

Российская академия наук

Журнал биологии развития

ОНТОГЕНЕЗ

Том 54 № 1 2023 ЯНВАРЬ–ФЕВРАЛЬ

Журнал основан в 1970 году академиком Б.Л. Астауровым
Выходит 6 раз в год
ISSN: 0475-1450

*Журнал издается под руководством
Отделения биологических наук РАН*

Главный редактор
А.В. Васильев

Редакционная коллегия:

И.И. Адамейко, Ю.Д. Богданов, И.Ю. Баклушинская (*зам. гл. редактора*),
Е.С. Васецкий (*зам. гл. редактора*), О.А. Гусев, В.Е. Дьяконова,
Т.А. Ежова, Г.Н. Ениколопов, А.В. Ересковский, А.Г. Зарайский,
Ю.А. Краус (*отв. секретарь*), Р.П. Костюченко, Г.С. Левит,
В.С. Михайлов, Н.Д. Озернюк, Г.Е. Онищенко,
Д.В. Онищук, М.В. Ремизова, С.В. Рожнов,
О.Л. Серов, А.Н. Томилин

Редакционный совет:

М.А. Александрова, В.Я. Бродский, Скотт Гилберт,
В.А. Голиченков, Э.Н. Григорян, С.М. Закиян, И.С. Захаров,
В.Б. Иванов, А.М. Куликов, И.В. Лядова, А.В. Марков,
А.М. Оловников, О.Б. Симонова, Д.А. Сахаров,
В.С. Тарабыкин, М.В. Угрюмов, Н.П. Шарова

Адрес редакции: 119334 Москва, ул. Вавилова, 26

E-mail: editor@ontogenez.org, ontogenez@list.ru

<https://ontogenez.org>

Зав. редакцией Е.Д. Гасило

Москва

ООО «Объединённая редакция»

Оригинал-макет подготовлен ООО «ИКЦ «АКАДЕМКНИГА»

© Российская академия наук, 2023

© Редакция журнала «Онтогенез»
(составитель), 2023

Свидетельство о регистрации средства массовой информации
ПИ № ФС77-80515 от 23 марта 2021 г., выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи,
информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)

Подписано к печати 00.00.2023 г. Дата выхода в свет 00.00.2023 г. Формат 60 × 88¹/₈ Усл. печ. л. 9.04 Уч.-изд. л. 9.25
Тираж 21 экз. Зак. 4981 Бесплатно

Учредители: Российская академия наук,
Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

Издатель: Российская академия наук, 119991 Москва, Ленинский пр., 14
Исполнитель по контракту № 4У-ЭА-130-22 ООО «Объединённая редакция»,
109028, г. Москва, Подкопаевский пер., д. 5, каб. 6
Отпечатано в типографии «Book Jet» (ИП Коняхин А.В.),
390005, г. Рязань, ул. Пушкина, 18, тел. (4912) 466-151

16+

СОДЕРЖАНИЕ

Том 54, номер 1, 2023

ОБЗОРЫ

Серотонин и надпочечники: регуляция функций, регуляция развития

В. И. Мельникова, Н. С. Бондаренко

3

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Функционирование ядрышкового организатора в растущих ооцитах кур:
ревидия существующих представлений

А. Г. Давидьян, Е. И. Кошель, С. А. Галкина, А. Ф. Сайфитдинова, Е. Р. Гагинская

18

Получение качественного препарата РНК и оценка референсных генов для постановки
количественной ПЦР при работе с тканями ствола *Pinus sylvestris* L.

*Ю. Л. Мощенская, Н. А. Галибина, М. А. Корженевский, Т. В. Тарелкина,
К. М. Никерова, О. В. Чирва*

27

Роль компонентов внеклеточного матрикса в дифференцировке эктодермальных производных
плюрипотентных клеток человека

А. А. Огнивцев, Е. П. Калабушева, Е. О. Осидак, С. П. Домогатский, Е. А. Воротеляк

41

Моделирование децидуализации клеток стромы эндометрия мыши с последующей
имплантацией эмбриона *in vitro*

А. О. Гайдамака, А. В. Муромцев, Л. Ш. Измайлова, Г. А. Марченко, Е. А. Воротеляк

59

КОЛЛЕКЦИЯ ЛИНИЙ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Создание линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток ICGi043-A
с помощью репрограммирования мононуклеарных клеток периферической крови пациента
с болезнью Паркинсона, ассоциированной с патологическим вариантом р.G2019S *LRRK2*

*Е. В. Григорьева, С. В. Павлова, А. А. Малахова, Е. С. Яркова, Д. А. Сорогина, Ю. М. Минина,
И. В. Милыхина, М. А. Николаев, С. Н. Пчелина, С. П. Медведев, С. М. Закиян*

79

Создание линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток ICGi042-A
с помощью репрограммирования мононуклеарных клеток периферической крови пациента
с болезнью Паркинсона, ассоциированной с генетическим вариантом с.1000G>A в гене *LRRK2*

*Е. В. Григорьева, С. В. Павлова, А. А. Малахова, С. П. Медведев, Ю. М. Минина,
Ю. В. Вяткин, Е. А. Хабарова, Дж. А. Рзаев, Л. В. Коваленко, С. М. Закиян*

87

Линия индуцированных плюрипотентных стволовых клеток ICGi023-A, полученная
от пациента с полиморфизмами в генах *LRRK2* и *PINK1*, ассоциированными
с болезнью Паркинсона

*А. А. Малахова, С. В. Павлова, Е. В. Григорьева, С. П. Медведев, Ю. М. Минина,
Ю. В. Вяткин, Е. А. Хабарова, Д. А. Рзаев, Л. В. Коваленко, С. М. Закиян*

96

Получение линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток ICGi022-A-3,
ICGi022-A-4 и ICGi022-A-5 с внесенной в ген *MYBPC3* с помощью системы CRISPR/Cas9
мутацией р.Asn515del

*С. В. Павлова, Л. Ш. Шаяхметова, К. А. Проняева, А. Е. Шульгина,
С. М. Закиян, Е. В. Дементьева*

105

Создание линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток ICGi044-B и ICGi044-C
с помощью репрограммирования мононуклеарных клеток периферической крови пациента
с болезнью Паркинсона, ассоциированной с мутацией с.1492T>G в гене *GLUD2*

*Д. А. Сорогина, Е. В. Григорьева, А. А. Малахова, С. В. Павлова, С. П. Медведев, Ю. В. Вяткин,
Е. А. Хабарова, Дж. А. Рзаев, С. М. Закиян*

114

Contents

Vol. 54, No. 1, 2023

REVIEWS

Serotonin and Adrenals: Regulation of Functions, Regulation of Development

V. I. Melnikova and N. S. Bondarenko

3

RESEARCH PAPERS

Nucleolus Organizer Region Functioning in Chicken Growing Oocytes:
A Revision of the Existing Views

A. G. Davidian, E. I. Koshel, S. A. Galkina, A. F. Saifitdinova, and E. R. Gaginskaya

18

High-Quality RNA Extraction and Evaluation of Reference Genes for qPCR Assay
of *Pinus sylvestris* L. Trunk Tissues

*Yu. L. Moshchenskaya, N. A. Galibina, M. A. Korzhenevskiy, T. V. Tarelkina,
K. M. Nikerova, and O. V. Chirva*

27

The Role of Extracellular Matrix in Human Pluripotent Cells Differentiation
into Ectodermal Derivatives

A. A. Ognitsev, E. P. Kalabusheva, E. O. Osidak, S. P. Domogatsky, and E. A. Vorotelyak

41

Modelling of the Decidualization of Mouse Endometrial Stromal Cells with Subsequent Embryo
Implantation *in vitro*

A. O. Gaidamaka, A. V. Muromtsev, L. S. Izmailova, G. A. Marchenko, and E. A. Vorotelyak

59

PLURIPOTENT STEM CELL COLLECTION

Generation of an Induced Pluripotent Stem Cell Line, ICGi043-A, by Reprogramming Peripheral Blood
Mononuclear Cells from Parkinson's Disease Patient with p.G2019S Mutation in *LRRK2* Gene

*E. V. Grigor'eva, S. V. Pavlova, A. A. Malakhova, E. S. Yarkova, D. A. Sorogina, J. M. Minina,
I. V. Miliukhina, M. A. Nikolaev, S. N. Pchelina, S. P. Medvedev, and S. M. Zakian*

79

Generation of an Induced Pluripotent Stem Cell Line, ICGi042-A, by Reprogramming Peripheral Blood
Mononuclear Cells from Parkinson's Disease Patient with *c.1000G>A* mutation in *LRRK2* Gene

*E. V. Grigor'eva, S. V. Pavlova, A. A. Malakhova, S. P. Medvedev, J. M. Minina, Y. V. Vyatkin,
E. A. Khabarova, J. A. Rzaev, L. V. Kovalenko, and S. M. Zakian*

87

An Induced Pluripotent Stem Cell Line (ICGi023-A) Obtained from a Patient
with Parkinson's Disease Associated Polymorphisms in *LRRK2* and *PINK1* Genes

*A. A. Malakhova, S. V. Pavlova, E. V. Grigor'eva, S. P. Medvedev, J. M. Minina, Y. V. Vyatkin,
E. A. Khabarova, J. A. Rzaev, L. V. Kovalenko, and S. M. Zakian*

96

Generation of Induced Pluripotent Stem Cell Lines ICGi022-A-3, ICGi022-A-4, and ICGi022-A-5
with p.Asn515del Mutation Introduced in *MYBPC3* Using CRISPR/Cas9

*S. V. Pavlova, L. Sh. Shayakhmetova, K. A. Pronyaeva, A. E. Shulgina,
S. M. Zakian, and E. V. Demytyeva*

105

Creation of Induced Pluripotent Stem Cells ICGi044-B and ICGi044-C Using Reprogramming
of Peripheral Blood Mononuclear Cells of a Patient with Parkinson's Disease Associated
with *c.1492T>G* Mutation in the *GLUD2* Gene

*D. A. Sorogina, E. V. Grigor'eva, A. A. Malakhova, S. V. Pavlova, S. P. Medvedev, Y. V. Vyatkin,
E. A. Khabarova, J. A. Rzaev, and S. M. Zakian*

114

СЕРОТОНИН И НАДПОЧЕЧНИКИ: РЕГУЛЯЦИЯ ФУНКЦИЙ, РЕГУЛЯЦИЯ РАЗВИТИЯ

© 2023 г. В. И. Мельникова^а *, Н. С. Бондаренко^а

^аИнститут биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия

*e-mail: v_melnikova@mail.ru

Поступила в редакцию 10.08.2022 г.

После доработки 12.01.2023 г.

Принята к публикации 13.01.2023 г.

Серотонин является не только нейротрансмиттером, но и важным гуморальным регулятором разнообразных физиологических процессов за пределами центральной нервной системы. В последнее десятилетие складывается концепция существования локальных серотонинергических систем в периферических органах, где серотонин реализует свое воздействие через аутокринно-паракринные механизмы. Такие локальные системы уже описаны в поджелудочной железе, тимусе, молочной железе, красном костном мозге. Мы считаем, что подобная локальная серотонинергическая система характерна и для надпочечников. Эти парные органы являются ключевым компонентом эндокринной системы млекопитающих, обеспечивающим комплексную физиологическую реакцию на стресс. Надпочечники состоят из двух неродственных по происхождению и функциям отделов — коры и медуллы, при этом серотонин играет важную роль в регуляции секреции гормонов в обеих этих структурах. Цель данного обзора — анализ структуры локальной серотонинергической системы в надпочечнике, а также ее роли как в регуляции функций надпочечников у взрослых животных, так и в их формировании в эмбриогенезе. Обобщение имеющихся данных позволяет говорить о том, что наличие локальной серотонинергической системы делает орган восприимчивым к колебаниям уровня циркулирующего в крови серотонина на всех этапах онтогенеза. Таким образом, локальная чувствительность к серотонину обеспечивает возможность системной гуморальной координации формирования и функционирования как надпочечников, так и других периферических органов. В этом аспекте становится понятна важность локальных серотонинергических систем для медицины и биологии развития.

Ключевые слова: надпочечники, серотонин, локальная серотонинергическая система, медулла, кортекс, развитие, катехоламины, стероидные гормоны, стресс, симпатoadреналовая система

DOI: 10.31857/S0475145023010081, EDN: FRKTOE

ВВЕДЕНИЕ

Серотонин известен, прежде всего, как нейромедиатор и нейромодулятор в центральной нервной системе, где он контролирует различные физиологические процессы, включая настроение, познание, движение, возбуждение и вегетативные функции. Тем не менее, первым описанным эффектом серотонина в конце XIX-го века было его периферическое влияние на сердечно-сосудистую систему (Weiss, 1896). В 1930-е годы он был впервые выделен из клеток кишечника, под названием энтерамин, а позднее была идентифицирована его химическая структура (Rapport et al., 1948). Только 5% эндогенного серотонина в организме содержится в центральной нервной системе, а 95% локализуется в периферических органах, особенно в энтерохромаффинных клетках желудочно-кишечного тракта (Amireault et al., 2013), что свидетельствует о важности серотонина

за пределами мозга. На периферии серотонин участвует в регуляции иммунной и сердечно-сосудистой систем, кроветворения, энергетического метаболизма и секреции инсулина, играет важную роль в гонадах, желудочно-кишечном тракте и легких (Côté et al., 2003; Amireault et al., 2013). Может показаться удивительным, что одно и то же вещество обладает таким количеством различных функций. Это можно объяснить многообразием специфических рецепторов серотонина. В настоящее время известно 15 различных генов рецепторов, объединенных в четыре подтипа: htr1/5, htr2, htr3 и htr4/6/7. За исключением Htr3 рецепторов, которые представляют собой управляемые серотонином ионные каналы, все остальные являются рецепторами, связанными с G-белками, участвующими во внутриклеточной передаче сигналов (Alexander et al., 2013). Таким образом, множественные аспекты регуляции и передачи сигнала

лов могут происходить одновременно при связывании серотонина с несколькими рецепторами.

В последнее время произошли кардинальные изменения в нашем понимании того, как организована работа серотонина на периферии. Ранее полагали, что эффекты серотонина за пределами нервной системы реализуются главным образом через эндокринные механизмы. Серотонин, синтезируемый в энтерохромаффинных клетках кишечника, попадает в общую циркуляцию, депонируется тромбоцитами, распределяется с кровью по всему организму и ведет себя как плейотропный гормон (Côté et al., 2003; Yu et al., 2009). Однако в последнее десятилетие во многих периферических органах были обнаружены локальные серотонинергические системы, где серотонин-продуцирующие и серотонин-чувствительные клетки располагаются в непосредственной близости друг от друга, благодаря чему серотонин может действовать как местный регулятор аутокринно-паракринным путем. К настоящему времени локальные серотонинергические системы и их роль описаны в поджелудочной железе, тимусе, молочной железе, красном костном мозге, печени и т.д. (Paulmann et al., 2009; Amireault et al., 2013; Лифанцева и др., 2017).

Данный обзор посвящен анализу и обобщению существующих данных о роли серотонина в работе и развитии надпочечников в свете современной концепции о локальных серотонинергических системах на периферии. Мы также прослеживаем, как меняется функциональное значение серотонина на разных этапах онтогенеза.

У млекопитающих надпочечники являются ключевыми компонентами эндокринной системы и состоят из двух морфологически и функционально различных областей, а именно мозгового вещества (медуллы), образованного хромаффинными клетками, продуцирующими катехоламины, и коры (кортекса), образованной стероидогенными клетками. Внешний слой, кора надпочечников, имеет мезодермальное происхождение и выделяет стероидные гормоны (глюкокортикоиды, минералокортикоиды), которые опосредуют медленные, но длительные физиологические реакции на стресс, а также участвуют в регуляции обмена веществ и иммунных реакций. Внутренний мозговой слой надпочечников является производным нервного гребня, и тесно связан с постганглионарными симпатическими нейронами (Huber et al., 2009). Хромаффинные клетки медуллы при стимуляции выделяют катехоламины в кровотоки, поэтому мозговое вещество надпочечников часто рассматривают как нейроэндокринный отдел симпатической нервной системы, ответственный за быстрые реакции организма на стресс (Bauer, Currie, 2020). Несмотря на то, что кора и медулла столь неродственны по происхождению и функ-

циям, серотонин играет важную роль в регуляции секреции гормонов посредством аутокринно-паракринных механизмов в обеих этих структурах. Более того, существующие данные позволяют рассуждать о том, что локальная серотонинергическая система надпочечников может играть интегрирующую роль в отношении функций коры и медуллы как целостного органа.

ЛОКАЛЬНАЯ СЕРОТОНИНЕРГИЧЕСКАЯ СИСТЕМА В МЕДУЛЛЕ НАДПОЧЕЧНИКОВ

Серотонин обнаружили в хромаффинных клетках еще в 80-е годы и сначала ошибочно полагали, что он синтезируется *in situ* (Verhofstad, Jonsson, 1983). Вскоре выяснилось, что хромаффинные клетки лишены ключевого скорость-лимитирующего фермента синтеза серотонина – триптофангидроксилазы (ТпГ), но содержат второй фермент – декарбоксилазу ароматических аминокислот (ДАА) и способны захватывать серотонин из окружающего пространства благодаря высокому уровню экспрессии транспортера серотонина (SERT) (Ritzen et al., 1965; Vandenberg et al., 1991; Schroeter et al., 1997). Доказано, что хромаффинные клетки могут синтезировать серотонин не из триптофана, а из непосредственного предшественника – 5-гидрокситриптофана (5НТР), который присутствует в крови и тканевой жидкости. Тем не менее, ведущую роль в определении уровня серотонина в медулле играет именно SERT (Brindley et al., 2016). Попадая внутрь клетки, серотонин либо с помощью везикулярного транспортера моноаминов (VMAT) закачивается в секреторные гранулы совместно с адреналином и норадреналином, либо катаболизируется моноаминоксидазой (рис. 1). Содержание серотонина в хромаффинных клетках относительно невелико, на два порядка ниже, чем адреналина (Winkler, Westhead, 1980; Schroeter et al., 1997). Тем не менее, этого количества достаточно для осуществления локального контроля секреции катехоламинов через аутокринно-паракринные механизмы. Действительно, по данным литературы концентрация адреналина в секреторных везикулах может достигать 0.1–1 М (Winkler, Westhead, 1980; Albillos et al., 1997), а согласно нашим собственным неопубликованным данным, при стимуляции хромаффинных клеток медуллы концентрация выделяемого серотонина находится в пиколярном диапазоне. На хромаффинных клетках медуллы экспрессируется рецептор к серотонину 1a типа (Htr1a) (рис. 1). Таким образом, хромаффинные клетки являются одновременно серотонин-продуцирующими и серотонин-чувствительными, что согласуется с представлениями о местном аутокринно-паракринном механизме действия серотонина (Brindley et al., 2017).

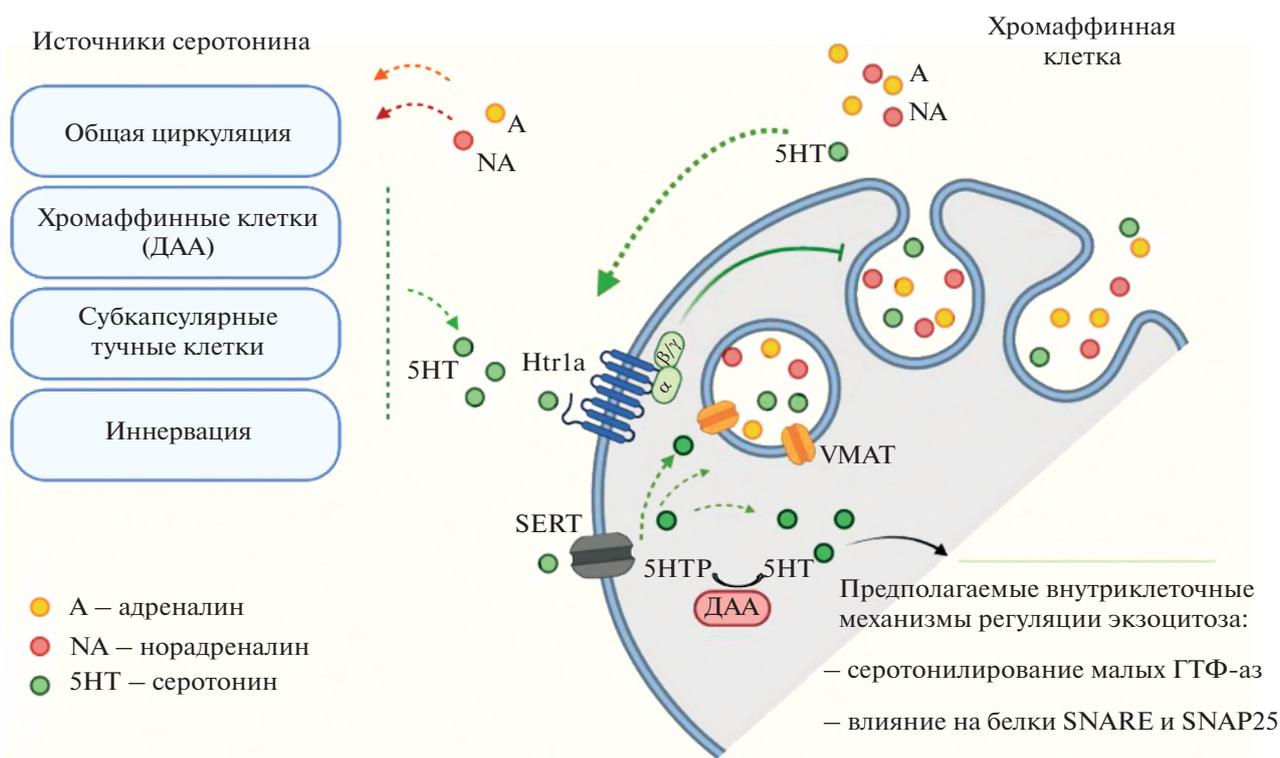


Рис. 1. Локальная серотонинергическая система в медулле зрелых надпочечников. Условные обозначения: 5HT – серотонин, Htr1a – рецептор серотонина 1a типа, SERT – транспортер серотонина, VMAT – везикулярный транспортер моноаминов, А – адреналин, NA – норадреналин, ДАА – декарбоксилаза ароматических аминокислот, 5HTP – 5-гидрокситриптофан, предшественник серотонина.

Наиболее изученным эффектом серотонина в надпочечниках является его способность контролировать ответ симпатoadrenalовой системы на стресс. Действуя через Htr1a рецепторы, серотонин ингибирует секрецию катехоламинов в медулле надпочечников (Brindley et al., 2016, 2019) (рис. 1). Блокада рецепторов Htr1a уменьшает количество везикул, подвергающихся экзоцитозу, в то время как количество (квантовый размер) и кинетика высвобождения катехоламинов не меняется. Интересно отметить, что через рецептор Htr1a осуществляется подобный аутокринно-паракринный контроль высвобождения медиатора и в центральной нервной системе, однако внутриклеточный путь передачи сигнала от рецептора в хромаффинных клетках и нейронах различается коренным образом. В нейронах активация этого рецептора связана с изменением возбудимости мембраны и проницаемости кальциевых и калиевых каналов, опосредованное G-белками (Jewell, Currie, 2013). В то же время в хромаффинных клетках механизм ингибирования секреции катехоламинов через Htr1a рецепторы не включает модуляцию кальциевых и калиевых каналов и уровня внутриклеточного кальция (Brindley et al., 2016). Нижестоящие молекулярные мишени G-белков в хромаффинных клетках еще предсто-

ит определить, однако предполагается, что один из возможных механизмов включает связывание Gβγ-белка непосредственно с белками SNARE, которые участвуют в контроле слияния экзоцитозных пузырьков с мембраной (Betke et al., 2012). Gβγ может конкурировать с Ca²⁺-связанным синапто-тагмин-1 за связывание с C-концом SNAP25, что может нарушить запуск экзоцитоза (Yoon et al., 2007; Zurawski et al., 2016). Другой предполагаемой мишенью Gβγ может являться динамин, который способен модулировать как экзоцитоз, так и эндоцитоз в хромаффинных клетках (Chan et al., 2010; Anantharam et al., 2011).

Известно также о рецептор-независимых механизмах серотонинового контроля секреции катехоламинов в надпочечниках, например, в регуляции количественного размера единичных событий экзоцитоза принимает участие SERT, но не рецептор (Briscoe et al., 2008). Также существуют доказательства того, что SERT может модулировать регуляцию транскрипции в мозговом веществе надпочечников. Под влиянием острого стресса повышается экспрессия и активность тирозингидроксилазы, скорость-лимитирующего фермента синтеза катехоламинов, что способствует восполнению резерва катехоламинов в период повышенной потребности в них (Sabban et al., 1997; Kvetnansky et al.,

2013). Предполагается, что модулирующее влияние SERT в сочетании с особым механизмом работы Htr1a рецепторов способствует точной настройке серотонинергического сигналинга для контроля секреции катехоламинов в периоды интенсивной стимуляции (т.е. стресса) (Brindley et al., 2017).

В трактовке имеющихся данных необходимо учитывать, что медулла надпочечника представляет собой периферическое звено симпатoadrenalовой системы, в то время как серотонин контролирует ответ организма на стресс как на периферии, так и в центральном ее отделе. Известно, что центральные серотонинергические нейроны ядра шва непосредственно иннервируют симпатические преганглионарные нейроны. Помимо прямой связи, возможна также серотонинергическая модуляция этих клеток посредством активации симпатических премоторных нейронов. Иными словами, в головном и спинном мозге серотонинергическая нервная передача способна модулировать центральные стимулы, направленные к периферическим отделам симпатoadrenalовой системы. При этом центральные и периферические отделы тесно взаимодействуют и осуществляют комплексную координацию физиологической реакции организма на экологические, метаболические и эмоционально-психологические стрессоры посредством выброса катехоламинов в кровотоки (подробно можно прочитать в обзоре Brindley et al., 2017). Поэтому следует с осторожностью интерпретировать данные, полученные с помощью традиционных экспериментальных моделей, например с использованием мышей, нокаутных по гену SERT, или с применением ингибиторов SERT и антагонистов рецептора Htr1a. Известно, например, что стресс-индуцированная секреция адреналина повышается как у животных, так и у человека на фоне применения антидепрессантов из группы ингибиторов SERT, а также у мышей SERT^{-/-} (Tjurma et al., 2002; Briscoe et al., 2008; Sanders et al., 2008). Также появляется все больше доказательств связи между нарушениями симпатoadrenalовых реакций и депрессией, тревогой и другими заболеваниями, связанными с серотонинергической сигнализацией в мозге (подробнее в обзоре Brindley et al., 2017). С уверенностью разграничить центральные и периферические эффекты серотонина в симпатoadrenalовой системе поможет недавно созданная линия мышей с локальным нокаутом гена SERT в надпочечниках на фоне сохранной его экспрессии в центральной нервной системе (Brindley et al., 2019). У таких мышей было обнаружено снижение на 50% содержания серотонина в надпочечниках, при этом уровень серотонина в крови, а также концентрация катехоламинов в медулле оставались прежними. Эта уникальная экспериментальная модель открывает большие перспективы для исследования широкого спектра проблем в области медицины, по-

скольку высвобождение катехоламинов из хромаффинных клеток надпочечников помогает координировать физиологическую реакцию на эмоциональные/психологические, физические или метаболические стрессоры. В зависимости от природы стрессора нарушенная секреция катехоламинов надпочечниками может способствовать развитию гипертонии, сердечной недостаточности и усугублять течение диабета 1-го 2-го типов (Bedi, Arora, 2007; Weinstein et al., 2010; Wong et al., 2012; Ziegler et al., 2012; Paine et al., 2015).

Несмотря на активное изучение роли серотонина в надпочечниках, некоторые аспекты этой проблемы до сих пор остаются за пределами интересов ученых. Это касается в первую очередь альтернативных механизмов действия серотонина, не связанных с рецепторами. В последние десятилетия было установлено, что серотонин, попадая в клетку с помощью SERT, может действовать как внутриклеточный мессенджер и участвовать в посттрансляционной модификации белков (Walther et al., 2003; Muma, Mi, 2015; Bader, 2019). Посредством фермента транслгутаминазы 2 серотонин ковалентно присоединяется к глутаминовым остаткам, что приводит к структурно-функциональным изменениям в белках. Например, в эндокринных клетках поджелудочной железы установлено, что серотонилирование малых ГТФ-аз участвует в регуляции экзоцитоза и секреции инсулина (Paulmann et al., 2009). С большой вероятностью можно предположить, что подобный механизм имеет место и в клетках надпочечников. Другая гипотеза вытекает из способности серотонина повышать проницаемость микроциркуляторного русла в различных органах (Abbott, 2000; Walther et al., 2007; Li et al., 2016), ослабляя адгезию клеток эндотелия. Реализация этого эффекта также включает серотонилирование малых ГТФ-аз и фосфорилирование белков клеточной адгезии (Li et al., 2016). Изменение проницаемости капилляров потенциально могло бы влиять на секрецию гормонов надпочечников в кровь. Иными словами, эффектами серотонилирования могут являться усиление экзоцитоза и ослабление барьерной функции эндотелия сосудов, но вопрос о том, способствует ли эта новая сигнальная парадигма серотонинергическому контролю секреции катехоламинов или другим функциям хромаффинных клеток, остается открытым.

Как свидетельствуют последние исследования, серотонин играет важную роль не только в регуляции функций зрелых надпочечников, но и в формировании медуллы в эмбриогенезе. Хромаффинные клетки дифференцируются из эмбриональных мультипотентных клеток нейроэктодермального происхождения (так называемые предшественники шванновских клеток, ПШК), которые мигрируют по нервным волокнам к месту окончательной закладки надпочечников (An-

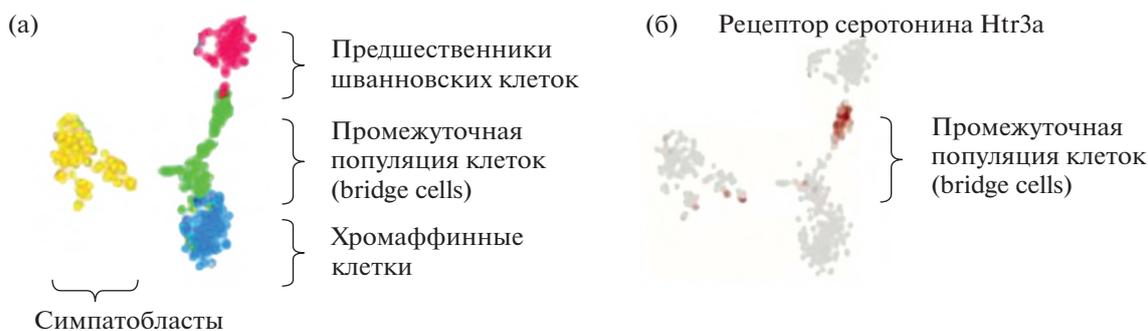


Рис. 2. Дифференцировка хромаффинных клеток надпочечников в эмбриогенезе мыши, данные анализа транскриптомов отдельных клеток на 13.5 день эмбрионального развития. (а) Клеточный состав формирующейся медуллы надпочечника представлен предшественниками шванновских клеток, транзиторной популяцией клеток (bridge cells) и образующимися хромаффинными клетками. Диаграмма показывает кластеры клеток, выделенные методом t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding (t-SNE). Относительное расстояние между кластерами отражает различия в паттернах генов, экспрессируемых клетками кластера. (б) Экспрессия рецептора серотонина Htr3a (выделено коричневым цветом) обнаружена главным образом в транзиторных bridge cells. Рисунки выполнены по материалам статьи Kameneva, Melnikova et al., 2022, с изменениями.

derson et al., 1991; Huber et al., 2009; Furlan et al., 2017). Современные транскриптомные технологии позволили установить, что переход от ПШК к хромаффинным клеткам происходит через короткоживущую промежуточную популяцию так называемых “bridge cells” (рис. 2а) (Furlan et al., 2017; Kastriti et al., 2019). Компоненты серотонинергической системы появляются на самых ранних этапах дифференцировки хромаффинных клеток (Kameneva, Melnikova et al., 2022). В формирующихся надпочечниках, в отличие от зрелых, серотонинчувствительными клетками являются переходные “bridge cells”, в них обнаружен рецептор Htr3a (рис. 2б). А серотонин-продуцирующими являются ранние хромаффинные клетки. Они способны накапливать серотонин и выделять его. Уже на 14-й день эмбрионального развития (Э14) у мышей до 80% хромаффинных клеток содержат серотонин (Kameneva, Melnikova et al., 2022). Подобно зрелым надпочечникам, эмбриональные хромаффинные клетки не экспрессируют ТпГ, но в них обнаружена ДАА, благодаря чему они могут синтезировать серотонин из непосредственного предшественника 5НТР. Интересно отметить, что ДАА содержится и в “bridge cells”, то есть их тоже можно относить к локальным источникам серотонина. Во всех клетках эмбрионального надпочечника экспрессируется моноаминоксидаза, ответственная за деградацию серотонина (Kameneva, Melnikova et al., 2022). Другой особенностью эмбриональных хромаффинных клеток является отсутствие в них транспортера SERT, вместо которого они экспрессируют транспортер органических катионов Slc29a4, который активно закачивает в клетки моноамины (Kameneva, Melnikova et al., 2022). В эмбриональных хромаффинных клетках функционируют везикулярные транспортеры VMAT1 и VMAT2, ответственные за везикуляр-

ное запасание серотонина (Kameneva, Melnikova et al., 2022). Следовательно, клетки эмбрионального надпочечника обладают необходимым молекулярным механизмом для транспорта, синтеза и секреции серотонина (Kameneva, Melnikova et al., 2022).

Генерация хромаффинных клеток происходит в течение ограниченного временного окна в эмбриональном развитии. У мышей этот период соответствует Э11–Э14, у крыс на день позже, а у человека – 8–10 нед. (Kameneva et al., 2021; Kameneva, Melnikova et al., 2022). И именно в этот период наступает ключевая регуляторная фаза, опосредованная серотонином, во время которой серотонин лимитирует количество образующихся хромаффинных клеток (рис. 3). Транзиторная популяция “bridge-cells” пролиферирует и дифференцируется в хромаффинные клетки, по мере накопления хромаффинных клеток возрастает уровень выделяемого ими серотонина, который активирует свой рецептор Htr3a на “bridge cells”, замедляя их клеточный цикл, и останавливая генерацию новых хромаффинных клеток, как бы посылая сигнал “достаточно” предшественникам (рис. 3) (Kameneva, Melnikova et al., 2022). Таким образом, “bridge cells”, будучи чувствительными к серотонину, являются частью петли отрицательной обратной связи, управляющей размером популяции хромаффинных клеток надпочечников, выделяющих серотонин. Интересно, что описанный механизм является однонаправленным, снижение уровня серотонина и фармакологическая блокада рецептора Htr3a у плодов не приводят к чрезмерному росту числа хромаффинных клеток. Таким образом, серотонин-зависимый контроль количества хромаффинных клеток защищает от избыточного роста надпочечников и, вероятно, потен-

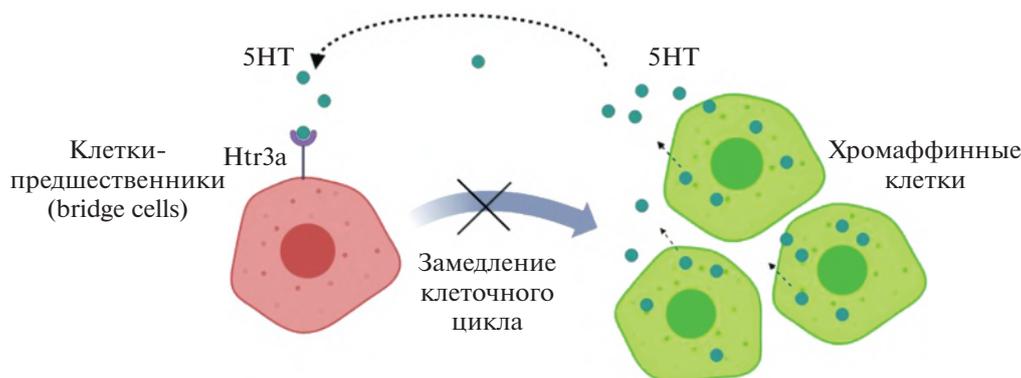


Рис. 3. Серотонин-опосредованный механизм контроля образования хромаффинных клеток надпочечников в эмбриогенезе. Транзиторная популяция клеток-предшественников (bridge cells) дифференцируется в хромаффинные клетки, которые способны выделять серотонин. По мере накопления хромаффинных клеток, уровень выделяемого серотонина возрастает, и через Htr3a рецепторы клеток популяции bridge cells ограничивает образование новых хромаффинных клеток, замедляя клеточный цикл bridge cells. Условные обозначения: 5HT – серотонин, Htr3a – рецептор серотонина 3a типа.

циального развития таких опухолей, как нейробластомы.

Такой механизм контроля формирования хромаффинных тканей может иметь важные поведенческие, экологические и эволюционные аспекты. Фактически, не только локальная паракринная регуляция в развивающихся надпочечниках, но и системный уровень серотонина у плода может влиять на будущий размер мозгового вещества. Действительно, помимо локальных клеток медуллы, основным источником серотонина у плода в период активного формирования надпочечников является плацента, что открывает потенциал для негенетического контроля развития симпатoadреналовой системы у потомства (Bonin et al., 2011; Kameneva, Melnikova et al., 2022). Интересно отметить, что факторами, регулируемыми поступлением серотонина из плаценты к плоду, могут быть стресс, воспаление и состояние здоровья матери (Goeden et al., 2016; Chen et al., 2020; Kameneva, Melnikova et al., 2022). Повышение серотонина в плаценте и общей циркуляции плода приводит к долгосрочному необратимому уменьшению размера медуллы надпочечников и снижению секреции адреналина в постнатальном периоде, а также в значительной степени влияет на поведение потомства (Kameneva, Melnikova et al., 2022). Это выражается в снижении агрессивности животных и изменении предпочтительной стратегии преодоления трудностей в пользу реактивного типа поведения (Kameneva, Melnikova et al., 2022). Индивидуальные уровни агрессивного поведения действительно связаны с тем, как животные реагируют на широкий спектр экологических проблем. Кроме того, механизм передачи информации от матери к потомству посредством серотонина может быть даже более очевидным в дикой популяции в условиях критического эко-

логического стресса. Это предположение получило свое подтверждение в полевых исследованиях мелких грызунов, у которых плотность популяции периодически достигает исключительных значений и вызывает социальный стресс у отдельных животных (Liu et al., 2020; Kameneva, Melnikova et al., 2022). Это, наряду с другими факторами, заставляет часть популяции мигрировать из привычного ареала и осваивать новые территории. Разница между животными, вынужденными мигрировать, и теми, кто остается, может быть связана с поведенческим контролем агрессии, на который влияет разный размер хромаффинных органов. Действительно, у мигрирующих животных размер медуллы меньше, чем у резидентных. Эта закономерность подтверждает связь между стрессом у беременных матерей, концентрацией серотонина в плаценте и у плодов, и результирующим размером хромаффинных органов у потомства. По-видимому, молекулярные механизмы, контролируемые размер хромаффинных тканей, важны не только для естественного отбора, но и для искусственного. Например, ранее сообщалось, что одомашнивание животных сопровождается снижением размера и подавлением функции надпочечников, ответственной за реакции на страх и стресс. Гипофункция надпочечников и снижение уровня гормонов стресса хорошо документированы у одомашненных видов и были экспериментально вызваны отбором на приручаемость (Wilkins et al., 2014).

Таким образом, локальная серотонинергическая система в медулле надпочечников играет важную роль в процессе формирования этих органов у плодов, а также в так называемом пренатальном программировании поведенческих паттернов у потомства в постнатальной жизни.

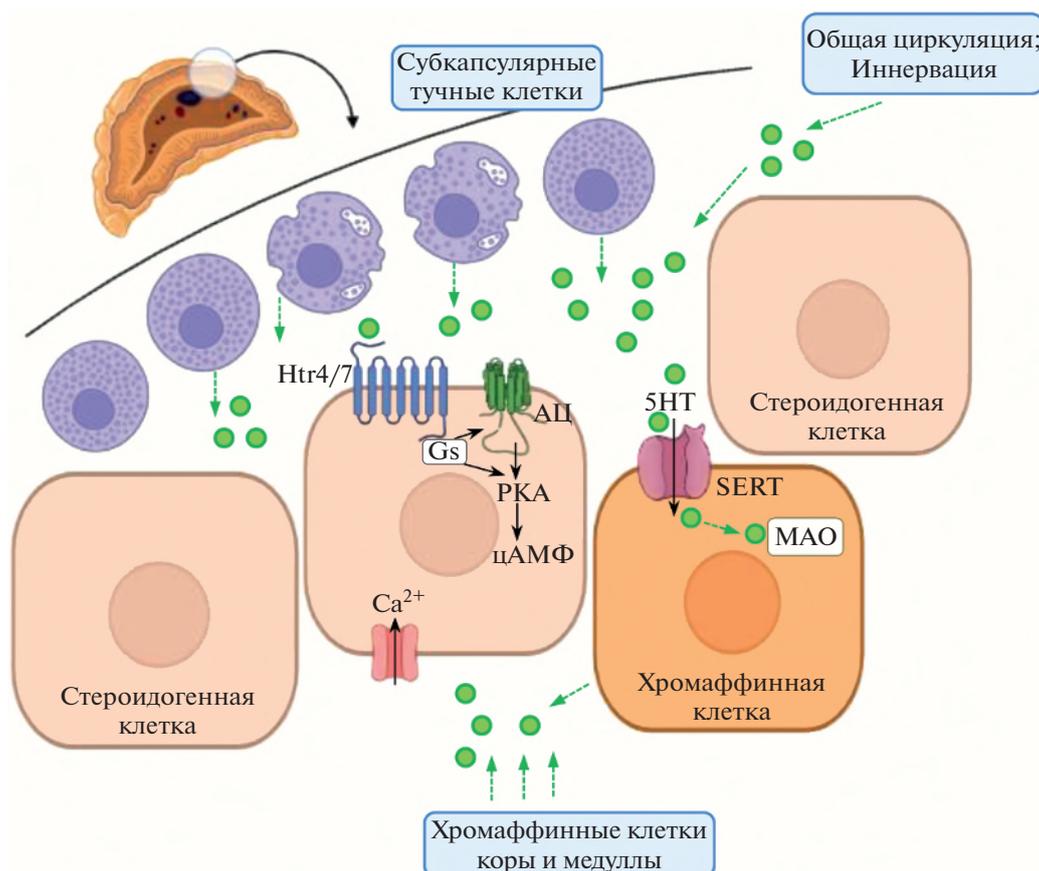


Рис. 4. Локальная серотонинергическая система в коре зрелых надпочечников. Условные обозначения: 5HT – серотонин, Ntr4/7 – рецепторы серотонина 4 или 7 типов, SERT – транспортер серотонина, АЦ – аденилатциклаза, РКА – протеинкиназа А, MAO – моноаминоксидаза, Gs – G-белки.

ЛОКАЛЬНАЯ СЕРТОНИНЕРГИЧЕСКАЯ СИСТЕМА В КОРЕ НАДПОЧЕЧНИКОВ

Многочисленные данные свидетельствуют о том, что локально продуцируемый серотонин осуществляет регуляцию секреции стероидных гормонов в коре надпочечников через паракринные механизмы. Однако, организация локальной серотонинергической системы в коре значительно отличается от таковой в медулле, роли серотонин-продуцирующих и серотонин-чувствительных клеток распределены иначе (рис. 4). В коре надпочечников выработка разных стероидных гормонов разделена морфологически и функционально по зонам и регулируется независимо. Отдельно следует отметить, что в коре надпочечников у ряда видов присутствуют небольшие включения медуллярных хромаффинных клеток (Lefebvre et al., 2001), которые находятся в тесном контакте со стероидогенными клетками (Bornstein, Ehrhart-Bornstein, 1992; Bornstein et al., 1994; Lefebvre et al., 2001). Организация коры у млекопитающих характеризуется значительными межвидовыми различиями (Vinson, 2016). Гистологически в коре надпочечников выделяют три основные концен-

трические зоны – клубочковую, фасцикулярную и сетчатую (Arnold, 1866; Vinson, 2016). Наиболее выраженные отличия в структурно-функциональной организации коры отмечены между приматами и человеком в сравнении с остальными видами млекопитающих (Chen, Miller, 2013; Vinson, 2016). Складывается впечатление, что кора надпочечников подвергалась значительным изменениям в процессе эволюции, по-видимому, в связи с ее важным значением для адаптации и организации социальных взаимоотношений.

В коре надпочечников серотонин может регулировать стероидогенез как напрямую, так и опосредованно (Louiset et al., 2019). Наличие рецепторов к серотонину на эндокринных клетках обеспечивает возможность прямого действия (Lefebvre et al., 1992; Contesse et al., 1996; Lenglet et al., 2002; Louiset et al., 2019). В то же время серотонин, выделяемый нервными волокнами или тучными клетками вблизи кровеносных сосудов (Hinson et al., 1989), модулирует кровоток, который, в свою очередь, влияет на синтез стероидов (Vinson et al., 1985).

Рассматривают множественные источники серотонина в коре надпочечников (рис. 4). Типы клеток коры, в которых находят серотонин, отличаются у разных видов млекопитающих (Lefebvre et al., 1992, 1998). Например, у человека серотонин присутствует исключительно в субкапсулярных тучных клетках надпочечников, у крыс в тучных клетках и в хромаффинных клетках, а у мышей также в нервных волокнах (Verhofstad, Jonsson, 1983; Hinson et al., 1989; Fernández-Vivero et al., 1993; Bram et al., 2016; Louiset et al., 2019). Серотонин может как синтезироваться, так и захватываться в клетки, благодаря экспрессии транспортера SERT (Shanker et al., 2020). Полный комплект ферментов синтеза серотонина обнаружен исключительно в субкапсулярных тучных клетках, которые считают значимым источником серотонина не только для кортекса, но и для хромаффинных клеток медуллы. Собственно эндокринные клетки коры у изученных видов млекопитающих не содержат ТпГ (Chen, Miller, 2012; García-Iglesias et al., 2013; Swami, Weber, 2018). Интересная особенность обнаружена у человека, где экспрессия ТпГ2 появляется в коре надпочечников при патологических состояниях. Например, двусторонняя гиперплазия коры при первичной пигментной узелковой болезни надпочечников (Le Mestre et al., 2019) сопровождается появлением ТпГ2, что приводит к образованию внутринадпочечниковой серотонинергической стимулирующей петли, ответственной за гиперсекрецию кортизола (Bram et al., 2016; Le Mestre et al., 2019). В целом, в отношении патологий надпочечников человека, сопровождающихся гиперсекрецией стероидов, сообщалось об усилении активации сигнального пути серотонина (Lacroix et al., 2010; Bram et al., 2016; Louiset et al., 2019). Это позволяет предположить, что локальный серотонинергический контроль секреции стероидов может играть важную роль как в норме, так и в патогенезе первичных заболеваний надпочечников.

У некоторых видов млекопитающих клетки кортекса экспрессируют второй фермент синтеза серотонина – ДАА, что позволяет синтезировать его из 5НТР, присутствующего в биологических жидкостях (Kent, Coupland, 1984; Baker et al., 1991). Поскольку эндотелий сосудов также может экспрессировать ДАА (Rouzaud-Laborde et al., 2012), нельзя исключать возможность поступления серотонина из клеток эндотелия с учетом богатого кровоснабжения ткани надпочечников. Данное предположение требует экспериментальных подтверждений. Серотонин также может выделяться локально из нервных терминалей, иннервирующих надпочечник (Brindley et al., 2017). Существует мнение, что островки хромаффинных клеток в коре могут служить дополнитель-

ным источником серотонина благодаря присутствию в них SERT (Shanker et al., 2020).

В отличие от медуллы, эндокринные клетки в коре в норме экспрессируют транспортер серотонина SERT на крайне низком уровне (Shanker et al., 2020). При этом хронический иммобилизационный стресс значительно стимулирует экспрессию SERT в коре надпочечников (Shanker et al., 2020). Однако, этот эффект ограничен, по-видимому, островками хромаффинных клеток, лежащими в коре (Shanker et al., 2020).

Экспрессию SERT в субкапсулярных тучных клетках коры надпочечников не изучали, однако имеются основания предполагать такую возможность. Тучные клетки соединительнотканного типа способны экспрессировать SERT, в отличие от тучных клеток мукозального типа (Saito et al., 2002). Поскольку тучные клетки коры надпочечников чувствительны к активации веществом 48/80 (Hinson et al., 1989), что является характеристикой тучных клеток соединительнотканного типа (Metcalf et al., 1997), можно предположить, что они могут экспрессировать SERT. В экстрактах коры надпочечников разных видов животных обнаруживают значительное количество основного катаболита серотонина – гидроксиндолуксусной кислоты (Lefebvre et al., 1992, 2001), а также фермент катаболизма серотонина моноаминоксидазу типов А и В (Rodríguez et al., 2000; Lefebvre et al., 2001).

Паттерн экспрессии рецепторов к серотонину в коре надпочечников также отличается выраженной видоспецифичностью. В частности, у человека стероидогенный эффект серотонина опосредован рецепторами Htr4, тогда как у крыс в альдостероновом ответе на серотонин участвуют рецепторы Htr7 (Lefebvre et al., 1992; Contesse et al., 1996; Lenglet et al., 2002; Louiset et al., 2019). У мышей типы рецепторов серотонина в коре надпочечников пока не идентифицированы (Louiset et al., 2019). У всех изученных видов оба рецептора Htr4 и Htr7 в надпочечниках связаны с аденилатциклазами и цАМФ-зависимыми протеинкиназами (РКА) (рис. 4). Активация обоих этих сигнальных путей обеспечивает приток кальция через кальциевые каналы Т-типа и приводит к стимуляции стероидогенеза (Lenglet et al., 2002; Louiset et al., 2017) (рис. 4). У человека распределение рецептора Htr4, который в избытке присутствует в клубочковой зоне и слабо экспрессируется в фасцикулярной и сетчатой зонах, объясняет более высокую эффективность серотонина для стимуляции выработки минералокортикоидов, чем глюкокортикоидов и андрогенов (Louiset et al., 2019). Избыток выделенного серотонина может метаболизироваться MAO А, присутствующим в цитоплазме внутрикорковых хромаффинных клеток (Lefebvre et al., 2001) (рис. 4).

Участие серотонина в локальной паракринной регуляции секреции минералокортикоидов и глюкокортикоидов клетками коры надпочечников половозрелых млекопитающих подтверждено многочисленными исследованиями. У человека тучные клетки, находясь в тесном контакте с альдостерон-продуцирующими клетками, модулируют их работу посредством воздействия серотонина на секрецию альдостерона (Lefebvre et al., 2001; Louiset et al., 2019). Таким образом, у человека паракринная регуляция активности клеток коры надпочечников с помощью серотонина включает взаимодействие между тремя типами клеток: тучные клетки (источник серотонина), эндокринные клетки коры (серотонин-чувствительные) и внутрикорковые хромаффинные клетки (ответственные за катаболизм выделенного серотонина) (Lefebvre et al., 2001) (рис. 4). В свою очередь, есть основания предполагать существование отрицательной обратной связи в регуляции выделения серотонина тучными клетками (Carvalho et al., 2006; Louiset et al., 2019), тем не менее, эту гипотезу еще предстоит проверить. Серотонин может также оказывать влияние на секрецию стероидов эндокринными клетками надпочечников опосредованно через модуляцию секреции цитокинов, например, интерлейкина 6, фактора некроза опухоли, интерлейкина 1 (Natarajan et al., 1989; Tominaga et al., 1991; Ritchie et al., 1996; Lefebvre et al., 1998).

В контроле секреции глюкокортикоидов у человека участвуют рецепторы серотонина Htr4, а у животных – Htr7 (Lefebvre et al., 1992; Contesse et al., 1996; Lenglet et al., 2002; Louiset et al., 2019). У человека серотонин стимулирует выработку кортизола в надпочечниках через внутриклеточные сигнальные пути, также связанные с цАМФ/РКА (Lefebvre et al., 1992, 2001; Contesse et al., 2000), и это действие может усиливаться при некоторых патологиях надпочечников, сопровождающихся гиперкортизолизмом (Lefebvre et al., 2015). Аналогичные данные представлены и для других видов млекопитающих (Haning, Tait, 1970; Barbieri et al., 1984). Таким образом, через влияние на секрецию глюкокортикоидов серотонин может напрямую участвовать в регуляции реакций организма на стресс, а также в той или иной мере определять его последствия, в том числе и для самих надпочечников. Известно, что хронический иммобилизационный стресс у крыс значительно повышает экспрессию рецепторов серотонина в фасцикулярной зоне надпочечников, ответственной за синтез глюкокортикоидов (García-Iglesias et al., 2013). Все вышеперечисленное может иметь значение для адаптации организма к меняющимся условиям окружающей среды.

Именно в регуляции ответа на стресс важную роль играет взаимодействие между корой и медуллой надпочечников, и серотонин является участником этого процесса. Например, хро-

маффинные клетки медуллы, как и тучные клетки коры (Carvalho et al., 2006), экспрессируют рецептор ангиотензина, уровень экспрессии которого увеличивается при стрессе (Armando et al., 2003). Следовательно, ренин-ангиотензин-альдостероновая система важна для координации работы обоих отделов надпочечников.

Взаимосвязь коры и медуллы прослеживается не только в поддержании гомеостаза и регуляции реакции на стресс во взрослом организме, но и в развитии надпочечников. Например, глюкокортикоидные гормоны, секретлируемые корой надпочечников, способствуют дифференцировке симпатoadреналовых предшественников в хромаффинные клетки медуллы в эмбриогенезе, в частности, индуцируют экспрессию фенилэтанолмин N-метилтрансферазы (фермента синтеза адреналина) (Anderson, 1993; Finotto et al., 1999). Несмотря на то, что кора и медулла надпочечников развиваются и функционируют в тесном взаимодействии, по происхождению они не являются родственными. Начиная с 1930х годов (Zwemer et al., 1938; Vinson, 2016) постепенно накапливались сведения, на основании которых складывалось современное представление о развитии коры надпочечников. У млекопитающих она возникает из адреногонадального зародыша, происходящего из целомического эпителия и нижележащей промежуточной (мезонефрической) мезодермы в течение 4–6-й недели беременности у человека и на Э10 у мышей (Ikeda et al., 1994; Hatano et al., 1996; Yates et al., 2013). Затем адреногонадальный зародыш делится на зачатки надпочечников и гонад (Goto et al., 2006; Yates et al., 2013), и мигрирует к месту окончательной закладки органов. К 9-й неделе беременности у человека (Э13 у мыши) внутрь зачатка надпочечников проникают предшественники хромаффинных клеток, образуя центральный мозговой слой. Вместе с этим происходит активная васкуляризация зачатка органа, его зонирование и инкапсуляция (Xing et al., 2015; Vinson, 2016; Finko et al., 2019). С этого момента и до рождения железа увеличивается в размерах примерно в 8–10 раз (Yates et al., 2013), а третья кортикальная зона у человека становится оформленной к 14-ти неделям беременности (Goto et al., 2006; Yates et al., 2013).

Тучные клетки в субкапсулярной области надпочечников плода человека появляются в возрасте 16–18-ти недель (Naccache et al., 2016). Увеличение плотности тучных клеток надпочечников предшествует экспрессии альдостеронсинтазы плода (Naccache et al., 2016). Это позволяет предположить, что тучные клетки могут играть значительную роль в дифференцировке эндокринных клеток коры у плодов. Начало секреции минералокортикоидов и глюкокортикоидов в эмбриогенезе все еще остается предметом дискуссий (Goto et al., 2006; Naccache et al., 2016), тем не менее понятно, что к этому мо-

менту в развивающейся коре уже присутствуют тучные клетки и сигнальный путь серотонина, что свидетельствует о пространственно-временной корреляции с экспрессией стероидогенных ферментов.

До настоящего времени роль серотонина в регуляции развития коры надпочечников непосредственно не изучали. Однако существуют многочисленные свидетельства, косвенно подтверждающие важность серотонина в этом процессе, например, исследования животных с нокаутами различных компонентов серотонинергической системы говорят о значимости транспортера SERT. Содержание серотонина в надпочечниках резко снижено у мышей или крыс с дефицитом SERT (Linder et al., 2009; Brindley et al., 2016; Louiset et al., 2019). Мыши с подавлением экспрессии транспортера серотонина (SERT+/- и SERT-/-) более чувствительны к стрессу, чем мыши SERT+/+, и у них значительно снижена экспрессия гена рецептора глюкокортикоидов (GR), в том числе и в коре надпочечников (Adames et al., 2006; Li, 2006; Jiang et al., 2009). Сравнение мышей с нокаутами SERT и TпГ позволяет заключить, что избыток серотонина может быть более критичен в развитии коры, чем недостаток. Эта закономерность прослеживается не только в отношении надпочечников, но также и других органов (Nordquist, Orelan, 2010; St-Pierre et al., 2016; Kameneva, Melnikova et al., 2022). Например, у мышей SERT-/- повышенный уровень внеклеточного серотонина приводит к ряду структурных аномалий мозга (Kalueff et al., 2010), в то время как у нокаутных по TпГ2 структура мозга не нарушена (Gutknecht et al., 2012). Концептуально аналогичные результаты показывает применение селективных ингибиторов SERT в эмбриональном развитии мышей (Noorlander et al., 2008; St-Pierre et al., 2016).

Кроме того, как упоминалось выше, временное повышение уровня серотонина у плодов в период формирования надпочечников приводит к долгосрочным изменениям в поведении потомства, в первую очередь в реакциях на стресс (Kameneva, Melnikova et al., 2022). Весьма вероятно, что эти изменения обусловлены отклонениями в развитии не только медуллы надпочечников, но и кортекса, в силу тесной взаимосвязи этих компартментов в регуляции ответа на стресс. Поэтому детальное изучение роли серотонина в развитии коры надпочечников представляется целесообразным и перспективным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, анализ существующих данных позволяет заключить, что в коре и медулле надпочечников присутствует и функционирует локальная серотонинергическая система, которая играет важную роль в регуляции секреции гормонов по-

средством аутокринно-паракринных механизмов. Локальная серотонинергическая система надпочечников может играть также интегрирующую роль в отношении функционирования коры и медуллы как целостного органа, ответственного за комплексную физиологическую реакцию организма на стресс. Исследования последних лет показали, что локальное значение серотонина не ограничивается его регуляторным влиянием в зрелых надпочечниках, а распространяется также на контроль формирования этого органа в эмбриогенезе. И хотя последнее доказано в отношении медуллы, существуют веские основания предполагать, что регуляторная роль серотонина распространяется также и на развитие кортекса. Отдельно следует подчеркнуть, что наличие серотонин-чувствительных клеток делает орган восприимчивым к колебаниям уровня циркулирующего в крови серотонина, что обеспечивает возможность системной гуморальной координации работы органов. В таком аспекте становится понятна важность локальных серотонинергических систем для медицины. Известно, что концентрация серотонина в плазме крови может значительно повышаться, например, при сердечно-сосудистых заболеваниях (гипертония, тромбоз, ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда), а также при сепсисе (Vikenes et al., 1999; Brindley et al., 2016). Примечательно, что уровень внеклеточного серотонина возрастает также при использовании антидепрессантов из группы блокаторов транспортера серотонина, которые все шире применяются в мировой практике. Важная роль надпочечников в поддержании гомеостаза указывает на необходимость учитывать физиологическое взаимодействие между циркулирующим серотонином и функцией надпочечников в патогенезе ряда заболеваний. Особо следует отметить важность серотонина в пренатальном развитии, где он выступает как связующий фактор между окружающей средой и формирующимся организмом, и может регулировать процессы развития в контексте изменений окружающей среды. Это открывает большой потенциал для негенетического контроля развития как надпочечников, так и других периферических органов, в которых присутствуют локальные серотонинергические системы. Иными словами, функция серотонина на всех этапах индивидуального развития много шире, чем мы могли себе представить совсем недавно.

