий сравнение площади воспалительного инфильтрата в группах «контроль», «носитель» и «БЭК», с планками погрешностей. Состояние раны мыши на 5 сутки: б) группа «контроль», в) группа «носитель», г) группа «БЭК»; окрашивание гематоксилин-эозином, масштабные отрезки – 100 мкм

Стадия пролиферации

Грануляционная ткань. В этот период происходило созревание грануляционной ткани у мышей всех групп. Однако был отмечен ряд существенных различий в формировании грануляционной ткани у мышей из группы «контроль» и мышей из группы «БЭК».

Как известно, длительно незаживающая рана характеризуется нарушениями формирования грануляционной ткани по разным причинам. Например, сверхпродукция нейтрофилами АФК вызывает повреждения ВКМ [4]. Также, как было указано выше, предполагают, что нормальному рубцеванию препятствует TNF- α , индуцирующий активность коллагеназы [15-17].

В группе «контроль», имитирующей длительно незаживающую рану без лечения, у большинства животных на гистологических препаратах ран была отмечена большая разница между и толщиной дермы по краям и толщиной зоны ремоделирования ткани по центру раны. Края раны значительно возвышались над раневым ложем на 7 сутки эксперимента (рисунок 1.3 б). В группе «носитель» наблюдалась схожая картина (рисунок 1.3 в). В группе «БЭК» на 7 сутки у большинства животных толщина зоны ремоделирования ткани в раневом ложе практически достигала краев раны (рисунок 1.3 г).

На 14 сутки у многих животных из группы «контроль» толщина зоны ремоделирования ткани всё ещё была значительно меньше толщины дермы краев раны (рисунок 1.3 е), в группе «носитель» толщина зоны ремоделирования ткани частично, или полностью достигала краев раны (рисунок 1.3 ж), а в группе «БЭК» у большинства животных зона ремоделирования ткани полностью заполняла раневое ложе по ширине и высоте (рисунок 1.3 з). Морфологически середина раны у мышей группы «контроль» на 14

сутки характеризовалась скудным количеством ткани, а в группах «носитель» и «БЭК» - обильным, грануляционная ткань в группе «БЭК» отличалась хорошо визуализируемыми волокнами. Для описания эффективности лечения при трансплантации БЭК в отношении влияния на грануляции, было введено понятие «коэффициент сглаживания», который определяет отношение толщины зоны ремоделирования ткани раневого ложа по отношению к толщине дермы краев ран. Согласно проведенному анализу, в группе «БЭК» коэффициент сглаживания был достоверно выше, чем таковой в группах «носитель» и «контроль» на 7 сутки, что свидетельствовало об эффективности трансплантации БЭК в устранении дефекта грануляционной ткани, которая может привести к косметическим проблемам (рисунок 1.3 а). На 14 сутки коэффициенты сглаживания в группах «БЭК» и «носитель» были достоверно выше, чем в группе «контроль», но при том достоверно не отличались друг от друга (рисунок 1.3 д) [18, 19].

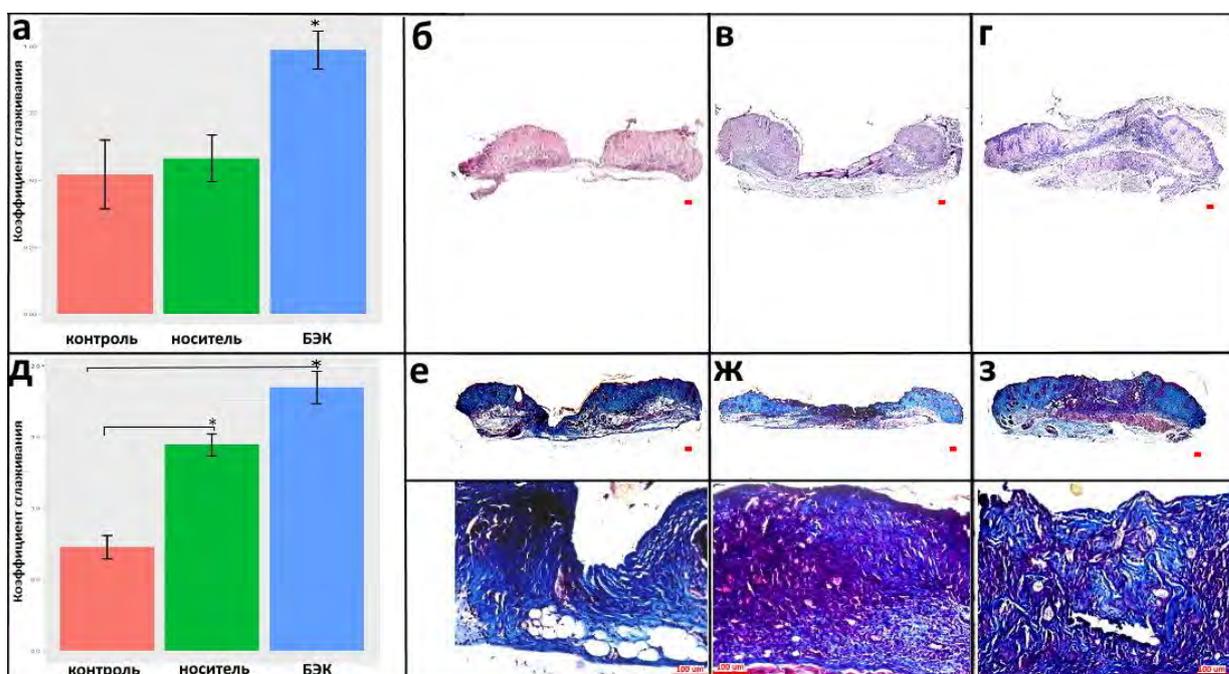


Рисунок 1.3 - Стадия пролиферации

Графики, иллюстрирующие сравнение коэффициента сглаживания в группах «контроль», «носитель» и «БЭК» на а) 7 и д) 14 сутки с указанием планок погрешностей, * – уровень значимости ($p \leq 0.05$). Состояние раны мыши на 7 сутки: б) группа «контроль», в) группа «носитель», г) группа «БЭК», окрашивание гематоксилин-эозином. Состояние раны мыши на 14 сутки: е) группа «контроль», ж) группа «носитель», з) группа «БЭК», окрашивание по Маллори. Масштабные отрезки – 100 мкм

Состояние ткани по краям ран. ВФ: гибель и регенерация. На 7 сутки у многих животных всех групп продолжались дегенеративные изменения ткани краев ран. Ввиду индивидуальных различий между темпами регенерации, у мышей всех групп наблюдались различные варианты состояния краев ран на данную временную точку: умеренная

дегенерация ИФЭ, дермы и ВФ по краям раны; массовая гибель данных структур с дальнейшим формированием струпа; частичная регенерация ткани. В нашем эксперименте были отмечены определенные различия в динамике процессов дегенерации, гибели и регенерации ВФ у животных групп «контроль» и «БЭК». Так, у многих мышей из группы «контроль» была отмечена массовая гибель ВФ по краям раны. Клетки ВФ характеризовались выраженными дегенеративными изменениями, а также кариолизисом (рисунок 1.4 б). В то же время, в группе «БЭК» многие ВФ, расположенные, по краям ран имели либо нормальную морфологию, либо характеризовались умеренными признаками дегенерации (рисунок 1.4 г). Среднее число ВФ на край раны в группе «БЭК» демонстрировало увеличение по сравнению с группой «контроль», что может свидетельствовать о том, что БЭК способствует сохранению ВФ, либо ускоряет процесс их регенерации (рисунок 1.4 а).

На 14 сутки большинство ран содержит ВФ, характеризующиеся нормальной морфологией, и их количество достоверно не отличалось во всех трех группах, что свидетельствует о том, что темпы регенерации во всех группах сравнялись (рисунок 1.10з)

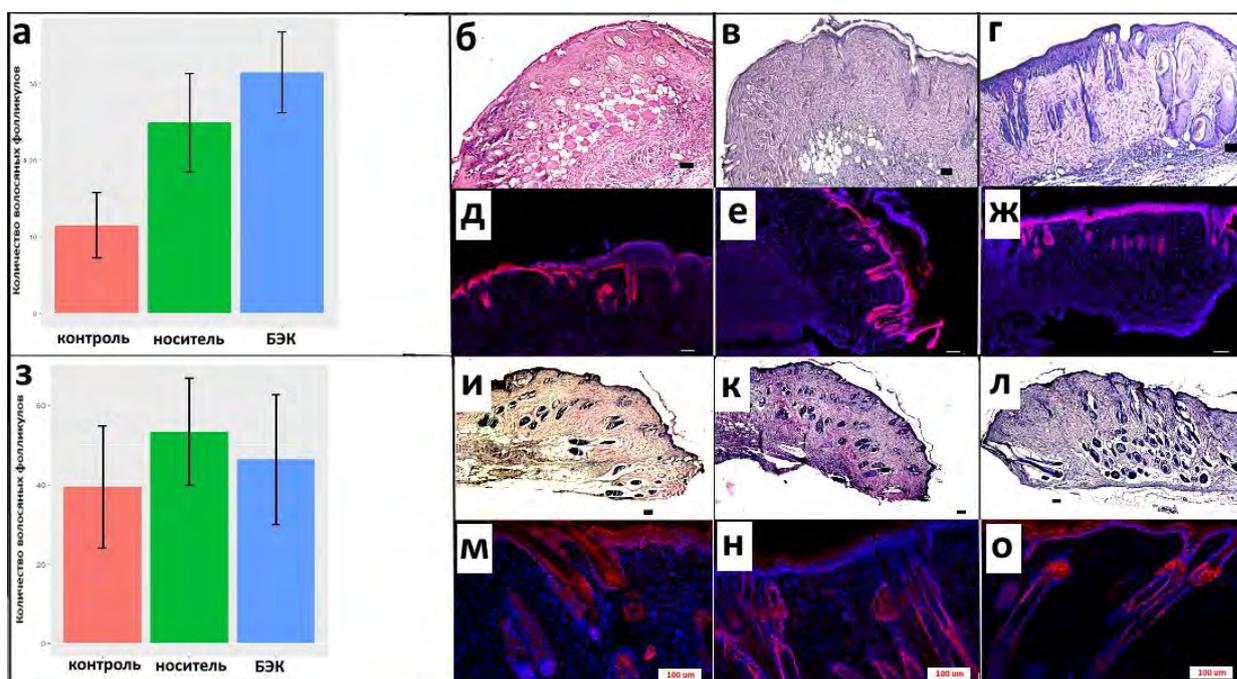


Рисунок 1.4 - Регенерация длительно незаживающей раны, стадия пролиферации
Графики, иллюстрирующие сравнение среднего числа ВФ на край раны в группах «контроль», «носитель» и «БЭК» на а) 7 сутки з) на 14 сутки с указанием планок погрешностей. Состояние края раны мыши, 7 сутки, окрашивание гематоксилин-эозином: (б) группа «контроль», в) группа «носитель» г) группа «БЭК»); окрашивание антителами к Krt14: (д) группа «контроль», е) группа «носитель», ж) группа «БЭК»), ядра докрашены DAPI; край раны мыши, 14 сутки, окрашивание гематоксилин-эозином: (и) группа «контроль», к) группа «носитель», л) группа «БЭК»); окрашивание антителами к Krt14: (м) – группа «контроль», н) – группа «носитель», о) – группа «БЭК»), ядра докрашены DAPI. Масштабные отрезки 100 мкм

Интенсивность ангиогенеза. Количественный анализ показал, что на 7 сутки достоверного различия между плотностью сосудов в раневом ложе у мышей во всех трех группах обнаружено не было, следовательно, БЭК не влияет на ангиогенез (рисунок 1.5).

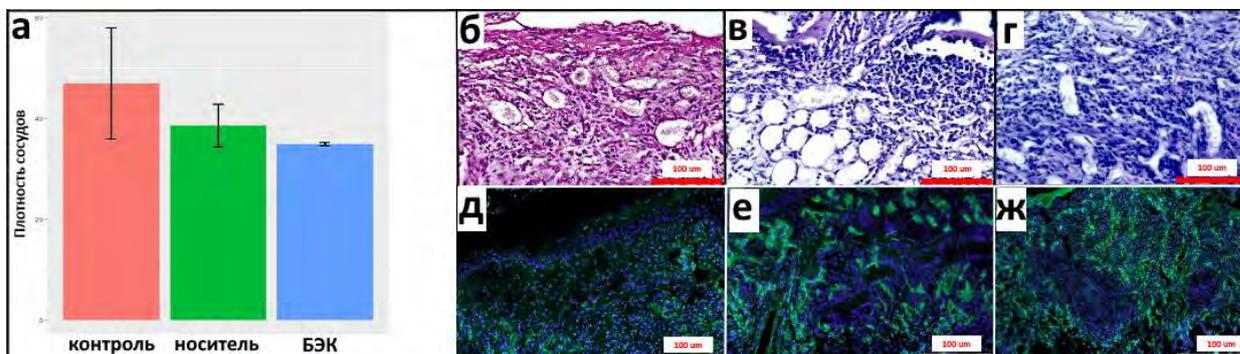


Рисунок 1.5 - Регенерация длительно незаживающей раны, стадия пролиферации а) график, иллюстрирующий сравнение плотности сосудов в раневом ложе мышей из групп «контроль», «носитель» и «БЭК» с указанием планок погрешностей; состояние раневого ложа мыши, 7 сутки, окрашивание гематоксилин-эозином: б) группа «контроль», в) группа «носитель», г) группа «БЭК»); окрашивание антителами к CD31: д) группа «контроль», е) группа «носитель», ж) группа «БЭК»), ядра докрашены DAPI. Масштабные отрезки – 100 мкм

Ремоделирование рубца и реэпителизация.

На 21 день большинство ран животных всех групп характеризовались формированием рубца и реэпителизацией (рисунок 1.6). В рубцовой ткани многих мышей было отмечено преобладание волокон над клеточным компонентом, а также наблюдались ВФ в фазе зрелого анагена, из чего можно сделать вывод о полной завершенности процесса регенерации раны. Однако у некоторых мышей в раневом ложе клеточный компонент преобладал над волокнами, а также была отмечена инфильтрация воспалительными клетками, что говорит о незавершенности процесса ранозаживления. Оба варианта ранозаживления были отмечены у мышей всех трех групп. Таким образом, темпы регенерации у мышей всех трех групп на 21 сутки уравнивались.

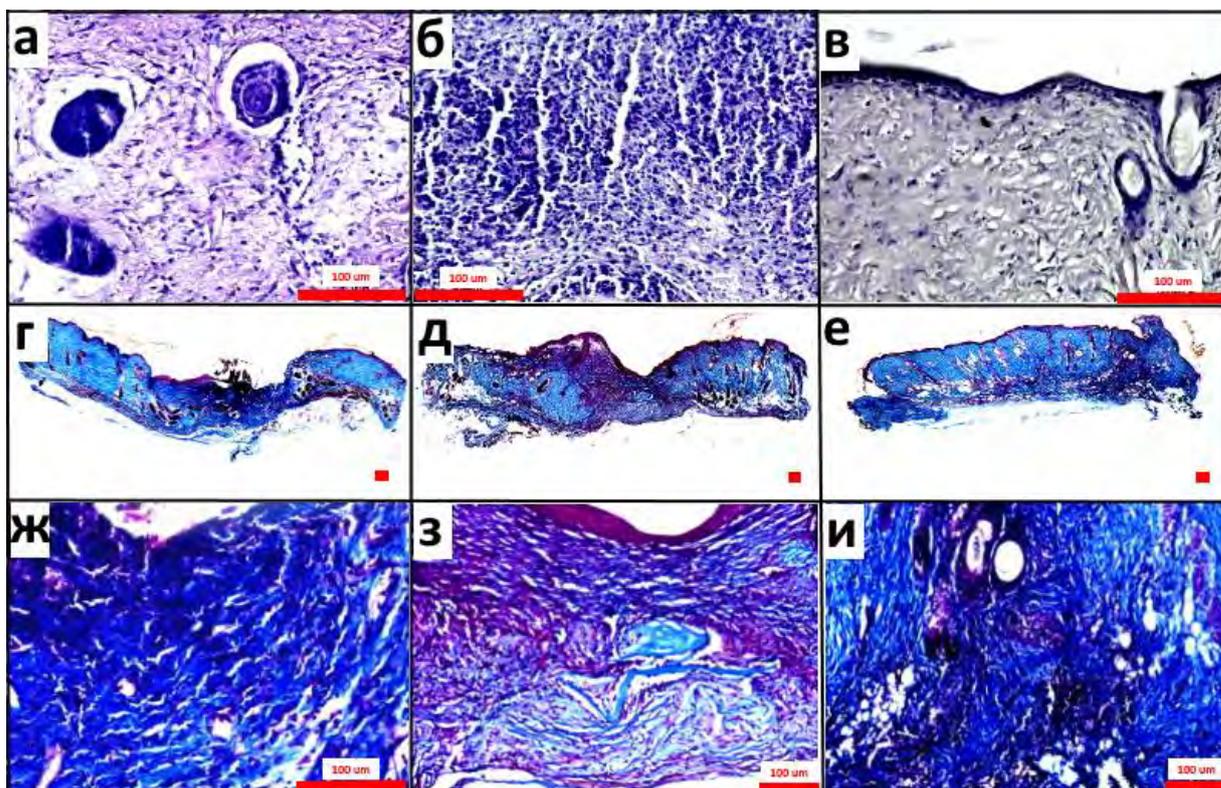


Рисунок 1.6 - Регенерация длительно незаживающей раны. Стадия ремоделирования рубца и реэпителизации

Состояние раневого ложа мыши, 21 сутки, окрашивание гематоксилин-эозином: а) зрелый рубец с ВФ, группа «контроль», б) инфильтрация воспалительными клетками, преобладание клеточного компонента над волокнами, группа «носитель», в) зрелый рубец с ВФ, группа «БЭК»; рана мыши, 21 сутки, окрашивание по Маллори: г), ж) группа «контроль», д), з) группа «носитель», е), и) группа «БЭК». Масштабные отрезки – 100 мкм

1.1.3.2 Характеристика раневого процесса методом растровой сканирующей оптоакустической мезоскопии

РСОМ является новейшей неинвазивной методикой, которая позволяет получать изображения в высоком разрешении и является удобной для проведения исследований различных состояний кожи. Оптоакустическая мезоскопия состоит в детекции ультразвуковых волн, которые создаются в ткани в ответ на пульсирующее освещение лазером. Для проведения РСОМ, осуществляется сканирование интересующего участка кожи при помощи датчика параллельно с освещением пучком оптических волокон. Оптоакустические волны, генерированные в ткани в ответ на пульсирующее освещение, фиксируются; полученное изображение представляет собой трехмерное распространение абсорбированного света в коже. Реконструированные изображения демонстрируют распределение меланина и гемоглобина в эпидермисе и дерме, позволяющее получать изображение микроваскуляторной системы кожи на глубине до 1-2 мм [20].

Поскольку РСОМ успешно используется в исследованиях таких патологий кожи, как псориаз, или атопическая экзема, в текущей работе данную методику применили для

оценки динамики кровотока раны в качестве критерия удачной трансплантации БМКП. Измерения были проведены на 3, 5, 7, 10, 14 и 21 день. В результате эксперимента была обнаружено, что на 10 сутки интенсивность сигнала на низких частотах в группе «БЭК» достоверно превышает таковую в группе «контроль» (рисунок 1.7 г). Это могло бы быть интерпретировано в пользу того, что БЭК способствует ангиогенезу во время ранозаживления.

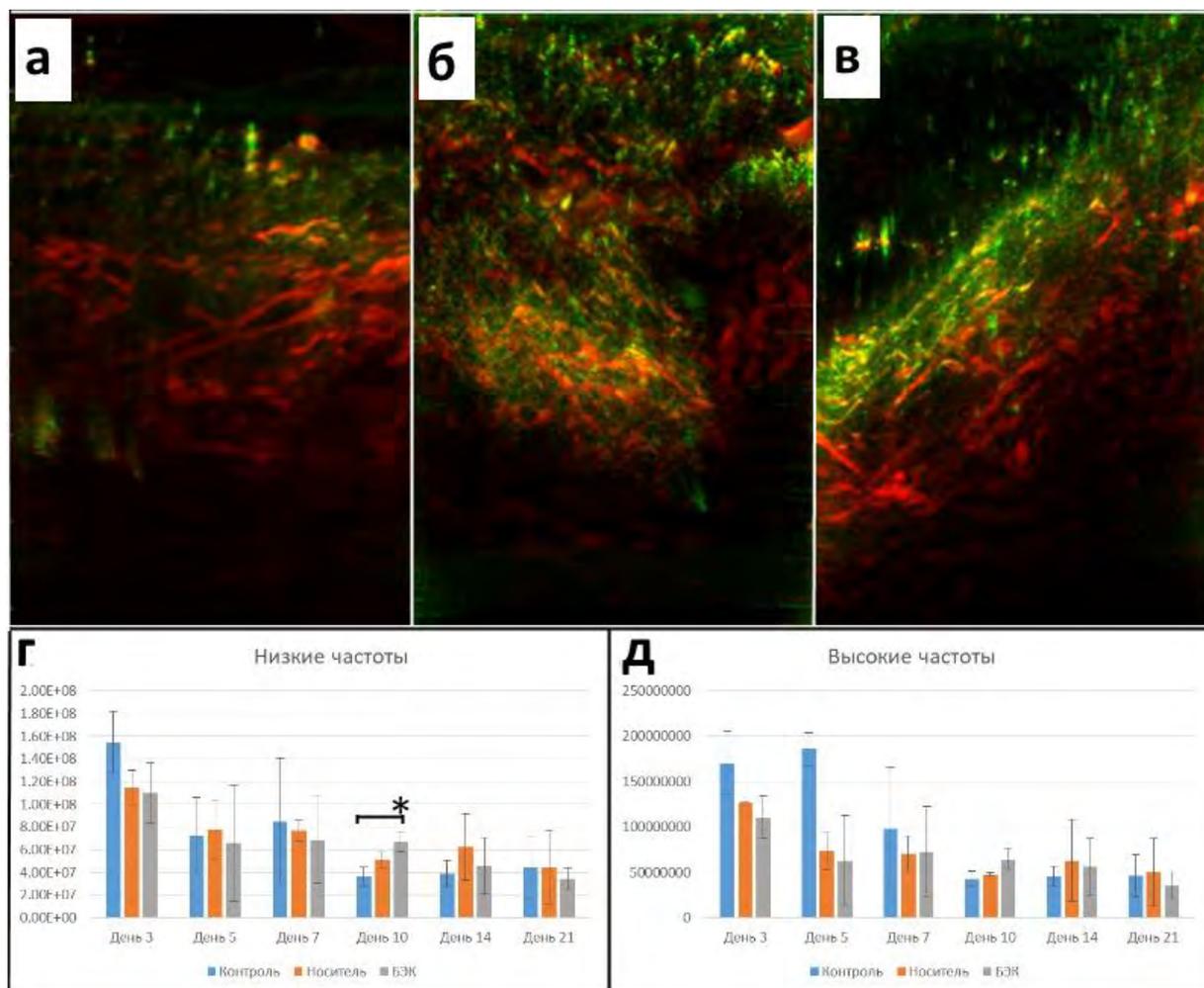


Рисунок 1.7 - Исследование раневого ложа методом PCOM

Трехмерная реконструкция визуализации сосудов при помощи PCOM на 21сутки мыши из группы а) - «контроль», б) - «носитель», в) - БЭК; низкочастотный сигнал представлен красным цветом, высокочастотный – зеленым. Графики, иллюстрирующие интенсивность сигнала на г) низких и д) высоких частотах с указанием планок погрешностей, * – уровень значимости ($p \leq 0.05$)

Однако, в ходе работы возник ряд труднопреодолимых технических сложностей. Так материал, из которого был сконструирован носитель для клеток БЭКа, затруднял проведение эксперимента и создавал значительный фон. Кроме того, трансплантат препятствовал наблюдению за состоянием микроваскулярного русла под ним, в то время как рана мышей без трансплантации оставалась открытой из-за чего полученные

результаты были несравнимыми. Проведением измерений препятствовал не только трансплантат, но и пластырь, снятие которого создавало риск инфицирования раны. Кроме того, во время проведения измерений животное, чей организм испытывал нагрузку из-за кровопотери, было вынуждено пребывать продолжительное время в состоянии общего наркоза, что негативно сказывалось на его состоянии и нередко приводило к гибели. Все это позволяет заключить, что РСМ не может быть рекомендован для оценки эффективности трансплантации БМКП во время доклинических исследований.

1.1.3.3 Паттерны экспрессии маркеров некроптоза RIPK-1 и RIPK-3 в длительно незаживающей ране

На данный момент существуют значительные пробелы в знаниях о динамике процессов репарации и запрограммированной клеточной гибели в ишемизированной длительно незаживающей раны. Так, количество работ, проливающих свет на роль некроптоза и его компонентов RIPK-1 и RIPK-3 в регенеративных процессах, является крайне ограниченным. Поэтому одной из задач данной работы было изучение паттернов экспрессии RIPK-1 и RIPK-3 во время регенерации ишемизированной длительно незаживающей раны.

Гистологическое исследование показало, что на 5 и 7 сутки по краям раны были обнаружены участки деградации ткани, а также погибших клеток. Далее требовалось подтвердить, что клетки гибли не путем некроза, а в ходе запрограммированной клеточной гибели. Иммуногистохимическое выявление расщепленной каспазы-3 для этой задачи не подходило, так как данная протеаза является специфическим маркером апоптоза и не активируется во время некроптоза. По этой причине был использован метод TUNEL, позволяющий выявить как апоптотические, так и некроптотические клетки. В ходе исследования криосрезов ран этим методом, было показано наличие нескольких зон, содержащих клетки, погибшие в ходе запрограммированной клеточной гибели, по краям ран (рисунок 1.8 в, г, ж, з).

Иммуногистохимическое окрашивание показало наличие RIPK-3+ клеток в раневом ложе, а также в некоторых участках по краям раны (рисунок 1.9 а, б, д, е). Поскольку исследование препарата методом TUNEL и иммуногистохимическое окрашивание антителами против RIPK-3 проводится по протоколам, имеющим существенные различия между собой, сопоставление TUNEL+ и RIPK-3+ участков ткани проводилось на серийных срезах. В ходе анализа серийных срезов было показано, что участки ткани, подвергшейся запрограммированной клеточной гибели и таковые, экспрессирующие RIPK-3, практически не перекрывались (рисунки 1.8 и 1.9).

