

Сведения об авторах:

Е.А. Басова – студентка

М.А. Фролова – студентка

И.Ю. Маклакова – доктор медицинских наук, доцент

Information about the authors:

E.A. Basova – student

M.A. Frolova – student

I.Yu. Maklakova – Doctor of Sciences (Medicine), Assistant Professor

***Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):**

ekaterina.basova02@mail.ru

УДК 615.46

ПОДХОД К ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ АТОПИЧЕСКОГО ДЕРМАТИТА

Вячеслав Дмитриевич Боковой, Мария Анатольевна Десятова, Артем

Владимирович Коротков, Олег Германович Макеев

Кафедра медицинской биологии и генетики

ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения РФ

Екатеринбург, Россия

Аннотация

Введение. Атопический дерматит – распространённая патология, составляющая 20–40% в структуре кожных заболеваний. Для его лечения в настоящее время применяют препараты системной терапии: азатиоприн, циклоспорин, метотрексат и др., которые обладают выраженным иммуносупрессивным и цитостатическим действием и характеризуются многочисленными осложнениями. **Цель исследования** - разработать эффективный подход к генной терапии атопического дерматита. **Материал и методы.** Использовали экзосомы, полученные из кондиционной культуры мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, предварительно трансфицированных плазмидным вектором, несущим в качестве полезного ген *Klotho* membrane (Addgene plasmid 17712). Выделяли экзосомы, включающие трансмембранную форму белка *Klotho*, наносили на область кожного дефекта в количестве 1,0 мкг на см² кожного дефекта два раза в сутки. **Результаты.** Использование экзосом, полученных из кондиционной среды генно-модифицированных плазмидой с трансмембранным геном *Klotho* культивируемых мультипотентных мезинхимальных стромальных клеток позволяет снизить сроки лечения атопического дерматита с 3-4 недель до 9-14 суток и повысить качество терапии в сравнении с существующими способами. **Выводы.** Разработан подход к терапии атопического дерматита, в основе которого лежит нанесение экзосом, включающих трансмембранную форму белка *Klotho*, на область кожного дефекта. Достигнута высокая результативность терапии, с сокращением сроков лечения.

Ключевые слова: атопический дерматит, ген *Klotho*, трансфекция ММСК, ЭКЗОСОМЫ.

APPROACH TO PATHOGENETIC THERAPY OF ATOPIC DERMATITIS

Vyacheslav D. Bokovoy, Mariya A. Desyatova, Artem V. Korotkov, Oleg G. Makeev
Department of Medical Biology and Genetics

Ural state medical university

Yekaterinburg, Russia

Abstract

Introduction. Atopic dermatitis is a common pathology, accounting for 20-40% in the structure of skin diseases. For its treatment, systemic therapy drugs are currently used: azathioprine, cyclosporine, methotrexate, etc., which have a pronounced immunosuppressive and cytostatic effect and are characterized by numerous complications. **The purpose of the study** is to develop an effective approach to gene therapy of atopic dermatitis. **Material and methods.** Exosomes obtained from a conditioned culture of multipotent mesenchymal stromal cells previously transfected with a plasmid vector carrying the *Klotho* membrane gene (Addgene plasmid 17712) as a useful one were used. Exosomes were isolated, including the transmembrane form of the *Klotho* protein, applied to the area of the skin defect in an amount of 1.0 micrograms per cm² of the skin defect twice a day. **Results.** The use of exosomes obtained from a conditioned medium of genetically modified plasmids with the *Klotho* transmembrane gene cultured multipotent mesenchymal stromal cells allows to reduce the duration of treatment of atopic dermatitis from 3-4 weeks to 9-14 days and improve the quality of therapy in comparison with existing methods. **Conclusions.** An approach to the treatment of atopic dermatitis has been developed, which is based on the application of exosomes, including the transmembrane form of the *Klotho* protein, to the area of the skin defect. High efficiency of therapy has been achieved, with a reduction in the duration of treatment.

