

УДК 576.524

## ПРОБЛЕМА ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И АПОПТОЗА ПРИ КРИОХРАНЕНИИ КЕРАТИНОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА В СУСПЕНЗИИ

© 2021 г. А. Н. Попова<sup>а, \*</sup>, Е. А. Воротеляк<sup>а, б, \*\*</sup><sup>а</sup>Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия<sup>б</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, Москва, 119234 Россия

\*e-mail: popova.anna.n@gmail.com

\*\*e-mail: vorotelyak@yandex.ru

Поступила в редакцию 07.03.2021 г.

После доработки 25.03.2021 г.

Принята к публикации 30.03.2021 г.

Криохрани́ение кератиноцитов человека — обязательный этап создания эпидермального эквивалента кожи. Однако переводя клетки в суспензию и замораживая их, мы сталкиваемся с проблемой активации терминальной дифференцировки и апоптоза в кератиноцитах, что приводит к потере стволовых и прогениторных клеток в культуре. При разрыве связи между  $\beta 1$ -интегрином и внеклеточным матриксом в момент перевода клеток в суспензию происходит практически одновременное включение сигнального пути PI3K/Akt, стимулирующего дифференцировку, и апоптотического пути Caspase-8. Мы предположили, что замедляя процессы терминальной дифференцировки разными путями — добавляя растворимый фибронектин, а также ингибиторы PI3-kinase и Caspase-8 в среду для разморозки — возможно минимизировать массивные потери кератиноцитов и, в первую очередь, стволовых клеток после криохранения кератиноцитов в суспензии.

*Ключевые слова:* кератиноциты, криохрани́ение, дифференцировка, апоптоз

DOI: 10.31857/S0475145021040066

Поводом к написанию данного обзора послужила для нас необходимость сохранения стволовых клеток (СК) после криохранения кератиноцитов в суспензии. Это важно, в частности, когда речь идет о применении клеток в составе биомедицинских клеточных продуктов для регенеративной медицины. Криохрани́ение культур кератиноцитов дает возможность планирования хирургических вмешательств, накопления материала для последующих операций, проведения контроля качества, транспортировки полученных тканевых эквивалентов (Jackson et al., 2014). Данных о применении культивированных кератиноцитов человека, замороженных в суспензии, мало, но при этом показано, что жизнеспособность клеток после заморозки в суспензии и в монослое примерно одинакова при существенно более высокой сложности процедуры хранения в монослое (Pasch et al., 2000). Кроме того, доказано, что некоторые протоколы криохранения стимулируют пролиферативный потенциал клеток. Предположительно, это связано с селекцией наиболее устойчивых и быстро пролиферирующих кератиноцитов (Naaldijk et al., 2016). Сохранение недифференцированного фенотипа культивированных кератиноцитов кожи и роговицы после криоконсервации играет немало-

важную роль для позитивного эффекта трансплантации у ожоговых пациентов (De Luca et al., 2006; Jackson et al., 2017). Так, высокий процент низкодифференцированных кератиноцитов в составе трансплантата при лечении пациентов с лимбально-клеточной недостаточностью ожоговой этиологии приводит к значимому улучшению клинических результатов (Rama et al., 2010). Одновременное сохранение недифференцированного фенотипа и высокого пролиферативного потенциала в культуре кератиноцитов необходимо для формирования многослойного пласта кератиноцитов, в котором достигнут баланс между пролиферацией и дифференцировкой (Metral et al., 2017). Хранение кератиноцитов также необходимо в работе клеточных банков и коллекций клеточных культур. Поскольку популяция первичных кератиноцитов гетерогенна и содержит клетки разного уровня дифференцировки, в том числе эпидермальные стволовые, для успешной рекультивации после разморозки и ведения культуры критическим является сохранения пула стволовых и прогениторных клеток.

Хранение кератиноцитов в суспензии зачастую представляет собой проблему, поскольку жизнеспособность и степень дифференцировки

этих клеток строго зависят от наличия контактов с субстратом. Таким образом, обычные для других клеток потери, вызванные повреждающим действием криохранения, усугубляются индукцией дифференцировочных процессов, которые в случае кератиноцитов означают выход из клеточного цикла и последующую гибель. Существует ряд концепций эффективного криохранения (Woelders, 2004; Muller, 2004; Meryman, 2007; Rao, 2012; Averill-Bates, 2014), однако очевидно, что для кератиноцитов одним из основных условий успешного выхода после заморозки является быстрое восстановление межклеточных и клеточно-матриксных контактов.