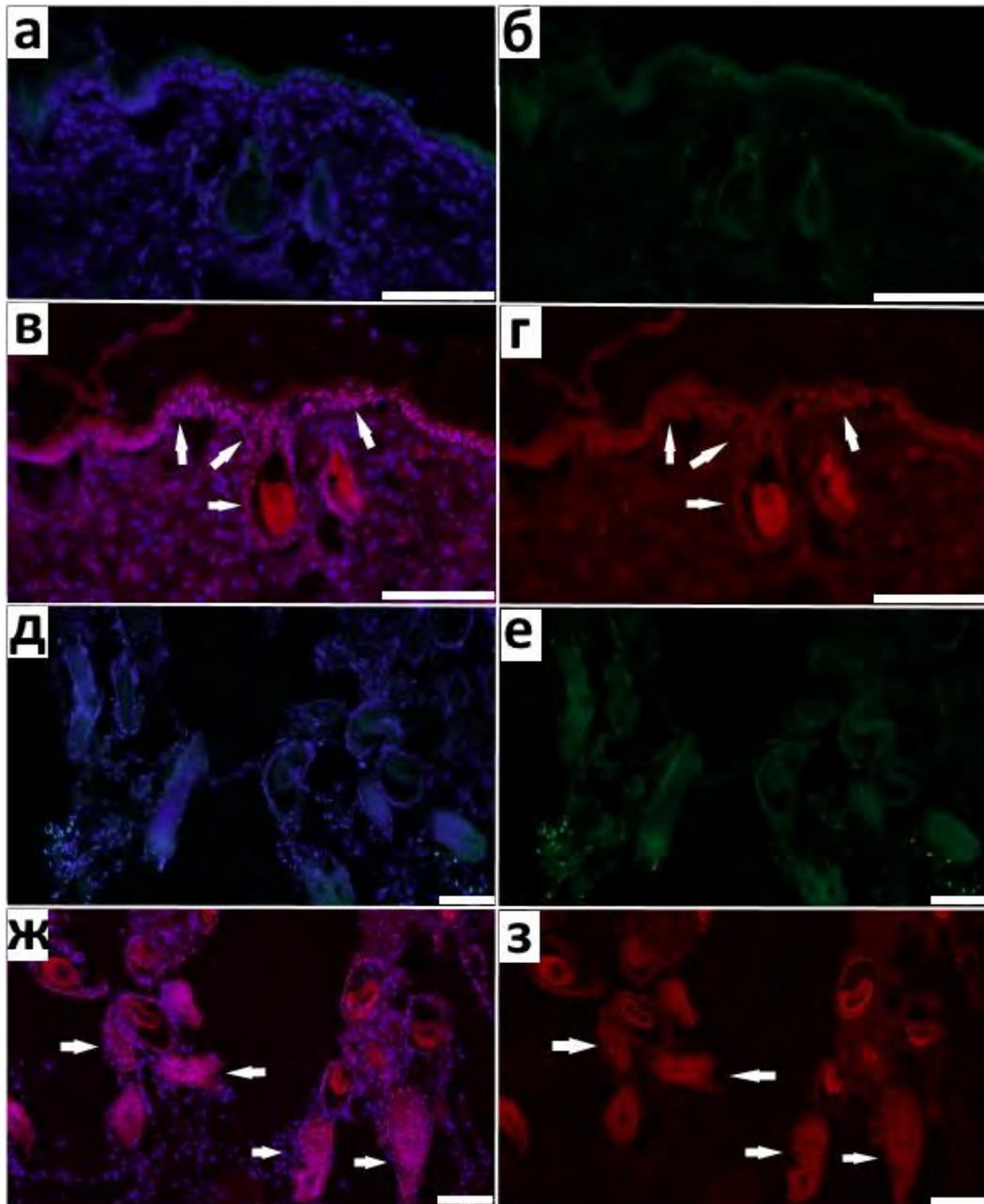


Рисунок 1.8 - Рана мыши на 5 сутки, серийные срезы

Срезы, окрашенные антителами против RIPK-3: а), д) – с DAPI; б), е) – без DAPI, отсутствие специфичности. Срезы, окрашенные с помощью метода TUNEL: в), ж) – с DAPI; г), з) – без DAPI, стрелками указаны TUNEL+ клетки ВФ и ИФЭ; масштабные отрезки 100 мкм

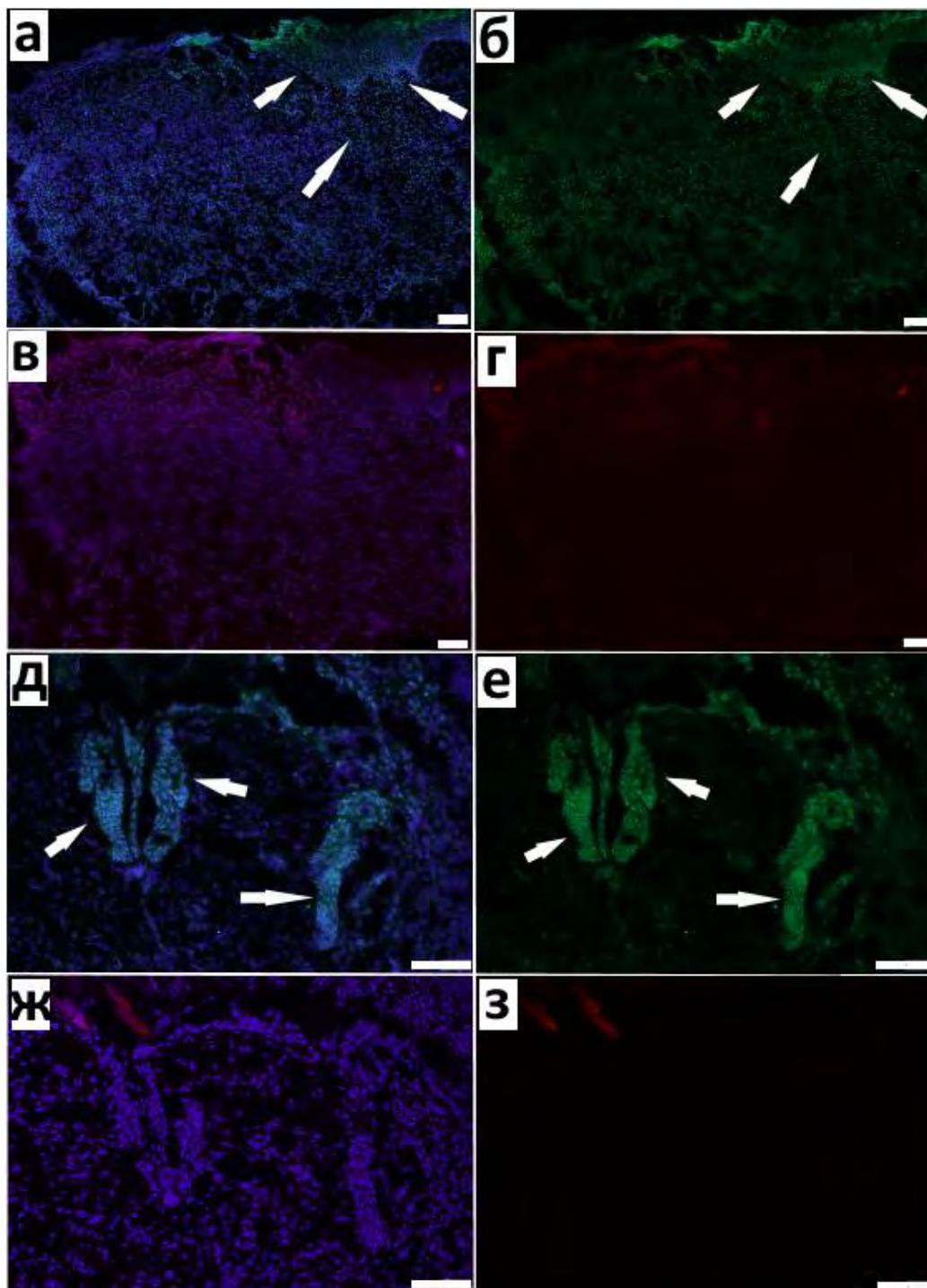


Рисунок 1.9 - Рана мыши на 7 сутки, серийные срезы
 Срезы, окрашенные антителами против RIPK-3: а), д) – с DAPI; б), е) – без DAPI. Стрелками указаны RIPK-3+ участки раны. Срезы, окрашенные с помощью метода TUNEL: в), ж) – с DAPI; г), з) – без DAPI), отсутствие специфичности; масштабные отрезки 100 мкм

На 14 и 21 сутки наблюдали формирование рубца и реэпителизацию. Кератиноциты ИФЭ демонстрировали гиперпролиферацию. Анализ серийных срезов, окрашенных антителами против RIPK-3 и против маркера пролиферации Ki-67, показал частичное совпадение их экспрессии в кератиноцитах ИФЭ и в клетках ВФ (рисунок 1.10).

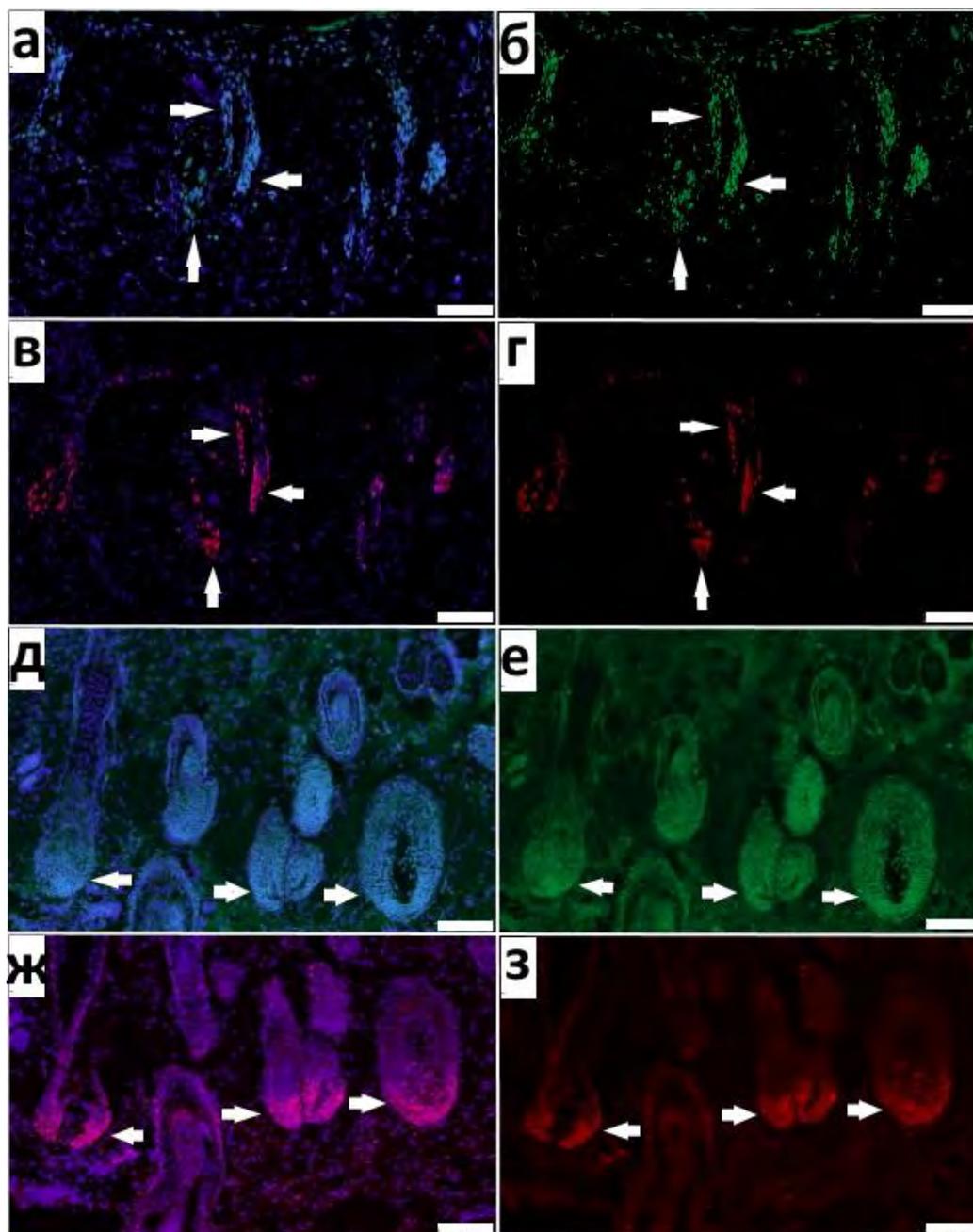


Рисунок 1.10 - Рана мыши на 14 (а, б), в), г)) и на 21 сутки (д), е), ж), з)), серийные срезы. Окрашивание антителами против RIPK-3: а), д) с DAPI; б), е) без DAPI, стрелками показаны RIPK-3+ участки ткани. Окрашивание антителами против Ki-67: в), ж) с DAPI; г), з) без DAPI, стрелками указаны Ki-67+ участки ткани. Масштабные отрезки – 100 мкм

Кроме того, в дерме RIPK-3 был колокализован с маркером фибробластов Vimentin. Статистический анализ показал, что $82.3\% \pm 15.6\%$ Vimentin+ клеток были RIPK-3+ (рисунок 1.11).

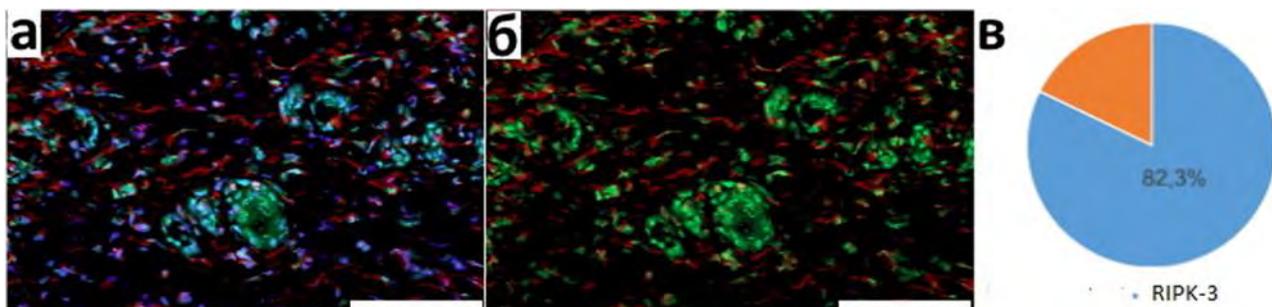


Рисунок 1.11 - Экспрессия RIPK-3 в дермальных фибробластах в ране мыши на 14 сутки. Окрашивание антителами против RIPK-3 и против Vimentin (а) с DAPI, б) без DAPI), зеленый цвет – RIPK-3+ клетки; красный цвет – Vimentin+ клетки; масштабные отрезки 100 мкм; в) доля RIPK-3+ клеток среди Vimentin+ клеток.

Экспрессия RIPK-1 не наблюдалась в ране на 5, 7 и 14 день, однако, на 5 и 7 сутки на препаратах присутствовало неспецифическое окрашивание (рисунок 1.12). На 21 сутки ранозаживления в клетках ВФ наблюдались RIPK-1+ клетки. Анализ серийных срезов, окрашенных антителами против RIPK-1 и Ki-67, показал, что эти маркеры экспрессировались в одних и тех же ВФ, однако, их экспрессия не перекрывалась (рисунок 1.13).

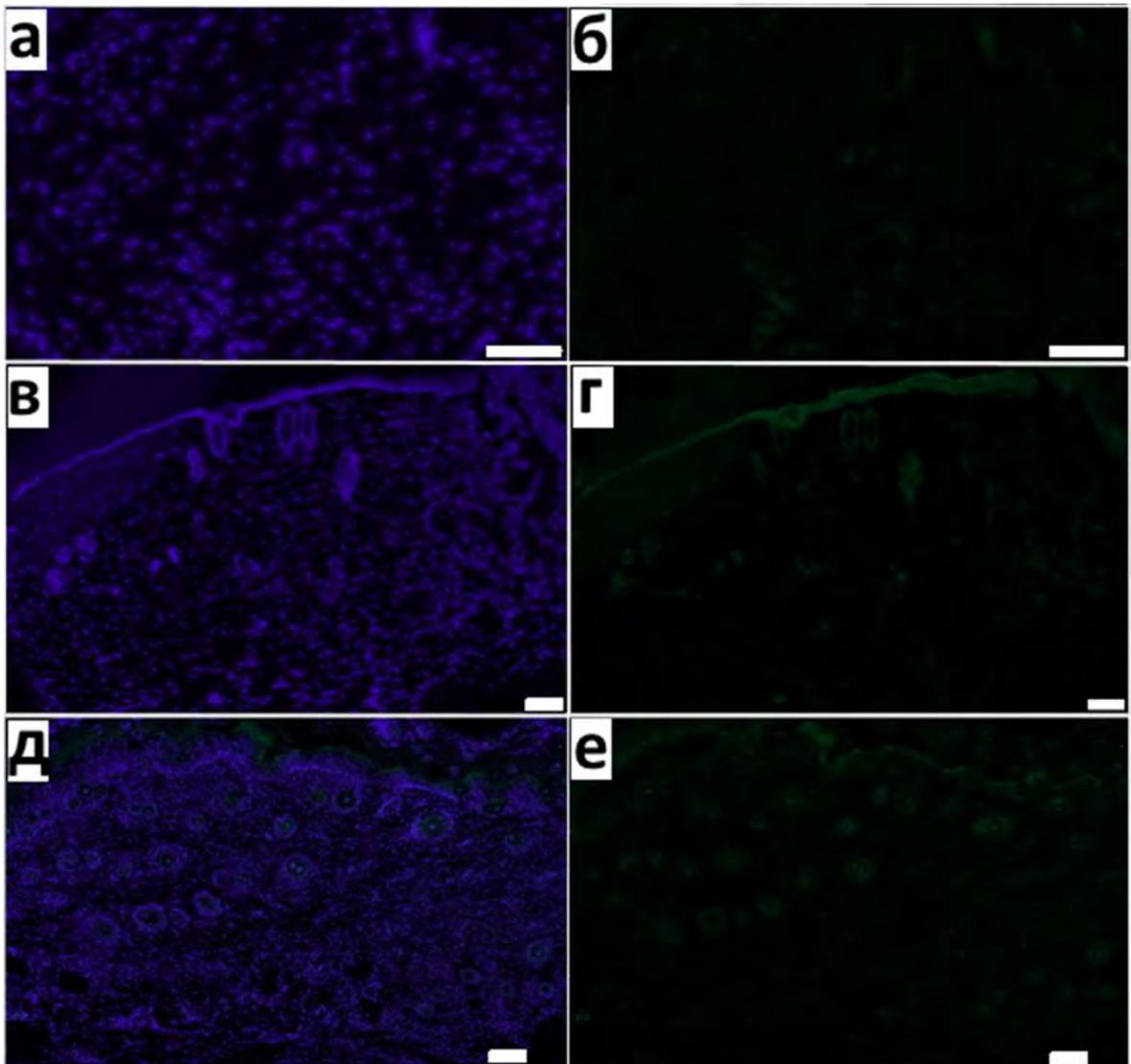


Рисунок 1.12 - Рана мыши на 5 (а, б) 7 (в, г) и 14 (д, е) сутки, серийные срезы. Окрашивание антителами против RIPK-1 (а, в, д) – с DAPI; б, г, е) – без DAPI), специфика отсутствует. Масштабные отрезки – 100 мкм

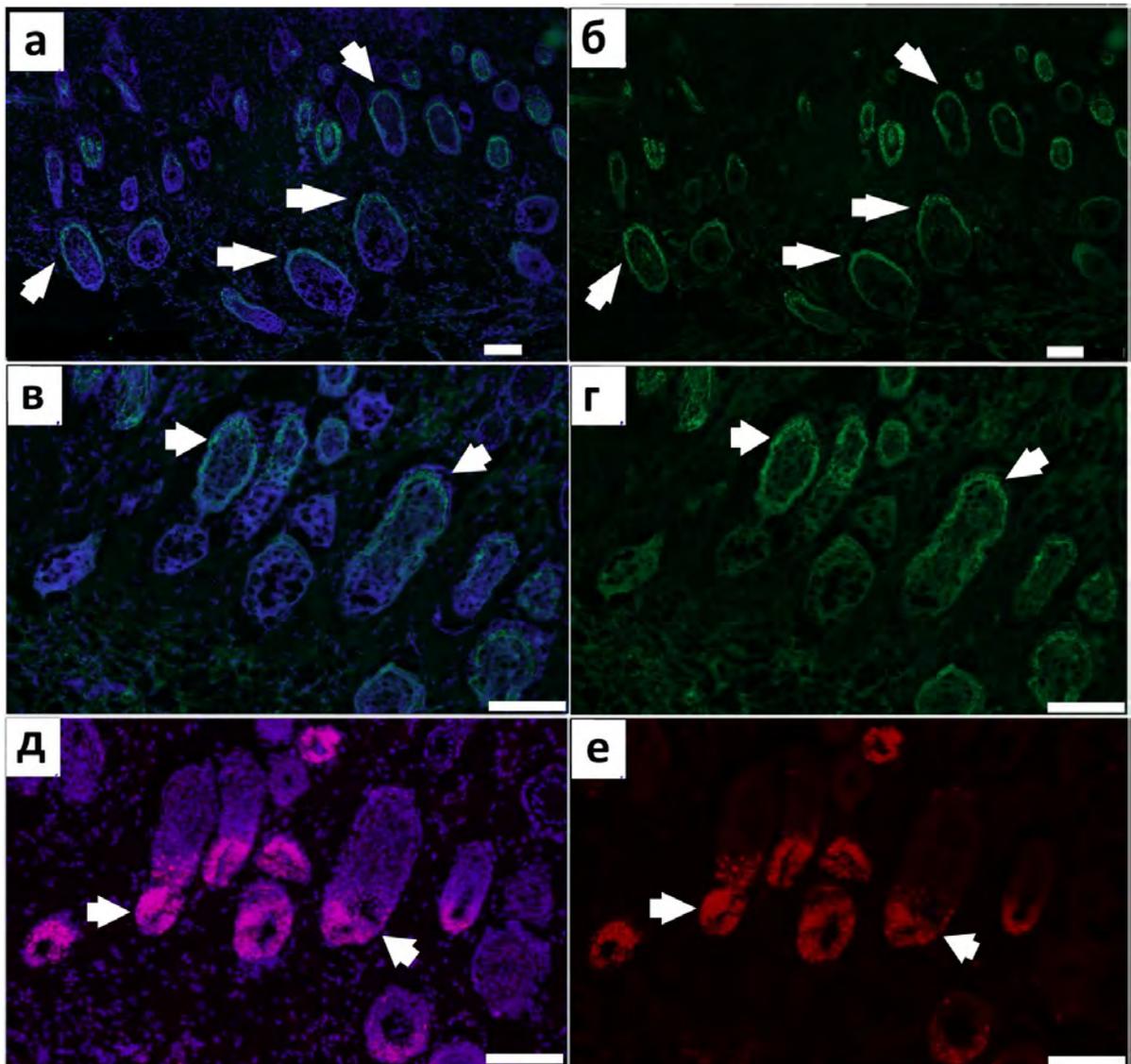


Рисунок 1.13 - Рана мыши на 21 сутки. Экспрессия RIPK-1 в волосяных фолликулах. Иммуногистохимическое окрашивание антителами против RIPK-1 (а) – с DAPI, б) – без DAPI). Окрашивание серийных срезов антителами против RIPK-1 (в) – с DAPI, г) – без DAPI) и Ki-67 (д) с DAPI, е) без DAPI). Стрелками указаны RIPK-1+ и Ki-67+ клетки. Масштабные отрезки – 100 мкм

Полученные результаты свидетельствуют о том, что экспрессия RIPK-1 и RIPK-3 во время ранозаживления может быть не связана с некроптозом и иметь неканонические функции [21].

Данное предположение косвенно подтверждается работой Годвин с соавторами [22]. У нокаутных по *Ripk3* мышей по сравнению с диким типом замедлена скорость регенерации раны. У них наблюдается длительное сокращение площади раны, задержка эпителизации и ангиогенеза, аномальная грануляция и формирование коллагена, изменение динамики инфильтрации раневого ложа нейтрофилами. При ранозаживлении экспрессия IL-6, KC, IL-1 β и TNF- α у *Ripk3*^{-/-} мышей и у животных дикого типа отличалась [22].

1.2 Отличительные особенности (сигнатура) дермальных фибробластов пациентов с дистрофическим буллезным эпидермолизом

1.2.1 Введение

Врожденный буллезный эпидермолиз (ВБЭ) – это группа тяжелых наследственных генодерматозов. Лечение ВБЭ в настоящее время носит лишь симптоматический характер. В то же время генетический характер заболеваний и современное развитие генно-инженерных и клеточных технологий требует от исследователей в области регенеративной медицины разработки современных модельных систем для изучения патогенеза и создания методов специфического воздействия на мутации. Это свидетельствует об актуальности и фундаментальной значимости проблемы, лежащей в основе исследования, и подходов к изучению механизмов ВБЭ на основе клеточного моделирования.

Рецессивная форма буллезного дистрофического эпидермолиза (RDEB) - это наиболее тяжелая форма ВБЭ. Мутации в гене COL7A1 вызывают множественные аномалии, включая хроническое воспаление и профибротические изменения кожи. Однако корреляции между специфическими мутациями в COL7A1 и их фенотипическим результатом остаются в значительной степени неизученными. Описанные здесь мутации в гене COL7A1 были обнаружены в регистре DEB. Среди них выявлены две гомозиготные мутации и два случая сложных гетерозиготных мутаций. Создана панель первичных специфичных для пациента линий фибробластов RDEB (FEB) и проведено их сравнение с контрольными фибробластами от здоровых доноров (FHC). Набор морфологических признаков и сократительная способность клеток отличают FEB от FHC. Обнаружена взаимосвязь между мутациями и некоторыми фенотипическими признаками FEB. Основываясь на анализе имеющихся данных RNA-seq фибробластов RDEB, выполнен анализ экспрессии генов RT-qPCR в полученных клеточных линиях, подтвердив дифференциальный статус нескольких генов и выявив новые. Полученные панели клеточных линий будут полезны не только для изучения сигнатур RDEB, но и для исследования общих механизмов, участвующих в прогрессировании заболевания.

1.2.2 Материалы и методы

1.2.2.1 Используемые культуры

В этой работе были использованы следующие клеточные культуры: первичные линии фибробластов и кератиноцитов человека. Все линии культивировали в пластиковой посуде фирмы Corning и содержали в CO₂ инкубаторе CERTOMAT CS-20 (Sartorius) при +37°C, 5% CO₂ и насыщающей влажности.

1.2.2.2 Методы культивирования эукариотических клеток

Заморозка клеток

Все культуры замораживали в соответствующей им культуральной среде с добавлением 10% ДМСО (ПанЭко) при -70°C на скорости -1°C/мин после чего переносили в сосуд Дьюара с жидким азотом для длительного хранения.

Для учета образцов хранящихся в жидком азоте использовался разработанный автором веб-сервис.

Получение биопсий кожи и образцов крови

Образцы кожи были получены от 4 пациентов с диагностированным РДЭБ из числа пациентов Национального медицинского исследовательского центра здоровья детей в Москве. В качестве контрольной группы в исследование были включены клетки доноров без симптомов или признаков ВБЭ. Исследование было проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией и было получено одобрение комитета по этике исследований Российского национального медицинского университета им. Н.И. Пирогова. Каждый пациент (или его родитель в случае, если пациент был детского возраста), включенный в это исследование, предоставил письменное информированное согласие на свое участие. Все испытуемые дали информированное согласие на публикацию фотографий. Образцы венозной крови всех испытуемых собирали в пробирки с ЭДТА. Для выделения мононуклеарных клеток периферической крови человека использовали стандартный метод, который включает центрифугирование в градиенте плотности Ficoll® Raque, как описано в [23]. Образцы кожи были получены от пациентов и доноров с помощью пробойника для биопсии кожи (4–6 мм, MEDAX). Образцы кожи транспортировали и хранили в среде DMEM (ПанЭко) с добавлением 4 ммоль 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 в течение 1,5 часов, меняя раствор каждые 10 минут. Затем при необходимости биоптат разрезали на небольшие кусочки и отрезали слой жировой клетчатки.

