

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МЕДИЦИНА

УДК 617-089.844

© Коллектив авторов, 2018

Т.И. Биккузин¹, В.Н. Павлов¹, Y. She², H. Zhang²

ПОЛУЧЕНИЕ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ИЗ КЕРАТОЦИТОВ РОГОВИЦЫ

¹ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет»

Минздрава России, г. Уфа

²Harbin Medical University, Harbin, China

Нехватка донорского материала и отторжение трансплантата являются острой проблемой существующих методов кератопластики. Современные клеточные технологии могут стать эффективным решением. В нашей работе мы рассматриваем кератоциты человеческой роговицы в качестве доступного источника индуцированных плюрипотентных стволовых клеток.

Человеческие кератоциты, выделенные из донорской роговицы, были подвергнуты эписомальному репрограммированию. В течение суток культура кератоцитов находилась под воздействием ряда факторов репрограммирования: Oct4, Sox2, Klf4, Lin28, L-Мyc и p53. Вследствие чего через несколько фаз деления кератоцитов среди них были идентифицированы очаги клеток, схожие по своим характеристикам с плюрипотентными стволовыми клетками. Полученные индуцированные плюрипотентные стволовые клетки были механически изолированы, пассажированы и верифицированы с помощью иммунофлуоресцентного анализа.

Ключевые слова: офтальмология, роговица, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, клеточное репрограммирование.

T.I. Bikkuzin, V.N. Pavlov, Y. She, H. Zhang

OBTAINING HUMAN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS FROM CORNEAL KERATOCYTES

Lack of donor material and immune rejection are an acute problem of existing methods of keratoplasty. Modern cellular technology can be an effective solution. In our work, we consider human corneal keratocytes as an accessible source of induced pluripotent stem cells.

Human keratocytes isolated from the donor cornea were subjected to episomal reprogramming. Within a day the colony of keratocytes was affected by a number of reprogramming factors: Oct4, Sox2, Klf4, Lin28, L-Myc and p53. After several phases of keratocytes division, cell foci similar in their characteristics to pluripotent stem cells were identified. The derived induced pluripotent stem cells were mechanically isolated, passaged and verified by immunofluorescence analysis.

Key words: ophthalmology, cornea, induced pluripotent stem cells, cell reprogramming.

Роговичная слепота является одной из основных причин инвалидности по зрению. Единственным общепринятым методом лечения, способным вернуть зрение в данной ситуации, является трансплантация роговицы. Тем не менее во многих развитых странах глазные банки с трудом справляются с растущим спросом на ткани для трансплантации, что частично связано с увеличением продолжительности жизни населения. Таким образом, проблема нехватки донорского материала имеет тенденцию к усугублению, что вызывает потребность поиска альтернативы консервированной донорской роговице [4,9].

Трансплантация биоинженерных тканей, полученных из стволовых клеток, является одним из приоритетных направлений развития медицины. Плюрипотентные стволовые клетки, такие как эмбриональные стволовые клетки, могут самообновляться и дифференцироваться во все типы клеток человеческого организма. Благодаря последним достижениям науки соматические клетки могут быть репрограммированы *in vitro* в индуцированные плюрипотентные стволовые (ИПС) клетки путем переноса ядер в

ооциты или через эктопическую экспрессию определенных факторов транскрипции [2,3,7-9]. При этом ранние методы получения ИПС-клеток являются малоэффективными и могут быть сопряжены с риском канцерогенности. Для решения этих проблем учеными были разработаны более безопасные методы репрограммирования. Среди них можно выделить «систему эписомальных векторов» – метод, который был применен и в нашей работе. Эписомальные векторы на короткий срок встраиваются в геном клетки, репрограммируют её до состояния плюрипотентности и затем самостоятельно выводятся из ядра клетки, что значительно снижает риск возникновения нежелательных мутаций [1,4,7,11].

Примечательным свойством ИПС-клеток является «эпигенетическая память» – способность наследовать ИПС-клетками ряд эпигенетических меток, характерных для исходных соматических клеток. Показано, что данный феномен, имеющий общий источник органогенеза, можно использовать для повышения качества генерации различных типов клеток [1,5]. Как известно, кератоциты и эн-

дотелиальные клетки человеческой роговицы образуются из иммигрирующих мезенхимальных стволовых клеток нервного гребня [4]. Вследствие своих анатомических и физиологических особенностей эндотелий роговицы становится труднодоступным для получения и культивации *in vitro*, альтернативным источником могут стать ИПС-клетки, обладающие «эпигенетической памятью» о своем роговичном происхождении [6,10].