БЛАГОДАРНОСТИ

Рисунки к обзору подготовлены с использованием интернет-ресурса BioRender (<https://biorender.com/>).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках раздела Государственного задания ИБР РАН № ГЗ 0088-2021-0020 2022 г.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящий обзор не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ВКЛАД АВТОРОВ

Авторы внесли одинаковый вклад в подготовку и написание текста обзора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Лифанцева Н.В., Конеева Ц.О., Воронежская Е.Е. и др. Экспрессия компонентов серотонинергической системы в развивающемся тимусе крыс // Доклады Академии наук (Биохимия, биофизика, молекулярная биология). 2017. Т. 477. № 6. С. 745–748.
- Abbott N.J. Inflammatory mediators and modulation of blood–brain barrier permeability // Cellular and Molecular Neurobiology. 2000. V. 20. № 2. P. 131–147.
- Adamec R., Burton P., Blundell J. et al. Vulnerability to mild predator stress in serotonin transporter knockout mice // Behavioural Brain Research. 2006. V. 170. № 1. P. 126–140. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.02.012>
- Albillos A., Dernick G., Horstmann H., et al. The exocytotic event in chromaffin cells revealed by patch amperometry // Nature. 1997. V. 389. № 6650. P. 509–512.
- Alexander S.P.H., Benson H.E., Faccenda E., et al. The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2013/14: G protein-coupled receptors // British J. Pharmacology. 2013. V. 170. № 8. P. 1459–1581. <https://doi.org/10.1111/bph.12445>
- Amireault P., Sibon D., Côté F. Life without peripheral serotonin: insights from tryptophan hydroxylase 1 knockout mice reveal the existence of paracrine/autocrine serotonergic networks // ACS Chemical Neuroscience. 2013. V. 4. № 1. P. 64–71. <https://doi.org/10.1021/cn300154j>
- Anantharam A., Bittner M.A., Aikman R.L. et al. A new role for the dynamin GTPase in the regulation of fusion pore expansion // Molecular Biology of the Cell. 2011. V. 22. № 11. P. 1907–1918. <https://doi.org/10.1091/mbc.e11-02-0101>
- Anderson D.J. Cell fate determination in the peripheral nervous system: the sympathoadrenal progenitor // J. Neurobiology. 1993. V. 24. № 2. P. 185–198. <https://doi.org/10.1002/neu.480240206>
- Anderson D.J., Carnahan J.F., Michelsohn A. et al. Antibody markers identify a common progenitor to sympathetic neurons and chromaffin cells *in vivo* and reveal the timing of commitment to neuronal differentiation in the sympathoadrenal lineage // J. Neuroscience. 1991. V. 11. № 11. P. 3507–3519. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.11-11-03507.1991>
- Armando I., Tjurmina O.A., Li Q. et al. The serotonin transporter is required for stress-evoked increases in adrenal catecholamine synthesis and angiotensin II AT2 receptor expression // Neuroendocrinology. 2003. V. 78. № 4. P. 217–225. <https://doi.org/10.1159/000073705>
- Arnold J. Ein Beitrag zu der feineren Struktur und dem Chemismus der Nebennieren // Virchows Archiv. 1866. V. 35. № 1. P. 64–107. <https://doi.org/10.1007/BF01979887>
- Bader M. Serotonylation: serotonin signaling and epigenetics // Frontiers in Molecular Neuroscience. 2019. V. 12. P. 288. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00288>
- Baker H., Abate C., Szabo A. et al. Species-specific distribution of aromatic L-amino acid decarboxylase in the rodent adrenal gland, cerebellum, and olfactory bulb // J. Comparative Neurology. 1991. V. 305. № 1. P. 119–129. <https://doi.org/10.1002/cne.903050111>
- Barbieri C., Sala M., Bigatti G. et al. Serotonergic regulation of cortisol secretion in dogs // Endocrinology. 1984. V. 115. № 2. P. 748–751. <https://doi.org/10.1210/endo-115-2-748>
- Bauer M.B., Currie K.P.M. Adrenal Medulla Hormones // Hormonal Signaling in Biology and Medicine. Academic Press. 2020. P. 635–653. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813814-4.00029-8>
- Bedi U.S., Arora R. Cardiovascular manifestations of post-traumatic stress disorder // Journal of the National Medical Association. 2007. V. 99. № 6. P. 642.
- Betke K.M., Wells C.A., Hamm H.E. GPCR mediated regulation of synaptic transmission // Prog. Neurobiol. 2012. V. 96. № 3. P. 304–321. PMID: 22307060; PMCID: PMC3319362. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2012.01.009>
- Bonnin A., Goeden N., Chen K. et al. A transient placental source of serotonin for the fetal forebrain // Nature. 2011. V. 472. № 7343. P. 347–350.
- Bornstein S.R., Ehrhart-Bornstein M. Ultrastructural evidence for a paracrine regulation of the rat adrenal cortex mediated by the local release of catecholamines from chromaffin cells // Endocrinology. 1992. V. 131. № 6. P. 3126–3128. <https://doi.org/10.1210/en.131.6.3126>
- Bornstein S.R., Gonzalez-Hernandez J.A., Ehrhart-Bornstein M. et al. Intimate contact of chromaffin and cortical cells within the human adrenal gland forms the cellular basis for important intraadrenal interactions // The Journal Clinical Endocrinology & Metabolism. 1994. V. 78. № 1. P. 225–232. <https://doi.org/10.1210/jcem.78.1.7507122>
- Bram Z., Louiset E., Ragazzon B. et al. PKA regulatory subunit 1A inactivating mutation induces serotonin signaling in primary pigmented nodular adrenal disease // JCI Insight. 2016. V. 1. № 15. P. e87958. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.87958>

- Brindley M.B., Bauer R.D., Blakely K.P. et al.* An interplay between the serotonin transporter (SERT) and 5-HT receptors controls stimulus-secretion coupling in sympathoadrenal chromaffin cells // *Neuropharmacology*. 2016. V. 110. P. 438–448.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.08.015>
- Brindley M.B., Bauer R.D., Blakely K.P.M. et al.* Serotonin and serotonin transporters in the adrenal medulla: a potential hub for modulation of the sympathetic stress response // *ACS Chemical Neuroscience*. 2017. V. 8. № 5. P. 943–954.
<https://doi.org/10.1021/acscemneuro.7b00026>
- Brindley R.L., Bauer M.B., Walker L.A. et al.* Adrenal serotonin derives from accumulation by the antidepressant-sensitive serotonin transporter // *Pharmacological Research*. 2019. V. 140. P. 56–66.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.06.008>
- Briscoe V.J., Ertl A.C., Tate D.B. et al.* Effects of a selective serotonin reuptake inhibitor, fluoxetine, on counterregulatory responses to hypoglycemia in healthy individuals // *Diabetes*. 2008. V. 57. № 9. P. 2453–2460.
<https://doi.org/10.2337/db08-0236>
- Carvalho R.F., Ribeiro R.A., Falcão R.A. et al.* Angiotensin II potentiates inflammatory edema in rats: Role of mast cell degranulation // *European Journal Pharmacology*. 2006. V. 540. № 1–3. P. 175–182.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.04.014>
- Chan S.A., Doreian B., Smith C.* Dynamin and myosin regulate differential exocytosis from mouse adrenal chromaffin cells // *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2010. V. 30. № 8. P. 1351–1357.
- Chen G.L., Miller G.M.* Advances in tryptophan hydroxylase-2 gene expression regulation: New insights into serotonin–stress interaction and clinical implications // *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*. 2012. V. 159. № 2. P. 152–171.
<https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32023>
- Chen G.L., Miller G.M.* Tryptophan hydroxylase-2: an emerging therapeutic target for stress disorders // *Biochemical Pharmacology*. 2013. V. 85. № 9. P. 1227–1233.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.02.018>
- Chen H.J., Antonson A.M., Rajasekera T.A. et al.* Prenatal stress causes intrauterine inflammation and serotonergic dysfunction, and long-term behavioral deficits through microbe- and CCL2-dependent mechanisms // *Translational Psychiatry*. 2020. V. 10. № 1. P. 1–12.
<https://doi.org/10.1038/s41398-020-00876-5>
- Contesse V., Hamel C., Lefebvre H. et al.* Activation of 5-hydroxytryptamine₄ receptors causes calcium influx in adrenocortical cells: involvement of calcium in 5-hydroxytryptamine-induced steroid secretion // *Molecular Pharmacology*. 1996. V. 49. № 3. P. 481–493.
- Contesse V., Lefebvre H., Lenglet S. et al.* Role of 5-HT in the regulation of the brain-pituitary-adrenal axis: effects of 5-HT on adrenocortical cells // *Canadian Journal Physiology and Pharmacology*. 2000. V. 78. № 12. P. 967–983.
<https://doi.org/10.1139/y00-098>
- Côté E., Thevenot C., Fligny Y. et al.* Disruption of the non-neuronal tph1 gene demonstrates the importance of peripheral serotonin in cardiac function // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003. V. 100. № 23. P. 13525–13530.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2233056100>
- Fernández-Vivero J., Rodríguez-Sánchez F., Verástegui C. et al.* Immunocytochemical distribution of serotonin and neuropeptide Y, NPY in mouse adrenal gland // *Histology and Histopathology*. 1993. V. 8. № 3. P. 509–520. PMID: 8358162.
- Finco I., Mohan D.R., Hammer G.D. et al.* Regulation of stem and progenitor cells in the adrenal cortex // *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research*. 2019. V. 8. P. 66–71.
<https://doi.org/10.1016/j.coemr.2019.07.009>
- Finotto S., Krieglstein K., Schober A. et al.* Analysis of mice carrying targeted mutations of the glucocorticoid receptor gene argues against an essential role of glucocorticoid signalling for generating adrenal chromaffin cells // *Development*. 1999. V. 126. № 13. P. 2935–2944.
<https://doi.org/10.1242/dev.126.13.2935>
- Furlan A., Dyachuk V., Kastrić M.E. et al.* Multipotent peripheral glial cells generate neuroendocrine cells of the adrenal medulla // *Science*. 2017. V. 357. № 6346. P. eaal3753.
<https://doi.org/10.1126/science.aal3753>
- García-Iglesias B.B., Mendoza-Garrido M.E., Gutiérrez-Ospina G. et al.* Sensitization of restraint-induced corticosterone secretion after chronic restraint in rats: involvement of 5-HT₇ receptors // *Neuropharmacology*. 2013. V. 71. P. 216–227.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.03.013>
- Goeden N., Velasquez J., Arnold K.A. et al.* Maternal inflammation disrupts fetal neurodevelopment via increased placental output of serotonin to the fetal brain // *Journal Neuroscience*. 2016. V. 36. № 22. P. 6041–6049.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2534-15.2016>
- Goto M., Hanley K.P., Marcos J. et al.* In humans, early cortisol biosynthesis provides a mechanism to safeguard female sexual development // *The Journal Clinical Investigation*. 2006. V. 116. № 4. P. 953–960.
<https://doi.org/10.1172/JCI25091>
- Gutknecht L., Araragi N., Merker S. et al.* Impacts of brain serotonin deficiency following Tph2 inactivation on development and raphe neuron serotonergic specification // *PLoS One*. 2012. e43157.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043157>
- Haning R., Tait J.F.* In vitro effects of ACTH, angiotensins, serotonin and potassium on steroid output and conversion of corticosterone to aldosterone by isolated adrenal cells // *Endocrinology*. 1970. V. 87. № 6. P. 1147–1167.
<https://doi.org/10.1210/endo-87-6-1147>
- Hatano O., Takakusu A., Nomura M. et al.* Identical origin of adrenal cortex and gonad revealed by expression profiles of Ad4BP/SF-1 // *Genes to Cells*. 1996. V. 1. № 7. P. 663–671.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.1996.00254.x>
- Hinson J.P., Vinson G.P., Pudney J. et al.* Adrenal mast cells modulate vascular and secretory responses in the intact adrenal gland of the rat // *Journal Endocrinology*. 1989. V. 121. № 2. P. 253–NP.
<https://doi.org/10.1677/joe.0.1210253>

- Huber K., Kalcheim C., Unsicker K. The development of the chromaffin cell lineage from the neural crest // *Autonomic Neuroscience*. 2009. V. 151. № 1. P. 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2009.07.020>
- Ikeda Y., Shen W.H., Ingraham H.A. et al. Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases // *Molecular Endocrinology*. 1994. V. 8. № 5. P. 654–662. <https://doi.org/10.1210/mend.8.5.8058073>
- Jewell M.L., Currie K.P.M. Control of Ca V 2 calcium channels and neurosecretion by heterotrimeric G protein coupled receptors // *Modulation of Presynaptic Calcium Channels*. Springer, Dordrecht, 2013. P. 101–130.
- Jiang X., Wang J., Luo T. et al. Impaired hypothalamic-pituitary-adrenal axis and its feedback regulation in serotonin transporter knockout mice // *Psychoneuroendocrinology*. 2009. V. 34. № 3. P. 317–331. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2008.09.011>
- Kalueff A.V., Olivier J.D.A., Nonkes L.J.P. et al. Conserved role for the serotonin transporter gene in rat and mouse neurobehavioral endophenotypes // *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2010. V. 34. № 3. P. 373–386. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2009.08.003>
- Kameneva P., Artemov A.V., Kastriti M.E. et al. Single-cell transcriptomics of human embryos identifies multiple sympathoblast lineages with potential implications for neuroblastoma origin // *Nat. Genet.* 2021. V. 53. № 5. P. 694–706. PMID: 33833454; PMCID: PMC7610777. <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00818-x>
- Kameneva P., Melnikova V.I., Kastriti M.E. et al. Serotonin limits generation of chromaffin cells during adrenal organ development // *Nature Communications*. 2022. V. 13. № 1. P. 1–21.
- Kastriti M.E., Kameneva P., Kamenev D. et al. Schwann cell precursors generate the majority of chromaffin cells in Zuckerkandl organ and some sympathetic neurons in paraganglia // *Front. Mol. Neurosci.* 2019. V. 25. № 12. P. 6. PMID: 30740044; PMCID: PMC6355685. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00006>
- Kent C., Coupland R.E. On the uptake and storage of 5-hydroxytryptamine, 5-hydroxytryptophan and catecholamines by adrenal chromaffin cells and nerve endings // *Cell and Tissue Research*. 1984. V. 236. № 1. P. 189–195.
- Kvetnansky R., Lu X., Ziegler M.G. Stress-triggered changes in peripheral catecholaminergic systems // *Advances in Pharmacology*. 2013. V. 68. P. 359–397. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411512-5.00017-8>
- Lacroix A., Bourdeau I., Lampron A. et al. Aberrant G-protein coupled receptor expression in relation to adrenocortical overfunction // *Clinical Endocrinology*. 2010. V. 73. № 1. P. 1–15. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2009.03689.x>
- Lefebvre H., Compagnon P., Contesse V. et al. Production and metabolism of serotonin (5-HT) by the human adrenal cortex: paracrine stimulation of aldosterone secretion by 5-HT // *The Journal Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2001. V. 86. № 10. P. 5001–5007. <https://doi.org/10.1210/jcem.86.10.7917>
- Lefebvre H., Contesse V., Delarue C. et al. Serotonin-induced stimulation of cortisol secretion from human adrenocortical tissue is mediated through activation of a serotonin₄ receptor subtype // *Neuroscience*. 1992. V. 47. № 4. P. 999–1007. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(92\)90047-6](https://doi.org/10.1016/0306-4522(92)90047-6)
- Lefebvre H., Contesse V., Delarue C. et al. Serotonergic regulation of adrenocortical function // *Horm. Metab. Res.* 1998. V. 30. № 6–7. P. 398–403. PMID: 9694569. <https://doi.org/10.1055/s-2007-978904>
- Lefebvre H., Duparc C., Prevost G. et al. Paracrine control of steroidogenesis by serotonin in adrenocortical neoplasms // *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2015. V. 408. P. 198–204. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.11.013>
- Le Mestre J., Duparc C., Reznik Y. et al. Illicit upregulation of serotonin signaling pathway in adrenals of patients with high plasma or intra-adrenal ACTH levels // *The Journal Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2019. V. 104. № 11. P. 4967–4980. <https://doi.org/10.1210/jc.2019-00425>
- Lenglet S., Louiset E., Delarue C. et al. Activation of 5-HT₇ receptor in rat glomerulosa cells is associated with an increase in adenylyl cyclase activity and calcium influx through T-type calcium channels // *Endocrinology*. 2002. V. 143. № 5. P. 1748–1760. <https://doi.org/10.1210/endo.143.5.8817>
- Li Q. Cellular and molecular alterations in mice with deficient and reduced serotonin transporters // *Molecular Neurobiology*. 2006. V. 34. № 1. P. 51–65.
- Li Y., Hadden C., Cooper A. et al. Sepsis-induced elevation in plasma serotonin facilitates endothelial hyperpermeability // *Scientific Reports*. 2016. V. 6. № 1. P. 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep22747>
- Linder A.E., Beggs K.M., Burnett R.J. et al. Body distribution of infused serotonin in rats // *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2009. V. 36. № 5–6. P. 599–601. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2009.05147.x>
- Liu J., Huang S., Li G. et al. High housing density increases stress hormone- or disease-associated fecal microbiota in male Brandt's voles (*Lasiopodomys brandtii*) // *Hormones and Behavior*. 2020. V. 126. P. 104838. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2020.104838>
- Louiset E., Duparc C., Lefebvre H. Role of serotonin in the paracrine control of adrenal steroidogenesis in physiological and pathophysiological conditions // *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research*. 2019. V. 8. P. 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.coemr.2019.07.003>
- Louiset E., Duparc C., Lenglet S. et al. Role of cAMP/PKA pathway and T-type calcium channels in the mechanism of action of serotonin in human adrenocortical cells // *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2017. V. 441. P. 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.10.008>
- Metcalfe D.D., Baram D., Mekori Y.A. Mast cells // *Physiological Reviews*. 1997. V. 77. № 4. P. 1033–1079. <https://doi.org/10.1152/physrev.1997.77.4.1033>
- Muma N.A., Mi Z. Serotonylation and transamidation of other monoamines // *ACS Chemical Neuroscience*. 2015. V. 6. № 7. P. 961–969. <https://doi.org/10.1021/cn500329r>
- Naccache A., Louiset E., Duparc C. et al. Temporal and spatial distribution of mast cells and steroidogenic enzymes

- in the human fetal adrenal // *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2016. V. 434. P. 69–80.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.06.015>
- Natarajan R., Ploszaj S., Horton R. et al.* Tumor necrosis factor and interleukin-1 are potent inhibitors of angiotensin-II-induced aldosterone synthesis // *Endocrinology*. 1989. V. 125. № 6. P. 3084–3089.
<https://doi.org/10.1210/endo-125-6-3084>
- Noorlander C.W., Ververs F.F., Nikkels P.G. et al.* Modulation of serotonin transporter function during fetal development causes dilated heart cardiomyopathy and life-long behavioral abnormalities // *PLoS One*. 2008. V. 3. № 7. P. e2782.
- Nordquist N., Oreland L.* Serotonin, genetic variability, behaviour, and psychiatric disorders—a review // *Upsala Journal Medical Sciences*. 2010. V. 115. № 1. P. 2–10.
<https://doi.org/10.3109/03009730903573246>
- Paine N.J., Watkins L.L., Blumenthal J.A. et al.* Associations of Depressive and Anxiety Symptoms with 24-hour Urinary Catecholamines in individuals with untreated high blood pressure // *Psychosomatic Medicine*. 2015. V. 77. № 2. P. 136.
<https://doi.org/10.1097/PSY.0000000000000144>
- Paulmann N., Grohmann M., Voigt, J.P. et al.* Intracellular serotonin modulates insulin secretion from pancreatic β -cells by protein serotonylation // *PLoS Biology*. 2009. V. 7. № 10. P. e1000229.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000229>
- Rapport M.M., Green A.A., Page I.H.* Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization // *J. Biol. Chem.* 1948. V. 176. № 3. P. 1243–1251. PMID: 18100415176.
- Ritchie P.K., Knight H.H., Ashby M. et al.* Serotonin increases interleukin-6 release and decreases tumor necrosis factor release from rat adrenal zona glomerulosa cells *in vitro* // *Endocrine*. 1996. V. 5. № 3. P. 291–297.
- Ritzen M., Hammarstroem L., Ullberg S.* Autoradiographic distribution of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxytryptophan in the mouse // *Biochem. Pharmacol.* 1965. V. 14. P. 313–321. PMID: 14314328.
[https://doi.org/10.1016/0006-2952\(65\)90196-6](https://doi.org/10.1016/0006-2952(65)90196-6)
- Rodríguez M.J., Saura J., Finch C.C. et al.* Localization of monoamine oxidase A and B in human pancreas, thyroid, and adrenal glands // *Journal Histochemistry & Cytochemistry*. 2000. V. 48. № 1. P. 147–151.
<https://doi.org/10.1177/002215540004800115>
- Rouzaud-Laborde C., Hanoun N., Baysal I. et al.* Role of endothelial AADC in cardiac synthesis of serotonin and nitrates accumulation // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 7. P. e34893.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034893>
- Sabban E.L., Nankova B.B., Serova L.I. et al.* Regulation of gene expression of catecholamine biosynthetic enzymes by stress // *Advances in Pharmacology*. Academic Press, 1997. V. 42. P. 564–567.
[https://doi.org/10.1016/S1054-3589\(08\)60813-3](https://doi.org/10.1016/S1054-3589(08)60813-3)
- Saito T., Fujimoto W., Yanase H. et al.* Immunohistochemical localization of serotonin transporter in the adrenal chromaffin cells and mast cells of mice // *Biomedical Research*. 2002. V. 23. № 6. P. 277–286.
<https://doi.org/10.2220/biomedres.23.277>
- Sanders N.M., Wilkinson C.W., Taborsky Jr. et al.* The selective serotonin reuptake inhibitor sertraline enhances counterregulatory responses to hypoglycemia // *American Journal Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2008. V. 294. № 5. P. E853–E860.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00772.2007>
- Schroeter S., Levey A.I., Blakely R.D.* Polarized expression of the antidepressant-sensitive serotonin transporter in epinephrine-synthesizing chromaffin cells of the rat adrenal gland // *Molecular and Cellular Neuroscience*. 1997. V. 9. № 3. P. 170–184.
<https://doi.org/10.1006/mcne.1997.0619>
- Shanker S., Saroj N., Cordova E.J. et al.* Chronic restraint stress induces serotonin transporter expression in the rat adrenal glands // *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2020. V. 518. P. 110935.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110935>
- St-Pierre J., Laurent L., King S. et al.* Effects of prenatal maternal stress on serotonin and fetal development // *Placenta*. 2016. V. 48. P. S66–S71.
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2015.11.013>
- Swami T., Weber H.C.* Updates on the biology of serotonin and tryptophan hydroxylase // *Current Opinion in Endocrinology & Diabetes and Obesity*. 2018. V. 25. № 1. P. 12–21.
<https://doi.org/10.1097/MED.0000000000000383>
- Tjurmina O.A., Armando I., Saavedra J.M. et al.* Exaggerated adrenomedullary response to immobilization in mice with targeted disruption of the serotonin transporter gene // *Endocrinology*. 2002. V. 143. № 12. P. 4520–4526.
<https://doi.org/10.1210/en.2002-220416>
- Tominaga T., Fukata J., Naito Y. et al.* Prostaglandin-dependent *in vitro* stimulation of adrenocortical steroidogenesis by interleukins // *Endocrinology*. 1991. V. 128. № 1. P. 526–531.
<https://doi.org/10.1210/endo-128-1-526>
- Vandenbergh D.J., Mori N., Anderson D.J.* Co-expression of multiple neurotransmitter enzyme genes in normal and immortalized sympathoadrenal progenitor cells // *Developmental Biology*. 1991. V. 148. № 1. P. 10–22.
[https://doi.org/10.1016/0012-1606\(91\)90313-R](https://doi.org/10.1016/0012-1606(91)90313-R)
- Verhofstad A.A.J., Jonsson G.* Immunohistochemical and neurochemical evidence for the presence of serotonin in the adrenal medulla of the rat // *Neuroscience*. 1983. V. 10. № 4. P. 1443–1453.
[https://doi.org/10.1016/0306-4522\(83\)90125-2](https://doi.org/10.1016/0306-4522(83)90125-2)
- Vikenes K., Farstad M., Nordrehaug J.E.* Serotonin is associated with coronary artery disease and cardiac events // *Circulation*. 1999. V. 100. № 5. P. 483–489.
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.100.5.483>
- Vinson G.P.* Functional zonation of the adult mammalian adrenal cortex // *Frontiers in Neuroscience*. 2016. V. 10. P. 238.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00238>
- Vinson G.P., Pudney J.A., Whitehouse B.J.* The mammalian adrenal circulation and the relationship between adrenal blood flow and steroidogenesis // *Journal Endocrinology*. 1985. V. 105. № 2. P. 285–NP.
<https://doi.org/10.1677/joe.0.1050285>
- Walther D.J., Peter J.U., Winter S. et al.* Serotonylation of small GTPases is a signal transduction pathway that

- triggers platelet α -granule release // *Cell*. 2003. V. 115. № 7. P. 851–862.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)01014-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)01014-6)
- Walther A., Petri E., Peter C. et al. Selective serotonin-receptor antagonism and microcirculatory alterations during experimental endotoxemia // *Journal of Surgical Research*. 2007. V. 143. № 2. P. 216–223.
<https://doi.org/10.1016/j.jss.2006.08.021>
- Weinstein A.A., Deuster P.A., Francis J.L. et al. Neurohormonal and inflammatory hyper-responsiveness to acute mental stress in depression // *Biological Psychology*. 2010. V. 84. № 2. P. 228–234.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2010.01.016>
- Weiss O. Über die Wirkungen von Blutserum-Injectionen ins Blut // *Archiv für die Gesamte Physiologie des Menschen und der Thiere*. 1896. V. 65. № 3. P. 215–230.
<https://doi.org/10.1007/BF01661741>
- Wilkins A.S., Wrangham R.W., Fitch W.T. The “domestication syndrome” in mammals: a unified explanation based on neural crest cell behavior and genetics // *Genetics*. 2014. V. 197. № 3. P. 795–808.
<https://doi.org/10.1534/genetics.114.165423>
- Winkler H., Westhead E. The molecular organization of adrenal chromaffin granules // *Neuroscience*. 1980. V. 5. № 11. P. 1803–1823.
[https://doi.org/10.1016/0306-4522\(80\)90031-7](https://doi.org/10.1016/0306-4522(80)90031-7)
- Wong D.L., Tai T.C., Wong-Faull D.C. et al. Epinephrine: A short- and long-term regulator of stress and development of illness // *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2012. V. 32. № 5. P. 737–748.
- Xing Y., Lerario A.M., Rainey W. et al. Development of adrenal cortex zonation // *Endocrinology and Metabolism Clinics*. 2015. V. 44. № 2. P. 243–274.
<https://doi.org/10.1016/j.ecl.2015.02.001>
- Yates R., Katugampola H., Cavlan D. et al. Adrenocortical development, maintenance, and disease // *Current Topics in Developmental Biology*. 2013. V. 106. P. 239–312.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416021-7.00007-9>
- Yoon E.J., Gerachshenko T., Spiegelberg B.D. et al. G β γ interferes with Ca²⁺-dependent binding of synaptotagmin to the soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (SNARE) complex // *Molecular Pharmacology*. 2007. V. 72. № 5. P. 1210–1219.
<https://doi.org/10.1124/mol.107.039446>
- Yu Z., Ohba M., Nakamura M. et al. Dynamics of platelet mobilisation into lungs in response to 5-hydroxytryptamine (serotonin) in mice // *Thrombosis and Haemostasis*. 2009. V. 102. № 12. P. 1251–1258.
<https://doi.org/10.1160/TH08-06-0406>
- Ziegler M.G., Elayan H., Milic M. et al. Epinephrine and the metabolic syndrome // *Current Hypertension Reports*. 2012. V. 14. № 1. P. 1–7.
- Zurawski Z., Rodriguez S., Hyde K. et al. G β γ binds to the extreme C terminus of SNAP25 to mediate the action of Gi/o-coupled G protein-coupled receptors // *Molecular Pharmacology*. 2016. V. 89. № 1. P. 75–83.
<https://doi.org/10.1124/mol.115.101600>
- Zwemer R.L., Wotton R.M., Norkus M.G. A study of cortico-adrenal cells // *The Anatomical Record*. 1938. V. 72. № 2. P. 249–263.
<https://doi.org/10.1002/ar.1090720210>

Serotonin and Adrenals: Regulation of Functions, Regulation of Development

V. I. Melnikova^{1, *} and N. S. Bondarenko¹

¹Koltzov Institute of Developmental Biology of the Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia

*e-mail: v_melnikova@mail.ru

Serotonin is not only a neurotransmitter, but also an important humoral regulator of various physiological processes outside the central nervous system. In the last decade, the concept of local serotonergic systems in peripheral organs, where serotonin realizes its effects via autocrine/paracrine mechanisms, has been developing. Such local systems have already been described in the pancreas, thymus, mammary gland, and bone marrow. We consider that a similar local serotonergic system is also characteristic of the adrenal glands. These paired organs are a key component of the mammalian endocrine system, providing a complex physiological response to stress. The adrenal glands consist of two parts distinct in origin and function – the cortex and medulla, while serotonin plays an important role in regulation of hormone secretion in both of these structures. This review is aimed to analyze the structure of the local serotonergic system in the adrenal gland, as well as its role both in the regulation of adrenal functions in adult animals and in the formation of adrenals in embryogenesis. Analysis of the available data suggests that local serotonergic systems makes an organ susceptible to fluctuations in the level of serotonin circulating in the blood at all stages of ontogenesis. Thus, local sensitivity to serotonin provides the possibility of systemic humoral coordination of the development and functioning of the adrenal glands and other peripheral organs. From this perspective, the importance of local serotonergic systems for developmental biology and medicine gains insight.

Keywords: adrenals, serotonin, local serotonergic system, medulla, cortex, ontogenesis, catecholamines, steroid hormones, stress, sympathoadrenal system

ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ЯДРЫШКОВОГО ОРГАНИЗАТОРА В РАСТУЩИХ ООЦИТАХ КУР: РЕВИЗИЯ СУЩЕСТВУЮЩИХ ПРЕДСТАВЛЕНИЙ

© 2023 г. А. Г. Давидьян^а, *, Е. И. Кошель^б, С. А. Галкина^а,
А. Ф. Сайфитдинова^с, Е. Р. Гагинская^а

^аСанкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия

^бУниверситет ИТМО, Санкт-Петербург, 197101 Россия

^сРоссийский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, Санкт-Петербург, 191186 Россия

*e-mail: a.davidian@spbu.ru

Поступила в редакцию 16.08.2022 г.

После доработки 26.09.2022 г.

Принята к публикации 28.11.2022 г.

В современной литературе утвердилось представление о том, что в яичнике взрослых самок птиц ядрышковый организатор (ЯОР) инактивирован на всех стадиях роста ооцита. Однако на примере яичника цыплят *Gallus g. domesticus*, в половине ооцитов стадии ранней диплотены обнаруживали одно или два ядрышка, которые функционировали вплоть до стадии развитых ламповых щеток. Предполагалось, что диплотенные ооциты с инактивированным ЯОР у цыпленка сохраняются как резерв для развития в яичнике взрослой самки. Такое несоответствие в функциональной активности ЯОР в ооцитах цыпленка и взрослой самки требовало специальных исследований. Здесь мы приводим новые результаты сравнительного анализа ядрышка в ооцитах у цыплят и у половозрелых кур. Мы впервые показываем, что в ооцитах взрослых кур, как и у цыплят, ядрышко появляется на стадии ранней диплотены и синтез пре-рРНК в нем продолжается до стадии ламповых щеток. На стадии ламповых щеток ЯОР инактивируется: ядрышко распадается на крупные фрагменты, содержащие как пре-рРНК, так и фибрилларин, а затем на мелкие гранулы, которые не содержат пре-рРНК, но содержат фибрилларин. Результаты устраняют указанное выше противоречие и демонстрируют сходный алгоритм функционирования ЯОР в ооцитах у половозрелых и неполовозрелых самок птиц.

Ключевые слова: курица, ооциты, диплотена, гены рРНК, ядрышковый организатор (ЯОР), ядрышко

DOI: 10.31857/S0475145023010032, EDN: FQIQKI

ВВЕДЕНИЕ

Оогенез — это особый тип дифференцировки клетки, направленный на формирование зрелой яйцеклетки, которая во время длительного созревания накапливает материнский запас органелл, макромолекул и энергоемких соединений, необходимых для осуществления ранних этапов эмбриогенеза (Дондуа, 2018). В материнские запасы зрелого яйца входит огромное количество рибосом — компонентов белок-синтезирующего аппарата клетки. Важный структурный и функциональный элемент рибосом — это четыре молекулы рибосомных РНК (рРНК), три из которых (18S, 5.8S и 28S рРНК) закодированы в геноме в повторяющихся последовательностях рДНК, формирующих ядрышкообразующий район хромосомы, или ядрышковый организатор (ЯОР). Активация ЯОР приводит к формированию ядрышка.

В кариотипе домашней курицы *Gallus gallus domesticus* единственный ЯОР расположен на микрочромосоме GGA16 (Auer et al., 1987; Miller et al., 1996). В отличие от ближайших родственников — крокодилов и черепах (Davidian et al., 2021), в оогенезе птиц рибосомные гены не амплифицируются, хотя, как и у большинства позвоночных, все хромосомы кариотипа проходят типичную стадию ламповых щеток (ЛЩ) в диплотене профазы мейоза I в период роста ооцита. После того, как метод выделения ЛЩ из ооцитов амфибий (Gall, 1954, 1956; Callan, 1986) был адаптирован для выделения ЛЩ из ооцитов птиц (Ahmad, 1970; Кропотова, Гагинская, 1984; Hutchison, 1987; Solovei et al., 1992, 1993; 1994; Saifitdinova et al., 2017), подавляющее большинство исследований функциональной активности хромосом в растущих ооцитах курицы проводят на ЛЩ, выделен-

ных вручную из ооцитов диаметром от 200 мкм (стадия развитых ЛЩ) до 1.5–2.0 мм. Solinhac et al. (2010) показали, что на стадии ЛЩ в ооцитах курицы ЯОР инактивирован. Это наблюдение согласуется с более ранними результатами гистохимических исследований ооцитов птиц (Гагинская, Грузова, 1969; Гагинская, 1972а, 1972б) и данными, полученными с использованием метода гибридизации *in situ* на парафиновых срезах (Гагинская, Грузова, 1975). Одновременно существовали данные о том, что рРНК поступают в ооцит из фолликулярных клеток в специализированных органеллах – трансосомах (Press, 1964; Bellairs, 1965; Schjeide et al., 1970; Callebaut, 1973). В результате сложилась концепция, которая сводится к тому, что в яичниках взрослых птиц ЯОР в ооцитах инактивирован на всех стадиях оогенеза. Считается, что отсутствие синтеза рРНК в самих ооцитах компенсируют фолликулярные клетки соматического происхождения, которые выполняют функцию трофоцитов, по крайней мере, в снабжении ооцита рРНК (обзоры: Гагинская, 1975; Gaginskaya et al., 2009; Koshel et al., 2016; Красикова, Куликова, 2019). В последние полвека эта концепция поддерживается исследованиями изолированных из ооцитов зародышевых пузырьков (ядро растущего ооцита – ЗП) и ЛЩ (Кропотова, Гагинская, 1984; Hutchison, 1987; Solovei et al., 1992, 1994; Saifitdinova et al., 2003, 2017; Gaginskaya et al., 2009; Krasikova et al., 2012; Красикова, Куликова, 2019).

В известном противоречии с приведенной концепцией находились данные, полученные при исследовании ядер ооцитов в яичниках неполовозрелых самок *G. g. domesticus* (Brambell, 1926; Greenfield, 1966; Callebaut, 1968; Wylie, 1972; Гагинская, Чинь, 1980; Krasikova et al., 2012). Перечисленные авторы определенно описывали ядрышки в ооцитах как ранней диплотенной стадии (до преобразования хромосом в ЛЩ), так и на первых этапах стадии ЛЩ. На стадии ЛЩ ядрышко фрагментируется и полностью исчезает. Но существующие данные о ядрышках в ооцитах цыплят сами по себе были тоже противоречивы. Так, Калэбо (Callebaut, 1968) ссылаясь на свои отрицательные результаты включения НЗ-тимидина, тогда как Вайли (Wylie, 1972) выявил синтез ДНК в ядрышке и пришел к заключению об амплификации рДНК невысокого уровня в оогенезе курицы. По данным количественного анализа ооцитов на парафиновых срезах ювенильных яичников, только половина ооцитов ранней диплотены обнаруживала одно или два истинных ядрышка, на основании чего была сформулирована гипотеза о существовании в ювенильном яичнике двух морфо-функциональных форм ооцитов ранней диплотенной стадии, которые различаются между собой наличием или отсутствием ядрышка в ядре (Чинь и др., 1979; Гагинская, Чинь, 1980). Согласно этой гипотезе ооциты без ядрышка сохраняются в состо-

янии покоя до наступления половой зрелости самки и составляют тот резерв, за счет которого во взрослом яичнике периодически развиваются зрелые яйцеклетки, ЯОР в них никогда не активируется (обзоры: Гагинская, 1975; Koshel et al., 2016). Судьба содержащих ядрышко ооцитов в яичнике цыпленка вызвала вопросы. Очевидное противоречие между данными о функционировании ЯОР в ооцитах у половозрелых и неполовозрелых самок требовало исследования проблемы с использованием новых подходов (Koshel et al., 2016).

Здесь мы публикуем новые данные о функциональном состоянии ЯОР в ооцитах у половозрелых самок и цыплят *G. g. domesticus*, полученные с использованием флуоресцентной иммуногистохимии для выявления специфичных белков ядрышка и флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) для выявления пре-рРНК транскриптов, а также 3D-реконструкции целого яичника цыпленка в программе Amira-6. Мы обнаружили полное сходство цитологической картины функционирования ЯОР на одних и тех же стадиях оогенеза у цыпленка и взрослой курицы, что снимает трудно объяснимые противоречия в существующих до сих пор представлениях (обзор: Koshel et al., 2016).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объекты исследования

В качестве объекта исследования мы выбрали домашнюю курицу (*Gallus gallus domesticus*) породы русская белая. Всего было взято в анализ пять особей цыплят в возрасте десяти дней после вылупления и пять половозрелых особей кур. Животных получали в Центре коллективного пользования “Генетическая коллекция редких и исчезающих пород кур” Всероссийского научно-исследовательского института генетики и разведения с/х животных (г. Пушкин, Ленинградская обл.). Умерщвление животных проводили в соответствии с этическими требованиями государственного и международного уровня (National Research Council, 2011), что подтверждено заключением Этической комиссии СПбГУ № 131-03-3 от 01.06.2017.

Парафиновые срезы яичников

Яичники ювенильных цыплят фиксировали смесью метилового спирта и уксусной кислоты (3 : 1), проводили через раствор целлоидина с касторовым маслом (1 : 1) и заливали в парафин. Серийные срезы толщиной 10 мкм получали на санном Leica SM-2010R (Leica, Германия) или ротационном микротоме Leica RM-2235 с Cool-Clamp (Leica, Германия). Срезы яичника окрашивали гематоксилин–эозином или метиловым зеленым–пиронином (Ромейс, 1954). Мы не обнаружили принципиальной разницы между этими способами окраски для выявления ядрышка.

Замороженные срезы яичников

Фрагменты яичников *G. g. domesticus* фиксировали в растворе 4% параформальдегида в PBS в течение ночи. После фиксации ткань промывали PBS и пропитывали 30% сахарозой в течение ночи при 4°C. Фрагменты яичников помещали в формочки из фольги со специальной средой Surgipath® FSC 22® Frozen Section Embedding Medium (Leica Biosystems, США), замораживали в парах жидкого азота и хранили при -80°C. Криосрезы толщиной 10 или 20 мкм, сделанные с помощью криотома Leica CM1850UV (Leica Biosystems, США), помещали на предметные стекла Superfrost Plus (Thermo Fisher Scientific, Германия). Перед использованием криосрезы сушили минимум 2 ч при комнатной температуре.

Иммунофлуоресцентное окрашивание

Иммунофлуоресцентное окрашивание применяли к криосрезам яичников. Предобработку препаратов и процедуру непрямого иммуноокрашивания проводили, как описано в работе Давидьян и др. (Davidian et al., 2017). В работе использованы следующие первичные антитела: против фибрилларина (ab4566, Abcam, Великобритания, разведение 1 : 500), против нуклеолина (ab22758, Abcam, Великобритания, разведение 1 : 1000), и поликлональная сыворотка R288 против р80 коилина (Andrade et al., 1991, разведение 1 : 2000). Криосрезы яичников инкубировали с первичными антителами в течение ночи при 4°C и с соответствующими вторичными антителами в течение 1 часа при 37°C. Все антитела разводили в PBS с 5% лошадиной сывороткой Gibco® (Thermo Fisher Scientific, США). Препараты контрастировали 1 мкг/мл DAPI в растворе PBS с глицерином и фотопротектором DABCO.

FISH на криосрезях

Для выявления активных ядрышек в ооцитах кур был применен метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) в соответствии с протоколом РНК-FISH. Целью была детекция транскриптов спейсерных районов кластеров рибосомных генов в рДНК ЯОР, что позволяет маркировать синтезированные последовательности пре-рРНК в составе ядрышек. Гибридизационный зонд, комплементарный фрагменту 134 п.н. внутреннего спейсера ITS1 рибосомных генов курицы, был разработан на базе ранее расшифрованной последовательности кластера генов рРНК этого вида (Duomin et al., 2016). Синтез зонда осуществляли методом ПЦР с предварительно подобранными праймерами F-5'CAGCCTTCCCTTCCCTTCC, R-5'CCCTCGTCTCCCTTCTCTCT (ООО "Билль", Россия) в амплификаторе MJ Mini (BioRad, США), в качестве матрицы использовали геном-

ную ДНК домашней курицы породы русская белая. ПЦР-продукт метили дигоксигенином.

РНК-FISH проводили на свежих криосрезях яичников. Предобработка срезов включала в себя: пермеабиллизацию мембран клеток 0.1% раствором Тритона X100 в течение 20 мин при комнатной температуре, отмывку детергента в PBS, обработку раствором протеиназы К (4 мкг/мл) в течение 15 мин при 4°C. Для ингибирования фермента препараты фиксировали 2% PFA в течение 5 мин при комнатной температуре и затем промывали в PBS. После дегидратации препаратов в растворах этанола (50%–70%–96%) наносили предварительно денатурированную гибридизационную смесь (состав гибридизационной смеси в 2× SSC: 50 нг/мкл зонда, 50% формамида, 10% DSS, 0.5 мкг/мкл тРНК) и инкубировали в течение ночи при 37°C. Несвязавшийся зонд отмывали в 0.2× SSC при 60°C, затем в 2× SSC при 60°C и в 4× SSC с 0.1% Tween-20 при комнатной температуре. Для уменьшения неспецифического связывания антител препараты инкубировали в 5% растворе лошадиной сыворотки Gibco® (Thermo Fisher Scientific, США) в 4× SSC буфере с 0.1% Tween-20 в течение 1 ч при 37°C. Для детекции зонда, меченного дигоксигенином, использовали антитела, конъюгированные с Cy3 (Jackson ImmunoResearch, США), в разведении 1 : 400 в течение 1 часа при 37°C с последующими отмывками в 4× SSC буфере с 0.1% Tween-20 и 2× SSC. Препараты контрастировали DAPI, растворенном в 2× SSC, с добавленными глицерином и DABCO.

3D-анализ яичника цыпленка

Для оценки соотношения в яичнике ооцитов, содержащих и не содержащих ядрышки, был применен метод 3D-анализа биологических объектов с помощью программного обеспечения Amiga-6 (FEI Company, США). 3D-реконструкцию осуществляли на основе фотографий серии парафиновых срезов (в количестве 130 штук) яичника цыпленка десятидневного возраста. Микрофотографии получали с использованием эпифлуоресцентного микроскопа Carl Zeiss Axio Imager M1 (ZEISS, Германия), оборудованного моторизованной станиной и цифровой камерой AxioCam MRc5. Панорамные изображения срезов при увеличении объектива ×10 получали с использованием программного модуля MozaiX, а изображения по глубине среза – при помощи модуля "Z-stack". Панорамные фотографии собирали в стек в программе Amiga-6, где осуществляли прорисовку контура яичника. С целью более детального анализа структур ядра проводили Z-сканирование каждого ооцита с использованием объектива ×63, учитывая ядра, только полностью попадающие на 10 мкм срез. Проанализировано 284 ооцита ранней диплотенной стадии из кортекса передней и задней

части яичника, отдельно просчитаны ооциты, содержащие и не содержащие ядрышко. Достоверность результата оценивали по схеме эксперимента Бернулли с использованием функции языка R (*binom.test* и *prop.test*).

Микроскопия и работа с изображениями

Препараты исследовали с помощью эпифлуоресцентных микроскопов Carl Zeiss Axio Imager M1 (ZEISS, Германия), DMRXA и DM4000B (Leica Microsystems, Германия) с соответствующими программными обеспечениями. Окончательное оформление всех рисунков проводили с использованием программного обеспечения Adobe Photoshop.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проверка гипотезы о дифференциальной экспрессии генов рРНК в ооцитах внутри одного яичника у неполовозрелых особей при полной их инактивации в ооцитах половозрелых кур была выполнена с применением методов иммуноокрашивания, FISH, компьютерного 3D-анализа парафиновых срезов целых яичников и эпифлуоресцентной микроскопии. Мы исследовали содержимое ядер в ооцитах десятидневных цыплят и взрослых кур на последовательных стадиях роста ооцитов, включающих стадию ранней диплотены (диаметр ооцита 16–60 мкм), переходную стадию к ЛЩ (диаметр ооцита 60–120 мкм), а также стадию ЛЩ (диаметр ооцита 120–1500 мкм).

Функционирование ЯОР в ооцитах цыпленка

Мы описываем яичник недавно вылупившегося цыпленка на основе 3D-реконструкции в программе Amiga-6 и молекулярно-цитологического анализа присутствия рРНК в ранних диплотенных ооцитах (рис. 1). Проведен анализ мейоцитов в разных зонах яичника десятидневного цыпленка (рис. 1а, 1б). Результаты согласуются с ранее опубликованными данными (Hughes, 1963; Чинь и др., 1979; Guraya, 1989; Bernardo et al., 2015; Davidian et al., 2017) о том, что в ядрах ооцитов на зиготенной и пахитенной стадиях ядрышко отсутствует (рис. 1в), одно или два ядрышка можно наблюдать в ооцитах ранней диплотенной стадии профазы мейоза I (рис. 1г). В последних мы выявляли ядрышко на парафиновых срезах, окрашенных неспецифическими красителями (рис. 1г'), на криосрезах с помощью РНК-FISH с зондом ITS1 для выявления пре-рРНК (рис. 1г''), а также с помощью иммуногистохимии с антителами против фибрилларина и нуклеолина (рис. 1г'''). 3D-реконструкция яичника по серийным срезам (рис. 1д) демонстрирует передне-задний и спин-

но-брюшной градиенты созревания ооцитов в яичнике цыпленка.

Для оценки доли ооцитов, содержащих ядрышко, мы исследовали полноразмерные ядра в 284-х ооцитах стадии ранней диплотены из разных участков яичника на парафиновых срезах, окрашенных гематоксилин-эозином или метиловым зеленым-пиронином. По нашим данным, $85.5 \pm 4.2\%$ диплотенных ооцитов содержали в ядре одно, реже два, ядрышка. Мы предполагаем, что остальные ооциты без ядрышка ($14.5 \pm 4.2\%$) находятся в самом начале диплотены, рибосомные гены в них активируются, но полноценное ядрышко еще не успело сформироваться. Мы не исключаем, что начальные этапы формирования ядрышка были незаметны на морфологических препаратах и могли остаться неучтенными.

Наши результаты существенно отличаются от ранее опубликованных Чинем и соавторами (Чинь и др., 1979; Гагинская, Чинь, 1980), согласно которым у цыпленка ядрышко обнаруживали только в 50% ооцитов ранней диплотенной стадии. Расхождения результатов (86% vs 50%) мы объясняем разницей в методике анализа. Указанные авторы анализировали гистологические срезы толщиной 2–4 мкм. В то же время в ранних диплотенных ооцитах ядра имеют диаметр порядка 10 мкм при ядрышке около 2 мкм, что могло сказаться на ошибке подсчетов. Мы изготавливали гистологические срезы толщиной 10 мкм и использовали автоматизированный микроскоп с программным модулем “Z-stack”, позволяющим выбирать для анализа только целые ядра по глубине среза (рис. 1в, 1г). Таким образом проведенный нами анализ ставит под сомнение сложившееся ранее представление об активации ЯОР только в 50% ооцитов яичника цыпленка (обзор: Koshel et al., 2016).

Функционирование ЯОР в ооцитах половозрелой курицы

В яичнике взрослой птицы все ооциты находятся на диплотенной стадии профазы мейоза I (Brambell, 1926; Gilbert, 1966; Guraya, 1989). В процессе роста они последовательно переходят от ранней диплотены через стадию транскрипционно активных ламповых щеток, соответствующую периоду цитоплазматического роста ооцита, к стадии конденсации и инактивации хромосом в период вителлогенеза (Кольцов, 1938; Гагинская, 1972а, 1972б; Guraya, 1989; Callebaut et al., 1997). Достоверные описания ядрышек в ооцитах половозрелых птиц нам неизвестны. Например, описанные Луайе (Loyez, 1906) ядрышки в ооцитах зяблика на поверку оказались центромерными белковыми телами (Гагинская, Грузова, 1969, 1975; Гагинская, 1972б, 1975; Saifitdinova et al., 2003; Krasikova et al., 2004), а определенные Т. Горбик (Горбик,

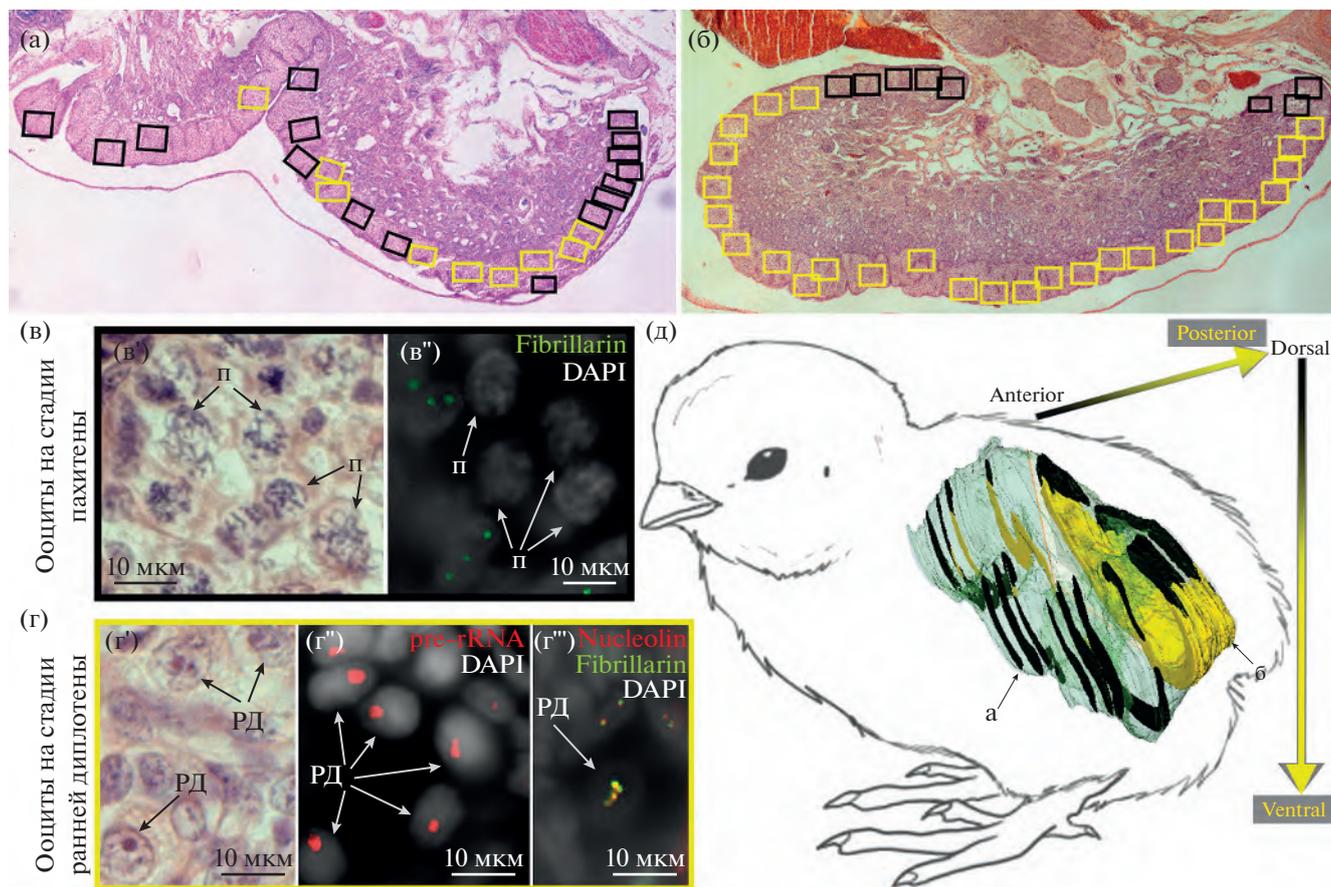


Рис. 1. Распределение ооцитов зиготенной/пахитенной и ранней диплотенной стадий мейоза в яичнике десятидневного цыпленка по данным анализа серийных срезов и 3D-реконструкции в программе Amira-6. (а, б) Фрагменты поперечных срезов передней (а) и задней (б) частей яичника: прямоугольники очерчивают зоны подсчета мейоцитов в кортексе, черные – преобладание ооцитов на зиготенной/пахитенной стадии, желтые – преобладание ооцитов на ранней диплотенной стадии, увеличение объектива $\times 10$. (в) Участок кортекса из передней части яичника, преобладание ооцитов на пахитенной (П) стадии мейоза I, увеличение объектива $\times 63$: (в') парафиновый срез, окраска гематоксилин-эозин, (в'') криосрез, иммунофлуоресценция антител против фибрилларина (зеленый), DAPI (серый). (г) Участок кортекса из задней части яичника, преобладание ооцитов на ранней диплотенной (РД) стадии мейоза I, увеличение объектива $\times 63$: (г') парафиновый срез, окраска гематоксилин-эозин, (г'') криосрез, РНК-FISH с зондом ITS1 (красный), DAPI (серый), (г''') криосрез, иммунофлуоресценция антител против фибрилларина (зеленый), нуклеолина (красный), DAPI (серый). (д) 3D-реконструкция целого яичника, передне-задний и спинно-брюшной градиенты созревания мейоцитов в кортексе: светло-зеленый цвет – весь яичник в полупрозрачном режиме, черный цвет – зоны кортекса с преобладанием ооцитов на стадиях зиготены/пахитены, желтый цвет – зоны кортекса с преобладанием ооцитов на стадии ранней диплотены; черные стрелки – срезы, представленные на (а) и (б).

1977) клетки с ядрышками в яичнике скворца как ранние диплотенные ооциты, судя по всему, были клетками нервного ганглия. В целом, в литературе утвердилось представление о том, что у взрослых птиц ЯОР полностью инактивирован в ооцитах всех размеров и стадий (Гагинская, Грузова, 1969, 1975; Гагинская, 1972а, 1972б; Кропотова, Гагинская, 1984; Hutchison, 1987; Guraya, 1989; Saifitdinova et al., 2003; Solinhac et al., 2010; Khodyuchenko et al., 2012; Krasikova et al., 2012; обзоры: Гагинская, 1975; Gaginskaya et al., 2009; Koshel et al., 2016; Боголюбов, 2019; Красикова, Куликова, 2019). В настоящей работе мы впервые показываем, что, как и в яичнике цыпленка, в яичнике взрослой курицы ооциты в ранней ди-

плотене (~ 50 мкм) и в переходной стадии к ЛЩ (~ 60 – 120 мкм) содержат в ядре одно или два функционирующих ядрышка (рис. 2, 3). С использованием соответствующих антител в этих ядрышках мы выявили РНК-полимеразу I (рис. 2а') и фибрилларин (рис. 2а'', 2б''), в опытах по РНК-FISH с зондом ITS1 в них обнаружены также непротранскрибированные рРНК (рис. 2б'), что свидетельствует о транскрипционной активности генов рРНК в этот период развития ооцита.

По нашим наблюдениям, ЯОР у взрослых кур инактивируется в ооцитах уже на ранней-средней стадии ЛЩ, когда вместо ядрышка в ЗП можно видеть немногочисленные его фрагменты, содержащие фибрилларин и молекулы пре-

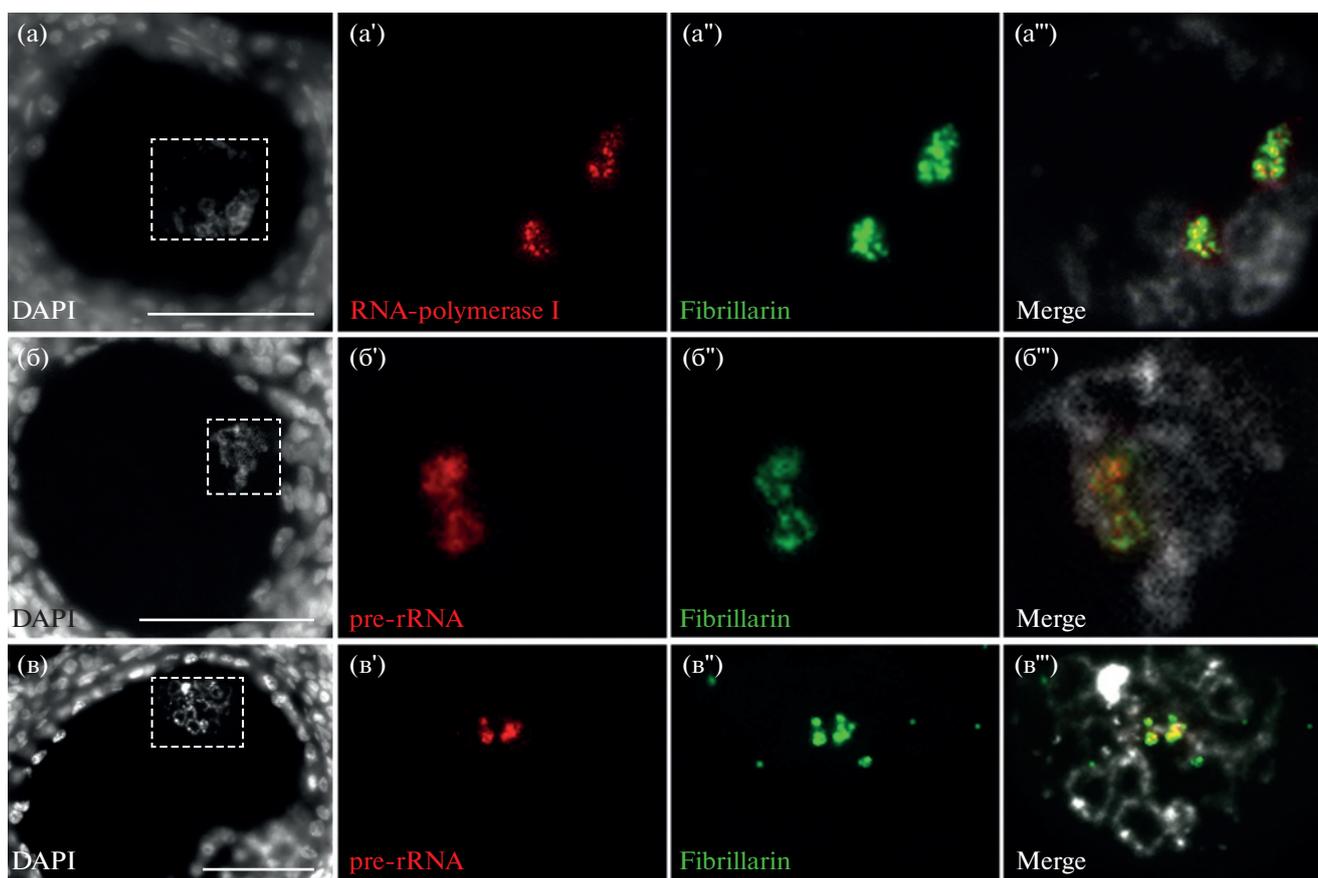


Рис. 2. Ядрышко в ооцитах на стадии, переходной к ЛЩ, (а–б) и начало распада ядрышка на стадии ЛЩ (в) в яичнике половозрелой курицы. (а–а''') Двойное иммуноокрашивание с помощью антител к РНК-полимеразе I (а') и фибрилларину (а''). (б–б''') и (в–в''') РНК-FISH с зондом ITS1 (б', в') с последующим окрашиванием антителами к фибрилларину (б'', в''). На картинах совмещения (Merge) добавлен канал DAPI (серый). Криосрезы, эпифлуоресцентная микроскопия. Масштабные линии – 50 микрометров.

рРНК, а также множество мелких гранул, в которых мы выявляли только фибрилларин (рис. 2в'''). Наблюдаемая картина идентична описываемой нами в ооцитах соответствующих стадий у неполовозрелых самок (см. также Davidian et al., 2017). В более крупных ооцитах с хорошо развитыми ЛЩ, а также на последующих стадиях инактивации хромосом в период вителлогенеза ядрышки или фрагменты ядрышек в ЗП не выявляются с использованием методов морфологического анализа, иммуногистохимии или РНК-FISH. Деградация ядрышка, обусловленная инактивацией генов рРНК, происходит в ооците во время периода его цитоплазматического роста и функционирования ЛЩ, предшествующего периоду накопления экзогенного желтка. Точно сопоставить время инактивации рибосомных генов с размерами ооцита затруднительно, поскольку соответствие конкретной стадии роста ооцита его размерам может варьировать от клетки к клетке и от организма к организму (Гагинская, Чинь, 1980; Davidian et al., 2017).

В работе Красиковой с соавторами (Krasikova et al., 2012) выявляли ядрышко и отдельные коилин-содержащие тельца в ооцитах ювенильных самок домашней курицы и перепела, но ни тех, ни других телец не наблюдали в ооцитах половозрелых самок тех же видов. В ЗП ооцитов из яичников взрослых кур мы впервые наблюдали коилин, ассоциированный с ядрышками. На переходной к ЛЩ стадии коилин выявляли как внутри ядрышка, так и в виде скоплений снаружи ядрышка в непосредственном с ним контакте (на рис. 3а''–3а''' наконечник стрелки). В ядрах ооцитов, содержащих развитые ЛЩ и деградирующее ядрышко, коилин был ко-локализован с фибрилларинном во всех фрагментах распадающегося ядрышка (рис. 3б–3б'''). Известно, что локализация коилина около ядрышка в основном бывает вызвана клеточным ответом на стресс, приводящим к выключению транскрипции генов рРНК в соматических клетках (Gilder et al., 2011; Broom, Hebert, 2013; Hebert, 2013; Trinkle-Mulcahy, Sleeman, 2017). Мы допускаем, что коилин может играть

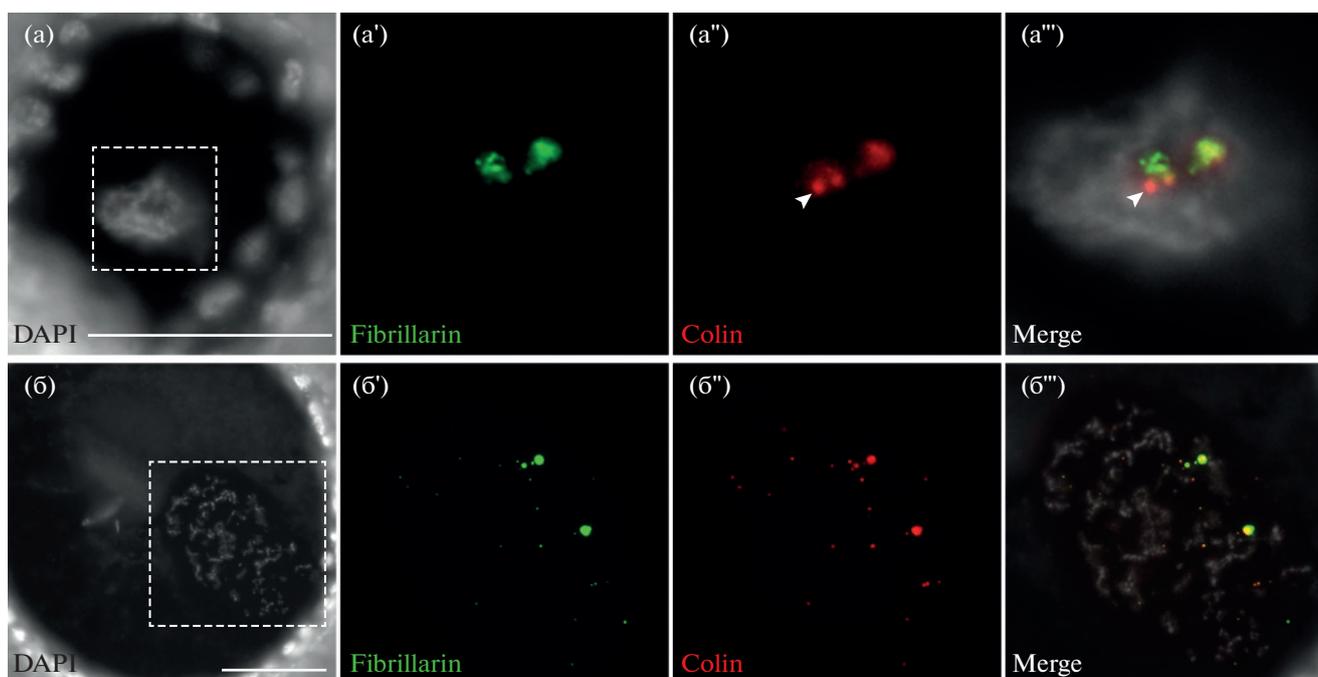


Рис. 3. Локализация фибрилларина (зеленая флуоресценция) и коилина р80 (красная флуоресценция) в ооцитах половозрелой курицы. (а–а''') Ооцит на стадии, переходной к стадии ЛЩ; хромосомы слабо деспирализованы, ярко окрашены DAPI (серый). (а'–а''') Два близко лежащих ядрышка, коилин внутри ядрышка и в виде скоплений снаружи ядрышка (наконечник стрелки). (б–б''') Ооцит на стадии ЛЩ; хромосомы сильно деспирализованы, слабо окрашены DAPI, фрагменты ядрышка содержат коилин. На картинах совмещения (Merge) добавлен канал DAPI. Криосрезы, эпифлуоресцентная микроскопия. Масштабные линии – 50 микрометров.

роль в инактивации ЯОР во время роста ооцита, то есть не в ответ на стресс, а в естественных условиях развития яйцеклетки. Сходство естественных процессов в ядре растущего ооцита с результатами опытов на культуре клеток, подвергшихся стрессу, заслуживает дополнительного изучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В свете полученных в настоящей работе данных мы считаем необходимым пересмотреть существующие представления о функционировании ЯОР в ооцитах домашней курицы *G. g. domesticus* и, по-видимому, вообще представителей класса Aves. Ядрышко присутствует во всех ооцитах на стадии ранней диплотены и сохраняется функционально активным вплоть до стадии ЛЩ, после чего оно деградирует и полностью исчезает задолго до начала вителлогенеза в ооците. По всей видимости, функциональная роль ядрышка в оогенезе птиц определяется потребностями ооцита в период цитоплазматического роста. В период вителлогенеза ядрышко в растущем ооците никогда не выявлялось. Существуют свидетельства того, что инактивация генов рРНК в ядре ооцита у птиц компенсируется активностью клеток фолликулярного эпителия (Press, 1964; Schjeide et al., 1970; Callebaut, 1973). Важно подчеркнуть, что согласно совре-

менным работам по анализу функциональной морфологии ядерных структур в оогенезе птиц, феномен амплификации рибосомных генов для оогенеза птиц не характерен (Gaginskaya et al., 2009; Koshel et al., 2016; Красикова, Куликова, 2019). Таким образом, между диплотенными ооцитами в яичниках неполовозрелых и взрослых самок нет различий по функциональному состоянию ЯОР на одинаковых стадиях оогенеза.

БЛАГОДАРНОСТИ

Настоящее исследование посвящается 100-летию создания профессором П.П. Ивановым кабинета эмбриологии – предшественника кафедры эмбриологии Санкт-Петербургского государственного университета. Авторы благодарны Александру Демину и ООО “Бигль” за разработку и синтез праймеров. В работе использовано оборудование Научного парка СПбГУ (ЦКП “Хромас”).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование поддержано грантом Российского научного фонда № 22-24-00538.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Манипуляции с животными проводили в соответствии с этическими требованиями государственного и международного уровня, изложенными в Руководстве по уходу и использованию лабораторных животных (National Research Council, 2011), что подтверждено заключением Этической комиссии СПбГУ № 131-03-3 от 01.06.2017.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Определение задачи – ЕРГ; выполнение экспериментов – АГД, ЕИК, САГ, АФС; написание текста статьи – АГД, ЕРГ; редактирование текста статьи – ЕРГ, АГД, САГ; подготовка иллюстраций – АГД. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Боголюбов Д.С. Безмембранные органеллы эукариотической клетки: основные понятия и принципы формирования // Цитология. 2019. Т. 61. № 9. С. 683–703.

Гагинская Е.Р. Ядерные структуры в ооцитах половозрелых птиц. I. Поведение хромосом в период цитоплазматического роста ооцита // Цитология. 1972а. Т. 14. № 4. С. 426–432.

Гагинская Е.Р. Ядерные структуры в ооцитах половозрелых птиц. II. Белковые тела и кариосфера // Цитология. 1972б. Т. 14. № 5. С. 568–577.

Гагинская Е.Р. О классификации типов оогенеза // Онтогенез. 1975. Т. 6. № 6. С. 539–545.

Гагинская Е.Р., Грузова М.Н. Особенности оогенеза зяблика // Цитология. 1969. Т. 9. № 10. С. 1241–1251.

Гагинская Е.Р., Грузова М.Н. Выявление амплифицированной рДНК в клетках яичников некоторых насекомых и птиц методом гибридизации нуклеиновых кислот на препаратах // Цитология. 1975. Т. 17. № 10. С. 1132–1137.

Гагинская Е.Р., Чинь С.Х. Особенности оогенеза цыпленка. II. Фолликулярный период в развитии ооцитов // Онтогенез. 1980. Т. 11. С. 213–221.

Горбик Т.А. О морфодинамике яйцевых фолликулов в оогенезе некоторых диких птиц // Вестник Ленинградского университета. 1977. № 3. С. 7–13.

Дондуа А. К. Биология развития. СПб: Изд-во С.-Петербург. ун-та, 2018. 812 с.

Кольцов Н.К. Структура хромосом и обмен веществ в них // Биологический журнал. 1938. Т. 7. № 1. С. 3–46.

Красикова А.В., Куликова Т.В. Хромосомы типа ламповых щеток: современные представления и перспективы исследований // СПб.: Изд-во С.-Петербург. ун-та, 2019. 104 с.

Кропотова Е.В., Гагинская Е.Р. Хромосомы типа ламповых щеток из ооцитов японского перепела. Данные световой и электронной микроскопии // Цитология. 1984. Т. 26. С. 1006–1015.

Ромейс Б. Микроскопическая техника. Москва: Изд-во иностранной литературы, 1954. 718 с.

Чинь С.Х., Гагинская Е.Р., Калинина Е.И. Особенности оогенеза цыпленка. I. Экстрафолликулярный период в развитии ооцитов // Онтогенез. 1979. Т. 10. № 4. С. 340–349.

Ahmad M.S. Development, structure and composition of lampbrush chromosomes in domestic fowl // Can. J. Genet. Cytol. 1970. V. 12. № 4. P. 728–737.

Andrade L.E., Chan E.K., Raska I. et al. Human autoantibody to a novel protein of the nuclear coiled body: Immunological characterization and cDNA cloning of p80-coilin // J. Exp. Med. 1991. V. 173. P. 1407–1419.

Auer H., Mayr B., Lambrou M. et al. An extended chicken karyotype, including the NOR chromosome // Cytogenetics and Cell Genetics. 1987. V. 45. P. 218–221.

Bellaïrs R. The relationship between oocyte and follicle in the hen's ovary as shown by electron microscope // J. Embryol. Exp. Morphol. 1965. V. 13. P. 215–233.

Brambell F.W.R. The oogenesis of the fowl (*Gallus bankiva*) // Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. 1926. V. 214. P. 113–151.

Broome H.J., Hebert M.D. Coilin displays differential affinity for specific RNAs *in vivo* and is linked to telomerase RNA biogenesis // J. Mol. Biol. 2013. V. 425. № 4. P. 713–724.

Callan H.G. Lampbrush Chromosomes. Heidelberg: Springer, 1986. 254 p.

Callebaut M. [H3] Uridine incorporation during previtellogenesis and early vitellogenesis in the oocytes of the chick (*Gallus gallus*) // J. Embryol. Exp. Morphol. 1968. V. 20. P. 169–174.

Callebaut M. Correlation between germinal vesicle and oocyte development in the adult Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). A cytochemical and autoradiographic study // Development. 1973. V. 29. P. 145–157.

Callebaut M., Van Nassauw L., Harrison F. Comparison between oogenesis and related ovarian structures in a reptile, *Pseudemys scripta elegans* (turtle) and in a bird *Coturnix coturnix japonica* (quail) // Reprod. Nutr. Dev. 1997. V. 37. № 3. P. 233–252.

Davidian A.G., Koshel E.I., Lavrova O.B. et al. Functional features of the nucleolar organizer in developing oocytes of juvenile birds // Russ. J. Dev. Biol. 2017. V. 48. № 3. P. 224–230.

Davidian A., Koshel E., Dyomin A. et al. On some structural and evolutionary aspects of rDNA amplification in oogenesis of *Trachemys scripta* turtles // Cell Tissue Res. 2021. V. 383. № 2. P. 853–864.

Dyomin A.G., Koshel E.I., Kiselev A.M. et al. Chicken rRNA gene cluster structure // PLoS One. 2016. V. 11. e0157464.

Gaginskaya E., Kulikova T., Krasikova A. Avian lampbrush chromosomes: a powerful tool for exploration of genome expression // Cytogenet. Genome Res. 2009. V. 124. № 3–4. P. 251–267.

Gall J.G. Lampbrush chromosomes from oocyte nuclei of the newt // J. Morphol. 1954. V. 94. P. 283–352.

Gall J.G. On the submicroscopic structure of chromosomes // Brookhctven Syrup. Biol. 1956. № 8. P. 17–36.

Gilbert S.F. Formation of the egg in the domestic chicken // Adv. Reprod. Physiol. 1966. V. 2. P. 111–180.

Gilder A.S., Do P.M., Carrero Z.I. et al. Coilin participates in the suppression of RNA polymerase I in response to cisplatin-induced DNA damage // Mol. Biol. Cell. 2011. V. 22. № 7. P. 1070–1079.

- Greenfield M.L.* The oocyte of the domestic chicken shortly after hatching, studied by electron microscopy // *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1966. V. 15. P. 297–316.
- Guraya S.S.* Ovarian Follicles in Reptiles and Birds. Berlin: Springer-Verlag, 1989. 285 p.
- Hebert M.D.* Signals controlling Cajal body assembly and function // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2013. V. 45. № 7. P. 1314–1317.
- Hughes G.C.* The population of germ cells in the developing female chick // *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1963. V. 11. P. 513–536.
- Hutchison N.* Lampbrush chromosomes of the chicken, *Gallus domesticus* // *J. Cell Biol.* 1987. V. 105. № 4. P. 1493–1500.
- Khodyuchenko T., Gaginskaya E., Krasikova A.* Non-canonical Cajal bodies form in the nucleus of late stage avian oocytes lacking functional nucleolus // *Histoschem. Cell Biol.* 2012. V. 138. P. 57–73.
- Koshel E., Galkina S., Saifitdinova A. et al.* Ribosomal RNA gene functioning in avian oogenesis // *Cell Tissue Res.* 2016. V. 366. P. 533–542.
- Krasikova A., Kulikova T., Saifitdinova A. et al.* Centromeric protein bodies on avian lampbrush chromosomes contain a protein detectable with antibody against DNA topoisomerase II // *Chromosoma.* 2004. V. 113. P. 316–323.
- Krasikova A., Kulikova T., Saifitdinova A. et al.* Three-dimensional organisation of RNA-processing machinery in avian growing oocyte nucleus // *Chromosome Res.* 2012. V. 20. № 8. P. 979–994.
- Loyez M.* Recherches sur le developpement ovarien des oeufs meroblastiques a vitellus nutritive abondant // *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exper.* 1906. V. 8. P. 69–397.
- Miller M.M., Goto R.M., Taylor R.L.J. et al.* Assignment of Rfp-Y to the chicken major histocompatibility complex/NOR microchromosome and evidence for high-frequency recombination associated with the nucleolar organizer region // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. V. 93. P. 3958–3962.
- National Research Council. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th ed. Washington, (DC): The National Academies Press, 2011. 220 p.
- Ochs R.L., Stein T.W., Tan E.M.* Coiled bodies in the nucleolus of breast cancer cells // *J. Cell Sci.* 1994. V. 107. P. 385–399.
- Press N.* An unusual organelle in avian ovaries // *J. Ultrastruct. Res.* 1964. V. 10. P. 528–546.
- Saifitdinova A., Derjushcheva S., Krasikova A. et al.* Lampbrush chromosomes of the chaffinch (*Fringilla coelebs* L.) // *Chromosome Res.* 2003. V. 11. P. 99–113.
- Saifitdinova A., Galkina S., Volodkina V. et al.* Preparation of lampbrush chromosomes dissected from avian and reptilian growing oocytes // *Bio. Comm.* 2017. V. 62. № 3. P. 165–168.
- Schjeide O.A., Galey F., Grellert E.A. et al.* Macromolecules in oocyte maturation // *Biol. Reprod.* 1970. V. 2. P. 14–43.
- Solinhaç R., Leroux S., Galkina S. et al.* Integrative mapping analysis of chicken microchromosome 16 organization // *BMC Genomics.* 2010. V. 11. P. 616.
- Solovei I., Gaginskaya E., Allen T. et al.* A novel structure associated with a lampbrush chromosome in the chicken *Gallus domesticus* // *J. Cell Sci.* 1992. V. 101. P. 759–772.
- Solovei I., Gaginskaya E., Hutchison N. et al.* Avian sex chromosomes in the lampbrush form: the ZW lampbrush bivalent from six species of bird // *Chromosome Res.* 1993. V. 1. P. 153–166.
- Solovei I., Gaginskaya E.R., Macgregor H.C.* The arrangement and transcription of telomere DNA sequences at the ends of lampbrush chromosomes of birds // *Chromosome Res.* 1994. V. 2. № 6. P. 460–470.
- Trinkle-Mulcahy L., Sleeman J.E.* The Cajal body and the nucleolus: “In a relationship” or “It’s complicated”? // *RNA Biol.* 2017. V. 14. № 6. P. 739–751.
- Wylie C.C.* Nuclear morphology and nucleolar DNA synthesis during meiotic prophase in oocytes of the chick (*Gallus domesticus*) // *Cell Differ.* 1972. V. 1. № 5. P. 325–334.

Nucleolus Organizer Region Functioning in Chicken Growing Oocytes: A Revision of the Existing Views

A. G. Davidian^{1,*}, E. I. Koshel², S. A. Galkina¹, A. F. Saifitdinova³, and E. R. Gaginskaya¹

¹*St Petersburg University, St. Petersburg, 199034 Russia*

²*ITMO University, St. Petersburg, 197101 Russia*

³*Herzen State Pedagogical University of Russia, St. Petersburg, 191186 Russia*

*e-mail: a.davidian@spbu.ru

It is believed that the nucleolus organizer region (NOR) in the ovary of adult birds is inactivated at all stages of oocyte growth. However, in the ovary of juvenile chicken (*Gallus g. domesticus*) one or two nucleoli were observed in 50% of early diplotene oocytes. These nucleoli were functioning up to the lampbrush stage. It was assumed that diplotene oocytes with inactivated NOR are stored as a pool for development in the ovary of adult hens. Such a contradiction in the NOR functional activity in the oocytes of juvenile and adult hens required special studies. Here we represent new results of a comparative study of the nucleoli in oocytes of juvenile and adult hens. We show for the first time that in the oocytes of laying hens the nucleolus appears at the early diplotene stage and the pre-rRNA synthesis continues up to the lampbrush stage. At the lampbrush stage, the NOR is getting inactivated. The nucleolus disintegrates into large fragments containing both pre-rRNA and fibrillarin. Then these larger fragments break down into small granules that do not contain pre-rRNA but contain fibrillarin. The results resolve the above contradiction and demonstrate a similar pattern of NOR functioning in oocytes of adult and juvenile birds.