В нашей работе мы сталкиваемся с тем, что клетки, вышедшие живыми после криохранения в суспензии (окраска трипановым синим), оказываются неспособны прикрепиться к матриксу или открепляются от него в течение первых трех суток. Обращает на себя внимание тот факт, что количество прикрепившихся клеток зависит от состава внеклеточного матрикса (ВКМ) и от плотности посева кератиноцитов (неопубликованные данные). При этом не все клетки гибнут — продолжит кератиноцит пролиферировать или перейдет к дифференцировке либо апоптозу, как известно, напрямую зависит от количества  $\beta 1$ -интегрина на его мембране (Tiberio et al., 2002). Так как сигналинг от интегринных рецепторов является ключевым условием выживания клетки (Pozzi et al., 1998), мы рассмотрим здесь  $\beta 1$ -интегрин как узловой элемент, который через взаимодействие с различными лигандами создает систему, необходимую для сохранения пролиферативной активности клеток и интегрирует пути апоптоза и дифференцировки кератиноцитов. В данном случае важно понять, как можно минимизировать массивные потери кератиноцитов и, в первую очередь, СК после криохранения кератиноцитов в суспензии. Мы рассмотрим различные варианты воздействия на молекулу  $\beta 1$ -интегрина, чтобы определить, насколько разными могут быть механизмы и последствия такого воздействия, и какие воздействия можно оказывать для сохранения жизнеспособности кератиноцитов после травмы криохранения.

Роль межклеточных и клеточно-матриксных контактов в поддержании пролиферации и сохранении СК давно изучается. Ключевую роль в процессе дифференцировки кератиноцитов играет ERK-МАРК сигнальный путь (Zhu et al., 1999; Levy et al., 2000; Naase et al., 2001; Evans et al., 2003). Доказано, что система  $\beta 1$ -интегрин—МАРК *in vitro* участвует в поддержании СК эпидермиса в недифференцированном состоянии. При нарушении сигналинга от интегринных рецепторов, в частности от  $\beta 1$ , этот баланс может быть нарушен. Так, трансфекция культуры человеческих кератиноцитов мутантным  $\beta 1$ -интегрином (доминантная негатив-

ная мутация), уменьшая экспрессию  $\beta 1$  на поверхности клеток, приводит к снижению клеточной адгезии и супрессии МАРК пути, что является стимулом к дифференцировке СК (Zhu et al., 1999).

Кроме того, доказано, что процесс пролиферации и дифференцировки напрямую зависит от взаимодействия  $\beta 1$ -интегрин с рецепторами к факторам роста. Известно, что один из основных путей влияния интегринных рецепторов к факторам роста — процесс транзактивации. Рецепторы к эпидермальному фактору роста (EGFR), тромбоцитарному фактору роста (PDGFR), фактору роста эндотелия сосудов (VEGFR) и др. активируются в результате связывания интегринных рецепторов с молекулами ВКМ (Moro et al., 1998; Soldi et al., 1999; Danilkovitch-Miagkova et al., 2000; Miranti et al., 2002). Обратное тоже справедливо, и рецепторы к факторам роста способны к транзактивации интегринных рецепторов (Bagutti et al., 1996; Grassian et al., 2011). Активация EGFR, например, приводит к повышению экспрессии  $\beta 1$  и наоборот (Wang et al., 1998). В работе Багутти (Bagutti et al., 2001) авторы исследовали роль различных факторов в процессе дифференцировки эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) мыши в эпидермальном направлении. Они показали, во-первых, что ни контакт с базальной мембраной, ни межклеточные взаимодействия с эпидермальными кератиноцитами так не стимулировали ЭСК к дифференцировке, как сокультивирование их с фибробластами, синтезирующими в среду факторы роста. Кроме того, они обнаружили, что ЭСК, полученные путем трансфекции вектором, блокирующим ген  $\beta 1$ -интегрин, обладали меньшей чувствительностью к факторам роста фибробластов (aFGF, bFGF), фактору роста кератиноцитов (KGF), трансформирующему фактору роста (TGF $\alpha$ ), чем ЭСК дикого типа, и нуждались в их более высокой концентрации в культуральной среде для начала дифференцировки.