Выделение первичных фибробластов человека

Для выделения фибробластов дерму погружали в 0,2% раствор коллагеназы I (Worthington) в среде DMEM, измельчали с помощью глазных ножниц до фрагментов размером менее 1 мм³ и инкубировали при +37°C в течение 3-4 ч. Полученную взвесь осаждали центрифугированием при 400g в течение 5 мин. Осадок ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) и снова осаждали для удаления следов коллагеназы. Далее осадок ресуспендировали в культуральной среде для первичных фибробластов (DMEM, содержащая 2 mM глутамин и 4,5 г/л глюкозы (ПанЭко) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС) (HyClone), 10 mM пирувата натрия (Gibco) и 100 U/мл смеси антибиотиков пенициллина и стрептомицина (Gibco) в соотношении 1:1 со средой AmnioMAXTM-II (Gibco)) и высевали на культуральный пластик.

Условия культивирования фибробластов

Первичные фибробласты культивировали в среде DMEM с 10% ФБС. Культуры пассировали по достижении клетками 70-90% конфлюэнтности в соотношении 1:5, промывая раствором Версена (ПанЭко) и инкубируя в растворе 0,05% трипсина с ЭДТА (Gibco) 5 минут. Открепившуюся суспензию клеток осаждали при 400g, ресуспендировали в культуральной среде и высевали на пластик. Смену среды осуществляли через каждые 2 дня.

1.2.2.2 Иммуноцитохимическая окраска клеточных культур

Иммуноцитохимическую (ИЦХ) окраску осуществляли по следующему протоколу. Клетки фиксировали 10% забуференным формалином (Биовитрум) в течении 10 минут, промывали ФСБ и инкубировали с первичными антителами, разведенными в блокирующем растворе (ФСБ (ПанЭко), 10% фетальной телячьей сыворотки (Capricorn Scientific), 0,3% TRITON X-100 (Sigma)) во влажной камере при +4°C в течение 12-14 ч. Далее промывали ФСБ и применяли вторичные антитела, конъюгированные с флуоресцентной меткой разведенные в растворе ФСБ с 0,3% TRITON X-100, инкубировали 2 часа при комнатной температуре, ядра окрашивали DAPI (Biotium) или Hoechst 33342 (ThermoFisherScientific, R37165) и оставляли в ФСБ для съемки.

Список использованных в работе первичных антител:

- антитела против коллагена I (RAN C11, Имтек); 1:100
- антитела против коллагена IV (ab6586, Abcam); 1:100
- антитела против фибронектина (ab2413, Abcam); 1:250
- антитела против S100A4 (ab27957, Abcam); 1:200
- антитела против α -SMA (ab5694, Abcam); 1:100
- антитела против FN ED-A (ab6328, Abcam); 1:200

антитела против SM22A (ab10135, Abcam); 1:200
антитела против коллагена VII (C6805, Merck); 1:500
антитела против ki67 (ab16667, Abcam); 1:250
антитела против hTERT (ab230527, Abcam); 1:50
антитела против BMI-1 (ab14389, Abcam); 1:100
антитела против белка Cas9 (Sigma-Aldrich, SAB4200701); 1:100
антитела против кератина 5 (Abcam, ab207351); 1:100

Список использованных в работе вторичных антител:

антитела против мыши Alexa-594 (A21201, Invitrogen); 1:1000
антитела против мыши Alexa-488 (A11029, Invitrogen); 1:1000
антитела против кролика Alexa-594 (A21442, Invitrogen); 1:1000
антитела против козы Alexa-488 (A21467, Invitrogen); 1:1000

1.2.2.3 Микроскопия

Световая микроскопия

Светлопольную микроскопию осуществляли на микроскопах Keyence BZ-9000 и EVOS FL AUTO.

Фазово-контрастная микроскопия

Фазово-контрастную и цейтраферную съемку осуществляли на микроскопе EVOS FL AUTO.

Цейтраферная съемка производилась в инкубационной камере с 5% CO₂ при +37°C и насыщающей влажности.

Флуоресцентная микроскопия

Флуоресцентную микроскопию осуществляли на микроскопе EVOS FL AUTO.

Для прижизненной флуоресцентной микроскопии клетки пассировали в восьмилучные стеклянные камеры для микроскопии (Ibidi). Перед съемкой отбирали культуральную среду клеток и добавляли среду MEM для микроскопии (Gibco), содержащую 50 мМ HEPES.

Конфокальная микроскопия

Конфокальные изображения получали с помощью конфокального сканирующего микроскопа LSM 880 (Carl Zeiss) на базе инвертированного флуоресцентного микроскопа Axio Observer.Z1 Zeiss, оснащенного шестью лазерными линиями (633, 594, 561, 543, 514, 488 и 405 нм), пятью объективами (EC Plan-Neofluar 5 × / 0,16, EC Plan-Neofluar 10 × / 0,3, PL APO 20 × / 0,8, PL APO 40 × / 0,95, PL APO 63 × / 1,4 Oil DIC) и LSM-программным обеспечением ZEN 2. Были использованы следующие полосы пропускания: DAPI 410–579 нм; FITC/eGFP 493–579 нм; TurboFP635 582–754 нм; Alexa Fluor-594, 585–733 нм.

Анализ изображений

Обработку фотографий осуществляли с использованием программного обеспечения Fiji [24].

1.2.2.4 Проточная цитометрия и клеточный сортинг

Клеточный сортер Bio-Rad S3 (Bio-Rad) с 488-нм лазером использовали для проточной цитометрии живых и фиксированных клеток и клеточного сортинга. Флуоресценция регистрировалась в зеленом (FL1, 510–540 нм) и красном (FL4, 660–690 нм) каналах.

Клеточный сортер FACSAria (BD) использовали для детекции флуоресценции Hoechst 33342 (B2261, Sigma-Aldrich) и TurboFP635 с каналом AmCyan для Hoechst 33342 и каналом KillerRed для TurboFP635.

1.2.2.5 Цитогенетический анализ

Клетки в культуре, которые достигли 60-70% монослоя, обрабатывали колхицином (конечная концентрация 1,6 мкг/мл) в стандартных условиях культивирования в течение 2 часов или в течение ночи в зависимости от скорости пролиферации культуры, собирали снятием трипсином и центрифугировали. Осадок клеток ресуспендировали в теплом гипотоническом растворе KCl (0,56%) при +37°C, который осторожно капали в осадок, и инкубировали в течение 20 минут. Затем для префиксации добавляли небольшое количество холодного свежего фиксатора -20°C (1 часть лимонной кислоты и 3 части метанола) и смесь немедленно центрифугировали. Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в 4 мл холодного чистого фиксатора, инкубировали в течение 20 мин при -4°C, и жидкость удаляли центрифугированием и аспирацией. После этого фиксатор меняли три раза аналогичным образом, но без инкубации, и, наконец, осадок ресуспендировали в 1 мл фиксатора для хранения при -20°C и дальнейшего использования. Для получения образцов метафазных хромосом капли смеси наносили пипеткой на дополнительные предметные стекла, предварительно обработанные 40% этанолом, с высоты 10-15 см, и фиксатор выжигали до его испарения. После 3 дней инкубации при +37°C слайды с хромосомами обрабатывали 0,1% раствором трипсина в ФСБ в течение 20-60 секунд, промывали 1% раствором ФБС в ФСБ в течение 15 секунд и окрашивали раствором Гимза в ФСБ в течение 30 минут при комнатной температуре. Затем предметные стекла промывали дистиллированной водой и сушили. Оценка метафазных хромосом производилась с использованием программного обеспечения IKAROS (MetaSystems).

1.2.2.6 STR типирование

Стандартное профилирование клеточных линий короткими tandemными повторами (Short Tandem Repeat; STR) было выполнено в специализированной лаборатории Gordiz для дальнейшей аутентификации клеток-потомков. Генетические профили были получены с использованием 20 маркеров.

1.2.2.7 Оценка морфологии фибробластов

Фибробласты были посажены в низкой плотности таким образом, чтобы отдельные клетки можно было отделить друг от друга на микроскопических изображениях. Фазово-контрастные фотографии клеток были сделаны на следующий день после посева. Плагин PHANTAST FiJi [25] использовали для сегментации клеток на изображениях.

Полученные контуры клеток анализировали с помощью стандартной функции FiJi «Анализ частиц», исключая объекты по краям. Неправильно выбранные регионы были вручную удалены из выборки. Были проанализированы следующие параметры доступные в меню «Анализ частиц» в FiJi: площадь (area), периметр (perimeter), описывающий прямоугольник (bounding rectangle) (ширина, высота и соотношение сторон), вписанный эллипс (fit ellipse) (большая и малая оси), кругообразность (circularity), закругленность (roundness), компактность (solidity) и диаметр, измеренный штангенциркулем (Feret's diameter) (максимальный и минимальный).

Оценка размера и гранулярности клеток производилась путем анализа прямого и бокового рассеяния по данным проточной цитометрии с помощью клеточного сортера S3 (Bio-Rad).

1.2.2.8 Полуколичественный анализ экспрессии при иммунофлуоресцентной окраске

Флуоресцентные микрофотографии были сделаны с одинаковыми настройками каналов для всех изображений. Для каждого образца было сделано не менее 3 флуоресцентных микрофотографий. Для выделения окрашенных регионов на изображениях использовали функцию “threshold” Fiji [24]. Интенсивность окрашивания оценивали, как среднее значение интенсивности пикселей в пороговой области для каждого изображения.

1.2.2.9 Оценка контракции коллагенового геля фибробластами

Фибробласты заключали в гель из коллагена I типа [26] с концентрацией коллагена 3 мг/мл и концентрацией фибробластов 1×10^5 клеток/мл. В каждую лунку 24-луночных планшетов помещали 500 мкл жидкого геля с клетками. После застывания геля в каждую лунку добавляли 500 мкл культуральной среды. На следующий день гели отделяли от стенок лунок с помощью шприцевой иглы и давали возможность сократиться.

Сканирование лунок плат было выполнено с помощью микроскопа EVOS FL AUTO на 2-й день, а площадь каждого геля на панорамах была измерена с помощью программного обеспечения FiJi [24].

1.2.2.10 Анализ на микоплазму

Отсутствие контаминации микоплазмой определяли с помощью набора Myno Real-Time PCR kit (Евроген) в соответствии с инструкциями производителя.

1.2.2.11 Статистический анализ

Для полуколичественного сравнения уровня экспрессии белков при иммунофлуоресцентном анализе делали по 4 фотографии для каждой линии клеток. На каждой фотографии было около 30 клеток.

Для сравнения уровня экспрессии C7 в ФЭБ и ФЗК использовали вложенный t-тест (nested t test). Различия считались значимыми при $p < 0.05$. Для графического представления использовали диаграммы с указанием среднего значения и стандартной ошибки среднего для каждой линии клеток.

Для сравнения уровня экспрессии α -SMA и FN ED-A в ФЭБ и ФЗК использовали однофакторный дисперсионный анализ с критерием Тьюки. Различия считались значимыми при $p < 0.05$. Для графического представления использовали диаграммы с указанием среднего значения и 95% доверительного интервала для комбинированных РДБЭ и здоровой линий.

Для морфологического анализа первичных фибробластов измеряли от 43 до 127 клеток на фазово-контрастных изображениях. Для сравнения совмещенных выборок РДБЭ клеток со здоровым контролем использовали двухвыборочный t-тест. Для сравнения отдельных линий РДБЭ со здоровым контролем использовали однофакторный дисперсионный анализ с LSD тестом Фишера или двухвыборочный t-тест. Различия считались значимыми при $p < 0.05$. Для графического представления использовали диаграммы с указанием среднего значения и стандартной ошибки среднего.

Данные прямого и бокового светорассеяния проточной цитометрии сравнивали с помощью критерия хи-квадрат FlowJo. Всего было измерено более 10 тысяч клеток для каждой линии. Различия между выборками считаются статистически значимыми ($p < 0.05$) при $T(x) > 4$, но в работе значимыми считались “очевидные” различия с превышением $T(x)$ фонового уровня на 100 и более. Для графического представления использовались нормированные частотные гистограммы и диаграммы с указанием среднего значения и стандартной ошибки среднего.

Для сравнения данных проточной цитометрии отдельных первичных линий фибробластов использовали однофакторный дисперсионный анализ с критерием Тьюки,

сравнивая средние значения по трем экспериментам. Различия считались значимыми при $p < 0.05$. Для графического представления использовали диаграммы с указанием среднего значения и стандартной ошибки среднего.

Для сравнения контракции коллагенового геля фибробластами ставили по 4 эксперимента для каждой линии клеток. Итоговые выборки сравнивали непараметрическим тестом Манна-Уитни. Различия считались значимыми при $p < 0.05$. Для графического представления использовали диаграммы с указанием среднего значения и стандартной ошибки среднего.

1.2.2.12 Программное обеспечение

Статистические расчеты были выполнены с использованием Microsoft Excel 2016, Origin 8 и GraphPad Prism 8.

Редактирование и анализ изображений выполняли с помощью PaintNET 4.2.15, Adobe Photoshop CS6 13.0.1.3, Inkscape 1.0.2 и Fiji GM 1.2.

Данные проточной цитометрии были проанализированы с помощью FlowJo X 10.0.7.

Качество первичных fastq прочтений оценивали с помощью FastQC 0.11.9.

Выравнивание fastq прочтений с референсным геномом было выполнено с использованием Hisat 2.2.1.

1.2.3 Результаты и обсуждение

1.2.3.1 Описание экспериментального материала

В работе использовали клетки, полученные от четырех пациентов с РДБЭ. Все пациенты были мужского пола, в возрасте от 3 до 21 года и из разных регионов Российской Федерации (Калининградская область, Ульяновская область, республика Дагестан и Московская область). Клетки восьми здоровых доноров использовали в качестве контроля. Среди здоровых доноров трое были мужского пола, а возраст варьировал от 8 до 58 лет. Все здоровые доноры происходили из Центрального региона Российской Федерации (таблица 1.3).

Следующие обозначения были приняты для клеточных линий, полученных от пациентов и доноров:

ФЭБ - первичные дермальные фибробласты от пациентов с РДБЭ

ФЗК - первичные дермальные фибробласты от здоровых пациентов

Таблица 1.3 – Список пациентов с РДБЭ и здоровых доноров: пол, возраст, пациент-специфические клеточные линии, мутации, выявленные в гене *col7a1*

Пациент	Форма РДБЭ	Пол/ Возраст	Клеточные линии	Уровень коллагена 7	Мутация 1	Мутация 2
д1 РДБЭ	генерализованный тяжелый ORPHA 79408	М/8	ФЭБ1	сниженный	с.425A > G (p.K142R)	с.425A > G (p.K142R)
д2 РДБЭ	инвертированный ORPHA 79409	М/16	ФЭБ2	сниженный	с.682 + 1G > А	с.6205 C > T (p.R2069C)
д3* РДБЭ	генерализованный тяжелый ORPHA 79408	М/5	ФЭБ3	сниженный	с.8245G > A (p.G2749R)	с.8245G > A (p.G2749R)
д4 РДБЭ	генерализованный умеренный ORPHA 89842	М/21	ФЭБ4	сниженный	с.520G > A (p.G174R)	нет данных
д5		Ж/58	ФЗК1	норма		
д6		Ж/57	ФЗК2	норма		
д7		М/8	ФЗК3	норма		
д8		Ж/24	ФЗК4	норма		
д9		М/24	ФЗК5	нет данных		

*—Пробанд имел гетерозиготную мутацию с.1054C > T (p.R352C) в гене *krt5*.

1.2.3.2 Анализ выявленных мутаций в гене *col7a1*

Мутации РДБЭ, описанные в данной работе, можно разделить на две группы: мутации сайта сплайсинга и миссенс-мутации. В базе данных ClinVar и Human Gene Mutation Database (HGMD) мутации исследуемых пациентов попали в категорию буллезного эпидермолиза дистрофического типа с аутосомно-рецессивным наследованием (таблица 1.3).

Целевые области гена *col7a1* с мутациями, ведущими к симптоматическим комплексам ДБЭ, были исследованы с помощью NGS и подтверждены секвенированием по Сэнгеру.

Пациент д1 имел миссенс-вариант с.425A > G (p.K142R, rs121912856) в гомозиготном состоянии (рисунок 1.14 А). Этот переход распространен среди пациентов европейской популяции с ДБЭ (HGMD Professional 2012.1) [27]. Описано также гетерозиготное состояние этой мутации, проявляющееся в легкой форме заболевания (локализованный РДБЭ) [28].

Пациент д2 представлял собой случай сложной гетерозиготной мутации, состоящей из интронной мутации с.682 + 1G > A и миссенс-варианта с.6205C > T (p.R2069C, rs121912855) в экзоне 74 гена *col7a1* (рисунок 1.14 Б и В). Вариант с.6205C > T был описан в нескольких случаях инвертированного подтипа РДБЭ в популяциях Ирана и Японии [27, 29, 30]. Эти мутации довольно часто выявлялись в европейской популяции как по отдельности, так и в комбинации с с.425A > G [31, 32].

Пациент д3 представлял собой редкий случай сочетания патологической мутации РДБЭ в экзоне 111 с.8245G > A (p.G2749R, rs121912853) в гомозиготном состоянии (регистрационный номер ClinVAR VCV000017460) со второй гетерозиготной мутацией в *krt5* с.1054C > T p.R352C (рисунок 1.14 Г и Д). Подобная мутация кератина 5, R352S, была описана как первая мутация в 2А домене KRT5 у японских и корейских пациентов с ПБЭ [33]. Также стоит отметить, что пациент д3 родился от кровного брака, хотя родословная другого пациента с тяжелым генерализованным РДБЭ (д1) неизвестна.

Пациент д4 имел мутацию с.520G > A в экзоне 4 *col7a1*. Этот патологический вариант рассматривался как миссенс-мутация глицина, p.G174R [34].

Таким образом, были определены мутации пациентов, приведшие к фенотипу РДБЭ. Были найдены мутации как описанные ранее, так и новые варианты, и их уникальные сочетания.

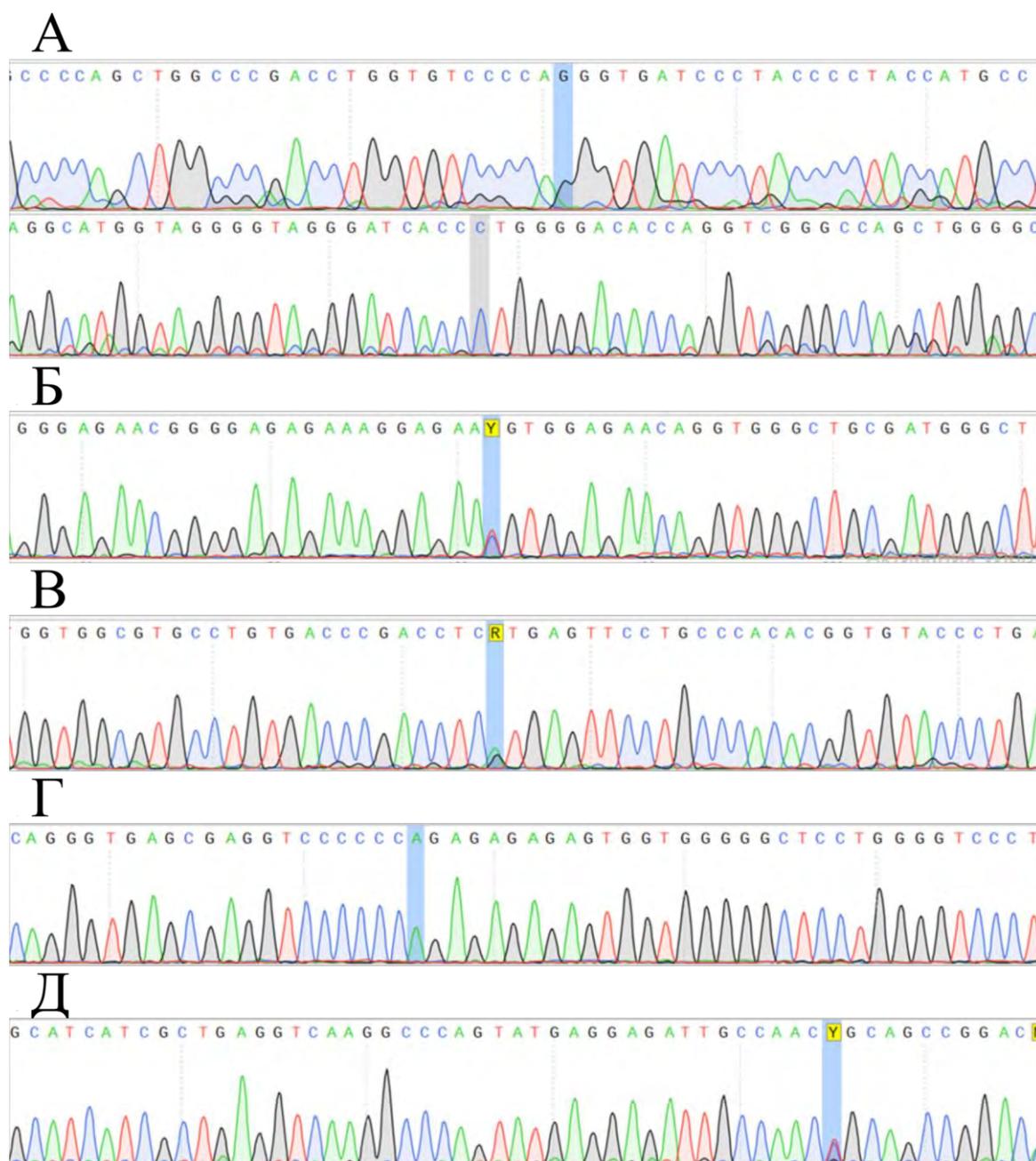


Рисунок 1.14 - Выявленные в результате секвенирования мутации
 А. - д1 col7a1 с.425A>G. Гомозиготная миссенс мутация р. K142R (прямая и обратная цепи). Б. - д2 col7a1 с.6205C>T. Гетерозиготная миссенс мутация р. R2069C. В. - д2 col7a1 с.682+1G>A. Гетерозиготная мутация в интроне 5. Г. - д3 col7a1 с.8245G>A. Гомозиготная мутация р.G2749R. Д. - д3 KRT5 с.1054C>T. Гетерозиготная мутация р.R352C

1.2.3.3 Экспрессия коллагена VII типа в коже РДБЭ пациентов

Биопсии кожи пациентов дб, д3 и д2 изучались на экспрессию С7 (рисунок 1.15 А – В). В то время как в здоровой коже С7 локализован в области ДЭС, в коже пациентов с РДБЭ экспрессия С7 имеет диффузный характер и наблюдается во всей дерме. Отрицательный контроль иммуноокрашивания продемонстрировал специфичность ИГХ теста (рисунок 1.15 Г). Интенсивность сигнала почти не уменьшалась в случае д2 (рисунок 1.15 Б) и слегка снижалась в случае д3 (рисунок 1.15 В). Нарушение целостности

сигнала и делокализация показали, что функция крепящих фибрилл нарушена. Эти данные согласуются с ранее опубликованными данными [35] о рекомбинантном мутанте со сходной мутацией р.G2749R C7, который был способен к секреции, но не к продукции зрелой тройной спирали молекулы C7.

Мутации в ФЭБ1, ФЭБ2 и ФЭБ4 локализованы в области гомологии C7 с белками хрящевого матрикса, которая расположена выше эпитопа для антитела LN7.2. Считается, что эпитоп находится в FN3-домене C7, который кодируется нижележащими экзонами относительно экзонов 3-6, затронутых в линиях ФЭБ [36]. Неколлагеновый домен NC1 с сайтами связывания матрикса считается наиболее иммунореактивной частью C7 [36]. Использование моноклонального антитела LN7.2 на ИГХ кожи позволило подтвердить различный характер экспрессии и дисфункцию крепящих фибрилл у пациента д3 (рисунок 1.15).

Таким образом, в коже пациентов были найдены нарушения распределения C7 характерные для РДБЭ.

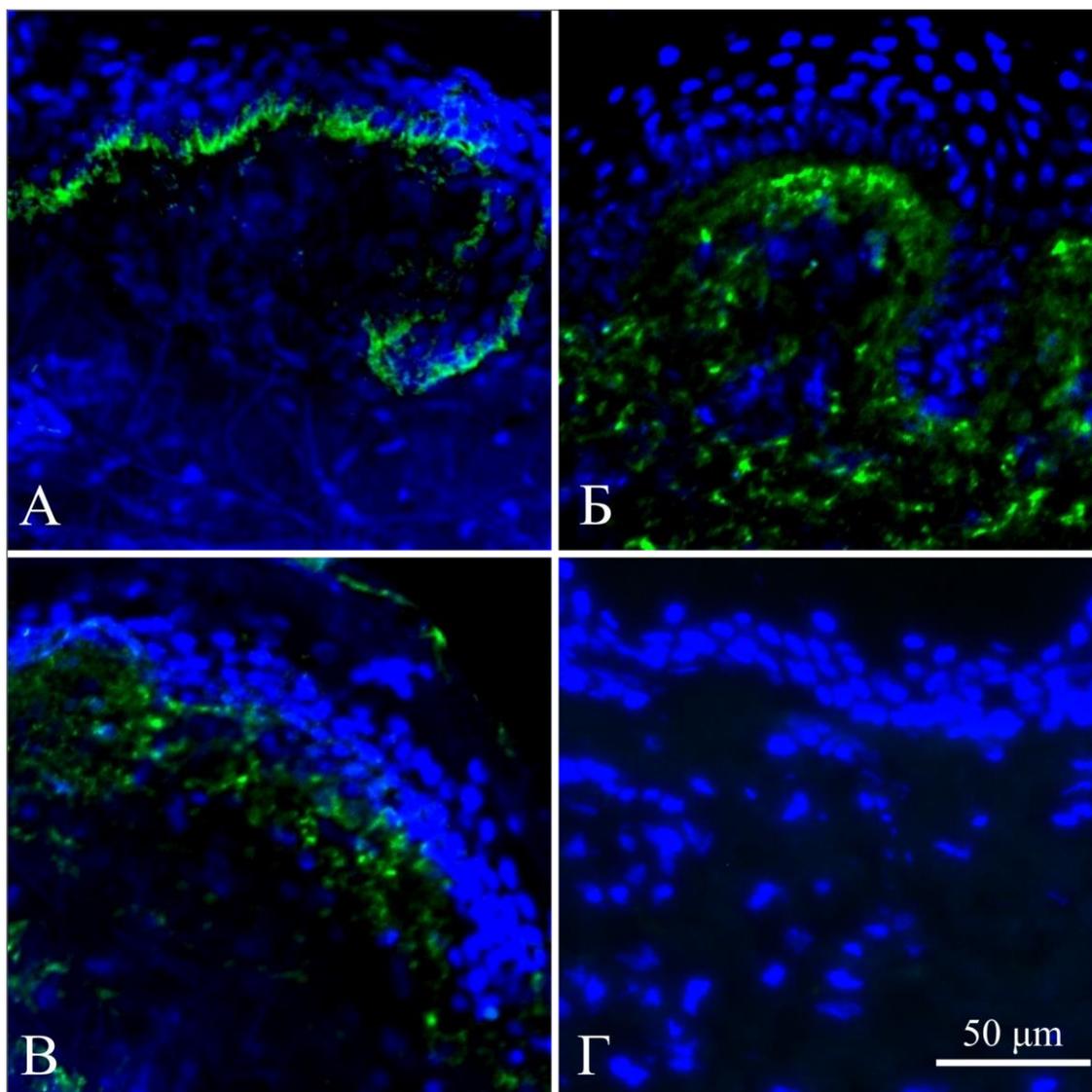


Рисунок 1.15 - Иммуногистохимическое окрашивание криосрезов кожи (А) - кожа здорового донора дб. (Б) - кожа пациента д2 с инвертированным РДБЭ. (В) - кожа пациента д3 с генерализованным тяжелым РДБЭ. (Г) - отрицательный контроль вторичных антител на срезе кожи. Зеленый канал - коллаген VII типа. Синий канал - ДНК (DAPI). Флуоресцентная микроскопия.

