

*Макеев О.Г., Шуман Е.А.,
Коротков А.В., Десятова М.А.*

РЕВИТАЛИЗАЦИЯ ФИБРОБЛАСТОВ КОЖИ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ОБРАЗЦОВ ТКАНИ П АЦИЕНТОВ СТАРШИХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП

Институт медицинских клеточных технологий,
Екатеринбург, Российская Федерация
Уральский государственный медицинский университет,
Екатеринбург, Российская Федерация

Резюме

Эффективность заместительной аутогенной клеточной терапии во многом определяется величиной восстановительного потенциала трансплантируемых клеток, который снижается по мере старения организма. В данной работе продемонстрирована возможность ревитализации клеток, полученных от пациентов старших возрастных групп, путем нокаута SINE/Alu последовательностей.

Ключевые слова: ревитализация фибробластов, нокаут гена, SINE/Alu последовательности

Введение

Радикальное решение проблемы коррекции многих заболеваний перенесено в область применения клеточных технологий для заместительной терапии. Ряд проблем, связанных с применением аллогенных клеток, выводит методы, использующие аутогенные клетки, в число исключительно возможных для практического использования. Однако, как показал многолетний опыт применения таких технологий (напр. Isologen, США) их применению препятствует ограниченный восстановительный потенциал клеток стареющего организма. Последнее в полной мере относится к заместительной терапии повреждений кожи. Известно, что при биологическом старении, наряду с уменьшением количества тканевых фибробластов, последние характеризуются снижением пролиферативной активности и восприимчивости (реакционной способности) к факторам роста [1]. В результате снижается синтез фибробластами белков коллагена и эластина, а также компонентов аморфного вещества соединительной ткани дермы.

В то же время интенсивность синтеза фибробластами металлопротеиназ, разрушающих коллаген и эластин, возрастает [2, 10].

Одной из наиболее научно обоснованной гипотез старения в настоящее время является предположение о том, что его причиной является нестабильность генома клетки [3]. Предполагаемые механизмы развития нестабильности генома в процессе старения включают двухцепочечные разрывы ДНК, укорочение теломер, снижение эффективности систем репарации и активацию мобильных элементов [4, 5]. В последнее время все возрастающее внимание отводится активации в геноме мобильных элементов [4, 6]. При этом отмечается, что данный процесс является самоподдерживающимся – экспрессия участков транспозонов приводит к их активации и увеличению числа, что, в свою очередь сопровождается повышением количества продуктов экспрессии [2, 3]. Принимая во внимание вышесказанное, вполне логичным представляется подход к коррекции возрастных изменений в клетках путем целевого «нокаута» транспозонов. Для этой цели наибольшее внимание привлекают SINE/Alu последовательности, так как их нокаут, как было показано в работе Wang J. С соавторами [7] позволяет восстановить функции «старых» стволовых клеток.

Целью настоящего исследования явилось определение, возможности, с использованием данного подхода, корректировать изменения физиологии фибробластов, возникающие в процессе старения человека.

Материалы и методы

Конструкция вектора

За основу генной конструкции был взят вектор, процесс создания которого и результативность применения подробно описаны в работе Wang [7]. Отличительной особенностью разработанного нами совместно с ООО «Уральская биомедицинская компания» генного конструкта заключается в том, что в качестве основы нами была выбрана плаزمид рSF-H1 (Oxford genetics Ltd's) а не лентивирус. Последнее обусловлено большей безопасностью (применительно к возможному клиническому использованию в дальнейшем) плазмид по сравнению с векторами на основе вирусов.

Культура клеток

Клетки фибробластического дифферона получены от пяти доно-

ров в возрасте 65–72 лет, подвергшихся хирургическим вмешательствам, с их добровольного письменного согласия.

Первичную культуру клеток фибробластического дифферона получали по способу получения культуры клеток кожи [8]. В дальнейшем клетки снимали с культуральной поверхности флаконов с использованием раствора Версена (Sigma) по стандартной методике. Снятые клетки помещали в 24-луночные планшеты. По достижении 70% конfluenceности клетки инкубировали в среде DMEM с добавлением 10% FBS, 10 нг/мл FGF, 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Sigma) и трансфецировали либо «пустой» плазмидой pSF-H1, либо плазмидой, содержащей последовательности, формирующие шпилечную РНК к продуктам экспрессии SINE/Alu («рабочая» плазида) с использованием набора Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) согласно протокола производителя. Клетки продолжали культивировать в среде DMEM с добавлением 10% FBS, 10 нг/мл FGF, 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 1 мкг/мл пурамицина (Sigma), поскольку в плазмиды в качестве дополнительной селективной метки был включен ген устойчивости к пурамицину. Смену среды производили каждые 3 дня. Об эффективности трансфекции судят по количеству живых клеток в среде.