Таким образом, сигнал от интегринного  $\beta 1$ , связанного с ВКМ, а кроме того с рецепторами к факторам роста, необходим для сохранения баланса между пролиферацией и дифференцировкой. При этом отсутствие сигнала от  $\beta 1$ -интегрин, связанного с матриксом, приводит к бесконтрольной пролиферации, что и наблюдается в ряде злокачественных опухолей, которые даже при потере контакта с белками матрикса продолжают пролиферировать (Hanahan et al., 2000; Reginato et al., 2003).

Одна из ключевых проблем криохранения кератиноцитов — перевод их в суспензию. Давно известно, что переход нормальных кератиноцитов в суспензию сопровождается началом их дифференцировки (Watt et al., 1993). Показано, что кератиноциты в суспензии начинают активно син-

тезировать маркер терминальной дифференцировки лорикрин, и через 24 ч уже 100% клеток лорикрин-позитивны. Дифференцировку можно избежать, если клетки в суспензии начнут формировать связи между  $\beta 1$ -интегрином и растворимым фибронектином, добавленным в культуральную среду. Таким образом, удержание в недифференцированном состоянии напрямую зависит от наличия сигнала от  $\beta 1$ -интегрина, связанного с фибронектином. Кроме этого, показано, что ламинин V и коллаген IV также образуют связи с  $\beta 1$ -интегрином, но в отсутствие фибронектина не способны останавливать процесс дифференцировки (Watt et al., 1993).

Кроме того, перевод кератиноцитов в суспензию может сопровождаться также и апоптозом — апоптозом, вызванным откреплением клеток от матрикса. Данный механизм описан в работе Реджинато (Reginato et al., 2003), авторы которой установили, что сигнал от интегрин, связанного с белками матрикса, влияет на сохранение экспрессии EGFR (рецептор одного из основных митогенов) кератиноцитов, находящихся в суспензии. Было показано, что присутствие в суспензии молекул ВКМ (Matrigel) сохраняет экспрессию EGFR на определенном уровне, при этом блокирование  $\beta 1$ -интегрин моноклональными антителами приводит к снижению уровня экспрессии EGFR (Reginato et al., 2003) точно так же, как открепление кератиноцитов от ВКМ (Grassian et al., 2011), причем сигналом к дифференцировке является не соотношение связанных и несвязанных молекул  $\beta 1$ , а абсолютное число связанных с ВКМ молекул  $\beta 1$ -интегринов (здесь имеет место дозозависимый эффект взаимодействия  $\beta 1$ -интегрин с белками матрикса). От уровня экспрессии EGFR напрямую зависит синтез проапоптотического белка Vim. В норме EGF подавляет экспрессию Vim, а значит и процесс апоптоза. Однако в процессе аноикиса, несмотря на присутствие в среде молекул EGF, авторы видели неуклонный рост экспрессии Vim. Как выяснилось, к 24 ч нахождения кератиноцитов в суспензии значительно снижалась экспрессия EGFR, соответственно сигнал от EGFR, связанного с EGF, не блокировал синтез Vim. Кроме того, повышение экспрессии Vim напрямую зависело от нарушения связи интегрин  $\beta 1$  с матриксом: при добавлении антител, блокирующих  $\beta 1$ -интегрин, наблюдалось повышение экспрессии Vim в кератиноцитах, находившихся в суспензии, даже в присутствии молекул ВКМ в среде (Reginato et al., 2003). Здесь, по-видимому, происходило конкурентное ингибирование между антителами и фибронектином за молекулу  $\beta 1$ -интегрин.

Что касается криохранения кератиноцитов в суспензии, оно приводит к увеличению доли клеток в состоянии апоптоза (Borderie et al., 1998; Xiao, 2003; Heng, 2006), то есть усугубляет процес-

сы, которые запускаются в кератиноцитах при переводе их в суспензию.