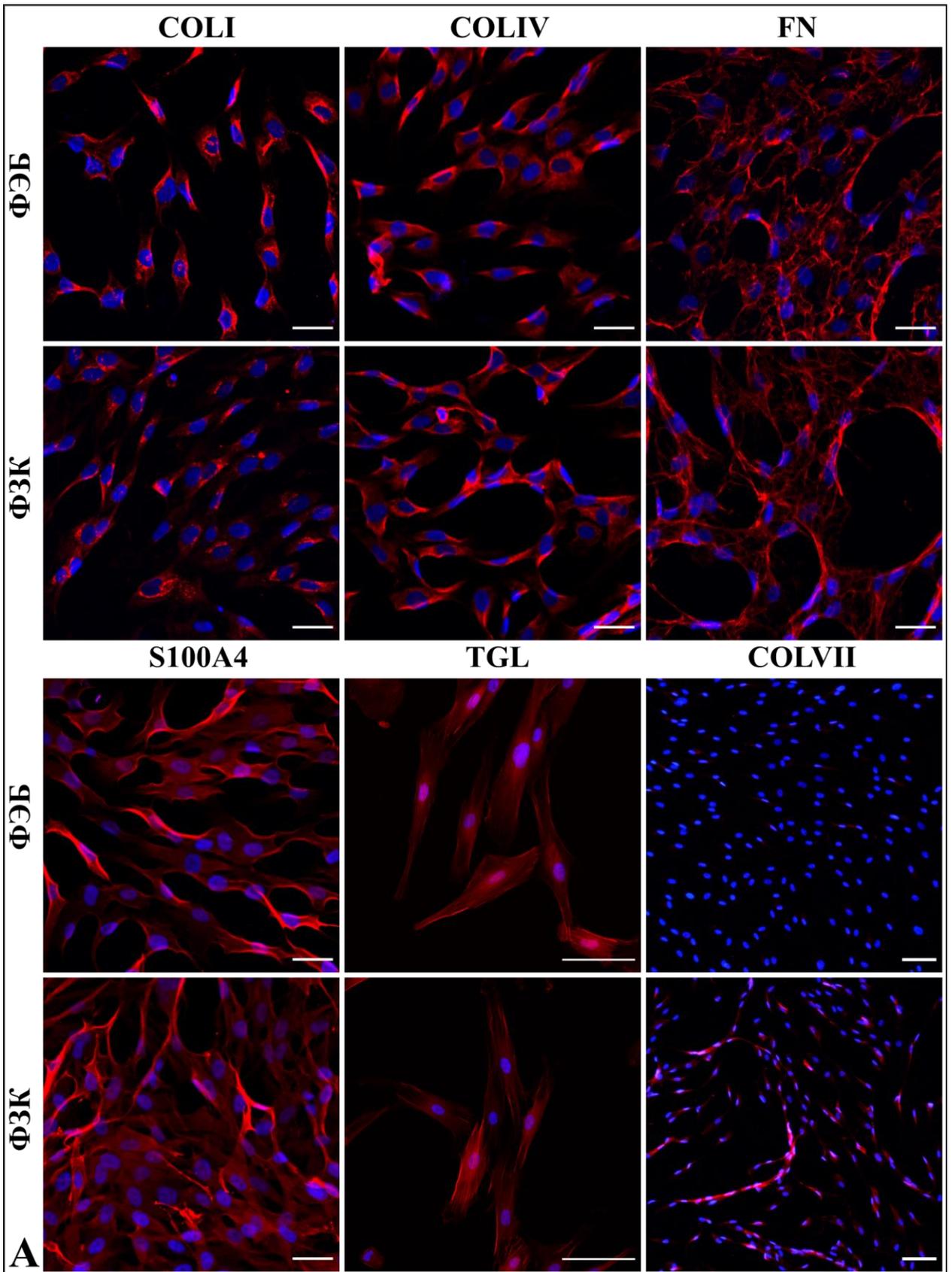
1.2.3.4 Характеристика линий фибробластов

Все первичные дермальные фибробласты были проверены на наличие микоплазмы, и было выполнено STR профилирование. Микоплазмы и кросс-контаминации не было обнаружено. Цитогенетическое исследование подтвердило отсутствие хромосомных aberrаций после 10 пассажей.

Для установления природы клеток и выявления различий здоровые и РДБЭ фибробласты проанализировали на экспрессию маркеров фибробластов: S100A4, трансгелина (transgelin; TAGLN), коллагена IV типа, коллагена I типа, фибронектина, альфа-гладкомышечного актина (α -smooth muscle actin; α SMA), сегмента ED-A фибронектина (fibronectin ED-A; FN ED-A) и коллагена VII типа (рисунок 1.16). Клетки

демонстрировали одинаковую экспрессию маркеров, за исключением C7, α -SMA и FN ED-A. Метод полуколичественного сравнения данных иммуноцитохимии применили для сравнения уровней экспрессии C7, α SMA и FN ED-A. Интенсивность окрашивания для C7 измеряли для ФЭБ (1–3) и ФЗК (1–4). Средние значения этих групп сравнивали с помощью вложенного t-теста. Результаты показывают, что клетки ФЭБ имеют более низкую интенсивность окрашивания C7 по сравнению с клетками ФЗК ($p < 0,001$) (рисунок 1.17). Интенсивность окрашивания для α -SMA и FN ED-A измеряли для ФЭБ (1–4) и ФЗК1. Образцы сравнивали с использованием однофакторного дисперсионного анализа с использованием критерия Тьюки. Уровни экспрессии α -SMA и FN ED-A каждой линии ФЭБ были значимо ($p < 0,05$) выше, чем у ФЗК (рисунок 1.16 В, Г).

Таким образом, было подтверждено, что выделенные популяции клеток действительно представляют собой фибробласты. Для фибробластов РДБЭ было четко показано снижение экспрессии C7 и повышение экспрессии α -SMA и FN ED-A.



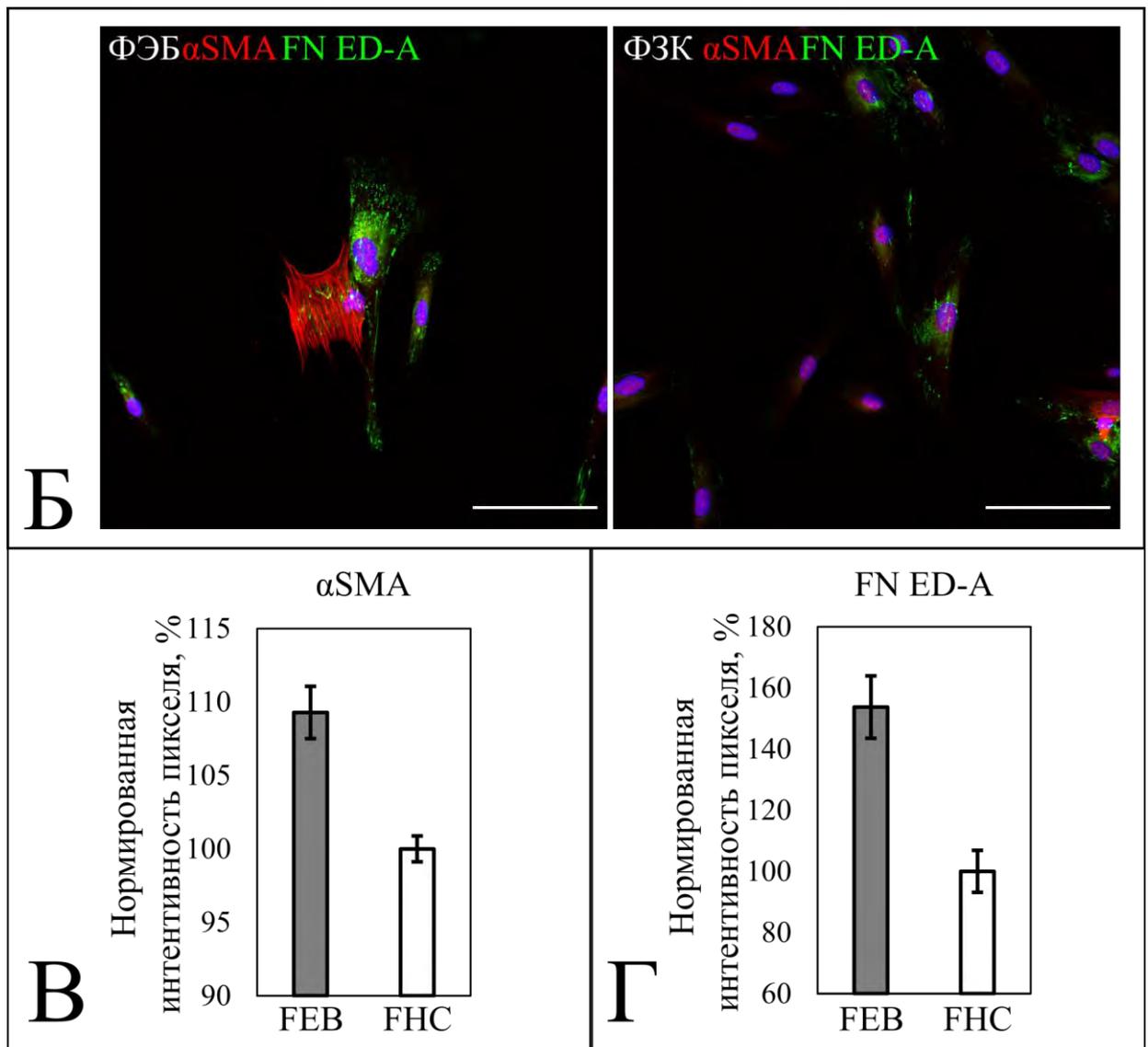


Рисунок 1.16 - ИЦХ окрашивание ФЭБ1 (ФЭБ) и ФЗК1 (ФЗК)

(А) - красным каналом показаны маркеры: COLI - коллаген I типа; COLIV - коллаген IV типа; FN - фибронектин; S100A4 - фибробласт-специфический белок 1; TGL - трансгелин; COLVII - коллаген VII типа. Синий канал показывает ядра (DAPI). Масштабная линейка - 100 мкм. Конфокальная микроскопия (COLI, COLIV, FN, S100A4, TGL) и флуоресцентная микроскопия (COLVII). (Б) - красный канал показывает α -SMA - альфа-гладкомышечный актин. Зеленый канал показывает FN ED-A - сегмент ED-A фибронектина. Синий канал показывает ядра (DAPI). Масштабная линейка - 100 мкм. Конфокальная микроскопия. (В) - уровень экспрессии α -SMA в линиях ФЭБ и ФЗК. Среднее значение и 95% доверительный интервал показаны для комбинированных ФЭБ (1–4) и ФЗК1 (ФЗК). ФЗК был принят за 100%. (Г) - уровень экспрессии FN ED-A в линиях ФЭБ и ФЗК. Среднее значение и 95% доверительный интервал показаны для комбинированных ФЭБ (1–4) и ФЗК1 (ФЗК). ФЗК был принят за 100%.

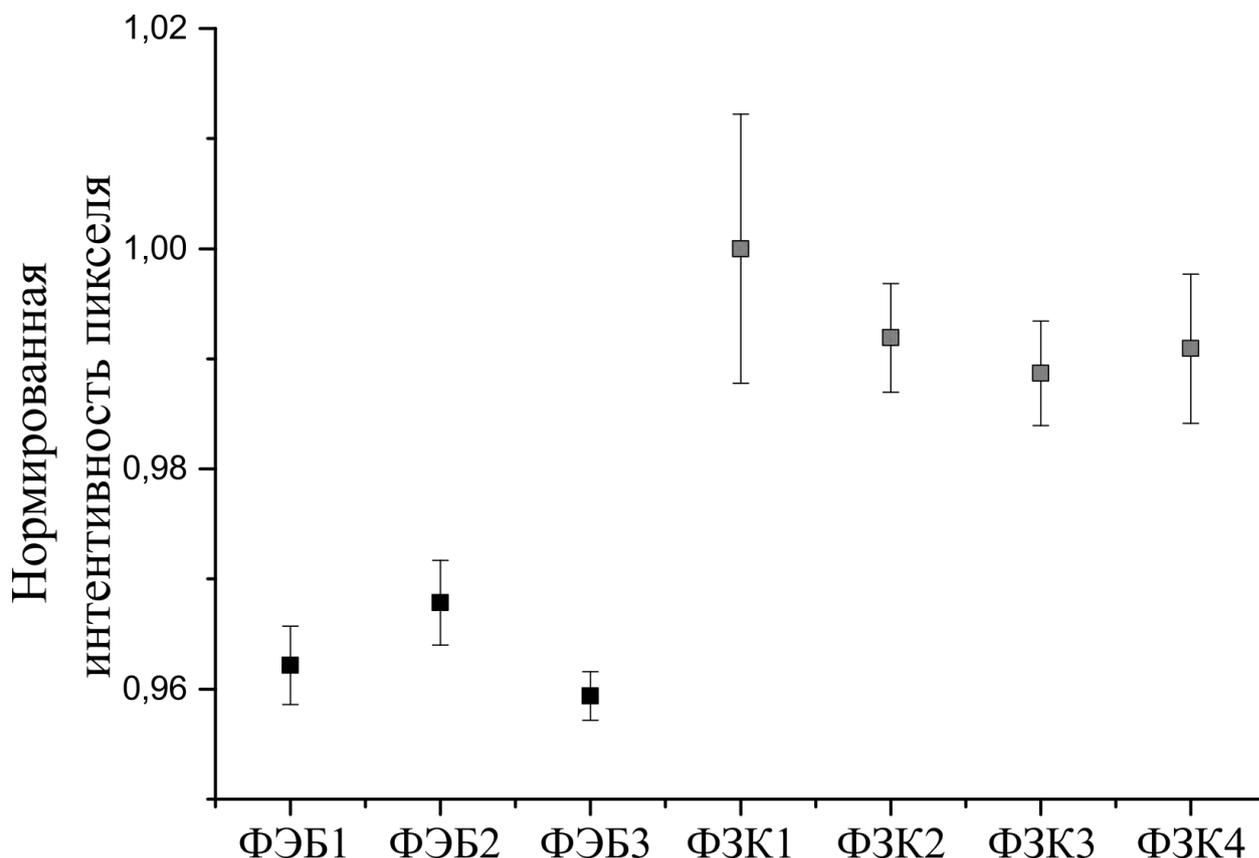


Рисунок 1.17 - Уровень экспрессии коллагена VII типа в линиях ФЭБ и ФЗК. Для каждой клеточной линии показаны среднее значение и стандартная ошибка. Наивысшее среднее значение было принято за единицу.

1.2.3.5 Анализ морфологии фибробластов

Было сделано предположение, что состояние РДБЭ может отразиться на морфологии фибробластов в культуре. Для проверки данной гипотезы был произведен комплексный количественный анализ ряда морфологических параметров.

Все первичные дермальные фибробласты имели нормальную веретенообразную морфологию (рисунок 1.18 А). Для морфологического анализа измеряли от 43 до 127 клеток у каждой клеточной линии. Для сравнения ФЭБ и ФЗК использовали комбинированные данные морфологии из ФЭБ (1–4) и ФЗК1. Морфологические параметры сравнивали с помощью двухвыборочного t-теста. Данные проточной цитометрии с прямым рассеянием и боковым рассеянием сравнивали с помощью сравнения хи-квадрат FlowJo. ФЗК1 сравнивали с дубликатами ФЭБ (1–4). Фоновый уровень T (x) был получен сравнением ФЗК1 с повтором ФЗК1 плюс ФЗК3 в двух экземплярах. Результаты показали, что ФЭБ в среднем имеют большую площадь, периметр, минимальную ось вписанного эллипса и минимальный диаметр, измеренный штангенциркулем. Кроме того, клетки ФЭБ оказались менее кругообразными и компактными (рисунок 1.18 Б, таблица 1.4). Не было обнаружено значимых различий в

боковом светорассеянии (side scatter; SSC) между комбинированными ФЭБ и ФЗК, но сравнение прямого светорассеяния (forward scatter; FSC) показало, что клетки ФЭБ в среднем больше чем ФЗК ($T(x) = 868$, фоновый уровень $T(x) = 215$) (рисунок 1.18; таблица 1.4).

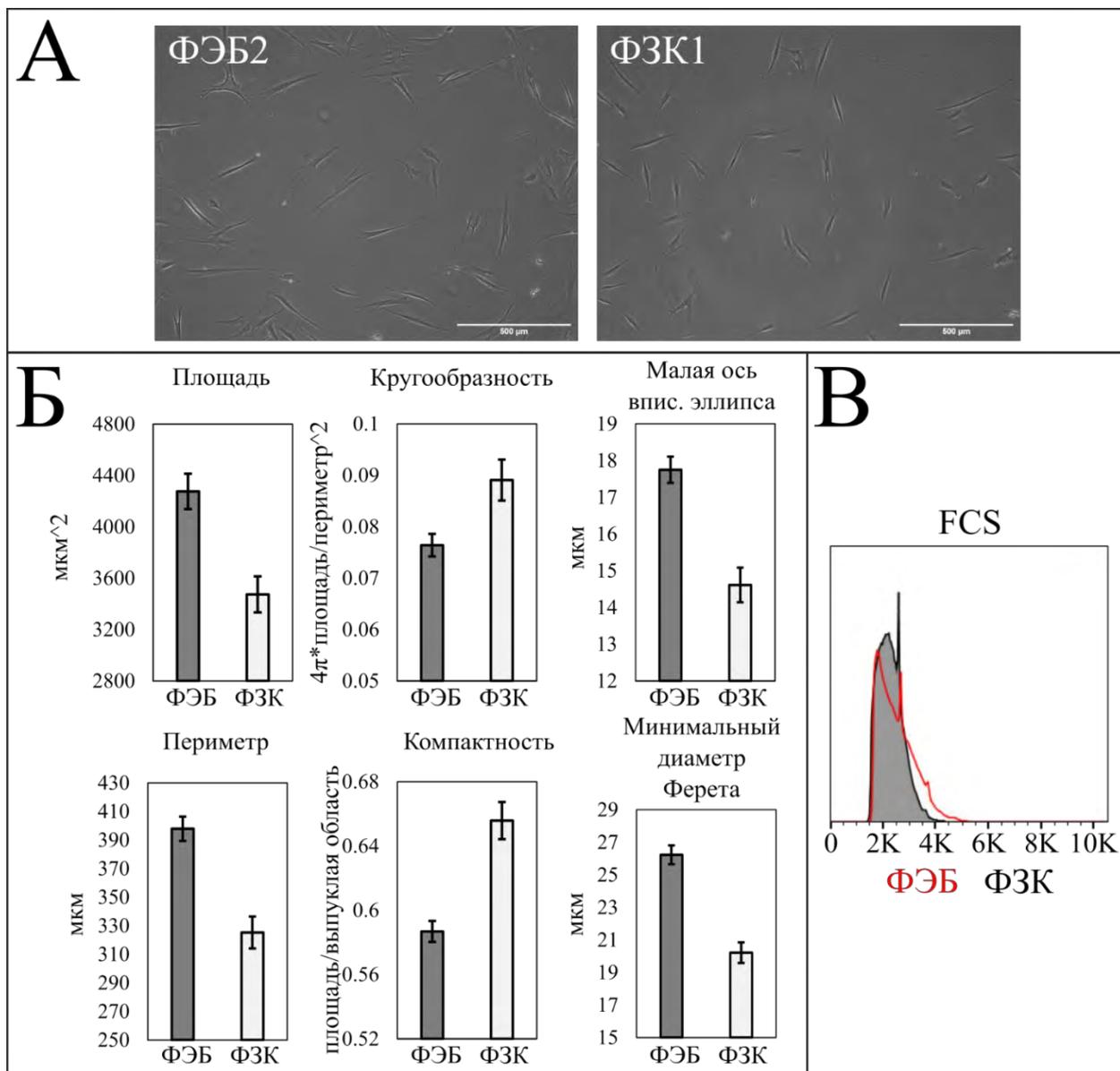


Рисунок 1.18 - Сравнение морфологии ФЭБ и ФЗК

(А) - фазово-контрастная микроскопия фибробластов в культуре. Увеличение $\times 100$. (Б) - результаты морфологического анализа ФЭБ и ФЗК. Площадь, периметр, минимальный диаметр, измеренный штангенциркулем и малая ось вписанного эллипса значимо больше ($p < 0,05$), а округлость и компактность значимо меньше ($p < 0,05$) для ФЭБ по сравнению с ФЗК при сравнении двухвыборочный t-тестом. Ошибка - стандартная ошибка. (В) FCS-гистограмма прямого рассеяния ФЗК и комбинированных ФЭБ (1–4). Распределения значимо различаются ($T(x) = 868$; $p < 0,05$)

Таблица 1.4 - Анализ морфологии и контракции отдельных линий ФЭБ по сравнению с ФЗК1

Клеточная линия	Площадь	Периметр	Малая ось вписанного эллипса	Кругообразность	Компактность	Минимальный диаметр, измеренный штангенциркулем	Контракция коллагенового геля	FSC	SSC
ФЭБ1		Б		М	М				Б
ФЭБ2	Б	Б	Б		М	Б		Б	Б
ФЭБ3					М		Б	М	М
ФЭБ4	Б	Б			М	Б		Б	Б

1.2.3.6 Анализ контракции коллагенового геля фибробластами

Было сделано предположение, что нарушение *C7* приведет к изменению активности перестройки ВКМ фибробластами. Для проверки данной гипотезы был поставлен тест отражающий активность взаимодействия фибробластов с внеклеточным матриксом, а именно скорость контракции коллагенового гидрогеля.

Контракцию четырех коллагеновых гелей измеряли для каждой линии ФЭБ (1, 2, 3 и 4) и ФЗК1. Данные первичных клеток были объединены в две группы (ФЭБ и ФЗК) и сравнены с помощью теста Манна-Уитни. Было показано, что вызванная фибробластами контракция коллагена значимо выше в клетках ФЭБ по сравнению с клеточными линиями ФЗК ($p < 0,05$) (рисунок 1.19 А; таблица 1.4).

Таким образом, было показано отличие активности перестройки ВКМ фибробластами РДБЭ от здоровых фибробластов.

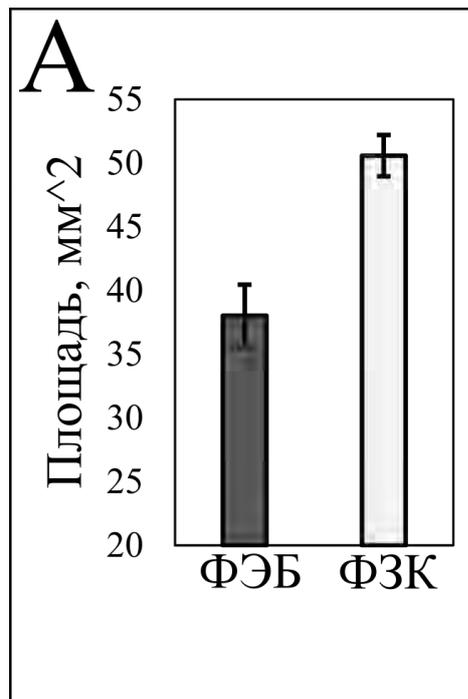


Рисунок 1.19 А - Анализ контракции коллагенового геля ФЭБ и ФЗК
 Результаты теста Манна – Уитни показывают, что распределения значительно различаются ($p < 0,05$). Для каждой группы показаны среднее значение и стандартная ошибка .

Статистика выполнена с использованием однофакторного дисперсионного анализа с LSD тестом Фишера. Сокращение коллагенового геля отдельными линиями ФЭБ сравнивали с ФЗК1 с помощью теста Манна-Уитни. FSC и SSC ФЭБ сравнивали с ФЗК1 с помощью критерия хи-квадрат FlowJo. «Больше» и «Меньше» указывают, что линия ФЭБ имеет большее или меньшее значение, соответственно, по сравнению с ФЗК, и разница значима ($p < 0,05$).

1.2.3.8 Роль выявленных мутаций в структуре и функционировании гена *col7a1*

Среди четырех пациентов с РДБЭ, пациенты д1 и д3 демонстрировали более тяжелые формы заболевания, в то время как д2 и д4 имели более мягкие фенотипы. Важно отметить, что д1/д3 имели гомозиготные состояния мутаций, в то время как д2/д4 имели гетерозиготные мутации.

Мутации *col7a1* пациентов д1 и д3 были локализованы в разных частях гена, нарушая домен NC1 и дистальную часть тройного спирального домена (triple-helical domain; THС), соответственно. Однако генерализованная тяжелая форма РДБЭ характерна для обоих пациентов.

Был показан составной гетерозиготный статус мутаций в *col7a1* пациента д2. Накопленные данные о мутациях д2 были сопоставлены с ранее опубликованными и позволяют предположить, что основное влияние на инвертированный фенотип РДБЭ в д2 обусловлено мутацией в экзоне 74 p.R2069C [37].

Мутации с.425A>G, с.682 + 1G> A и их сложные комбинации довольно часты, особенно среди европейской популяции РДБЭ [31, 38].

Мутация с.425A>G привлекает внимание не только из-за своей частоты в европейской популяции, но и из-за возможности ее лечения с помощью системы редактирования генома CRISPR/Cas9, т.к. контекст локальной последовательности сайта мутации содержит последовательность РАМ для направления гидовой РНК, показавшей свою высокую эффективность в генной терапии [39, 40].

Описаны случаи пациентов с комплексными гетерозиготными мутациями, в том числе р.G174R, которая была обнаружена у пациента д4. Хотя она была локализована в домене NC1 col7a1, у пациентов была обнаружена незначительная экспрессия функционального C7 с рудиментарными крепящими фибриллами [41].

Мутация с.520G>A col7a1 у пациента д4 (положение в геноме 48630789 в GRCh37 / hg19) была описана ранее [42] у пациента с тяжелым генерализованным РДБЭ, где эта мутация сочеталась с гетерозиготной мутацией в экзоне 117.

У пациента д3 была обнаружена гомозиготная мутация р.G2749R col7a1, которая вызывает тяжелую форму РДБЭ в сочетании с новой мутацией в krt5, р.R352C. Мутация находилась на С-конце домена ТНС. Важно отметить, что лиганды домена NC1, большая часть домена ТНС и сайтов расщепления домена NC2 были интактными. Эта замена глицина в C7 не изменяла способность клеток к миграции и связыванию с ВКМ [43]. Влияние р.G2749R на нарушение структуры C7 было показано ранее экзогенной экспрессией рекомбинантного белка [44]. Эта мутантная форма C7 имеет пониженную способность сворачиваться в тройную спиральную форму и имеет повышенную чувствительность к расщеплению протеазой.

