

© КОНДРАТЬЕВА Е. В., АДИЛЬГЕРЕЕВА Э. П., АМЕЛИНА Е. Л., ТАБАКОВ В. Ю., АНУЧИНА А. А., УСТИНОВ К. Д., ЯСИНОВСКИЙ М. И., ВОРОНИНА Е. С., ЛАВРОВ А. В., СМИРНИХИНА С. А.

УДК: 602.9

DOI: 10.20333/2500136-2019-2-95-101

ПОЛУЧЕНИЕ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ИЗ ФИБРОБЛАСТОВ ПАЦИЕНТА С МУКОВИСЦИДОЗОМ

Е. В. Кондратьева¹, Э. П. Адильгереева¹, Е. Л. Амелина², В. Ю. Табаков¹, А. А. Анучина¹, К. Д. Устинов¹, М. И. Ясиновский¹, Е. С. Воронина¹, А. В. Лавров^{1,3}, С. А. Смирнихина¹

¹Медико-генетический научный центр, Москва 115522, Российская Федерация

²Научно-исследовательский институт пульмонологии, Москва 115682, Российская Федерация

³Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва 117997, Российская Федерация

Цель исследования. Разработка протокола получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) и создание линии ИПСК, полученной из клеток от пациента с муковисцидозом, вызванным гомозиготной мутацией F508del.

Материал и методы. ИПСК получали путем репрограммирования культивированных фибробластов кожи пациента с муковисцидозом с помощью вируса Сендай. Наличие мутации в гене CFTR в фибробластах и полученных ИПСК подтверждали методом секвенирования ДНК по Сэнгеру. Полученный клон ИПСК культивировали до стадии эмбрионидных телец и после спонтанной дифференцировки окрашивали иммуноцитохимически. Анализ экспрессии генов в полученной линии ИПСК проводили с помощью иммуноцитохимического окрашивания и полимеразной цепной реакции, сопряженной с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Для подтверждения отсутствия хромосомных перестроек проводили анализ кариотипа полученных ИПСК.

Результаты. Полученная линия ИПСК демонстрировала морфологию эмбриональных стволовых клеток. Клетки имели нормальный кариотип 46,XY, специфично окрашивались антителами на маркеры плюрипотентности (Oct4, Nanog, TRA-1-81 и SSEA-4) в иммуноцитохимическом анализе, а также демонстрировали экспрессию маркеров плюрипотентности (OCT4, NANOG и FOXD3) в ОТ-ПЦР. В культуре дифференцированных ИПСК выявлены клетки, положительно окрашенные антителами на маркеры трех зародышевых листков - эктодермы (b-III-тубулин), мезодермы (фибронектин) и энтодермы (α-фетопротеин).

Заключение. Таким образом, нами отработан протокол получения и характеристики ИПСК и создана линия ИПСК, а также подтверждена их функциональная и фенотипическая плюрипотентность.

Ключевые слова: индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, клеточное репрограммирование, фибробласты, муковисцидоз, вирус Сендай.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Кондратьева ЕВ, Адильгереева ЭП, Амелина ЕЛ, Табаков ВЮ, Анучина АА, Устинов КД, Ясиновский МИ, Воронина ЕС, Лавров АВ, Смирнихина СА. Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток из фибробластов пациента с муковисцидозом. *Сибирское медицинское обозрение.* 2019;(2):95-101. DOI: 10.20333/2500136-2019-2-95-101

RECEIVING INDUCED PLURIPOTENTIAL STEM CELLS FROM FIBROBLASTS OF PATIENTS WITH CYSTIC FIBROSIS

E. V. Kondrateva¹, E. P. Adilgereeva¹, E. L. Amelina², V. Yu. Tabakov¹, A. A. Anuchina¹, K. D. Ustinov¹, M. I. Yasinovsky¹, E. S. Voronina¹, A. V. Lavrov^{1,3}, S. A. Smirnikhina¹

¹Research Centre for Medical Genetics, Moscow 115522, Russian Federation

²Pulmonology Scientific Research Institute, Moscow 115682, Russian Federation

³Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow 117997, Russian Federation

The aim of the research is the development of protocol for receiving induced pluripotent stem cells (iPSCs) and the creation of line from iPSCs received from cells of patients with cystic fibrosis caused by homozygous mutation F508del.

Material and methods. iPSCs were received reprogramming cultured fibroblasts of a patient with cystic fibrosis using Sendai virus. Presence of CFTR gene mutations in fibroblasts and the obtained iPSCs were confirmed by Sanger DNA sequencing. The obtained iPSC clone was cultured till embryoid bodies stage and, after spontaneous differentiation, it was stained immunocytochemically. Analysis of gene expression in the obtained iPSC line was performed using immunocytochemical staining and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). To confirm the absence of chromosomal rearrangements, analysis of karyotype of the obtained iPSCs was performed.