В работе Тиберио (Tiberio et al., 2002) показано влияние концентрации  $\beta 1$ -интегрин кератиноцитов на вероятность включения в них механизма апоптоза. Авторы данной работы анализировали три группы кератиноцитов, отличавшиеся скоростью адгезии к коллагену IV типа. Исследование гибели клеток, проведенное методом TUNEL в этих трех группах, показало, что в первой группе, содержащей высокий процент  $\beta 1$ -интегрин-позитивных клеток, апоптоза практически не было. Авторы сделали вывод, что СК защищены от аноикиса благодаря, в первую очередь, их высокой адгезивности. Кроме того, было показано, что лиганд — связывающая способность  $\alpha 5 \beta 1$ -интегрин (основной рецептор к фибронектину) снижается после перевода кератиноцитов в суспензию и к 24 ч  $\beta 1$ -интегрин полностью исчезает с поверхности кератиноцита, коммитированного к дифференцировке (Adams, 1990; Watt, 1993). Добавление антител к  $\beta 1$ -интегрину, предотвращающих его связывание с фибронектином, но не активирующих его, в первой и второй группах (СК — экспрессировали максимальный уровень  $\beta 1$ -интегрин — и ранние прогениторы) приводило к значительному усилению апоптоза в этих клетках (Tiberio, 2002). Таким образом, СК могут быть наиболее эффективной мишенью для снижения степени дифференцировки через  $\beta 1$ -интегрин сигналинг.

От чего же зависит судьба кератиноцита, находящегося в суспензии? И какие процессы — апоптоза или дифференцировки — доминируют в кератиноцитах при переводе их в суспензию?

Анализом процессов апоптоза и дифференцировки кератиноцитов в суспензии исследователи занимаются давно (Terskikh, Vasil'ev, 2005). Ранее считалось, что они протекают по различным механизмам и могут не зависеть один от другого (Mittra et al., 1997). Позднее представления о взаимосвязи апоптоза и терминальной дифференцировки в суспензии эволюционировали.

Как уже сказано выше, сигналом к дифференцировке кератиноцитов в суспензии является потеря контакта  $\beta 1$ -интегрин с ВКМ. В течение первых 4 часов кератиноциты необратимо выходят из клеточного цикла, в то время как лорикрин в клетках начинает появляться не раньше, чем через 10 часов нахождения в суспензии. Хорошо известно, что терминальную дифференцировку частично можно ингибировать антителами к  $\beta 1$ -интегрину (Adams et al., 1989; Watt et al., 1993), однако важно понимать, что не все антитела к  $\beta 1$ -интегрину обладают способностью блокировать дифференцировку. В работе Ватт (Watt et al., 1993) исследователи экспериментировали с разными типами антител к  $\beta 1$ -интегрину (они использовали две группы моноклональных антител: блокирую-

щих и не блокирующих связь  $\beta 1$ -интегрина с белками ВКМ (фибронектином, ламинином и коллагеном IV)) и обнаружили, что только антитела из первой группы к субъединице  $\beta 1$  способны остановить дифференцировку в суспензии. Кроме этого, антитела из первой группы к гетеродимерам  $\alpha 3\beta 1$  и  $\alpha 5\beta 1$  также были способны существенно блокировать дифференцировку. Таким же эффектом обладали антитела первой группы к субъединицам  $\alpha 3$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 5$ , применяемые в комплексе с антителами к  $\beta 1$ . Это подтвердилось тем, что коллаген IV и ламинин (лиганды к  $\alpha 3\beta 1$  и  $\alpha 5\beta 1$ ) блокировали дифференцировку лишь в комплексе с фибронектином (Darribère et al., 1990; Watt et al., 1991). Эффективность антител первой группы была дозозависимой: лишь взятые в концентрации 250 мкг/мл они блокировали дифференцировку с эффективностью, близкой к фибронектину (Watt et al., 1993), что может указывать на чувствительность дифференцировки к количеству активированных субъединиц  $\beta 1$ . Однако стоит отметить, что даже сам фибронектин не был способен полностью блокировать дифференцировку в кератиноцитах, переведенных в суспензию. Авторы объясняют это тем, что связываясь с молекулой интегрина на поверхности клетки, фибронектин в то же время не предотвращает ингибирование внутриклеточного транспорта предшественников интегрина  $\beta 1$ , а также не снимает блок гликозилирования  $\beta 1$ -интегрина. Кроме того, добавление фибронектина не предотвращает снижение экспрессии белков, участвующих в формировании фокальных контактов наряду с интегринами ( $\beta$ -актин, филламин,  $\alpha$ -актинин), при переводе кератиноцитов в суспензию. Антитела из второй группы не блокировали процесс дифференцировки, даже взятые в высокой концентрации.