Оценку жизнеспособности фибробластов проводили окраской клеток 0,4% раствором трипанового синего (Sigma). Окрашенные образцы исследовали под световым микроскопом в камере Горяева и подсчитывают окрашенные и неокрашенные клетки в количестве не менее 500 клеток в каждом образце, рассчитывая процент жизнеспособных клеток от общего количества подсчитанных клеток.

Специфическую функцию фибробластов оценивали по включению в макромолекулы меченых селективных предшественников синтеза ДНК (2^{14}C -тимидин), коллагена ($\text{L-U}^{14}\text{C}$ -пролин) и кислых ГАГов ($\text{D-6}^3\text{H}$ -глюкозамин гидрохлорид). Для оценки количества теломер использовали сайтспецифичный олигонуклеотидный зонд (CCСТАА)³ с включением в структуру зонда меченого по тритию дезоксицитидина (все радиофармпрепараты Amersham Pharmacia Biotech). Радионуклиды с активностью 37 кБк/мл среды вносили на 75 см² матрасы одновременно с $0,5 \times 10^6$ фибробластов из вторичной 30-ти суточной культуры. Эксперимент прерывали через трое суток культивирования, фибробласты снимали с флаконов раствором Версена по стандартной методике и подсчитывали на клеточном анализаторе. Оценку количества теломер выполняли методом гибридизации после выделения ДНК культи-

вированных клеток и отжига цепей. Полученные комплексы осаждали на нитроцеллюлозных фильтрах (Sartorius, Германия).

Для оценки синтетической активности по включению ^{14}C -тимидина клетки отмывали от свободной радиоактивности переосаждением в изотоническом растворе и трехкратно — этанолом. Гидролиз ДНК проводили 5% раствором муравьиной кислоты при нагревании с последующим упариванием и перерастворением в этаноле для подсчета радиоактивности.

С целью изучения синтеза коллагена, после удаления фибробластов 0,25% раствором трипсина, не повреждающим коллагеновые волокна, матрасы многократно отмывали от невключившегося меченого L-пролина. Адгезированные на пластике волокна двукратно обезвоживали пропанолом, а пролин и оксипролин экстрагировали с культуральной поверхности кислым этанолом при нагревании. Полученные экстракты упаривали и перед радиометрией перерастворяли в этаноле.

Применение глюкозамина, содержащего тритий в шестом положении, позволяет оценить синтез в культуре гидрофильных высокомолекулярных ГАГов (глюкуроновая кислота и хондроитин сульфат) и пренебречь возможностью его окисления (при окислении N- ^{63}N удаляется с образованием $^3\text{H}_2\text{O}$). После подсчета клеток культуру инкубировали в 5% растворе трипсина при 37°C для отделения связанных с ГАГами белков. Из экстракта высокополимерные ГАГи выделяли трехкратным переосаждением смесью этанол-эфир. Препарат ГАГов перерастворяли в воде и радиометрировали в гетерогенной системе с введением в сцинтилляционную жидкость детергента тритон X-100.

Подсчет радиоактивности производили в спирто-толуоловом сцинтиллаторе на жидкостном сцинтилляционном счетчике Бета-2 (эффективность счета по углероду — 98%, по тритию — 56%). Результаты выражали в беккерелях на 10^6 клеток.

Для исследования деструктивных потенциалов культивируемых фибробластов использовали наборы реагентов для количественного определения металлопротеиназы-1 (Cusabio) согласно протокола изготовителя. Полученные значения выражали в нанограммах на миллилитр культуральной среды

Результаты

Как следует из полученных данных (Таблица 1), доля жизнеспособных фибробластов, после их трансфекции, достаточно высока (96,4%) и воспроизводима (отклонение менее 3,5%).

Таблица 1

Результаты оценки жизнеспособности клеток с добавлением в среду культивирования пуромицина

Клетки	Доля жизнеспособных клеток, %
Фибробласты, трансфицированные «пустой» плазмидой	5,4±1,7
Фибробласты, трансфицированные «рабочей» плазмидой	89,4±2,7*

Таблица 2

Параметры культивированных фибробластов

Показатель	Фибробласты, трансфицированные «пустой» плазмидой	Фибробласты, трансфицированные «рабочей» плазмидой
Включение 2^{14}C -тимидина в ДНК клеток (Бк/ 10^6 кл)	66,6 ± 3,9	85,1 ± 7,7*
Включение (СССТАА) ³ в ДНК клеток (Бк/ 10^6 кл)	18,6 ± 0,7	26,9 ± 1,5*
Включение L- $U^{14}\text{C}$ -пролина в коллаген (Бк/ 10^6 кл/ 10 см^2)	71,9 ± 3,3	88,0 ± 6,6*
Включение D- 6^3H -глюкозамин гидрохлорида в высокомолекулярные ГАГи (Бк/ 10^6 кл)	5,7 ± 0,2	6,6 ± 0,3*
Концентрация металлопротеиназы-1 (нг/мл)	337 ± 26	247 ± 24*

* — статистически достоверные отличия от контрольной группы ($p < 0.05$).