Целью исследования явилось получение и последующая идентификация человеческих индуцированных плюрипотентных стволовых клеток из фибробластов стромы роговицы.

Материал и методы

Для получения человеческих кератоцитов нами были использованы лимбальные участки донорских роговиц, неиспользованные во время проведения кератопластических операций. В соответствии с положениями Хельсинкской декларации были получены согласия от доноров или их родственников. Проведение исследований, изложенных ниже, было одобрено этическим комитетом Харбинского медицинского университета (г. Харбин, Китай).

Выделение кератоцитов из образцов ткани и формирование субкультуры

Фибробласты были выделены из лимбального края роговицы и культивированы методом первичного эксплантата. Краткое описание: эпителиальный и эндотелиальный слои были механически удалены пинцетом, тогда как оставшиеся средняя часть роговицы, представленная стромой, была разрезана на микро эксплантаты (1-2 мм). Затем эксплантаты стромальной ткани были помещены в 24-луночные планшеты по одной штуке на лунку. После этого первичная культура стромальных фибробластов культивировалась в течение 1-2 недель в среде DMEM F12 с 10% содержанием бычьей сыворотки при 37,0 °С. После достижения необходимой конfluence культуры стромальных клеток была пересажена в культуральный флакон (рис. 1).

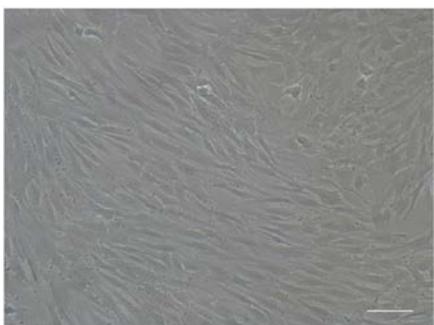


Рис. 1. Субкультура клеточной линии кератоцитов роговицы человека. 2-й пассаж. Фазово-контрастная микроскопия. Масштабная метка = 100 мкм

Выведение человеческих стромальных ИПС-клеток (ЧСИПСК) из кератоцитов человека.

С целью получения ИПС-клеток нами была использована техника эписомального репрограммирования «Epi5™ Episomali PSCR eprogramming Kit» (Invitrogen). В течение суток кератоциты инкубировались на покрытие Matrigel® Matrix (Corning) в питательной среде Opti-MEM (Biologicalindustries) с добавлением комбинации репрограммирующих факторов «Epi5» (Oct4, Sox2, Klf4, Lin28, L-Myc и p53) и Lipofectamine® 3000 (Invitrogen). На следующий день культуральная среда была заменена на культуральную среду для пролиферации стволовых клеток TeSR-E8 (Stemcelltechnologies), который менялся каждый день.

Иммуноцитохимический анализ

Из тарелок для культивирования клеток культуральную среду удаляли с последующим трехразовым промыванием физраствором (Sigma, Китай). Далее клетки инкубировались в 4% параформальдегиде (Sigma, Китай) в течение 15 минут. После промывки в течение 15 минут физраствором добавлялся 0,1% Triton X-100 (Sigma, Китай) для повышения проницаемости клеточной мембраны в исследуемых клетках. Затем их снова промывали физраствором и блокировали 5% бычьей сывороткой в течение 30 минут. После чего клетки инкубировали со следующими первичными антителами: TRA-1-60 (Millipore, США), Oct4 (Santa Cruz Biotechnology, США), Nanog (Novus, США) – при 4°C в течение ночи. На следующий день после трехкратного промывания физраствором, колонии клеток инкубировались с соответствующими конъюгированными вторичными антителами Alexa Fluor 633 donkeyanti-mouseIgG и Alexa Fluor 488 goatanti-rabbitIgG (Invitrogen, США) в течение 1 часа при комнатной температуре в темном помещении. Ядра окрашивались 4'-6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) (Invitrogen, США). Клетки микроскопировали и фотографировали с помощью флуоресцентного микроскопа Axiovert200M, Carl Zeiss (Германия).