Именно разрыв связи  $\beta 1$ -интегрина с фибронектином стимулирует запуск в кератиноцитах процессов терминальной дифференцировки (Levy et al., 2000; Watt et al., 2002) и апоптоза (Stupack et al., 2001). В работе Джейнс (Janes et al., 2009) авторы показали, что включение этих процессов происходит в кератиноцитах практически одновременно и сопровождается активацией сигнального пути дифференцировки PI3K/Akt и апоптотического пути Caspase-8. Как известно, киназа PI3K может быть активирована белками Ras (Erk/MAPK-путь) и посредством других сигнальных путей (VEGFR, цитокины, инсулин). При помощи трансфекции кератиноцитов ретровирусным вектором, авторы вводили активируемый тамоксифеном (4-ОНТ) ген Akt (myrAktER) и показали, что *in vitro* PI3K/Akt-путь включается при переходе кератиноцитов из стволового компартмента в супрабазальные слои. Это было подтверждено с использованием двойной окраски антителами к Akt и  $\beta 1$ -интегрину *in vivo*. Авторы обнаружили актива-

цию PI3K/Akt пути в супрабазальных слоях эпидермиса, в то время как клетки базального слоя, активно экспрессировавшие  $\beta 1$ -интегрин, были отрицательны по Akt. На основании этих экспериментов сделан вывод о том, что включение PI3K пути происходит на начальных стадиях дифференцировки (в зернистом и роговом слоях клетки были Akt негативны). Применение ингибиторов PI3K (LY294002) приводило к остановке терминальной дифференцировки в суспензии. Кроме того, процесс активации каспаз возможно было остановить при формировании связи  $\beta 1$ -интегрин-фибронектин и внесении ингибитора PI3K, что говорит о том, что PI3K/Akt осуществляет регуляцию каспазного пути. Между сигнальными путями PI3K/Akt и Caspase-8 существует обратная связь: активация каспаз приводит к снижению фосфорилирования Akt. Чтобы проанализировать вклад каспазного пути в стимуляцию кератиноцитов к дифференцировке в суспензии, авторы использовали ингибитор к широкому спектру каспаз z-VAD-fmk, а также специфические ингибиторы двух основных путей апоптоза – Caspase-8 и Caspase-9-зависимых. Выяснилось, что терминальная дифференцировка блокируется во всех трех случаях, но ингибитор Caspase-8 (z-IETD-fmk) так же эффективен, как z-VAD-fmk, в то время как ингибитор Caspase-9 (z-LEHD-fmk) блокирует дифференцировку только частично (Janes et al., 2009).