1.2.3.9 Свойства клеток, полученных от пациентов с рецессивным дистрофическим буллезным эпидермолизом

Повреждение C7, вызванное мутациями, представляет собой наиболее важную часть патогенеза РДБЭ. Первоначально считалось, что нарушение структурного компонента ДЭС ведет к фенотипу РДБЭ, хотя теперь ясно, что общая картина развития этой патологии более сложна [45]. Потеря нормальных лигандов C7 в РДБЭ заставляет клетки кожи секретировать воспалительные факторы, а также матриксные и лизосомальные протеазы [46, 47].

На основании результатов ИЦХ можно сделать вывод, что следовые количества C7 присутствовали во всех линиях ФЭБ и КЭБ, но уровень белка был чрезвычайно низким, несмотря на разные типы мутаций. Это дает основание предполагать, что эти пациенты

могут быть иммунотолерантны к терапевтической инфузии рекомбинантного С7, трансплантации кожи или трансплантации костного мозга [48, 49].

Коллаген I, коллаген IV и фибронектин являются компонентами крепящих фибрилл и могут связываться с доменами NC1 С7 [50]. Было сделано предположение, что дефекты С7 в фибробластах РДБЭ могут вызывать изменения в паттернах экспрессии этих белков. Никакой разницы в экспрессии коллагена I и IV не было обнаружено. В тоже время полуколичественный анализ показал повышенную экспрессию альтернативной формы фибронектина, FN ED-A, но отсутствие разницы в общей экспрессии фибронектина. Это различие наблюдалось в фибробластах, посаженных с низкой плотностью, но ситуация в плотной популяции может быть иной [51].

S100A4, или фибробласт-специфический белок 1 (fibroblast specific protein; FSP1), считается специфическим маркером фибробластов [52]. Он экспрессируется при нормальном заживлении ран, а также участвует в патологических процессах [53]. TAGLN, который известен как белок, специфичный для фибробластов и гладкомышечных клеток, подавляется во время эпителиально-мезенхимального перехода и активируется в ответ на стимуляцию TGF- β [54, 55]. Анализ ИЦХ на экспрессию S100A4 и TAGLN выявил гомогенную окраску всех клеток, подтверждая фибробластную природу этих клеток и отсутствие контаминации другими типами клеток.

Крупномасштабные эксперименты *in vitro* с фибробластами пациентов с ВБЭ разных подтипов продемонстрировали чрезвычайно широкий диапазон способности к контракции (нормальная, плохая и гиперконтракция) [56]. В данной работе было показано, что в среднем линии ФЭБ имеют более высокую скорость контракции, чем здоровые клетки. Усиленная контракция ФЭБ может указывать на профибротические процессы в дерме пациентов с РДБЭ. В связи с этим проверили, может ли усиленная контракция клеток ФЭБ объясняться наличием миофибробластов в культуре. Окрашивание ИЦХ клеток ФЭБ на маркер миофибробластов выявило повышенную экспрессию α SMA. Возможно, что появление миофибробластов в культуре связано с трансдифференцировкой фибробластов под действием патологических факторов.

Морфологический анализ показал, что в среднем клетки ФЭБ больше по размеру, более распластаны и менее компактные по своей морфологии по сравнению с ФЗК. Причиной тому, вероятно, являются изменения цитоскелета, связанные с признаками клеточного старения, что подтверждается окраской ФЭБ на SA- β -Gal сопоставимой с ФЗК от пожилых доноров. Известно, что стареющие фибробласты меняют свою морфологию от маленькой веретенообразной формы к большой плоской распластанной форме, и поэтому увеличение площади поверхности может быть частично отнесено к изменениям в

цитоскелете [57]. Сообщалось, что кожа пациентов с РДБЭ поразительно похожа на кожу пожилых людей с ее выраженными ультраструктурными, клиническими особенностями и некоторыми белковыми маркерами [58]. Кроме того, было показано, что человеческие фибробласты кожи от пожилых доноров отличались по морфологии в сторону увеличенного размера клеток [59, 60].

1.3 Заключение

Таким образом, проведенное исследование регенерационных процессов показало, что предложенная нами оценка таких параметров раневого процесса, как инфильтрация раны воспалительными клетками, состояние зоны ремоделирования ткани, количество ВФ, васкуляризация раневого ложа, согласно соответствующим стадиям ранозаживления, методами гистологии и иммуногистохимии является адекватной и подходит для оценки эффективности трансплантации БЭК на предложенной модели. Кроме того, в работе был предложен новый показатель – коэффициент сглаживания, который, являясь отношением толщины зоны ремоделирования ткани к толщине дермы краев раны, позволил оценить степень заполненности раневого ложа развивающейся тканью. Данный показатель позволит оценивать состояние зоны ремоделирования ткани в раневом ложе с трансплантацией и без неё, и таким образом прогнозировать эффективность БМКП на предмет устранения косметических дефектов. Трансплантация БМКП влияет на свойства фибробластов и препятствуют механическому напряжению в ране и, как следствие, предотвращает формирование косметического дефекта. В то же время, достоверные различия в количестве волосяных фолликулов по краям ран и инфильтрацию раневого ложа воспалительными клетками у мышей из групп «контроль» и «БЭК» обнаружены не были. На ангиогенез трансплантация БЭК также не влияла.

Экспрессия RIPK-1 и RIPK-3 в длительно незаживающих кожных ранах наблюдалась в зонах, где запрограммированная клеточная гибель не выявлялась. Таким образом, экспрессия RIPK-1 и RIPK-3 в здоровой и поврежденной коже может быть не связана с запрограммированной клеточной гибелью.

Были выявлены и подтверждены мутации четырех пациентов с РДБЭ. Полученные данные расширяют знания относительно распространенности мутаций в популяции, а также демонстрируют случаи комбинации нескольких мутаций в рамках одного генома, что демонстрирует важность исследования генома для установления причин заболевания.

Исследование выявило присутствие, в случае гомозиготной мутации с.425A>G, наличия последовательности РАМ рядом с областью мутации, что потенциально может быть использовано в разработке генной терапии данного типа мутаций с помощью системы редактирования генома CRISPR/Cas9.

Как для фибробластов, так и для кератиноцитов полученных от пациентов с РДБЭ было показано значительное снижение экспрессии С7, но не полное его отсутствие. Тот факт, что на ИЦХ и в клеточных лизатах обнаруживались мишени связывания антител против наиболее иммунореактивной части С7 свидетельствует о том, что данные

пациенты могут быть иммунотолерантны к введению здорового *C7* в организм, что открывает широкие возможности относительно доступных для них вариантов терапии.

В культуре фибробластов, полученных от пациентов с РДБЭ, было обнаружено присутствие миофибробластов и черт характерных для стареющих клеток, что указывает на наличие воспалительных и фиброзных процессов в коже. При этом признаков онкотрансформации обнаружено не было. Полученные данные указывают на вклад процессов воспаления и фиброза в приобретение фенотипа РДБЭ. Дальнейшие исследования данного направления могут открыть новые способы коррекции симптомов и улучшения состояния пациентов с РДБЭ, не связанные напрямую с исправлением структурной составляющей заболевания.

Получено 4 новых линии фибробластов и 2 линии кератиноцитов от пациентов с ВБЭ, для которых были выявлены мутации (в т.ч. новые) приводящие к фенотипу РДБЭ. Характеристика данных линий привела к обнаружению сниженной, но не отсутствующей экспрессии *C7* во всех линиях, а также фиброзного и стареющего фенотипа фибробластов без признаков онкотрансформации [61].

Дополнительно в целях планирования новой тематики в рамках данного раздела проведен обзор литературы и проведено описание образования газообменных единиц в легких как многофакторного процесса, который включает изменения актомиозинового цитоскелета альвеоцитов и миофибробластов, эластогенез, передачу сигналов ретиноевой кислоты и вклад мезенхимальных альвеолярных клеток во вторичную септацию [62].

1.4 СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Xu F., Zhang C., Graves D.T. Abnormal cell responses and role of TNF- α in impaired diabetic wound healing// *BioMed Research International*. - 2013. - Vol. 2013. - Art. № 754802. DOI: 10.1155/2013/754802.
2. Zhang J. et al. PKC η as a promising therapeutic target for TNF α -induced inflammatory disorders in chronic cutaneous wounds//*Int. J. Mol. Med*. - 2017. - Vol. 40. - № 5. - P. 1335 – 1346. DOI: 10.3892/ijmm.2017.3144.
3. Eming S.A., Krieg T., Davidson J.M. Inflammation in wound repair: Molecular and cellular mechanisms//*J. Invest. Dermatol. Elsevier Masson SAS*. - 2007. - Vol. 127. - № 3. - P. 514 – 525. DOI: 10.1038/sj.jid.5700701.
4. Zhao R. et al. Inflammation in chronic wounds//*Int. J. Mol. Sci*. - 2016. - Vol. 17. - № 12. - P. 1 – 14. DOI: 10.3390/ijms17122085.
5. Васильев А.В., Клеточные механизмы репарации тканевых повреждений: автореф. дис. канд. биол. наук : 03.00.25. – М., 2003. – 39 с.
6. Zhang Q. et al. Hyperbaric oxygen attenuates apoptosis and decreases inflammation in an ischemic wound model//*J. Invest. Dermatol. United States*. - 2008. - Vol. 128. - № 8. - P. 2102 – 2112. DOI: 10.1038/jid.2008.53.
7. Rai N.K. et al. Apoptosis: A basic physiologic process in wound healing//*Int. J. Low. Extrem. Wounds*. - 2005. - Vol. 4. - № 3. - P. 138 – 144. DOI: 10.1177/1534734605280018.
8. Lao G. et al. Human tissue inhibitor of metalloproteinases-1 improved wound healing in diabetes through its anti-apoptotic effect//*Exp. Dermatol. Denmark*. - 2019. - Vol. 28. - № 5. - P. 528 – 535. DOI: 10.1111/exd.13442.
9. Shaikh-Kader A. et al. The link between advanced glycation end products and apoptosis in delayed wound healing//*Cell Biochem. Funct*. - 2019. - Vol. 37. - № 6. - P. 432 – 442. DOI: 10.1002/cbf.3424.
10. Pasparakis M., Vandenabeele P. Necroptosis and its role in inflammation//*Nature. England*. - 2015. - Vol. 517. - № 7534. - P. 311 – 320. DOI: 10.1038/nature14191.
11. Saito N. et al. RIPK1 downregulation in keratinocyte enhances TRAIL signaling in psoriasis//*J. Dermatol. Sci. Japanese Society for Investigative Dermatology*. - 2018. - Vol. 91. - № 1. - P. 79 – 86. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2018.04.007.
12. Al-Lamki R.S. et al. Tubular epithelial cells in renal clear cell carcinoma express high RIPK1/3 and show increased susceptibility to TNF receptor 1-induced necroptosis//*Cell Death Dis*. - 2016. - Vol. 7. - № 6. - P. 1 – 14. DOI: 10.1038/cddis.2016.184.

13. Chermnykh E.S. et al. Tissue-engineered biological dressing accelerates skin wound healing in mice via formation of provisional connective tissue //Histol. Histopathol. Spain. - 2018. - Vol. 33. - № 11. - P. 1189 – 1199. DOI: 10.14670/HH-18-006.
14. Han G., Ceilley R. Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments//Adv. Ther. Springer Healthcare. - 2017. - Vol. 34. - № 3. - P. 599 – 610. DOI: 10.1007/s12325-017-0478-y.
15. Brenner D.A. et al. Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumour necrosis factor-alpha//Nature. England. - 1989. - Vol. 337. - № 6208. - P. 661 – 663. DOI:: 10.1038/337661a0.
16. Dayer J.M., Beutler B., Cerami A.A. Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts//J. Exp. Med. - 1985. - Vol. 162. - № 6. - P. 2163 – 2168. DOI:: 10.1084/jem.162.6.2163.
17. Morgun E., Rogovaya O., SuchinichI K., Vorotelyak E. Scar formation under an influence of tissue-engineered skin equivalent in non-healing skin wound model//FebsOpenBio. - 2021. - Vol. 11. - P. 336 - 337.
19. Е.И. Моргун, О.С. Роговая, К.К. Сухинич, Е.А. Воротеяк. Образование рубца под воздействием тканеинженерной конструкции в модели длительно незаживающей раны//Гены и клетки. – 2020. - Т. XV. - №3. – Приложение. – С. 104.
20. Li X. et al. Optoacoustic mesoscopy analysis and quantitative estimation of specific imaging metrics in Fitzpatrick skin phototypes II to V//J. Biophotonics. - 2019. - Vol. 12. - № 9. - P. 1 – 9. DOI: 10.1002/jbio.201800442.
21. Моргун Е.И., Позднякова Е.Д., Воротеяк Е.А. Экспрессия протеинкиназ RIPK-1 и RIPK-3 в клетках волосяного фолликула мыши и человека//Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. - 2020. - Т. 494. - № 1. - С. 252 – 255. / Morgun E.I., Pozdniakova E.D., Vorotelyak E.A. Expression of Protein Kinases RIPK-1 and RIPK-3 in Mouse and Human Hair Follicle//Dokl. Biochem. Biophys. - 2020. - Vol. 494. - № 1. - P. 252 – 255.
22. Godwin A. et al. Receptor-Interacting Protein Kinase 3 Deficiency Delays Cutaneous Wound Healing. // PLoS One. 2015. Vol. 10, № 10. P. e0140514.
23. Grievink H. W., Luisman T., Kluft C., Moerland M., Malone K. E. Comparison of Three Isolation Techniques for Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: Cell Recovery and Viability, Population Composition, and Cell Functionality//Biopreservation and Biobanking. – 2016. – Т. 14. – Comparison of Three Isolation Techniques for Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. – № 5. – С. 410 - 415. DOI: 10.1089/bio.2015.0104.

24. Schindelin J. et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis//Nature Methods. – 2012. - Vol. 9. – № 7. – P. 676 - 682. DOI: 10.1038/nmeth.2019.
25. GitHub - nicjac/PHANTAST-FIJI: Repository for the FIJI/ImageJ implementation of the phase contrast microscopy segmentation toolbox (PHANTAST) [Электронный ресурс]. – URL: <https://github.com/nicjac/PHANTAST-FIJI> (дата обращения: 29.12.2020).
26. Salomon G.D. et al. The local effects of cachectin/tumor necrosis factor on wound healing.//Ann. Surg. - 1991. - Vol. 214. - № 2. - P. 175 – 180. DOI: 10.1097/00000658-199108000-00012.
27. Csikós M. et al. High frequency of the 425A-->G splice-site mutation and novel mutations of the COL7A1 gene in central Europe: significance for future mutation detection strategies in dystrophic epidermolysis bullosa//The British Journal of Dermatology. – 2005. - Vol. 152. – № 5. – P. 879 - 886. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2005.06542.x.
28. Gorell E.S. et al. Characterization of patients with dystrophic epidermolysis bullosa for collagen VII therapy//The British Journal of Dermatology. – 2015. - Vol. 173. – № 3. – P. 821 - 823. DOI: 10.1111/bjd.13737.
29. Van den Akker P.C. et al. The inversa type of recessive dystrophic epidermolysis bullosa is caused by specific arginine and glycine substitutions in type VII collagen//Journal of Medical Genetics. – 2011. - Vol. 48. – № 3. – P. 160 - 167.
30. Gorell E.S. et al. Characterization of patients with dystrophic epidermolysis bullosa for collagen VII therapy//The British Journal of Dermatology. – 2015. - Vol. 173. – № 3. – P. 821 - 823.
31. Jerábková B. et al. Analysis of the COL7A1 gene in Czech patients with dystrophic epidermolysis bullosa reveals novel and recurrent mutations//Journal of Dermatological Science. – 2010. - Vol. 59. – № 2. – P. 136 - 140.
32. Kahofer P. et al. Dystrophic epidermolysis bullosa inversa with COL7A1 mutations and absence of GDA-J/F3 protein//Pediatric Dermatology. – 2003. - Vol. 20. – № 3. – P. 243 - 248.
33. Yasukawa K. et al. Epidermolysis bullosa simplex in Japanese and Korean patients: genetic studies in 19 cases//The British Journal of Dermatology. – 2006. - Vol. 155. – № 2. – P. 313 - 317.
34. Almaani N. et al. Identical glycine substitution mutations in type VII collagen may underlie both dominant and recessive forms of dystrophic epidermolysis bullosa//Acta Dermato-Venereologica. – 2011. - Vol. 91. – № 3. – P. 262 - 266.

35. Tanaka T. et al. The epitope for anti-type VII collagen monoclonal antibody (LH7:2) locates at the central region of the N-terminal non-collagenous domain of type VII collagen//The British Journal of Dermatology. – 1994. - Vol. 131. – № 4. – P. 472 - 476.
36. Woodley D.T., Remington J., Chen M. Autoimmunity to Type VII Collagen: Epidermolysis Bullosa Acquisita//Clinical Reviews in Allergy & Immunology. – 2007. – Vol. 33. – № 1. – P. 78 - 84.
37. Vendrell X. et al. Pregnancy after PGD for recessive dystrophic epidermolysis bullosa inversa: genetics and preimplantation genetics//Journal of Assisted Reproduction and Genetics. – 2011. – Vol. 28. – № 9. – P. 825 - 832.
38. Gardella R. et al. Identification of two splicing mutations in the collagen type VII gene (COL7A1) of a patient affected by the localisata variant of recessive dystrophic epidermolysis bullosa//American Journal of Human Genetics. – 1996. - Vol. 59. – № 2. – P. 292 - 300.
39. March O.P., Kocher T., Koller U. Context-Dependent Strategies for Enhanced Genome Editing of Genodermatoses//Cells. – 2020. - Vol. 9. – № 1. – P. 112. DOI: 10.3390/cells9010112.
40. Zhang Z. et al. Analyzing Effects of Naturally Occurring Missense Mutations//Computational and Mathematical Methods in Medicine. – 2012. - Vol. 2012. DOI: 10.1155/2012/805827
41. Kern J.S. et al. Forty-two novel COL7A1 mutations and the role of a frequent single nucleotide polymorphism in the MMP1 promoter in modulation of disease severity in a large European dystrophic epidermolysis bullosa cohort//The British Journal of Dermatology. – 2009. - Vol. 161. – № 5. – P. 1089 - 1097.
42. Whittock N.V. et al. Comparative mutation detection screening of the type VII collagen gene (COL7A1) using the protein truncation test, fluorescent chemical cleavage of mismatch, and conformation sensitive gel electrophoresis//The Journal of Investigative Dermatology. – 1999. - Vol. 113. – № 4. – P. 673 - 686.
43. Woodley D.T. et al. Characterization of Molecular Mechanisms Underlying Mutations in Dystrophic Epidermolysis Bullosa Using Site-directed Mutagenesis//Journal of Biological Chemistry. – 2008. – Vol. 283. – № 26. – P. 17838 - 17845.
44. Chen M. et al. The recombinant expression of full-length type VII collagen and characterization of molecular mechanisms underlying dystrophic epidermolysis bullosa//The Journal of Biological Chemistry. – 2002. - Vol. 277. – № 3. – P. 2118 - 2124.
45. Nyström A. et al. Collagen VII plays a dual role in wound healing//The Journal of Clinical Investigation. – 2013. - Vol. 123. – № 8. – P. 3498 - 3509.

46. Küttner V. et al. Global remodelling of cellular microenvironment due to loss of collagen VII//Molecular Systems Biology. – 2013. - Vol. 9. – P. 657.
47. Thriene K. et al. Combinatorial Omics Analysis Reveals Perturbed Lysosomal Homeostasis in Collagen VII-deficient Keratinocytes//Molecular & cellular proteomics: MCP. – 2018. - Vol. 17. – № 4. – P. 565 - 579.
48. Rashidghamat E. Novel and emerging therapies in the treatment of recessive dystrophic epidermolysis bullosa / E. Rashidghamat, J.A. McGrath // Intractable & Rare Diseases Research. – 2017. – T. 6. – № 1. – C. 6 - 20.
49. Hwang E.S. A comparative analysis of the cell biology of senescence and aging / E.S. Hwang, G. Yoon, H.T. Kang // Cellular and molecular life sciences: CMLS. – 2009. – T. 66. – № 15. – C. 2503 - 2524.
50. Bell E., Ivarsson B., Merrill C. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro//Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1979. - Vol. 76. – № 3. – P. 1274 - 1278.
51. Inoue T. et al. Cell density-dependent regulation of fibronectin splicing at the EDA region in fibroblasts: cell density also modulates the responses of fibroblasts to TGF- β and cancer cell-conditioned medium//Cancer Letters. – 1998. – Vol. 129. – № 1. – P. 45 - 54.
52. Chen M. et al. Interactions of the Amino-terminal Noncollagenous (NC1) Domain of Type VII Collagen with Extracellular Matrix Components. A potential role in epidermal-dermal adherence in human skin// Journal of Biological Chemistry. – 1997. – Vol. 272. – № 23. – P. 14516 - 14522.
53. Bussard K.M. et al. Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment//Breast cancer research: BCR. – 2016. - Vol. 18. – № 1. – P. 84.
54. Hesper N.A. et al. Epithelial-to-mesenchymal transition in fibrosis: Collagen type I expression is highly upregulated after EMT, but does not contribute to collagen deposition//Experimental Cell Research. – 2013. – Vol. 319. – № 19. – P. 3000 - 3009.
55. Lawson D., Harrison M., Shapland C., Lawson D. Fibroblast transgelin and smooth muscle SM22 α are the same protein, the expression of which is down-regulated in many cell lines//Cell Motility. – 1997. - Vol. 38. – № 3. – P. 250 - 257.
56. Pan J. et al. Role of microRNA-29b in angiotensin II-induced epithelial-mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells//International Journal of Molecular Medicine. – 2014. - Vol. 34. – № 5. – P. 1381 - 1387.

57. Lago J.C., Puzzi M.B. The effect of aging in primary human dermal fibroblasts//PLoS ONE. – 2019. - Vol. 14. – № 7. - e0219165. DOI: 10.1371/journal.pone.0219165.
58. Breitenbach J.S. et al. Transcriptome and ultrastructural changes in dystrophic Epidermolysis bullosa resemble skin aging//Aging. – 2015. - Vol. 7. – № 6. – P. 389 - 411.
59. Strutz F. et al. Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1//Journal of Cell Biology. – 1995. – Vol. 130. – № 2. – P. 393 - 405.
60. Yang J. et al. Cell size and growth rate are major determinants of replicative lifespan//Cell Cycle. – 2011. - Vol. 10. – № 1. – P. 144 - 155.
61. Beilin A.K., Evtushenko N.A., Lukyanov D.K., Murashkin N.N., Ambarchian E.T., Pushkov A.A., Savostyanov K.V., Fisenko A.P., Rogovaya O.S., Vasiliev A.V., Vorotelyak E.A., Gurskaya N.G. Signatures of Dermal Fibroblasts from RDEB Pediatric Patients//Int. J. Mol. Sci. 2021. - 2021. - Vol. 22. - Is. 4. - Art. № 1792. DOI: 10.3390/ijms22041792. – Q1.
62. Rippa A.L., Alpeeva E.V., Vasiliev A.V., Vorotelyak E.A. Alveologenesi: What governs secondary septa formation// Int. J. Mol. Sci. 2021. - 2021. - Vol. 22. - Is. 22. - Art. №12107. DOI 10.3390/ijms222212107. – Q1.

1.5 Отчетные публикации по разделу

1. Beilin A.K., Evtushenko N.A., Lukyanov D.K., Murashkin N.N., Ambarchian E.T., Pushkov A.A., Savostyanov K.V., Fisenko A.P., Rogovaya O.S., Vasiliev A.V., Vorotelyak E.A., Gurskaya N.G. Signatures of Dermal Fibroblasts from RDEB Pediatric Patients//Int. J. Mol. Sci. 2021. - 2021. - Vol. 22. - Is. 4. - Art. № 1792. DOI: 10.3390/ijms22041792. – Q1.
2. Rippa A.L., Alpeeva E.V., Vasiliev A.V., Vorotelyak E.A. Alveologenesi: What governs secondary septa formation// Int. J. Mol. Sci. 2021. - 2021. - Vol. 22. - Is. 22. - Art. №12107. DOI 10.3390/ijms222212107. – Q1.

Раздел 2 Исследование механизмов дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток человека, в том числе при помощи методов генетического манипулирования

2.1 Введение

Фундаментальные процессы дифференцировки первичных половых клеток (ППК) человека в раннем эмбриогенезе плохо изучены, как в связи с невозможностью работы на эмбрионах человека, так и с отсутствием корректных клеточных моделей раннего развития ППК *in vitro*. Исходя из этого, на сегодняшний день представляется весьма актуальным создание корректной клеточной модели, отражающей дифференцировку плюрипотентных стволовых клеток человека в ППК.

Мы разработали метод дифференцировки эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека в направлении ранней мезодермы и далее в ППК, в условиях как адгезивной клеточной культуры, так и в виде свободно плавающих эмбрионидных телец (ЭТ). Мы показали, что, в случае дифференцировки на адгезивном субстрате важно придерживаться оптимального размера и рассеяния первоначальных клеточных колоний, что увеличивает эффективность дифференцировки. В случае использования ЭТ также было показано, что увеличение эффективности дифференцировки связано с уменьшением первоначального количества клеток в одном ЭТ. Разработанный протокол дифференцировки включает в себя две ступени: индукция дифференцировки ЭСК и ИПСК до стадии ранней мезодермы, с последующей дифференцировкой при помощи BMP4 в ранние ППК. При помощи прижизненной окраски на маркер ППК SSEA1 с последующим сортировкой нам удалось получить чистые популяции ППК из гетерогенных смесей. Чистые популяции ППК были жизнеспособны после сортировки и были способны к пролиферации в течение нескольких пассажей, во время которых также происходило их дальнейшее созревание.

Разработанный нами метод дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток в раннюю мезодерму и ее производные – ППК – открывает возможности для изучения процессов формирования ППК на ранних и поздних стадиях спецификации. Одновременно, этот метод позволяет производить моделирование процессов клеточной дифференцировки у пациентов с врожденными состояниями, сопровождающимися бесплодием, такими, как, например, синдром Дауна.

2.2 Материалы и методы

2.2.1 Культура клеток

Женские ЭСК человека были любезно предоставлены М.А. Лагарьковой. Женские индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (hiPSC-KYOU) куплены в коллекции клеточных культур АССТ. Оба клеточные линии поддерживались в среде для плюрипотентных клеток человека mTeSR1 на чашках, покрытых матригелем (BD Biosciences) при 37°C, 5%CO₂ и 2,5 % O₂. Для дальнейшего пассирования или процесса дифференцировки клетки обрабатывались диспазой (1мг/мл) в среде ДМЕМ.