Результаты и обсуждение

Через 3 недели эксперимента среди кератоцитов стали появляться очаги клеток, схожих по своим внешним характеристикам с эмбриональными стволовыми клетками (рис. 2). На 30-й день образовавшиеся колонии «новых» клеток были механически изолированы и пассажированы для дальнейшей культивации и верификации (рис. 3).

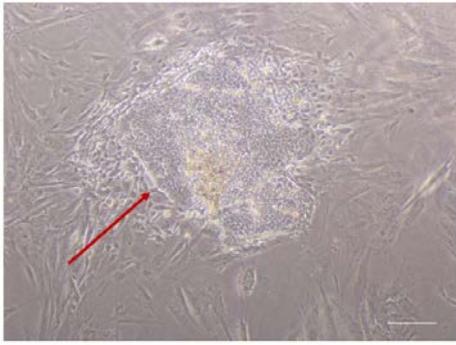


Рис. 2. Очаг ЧСИПСК среди кератицитов на 25-й день эксперимента. Фазово-контрастная микроскопия. Масштабная метка = 100 мкм

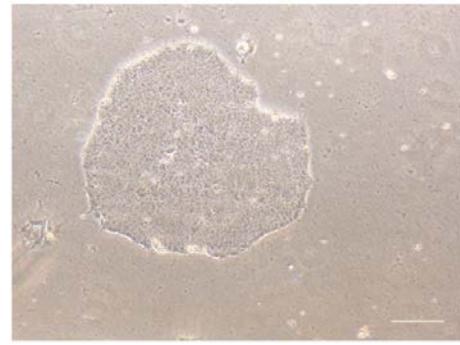


Рис. 3. Изолированная линия ЧСИПСК. 1-й пассаж. Фазово-контрастная микроскопия. Масштабная метка = 100 мкм

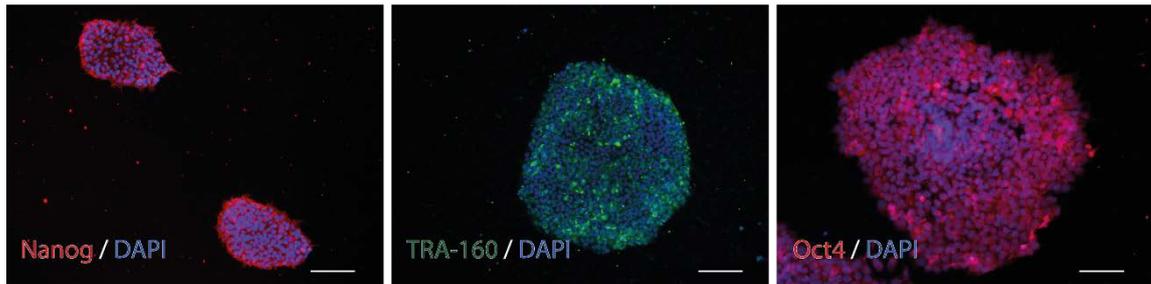


Рис. 4. Иммуноцитохимический анализ ЧСИПСК. Фазово-контрастная микроскопия. Масштабная метка = 100 мкм. DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) – контрольный маркер ядер клеток

Иммуноцитохимический анализ показал, что выведенные ЧСИПСК экспрессируют классические маркеры плюрипотентности: OCT4, TRA-1-60 и NANOG (рис. 4). Данные маркер-белки не встречаются в соматических клетках человека. Вместе с тем эмбриональные и ИПС клетки экспрессируют данные белки в избытке, так как последние являются основными факторами поддержания их плюрипотентных свойств. Исходя из вышеизложенных результатов можно заключить, что полученные ЧСИПСК являются полноценной линией ИПС клеток.

Выводы

В нашей работе мы успешно применили метод эписомального репрограммирования для получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток из стромы человеческой роговицы.

Выведенная культура ЧСИПСК будет использована для дальнейших исследований на наличие свойств «эпигенетической памяти» и возможностей применения их в трансплантологии.

Сведения об авторах статьи:

Биккузин Тимур Ильдусович – аспирант кафедры урологии с курсом ИДПО ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России. Адрес: 450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3. E-mail: nbvnext00@yandex.ru.