Переводя кератиноциты в суспензию и подвергая их травме криохранения, мы неизбежно нарушаем механизмы сигналинга, ответственные за сохранение жизнеспособности и степени дифференцировки этих клеток. Находясь в суспензии, кератиноциты стремительно теряют способность к адгезии, поскольку экспрессия интегринов, в частности  $\beta 1$ -интегрин, постоянно снижается. Задача – приостановить процесс необратимого выхода кератиноцитов из клеточного цикла и сохранить максимальное количество  $\beta 1$ -интегрин-позитивных клеток в культуре. Мы предполагаем, что замедляя процессы терминальной дифференцировки разными путями – добавляя растворимый фибронектин, а также ингибиторы к PI3-kinase и Caspase-8, в среду для разморозки – возможно минимизировать массивные потери кератиноцитов и, в первую очередь, стволовых клеток после криохранения кератиноцитов в суспензии.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа поддержана Российским Научным Фондом (проект № 21-74-30015).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья 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.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Adams J.C., Watt F.M.* Fibronectin inhibits the terminal differentiation of human keratinocytes // *Nature*. 1989. V. 340(6231). P. 307–309.
- Adams J.C., Watt F.M.* Changes in keratinocyte adhesion during terminal differentiation: reduction in fibronectin binding precedes alpha 5 beta 1 integrin loss from the cell surface // *Cell*. 1990. V. 63(2). P. 425–435.
- Averill-Bates D.A., Yee M.C.-S., Grondin M. et al.* Cryopreservation of rat hepatocytes with wheat proteins: Role in oxidative stress protection // *Cryobiol.* 2014. V. 69(3). P. 512–513.
- Bagutti C., Wobus A.M., Fässler R. et al.* Differentiation of embryonal stem cells into keratinocytes: comparison of wild-type and beta 1 integrin-deficient cells // *Dev. Biol.* 1996. V. 179(1). P. 184–196.
- Borderie V.M., Lopez M., Lombet A. et al.* Cryopreservation and culture of human corneal keratocytes // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1998. V. 39(8). P. 1511–1519.
- Danilkovitch-Miagkova A., Angeloni D., Skeel A. et al.* Integrin-mediated RON growth factor receptor phosphorylation requires tyrosine kinase activity of both the receptor and c-Src // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275(20). P. 14783–14786.
- Darribère T., Guida K., Larjava H. et al.* In vivo analyses of integrin beta 1 subunit function in fibronectin matrix assembly // *J. Cell Biol.* 1990. V. 110(5). P. 1813–1823.
- De Luca M., Pellegrini G., Green H.* Regeneration of squamous epithelia from stem cells of cultured grafts // *Regen. Med.* 2006. V. 1. P. 45–57.
- Evans R.D., Perkins V.C., Henry A., et al.* A tumor-associated beta 1 integrin mutation that abrogates epithelial differentiation control // *J. Cell Biol.* 2003. V. 160(4). P. 589–596.
- Grassian A.R., Schafer Z.T., Brugge J.S.* ErbB2 stabilizes epidermal growth factor receptor (EGFR) expression via Erk and Sprouty2 in extracellular matrix-detached cells // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286(1). P. 79–90.
- Haase I., Hobbs R.M., Romero M.R., et al.* A role for mitogen-activated protein kinase activation by integrins in the pathogenesis of psoriasis // *J. Clin. Invest.* 2001. V. 108. P. 527–536.
- Hanahan D., Weinberg R.A.* The hallmarks of cancer // *Cell*. 2000. V. 100(1). P. 57–70.
- Heng B.C., Ye C.P., Liu H., Toh W.S. et al.* Loss of viability during freeze-thaw of intact and adherent human embryonic stem cells with conventional slow-cooling protocols is predominantly due to apoptosis rather than cellular necrosis // *J. Biomed. Sci.* 2006. V. 13(3). P. 433–445.
- Hertle M.D., Adams J.C., Watt F.M.* Integrin expression during human epidermal development *in vivo* and *in vitro* // *Development*. 1991. V. 112(1). P. 193–206.
- Janes S.M., Ofstad T.A., Campbell D.H. et al.* PI3-kinase-dependent activation of apoptotic machinery occurs on commitment of epidermal keratinocytes to terminal differentiation // *Cell Res.* 2009. V. 19(3). P. 328–339.
- Jackson C., Aabel P., Eidet J.R. et al.* Effect of storage temperature on cultured epidermal cell sheets stored in xenobiotic-free medium // *PLoS One*. 2014. V. 9(8). P. e105808.
- Levy L., Broad S., Diekmann D. et al.* b1 integrins regulate keratinocyte adhesion and differentiation by distinct mechanisms // *Cell*. 2000. V. 11. P. 453–466.
- Metral E., Bechetoille N., Demarne F. et al.*  $\alpha 6$  integrin ( $\alpha 6$ high)/transferrin receptor (CD71) low keratinocyte stem cells are more potent for generating reconstructed skin epidermis than rapid adherent cells // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. V. 18(2). P. e282.
- Moro L., Venturino M., Bozzo C. et al.* Integrins induce activation of EGF receptor: role in MAP kinase induction and adhesion-dependent cell survival // *EMBO J.* 1998. V. 17(22). P. 6622–6632.
- Miranti C., Brugge J.* Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction // *Nat. Cell Biol.* 2002. V. 4(4). P. e83–90.
- Meryman H.T.* Cryopreservation of living cells: principles and practice // *Transfusion*. 2007. V. 47(5). P. 935–945.
- Mitra R.S., Wrone-Smith T., Simonian P. et al.* Apoptosis in keratinocytes is not dependent on induction of differentiation // *Lab. Invest.* 1997. V. 76(1). P. 99–107.
- Muller P., Aurich H., Wenkel R. et al.* Serum-free cryopreservation of porcine hepatocytes // *Cell Tiss. Res.* 2004. V. 317(1). P. 45–56.
- Naaldijk Y., Friedrich-Stöckigt A., Sethe S. et al.* Comparison of different cooling rates for fibroblast and keratinocyte cryopreservation // *J. Tiss. Eng. Regen. Med.* 2016. V. 10(10). P. e354–e364.
- Pasch J., Schiefer A., Heschel I. et al.* Variation of the HES concentration for the cryopreservation of keratinocytes in suspensions and in monolayers // *Cryobiol.* 2000. V. 41(2). P. 89–96.
- Rama P. et al.* Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration // *N. Engl. J. Med.* 2010. V. 363. P. 147–155.
- Rao B.S., Mahesh Y.U., Charan K.V. et al.* Effect of vitrification on meiotic maturation and expression of genes in immature goat cumulus oocyte complexes // *Cryobiol.* 2012. V. 64(3). P. 176–184.
- Rippa A.L., Vorotelyak E.A., Vasiliev A.V. et al.* The role of integrins in the development and homeostasis of the epidermis and skin appendages // *Acta Naturae*. 2013. V. 5(4). P. 22–33.
- Reginato J., Mills K.R., Paulus J.K. et al.* Integrins and EGFR coordinately regulate the pro-apoptotic protein Bim to prevent anoikis // *Nat. Cell Biol.* 2003. V. 5(8). P. 733–740.
- Soldi R., Mitola S., Strasly M. et al.* Role of  $\alpha 3 \beta 1$  integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2 // *EMBO J.* 1999. V. 18(4). P. 882–892.

