

ЭКСПРЕССИОННЫЙ ПРОФИЛЬ ИЗОГЕННЫХ КЛЕТОК РАННЕЙ МЕЗОДЕРМЫ, ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ ИЗ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

© 2024 г. А. В. Селезнева, Е. В. Коробко, С. Л. Киселев, Ю. Г. Суздальцева*

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия

* e-mail: yu_suzdaltseva@mail.ru

Поступила в редакцию 20.09.2023

После доработки 08.01.2024

Принята к публикации 14.01.2024

Образование рубца при нормальной регенерации поврежденных тканей у взрослых может приводить к заметным косметическим и функциональным дефектам органов и существенно влиять на качество жизни. Напротив, известно, что ткани плода до третьего триместра беременности способны к полной регенерации с восстановлением исходной архитектуры и функциональной активности. Понимание клеточных и молекулярных механизмов регенерации ран плода создаст основу для разработки успешного лечения, направленного на минимизацию рубцевания. Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) играют важную роль в восстановлении тканей, поскольку секретируемые ими цитокины, хемокины, факторы роста и внеклеточные везикулы участвуют в регуляции миграции, ангиогенеза, синтеза и ремоделирования внеклеточного матрикса. Мезодермальная дифференцировка индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (ИПСК) позволяет воспроизвести последовательные этапы эмбриогенеза *in vitro* и создать изогенные клеточные модели МСК, соответствующие разным стадиям развития человека. В данной работе в результате специфически направленной многостадийной мезодермальной дифференцировки ИПСК были получены изогенные линии клеток примитивной полоски, латеральной и параксиальной мезодермы и проведен сравнительный анализ их экспрессионных профилей. Показано, что полученные клетки латеральной мезодермы (ЛМ) и параксиальной мезодермы (ПМ), являются предшественниками для МСК. МСК, полученные в результате дифференцировки клеток как ЛМ, так и ПМ, обладали сходным профилем по экспрессии панмезодермальных маркеров. Сравнительный анализ функциональной активности МСК и их предшественников в провоспалительном микроокружении позволит получить молекулярные инструменты для лучшего понимания фундаментальных механизмов регенерации тканей плода и определить терапевтические мишени для минимизации рубцевания и патологических процессов, характеризующихся чрезмерной фиброплазией.

Ключевые слова: мезенхимальные стромальные клетки; дифференцировка плюрипотентных стволовых клеток человека; регенерация тканей

DOI: 10.31857/S0044452924020043, **EDN:** XAQGKH

ВВЕДЕНИЕ

У взрослых заживление ран, как правило, завершается образованием рубцов, которые могут вызывать функциональные осложнения и психологические проблемы [1, 2]. Хотя клеточные и молекулярные механизмы, лежащие в основе заживления ран и образования рубцов, хорошо описаны, а современные лекарства и определенные техники позволяют ранам заживать быстрее с меньшим образованием рубцов, по-настоящему эффективных методов лечения рубцов до сих пор не существует [3, 4]. Вместе с тем известно, что ткани плода млекопитающих на протяжении первого и второго триместров развития быстро заживают без образования рубцов

с восстановлением первоначальной структуры ткани с нормальной трехмерной архитектурой коллагена, типичной дифференцировкой клеток, полным эпителиальным покрытием и эпидермальными придатками [5, 6]. Сравнительные исследования механизмов регенерации тканей у взрослых и плодов позволили бы определить конкретную молекулярную или клеточную мишень в процессе рубцевания, чтобы разработать новое лекарственное средство, которое потенциально могло бы улучшить жизнь многих пациентов. Но поскольку такие исследования сильно ограничены этическими проблемами и практически недоступностью эмбриональных тканей человека разных стадий развития, физиологические,

клеточные и молекулярные механизмы безрубцовой регенерации плода в настоящее время остаются практически неизвестными.