Keywords: chicken, oocytes, diplotene, rRNA genes, nucleolus organizer region (NOR), nucleolus

ПОЛУЧЕНИЕ КАЧЕСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА РНК И ОЦЕНКА РЕФЕРЕНСНЫХ ГЕНОВ ДЛЯ ПОСТАНОВКИ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ПЦР ПРИ РАБОТЕ С ТКАНЯМИ СТВОЛА *Pinus sylvestris* L.¹

© 2023 г. Ю. Л. Мощенская^а, *, Н. А. Галибина^а, М. А. Корженевский^а,
Т. В. Тарелкина^а, К. М. Никерова^а, О. В. Чирва^а

^аИнститут леса — обособленное подразделение Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра
“Карельский научный центр Российской академии наук”, Петрозаводск, Россия

*e-mail: moshchenskaya@krc.karelia.ru

Поступила в редакцию 15.06.2022 г.

После доработки 17.10.2022 г.

Принята к публикации 18.10.2022 г.

Сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.) относится к видам древесных растений, для которых характерно наличие ядровой древесины (HW), формирующейся в ходе старения заболони (SW). Благодаря четкой границе между SW и HW *P. sylvestris* может служить модельным древесным растением для изучения закономерностей формирования HW. В настоящее время для изучения процессов формирования тканей ствола древесных растений активно применяются молекулярно-генетические методы. Особенностью тканей ствола хвойных древесных растений является содержание большого количества вторичных метаболитов, низкое содержание нуклеиновых кислот и возможная частичная деградация РНК. В данной работе рассматривается выбор наиболее успешного метода выделения высококачественного препарата РНК для проведения ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) в тканях ствола *P. sylvestris* по радиальному вектору “проводящая флоэма/камбиальная зона — дифференцирующаяся ксилема — внешняя часть SW (1–2 годичных кольца) — внутренняя часть SW (1–2 кольца перед транзитной зоной (TZ)) — TZ (2 кольца перед HW)” для получения воспроизводимых данных ПЦР-РВ. Во всех описанных тканях проведена оценка стабильности экспрессии шести потенциальных референсных генов (*Actin1*, α -*Tubulin*, β -*Tubulin*, *Ef1a*, *GAPDH*, *UBQ*). Показаны различия в уровнях экспрессии целевых генов при нормализации данных с использованием референсных генов с различной стабильностью экспрессии.

Ключевые слова: *Pinus sylvestris*, выделение РНК, нормализация, ПЦР-РВ, референсные гены, экспрессия генов

DOI: 10.31857/S0475145023010093, EDN: FRMYSQ

ВВЕДЕНИЕ

Накопление биомассы у древесных растений происходит благодаря деятельности латеральной меристемы — камбия. Стволовые клетки камбия дают начало тканям сосудистой системы растений — ксилеме, откладывающейся внутрь от камбия, и флоэме, откладывающейся наружу (Fischer et al., 2019). Флоэма является основным транспортным маршрутом для фотоассимилятов, сигнальных молекул и некоторых минеральных веществ по всему растению; ксилема обеспечивает транспорт воды и растворенных минеральных веществ, поглощаемых корнями, выполняет меха-

ническую функцию. Конечный этап дифференциации производных камбия в сосуды, волокна, трахеиды ксилемы — это программируемая клеточная смерть (ПКС), эти структурные элементы состоят только из клеточных стенок, формирующих основную биомассу ствола древесных растений. В отличие от них, слабо дифференцированные паренхимные клетки ксилемы сохраняют протопласт, они участвуют в транспорте, запасании питательных веществ, в различных биосинтетических процессах. Внешнюю часть древесины, содержащую живые клетки лучевой и аксиальной паренхимы, называют заболонной древесиной (sapwood, SW). По мере старения SW происходит гибель клеток паренхимы, накопление в них большого количества вторичных метаболитов и

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0475145023010093 для авторизованных пользователей.

образование физиологически неактивной ядровой древесины (heartwood, HW). Переходная зона (transition zone, TZ), расположенная между SW и HW, согласно данным литературы, характеризуется активной транскрипцией генов, кодирующих различные ферменты, в том числе синтеза вторичных метаболитов, а также связанных с ПКС у растений (Lim et al., 2016). Сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.), благодаря четкой границе между SW и HW, относится к модельным древесным растениям для изучения закономерностей формирования HW.

В настоящее время для изучения процессов формирования тканей ствола древесных растений активно применяются молекулярно-генетические методы, в частности, метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Метод ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) широко используется для количественной оценки уровня экспрессии генов и имеет ряд преимуществ: простота реализации, высокая чувствительность, специфичность и повторяемость. Однако работа с хвойными древесными растениями в качестве объекта исследований сопряжена с рядом трудностей при выполнении молекулярно-генетического анализа. Наличие прочных вторичных клеточных стенок и высокое содержание вторичных метаболитов, частичная деградация РНК в SW затрудняют получение высокоочищенных, целостных препаратов тотальной РНК, пригодных для использования в качестве матрицы в реакции обратной транскрипции и дальнейшего ПЦР анализа. Значительные изменения в строении и составе тканей по мере продвижения от периферии ствола (зона камбиального роста) к центру (формирующаяся HW) усложняют выбор универсального эталонного гена для нормализации данных количественной ПЦР во всех изучаемых тканях. В настоящее время в литературе имеются данные об использовании *Actin*, *Histone*, *upLOC*, *PGK1* для анализа экспрессии генов у разных видов сосны в качестве генов-нормализаторов (Chen et al., 2016; Lim et al., 2016; Mo et al., 2019), однако работы по оценке стабильности экспрессии референсных генов в различных тканях ствола взрослых деревьев *Pinus sylvestris* ранее не проводилось.

В настоящее время существует ряд публикаций, представляющих собой практические рекомендации, касающиеся выделения РНК, постановки реакции обратной транскрипции, постановки, анализа и публикации данных ПЦР-РВ (Bustin et al., 2009, 2010; Taylor et al., 2010).

В данной работе описана отработка различных этапов проведения анализа экспрессии генов в тканях ствола *P. sylvestris* L. по радиальному вектору: “проводящая флоэма/камбиальная зона – дифференцирующаяся ксилема – внешняя часть SW (1–2 кольца) – внутренняя часть SW (1–

2 кольца перед TZ) – TZ (2 кольца перед HW)” для получения воспроизводимых данных ПЦР-РВ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал и отбор образцов

Отбор образцов для анализа стабильности экспрессии референсных генов проводили в период активного камбиального роста (конец июня) с разновозрастных (30, 70–80, 180 лет) деревьев *Pinus sylvestris* L., произрастающих в средней (заповедник “Кивач”, республика Карелия) и северной (Калевальский район, Карелия; заповедник “Пасвик”, Печенгский район Мурманской области) подзоне тайги. Для отбора тканей с южной стороны ствола на высоте 1.5 м делали “окошки” и отделяли кору от древесины. Со стороны коры скальпелем снимали слой тканей, включающий камбиальную зону, проводящую флоэму и небольшую порцию непроводящей флоэмы (фракция “флоэма”). Со стороны ствола соскабливали слой дифференцирующейся ксилемы, содержащей клетки ксилемы на стадии растяжения и формирования вторичной клеточной стенки (фракция “ксилема”). Далее с “окошек” отбирали керны. Все ткани сразу замораживали в жидком азоте и хранили в нем и/или в низкотемпературной морозильной камере (New Brunswick Premium –86°C Freezers, Eppendorf, Великобритания) до проведения анализа. В лабораторных условиях керны подсвечивали в ультрафиолетовом свете для определения границы ядровой древесины и отбирали образцы транзитной зоны (TZ) (2 годичных кольца на границе с ядровой древесиной), внутренней заболони (SWint) (2 годичных кольца после TZ) и внешней заболони (SWext) (1 годичное кольцо – ксилема текущего года).

Выделение и очистка тРНК

Состав экстракционного ЦТАБ-буфера: 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 25 mM ЭДТА, 2 M NaCl, 2% ЦТАБ, 2% PVP-40, довести до pH 5.0. Состав ДДС буфера: 10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM ЭДТА (pH 8), 1% SDS, 1 M NaCl, довести до pH 5.0.

Навеску растительной ткани (200 мг) растирали в жидком азоте и добавляли 2 мл предварительно разогретого до 65°C ЦТАБ-буфера и 20 мкл 2%-меркаптоэтанола, полученную смесь инкубировали в течение 15 мин при 65°C периодически встряхивая, затем центрифугировали при 12000 g (Microfuge 20R, Beckman Coulter, Россия) и комнатной температуре в течение 15 мин, отбирали надосадочную жидкость и добавляли равный объем смеси хлороформ/изоамиловый спирт (24 : 1). Центрифугировали при 12000 g в течение 30 мин при температуре 4°C. К водной фазе добавляли 1 V изопропанола и осаждали в течение 2–3 ч при –70°C. Центрифугировали при 12000 g при комнат-

ной температуре в течение 30 мин, осадок промывали 70% этанолом (центрифугирование при 9200 g 2 мин при комнатной температуре). Осадок растворяли в стерильной, свободной от РНКаз воде. При необходимости, для лучшей очистки препарата РНК, совместно с хлороформ-изоамиловой смесью использовали фенол (соотношение фенол : хлороформ : изоамиловый спирт составляло 25 : 24 : 1). При использовании в протоколе дополнительной экстракции ДДС-буфером изопропиловый спирт для осаждения РНК после первого этапа выделения заменяли на 10М хлорид лития (добавляли 1/4 объема LiCl и осаждали в течение ночи при 4°C). Осадок РНК повторно растворяли в 600 мкл ДДС-буфера, добавляли хлороформ-изоамиловую смесь и осаждали РНК из водной фазы изопропиловым спиртом, так же как в первом варианте протокола. После проверки качества выделенную РНК сразу использовали в реакции обратной транскрипции для получения кДНК.

Постановка реакции обратной транскрипции и оценка качества нуклеиновых кислот

Перед проведением реакции обратной транскрипции полученный препарат инкубировали с ДНКазой в течение часа при 37°C. Реакцию обратной транскрипции (ОТ) проводили с помощью термоциклера “T100 Thermal cycler” (“BioRad”, США) с набором реактивов MMLV RT (Евроген, Россия). Для реакции ОТ в реакционную смесь добавляли 5 мкл матрицы РНК (~500 нг), 1 мкл 20 мкМ Oligo(dT)15-primer, 1 мкл 20 мкМ (Random (dN)10-primer, 2 мкл деионизированной свободной от нуклеаз воды, затем прогревали смесь 10 мин до 70°C для инактивации ДНКазы и расплавления вторичных структур РНК. Затем добавляли 11 мкл заранее подготовленной реакционной смеси (4 мкл 5× буфера для синтеза первой цепи, 2 мкл смеси dNTP (10 мМ каждого), 2 мкл DTT (20 мМ), 1 мкл MMLV ревертазы (100 ед.)), инкубировали 50 мин при 37°C, а затем прогревали смесь в течение 10 мин при 70°C для остановки реакции. Качество и количество выделенной РНК и синтезированной кДНК проверяли спектрофотометрически (планшетный спектрофотометр SPECTROstar NANO, “BMG Labtech”, Германия) и при помощи электрофореза в 1% агарозном геле (система горизонтального гель-электрофореза Sub-Cell GT Agarose Gel, Bio-Rad, США). Полученные препараты кДНК сразу использовали для проведения анализа или хранили при –80°C не более 1 мес. Для контроля примеси геномной ДНК проводили ПЦР-РВ со специфическими для референсных генов праймерами с препаратом тотальной РНК, а также с использованием в качестве матрицы реакционной смеси для синтеза кДНК, прошедшей все стадии инкубации и инактивации, но без добавления обратной транскриптазы.

*Поиск генов в геноме *P. sylvestris* и дизайн праймеров для постановки ПЦР-РВ*

Поиск белков *P. sylvestris*, кодируемых потенциальными референсными генами, проводили с использованием базы данных GymnoPLAZA (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/plaza/versions/gymno-plaza/>). С этой целью были получены аминокислотные последовательности актина, тубулина (Zhu et al., 2019), убиквитина (UBQ) (Chen et al., 2016) *Pinus massoniana*, частичные аминокислотные последовательности NAD-зависимой глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы *Pinus sylvestris* L. (accessions AAL73356.1, AAL73355.1, BAN58080.1), депонированные в NCBI и последовательности белков Actin, Tubulin, EF1a1-4, GAPDH, UBQ *Arabidopsis thaliana* из базы данных UniProt/SwissProt (<https://www.uniprot.org>).

Предсказание структуры белков сосны обыкновенной было выполнено с использованием ресурса National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>) (Marchler-Bauer, Bryant, 2004) и инструмента ScanProSite (<https://prosite.expasy.org/scanprosite/>) (de Castro et al., 2006). Филогенетический анализ проводили с помощью программы MEGA 7 (Kumar et al., 2016). Множественное выравнивание потенциальных белков сосны обыкновенной и других организмов было выполнено с помощью ClustalW. Филогенетические деревья были построены с использованием метода присоединения ближайшего соседа (Neighbor-Joining method) на основе модели коррекции Пуассона с 1000 повторами bootstrap (Saitou, Nei, 1987). Определение процента идентичности/сходства белков *P. sylvestris*, *P. massoniana* и *A. thaliana* было выполнено в EMBOSS Needle (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/).

Постановка ПЦР-РВ

Аmplификацию образцов проводили в термоциклере (амплификаторе) CFX96 (“BioRad”, США), используя наборы для амплификации с интеркалирующим красителем SYBR Green (Евроген, Россия). ПЦР-РВ проводили в реакционной смеси объемом 25 мкл, содержащей 5 мкл qPCRmix-HS SYBR, по 1 мкл прямого и обратного праймера (0.4 мкМ) (Синтол, Россия), 2 мкл матрицы кДНК, 16 мкл деионизированной, свободной от нуклеаз воды. Конечное содержание кДНК в реакционной среде для всех образцов составляло ~100 нг, согласно рекомендации протокола производителя. ПЦР проводили при следующих условиях: 95°C в течение 5 мин, затем 40 циклов: денатурация (95°C, 15 с), отжиг (53.9–60.9°C, 30 с), элонгация (72°C, 30 с). Для каждой пары праймеров применяли отрицательный контроль – постановка ПЦР в отсутствие матрицы кДНК.

Специфичность полученных продуктов ПЦР оценивали с помощью кривых плавления. Относительный уровень транскриптов генов (RQ) вычисляли по формуле:

$$RQ = E^{-\Delta C_t}, \text{ где } E - \text{эффективность ПЦР, а}$$

$$\Delta C_t = C_t (\text{целевого гена}) - \\ - C_t (\text{референсного гена}),$$

и выражали в относительных единицах (отн. ед.) (Pfaffl, 2001). Для определения эффективности (E) ПЦР-амплификацию проводят с каждой парой праймеров на серии 10-кратных разведений (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) кДНК. С помощью программного обеспечения Excel строят график зависимости C_t от Lg [концентрация кДНК] и, используя значения наклона кривой (slope, k), вычисляют эффективность по формуле $E = 10^{1/k}$, для расчета значения эффективности в %, использовали формулу: $E = (10^{1/k} - 1) \times 100$ (Chang et al., 2012). Также эффективность амплификации оценивали индивидуально в каждой реакции на основе необработанных данных флуоресценции амплификации при помощи программного обеспечения LinRegPCR (Ramakers et al., 2003).

Оценка стабильности референсных генов

Для выбора подходящего референсного гена с помощью двух пакетов программ NormFinder и BestKeeper анализировали стабильность экспрессии каждого претендента на эту роль. Исходные значения C_t переводили в формат, необходимый для анализа в NormFinder. Максимальный уровень экспрессии (наименьшее значение C_t) принимали равным 1. Относительные уровни экспрессии рассчитывали, используя формулу: $2^{-\Delta g C_t}$, в которой $\Delta g C_t$ – это наименьшее значение C_t , вычтенное из соответствующего значения C_t для каждого гена и каждого образца. При помощи программы BestKeeper потенциальные референсные гены анализировали используя непретворенные значения C_t и значения эффективности амплификации.

Статистическая обработка данных

Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием пакетов программ Microsoft Excel 2010 и Past 4.03. Средние значения пороговых циклов и относительной экспрессии генов рассчитывали на основе 5–6 биологических повторностей. Нормальность распределения проверяли с использованием критерия Шапиро–Уилка. Распределение не являлось нормальным, поэтому для оценки различий использовали критерий Манна–Уитни. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Выделение тотальной РНК из разных образцов тканей ствола сосны обыкновенной

Фракции “ксилема” и “флоэма”

Поскольку ранее апробированные на древесных тканях наборы для выделения тотальной РНК на основе гуанидин-изотиоцианата – TRIzol (Invitrogen, США), реагент ExtractRNA (Евроген, Россия), PureZOL (Bio-Rad, США) не дали возможности выделения достаточного количества качественной суммарной РНК, в данной работе мы использовали метод выделения тотальной РНК с применением ЦТАБ-буфера, который, по данным литературы, является более успешным для получения качественных препаратов РНК из древесных тканей, богатых вторичными метаболитами и полисахаридами. Использование данного метода дало неплохие результаты при выделении РНК из фракции “ксилема”: наблюдался достаточно высокий выход РНК, значения соотношений A260/A280, A260/A230 (табл. 1) свидетельствовали об отсутствии примесей белка и вторичных метаболитов. В случае выделения тотальной РНК из фракции “флоэма” буфером на основе ЦТАБ наблюдали достаточно низкий выход РНК и низкие значения соотношений A260/A280, A260/A230 (табл. 1), которые свидетельствуют о наличии примесей, низком качестве полученной РНК и непригодности использования полученного препарата для дальнейшего анализа методом ПЦР-РВ. В дальнейшем протокол экстракции тотальной РНК был дополнен применением фенола для лучшей очистки от белков и этапом дополнительной экстракции ДДС-буфером, как описано в работе Су с соавт. (Су и др., 2009) с некоторыми изменениями (см. методику). Качество полученной РНК была оценено спектрофотометрически и при помощи метода гель-электрофореза. Электрофорез в 1% агарозном геле показал четкое разделение полос 28S и 18S рРНК (рис. 1, 1, 2), а спектрофотометрические характеристики препарата свидетельствовали об отсутствии загрязнения (табл. 1). При постановке ПЦР-РВ со специфическими для референсных генов праймерами в качестве отрицательного контроля использовали реакционную смесь без матрицы, препарат тотальной РНК, а также реакционную смесь для синтеза кДНК, прошедшую все стадии инкубации и инактивации, но без добавления фермента для обратной транскрипции. Ни в одном из вариантов отрицательного контроля не было обнаружено продуктов амплификации после 40 циклов реакции.

Таким образом, применение метода выделения РНК при помощи экстракционного буфера на основе ЦТАБ с дополнительной экстракцией ДДС-буфером позволило получить пригодные для дальнейшего ПЦР анализа препараты тотальной РНК.

Таблица 1. Спектрофотометрические показатели качества и количества РНК, выделенной из тканей ствола *Pinus sylvestris* L. с применением ЦТАБ-буфера (ЦТАБ) и ЦТАБ-буфера с дополнительной экстракцией ДДС (ЦТАБ/ДДС). \pm SD ($N = 15$)

Фракция	ЦТАБ			ЦТАБ/ДДС		
	выход РНК, мкг/г сырого веса	A260/A230	A260/A280	выход РНК, мкг/г сырого веса	A260/A230	A260/A280
Фракция “Ксилема”	130.66 (\pm 12.1)	2.12 (\pm 0.01)	1.87 (\pm 0.008)	121.2 (\pm 9.3)	2.01 (\pm 0.009)	1.96 (\pm 0.007)
Фракция “Флоэма”	55.99 (\pm 3.2)	1.56 (\pm 0.009)	1.32 (\pm 0.008)	144.25 (\pm 11.4)	2.06 (\pm 0.008)	1.98 (\pm 0.009)
Внешняя заболонь (SWext)	3.65 (\pm 0.09)	1.15 (\pm 0.02)	1.21 (\pm 0.08)	9.6 (\pm 1.2)	1.93 (\pm 0.009)	1.92 (\pm 0.008)
Внутренняя заболонь (SWint)	4.59 (\pm 0.1)	1.35 (\pm 0.08)	1.25 (\pm 0.07)	12.35 (\pm 0.9)	1.97 (\pm 0.001)	1.95 (\pm 0.09)
Транзитная зона (TZ)	6.89 (\pm 0.21)	1.25 (\pm 0.02)	1.34 (\pm 0.09)	13.4 (\pm 1.9)	1.99 (\pm 0.006)	1.96 (\pm 0.008)

Заболонная древесина и транзитная зона

Выделение РНК из SW и TZ было также более успешным, если в протоколе применялся фенол, а также использовалась дополнительная экстракция ДДС-буфером. В данном случае увеличивался выход РНК и наблюдались более высокие значения соотношений A260/A280, A260/A230, свидетельствующих о чистоте полученного препарата (табл. 1). Было также показано, что в TZ древесины, по сравнению с SW, выше общий выход РНК. Электрофореграммы РНК, полученной из TZ, показывали четкое разделение полос субъединиц рРНК (рис. 1, 3).

Анализ спектров поглощения РНК показал сдвиг максимума поглощения на 270 нм в препаратах, полученных из общей навески SW (Дополнительные материалы, рис. 1а), что, вероятно, свидетельствует о загрязнении и/или частичной деградации РНК в этой ткани. О деградации РНК свидетельствует также электрофорез полученного препарата в агарозном геле (рис. 1, 4). Для получения качественного препарата РНК в дальнейшем мы разделили SW на внутреннюю (SWint), среднюю и внешнюю части (SWext). Было показано, что сдвиг максимума поглощения характерен для РНК, полученной из средней части SW, поэтому она была исключена из дальнейшего исследования. РНК, полученная из SWint и SWext, имела максимум поглощения на 260 нм (Дополнительные материалы, рис. 1б, 1в), а электрофореграммы свидетельствовали о целостности препарата (рис. 1, 5, 6). Спектрофотометрические показатели качества и количества РНК, полученной из SWint и SWext, приведены в табл. 1. Использование отрицательных контролей при постановке ПЦР-РВ свидетельствовало об отсутствии контаминации и загрязнения препарата геномной ДНК.

Поиск последовательностей потенциальных референсных генов в геноме *P. sylvestris* и дизайн праймеров для постановки ПЦР-РВ

Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (*GAPDH*)

Поиск по геному сосны обыкновенной выявил 4 гена, кодирующих белковые последовательности, гомологичные *GAPDH* сосны, описанным ранее. Анализ структуры белков показал, что все 4 последовательности содержат домены, типичные для глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназ. Сравнительный эволюционный анализ показал, что 1 потенциальный *GAPDH* ген сосны обыкновенной (PSY00009485) входит в кладу, образованную цитоплазматическими глицеральдегид-3-фосфатдегид-

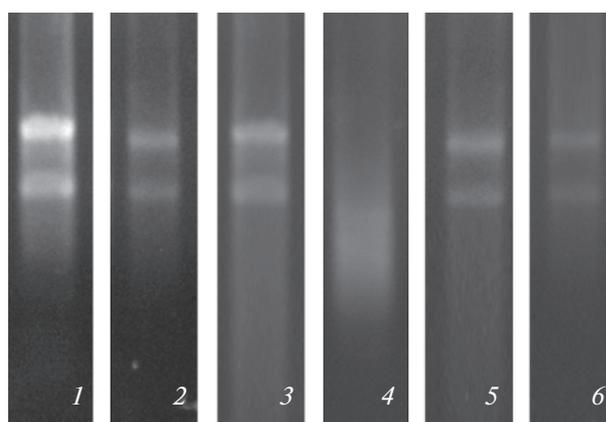


Рис. 1. Электрофорез в 1% агарозном геле totalной РНК, выделенной из: фракции “флоэма” (1), фракции “ксилема” (2), транзитной зоны (3), суммарной навески заболонной древесины (SW) (4), внутренней (SWint) (5) и внешней (SWext) (6) части заболони *Pinus sylvestris* L., с применением экстракционного ЦТАБ-буфера и дополнительной экстракцией ДДС-буфером.

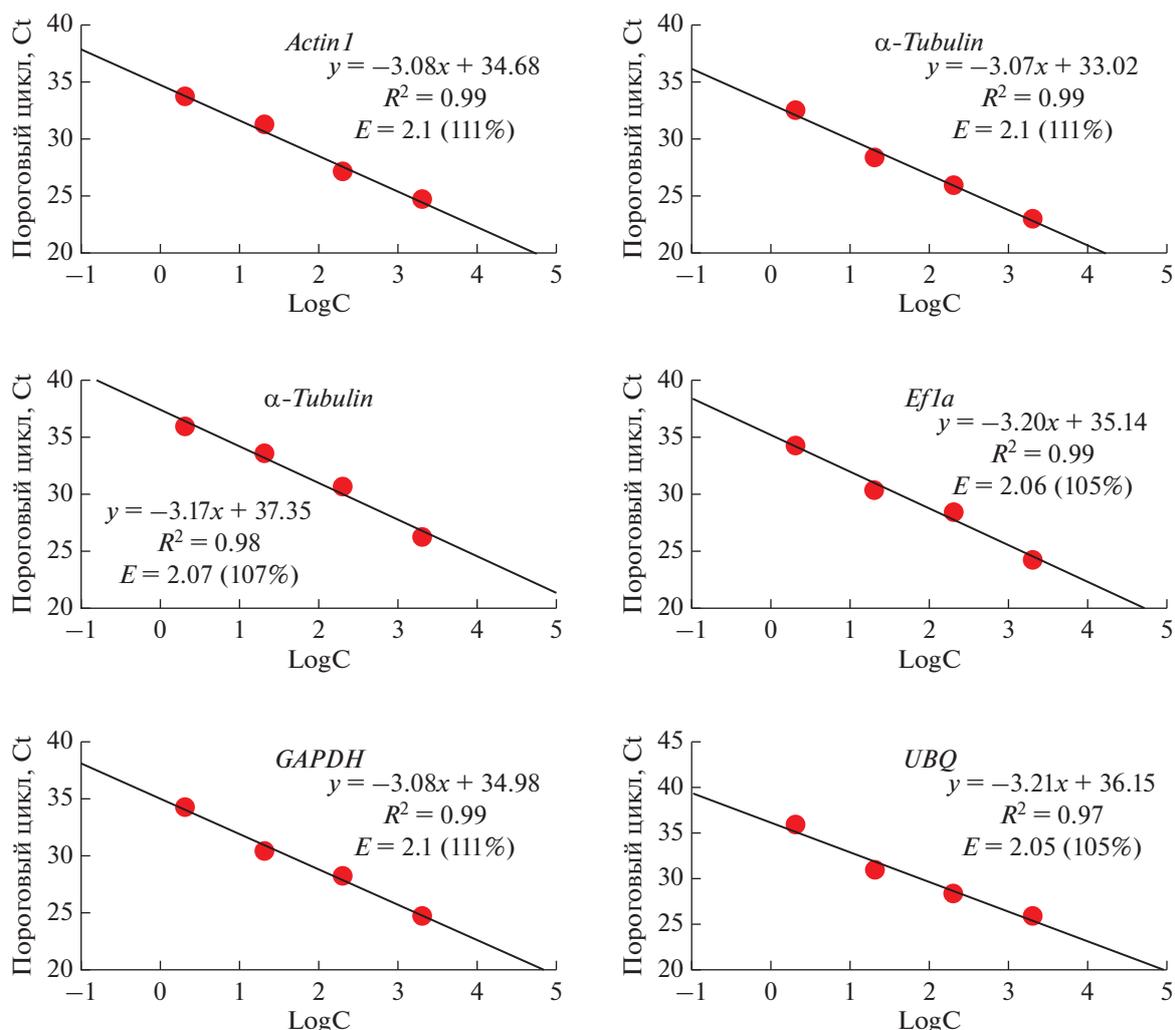


Рис. 2. Зависимость порогового цикла (Ct), полученного в ходе ПЦР для каждого референсного гена, от логарифма концентрации ДНК матрицы (LogC). Точками обозначены средние значения пороговых циклов по трем повторам. На графике показано уравнение зависимости, коэффициент корреляции (R^2) и эффективность реакции ПЦР (E).

рогеназами других видов (Дополнительные материалы, рис. 2г). Доля идентичных аминокислот в последовательностях белков PSY00009485 и цитоплазматических глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназ *Arabidopsis thaliana* составил 86.2%.

Факторы элонгации 1a (EF1a)

Поиск по геному сосны обыкновенной выявил 4 гена, кодирующих белковые последовательности, гомологичные факторам элонгации 1a *A. thaliana*. Структурный анализ белков показал, что все 4 последовательности содержат домены, характерные для факторов элонгации 1a. Сравнительный эволюционный анализ подтвердил, что выявленные последовательности сосны входят в одну кладу с факторами элонгации 1a *A. thaliana* (Дополнительные материалы, рис. 2б). Все 4 белка продемонстрировали сходство с факторами элонгации 1a

A. thaliana (доля идентичных аминокислот в белках – 70.2–87.1%), ближайшим гомологом был белок, кодируемый геном PSY00004289.

Актин (Actin1)

Поиск по геному сосны обыкновенной выявил 6 генов, кодирующих белковые последовательности, гомологичные актинам *Pinus massoniana* Lamb. Структурный анализ белков показал, что все последовательности содержат домены, характерные для актинов. Сравнительный эволюционный анализ показал, что ближайшим гомологом Actin-1 *P. massoniana* является последовательность PSY00006852 (Дополнительные материалы, рис. 2а). Данный белок имел наиболее высокий процент идентичных аминокислот с последовательностями Actin-1 *A. thaliana* и *P. massoniana* (95.8 и 100.0% соответственно).

Таблица 2. Эффективность амплификации потенциальных референсных генов при использовании различных концентраций кДНК. Указаны средние по трем повторам значения эффективности \pm SD

Ген	Количество кДНК (нг/реакцию)			
	500	50	5	0.5
<i>Actin1</i>	1.94 \pm 0.005	1.98 \pm 0.006	1.99 \pm 0.005	1.98 \pm 0.005
α - <i>Tubulin</i>	1.92 \pm 0.007	1.97 \pm 0.003	1.99 \pm 0.004	1.98 \pm 0.005
β - <i>Tubulin</i>	1.92 \pm 0.006	1.98 \pm 0.003	1.99 \pm 0.005	1.98 \pm 0.005
<i>Ef1a</i>	1.93 \pm 0.005	1.99 \pm 0	1.99 \pm 0.004	1.98 \pm 0.003
<i>GAPDH</i>	1.95 \pm 0.003	1.99 \pm 0	1.99 \pm 0.0008	1.98 \pm 0.003
<i>UBQ</i>	1.9 \pm 0.007	1.92 \pm 0.004	1.99 \pm 0.003	1.98 \pm 0.004

Тубулин (*Tubulin*)

Поиск по геному сосны обыкновенной выявил 10 генов, кодирующих белковые последовательности, гомологичные тубулину *P. massoniana* Lamb. Структурный анализ белков показал, что все последовательности содержат домены, характерные для α - и β -Tubulin. Сравнительный эволюционный анализ показал, что 8 последовательностей сосны обыкновенной кластеризуются с последовательностями генов β -Tubulin *A. thaliana* и *P. massoniana* и 2 последовательности гомологичны генам α -Tubulin (Дополнительные материалы, рис. 2в). Белок, кодируемый геном *PSY00000513*, имел наиболее высокий процент идентичных аминокислот с последовательностями α -Tubulin-2 *A. thaliana* и α -Tubulin *P. massoniana* (96.7 и 99.6% соответственно). Белок, кодируемый геном *PSY00020389*, имел наиболее высокий процент идентичных аминокислот с последовательностями β -Tubulin-8 *A. thaliana* и β -Tubulin *P. massoniana* (95.3 и 100.0% соответственно).

Полиубиквитин (*UBQ*)

Поиск по геному сосны обыкновенной выявил 13 генов, кодирующих белковые последовательности, гомологичные UBQ *P. massoniana*. Структурный анализ белков показал, что все последовательности очень близки по структуре и содержат несколько убиквитиновых повторов, наибольшее количество которых содержал белок, кодируемый геном *PSY00000253*.

На основе филогенетического анализа из каждого семейства были выбраны подходящие гены, и сконструированы специфичные пары праймеров для дальнейшей постановки ПЦР-РВ (Дополнительные материалы, табл. 1).

Эффективность и специфичность амплификации потенциальных референсных генов

До этапа оценки стабильности экспрессии потенциальных референсных генов, мы оценивали эффективность реакции амплификации (E) и

специфичность продуктов, полученных в ходе ПЦР-РВ. Наиболее часто используемым методом оценки эффективности ПЦР является постановка амплификации на серии последовательных десятикратных разбавлений матрицы ДНК, каждое из которых анализируется в трех повторях. Эффективность амплификации для потенциальных референсных генов, рассчитанная на основе серии последовательных десятикратных разведений в диапазоне концентраций от 0.5 до 500 нг ДНК на реакцию, составила 2.05–2.11 (105–111%), т.е. составила $>100\%$ для всех исследуемых генов (рис. 2). Использование такого метода расчета эффективности ПЦР дает только одно для всех используемых концентраций ДНК значение эффективности. Очевидно, что данный метод оценки эффективности является упрощенным подходом, поскольку значение E значительно варьирует при изменении концентрации ДНК, используемой в реакции. В связи с этим, нашим следующим этапом было индивидуальное измерение эффективности с использованием кинетики реакции одного образца на основе необработанных данных флуоресценции амплификации при помощи программного обеспечения LinRegPCR (Ramakers et al., 2003). Средние по трем повторам значения эффективности ПЦР для каждой точки разведения представлены в табл. 2. Показано, что при использовании высоких концентраций ДНК матрицы эффективность ПЦР показывает низкие значения, что, вероятно, связано с влиянием ингибиторов ПЦР и ослаблением их эффекта по мере разбавления образца. Использование значений S_t , полученных при использовании в ПЦР высоких концентраций кДНК, сильно искажает наклон стандартной кривой и приводит к искажению рассчитанных по методу стандартных разведений значений эффективности. Таким образом, использование данного метода возможно только в более узком диапазоне концентраций при исключении точек, соответствующих высоким концентрациям кДНК.

Постановка ПЦР с последовательными разведениями ДНК (серия двукратных разведений) в

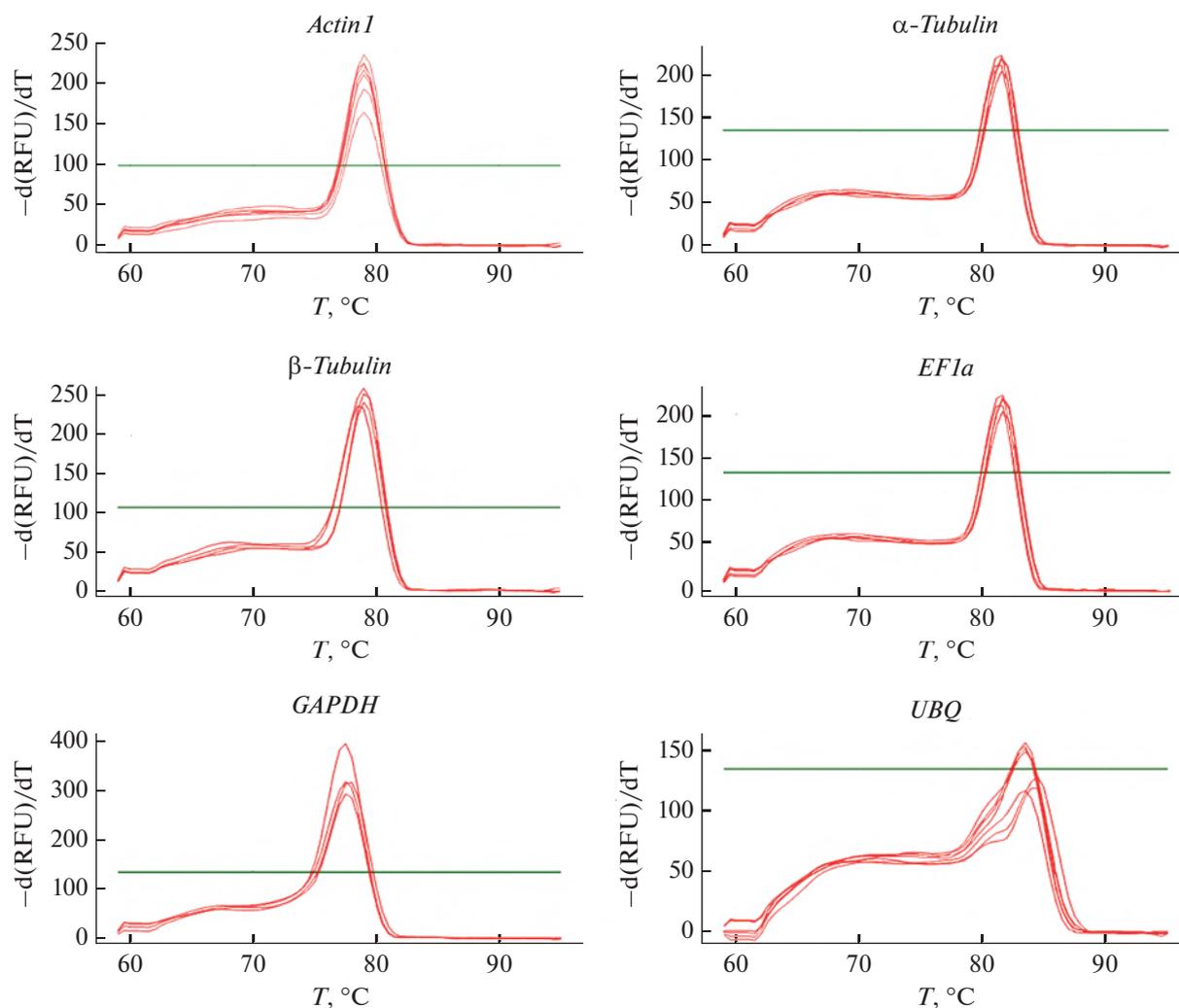


Рис. 3. График производной кривой плавления продуктов ПЦР с потенциальными референсными генами.

более узком диапазоне концентраций (1–100 нг ДНК на реакцию, диапазон концентраций ДНК, рекомендуемый протоколом производителя) показывает более успешные результаты: эффективность амплификации при такой постановке реакции составила от 1.98 до 2.0. В дальнейшем для расчета относительной экспрессии мы использовали средние на ампликон значения эффективности, рассчитанной индивидуально в каждой реакции при помощи программы LinRegPCR.

Оценку специфичности амплификации потенциальных референсных генов проводили при помощи анализа кривых плавления продуктов ПЦР и гель-электрофореза в 8% акриламидном геле.

По кривым плавления продуктов ПЦР с каждой парой праймеров мы выявили, что в случае использования праймеров *UBQ* в ходе ПЦР амплифицируются неспецифические продукты реакции, на основании чего данный ген был исключен из

дальнейшего анализа. В случае генов *Actin1*, *α-Tubulin*, *β-Tubulin*, *Efla*, *GapDH* был выявлен один пик плавления и не обнаружено неспецифических продуктов реакции (рис. 3). В ходе оценки специфичности ПЦР при помощи гель-электрофореза в 8% акриламидном геле для выбранных генов были обнаружены ампликоны ожидаемой длины и показано отсутствие димеров праймеров.

Оценка стабильности экспрессии потенциальных референсных генов

Полученные для потенциальных референсных генов средние значения пороговых циклов (*Ct*) находились в диапазоне от 26 до 34 циклов. Максимальные значения экспрессии для всех потенциальных референсных генов показаны для флоэмы, минимальные – для транзитной зоны. В целом, наиболее высокая экспрессия (минимальные средние значения *Ct*) была показана для гена

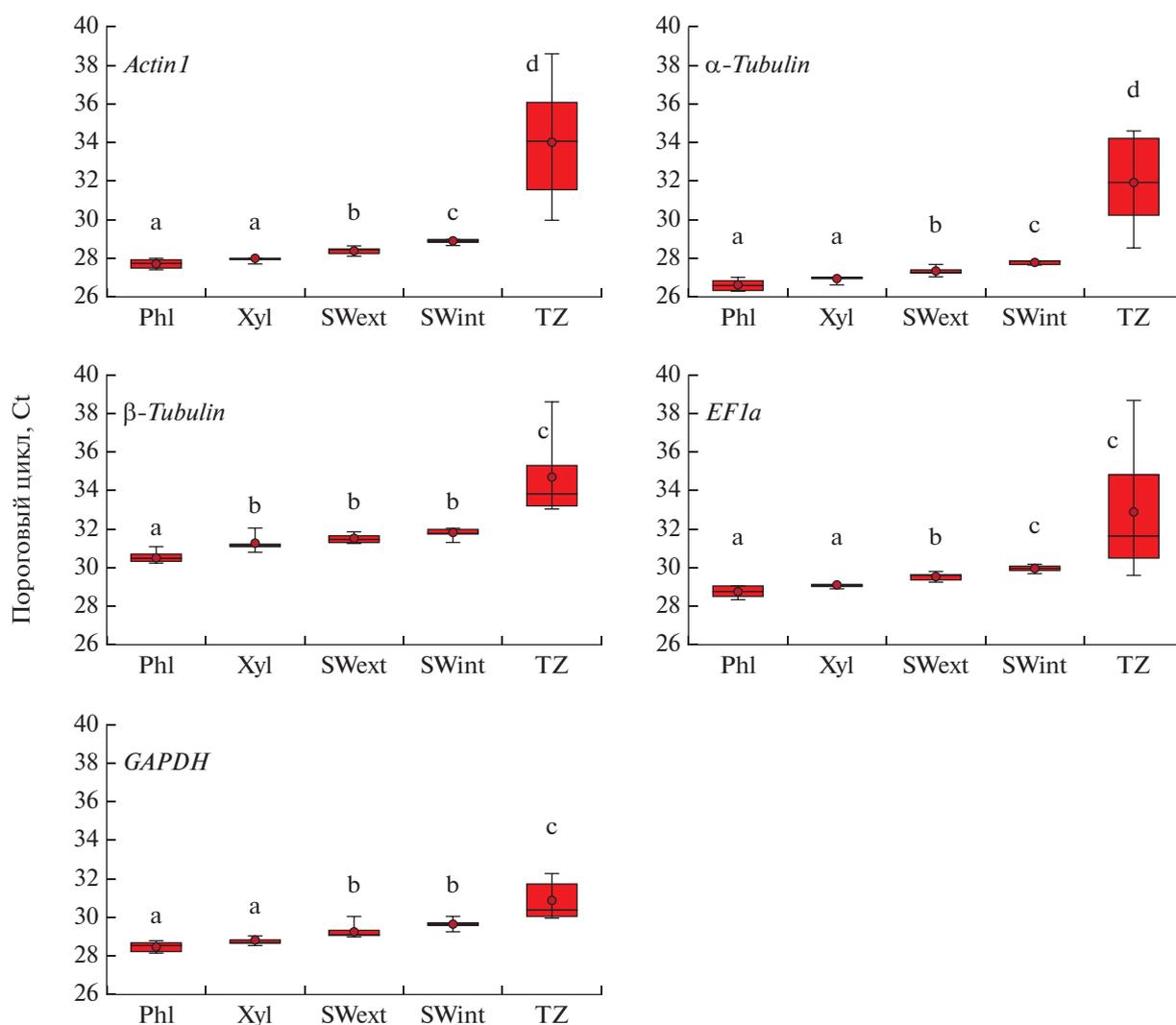


Рис. 4. Экспрессия потенциальных референсных генов (выраженная в виде значений Ct). Линия в прямоугольниках – медиана. Точка – средние значения по 6 биологическим повторностям. Прямоугольниками показаны 25-й и 75-й перцентили. Бары – максимальные и минимальные значения. Буквами указаны значимые различия между исследуемыми образцами.

α -Tubulin, хуже всего экспрессировался ген β -Tubulin (рис. 4).

Анализ пригодности потенциальных референсных генов с помощью программы BestKeeper основан на оценке средних значений Ct и значений стандартного отклонения (SD). Гены, имеющие значения SD > 1, исключаются из дальнейшего анализа. Ранжирование генов, в данном случае происходит в соответствии с коэффициентом корреляции Пирсона (r). Референсный ген с высокой стабильностью экспрессии имеет близкие к 1 значения r .

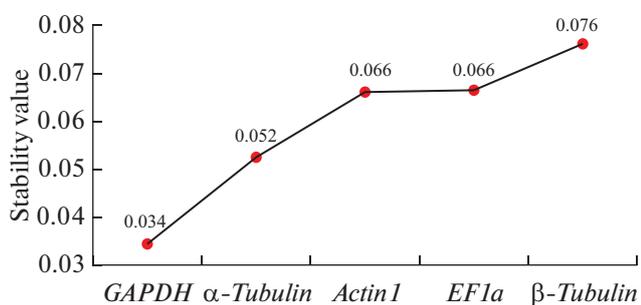
В нашем исследовании мы проводили анализ стабильности экспрессии референсных генов в пределах одной ткани и на общем массиве данных, полученных на всех исследуемых тканях.

Для анализа были взяты ткани: фракция “флоэма”, фракция “ксилема”, внешняя заболонь (SWext), внутренняя заболонь (SWint), транзитная зона (TZ). Средние значения Ct для референсных генов в каждой ткани были получены на разновозрастных растениях *P. sylvestris* (30 лет, 70–80 лет, 180 лет). В результате анализа BestKeeper было показано, что коэффициент корреляции Пирсона для различных генов и тканей варьировал от 0.69 до 1.0. Было выявлено, что в “ксилеме”, “флоэме” и SW все референсные гены имеют SD < 1 (табл. 3). Отличительной особенностью транзитной зоны было то, что в данной ткани в значительной степени увеличивались значения SD для генов *Actin1*, α -Tubulin, β -Tubulin, *EF1a* (диапазон значений от 1.62 до 2.85). При расчете показателей стабильности экспрессии на общий массив

Таблица 3. Показатели стабильности экспрессии потенциальных референсных генов, рассчитанные с помощью программы BestKeeper (Pfaffl, 2004)

		<i>Actin1</i>	α - <i>Tubulin</i>	β - <i>Tubulin</i>	<i>EF1a</i>	<i>GAPDH</i>
Phl	Pearson correlation coefficient (<i>r</i>)	0.99	1.0	0.91	0.96	0.95
	<i>p</i> -value	0.001	0.001	0.011	0.002	0.004
	Standard deviation (SD)	0.23	0.27	0.26	0.29	0.22
Xyl	Pearson correlation coefficient (<i>r</i>)	0.96	0.88	0.95	0.97	0.98
	<i>p</i> -value	0.003	0.021	0.003	0.001	0.001
	Standard deviation (SD)	0.08	0.10	0.27	0.05	0.12
SWext	Pearson correlation coefficient (<i>r</i>)	0.96	0.99	0.98	0.96	0.98
	<i>p</i> -value	0.002	0.001	0.001	0.002	0.001
	Standard deviation (SD)	0.16	0.15	0.19	0.18	0.26
SWint	Pearson correlation coefficient (<i>r</i>)	0.69	0.74	0.91	0.90	0.96
	<i>p</i> -value	0.130	0.093	0.011	0.014	0.002
	Standard deviation (SD)	0.16	0.09	0.18	0.30	0.21
TZ	Pearson correlation coefficient (<i>r</i>)	0.75	0.84	0.85	0.95	0.97
	<i>p</i> -value	0.083	0.037	0.034	0.004	0.002
	Standard deviation (SD)	2.80	2.17	1.62	2.85	0.87
Все ткани	Pearson correlation coefficient (<i>r</i>)	0.94	0.96	0.95	0.95	0.97
	<i>p</i> -value	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
	Standard deviation (SD)	1.85	1.52	1.12	1.19	0.77

данных (для всех исследуемых тканей) также было показано, что для вышеперечисленных генов значения $SD > 1$ (табл. 3), что делает их непригодными для нормализации данных ПЦР. Таким образом, было показано, что единственным геном, который может использоваться в нормализации данных ПЦР является *GAPDH* (значения SD для него составили 0.87 для TZ и 0.77 для общего массива данных по всем тканям, коэффициент корреляции Пирсона в обоих случаях составил 0.97).

**Рис. 5.** Ранжирование референсных генов по стабильности экспрессии, выполненное в программе NormFinder.

Другая программа NormFinder оценивает стабильность экспрессии на основе статистической и математической модели, которая рассчитывает общую вариацию экспрессии генов кандидатов для идентификации оптимального гена нормализации (Chi et al., 2012). Данная программа на основе их меж- и внутригрупповой вариации рассчитывает значение стабильности (stability value), на основании которого ранжирует исследуемые гены. Наиболее стабильно экспрессирующийся ген имеет минимальное значение показателя стабильности. В нашем исследовании мы проанализировали стабильность экспрессии потенциальных референсных генов у деревьев *P. sylvestris* L. трех возрастных групп (30 лет, 70–80 лет, 180 лет). Каждая группа включала в себя образцы фракции “ксилемы”, “флоэмы”, SWint, SWext, TZ. На основании оценки NormFinder ген *GAPDH* имел самый низкий коэффициент стабильности и был определен как наиболее стабильно экспрессирующийся (рис. 5). Таким образом, на основании данных, полученных при помощи двух пакетов программ, нами сделан вывод о том, что наилучшим геном для нормализации данных ПЦР в исследуемых тканях (фракция “ксилема”, фракция “флоэма”, SWint, SWext, TZ) *P. sylvestris* является ген *GAPDH*.

Нормализация данных количественной ПЦР с использованием гена *GAPDH*

В тканях ствола расчет относительного уровня экспрессии с использованием референсного гена *GAPDH* проводили для генов *PXY* и *PAL*.

Ген *PXY* является участником *TDIF/CLE41-TDR/PXY* – сигнального пути, регулирующего деление сосудистых клеток, организацию сосудов и дифференцировку ксилемы. Из данных литературы известно, что максимум экспрессии гена *PXY* у древесных растений в период активного камбиального роста приходится на ксилемную сторону камбиальной зоны. В нашем исследовании было показано значимое преобладание уровня экспрессии *PXY* в “ксилеме”, по сравнению с “флоэмой” при использовании в качестве нормализатора для расчета относительной экспрессии гена *GAPDH* (рис. 6а).

Из данных литературы известно, что транзитная зона характеризуется активной транскрипцией генов, кодирующих ферменты синтеза вторичных метаболитов (Lim et al., 2016). Ген *PAL* кодирует фенилаланинаммиаклиазу – ключевой фермент биосинтеза вторичных метаболитов. При расчете относительной экспрессии гена *PAL* с использованием в качестве референсного гена *GAPDH* было показано почти десятикратное ее увеличение в транзитной зоне по сравнению с SWint (рис. 6б).

ОБСУЖДЕНИЕ

Высококачественная очищенная РНК имеет решающее значение для получения точных, воспроизводимых результатов в ходе проведения количественной ПЦР-РВ. Поэтому при проведении процедуры экстракции тотальной РНК необходимо позаботиться о предотвращении деградации препарата РНКазами и удалении загрязняющих веществ. Выделение и очистка тотальной РНК из тканей ствола *Pinus sylvestris* сопряжена с рядом трудностей, в частности, высокое содержание вторичных метаболитов в этих тканях затрудняет экстракцию нуклеиновых кислот и требует дополнительного этапа очистки от возможных примесей.

Преобладающее число используемых для экстракции РНК протоколов предполагают использование в качестве одного из компонентов системы изоляции РНК соли гуанидина (Lal et al., 2001), которые являются сильным белковым денатурантом и ингибитором РНКаз. Однако во многих источниках литературы имеются сведения о том, что применение экстракционных смесей на основе солей гуанидина не эффективно при работе с тканями, богатыми вторичными метаболитами (Ghawana et al., 2007). К тому же, использование гуанидина может способствовать образованию сложного комплекса, который будет еще больше

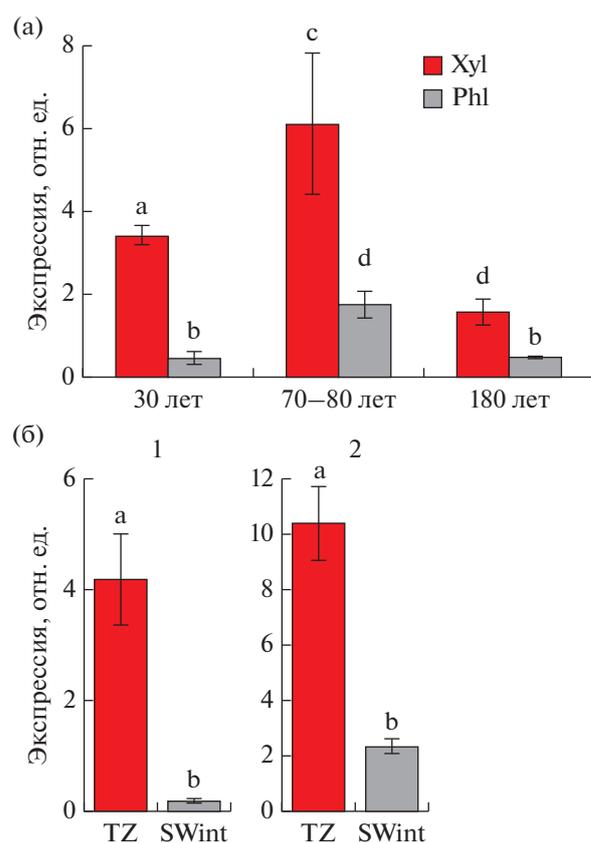


Рис. 6. Расчет относительной экспрессии рецептор-подобной киназы TDR (*PXY*) в тканях ствола разно-возрастных деревьев *Pinus sylvestris* (заповедник “Кивач”) (а) и фенилаланинаммиаклиазы (*PAL*) во внутренней заболони и транзитной зоне 70–80-летних деревьев (б) (1 – Калевала, 2 – заповедник “Пасвик”) с использованием в качестве референсного гена *GAPDH*. Phl – фракция “флоэма”, Xyl – фракция “ксилема”, SWint – внутренняя заболонь, TZ – транзитная зона. Бары – стандартное отклонение, рассчитанное на основании пяти биологических повторностей. Буквами указаны значимые различия между исследуемыми образцами.

ингибировать выделение РНК (Ghawana et al., 2007). В связи с этим, в нашем исследовании мы использовали для выделения тотальной РНК экстракционную смесь на основе ЦТАБ-буфера. Стандартный протокол выделения с применением ЦТАБ-буфера оказался успешным только в случае получения препарата РНК из “ксилемы”, экстракция из “флоэмы” оказалась весьма затруднительной (наблюдался низкий выход РНК, спектрофотометрические показатели свидетельствовали о загрязнении препарата). В ранее проведенной работе (Lim et al., 2016) для экстракции РНК авторы также использовали протокол выделения с использованием ЦТАБ-буфера (Chang et al., 1993), однако при использовании данного метода для большинства тканей были показаны низкие значения соотношений A_{260}/A_{280} и

A260/A230. Образцы тканей ствола *P. sylvestris* для экстракции отбирали в период активного камбиального роста (июнь). Ранее на растениях сосны обыкновенной было показано, что в июне во флоэмной части камбия, по сравнению с ксилемной, почти в 2 раза выше содержание органических кислот и фенольных соединений (Antonova, Stasova, 1997). Известно, что фенолы легко окисляются и необратимо связываются с нуклеиновыми кислотами, затрудняя их экстракцию (Chen et al., 2003). Также причиной, снижающей эффективность экстракции РНК из “флоэмы”, может являться загрязнение полисахаридами, затрудняющее осаждение РНК и искажающее спектрофотометрические характеристики (Chan et al., 2007). Применение в протоколе экстракции РНК осаждения LiCl, добавление фенола и дополнительная экстракция ДДС-буфером позволила увеличить выход тотальной РНК при экстракции из “флоэмы” и добиться получения чистого препарата, пригодного для дальнейшего его использования в молекулярно-генетических исследованиях. Такой вариант протокола выделения РНК оказался также более успешным при экстракции из TZ, SWint, SWext *P. sylvestris*. Особенностью данных тканей, помимо содержания большого количества вторичных метаболитов является низкое содержание нуклеиновых кислот и возможная частичная деградация РНК. Высокие концентрации хлорида лития позволяют избирательно осаждать РНК отдельно от ДНК, а также осаждают только продукты транскрипции большой длины, что, вероятно, является плюсом при работе с частично деградированными препаратами РНК.

Следующим важным шагом к получению точных воспроизводимых данных количественной ПЦР является выбор оптимального метода нормализации данных. Наиболее часто используемым методом нормализации данных при проведении ПЦР является использование в качестве нормализатора одного или нескольких референсных генов. Выбор подходящего референсного гена при работе с тканями ствола хвойных пород древесных растений затруднен сильным изменением строения, состава и функций изучаемых тканей по мере продвижения от периферии ствола (непроводящая и проводящая флоэма, камбиальная зона) к формирующейся ядровой древесине. Ранее оценка стабильности экспрессии различных референсных генов была проведена в корнях, молодых стеблях, хвое и шишках *Pinus massoniana*, показано, что наиболее стабильными генами в данных тканях являются *ACT* (Chen et al., 2016; Mo et al., 2019) и *upLOC* (Mo et al., 2019). Исследуемый ген *PGK1* стабильно экспрессировался только в молодых стеблях (Mo et al., 2019). На растениях взрослых деревьев *Pinus sylvestris* L. для исследования экспрессии генов в тканях ствола в качестве генов-нормализаторов использовали ге-

ны, кодирующие актин и гистон (Lim et al., 2016), при этом исследований стабильности экспрессии потенциальных референсных генов в этих тканях ранее не проводилось. В нашем исследовании мы выбрали в качестве потенциальных референсных генов актин (*Actin1*), тубулин (α -, β -*Tubulin*) (относящиеся к группе структурных генов), глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа (*GAPDH*), убиквитин (*UBQ*) (гены регуляции метаболизма) и *Efla* (ген, участвующий в трансляции) (Han et al., 2012; Niu et al., 2015). Для вышеперечисленных генов была проведена работа по оценке специфичности и эффективности амплификации. Было показано, что при работе с изучаемыми тканями постановка ПЦР с высокой концентрацией кДНК приводит к получению завышенных значений эффективности ПЦР, рассчитанной по методу стандартных разведений (рис. 2). Расчетная величина эффективности реакции более 100% может наблюдаться при наличии в смеси ПЦР различных ингибиторов (Sves et al., 2015). Таким образом, даже получение целостного препарата РНК с требуемыми значениями спектрофотометрических показателей, не исключают возможность наличия различных примесей в смеси ПЦР, искажающих результаты анализа. Использование метода расчета эффективности ПЦР индивидуально в каждой реакции (Ramakers et al., 2003) и соблюдение рекомендуемых соотношений концентрации кДНК и других компонентов смеси позволяет получать достоверные, воспроизводимые данные при помощи ПЦР-РВ.

Оценка стабильности потенциальных референсных генов показала сходные результаты при использовании двух пакетов программ – BestKeeper и NormFinder. При анализе BestKeeper в “ксилеме” и “флоэме” все изученные гены имели $SD < 1$, что говорит об их стабильной экспрессии в этих тканях. В ходе исследования было показано, что по мере продвижения к центру ствола, стабильность экспрессии большинства изученных референсных генов снижается: в SWint гены *Actin1*, α -*Tubulin*, β -*Tubulin*, *Efla* имели низкие значения r (от 0.69 до 0.91) (табл. 3), а в TZ анализ BestKeeper оценил ген *GAPDH* ($SD = 0.87$, $r = 0.97$) как единственный стабильно экспрессирующийся ген. Расчет относительной экспрессии целевых генов – *PXY* и *PAL* в тканях ствола разновозрастных деревьев *P. sylvestris* с применением в качестве нормализатора гена *GAPDH* показал значимые различия между тканями ствола в уровнях относительной экспрессии (рис. 6).

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук”.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания Институт леса — обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук” — “Комплексное исследование факторов продуктивности таежных лесов” (2021–2025 гг., рук. А.М. Крышень, Минобрнауки России, 0185-2021-0018), номер госрегистрации — 121061500082-2, при частичной финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 21-14-00204 (2021–2023 гг., рук. Н.А. Галибина) — филогенетический анализ референсных и целевых генов).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При выполнении данного исследования люди и животные не использовались в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Су М., Цзан В., Яо Н., Хуан М. Выделение высококачественной РНК из различных тканей *Populus* // Физиология растений. 2009. Т. 56. № 5. С. 791.
- Antonova G.F., Stasova V.V. Effects of environmental factors on wood formation in larch (*Larix decidua* Ldb.) stems // Trees. 1997. V. 11. P. 462.
<https://doi.org/10.1007/PL00009687>
- Bustin S.A., Beaulieu J.F., Huggett J., Jaggi R., Kibenge F.S., Olsvik P.A., Penning L.C., Toegel S. MIQE précis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments // BMC Mol. Biol. 2010. V. 11. P. 74.
<https://doi.org/10.1186/1471-2199-11-74>
- Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wittwer C.T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments // Clinical Chemistry. 2009. V. 55. P. 611.
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Chan K.L., Ho C.L., Namasivayam P., Napis S. A simple and rapid method for RNA isolation from plant tissues with high phenolic compounds and polysaccharides // Protocol Exchange. 2007.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2007>
- Chang E., Shi S., Liu J., Cheng T., Xue L., Yang X., Yang W., Lan Q., Jiang Z. Selection of reference genes for quantitative gene expression studies in *Platycladus orientalis* (Cupressaceae) Using real-time PCR // PLoS One. 2012. V. 7(3): e33278.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033278>
- Chang S., Puryear J., Cairney J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees // Plant Mol. Biol. Report. 1993. V. 11. P. 113.
- Chen H., Yang Z., Hu Y., Tan J., Jia J., Xu H., Chen X. Reference genes selection for quantitative gene expression studies in *Pinus massoniana* L. // Trees. 2016. V. 30. P. 685.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205182>
- Chen Y., Weining S., Daggard G. Preparation of total RNA from a very small wheat embryo suitable for differential display // Ann. Appl. Biol. 2003. V. 143. P. 261.
<https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2003.tb00293.x>
- Chi X., Hu R., Yang Q., Zhang X., Pan L., Chen N., Chen M., Yang Z., Wang T., He Y., Yu S. Validation of reference genes for gene expression studies in peanut by quantitative real-time RT-PCR // Mol. Genet. Genomics. 2012. V. 287(2). P. 167.
<https://doi.org/10.1007/s00438-011-0665-5>
- de Castro E., Sigrist C.J., Gattiker A., Bulliard V., Langendijk-Genevaux P.S., Gasteiger E., Bairoch A., Hulo N. ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins // Nucleic Acids Res. 2006. V. 34. P. 362.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkl124>
- Fischer U., Kucukoglu M., Helariutta Y., Bhalerao R.P. The dynamics of cambial stem cell activity // Annu. Rev. Plant Biol. 2019. V. 70. P. 293.
<https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-100402>
- Ghawana S., Paul A., Kumar H., Kumar A., Singh H., Bhardwaj P.K., Rani A., Singh R.S., Raizada J., Singh K., Kumar S. An RNA isolation system for plant tissues rich in secondary metabolites // BMC Res. Notes. 2007. V. 4. P. 85.
<https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-85>
- Han X., Lu M., Chen Y., Zhan Z., Cui Q., Wang Y. Selection of reliable reference genes for gene expression studies using real-time PCR in tung tree during seed development // PLoS One. 2012. V. 7. P. e43084.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043084>
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets // Mol. Biol. Evol. 2016. V. 33. P. 1870.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Lal L., Sahoo R., Gupta R.K., Sharma P., Kumar S. RNA isolation from highphenolic tea leaves and apical buds // Plant Mol. Biol. Rep. 2001. V. 19. P. 181a.
<https://doi.org/10.1007/BF02772161>
- Lim K.J., Paasela T., Harju A., Venäläinen M., Paulin L., Auvinen P., Kärkkäinen K., Teeri T.H. Developmental changes in scots pine transcriptome during heartwood formation // Plant Physiol. 2016. V. 172. P. 1403.
<https://doi.org/10.1104/pp.16.01082>
- Marchler-Bauer A., Bryant S.H. CD-Search: protein domain annotations on the fly Nucleic // Acids Res. 2004. V. 32. P. 327.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkh454>
- Meyer-Gauen G., Herbrand H., Pahnke J., Cerff R., Martin W. Gene structure, expression in *Escherichia coli* and biochemical properties of the NAD1-dependent glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase from *Pinus sylvestris* chloroplasts // Gene. 1998. V. 209. P. 167.
[https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(98\)00034-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(98)00034-1)
- Mo J., Xu J., Jin W., Yang L., Yin T., Shi J. Identification of reference genes for quantitative gene expression studies in *Pinus massoniana* and its introgression hybrid //

- Forests 2019. V. 10. P. 787.
<https://doi.org/10.3390/f10090787>
- Niu X., Zhang G., Xu J., Tao A., Fang P., Su J. Selection of reliable reference genes for quantitative real-time PCR gene expression analysis in Jute (*Corchorus capsularis*) under stress treatments // *Frontiers in Plant Science*. 2015. V. 6. P. 848.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00848>
- Ramakers C., Ruijter J.M., Deprez R.H., Moorman A.F. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data // *Neurosci. Lett*. 2003. V. 339. P. 62.
[https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(02\)01423-4](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(02)01423-4)
- Saitou N., Nei M. The Neighbor-Joining Method – a new method for reconstructing phylogenetic trees // *Mol. Biol. Evol.* 1987. V. 4. P. 406.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Svec D., Tichopad A., Novosadova V., Pfaffl M.W., Kubista M. How good is a PCR efficiency estimate: recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments // *Biomol. Detect. Quantif.* 2015. V. 3. P. 9.
<https://doi.org/10.1016/j.bdq.2015.01.005>
- Taylor S., Wakem M., Dijkman G., Alsarraj M., Nguyen M. A practical approach to RT-qPCR—Publishing data that conform to the MIQE guidelines // *Methods*. 2010. V. 50. P. S1.
<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2010.01.005>
- Zhu P., Ma Y., Zhu L., Chen Y., Li R., Ji K. Selection of suitable reference genes in *Pinus massoniana* Lamb. under different abiotic stresses for qPCR normalization // *Forests*. 2019. V. 10. P. 632.
<https://doi.org/10.3390/f10080632>
- Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR // *Nucleic Acids Res.* 2001. V. 29. P. E45.
<https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>

High-Quality RNA Extraction and Evaluation of Reference Genes for qPCR Assay of *Pinus sylvestris* L. Trunk Tissues

Yu. L. Moshchenskaya^{1,*}, N. A. Galibina¹, M. A. Korzhenevskiy¹,
 T. V. Tarelkina¹, K. M. Nikerova¹, and O. V. Chirva¹

¹Forest Research Institute of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russian
 *e-mail: moshchenskaya@krc.karelia.ru

Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) is a species of tree with heartwood (HW), which is forming during aging of sapwood (SW). Due to clear-cut border between SW and HW *P. sylvestris* should be used as a model woody plant for studying patterns of HW formation. Currently, molecular genetic methods are used to study the processes of trunk tissues formation in woody plants often. A feature of trunk tissues of coniferous trees is a high content of secondary metabolites, a low content of nucleic acids, and potential partial degradation of RNA. In this work we discuss the choice of most successful method for extraction a high-quality RNA for real-time PCR (RT-PCR) in *P. sylvestris* trunk tissues along the radial vector “conductive phloem/cambial zone – differentiating xylem – exterior part of SW (1–2 annual rings) – interior part of SW (1–2 annual rings afore transition zone (TZ)) – TZ (2 annual rings afore HW)” for reproducible RT-PCR data. The expression stability of six potential reference genes (*Actin1*, α -*Tubulin*, β -*Tubulin*, *Ef1a*, *GAPDH*, *UBQ*) was assessed in all describe tissues. Differences in expression levels of target genes are shown by data normalization using reference genes with different stability of expression.

Keywords: *Pinus sylvestris*, RNA extraction, normalization, RT-PCR, reference genes, gene expression

РОЛЬ КОМПОНЕНТОВ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА В ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ ЭКТОДЕРМАЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

© 2023 г. А. А. Огнивцев^а, Е. П. Калабушева^{а, *}, Е. О. Осидак^б,
С. П. Домогатский^{с, d}, Е. А. Воротеляк^а

^аИнститут биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия

^бООО фирмы “ИМТЕК”, 3-я Черепковская ул., 15А, Москва, 121552 Россия

^сНациональный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии
им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи, ул. Гамалеи, 18, Москва, 123098 Россия

^dНациональный медицинский исследовательский центр кардиологии
им. Академика Е.И. Чазова, 3-я Черепковская ул., 15А, Москва, 121552 Россия

*e-mail: Kalabusheva.e@gmail.com

Поступила в редакцию 08.06.2022 г.

После доработки 16.09.2022 г.

Принята к публикации 10.10.2022 г.

Одним из важнейших событий эмбрионального развития млекопитающих является разделение эктодермы на покровную и нейроэктодерму. Сигнальные каскады, индуцируемые факторами роста и цитокинами, вовлеченными в эти процессы, детально изучаются последние десятилетия. В то же время вклад компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ) в эти направления дифференцировки остается неизвестным для млекопитающих, в то время как важнейшая роль ВКМ в этом процессе показана на других модельных организмах. Для оценки влияния компонентов ВКМ на формирование эктодермальных производных мы моделировали нейральную и эпидермальную дифференцировку индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека с использованием субстратов, состоящих из различных компонентов ВКМ, а также исследовали вовлеченность в процессы дифференцировки одного из центральных звеньев сигнальных каскадов ВКМ, транскрипционного коактиватора YAP1. Наши результаты выявили стимулирующий эффект ламинина 332 на ранние этапы эпидермальной дифференцировки и коллагенов I и III типов на выделение глиально-го направления поздней нейральной дифференцировки.