- Stupack D.G., Puente X.S., Boutsaboualoy S. et al.* Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins // *J. Cell Biol.* 2001. V. 155(3). P. 459–470.
- Tiberio R., Marconi A., Fila C. et al.* Keratinocytes enriched for stem cells are protected from anoikis via an integrin signaling pathway in a Bcl-2 dependent manner // *FEBS Lett.* 2002. V. 524(1–3). P. 139–144.
- Tersikh V.V., Vasiliev A.V.* Apoptosis and differentiation of epidermal keratinocytes // *Rus. J. Develop. Biol.* 2005. V. 36. P. 61–64.
- Watt F.M.* Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation // *EMBO J.* 2002. V. 21(15). P. 3919–3926.
- Watt F., Kubler M.D., Hotchin N.A. et al.* Regulation of keratinocyte terminal differentiation by integrin-extracellular matrix interactions // *J. Cell Sci.* 1993. V. 106. P. 175–182.
- Woelders H., Chaveiro A.* Theoretical prediction of optimal freezing programmes // *Cryobiol.* 2004. V. 49. P. 258–271.
- Xiao M., Dooley D.C.* Assessment of cell viability and apoptosis in human umbilical cord blood following storage // *J. Hematother. Stem Cell Res.* 2003. V. 12(1). P. 115–122.
- Zhu A.J., Haase I., Watt F.M.* Signaling via b1 integrins and mitogen-activated protein kinase determines human epidermal stem cell fate in vitro // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999. V. 96. P. 6728–6733.

## Problem of Terminal Differentiation and Apoptosis during Human Keratinocytes Cryostorage in Suspension

A. N. Popova<sup>1, \*</sup> and E. A. Vorotelyak<sup>1, 2, \*\*</sup>

<sup>1</sup>*Koltzov Institute of Development Biology RAS, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia*

<sup>2</sup>*Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1, Moscow, 119234 Russia*

\**e-mail: popova.anna.n@gmail.com*

\*\**e-mail: vorotelyak@yandex.ru*

Cryostorage of human epidermal keratinocytes is an essential stage in living epidermal equivalent manufacturing. However cryostorage of keratinocytes in suspension stimulates processes of terminal differentiation and apoptosis leading to massive loss of stem and progenitor keratinocytes. Suspension-induced signal of disruption between  $\beta$ 1-integrin and extracellular matrix causes simultaneous activation of PI3K/Akt- and Caspase-8 pathways. We assumed that terminal differentiation could be blocked by fibronectin, PI3-kinase, and Caspase-8-inhibitors added to culture medium after cryostorage in suspension.

*Keywords:* keratinocytes, cryostorage, differentiation, apoptosis