Keywords: atopic dermatitis, *Klotho* gene, MMSC transfection, exosomes.

ВВЕДЕНИЕ

Атопический дерматит – это рецидивирующее воспалительное кожное заболевание. Актуальность разработки подходов к лечению обусловлена, с одной стороны – распространённостью данной патологии (от 20 до 40% в структуре кожных заболеваний), а с другой – отсутствием одновременно безопасных и эффективных способов терапии. Так в недавнем мультицентровом клиническом исследовании эффективность терапии дерматитов составила 38.3% [1]. Для лечения атопического дерматита в настоящее время применяют препараты системной терапии: азатиоприн, циклоспорин, метотрексат и др., которые обладают выраженным иммуносупрессивным и цитостатическим действием и характеризуются разнообразными осложнениями. Для наружной терапии атопического дерматита до сих пор «золотым стандартом» считаются глюкокортикоиды от слабой (гидрокортизон, преднизолон и др.) до высокой степени активности

(метилпреднизолонацепонат, мометазонафуорат, клобетазолапропионат и др.), которые также не лишены многочисленных побочных эффектов.

Цель исследования – снижение сроков и повышение качества лечения атопического дерматита.

Цель достигается путем применения экзосом, содержащих полноразмерную форму белка Klotho, получаемых из генномодифицированных ММСК путем индукции в последних гиперэкспрессии трансмембранного гена Klotho.

Трансмембранная форма белка Klotho реализует множество функций, в том числе отвечает за транслокацию Na/K АТФаз и передачу сигналов факторов роста. При этом растворимая форма белка, образующаяся из трансмембранной, также участвует в регуляции концентрации ионов кальция [2].

Все эти механизмы имеют решающее значение для возникновения и развития генетически детерминированного нарушения функций эпидермиального барьера, выступающего в качестве основного звена патогенеза атопического дерматита. Именно нарушение проницаемости эпидермиального барьера кожи приводит к избыточной трансэпидермальной потере воды, а уменьшение гидратации кожи генерирует хроническое воспаление и, с одной стороны, усиливает зуд и эксфолиации, а с другой-образует дополнительные входные ворота для патогенов. В свою очередь, трансмембранная форма белка Klotho также активирует кальциевые каналы и препятствует их интернализации, что обеспечивает гидратацию эпидермиса и, тем самым, разрывает порочный круг патогенеза атопического дерматита.

Цель исследования – разработать подход к эффективной генной терапии атопического дерматита.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В ходе работы использовали плазмиды, несущие в качестве полезного ген Klotho (Addgene plasmid 17712: Klotho (membrane)). Плазмиды хранили и наращивали в составе трансгенного штамма бактерии *E. coli* (Dh5a). Для выделения и очистки плазмидного генетического материала бактерии размораживали и наращивали на жидкой LB-среде с добавлением используемого для селекции антибиотика ампициллина (75 мкг/мл), поскольку в качестве репортерного гена плазмиды содержат ген устойчивости к данному антибиотику, что приводит к гибели бактерий *E.coli*, лишенных данных плазмид.

После получения высокой плотности бактерий культуры центрифугировали при 1000g в течение 10 минут, супернатант удаляли, а осадок использовали для выделения плазмидной ДНК с помощью коммерческого набора реагентов MiniprepKit (ZymoResearch, США) в соответствии с протоколом производителя.

Количественный подсчет плазмидной ДНК (пДНК) проводили на спектрофотометре (BIO-RAD) при длине волны 260 нм. Качественный анализ проводили по соотношению OD260/OD280. Образцы считали пригодными при $OD260/OD280 = 1.8 \pm 0.1$. Копийность полученных растворов пДНК

определяли по формуле: (количество ДНК (нг) \times 6,022 \times 10²³) / (длина плазмиды (п.о.) \times 1 \times 10⁹ \times 650).