2.2.2 Дифференцировка плюрипотентных стволовых клеток человека в первичные половые клетки

Дифференцировку проводили на чашках, покрытых матригелем. Сразу после посева клетки культивировали в среде mTeSR1, содержащей 5μM ROCKi в течение ночи при 37°C, 5%O₂ и 5% CO₂. На следующий день клетки индуцировали 50 ng/mL rhActA и 10 μM ROCKi в базальной среде, состоящей из DMEM/F12, 15% KSR, 0,1mM NEAA, 2mM GlutaMax, 1mM Sodium pyruvate и 0,1 mM 2-betamercaptoethanol в течение 36-42 ч. После 2 дневной индукции активинном А, клеточную культуру продолжали индуцировать 100 нг/мл BMP4, 20 нг/мл рекомбинантным человеческим LIF и 20мкМ ROCKi в течение 6 суток. После формирования эмбрионидных телец их дифференцировку проводили на неадгезивном субстрате. Эмбрионидные тельца индуцировали 50 нг/мл активина А и 10 мкМ ROCKi в течение 36-42 часов. Среду меняли раз в сутки. Далее на протяжении 6 дней эмбрионидные, индуцированные активинном А, культивировали в базальной среде в присутствии 100 нг/мл BMP4, 20нг/мл рекомбинантного человеческого LIF и 20 мкМ ROCKi. Среду меняли ежедневно.

2.2.3 Проточная цитофлуориметрия и сортинг клеток

Клетки инкубировали с антителами против SSEA1 (1:100) в культуральной среде в течение ночи при 37C, 5%O₂ и 5%CO₂. На следующий день среду сливали и культуру 3 раза промывали средой DMEM/F12, затем инкубировали со вторыми антителами (1:1000) в культуральной среде в течение 1,5 часа при 37°C, 5%O₂, 5%CO₂. После отмывки средой DMEM/F12 клетки обрабатывали диспазой 20-30 мин при 37°C. Аккуратным пипетированием получали одноклеточную суспензию. Диссоциированные клетки осаждали, и осадок ресуспендировали в 3% (v/v) бычьей сыворотке в PBS. Полученные клетки анализировали и сортировали с помощью сортера S3 cell sorter (Bio-Rad).

2.2.4. Приготовление гистологических препаратов

Для приготовления гистологических препаратов эмбрионидные тельца промывали 3 раза по 5 минут в PBS и затем фиксировали в 4% - ном параформальдегиде забуференным

PBS в течение 1,5 часа при +4°C. После фиксации эмбрионидные тельца отмывали в PBS 3 раза по 5 мин и проводили по 10%, 20%, 30% растворам сахарозы на PBS. Каждая проводка в сахарозе проводилась по 30 мин при комнатной температуре. После сахарозной проводки образцы заключали в смесь, Tissue Tec O.C.T. (Jung, Германия), замораживали и хранили при -70°C. Полутонкие криосрезы толщиной 7 мкм были получены с помощью криостата Leica (Leica Microsystems, Германия). Полученные криосрезы наклеивали на адгезивные, плюсовые стекла. Стекла высушивали при комнатной температуре и далее хранили при -20°C до последующих анализов.

2.2.5 Иммунофлуоресцентная окраска

Методика флюоресцентной окраски антителами против специфических эпитопов белков интересов была реализована в соответствии со стандартным протоколом. Культуру промывали раствором PBS и фиксировали 4% - ным параформальдегидом в забуференном PBS в течение 1 часа при 4°C. После фиксации клеточную культуру отмывали PBS 3 раза по 5 минут и инкубировали 60 мин в блокирующем растворе 10% FBS, 0,1% Triton X100, 0.01% Tween-20 в PBS при 37°C. Первичные антитела разводили в блокирующем растворе по рекомендациям производителя и наносили на клетки, инкубировали в течение 1,5 часа при 37°C. Затем отмывали от первых антител PBS 3 раза по 5 мин, затем наносили вторичные антитела, разведенные в блокирующем растворе и инкубировали при 37°C 1,5 часа. Препараты отмывали от антител, ядра окрашивали красителем DAPI 1 мкг/мл (Biotium).

Для выявления специфичности связывания антител проводили стандартный отрицательный контроль первичных и вторичных антител. Для отрицательного контроля первичных антител использовали фибробласты человека, а для вторичных антител при проведении протокола окраски не добавляли первичные антитела.

2.2.6 Микроскопия

Для анализа образцов использовали конфокальный (Zeiss LSM880) и флюоресцентные инвертированные микроскопы (EVOS и ZEISS AVIOVERT). Полученные изображения анализировали с помощью программ открытого доступа FIJI и ImageJ. Цейтраферную съемку проводили с помощью микроскопа EVOS с инкубационной камерой для клеточных культур. Съемку проводили в течение 24 часов с интервалом фиксирования изображения 2 часа. С помощью программного обеспечения зафиксированные изображения переводили в видео файл.

2.2.7 Выделение РНК, синтез кДНК и ПЦР анализ в реальном времени

Тотальную РНК из клеток выделяли с помощью набора для выделения тотальной РНК (Qiagen) согласно инструкции производителя. Тотальную РНК обрабатывали

ферментом Dnase I (Qiagen) в процессе выделения. Концентрацию выделенной РНК измеряли на спектрофотометре (IMPLEN P360 NanoPhotometer).

Синтез первой цепи кДНК

Первую цепь кДНК синтезировали на тотальной РНК с помощью набора MMLV RT-KIT (Евроген). Все этапы синтеза первой цепи кДНК проводили согласно инструкции производителя.

Подбор праймеров

Подбор праймеров проводили с использованием международной базы данных по нуклеотидным последовательностям и программы Primer BLAST (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Гены интереса анализировали и подбирали консервативные домены. Используя сиквенсы консервативных доменов, подбирали праймеры *in silico*. Праймеры для проведения ПЦР и ПЦР в реальном времени заказывали в ЗАО «Еврогене» и ООО «Биотех-Индустрии». Нуклеиновые последовательности праймеров и размеры ПЦР продуктов, соответствующим генам интересов, указаны в таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Список праймеров и их последовательности

Гены	Последовательности праймеров	Длина ампликона
SSEA1	F: AGGGGGTTCTTCCTCACCTT	107
	R: ATATGGCCTGTGGCAGATGG	
NANOS3	F: GCTACACCTCCGTCTACAGC	133
	R: CCGGCACCTCTGAAACCTG	
PRDM14	F: CTCTACGATCTGCCCTGGT	230
	R: CTCAGCCCCTCAGGTAACAG	
GAPDH	F: TGCACCACCAACTGCTTAGC	87
	R: GGCATGGACTGTGGTCATGAG	
OCT4	F: ACCCACACTGCAGCAGATCA	69
	R: CACACTCGGACCACATCCTTCT	
SOX2	F: TGCAGCGCTGCACAT	93
	R: GCAGCGTGTACTTATCCTTCTTCA	
NANOG	F: ACAACTGGCCGAAGAATAGCA	63
	R: GGTTCACAGTCGGGTTTAC	
KLF4	F: ACCAGGCACTACCGTAAACACA	79
	R: GGTCCGACCTGGAAAATGCT	
PRDM1	F: AAGCAACTGGATGCGCTATGT	108
	R: GGGATGGGCTTAATGGTGTAGAA	
DAZL	F: ATGTTGTACCTCCGGCTTATTCA	118
	R: CCATTTCCAGAGGGTGGAGTA	
DNMT3B	F:TGGAGCCACGACGTAACAAA	88
	R:GCATCCGTCATCTTTCAGCCTA	
PIWIL2	F: CTGAAACGGGAAATGCTTCCA	78
	R: CCTGTCCTTGCGTACCAGATTA	
TFAP2C	F: TTGCTGCACGATCAGACAGT	274
	R: ACCGGCCTCCATTTTTCGAT	
cKIT	F: GCTTACCAGAAGCTTCCATAGTG	72
	R: AGGTGAACTGCAAATACATAGGG	
EOMES	F: CCGACAATAACATGCAGGGC	184
	R: TGCAGTCGGGGTTGGTATTT	

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Качественную и количественную оценки экспрессии исследуемых генов проводили с помощью ПЦР и ПЦР в реальном времени. ПЦР проводили на ранее синтезированной кДНК. Для проведения ПЦР использовали набор Scree-mix (Евроген) для амплификации в соответствии инструкции производителя на амплификаторе T1000 Touch Thermal cycler (Bio-Rad). Температуру отжига праймеров брали из рекомендаций *in silico*, но в некоторых случаях подбирали эмпирически.

Агарозный электрофорез

Использовали 2% агарозный гель для подтверждения наличия продукта ПЦР и специфичности этого продукта.

ПЦР в реальном времени

Для количественного анализа уровня экспрессии гена интереса проводили ПЦР в реальном времени, основываясь на рабочих праймерах. Для проведения ПЦР в реальном времени использовали готовый коммерческий набор SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad) на амплификаторе ABI7500 (Appliedbiosystems). В процессе ПЦР в реальном времени образцы нормировали на исходные клетки и эндогенный ген GAPDH домашнего хозяйства. Обработку результатов проводили с помощью программы 7500 System software (Appliedbiosystems). Специфичность реакции оценивались по кривым плавления и электрофорезом на агарозном геле. Относительный уровень экспрессии исследуемых генов определялась выдаваемыми значениями программы 7500 Systems software и отдельными контрольными расчетами.

2.2.8 Статистические анализы

Статистический анализ полученных данных был проведен в программе Excell Microsoft Office. Для расчета критерия достоверности использовался статистический анализ two-tailed ANOVA. Критическое значение считалось статистически достоверным, если p-value равен, либо меньше 0,05.

2.3 Результаты и обсуждение

2.3.1 Дифференцировка ИПСК с трисомией 21 хромосомы в первичные половые клетки

Основываясь на опыте дифференцировки ИПСК женских линий в ППК-подобные клетки *in vitro*, было бы интересно изучить модель бесплодия. Мы, применяя протокол формирования ППК из ИПСК, постарались исследовать дифференцировку ППК-подобных клеток из мужских ИПСК, полученных от пациента с синдромом Дауна (СД). СД является подходящей моделью-кандидатом для анализа ранней спецификации ППК вплоть до появления зрелых гамет, поскольку пациенты с СД страдают бесплодием [1].

Конвенциональная линия ИПСК с синдромом Дауна (СД-ИПСК) была индуцирована в ранние мезодермо-подобные клетки. Далее, используя BMP4, клетки были направлены в ППК. Мы оценили влияние количества клеток с СД в эмбриоидных тельцах на индукцию в ППК поскольку предположили, что линии ИПСК с трисомией 21 хромосомы могут, по сравнению с нормальными ИПСК по-другому реагировать на индукцию. Соответственно, целью был подбор оптимальной концентрации клеток для дифференцировки СД-ИПСК в ППК. Мы наблюдали, что чем меньше клеток было в эмбриоидных тельцах, тем выше была экспрессия генов ППК.

Затем мы проанализировали и сравнили профиль экспрессии мРНК ППК, полученных из здоровых и СД-ИПСК. Здоровые и СД ППК экспрессировали *SOX2*, маркер плюрипотентности, на одинаковом уровне, в то время как экспрессия *OCT4* и *NANOG* была понижена в ППК с синдромом Дауна (СД-ППК) (рисунок 2.1). Анализ экспрессии мРНК в обеих группах клеток, индуцированных BMP4, показал, что ранние регуляторные мастер гены ППК, *EOMES*, *PRDM14* и *SOX17* были понижены в клетках с СД по сравнению со здоровыми ППК. Однако, *TFAP2C* был повышен в СД-ППК. Ранний мастер ген ППК *PRDM1* и маркер зародышевых клеток *PIWIL2* экспрессировались на более высоких уровнях в клетках с СД, в то время как поверхностный маркер *CD38* и *NANOS3* демонстрировали обратную картину экспрессии. Клетки с СД отличались от здоровых клеток пониженной регуляцией *NANOS3* (рисунок 2.1).

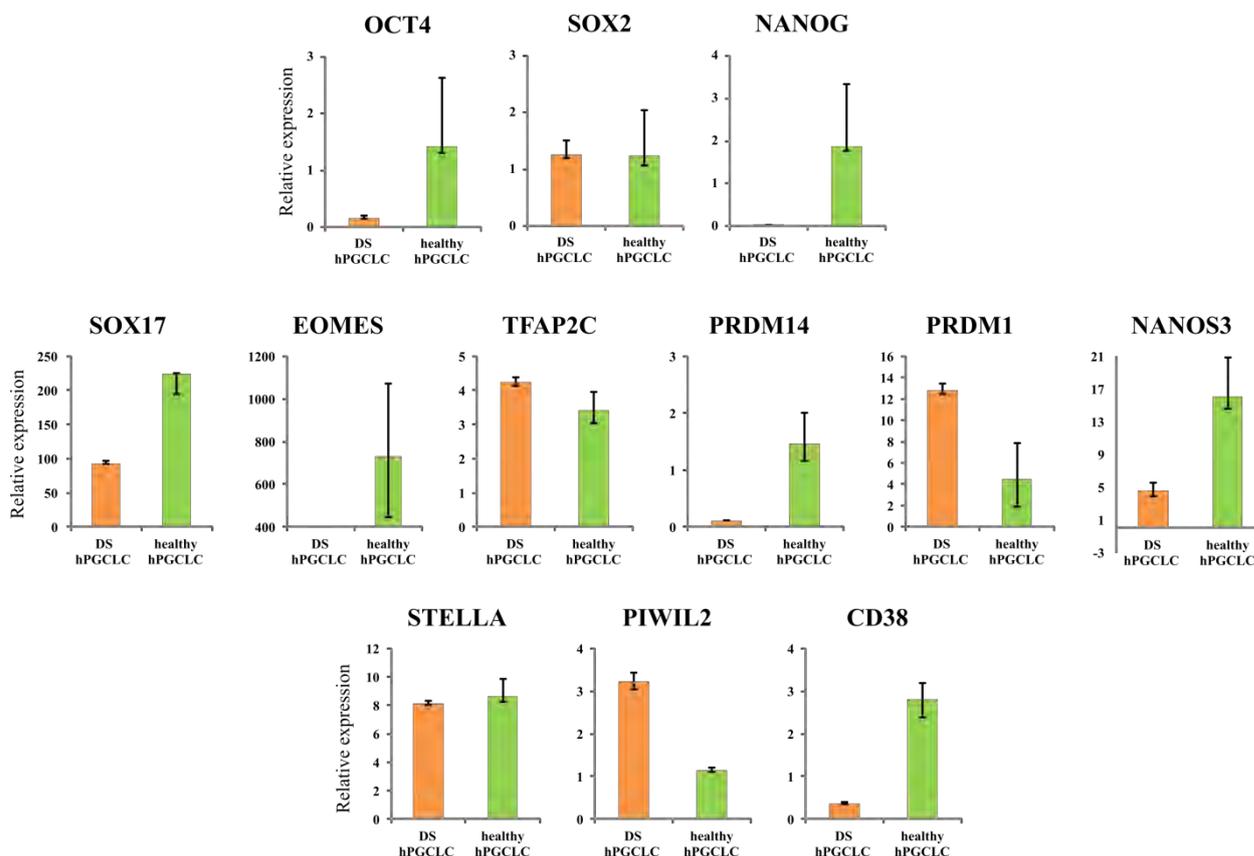


Рисунок 2.1 – Сравнение экспрессий генов ППК в ППК-подобных клетках с нормальным кариотипом и с синдромом Дауна

Это наблюдение мы подтвердили иммунофлуоресцентным окрашиванием. В ППК-индуцированных клетках с трисомией 21 хромосомы наблюдалось выборочное окрашивание OCT4, в то время как в ППК с набором 46 XY большинство клеток были положительными на OCT4. Сигнал NANOS3 отсутствовал или наблюдался в отдельных клетках в клеточной линии с трисомией 21 хромосомы после 6 дневной индукции с BMP4 (рисунок 2.2). Кроме того, здоровые ППК положительно окрашивались на NANOS3, который локализовался в цитоплазме и на периферии ядра. Антитела против SOX17 окрашивали ядра в клетках с трисомией 21 хромосомы, в то время как в нормальных ППК сигнал распределялся в цитоплазме. В связи с пониженной экспрессии мРНК NANOS3 и отсутствием сигнала NANOS3 при иммуноцитохимической окраске клеток с трисомией 21 хромосомы, мы провели сравнение флуоресцентного сигнала NANOS3 между здоровыми и СД-ППК. Этот анализ показал, что в клетках с СД, индуцированных BMP4, сигнал NANOS3 был в два раза ниже, чем у здоровых ППК. Для оценки эффективности дифференцировки из ИПСК с трисомией 21 хромосомы в ППК, мы провели анализ с помощью проточной цитометрии, прижизненно маркируя клетки антителами против поверхностного маркера ППК SSEA1 [2]. Результаты проточной цитометрии продемонстрировали снижение процента SSEA1+ клеток у СД-ППК. Несмотря на низкую

экспрессию мРНК *NANOS3*, гены *STELLA* и *PIWIL2* высоко экспрессировались в ППК с ДС. Возможная причина апрегулирования *TFAP2C* и *PRDM1* может быть связана с даунрегуляцией *NANOS3* в рамках регуляторного механизма.

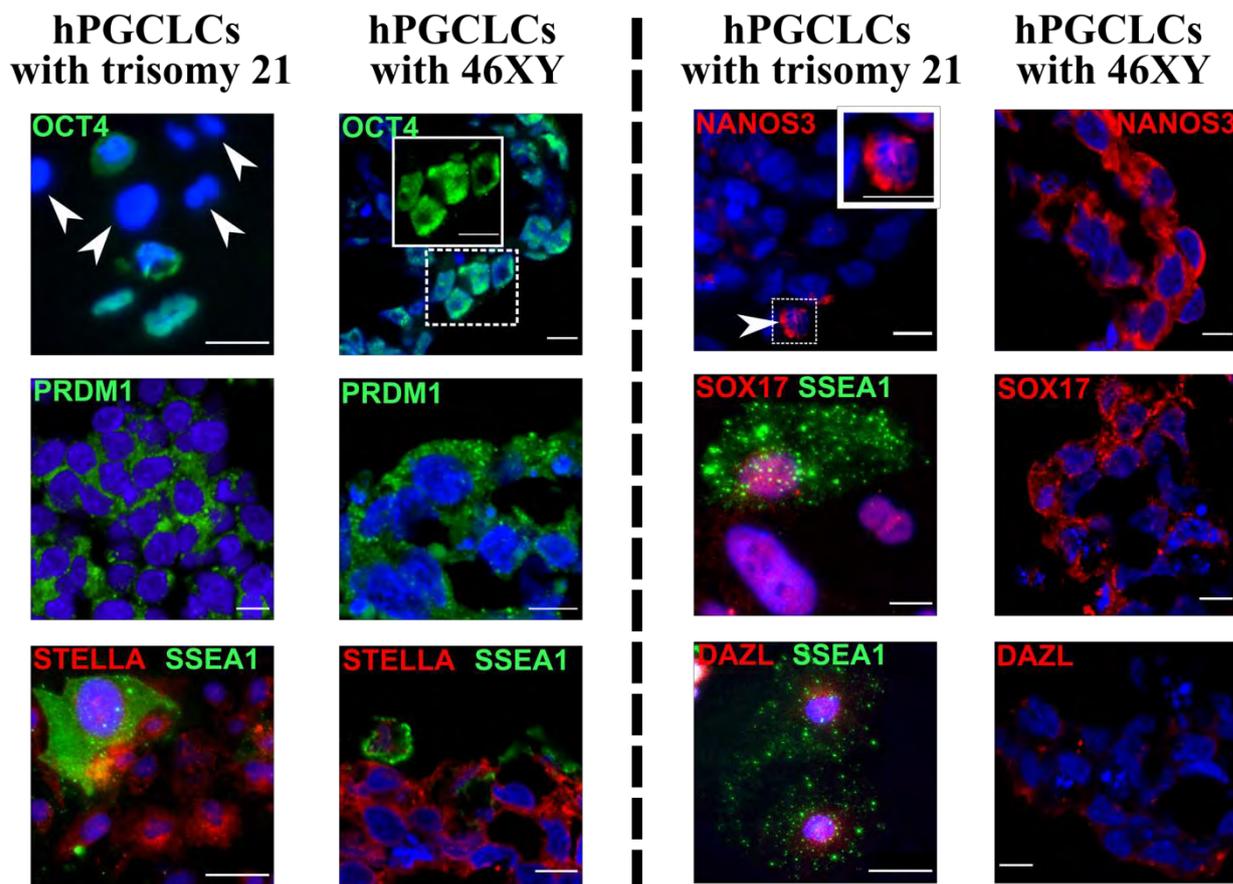


Рисунок 2.2 - Иммунофлуоресцентная окраска ППК-подобных клеток, полученных из ИПСК с нормальным кариотипом и синдромом Дауна

2.3.3 Обсуждение

Цель нашего исследования состоит в изучении возможности дифференцировки чиПСК в ППК. Мы показали, что ступенчатая индукция чиПСК дифференцирует их в ППК подобные клетки. Следует отметить, что возможность дифференцировки чиПСК в ППК является важным аспектом в изучении развитии ППК человека *in vitro*. Работа с эмбрионами человека имеет этические ограничения для использования в исследовательских целях. В связи с этим *in vitro* модель получения ППК человека из чиПСК является перспективной отраслью науки, которая ответит на многие вопросы формирования и обособления ППК и создаст возможность решить многие наследственные заболевания.

Мы показали, что у ИПСК с трисомией 21 хромосомы при индукции в ППК-подобные клетки нарушается экспрессия *NANOS3*, раннего маркера ППК [3]. Можно

предполагать, что нарушение функционирования NANOS3 может быть связано с генным дисбалансом в связи с лишней 21 хромосомой, либо же митотическое и мейотическое деления имеют точки контроля, не разрешающие дальнейшего процессинга и переноса генетической информации в клетках с нарушенным набором хромосом. Дополнительные фундаментальные исследования особенностей процесса дифференцировки ПСК в зародышевые клетки *in vivo* и *in vitro* откроют перспективы для лучшего понимания эмбриогенеза и мейоза ППК человека.

2.4 Заключение

Дифференцировка в ППК-подобные клетки ИПСК с трисомией 21 хромосомы показала, что отклонение в фертильности у пациентов с СД может быть связано с нарушением генетических и молекулярных механизмов обособления ППК на раннем этапе развития. Мы показали, что у ИПСК с трисомией 21 хромосомы при индукции в ППК-подобные клетки нарушается экспрессия *NANOS3*, раннего маркера ППК.

2.5 Список использованных источников

1. Pradhan M., Dalal A., Khan F., & Agrawal S. Fertility in men with Down syndrome: a case report//Fertility and Sterility. - 2006. – Vol. 86. - № 6. – P. 1765.e1-3. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2006.03.071.
2. Sugawa F., Araúzo-Bravo M. J., Yoon J., Kim K.-P., Aramaki S., Wu G., Stehling M., Psathaki O. E., Hübner K., & Schöler H. R. Human primordial germ cell commitment in vitro associates with a unique PRDM14 expression profile//The EMBO Journal. - 2015. – Vol. 34. - № 8. – P. 1009 – 1024. DOI: 10.15252/embj.201488049.
3. Abdyev, V. K., Dashenkova, N. O., Dashinimaev, E. B., Vorotelyak, E. A., & Vasiliev, A. V. NANOS3 downregulation in Down syndrome hiPSCs during primordial germ cell-like cell differentiation//Histochemistry and Cell Biology. - 2021. – P. 1 - 9. DOI: 10.1007/s00418-021-02040-6.

2.6 Отчетные публикации по разделу

1. **Abdyev V.K., Dashenkova N.O., Dashinimaev E.B., Vorotelyak E.A., Vasiliev A.V.** NANOS3 downregulation in Down syndrome hiPSCs during primordial germ cell-like cell differentiation//Histochemistry and Cell Biology. - 2021. – P. 1 - 9. DOI: 10.1007/s00418-021-02040-6.

Раздел 3. Гемопозитические стволовые клетки: идентификация, экспансия и дифференцировка в различных моделях

3.1 Введение

Многие десятилетия трансплантация гемопозитических стволовых клеток (ГСК) остаётся необходимым условием продления жизни пациентам, страдающим от гематологических нарушений, таких как острый миелоидный лейкоз, апластическая анемия, лимфомы, миеломы, и другие иммунодефицитные расстройства. Несмотря на растущий спрос на аутологичную и аллогенную трансплантацию ГСК, в связи с ростом частоты гематологических заболеваний, низкая встречаемость популяции ГСК в пуповинной крови и костном мозге (основном источнике ГСК) препятствует их медицинскому применению. Количество ГСК, которое можно получить от пациентов или доноров, часто оказывается неэффективным для восстановления костного мозга, поэтому расселение ГСК *ex vivo*, остаётся на сегодняшний день актуальной, серьёзной проблемой [1]. Современное состояние проблемы в этой области исследований таково, что точное воспроизведение регулярного, либо экстренного кроветворения остаётся пока невозможным.

3.2 Материалы и методы

3.2.1 Оборудование и реактивы

Инструменты для операционной и бокса, (пробирки, воронка, фильтр Cell Strainer Sterile 70µm, шприцы, спирт, лёд)

Среда DMEM (Gibco, #11960-044, США)

Среда F12 1X (Gibco, # 11765-047, США)

Лизис-буфер (50 мл H₂O, 8,26 г NH₄CL, 1 г K₂CO₃, 0,037 мг EDTA)

MACS –буфер (PBS pH 7,2, 0,5% NBCS, 2 mM EDTA)

FITC – CD34 (#11-0341-85, «eBioscience»),

c-Kit-PE (#12-1171-83, «eBioscience»),

Lin biotinylated cocktail (CD11b, Gr1, CD45, Ter119, CD3e) (341080, «Glycotope GmbH»), SA –APC-Cy7 (405208, «BioLegend»), Sca1-BV11 (108131, «BioLegend»)

Anti-PE MicroBeads. (#130-048-801, «Miltenyi Biotec»)

Оборудование для магнитной сортировки (Miltenyi Biotec)

Пенициллин/стрептомицин (PenStrep) (#15070-063, Gibco, США)

Фосфатно-солевой буфер (PBS, №Am-E404-200, «Хеликон»)

Эмбриональная бычья сыворотка (Gibco, №10270-106, США),

TPO –тромбопоэтин (Murine TPO, #315-14-100UG, PeproTech)

SCF-фактор стволовых клеток (SCF Mouse #S-9915, Sigma)

ITSX – инсулин-трансферрин (Gibco, # 51500-056, США)

HEPES – буферный раствор (Gibco, #15630-056, США)

HAS –сывороточный альбумин человека (Rec Albumin, Biosciences #

PVA –поливиниловый спирт (0,1 г порошка ПВС, 49 г дист H₂O.)

Poly-D- Lysin – полилизин (№ 127-5.5, CELL)

Желатин 0,1% раствор (№ Ф061, ПанЭко)

Дистиллированная вода BD lysing solution (10x, (№ 349202),

Параформальдегид (PAF, P6148-1KG, «Sigma», «Хеликон»),

Антитела к поверхностным маркерам

BD FACS Flow-проточная жидкость (для FACS Canto II, #342003, «Биолайн»)

BD FACS shutdown- раствор для выключения проточного цитометра (№334224, «Биолайн»)

BD FACS Clean (№340345, «Биолайн»)

BD FACS Rinse (№340346, «Биолайн»)

BD Cytometer Setup&Tracking Beads Kit (№655050, «Биолайн»)

Центрифуга

Вортекс

Автоматические дозаторы на 10-1000 мл;

Проточный цитофлуориметр (CytoFlex S)

Клеточный сортер FACS Aria III

Falcon пробирки (5 мл, #352008,)

Наконечники (10, 200,-1000 мкл)

Пробирки типа Эппендорф (0,5, 1 мл).