Ключевые слова: эпидермальная дифференцировка, нейральная дифференцировка, ИПСК, ламинин, коллаген, YAP1

DOI: 10.31857/S047514502301010X, **EDN:** FRONQI

ВВЕДЕНИЕ

ВКМ является важнейшим компонентом стволовой ниши. В его многочисленные функции входит поддержание стволового состояния, стимуляция и выбор направления дифференцировки (Brafman et al., 2013; Long et al., 2016), контроль пролиферации (Soulintzi, Zagris, 2007; Ford-Periggs et al., 2003) и обеспечение жизнеспособности клеток (Costell et al., 1999). Огромную роль он играет в эмбриогенезе на ранних этапах гаструляции и нейруляции (Walma, Yamada, 2020). Стоит отметить, что роль компонентов ВКМ на этих этапах эмбриогенеза наиболее изучена на насекомых (Meyer et al., 2014), рыбах (Araya et al., 2016), амфибиях (Feledy et al., 1999; Linker et al., 2009) и птицах (Liem et al., 1995; Zagris et al., 2011). Данных о роли ВКМ в дифференцировке эктодермы

млекопитающих на нейральную и покровную ткани чрезвычайно мало, некоторые авторы обзорных статей напрямую отмечают пробел в этой области (Long, Huttner, 2019). В то же время данный вопрос актуален как для исследований фундаментальных процессов протекания эмбриогенеза млекопитающих, так и в контексте изучения патологий эмбриона человека и разработки тест-систем на основе дифференцировки ИПСК для фармакологических исследований.

Использование эмбриональных и индуцированных ПСК человека для получения дифференцированных культур нейральных, эпидермальных, мезенхимных и других клеток является одним из самых современных способов моделирования процессов морфо- и органогенеза человека (Rust et al., 2006; Qiao et al., 2012; Brafman et al., 2013; Warmflash et al.,

2014; Gomez et al., 2019). Этот подход в сочетании с технологиями секвенирования единичных клеток эмбрионов мыши (Mohammed et al., 2017; Pijuan-Sala et al., 2019), позволяет определить ключевые факторы, контролирующие процессы гистогенеза и органогенеза в эмбриональном развитии млекопитающих. Основные подходы при разработке протоколов дифференцировки отталкиваются от данных, наработанных при изучении механизмов дифференцировки *in vivo* в эмбриогенезе модельных организмов. В частности, протоколы индукции нейральной и эпидермальной дифференцировки были разработаны по похожему плану. Основными методами нейральной индукции являются получение нейросфер и двойное SMAD-ингибирование (Wattanapanitch et al., 2014; Pauly et al., 2018). Получение нейросфер из эмбрионидных телец имитирует процесс формирования нервной трубки в эмбриогенезе (Zhang et al., 2001). В основе метода двойного SMAD-ингибирования лежит имитация выделения нейроэктодермы в процессе дифференцировки по умолчанию путем добавления ингибиторов сигнальных каскадов BMP и TGF β (Ozair et al., 2013). Эпидермальную судьбу эктодермальные клетки эмбриона мыши приобретают на E7.0, что было показано на эксплантах эпидермальной (Li et al., 2013). Эпидермальная индукция требует добавления фактора BMP4, а также ретиноевой кислоты, необходимой для созревания кератиноцитов (Itoh et al., 2011; Itoh et al., 2013; Kogut et al., 2014). В то время как необходимые факторы роста или заменяющие их химические соединения сохраняются в любых модификациях протоколов дифференцировки, компоненты внеклеточного матрикса, используемые в качестве субстратов для культивирования, различаются. В качестве классического субстрата используют матригель – продукт клеточной линии саркомы мыши, по составу сходный с базальной мембраной. Данный субстрат подходит для культивирования и поддержания культуры ПСК, поэтому часто используется при индукции дифференцировки. Протоколы дифференцировки кератиноцитов также включают в себя коллагены I и IV типов (Itoh et al., 2011; Kim et al., 2018; Domingues et al., 2022), в то время как протоколы нейральной дифференцировки включают фибронектин и ламинин (Ma et al., 2008). Тем не менее, единого мнения, такого как в случае применения матригеля для культуры ПСК, у исследователей нет.

Внеклеточный матрикс оказывает комплексное воздействие на клетки: активация лиганд-рецепторных сигнальных путей за счет связывания белков фокальных контактов и полудесмосом (Ma et al., 2008; Vraffman et al., 2013), передача механических сигналов микроокружения – жесткость матрикса оказывает влияние на клеточный цитоскелет, что в свою очередь активирует внутриклеточные сигнальные каскады (Evans et al.,

2009), модуляция сигнальных молекул в качестве кофакторов (Lin et al., 2021), и т.д. Все эти сигналы суммируются, оказывая результирующие воздействия на транскриптомный профиль клетки, а, следовательно, и на выбор ею определенного направления дифференцировки. Одним из центральных звеньев суммарного эффекта от всех параметров ВКМ является сигнальный путь белка YAP1 (Hao et al., 2014; Nardone et al., 2017; Cai et al., 2021). В нашем исследовании мы анализировали влияние компонентов ВКМ на эффективность нейральной и эпидермальной дифференцировки ИПСК, а также вовлеченность сигнального каскада YAP1 в этот процесс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование и дифференцировка ИПСК

ИПСК человека линии “Kyoto”, полученные из клеточной коллекции ATCC (кат № ATCC[®] ACS-1023), культивировали в среде mTeSR1 (StemCell Technologies) в атмосфере 5% O₂, 5% CO₂ при температуре 37°C с ежедневной сменной среды. Пассирование проводили реагентом ReLeSR (StemCell Technologies) согласно рекомендации производителя. При пассировании добавляли ROCK-ингибитор Y-27632 (StemCell Technologies) в концентрации 10 мкМ на 1 сут.

Дифференцировку в эпидермальном направлении стимулировали добавлением 1 мкМ ретиноевой кислоты (Sigma Aldrich) и 25 нг/мл BMP4 (Sigma Aldrich) на среде DK-SFM (Invitrogen) в течение 4-х суток. Далее культуру вели в атмосфере 21% O₂, 5% CO₂ при температуре 37°C на среде DK-SFM с заменой среды через день.

Для индукции нейральной дифференцировки ИПСК диссоциировали аккутазой (StemCell Technologies), суспензию помещали в низкоадгезивные планшеты (Corning) в среде Neurobasal medium (Gibco), с добавлением 50× Neural Induction Supplement (Gibco), 200 мМ Glutamax (Gibco) и пенициллина/стрептомицина (Gibco) в концентрациях 0.25 и 10 мкг/мл для формирования нейросфер, которые культивировали в атмосфере 5% O₂, 5% CO₂ при температуре 37°C с ежедневной сменной 1/2 среды. Для оценки эффективности ранней дифференцировки нейросферы высаживали на субстраты на 5 сут после формирования нейросфер, для проведения работ, связанных с поздними этапами дифференцировки – на 21 сут. После прикрепления к матриксу для культивирования использовали среду DMEM/F12 (ПанЭко), с добавлением 50× B-27 Supplement (Gibco), 100× N-2 Supplement (Gibco), 200 мМ Glutamax и пенициллина/стрептомицина в концентрациях 0.25 и 10 мкг/мл соответственно.

Эксперименты по анализу влияния компонентов ВКМ на протекание ранних этапов нейральной и эпидермальной дифференцировки проводили в 6 независимых биологических повторах, для поздних этапов нейральной дифференцировки использовали 3 независимых биологических повтора.

Выделение и культивирование первичных кератиноцитов

Биоптаты кожи здоровых взрослых доноров, полученные при косметологических операциях из МНИОИ им. П.А. Герцена с информированного согласия пациентов, промывали раствором Хэнкса (ПанЭко) с добавлением 3 мг/мл гентамицина. В работе использован биоматериал от доноров женского пола в возрасте 27, 35 и 37 лет. Далее хирургически удаляли дерму и помещали в 0.2% раствор диспазы (Gibco) и инкубировали в течение ночи при 4°C. Эпидермис отделяли механически и диссоциировали в растворе 0.25% трипсина (Gibco)/фосфатного солевого буфера (ПанЭко) 1 : 1 в течение 30 мин. Суспензию кератиноцитов промывали фосфатным солевым буфером и культивировали на среде СпТ-07 (CellnTec) в атмосфере 21% O₂, 5% CO₂ при температуре 37°C.

Сорбирование компонентов ВКМ

В экспериментах использовали компоненты ВКМ человека производства биотехнологической фирмы «ИМТЕК» (Россия): коллаген I (НС11, плацента человека), коллаген III (НС33, плацента человека), ламинин 332 (Hvnc-C, плацента человека). Компоненты ВКМ сорбировали в концентрации 12 мкг/мл. Матригель (Corning) сорбировали в концентрации 100 мкг/мл.

Для культивирования нейросфер использовали матригель, который полимеризовали согласно инструкции производителя, и коллаген I типа. К раствору коллагена I типа добавляли эмбриональ-

ную телячью сыворотку (HyClone), среду M199 (ГУП по производству бактериальных и вирусных препаратов ИПВЭ им. М.П. Чумакова) и Glutamax (Gibco), далее для полимеризации нейтрализовали добавлением 0.34 М NaOH (ХЧ Фарм), бикарбоната натрия (ПанЭко) и NEPER (Sigma Aldrich).

Количественный ПЦР-анализ

РНК изолировали реактивом RNazol®RT (MolecularResearchCenter) по протоколу, рекомендованному производителем. Удаление геномной ДНК и обратную транскрипцию проводили с использованием “Quantitect®ReverseTranscriptionKit” (Qiagen) по инструкции производителя. Для проведения обратной транскрипции использовали 1 мкг РНК. Для проведения ОТ-ПЦР использовали набор “qPCRmix-HS SYBR + Low-ROX” (Евроген). Количественный ПЦР анализ проводили при помощи амплификатора LightCycler96 (Roche). Использовали следующую программу: 10 мин при 95°C, 45 циклов, каждый из которых включал в себя: 20 с при 95°C, 20 с при 60°C и 30 с при 72°C. Все эксперименты выполнены с трехкратными техническими и биологическими повторами. Содержание продуктов в каждой пробе определяли методом $2^{-\Delta\Delta Cq}$, результаты нормировали на экспрессию GAPDH и HPRT. На приведенных в работе диаграммах представлены результаты анализа экспрессии, нормированные на GAPDH. Использованные праймеры представлены в табл. 1.

Данные на графиках представлены в виде среднего арифметического с разбросом в виде ошибки среднего. Для статистического анализа использовали программное обеспечение GraphPAD Prism 8.0.1. Статистическую значимость оценивали методом двухфакторного дисперсионного анализа, парные сравнения проводили методом Шидака.

Таблица 1. Праймеры для количественного ПЦР-анализа экспрессии генов человека

Название гена	Последовательность прямого праймера	Последовательность обратного праймера
CTGF	5'GAGACGAACGTCCATGCTG3'	5'TGTGCACCGCCAAAGATG3'
CYR61	5'GGGCTGCATTCCCTCTGTGT3'	5'AAGGAGGCCGTCCTGGTCC3'
GFAP	5'CCTCGCCCTCTAGCAGCTTC3'	5'GGGAGGCGGCCAGTTATCA3'
YAP1	5'AGAGAATCAGTCAGAGTGCTCCA3'	5'TTCAGCCGCAGCCTCTCC3'
SOX2	5'CCCCTGTGGTTACCTCTTCCTCC3'	5'GTGCCGTTAATGGCCGTGCC3'
PAX6	5'CAGGGCAATCGGTGGTAGTAAA3'	5'TACGCTTGGTATGTTATCGTTGGT3'
GAPDH	5'CCATGTTCTCATGGGTGTG3'	5'GGTGCTAAGCAGTTGGTGGTG3'
HPRT	5'ACCAGGTTATGACSTTGATT3'	5'AAGTTGGCCTAGTTTATGTT3'

Иммуноцитохимия

Культуры фиксировали 4% раствором параформальдегида (Sigma-Aldrich) в течение 15 минут. Далее вносили в лунки первичные антитела (табл. 2), разведенные в фосфатном буфере с добавлением 2.5% бычьего сывороточного альбумина (Химмед), 1% Triton X-100 (AppliChem) и 1% Tween20 (AppliChem). Инкубировали при 4°C в течение ночи.

Далее препараты промывали фосфатным буфером и вносили раствор вторичных антител (табл. 3), конъюгированных с флюорофорами. Ядра докрашивали DAPI (Invitrogen) в концентрации 1 мг/мл. Трехмерные культуры заключали в пересыщенный раствор фруктозы.

Для окрашивания актинового цитоскелета клеток использовали AlexaFluor 488® phalloidin (Thermofisher).

Микроскопия

Фотографии культур в фазовом контрасте получали на инвертированном микроскопе Olympus IX73, оснащенного камерой Olympus U-TV0.63XC. Для получения цифровых изображений использовали программное обеспечение Olympus cellSens Dimension.

Флуоресцентную микроскопию клеток проводили при помощи инвертированного микроскопа Olympus IX73, оснащенного камерой Olympus

U-TV0.63XC. Для получения цифровых изображений использовали программное обеспечение Olympus cellSens Dimension.

Конфокальную микроскопию клеток проводили при помощи микроскопа Zeiss LSM 880. Для получения цифровых изображений использовали программное обеспечение Zeiss Zen Black. Обработку полученных изображений осуществляли при помощи программного обеспечения ImageJ.

Анализ фотографий клеточных культур

При анализе использовали программное обеспечение CellProfiler. Долю автоматически подсчитанных положительных по специализированным маркерам ядер рассчитывали относительно фотографий, окрашенных DAPI. Показатель удельной площади актинового цитоскелета (площадь клетки) получали путем деления общей площади, занимаемой актиновым цитоскелетом, на количество ядер (мкм²). Показатель удельной площади фокальных контактов (площадь фокальных контактов) получали путем деления общей площади, занимаемой фокальными контактами, на количество ядер (мкм²). При проведении количественного анализа на каждый биологический эксперимент делали 3 технических повтора, с каждого из которых получали не менее 10 снимков. Данные на графиках представлены в виде среднего арифметического с разбросом в виде ошибки среднего. Для статистического анализа использовали про-

Таблица 2. Используемые в работе первичные антитела

Антиген	Каталожный номер	Производитель	Разведение	Подтип
β-Tubulin III	MAb-1637	Sigma-Aldrich	1 : 200	Моноклональные IgG1 мыши, клон TU-20
P63	Ab735	Abcam	1 : 50	Моноклональные IgG2a кролика, клон 4A4
NeuN	Ab104225	Abcam	1 : 200	Поликлональные IgG кролика
Keratin 14	Ab181595	Abcam	1 : 500	Моноклональные IgG кролика, клон EPR17350
Vinculin	Ab129002	Abcam	1 : 250	Моноклональные IgG кролика, клон EPR8185
YAP1	Ab52771	Abcam	1 : 100	Моноклональные IgG кролика, клон EP1674Y
Sox2	Ab92494	Abcam	1 : 100	Моноклональные IgG кролика, клон EPR3131
GFAP	Mab5628	Chemicon	1 : 200	Моноклональные IgG2a мыши
Keratin 18	Ab668	Abcam	1 : 100	Моноклональные IgG1 мыши, клон C-04

Таблица 3. Используемые в работе вторичные антитела

Антиген, подтип	Флюорофор	Каталожный номер	Производитель	Разведение
Goat anti-rabbit IgG (H + L) Secondary Antibody	AlexaFluor 488	A-11008	Invitrogen	1 : 500
Donkey anti-rabbit IgG (H + L) Secondary Antibody	AlexaFluor 546	A-10040	Invitrogen	1 : 500
Donkey anti-mouse IgG (H + L) Secondary Antibody	AlexaFluor 546	A-10036	Invitrogen	1 : 500
Goat anti-mouse IgG (H + L) Secondary Antibody	AlexaFluor 488	A-32723	Invitrogen	1 : 500

граммное обеспечение GraphPAD Prism 8.0.1. Статистическую значимость оценивали методом однофакторного дисперсионного анализа, парные сравнения проводили методом Шидака.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние компонентов ВКМ на индукцию ранней эпидермальной дифференцировки

В работе мы рассматривали влияние ламинина 332 и коллагена I типа на индукцию эпидермальной дифференцировки. Ламинин 332 является одним из компонентов базальной мембраны, его применение для культивирования в виде субстрата (Kariya et al., 2012) или стимуляция его продукции путем генетической модификации (De Rosa et al., 2019) в первичных эпидермальных кератиноцитах позволяет сохранить пул стволовых клеток. Коллаген I типа относится к интерстициальным коллагенам, он используется во многих протоколах в качестве дополнительного индуктора эпидермальной дифференцировки (Itoh et al., 2011; Kim et al., 2018). В качестве дополнительного субстрата сравнения мы использовали коллаген III типа, который также относится к интерстициальным коллагенам, однако при этом не используется в индукции эпидермальной дифференцировки. В качестве контроля мы использовали матригель. Дифференцировку индуцировали внесением BMP4 и ретиноевой кислоты.

Эффективность дифференцировки мы оценивали на основании динамики экспрессии специализированных маркеров. На каждом из исследуемых субстратов мы наблюдали исчезновение SOX2, ключевого фактора плюрипотентности и нейтральной дифференцировки, последовательное появление кератинов 18 и 14, возникновение экспрессии ключевого регулятора эпидермальной дифференцировки P63 (рис. 1а). Визуально уровни экспрессии P63 и кератина 14 не различались между группами. В контроле и на субстрате из коллагена III типа наблюдали единичные кератин 18 – положительные клетки, что свидетельствовало о задержке дифференцировки. Количественно оценили долю P63-положительных ядер дифференцирующихся кератиноцитов на разных субстратах (рис. 1б). Результаты показывают, что ламинин 332 статистически значимо повышает эффективность дифференцировки, в то время как коллагены снижают процентное содержание P63⁺ клеток.

В условиях культивирования компоненты ВКМ контролируют процессы клеточной дифференцировки за счет стимуляции клеточной адгезии и формирования специализированных контактов. Мы оценили изменения площади клеток и площади фокальных контактов при индукции эпидермальной дифференцировки при культивиро-

вании на различных субстратах из сорбированных компонентов ВКМ с целью поиска взаимосвязи между исследуемыми параметрами и эффективностью дифференцировки. Площадь клетки и площадь фокальных контактов измеряли с использованием программного обеспечения Cell Profiler на основе фотографий иммуногистохимического выявления актина и винкулина (рис. 2а). Наши результаты показали тенденцию к увеличению площади клетки в культурах на сорбированных коллагенах I и III типа, площадь фокальных контактов при этом пропорционально и статистически значимо возрастала (рис. 2б). Интересно, что с увеличением площади клеток и площади фокальных контактов снижалась эффективность эпидермальной дифференцировки.

Поскольку YAP1 является одним из центральных звеньев сигнальных каскадов ВКМ, а его активность критически важна для выживания кератиноцитов на ранних этапах дифференцировки эпидермиса мыши (Zhang et al., 2011), мы оценили экспрессию и локализацию белка YAP1 в дифференцирующихся кератиноцитах. Во всех исследуемых культурах выявили экспрессию YAP1, однако интенсивность сигнала иммуногистохимического выявления в культурах на коллагенах была значительно ниже в сравнении с контролем (рис. 3а). Различалась доля клеток с активной формой YAP1: на сорбированном коллагене I типа доля YAP1⁺ ядер была значительно снижена в сравнении с остальными субстратами (рис. 3б).

Тем не менее, на основании полученных данных мы можем говорить о более эффективном протекании ранних этапов эпидермальной дифференцировки на субстрате из ламинина 332, в то время как коллагены I и III типов снижали эффективность дифференцировки. Наши данные показывают, что эффективность дифференцировки не зависит от активности YAP1. Хотя мы наблюдали снижение доли P63-положительных и YAP1-положительных ядер в культуре на коллагене I типа, мы не отмечали подобных корреляций на остальных исследуемых субстратах. Независимость протекания ранних этапов дифференцировки в эктодермальном направлении от активации YAP1 отмечают и другие исследователи (Pagliari et al., 2021). Интересно, что снижение эффективности эпидермальной дифференцировки коррелирует с увеличением площади клетки и фокальных контактов. Данный эффект может быть связан со стимуляцией дифференцировки в альтернативных направлениях под воздействием коллагенов (Rasmussen, et al., 2015; Ozasa et al., 2021).

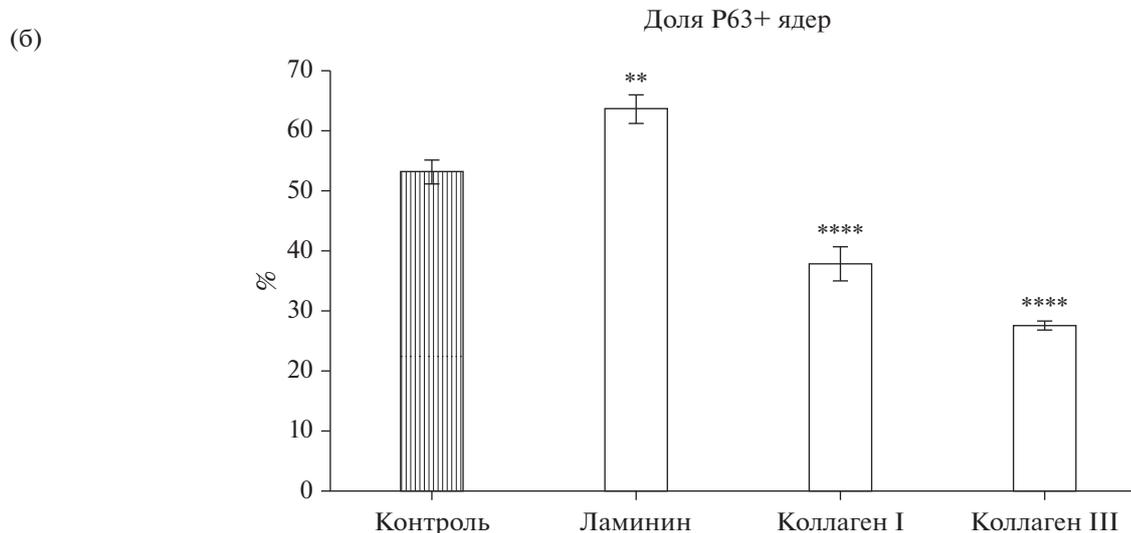
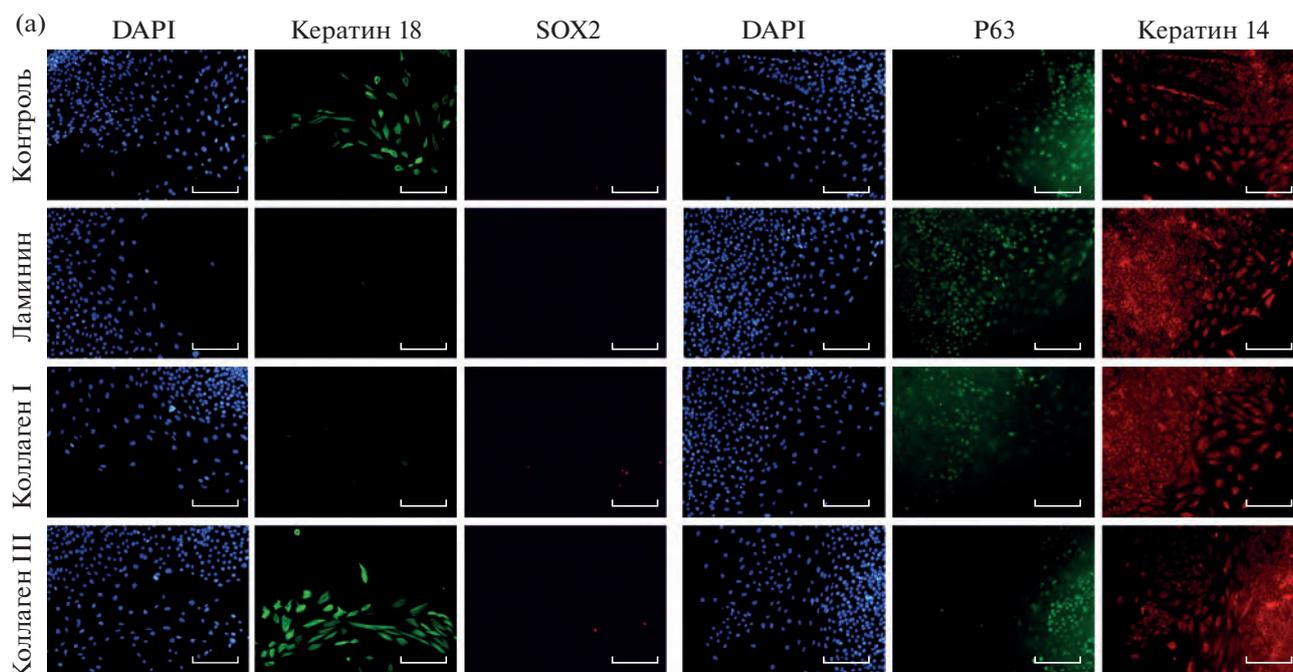


Рис. 1. Эффективность эпидермальной дифференцировки ИПСК на сорбированных компонентах ВКМ. (а) Иммуногистохимическое выявление маркеров эпидермальной дифференцировки. Флуоресцентная микроскопия. Масштабный отрезок 200 мкм. (б) Доля P63-положительных клеток в дифференцирующихся культурах. Тотальное количество клеток на изображение было посчитано на основании окрашивания DAPI. ** – статистически значимое различие при $p \leq 0.01$, **** – статистически значимое различие при $p \leq 0.0001$, тест Шидака для множественных сравнений.

1. Влияние компонентов ВКМ на поддержание культуры первичных эпидермальных кератиноцитов человека

Далее мы сравнили влияние исследуемых субстратов на ранних сроках индукции эпидермальной дифференцировки с эффектами, оказываемыми на уже дифференцированные клетки. Первичные кератиноциты культивировали на вышеописанных субстратах. Во всех анализируемых условиях 100% клеток были положительны по кератину 14 и P63

независимо от используемого субстрата (данные не приведены). Выявление YAP1 показало, что, независимо от используемого типа ВКМ, в низкой плотности кератиноциты имеют ядерную локализацию YAP1, которая по мере формирования конфлуэнтного монослоя становится цитоплазматической (рис. 4а).

Поскольку исследуемые нами субстраты не оказывали значительного влияния на экспрессию и локализацию YAP1, мы культивировали пер-

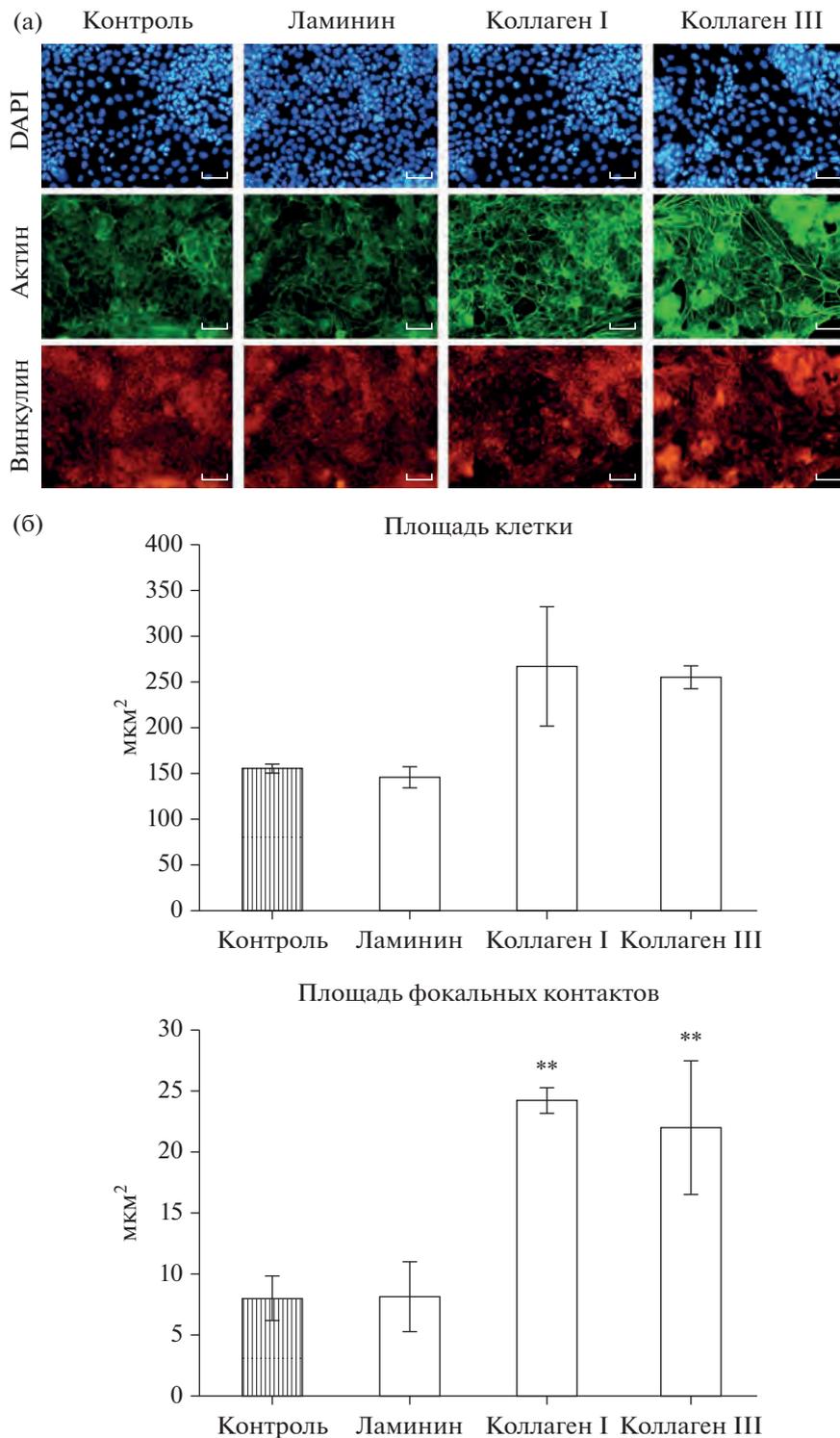


Рис. 2. Площадь клетки и фокальных контактов в дифференцирующихся культурах кератиноцитов на сорбированных компонентах ВКМ. (а) Иммуногистохимическое выявление актина и винкулина. Флуоресцентная микроскопия. Масштабный отрезок 200 мкм. (б) Количественный обсчет площади клеток и фокальных контактов. Точное количество клеток на изображение было посчитано на основании окрашивания DAPI. ** – статистически значимое различие при $p \leq 0.01$, тест ШИдака для множественных сравнений.

вичные кератиноциты в присутствии ROCK- и SRC-ингибиторов для исследования эффектов компонентов ВКМ при модулировании сигналь-

ного пути YAP1. Добавление SRC-ингибитора приводило к гибели клеточных культур как в данном, так и в последующих экспериментах, в то

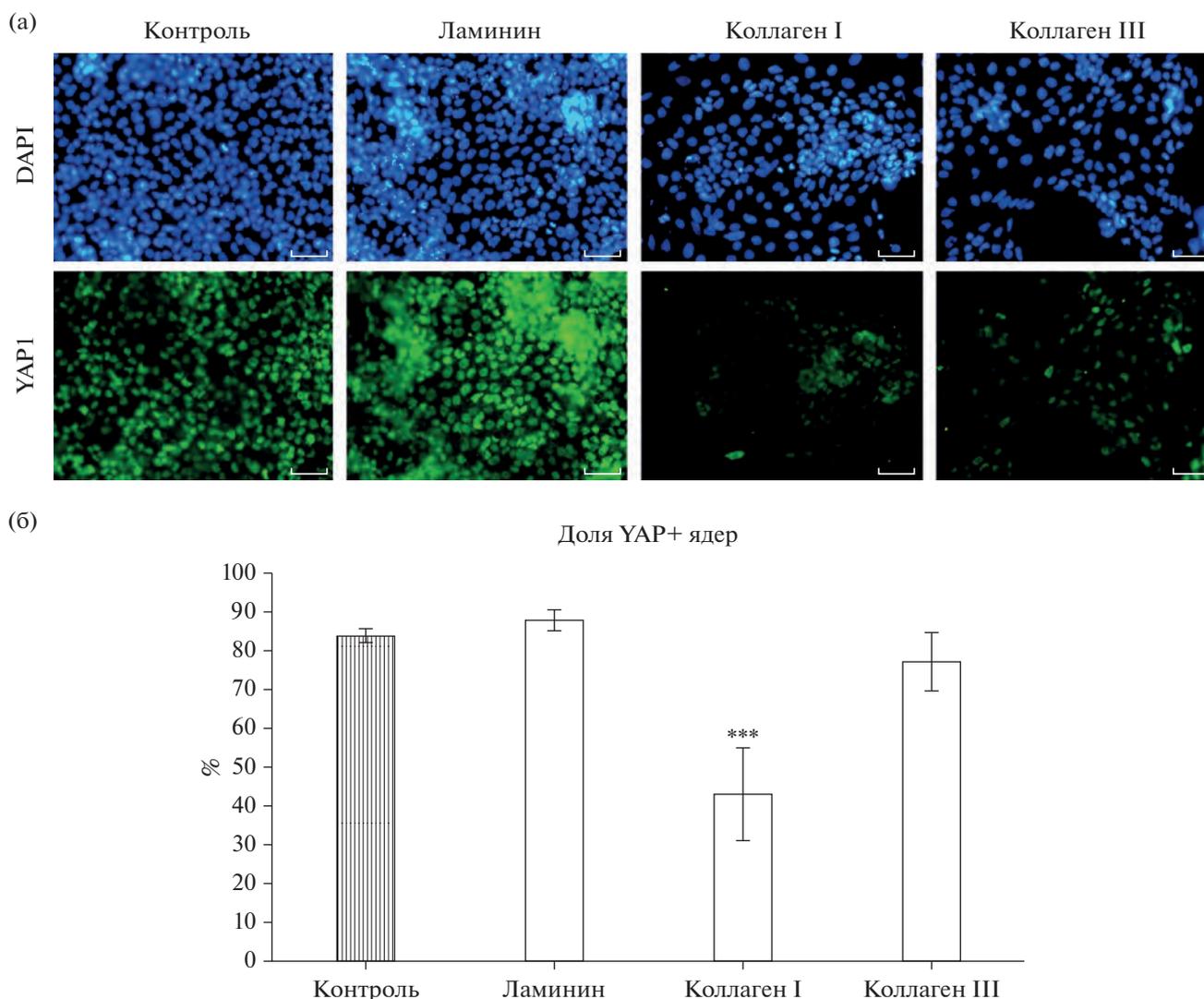


Рис. 3. Экспрессия и активация YAP1 в дифференцирующихся кератиноцитах на сорбированных компонентах ВКМ. (а) Иммуногистохимическое выявление YAP1. Масштабный отрезок 100 мкм. (б) Доля клеток с ядерной локализацией YAP1. Тотальное количество клеток на изображение было посчитано на основании окрашивания DAPI. *** – статистически значимое различие при $p \leq 0.001$, тест Шидака для множественных сравнений.

время как добавление ROCK-ингибитора увеличивало скорость роста кератиноцитов. Иммуногистохимическое выявление показало сохранение тенденции цитоплазматической локализации YAP1 при формировании конfluэнтного монослоя (рис. 4б). Измерение площади клетки и фокальных контактов также не выявило значимых отличий между разными субстратами, однако отразило увеличение плотности клеточной культуры, ассоциированное с увеличением пролиферации под воздействием ROCK-ингибитора (рис. 4в).

Поскольку мы не обнаружили разницы в активации YAP1 в культурах методом иммуногистохимического выявления, далее оценили экспрессию в исследуемых культурах самого YAP1 и его мишеней – CTGF и CYR61 (рис. 5). Мы не обна-

ружили статистически значимой разницы между экспрессией этих факторов в культурах на субстратах из различных компонентов ВКМ, однако ROCK-ингибитор значительно подавлял экспрессию как YAP1, так и его мишеней. Результаты ПЦР-анализа косвенно указывают на то, что, во-первых, ROCK-ингибитор действительно подавляет сигнальный каскад YAP1 в культуре первичных кератиноцитов, и, во-вторых, что субстрат не оказывает влияния на его активацию в этих клетках.

2. Влияние компонентов ВКМ на эффективность нейральной дифференцировки

Нейросферы культивировали в течение 5 и 21 суток, после чего высаживали на субстраты для

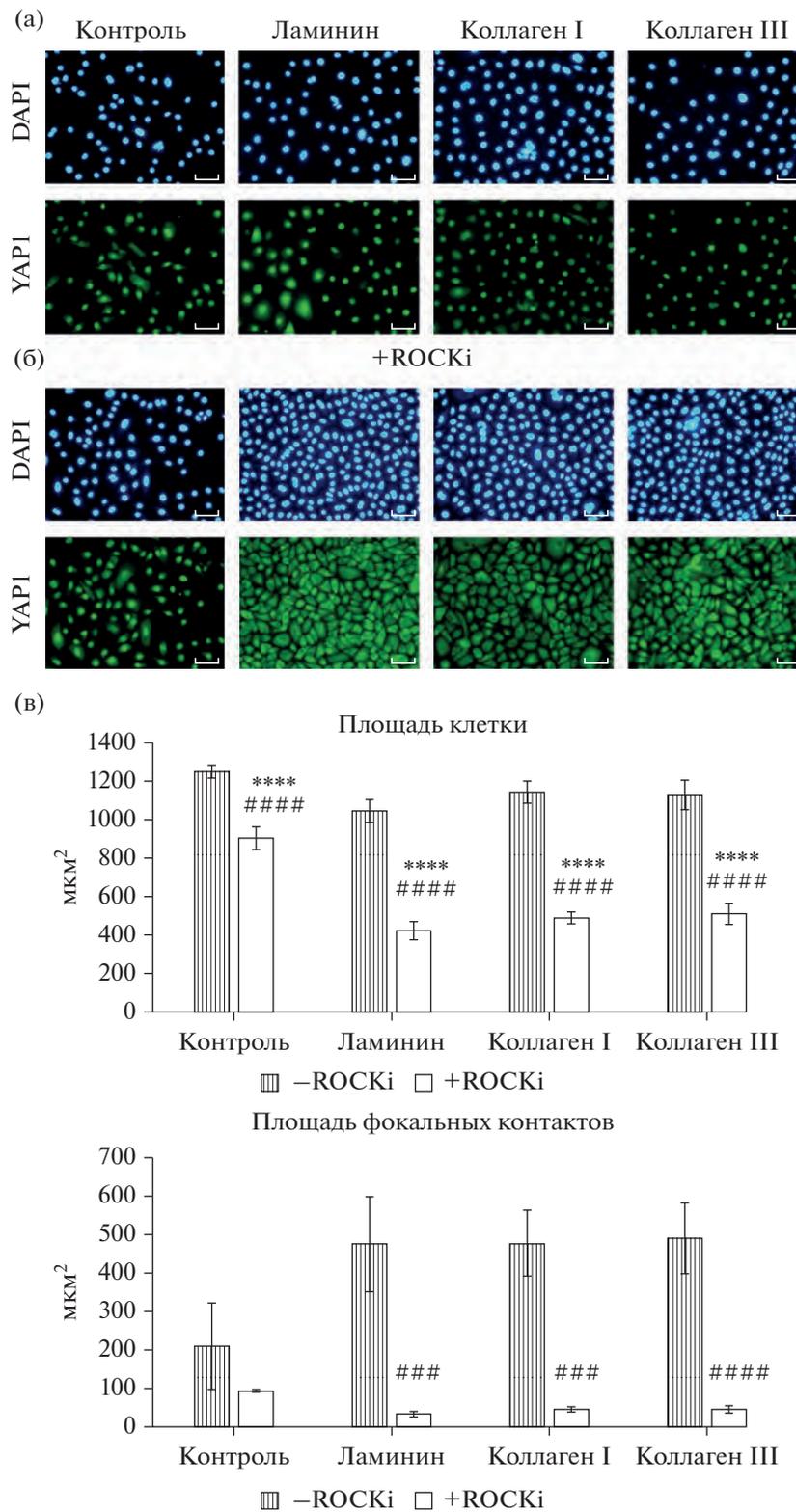


Рис. 4. Иммуногистохимическое выявление YAP1 в культурах первичных кератиноцитов на сорбированных компонентах ВКМ. (а) Контрoль. (б) Культуры с добавлением ROCK-ингибитора. Флуоресцентная микроскопия. Масштабный отрезок 50 мкм. (в) Количественный обсчет площади клеток и фокальных контактов. Тотальное количество клеток на изображение было посчитано на основании окрашивания DAPI. **** – статистически значимое отличие от контрольной группы при $p \leq 0.0001$, ### – статистически значимое отличие от группы без добавления ROCK-ингибитора при $p \leq 0.001$, #### – статистически значимое отличие от группы без добавления ROCK-ингибитора при $p \leq 0.0001$, тест Шидака для множественных сравнений.

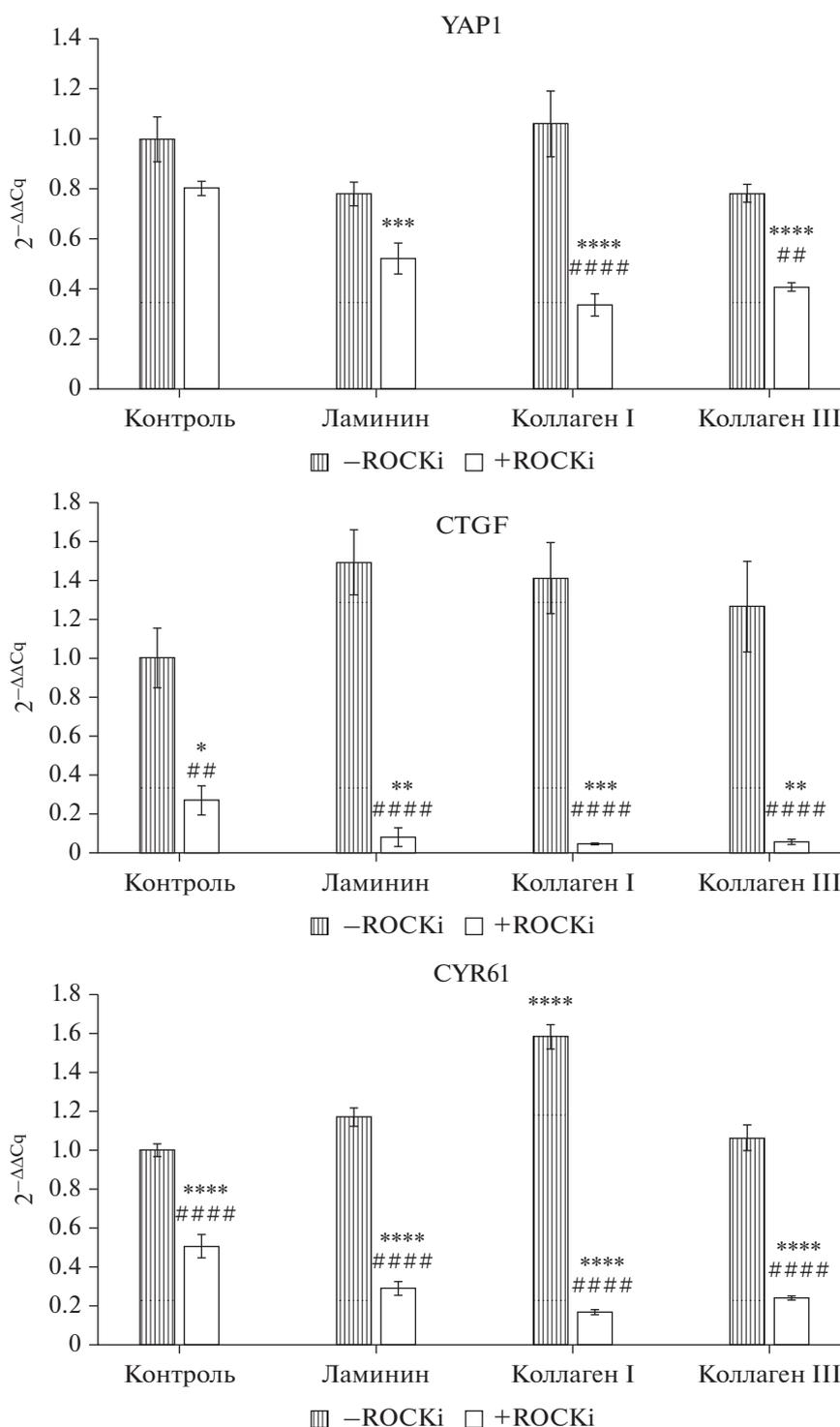


Рис. 5. Экспрессия YAP1 и его мишеней в культуре первичных кератиноцитов на субстратах из сорбированных компонентов ВКМ. Количественный ПЦР-анализ. Результаты нормализованы на уровень экспрессии GAPDH. * – статистически значимое отличие при $p \leq 0.05$, ** – при $p \leq 0.01$, *** – при $p \leq 0.001$, **** – при $p \leq 0.0001$ от контрольной группы. ## – статистически значимое отличие при $p \leq 0.01$, #### – при $p \leq 0.0001$ от группы без добавления ROCK-ингибитора, тест Шидака для множественных сравнений.

анализа влияния последних на ранние и поздние этапы нейральной дифференцировки, соответственно. Эффективность нейральной дифферен-

цировки мы оценивали на основании экспрессии специализированных маркеров – $\beta 3$ -тубулина, GFAP и SOX2.

После 5 сут культивирования, нейросферы одинаково эффективно адгезировали к сорбированным компонентам ВКМ, нейральные клетки мигрировали из нейросфер по субстрату (рис. 6а). Нейральные прогениторные клетки были положительны по SOX2 и $\beta 3$ -тубулину, однако мы не наблюдали экспрессии GFAP (рис. 6б). Таким образом, компоненты ВКМ не оказывали влияния на интенсивность дифференцировки на данном этапе.

Все культуры были положительны по YAP1, в отличие от индукции эпидермальной дифференцировки его локализация была преимущественно цитоплазматической (рис. 6в). Однако, высокая плотность клеток не позволила нам провести количественные обсчеты. Аналогичные затруднения возникли при подсчете размера площади клетки и фокальных контактов, поэтому этот анализ мы исключили. Добавление ROCK-ингибитора не оказывало влияния на экспрессию специализированных маркеров (данные не приведены). Тем не менее, мы проверили активность сигнального пути YAP1 методом количественного ПЦР-анализа (рис. 6г). ROCK-ингибитор подавлял экспрессию YAP1 и его мишеней на всех субстратах, за исключением коллагена I типа. Экспрессия самого YAP1 не зависела от типа субстрата. На коллагене I типа повышалась экспрессия обеих мишеней YAP1, что свидетельствовало об активации его сигнального пути. Интересно, что все анализируемые субстраты влияют в различной мере на экспрессию исследуемых членов каскада YAP1, хотя это и не приводит к какой-либо разнице в экспрессии нейральных маркеров. Вероятно, данное воздействие сказывается на более поздних этапах дифференцировки.

ВКМ оказывал значительное влияние на поздние этапы дифференцировки. Миграция из нейросфер на субстратах из коллагенов протекала значительно менее эффективно в сравнении с контролем на матригеле и ламинине (рис. 7а). В то время как на контрольном субстрате и ламинине к 5м суткам культивирования формировался конфлуэнтный монослой, на коллагенах нейросферы оставались в виде отдельных структур, откуда выдавались отростки нейральных клеток. Все исследуемые культуры содержали $\beta 3$ -тубулин, NeuN и SOX2 – положительные клетки (рис. 7б). Количественная оценка показала снижение доли NeuN+ клеток на субстрате из коллагена III типа и тенденцию к снижению количества SOX2+ клеток на субстратах из коллагенов обоих типов (рис. 7в).

Интересные результаты мы обнаружили при детекции глиального маркера GFAP (рис. 8). GFAP-положительные клетки появлялись только при культивировании на субстратах из коллагенов I и III типов, но не на матригеле или ламинине. Добавление ROCK-ингибитора приводило к ис-

чезновению этого маркера на субстратах из коллагенов, но стимулировало его появление в культуре на матригеле (рис. 8а, 8б). Дополнительно оценили экспрессию этого маркера методом количественного ПЦР-анализа (рис. 8в). Результаты анализа подтвердили повышение экспрессии GFAP на коллагенах I и III типа в контроле и на матригеле при добавлении ROCK-ингибитора. Интересно, что статистически значимое повышение экспрессии отметили в культурах на коллагенах I и III типа в присутствии ROCK-ингибитора, хотя иммуногистохимически мы не выявляли данный маркер в культуре. Мы предполагаем, что в данном случае продукция GFAP регулируется главным образом на посттранскрипционном уровне.

Поддержание и стимуляция дифференцировки в нейрональном направлении на субстрате из ламинина и ламинин-содержащем матригеле была описана и ранее (Flanagan et al., 2006; Ma et al., 2008). При этом стимуляция глиальной дифференцировки под воздействием субстратов из коллагена ранее была показана только для постнатальных нейральных прогениторных клеток кролика (Raghavan et al., 2013). Интересный эффект стимуляции глиальной дифференцировки под воздействием ROCK-ингибитора требует дальнейшего исследования. Одной из причин такого явления может быть стимуляция полной нейральной дифференцировки, включающей в себя как нейрональную, так и глиальную, под воздействием данной малой молекулы. Подобный эффект наблюдали в исследовании на культуре нейральных стволовых клеток мыши, причем эффект ROCK-ингибитора был опосредован частичной активацией сигнального пути YAP1 (Jia et al., 2016).

Количественный ПЦР-анализ показал увеличение экспрессии YAP1 и его мишеней при культивировании на коллагенах I и III типов. Вероятно, сигнальный путь YAP вносит вклад в возникновение глиальных клеток на вышеуказанных субстратах (рис. 9). Однако, ROCK-ингибитор, как и в предыдущих экспериментах, снижал экспрессию участников этого сигнального пути. Стимуляция глиальной дифференцировки в текущем эксперименте, по-видимому, опосредована различными механизмами.

Далее мы исследовали, сохраняется ли подобное соотношение дифференцирующихся нейронов и глиальных клеток в трехмерных условиях. Для этого поместили нейросферы в трехмерный гель, состоящий из матригеля и коллагена I типа. Интересно, что в трехмерных условиях культивирования мы не наблюдали возникновения глиальных клеток ни на одном из субстратов, при этом добавление ROCK-ингибитора также не приводило к появлению GFAP-экспрессирующих клеток (рис. 10). Плотные клеточные узлы, образованные клеточными ядрами, положитель-

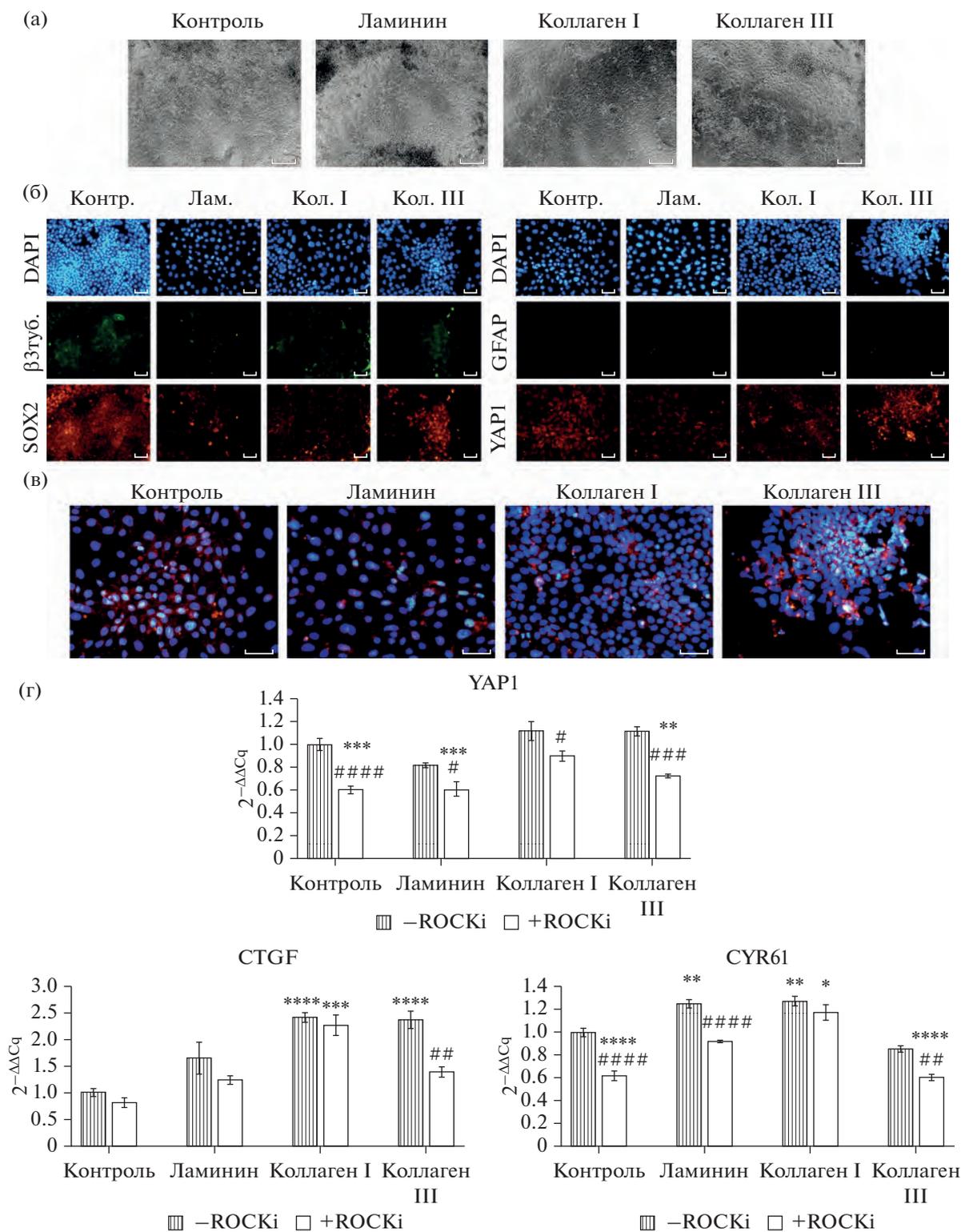


Рис. 6. Ранняя нейральная дифференцировка. (а) Адгезия нейросфер и миграция клеток на сорбированных компонентах ВКМ. Фазовый контраст. Масштабный отрезок 200 мкм. (б) Экспрессия маркеров нейральной дифференцировки. Флуоресцентная микроскопия. Масштабный отрезок 50 мкм. (в) Экспрессия YAP1 на ранних этапах нейральной дифференцировки. Флуоресцентная микроскопия. Масштабный отрезок 50 мкм. (г) Экспрессия YAP1 и его мишеней в культуре дифференцирующихся нейральных прогениторных клеток на субстратах из сорбированных компонентов ВКМ. Количественный ПЦР-анализ. Результаты нормализованы на уровень экспрессии GAPDH. * – статистически значимое отличие при $p \leq 0.05$, ** – при $p \leq 0.01$, *** – при $p \leq 0.001$, **** – при $p \leq 0.0001$ от контрольной группы. # – статистически значимое отличие при $p \leq 0.01$, ## – при $p \leq 0.01$, ### – при $p \leq 0.001$, #### – при $p \leq 0.0001$ от группы без добавления ROCK-ингибитора, тест Шидака для множественных сравнений.

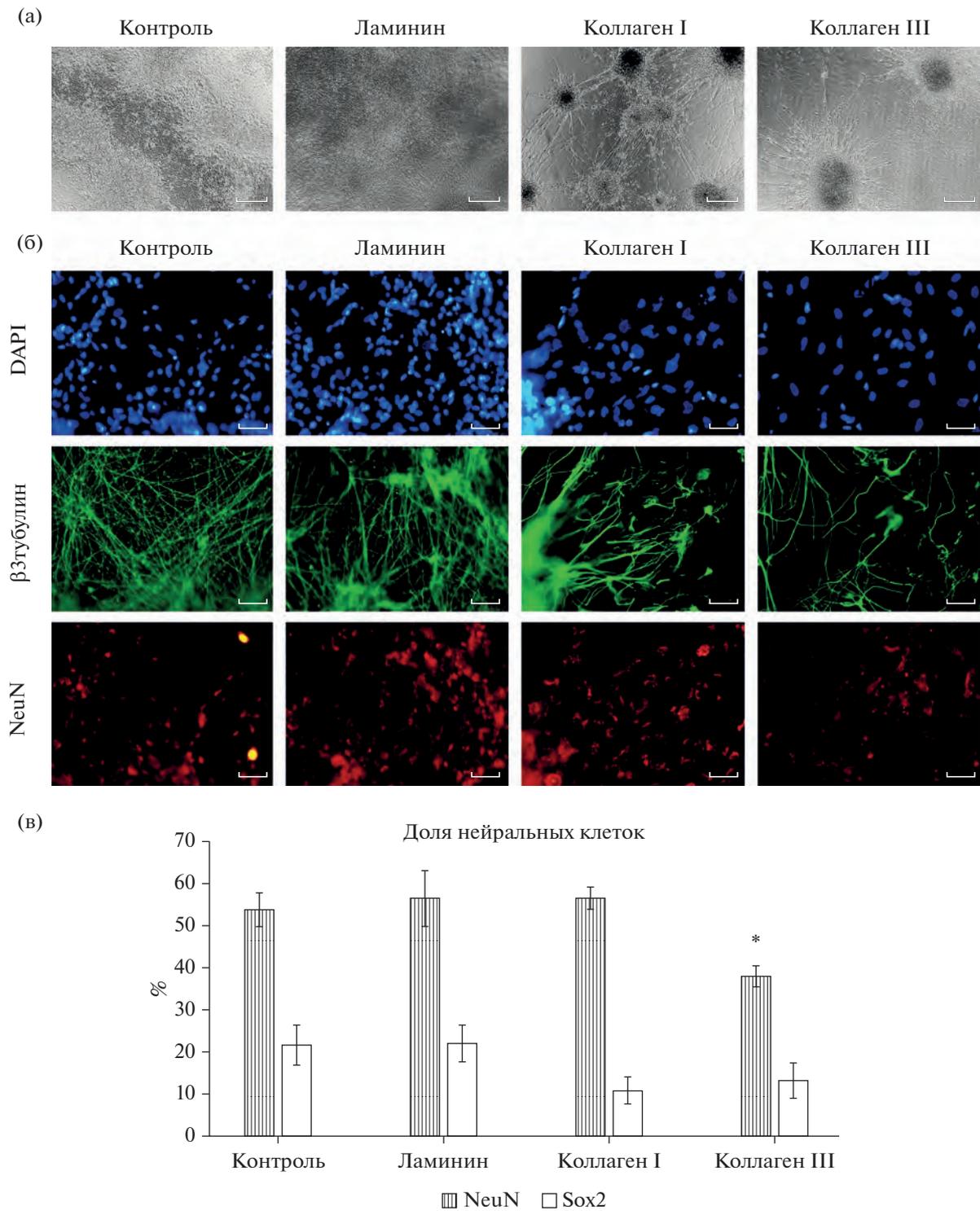


Рис. 7. Поздняя нейральная дифференцировка. (а) Адгезия нейросфер и миграция клеток на сорбированных компонентах ВКМ. Фазовый контраст. Масштабный отрезок 200 мкм. (б) Экспрессия маркеров нейральной дифференцировки. Флуоресцентная микроскопия. Масштабный отрезок 50 мкм. (в) Доля SOX2 и NeuN положительных клеток в культурах. Тотальное количество клеток на изображении было посчитано на основании окрашивания DAPI. * – статистически значимое различие при $p \leq 0.05$, тест Шидака для множественных сравнений.

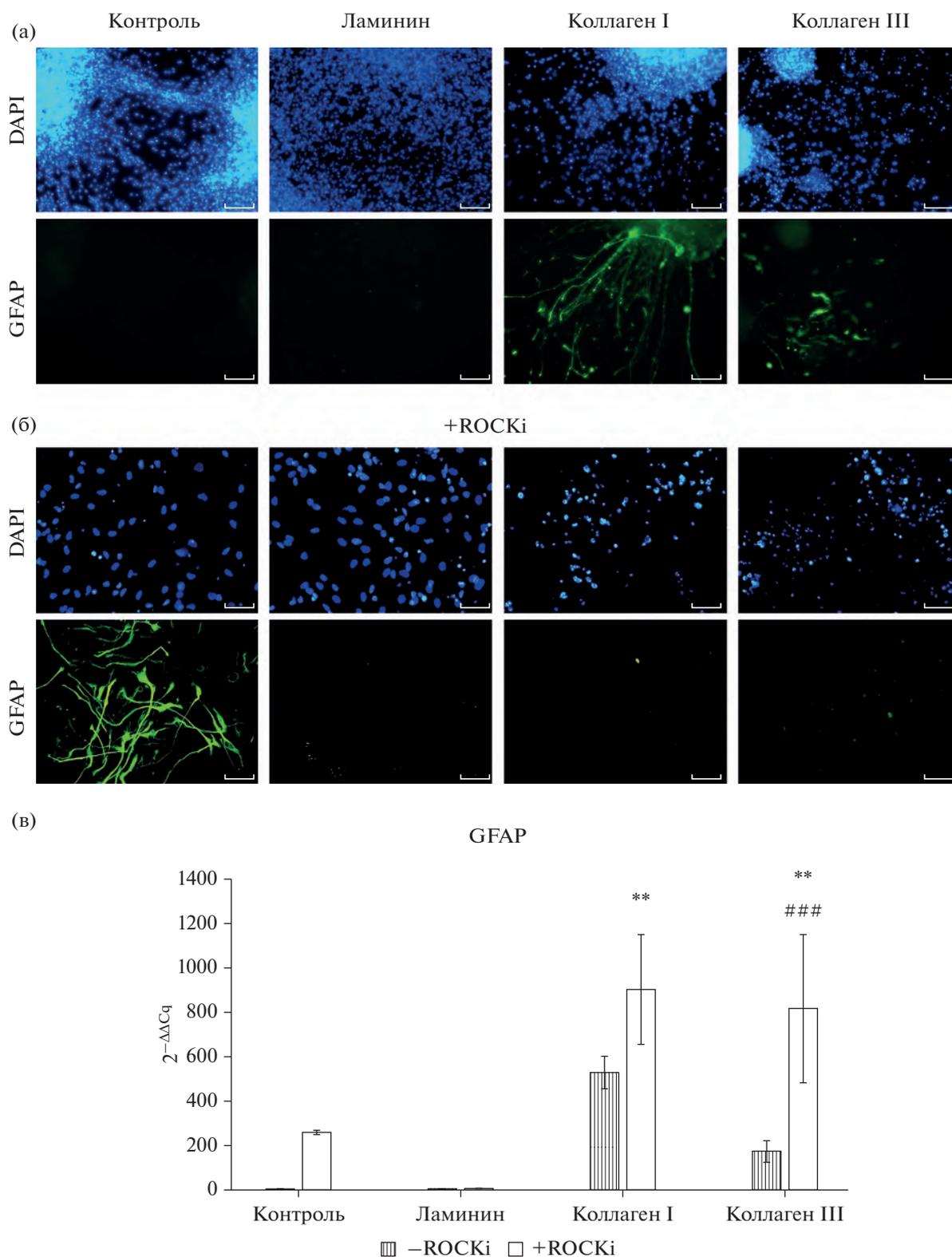


Рис. 8. Иммуногистохимическое выявление GFAP в культурах поздней нейральной дифференцировки на сорбированных компонентах ВКМ. (а) Контрoль. (б) Культуры с добавлением ROCK-ингибитора. Флуоресцентная микроскопия. Масштабный отрезок 50 мкм. (в) Экспрессия GFAP в культурах поздней нейральной дифференцировки на субстратах из сорбированных компонентов ВКМ. Количественный ПЦР-анализ. Результаты нормализованы на уровень экспрессии GAPDH. ** – статистически значимое отличие от контрольной группы при $p \leq 0.01$, ### – статистически значимое отличие от группы без добавления ROCK-ингибитора при $p \leq 0.001$, тест Шидака для множественных сравнений.

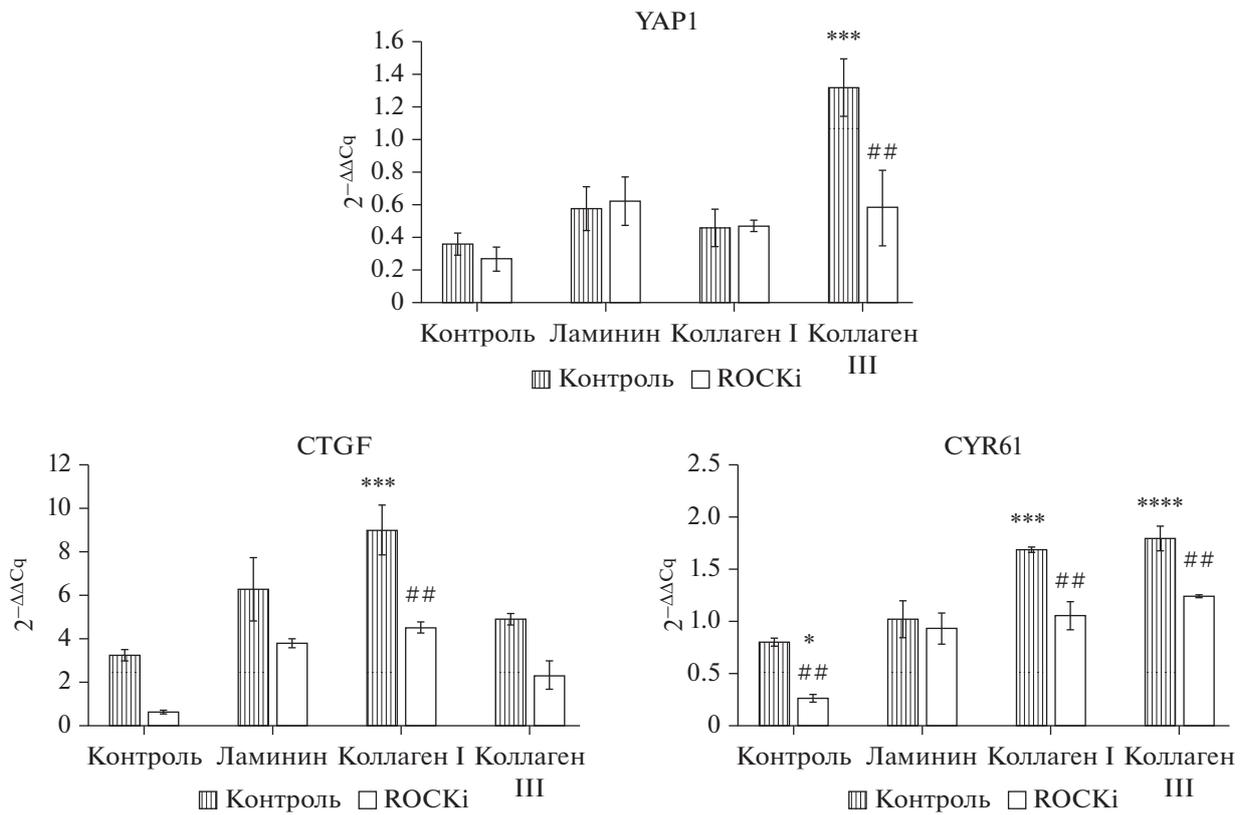


Рис. 9. Экспрессия YAP1 и его мишеней в культуре поздней нейральной дифференцировки на субстратах из сорбированных компонентов ВКМ. Результаты нормализованы на уровень экспрессии GAPDH. *** – статистически значимое отличие при $p \leq 0.001$, **** – при $p \leq 0.0001$ от контрольной группы. ## – статистически значимое отличие от группы без добавления ROCK-ингибитора при $p \leq 0.01$, тест Шидака для множественных сравнений.

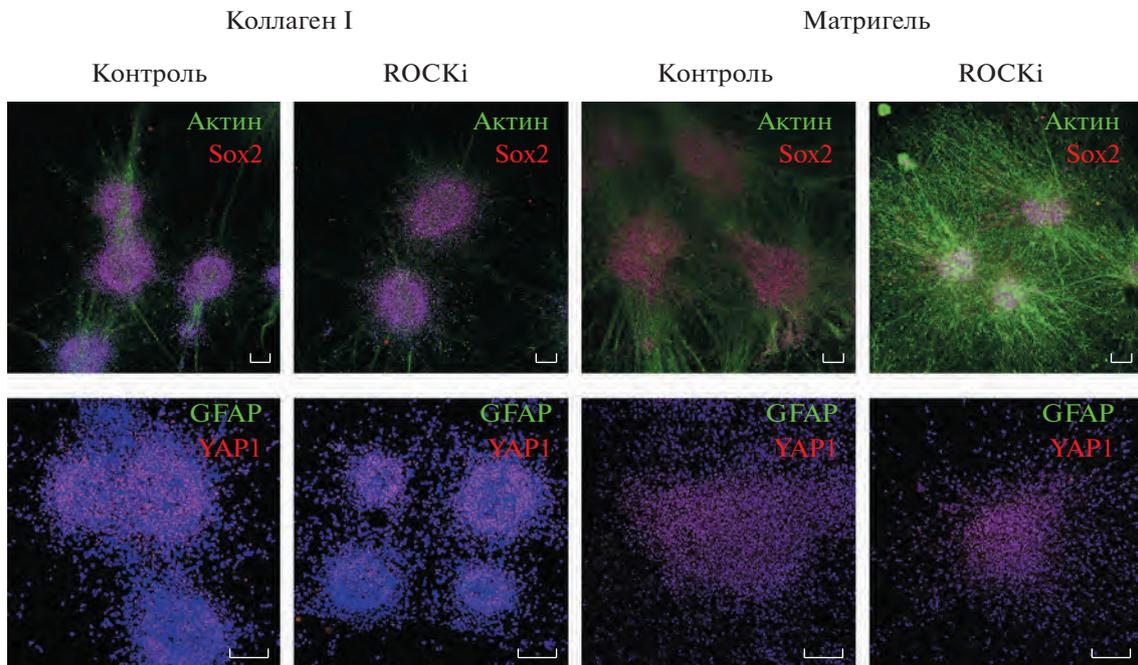


Рис. 10. Морфология культур поздней нейральной дифференцировки в трехмерных условиях. Ядра докрашены DAPI. Конфокальная микроскопия. Масштабный отрезок 100 мкм.