Results. The obtained iPSC line demonstrated embryonic stem cells morphology. The cells had normal karyotype 46, XY, they were specifically stained by antibodies for pluripotency markers (Oct4, Nanog, TRA-1-81 and SSEA-4) in immunocytochemical analysis, also they demonstrated the expression of markers for pluripotency (OCT4, NANOG and FOXD3) in RT-PCR. Cells, positively stained with antibodies for markers of three germ layers - ectoderm (b-III-tubulin), mesoderm (fibronectin) and endoderm (α-fetoprotein), were detected in the culture of differentiated iPSCs.

Conclusion. Thus, a protocol for obtaining and characterizing iPSCs has been worked out, iPSC line has been created, and also their functional and phenotypic pluripotency has been confirmed.

Key words: induced pluripotent stem cells, cell reprogramming, fibroblasts, cystic fibrosis, Sendai virus.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest associated with the publication of this article.

Citation: Kondrateva EV, Adilgereeva EP, Amelina EL, Tabakov VYu, Anuchina AA, Ustinov KD, Yasinovsky MI, Voronina ES, Lavrov AV, Smirnikhina SA. Receiving induced pluripotent stem cells from fibroblasts of patients with cystic fibrosis. *Siberian Medical Review.* 2019;(2):95-101. DOI: 10.20333/2500136-2019-2-95-101

Муковисцидоз (МВ) является одним из самых распространённых наследственных заболеваний: по данным ВОЗ, частота заболевания в разных популяциях, нациях и этнических группах существенно варьирует, составляя в среднем 1 случай на 2000-2500 новорожденных у представителей белой расы. Данная патология обусловлена мутациями в гене *CFTR* (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, муковисцидозный трансмембранный регулятор проводимости), частота их носительства среди европеоидов достигает 1 на 25 человек [1]. Самой частой мутацией является F508del, ее частота достигает 85 % среди больных МВ [2]. В результате мутаций в гене *CFTR* нарушается транспорт ионов хлора и натрия через клеточную мембрану, что вызывает у пациента нарушения функционирования желёз внешней секреции, а наиболее распространённой формой МВ является лёгочная форма, при которой возникает секреторная недостаточность бронхиального дерева. В результате развивается мукостаз, нарушение вентиляции лёгких, что приводит к ослаблению неспецифического механизма защиты, присоединению респираторной инфекции и формированию множественных бронхоэктазов. Именно дыхательная недостаточность является причиной смерти подавляющего большинства детей и взрослых с МВ [3].

На сегодняшний день МВ, как и большинство других наследственных заболеваний, не имеет этиотропной терапии. Пациенты вынуждены на протяжении всей жизни принимать муколитики, антибиотики, следить за должным удалением мокроты и бороться с тяжёлыми обострениями болезни.

Между тем, в последние годы широко распространены и продолжают развиваться методы геномного редактирования, позволяющие корректировать мутации. Эти методы являются технологически не очень сложными, демонстрируют довольно высокую эффективность и позволяют получить стабильный результат. При этом патогенетические методы лечения подходят не всем пациентам, так как разработаны для лечения больных с определённым перечнем мутаций, в отличие от технологии геномного редактирования CRISPR/Cas9, которая является более универсальной.

Для разработки метода лечения МВ путем коррекции мутации в гене *CFTR* с помощью технологии CRISPR/Cas9 у человека теоретически можно использовать два подхода: *ex vivo* (забор клеток у пациента, их редактирование и последующая их аутологичная трансплантация) и *in vivo* (системное введение в организм человека компонентов для геномного редактирования). Чтобы отработать подходы к лечению, в первую очередь, необходимо получить индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) из фибробластов больных МВ, провести редактирование мутации и вызвать дифференцировку ИПСК, например, в клетки респираторного эпителия. В дифференцированных клетках можно показать восстановление функции канала *CFTR*, в отличие от ИПСК, в которых этот белок не экспрессируется.

В течение последнего десятилетия ученым уже неоднократно удавалось получить ИПСК из соматических клеток взрослого организма путем их репрограммирования до плюрипотентного состояния с помощью набора определенных транскрипционных факторов. Факторы Oct4, Sox2, Klf4 и c-Мyc являются классическими трансгенами и используются с 2006 года, когда С. Яманака и К. Такахаши впервые описали их необходимость и достаточность для индукции плюрипотентного состояния в мышинных эмбриональных фибробластах [4]. Позднее было показано, что та же самая комбинация факторов способна индуцировать плюрипотентное состояние в клетках человека [5].

Опубликовано множество протоколов, которые различаются по способу доставки трансгенов в клетки, условиям культивирования клеток в процессе репрограммирования, а также эффективности [6].

