

МОДЕЛИРОВАНИЕ РЕГЕНЕРАЦИИ КОЖИ И ВОЛОСЯНЫХ ФОЛЛИКУЛОВ ЧЕЛОВЕКА В ПОЛНОСЛОЙНОМ КСЕНОТРАНСПЛАНТАТЕ

© 2022 г. О. Л. Черкашина^{a, *}, А. В. Косых^a, Е. И. Моргун^a, А. Л. Риппа^a, А. А. Цитрина^a,
А. П. Эттингер^b, Э. С. Чермных^a, Е. П. Калабушева^a, Е. А. Воротеляк^a

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

^bРоссийский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова,
ул. Островитянова, 1, Москва, 117997 Россия

*e-mail: olgalcher@gmail.com

Поступила в редакцию 19.11.2021 г.

После доработки 14.12.2021 г.

Принята к публикации 18.12.2021 г.

Ксенотрансплантация кожи человека мышам с иммунодефицитом является одной из наиболее адекватных моделей для изучения механизмов регенерации и, таким образом, открывает широкие перспективы для исследований в областях современной клеточной биологии и регенеративной медицины. Разработанная в нашей лаборатории модель ксенотрансплантации полнослойного кожного лоскута позволила нам впервые описать динамику восстановления дермы и подкожной жировой клетчатки человека. Исследована экспрессия и активация белка YAP1 в ходе регенерации эпидермиса, волосных фолликулов (ВФ), папиллярной дермы (ПД), на основе чего были сделаны предположения о характере некоторых клеточных и молекулярных процессов в ходе регенерации кожи человека.

Ключевые слова: регенерация кожи, ксенотрансплантация, волосные фолликулы, эпидермис, папиллярная дерма, адипоциты, YAP1

DOI: 10.31857/S0475145022020100

ВВЕДЕНИЕ

Ксенотрансплантация кожи человека делает возможным изучение процессов регенерации в норме, при моделировании заболеваний или тестировании лекарственных препаратов. В работе была использована ранее разработанная нашим коллективом модель ксенотрансплантации полнослойного кожного лоскута человека (Kalabushcheva et al., 2020). Подобный ксенотрансплантат позволяет изучать не только регенерацию эпидермиса, которая подробно рассмотрена в ранее опубликованных работах (например, Kappes et al., 2004), но и исследовать динамику восстановления дермы и подкожной жировой клетчатки, а также морфологию волосных фолликулов, которые ранее изучались преимущественно на клетках и тканях лабораторных животных (например, Chermnykh et al., 2018; Vsevolodov et al., 2021). Отдельной областью интереса в нашем исследовании было изучение активации сигналинга YAP1 в различных структурах кожи человека в ходе регенерации. Повышенный процент клеток с ядерной локализацией YAP1 коррелирует с гиперпролиферативным и воспалительным фено-

типом (Jia et al., 2018), в то же время снижение его экспрессии связывают с хроническими незаживающими ранами (Yu et al., 2017). Применение модели ксенотрансплантации полнослойного лоскута кожи человека позволит исследовать экспрессию и активность YAP1 как в эпидермисе и ВФ, так и в различных слоях дермы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Биоптаты кожи волосистой части головы были получены из МНИОИ им. П.А. Герцена с информированного согласия пациентов. Полнослойные кожные лоскуты трансплантировали мышам линии NOD/SCID (Charles River Laboratories); всего в работе использовали 15 животных, мышей содержали в SPF-условиях. Операции проводили по ранее разработанному и описанному в нашей лаборатории протоколу (Kalabushcheva et al., 2020). Забор материала проводили на 40, 75 и 110 сут после трансплантации для получения криосрезов. Криосрезы использовали для окрашивания гематоксилин-эозином (BioVitrum), а также иммуногистохимического окрашивания (используемые