ными по SOX2 и YAP1 давали протяженные отростки в толщу геля, между отростками располагались ядра мигрирующих клеток. Матригель более способствовал клеточной миграции из нейросфер, однако это не сказывалось на экспрессии анализируемых маркеров. Трехмерные условия культивирования оказывают значительное влияние на клеточную физиологию. Для дифференцирующихся нейральных прогениторных клеток трехмерные условия культивирования способствуют дифференцировке в нейрональном направлении, а также выживаемости и миграции клеток (Kaiser et al., 2019). При этом данный эффект показан как для матригеля, так и для коллагенового геля.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы мы выявили, что ламинин стимулирует ранние этапы эпидермальной дифференцировки в отличие от субстратов из коллагенов I и III типа. Данный результат весьма актуален, поскольку в современных протоколах эктодермальной дифференцировки ИПСК рекомендуют использование коллагенов (Itoh et al., 2011; Kogut et al., 2014; Kim et al., 2018; Ruiz-Torres et al., 2021), но не ламинина. Также мы показали стимулирующий эффект коллагенов I и III типа на глиальную дифференцировку. Изучение механизмов глиальной дифференцировки важно для понимания основ патогенеза нейродегенеративных заболеваний, развития нервной ткани и разработки специализированных носителей для терапии при необходимости стимуляции регенерации нервной ткани. Хотя мы отметили снижение индукции глиальной дифференцировки в трехмерных условиях, вероятно носители с обширной площадью поверхности, сочетающие в себе свойства как двумерных, так и трехмерных условий культивирования, позволят разработать наиболее выгодные условия для стимуляции необходимого развития нервной ткани.

Наши результаты показали, что процесс индукции ранней нейральной и эпидермальной дифференцировки напрямую не коррелирует с уровнем экспрессии YAP1. Тем не менее, стоит отметить интересное наблюдение, а именно — преимущественно ядерную локализацию данного белка в ходе ранней эпидермальной дифференцировки и преимущественно цитоплазматическую локализацию для ранней нейральной дифференцировки. Условия культивирования лишь отчасти отображают процессы, происходящие *in vivo*, однако данный феномен может дополнить современное понимание морфогенеза эктодермальных дериватов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность ЦКП ИБР РАН и УНУ “Коллекция клеточных культур” ИБР РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование влияния компонентов ВКМ на эффективность эпидермальной и нейральной дифференцировке проведено в рамках исполнения государственного задания № 0088-2021-0016. Исследование роли сигнального каскада YAP1 в субстрат-опосредованной индукции эпидермальной и нейральной дифференцировки проведено с поддержкой гранта РФ № 21-74-30015.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При выполнении данного исследования лабораторные животные не использовались в качестве объектов. Все применимые международные, национальные и институциональные принципы использования первичного материала тканей человека в экспериментах и условия ухода за ними были соблюдены.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Е.О. Осидак и С.П. Домогатский являются сотрудниками ООО фирмы “ИМТЭК”, в которой были произведены компоненты внеклеточного матрикса, используемые в работе. Остальные авторы конфликтов интереса не имеют.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

А.А. Огневцев проводил работы по культивированию клеточных линий и индукции дифференцировки, а также отвечал за проведение иммуногистохимической детекции с последующей обработкой полученных фотографий и количественный ПЦР-анализ. Е.О. Осидак и С.П. Домогатский проводили статистические обсчеты полученных результатов. Е.П. Калабушева отвечала за выделение первичного материала и микроскопию. А.А. Огневцев, Е.П. Калабушева и Е.А. Воротеляк разрабатывали дизайн исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Araya C., Carmona-Fontaine C., Clarke J.D. Extracellular matrix couples the convergence movements of mesoderm and neural plate during the early stages of neurulation // *Dev. Dyn.* 2016. V. 245. P. 580–589.
- Brafman D.A., Phung C., Kumar N., Willert K. Regulation of endodermal differentiation of human embryonic stem cells through integrin-ECM interactions // *Cell Death Differ.* 2013. V. 20. № 3. P. 369–381.
- Cai X., Wang K.C., Meng Z. Mechanoregulation of YAP and TAZ in cellular homeostasis and disease progression // *Front. Cell Dev. Biol.* 2021. V. 9. P. 673599.
- Costell M., Gustafsson E., Aszódi A., Mörgelin M., Bloch W., Hunziker E., Addicks K., Timpl R., Fässler R. Perlecan maintains the integrity of cartilage and some basement membranes // *J. Cell Biol.* 1999. V. 147. № 5. P. 1109–1122.
- De Rosa L., Secone Seconetti A., De Santis G., Pellacani G., Hirsch T., Rothoefl T., Teig N., Pellegrini G., Bauer J.W.,

- De Luca M.* Laminin 332-dependent YAP dysregulation depletes epidermal stem cells in junctional epidermolysis bullosa // *Cell Rep.* 2019. V. 27. № 7. P. 2036–2049.
- Domingues S., Darle A., Masson Y., Saidani M., Lagoutte E., Bejanariu A., Coutier J., Ayata R.E., Bouschbacher M., Peschanski M., Lemaitre G., Baldeschi C.* Clinical grade human pluripotent stem cell-derived engineered skin substitutes promote keratinocytes wound closure *in vitro* // *Cells.* 2022 V. 11. № 7. P. 1151.
- Evans N.D., Minelli C., Gentleman E., LaPointe V., Patankar S.N., Kallivretaki M., Chen X., Roberts C.J., Stevens M.M.* Substrate stiffness affects early differentiation events in embryonic stem cells // *Eur. Cell Mater.* 2009. V. 21. P. 1–13.
- Feledy J.A., Beanan M.J., Sandoval J.J., Goodrich J.S., Lim J.H., Matsuo-Takasaki M., Sato S.M., Sargent T.D.* Inhibitory patterning of the anterior neural plate in *Xenopus* by homeodomain factors *Dlx3* and *Msx1* // *Dev. Biol.* 1999. V. 212. № 2. P. 455–464.
- Flanagan L.A., Rebaza L.M., Derzic S., Schwartz P.H., Monuki E.S.* Regulation of human neural precursor cells by laminin and integrins // *J. Neurosci. Res.* 2006. V. 83. № 5. P. 845–856.
- Ford-Perriss M., Turner K., Guimond S., Apedaile A., Haubeck H.D., Turnbull J., Murphy M.* Localisation of specific heparan sulfate proteoglycans during the proliferative phase of brain development // *Dev. Dyn.* 2003. V. 227. № 2. P. 170–184.
- Gomez G.A., Prasad M.S., Sandhu N., Shelar P.B., Leung A.W., Garcia-Castro M.I.* Human neural crest induction by temporal modulation of WNT activation // *Dev. Biol.* 2019. V. 449. № 2. P. 99–106.
- Hao J., Zhang Y., Wang Y., Ye R., Qiu J., Zhao Z., Li J.* Role of extracellular matrix and YAP/TAZ in cell fate determination // *Cell Signal.* 2014. V. 26. № 2. P. 186–191.
- Itoh M., Kiuru M., Cairo M.S., Christiano A.M.* Generation of keratinocytes from normal and recessive dystrophic epidermolysis bullosa-induced pluripotent stem cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. № 21. P. 8797–8802.
- Itoh M., Umegaki-Arao N., Guo Z., Liu L., Higgins C.A., Christiano A.M.* Generation of 3D skin equivalents fully reconstituted from human induced pluripotent stem cells (iPSCs) // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 10. P. 77673.
- Jia X.F., Ye F., Wang Y.B., Feng D.X.* ROCK inhibition enhances neurite outgrowth in neural stem cells by upregulating YAP expression *in vitro* // *Neural. Regen. Res.* 2016. V. 11. № 6. P. 983–987.
- Kariya Y., Sato H., Katou N., Kariya Y., Miyazaki K.* Polymerized laminin-332 matrix supports rapid and tight adhesion of keratinocytes, suppressing cell migration // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 5. P. e35546.
- Kim Y., Park N., Rim Y.A., Nam Y., Jung H., Lee K., Ju J.H.* Establishment of a complex skin structure via layered co-culture of keratinocytes and fibroblasts derived from induced pluripotent stem cells // *Stem Cell Res. Ther.* 2018. V. 9. № 1. P. 217.
- Kogut I., Roop D.R., Bilousova G.* Differentiation of human induced pluripotent stem cells into a keratinocyte lineage // *Methods Mol. Biol.* 2014. V. 1195. P. 1–12.
- Li L., Liu C., Biechele S., Zhu Q., Song L., Lanner F., Jing N., Rossant J.* Location of transient ectodermal progenitor potential in mouse development // *Development.* 2013. V. 140. № 22. P. 4533–4543.
- Liem K.F., Jr., Tremml G., Roelink H., Jessell T.M.* Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm // *Cell.* 1995. V. 82. № 6. P. 969–979.
- Lin X., Lu C., Ohmoto M., Choma K., Margolskee R.F., Matsumoto I., Jiang P.* R-spondin substitutes for neuronal input for taste cell regeneration in adult mice // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2021. V. 118. № 2. P. e2001833118.
- Linker C., De Almeida I., Papanayotou C., Stower M., Saba-do V., Ghorani E., Streit A., Mayor R., Stern C.D.* Cell communication with the neural plate is required for induction of neural markers by BMP inhibition: evidence for homeogenetic induction and implications for *Xenopus* animal cap and chick explant assays // *Dev. Biol.* 2009. V. 327. № 2. P. 478–486.
- Long K.R., Huttner W.B.* How the extracellular matrix shapes neural development // *Open Biol.* 2019. V. 9. № 1. P. 180216.
- Long K., Moss L., Laursen L., Boulter L., Ffrench-Constant C.* Integrin signalling regulates the expansion of neuroepithelial progenitors and neurogenesis via *Wnt7a* and *Decorin* // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. P. 10354.
- Ma W., Tavakoli T., Derby E., Serebryakova Y., Rao M.S., Mattson M.P.* Cell-extracellular matrix interactions regulate neural differentiation of human embryonic stem cells // *BMC Dev. Biol.* 2008. V. 8. P. 90.
- Meyer S., Schmidt I., Klämbt C.* Glia ECM interactions are required to shape the *Drosophila* nervous system // *Mech. Dev.* 2014. V. 133. P. 105–116.
- Mohammed H., Hernando-Herraez I., Savino A., Scialdone A., Macaulay I., Mulas C., Chandra T., Voet T., Dean W., Nichols J., Marioni J.C., Reik W.* Single-cell landscape of transcriptional heterogeneity and cell fate decisions during mouse early gastrulation // *Cell Rep.* 2017. V. 20. № 5. P. 1215–1228.
- Nardone G., Oliver-De La Cruz J., Vrbsky J., Martini C., Pribyl J., Skládal P., Pešl M., Caluori G., Pagliari S., Martino F., Maceckova Z., Hajdúch M., Sanz-García A., Pugno N.M., Stokin G.B., Forte G.* YAP regulates cell mechanics by controlling focal adhesion assembly // *Nat. Commun.* 2017. V. 8. P. 15321.
- Ozair M.Z., Kintner C., Brivanlou A.H.* Neural induction and early patterning in vertebrates // *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 2013. V. 2. № 4. P. 479–498.
- Ozasa R., Matsugaki A., Matsuzaka T., Ishimoto T., Yun H.S., Nakano T.* Superior alignment of human iPSC-Osteoblasts associated with focal adhesion formation stimulated by oriented collagen scaffold // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 12. P. 6232.
- Pagliari S., Vinarsky V., Martino F., Perestrelo A.R., Oliver De La Cruz J., Caluori G., Vrbsky J., Mozetic P., Pompeiano A., Zancla A., Ranjani S.G., Skladal P., Kytyr D., Zdráhal Z., Grassi G., Sampaolesi M., Rainer A., Forte G.* YAP-TEAD1 control of cytoskeleton dynamics and intracellular tension guides human pluripotent stem cell mesoderm specification // *Cell Death Differ.* 2021. V. 28. № 4. P. 1193–1207.
- Pauly M.G., Krajka V., Stengel F., Seibler P., Klein C., Capetian P.* Adherent vs. free-floating neural induction by dual SMAD inhibition for neurosphere cultures derived

- from human induced pluripotent stem cells // *Front Cell Dev. Biol.* 2018. V. 6. P. 3.
- Pijuan-Sala B., Griffiths J.A., Guibentif C., Hiscock T.W., Jawaid W., Calero-Nieto F.J., Mulas C., Ibarra-Soria X., Tyser R.C.V., Ho D.L.L., Reik W., Srinivas S., Simons B.D., Nichols J., Marioni J.C., Göttgens B. A single-cell molecular map of mouse gastrulation and early organogenesis // *Nature*. 2019. V. 566. № 7745. P. 490–495.
- Qiao Y., Zhu Y., Sheng N., Chen J., Tao R., Zhu Q., Zhang T., Qian C., Jing N. AP2 γ regulates neural and epidermal development downstream of the BMP pathway at early stages of ectodermal patterning // *Cell Res.* 2012. V. 22. № 11. P. 1546–1561.
- Raghavan S., Gilmont R.R., Bitar K.N. Neuroglial differentiation of adult enteric neuronal progenitor cells as a function of extracellular matrix composition // *Biomaterials*. 2013. V. 34. № 28. P. 6649–6658.
- Rasmussen C.H., Petersen D.R., Moeller J.B., Hansson M., Dufva M. Collagen type I improves the differentiation of human embryonic stem cells towards definitive endoderm // *PLoS One*. 2015. V. 10. № 12. P. e0145389.
- Ruiz-Torres S., Lambert P.F., Wikenheiser-Brokamp K.A., Wells S.I. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into epidermal stem and progenitor cells // *Mol. Biol. Rep.* 2021. V. 48. № 8. P. 6213–6222.
- Rust W.L., Sadasivam A., Dunn N.R. Three-dimensional extracellular matrix stimulates gastrulation-like events in human embryoid bodies // *Stem Cells Dev.* 2006. V. 15. № 6. P. 889–904.
- Soulintzi N., Zagris N. Spatial and temporal expression of perlecan in the early chick embryo // *Cells Tissues Organs*. 2007. V. 186. № 4. P. 243–256.
- Walma D.A.C., Yamada K.M. The extracellular matrix in development // *Development*. 2020. V. 147. № 10. P. dev175596.
- Warmflash A., Sorre B., Etoc F., Siggia E.D., Brivanlou A.H. A method to recapitulate early embryonic spatial patterning in human embryonic stem cells // *Nat. Methods*. 2014. V. 11. № 8. P. 847–854.
- Wattanapanitch M., Klincumhom N., Potirat P., Amornpisutt R., Lorthongpanich C., U-pratya Y., Laowtammathron C., Kheolamai P., Pongvarin N., Issaragrisil S. Dual small-molecule targeting of SMAD signaling stimulates human induced pluripotent stem cells toward neural lineages // *PLoS One*. 2014. V. 9. № 9. P. 106952.
- Zagris N., Gilipathi K., Soulintzi N., Konstantopoulos K. Decorin developmental expression and function in the early avian embryo // *Int. J. Dev. Biol.* 2011. V. 55. № 6. P. 633–639.
- Zhang H., Pasolli H.A., Fuchs E. Yes-associated protein (YAP) transcriptional coactivator functions in balancing growth and differentiation in skin // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. V. 108. № 6. P. 2270–2275.
- Zhang S.C., Wernig M., Duncan I.D., Brüstle O., Thomson J.A. *In vitro* differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells // *Nat. Biotechnol.* 2001. V. 19. № 12. P. 1129–1133.

The Role of Extracellular Matrix in Human Pluripotent Cells Differentiation into Ectodermal Derivatives

A. A. Ognivtsev¹, E. P. Kalabusheva^{1,*}, E. O. Osidak², S. P. Domogatsky^{3,4}, and E. A. Vorotelyak¹

¹Koltzov Institute of Developmental Biology of the Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia

²Imtek Ltd., ul. Cherepkovskaya 3, 15A, Moscow, 121552 Russia

³Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, ul. Gamalei, 18, Moscow, 123098 Russia

⁴National Medical Research Center for Cardiology named after academician Yevgeniy Chazov of the Ministry of Health of the Russian Federation, ul. Cherepkovskaya 3, 15A, Moscow, 121552 Russia

*e-mail: Kalabusheva.e@gmail.com

One of the most important events in the embryonic development of mammals is the division of the ectoderm into integumentary and neuroectoderm. Signaling cascades induced by growth factors and cytokines involved in these processes have been studied in detail in recent decades. At the same time, the contribution of extracellular matrix (ECM) to these differentiation lineages remains unknown for mammals, while the significance of ECM in this process has been shown in other model organisms. To assess the effect of ECM on the formation of ectodermal derivatives, we modeled the neural and epidermal differentiation of human induced pluripotent stem cells (iPSCs) using substrates consisting of various ECM molecules; and also studied the involvement of one of the central links of the ECM signaling cascades, a transcriptional coactivator YAP1 in differentiation processes. Our results revealed the stimulatory effect of laminin 332 on the early stages of epidermal differentiation and of type I and III collagens on the inducing of the glial fate of late neural differentiation.

Keywords: epidermal differentiation, neural differentiation, iPSC, laminin, collagen, YAP1

МОДЕЛИРОВАНИЕ ДЕЦИДУАЛИЗАЦИИ КЛЕТОК СТРОМЫ ЭНДОМЕТРИЯ МЫШИ С ПОСЛЕДУЮЩЕЙ ИМПЛАНТАЦИЕЙ ЭМБРИОНА *IN VITRO*¹

© 2023 г. А. О. Гайдамака^{а, *}, А. В. Муромцев^а, Л. Ш. Измайлова^а,
Г. А. Марченко^б, Е. А. Воротеляк^а

^аИнститут биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия

^бLuminex corporation, Het Zuiderkruis, 1 's-Hertogenbosch, The Netherlands, 5215 MV

*e-mail: stadtrand@yandex.ru

Поступила в редакцию 26.07.2022 г.

После доработки 19.10.2022 г.

Принята к публикации 25.10.2022 г.

Децидуализация клеток стромы – ключевой этап приобретения рецептивности эндометрия к эмбриону. Этот процесс регулируется половыми стероидными гормонами, а у мыши дополнительно индуцируется прикреплением эмбриона. В настоящее время существует множество протоколов индукции децидуализации стромы *in vitro*, однако большинство из них требует проверки соответствия процессов, происходящих в культуре клеток, таковым в живом организме. Эта работа посвящена изучению морфологии клеток стромы и экспрессионной активности генов, ответственных за прогрессирование децидуализации в 2D культуре с последующим прикреплением эмбриона. Также исследована целесообразность использования нескольких вариантов протоколов индукции децидуализации и возможность применения клеток стромы после криоконсервации.

Ключевые слова: эндометрий, строма, децидуализация, имплантация *in vitro*, половые стероидные гормоны

DOI: 10.31857/S0475145023010044, **EDN:** FQPSTI

ВВЕДЕНИЕ

Одним из важнейших начальных этапов беременности является имплантация – процесс прикрепления эмбриона к эндометрию матки. Успешность имплантации зависит от установления множества эндокринных, паракринных сигналов и контактных взаимодействий между клетками эмбриона, и эндометрия матки. Участие целого ряда факторов в этом процессе обеспечивает строгий пространственно-временной контроль прохождения имплантации как со стороны эндометрия, так и со стороны эмбриона.

Нарушения в ходе имплантации являются наиболее частыми причинами прерывания беременности на ранних сроках: несмотря на развитие вспомогательных репродуктивных технологий, эффективность прохождения беременности до этапа имплантации даже с использованием эмбрионов высокого качества остается низкой (Larsen et al., 2013). В связи с этим изучение имплантации остается актуальной задачей. Однако существует несколько

ограничений, препятствующих получению более глубокого понимания процесса имплантации. Например, этические ограничения не позволяют исследовать имплантацию человека *in vivo*, а материал биопсий не всегда доступен для моделирования имплантации *in vitro* и зачастую не однороден по возрасту доноров и фазе цикла. Поэтому для изучения имплантации *in vitro* часто используют модели на основе клеток эндометрия мыши, поскольку для мыши и человека обнаружено множество общих молекулярных механизмов, задействованных в имплантации.

Подготовка эндометрия к имплантации происходит за счет последовательного действия двух гормонов: эстрадиола (E2) и прогестерона (P4). E2 обеспечивает пролиферацию клеток стромы и эпителия эндометрия, а действие P4 направлено на их последующую дифференцировку. Это необходимо для приобретения эндометрием рецептивности, то есть способности воспринять эмбрион во время имплантации (Zhang et al., 2013).

Процесс, включающий терминальную дифференцировку клеток стромы эндометрия, ассоциированную с рецептивностью, называется децидуализацией. Дифференцировка заключается в приобре-

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0475145023010044 для авторизованных пользователей.

тении клетками эпителиоподобной морфологии, полиплоидизации и изменении метаболизма. Децидуализация стромы человека происходит в каждом менструальном цикле во время секреторной фазы и зависит от половых стероидных гормонов. В то же время, у мыши децидуализация начинается в ответ на сигналы имплантирующейся бластоцисты, такие, как интерлейкин-1 β (IL-1 β) и Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF), однако дифференцировка клеток стромы также находится под контролем E2 и P4 (Ojosnegros et al., 2021).

Для прогрессирования децидуализации требуется гормон-опосредованная активация белков — компонентов сигнальных путей и факторов транскрипции, отвечающих за приобретение клетками стромы соответствующего фенотипа. Наиболее известными стромальными регуляторами децидуализации и поддержания рецептивности эндометрия являются NOXA10/11, BMP2, HAND2, FOXO1A, C/EBP β и WNT4 (Ramathal et al., 2010). Данные факторы отвечают не только за дифференцировку стромы, но и за комплексное взаимодействие между всеми компартментами эндометрия, включая люминальный и железистый эпителий, кровеносные сосуды и иммунные клетки.

Несвоевременная или аномальная децидуализация клеток стромы может являться причиной излишней селективности эндометрия, что приводит к отсутствию имплантации или повышенной рецептивности, что связано с имплантацией потенциально нежизнеспособных эмбрионов (Macklon, Brosens, 2014). В связи со сложностями изучения децидуализации *in vivo*, необходимо разработать релевантную модель децидуализации стромы с последующей имплантацией эмбриона *in vitro* для исследования патологических состояний эндометрия. На настоящий момент исследователями применяется несколько вариантов протоколов индукции децидуализации *in vitro*, однако не существует общепризнанного стандарта, который с высокой точностью отражал бы дифференцировку стромы во время беременности (De Clercq et al., 2017; Hisamatsu et al., 2021; Yu et al., 2022).

Целью этой работы стало изучение двух моделей децидуализации стромы эндометрия мыши в 2D культуре, основанных на действии медроксипрогестерона (МРА) совместно с E2 и на действии P4 и E2. Также было уделено отдельное внимание сравнению полученных моделей при имплантации эмбриона *in vitro*. В дополнение к этому были получены данные о целесообразности использования клеток стромы после криоконсервации для дальнейшей индукции децидуализации *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные

Работа была проведена на мышах линии Balb/C возрастом от 12 до 15 недель. Мышей содержали в стандартных условиях вивария ИБР РАН в клетках по 4–6 особей с неограниченным доступом к воде и корму. Все манипуляции с животными были одобрены этической комиссией ИБР РАН (Протокол № 40 от 17.09.2021).

Перед выделением клеток стромы эндометрия по стандартному протоколу самкам внутрибрюшинно вводили E2 (Sigma-Aldrich, США) для синхронизации животных в фазе эструса (De Clercq et al., 2017).

Получение культуры клеток стромы эндометрия

Клетки стромы выделяли по протоколу, описанному ранее (Izmaylova et al., 2021). Самок выводили из эксперимента путем цервикальной дислокации. Далее изолировали матки, разрезали рога маток продольно и промывали раствором Хенкса (ПанЭко, Россия), содержащем 4% гентамицина. Перед получением клеток стромы ферментативным способом удаляли эпителий: матки помещали в 0.1% раствор диспазы (Gibco, Ирландия) в среде ДМЕМ (ПанЭко, Россия) на 12 ч при 4°C. На следующий день матки в растворе диспазы инкубировали в течение 20 минут при 37°C с последующим интенсивным встряхиванием на вортексе. После этого удаляли среду с отделившимися эпителиальными пластами. Далее измельчали оставшуюся ткань до фрагментов 1–2 мм и помещали в 0.2% раствор коллагеназы II (Gibco, Ирландия) в среде ДМЕМ на 5 ч при 37°C. По истечении времени супернатант с клетками стромы отбирали, центрифугировали, а осадок клеток отмывали от фермента. Клетки переносили в культуральный флакон и культивировали в мультигазовом инкубаторе (5% CO₂ и 5% O₂) в полной среде ДМЕМ, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 1% Glutamax (Gibco, Ирландия), 1% PenStrep (Gibco, Ирландия). Перед первым пассажем клетки культивировали минимум 3 дня.

Индукция суперовуляции у самок и получение датированной беременности

Протокол рассчитан на 7 дней. В 1 день в 13–15 ч проводится внутрибрюшинная инъекция гонадотропного гормона сыворотки жеребых кобыл (ГСЖК) в физиологическом растворе в размере 5 МЕ на особь. На 3 день в 13–15 ч проводится инъекция хорионического гонадотропина человека в физиологическом растворе в размере 5 МЕ на особь (Sigma-Aldrich, США). После инъекции производится ссадка самок с самцами. На 4 день

в 8 утра производится детектирование вагинальных пробок. Этот момент приравнивается к 0.5 сут эмбрионального развития (E0.5). Через 3 дня эмбрионы достигают возраста 3.5 дней (E3.5) и готовы к выделению из маток.

Выделение эмбрионов мыши на стадии бластоцисты

Выделение бластоцист происходит на стадии E3.5. Мышей выводили из эксперимента, матки изолировали и помещали в среду M2 (Gibco, Ирландия). Матки промывали и помещали на часовое стекло. Шприц, наполненный средой M2, помещали в шейку матки и вводили поочередно по 1–2 мл среды в каждый рог для вымывания эмбрионов из полости матки. Затем переносили эмбрионы при помощи держателя капилляров Stripper из часового стекла в 4-луночный планшет со средой M2 для их отмывки и дальнейшего использования.

Децидуализация in vitro

В работе использовали 2 наиболее распространенных варианта протоколов децидуализации: E2 (10 нМ) и P4 (1 мкМ), а также E2 (10 нМ) и 1 мкМ (MPA) (Okado et al., 1999; Berkhout et al., 2018). В полную среду DMEM добавляли гормоны, разведенные в диметилсульфоксиде (DMSO; SigmaAldrich, США). Концентрация DMSO в среде составляла 0.01%. Такая концентрация обладает минимальной токсичностью для клеток (Galvao et al., 2014). Гормональное воздействие заключалось либо в замене стандартной среды DMEM на среду с добавлением гормонов, либо пассирование клеток в среде с гормонами. В первом случае культивирование необходимо проводить 3-е сут для децидуализации *in vitro*, во втором случае – 3.5 сут.

Криоконсервация клеток стромы эндометрия

Клетки снимали с культурального флакона последовательной обработкой раствором Версена (ПанЭко, Россия) и 0.5% раствором трипсина (Gibco, Ирландия), после этого клетки центрифугировали и переносили в криопробирки, содержащие среду DMEM с 20% FBS и 10% DMSO. Криопробирки помещали в изопропанол и ставили на ночь на -70°C , после чего переносили в пары жидкого азота. Размораживание проводили быстрым способом, нагревая клетки теплом рук.

Проточная цитометрия с визуализацией на проточном цитометре AMNIS

Клетки стромы эндометрия (до 4 пассажа) сажали в культуральный флакон и подвергали раз-

личным вариантам воздействий: контроль без гормонов, E2 + P4, E2 + MPA. Децидуализация *in vitro* проводилась методом пассирования клеток в среде с гормонами. По окончании культивирования клетки снимали с культуральных флаконов при помощи раствора Версена и 0.5% трипсина, центрифугировали 5 минут при 1200 g и отмывали 3 раза DPBS (ПанЭко, Россия) с последующим центрифугированием. После отмывок производилась фиксация в 4% растворе параформальдегида (Sigma-Aldrich, США) в течение 15 мин при комнатной температуре с последующим центрифугированием и 2 отмывками в DPBS. В конце образцы окрашивали DAPI (Sigma-Aldrich, США) и отмывали DPBS 1 раз. Полученную суспензию клеток анализировали, используя проточный цитометр с визуализацией Amnis ImageStreamX Mark II, Luminex. Анализ производился на приборе ImageStream[®]X MarkII при помощи программного обеспечения IDEAS (Amnis, США) версии 6.2.187.0. В каждом образце собирали по 5000 клеток целевого диапазона: площадь клеток в фазовом контрасте: от 147.44 до 1073.94, отношение длина-ширина: от 1.038 до 0.749 (рис. 1).

Последовательность обработки полученных данных была одинаковой для всех образцов, ниже продемонстрирован процесс анализа на примере одного из образцов (рис. 2).

На начальном этапе отбираются клетки, попавшие в фокус камеры прибора (рис. 2а) и затем в диапазон площади и соотношения сторон (рис. 2б), что позволяет отфильтровать клеточный дебрис и ассоциаты клеток. Гистограмма распределения интенсивности позволяет определить структуру субпопуляций клеток, где пик интенсивности “2n” соответствует диплоидным клеткам, “4n” – тетраплоидным, “xn” – полиплоидным (рис. 2в). Дальнейший анализ отфильтровывает деформированные ядра клеток, оставляя только округлые ядра (рис. 2г). Полученные таким образом данные использовали для построения двумерных диаграмм рассеяния в координатах площадь ядра и интенсивность сигнала в канале DAPI, где вручную удаляли непригодные для анализа клетки.

Исследование влияния различных концентраций E2 и P4 на среднюю площадь ядер

В 96 луночный планшет вносили по 30000 клеток на лунку. В качестве негативного контроля брали образцы без гормонального воздействия, положительный контроль составили образцы с концентрацией гормонов 10 нМ E2 и 1 мкМ P4. Остальные образцы подвергались воздействию гормонов E2 и P4, отличающихся в 0.25 (2.5 нМ E2 и 0.25 мкМ P4), 0.5 (5 нМ E2 и 0.5 мкМ P4), 1.5 (15 нМ E2 и 1.5 мкМ P4) и 2 (20 нМ E2 и 2 мкМ P4) раз от положительного контроля. Гормональное воздействие проводилось в течение 3 дней в соот-

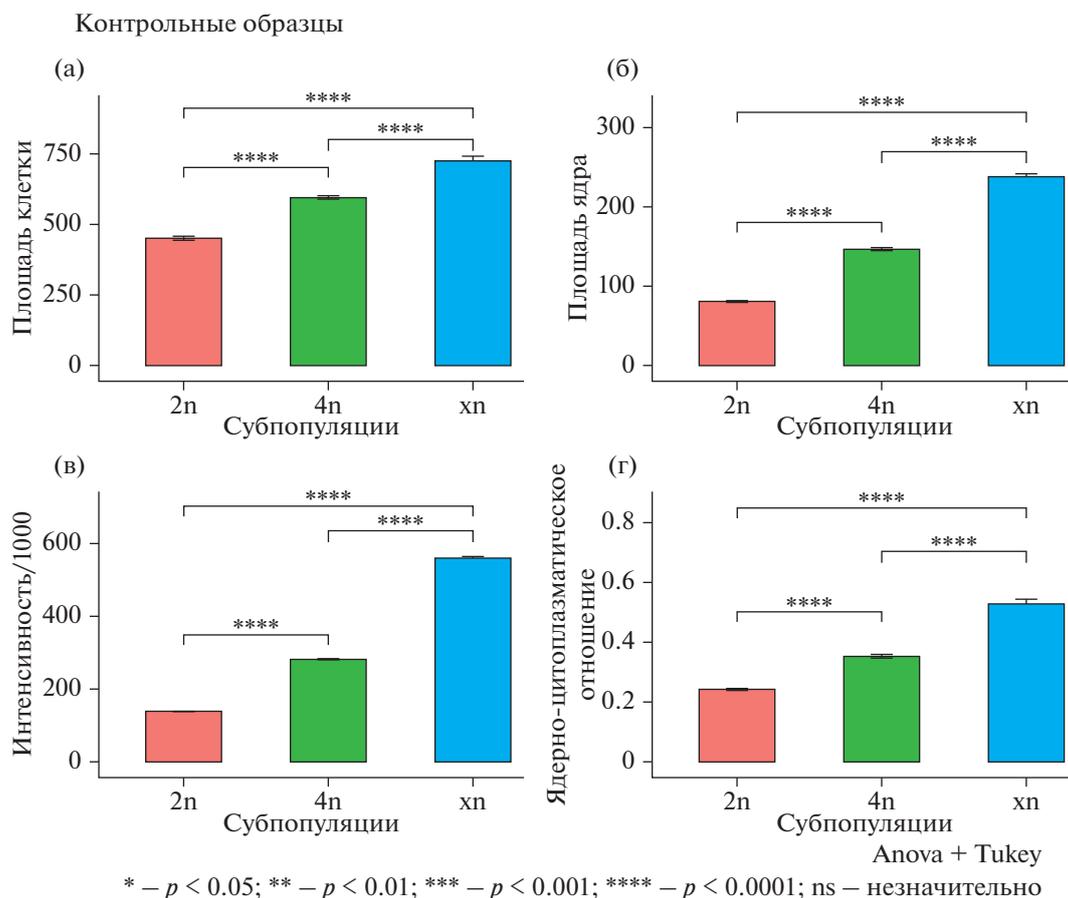


Рис. 1. Сравнение характеристик субпопуляций в контрольных образцах под воздействием гормонов (без дополнительных условий культивирования). Контроль – без обработки гормонами, PE – E2 + P4, MPA – E2 + MPA. (а) Площадь клетки, (б) площадь ядра, (в) интенсивность флуоресценции DAPI/1000 (от изначальных значений, для удобства визуализации), (г) ядерно-цитоплазматическое отношение. На каждом графике 2n – диплоидная субпопуляция, 4n – тетраплоидная субпопуляция, xp – полиплоидная субпопуляция.

ветствии с протоколом децидуализации. На третий день ядра клеток окрашивали Hoechst 33342 (Invitrogen, США). Затем клетки фотографировали на флуоресцентном микроскопе Olympus IX73. Фотографии были обработаны в программе Cell Profiler v.4.2 (CellProfiler, США). После подсчета значений площадей и их сортировки по возрастанию было выбрано 1000 наибольших значений, которые соответствуют самым крупным ядрам.

Культивирование стромы с эмбрионами

Строма была разделена на 3 группы: без воздействия гормонов, под воздействием E2 + P4, под воздействием E2 + MPA. Каждая группа была представлена 3 биологическими повторами. На опытных образцах стромы проводили 3-х дневный протокол децидуализации. Затем в образцы переносили свежесывленные эмбрионы мыши (по 6 штук на лунку 12 луночного планшета) на стадии бластоцисты, заменив при этом среду для децидуализации на полную среду ДМЕМ. Перед

переносом эмбрионы помещались в среду, содержащую флуоресцентный краситель Calcein (ThermoFisher Scientific, США). Прикрепление и площадь инвазии эмбрионов проверяли каждые 24 ч. По прошествии 96 ч совместного культивирования образцы лизировали при помощи Trizol Reagent (ThermoFisher Scientific, США) для последующего анализа экспрессии генов.

ПЦР в реальном времени

Измерение экспрессии проводилось для следующих генов: *Prl* (пролактин), *Bmp2*, *Hand2*, *Hoxa11*, *Rac1*, *RhoA*, *Mmp2*. В качестве референсных генов использовали *Actb* и *Tbp*. Праймеры для указанных генов подбирали с помощью программ PrimerBlast (NCBI), PrimerSelect (“DNASTAR”, США) и онлайн сервиса Oligoanalyzer. Праймеры были синтезированы в компании “Евроген” (Россия). Последовательности праймеров представлены в табл. 1. Выделение тотальной РНК из клеток стромы проводили, используя коммерче-

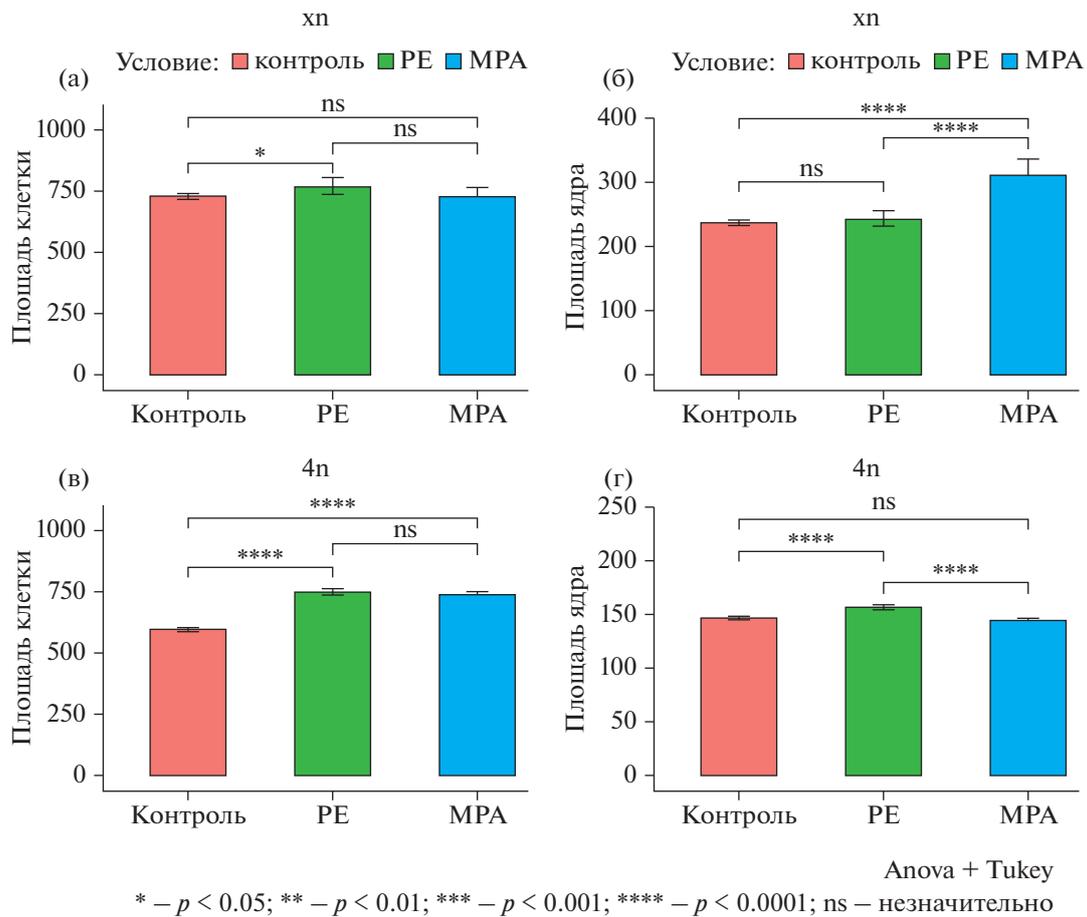


Рис. 2. Характеристики субпопуляций в контрольных образцах под воздействием гормонов (без дополнительных условий культивирования). Контроль – без обработки гормонами, PE – E2 + P4, MPA – E2 + MPA. (а) Площадь клетки субпопуляции полиплоидных клеток, (б) площадь ядра субпопуляции полиплоидных клеток, (в) площадь клетки субпопуляции тетраплоидных клеток, (г) площадь ядра субпопуляции тетраплоидных клеток.

ский протокол для Trizol Reagent (Thermofisher, США). Затем проводили обработку образцов ДНКазой I (Thermofisher, США) с последующим переосаждением РНК в 8 М растворе LiCl. Обратную транскрипцию проводили коммерческим набором компании “Евроген” MMLV RT Kit. Реакцию ПЦР проводили на амплификаторе Roche LightCycler 96 SW 1.1c использованием набора компании “Евроген” qPCRmix-HS SYBR + LowRox.

Статистическая обработка результатов

Оценка средней площади ядер: фотографии обрабатывали в программе Cell Profiler v.4.2. В результате были получены значения площадей ядер каждой индивидуальной клетки. Результаты были обработаны при помощи дисперсионного анализа с последующим пост-хок тестом по методу Тьюки.

Анализ результатов ПЦР в реальном времени: значения Ct были преобразованы в dCt по референсным генам. Между разными группами (ин-

тактная строма, строма после криоконсервации, строма после культивирования с эмбрионами) и воздействиями (без гормонов, воздействие E2 + P4, воздействие E2 + MPA) проводились попарные сравнения с помощью дисперсионного анализа с последующим пост хок тестом по методу Тьюки. В ряде случаев при нарушении условий дисперсионного анализа применялся критерий Краскела–Уоллиса с последующим пост хок тестом по методу dunn (с поправкой Бонферрони). Визуализация результатов проводилась в значениях $2^{(-dct)}$ для более легкой читаемости графиков.

Обработка данных проточного цитометра с визуализацией Amnis: значения интенсивностей флуоресценции DAPI, площадей клеток и ядер для каждого образца были экспортированы в виде .txt файлов и подвергнуты кластерному анализу методом k_средних в среде программирования python 3.8.12 (numpy: 1.21.0, pandas: 1.4.1, scikit-learn: 1.0.2). Кластеризация проводилась в предположении существования 3 субпопуляций, в ка-

Таблица 1. Последовательности праймеров

Название гена, прямой или обратный праймер	Последовательность	Производитель, страна
<i>Prl</i> , fw	AGCCTCTGCCAATCTGTTCC	Евроген, Россия
<i>Prl</i> , rv	ATCCCATTTTCCTTTGGCTTCA	
<i>Bmp2</i> , fw	CGGGAACAGATACAGGAAGC	
<i>Bmp2</i> , rv	GCTGTTTGTGTTTGGCTTGA	
<i>Hand2</i> , fw	CCGACACCAAACCTCTCCAAG	
<i>Hand2</i> , rv	TCTTGTCTGTTGCTGCTCACT	
<i>Hoxa11</i> , fw	CGGCCACACTGAGGACAAGGC	
<i>Hoxa11</i> , rv	GACGCTGAAGAAGAACTCTCGC	
<i>Rac1</i> , fw	ATGCAGGCCATCAAGTGTG	
<i>Rac1</i> , rv	TAGGAGAGGGGACGCAATCT	
<i>RhoA</i> , fw	TGAAGCAGGAGCCGGTAAA	
<i>RhoA</i> , rv	CAAAAGCGCCAATCCTGTTT	
β - <i>actin</i> , fw	CGTGCGTGACATCAAAGAGAA	
β - <i>actin</i> , rv	GGCCATCTCCTGCTCGAA	
<i>Tbp</i> , fw	CTACCGTGAATCTTGGCTGTAAAC	
<i>Tbp</i> , rv	AATCAACGCAGTTGTCCGTGGC	
<i>Mmp2</i> , fw	CAAGGATGGACTCCTGGCACAT	
<i>Mmp2</i> , rv	TACTCGCCATCAGCGTTCCCAT	

честве метрики кластеризации использовался силуэт. Точность кластеризации составила 0.71–0.75. Полученные субпопуляции были подвергнуты дисперсионному анализу с последующим сравнением групп по методу Тьюки.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние дозы гормонов на площадь ядра (флуоресцентная микроскопия)

На первом этапе работы была исследована модель децидуализации стромы, где в качестве индукторов выступают половые стероидные гормоны, участвующие в дифференцировке стромальных клеток *in vivo*. Клетки обрабатывали E2 и P4 в нескольких вариантах дозирования, при этом сохраняя одно и то же соотношение концентраций гормонов: P4/E2 = 100. Соотношение было взято из работы Окада с соавторами, где был предложен протокол моделирования децидуализации с использованием P4 в концентрации 1 мкМ и E2 – в 10 нМ (Okada et al., 1999). Данный протокол широко используется в настоящее время, поэтому мы решили выяснить, каким образом будут влиять кратно измененные концентрации гормонов на процесс децидуализации (см. материалы и методы).

Клетки стромы в ходе децидуализации становятся полиплоидными. Поэтому для качественной оценки ответа клеток стромы на гормональное воз-

действие была использована морфологическая характеристика – площадь ядра, отражающая увеличение содержания ДНК в клетке (Gregory, 2001). Концентрация из работы Окада была принята нами за исходную точку (группа 1), в то время как остальные концентрации отличались в 0.25, 0.5, 1.5 и 2 раз от группы 1.

Ядра в группе 1 в среднем имеют значимо большую площадь по сравнению с остальными группами, группа 0.25 значимо отличается от групп 0.5 и 2 в большую сторону (рис. 3). В соответствии с этим результатом мы взяли концентрации гормонов из группы 1 для обработки стромы в последующих экспериментах.

Определение субпопуляционного состава клеток стромы эндометрия

Клетки стромы как без обработки гормонами, так и поле обработки E2 + P4 или E2 + МРА формируют 3 субпопуляции, соответствующие диплоидным (2n), тетраплоидным (4n) и полиплоидным клеткам (xn) (рис. 4).

Выявленные субпопуляции в контрольной группе значимо отличаются друг от друга по значениям площадей клетки и ядра, интенсивности флуоресценции DAPI и ядерно-цитоплазматическому отношению. При этом в тетраплоидной популяции (4n) в среднем значения всех указанных показателей больше относительно диплоид-

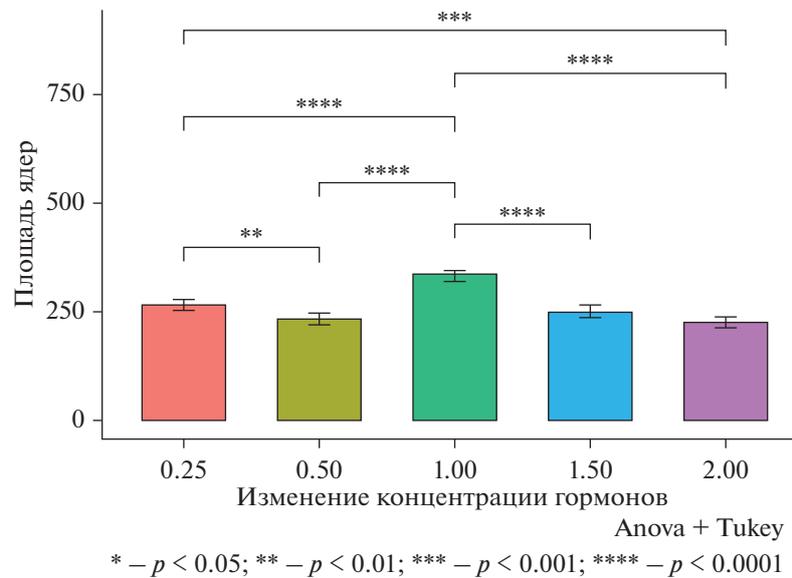


Рис. 3. Изменение площади ядер в μm^2 в зависимости от дозы гормонов E2 и P4. По оси x отложены значения, которые отображают, во сколько раз в каждой экспериментальной группе концентрации гормонов отличаются от стандартной концентрации: 1 – 1 μM P4 и 10 нМ E2, 0.5 – 0.5 μM P4 и 5 нМ E2, 0.25 – 0.25 μM P4 и 2.5 нМ E2, 1.5 – 1.5 μM P4 и 15 нМ E2, 2 – 2 μM P4 и 20 нМ E2.

ной популяции, но меньше, чем в полиплоидной (см. дополнительные материалы, рис. 1, 2). Образцы стромальных клеток, подвергшихся воздействию гормонов для децидуализации *in vitro* (E2 + P4 и E2 + MPA) демонстрируют аналогичное контролю распределение всех показателей между субпопуляциями.

Тетраплоидные клетки демонстрируют уменьшение ядерно-цитоплазматического отношения в обработанных гормонами образцах по сравнению с контролем без обработки. В то же время ядерно-цитоплазматическое отношение полиплоидных клеток при воздействии E2 + P4 значительно больше, чем в контроле, образцы E2 + P4 и E2 + MPA также значительно отличаются друг от друга. В группе E2 + P4 на уровне тенденции растет площадь ядра по сравнению с контролем, в группе E2 + MPA площадь ядра значительно больше, чем в контроле и E2 + P4 (см. дополнительные материалы, рис. 1, 2).

Экспрессия генов децидуализации в клетках стромы в различных условиях

Для того чтобы выяснить, каким образом влияют различные способы обработки гормонами на дифференцировку клеток стромы, был проведен анализ экспрессии генов, ассоциированных с децидуализацией. Кроме того, была исследована роль эмбриона в процессе децидуализации *in vitro*, а также способность стромы отвечать на гормональные воздействия и эмбрион после криоконсервации.

Пролактин (*Prl*)

При любом типе гормонального воздействия уровень экспрессии *Prl*, кодирующего гормон пролактин, достоверно растет относительно стромы без обработки гормонами (б/г). Такая зависимость наблюдается для всех состояний стромы, как для интактной, так и подвергшейся криоконсервации и культивированию с эмбрионом (рис. 6а–6в).

После криоконсервации клеток происходит значимое увеличение экспрессии *Prl* по сравнению с интактной стромой для всех типов гормональных воздействий (рис. 6г–6е). Аналогичные эффекты вызывает влияние эмбриона в группе образцов без обработки (рис. 6г) и образцов под воздействием E2 + P4 (рис. 6д), однако в гормональном режиме E2 + MPA (рис. 6е) влияние эмбриона не вызывает значимого повышения экспрессии *Prl*.

Bmp2

Вне зависимости от типа гормонального воздействия уровень экспрессии *Bone Morphogenetic Protein 2* (*Bmp2*) в целом уменьшался относительно контроля без обработки гормонами (рис. 7а–7в). Однако, стоит отметить, что гормональное воздействие E2 + P4 влияло незначительно в случае культивирования стромы с эмбрионом (рис. 7в).

Криоконсервация клеток достоверно приводит к снижению экспрессии *Bmp2* по сравнению с интактной стромой и культивированием совместно с эмбрионом для всех типов гормональ-

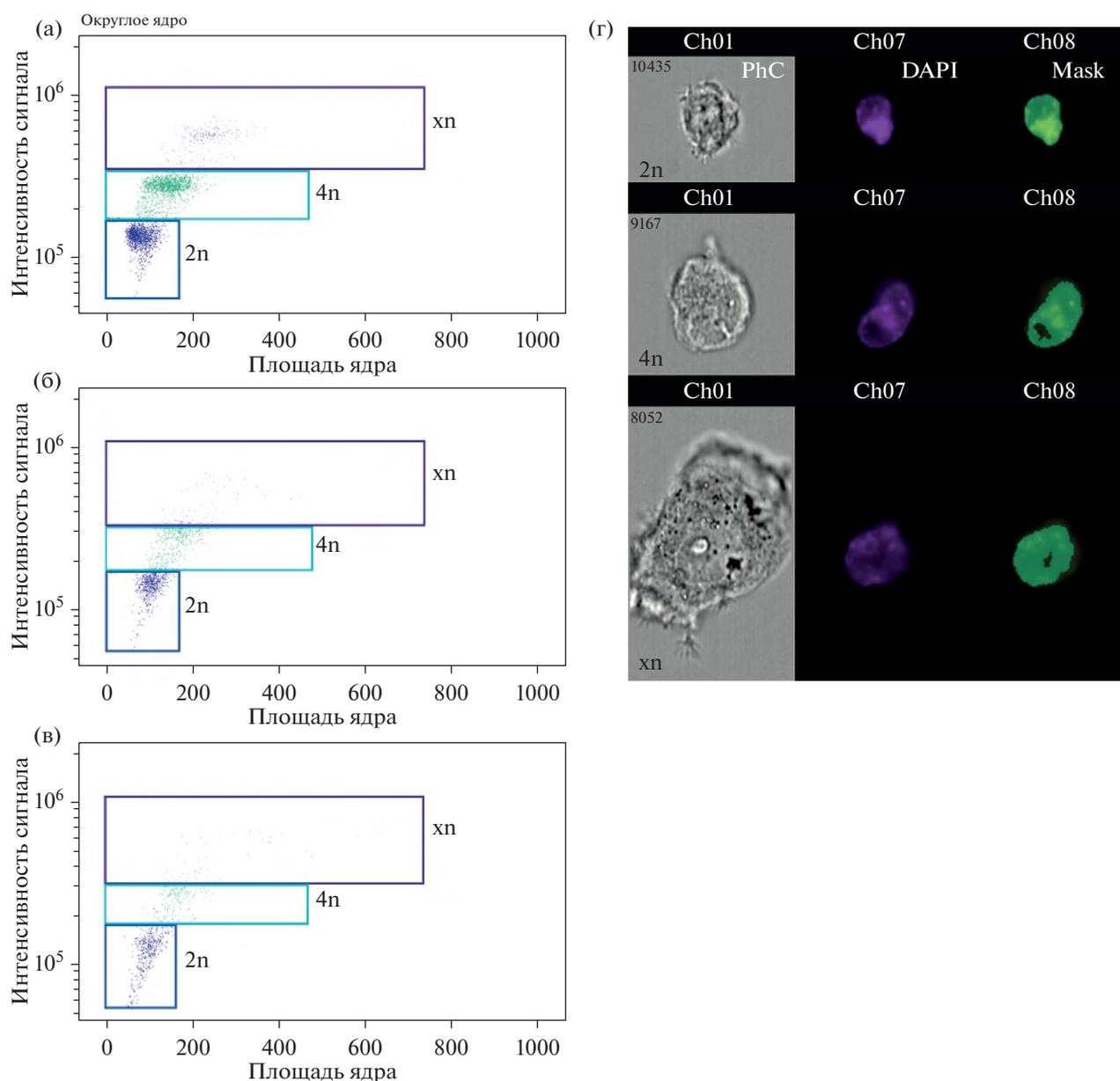


Рис. 4. Распределение клеток по площади ядра и интенсивности сигнала (двухмерная гистограмма). (а) Контрольные образцы, без обработки гормонами (9416 клеток), (б) обработка гормонами 1 мкМ Р4 и 10 нМ Е2 (4366 клеток), (в) обработка гормонами 10 нМ Е2 и 1 мкМ МРА (3795 клеток). На каждом графике 2n – диплоидные клетки, 4n – тетраплоидные клетки, xn – полиплоидные клетки. (г) Изображение клеток, относящихся к представленным субпопуляциям, PhC – фазовый контраст, Mask – маскирование участка, соответствующего ядру клетки.

ных воздействий (рис. 7г–7е). Присутствие эмбриона не влияет на экспрессию *Vmp2* в строме по сравнению с интактной стромой для всех типов режимов культивирования (рис. 7г–7е).

Hand2

При всех типах гормональных воздействий экспрессия *Heart- and neural crest derivatives-expressed protein 2 (Hand2)* значимо увеличивается по

сравнению с контролем без гормонов для любых состояний стромы (рис. 8а–8в).

Криоконсервация клеток не оказывает влияния на экспрессию *Hand2* по сравнению с интактной стромой в случае отсутствия гормонального воздействия (рис. 8г) и обработки Е2 + Р4 (рис. 8д), однако значимо снижает экспрессию *Hand2* по сравнению с интактной стромой в случае гормонального воздействия Е2 + МРА (рис. 8е). Культивирование стромы с эмбрионом достоверно повышает экспрессию *Hand2* по сравнению с ин-

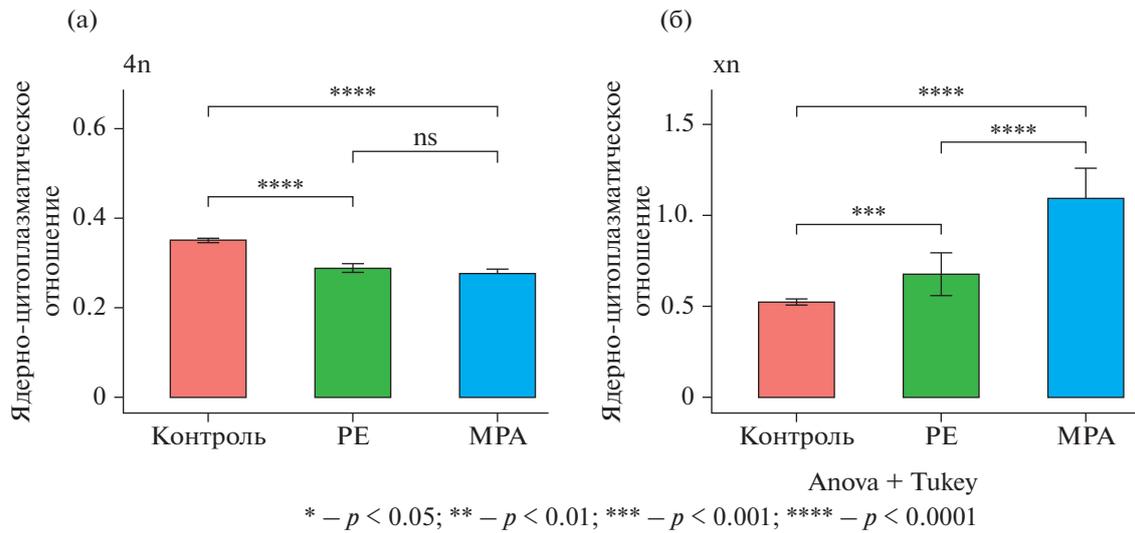


Рис. 5. Ядерно-цитоплазматическое отношение клеток в зависимости от типа гормонального воздействия (без обработки – контроль, E2 + P4 – PE, E2 + MPA – MPA). (a) Тетраплоидные клетки, (б) полиплоидные клетки.

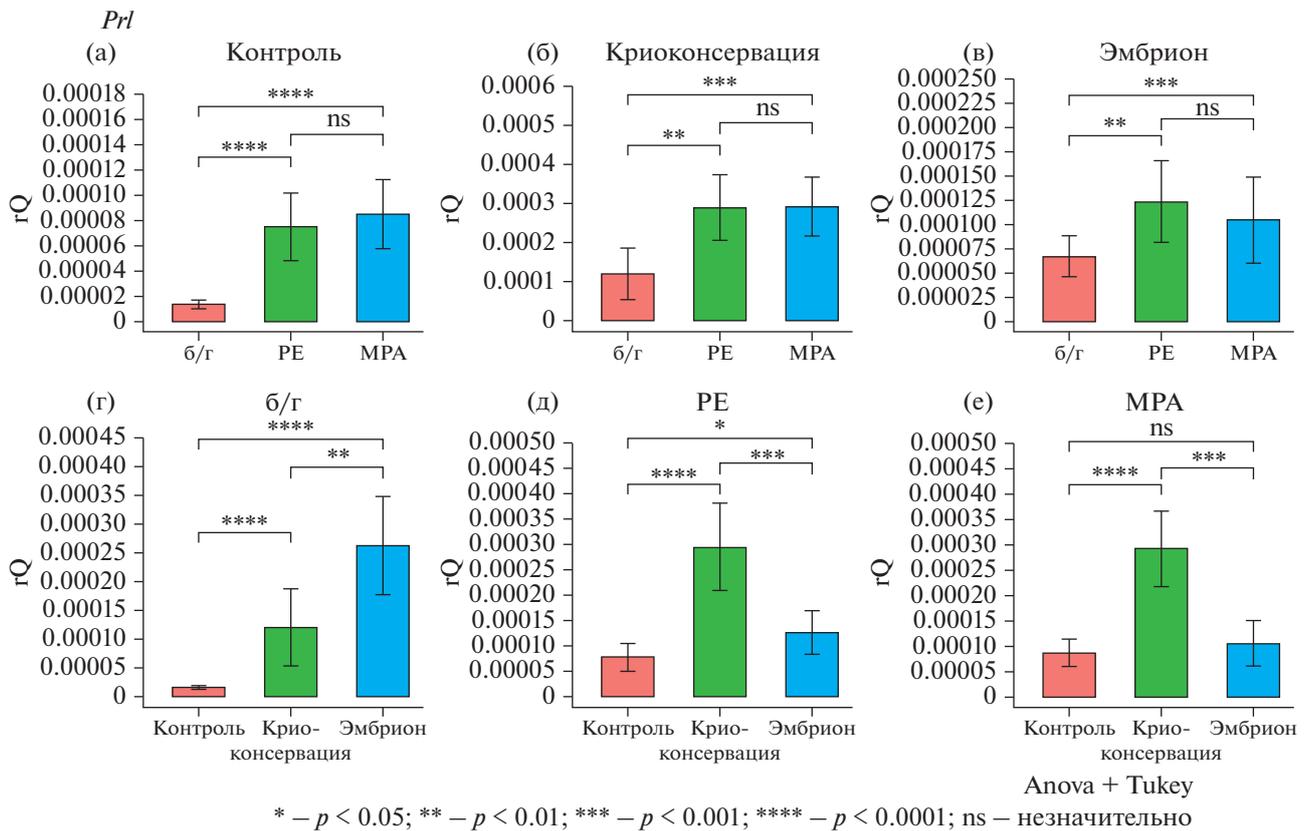
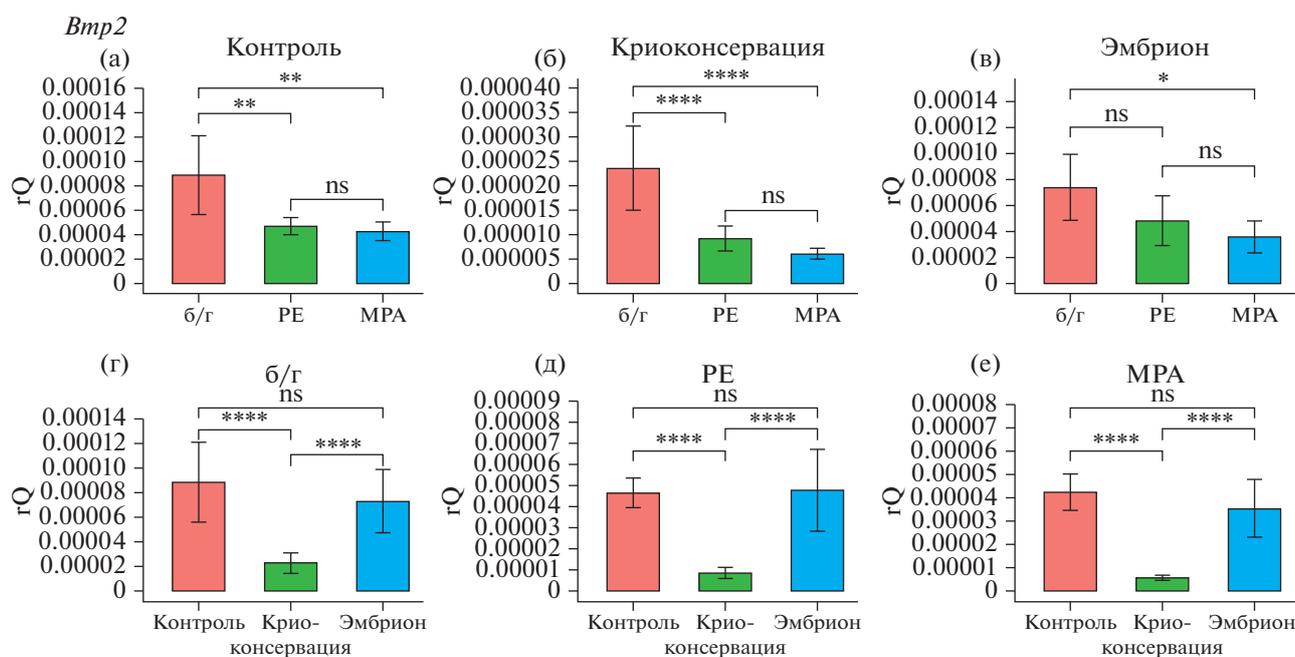


Рис. 6. Экспрессия гена пролактина (*Prl*). rQ – уровень экспрессии *Prl* относительно гена домашнего хозяйства *Actb*. (а, б, в) Влияние гормональных воздействий (б/г – строма без гормонального воздействия, PE – гормональное воздействие E2 + P4, MPA – гормональное воздействие E2 + MPA) на интактную строма (а), строма после криоконсервации (б), строма после культивирования с эмбрионом (в); (г, д, е) влияние состояния стромы (контроль – интактная строма, криоконсервация – строма после криоконсервации, эмбрион – культивирование стромы с эмбрионом) на контрольные образцы без гормонального воздействия (г), образцы при гормональном воздействии E2 + P4 (д), образцы при гормональном воздействии E2 + MPA (е).



Anova + Tukey

* – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$; *** – $p < 0.001$; **** – $p < 0.0001$; ns – незначительно

Рис. 7. Экспрессия *Bmp2*. rQ – уровень экспрессии *Bmp2* относительно гена домашнего хозяйства *Actb*. (а, б, в) Влияние гормональных воздействий (б/г – строма без гормонального воздействия, PE – гормональное воздействие E2 + P4, MPA – гормональное воздействие E2 + MPA) на интактную строму (а), строму после криоконсервации (б), строму после культивирования с эмбрионом (в); (г, д, е) влияние состояния стромы (контроль – интактная строма, криоконсервация – строма после криоконсервации, эмбрион – культивирование стромы с эмбрионом) на контрольные образцы без гормонального воздействия (г), образцы при гормональном воздействии E2 + P4 (д), образцы при гормональном воздействии E2 + MPA (е).

тактной стромой для всех режимов культивирования (рис. 8г–8е).

Hoxa11

Гормональное воздействие (E2 + P4 и E2 + MPA) достоверно увеличивает уровень экспрессии *Hoxa11* относительно интактной стромы (рис. 9а) и стромы после криоконсервации (рис. 9б), но не оказывает влияния на экспрессию *Hoxa11* в случае культивирования совместно эмбрионами (рис. 9в).

Криоконсервация и присутствие эмбриона в культуре клеток стромы значимо уменьшает экспрессию *Hoxa11* по сравнению с интактной стромой для всех типов гормональной обработки (рис. 9г–9е). Однако влияние эмбриона оказалось незначимым только в случае отсутствия гормонального воздействия (рис. 9г).

Rac1

При всех типах гормонального воздействия экспрессия *Rac1* увеличивается по сравнению с контролем без обработки как для интактной стромы

(рис. 10а), так и для стромы после культивирования с эмбрионами (рис. 10в), однако не изменяется для стромы после криоконсервации (рис. 10б).

Криоконсервация стромы не значимо влияет на экспрессию *Rac1* по сравнению с интактной стромой без обработки гормонами (рис. 10г) и гормонального воздействия E2 + P4 (рис. 10д), однако значимо уменьшает экспрессию *Rac1* для воздействия E2 + MPA (рис. 10е). Воздействие эмбрионов значимо повышает экспрессию *Rac1* для всех режимов.

RhoA

Воздействие E2 + P4 не оказывает влияния на экспрессию *RhoA* по сравнению с контролем (без гормонального воздействия) в случае интактной стромы (рис. 11а) и стромы после криоконсервации (рис. 11б), однако значимо повышает экспрессию *RhoA* в случае культивирования стромы с эмбрионами (рис. 11в). Гормональное воздействие на строму E2 + MPA не изменяет уровень экспрессии *RhoA* относительно режима культивирования

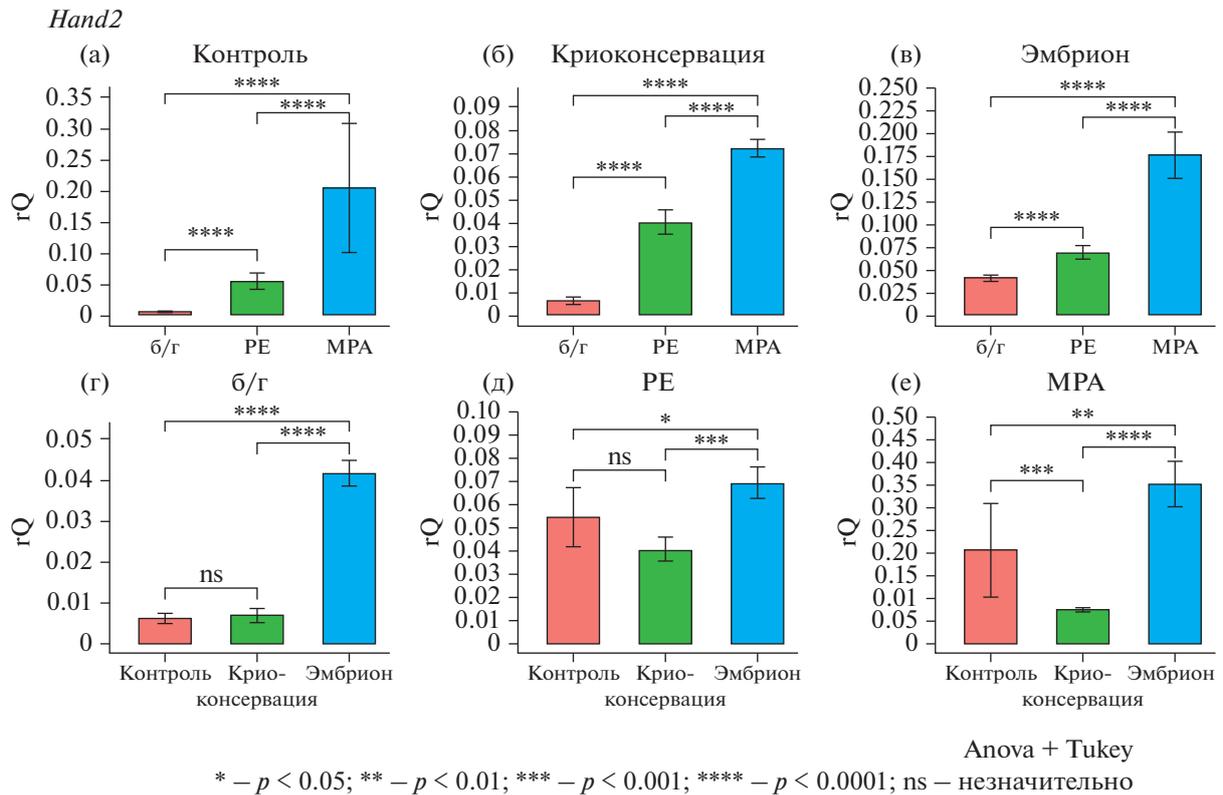


Рис. 8. Экспрессия *Hand2*. rQ – уровень экспрессии *Hand2* относительно гена домашнего хозяйства *Actb*. (а, б, в) Влияние гормональных воздействий (б/г – строма без гормонального воздействия, PE – гормональное воздействие E2 + P4, MPA – гормональное воздействие E2 + MPA) на интактную строму (а), строму после криоконсервации (б), строму после культивирования с эмбрионом (в); (г, д, е) влияние состояния стромы (контроль – интактная строма, криоконсервация – строма после криоконсервации, эмбрион – культивирование стромы с эмбрионом) на контрольные образцы без гормонального воздействия (г), образцы при гормональном воздействии E2 + P4 (д), образцы при гормональном воздействии E2 + MPA (е).