Одним из способов доставки факторов Яманаки (Oct4, Sox2, Klf4 и c-Мyc) является доставка с помощью лентивирусов. Были получены ИПСК с применением данного метода доставки трансгенов как на мышинных, так и на человеческих клетках *in vitro* [7, 8, 9]. Однако, лентивирусы, используемые в качестве способа доставки, обладают способностью интегрироваться в геном клетки и сохранять в дальнейшем транскрипционную активность в ИПСК [10], что делает лентивирусный метод небезопасным для использования. Подобное интегрирование может вызывать непредвиденные модификации структуры генома, приводить к развитию злокачественных новообразований.

В другом способе доставки трансгенов используются ретровирусные векторы [4, 11], однако они аналогично лентивирусам способны интегрироваться в геном клеток, и существуют исследования, показывающие, что трансгенные факторы начинали вновь экспрессироваться уже в дифференцированной клетке, полученной из ИПСК после репрограммирования с помощью ретровируса [10].

Были предприняты попытки получить стабильный, качественный, а главное – безопасный способ доставки факторов репрограммирования с помощью невирусных моделей [12]. Но до сих пор ещё не создан невирусный метод, удовлетворяющий условиям. Все попытки приводили к тому, что методика оказывалась или недостаточно эффективной, не позволяя клетке полноценно дедифференцироваться в плюрипотентное состояние, или слишком опасной и неконтрольной, что могло вызвать различные спонтанные мутации в клетках пациента.

Наконец, существует способ репрограммирования соматических клеток в ИПСК с помощью вируса Сендай – РНК-содержащего вируса, который не проникает в ядро клетки, и, следовательно, не встраивается в клеточный геном [13, 14, 15]. Репрограммирование клеток в ИПСК с использованием вируса Сендай достигается благодаря экспрессии факторов Яманаки, трансгены которых содержатся в векторных частицах, и является достаточно эффективным и безопасным.

Целью нашего исследования была разработка эффективного протокола получения ИПСК и получение линии ИПСК из клеток от пациента с муковисцидозом, вызванным гомозиготной мутацией F508del.

Материал и методы

Получение первичной культуры фибробластов

У пациента с муковисцидозом после подписания им формы информированного согласия в качестве анонимного участника исследования и донора биологических материалов проводили биопсию кожи со средней трети внутренней поверхности предплечья. Все услуги по культивированию и пробоподготовке были предоставлены Центром коллективного пользования «Биобанк» (ФГБНУ «МГНЦ», Москва, Россия). Первичную культуру фибробластов кожи получали из биопсийного материала с помощью разработанной процедуры подготовки культуры клеток фибробластов. Фибробласты изначально размножали в пролиферативной среде «Амниокар» (ПанЭко). Полученные культуры депонированы и доступны в ЦКП «Биобанк».

Подтверждение мутации

Из первичной культуры фибробластов и из культуры ИПСК выделяли геномную ДНК с помощью набора Quick-DNA Miniprep Kit (Zymo Research) и оценивали ее концентрацию с помощью набора Qubit dsDNA BR Assay Kit (Life Technologies) согласно инструкциям производителей. ПЦР-амплификацию продукта реакции проводили с помощью Taq-полимеразы и смеси dNTP (Евроген) в амплификаторе (Eppendorf) и пары специфических праймеров (см. табл.). ПЦР-продукты анализировали методом секвенирования ДНК по Сэнгеру.

Получение ИПСК с помощью вирусных векторов.

Первичную культуру фибробластов, замороженную на втором пассаже, размораживали в среде для культивирования фибробластов (состав: DMEM+GlutaMax (Life Technologies), 1 % смесь аминокислот MEM (Life Technologies), 5,5 мМ бета-меркаптоэтанол (Sigma-Aldrich), пенициллин-стрептомицин (50 ЕД/мл; 50 мкг/мл) (ПанЭко)) с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки (FBS) (Hyclone) и засевали в культуральные флаконы 25 см² (Costar). После достижения клетками конфлюэнтности 95-100 % их пересевали в 6-луночные культуральные планшеты (Costar) в плотности 20-80 тыс. клеток на одну лунку. Репрограммирование проводили с использованием набора CytoTune™ -iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit (Thermo Fisher Scientific) согласно протоколу производителя. Клетки культивировали в среде для культивирования фибробластов с добавлением 10% FBS. На 8 день после репрограммирования клетки пересевали в культуральные планшеты (Costar), предварительно покрытые витронектином (Life Technologies) согласно протоколу производителя. Через сутки после посева клетки переводили на среду Essential 8™ Medium (Thermo Fisher Scientific). На 10-12 день наблюдалось появление первых колоний. К 28-му дню после репрограммирования колонии выделяли механически и пересевали.