Как следует из полученных данных (Табл. 2), трансфицированные «рабочей» плазмидой клетки отличаются от контрольной группы большей длиной теломер (на 45% по включению (СССТАА)³ в ДНК клеток), повышенным пролиферативным потенциалом трансфицированных клеток (на 28% по включению 2^{14}C -тимидина в ДНК по сравнению с контрольной группой), большей интенсивностью синтеза коллагена и глюкозамингликанов (на 22 и 16% соответственно) и снижением активности металлопротеиназ (на 26,7–27%).

Обсуждение результатов

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что трансфицированные рабочей плазмидой клетки обладают большим потенциалом в отношении синтеза ДНК и основных макромолекул соединительной ткани по сравнению с нетрансфицированными, и пониженной металлопротеиназной активностью.

По-видимому, нокаут Alu последовательностей приводит к изменению экспрессии генов, которые прямо или опосредованно контролируют эти процессы.

Вышесказанное предположение хорошо согласуется с данными литературы, свидетельствующими о том, что Alu последовательности тесно связаны с промоутерными последовательностями генов, которые контролируют метаболические, транспортные и сигнальные процессы [9]. В настоящее время не вызывает сомнений способность Alu последовательности влиять на экспрессию генов [4] и оказывать действие на посттранскрипционные процессы [4, 11].

Alu элементы содержат сайты связывания для комплекса ядерных гормонов и большого количества факторов транскрипции [5, 9]. Эти участки могут конкурировать за факторы транскрипции с промоторами генов или выступать промоторами для соседних генов [6].

С другой стороны, учитывая крайнюю неравномерность распределения этих мобильных элементов по геному человека (в основном они сосредоточены в области центромер 14, 16, и 21 хромосом и практически отсутствуют в хромосомах 4, 19, 20, X и Y), трудно объяснить полученные результаты исходя из предположения, что в результате их нокаута мы получили столь широкую картину изменения физиологии фибробластов.

Также следует принять во внимание, что это не единственные мобильные генетические элементы, предполагающие значимую роль в жизнедеятельности клетки.

С большей вероятностью, использованный нами подход затронул некоторые глубинные и пока неясные внутриклеточные процессы.

Несмотря на то, что полученные результаты вселяют оптимизм в отношении перспектив аутогенной клеточной терапии, требуются дополнительные исследования, которые необходимы прежде всего для понимания того, во что мы вмешиваемся и каковы будут последствия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Campisi J. Molecular mechanisms of intrinsic aging // *Ann. Dermatol. Venereol.* – 2002. – Vol. 129. – P. 1100
2. Glinsky G.V. Transposable Elements and DNA Methylation Create in Embryonic Stem Cells Human-Specific Regulatory Sequences Associated with Distal Enhancers and Noncoding RNAs. // *Genome Biol. Evol.* - 2015. - Vol. 7 (6). – P. 1432-1454
3. Macia A., Muñoz-Lopez M., Cortes J. L., Robert K. Hastings R.K, et al. Epigenetic Control of Retrotransposon Expression in Human Embryonic // *Stem Cells Mol. Cell. Biol.* – January 2011. – Vol. 31 (2). – P. 300-316
4. Chen J.-H., Hales C. N., Ozanne S. E. DNA damage, cellular senescence and organismal ageing: causal or correlative? // *Nucleic Acids Res.* – 2007– Vol. 35. – P. 7417–7428,
5. Maxwell P. H., Burhans W. C., Curcio M. J. Retrotransposition is associated with genome instability during chronological aging. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2011. – Vol. 108 – P. 20376–20381
6. Kaneko H., Dridi S., Tarallo V., Gelfand B.D., et al. DICER1 deficit induces Alu RNA toxicity in age-related macular degeneration. // *Nature.* – 2011. – Vol. 47. – P. 325–330
7. Wang J., Glenn J., Geesman S. et al Inhibition of activated pericentromeric SINE/Alu repeat transcription in senescent human adult stem cells reinstates self-renewal. // *Cell Cycle.* – 2011. – Vol. 10 (17), – P. 3016-30
8. Макеев О.Г., Зубанов П.С., Улыбин А.И. Способ получения культуры клеток кожи. // Патент РФ № 2345781 // Бюл. изобр. РФ № 4, 10.02.2009
9. Jenkins G. Molecular mechanisms of skin ageing. // *Mech. Ageing. Dev.* – 2002. – Vol. 123(7) – P. 801-10;
10. Sárdy M. Role of matrix metalloproteinases in skin ageing. // *Connect Tissue Res.* 2009 – Vol. 50(2) – P. 132-8
11. Vijg J., Suh Y. Genome instability and aging. // *Annu. Rev. Physiol.* – 2013.– Vol. 75/ – P. 645–668