Павлов Валентин Николаевич – д.м.н., профессор, член-корр. РАН, зав. кафедрой урологии с курсом ИДПО, ректор ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России. Адрес: 450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3.

She Yan – PhD, Dr. Ophthalmology hospital of First Affiliated Hospital of Harbin Medical University. Address: No. 141, Yiman Street, Nangang District, Harbin 150001, China.

Zhang Hong – MBBS, PhD, Prof. Ophthalmology hospital of First Affiliated Hospital of Harbin Medical University. Address: No. 141, Yiman Street, Nangang District, Harbin 150001, China.

ЛИТЕРАТУРА

1. Васькова, Е.А. Феномен «эпигенетической памяти» индуцированных плюрипотентных стволовых клеток / Е.А. Васькова, А.Е. Стекленева, С.П. Медведев, С.М. Закиян // Acta naturae. – 2013. – №4. – С.15-21.
2. Меркулов, В.А. Проблемы и перспективы применения клеточной терапии в клинической практике / В.А. Меркулов, Н.Д. Бунытия, С.М. Радаев // Вестник НЦЭСМП. – 2011. – №2. – С.35-38.
3. Baranek, M. Effect of small molecules on cell reprogramming / M. Baranek [et al.] // J. Mol Biosyst. – 2017. – Vol. 13. – P. 277-313.
4. Hayashi, R. Generation of corneal epithelial cells from induced pluripotent stem cells derived from human dermal fibroblast and corneal limbal epithelium / R. Hayashi [et al.] // J. PLoS One. 2012. – Vol. 7. – P. 165-176.
5. Kim, K. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells / K. Kim [et al.] // Nature. 2010. – Vol. 467. – P.285-290.
6. Lo Sardo, V. Influence of donor age on induced pluripotent stem cells / V. Lo Sardo [et al.] // J. Nat. Biotechnol. 2017. – Vol. 35. – P.69-74.
7. Okita, K. A more efficient method to generate integration-free human iPSC cells / K. Okita [et al.] // J. Nat Methods. 2011. – Vol. 8, № 5. – P. 409-412.
8. Piao, Y. Efficient generation of integration-free human induced pluripotent stem cells from keratinocytes by simple transfection of episomal vectors / Y. Piao [et al.] // J. Stem Cells Transl Med. 2014. – Vol. 3. – P.787-791.
9. Takahashi, K. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors / K. Takahashi [et al.] // Cell. 2007. – Vol. 131. – P. 861-872.
10. Varga, E. Generation of human erythroblast-derived iPSC line using episomal reprogramming system / E. Varga [et al.] // J. Stem Cell Res. 2017. – Vol. 25. – P.30-33.

11. Wong, R.C.B. Generation of a human induced pluripotent stem cell line CERAi001-A-6 using episomal vectors / R. C. B. Wong [et al.] // J. Stem Cell Res. 2017. –Vol. 22. –P.13-15.

REFERENCES

- Vaskova, E.A. [et al.] «Epigenetic Memory» Phenomenon in Induced Pluripotent Stem Cells. Acta Nat. 2013. Vol. 5. № 4. P. 15-21. (In Russ).
- Merkulov V.A., Bunyatyan N.D., Radaev S.M. Problems and perspectives of cell therapy in clinical practice. Vedomosti NTsESMP. 2011. Vol. 2. P. 35-38.
- Baranek M. [et al.] Effect of small molecules on cell reprogramming. J. Mol Biosyst. 2017. Vol. 13. P. 277-313.
- Hayashi R. [et al.] Generation of corneal epithelial cells from induced pluripotent stem cells derived from human dermal fibroblast and corneal limbal epithelium. J. PLoS One. 2012. Vol. 7. P. 165-176.
- Kim, K. [et al.] Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. Nature. 2010. Vol. 467. P.285-290.
- Lo Sardo V. [et al.] Influence of donor age on induced pluripotent stem cells. J. Nat. Biotechnol. 2017. Vol. 35. P.69-74.
- Okita K. [et al.] A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. J. Nat Methods. 2011. Vol. 8, № 5. P. 409-412.
- Piao, Y. [et al.] Efficient generation of integration-free human induced pluripotent stem cells from keratinocytes by simple transfection of episomal vectors. J. Stem Cells Transl Med. 2014. Vol. 3. P.787-791.
- Takahashi, K. [et al.] Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell. 2007. Vol. 131. P. 861-872.
- Varga E. [et al.] Generation of human erythroblast-derived iPSC line using episomal reprogramming system. J. Stem Cell Res. 2017. Vol. 25. P.30-33.
- Wong, R.C.B. [et al.] Generation of a human induced pluripotent stem cell line CERA i001-A-6 using episomal vectors. J. Stem Cell Res. 2017. Vol. 22. P.13-15.