Иммуноцитохимическое окрашивание

В иммуноцитохимическом анализе экспрессии маркеров SSEA4, OCT4, SOX2, NANOG, TRA-1-60 использовали мышинные моноклональные антитела против SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81 (все Thermo Fisher Scientific), SOX2 (Abcam), кроличьи поликлональные антитела против OCT4 (Abcam) и против NANOG (Thermo Fisher Scientific), а также вторичные противомышинные и противокроличьи (все Invitrogen) антитела согласно инструкциям производителей. Иммунофлуоресценцию регистрировали с помощью флуоресцентного микроскопа Axio VERT A1 (Zeiss) и программного обеспечения ZEN.

Полимеразная цепная реакция,

сопряженная с обратной транскрипцией

Тотальную РНК выделяли из клеток с помощью набора RNeasy Plus mini kit (Qiagen) и оценивали ее концентрацию с помощью набора Qubit RNA BR Assay Kit (Life Technologies) согласно инструкциям производителей. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием случайных шестинуклеотидных праймеров (ДНК-Синтез), обратной транскриптазы М-MLV (Promega), ингибитора рибонуклеаз (Promega), смеси нуклеотидов (Fermentas) согласно инструкциям производителей, используя 1 мкг тотальной РНК на одну реакцию. ПЦР-амплификацию продуктов реакции проводили с помощью Taq-полимеразы и смеси dNTP (Евроген) в амплификаторе (Eppendorf). Список использованных праймеров, специфичных для генов OCT4, NANOG и FOXD3, приведен в таблице (см. выше). ПЦР-продукты анализировали путем электрофореза ДНК в 1,5 % агарозном геле.

Таблица

Список использованных праймеров

Table

List of primers used

Маркеры плюрипотентности		Длина продукта, п.о.
OCT4_F	CGACCATCTGCCGCTTTGAG	588
OCT4_R	CCTAGCTCCTCCCTCCCTGTC	
NANOG_F	CAGCCCTGATTCTCCACCACTCC	343
NANOG_R	TGGAAGGTTCCAGTCGGGTTACC	
FOXD3_F	CAAGCCCAAGAACAGCCTAGTGAA	203
FOXD3_R	TGACGAAGCAGTCGTTGAGTGAGA	
Гены домашнего хозяйства		
B2M_F	CTGCCGTGTGAACCATGTGA	103
B2M_R	CAATCCAAATGCGGCATCTTC	
GAPDH_F	GCTCTCTGCTCCTCTGTTTC	115
GAPDH_R	ACGACCAAATCCGTTGACTC	
Фрагмент гена CFTR для секвенирования и подтверждения мутации		
CFTR_508_F	TGCATAGCAGAGTACCTGAAACAGGA	503
CFTR_508_R	TTGATCCATTACAGTAGCTTACCCA	

Кариотипирование

Анализ кариотипа полученных ИПСК проводили методом GTG-дифференциального окрашивания в соответствии со стандартными цитогенетическими протоколами на основе Международной системы цитогенетической номенклатуры человека (2016 г.). Высушенные на воздухе препараты метафазных хромосом выдерживали несколько дней при комнатной температуре. Препараты обрабатывали 0,05 % трипсином (Hyclone) в течение 1-5 минут при комнатной температуре, промывали фосфатным буфером (ПанЭко). Затем препараты окрашивали в красящем 5 % растворе Гимза (ПанЭко) в течение 1-5 минут, промывали дистиллированной водой и высушивали при комнатной температуре, после чего проводили микроскопический анализ.

Формирование и культивирование эмбрионидных телец

(спонтанная дифференцировка ИПСК)

Колонии ИПСК снимали раствором Версена (ПанЭко) по стандартному протоколу, диссоциировали на фрагменты в 1 мл среды TeSR-E8 (StemCell Technologies) с 5 мкМ ROCK-ингибитора Y27632 (StemCell Technologies) и переносили в 6-луночный планшет с предельно низкой адгезией Corning® Costar® Ultra-Low Attachment 6-well plate (Corning).

Через 3 дня среду заменяли на свежую, состоящую из 1/2 объема среды TeSR-E8 и 1/2 объема ES-среды (состав: DMEM/F12 (Hyclone), 20 % KO Serum replacement (Thermo Fisher Scientific), 2 мМ L-глутамин (Hyclone), 0,1 мМ β-меркаптоэтанол (Sigma-Aldrich), 1% смесь аминокислот (Hyclone), пенициллин-стрептомицин (50 ЕД/мл; 50 мкг/мл) (ПанЭко)). Еще через 3 дня заменяли половину объема среды в лунках на среду для культивирования эмбрионидных телец (EB-среда), состоящую из 1/2 объема ES-среды и 1/2 объема среды для фибробластов без FBS. Далее смену 1/2 объема среды в лунке проводили раз в 2-3 дня в течение 14 дней, при этом вводили FBS (Hyclone) и при каждой последующей смене постепенно увеличивали его содержание в свежей среде, начиная с 1 % и заканчивая 10 % от общего объема среды.