Аутологичный материал (10–30 мм³) в виде образцов, полученных методом панч-биопсии, был взят у лабораторных крыс в асептических условиях.

После забора образцы помещали в стерильные одноразовые полипропиленовые пробирки, содержащие от 5 до 50 мл смесевой питательной среды DMEM/F-12, в соотношении 1:1, с добавлением культуральных антибиотиков пенициллина, стрептомицина и амфотерицина В (Sigma Aldrich, США). При температуре +4°C пробы доставляли в лабораторию в течение не более чем 4 часов. Далее образцы ткани препарировали на чашках Петри в ламинарных боксах, удаляя некротические ткани, и механически измельчили стерильным лезвием до размеров, не превышающих 4 мм³. Полученные кусочки ткани промывали в фосфатном буферном растворе PBS (Биолот, Россия) для удаления форменных элементов крови и помещали в свежую питательную среду DMEM/F-12 с 10% фетальной бычьей сывороткой (ФБС) в культуральные флаконы с площадью посевной поверхности 25 см² (Orange, Бельгия).

Клетки культивировали в течение 48 часов при 37°C, 95% влажности и 5% содержании углекислого газа. По истечении двухсуточного срока наблюдения, флаконы подвергали тщательной оценке признаков возможной микроорганизменной контаминации. При отсутствии макро- и микроскопических признаков тех или иных инфекционных агентов, в первичную культуру добавляли лиофилизированную коллагеназу (Биолот, Россия) в рабочей концентрации 200 ед/мл. После достижения полной химической деструкции ткани (в течение 24–48 часов), первичные культуры клеток отмывали от фермента путем центрифугирования при 200g с последующим ресуспендированием клеточного осадка в свежей культуральной среде. Гомогенизированную клеточную суспензию переносили в новые малые культуральные флаконы.

Трансфекцию ММСК выполняли методом липосомальной трансфекции с использованием комплекса поликатионных липидов Lipofectamin 2000 (Sigma Aldrich, США), согласно протоколу производителя. Концентрация белка Klotho в клеточных лизатах контрольной группы клеток составила 74,22 \pm 6,73 в и 93,03 \pm 6,65 в экспериментальной группе (пг белка Klotho/мкг общего белка).

Клетки выращивали на бессывороточной среде StemPro-MSC исходя из двух условий:

1. Применение бессывороточной среды повышает эффективность трансфекции с использованием липосом.

2. Стандартное применение эмбриональных сывороток, в том числе КРС, обычно используемых в качестве добавки к средам при культивировании клеток, в данном случае неприемлемо, поскольку последние несут в своем составе посторонние экзосомы.

В процессе культивирования, при смене среды, 1/3 среды забирали и заменяли на новую. Забранную среду сразу после получения центрифугировали

на охлаждаемой центрифуге при 2000g в течение 90 минут при -4оС для ее хранения.

С целью получения экзосом, на начальном этапе кондиционную среду центрифугировали (600g, 60 минут) для отделения клеточной фракции, для предварительного сбора супернатанта центрифугировали дважды при 15000–17000 g в течение 220 минут, а для сбора полученного супернатанта при 100000 g в течение 300 минут.

В дальнейшем супернатант фильтровали через нитроцеллюлозные фильтры (Sarsthted) с диаметром пор 220 нм. Для концентрирования раствора экзосом осадок повторно ресуспендировали до 1/10 его исходного объёма и центрифугировали при 100 000 g в течение 120 минут. Перед применением готовили взвесь экзосом в физрастворе, который помещали в стерильный шприц.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Испытание подхода проводилось на модели атопического дерматита, основанной на нокауте гена филагтрина у лабораторных крыс.

Полученные экзосомы в виде взвеси в физиологическом растворе наносили на поврежденную поверхность из расчета 1,0 мкг белка на см² при влажном ведении. Спустя 9-14 суток наблюдалась нормализация структуры кожи, которая соответствовала неповрежденной.