Пробирки на 15, 50 мл

Планшеты 96-луночные для культуры клеток с покрытием (Human Fibronectin Cellware, CORNING, #354409, США)

Планшеты 12-луночные для культуры клеток

Планшеты 96-луночные для культуры клеток, Eppendorf

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

3.2.2 Получение суспензии клеток костного мозга

Объектом исследования являлись клетки костного мозга половозрелых самцов мышей породы C57Bl/6. Средняя масса тела животных составляла 18-20г. Суспензию клеток КМ мыши получали из бедренных и большеберцовых костей. Суспензию фильтровали, центрифугировали при 300g 5мин, удаляли супернатант, ресуспендировали и добавляли буфер для лизиса эритроцитов (2 мин при комнатной температуре). Далее для отмывки буфера добавляли среду DMEM (пенициллин 100 ед./мл, стрептомицин 100мкг/мл, 12мМ/мл L-глутамин, 2% FCS) и центрифугировали для отмывки буфера при 300g 5мин. Супернатант удаляли, добавляли среду и считали клетки в камере Горяева. Из полученной первичной суспензии клеток КМ отбирали пробы для анализа (5 проб по 1 x 10⁶). Остальные клетки использовали для магнитной сортировки.

3.2.3 Магнитная сортировка клеток c-Kit+

Для магнитной сортировки из полученной суспензии клеток КМ отбирали пробу 20x10⁶ клеток и довели объём MACS-буфером до 5мл. Центрифугировали при 300g 5мин, супернатант отбирали досуха, осадок клеток ресуспендировали на вортексе. Добавляли 200 мкл буфера MACS. Вортексировали. Добавляли антитела 20 мкл anti c-Kit PE. Инкубировали 15 мин в холодильнике (в темноте, +4°C). Добавляли 1 мл буфера. Центрифугировали при 300g 10 мин. Супернатант отбирали досуха, осадок клеток ресуспендировали на вортексе (повторяли при необходимости). Ресуспендировали клетки

в 180 мкл буфера. Добавляли 20 мкл Anti-PE MicroBeads. Вortexировали, инкубировали 15 мин в холодильнике. Добавляли 1 мл буфера, центрифугировали при 300g 10 мин. Супернатант отбирали досуха. Осадок клеток разбивали, ресуспендировали клетки в 500 мкл буфера. Помещали колонку в магнитное поле в соответствующий MACS сортер, промывали колонку 3 мл буфера. Добавляли в колонку суспензию клеток через фильтр, собирали немеченую (отрицательную) фракцию клеток. Далее промывали колонку 3 мл буфера дважды, в ту же пробирку с немеченой фракцией. Удаляли колонку с немеченой фракцией из сортера, помещали стерильную пробирку для положительной (меченой) фракции. Добавляли в колонку каплями 5 мл буфера. Поршнем, с усилием вымывали меченую фракцию клеток. Промывали ещё раз в ту же пробирку. По окончании сортировки подсчитывали кол-во клеток в камере Горяева. Выделенные клетки окрашивали CD34 FITC - 2,5мкл 1x10⁶ кл, APC-Cy7- Lin - 2мкл 1x10⁶ кл, BV711-Sca1 - 1мкл.

3.2.4 Сортировка клеток на FACS

Предварительно отобранные из полученной первичной суспензии клеток Км пробы (5 проб: UL, FITC-CD34, PE-c-Kit, APC-Cy7-Lin, BV711-Sca1). Центрифугировали при 300g 5 мин. Вortexировали, супернатант отбирали досуха.

Приготовление а/г: рабочие объёмы, указанные в таблице, брали из расчета на 10⁷ клеток и менее. При использовании большего количества клеток все объёмы увеличивали пропорционально. В микронике добавляли по 50 мкл PBS +1% FCS на пробу, затем а/г соответственно таблице 3.1.

Таблица 3.1 - Панель антител

FITC-CD34	2µL
PE-c-Kit	1 µL
Lin: CD11b, Gr1, Ter119, CD3e, CD45 (Biotin)	По 1 µL каждого антитела
BV711-Sca1	0,5 µL
MIX	FITC-CD34 2 µL, Lin (биотинилированный коктейль) 1 µL, BV711-Sca 0,5 µL

Биотинилированные Lin⁺ докрасивали стрептавидином – APC-Cy7.

Сортировали клетки на FACS Aria III в три пробирки:

- 1) клетки LSK CD34-
- 2) клетки LSK CD34+
- 3) клетки LSK

После сортировки клетки центрифугировали и ресуспендировали в основной среде (F12+PVA) из расчёта 400 клеток в 100 мкл среды. Использовали плоскодонную 96-луночную плату для культуральных работ.

Клетки раскапывали по лункам в 2 планшета (с предварительно раскапанной средой с факторами по 100мкл/лунка). В итоге в каждой лунке было 200 мкл среды с факторами и 400 клеток.

3.3 Результаты и обсуждение

3.3.1 Гемопоз и гемопоэтическая стволовая клетка. Обзор литературы

Под гемопозом понимают образование клеток крови в процессе иерархической дифференцировки относительно небольшого количества гемопоэтических стволовых клеток. В основе иерархической системы гемопоза лежит гемопоэтическая стволовая клетка (ГСК, HSC).

Основными характеристиками ГСК являются способность находиться в состоянии покоя, способность к самообновлению и мультипотентность (т.е. способность давать начало различным популяциям клеток крови).

В популяции ГСК принято различать несколько субпопуляций, основными из которых являются длительно-репопулирующие (long-term hematopoietic stem cells, LT-HSC) и коротко-репопулирующие ГСК (ST-HSC) [2-4]. Около 75% LT-HSC в костном мозге находятся в состоянии покоя, в фазе G₀. После выхода из фазы G₀ LT-HSC входят в клеточный цикл и подвергаются симметричному или асимметричному делению, давая начало дочерним HSC и/или прекоммитированным гемопоэтическим прогениторным клеткам (ГСПК), способным дифференцироваться в различные типы клеток крови. ГСК наделены уникальной способностью соблюдать баланс самообновления и дифференцировки таким образом, что зрелые клетки, необходимые для функционирования тканей, могут быть быстро сгенерированы и заменены без истощения пула ГСК [5]. В эксперименте перенос LT-HSC летально облученным мышам-реципиентам обеспечивает формирование у реципиентов всех типов клеток крови и длительное восстановление гемопоза (по некоторым данным – более 12 мес) [5-8], что принято обозначать как длительная репопулирующая способность LT-HSC. ST-HSC, в отличие от LT-HSC, пролиферативно более активны. Также, как и LT-HSC, ST-HSC характеризуются мультипотентностью, однако они способны восстанавливать гемопоз у летально облученных реципиентов на более короткий период по сравнению в LT-HSC (до 6 мес.) [9]. Существует обратная связь между пролиферативной активностью HSC и ее репопулирующей способностью, что и объясняет различия в репопулирующей способности LT-HSC и ST-HSC.

Еще одна популяция клеток – мультипотентные предшественники (MPP, multipotent progenitor cells), также, как и LT-HSC и ST-HSC, обладает мультипотентностью, однако способность к самообновлению у этой популяции клеток уже теряется. В норме (в отсутствие стресса) именно на эту популяцию клеток приходится бо́льшая пролиферативная активность, и именно эта популяция поддерживает устойчивый гемопоз в отсутствие стресса; HSC в этих условиях, в основном, неактивны и находятся в

состоянии покоя [10]. Совокупность популяций ГСК и МРР принято называть гемопоэтическими стволовыми и прогениторными клетками-предшественниками (ГСПК).

Мультипотентность и самообновляемость ГСК, как ключевые характеристики стволовых клеток, вызывают большой интерес у исследователей. Показано, что состояние ГСК зависит от внутриклеточных и внеклеточных сигналов, обеспечивающих поддержание клеток в состоянии покоя и/или определяющих их выход в пролиферацию и дифференцировку. К внеклеточным факторам относятся, в частности, цитокины, секретируемые клетками ниши. Выделение и характеристика клеток, соседствующих с ГСК в костном мозге или пуповине, помогает идентифицировать эти факторы. Для поддержания ГСК требуются такие факторы как Stem Cell Factor (SCF), хемокиновый лиганд CXС-12 (CXCL12 или stromal cell-derived factor 1), тромбопоэтин (ТРО), ангиопоэтин-подобные белки, факторы роста фибробластов (1, 2) интерлейкины 3 и 6, фактор некроза опухоли, интерфероны и др.

При выделении ГСК необходимо учитывать набор экспрессируемых на поверхности клеток антигенов. ГСК могут быть выделены путем сортировки клеток, активированной флуоресценцией (FACS), с использованием маркеров клеточной поверхности. Маркировка ГСК с помощью моноклональных антител с последующей иммунофенотипической идентификацией является основным методом распознавания и сортировки кроветворных клеток со стволовым потенциалом. Одного маркера, позволяющего достоверно идентифицировать ГСК, не существует; популяцию идентифицируют по совокупности фенотипических маркеров. При этом совокупность маркеров, используемых для идентификации ГСК мыши и человека, существенно различается.

Первые эксперименты Мюллера-Сиебурга и Витлока из лаборатории Вейсмана в 1980-х гг. по выделению ГСК продемонстрировали, что у мышей популяция находится в костном мозге и не экспрессирует маркеры зрелых клеток, такие как B220 и Thy1 (Thy1 в то время считался маркером ГСК мыши) [11-13]. Вскоре было показано, что для ГСК характерно отсутствие экспрессии и других основных маркеров зрелых гемопоэтических клеток - Gr-1, B220, TER119, CD3e, CD11b, Mac-1. В связи с этим стал применяться термин «lineage negative cells» [14]. Отсутствие экспрессии линейных маркеров характерно не только для ГСК мыши, но и для ГСК человека [5]. В экспериментах, целью которых было дополнить список антигенов, характерных для ГСК мышей, были выявлены маркеры, первый из которых сегодня известен под названиями «антиген стволовых клеток-1» (stem cell antigen-1, Sca-1) и второй – «рецептор к фактору роста стволовых

клеток», c-Kit (CD117) [15]. Благодаря этим исследованиям было сформировано понятие популяции LSK (Lin- Sca-1+ c-Kit+), включающей весь гетерогенный пул ГСПК [4, 16].

Поскольку популяция Lin-Sca-1+c-kit+ гетерогенна, для идентификации ГСК применяется анализ дополнительных маркеров. Для идентификации ГСК мыши используют один из трех подходов: анализ ко-экспрессии CD34 и CD135, анализ ко-экспрессии CD150 и CD48, детекция так называемой боковой популяции. Возможно сочетанное использование перечисленных маркеров.

CD34 участвует в клеточной адгезии [17]. В зависимости от экспрессии CD34 популяция Lin-Sca-1+c-kit+ делится на субпопуляции CD34- и CD34+. Субпопуляция CD34- представлена клетками LT-HSC. Ее второй характеристикой является отсутствие экспрессии CD135 (фенотип CD34-, CD135-). При переносе летально облученным реципиентам клетки LSK CD34-CD135- обеспечивают длительное восстановление гемопоэза у мышей-реципиентов [8]. Популяция CD34+ включает в себя субпопуляции ST-HSC и MPP. Различить эти популяции можно, определяя экспрессию на них маркера FLK2/Flt3 (CD135) [1]. CD135 - член семейства тирозиновых протеинкиназ, передающих сигнал через фосфоинозитид-3-киназу (PI3K). Экспрессия CD135 увеличивается по мере дифференцировки LT-HSC в ST-HSC и MPP. Этот градиент экспрессии связан с функциональной ролью рецептора в определении клеточной судьбы.

В 1996 году Гуделл и коллеги [18] сообщили о новом методе идентификации популяции ГСК в костном мозге мышей, основанном на способности ГСК элиминировать (выбрасывать) флуоресцентный краситель Hoechst 33342. Благодаря этому свойству, при окрашивании суспензии клеток костного мозга данным красителем, ГСК имеют фенотип Hoechst 33342-/low, отличаются от остальных клеток костного мозга, имеющих фенотип Hoechst 33342+ и идентифицируются как клетки «боковой популяции» (Side population). Позже группой Моррисона [19] было охарактеризовано семейство сигнальных молекул активации лимфоцитов (SLAM), состоящее из CD150, CD244 и CD48. Было показано, что почти половина клеток популяции LSK имеет фенотип CD150+CD48-, и именно эта часть LSK обладает способностью долгосрочно восстанавливать кроветворение.

Поиск новых поверхностных маркеров и метаболитов клетки, позволяющих надежно идентифицировать ГСК и их субпопуляции, продолжается, и список маркеров постоянно пополняется новыми. Тем не менее, наиболее часто для идентификации ГСК используют один из устоявшихся и описанных выше методов идентификации этих клеток: SPLSK, LSK CD34- CD135-, LSK CD150+ CD48-, LSK CD34-CD150+.

Сочетание маркеров, используемых для идентификации ГСК человека, отличается от такового, используемого для идентификации ГСК мыши. В частности, для ГСК

человека характерна экспрессия CD34 [20], и для их идентификации принято использовать другой набор маркеров. Наиболее часто, ГСК человека идентифицируют как клетки Lin-, CD34+, CD38-, CD45RA-, Thy-1+, Rhodamin123Low, CD49f+.

3.3.2 Ниша ГСК

Кроветворение – образование клеток крови из ГСК, - является строго регулируемым и иерархическим процессом, хотя взгляды на чёткость иерархии в процессе гемопоэза в последние годы изменяются [21] ГСК находятся в особом окружающем их пространстве, называемом нишей. Кроветворная ниша постоянно реконструируется в зависимости от стадии развития и энергетических потребностей организма, требуя особую чувствительность, гибкость во взаимодействии с окружающей их стромальной средой. Впервые выдвинутая Скофилдом в 1978 году концепция ниши превратилась из простой гипотезы в широко распространённую модель кроветворения, которая включает различные биологические участки с различными целями. Ниша обеспечивает специализированную и строго контролируемую среду, которая определяет судьбу стволовых клеток, регулирует самообновление, скорость пролиферации и защищает клетки от истощения и гибели [16, 22, 23]. Различают эндостальные, расположенные в непосредственной близости от эндоста и сосудистые, находящиеся в непосредственной близости синусоидов и артериол костного мозга. Различные подтипы ниши по-разному влияют на судьбу ГСК. Согласно классическим представлениям (частично пересматриваемым в настоящее время) покоящиеся ГСК локализуются в эндостальных зонах, в тесном контакте с микрососудами. В формировании ниши участвуют многие типы клеток, включая остеобласты, остециты, остеокласты, эндотелиальные, мезенхимальные, нейрональные, глиальные клетки, периваскулярные мезенхимальные стволовые/стромальные клетки (МСК), ретикулярные клетки. Множество факторов, связанных с физиологией ниши ГСК, играют важную роль в процессах поддержания и дифференцировки ГСК. Совместные культуры ГСПК с клетками ниши оказались эффективными в сбалансированном поддержании и дифференцировке ГСК *in vitro* [5] Клетки ниши высвобождают важные медиаторы миграции и поддержания ГСК, включая E-селектин, CXCL12, фактор стволовых клеток (SCF), лептин и нестин [24, 25] Глиальные клетки являются компонентами ниши, которые влияют на регуляцию состояния покоя ГСК, посредством цитостатического эффекта активированного трансформирующей фактор роста β (TGF- β), который является мощным негативным регулятором (ингибитором) самообновления и пролиферации гемопоэтических клеток-предшественников. TGF- β активируется как через нишевые генерируемые паракринные сигналы, так и через ГСК-генерируемую аутокринную обратную связь [26].

Не менее важную роль в поддержании необходимого количества ГСК, играют мегакариоциты, предотвращая повышенный уровень пролиферации. Мегакариоциты могут напрямую регулировать размер пула HSC у мышей, так как являются источником лиганда CXCL4, также называемый фактором тромбоцитов 4 или PF4, в костном мозге. CXCL4 регулирует активность клеточного цикла ГСК и может подавлять пролиферацию гемопоэтических предшественников человека и мышей. Кроме того, было показано, что CXCL4 снижает химиочувствительность гемопоэтических предшественников человека и мыши. Мегакариоциты являются источником TGF- β , который необходим для поддержания состояния покоя ГСК [27]. Исследование способности ГСК к самообновлению у новорожденных мышат показало, что пул ГСК уменьшился в размерах у мышей Tgfb1 -/- в возрасте от 8 до 10 дней по сравнению с контрольными мышами. Кроме того, ГСК, выделенные из Tgfb1 -/- в возрасте от 8 до 10 дней мыши продемонстрировали ослабленную способность к самообновлению после трансплантации животным-реципиентам [1]. Изучение роли Smad3 из семейства белков Smad в кроветворении мышей показало, что неадгезивные культуры клеток, полученные из Smad3^{-/-} мышей содержали больше клеток, способных образовывать колонии, чем у мышей Smad3^{+/+} или Smad3^{+/-}. Эти результаты свидетельствуют о том, что подавление передачи сигналов Smad3 способствует поддержанию долгосрочного кроветворения *in vitro*. Однако, ГСК, изолированные из мышей с дефицитом Smad4 продемонстрировали сниженную способность к репопуляции у первичных и вторичных реципиентов, что указывает на то, что SMAD4 имеет решающее значение для самообновления ГСК *in vivo* [3,38]. Остеокласты, которые высвобождают накопленный TGF- β , накопленный во время регенерации кости, также могут способствовать самообновлению стволовых клеток [20]. Полученные результаты подтверждают роль различных типов клеток в определении передачи сигналов TGF в нише костного мозга и их регулирующее влияние на свойства ГСК *in vivo*. Остеобласты модулируют судьбу ГСК путем секреции тромбопоэтина (ТРО), тем самым активируя Notch сигнальные пути [1]. Остеоциты и мезенхимные стволовые клетки служат одним из основных поставщиков цитокинов для ГСК. Эндотелиальные клетки костного мозга (ВМЕС) образуют сеть кровеносных сосудов, которые регулируют как отток более дифференцированных клеток, лейкоцитов, так и поддержание ГСПК [28, 29]. Совместные культуры ГСПК с различными клетками ниши оказались эффективными в сбалансированном поддержании и дифференцировке ГСК *in vitro* [16]. Роль не гемопоэтических клеток костного мозга, с которыми взаимодействуют ГСК, их природа, и то, как они поддерживают или вызывают определенный аспект поведения ГСК, до сих пор

остаётся невыясненной окончательно, поэтому исследования в этой области активно ведутся до сих пор.

3.3.3 Разработка экспериментальных моделей экспансии ГСК

Отработка моделей для исследования процессов развития кроветворных клеток, моделирование кроветворной ниши для создания специфической среды, поддерживающей ГСК *ex vivo*, это одно из необходимых условий для экспансии ГСК и дифференцировки в искусственной среде. ГСК, как правило, остаются неподвижными в нише костного мозга, в то время как разнообразные стимулы, которые вызывают потерю покоя, побуждают их к выходу в клеточный цикл и индуцируют пролиферацию, часто связанную со стрессом, повреждением ДНК и апоптозом. Дальнейшие исследования в ближайшем будущем должны обеспечить средства для создания ниш *ex vivo*, которые могут лучше воспроизводить аспекты поведения ГСК. Накопленные на сегодняшний день данные подтверждают мнение о том, что одного моделирования ниш костного мозга может быть недостаточно для регулирования потенциала самообновления ГСК в культурах *ex vivo*. Очевидно, экспансия *ex vivo* потребует подходов, которые могут вызывать симметричное деление стволовых клеток и, следовательно, способствовать самообновлению ГСК без дальнейшей дифференцировки и апоптоза [1]. Разработка моделей кроветворения *ex vivo* зависит от понимания того, как ГСК реагируют на гемопоэтические цитокины. Нишевые факторы, включая тромбопоэтин, фактор стволовых клеток, лиганд Flt3, интерлейкин-6 и колониестимулирующий фактор гранулоцитов (G-CSF), использовались в культурах *ex vivo* для изучения влияния на пролиферацию ГСК. Оптимизация современных методов культивирования клеток для клинических применений за счет использования, например, белков сигнальных путей Wnt и Notch, или небольших молекул, таких как PGE2, SR-1 или UM171, могут способствовать экспансии ГСК *ex vivo*, а также повысить эффективность приживления генно-модифицированных ГСК. В настоящее время получение ГСК для клинических применений, в основном, основано на отборе клеток фенотипа CD34+. Однако, популяция CD34+ неоднородна, и содержит лишь небольшой процент LT-HSC, а именно эти клетки важны для клинической терапии, поскольку именно они обеспечивают длительное восстановление гемопоэза. Выделение более очищенных популяций ГСК человека с использованием хорошо известных маркеров, таких как CD90+, CD45RA+ и CD49f+, может помочь прицельному выделению желаемых популяций. Однако такой подход приведет к существенному уменьшению количества клеток, которые можно получить от донора, в связи с чем, потребует разработки методов экспансии выделенных ГСК.

Достижения в области визуализации и генетические инструменты расширили общие знания о нише ГСК [30]. Должны быть приняты во внимание и скорректированы дополнительные ключевые факторы, включая пластичность ГСК и профили метаболизма и транскриптома ГСК при отработке условий культуры *ex vivo* для увеличения числа ГСК с характеристиками, которые близки к примитивным ГСК, примитивными считаются ГСК мыши CD34⁺ и CD34⁻ [31]. В последние годы были достигнуты значительные успехи в области редактирования генов. Высокоэффективное редактирование генов ГСК широко применяется для биологических исследований и генетического анализа нарушений в процессах кроветворения. За последние несколько лет редактирование генов стало мощным инструментом для геномно - функциональных исследований и терапевтической коррекции моногенных заболеваний. Платформы для редактирования генов, такие как CRISPR/Cas9 и TALEN, показали большие перспективы в доклинических исследованиях для лечения гематологических заболеваний, однако, остаются нерешёнными важные проблемы, такие как эффективность и специфичность системы редактирования [32].

Репопулирующая способность, оцениваемая в тестах по трансплантации ГСК реципиентам, является основной характеристикой ГСК. По этическим причинам анализ репопулирующей способности ГСК человека может быть проведен только в системе ксенотрансплантации. Для ксенотрансплантации ГСК человека были созданы специальные модели, основанные на использовании в качестве реципиентов иммунодефицитных и/или гуманизированных мышей, что отменяет отторжение клеток человека и позволяет проследить приживление трансплантированных клеток. Другой используемой моделью является внутриматочная трансплантация у овец. Золотым стандартом для подтверждения принадлежности той или иной клеточной популяции к ГСК является метод «серийного переноса», заключающийся в переносе исследуемой клеточной популяции последовательно двум или более реципиентам с последующим определением способности клеток донора к восстановлению кроветворения у всех реципиентов [15]. Развитие кроветворной системы также достаточно широко изучено на модели *Danio rerio*.

Несмотря на интенсивные исследования механизмов, обеспечивающих самоподдержание популяции ГСК, до настоящего времени не удается разработать методы их эффективной экспансии *ex vivo*. Простота использования, низкая стоимость, широкая доступность этой модели предлагают значительные преимущества по сравнению с большинством моделей крупных животных. Генная терапия *ex vivo* на основе CD34⁺ гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) представила многообещающие результаты в клинических испытаниях. Так, например была разработана экспериментальная модель,

которая позволяет проследить развитие CD34+ ГСПК человека до различных субпопуляций, в ксенотрансплантате у гуманизированных мышей в течение 6 месяцев. Протокол трансплантации основан на введении высокоочищенных генно-модифицированных клеток CD34+CD38-, экспрессирующих GFP, с первичными клетками-предшественниками CD34+CD38+. Результаты показали, что CD34+CD38- клетки периферической крови могут быть культивированы *ex vivo* и использоваться для трансплантации с высоким потенциалом репопуляции [33]. Однако, каждая модель имеет как преимущества, так и свои ограничения. Общие различия в физиологии человека и мышей, несовместимость некоторых цитокинов затрудняет использование модели ксенотрансплантаций в некоторых вопросах [33, 34].

Несколько стратегий по увеличению числа функциональных кроветворных клеток человека *ex vivo* были основаны на высокопроизводительном объективном скрининге библиотек малых молекул и химических соединений. Эти исследования привели к идентификации нескольких небольших молекул (стемрегинин1 (SR1), производное пиримидоиндола – UM171, ингибитор деацетилазы – вальпроевая кислота (VPA)), которые в настоящее время используются в клинике для более эффективной экспансии в культурах *ex vivo* кроветворных клеток из клеток пуповинной крови CD34+ [31]. Разработка протоколов по экспансии ГСК с новыми комбинациями цитокинов является перспективным и востребованным направлением исследований.

Один из таких протоколов был недавно предложен Вилкинсон и соавторами [23]. Авторы показали, что культивирование сортированных ГСК мыши Lin-c-Kit+Sca-1+CD34- в среде без альбумина позволяет длительно поддерживать долгосрочную экспансию функциональных ГСК мыши *ex vivo*. Было обнаружено, что высокая концентрация в среде тромбопоэтина в сочетании с низкой концентрацией SCF и культивирование на поверхности, покрытой фибронектином, усиливают поддержание самообновления ГСК [32]. Используя этот метод, авторам удалось добиться увеличения количества 50 исходных ГСК примерно в 13 000 раз во время культивирования. Эти условия (100 нг/мл TPO и 10 нг/мл SCF) индуцировали пролиферацию различных субпопуляций ГСК, среди них наибольшей пролиферативной активностью обладала субпопуляция CD150+CD34- LSK. Среди различных данных литературы, уровень экспансии ГСК, достигнутый (по данным авторов) в этой работе, является наибольшим [23].

Актуальной является дальнейшая оптимизация имеющихся протоколов культивирования и разработка новых экспериментальных моделей для исследования различных аспектов гемопоэза.

Настоящая работа посвящена методам изоляции и экспансии ГСК мыши *ex vivo*.

3.3.4 Фенотип и стратегия очистки гематопозитических стволовых клеток. Составление панели и титровка антител для цитометрического анализа

В основе постоянно обновляющейся системы гемопоэза лежит полипотентная ГСК, способная к самообновлению и длительному самоподдержанию. До сих пор не установлены механизмы стабилизации ГСК в состоянии покоя, их активации, выхода на стадию симметричного или асимметричного деления и коммитирования к образованию функционально разных форменных элементов крови. Анализ литературных данных по экспансии и длительному культивированию ГСК показал, что интерес к этой проблеме всё так же высок, но вопрос выбора оптимальных условий культивирования остаётся открытым. Большой отклик вызвала работа А.С. Wilkinson с соавторами, которые смогли разработать протокол культивирования ГСК, обеспечивающий длительное наращивание ГСК (1–2 месяца) и получение значительного количества функциональных ГСК (по оценкам авторов, в течение месяца культивирования клеток экспансия составляла от 236-899 [23]). Кардинальным отличием их метода от уже существующих является использование поливинилового спирта (PVA) в качестве замены сывороточного альбумина. Задачей наших исследований на данном этапе была отработка методов фенотипической идентификации ГСК в экспериментах на мышах. Согласно протоколу А.С. Wilkinson и соавторов [32], для экспансии использовали клетки LSK, LSK CD34+, LSK CD34-. Для их получения клетки мышинного костного мозга выделяли из большеберцовой кости, бедренной кости и таза, окрашивали антителами PE-c-Kit, и выделяли обогащённые c-Kit+ клетки с помощью магнитных шариков anti-PE и колонок LS (Miltenyi Biotec). В 2021 г. нами были проведены эксперименты по отработке модели экспансии ГСК, предложенной А.С. Wilkinson и соавторами.