На 16-й день эмбрионидные тельца аккуратно собирали в стерильные пластмассовые наконечники (ULPlast) с помощью автоматических пипеток (Thermo Fisher Scientific) и переносили на покрытые желатином (Sigma-Aldrich) 60-мм чашки Петри (SPL Life Sciences) в среду для культивирования эмбрионидных телец с добавлением 10 % FBS. Эмбрионидные тельца прикреплялись к желатиновой подложке, начиналась миграция клеток из эмбрионидных телец на поверхность чашки.

Через 16-20 дней образовывались обширные области дифференцированных клеток. На 30-й день культивирования клетки фиксировали в 4 % параформальдегиде (Sigma-Aldrich) и проводили иммуноцитохимический анализ на маркеры клеток, принадлежащих трём зародышевым листкам. Для анализа использовали мышинные моноклональные антитела против β-тубулина и α-фетопротейна и кроличье поликлональное антитело против фибронектина (все Abcam), а также вторичные противомышинные и противокроличьи (все Invitrogen) антитела согласно инструкциям производителей.

Результаты и обсуждение

Для разработки метода лечения МВ с помощью технологии геномного редактирования CRISPR/Cas9 нами было запланировано получение ИПСК из фибробластов пациента с МВ. Для начала мы получили первичную культуру фибробластов кожи из биопсийного материала от пациента с МВ. Далее мы подтвердили методом секвенирования ДНК по Сэнгеру наличие у пациента гомозиготной мутации F508del в гене CFTR (рис. 1).



Рисунок 1. Мутация F508del в гене CFTR в ДНК, выделенной из фибробластов пациента, подтверждена путем секвенирования по Сэнгеру.
Figure 1. F508del mutation in CFTR DNA gene, received from patient's fibroblasts, confirmed by Sanger sequencing.

Из целого ряда способов репрограммирования клеток, которые существуют на сегодняшний день, мы выбрали методику доставки трансгенов в ИПСК с помощью вируса Сендай, который показал свою эффективность и безопасность, поскольку не встраивается в клеточный геном. Репрограммирование клеток в ИПСК в данном случае достигается благодаря экспрессии факторов Яманаки, трансгены которых содержатся в векторных частицах. Через две недели после заражения мы наблюдали появление колоний и постепенное их увеличение к концу месяца (рис. 2). Эффективность репрограммирования, которую рассчитывали как отношение числа полученных колоний к числу клеток, подвергавшихся заражению, составила 0,2 %.

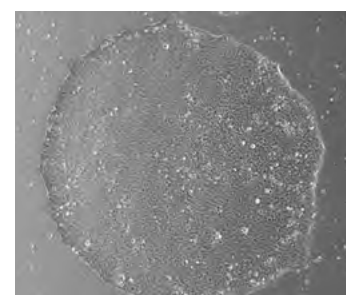


Рисунок 2. Морфология колонии ИПСК. Увеличение 10X.
Figure 2. Morphology of iPSC colony. 10X increase.

В полученных ИПСК мы также подтвердили наличие гомозиготной мутации F508del в гене *CFTR* методом секвенирования ДНК по Сэнгеру (рис. 3).

Для подтверждения плюрипотентности полученных ИПСК проводили иммуноцитохимический анализ экспрессии маркеров, характерных для плюрипотентных клеток (SSEA4, OCT4, SOX2, NANOG, TRA-1-60). Результаты свидетельствуют об экспрессии полученными ИПСК всех перечисленных маркеров. Кроме того, подтверждение экспрессии маркеров плюрипотентности *OCT4*, *NANOG* и *FOXD3* проводили путем ОТ-ПЦР. Результаты свидетельствуют об экспрессии полученными ИПСК всех перечисленных маркеров и показаны на рисунке 4. В качестве отрицательного контроля использовали фибробласты кожи, из которых получали ИПСК. На рисунке 4 видно, что маркеры плюрипотентности в них не экспрессируются.

В ходе репрограммирования происходят значительные изменения хроматина, которые могут приводить к хромосомным перестройкам. Для подтверждения их отсутствия был проведен анализ кариотипа полученных ИПСК методом GTG-дифференциального окрашивания. Отобранная линия клеток имеет нормальный мужской кариотип 46,XY (рис. 5).