Последующие наблюдения не выявило обострения заболевания у подопытных животных в течение трёх месяцев.

ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, использование экзосом, полученных из кондиционной среды генно-модифицированных плазмидой с трансмембранным геном Klotho культивируемых мультипотентных мезинхимальных стромальных клеток позволяет снизить сроки лечения атопического дерматита до 9-14 суток и повысить качество терапии в сравнении с существующими способами.

ВЫВОДЫ

1. Разработан подход к терапии атопического дерматита, в основе которого - нанесение экзосом, включающих трансмембранную форму белка Klotho, на область кожного дефекта.

2. Достигнута высокая результативность терапии, с сокращением сроков лечения (до 9–14 суток).

3. Дальнейшая работа будет направлена на верификацию и внедрение разработанного подхода, в качестве стандартного метода лечения атопического дерматита.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Dearman, B. L. Advances in skin tissue bioengineering and the challenges of clinical translation / B. L. Dearman, S. T. Boyce, J. E. Greenwood // *Frontiers in Surgery*. – 2021. – Vol. 8. – P. 640879.

2. New Insights into the mechanism of action of soluble Klotho / G. D. Dalton, J. Xie, S. W. An, C. L. Huang // *Frontiers in Endocrinology*. – 2017. – Vol. 8. – P. 323.

Сведения об авторах

В.Д. Боковой* – студент

М.А. Десятова – ассистент кафедры
А.В. Коротков – кандидат медицинских наук, доцент
О.Г. Makeev – доктор наук, профессор

Information about the authors

V.D. Bokovoy* – student

М.А. Desyatova – Department assistant

A.V. Korotkov – Candidate of Sciences (Medicine), Associate Professor

O.G. Makeev – Doctor of Sciences (Medicine), Professor

***Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):**

slava.bokovoy@gmail.com

УДК 616-092.9

ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ ФУКОКСАНТИНА НА МОДЕЛИ CCL₄-ИНДУЦИРОВАННОГО ФИБРОЗА ПЕЧЕНИ У МЫШЕЙ

Вячеслав Дмитриевич Боковой, Василий Николаевич Слаутин, Александр
Сергеевич Бугаков, Ксения Андреевна Гаврилова

Кафедра патологической физиологии

ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения РФ

Екатеринбург, Россия

Аннотация

Введение. Отсутствие эффективных терапевтических методов лечения терминальных стадий фиброза печени является актуальной проблемой здравоохранения. В отношении фиброза печени перспективным представляется применение фукоксантина, обладающего противовоспалительным действием, которое реализуется за счёт ингибирования активации транскрипционного ядерного фактора NF-κB. **Цель исследования** – определение эффективности применения фукоксантина при фиброзе печени. **Материал и методы.** Эксперименты проведены на 30 самцах мышей (массой 20-22 г) распределённых по 3 группам: интактной, контрольной и основной. Для моделирования фиброза печени лабораторным животным контрольной и основной групп вводили тетрахлорметан в дозе 2 мкл/кг внутривенно 2 раза в неделю в течение 6 недель. Фукоксантин вводили ежедневно per os в дозе 10 мг/кг. Для оценки эффективности проведённого лечения выполнено исследование гистологических препаратов с использованием шкалы METAVIR. Для количественной оценки соединительной ткани в печени использован краситель Sirius red. Иммуногистохимическим методом произведён анализ количества α-SMA+ клеток. Методом ИФА в сыворотке крови определены уровни провоспалительных цитокинов (IL-1β, TNF-α). **Результаты.** Применение фукоксантина привело к снижению уровня провоспалительных цитокинов и количества лейкоцитов в печени. Установлено снижение содержания соединительной ткани и миофибробластов в печени. **Выводы.** Фукоксантин ингибировал выработку провоспалительных цитокинов, подавлял миграцию лейкоцитов. Подавление фукоксантином провоспалительных