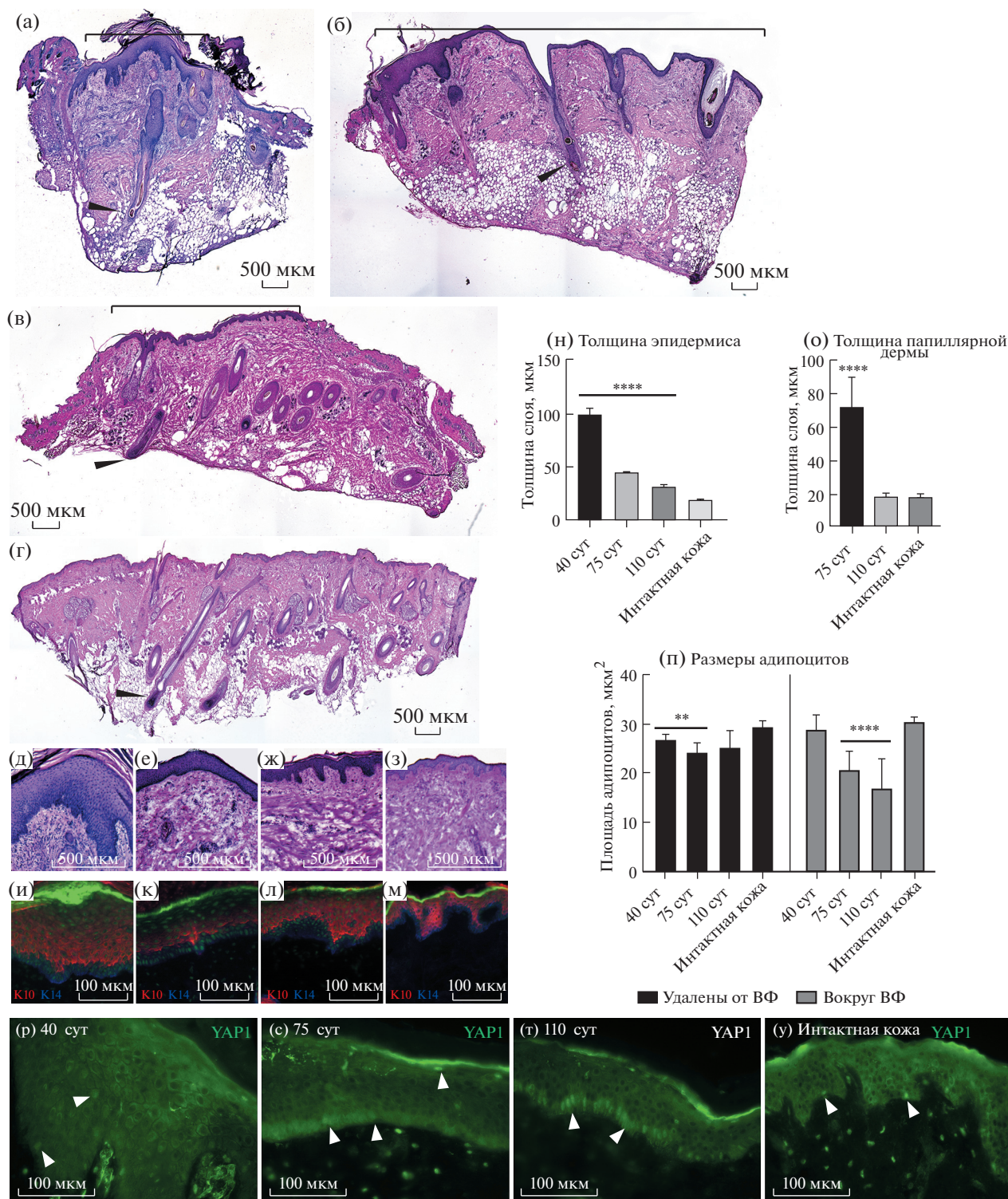


Рис. 1. Морфология кожи человека после ксенотрансплантации на 40 (а), 75 (б) и 110 (в) сут (скобками отмечены границы трансплантата), (г) — интактная кожа, стрелками отмечены ВФ, масштабный отрезок — 500 мкм. (д–з) — увеличенные фрагменты препаратов (а–г) соответственно, масштабный отрезок — 500 мкм. (и–м) — окрашивание на Кератин 10 (красный), Кератин 14 (синий), Human Nuclei (зеленый), масштабный отрезок — 100 мкм. (н–п) — измерение морфологических параметров транспантированной кожи, ** — $p < 0.01$, **** — $p < 0.0001$ относительно интактной кожи. (р–с) — YAP1 в эпидермисе и ПД человека. Стрелками отмечены примеры YAP1-положительных ядер. Масштабный отрезок — 100 мкм.

антитела: cytokeratin 14, ab181595, Abcam, 1 : 1000; keratin 10, MA1-06319, Thermofisher, 1 : 200; YAP1, ab52771, Abcam, 1 : 300, Human Nuclei, MAB1281A4, Merck, 1 : 100). Фотографии получали на микроскопе Keyence BZ-9000 и Leica DMI 6000. Измерения проводили с использованием программного обеспечения ImageJ и Cell Profiler. Для проведения попарных сравнений в программе GraphPad Prism использовали непараметрический критерий Краскела—Уоллиса с поправкой Данна на множественные сравнения. Данные на графиках представлены в виде медианы с разбросом в виде 95% доверительного интервала.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Трансплантат успешно интегрируется в ткани мышцы, сохраняются эпидермис, дерма и подкожная жировая клетчатка кожи человека (рис. 1а–1г).