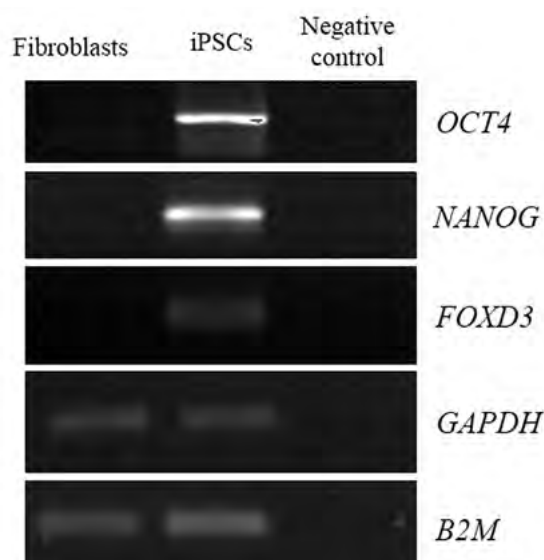


Рисунок 4. Экспрессия маркеров плюрипотентности *OCT4*, *NANOG* и *FOXD3* в ОТ-ПЦР.
Figure 4. Expression of *OCT4*, *NANOG* and *FOXD3* pluripotency markers in RT-PCR.

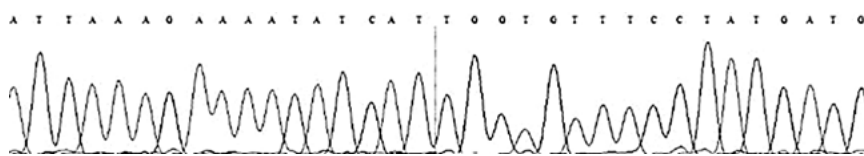


Рисунок 3. Мутация F508del в гене *CFTR* в ДНК, выделенной из ИПСК пациента, подтверждена путем секвенирования по Сэнгеру.
Figure 3. F508del mutation in *CFTR* DNA gene, received from patient's iPSC, confirmed by Sanger sequencing.



Рисунок 5. Кариотип ИПСК.
Figure 5. iPSC Karyotype.

Для функционального подтверждения плюрипотентного статуса репрограммированных клеток проводили анализ на формирование клетками эмбрионидных тел и дифференцировку в клетки, принадлежащие трем зародышевым листкам. К 20-30-му дню мы наблюдали формирование эмбрионидных тел. При иммуноцитохимическом анализе в культуре спонтанно дифференцировавшихся клеток наблюдалась экспрессия маркеров, принадлежащих всем трём зародышевым листкам. Таким образом, полученные репрограммированные клетки проявляли функциональные свойства плюрипотентных клеток, т. е. были способны дифференцироваться в клетки-производные трех зародышевых листков.

Заключение

Учитывая распространенность МВ во всем мире, моногенность этого заболевания и успехи работ в области геномного редактирования в последние годы, представляется крайне актуальной и перспективной разработка этиотропного лечения данного заболевания. Наши исследования сосредоточены на самой распространенной мутации в гене *CFTR* – мутации F508del. Для разработки метода коррекции мутации с помощью технологии CRISPR/Cas9 у человека в первую очередь нам было необходимо получить

индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) из фибробластов больных МВ. С этой целью мы отработали протокол получения и характеристики ИПСК с помощью РНК-содержащего вируса Сендай. В результате мы получили колонии ИПСК, подтвердили их функциональную (формирование эмбрионных тел и дифференцировка в клетки трех зародышевых листков) и фенотипическую (экспрессия маркеров) плюрипотентность. Далее эти клетки могут быть использованы для редактирования мутации и их дифференцировки, например, в клетки респираторного эпителия.

Благодарности

Получение и характеристика ИПСК выполнены за счет средств Российского научного фонда (Соглашение № 17-75-20095); в рамках государственного задания Минобрнауки России: получение культуры фибробластов от больного МВ и подтверждение мутации; работа поддержана Программой фундаментальных исследований президиума РАН «Фундаментальные исследования для биомедицинских технологий» 2018-2020 гг.: раздел «Введение».

Мы благодарим д.б.н., проф. Сергея Львовича Киселева и сотрудников возглавляемой им лаборатории эпигенетики (ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН) за помощь в получении и характеристике ИПСК.

Литература/ References

1. Nazareth D, Walshaw M. Coming of age in cystic fibrosis - transition from paediatric to adult care. *Clinical Medicine*. 2013;13(5):482–6. DOI: 10.7861/clinmedicine.13-5-482
2. Amaral MD. Novel personalized therapies for cystic fibrosis: treating the basic defect in all patients. *Journal of Internal Medicine*. 2015;277(2):155–166. DOI: 10.1111/joim.12314
3. Burney T, Davies J. Gene therapy for the treatment of cystic fibrosis. *The Application of Clinical Genetics*. 2012;(5):29–36. DOI: 10.2147/TACG.S8873
4. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4): 663–76. DOI: 10.1016/j.cell.2006.07.024
5. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131(5): 861–72. DOI: 10.1016/j.cell.2007.11.019
6. Maherali N, Hochedlinger K. Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2008;3(6):595–605. DOI: 10.1016/j.stem.2008.11.008
7. Новосадова ЕВ, Некрасов ЕД, Честков ИВ, Сурдина АВ, Васина ЕМ, Богомазова АН, Мануилова ЕС, Арсеньева ЕЛ, Симонова ВВ, Коновалова ЕВ, Федотова ЕЮ, Абрамычева НЮ, Хаспеков ЛГ,