Выделение популяции обогащенной ГСК проводили по фенотипу Lin- c-Kit+ Sca1+CD34-; в составе Lin использовали маркеры: Gr1, Ter119, B220, CD3e, CD11b.

При составлении панели антител важно учитывать, как технические параметры прибора, сочетания каналов детекции и лазеров, так и биологические особенности исследуемой популяции клеток. Относительная плотность антигена находится в обратной зависимости от яркости флуоресценции выбранного флуорофора, поэтому для клеточных маркеров c-Kit и Sca-1 были выбраны наиболее яркие флуорофоры PE и BV711 соответственно. Для всех антител (SA, CD135, CD16/32), кроме CD34, были выбраны яркие флуорофоры в связи с тем, что популяция LSK в костном мозге представлена небольшим количеством клеток – около 2% (таблица.3.2, рисунок 3.1).

Таблица 3.2 - Панель антител

CD34	FITC
c-Kit	PE
Lin-SA	APC-Cy7
CD135	BV421
CD16/32	BV510
Sca-1	BV711

Титр антител является одним из этапов оптимизации панели антител для получения надежных результатов в идентификации популяций и определения нужного уровня экспрессии. Недостаточное количество антител означает, что интересующий маркер, экспрессированный на низком уровне, не будет отличаться значительным образом от отрицательной популяции, а избыток увеличивает неспецифическое связывание и смещение отрицательной популяции в сторону экспрессии. Проверка количества антител проводилась на Single-контролях. Оптимальное содержание антител на пробу определяли путем подсчета индекса разделения (Separation Index, SI) для каждого образца, которое зависит от интенсивности флуоресценции (MFI) положительной и отрицательной популяции. Число событий положительной популяции должно быть достаточным (около 20 тыс.). Чем выше окажется значение SI, тем лучше разделение между положительной и отрицательной популяцией (таблица 3.3)

$$\text{Separation Index} = \frac{\text{MedianPositive} - \text{MedianNegative}}{(\text{84\%Negative} - \text{MedianNegative})/0.995}$$

Таблица 3.3 - Анализ титра антител

Антитело	Содержание, μL	Median Positive	Median Negative	SI
CD34 FITC	1	2261	412	4,34
	2,5	2419	447	4,54
	5	2502	393	5,19
c-Kit PE	1	4251	239	19,9
	2,5	4464	439	18,4
	5	5146	267	16,5
SA APC-Cy7	1:100	6325	640	6,93
	1:500	5525	604	6,09
	1:1000	3236	803	2,19
CD135 BV421	1	6723	458	10,9
	2,5	5852	527	9,2
	5	5952	580	8,88
CD16/32 BV510	1	15851	806	18,5
	2,5	14655	485	11,8
	5	14510	217	10,8
Sca-1 BV711	0,5	2904	85,1	32,7
	1	3336	107	27,5
	2	3382	115	25,4

После подготовки панели антител был проведен анализ стратегии гейтирования для идентификации искомым популяций LT-HSC и ST-HSC стволовыми клетками по c-Kit маркеру [3, 16].

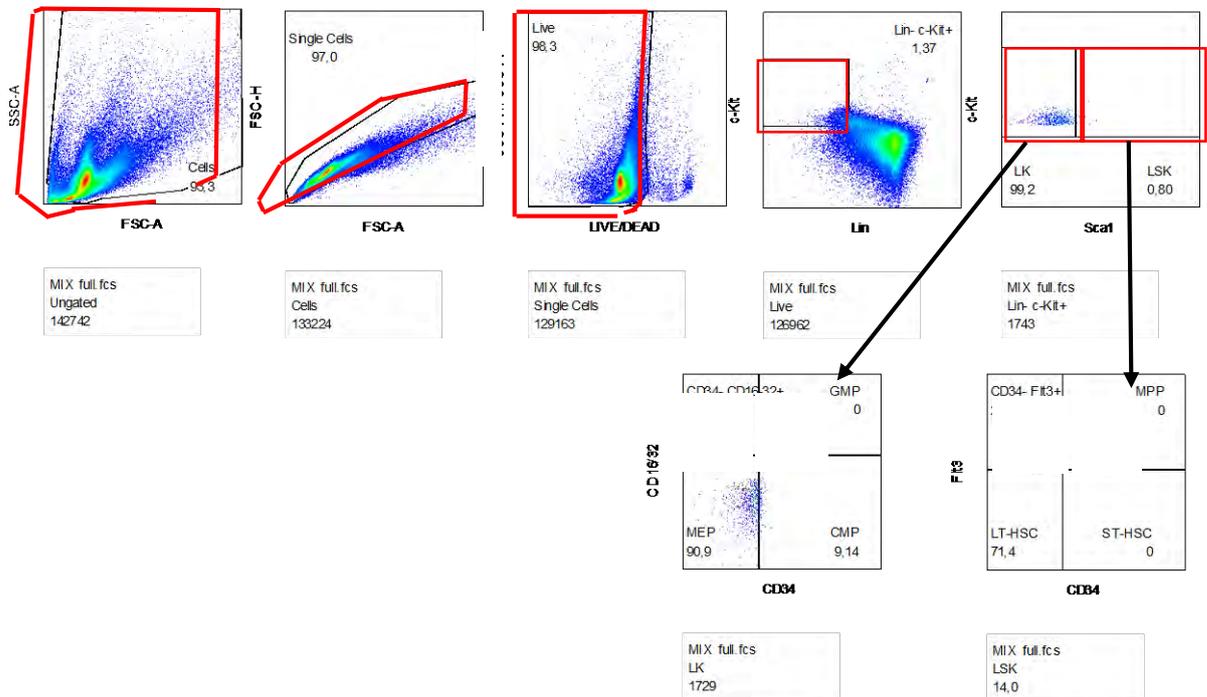


Рисунок 3.1 - Идентификация ГСК костного мозга мыши

Из LSK популяции: CD34- – LT-HSC, CD34+ Flt3- – ST-HSC, CD34+ Flt3+ – MPP (Multipotent Progenitor cell), из LK популяции выделили CD34- – MEP (Megakaryocyte-Erythroid Progenitor cell), CD34+ CD16/32- – CMP (Common Myeloid Progenitor cell), CD34+ CD16/32+ – GMP (Granulocyte-Monocyte Progenitor cell)

Чтобы отследить эффективность магнитной сортировки и подобрать условия, необходимые для ее эффективности, был проведен анализ суспензий отсортированных клеток.

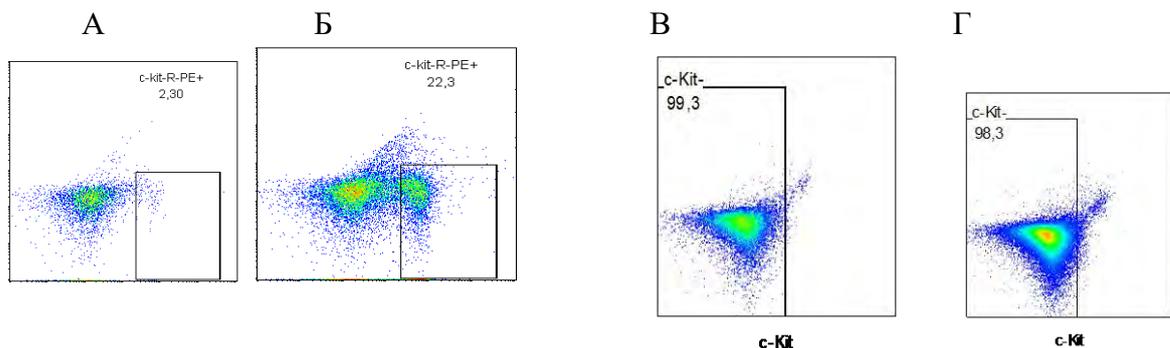


Рисунок 3.2 - Обогащение суспензии клеток костного мозга методом магнитной сортировки увеличивает содержание c-Kit+ клеток

А – КМ до сортировки на магнитных бусах MACS, Б - КМ после сортировки на бусах MACS. В - c-Kit положительные клетки в отрицательной фракции. Г - положительных клеток после дополнительного окрашивания негативной фракции с антителами c-Kit.

Исходя из полученных результатов (рисунок 3.2), можно сказать, что содержание с-Kit- положительных клеток в КМ до магнитной сортировки составляло 2,3% (рисунок 3.2 А). После проведения магнитной сортировки процедуры обогащения количество клеток в суспензии увеличивалось до 22,3% (рисунок 3.2 Б). В суспензии отрицательной фракции клеток вся популяция (с точностью до 99%) не содержала положительных по с-Kit маркеру клеток (рисунок 3.2 В), даже после дополнительной инкубации с анти-с-Kit-PE (рисунок 3.2 Г). Таким образом, благодаря магнитной сортировке, процент содержания положительных по с-Kit-маркеру клеток возрастал в 10 раз и с-Kit+ клетки отсутствовали в отрицательной фракции отсортированных клеток.

Следующим этапом была сортировка положительной фракции клеток, полученной после обогащения суспензии по с-Kit-маркеру, с помощью сортера FACS Aria III. Исследуемую фракцию клеток обрабатывали смесью антител (CD34, Lin, Sca-1). И сортировали 3 субпопуляции LSK: Lin-c-Kit+Sca1+CD34-, Lin-c-Kit+Sca1+CD34+ и Lin-c-Kit+Sca1+ (рисунок 3.3). При анализе обогащенных по с-Kit+ клеток, полученных в результате магнитной сортировки, стало явным существование двух субпопуляций по экспрессии с-Kit: Kithigh и с-Kitlow.

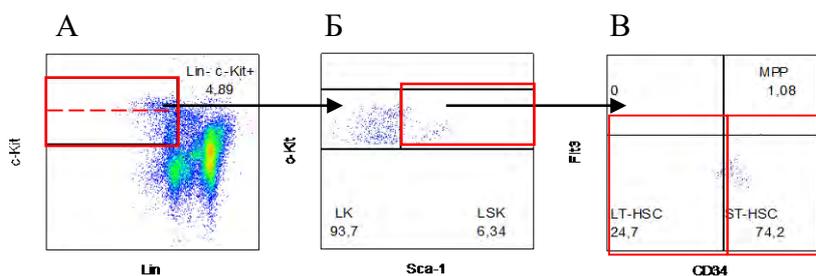


Рисунок 3.3 - Схема гейтирования клеточных популяций для флуоресцентно активируемой сортировки клеток (FACS)

Этап 1 – изоляция живых клеток по Live/Dead (не показано на рисунке), А — отделение по отсутствию экспрессии Lin-маркеров, в сочетании с с-Kit экспрессией. Б — определение LSK популяции клеток на основании ко-экспрессии с-Kit и Sca-1. В – разделение популяции LSK на основании наличия или отсутствия экспрессии CD34.

Полученные подгруппы клеток LSK CD34-, LSK CD34+ и LSK были отсортированы в пробирки и использованы для дальнейшего культивирования. Пилотные эксперименты по культивированию выделенных популяций показали, что они сохраняют жизнеспособность и могут быть поддержаны в культуре в течение не менее 8 дней. В дополнительных экспериментах были подобраны условия обеспечения стерильности сортированных популяций (инкубация в среде с повышенной (2х-кратной) концентрацией антибиотиков в течение 60 минут перед переводом клеток в стандартную среду (сохранение стерильности после сортировки является одной из проблем)).

Таким образом, в 2021 г. были отработаны методы фенотипической идентификации ГСК, подобраны условия для выделения очищенных субпопуляций клеток LSK, проведены пилотные эксперименты по культивированию выделенных клеток.

3.3.5 Отработка идентификации флуоресцентных молекул на мембране клеток

При работе с ГСК помимо их базовой фенотипической характеристики, большой интерес представляет возможность получения прижизненных изображений клеток и изучение динамики движения отдельных молекул на их поверхности в различных условиях. Решение этих задач возможно с использованием флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения (ФМПВО).

Для отработки этих методов были проведены эксперименты с обнаружением мускариновых рецепторов на поверхности кардиомиоцитов сердца мыши [35] и на примере мускариновых рецепторов, связанных с флуоресцено-меченым антагонистом: телензепином-Су3В изучали свойства мембраны культивируемых клеточных линий и первичных культур [36]. Для исследования флуоресцентных меток в живых клетках был использован метод флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения (ФМПВО), который позволяет получать прижизненные изображения клеток и изучать динамику движения отдельных рецепторов на поверхности клеток. Было показано, что исследование срезов сердечной мышцы мыши *ex vivo* выявило более высокий уровень подвижности молекул мускариновых рецепторов второго типа на мембране клеток, по сравнению с кардиомиоцитами мыши HL1 из культуры. Кроме того, была показана гетерогенность поверхностной мембраны различных типов клеток на примере мускариновых рецепторов, помеченных разными флуоресцентными метками.

3.4 Заключение

В рамках поставленной задачи анализа перспективных направлений исследований в области изучения и применения ГСК и отработки методов фенотипической идентификации ГСК в экспериментах на мышах было проведено детальное изучение литературы, посвященной исследованиям в области гемопоэтических стволовых клеток - современным представлениям о происхождении и развитии ГСК, процессам их дифференцировки и самоподдержания. На сегодняшний день проблема точного воспроизведения процесса кроветворения остаётся открытой, а фенотип ГСК и других популяций гемопоэтических клеток постоянно обновляется, благодаря непрекращающимся исследованиям. Разработка моделей экспансии ГСК *ex vivo* ведется в различных направлениях, однако наиболее пристальное внимание уделяется созданию актуального протокола культивирования. На основе анализа литературы нами был выбран протокол, разработанный Wilkinson и соавторами, показавший наиболее эффективный результат экспансии ГСК *ex vivo*. Исходя из условий выбранного протокола, нами была создана и оптимизирована панель антител для идентификации и дальнейшей сортировки популяций ГСК. Отработана методика по получению обогащенной суспензии по c-Kit маркеру и анализ полученной суспензии на проточном цитометре. Подобраны условия сортировки ГСПК-групп клеток: LSK CD34-, LSK CD34+ и LSK.

3.5 СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Naka K., Hirao A. Regulation of hematopoiesis and hematological disease by *tgf-b* family signaling molecules//Cold Spring Harb Perspect Biol. - 2017. – Vol. 9(9): a027987. DOI: 10.1101/cshperspect.a027987.
2. Zeng J., Yuxuan WuY., et al. Therapeutic base editing of human hematopoietic stem cells//Nat Med. -2020. - Vol.26 (4). – P.535 – 541. DOI: 10.1038/s41591-020-0790-y.
3. Chatterjee C., Schert P., Frommer M., et al. Rebuilding the hematopoietic stem cell niche: Recent developments and future prospects//Acta Biomaterialia. - 2021. - Vol. 11(1). - P. 1 – 20.
4. Bujko K., Kucia M., Ratajczak J., Ratajczak M.Z. Hematopoietic stem and progenitor cells (hspcs)//Stem Cells. - Advances in Experimental Medicine and Biology. - 2019. - Ch.3 - P. 49 - 77. -1201. DOI: 10.1007/978-3-030-31206-0_3.
5. Challen G.A., Boles N.C., et al. Distinct hematopoietic stem cell subtypes are differentially regulated by *tgf-b1*//Cell Stem Cell. - 2010.- Vol. 6(3). - P. 265 - 78. DOI: 10.1016/j.stem.2010.02.002.
6. Yang L., Bryder D., et al. Identification of *Lin_Sca1_kit_CD34_Flt3*_short-term hematopoietic stem cells capable of rapidly reconstituting and rescuing myeloablated transplant recipients//Blood. – 2005. – Vol. 105(7). – P.2717 - 2723. DOI: 10.1182/blood-2004-06-2159.
7. Brown G. Hematopoietic stem cells: nature and niche nurture//Bioengineering. - 2021. - Vol. 8. (67). - P. 1 - 13. DOI: 10.3390/bioengineering8050067.
8. Jurecic R. Hematopoietic Stem Cell Heterogeneity//Adv Exp Med Biol. - 2019. - Vol. 1169. - P. 195 - 211. DOI: 10.1007/978-3-030-24108-7_10.
9. Kumar S., Geiger H. HSC niche biology and hsc expansion *ex vivo*//Trends Mol Med. – 2017. – Vol. 23(9). – P. 799 – 819. DOI: 10.1016/j.molmed.2017.07.003.
10. de Haan G, Lazare SS. Aging of hematopoietic stem cells//Blood. - 2018. - Vol. 131(5). - P. 479 - 487. DOI: 10.1182/blood-2017-06-746412.
11. Müller-Sieburg CE, Whitlock CA, Weissman IL. Isolation of two early B lymphocyte progenitors from mouse marrow: A committed Pre-Pre-B cell and a clonogenic Thy-1lo hematopoietic stem cell//Cell. - 1986. - Vol. 44(4). - P. 653 - 662. DOI: 10.1016/0092-8674(86)90274-6.
12. Whitlock CA, Tidmarsh GF, et al. Bone marrow stromal cell lines with lymphopoietic activity express high levels of a pre-B neoplasia-associated molecule//Cell. - 1987. - Vol.48 (6). - P.1009 - 1021. DOI: 10.1016/0092-8674(87)90709-4.

13. Whitlock CA, Witte ON. Long-term culture of B lymphocytes and their precursors from murine bone marrow//Proc Natl Acad Sci U S A. - 1982. - Vol. 79(11). - P. 3608 - 3612. DOI: 10.1073/pnas.79.11.3608.
14. Frascoli M, Proietti M, Grassi F. Phenotypic analysis and isolation of murine hematopoietic stem cells and lineage-committed progenitors//J Vis Exp. - 2012. - Vol. 8.(65). - P. 3736. DOI: 10.3791/3736.
15. Hornung RL, Longo DL. Hematopoietic stem cell depletion by restorative growth factor regimens during repeated high-dose cyclophosphamide therapy. - Blood. - 1992. - Vol. 80(1). - P. 77 - 83.
16. Christensen JL, Weissman IL. Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells//Proc Natl Acad Sci U S A. - 2001. - Vol. 98(25). - P. 14541 - 6. DOI: 10.1073/pnas.261562798.
17. Healy L, May G, et al. The stem cell antigen CD34 functions as a regulator of hemopoietic cell adhesion//Proc Natl Acad Sci U S A. - 1995. - Vol. 92(26). - P. 12240 - 12244. DOI: 10.1073/pnas.92.26.12240.
18. Goodell MA, Brose K, et al. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo//J Exp Med. - 1996. - Vol. 183(4). - P. 1797 - 806. DOI: 10.1084/jem.183.4.1797.
19. Kiel MJ, Yilmaz OH, et al. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells//Cell. - 2005. - Vol. 121(7). - P. 1109 - 1121. DOI: 10.1016/j.cell.2005.05.026.
20. Osawa M, Hanada K, et al Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell//Science. - 1996. - Vol. 273(5272). - P. 242 - 245. DOI: 10.1126/science.273.5272.242.
21. Carrelha J., Meng Y. et al. Hierarchically related lineage-restricted fates of multipotent haematopoietic stem cells//N at u r e. – 2018. - Vol.554. – P. 106 – 111. DOI: 10.1038/nature25455.
22. Romito M., Rai R., et al. Genome editing for blood disorders: state of the art and recent advances//Emerging Topics in Life Sciences. - 2019. – Vol. 3. (3) – P. 289 – 299. DOI: 10.1042/ETLS20180147.
23. Wilkinson A.C., Ishida R., et al. Long-term ex vivo hematopoietic stem cell expansion affords nonconditioned transplantation//Nature. - 2019. - Vol. 571(7763). – P.117 – 121. DOI: 10.1038/s41586-019-1244-x.

24. Szade K., Gulati G.S., Chan C.K.F. et al. Where hematopoietic stem cells live: the bone marrow niche//ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING. - 2018. - Vol. 29.(2). – P. 191 – 204. DOI: 10.1089/ars.2017.7419.
25. Lazzari E, Butler J.M. The instructive role of the bone marrow niche in aging and leukemia//Current Stem Cell Reports. – 2018. – Vol. 4. – P. 291 – 298. DOI: 10.1007/s40778-018-0143.
26. Mahadik B.P., Bharadwaj N.A.K. et al. Regulating dynamic signaling between hematopoietic stem cells and niche cells via a hydrogel matrix//Biomaterials. - 2017. - Vol. 125. – P. 54 – 64. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.02.013.
27. Bruns I, Lucas D. et al. Megakaryocytes regulate hematopoietic stem cell quiescence through CXCL4 secretion//Nat Med. – 2014. - Vol. 20(11). – P. 1315 - 1320. DOI: 10.1038/nm.3707.
28. Aggarwal R., Lu J., et al. Hematopoietic stem cells: transcriptional regulation, ex vivo expansion and clinical application//Curr Mol Med. – 2012. – Vol. 12(1). – P. 34 – 49. DOI: 10.2174/156652412798376125.
29. Itkin T., Gur-Cohen S., Spencer J.A., et al. Distinct bone marrow blood vessels differentially regulate hematopoiesis//Nature. - 2016. – Vol. 532(7599). – P. 323–328. DOI: 10.1038/nature17624.
30. Tajer P., Pike-Overzet K., et al. Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells for therapeutic purposes: lessons from development and the niche//Cells. – 2019. – Vol. 8(2). – P. 169 – 184. DOI: 10.3390/cells8020169 p. 1-15.
31. Pinho S., Frenette P.S. Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche//Nat Rev Mol Cell Biol. - 2019. - Vol. 20(5). – P. 303 – 320. DOI: 10.1038/s41580-019-0103-9.
32. Schroeder T. Hematopoietic stem cell heterogeneity: subtypes, not unpredictable behavior cell//Stem Cell. - 2010. - Vol 6(3). - P. 203 – 207. DOI: 10.1016/j.stem.2010.02.006.
33. Zonari E., Desantis G., et al. Efficient ex vivo engineering and expansion of highly purified human hematopoietic stem and progenitor cell populations for gene therapy//Stem Cell Reports. - 2017. -Vol. 8(4). – P. 977 – 990. DOI: 10.1016/j.stemcr.2017.02.
34. Rector K., Liu Y., Zant G.V. Comprehensive hematopoietic stem cell isolation methods stem cells and aging//Methods in Molecular Biology. – 2013. - Vol. 976. – P. 1 – 15. DOI: 10.1007/978-1-62703-317-6_1.
35. Mashanov G.I., Nenasheva T.A.1, Mashanova T., Maclachlan C., Birdsall N.J.M., Molloy J.E. A method for imaging single molecules at the plasma membrane of live cells within

tissue slices//Journal of General Physiology. - 2021. - Vol. 153. - Is. 1. DOI: 10.1085/jgp.202012657. – Q1.

36. Mashanov G., Nenasheva T., Mashanova A., Lape R., Birdsall N.J.M., Sivilotti L., Molloy J.E. Heterogeneity of cell membrane structure studied by single molecule tracking//Faraday Discussions. - 2021. DOI 10.1039/d1fd00035g. – Q2.

3.6 Отчетные публикации по разделу

1. Mashanov G.I., Nenasheva T.A.1, Mashanova T., Maclachlan C., Birdsall N.J.M., Molloy J.E. A method for imaging single molecules at the plasma membrane of live cells within tissue slices//Journal of General Physiology. - 2021. - Vol. 153. - Is. 1. DOI: 10.1085/jgp.202012657. – Q1.

2. Mashanov G., Nenasheva T.1, Mashanova A., Lape R., Birdsall N.J.M., Sivilotti L., Molloy J.E. Heterogeneity of cell membrane structure studied by single molecule tracking//Faraday Discussions. - 2021. DOI 10.1039/d1fd00035g. – Q2.

ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На данном этапе работы с использованием современных методов и оригинальных моделей были проведены исследования, направленные, прежде всего, на определение механизмов регуляции дифференцировки клеток с целью создания элементов регуляции этим процессом, а также разработки новых подходов к диагностике и коррекции патологий человека.

Подробно описан ход регенерации длительно незаживающей кожной раны в ишемизированном лоскуте, определены эффекты трансплантации тканеинженерной конструкции «Биологический эквивалент кожи», исследована экспрессия протеин киназ RIPK-1 и RIPK-3, которые канонически описаны, как участники процессов клеточной гибели, продемонстрировано, что в длительно незаживающих кожных ранах их экспрессия наблюдалась в зонах, где запрограммированная клеточная гибель не выявлялась, что позволяет сделать предположение о том, что экспрессия RIPK-1 и RIPK-3 в здоровой и поврежденной коже может быть не связана с запрограммированной клеточной гибелью.

Получен ряд клеточных линий из биопсий кожи пациентов, страдающих РДБЭ. Были выявлены и подтверждены мутации четырех пациентов с РДБЭ. Полученные данные расширяют знания относительно распространенности мутаций в популяции, а также демонстрируют случаи комбинации нескольких мутаций в рамках одного генома, что демонстрирует важность исследования генома для установления причин заболевания. Как для фибробластов, так и для кератиноцитов полученных от пациентов с РДБЭ было показано значительное снижение экспрессии коллагена VII, но не полное его отсутствие. Тот факт, что на ИЦХ и в клеточных лизатах обнаруживались мишени связывания антител против наиболее иммунореактивной части С7 свидетельствует о том, что данные пациенты могут быть иммунотолерантны к введению здорового С7 в организм, что открывает широкие возможности относительно доступных для них вариантов терапии.

В клеточных культурах обнаружены признаки, характерные для стареющих клеток, что указывает на наличие воспалительных и фиброзных процессов в коже. Полученные данные указывают на вклад процессов воспаления и фиброза в приобретение фенотипа РДБЭ. Дальнейшие исследования данного направления могут открыть новые способы коррекции симптомов и улучшения состояния пациентов с РДБЭ, не связанные напрямую с исправлением структурной составляющей заболевания.

На основе разработанного ранее протокола дифференцировки ПСК человека в направлении ППК исследованы некоторые молекулярные особенности этого процесса в

культуре ИПСК с трисомией по 21 хромосоме. Показано, что в этом случае нарушается экспрессия NANOS3, раннего маркера ППК. Дальнейшие исследования в этом направлении могут прояснить молекулярные механизмы спецификации ППК у человека и пролить свет на развитие бесплодия, в том числе мужского.

Модель ИПСК была также намечена в качестве основной для исследования закономерностей дифференциации гемопозитического клеточного ряда. В рамках этой задачи выбран оптимальный протокол дифференцировки *in vitro*, а также решен ряд методологических задач для реализации данного протокола. Полученные результаты создают основу для проведения дальнейших исследований и вносят существенный вклад в выполнение поставленных задач в разработке метода экспансии ГСК в модельных экспериментах на мышах.

В целом, полученные данные позволят в дальнейшем на основе фундаментальных сведений о механизмах клеточной дифференцировки, пластичности и морфогенеза определить клеточные мишени и получить модели для исследования и коррекции патологии тканей и органов человека.

Отчет о выполнении темы № 4: «Механизмы клеточной дифференциации в морфогенезе и процессах восстановления» (Рег. номер ЕГИСУ - АААА-А21-121011490124-0) Государственного задания на 2021 год был рассмотрен и утвержден на Ученом совете ИБР РАН (Протокол № 14 от 28.12.2021 г.)