Эпидермис в ксенотрансплантате утолщен (рис. 1д–1з), особенно в течение первого месяца после трансплантации. Хотя его толщина значительно уменьшается от 40 сут к 110-м, она не достигает толщины эпидермиса интактной кожи (рис. 1н). Такая тенденция наблюдается как при измерении его общей толщины, так и при анализе базального и шиповатого слоев на основе иммуногистохимического выявления кератина 10 и 14 (рис. 1и–1м). Низкая скорость регенерации эпидермиса может быть обусловлена нарушением микроокружения, в норме формируемого иммунными клетками.

ВФ на 40 сут находятся на стадии раннего анагена, на 110 сут они продуцируют стержни волоса и морфологически соответствуют стадии среднего анагена. Регенерация фолликулов несколько замедленна в сравнении с моделью трансплантации единичных ВФ (Oh et al., 2016), что объясняется большим размером трансплантата в нашей работе.

Дерма на 40 сут теряет морфологическое разделение на папиллярный и ретикулярный слои, содержит воспалительный инфильтрат (рис. 1а). Папиллярный слой выявляется на 75 сут, к 110 сут морфология дермы полностью соответствует интактной коже (рис. 1в, 1г, 1о). В исследованиях на мышцах показали, что фибробласты ретикулярной дермы формируют пул миофибробластов на ранних этапах регенерации, далее фибробласты ПД мигрируют в область повреждения, взаимодействуют с эпидермальными кератиноцитами и контролируют ремоделирование внеклеточного матрикса (Woodley, 2017), что соответствует динамике восстановления дермы человека, выявленной в нашей работе.

Исследования, проведенные на лабораторных животных, выявили вовлеченность клеток жировой ткани в миграцию фибробластов в область

повреждения (Schmidt et al., 2013), а также в регуляцию цикла ВФ (Rivera-Gonzalez et al., 2014). В ксенотрансплантате размер адипоцитов подкожной жировой клетчатки меньше значений, полученных для интактной кожи. В области, прилежащей к ВФ, наблюдается выраженная тенденция к уменьшению размера адипоцитов от 40 суток к 110 (рис. 1п). Аналогичные изменения наблюдали на мышцах при переходе от стадии цикла ВФ от раннего анагена к среднему (Rivera-Gonzalez et al., 2014), что воспроизводится в нашей модели. В интактной коже фолликулы находятся на стадии позднего анагена, поэтому адипоциты обладают большим размером.

Экспрессию YAP1 выявили на всех анализируемых сроках в эпидермисе, дерме и ВФ. В фолликулах он имел выраженную активную ядерную локализацию во внешнем корневом влагалище независимо от стадии цикла, что соответствует ранее опубликованным результатам (Elbediwy et al., 2016). В эпидермисе и ПД ядерная локализация YAP1 встречалась в единичных клетках на 40 и 75 сут после трансплантации (рис. 1р, 1с). В ходе регенерации при эпителизации раны YAP1 имеет преимущественно ядерную локализацию в эпидермисе. Поскольку наша модель не имеет оформленного раневого ложа, мы наблюдаем единичные клетки в эпидермисе, однако повышенную экспрессию YAP1 в ПД на 40 сут (рис. 1р). На 110 сут кератиноциты базального слоя эпидермиса имеют активную форму YAP1 с ядерной локализацией, в то время как папиллярные фибробласты обладают только неактивной формой с цитоплазматической локализацией. Интересно, что подобный паттерн распределения встречается именно на поздних сроках регенерации, и его появление вероятно коррелирует с завершением стадии ремоделинга ксенотрансплантата и активацией резидентных иммунных клеток человека.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы была описана динамика восстановления эпидермиса, дермы, подкожной жировой клетчатки человека в ксенотрансплантате в течение длительного срока — 110 сут. Выявлено, что динамика восстановления дермы и подкожной жировой клетчатки соответствует процессам, описанным ранее на лабораторных животных. Выявленный паттерн экспрессии и активности YAP1 указывает на значительные отличия ксенотрансплантированной кожи от интактной, что следует исследовать в дальнейшем в контексте иммунного статуса ксенотрансплантированной кожи.