без гормонов в случае интактной стромы (рис. 11а), но значимо снижает экспрессию после криоконсервации (рис. 11б) и значимо увеличивает ее при культивировании стромы с эмбрионами (рис. 11в).

После криоконсервации стромы не наблюдается изменений в уровне экспрессии *RhoA* по сравнению с интактной стромой в случае отсутствия гормонального воздействия (рис. 11г), однако условие криоконсервации достоверно снижает экспрессию *RhoA* при всех типах гормонального воздействия (рис. 11д, 11е). Воздействие эмбриона значимо снижает экспрессию *RhoA* относительно интактной стромы только в случае режима культивирования без гормонов (рис. 11г), в то время как в случае гормональных воздействий (рис. 11д, 11е) уровень экспрессии *RhoA* увеличивается в виде тенденции.

Mmp2

Гормональное воздействие E2 + P4 не оказывает влияния на экспрессию *Matrix Metalloproteinase 2*

(*Mmp2*) относительно стромы без обработки гормонами в случае интактной стромы (рис. 12а) и стромы после криоконсервации (рис. 12б), но значимо повышает экспрессию *Mmp2* при культивировании совместно с эмбрионами (рис. 12в). Гормональное воздействие E2 + MPA достоверно повышает экспрессию *Mmp2* по сравнению со стромой без гормонального воздействия в случае интактной стромы (рис. 12а) и стромы, культивированной с эмбрионами (рис. 12в), но не оказывает влияния на экспрессию *Mmp2* в строме после криоконсервации (рис. 12б).

Криоконсервация стромы вызывает повышение уровня экспрессии *Mmp2* по сравнению интактной стромой в отсутствие гормонального воздействия (рис. 12г), не оказывает влияния на экспрессию *Mmp2* в случае гормонального воздействия E2 + P4 (рис. 12д) и снижает экспрессию *Mmp2* при воздействии E2 + MPA. Присутствие эмбрионов значимо повышает экспрессию *Mmp2* по сравнению с интактной стромой в случае отсутствия гормонального воздействия (рис. 12г) и культивирова-

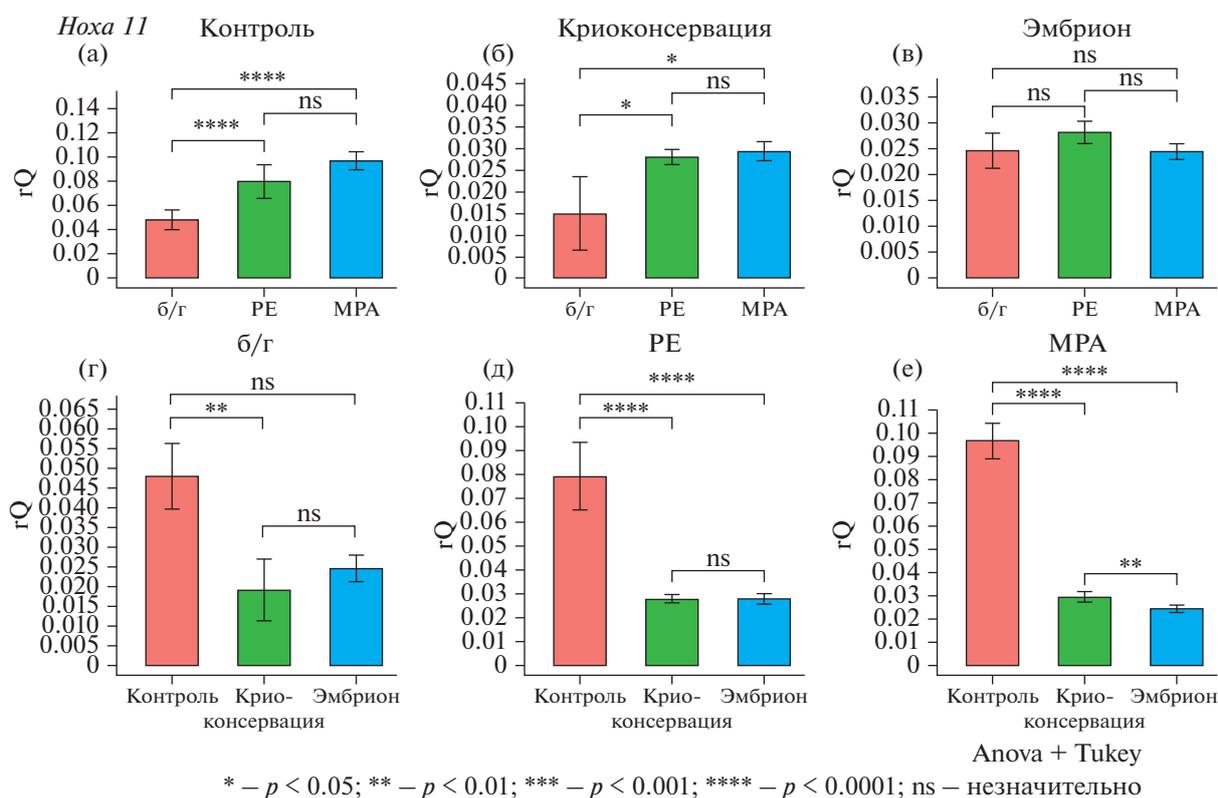


Рис. 9. Экспрессия *Hoxa11*. rQ — уровень экспрессии *Hoxa11* относительно гена домашнего хозяйства *Actb*. (а, б, в) Влияние гормональных воздействий (б/г — строма без гормонального воздействия, PE — гормональное воздействие E2 + P4, МРА — гормональное воздействие E2 + МРА) на интактную строма (а), строма после криоконсервации (б), строма после культивирования с эмбрионом (в); (г, д, е) влияние состояния стромы (контроль — интактная строма, криоконсервация — строма после криоконсервации, эмбрион — культивирование стромы с эмбрионом) на контрольные образцы без гормонального воздействия (г), образцы при гормональном воздействии E2 + P4 (д), образцы при гормональном воздействии E2 + МРА (е).

ния в условиях E2 + P4 (рис. 12д), а также снижает экспрессию *Mmp2* в случае воздействия E2 + МРА (рис. 12е).

Инвазия эмбрионов

Через 72 ч после начала культивирования стромы с эмбрионами площадь распластывания эмбрионов при гормональном воздействии E2 + P4 значительно увеличивается по сравнению со стромай без обработки гормонами и воздействием E2 + МРА, значимых отличий между группами без обработки гормонами и E2 + МРА нет (рис. 13а). Через 96 ч после начала культивирования группы не отличаются между собой (рис. 13б), при этом необходимо отметить, что в группе МРА большая часть эмбрионов дегенерировала ($n = 2$). Фотографии распластывания эмбрионов при различных режимах культивирования представлены на рис. 14.

ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на то, что модели имплантации эмбриона *in vitro* не могут в полной степени отразить процессы, происходящие на раннем этапе беременности, они широко используются, поскольку позволяют наблюдать взаимодействие клеток материнского организма и эмбриона напрямую. Кроме того, такие модели крайне удобны в варьировании условий имплантации, например, с целью выяснить причины возникновения того или иного нарушения. Обычно введение подобных модификаций вызывает технические сложности при изучении имплантации *in vivo*, что делает системы культивирования незаменимым инструментом для расширения понимания механизмов, обеспечивающих протекание данного процесса в норме и патологии. В связи с этим необходимо развивать существующие модели для того, чтобы с большей точностью интерпретировать полученные результаты. Целью этой работы было изучение известных и широко применяемых протоколов дедифференциации клеток стромы в условиях 2D культу-

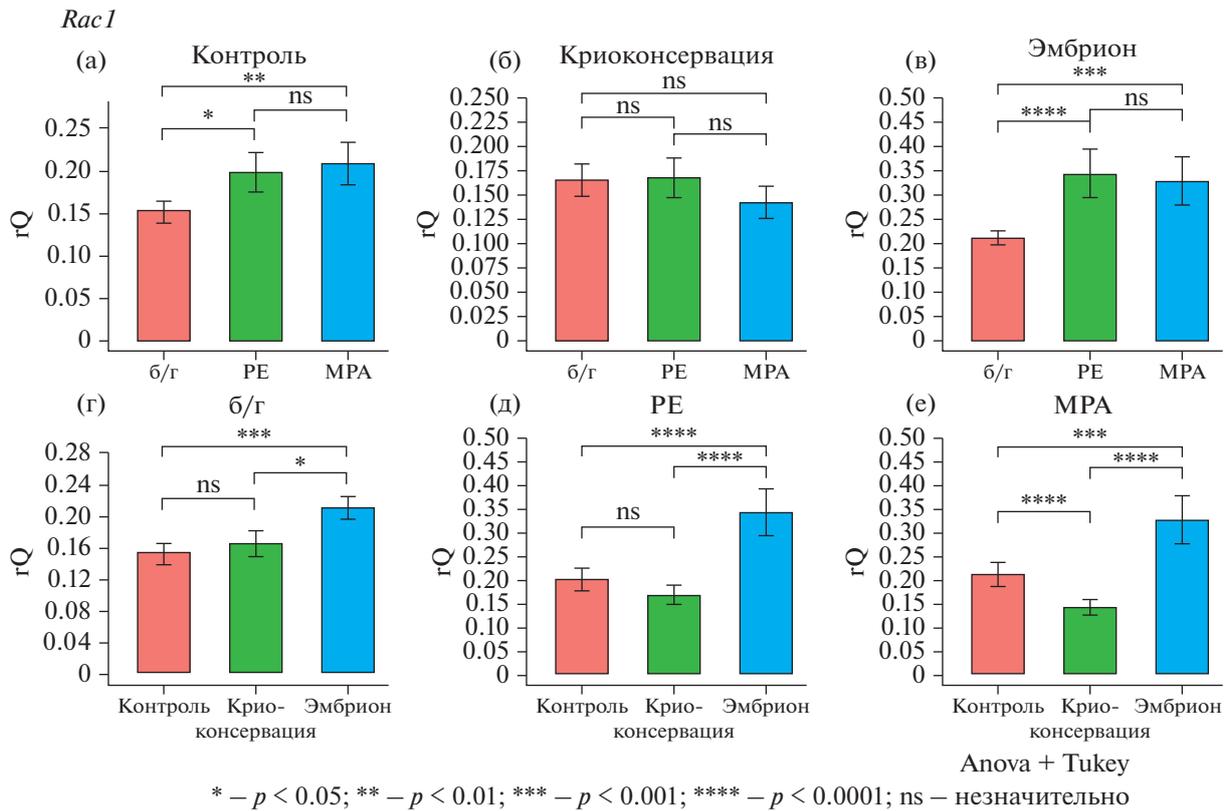


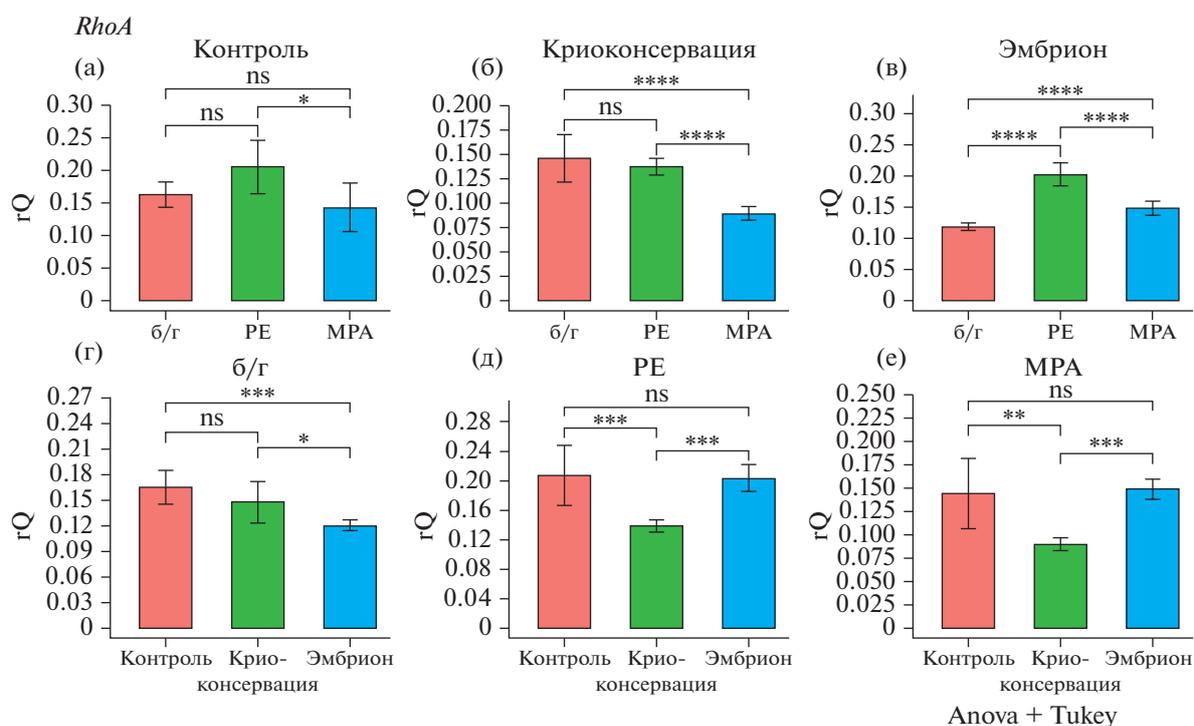
Рис. 10. Экспрессия *Rac1*. rQ – уровень экспрессии *Rac1* относительно гена домашнего хозяйства *Actb*. (а, б, в) Влияние гормональных воздействий (б/г – строма без гормонального воздействия, PE – гормональное воздействие E2 + P4, MPA – гормональное воздействие E2 + MPA) на интактную строму (а), строму после криоконсервации (б), строму после культивирования с эмбрионом (в); (г, д, е) влияние состояния стромы (контроль – интактная строма, криоконсервация – строма после криоконсервации, эмбрион – культивирование стромы с эмбрионом) на контрольные образцы без гормонального воздействия (г), образцы при гормональном воздействии E2 + P4 (д), образцы при гормональном воздействии E2 + MPA (е).

ры для оценки их соответствия процессу децидуализации с последующей имплантацией *in vitro*.

На настоящий момент известно целое множество протоколов децидуализации клеток стромы. Некоторые из них включают достаточно сложный состав гормонов для стимуляции дифференцировки клеток, например, дексаметазон, 5 α -дигидротестостерон, 17 α -гидроксипрогестерон, 8-Br-cAMP и др. (Irwin et al., 1989; Nakamoto et al., 2005). Другие протоколы более простые: клетки стромы подвергаются исключительно обработке P4 (Karia et al., 1991; Das et al., 2012). Однако индукция синтеза пролактина, главного маркера децидуализации, зависит от E2 (Randolph et al., 1990). Поэтому в большинстве современных исследований для запуска дифференцировки стромальных клеток используют E2 в сочетании с P4 или MPA, которые, в свою очередь, необходимы для поддержания децидуализованного фенотипа стромы (Huang et al., 1987; Yang et al., 2017; Berkhout et al., 2018).

Во многих работах, посвященных оптимизации протоколов децидуализации, варьируют различными вариантами гормональных обработок, при этом информация о точной концентрации гормонов, которая принимается за оптимальную для дифференцировки, фактически отсутствует.

Известно, что в ходе децидуализации стромальные клетки приобретают эпителиоподобную морфологию и подвергаются полиплоидизации. Увеличение плоидности часто приводит к увеличению площади ядра в связи с ростом содержания ДНК (Gregory, 2001). Поэтому мы провели оценку такой морфологической характеристики, как площадь ядра клетки, для изучения влияния различных концентраций E2 и P4 на дифференцировку стромы. Анализ результатов показал, что наибольшее увеличение площади ядра наблюдается в клетках, обработанных P4 в концентрации 1 мкМ и E2 – в 10 нМ. Кроме того, нами было выявлено увеличение площади ядра при воздействии 0.25 мкМ P4 и 2.5 нМ E2. Мы предполагаем, что данные концентрации могут быть близки физиологиче-



* – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$; *** – $p < 0.001$; **** – $p < 0.0001$; ns – незначительно

Рис. 11. Экспрессия *RhoA*. rQ – уровень экспрессии *RhoA* относительно гена домашнего хозяйства *Actb*. (а, б, в) Влияние гормональных воздействий (б/г – строма без гормонального воздействия, PE – гормональное воздействие E2 + P4, MPA – гормональное воздействие E2 + MPA) на интактную строму (а), строму после криоконсервации (б), строму после культивирования с эмбрионом (в); (г, д, е) влияние состояния стромы (контроль – интактная строма, криоконсервация – строма после криоконсервации, эмбрион – культивирование стромы с эмбрионом) на контрольные образцы без гормонального воздействия (г), образцы при гормональном воздействии E2 + P4 (д), образцы при гормональном воздействии E2 + MPA (е).

ской концентрации гормонов при децидуализации во время беременности, однако это предположение требует дальнейшей проверки.

MPA является агонистом рецепторов к прогестерону, но также связывается с глюкокортикоидным рецептором (Andraschko et al., 2022). Существуют данные о том, что глюкокортикоидные и эстрогеновые рецепторы могут осуществлять совместную регуляцию экспрессии генов, кодирующих транскрипционные факторы, в эндометрии. Глюкокортикоиды оказывают влияние на децидуализацию клеток стромы в ходе менструального цикла человека (Whirledge et al., 2017). Исходя из этих данных, мы предполагаем, что MPA может оказывать неспецифическое действие на клетки стромы в ходе децидуализации *in vitro*. Поэтому мы задались вопросом о существовании различий в индукции децидуализации между протоколами, в которых используется MPA или P4 в сочетании с E2.

Проточная цитометрия с визуализацией позволила определить субпопуляционную структуру клеток стромы эндометрия при различных режи-

мах культивирования: вне зависимости от гормонального воздействия выявляются субпопуляции диплоидных, тетраплоидных и полиплоидных клеток. Ввиду небольшого количества образцов мы не можем сделать однозначные выводы об изменении соотношения субпопуляций при гормональном воздействии, однако мы полагаем, что количество полиплоидных клеток должно увеличиваться.

Гормональное воздействие E2 + P4 и E2 + MPA приводит к увеличению ядерно-цитоплазматического соотношения полиплоидных клеток. Возможно, это происходит за счет увеличения площади ядер, поскольку в эксперименте с варьированием дозировки гормонов также выявляется увеличение площади ядер при обработке аналогичными концентрациями E2 и P4.

Далее мы исследовали экспрессию генов, продукты которых связаны с процессом децидуализации стромы. Для более наглядной демонстрации совокупности изменений в клетках стромы при любом воздействии качественные изменения экспрес-

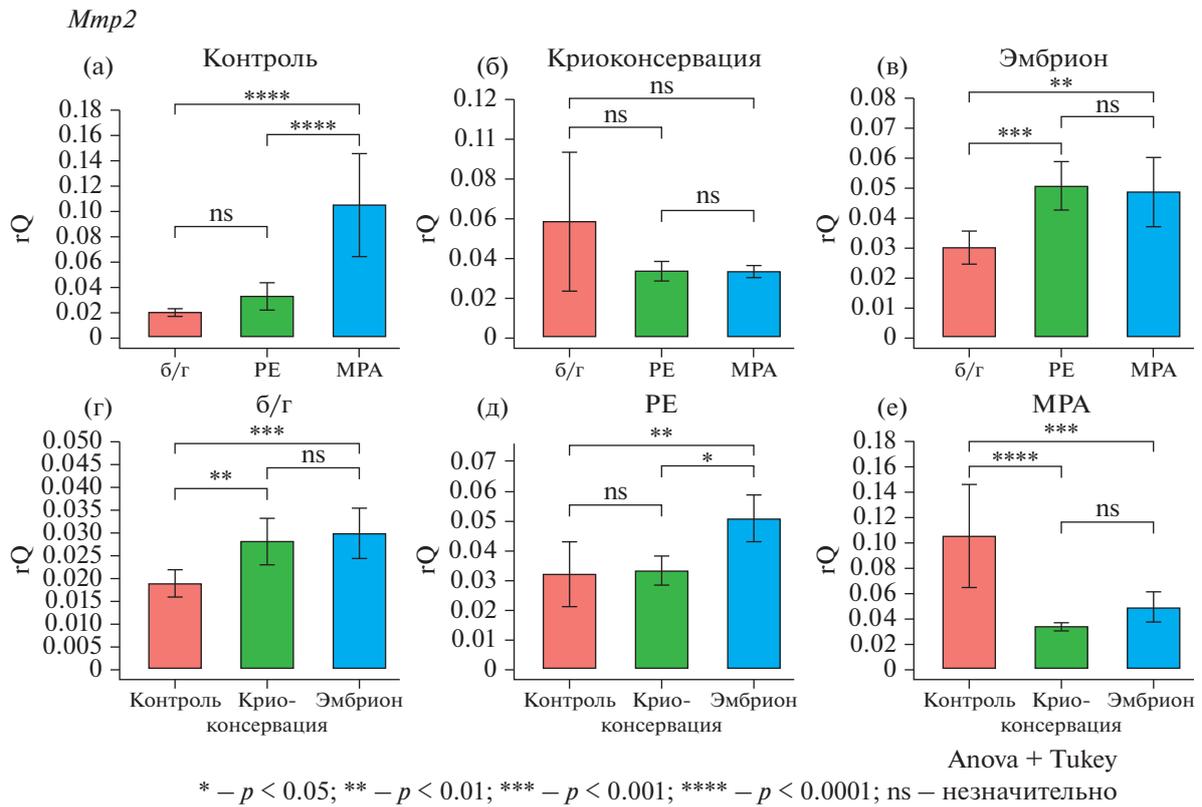


Рис. 12. Экспрессия *Mmp2*. rQ – уровень экспрессии *Mmp2* относительно гена домашнего хозяйства *Actb*. (а, б, в) Влияние гормональных воздействий (б/г – строма без гормонального воздействия, PE – гормональное воздействие E2 + P4, MPA – гормональное воздействие E2 + MPA) на интактную строму (а), строму после криоконсервации (б), строму после культивирования с эмбрионом (в); (г, д, е) влияние состояния стромы (контроль – интактная строма, криоконсервация – строма после криоконсервации, эмбрион – культивирование стромы с эмбрионом) на контрольные образцы без гормонального воздействия (г), образцы при гормональном воздействии E2 + P4 (д), образцы при гормональном воздействии E2 + MPA (е).

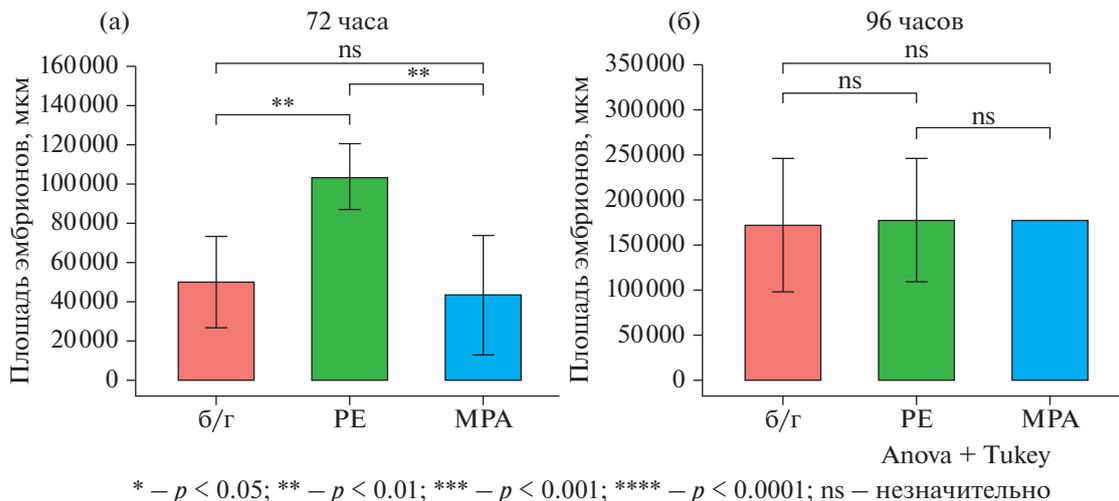


Рис. 13. Площадь распластывания эмбрионов. б/г – без гормонального воздействия, PE – воздействие E2 + P4, MPA – воздействие E2 + MPA. (а) Через 72 ч после начала совместного культивирования со стромой (24 ч после прикрепления эмбрионов), (б) через 96 ч после совместного культивирования со стромой (48 ч после прикрепления эмбрионов).

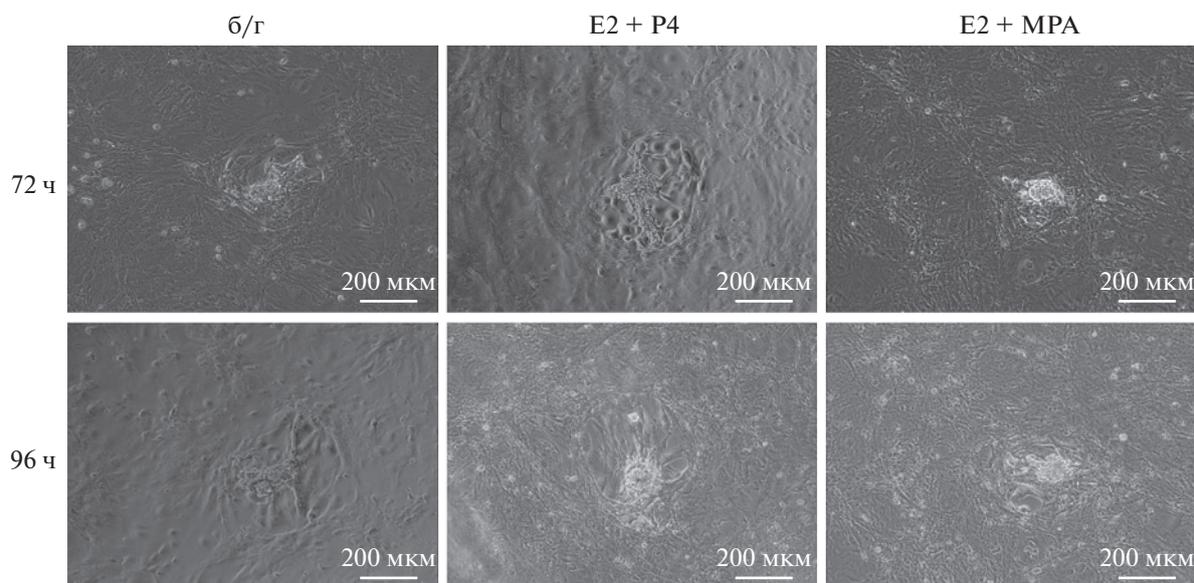


Рис. 14. Фазовый контраст. Распластывание эмбрионов после 72 и 96 ч культивирования со стромой. б/г – Без гормонального воздействия, PE – воздействие E2 + P4, MPA – воздействие E2 + MPA.

сии генов представлены в виде суммирующих графиков (рис. 15).

Тип воздействия указан в заголовке графиков, изменение экспрессии указывается относительно образца, в котором данное воздействие не производилось.

По оси абсцисс отложены исследуемые гены, по оси ординат – качественное изменение экспрессии генов по сравнению с отсутствием воздействия. 1 – повышение экспрессии гена, –1 – снижение экспрессии гена, 0 – экспрессия гена значимо не меняется. При каждом гене представлены значения дополнительных воздействий. Дополнительное воздействие повышает (стрелка вверх) или снижает (стрелка вниз) экспрессию гена, если принимать за контроль указанное в заголовке воздействие.

Экспрессия *Prl*, кодирующего пролактин, увеличивается как в ответ на гормональные воздействия (E2 + P4 и E2 + MPA), так и на присутствие эмбриона (рис. 15а, 15в). Это соотносится с более ранними работами, в которых изучались воздействия половых стероидных гормонов на процесс децидуализации стромы (Huang et al., 1987; Yang et al., 2017). Совместное культивирование стромы с эмбрионом также приводит к увеличению экспрессии *Prl*, причем даже без предварительной индукции децидуализации стромы. Мы предполагаем, что это может быть связано с секрецией эмбрионом факторов, паракринно действующих на клетки стромы. Одним из таких факторов является хорионический гонадотропин (ХГ). Известно, что его секреция вызывает выработку

циклического АМФ (цАМФ) в строме, который в свою очередь активирует транскрипцию генов, отвечающих за синтез пролактина (Makieva et al., 2018). Кроме того, присутствие эмбрионов усиливало эффект гормональных воздействий, что может быть результатом синергии эмбриональных факторов и гормонов (рис. 15в). Увеличение уровня экспрессии *Prl* стромой после криоконсервации в ответ на гормоны относительно интактных клеток (рис. 15г) противоречит аналогичной работе на клетках человека (Bochev et al., 2016). Расхождение в результатах может быть объяснено различными источниками клеток, поскольку в данном исследовании анализ экспрессии проводился на клетках мыши.

Экспрессия *Vmp2*, ответственного за прогрессирование децидуализации, снижалась практически во всех образцах в отличие от стромы без добавления гормонов (рис. 15а, 15б, 15г). Значимых изменений в экспрессии *Vmp2* не выявлялось только в образцах стромы после культивирования с эмбрионами (рис. 15в). Считается, что синтез VMP2 в стромальном компартменте зависит от установления диалога между стромой и люминальным эпителием эндометрия через белок Indian Hedgehog (ИИ) (Makieva et al., 2018). Этим может быть объяснено уменьшение уровня экспрессии *Vmp2* в нашем эксперименте, поскольку мы не использовали клетки эпителия для культивирования со стромой.

Стромальный транскрипционный фактор HAND2 участвует в ингибировании синтеза факторов роста фибробластов (Fibroblast growth fac-

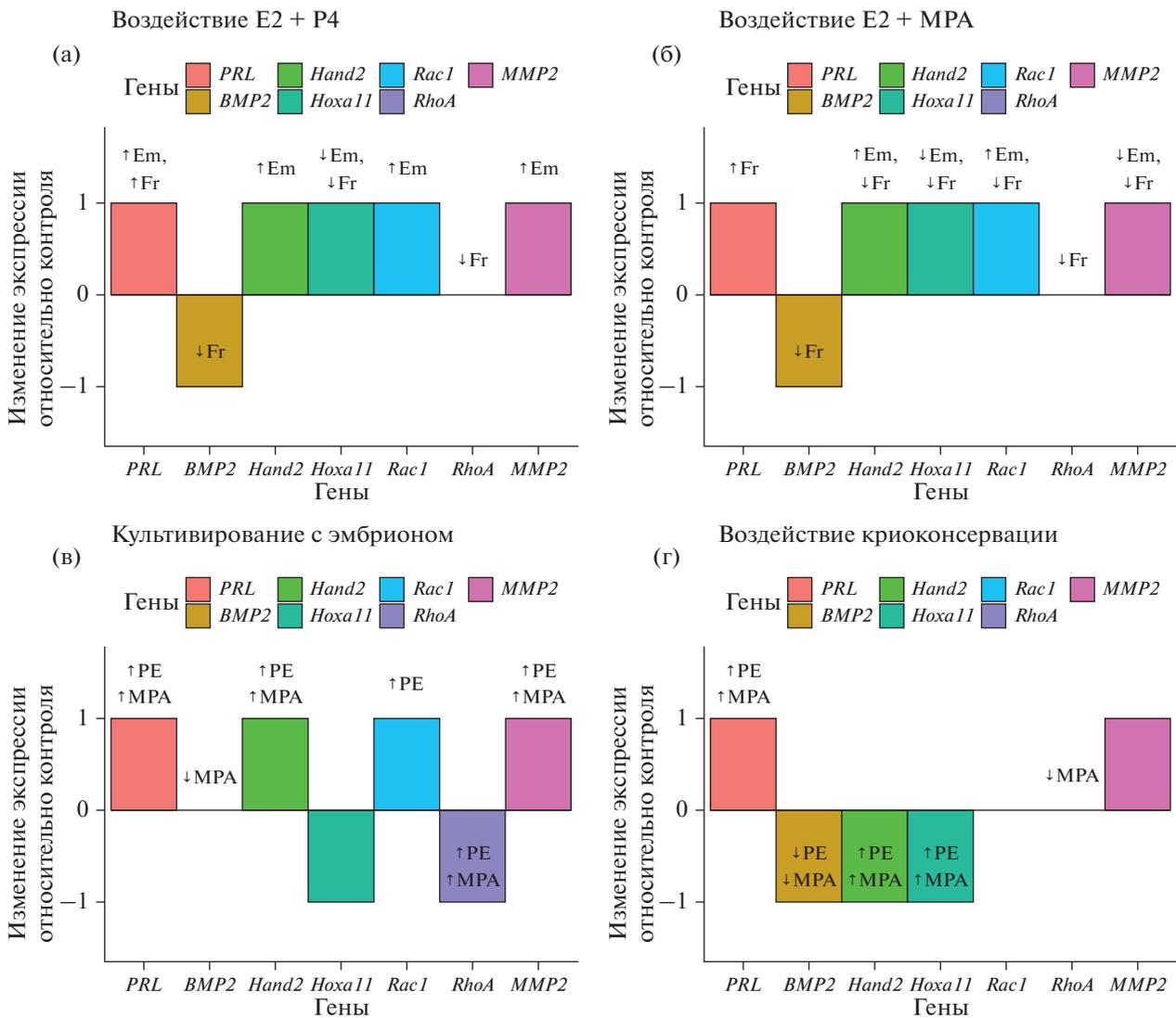


Рис. 15. Графики качественного изменения экспрессии генов, ассоциированных с децидуализацией для стромы: (а) обработанной E2 + P4, (б) обработанной E2 + MPA, (в) подвергшейся криоконсервации, (г) культивированной совместно с эмбрионами. Em – влияние культивирования с эмбрионом, Fr – воздействие криоконсервации, PE – воздействие E2 + P4, MPA – воздействие E2 + MPA.

tors; Fgfs) в строме, которые отвечают за поддержание E2-зависимой пролиферации эпителия эндометрия. Экспрессия гена, кодирующего этот фактор, повышается в ответ на оба варианта гормональных воздействий (рис. 15а, 15б), что соотносится с данными литературы об индукции HAND2 прогестероном (Makieva et al., 2018). Культивирование стромы с эмбрионами дополнительно увеличивает уровень экспрессии *Hand2* (рис. 15в), что говорит в пользу возможного паракринного влияния эмбриональных факторов на строму.

Белок *HOXA11* близок по своей функции более известному в контексте децидуализации стромы *HOXA10* (Ramathal et al., 2010). *HOXA10* имеет

большое значение в ходе подготовки к имплантации, поскольку необходим для полиплоидизации клеток стромы, экспрессии маркеров децидуализации и интегринов на поверхности просветного эпителия (Zhu et al., 2014; Makieva et al., 2018; Massimiani et al., 2019). В нашей работе экспрессия *Hoxa11* увеличивается в ответ на все типы гормональных режимов культивирования стромы, что соотносится с данными литературы об увеличении его экспрессии во время децидуализации. При дополнительном воздействии эмбриона экспрессия *Hoxa11* значительно снижается, что указывает на потенциальную роль эмбриона в процессе регуляции клеточного цикла клеток стромы.

Согласно исследованиям *in vitro*, миграция стромальных клеток в процессе имплантации эмбриона может облегчать его инвазию, а также участвовать в селекции жизнеспособных эмбрионов (Teklenburg et al., 2010; Berkhout et al., 2018). Основными регуляторами миграции стромы являются Rho ГТФазы – Rac1 и RhoA, которые отвечают за динамические клеточные процессы, модулируя динамику актина и микротрубочек, активность миозина и клеточную адгезию. Ранее было выявлено, что активность Rac1 увеличивается в децидуализированной строме в ответ на прикрепившийся эмбрион, а RhoA – уменьшается (Grewal et al., 2008). Мы также показали, что эмбрион в условиях децидуализации повышает экспрессию *Rac1* и снижает *RhoA* в клетках стромы, что потенциально способствует его инвазии за счет усиленной миграционной способности клеток. Важно отметить, что гормональное воздействие само по себе не оказывает такого влияния на экспрессию белков, ассоциированных с миграторным потенциалом клеток.

Наконец, экспрессия *Mmp2* в ответ на воздействие E2 + P4 увеличивается на уровне тенденции. Однако в данных условиях ее экспрессию достоверно повышает присутствие эмбриона, что предположительно способно облегчить инвазию за счет ремоделирования межклеточного матрикса. Эта гипотеза подтверждается функциональным тестом по измерению площадей инвазии эмбрионов, так как наличие эмбриона совместно с гормональным воздействием E2 + P4 дает наилучший результат инвазии (рис. 13).

Экспрессия *Mmp2* увеличивается при добавлении E2 + МРА, однако воздействие эмбриона ее значительно подавляет. Главное отличие воздействия E2 + МРА от E2 + P4 состоит в том, что при дополнительном воздействии эмбриона в случае E2 + P4 экспрессия *Mmp2* повышается, а в случае E2 + МРА, наоборот, понижается. Возможно, это связано с неспецифическим действием МРА, что также является причиной отставания распластывания эмбрионов в данных условиях и их деградации после 96 ч культивирования (рис. 13).

Криоконсервация, по-видимому, искажает фенотипическое преобразование клеток стромы после добавления гормонов, что выражается в снижении экспрессии *Hand2*, *Hoxa11* и отсутствии повышения экспрессии *Rac1* и *Mmp2* в ответ на гормоны.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Суммируя полученные данные, можно сделать вывод о том, что модели децидуализации и имплантации *in vitro* требуют дальнейшей доработки, поскольку они не могут дать правильного пред-

ставления о процессе взаимодействия эмбриона и эндометрия. Так, проанализировав данные инвазии эмбрионов и экспрессии генов, ассоциированных с децидуализацией, мы видим, что исследуемые модели не могут в полной мере отразить процессы *in vivo*. В то же время, мы показали, что модель, в которой используются половые стероидные гормоны E2 и P4, является более релевантной, чем с добавлением МРА. Существующие протоколы индукции дифференцировки клеток стромы не могут считаться оптимальными, поскольку зачастую они включают такие соединения, как МРА, имеющие дополнительные непредсказуемые эффекты на стромальные клетки и эмбрион. В дополнение к этому мы пришли к заключению, что культивирование стромы после криоконсервации является нецелесообразным, поскольку снижет ответ клеток стромы на гормональное воздействие.

Мы полагаем, что развитие 2D моделей имплантации эмбрионов на клетки стромы должно идти в направлении индукции децидуализации гормонами, естественными для клеток эндометрия. Кроме того, необходима модификация системы культивирования клеток стромы: для полноценной дифференцировки важно учитывать воздействие эпителия эндометрия.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования центра коллективного пользования (ЦКП) ИБР им. Н.К. Кольцова РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена за счет гранта Российского Научного Фонда (проект № 21-74-30015).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы использования животных в экспериментах и условия ухода за ними были соблюдены. Люди в данном исследовании не участвовали в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Антон Муромцев выполнил эксперименты и написал текст статьи, Анна Гайдамака написала текст статьи, Любовь Измайлова планировала эксперименты и помогала в анализе результатов проточного цитометра

Amnis, Екатерина Воротеяк планировала работу и отредактировала текст, Григорий Марченко проводил исследование суспензии клеток стромы на Amnis.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

См. файл “Дополнительные материалы”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Andraschko M., de Carvalho M.T., Cardoso Martins Pires H. et al.* Melatonin attenuates glucocorticoid effect induced by medroxyprogesterone acetate in rats // *Gen. Comp. Endocrinol.* 2022. V. 316. P. 113959.
- Berkhout R.P., Lambalk C.B., Huirne J. et al.* High-quality human preimplantation embryos actively influence endometrial stromal cell migration // *J. Assist. Reprod. Genet.* 2018. V. 35 № 4. P. 659–667.
- Bochev I., Belemezova K., Shterev A. et al.* Effect of cryopreservation on the properties of human endometrial stromal cells used in embryo co-culture systems // *J. Assist. Reprod. Genet.* 2016. V. 33. № 4. P. 473–480.
- Clercq K. De, Hennes A., Vriens J.* Isolation of mouse endometrial epithelial and stromal cells for in vitro decidualization // *J. Vis. Exp.* 2017. V. 2017. № 121. P. 1–10.
- Das A., Li Q., Laws M.J., Kaya H et al.* Estrogen-induced expression of Fos-related antigen 1 (FRA-1) regulates uterine stromal differentiation and remodeling // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. № 23. P. 19622–19630.
- Galvao J., Davis B., Tilley M. et al.* Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO // *The FASEB J.* 2014. V. 28. № 3. P. 1317–1330.
- Gregory T.R.* Coincidence, coevolution, or causation? DNA content, cell size, and the C-value enigma // *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society.* 2001. V. 76. № 1. P. 65–101.
- Grewal S., Carver J.G., Ridley A.J. et al.* Implantation of the human embryo requires Rac1-dependent endometrial stromal cell migration // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 105. № 42. P. 16189–16194.
- Hisamatsu Y., Murata H., Tsubokura H. et al.* Matrix metalloproteinases in human decidualized endometrial stromal cells // *Curr. Issues Mol. Biol.* 2021. V. 43. № 3. P. 2111–2123.
- Huang J.R., Tseng L., Bischof P. et al.* Regulation of prolactin production by progestin, estrogen and relaxin in human endometrial stromal cells // *Endocrinology.* 1987. V. 121. P. 2011–2017.
- Irwin J.C., Kirk D., King R.J. et al.* Hormonal regulation of human endometrial stromal cells in culture: an *in vitro* model for decidualization // *Fertil. Steril.* 1989. V. 52. № 5. P. 761–8.
- Izmailova L.S., Gaidamaka A.O., Serbina O.O. et al.* Effect of hormonal background on the expression of sex hormone receptors and the migration potential of mouse endometrial epithelial and stromal cells *in vitro* // *Russ. J. Dev. Biol.* 2021. V. 52. № 6. P. 401–413.
- Kariya M., Kanazaki H., Takakura K. et al.* Interleukin-1 inhibits *in vitro* decidualization of human endometrial stromal cells // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1991. V. 73. № 6. P. 1170–1174.
- Larsen E.C., Christiansen O.B., Kolte A.M. et al.* New insights into mechanisms behind miscarriage // *BMC medicine.* 2013. V. 11. P. 154.
- Macklon N.S., Brosens J.J.* The human endometrium as a sensor of embryo quality // *Biol. Reprod.* 2014. V. 91. № 4. P. 98.
- Makieva S., Giacomini E., Ottolina J. et al.* Inside the endometrial cell signaling subway: Mind the gap(s) // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19. № 9. P. 2477.
- Massimiani M., Lacconi V., La Civita F. et al.* Molecular signaling regulating endometrium-blastocyst crosstalk // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 21. № 1. P. 23.
- Nakamoto T., Okada H., Nakajima T. et al.* Progesterone induces the fibulin-1 expression in human endometrial stromal cells // *Hum. Reprod.* 2005. V. 20. № 6. P. 1447–1455.
- Ojosnegros S., Seriola A., Godeau A.L. et al.* Embryo implantation in the laboratory: an update on current techniques // *Hum. Reprod. Update.* 2021. V. 27. № 3. P. 501–530.
- Okada H.* Rapid downregulation of CD63 transcription by progesterone in human endometrial stromal cells // *Mol. Hum. Reprod.* 1999. V. 5. № 6. P. 554–558.
- Ramathal C.Y., Bagchi I.C., Taylor R.N. et al.* Endometrial decidualization: of mice and men // *Semin. Reprod. Med.* 2010. V. 28. № 1. P. 17–26.
- Randolph J.F., Peegel H., Ansbacher R. et al.* In vitro induction of prolactin production and aromatase activity by gonadal steroids exclusively in the stroma of separated proliferative human endometrium // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1990. V. 162. № 4. P. 1109–1114.
- Teklenburg G., Salker M., Molokhia M. et al.* Natural selection of human embryos: decidualizing endometrial stromal cells serve as sensors of embryo quality upon implantation // *PLoS One.* 2010. V. 5. № 4. P. e10258.
- Whirledge S., Kisanga E.P., Taylor R.N. et al.* Pioneer factors FOXA1 and FOXA2 assist selective glucocorticoid receptor signaling in human endometrial cells // *Endocrinology.* 2017. V. 158. № 11. P. 4076–4092.
- Yang Q., Zhang X., Shi Y. et al.* Increased expression of NDRG3 in mouse uterus during embryo implantation and in mouse endometrial stromal cells during *in vitro* decidualization // *Reproductive Sciences.* 2017. V. 25. № 8. P. 1197–1207.
- Yu H.F., Yang Z.Q., Xu M.Y. et al.* Yap is essential for uterine decidualization through Rrm2/GSH/ROS pathway in response to Bmp2 // *Int. J. Biol. Sci.* 2022. V. 18. № 6. P. 2261–2276.
- Zhang S., Lin H., Kong S. et al.* Physiological and molecular determinants of embryo implantation // *Mol. Aspects Med.* 2013. V. 34. № 5. P. 939–980.
- Zhu H., Hou C.C., Luo L.F. et al.* Endometrial stromal cells and decidualized stromal cells: origins, transformation and functions // *Gene.* 2014. V. 551. № 1. P. 1–14.

Modelling of the Decidualization of Mouse Endometrial Stromal Cells with Subsequent Embryo Implantation *in vitro*

A. O. Gaidamaka^{1, *}, A. V. Muromtsev¹, L. S. Izmailova¹, G. A. Marchenko², and E. A. Vorotelyak¹

¹*Koltzov Institute of Developmental Biology of the Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia*

²*Luminex corporation, Het Zuiderkruis, 1 's-Hertogenbosch, The Netherlands, 5215 MV*

**e-mail: stadtrand@yandex.ru*

The decidualization of stromal cells is a key step in acquiring endometrial receptivity to the embryo. This process is regulated by sex steroid hormones, and in the mouse is additionally induced by embryo attachment. There are many protocols for the induction decidualization of stroma *in vitro*, but most of them require verification of the compliance of the processes occurring in cell culture with those in a living organism. This work focuses on the morphology of stromal cells and the expression activity of genes responsible for the progression of decidualization in 2D culture with subsequent embryo attachment. The feasibility of using several variants of protocols for the induction of decidualization and the possibility of using stromal cells after cryopreservation were also investigated.

Keywords: endometrium, stroma, decidualization, implantation *in vitro*, sex steroid hormones

**СОЗДАНИЕ ЛИНИИ ИНДУЦИРОВАННЫХ
ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК iCGi043-A
С ПОМОЩЬЮ РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ МОНОНУКЛЕАРНЫХ
КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТА
С БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА, АССОЦИИРОВАННОЙ
С ПАТОЛОГИЧЕСКИМ ВАРИАНТОМ p.G2019S LRRK2**

© 2023 г. Е. В. Григорьева^{a, &, *}, С. В. Павлова^{a, &}, А. А. Малахова^{a, &}, Е. С. Яркова^a,
Д. А. Сорогина^a, Ю. М. Минина^a, И. В. Милухина^b, М. А. Николаев^c, С. Н. Пчелина^c,
С. П. Медведев^a, С. М. Закиян^a

^aФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук», просп. акад. Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090 Россия

^bФГБНУ Институт мозга человека им. Н.П. Бехтеревой Российской академии наук,
улица акад. Павлова, 9, Санкт-Петербург, 197376 Россия

^cПервый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова,
ул. Льва Толстого, 6–8, Санкт-Петербург, 197022 Россия

*e-mail: evlena@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 08.12.2022 г.

После доработки 20.12.2022 г.

Принята к публикации 22.12.2022 г.

Патологический вариант p.G2019S в гене *LRRK2* приводит к возникновению наследственной формы болезни Паркинсона (БП) и встречается у 7% пациентов с семейной формой данной патологии, однако пока до конца не ясны механизмы, запускающие нейродегенеративные процессы. Из мононуклеарных клеток периферической крови пациента с наследственной формой БП, ассоциированной с генетическим вариантом *c.6055G>A* (p.G2019S, rs34637584) в гене *LRRK2* нами были получены ИПСК (линия iCGi043-A) с использованием трансфекции эписомными векторами. Данные ИПСК интенсивно пролиферируют плотными однослойными колониями клеток, являются позитивными на эндогенную щелочную фосфатазу, имеют нормальный кариотип (46,XX), экспрессируют маркеры плюрипотентности (OCT4, SOX2, NANOG, TRA-1-60, SSEA-4) и способны дифференцироваться в три зародышевых листка (экто-, энто- и мезодерму), что подтверждает их плюрипотентный статус. Дальнейшая направленная дифференцировка полученных ИПСК в дофаминергические нейроны позволит создать *in vitro* клеточную модель БП, ассоциированную с патологическим вариантом *c.6055G>A* в гене *LRRK2* и внести вклад в понимание патогенеза БП.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, ген *LRRK2*, репрограммирование

DOI: 10.31857/S0475145023010056, EDN: FQQEYU

ВВЕДЕНИЕ

Нарушения структуры гена обогащенной лейциновыми повторами киназы 2 (*LRRK2*) являются наиболее частыми причинами развития наследственных форм болезни Паркинсона (БП). В то же время, точные механизмы участия варианта *LRRK2* в патогенезе БП пока не выяснены. Вариант

p.G2019S, усиливающий киназную активность фермента, встречается у 7% пациентов с семейной формой БП (Пчелина и др., 2011). Репрограммирование соматических клеток к плюрипотентному состоянию является революционной технологией и позволяет получать пациент-специфичные индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) способные неограниченно поддерживаться в культуре и дифференцироваться в любой тип кле-

& Равный вклад авторов.

ток. Данная уникальная возможность позволяет создавать *in vitro* клеточные модели, используемые для поиска триггеров заболевания и тестирования новых лекарственных препаратов. От пациента с БП, ассоциированной с патогенным вариантом *c.6055G>A* (p.G2019S, rs34637584) в гене *LRRK2* нами были получены ИПСК, отвечающие всем требованиям плюрипотентных клеток. Клетки экспрессируют маркеры плюрипотентности (факторы транскрипции SOX2, OCT4 и NANOG, а также поверхностные антигены TRA-1-60 и SSEA-4), имеют нормальный кариотип (46,XX), способны дифференцироваться во все три типа клеток эмбриона (экто-, энто- и мезодерму). Создание клеточной модели данной формы заболевания на основе ИПСК внесет вклад в изучение молекулярных механизмов, лежащих в основе *LRRK2*-зависимого патогенеза БП.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение ИПСК и условия культивирования

1 × 10⁶ МНК трансфицировали набором эпизомных векторов, кодирующих OCT4, KLF4, L-MYC, SOX2, LIN28 и mp53DD (по 0.5 мкг каждого) (Addgene ID № 41855–58, 41813–14) с использованием Neon Transfection System (Thermo Fisher Scientific), программа: 1650 В, 10 мс, 3 раза и культивировали, как описано в инструкции к набору Epi5™ Episomal iPSC Reprogramming Kit (Thermo Fisher Scientific) (https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2Fepi5_episomal_ipsc_reprogramming_man.pdf). На 9 день после трансфекции клетки переводили на среду, содержащую 85% KnockOut DMEM, 15% KnockOut Serum Replacement, 0.1 мМ NEAA, 0.1 мМ 2-меркаптоэтанол, 1% пенициллин-стрептомицин, GlutaMAX-I (все Thermo Fisher Scientific) и 10 нг/мл bFGF (SCI Store). Первичные колонии ИПСК отбирали вручную и высевали в индивидуальные лунки 48-ячеечного планшета с предварительно посаженными митотически инактивированными эмбриональными фибробластами мыши. ИПСК пассировали 2 раза в неделю в соотношении 1 : 10 с добавлением ROCK ингибитора – 2 мкг/мл Thiazovivin (Sigma). Диссоциацию колоний ИПСК осуществляли реагентом TrypLE (Thermo Fisher Scientific). Клетки культивировали при 37°C в 5% CO₂.

Выделение геномной ДНК и РНК

Геномную ДНК выделяли из МНК и ИПСК с использованием набора для очистки геномной ДНК Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega). РНК выделяли с использованием Trizol (Thermo Fisher Scientific) по протоколу производителя.

Генетический анализ

Пациент с патогенным вариантом G2019S в гене *LRRK2* был выявлен в результате скрининга данной замены в группе пациентов с БП с использованием ПЦР-рестрикционного анализа (Pchelina et al., 2006). Наличие варианта *c.6055G>A* в гене *LRRK2* подтверждали секвенированием по Сэнгеру, праймеры приведены в табл. 1. Реакции проводили на амплификаторе T100 Thermal Cycler (Bio-Rad) с использованием BioMaster HS-Taq PCR-Color (2×) (Biolabmix) и следующей программы: 95°C – 3 мин; 35 циклов: 95°C в течение 30 с; 68°C в течение 30 с; 72°C в течение 30 с; и 72°C в течение 5 мин. Реакции секвенирования по Сэнгеру проводили с помощью Big Dye Terminator V. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) и анализировали на генетическом анализаторе ABI 3130XL в ЦКП “Геномика” СО РАН (<http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/corefacility>).

Выявление микоплазмы и эписом

Детекцию контаминации микоплазмы и наличия последовательностей эписом в клетках проводили с помощью ПЦР (95°C 5 мин; 35 циклов: 95°C 15 с, 60°C 15 с, 72°C 20 с) на амплификаторе S1000 Thermal Cycler (Bio-Rad) (Choppa et al., 1998; Okita et al., 2013). Праймеры перечислены в табл. 1.

Анализ кариотипа

Кариотипирование проводили, как описано ранее (Grigor'eva et al., 2020).

Спонтанная дифференцировка in vitro

Потенциал дифференцировки *in vitro* анализировали с помощью формирования эмбрионидных телец, как описано ранее (Grigor'eva et al., 2020).

Иммунофлуоресцентное окрашивание

Клетки фиксировали в 4% параформальдегиде (10 мин, при комнатной температуре (КТ)), пермеабилizировали 0.5% Тритон-Х100 (30 мин, КТ), инкубировали с 1% БСА (30 мин, КТ). Первичные антитела инкубировали в течение ночи при 4°C, вторичные антитела добавляли на 1.5–2 ч при комнатной температуре (табл. 1). Ядра контрастировали DAPI. Микрофотографии были сделаны с использованием микроскопа Nikon Eclipse Ti-E и программного обеспечения NIS Elements.

Количественная ОТ-ПЦР

Обратную транскрипцию 1 мкг РНК проводили с помощью ревертазы M-MuLV (Biolabmix). Количественную ПЦР проводили на приборе LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche) с

Таблица 1. Антитела и олигонуклеотиды, использованные в исследовании

	Антитела, использованные в исследовании			
	Антитело	Разведение	Производитель, кат. №	RRID
Маркеры плюрипотентности	Rabbit IgG anti-OCT4	1 : 200	Abcam, ab18976	RRID:AB_444714
	Rabbit IgG anti-SOX2	1 : 500	Cell Signaling, 3579	RRID:AB_2195767
	Mouse IgG3 anti-SSEA4	1 : 200	Abcam, ab16287	RRID:AB_778073
	Mouse IgM anti-TRA-1-60	1 : 200	Abcam, ab16288	RRID:AB_778563
Маркеры дифференцированных производных	Mouse IgG2a anti- α SMA	1 : 100	Dako, M0851	RRID:AB_2223500
	Mouse IgG1 anti-human CD90	1 : 100	eBioscience, 14090982	RRID:AB_763535
	Rabbit IgG anti-GFAP	1 : 500	Dako Cat # Z0334	RRID:AB_10013382
	Mouse IgG2a anti-Tubulin β 3 (TUBB3)/Clone: TUJ1	1 : 1000	BioLegend, 801201	RRID:AB_2313773
	Mouse IgG1 anti-Cytokeratin 18 (KRT18)	1 : 100	Abcam, ab668	RRID:AB_305647
	Mouse IgG3 anti-SOX17	1 : 600	R&D systems Cat # MAB1924	RRID:AB_2195646
Вторичные антитела	Goat anti-Mouse IgG (H + L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 568	1 : 400	Thermo Fisher Scientific, A11031	RRID:AB_144696
	Goat anti-Mouse IgG2a Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 568	1 : 400	Thermo Fisher Scientific, A21134	RRID:AB_2535773
	Goat anti-Mouse IgG3 Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	1 : 400	Thermo Fisher Scientific, A21151	RRID:AB_2535784
	Goat anti-Mouse IgM Heavy Chain Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 568	1 : 400	Thermo Fisher Scientific, A21043	RRID:AB_2535712
	Goat anti-Rabbit IgG (H + L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	1 : 400	Thermo Fisher Scientific, A11008	RRID:AB_143165
	Goat anti-Rabbit IgG (H + L) Alexa Fluor 568	1 : 400	Thermo Fisher Scientific, A11011	RRID:AB_143157
	Олигонуклеотиды			
	Ген/локус	Размер продукта	Прямой/обратный праймер (5'-3')	
Детекция эписомных векторов	oriP	544 пн	TTCCACGAGGGTAGTGAACC/ TCGGGGGTGTTAGAGACAAC	
Референсный ген (колич. ОТ-ПЦР)	Бета-2-микроглобулин	280 пн	TAGCTGTGCTCGCGCTACT/ TCTCTGCTGGATGACGTGAG	
Маркеры плюрипотентности (колич. ОТ-ПЦР)	NANOG	391 пн	CAGCCCCGATTCTTCCACCAGTCCC/ CGGAAGATCCCAGTCGGGTTCCACC	
	OCT4	94 пн	CTTCTGCTTCAGGAGCTTGG/ GAAGGAGAAGCTGGAGCAAA	
	SOX2	100 пн	GCTTAGCCTCGTTCGATGAAC/ AACCCCAAGATGCACAACCTC	
Детекция микоплазмы	Ген рибосомальной 16S РНК	280 пн	GGGAGCAAACAGGATTAGATACCTT/ TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC	
Подтверждение генетического варианта	<i>LRRK2:c.6055G>A</i>	518 пн	GGCAGATACCTCCACTCAGC/ TTGATTTGCCTCACAAGTGC	

Таблица 2. Паспорт клеточной линии ИПСК человека ICGi042-A

Параметры	Описание
Уникальный идентификатор	ICGi043-A
Альтернативное название линии	LR-21
Учреждение	ФГБНУ Федеральный исследовательский центр “Институт цитологии и генетики СО РАН”, Новосибирск, Россия
Одобрение этического комитета	Исследование одобрено этической комиссией ФГБНУ Институт мозга человека им. Н.П. Бехтеревой Российской академии наук, протокол № 1 от 26.11.2020
Тип клеток	ИПСК
Вид организма	Человек
Дополнительная информация о происхожде- нии клеточной линии	Возраст: 74 Пол: Ж Этническая принадлежность: европеоидная раса
Исходный тип клеток	Мононуклеарные клетки периферической крови
Дата забора биоматериала	2020 год
Способ репрограммирования	Неинтегрирующиеся эписомные плазмидные векторы
Репрограммирующие факторы	OCT4, KLF4, L-MYC, SOX2, LIN28 и p53 shRNA
Клональность	Клональные
Генетическая модификация	Нет
Вид генетической модификации	Нет
Подтверждение элиминации/замолкания репрограммирующих трансгенов	ПЦР, не детектируются
Заболевание	Болезнь Паркинсона
Ген/локус	<i>LRRK2</i> :с.6055G>A (p.G2019S, rs34637584)
Морфология	Монослойные колонии, подобные плюрипотентным клеткам человека
Плюрипотентность	Подтверждена в тестах на формирование эмбрионидных телец
Кариотип	46,XX
Проверка контаминации	Бактерии, грибы и микоплазма не обнаружены
Область применения	<i>In vitro</i> модель БП
Способ культивирования	На питающем слое митотически инактивированных эмбриональных фибробластов мыши
Среда культивирования	85% KnockOut DMEM, 15% KnockOut Serum Replacement, 0.1 mM NEAA, 0.1 mM 2-меркаптоэтанол, 1% пенициллин-стрептомицин, GlutaMAX-I (все Thermo Fisher Scientific), 10 нг/мл bFGF (SCI Store)
Температура, °C	37
Концентрация CO ₂ , %	5
Концентрация O ₂ , %	20
Способ посева	Энзиматический, TripLE (Thermo Fisher Scientific)
Кратность посева	1 : 8–1 : 10
Криоконсервация	90% FBS, 10% DMSO
Условия хранения	Жидкий азот
Учетная запись в реестре	https://hpscereg.eu/cell-line/ICGi043-A
Дата паспортизации/депонирования	05/12/2022

Таблица 3. Характеристика линии ИПСК человека ICGi043-A

Параметры	Метод	Результат	Данные
Морфология	Микрофотография в фазовом контрасте	Характерная для плюрипотентных клеток человека	Рис. 1а
Фенотип	Качественный анализ <i>Окрашивание на щелочную фосфатазу</i>	Положительный	Рис. 1б
	Качественный анализ <i>Иммунофлуоресцентное окрашивание</i>	Положительное окрашивание на маркеры плюрипотентности: OCT4, NANOG, SOX2, TRA-1-60	Рис. 1в
	Количественный анализ <i>ПЦР в реальном времени</i>	Повышение уровня экспрессии маркеров плюрипотентности: NANOG, OCT4, SOX2	Рис. 1г
Генотип	Кариотипирование	46,XX Разрешение 450–500	Рис. 1д
Идентификация	STR анализ	25 из 25 полиморфных локусов совпадают с МНК	Данные доступны по запросу у авторов
Генотипирование	ПЦР-рестрикционный анализ	<i>LRRK2:c.6055G>A</i> , rs34637584	Данные доступны по запросу у авторов
	Секвенирование по Сэнгеру	Подтверждено присутствие генетического варианта в гетерозиготном состоянии	Рис. 1ж
Контаминация	Микоплазма	Отсутствует	Рис. 1з
Потенциал дифференцировки	Формирование эмбрионидных телец, иммунофлуоресцентное окрашивание	Положительное окрашивание на маркеры трех зародышевых листков: αSMA и CD90 (мезодерма); GFAP и TUBB3 (эктодерма); SOX17 и KRT18 (энтодерма)	Рис. 1е
Инфекции донора	ВИЧ, гепатит В, гепатит С	Нет данных	Нет данных
Дополнительная информация о генотипе	Группа крови	Нет данных	Нет данных
	HLA-типирование	Нет данных	Нет данных

набором BioMaster HS-qPCR SYBR Blue 2× (Bio-labmix) с использованием программы: 95°C 5 мин; 40 циклов: 95°C 10 с, 60°C 1 мин. Значения СТ нормализовали к бета-2-микроглобулину с использованием ΔΔСТ-метода.

STR анализ

Аутентификацию линии ИПСК осуществляла компания “Геноаналитика” (<https://www.genoanalytica.ru>) с использованием наборов AmpFISTR Identifier (Applied Biosystems) и Investigator HDplex (QIAGEN), на приборе 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Japan).

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ

Паспорт клеточной линии ИПСК ICGi043-A представлен в табл. 2, полная характеристика этой линии приведена на рис. 1 и в табл. 3.

Генотипирование 74-летней пациентки с БП выявил патологический вариант *LRRK2:c.6055G>A* (p.G2019S). Мононуклеарные клетки (МНК) периферической крови пациентки были репрограммированы к плюрипотентному состоянию с помощью неинтегрирующихся эписомных векторов, экспрессирующих факторы репрограммирования: OCT4, KLF4, L-MYC, SOX2, LIN28 и p53 shRNA (Okita et al., 2013). Полученная линия ИПСК (ICGi043-A)

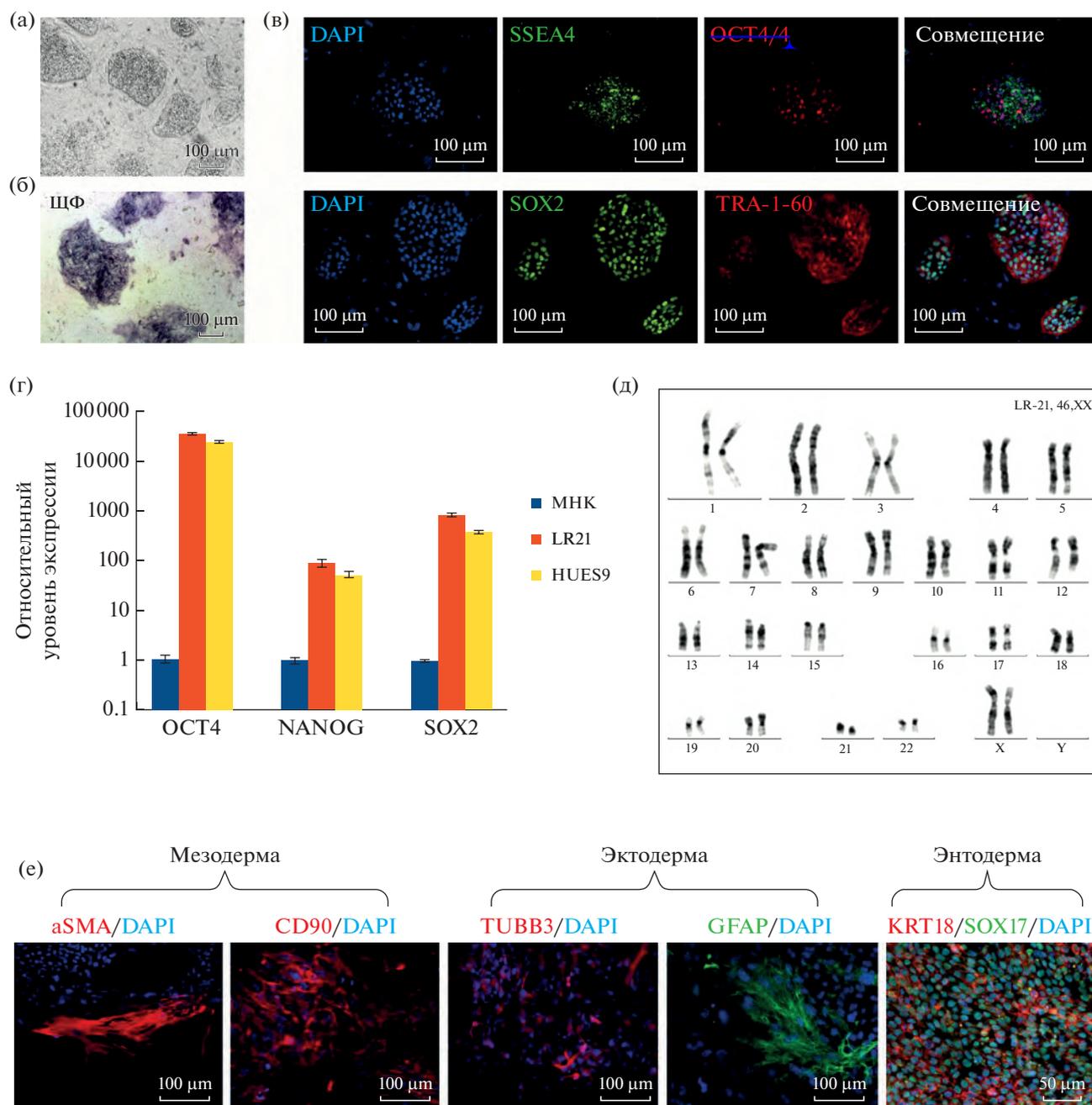


Рис. 1. Характеристика линии ИПСК человека ICGi043-A. (а, б) Клетки линии ICGi043-A, растущие на слое митотически инактивированных эмбриональных фибробластов мыши; (а) морфология клеток; (б) гистохимическое выявление щелочной фосфатазы; (в) иммунофлуоресцентная окраска на маркеры плюрипотентности: OCT4 (красный), SOX2 (зеленый), SSEA4 (зеленый), TRA-1-60 (красный) на 16-м пассаже; (г) ПЦР в реальном времени маркеров плюрипотентности (OCT4, NANOG, SOX2) линии ИПСК ICGi043-A на 16-м пассаже, МНК пациента и линии ЭС клеток HUES9; (д) G-бэндинг линии ICGi043-A на 5 пассаже показал нормальный кариотип (46,XX); (е) иммунофлуоресцентная окраска на маркеры трех зародышевых листков эктодермы (тубулин β3 (TUBB3/TUJ1), глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP)), мезодермы (α-актин гладких мышц (αSMA), поверхностный маркер CD90), энтодермы (SOX17, кератин 18 (KRT18)); (ж) секвеннограммы участков гена *LRRK2* МНК пациента с БП, линии ИПСК ICGi043-A и здорового донора (дикий тип); (з, и) результаты ПЦР анализа; (з) эписомные векторы элиминировали в ИПСК на 15 пассаже; (и) на 17 пассаже не было выявлено контаминации линии микоплазмами. Обозначения: МНК – мононуклеарные клетки периферической крови, HUES9 – линия эмбриональных стволовых клеток человека, служившая положительным контролем экспрессии маркеров плюрипотентности, ЩФ – щелочная фосфатаза. Все масштабные линейки – 100 мкм.