Гривенников ИА, Тарантул ВЗ, Киселев СЛ, Иллариошкин СН. Платформа для изучения молекулярных и клеточных механизмов болезни Паркинсона на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека. *Современные технологии в медицине*. 2016; 8(4): 157–166. [Novosadova EV, Nekrasov ED, Chestkov IV, Surdina AV, Vasina EM, Bogomazova AN, Manuilova ES, Arsenyeva EL, Simonova VV, Konovalova EV, Fedotova EYu, Abramychева NYu, Khaspekov LG, Grivennikov IA, Tarantul VZ, Kiselev SL, Illarioshkin SN. A platform for studying of molecular and cellular mechanisms of Parkinson's disease based on human induced pluripotent stem cells. *Modern Technologies in Medicine*. 2016;8(4):157–166. (In Russian)] DOI: <http://doi.org/10.17691/stm2016.8.4.20>

8. Blleloch R, Venere M, Yen J, Ramalho-Santos M. Generation of induced pluripotent stem cells in the absence of drug selection. *Cell Stem Cell*. 2007;1(3):245–247. DOI:10.1016/j.stem.2007.08.008

9. Al Abbar A, Nordin N, Ghazalli N, Abdullah S. Generation of induced pluripotent stem cells by a polycistronic lentiviral vector in feeder- and serum- free defined culture. *Tissue Cell*. 2018;(55):13–24. DOI: 10.1016/j.tice.2018.09.004.

10. Медведев СП, Шевченко АИ, Закиян СМ. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки: проблемы и перспективы применения в заместительной клеточной терапии. *Acta naturae (русскаяязычная версия)*. 2010. 2 (5):18–28. [Medvedev SP, Shevchenko AI, Zakian SM. Induced Pluripotent Stem Cells: Problems and Advantages when Applying them in Regenerative Medicine. *Acta Naturae*. 2010;2(5):18–28. (In Russian)]

11. Медведев СП, Малахова АА, Григорьева ЕВ, Шевченко АИ, Дементьева ЕВ, Соболев ИА, Лебедев ИН, Шилов АГ, Жимулев ИФ, Закиян СМ. Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток из фибробластов кожи плода человека. *Acta Naturae (русскаяязычная версия)*. 2010;2(2):108–110. [Medvedev SP, Malakhova AA, Grigor'eva EV, Shevchenko AI, Dementyeva EV, Sobolev IA, Lebedev IN, Shilov AG, Zhimulev IF, Zakian SM. Derivation of induced pluripotent stem cells from fetal human skin fibroblasts. *Acta Naturae (English edition)*. 2010;2(2):108–110. (In Russian)]

12. Behringer R, Gertsenstein M, Nagy KV, Nagy A. Reprogramming mouse fibroblasts with piggyBac transposons. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2017;(10):pdb.prot092627. DOI: 10.1101/pdb.prot092627

13. Fusaki N, Ban H, Nishiyama A, Saeki K Hasegawa M. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proceedings of the Japan Academy, Series B, Physical and Biological Sciences*. 2009;85(8):348–362. DOI:10.2183/pjab.85.348

14. Корель АВ, Кузнецов СБ. Направленное перепрограммирование соматических клеток: преимущества и недостатки индуцированных плюрипотентных

стволовых клеток (обзор литературы). *Сибирский научный медицинский журнал*. 2018;38(4):21-29. [Korel AV, Kuznetsov SB. Directed re-programming of somatic cells: advantages and limitations of induced pluripotent stem cells (review). *Siberian Scientific Medical Journal*. 2018;38(4):21-29. (In Russian)] DOI: 10.15372/SSMJ20180403

15. Haridhasapavalan KK, Borgohain MP, Dey C, Saha B, Narayan G, Kumar S, Thummer RP. An insight into non-integrative gene delivery approaches to generate transgene-free induced pluripotent stem cells. *Gene*. 2018;686:146-159. DOI: 10.1016/j.gene.2018.11.069

Сведения об авторах

Кондратьева Екатерина Владимировна, научный сотрудник, Медико-генетический научный центр; адрес: Российская Федерация, 115522, Москва, ул. Москворечье, д. 1; тел.: +7(921)6539595; e-mail: ekaterina.kondratyeva@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-0770-2569>

Адилгереева Эльмира Пайзутдиновна, научный сотрудник, Медико-генетический научный центр; адрес: Российская Федерация, 115522, Москва, ул. Москворечье, д. 1; тел.: +7(968)6195376; e-mail: elmira5376@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-6440-0500>

Амелина Елена Львовна, к.м.н., Научно-исследовательский институт пульмонологии; адрес: Российская Федерация, Москва, Ореховый бульвар, д. 28; тел.: +7(495)3956393; e-mail: eamelina@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5356-9415>