УДК 615.322

© А.Р. Казеева, К.А. Пупыкина, В.В. Пупыкина, 2018

А.Р. Казеева, К.А. Пупыкина, В.В. Пупыкина
МАКРОСКОПИЧЕСКИЙ И МИКРОСКОПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗЫ
СЫРЬЯ КРОВОХЛЕБКИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ
ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет»
Минздрава России, г. Уфа

В статье приведены результаты изучения морфологических и анатомических признаков сырья кровохлебки лекарственной с использованием макроскопического и микроскопического анализов. Выявлены характерные внешние признаки кровохлебки лекарственной, позволяющие идентифицировать сырье: для травы это описание стеблей, листьев, цветков и соцветий, их окраска и запах; морфологическими особенностями корневищ и корней являются характер излома и окраска его наружной пробки. При изучении микроскопических особенностей сырья кровохлебки установлены диагностически значимые признаки, позволяющие установить показатели подлинности. При описании травы кровохлебки обращают внимание на извилистые клетки эпидермиса листьев с четко видимыми утолщениями, амфистоматический тип листа, устьица аномоцитного типа, наличие простых, головчатых волосков, друз оксалата кальция, вместилищ с желтым содержимым, многоугольные клетки эпидермиса цветка с простыми волосками, друзами, устьицами аномоцитного типа, характерными пыльцевыми зернами. Для корневищ кровохлебки характерны хорошо выраженная сердцевина с крупными паренхимными клетками, пробка, первичная кора, сплошное камбиальное кольцо, мощные радиальные лучи. Корни кровохлебки имеют вторичное строение с выраженной пробкой, первичной корой, центральным цилиндром и характерными для них микродиагностическими элементами.

Ключевые слова: кровохлебка лекарственная, корневища и корни, трава, морфологические и микродиагностические признаки.

A.R. Kazeeva, K.A. Pupykina, V.V. Pupykina
MACROSCOPIC AND MICROSCOPIC ANALYSIS
OF BURNET HERBAL RAW MATERIAL

The article presents the results of the study of morphological and anatomical features of burnet raw materials with the use of macroscopic and microscopic analysis. The study revealed characteristic external signs of burnet, identifying raw material: for the herb it is a description of stems, leaves, flowers and blossoms, their color and smell; the morphological features of the roots and rhizomes include the nature of bending and coloring of the outer cork. Investigation of microscopic features of burnet raw material determined diagnostically significant signs that allow to set the indicators of authenticity. Description of burnet pays attention to the sinuous epidermal cells of leaves with clearly visible bulges, amphistomatic leaf type, stomata of irregular-celled type; presence of simple, capitate trichomes, clusters of calcium oxalate, a container with yellow contents; the polygonal cells of the epidermis of the flower with simple hairs, clusters, stomata of anomocytic type, characteristic of the pollen grains. Rhizomes of burnet is characterized by a well-pronounced core with large parenchymal cells, cork, primary bark, continuous cambial ring, powerful radial rays. Roots of burnet have a secondary structure with a pronounced cork, primary bark, central cylinder and characteristic microdiagnostic elements.

Key words: burnet, rhizomate and radices, herb, morphological and microdiagnostic signs.

В настоящее время особую актуальность приобретает исследование хорошо изученных лекарственных растений с целью выявления новых аспектов их использования в медицине. Фармакологическая активность лекарственных растений определяется входя-

щими в их состав биологически активными веществами, которые более родственны человеческому организму, оказывают влияние на различные биохимические процессы, происходящие в нем, и поэтому усваиваются лучше, чем их синтетические аналоги. Интерес-