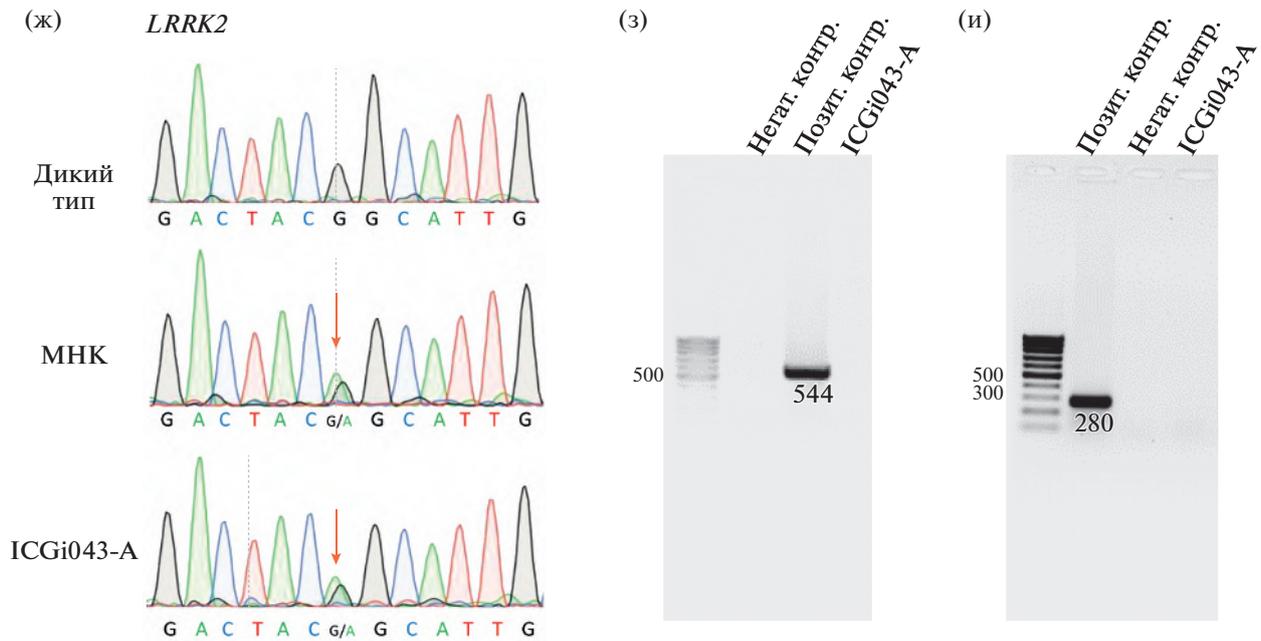


Рис. 1. Окончание.

была подробно охарактеризована. Колонии клеток росли на питающем слое митотически инактивированных эмбриональных фибробластов мыши, демонстрировали типичную морфологию плюрипотентных стволовых клеток человека (рис. 1а), интенсивно пролиферировали и демонстрировали активность щелочной фосфатазы (рис. 1б). Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток показало экспрессию факторов транскрипции SOX2 и OCT4, поверхностных антигенов TRA-1-60 и SSEA-4 на 16 пассаже (рис. 1в). Количественный анализ с помощью ПЦР в реальном времени выявил повышение уровня экспрессии маркеров плюрипотентности OCT4, NANOG и SOX2 на 16 пассаже (рис. 1г). Линия эмбриональных стволовых клеток человека HUES9 (HVRDe009-A) служила положительным контролем экспрессии маркеров плюрипотентности. G-бэндинг линии ICGi043-A на 5 пассаже показал нормальный кариотип (46,XX) (было проанализировано 100 метафазных пластинок; рис. 1д). Наличие полиморфизма в гене *LRRK2* в линии ICGi043-A был подтвержден секвенированием по Сэнгеру и сопоставлен с полиморфизмом в ДНК МНК (рис. 1ж). Способность полученной клеточной линии ICGi043-A дифференцироваться в три зародышевых листка была подтверждена спонтанной дифференцировкой *in vitro* посредством образования эмбриональных тел. Иммунофлуоресцентное окрашивание дифференцированных клеток выявило экспрессию маркеров эктодермы (тубулина β 3 (TUBB3/TUJ1), глиальный фибриллярный кис-

лый белок (GFAP)), мезодермы (α -актин гладких мышц (α SMA), поверхностный маркер CD90), энтодермы (SOX17, кератин 18 (KRT18)) (рис. 1е). Эписомные векторы элиминировали в ИПСК на 15 пассаже (рис. 1з). ПЦР-тест линии ИПСК ICGi043-A не выявил контаминации микоплазмами на 17 пассаже (рис. 1и). Анализ коротких tandemных повторов (STR) линии ИПСК ICGi043-A на 10 пассаже продемонстрировал идентичность МНК по 25 полиморфным локусам (данные доступны по запросу у авторов).

БЛАГОДАРНОСТИ

Репрограммирование мононуклеарных клеток периферической крови и характеристика ИПСК были выполнены в ФГБНУ Федеральный исследовательский центр «Институт цитологии и генетики СО РАН». Биологический материал (периферическая кровь) пациентки с патологическим вариантом *LRRK2:c.6055G>A* (p.G2019S) был предоставлен ФГБНУ Институт мозга человека им. Н.П. Бехтерева РАН. Выделение мононуклеарных клеток и генотипирование было осуществлено в Первом Санкт-Петербургском государственном медицинском университете им. акад. И.П. Павлова. Иммунофлуоресцентную визуализацию проводили с использованием ресурсов Центра коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов ИЦГ СО РАН (<https://ckp.icgen.ru/ckpmain/>), поддержанного Бюджетным проектом ИЦГ СО РАН FWN-2022-0015.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского Научного Фонда, проект № 19-75-20063.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование одобрено этической комиссией ФГБНУ Институт мозга человека им. Н.П. Бехтерева Российской академии наук, протокол № 1 от 26.11.2020. Пациенту была предоставлена вся информация о настоящем исследовании и им собственноручно подписано информированное согласие и информационный лист.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ВКЛАД АВТОРОВ

Е.В. Григорьева, С.В. Павлова и А.А. Малахова внесли равный вклад в работу и выполняли культуральную и молекулярно-генетическую часть работы, а именно, репрограммирование мононуклеарных клеток, получение индивидуальных клонов ИПСК и детальная их характеристика. Ведение индивидуальных клонов ИПСК и кПЦР были выполнены Е.С. Ярковой и Д.А. Сорोगиной. С.П. Медведев выполнил секвенирование по Сенгеру для подтверждения наличия полиморфизмов в полученных ИПСК. Ю.М. Минина выполнила кариотипирование полученной линии ИПСК. Ме-

дицинское сопровождение пациента и предоставление мононуклеарных клеток осуществлено И.В. Милухиной. М.А. Николаев и С.Н. Пчелина провели скрининг пациентов с БП с вариантом G2019S в гене *LRRK2*. Е.В. Григорьева, С.В. Павлова, А.А. Малахова и С.М. Закиян разработали дизайн эксперимента, провели анализ полученных данных и участвовали в написании статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Пчелина С.Н., Иванова О.Н., Емельянов А.К., Якимовский А.Ф.* Клиническое течение *LRRK2*-ассоциированной болезни Паркинсона // Журн. неврологии и психиатрии. 2011. Т. 12. С. 56–62.
- Choppa P.C., Vojdani A., Tagle C. et al.* Multiplex PCR for the detection of *Mycoplasma fermentans*, *M. hominis* and *M. penetrans* in cell cultures and blood samples of patients with chronic fatigue syndrome // Mol. Cell Probes. 1998. V. 12. № 5. P. 301–308.
- Grigor'eva E.V., Malankhanova T.B., Surumbayeva A. et al.* Generation of GABAergic striatal neurons by a novel iPSC differentiation protocol enabling scalability and cryopreservation of progenitor cells // Cytotechnology. 2020. V. 72. № 5. P. 649–663.
- Okita K., Yamakawa T., Matsumura Y. et al.* An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells // Stem Cells. 2013. V. 31. № 3. P. 458–466.
- Pchelina S.N., Yakimovskii A.F., Ivanova O.N., Emelianov A.K., Zakharchuk A.H., Schwarzman A.L.* G2019S *LRRK2* mutation in familial and sporadic Parkinson's disease in Russia // Mov. Disord. 2006. V. 21. № 12. P. 2234–2236.

Generation of an Induced Pluripotent Stem Cell Line, ICGi043-A, by Reprogramming Peripheral Blood Mononuclear Cells from Parkinson's Disease Patient with p.G2019S Mutation in *LRRK2* Gene

E. V. Grigor'eva^{1,*}, S. V. Pavlova¹, A. A. Malakhova¹, E. S. Yarkova¹, D. A. Sorogina¹, J. M. Minina¹, I. V. Miliukhina², M. A. Nikolaev³, S. N. Pchelina³, S. P. Medvedev¹, and S. M. Zakian¹

¹*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, prosp. acad. Lavrentieva, 10, Novosibirsk, 630090 Russia*

²*Behтерева Institute of the Human Brain of the Russian Academy of Sciences, ul. Akademika Pavlova, 9, Saint Petersburg, 197376 Russia*

³*Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, ul. L'va Tolstogo, 6–8, Saint Petersburg, 197022 Russia*

*e-mail: evlena@bionet.nsc.ru

The pathological variant p.G2019S in the *LRRK2* gene leads to the occurrence of a hereditary form of Parkinson's disease (PD) and affects 7% of patients with a familial form of the disease. However, the mechanisms that trigger pathological events during the development of the disease are not yet fully understood. We obtained iPSCs (ICGi043-A line) from peripheral blood mononuclear cells of a patient with a hereditary form of PD associated with the genetic variant c.6055G>A (p.G2019S, rs34637584) in the *LRRK2* gene using transfection with episomal vectors. iPSCs rapidly proliferate in dense monolayer cell colonies, are positive for endogenous alkaline phosphatase, have a normal karyotype (46,XX), express pluripotency markers (OCT4, SOX2, NANOG, TRA-1-60, SSEA-4) and are able to differentiate into three germ layers (ecto-, endo- and mesoderm), which confirms their pluripotent status. Future directed differentiation of the obtained iPSCs into dopaminergic neurons will allow the creation of an in vitro cell model of PD associated with the pathological variant c.6055G>A in the *LRRK2* gene, and contribute to understanding the pathogenesis of PD.

Keywords: Parkinson's disease, induced pluripotent stem cells, polymorphisms, reprogramming

**СОЗДАНИЕ ЛИНИИ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ICGi042-A С ПОМОЩЬЮ
РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК
ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТА С БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА,
АССОЦИИРОВАННОЙ С ГЕНЕТИЧЕСКИМ ВАРИАНТОМ *c.1000G>A*
В ГЕНЕ *LRRK2***

© 2023 г. Е. В. Григорьева^{a, b, c, *, &}, С. В. Павлова^{a, b, c, &}, А. А. Малахова^{a, b, c, &},
С. П. Медведев^{a, b, c}, Ю. М. Минина^a, Ю. В. Вяткин^d, Е. А. Хабарова^{a, e}, Дж. А. Рзаев^e,
Л. В. Коваленко^f, С. М. Закиян^{a, b, c}

^aФГБНУ “Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Российской академии наук”, просп. акад. Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090 Россия

^bФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина
Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Речкуновская, 15, Новосибирск, 630055 Россия

^cФГБНУ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
просп. акад. Лаврентьева, 8, Новосибирск, 630090 Россия

^dФГАОУВО Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
ул. Пирогова, 2, Новосибирск, 630090 Россия

^eФГБУ Федеральный центр нейрохирургии Министерства здравоохранения Российской Федерации,
ул. Немировича-Данченко, 132/1, Новосибирск, 630087 Россия

^fБУ ВО Сургутский государственный университет, просп. Ленина, 1, Сургут,
Ханты-Мансийский автономный округ – Югра, 628403 Россия

*e-mail: evlena@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 20.09.2022 г.

После доработки 08.10.2022 г.

Принята к публикации 10.10.2022 г.

Поиск новых полиморфизмов, связанных с наследственными заболеваниями, важен для диагностики и изучения патологии развития болезни. Мы проанализировали клинический экзом пациента с болезнью Паркинсона и выявили полиморфизмы в генах *LRRK2* (*c.1000G>A*, *c.2167A>G*) и *PINK1* (*c.1562A>C*). Генетический вариант *LRRK2:c.1000G>A* имеет неопределенное клиническое значение и представляет интерес для дальнейшего изучения. Мы создали индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) из мононуклеарных клеток периферической крови пациента с помощью неинтегрирующихся эписомных векторов. ИПСК (линия ICGi042-A) демонстрируют типичную морфологию и нормальный кариотип (46,XY), экспрессируют маркеры плюрипотентности (OCT4, SOX2, NANOG, SSEA4, TRA-1-60) и способны продуцировать производные трех зародышевых листков.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, полиморфизмы, репрограммирование

DOI: 10.31857/S0475145023010068, **EDN:** FRFNVG

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Паркинсона вызвана гибелью дофаминергических нейронов черной субстанции. Лишь 5% всех случаев болезни имеют генетическую

обусловленность. Для диагностики и изучения патологии развития болезни важен поиск новых полиморфизмов, ассоциированных с наследственными формами заболевания. После анализа клинического экзома 78-летнего пациента с болезнью Паркинсона нами были выявлены полиморфизмы

& Равный вклад авторов.

в генах *LRRK2* и *PINK1*. Уникальная технология индуцированной плюрипотентности позволяет создавать пациент-специфичные клеточные модели несущие генетические вариации (мутации, полиморфизмы), ассоциированные с наследственными заболеваниями. Преимуществом данных моделей является способность направленно дифференцировать полученные индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) в узко-специализированный тип клеток, страдающий при определенных патологиях и изучать на дифференцированных клетках молекулярно-генетические механизмы заболевания *in vitro*, а также тестировать потенциальные фармпрепараты. Полученные в данном исследовании ИПСК (линия ICGi042-A) и ее нейральные производные представляют собой уникальную клеточную модель *in vitro* для изучения вклада нуклеотидных вариаций в генах *LRRK2* и *PINK1* в патогенез болезни Паркинсона.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение ИПСК и условия культивирования

Мононуклеарные клетки периферической крови, 1×10^6 МНК, трансфицировали набором эписомных векторов (по 0.5 мкг каждого), кодирующих *OST4*, *KLF4*, *L-MYC*, *SOX2*, *LIN28* и *mp53DD* (Addgene ID № 41855–58, 41813–14) с использованием Neon Transfection System (Thermo Fisher Scientific или TFSscientific), программа: 1650 В, 10 мс, 3 раза и культивировали, как описано ранее (Grigor'eva et al., 2023).

Первичные колонии ИПСК отбирали вручную и высевали на чашки с покрытые внеклеточным матриксом Matrigel (Corning) в среде Essential 8 (TFSscientific) с 1% пенициллином-стрептомицином. Для пассирования ИПСК диссоциировали с помощью 0.5 мМ ЭДТА (Thermo Fisher Scientific) и пассировали в соотношении 1 : 8–1 : 10 с 2 мкМ тиазовивином (STEMCELL Technologies) каждые 4–5 дней. Клетки культивировали при 37°C в 5% CO₂.

Выделение геномной ДНК и РНК

Геномную ДНК выделяли из МНК и ИПСК с использованием набора для очистки геномной ДНК Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega). РНК выделяли с использованием Trizol (Thermo Fisher Scientific) по протоколу производителя.

Генетический анализ

Секвенирование клинического экзона проводили с использованием образца ДНК из пациент-специфичных МНК в компании “Генотек” (<https://www.genotek.ru>). Библиотека была создана с ис-

пользованием набора для подготовки библиотеки ДНК NEBNext Ultra (New England Biolabs) для Illumina после двойного штрих-кодирования с помощью NEBNext Multiplex Oligos для Illumina (New England Biolabs), контроль качества проводили с помощью Agilent Bioanalyzer 2100. Для обогащения библиотеки использовали SureSelectXT Target Enrichment System (Agilent Technologies), секвенирование в режиме Rapid Run Mode. Необработанные считывания, полученные с Illumina HiSeq 2500, загружали в базу данных SRA (проект PRJNA563295, образец SAMN14446263, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosample/14446263>).

Полиморфизмы были подтверждены секвенированием по Сэнгеру, праймеры целевого района приведены в табл. 1. Реакции проводили на амплификаторе T100 Thermal Cycler (Bio-Rad) с использованием BioMaster HS-Taq PCR-Color (2×) (Biolabmix) и следующей программы: 95°C – 3 мин; 35 циклов: 95°C в течение 30 с; 60°C в течение 30 с; 72°C в течение 30 с; и 72°C в течение 5 мин. Реакции секвенирования по Сэнгеру проводили с помощью Big Dye Terminator V. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) и анализировали на генетическом анализаторе ABI 3130XL в ЦКП “Геномика” СО РАН (<http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/corefacity>).

Выявление микоплазмы и эписом

Детекцию контаминации микоплазмы и наличия последовательностей эписом в клетках проводили с помощью ПЦР (95°C 5 мин; 35 циклов: 95°C 15 с, 60°C 15 с, 72°C 20 с) на амплификаторе S1000 Thermal Cycler (Bio-Rad) (Chopra et al., 1998; Okita et al., 2013). Праймеры перечислены в табл. 1.

Анализ кариотипа

Кариотипирование проводили, как описано ранее (Grigor'eva et al., 2020).

Спонтанная дифференцировка *in vitro*

Потенциал дифференцировки *in vitro* анализировали с помощью формирования эмбрионидных тел, как описано ранее (Grigor'eva et al., 2020).

Иммунофлуоресцентное окрашивание

Клетки фиксировали в 4% параформальдегиде (10 мин, при комнатной температуре (КТ)), пермеабилizировали 0.5% Тритон-Х100 (30 мин, КТ), инкубировали с 1% БСА (30 мин, КТ). Первичные антитела инкубировали в течение ночи при 4°C, вторичные антитела добавляли на 1.5–2 ч при комнатной температуре (табл. 1). Ядра контрастировали DAPI. Микрофотографии были сле-

Таблица 1. Антитела и олигонуклеотиды, использованные в исследовании

	Антитела, использованные в исследовании			
	Антитело	Разведение	Производитель, кат. №	RRID
Маркеры плюрипотентности	Rabbit IgG anti-OCT4	1 : 200	Abcam, ab18976	RRID:AB_444714
	Rabbit IgG anti-SOX2	1 : 500	Cell Signaling, 3579	RRID:AB_2195767
	Mouse IgG3 anti-SSEA4	1 : 200	Abcam, ab16287	RRID:AB_778073
	Mouse IgM anti-TRA-1-60	1 : 200	Abcam, ab16288	RRID:AB_778563
Маркеры дифференцированных производных	Mouse IgG2a anti- α SMA	1 : 100	Dako, M0851	RRID:AB_2223500
	Mouse IgG1 anti-Collagen IV	1 : 100	LifeSpan Biosciences, LS-C79603	RRID:AB_2218107
	Rabbit IgG anti-NF200	1 : 1000	Sigma, N4142	RRID:AB_477272
	Mouse IgG2a anti-Tubulin β 3 (TUBB3)/Clone: TUJ1	1 : 1000	BioLegend, 801201	RRID:AB_2313773
	Mouse IgG1 anti-Cytokeratin 18	1 : 100	Abcam, ab668	RRID:AB_305647
	Rabbit IgG anti-GATA6	1 : 50	Cell Signaling Technology, 5851	RRID:AB_10705521
Вторичные антитела	Goat anti-Mouse IgG (H + L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 568	1 : 400	Thermo Fisher Scientific, A11031	RRID:AB_144696
	Goat anti-Mouse IgG1 Alexa Fluor 568	1 : 400	Thermo Fisher Scientific, A21124	RRID:AB_2535766
	Goat anti-Mouse IgG2a Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 568	1 : 400	Thermo Fisher Scientific, A21134	RRID:AB_2535773
	Goat anti-Mouse IgG3 Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	1 : 400	Thermo Fisher Scientific, A21151	RRID:AB_2535784
	Goat anti-Mouse IgM Heavy Chain Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 568	1 : 400	Thermo Fisher Scientific, A21043	RRID:AB_2535712
	Goat anti-Rabbit IgG (H + L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	1 : 400	Thermo Fisher Scientific, A11008	RRID:AB_143165
	Goat anti-Rabbit IgG (H + L) Alexa Fluor 568	1 : 400	Thermo Fisher Scientific, A11011	RRID:AB_143157

Таблица 1. Окончание

	Олигонуклеотиды		
	Ген/локус	Размер продукта	Прямой/обратный праймер (5'–3')
Детекция эписомных векторов	oriP	544 пн	TTCCACGAGGGTAGTGAACC/ TCGGGGGTGTTAGAGACAAC
Референсный ген (колич. ОТ-ПЦР)	Бета-2-микроглобулин	280 пн	TAGCTGTGCTCGCGCTACT/ TCTCTGCTGGATGACGTGAG
Маркеры плюрипотентности (колич. ОТ-ПЦР)	NANOG	391 пн	CAGCCCCGATTCTTCCACCAGTCCC/ CGGAAGATTCCCAGTCGGGTTCCACC
	OCT4	94 пн	CTTCTGCTTCAGGAGCTTGG/ GAAGGAGAAGCTGGAGCAAA
	SOX2	100 пн	GCTTAGCCTCGTCGATGAAC/ AACCCCAAGATGCACAACCTC
Детекция микоплазмы	Ген рибосомальной 16S РНК	280 пн	GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT/ TGCACCATCTGTCACTCTGTAAACCTC
Подтверждение генетического варианта	<i>LRRK2:c.1000G>A</i>	564 пн	ATAATCCTCCTCTCGTCTATTAGGT/ GCCATCTTCATCTCCAATCTTCTC
	<i>LRRK2:c.2167A>G</i>	491 пн	CTGACTCTAATTCTCATTTCCACTC/ GAGACTAAGTTGTAGAGATGCCT
	<i>PINK1:c.1562A>C</i>	466 пн	GAAGGGCATCAGTAGGAGATAGG/ CATTCACAGACCATCACGACACAG

ланы с использованием микроскопа Nikon Eclipse Ti-E и программного обеспечения NIS Elements.

Количественная ОТ-ПЦР

Обратную транскрипцию 1 мкг РНК проводили с помощью ревертазы M-MuLV (Biolabmix). Количественную ПЦР проводили на приборе LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche) с набором BioMaster HS-qPCR SYBR Blue 2× (Biolabmix) с использованием программы: 95°C 5 мин; 40 циклов: 95°C 10 с, 60°C 1 мин. Значения СТ нормализовали к бета-2-микроглобулину с использованием ΔΔСТ-метода.

STR анализ

Аутентификацию линии ИПСК осуществляла компания “Геноаналитика” (<https://www.genoanalityca.ru>) с использованием наборов AmpFISTR Identifier (Applied Biosystems) и Investigator HDplex (QIAGEN), на приборе 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Japan).

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ

Паспорт клеточной линии ИПСК ICGi042-A представлен в табл. 2, полная характеристика этой линии приведена на рис. 1 и в табл. 3.

Клиническое экзомное секвенирование образца ДНК 78-летнего мужчины, больного болезнью Паркинсона, выявило вариации в генах, ассоциированных с болезнью Паркинсона, *LRRK2:c.1000G>A*, *LRRK2:c.2167A>G* и *PINK1:c.1562A>C*. Полиморфизм *LRRK2:c.1000G>A* приводит к аминокислотной замене (p.Glu334Lys) и влияет на структуру одного из функциональных доменов богатой лейцином повторяющейся киназы 2 (*LRRK2*). Мононуклеарные клетки (МНК) периферической крови пациента трансфицировали неинтегрирующимися эписомными плазмидными векторами, экспрессирующими факторы репрограммирования: OCT4, KLF4, L-MYC, SOX2, LIN28 и p53 shRNA (Okita et al., 2013). Полученная линия ИПСК (ICGi042-A) была подробно охарактеризована. Колонии клеток росли на пластике, обработанном белками экстраклеточного матрикса (Matrigel), демонстрировали типичную морфоло-

Таблица 2. Паспорт клеточной линии ИПСК человека ICGi042-A

Параметры	Описание
Уникальный идентификатор	ICGi042-A
Альтернативное название линии	PD12-4Lm
Учреждение	ФГБУН Федеральный исследовательский центр “Институт цитологии и генетики СО РАН”, Новосибирск, Россия
Одобрение этического комитета	Исследование одобрено этической комиссией ФГБУ “Федеральный центр нейрохирургии” Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, протокол № 1 от 14.03.2017
Тип клеток	ИПСК
Вид организма	Человек
Дополнительная информация о происхождении клеточной линии	Возраст: 78 Пол: М Этническая принадлежность: европеоидная раса
Исходный тип клеток	Мононуклеарные клетки периферической крови
Дата забора биоматериала	2015 год
Способ репрограммирования	Неинтегрирующиеся эписомные плазмидные векторы
Репрограммирующие факторы	OCT4, KLF4, L-MYC, SOX2, LIN28 и p53 shRNA
Клональность	Клональные
Генетическая модификация	Нет
Вид генетической модификации	Нет
Подтверждение элиминации/замолкания репрограммирующих трансгенов	ПЦР, не детектируются
Заболевание	Болезнь Паркинсона
Ген/локус	<i>LRRK2:c.1000G>A</i> , rs78501232 <i>LRRK2:c.2167A>G</i> , rs10878307 <i>PINK1:c.1562A>C</i> , rs1043424
Морфология	Монослойные колонии, подобные плюрипотентным клеткам человека
Плюрипотентность	Подтверждена в тестах на формирование эмбрионидных телец
Кариотип	46,XY
Проверка контаминации	Бактерии, грибы и микоплазма не обнаружены
Область применения	<i>In vitro</i> модель болезни Паркинсона
Способ культивирования	Монослойный на пластике, покрытом внеклеточным матриксом Matrigel (Corning)
Среда культивирования	Essential 8 medium (ThermoFisherScientific)
Температура, °C	37
Концентрация CO ₂ , %	5
Концентрация O ₂ , %	20
Способ посева	ЭДТА 0.5 мМ
Кратность посева	1 : 8–1 : 10
Криоконсервация	90% FBS, 10% DMSO
Условия хранения	Жидкий азот
Учетная запись в реестре	https://hpcreg.eu/cell-line/ICGi0042-A
Дата паспортизации/депонирования	24/08/2022

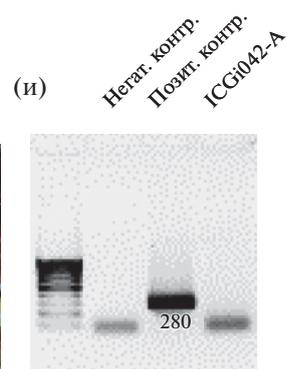
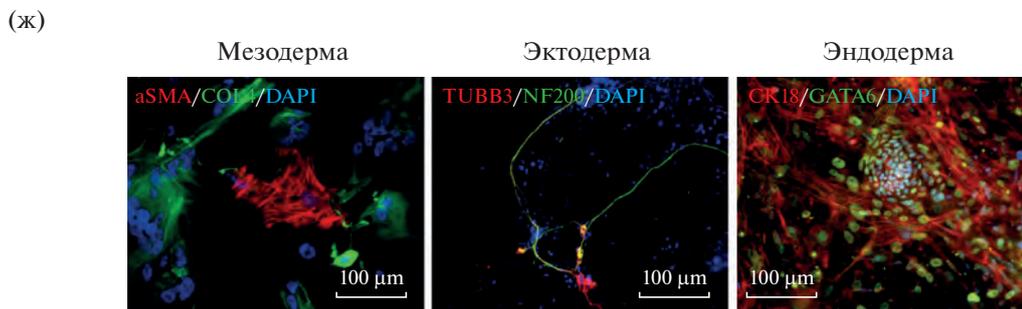
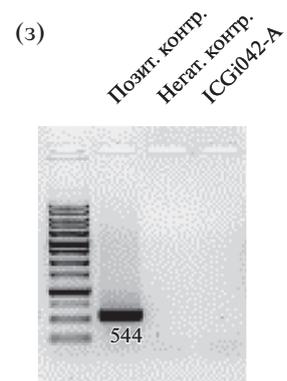
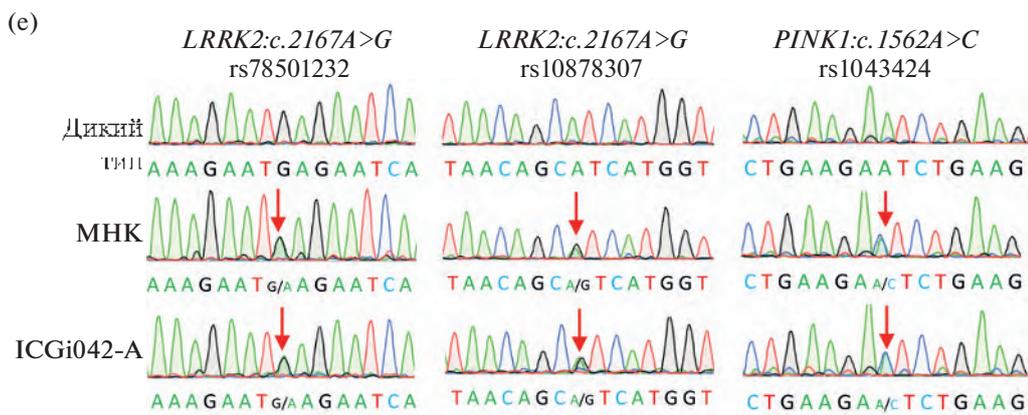
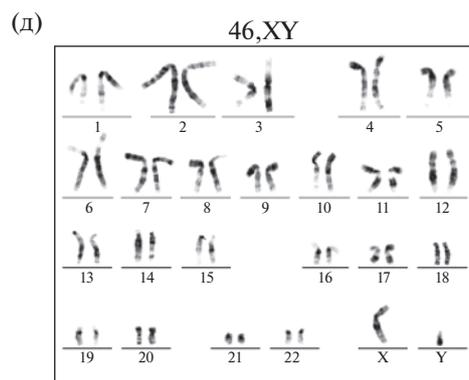
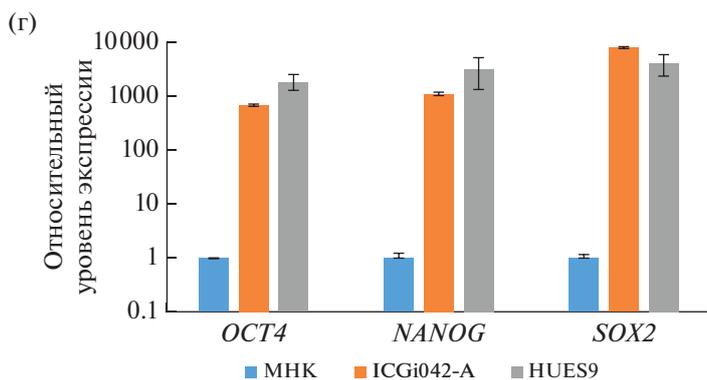
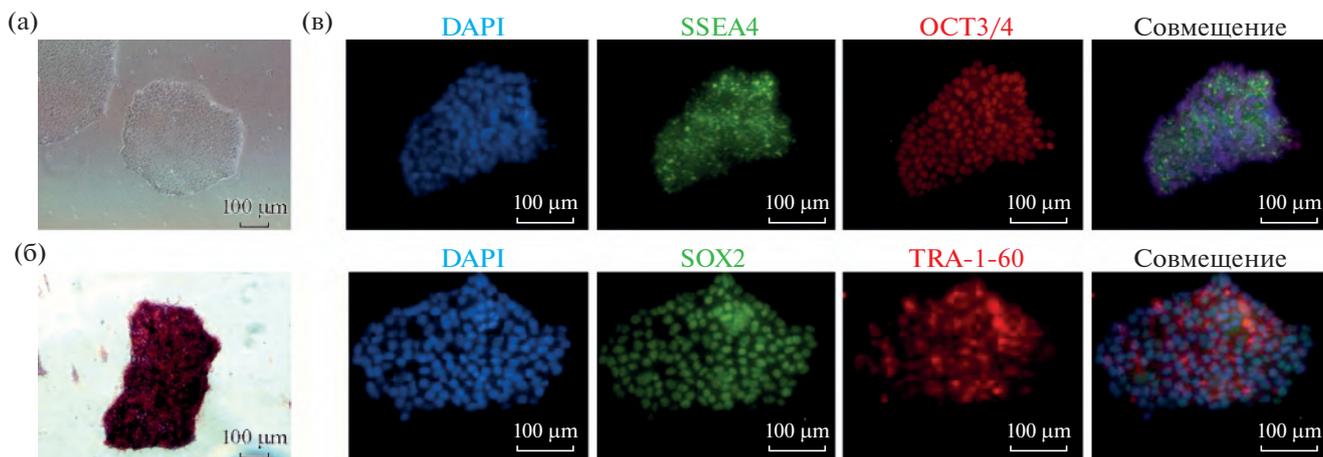


Таблица 3. Характеристика линии ИПСК человека ICGi042-A

Параметры	Метод	Результат	Данные
Морфология	Микрофотография в фазовом контрасте	Характерная для плюрипотентных клеток человека	Рис. 1а
Фенотип	Качественный анализ <i>Окрашивание на щелочную фосфатазу</i>	Положительный	Рис. 1б
	Качественный анализ <i>Иммунофлуоресцентное окрашивание</i>	Положительное окрашивание на маркеры плюрипотентности: OCT4, NANOG, SOX2, TRA-1-60	Рис. 1в
	Количественный анализ <i>ПЦР в реальном времени</i>	Повышение уровня экспрессии маркеров плюрипотентности: NANOG, OCT4, SOX2	Рис. 1г
Генотип	Кариотипирование	46,XY Разрешение 450–500	Рис. 1д
Идентификация	STR анализ	26 из 26 полиморфных локусов совпадают с МНК	Данные доступны по запросу у авторов
Генотипирование	Секвенирование клинического экзема	<i>LRRK2:c.1000G>A</i> , rs78501232 <i>LRRK2:c.2167A>G</i> , rs10878307 <i>PINK1:c.1562A>C</i> , rs1043424	Данные секвенирования загружены в базу данных SRA (SAMN14446263)
	Секвенирование по Сэнгеру	Подтверждено присутствие генетического варианта в гетерозиготном состоянии	Рис. 1е
Контаминация	Микоплазма	Отсутствует	Рис. 1и
Потенциал дифференцировки	Формирование эмбрионидных тел, иммунофлуоресцентное окрашивание	Положительное окрашивание на маркеры трех зародышевых листков: αSMA и COL4 (мезодерма); NF200 и TUBB3/TUJ1 (эктодерма); GATA6 и CK18 (энтодерма)	Рис. 1ж
Инфекции донора	ВИЧ, гепатит В, гепатит С	Нет данных	Нет данных
Дополнительная информация о генотипе	Группа крови	Нет данных	Нет данных
	HLA-типирование	Нет данных	Нет данных

←

Рис. 1. Характеристика линии ИПСК человека ICGi042-A. (а, б) Колонии клеток линии ICGi042-A, растущие на пластике, обработанном белками внеклеточного матрикса; (а) морфология клеток; (б) гистохимическое выявление щелочной фосфатазы; (в) иммунофлуоресцентная окраска на маркеры плюрипотентности: OCT4 (красный), SOX2 (зеленый), SSEA4 (зеленый), TRA-1-60 (красный) на 18-м пассаже; (г) ПЦР в реальном времени маркеров плюрипотентности (OCT4, NANOG, SOX2) линии ИПСК ICGi042-A на 20-м пассаже, МНК пациента и линии ЭС клеток HUES9; (д) G-бэндинг линии ICGi042-A на 16 пассаже показал нормальный кариотип (46,XY); (е) секвенограммы участков генов *LRRK2:c.1000G>A*, *LRRK2:c.2167A>G* и *PINK1:c.1562A>C* МНК пациента с БП, линии ИПСК ICGi042-A и здорового донора (дикий тип); (ж) иммунофлуоресцентная окраска на маркеры трех зародышевых листков: эктодермы (тубулин β3 (TUBB3/TUJ1), нейрофиламент 200 (NF200)), мезодермы (α-актин гладких мышц (αSMA), коллаген IV типа (COL4)), энтодермы (GATA6, кератин 18 (CK18)); (з, и) результаты ПЦР анализа; (з) эписомные векторы элиминировали в ИПСК на 15 пассаже; (и) на 19-м пассаже не было выявлено контаминации линии микоплазмами. Обозначения: МНК – мононуклеарные клетки периферической крови, HUES9 – линия эмбриональных стволовых клеток человека, служившая положительным контролем экспрессии маркеров плюрипотентности. Все масштабные линейки – 100 мкм.

гию плюрипотентных стволовых клеток человека (рис. 1а), были положительными по активности щелочной фосфатазы (рис. 1б) и интенсивно пролиферировали. Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток показало экспрессию факторов транскрипции SOX2 и OCT4, поверхностных антигенов TRA-1-60 и SSEA-4 на 18 пассаже (рис. 1в). Количественный анализ с помощью ПЦР в реальном времени выявил повышение уровня экспрессии маркеров плюрипотентности OCT4, NANOG и SOX2 на 20 пассаже (рис. 1г). Линия эмбриональных стволовых клеток человека HUES9 (HVRDe009-A) служила положительным контролем (Cowan et al., 2004). G-бэндинг линии ICGi042-A на 16 пассаже показал нормальный кариотип (46,XY) (было проанализировано 100 метафазных пластинок; рис. 1д). Полиморфизмы в генах *LRRK2:c.1000G>A*, *LRRK2:c.2167A>G* и *PINK1:c.1562A>C* были подтверждены секвенированием по Сэнгеру в линии ICGi042-A и сопоставлены с полиморфизмами в ДНК МНК (рис. 1е).

Способность полученной клеточной линии ICGi042-A дифференцироваться в три зародышевых листка была подтверждена спонтанной дифференцировкой *in vitro* посредством образования эмбриоидных телец. Иммунофлуоресцентное окрашивание дифференцированных клеток выявило экспрессию маркеров эктодермы (тубулина $\beta 3$ (TUBB3/TUJ1), нейрофиламента 200 (NF200)), мезодермы (α -актин гладких мышц (α SMA), коллаген IV типа (COL4)), энтодермы (GATA6, кератин 18 (CK18)) (рис. 1ж). Эписомные векторы элиминировались в ИПСК на 15 пассаже (рис. 1з). ПЦР-тест линии ИПСК ICGi042-A не выявил контаминации микоплазмами на 19 пассаже (рис. 1и). Анализ коротких tandemных повторов (STR) линии ИПСК ICGi042-A на 16 пассаже продемонстрировал идентичность МНК по 26 полиморфным локусам (данные доступны по запросу у авторов).

БЛАГОДАРНОСТИ

Иммунофлуоресцентную визуализацию проводили с использованием ресурсов Центра коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов ИЦГ СО РАН (<https://ckp.icgen.ru/ckr-tabo/>), поддержанного Бюджетным проектом ИЦиГ СО РАН FWNr-2022-0015.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Фонда научно-технического развития Югры в соответствии с проектом исследования № 2022-05-03/2022.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование одобрено этической комиссией ФГБУ «Федеральный центр нейрохирургии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, протокол № 1 от 14.03.2017. Пациенту была предоставлена вся информация о настоящем исследовании и им собственноручно подписано информированное согласие и информационный лист.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ВКЛАД АВТОРОВ

Е.В. Григорьева, С.В. Павлова и А.А. Малахова внесли равный вклад в работу и выполняли всю культуральную и молекулярно-генетическую часть работы, а именно, репрограммирование мононуклеарных клеток, получение индивидуальных клонов ИПСК и детальная их характеристика. С.П. Медведев выполнил секвенирование по Сэнгеру для подтверждения наличия полиморфизмов в полученных ИПСК. Ю.М. Минина выполнила кариотипирование полученной линии ИПСК. Анализ данных экзомного секвенирования был выполнен Ю.В. Вяткиным. Медицинское сопровождение пациента и предоставление мононуклеарных клеток осуществлено Е.А. Хабаровой и Дж.А. Рзаевым. Е.В. Григорьева, С.В. Павлова, А.А. Малахова, Л.В. Коваленко и С.М. Закиан разработали дизайн эксперимента, провели анализ полученных данных и участвовали в написании статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Choppa P.C., Vojdani A., Tagle C. et al. Multiplex PCR for the detection of *Mycoplasma fermentans*, *M. hominis* and *M. penetrans* in cell cultures and blood samples of patients with chronic fatigue syndrome // *Mol. Cell Probes*. 1998. V. 12. № 5. P. 301–308.
- Cowan C.A., Klimanskaya I., McMahon J. et al. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts // *N. Engl. J. Med.* 2004. V. 350. № 13. P. 1353–1356.
- Grigor'eva E.V., Malankhanova T.B., Surumbayeva A. et al. Generation of GABAergic striatal neurons by a novel iPSC differentiation protocol enabling scalability and cryopreservation of progenitor cells // *Cytotechnology*. 2020. V. 72. № 5. P. 649–663.
- Grigor'eva E.V., Kopytova A.E., Yarkova E.S., Pavlova S.V., Sorogina D.A., Malakhova A.A., Malankhanova T.B., Baydakova G.V., Zakharova E.Y., Medvedev S.P., Pchelina S.N., Zakian S.M. Biochemical characteristics of iPSC-derived dopaminergic neurons from N370S GBA variant carriers with and without Parkinson's disease // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. 24(5). 4437. <https://doi.org/10.3390/ijms24054437>
- Okita K., Yamakawa T., Matsumura Y. et al. An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells // *Stem Cells*. 2013. V. 31. № 3. P. 458–466.

**Generation of an Induced Pluripotent Stem Cell Line, ICGi042-A,
by Reprogramming Peripheral Blood Mononuclear Cells from Parkinson's Disease
Patient with *c.1000G>A* Mutation in *LRRK2* Gene**

**E. V. Grigor'eva^{1, 2, 3, *}, S. V. Pavlova^{1, 2, 3}, A. A. Malakhova^{1, 2, 3}, S. P. Medvedev^{1, 2, 3}, J. M. Minina¹,
Y. V. Vyatkin⁴, E. A. Khabarova^{1, 5}, J. A. Rzaev⁵, L. V. Kovalenko⁶, and S. M. Zakian^{1, 2, 3}**

¹*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
prosp. acad. Lavrentieva, 10, Novosibirsk, 630090 Russia*

²*Meshalkin National Medical Research Center, Ministry of Health of the Russian Federation,
ul. Rechkunovskaya, 15, Novosibirsk, 630055 Russia*

³*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
prosp. acad. Lavrentieva, 8, Novosibirsk, 630090 Russia*

⁴*Novosibirsk State University, ul. Pirogova, 2, Novosibirsk, 630090 Russia*

⁵*FSBI Federal Neurosurgical Center, ul. Nemirovicha-Danchenko, 132/1, Novosibirsk, 630087 Russia*

⁶*Khanty-Mansiysk Autonomous Okrug – Ugra “Surgut State University”, prosp. Lenina, 1, Surgut, 628403 Russia*

**e-mail: evlana@bionet.nsc.ru*

The search for new polymorphisms associated with hereditary diseases is important for diagnostics and the study of the disease development pathology. We have analyzed clinical exome of a Parkinson's disease patient and identified single-nucleotide variations in the *LRRK2* (*c.1000G>A*, *c.2167A>G*) and *PINK1* (*c.1562A>C*) genes. The *LRRK2:c.1000G>A* mutation has uncertain clinical significance, and is interesting for further investigation. We generated induced pluripotent stem cells (IPSCs) from PBMCs of the patient by a non-integrating episomal vectors. IPSCs demonstrate typical morphology and normal karyotype (46,XY), express pluripotency markers (OCT4, SOX2, NANOG, SSEA4, TRA-1-60), and are able to produce derivatives of three germ layers.

Keywords: Parkinson's disease, induced pluripotent stem cells, polymorphisms, reprogramming

**ЛИНИЯ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ICGi023-A, ПОЛУЧЕННАЯ ОТ ПАЦИЕНТА
С ПОЛИМОРФИЗМАМИ В ГЕНАХ *LRRK2* И *PINK1*,
АССОЦИИРОВАННЫМИ С БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА**

© 2023 г. А. А. Малахова^{a, b, c, *, &}, С. В. Павлова^{a, b, c, &}, Е. В. Григорьева^{a, b, c, &},
С. П. Медведев^{a, b, c}, Ю. М. Минина^a, Ю. В. Вяткин^d, Е. А. Хабарова^{a, e}, Д. А. Рзаев^e,
Л. В. Коваленко^f, С. М. Закиян^{a, b, c}

^aФГБНУ Федеральный исследовательский центр “Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук”, просп. акад. Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090 Россия

^bФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина
Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Речуновская, 15, Новосибирск, 630055 Россия

^cФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения
Российской академии наук, просп. акад. Лаврентьева, 8, Новосибирск, 630090 Россия

^dФГАОУВО Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
ул. Пирогова, 2, Новосибирск, 630090 Россия

^eФГБУ Федеральный центр нейрохирургии Министерства здравоохранения Российской Федерации,
ул. Немировича-Данченко, 132/1, Новосибирск, 630087 Россия

^fБУВО Ханты-Мансийского автономного округа – Югры “Сургутский государственный университет”,
просп. Ленина, 1, Сургут, Ханты-Мансийский автономный округ – Югра, 628403 Россия

*e-mail: amal@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 21.09.2022 г.

После доработки 07.10.2022 г.

Принята к публикации 10.10.2022 г.

Болезнь Паркинсона – это нейродегенеративное заболевание, лишь в 5% случаев имеющее известную генетическую обусловленность. Анализ клинического экзоза пациента со случаями паркинсонизма в семейном анамнезе выявил полиморфизмы в генах *LRRK2* и *PINK1*. Мононуклеарные клетки крови пациента репрограммированы к плюрипотентному состоянию с помощью эписомных векторов, экспрессирующих факторы плюрипотентности. Линия индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) демонстрировала типичную морфологию плюрипотентных клеток человека, имела нормальный кариотип, экспрессировала OCT4, NANOG, SOX2 и TRA-1-60 и давала производные трех зародышевых листков при спонтанной дифференцировке *in vitro*. Полученная линия ИПСК является ценным инструментом для изучения вклада полиморфных вариантов генов *LRRK2* и *PINK1* в патогенез болезни Паркинсона.

Ключевые слова: индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, репрограммирование, болезнь Паркинсона

DOI: 10.31857/S047514502301007X, **EDN:** FRKMTС

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Паркинсона (БП) является одним из самых распространенных нейродегенеративных заболеваний. Развитие патологии обусловлено гибелью нейронов черной субстанции головного мозга, продуцирующих нейромедиатор дофамин. Снижение уровня дофамина вызывает целый набор тяжелых симптомов, таких как брадикинезия, ри-

гидность мышц и тремор. Большинство случаев заболевания возникает в возрасте 60–70 лет, однако в 10–15% случаев болезнь Паркинсона дебютирует в возрасте до 45 лет. Помимо идиопатической формы БП, которая, как правило, имеет позднее начало, существует наследственная форма БП, для которой известны случаи с ранним началом. На сегодняшний день известно более 25 генетических локусов, ассоциированных с БП, мутации в которых объясняют 3–5% случаев возникновения

& Равный вклад авторов.

заболевания (Bloem et al., 2021). Наиболее часто наследственные формы БП обусловлены патологическими вариантами генов *SNCA*, *GBA* и *LRRK2*, характеризующимися аутосомно-доминантным типом наследования, а также генов *Parkin*, *PINK1*, *DJ-1* и *ATP13A2*, наследующимися по аутосомно-рецессивному типу. Таким образом, для БП характерна существенная генетическая гетерогенность. Как клиническая, так и генетическая гетерогенность приводят к большим трудностям при разработке новых средств диагностики и лечения БП. Создание клеточных моделей заболеваний человека имеет важное значение для изучения механизмов развития патологии и проведения фармакологических исследований. Получение культур нейронов среднего мозга пациентов путем биопсии невозможно. Решить проблему позволяет использование технологии индуцированной плюрипотентности. Дифференцированные производные пациент-специфичных ИПСК воспроизводят фенотипические особенности проявления болезни у конкретных пациентов и могут служить моделями для создания и тестирования новых лекарственных средств. В настоящей работе описано получение и детальная характеристика новой линии ИПСК ICGI023-A, полученной путем репрограммирования мононуклеарных клеток крови пациента с БП, несущего генетические варианты *LRRK2:c.1653C>G*, *LRRK2:c.4193G>A*, *PINK1:c.1018G>A*, *PINK1:c.1562A>C*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение ИПСК и условия культивирования

5×10^5 МНК трансфицированы набором эпизомных векторов (по 500 нг каждого), кодирующих OCT4, KLF4, L-MYC, SOX2, LIN28 и mp53DD (Addgene № 41855-58, 41813-14) с помощью Neon Transfection System (Thermo Fisher Scientific). Дальнейшее культивирование клеток проводили по протоколу получения фидер-независимых ИПСК, как описано в инструкции для пользователей Epi5™ Episomal iPSC Reprogramming Kit (Thermo Fisher Scientific) (https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2FEpi5_episomal_ipsc_reprogramming_man.pdf). Первичные колонии ИПСК отбирали микрокапилляром и помещали в лунки 4-ячеичных планшетов, обработанных матригелем (Matrigel matrix, Corning) в среду Essential 8 (Thermo Fisher Scientific) с добавлением 100 ед./мл пенициллина-стрептомицина. Для посева использовали 0.5 мМ ЭДТА в буфере PBS, клетки рассаживали в соотношении 1 : 10 каждые 4–5 дней, в ростовую среду при пересадке добавляли 2 мМ тиазовивина (STEMCELL Technologies). Культивирование клеток проводили при 37°C в атмосфере 5% CO₂.

Выделение геномной ДНК и РНК

Геномную ДНК из клеток выделяли набором Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega). РНК выделяли с использованием Trizol (Thermo Fisher Scientific) по протоколу производителя.

Секвенирование клинического экзоза

Для приготовления библиотек ДНК для экзомного секвенирования использовали набор NEBNext Ultra DNA Library Prep Kit (New England Biolabs), двойное баркодирование проводили с помощью набора NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (New England Biolabs). Для обогащения библиотеки использовали SureSelectXT Target Enrichment System (Agilent Technologies), секвенирование в режиме Rapid Run Mode. Сырые данные с Illumina HiSeq 2500 доступны в базе данных SRA (проект PRJNA563295, образец SAMN14446264, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosample/14446264>).

Секвенирование по Сэнгеру

Верификацию мутаций в геноме ИПСК проводили секвенированием по Сэнгеру. Целевой район гена амплифицировали с использованием праймеров, приведенных в табл. 1. Продукт ПЦР очищали выделением из агарозного геля. Секвенирующие реакции ставили с использованием Big Dye Terminator Version 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) и праймеров, используемых для ПЦР. Анализ нуклеотидных последовательностей проводили на приборе ABI 3130xl Genetic Analyzer в ЦКП “Геномика” СО РАН (<http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/corefacility>).

Количественная ОТ-ПЦР

Для синтеза кДНК из 1 мкг РНК использовали ревертазу М–MuLV (Biolabmix). Реакции количественной ПЦР проводили на приборе LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche) с набором BioMaster HS-qPCR SYBR Blue 2× (Biolabmix). Результаты нормализовали на beta-2-microglobulin используя метод ΔΔСТ.

Кариотипирование

Кариотип клеток анализировали на 18 пассаже по протоколу, описанному ранее, используя DAPI-бэндинг (Grigor'eva et al., 2020).

Детекция микоплазмы и эписом

Детекцию контаминации микоплазмой и наличия последовательностей эписом в клетках проводили с помощью ПЦР, как описано ранее (Chopra et al., 1998; Okita et al., 2013). Последовательности праймеров приведены в табл. 1.

Таблица 1. Антитела и праймеры, использованные в исследовании

	Антитела, использованные в исследовании			
	Антитело	Разведение	Производитель, кат. №	RRID
Маркеры плюрипотентности	Mouse IgG1 anti-OCT3/4	1 : 200	BD Transduction Laboratories, 611202	RRID: AB_398736
	Rabbit IgG anti-SOX2	1 : 500	Cell Signaling, 3579	RRID: AB_2195767
	Rabbit IgG anti-NANOG	1 : 200	Abcam, ab62734	RRID: AB_956161
	Mouse IgM anti-TRA-1-60	1 : 200	Abcam, ab16288	RRID: AB_778563
Маркеры дифференцированных производных	Mouse IgG2a anti-aSMA	1 : 100	Dako, M0851	RRID: AB_2223500
	Mouse IgG1 anti-Collagen IV	1 : 100	LifeSpan Biosciences, LS-C79603	RRID: AB_2218107
	Rabbit IgG anti-NF200	1 : 1000	Sigma, N4142	RRID: AB_477272
	Mouse IgG2a anti-Tubulin β 3 (TUBB3)/Clone: TUJ1	1 : 1000	BioLegend, 801201	RRID: AB_2313773
	Mouse IgG1 anti-Cytokeratin 18	1 : 100	Abcam, ab668	RRID: AB_305647
	Rabbit Anti-HNF-4-alpha	1 : 100	Abcam, ab231167	RRID: AB_2895610
Вторичные антитела	Goat anti-Mouse IgG (H + L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	1 : 400	Thermo Fisher Scientific, A11029	RRID: AB_2534088
	Goat anti-Mouse IgG (H + L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 568	1 : 400	Thermo Fisher Scientific, A11031	RRID: AB_144696
	Goat anti-Rabbit IgG (H + L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	1 : 400	Thermo Fisher Scientific, A11008	RRID: AB_143165
	Goat anti-Rabbit IgG (H + L) Alexa Fluor 568	1 : 400	Thermo Fisher Scientific, A11011	RRID: AB_143157
	Goat anti-Mouse IgG1 Alexa Fluor 568	1 : 400	Thermo Fisher Scientific, A21124	RRID: AB_2535766
	Goat anti-Mouse IgG2a Alexa Fluor 488	1 : 400	Thermo Fisher Scientific, A21131	RRID: AB_2535771

Таблица 1. Окончание

	Праймеры		
	Ген/ локус	Размер продукта	Прямой/обратный праймер (5'–3')
Детекция эписомных векторов	<i>oriP</i>	544 пн	TTCCACGAGGGTAGTGAACC/ TCGGGGGTGTTAGAGACAAC
Референсный ген (колич. ОТ-ПЦР)	<i>Beta-2-Microglobulin</i>	280 пн	TAGCTGTGCTCGCGCTACT/ TCTCTGCTGGATGACGTGAG
Маркер плюрипотентности (колич. ОТ-ПЦР)	<i>NANOG</i>	391 пн	CAGCCCCGATTCTTCCACCAGTCCC/ CGGAAGATCCCAGTCGGGTTCCACC
Маркер плюрипотентности (колич. ОТ-ПЦР)	<i>OCT4</i>	94 пн	CTTCTGCTTCAGGAGCTTGG/ GAAGGAGAAGCTGGAGCAAA
Маркер плюрипотентности (колич. ОТ-ПЦР)	<i>SOX2</i>	100 пн	GCTTAGCCTCGTCGATGAAC/ AACCCCAAGATGCACAACCTC
Детекция микоплазмы	Ген рибосомальной 16S РНК	280 пн	GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT/ TGCACCATCTGTCACTCTGTAAACCTC
Верификация мутации	<i>LRRK2:c.1653C>G</i>	533 пн	AAGCACAGCCTACTCACAC/ CCTATCATAGCAAACGGAGAACAG
Верификация мутации	<i>LRRK2:c.4193G>A</i>	436 пн	ATCGGTTGCTGACAAATATGCT/ AAAGAGACTGAAGCAATTGTTTGCC
Верификация мутации	<i>PINK1:c.1018G>A</i>	426 пн	CGTATTGGGAGTCGTCGATGTG/ AAGGAACCTGGGAAGTGCTGTCTC
Верификация мутации	<i>PINK1:c.1562A>C</i>	466 пн	GAAGGGCATCAGTAGGAGATAGG/ CATTCACAGACCATCACGACACAG

Спонтанная дифференцировка *in vitro*

Спонтанную дифференцировку ИПСК проводили с помощью формирования эмбрионидных телец в течение 14 дней, как описано ранее (Grigor'eva et al., 2020). Для исследования спектра дифференцированных производных эмбрионидные тельца рассаживали на 8-луночные планшеты для имиджинга Chambered Coverglass plates (Thermo Fisher Scientific), обработанные белками внеклеточного матрикса Matrigel (Corning), и культивировали 7–9 дней.

Иммунофлуоресцентное окрашивание

Клетки фиксировали 4% параформальдегидом (10 мин при комнатной температуре), обрабатывали 0.5% Triton-X100 (30 мин, комн. *t*), затем 1%

BCA (30 мин, комн. *t*). С первичными антителами инкубировали при 4°C в течение ночи, отмывали PBS 2 раза по 15 мин, вторые антитела добавляли на 1.5–2 ч (комн. *t*). Список антител приведен в табл. 1. Ядра окрашивали DAPI. Препараты анализировали на микроскопе Nikon Eclipse Ti-E, микрофотографии обрабатывали с использованием программного обеспечения NIS Elements.

STR анализ

Генотипирование образцов ДНК проводили методом фрагментного анализа по полиморфным маркерам, входящим в наборы AmpFISTR Identifier (Applied Biosystems) и InvestigatorHDplex (QIAGEN), на приборе 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosyste-

Таблица 2. Паспорт клеточной линии ИПСК человека ICGi023-A

Параметр	Описание
Уникальный идентификатор	ICGi023-A
Альтернативное название линии	PD45-6-1Lm
Учреждение	Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Федеральный исследовательский центр “Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук”, Новосибирск, Россия
Одобрение этического комитета	Исследование одобрено этической комиссией ФГБУ “Федеральный центр нейрохирургии” Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, протокол № 1 от 14.03.2017
Тип клеток	ИПСК
Вид организма	Человек
Дополнительная информация о происхождении клеточной линии	Возраст: 45 Пол: М
Исходный тип клеток	Этническая принадлежность: европеоидная раса
Дата забора биоматериала	Мононуклеарные клетки периферической крови 2016 г.
Способ репрограммирования	Неинтегрирующиеся эписомные плазмидные векторы
Репрограммирующие факторы	OCT4, KLF4, L-MYC, SOX2, LIN28 и p53 shRNA
Клональность	Клональные
Генетическая модификация	Нет
Вид генетической модификации	Нет
Подтверждение элиминации/замолкания репрограммирующих генетических конструкций	ПЦР, не детектируются
Заболевание	Болезнь Паркинсона
Ген/локус	<i>LRRK2:c.1653C>G</i> , rs7308720 <i>LRRK2:c.4193G>A</i> , rs7133914 <i>PINK1:c.1018G>A</i> , rs3738136 <i>PINK1:c.1562A>C</i> , rs1043424
Морфология	Монослойные колонии, подобные плюрипотентным клеткам человека
Плюрипотентность	Подтверждена в тесте на формирование эмбриоидных тел 46,XY
Кариотип	46,XY
Проверка контаминации	Бактерии, грибы и микоплазма не обнаружены
Область применения	<i>In vitro</i> модель болезни Паркинсона
Способ культивирования	Монослойный на пластике, покрытом внеклеточным матриксом Matrigel (Corning)
Среда культивирования	Essential 8 (ThermoFisher Scientific)
Температура, °C	37
Концентрация CO ₂ , %	5
Концентрация O ₂ , %	20
Способ посева	0.5 мМ ЭДТА
Кратность посева	1 : 8–1 : 10
Криоконсервация	90% FBS, 10% DMSO
Условия хранения	Жидкий азот
Учетная запись в реестре	https://hpscereg.eu/cell-line/ICGi023-A
Дата паспортизации/депонирования	14/04/2022

ms, Japan) компанией “Геноаналитика” (<https://www.genoanalytica.ru>).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Получение и характеристика клеточной линии

Линия ИПСК ICGi023-A получена путем репрограммирования мононуклеарных клеток (МНК) пе-

риферической крови 45-летнего мужчины, в семейном анамнезе которого описаны случаи паркинсонизма. Паспорт клеточной линии приведен в табл. 2. Секвенирование клинического экзона выявило полиморфные варианты генов, ассоциированных с болезнью Паркинсона: *LRRK2:c.1653C>G*, *LRRK2:c.4193G>A*, *PINK1:c.1018G>A*, *PINK1:c.1562A>C*. Проведена трансфекция МНК

Таблица 3. Характеристика линии ИПСК человека ICGI023-A

Параметр	Метод	Результат	Данные
Морфология	Микрофотография в фазовом контрасте	Типичная для плюрипотентных клеток	Рис. 1а
Фенотип	Качественный анализ <i>Окраска на щелочную фосфатазу</i>	Положительный	Рис. 1б
	Качественный анализ <i>Иммунофлуоресцентное окрашивание</i>	Выявляются маркеры плюрипотентности OCT4, NANOG, SOX2, TRA-1-60	Рис. 1в
	Количественный анализ <i>Количественная ОТ-ПЦР</i>	Повышение уровня экспрессии маркеров плюрипотентности <i>NANOG, OCT4, SOX2</i>	Рис. 1г
Генотип	Кариотипирование	46,XY Разрешение 450–500	Рис. 1з
Идентификация	STR анализ	26 из 26 полиморфных локусов совпадают с МНК	Доступны по запросу у авторов
Генотипирование	Секвенирование клинического экзоза	<i>LRRK2:c.1653C>G</i> , rs7308720 <i>LRRK2:c.4193G>A</i> , rs7133914 <i>PINK1:c.1018G>A</i> , rs3738136 <i>PINK1:c.1562A>C</i> , rs1043424	Данные загружены в базу данных SRA (SAMN14446264)
	Секвенирование по Сэнгеру	Подтверждено присутствие мутаций в гетерозиготном состоянии	Рис. 1д
Контаминация	Микоплазма	Отсутствует	Рис. 1е
Потенциал дифференцировки	Формирование эмбрионидных телец, иммунофлуоресцентное окрашивание	Выявлены маркеры трех зародышевых листков: αSMA и COL4 (мезодерма); NF200 и TUBB3/TUJ1 (эктодерма); HNF4a и CK18 (энтодерма)	Рис. 1и
Инфекции донора	ВИЧ, гепатит В, гепатит С	Нет данных	Нет данных
Дополнительная информация о генотипе	Группа крови	Нет данных	Нет данных
	HLA-типирование	Нет данных	Нет данных

неинтегрирующимися эписомными векторами, кодирующими факторы плюрипотентности OCT4, SOX2, KLF4, L-MYC, LIN28 и p53 shRNA (Okita et al., 2013). Полученная линия ICGi023-A имела типичную морфологию плюрипотентных стволовых клеток и демонстрировала активность щелочной фосфатазы (рис. 1а, 1б). На 12 пассаже клетки экспрессировали транскрипционные факторы OCT4, NANOG и SOX2 и поверхностный маркер TRA-1-60 (рис. 1в), а также демонстрировали повышение уровня экспрессии *OCT4, NANOG, SOX2* по сравнению с исходными МНК (рис. 1г).

В качестве положительного контроля при оценке экспрессии использовали линию эмбриональных стволовых клеток человека HUES9 (HVRDe009-A) (Cowan et al., 2004). Элиминацию эписомных векторов проверяли с помощью ПЦР (рис. 1ж). Полиморфизмы в генах *LRRK2* и *PINK1* подтверждали с помощью секвенирования по Сэнгеру (рис. 1д). Способность полученной линии ИПСК дифференцироваться в производные трех зародышевых листков продемонстрирована путем спонтанной дифференцировки в эмбрионидных тельцах. Иммунофлуоресцентное окрашивание

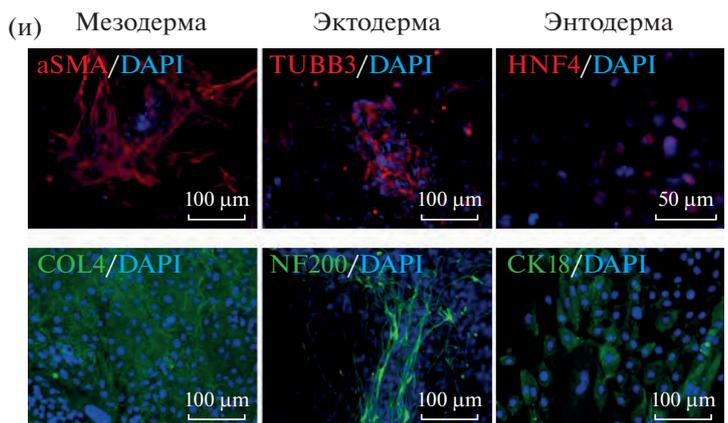
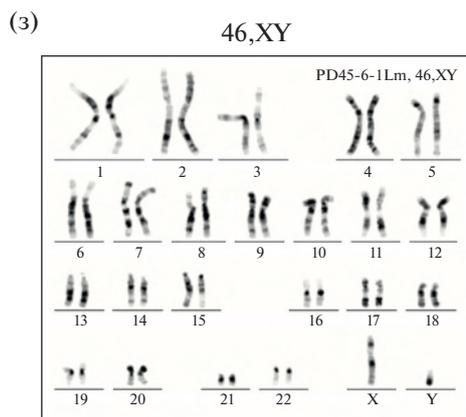
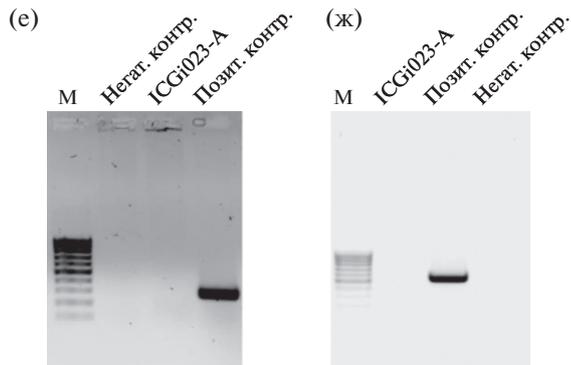
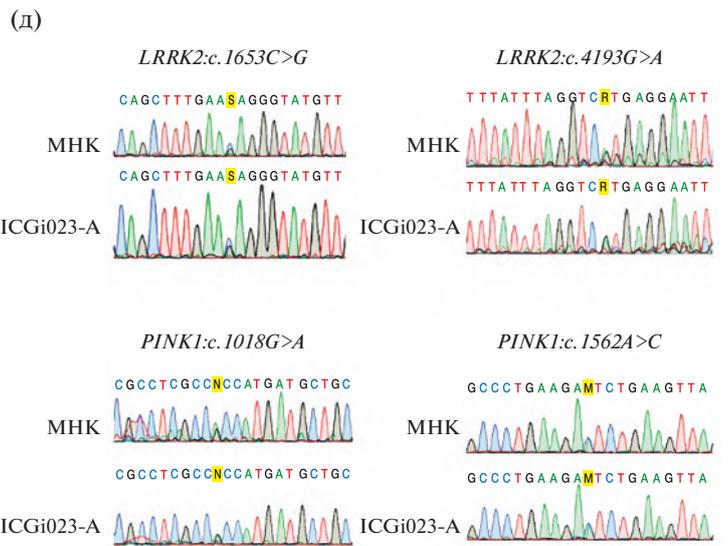
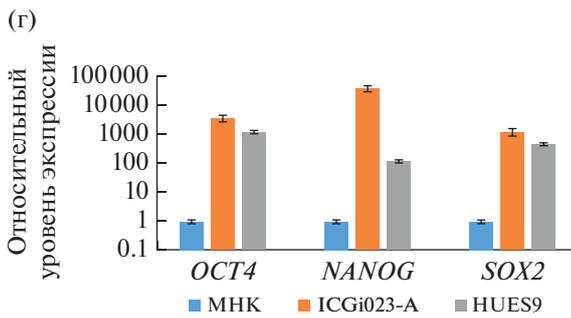
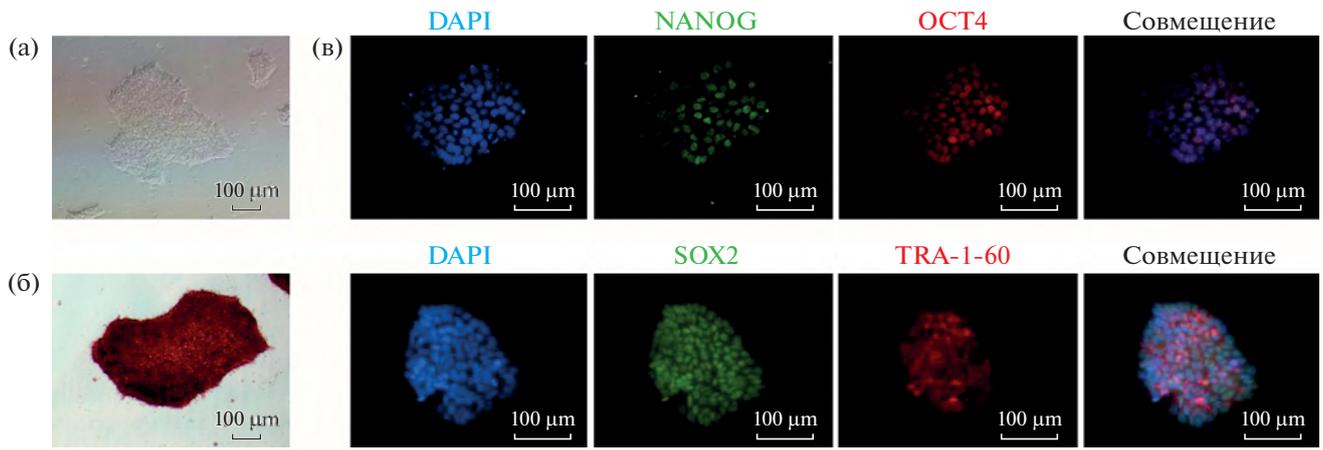


Рис. 1. Характеристика линии ИПСК ICGi023-A. (а) Морфология клеток линии ICGi023-A; (б) демонстрация активности щелочной фосфатазы в клетках линии ICGi023-A; (в) экспрессия транскрипционных факторов OCT4, NANOG и SOX2, а также поверхностного маркера TRA-1-60 на 12 пассаже; (г) данные ПЦР в реальном времени, повышение уровня экспрессии маркеров плюрипотентности *OCT4*, *NANOG*, *SOX2* по сравнению с исходными МНК; (д) полиморфизмы в генах *LRRK2* и *PINK1* подтверждали с помощью секвенирования по Сэнгеру; (е) ПЦР тест не выявил контаминации линии микоплазмами; (ж) ПЦР тест показал элиминацию эписомных векторов; (з) на 18-м пассаже клетки линии имели нормальный кариотип (46,XY); (и) подтверждение спонтанной дифференцировки клеток линии ICGi023-A в три зародышевых листка при формировании эмбрионидных тел: экспрессия маркеров производных эктодермы (нейрофиламент 200 (NF200) и тубулин $\beta 3$ (TUBB3)), мезодермы (гладкомышечный актин α (α SMA) и коллаген VI типа (COL4)) и энтодермы (транскрипционный фактор гепатоцитов HNF4a и кератин 18 (CK18)). Обозначения: МНК – мононуклеарные клетки периферической крови, HUES9 – линия эмбриональных стволовых клеток человека, служившая положительным контролем экспрессии маркеров плюрипотентности. Все масштабные линейки – 100 мкм.