Табакос Вячеслав Юрьевич, к.б.н., Медико-генетический научный центр; адрес: Российская Федерация, 115522, Москва, ул. Москворечье, д. 1; тел.: +7(499) 6127974; e-mail: vyutab@yandex.ru

Анучина Арина Артуровна, младший научный сотрудник, Медико-генетический научный центр; адрес: Российская Федерация, 115522, Москва, ул. Москворечье, д. 1; тел.: +7(916)3960574; e-mail: arinate@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1820-5461>

Устинов Кирилл Дмитриевич, лаборант-исследователь, Медико-генетический научный центр; адрес: Российская Федерация, 115522, Москва, ул. Москворечье, д. 1; тел.: +7(999)9238824; e-mail: kirillustinov1995@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-1780-8343>

Ясиновский Матвей Ильич, лаборант-исследователь, Медико-генетический научный центр; адрес: Российская Федерация, 115522, Москва, ул. Москворечье, д. 1; тел.: +7(916)6089186; e-mail: myasinovski@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3122-8054>

Воронина Екатерина Сергеевна, к.м.н., Медико-генетический научный центр; адрес: Российская Федерация, 115522, Москва, ул. Москворечье, д. 1; тел.: +7(499)6129889; e-mail: esvoronina@med-gen.ru

Лавров Александр Вячеславович, к.м.н., Медико-генетический научный центр; адрес: Российская Федерация, 115522, Москва, ул. Москворечье, д. 1; Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова; адрес: 117997 Российская Федерация, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1; тел.: +7(916)1139047; e-mail: alexandervlavrov@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-4962-6947>

Смирнихина Светлана Анатольевна, к.м.н., Медико-генетический научный центр; адрес: Российская Федерация, 115522, Москва, ул. Москворечье, д. 1; тел.: +7(926)5922603; e-mail: smirnikhinas@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-1558-3048>

Author information

Ekaterina V. Kondrateva, research scientist, Research Centre for Medical Genetics; Address: 1, Moskvorechie Str., Moscow, Russian Federation 115522; Phone: +7(921)6539595; e-mail: ekaterina.kondratyeva@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-0770-2569>

Elmira P. Adilgerееva, research scientist, Research Centre for Medical Genetics; Address: 1, Moskvorechie Str., Moscow, Russian Federation 115522; Phone: +7(968)6195376; e-mail: elmira5376@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-6440-0500>

Elena L. Amelina, Cand.Med.Sci., Pulmonology Scientific Research Institute; Address: 28, Orechovy Boulevard, Moscow, Russian Federation 115682; Phone: 7(495)3956393; e-mail: eamelina@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5356-9415>

Vyacheslav Yu. Tabakov, Cand.Biol.Sci., Research Centre for Medical Genetics; Address: 1, Moskvorechie Str., Moscow, Russian Federation 115522; Phone: +7(499) 6127974; e-mail: vyutab@yandex.ru

Arina A. Anuchina, junior research scientist, Research Centre for Medical Genetics; Address: 1, Moskvorechie Str., Moscow, Russian Federation 115522; Phone: +7(916)3960574; e-mail: arinate@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1820-5461>

Kirill D. Ustinov, laboratory assistant, Research Centre for Medical Genetics; Address: 1, Moskvorechie Str., Moscow, Russian Federation 115522; Phone: +7(999)9238824; e-mail: kirillustinov1995@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-1780-8343>

Matvey I. Yasinovskiy, laboratory assistant, Research Centre for Medical Genetics; Address: 1, Moskvorechie Str., Moscow, Russian Federation 115522; Phone: +7(916)6089186; e-mail: myasinovski@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3122-8054>

Ekaterina Sergeevna Voronina, Cand.Med.Sci., Research Centre for Medical Genetics; Address: 1, Moskvorechie Str., Moscow, Russian Federation 115522; Phone: +7(499)6129889; e-mail: esvoronina@med-gen.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5789-0927>

Alexander V. Lavrov, Cand.Med.Sci., Research Centre for Medical Genetics; Address: 1, Moskvorechie Str., Moscow, Russian Federation 115522; Pirogov Russian National Medical Research Medical University; Address: 1, Ostrovityanova Str., Moscow, Russian Federation, 117997; Phone: +7(916)1139047; e-mail: alexandervlavrov@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-4962-6947>

Svetlana A. Smirnikhina, Cand.Med.Sci., Research Centre for Medical Genetics; Address: 1, Moskvorechie Str., Moscow, Russian Federation 115522; Phone: +7(926)5922603; e-mail: smirnikhinas@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-1558-3048>

Поступила 27.12.2018 г.

Принята к печати 13.02.2019 г.

Received 27 December 2018

Accepted for publication 13 February 2019