БЛАГОДАРНОСТИ

ЦКП ИБР им Н.К. Кольцова РАН за доступ к флуоресцентным микроскопам Keyence BZ-9000 и Leica DMI 6000.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа поддержана грантом РНФ № 21-74-30015.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Проведение эксперимента одобрено комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных этического комитета по клиническим исследованиям РНИМУ им. Пирогова (номер заявки 17А+2020).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Е.П. Калабушева и Э.С. Чермных разрабатывали модель трансплантации, Е.П. Калабушева, А.В. Косых, А.П. Эттингер проводили манипуляции с мышами, проводили забор материала. А.Л. Риппа подготовила криосрезы для гистологического исследования. О.Л. Черкашина и Е.И. Моргун проводили гистологическое окрашивание препаратов. О.Л. Черкашина проводила обработку и анализ результатов. О.Л. Черкашина, Е.П. Калабушева и Е.А. Воротеляк участвовали в написании текста статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Chermnykh E.S., Kiseleva E. V., Rogovaya O.S., Rippa A.L., Vasiliev A. V., Vorotelyak E.A. Tissue-engineered biolog-

ical dressing accelerates skin wound healing in mice via formation of provisional connective tissue // *Histol. Histopathol.* 2018. V. 33. № 11. P. 1189–1199.

Elbediwy A., Vincent-Mistiaen Z.I., Spencer-Dene B. et al. Integrin signalling regulates YAP and TAZ to control skin homeostasis // *Development.* 2016. V. 143. № 10. P. 1674.

Jia J., Li C., Yang J. et al. Yes-associated protein promotes the abnormal proliferation of psoriatic keratinocytes via an amphiregulin dependent pathway // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. № 1. P. 1–11.

Kalabusheva E.P., Rippa A.L., Tsitrina A.A. et al. Xenotransplantation of a full-layer human skin strip as a model for studying skin regeneration and the hair follicle cycle // *Russ. J. Dev. Biol.* 2020. V. 52. № 1. P. 42–52.

Kappes U., Schliemann-Willers S., Bankova L. et al. The quality of human skin xenografts on SCID mice: a non-invasive bioengineering approach // *Br. J. Dermatol.* 2004. V. 151. № 5. P. 971–976.

Oh J.W., Kloepper J., Langan E.A. et al. A guide to studying human hair follicle cycling *in vivo* // *J. Invest. Dermatol.* 2016. V. 136. № 1. P. 34.

Rivera-Gonzalez G., Shook B., Horsley V. Adipocytes in skin health and disease // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2014. V. 4. № 3.

Schmidt B.A., Horsley V. Intradermal adipocytes mediate fibroblast recruitment during skin wound healing // *Development.* 2013. V. 140. № 7. P. 1517–1527.

Vsevolodov E.B., Mussayeva A.S., Latypov I.F. et al. Some paradoxical phenomena in hair follicle histophysiology // *Russ. J. Dev. Biol.* 2021. V. 52. № 1. P. 9–15.

Woodley D.T. Distinct fibroblasts in the papillary and reticular dermis: Implications for wound healing // *Dermatol. Clin.* 2017. V. 35. № 1. P. 95–100.

Yu J., Choi S., Um J. et al. Reduced expression of YAP in dermal fibroblasts is associated with impaired wound healing in type 2 diabetic mice // *Tissue Eng. Regen. Med.* 2017. V. 14. № 1. P. 49–55.

Modeling the Regeneration of Human Skin and Hair Follicles in a Full-Thickness Xenograft

O. L. Cherkashina^{1, *}, A. V. Kosykh¹, E. I. Morgun¹, A. L. Rippa¹, A. A. Tsitrina¹, A. P. Oettinger², E. S. Chermnykh¹, E. P. Kalabusheva¹, and E. A. Vorotelyak¹

¹Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

²Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 117997 Russia

*e-mail: olgalcher@gmail.com

Xenotransplantation of human skin to immunodeficient mice is one of the most representative models for studying the mechanisms of regeneration and, thus, expands perspectives for research in modern cell biology and regenerative medicine. The full-thickness skin strip xenotransplantation model developed in our laboratory allowed us to describe the dynamics of restoration of the human dermis and panniculus carnosus. Pattern of the expression and activation of the YAP1 protein during the regeneration of the epidermis, hair follicles (HF), papillary dermis (PD) enabled us to make the conclusions about the basis of some cellular and molecular processes involved into the regeneration of human skin.

Keywords: skin regeneration, xenotransplantation, hair follicles, epidermis, papillary dermis, adipocytes, YAP1