выявило производные эктодермы (нейрофиламент 200 (NF200) и тубулин $\beta 3$ (TUBB3)), мезодермы (гладкомышечный актин α (α SMA) и коллаген VI типа (COL4)) и энтодермы (транскрипционный фактор гепатоцитов HNF4a и кератин 18 (CK18)) среди дифференцированных клеток (рис. 1и). Анализ STR показал идентичность линии ICGi023-A с исходными МНК по 26 полиморфным локусам (данные доступны по запросу у авторов). На 18 пассаже линия ИПСК имела нормальный кариотип 46,XY (рис. 1з). Линия свободна от контаминации микоплазмой (рис. 1е). Полная характеристика приведена в табл. 3.

БЛАГОДАРНОСТИ

Визуализацию результатов иммунофлуоресцентного окрашивания клеток проводили с использованием ресурсов Центра коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов ИЦГ СО РАН (<https://ckp.icgen.ru/ckpmain/>), поддержанного Бюджетным проектом ИЦиГ СО РАН FWNR-2022-0015.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда научно-технического развития Югры в соответствии с проектом № 2022-05-03/2022.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование одобрено этической комиссией ФГБУ «Федеральный центр нейрохирургии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, протокол № 1 от 14.03.2017. Пациентом было собственноручно подписано добровольное информированное согласие.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

А.А. Малахова, С.В. Павлова и Е.В. Григорьева внесли равный вклад в работу, ими проведено репрограммирование мононуклеарных клеток крови, получение индивидуальных клонов ИПСК и детальная характеристика линии ICGi023-A. С.П. Медведев выполнил секвенирование по Сэнгеру для подтверждения наличия полиморфизмов в полученных ИПСК. Ю.М. Минина выполнила кариотипирование полученной линии ИПСК. Анализ данных экзомного секвенирования был выполнен Ю.В. Вяткиным. Медицинское сопровождение пациента и предоставление мононуклеарных клеток крови осуществлено Е.А. Хабаровой и Дж.А. Рзаевым. А.А. Малахова, С.В. Павлова, Е.В. Григорьева, Л.В. Коваленко и С.М. Закиян разработали дизайн эксперимента, провели анализ полученных данных и участвовали в написании статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bloem B.R., Okun M.S., Klein C.* Parkinson's disease // *Lancet*. 2021. V. 397. № 10291. P. 2284–2303.
- Choppa P.C., Vojdani A., Tagle C. et al.* Multiplex PCR for the detection of *Mycoplasma fermentans*, *M. hominis* and *M. penetrans* in cell cultures and blood samples of patients with chronic fatigue syndrome // *Mol. Cell Probes*. 1998. V. 12. № 5. P. 301–308.
- Cowan C.A., Klimanskaya I., McMahon J. et al.* Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts // *N. Engl. J. Med.* 2004. V. 350. № 13. P. 1353–1356.
- Grigor'eva E.V., Malankhanova T.B., Surumbayeva A. et al.* Generation of GABAergic striatal neurons by a novel iPSC differentiation protocol enabling scalability and cryopreservation of progenitor cells // *Cytotechnology*. 2020. V. 72. № 5. P. 649–663.
- Okita K., Yamakawa T., Matsumura Y. et al.* An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells // *Stem Cells*. 2013. V. 31. № 3. P. 458–466.

An Induced Pluripotent Stem Cell Line (ICGi023-A) Obtained from a Patient with Parkinson's Disease Associated Polymorphisms in *LRRK2* and *PINK1* Genes

A. A. Malakhova^{1, 2, 3, *}, S. V. Pavlova^{1, 2, 3}, E. V. Grigor'eva^{1, 2, 3}, S. P. Medvedev^{1, 2, 3}, J. M. Minina¹, Y. V. Vyatkin⁴, E. A. Khabarova^{1, 5}, J. A. Rzaev⁵, L. V. Kovalenko⁶, and S. M. Zakian^{1, 2, 3}

¹*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, prosp. acad. Lavrentieva, 10, Novosibirsk, 630090 Russia*

²*Meshalkin National Medical Research Center, Ministry of Health of the Russian Federation, ul. Rechkunovskaya, 15, Novosibirsk, 630055 Russia*

³*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, prosp. acad. Lavrentieva, 8, Novosibirsk, 630090 Russia*

⁴*Novosibirsk State University, ul. Pirogova, 2, Novosibirsk, 630090 Russia*

⁵*FSBI Federal Neurosurgical Center, ul. Nemirovicha-Danchenko, 132/1, Novosibirsk, 630087 Russia*

⁶*Surgut State University, prosp. Lenina, 1, Surgut, 628403 Russia*

*e-mail: amal@bionet.nsc.ru

Parkinson's disease is a neurodegenerative disorder with a range of causes, only 5% of which can be explained by known genetic variants. We revealed polymorphisms in *LRRK2* and *PINK1* genes of a person with parkinsonism cases in family anamnesis. PBMCs of the patient were reprogrammed with a non-integrating episomal vectors to generate an induced pluripotent stem cell (iPSC) line. The iPSC line showed typical morphology and normal karyotype, expressed pluripotency markers, and was capable to differentiate into three germ layers. The iPSCs represent a valuable tool for investigating a potential implication of the genetic variants into the Parkinson's disease pathogenesis.

Keywords: induced pluripotent stem cells, reprogramming, Parkinson's disease

ПОЛУЧЕНИЕ ЛИНИЙ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ
СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК ICGi022-A-3, ICGi022-A-4 И ICGi022-A-5
С ВНЕСЕННОЙ В ГЕН *MYBP3* С ПОМОЩЬЮ
СИСТЕМЫ CRISPR/Cas9 МУТАЦИЕЙ *p.Asn515del*© 2023 г. С. В. Павлова^а, Л. Ш. Шаяхметова^а, К. А. Проняева^а,
А. Е. Шульгина^а, С. М. Закиян^а, Е. В. Дементьева^а, *^аФГБНУ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, просп. акад. Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: dementyeva@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 30.11.2022 г.

После доработки 08.12.2022 г.

Принята к публикации 10.12.2022 г.

До 60% случаев гипертрофической кардиомиопатии обусловлены мутациями в генах, отвечающих за функционирование саркомеров. Однако не для всех вариантов, обнаруженных в ассоциированных с гипертрофической кардиомиопатией генах, в настоящее время известно их клиническое значение. Новые возможности для выяснения клинического значения генетических вариантов открывает использование методов редактирования нуклеотидных последовательностей. Трехнуклеотидная делеция с.1543_1545delAAC (*p.Asn515del*) с неясным клиническим значением была внесена в ген *MYBP3* индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) здорового донора с помощью системы CRISPR/Cas9. В результате были получены три линии ИПСК (ICGi022-A-3, ICGi022-A-4 и ICGi022-A-5), гомозиготные по данной мутации. Линии ИПСК с внесённой делецией имели характерную для плюрипотентных клеток человека морфологию, нормальный кариотип (46,XX), экспрессировали маркеры плюрипотентного состояния (OCT4, NANOG, TRA-1-60, SSEA-4) и были способны давать производные трех зародышевых листков при спонтанной дифференцировке. Исследование свойств кардиомиоцитов, полученных при направленной дифференцировке линий ИПСК ICGi022-A-3, ICGi022-A-4 и ICGi022-A-5, позволит установить патогенетический вклад варианта *p.Asn515del* в гене *MYBP3* в развитие гипертрофической кардиомиопатии.

Ключевые слова: гипертрофическая кардиомиопатия, генетические варианты с неясным клиническим значением, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, система CRISPR/Cas9

DOI: 10.31857/S0475145023010111, **EDN:** FRUOIN

ВВЕДЕНИЕ

В ходе генетического анализа пациентов с гипертрофической кардиомиопатией нами был выявлен пациент, имеющий вариант *p.Asn515del* (с.1543_1545delAAC) в 17-м экзоне гена *MYBP3* (Дементьева и др., 2020). Данный вариант представляет собой делецию одной аминокислоты и прежде уже обнаруживался у пациентов с гипертрофической (Поляк и др., 2016) и дилатационной (Waldmüller et al., 2011) кардиомиопатиями, однако его клиническое значение остается неясным. Поскольку большие перспективы для изучения клинического значения генетических вариантов открывает получение изогенных линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, имеющих одинаковый генетический фон и различающихся лишь присутствием одной мутации,

было решено внести вариант *p.Asn515del* в ген *MYBP3* индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) здорового донора ICGi022-A (Malakhova et al., 2020).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

*Внесение мутации p.Asn515del
в ген MYBP3 ИПСК здорового донора*

Направляющую РНК и донорный олигонуклеотид выбирали с помощью ресурсов Benchling (<https://www.benchling.com/>) и IDT (<https://www.idtdna.com/>) (табл. 1). 20 пмоль белка Cas9_NLS (NEB) и 100 пмоль направляющей РНК (Synthego) инкубировали 20 мин при комнатной температуре. Полученные рибонуклеопротеиновые комплексы вместе с 300 нг одноцепочечного

донорного олигонуклеотида (Biolegio) доставляли в 1×10^5 ИПСК линии ICGi022-A с помощью электропорации на приборе Neon Transfection System (ThermoFisher Scientific) (программа: 1100 В, 30 мс, 1 импульс). После электропорации клетки переносили на слой митотически инактивированных фибробластов мыши (фидера) в среду без антибиотика с добавлением 10 нг/мл Y-27632 (Sigma-Aldrich). Через 48 ч клетки субклонировали в 96-луночные планшеты. Клоны ИПСК культивировали при 37°C в 5% CO₂ в среде KnockOut DMEM, содержащей 15% KnockOut Serum Replacement, 0.1 мМ NEAA, 1× пенициллин-стрептомицин, 1 мМ GlutaMAX (все реактивы – ThermoFisher Scientific), 0.05 мМ 2-меркаптоэтанол (Amresco) и 10 нг/мл bFGF (SCI-store). ИПСК пассировали в соотношении 1 : 10 с использованием TrypLE™ Express Enzyme (ThermoFisher Scientific) каждые 4–5 дней.

Выделение геномной ДНК

Геномную ДНК выделяли из ИПСК с использованием набора Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega).

Анализ внесенных мутаций и нецелевой активности системы CRISPR/Cas9

Детекцию наличия мутации p.Asn515del в клонках ИПСК, амплификацию участков геномной ДНК, содержащих 17-й экзон гена *МУВРС3* или предсказанные сайты нецелевой активности системы CRISPR/Cas9, проводили с помощью ПЦР на приборе T100 Thermal Cycler (Bio-Rad) с набором BioMaster HS-Taq PCR-Color (2×) (Biolabmix). Программы: 95°C – 3 мин; 35 циклов: 95°C – 10 с, 58°C – 15 с, 72°C – 15 с; 72°C – 5 мин (анализ мутаций) и 95°C – 3 мин; 35 циклов: 95°C – 30 с, 60°C – 30 с, 72°C – 30 с; 72°C – 5 мин (анализ нецелевой активности). Используемые праймеры приведены в табл. 1. Реакции секвенирования по Сэнгеру выполняли с использованием Big Dye Terminator V. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) и анализировали в ЦКП “Геномика” СО РАН на генетическом анализаторе ABI 3130XL.

Выявление микоплазмы и эписом

Детекцию контаминации микоплазмами и наличия эписом в линиях ИПСК проводили с помощью ПЦР. Программы: 95°C – 3 мин; 35 циклов: 95°C – 15 с, 67°C – 15 с, 72°C – 20 с; 72°C – 5 мин (микоплазма) и 95°C – 5 мин; 35 циклов: 95°C – 15 с, 62°C – 15 с, 72°C – 15 с; 72°C – 5 мин (эписомы). Праймеры указаны в табл. 1.

Анализ кариотипа

Кариотипирование было выполнено в Томском НИМЦ согласно Международной системе цитогенетической номенклатуры хромосом человека.

Спонтанная дифференцировка in vitro

Спонтанную дифференцировку ИПСК посредством формирования эмбриоидных телц выполняли, как описано ранее (Dementyeva et al., 2021).

Иммунофлуоресцентное окрашивание

Клетки фиксировали в 4% параформальдегиде 10 мин, пермеабилizировали в 0.4% Тритон-X100 20 мин, инкубировали с 1% БСА 30 мин (все процедуры выполнялись при комнатной температуре). С первичными антителами клетки инкубировали в течение ночи при 4°C, а со вторичными антителами – 1 ч при комнатной температуре. Используемые антитела перечислены в табл. 1. Отмывки от несвязавшихся антител проводили в PBS 2 раза по 15 мин. Ядра контрастировали с использованием DAPI (Sigma-Aldrich). Микрофотографии были получены с помощью микроскопа Nikon Eclipse Ti-E и программного обеспечения NIS Elements.

Количественная ОТ-ПЦР

РНК выделяли с помощью TRIzol Reagent (ThermoFisher Scientific) согласно протоколу производителя. Обратную транскрипцию 1–2 мкг РНК проводили с использованием ревертазы M-MuLV (Biolabmix). Количественную ОТ-ПЦР выполняли на приборе LightCycler 480 System (Roche) с набором BioMaster HS-qPCR SYBR Blue 2× (Biolabmix). Программа: 95°C – 5 мин; 40 циклов: 95°C – 10 с, 60°C – 1 мин. Значения СТ нормализовали к бета-актину с помощью ΔΔСТ-метода.

STR анализ

Аутентификацию линий ИПСК осуществляла компания “Геноаналитика” (<https://www.genoanalytica.ru>) с помощью наборов AmpFISTR Identifier Direct PCR Amplification Kit (Applied Biosystems) и Investigator HDplex (QIAGEN) и прибора 3130 Genetic Analyzer (HITACHI, Applied Biosystems).

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ

Для редактирования геномной ДНК ИПСК здорового донора была использована система CRISPR/Cas9, состоящая из белка Cas9 и направляющей РНК, включающей последовательность (спейсер), комплементарную участку 17-го экзона гена *МУВРС3* (протоспейсеру). Комплексы из

Таблица 1. Антитела и олигонуклеотиды, использованные в исследовании

	Антитела			
	Антитело	Разведение	Производитель, кат. №	RRID
Маркеры плюрипотентности	Mouse IgG2b anti-OCT3/4	1 : 50	Santa Cruz Biotechnology, sc-5279	RRID: AB_628051
	Rabbit IgG anti-NANOG	1 : 200	ReproCELL, RCAB003P	RRID: AB_2714012
	Mouse IgG3 anti-SSEA4	1 : 200	Abcam, ab16287	RRID:AB_778073
	Mouse IgM anti-TRA-1-60	1 : 200	Abcam, ab16288	RRID:AB_778563
Маркеры дифференцированных производных	Mouse IgG2a anti-TUBB3	1 : 500	BioLegend, 801201	RRID:AB_2313773
	Chicken IgG anti-MAP2	1 : 1000	Abcam, ab5392	RRID:AB_2138153
	Mouse IgG2a anti- α SMA	1 : 100	Dako, M0851	RRID:AB_2223500
	Rabbit IgG anti-Nkx-2.5 (H-114)	1 : 100	Santa Cruz Biotechnology, sc-14033	RRID:AB_650281
	Mouse IgG1 anti-CK18	1 : 100	Abcam, ab668	RRID:AB_305647
	Mouse IgG1 anti-HNF3 β	1 : 100	Santa Cruz Biotechnology, sc-374376	RRID: AB_10989742
Вторичные антитела	Goat anti-Mouse IgG (H + L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 568	1 : 400	ThermoFisher Scientific, A11031	RRID:AB_144696
	Goat anti-Mouse IgG3 Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	1 : 400	ThermoFisher Scientific, A21151	RRID:AB_2535784
	Goat anti-Mouse IgM Heavy Chain Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 568	1 : 400	ThermoFisher Scientific, A21043	RRID:AB_2535712
	Goat anti-Rabbit IgG (H + L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	1 : 400	ThermoFisher Scientific, A11008	RRID:AB_143165
	Goat anti-Mouse IgG (H + L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	1 : 400	ThermoFisher Scientific, A11078	RRID: AB_2534122
	Goat Anti-Chicken IgY H&L, Alexa Fluor 488	1 : 400	Abcam, ab150173	RRID:AB_2827653

Таблица 1. Окончание

	Олигонуклеотиды		
	Ген/локус	Размер продукта	Прямой/обратный праймер (5'–3')
Детекция эписомных векторов	oriP	544 пн	TTCCACGAGGGTAGTGAACC/ TCGGGGGTGTTAGAGACAAC
Макеры плюрипотентности (колич. ОТ-ПЦР)	<i>OCT4</i>	94 пн	CTTCTGCTTCAGGAGCTTGG/ GAAGGAGAAGCTGGAGCAA
	<i>NANOG</i>	391 пн	CAGCCCCGATTCTTCCACCAGTCCC/ CGGAAGATTCCCAGTCGGGTTCCACC
	<i>SOX2</i>	100 пн	GCTTAGCCTCGTCGATGAAC/ AACCCCAAGATGCACAACCTC
Референсный ген (колич. ОТ-ПЦР)	<i>ACTB</i>	93 пн	GCACAGAGCCTCGCCTT/ GTTGTTCGACGACGAGCG
Детекция микоплазмы	Ген рибосомальной 16S РНК	280 пн	GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT/ TGCACCATCTGTCACTCTGTAAACCTC
Детекция внесения мутации p.Asn515del	<i>MYBPC3</i> , экзон 17	253 пн	CAGAGACACCACCTAATCATAG/ GAGATGAGAAGGATGAGGTTTAGG
Анализ всех внесенных мутаций	<i>MYBPC3</i> , экзон 17	408 пн	CAAATGGTGAGTTCCAGAAGC/ GAGATGAGAAGGATGAGGTTTAGG
Последовательность протоспейсера для направляющей РНК	<i>MYBPC3</i> , экзон 17	20 н.	ACACCACCTGATCATCAACG
Последовательность донорного олигонуклеотида	<i>MYBPC3</i> , экзон 17	90 н.	CGCTAGTGCACAGTGCATAGTGCCCCGCGT- CCTCCAGCATGGCCTCGATGATTAGGTGGT- GTCTCTGCCCGTCCTTCTTGAACCGGTATT
Анализ предсказанных сайтов нецелевой активности системы CRISPR/Cas9	chr14:56408346-56408720	375 пн	ACAGCCACAGCAATCCTAAG/ GACAGGGCCCTTTACAGAATAG
	<i>SLC9A8</i> , интрон 14	536 пн	CGGTGGAGTCCTAGCTAATAGA/ TCAGCCTCCGAGTGAAGAA
	<i>RTL8B</i> , экзон 1	511 пн	AGGAGGCACAAAGCCAATTA/ TTCTGTCCCAGATGTTGAATCC
	<i>SLC44A1</i> , экзон 16	344 пн	TTGGGAATAATTGGGCAGATAGA/ CATTAAGGCAACACAGCAGAAG

направляющей РНК и белка Cas9 вместе с одноцепочечным донорным олигонуклеотидом, комплементарным участку 17-го экзона гена *MYBPC3* и содержащим трехнуклеотидную делецию AAC (p.Asn515del), были доставлены в клетки линии

ICGi022-A с помощью электропорации. Полученные после электропорации клоны ИПСК были проанализированы посредством ПЦР с использованием пары праймеров, которая позволяет детектировать присутствие варианта p.Asn515del. В ре-

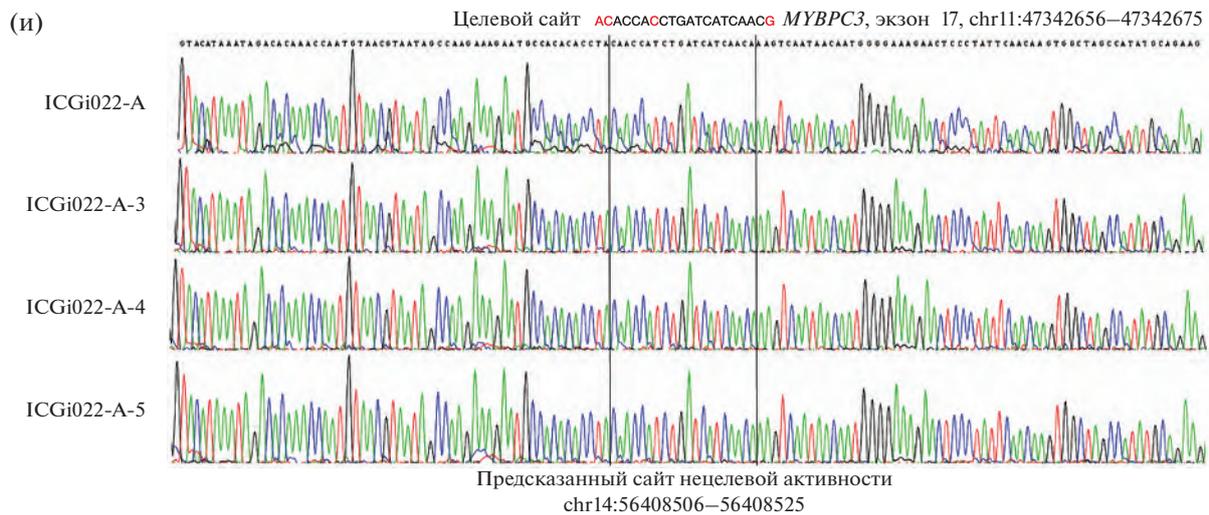


Рис. 1. Характеристика линий ИПСК ICGi022-A-3, ICGi022-A-4, ICGi022-A-5 с внесенной в ген *MYBPC3* мутацией *p.Asn515del*. (а) В трех линиях ИПСК, полученных в результате редактирования гена *MYBPC3* линии ИПСК ICGi022-A, выявлена гомозиготная мутация *p.Asn515del*. (б) Морфология линий ИПСК ICGi022-A-3, ICGi022-A-4 и ICGi022-A-5. Масштабная линейка — 200 мкм. (в) Экспрессия транскрипционных факторов *OCT4* и *NANOG* и поверхностных антигенов *TRA-1-60* и *SSEA4* в полученных линиях ИПСК. Масштабная линейка — 100 мкм. (г) Анализ экспрессии генов *OCT4*, *NANOG*, *SOX2* методом ПЦР в реальном времени в линиях ИПСК ICGi022-A-3, ICGi022-A-4 и ICGi022-A-5. Линия эмбриональных стволовых клеток человека HUES9 была использована в качестве контроля. (д) Кариотип полученных линий ИПСК. (е) Подтверждение способности линий ИПСК ICGi022-A-3, ICGi022-A-4 и ICGi022-A-5 дифференцироваться в производные трех зародышевых листков. Масштабная линейка — 100 мкм. (ж) ПЦР-тест показал отсутствие в полученных линиях ИПСК эписомных векторов. (з) ПЦР-тест показал отсутствие контаминации линий ИПСК микоплазмами. (и) Отсутствие нецелевой активности системы CRISPR/Cas9 в линиях ИПСК ICGi022-A-3, ICGi022-A-4 и ICGi022-A-5 в предсказанном сайте нецелевой активности chr14:56408506-56408525.

результате было отобрано 12 позитивных на наличие варианта *p.Asn515del* клонов. Для этих клонов было проведено секвенирование 17-го экзона гена *MYBPC3*. Три клон оказались гомозиготными по трехнуклеотидной делеции в гене *MYBPC3* (рис. 1а). Остальные клоны в одном аллеле имели вариант *p.Asn515del*, а во втором — различные варианты делеций и инсерций. Три линии ИПСК, гомозиготные по варианту *p.Asn515del*, ICGi022-A-3, ICGi022-A-4, ICGi022-A-5, были выбраны для дальнейшей работы и детально охарактеризованы. Линии ИПСК демонстрировали характерную для плюрипотентных стволовых клеток человека морфологию (рис. 1б) и экспрессировали маркеры плюрипотентного состояния: транскрипционные факторы *OCT4*, *NANOG* и поверхностные антигены *TRA-1-60* и *SSEA4* (рис. 1в). Количественный анализ с помощью ПЦР в реальном времени показал, что уровень экспрессии генов плюрипотентности *OCT4*, *NANOG* и *SOX2* в этих линиях сопоставим с уровнем их экспрессии в линии эмбриональных стволовых клеток человека HUES9 (рис. 1г). G-бэндинг линий ICGi022-A-3, ICGi022-A-4 и ICGi022-A-5 на 8–12 пассажах показал, что клетки сохраняли нормальный кариотип — 46,XX (рис. 1д). Способность линий ИПСК давать производные трех зародышевых листков оценивалась посредством спонтанной дифферен-

цировки в эмбрионных тельцах. Иммунофлуоресцентное окрашивание дифференцированных клеток выявило экспрессию маркеров эктодермы (β 3-тубулина (*TUBB3*) и *MAP2*), мезодермы (гладкомышечного α -актина (α SMA) и транскрипционного фактора *NKX2-5*), энтодермы (ядерного фактора гепатоцитов *HNF3 β* и цитоцератина 18 (*CK18*)) (рис. 1е). В полученных линиях ИПСК, как и в исходной линии ICGi022-A, отсутствовали эписомные векторы (рис. 1ж), а также контаминация микоплазмами (рис. 1з). Анализ коротких tandemных повторов (*STR*) в линиях ICGi022-A-3, ICGi022-A-4 и ICGi022-A-5 подтвердил их идентичность исходной линии ИПСК ICGi022-A по 26 полиморфным локусам (данные доступны по запросу у авторов). С помощью секвенирования по Сэнгеру в полученных линиях ИПСК было продемонстрировано отсутствие нецелевой активности системы CRISPR/Cas9 в 4 предсказанных с помощью ресурса Benchling (<https://www.benchling.com/>) сайтах. Пример анализа одного из предсказанных сайтов нецелевой активности системы CRISPR/Cas9 представлен на рис. 1и.

Паспорт линий ИПСК ICGi022-A-3, ICGi022-A-4 и ICGi022-A-5 представлен в табл. 2, полная характеристика этих линий приведена в табл. 3.

Таблица 2. Паспорт линий ИПСК человека ICGi022-A-3, ICGi022-A-4 и ICGi022-A-5

Параметр	Описание
Уникальный идентификатор	ICGi022-A-3 ICGi022-A-4 ICGi022-A-5
Альтернативное название линии	K7-MYBPC3-N515del-1 K7-MYBPC3-N515del-2 K7-MYBPC3-N515del-3
Учреждение	Федеральное государственное бюджетное научное учреждение “Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук”, Новосибирск, Россия
Тип клеток	ИПСК
Вид организма	Человек
Дополнительная информация о происхождении клеточной линии	Возраст: 42 Пол: Ж Этническая принадлежность: европеоидная раса
Исходный тип клеток	Мононуклеарные клетки периферической крови
Способ репрограммирования	Неинтегрирующиеся эписомные плазмидные векторы
Репрограммирующие факторы	OCT4, KLF4, L-MYC, SOX2, LIN28 и p53 shRNA
Клональность	Клональные
Подтверждение элиминации репрограммирующих трансгенов	ПЦР, не детектируются
Генетическая модификация	Да
Вид генетической модификации	Внесенная делеция трех нуклеотидов
Заболевание	Гипертрофическая кардиомиопатия
Ген/локус	<i>MYBPC3</i> :c.1543_1545delAAC (p.Asn515del), rs730880643
Метод внесения модификации/используемая сайт-специфическая нуклеаза	Система CRISPR/Cas9
Способ доставки сайт-специфической нуклеазы	Электропорация RNP (рибонуклеопротеиновыми комплексами)
Внесенный в клетки генетический материал	Донорный олигонуклеотид, содержащий мутацию c.1543_1545delAAC (p.Asn515del)
Метод анализа внесенной модификации	ПЦР с последующим секвенированием по Сэнгеру 17-го экзона гена <i>MYBPC3</i>
Способ оценки нецелевой активности	Секвенирование по Сэнгеру ПЦР-продуктов, содержащих предсказанные сайты нецелевой активности системы CRISPR/Cas9
Морфология	Монослойные колонии, подобные плюрипотентным клеткам человека
Плюрипотентность	Подтверждена в тестах на формирование эмбриоидных тел
Кариотип	46,XX
Проверка контаминации	Бактерии, грибы и микоплазма не обнаружены
Область применения	Изучение патогенетического вклада варианта c.1543_1545delAAC (p.Asn515del) в гене <i>MYBPC3</i> в развитие гипертрофической кардиомиопатии
Способ культивирования	На слое митотически инактивированных фибробластов мыши (фидера)
Среда культивирования	KnockOut DMEM (ThermoFisher Scientific)
Температура, °C	37

Таблица 2. Окончание

Параметр	Описание
Концентрация CO ₂ , %	5
Концентрация O ₂ , %	20
Способ посева	TrypLE™ Express Enzyme (ThermoFisher Scientific)
Кратность посева	1 : 10
Криоконсервация	90% FBS, 10% DMSO
Условия хранения	Жидкий азот
Учетная запись в реестре	https://hpscereg.eu/cell-line/ICGi022-A-3 https://hpscereg.eu/cell-line/ICGi022-A-4 https://hpscereg.eu/cell-line/ICGi022-A-5
Дата паспортизации/депонирования	19/08/2022

Таблица 3. Характеристика линий ИПСК человека ICGi022-A-3, ICGi022-A-4 и ICGi022-A-5

Параметры	Метод	Результат	Данные
Морфология	Микрофотография в фазовом контрасте	Характерная для плюрипотентных клеток человека морфология	Рис. 1б
Фенотип	Качественный анализ <i>Иммунофлуоресцентное окрашивание</i>	Положительное окрашивание на маркеры плюрипотентности: OCT4, NANOG, TRA-1-60, SSEA4	Рис. 1в
	Количественный анализ <i>ОТ-ПЦР в реальном времени</i>	Экспрессия маркеров плюрипотентности: <i>OCT4, NANOG, SOX2</i>	Рис. 1г
Генотип	Кариотипирование	46,XX Разрешение 450–500	Рис. 1д
Идентификация	STR анализ	26 из 26 полиморфных локусов совпадают с исходной линией ICGi022-A	Данные доступны по запросу у авторов
Анализ внесенной генетической модификации	ПЦР с последующим секвенированием по Сэнгеру	Гомозиготная мутация с.1543_1545del (p.Asn515del) в гене <i>MYBPC3</i>	Рис. 1а
Анализ нецелевой активности	ПЦР с последующим секвенированием по Сэнгеру	Отсутствие нецелевой активности системы CRISPR/Cas9 в 4 предсказанных сайтах	Рис. 1и
Контаминация	Микоплазма	Отсутствует	Рис. 1з
Потенциал дифференцировки	Формирование эмбрионидных телц, иммунофлуоресцентное окрашивание	Положительное окрашивание на маркеры трех зародышевых листков: TUBB3 и MAP2 (эктодерма); αSMA и NKX2-5 (мезодерма); CK18 и HNF3β (энтодерма)	Рис. 1е
Инфекции донора	ВИЧ, гепатит В, гепатит С	Нет данных	Нет данных
Дополнительная информация о генотипе	Группа крови	Нет данных	Нет данных
	HLA-типирование	Нет данных	Нет данных

БЛАГОДАРНОСТИ

Анализ иммунофлуоресцентного окрашивания проводили с использованием ресурсов ЦКП микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН, поддержанного Бюджетным проектом ИЦиГ СО РАН FWN-2022-0015.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-15-00271).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование одобрено этической комиссией ФГБУ «Федеральный центр нейрохирургии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, протокол № 1 от 14.03.2017. Пациентом было дано добровольное информированное согласие.

Для получения фидера все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы использования животных в экспериментах и условия ухода за ними были соблюдены.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

С.В. Павлова, Е.В. Дементьева и С.М. Закиан разработали дизайн эксперимента, провели анализ получен-

ных данных и участвовали в написании статьи. С.В. Павлова и Л.Ш. Шаяхметова осуществили подбор направляющей РНК и донорного олигонуклеотида для внесения мутации с помощью системы CRISPR/Cas9. С.В. Павлова провела эксперименты по редактированию генома ИПСК. Е.В. Дементьева, К.А. Проняева и А.Е. Шульгина охарактеризовали полученные в результате редактирования линии ИПСК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Дементьева Е.В., Вяткин Ю.В., Кретов Е.И. и др. Генетический анализ пациентов с гипертрофической кардиомиопатией // *Гены & Клетки*. 2020. Т. XV. № 3. С. 68–73.
- Поляк М.Е., Ховалыг А.Б., Букаева А.А. и др. Спектр мутаций в гене MYBPC3 у пациентов с гипертрофической кардиомиопатией // *Медицинская генетика*. 2016. Т. 15. № 8. С. 26–29.
- Dementyeva E.V., Pavlova S.V., Chernyavsky A.M., Zakian S.M. Generation of an induced pluripotent stem cell line, ICGi029-A, by reprogramming peripheral blood mononuclear cells of a patient suffering from hypertrophic cardiomyopathy and carrying a heterozygous p.N515del mutation in MYBPC3 // *Stem Cell Res*. 2021. V. 53. 102344.
- Malakhova A.A., Grigor'eva E.V., Pavlova S.V. et al. Generation of induced pluripotent stem cell lines ICGi021-A and ICGi022-A from peripheral blood mononuclear cells of two healthy individuals from Siberian population // *Stem Cell Res*. 2020. V. 48. 101952.
- Waldmüller S., Erdmann J., Binner P. et al. Novel correlations between the genotype and the phenotype of hypertrophic and dilated cardiomyopathy: results from the German Competence Network Heart Failure // *Eur. J. Heart Fail*. 2011. V. 13. № 11. P. 1185–1192.

Generation of Induced Pluripotent Stem Cell Lines ICGi022-A-3, ICGi022-A-4, and ICGi022-A-5 with p.Asn515del Mutation Introduced in MYBPC3 Using CRISPR/Cas9

S. V. Pavlova¹, L. Sh. Shayakhmetova¹, K. A. Pronyaeva¹, A. E. Shulgina¹, S. M. Zakian¹, and E. V. Dementyeva^{1,*}

¹Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, prospekt Lavrentyeva 10, Novosibirsk, 630090 Russia

*e-mail: dementyeva@bionet.nsc.ru

Up to 60% of hypertrophic cardiomyopathy cases are due to mutations responsible for sarcomere functioning. However, clinical significance is known not for all variants found in hypertrophic cardiomyopathy-associated genes. Using methods of nucleotide sequence editing opens new prospects for clarifying clinical significance of the variants. A trinucleotide deletion c.1543_1545delAAC (p.Asn515del) with uncertain significance was introduced in MYBPC3 of induced pluripotent stem cells (iPSCs) of a healthy donor by CRISPR/Cas9. Three iPSC lines (ICGi022-A-3, ICGi022-A-4, and ICGi022-A-5) homozygous at the mutation were generated. The iPSC lines with the introduced deletion demonstrated morphology characteristic of human pluripotent cells, normal karyotype (46,XX), expressed markers of the pluripotent state (OCT4, NANOG, TRA-1-60, SSEA-4), and were able to give rise to derivatives of three germ layers during spontaneous differentiation. Studying properties of cardiomyocytes obtained under directed differentiation of the ICGi022-A-3, ICGi022-A-4, and ICGi022-A-5 iPSC lines allows establishing pathogenetic contribution of the p.Asn515del variant in MYBPC3 to hypertrophic cardiomyopathy development.

Keywords: hypertrophic cardiomyopathy, variants of unknown significance, induced pluripotent stem cells, CRISPR/Cas9

СОЗДАНИЕ ЛИНИЙ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ICGi044-B И ICGi044-C С ПОМОЩЬЮ РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТА С БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА, АССОЦИИРОВАННОЙ С МУТАЦИЕЙ *c.1492T>G* В ГЕНЕ *GLUD2*

© 2023 г. Д. А. Сорогина^{a, b}, Е. В. Григорьева^{a, *}, А. А. Малахова^a, С. В. Павлова^a, С. П. Медведев^a, Ю. В. Вяткин^b, Е. А. Хабарова^{a, c}, Дж. А. Рзаев^c, С. М. Закиян^a

^aФГБНУ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, просп. акад. Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090 Россия

^bФГАОУВО Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, ул. Пирогова, 2, Новосибирск, 630090 Россия

^cФГБУ Федеральный центр нейрохирургии Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Немировича-Данченко, 132/1, Новосибирск, 630087 Россия

*e-mail: evlena@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 08.12.2022 г.

После доработки 25.12.2022 г.

Принята к публикации 28.12.2022 г.

Болезнь Паркинсона – мультифакториальное заболевание, в его этиологию вносят вклад как генетическая предрасположенность (5% всех случаев), так и факторы окружающей среды, и возрастные изменения в головном мозге и других системах организма. Для диагностики и изучения патологии развития болезни важен поиск новых полиморфизмов, ассоциированных с наследственными формами заболевания. Мы проанализировали клинический экзом 55-летнего пациента с болезнью Паркинсона и выявили полиморфизм в гене *GLUD2* (*c.1492T>G*). Данный полиморфизм является патогенным по базе данных ClinVar, однако механизм патогенеза до сих пор остается мало изученным. Кроме того, в настоящее время нет релевантных моделей на основе клеток человека, что вызывает большой интерес. Мы создали индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) из мононуклеарных клеток периферической крови пациента с помощью неинтегрирующих эписомных векторов (OCT4, KLF4, L-MYC, SOX2, LIN28 и p53 shRNA). Полученные линии ИПСК (ICGi044-B и ICGi044-C) демонстрируют типичную ЭСК-подобную морфологию, нормальный кариотип (46,XY), экспрессируют маркеры плюрипотентности (OCT4, SOX2, NANOG, SSEA4, TRA-1-60) и способны давать производные трех зародышевых листков. Линии ИПСК ICGi044-B и ICGi044-C, а также их нейральные производные представляют собой уникальную клеточную модель *in vitro* для изучения патогенетических механизмов развития болезни Паркинсона, ассоциированной с мутацией *c.1492T>G* в гене *GLUD2*.

Ключевые слова: репрограммирование, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, болезнь Паркинсона, полиморфизмы

DOI: 10.31857/S0475145023010123, **EDN:** FRVDZS

ВВЕДЕНИЕ

Пациент-специфичные клеточные модели на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) позволяют изучать механизмы развития различных наследственных заболеваний без хирургического вмешательства в организм человека. Это особенно полезно для изучения нейроде-

генеративных заболеваний, включая болезнь Паркинсона.

Наследственная форма болезни Паркинсона может быть вызвана мутациями в различных генах, одним из которых является ген *GLUD2*. Этот ген расположен на X-хромосоме и не имеет интронов. *GLUD2* кодирует митохондриальный фермент глутаматдегидрогеназу 2, который участвует в окис-

лении глутамата до α -кетоглутарата. *GLUD2* экспрессируется только в клетках Сертоли, астроцитах и нейронах.

Мутация *c.1492T>G* в гене *GLUD2* приводит к замене Ser445Ala в ферменте, что является причиной усиления ее активности. Из-за повышенной степени ферментативной активности происходит нарушение работы дофаминергических нейронов, что ведет к развитию болезни Паркинсона. У мужчин, гемизиготных по этой мутации, наблюдается раннее начало заболевания.

Полученные в данном исследовании линии ИПСК ICGi044-B и ICGi044-C, а также их нейральные производные представляют собой уникальную клеточную модель *in vitro* для изучения патогенетических механизмов развития болезни Паркинсона, ассоциированной с мутацией *c.1492T>G* в гене *GLUD2*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение ИПСК и условия культивирования

1×10^6 мононуклеарных клеток (МНК) периферической крови трансфицировали набором эписомных векторов (по 0.5 мкг каждого), кодирующих OCT4, KLF4, L-MYC, SOX2, LIN28 и mp53DD (Addgene ID № 41855–58, 41813–14) с использованием Neon Transfection System (Thermo Fisher Scientific), программа: 1650 В, 10 мс, 3 раза и культивировали, как описано (Grigor'eva et al., 2023). Первичные колонии ИПСК отбирали вручную и высевали на чашки с митотически инактивированными эмбриональными фибробластами мыши в среду, содержащую 85% Knock-Out DMEM, 15% KnockOut Serum Replacement, 0.1 mM NEAA, 0.1 mM 2-меркаптоэтанол, 1% пенициллин-стрептомицин, GlutaMAX-I (все Thermo Fisher Scientific) и 10 нг/мл bFGF (SCI Store). Для пассирования ИПСК диссоциировали с помощью TrypLE (Thermo Fisher Scientific) и рассаживали в соотношении 1 : 8–1 : 10 с 2 мкМ тиазовивином (STEMCELL Technologies) каждые 4–5 дней. Клетки культивировали при 37°C в 5% CO₂.

Выделение геномной ДНК и РНК

Геномную ДНК выделяли из МНК и ИПСК с использованием набора для очистки геномной ДНК Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega). РНК выделяли с использованием Trizol (Thermo Fisher Scientific) по протоколу производителя.

Генетический анализ

Секвенирование клинического экзона образца ДНК из пациент-специфичных МНК проводили в компании “Генотек” (<https://www.genotek.ru>). Библио-

отека была создана с использованием набора для подготовки библиотеки ДНК NEBNext Ultra (New England Biolabs) для Illumina после двойного штрих-кодирования с помощью NEBNext Multiplex Oligos для Illumina (New England Biolabs), контроль качества проводили с помощью Agilent Bioanalyzer 2100. Для обогащения библиотеки использовали SureSelectXT Target Enrichment System (Agilent Technologies), секвенирование в режиме Rapid Run Mode. Необработанные считывания, полученные с Illumina HiSeq 2500, загружали в базу данных SRA (проект PRJNA563295, образец SAMN22788975, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bio-sample/22788975>).

Подтверждение наличия мутации *GLUD2 c.1492 T>G* в ИПСК проводили секвенированием по Сэнгеру, праймеры приведены в табл. 1. Реакции проводили на амплификаторе T100 Thermal Cycler (Bio-Rad) с использованием BioMaster HS-Taq PCR-Color (2×) (Biolabmix) и следующей программы: 95°C – 3 мин; 35 циклов: 95°C – 30 с; 65°C – 30 с; 72°C – 15 с; и 72°C – 5 мин. Реакции секвенирования по Сэнгеру проводили с помощью Big Dye Terminator V. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) и анализировали на генетическом анализаторе ABI 3130XL в ЦКП “Геномика” СО РАН (<http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/corefacity>).

Выявление микоплазмы и эписом

Детекцию контаминации микоплазмы и наличия последовательностей эписом в клетках проводили с помощью ПЦР (95°C – 5 мин; 35 циклов: 95°C – 15 с, 60°C – 15 с, 72°C – 20 с) на амплификаторе S1000 Thermal Cycler (Bio-Rad) (Chopra et al., 1998; Okita et al., 2013). Праймеры перечислены в табл. 1.

Анализ кариотипа

Для кариотипирования клетки рассаживали на 4 лунки 12-луночного планшета с расчетом, чтобы через 2 сут монослой клеток достигал 80–90% конфлюэнтности. За 2.5 ч до фиксации среду меняли на свежую с добавлением 25–50 нг/мл колленида. Клетки дезагрегировали 200 мкл TrypLE, к суспензии доливали 3 мл 0.28% КС1 и инкубировали 20 мин при 37°C, затем к суспензии осторожно добавляли 1–2 капли фиксатора Карнуа (метанол–уксусная кислота 3 : 1). Клетки аккуратно суспендировали и переносили в центрифужную пробирку. Центрифугировали 5 мин при 1300 об./мин (300 g), супернатант сливали, к осадку осторожно добавляли 1 мл охлажденного во льду фиксатора, не перемешивая оставляли пробирку на 20 мин на льду. Затем клетки аккуратно пипетировали и центрифугировали 5 мин при 1300 об./мин (300 g). Осадок ресуспендировали в свежем охлажденном фиксато-

Таблица 1. Антитела и праймеры, использованные в исследовании

	Антитела, использованные в исследовании			
	Антитело	Разведение	Производитель, кат. №	RRID
Маркеры плюрипотентности	Rabbit IgG anti-OCT4	1 : 200	Abcam, ab18976	RRID:AB_444714
	Rabbit IgG anti-NANOG	1 : 500	Abcam, ab62734	RRID:AB_956161
	Mouse IgG3 anti-SSEA4	1 : 200	Abcam, ab16287	RRID:AB_778073
	Mouse IgM anti-TRA-1-60	1 : 200	Abcam, ab16288	RRID:AB_778563
Маркеры дифференцированных производных	Mouse IgG2a anti-aSMA	1 : 100	Dako, M0851	RRID:AB_2223500
	Rabbit IgG anti-NKX2.5 (H-114)	1 : 100	Santa Cruz Biotechnology, sc-14033	RRID:AB_650281
	Rabbit IgG anti-NF200	1 : 1000	Sigma, N4142	RRID:AB_477272
	Mouse IgG2a anti-Tubulin β 3 (TUBB3)/Clone: TUJ1	1 : 1000	BioLegend, 801201	RRID:AB_2313773
	Mouse IgG1 anti-HNF3b (FOXA2)	1 : 50	Santa Cruz Biotechnology, sc-374, 376	RRID:AB_10989742
	Mouse IgG2a anti-AFP	1 : 250	Sigma, A8452	RRID:AB_258392
Вторичные антитела	Goat anti-Mouse IgG (H + L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 568	1 : 400	Thermo Fisher Scientific, A11031	RRID:AB_144696
	Goat anti-Mouse IgG1 Alexa Fluor 568	1 : 400	Thermo Fisher Scientific, A21124	RRID:AB_2535766
	Goat anti-Mouse IgG2a Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 568	1 : 400	Thermo Fisher Scientific, A21134	RRID:AB_2535773
	Goat anti-Mouse IgG3 Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	1 : 400	Thermo Fisher Scientific, A21151	RRID:AB_2535784
	Goat anti-Mouse IgM Heavy Chain Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 568	1 : 400	Thermo Fisher Scientific, A21043	RRID:AB_2535712
	Goat anti-Rabbit IgG (H + L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	1 : 400	Thermo Fisher Scientific, A11008	RRID:AB_143165
	Goat anti-Rabbit IgG (H + L) Alexa Fluor 568	1 : 400	Thermo Fisher Scientific, A11011	RRID:AB_143157

Таблица 1. Окончание

	Олигонуклеотиды		
	Ген/локус	Размер продукта	Прямой/обратный праймер (5'–3')
Детекция эписомных векторов	oriP	544 пн	TTCCACGAGGGTAGTGAACC/ TCGGGGGTGTTAGAGACAAC
Референсный ген (колич. ОТ-ПЦР)	Бета-2-микроглобулин	280 пн	TAGCTGTGCTCGCGCTACT/ TCTCTGCTGGATGACGTGAG
Маркеры плюрипотентности (колич. ОТ-ПЦР)	NANOG	391 пн	CAGCCCCGATTCTTCCACCAGTCCC/ CGGAAGATCCCAGTCGGGTTACC
	OCT4	94 пн	CTTCTGCTTCAGGAGCTTGG/ GAAGGAGAAGCTGGAGCAAA
	SOX2	100 пн	GCTTAGCCTCGTCGATGAAC/ AACCCCAAGATGCACAACCTC
Детекция микоплазмы	Ген рибосомальной 16S РНК	280 пн	GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT/ TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC
Подтверждение мутации	<i>GLUD2: с.1492 T>G</i>	218 пн	СТААСТАССАСТТГСТССТГТС/ САГГТССААТСССАГГТТАТАС

ре и переносили в 1.5 мл пробирки для хранения и транспортировки. Суспензии фиксированных клеток передавали в клинично-диагностическую лабораторию генетической клиники НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ для анализа кариотипа.

Спонтанная дифференцировка *in vitro*

Потенциал дифференцировки *in vitro* анализировали с помощью формирования эмбрионидных теллец, как описано ранее (Grigor'eva et al., 2020).

Иммунофлуоресцентное окрашивание

Клетки фиксировали в 4% параформальдегиде (10 мин, при комнатной температуре (КТ)), пермеабилizировали 0.5% Тритон-Х100 (30 мин, КТ), инкубировали с 1% БСА (30 мин, КТ). Первичные антитела инкубировали в течение ночи при 4°C, вторичные антитела добавляли на 1.5–2 ч при комнатной температуре (табл. 1). Ядра контрастировали DAPI. Микрофотографии были сделаны с использованием микроскопа Nikon Eclipse Ti-E и программного обеспечения NIS Elements.

Количественная ОТ-ПЦР

Обратную транскрипцию 1 мкг РНК проводили с помощью обратной транскриптазы M-MuLV (Biolabmix). Количественную ПЦР проводили на приборе LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche) с BioMaster HS-qPCR SYBR Blue 2× (Biolabmix) с использованием программы: 95°C – 5 мин; 40 циклов: 95°C – 10 с, 60°C – 1 мин. Значения СТ нормализовали к бета-2-микроглобулину с использованием ΔΔСТ-метода.

STR анализ

Аутентификацию линии ИПСК осуществляла компания “Геноаналитика” (<https://www.genoanalytica.ru>) с использованием наборов AmpFISTR Identifiler (Applied Biosystems) и Investigator HDplex (QIAGEN), на приборе 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Japan).

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ

Паспорт клеточных линий ИПСК ICGi044-B и ICGi044-C представлен в табл. 2, полная характеристика этих линий представлена на рис. 1 и в табл. 3.

Таблица 2. Паспорт клеточных линий ICGi044-B и ICGi044-C

Параметры	Описание
Уникальный идентификатор	ICGi044-B ICGi044-C
Альтернативное название линии	PD40-8 PD40-13
Учреждение	ФГБНУ Федеральный исследовательский центр “Институт цитологии и генетики СО РАН”, Новосибирск, Россия
Одобрение этического комитета	Исследование одобрено этической комиссией ФГБУ “Федеральный центр нейрохирургии” Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, протокол № 1 от 14.03.2017
Тип клеток	ИПСК
Вид организма	Человек
Дополнительная информация о происхождении клеточной линии	Возраст: 55 Пол: М Этническая принадлежность: европеоидная раса
Исходный тип клеток	Мононуклеарные клетки периферической крови
Дата забора биоматериала	2017 год
Способ репрограммирования	Неинтегрирующиеся эписомные плазмидные векторы
Репрограммирующие факторы	OCT4, KLF4, L-MYC, SOX2, LIN28 и p53 shRNA
Клональность	Клональные
Генетическая модификация	Нет
Вид генетической модификации	Нет
Подтверждение элиминации/замолкания репрограммирующих трансгенов	ПЦР, не детектируются
Заболевание	Болезнь Паркинсона
Ген/локус	<i>GLUD2</i> c.1492 T>G, rs9697983
Морфология	Монослойные колонии, подобные плюрипотентным клеткам человека
Плюрипотентность	Подтверждена в тестах на формирование эмбриоидных тел
Кариотип	46,XY
Проверка контаминации	Бактерии, грибы и микоплазма не обнаружены
Область применения	<i>In vitro</i> модель болезни Паркинсона
Способ культивирования	Монослойный на пластике, покрытом эмбриональными фибробластами мыши
Среда культивирования	85% KnockOut DMEM, 15% KnockOut Serum Replacement, 0.1 mM NEAA, 0,1 mM 2-меркаптоэтанол, 1% пенициллин-стрептомицин, GlutaMAX-I (все Thermo Fisher Scientific), 10 нг/мл bFGF (SCI Store)
Температура, °C	37
Концентрация CO ₂ , %	5
Концентрация O ₂ , %	20
Способ посева	Энзиматический, TrypLE (Thermo Fisher Scientific)
Кратность посева	1 : 8–1 : 10
Криоконсервация	90% FBS, 10% DMSO
Условия хранения	Жидкий азот
Учетная запись в реестре	https://hpscreg.eu/cell-line/ICGi044-B https://hpscreg.eu/cell-line/ICGi044-C
Дата паспортизации/депонирования	07/11/2022

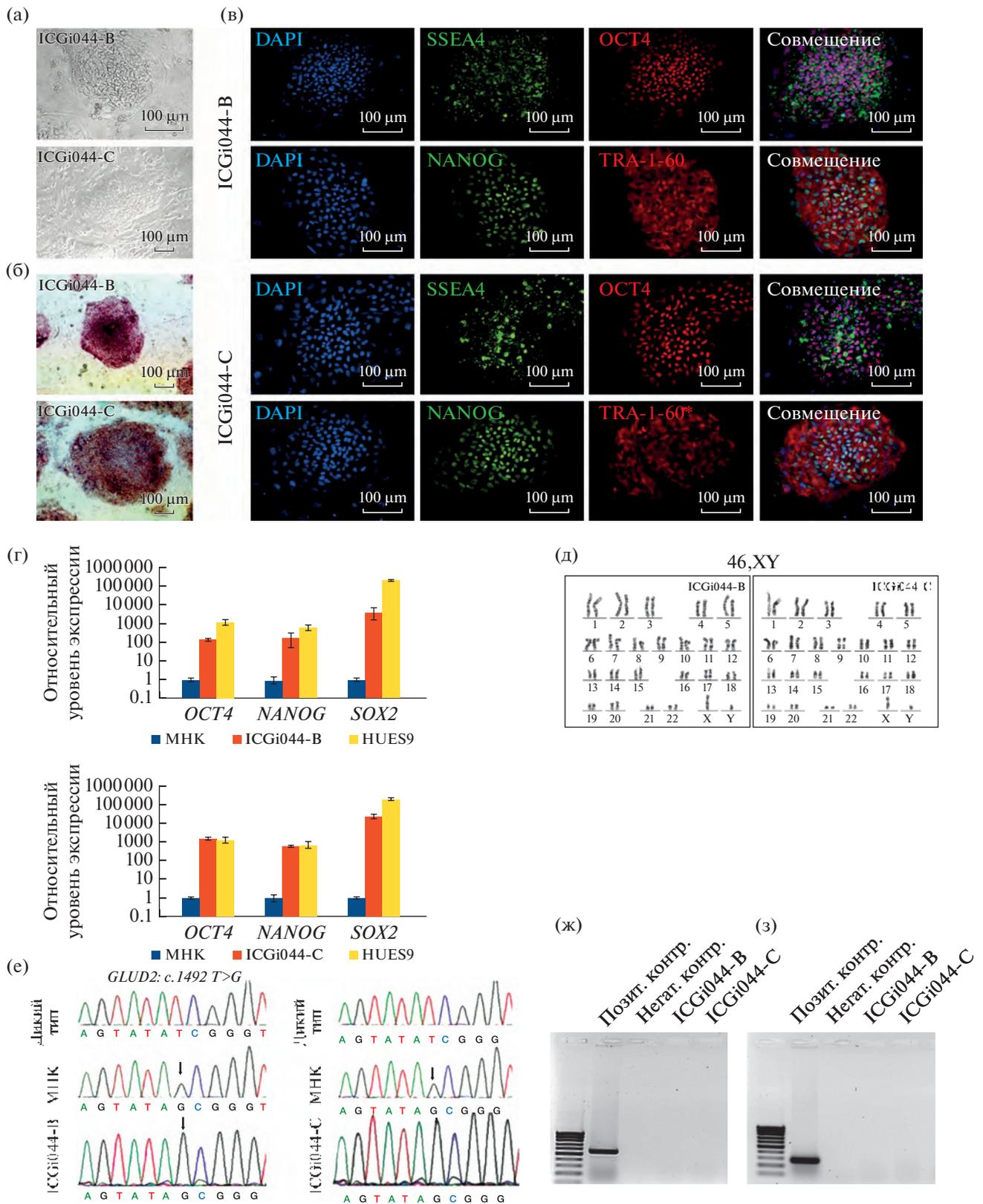


Рис. 1. Начало.

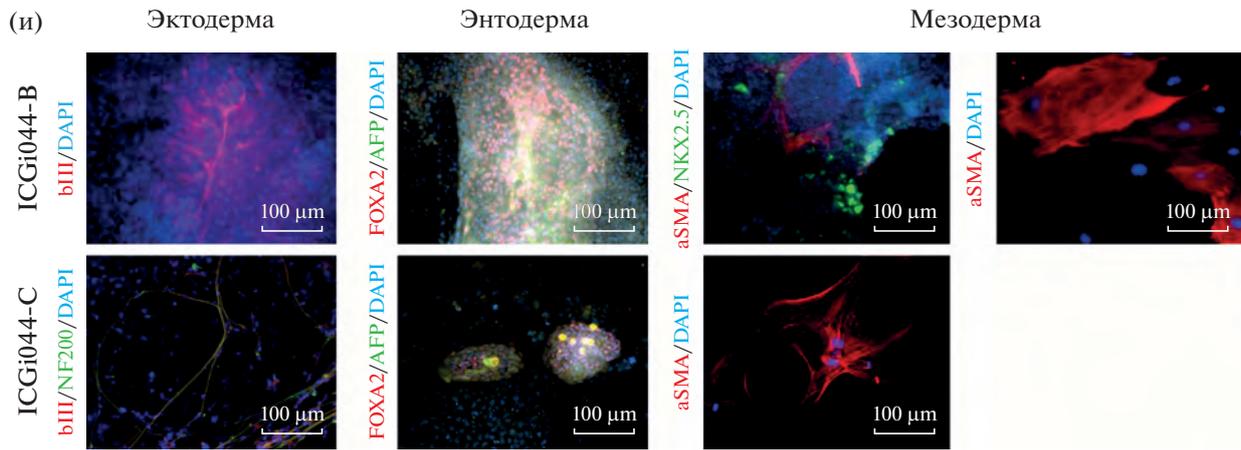


Рис. 1. Характеристика линий ИПСК человека ICGi044-B и ICGi044-C. (а, б) Колонии клеток ICGi044-B и ICGi044-C, растущие на пластике, покрытом эмбриональными фибробластами мыши; (а) морфология клеток; (б) гистохимическое выявление щелочной фосфатазы; (в) иммунофлуоресцентная окраска на маркеры плюрипотентности: *OCT4* (красный), *NANOG* (зеленый), *SSEA4* (зеленый), *TRA-1-60* (красный) на 18 пассаже; (г) количественный анализ с помощью ПЦР в реальном времени выявил повышение уровня экспрессии маркеров плюрипотентности *OCT4*, *NANOG* и *SOX2* на 20-м пассаже; (д) G-бэндинг линии ICGi044-B на 28 пассаже и линии ICGi044-C на 27 пассаже показал нормальный кариотип (46,XY); (е) секвенограммы участков гена *GLUD2* МНК пациента с БП, линий ИПСК ICGi044-B и ICGi044-C и здорового донора (дикий тип); (ж) иммунофлуоресцентная окраска на маркеры трех зародышевых листков эктодермы (тубулина $\beta 3$ (*TUBB3/TUJ1*), нейрофиламента 200 (*NF200*)), мезодермы (α -актин гладких мышц (α SMA), гомеобоксный белок *NKX2.5*), энтодермы (ядерный фактор гепатоцитов (*FOXA2*), α -фетопротеин (*AFP*)); (з, и) результаты ПЦР тестов; (з) эписомные векторы элиминировались в ИПСК на 20-м пассаже; (и) контаминация линий микоплазмами на 20-м пассаже не выявлена. Обозначения: МНК – мононуклеарные клетки периферической крови, HUES9 – линия эмбриональных стволовых клеток человека, служившая положительным контролем экспрессии маркеров плюрипотентности. Все масштабные линейки – 100 мкм.

При анализе клинического экзомного секвенирования образца ДНК 55-летнего мужчины с болезнью Паркинсона, был выявлен патогенный генетический вариант *c.1492 T>G* гена *GLUD2* (ClinVar: VCV000029936.3), ассоциированный с болезнью Паркинсона. Данный полиморфизм приводит к замене в аминокислотной последовательности (р.S445A) митохондриального фермента глутаматдегидрогеназы 2 и повышает ее активность. Мы трансфицировали МНК периферической крови пациента неинтегрирующимися эписомными плазмидными векторами, экспрессирующими факторы плюрипотентности, приводящие к репрограммированию соматических клеток: *OCT4*, *KLF4*, *L-MYC*, *SOX2*, *LIN28* и *p53 shRNA* (Okita et al., 2013). Полученные линии ИПСК (ICGi044-B и ICGi044-C) были подробно охарактеризованы. Колонии клеток росли на пластике, покрытом эмбриональными фибробластами мыши, обработанными митомицином С (Sigma), демонстрировали типичную морфологию плюрипотентных стволовых клеток человека (рис. 1а), были положительными по активности щелочной фосфатазы (рис. 1б) и интенсивно пролиферировали. Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток показало экспрессию факторов транскрипции *NANOG* и *OCT4*, поверхностных антигенов *TRA-1-60* и *SSEA-4* на 18 пассаже (рис. 1в). Количественный анализ с

помощью ПЦР в реальном времени выявил повышение уровня экспрессии маркеров плюрипотентности *OCT4*, *NANOG* и *SOX2* на 20 пассаже (рис. 1г). Линия эмбриональных стволовых клеток человека HUES9 (HVRDe009-A) служила положительным контролем (Cowan et al., 2004). G-бэндинг линии ICGi044-B на 28 пассаже и линии ICGi044-C на 27 пассаже показал нормальный кариотип (46,XY) (рис. 1д). Полиморфизм *c.1492 T>G* в гене *GLUD2* был подтвержден секвенированием по Сэнгеру в линиях ICGi044-B и ICGi044-C и сопоставлен с полиморфизмами в ДНК МНК (рис. 1е). Способность полученных клеточных линий дифференцироваться в три зародышевых листка была подтверждена спонтанной дифференцировкой *in vitro* посредством образования эмбриоидных тел. Иммунофлуоресцентное окрашивание дифференцированных клеток выявило экспрессию маркеров эктодермы (тубулина $\beta 3$ (*TUBB3/TUJ1*), нейрофиламента 200 (*NF200*)), мезодермы (α -актин гладких мышц (α SMA), гомеобоксный белок *NKX2.5*), энтодермы (ядерный фактор гепатоцитов (*FOXA2*), α -фетопротеин (*AFP*)) (рис. 1ж). Эписомные векторы элиминировались в ИПСК на 20 пассаже (рис. 1з). ПЦР-тест линий ИПСК ICGi044-B и ICGi044-C не выявил контаминации микоплазмами на 20 пассаже (рис. 1и). Анализ коротких tandemных повторов

Таблица 3. Характеристика линий ИПСК человека ICGi044-B и ICGi044-C

Параметры	Метод	Результат	Данные
Морфология	Микрофотография в фазовом контрасте	Характерная для плюрипотентных клеток человека	Рис. 1а
Фенотип	Качественный анализ <i>Окрашивание на щелочную фосфатазу</i>	Положительный	Рис. 1б
	Качественный анализ <i>Иммунофлуоресцентное окрашивание</i>	Положительное окрашивание на маркеры плюрипотентности: OCT4, NANOG, SSEA4, TRA-1-60	Рис. 1в
	Количественный анализ <i>ПЦР в реальном времени</i>	Повышение уровня экспрессии маркеров плюрипотентности: NANOG, OCT4, SOX2	Рис. 1г
Генотип	Кариотипирование	46,XY Разрешение 450–500	Рис. 1д
Идентификация	STR анализ	26 из 26 полиморфных локусов совпадают с МНК	Данные доступны по запросу у авторов
Генотипирование	Секвенирование клинического экзома	<i>GLUD2: с. 1492 T>G, rs9697983</i>	Данные секвенирования загружены в базу данных SRA (SAMN22788975)
	Секвенирование по Сэнгеру	Подтверждено присутствие мутаций в гемизиготном состоянии	Рис. 1е
Контаминация	Микоплазма	Отсутствует	Рис. 1и
Потенциал дифференцировки	Формирование эмбрионидных тел, иммунофлуоресцентное окрашивание	Положительное окрашивание на маркеры трех зародышевых листков: αSMA и NKX2.5 (мезодерма); NF200 и TUBB3/TUJ1 (эктодерма); FOXA2 и AFP (энтодерма)	Рис. 1ж
Инфекции донора	ВИЧ, гепатит В, гепатит С	Нет данных	Нет данных
Дополнительная информация о генотипе	Группа крови	Нет данных	Нет данных
	HLA-типирование	Нет данных	Нет данных

(STR) линий ИПСК ICGi044-B и ICGi044-C на 17 пассаже продемонстрировал идентичность МНК по 26 полиморфным локусам (данные доступны по запросу у авторов).

Клиническое экзомное секвенирование было выполнено в Новосибирском национальном исследовательском государственном университете.

БЛАГОДАРНОСТИ

Иммунофлуоресцентную визуализацию проводили с использованием ресурсов Центра коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов ИЦГ СО РАН (<https://ckp.icgen.ru/ckr-tabo/>), поддержанного Бюджетным проектом ИЦиГ СО РАН FWNR-2022-0015. МНК были предоставлены ФГБУ «Федеральный центр нейрохирургии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского Научного Фонда, проект № 19-75-20063.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование одобрено этической комиссией ФГБУ «Федеральный центр нейрохирургии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,

Новосибирск, протокол № 1 от 14.03.2017. Пациенту была предоставлена вся информация о настоящем исследовании и им собственноручно подписано информированное согласие и информационный лист.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ВКЛАД АВТОРОВ

Е.В. Григорьева, С.В. Павлова, А.А. Малахова и С.М. Закиан разработали дизайн эксперимента, провели анализ полученных данных и участвовали в написании статьи. Д.А. Сорогина и Е.В. Григорьева репрограммировали мононуклеарные клетки пациента. Вся культуральная и молекулярно-генетическая работа была проведена Д.А. Сорогиной, а именно получение индивидуальных клонов ИПСК и детальная их характеристика. С.П. Медведев выполнил секвенирование по Сенгеру для подтверждения наличия полиморфизмов в полученных ИПСК. Анализ данных экзомного секвенирования был выполнен Ю.В. Вяткиным. Медицинское сопровождение пациента и предоставление мононуклеарных клеток было осуществлено Е.А. Хабаровой и Дж.А. Рзаевым.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Choppa P.C., Vojdani A., Tagle C. et al.* Multiplex PCR for the detection of *Mycoplasma fermentans*, *M. hominis* and *M. penetrans* in cell cultures and blood samples of patients with chronic fatigue syndrome // *Mol. Cell Probes*. 1998. V. 12(5). P. 301–308. <https://doi.org/10.1006/mcpr.1998.0186>
- Cowan C.A., Klimanskaya I., McMahon J. et al.* Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts // *N. Engl. J. Med.* 2004. V. 350(13). P. 1353–1356. <https://doi.org/10.1056/NEJMSr040330>
- Grigor'eva E.V., Malankhanova T.B., Surumbayeva A. et al.* Generation of GABAergic striatal neurons by a novel iPSC differentiation protocol enabling scalability and cryopreservation of progenitor cells // *Cytotechnology*. 2020. V. 72(5). P. 649–663. <https://doi.org/10.1007/s10616-020-00406-7>
- Grigor'eva E.V., Kopytova A.E., Yarkova E.S., Pavlova S.V., Sorogina D.A., Malakhova A.A., Malankhanova T.B., Baydakova G.V., Zakharova E.Y., Medvedev S.P., Pchelina S.N., Zakian S.M.* Biochemical characteristics of iPSC-derived dopaminergic neurons from N370S GBA variant carriers with and without Parkinson's disease // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24(5). P. 4437. <https://doi.org/10.3390/ijms24054437>
- Okita K., Yamakawa T., Matsumura Y. et al.* An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood // *Stem Cells*. 2013. V. 31. № 3. P. 458–466.

Creation of Induced Pluripotent Stem Cells ICGi044-B and ICGi044-C Using Reprogramming of Peripheral Blood Mononuclear Cells of a Patient with Parkinson's Disease Associated with *c.1492T>G* Mutation in the *GLUD2* Gene

D. A. Sorogina^{1,2}, E. V. Grigor'eva^{1,*}, A. A. Malakhova¹, S. V. Pavlova¹, S. P. Medvedev¹, Y. V. Vyatkin², E. A. Khabarova^{1,3}, J. A. Rzaev³, and S. M. Zakian¹

¹*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, prosp. acad. Lavrentieva, 10, Novosibirsk, 630090 Russia*

²*Novosibirsk State University, ul. Pirogova, 2, Novosibirsk, 630090 Russia*

³*FSBI Federal Neurosurgical Center, ul. Nemirovicha-Danchenko, 132/1, Novosibirsk, 630087 Russia*

*e-mail: evlana@bionet.nsc.ru

Parkinson's disease is a multifactorial disease; both genetic predisposition (5% of all cases), environmental factors and age-related changes in the brain and other body systems contribute to its etiology. For the diagnosis and study of the pathology of the development of the disease, it is important to search for new polymorphisms associated with hereditary forms of the disease. We analyzed the clinical exome of a 55-year-old patient with Parkinson's disease and identified a single nucleotide polymorphism in the *GLUD2* gene (*c.1492T>G*). This genetic variant is pathogenic according to the ClinVar database, but the mechanism of pathogenesis is still poorly understood. In addition, there are currently no relevant models based on human cells, which is of great interest. We generated induced pluripotent stem cells (iPSCs) from patient peripheral blood mononuclear cells using non-integrating episomal vectors expressing OCT4, KLF4, L-MYC, SOX2, LIN28, and p53 shRNA. The obtained iPSC lines (ICGi044-B and ICGi044-C) demonstrate typical ESC-like morphology, normal karyotype (46,XY), express pluripotency markers (OCT4, SOX2, NANOG, SSEA4, TRA-1-60) and are able to give derivatives of three germ layers. The iPSC lines ICGi044-B and ICGi044-C, as well as their neural derivatives, represent an unique in vitro cell model for studying the pathogenic mechanisms of the development of Parkinson's disease associated with the *c.1492T>G* mutation in the *GLUD2* gene.

Keywords: reprogramming, induced pluripotent stem cells, Parkinson's disease, polymorphisms