Многообещающие технологии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (ИПСК) расширили наши возможности как в фундаментальных исследованиях, так и в клинических приложениях, позволив моделировать развитие человека, генетические заболевания и получать дифференцированные клетки для трансплантации пациентам. Отслеживание дифференцировки ИПСК в режиме реального времени позволяет достичь уровня экспериментальной доступности различных клеточных моделей, недостижимого *in vivo*. Данный подход представляется наиболее оптимальным для исследования фенотипических и функциональных особенностей клеток взрослого и плода с целью выяснения механизмов, ответственных за безрубцовое заживление [7].

Регенерация ткани невозможна без участия мезенхимальных стромальных клеток (МСК), так как восстановление паренхимы происходит на создаваемом ими молекулярном каркасе из белков внеклеточного матрикса. МСК выполняют регуляторную функцию в месте повреждения за счет способности динамически изменять свой фенотип, функциональную активность, экспрессию и секреторный профиль под действием внешних сигналов из микроокружения, способствуя успешному заживлению [8, 9]. Цитокины, хемокины, факторы роста и внеклеточные везикулы, секретируемые МСК, участвуют в регуляции внутриклеточных сигнальных каскадов, стимулирующих ангиогенез, рекрутирование клеток в очаг воспаления, ремоделирование внеклеточного матрикса [10, 11]. Также было показано, что МСК проявляют иммуномодулирующие эффекты при взаимодействии с иммунными клетками [12, 13]. Вызывая функциональные изменения в иммунных клетках, МСК обладают способностью регулировать баланс между вырабатываемыми провоспалительными и противовоспалительными факторами, создавая цитокиновое микроокружение, необходимое для успешного заживления [14–16]. Фибротические нарушения в различных тканях связывают с хронической активацией МСК провоспалительными медиаторами, которые вызывают их трансдифференцировку в рубцовые миофибробласты с пролиферативными, мигрирующими, сократительными, иммуномодулирующими и фагоцитарными свойствами [17].

Логично предположить, что заживление тканей плода без рубцов происходит с участием фетальных МСК (мезодермальных предшественников), которые фенотипически и функционально отличаются от взрослых. Хотя взрослые МСК, выделенные из различных тканей, обладают сходным

фенотипом, пролиферативным и дифференцировочным потенциалом [18], они происходят из различных по развитию клеточных популяций клонально-специфических мезодермальных предшественников, происходящих из нервного гребня, параксиальной мезодермы и мезодермы латеральной пластинки [19–21]. Дифференцировка ИПСК в мезодермальном направлении позволяет воспроизвести последовательные этапы эмбриогенеза *in vitro* и создать изогенные клеточные модели МСК, соответствующие разным стадиям развития человека. Разработка и описание свойств клеточных моделей МСК и их предшественников, дифференцированных из ИПСК, является важным этапом, обеспечивающим последующие сопоставительные исследования их функциональной активности в условиях провоспалительного микроокружения.

В настоящей работе была исследована возможность получения изогенных линий клеток примитивной полоски, параксиальной мезодермы (ПМ) и латеральной мезодермы (ЛМ) эмбриона человека, а также клеток, соответствующих по своим характеристикам МСК взрослого человека из ИПСК. Для этого были использованы протоколы многостадийной последовательной специфически направленной дифференцировки ИПСК в мезодермальном направлении с использованием комбинации экзогенных специфических ингибиторов, факторов роста и биологически активных низкомолекулярных соединений. Полученные линии клеток были охарактеризованы по экспрессии генов, специфических для мезодермальных клеток эмбриона человека. Проведена оценка изменения экспрессии генов в клетках в процессе мезодермальной дифференцировки ИПСК.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Культивирование ИПСК человека. Клеточную линию ИПСК человека endo-iPS12 [22] культивировали в CO₂ – инкубаторе MCO-19M (Sanyo, Япония) при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂ на стандартной пластиковой посуде для культивирования клеток (Corning Costar, США), пресорбированной раствором Vitronectin XF (Stemcell Technologies, Канада) в среде ncTarget (Nuwacell, Китай) с ежедневной заменой. По достижении 80% конфлюентности ИПСК дезагрегировали с использованием реактива ReLeSR (Stemcell Technologies, Канада) и пересевали в соотношении 1:4. Подсчет клеток производили в автоматическом счетчике клеток Countess Automated Cell Counter (Invitrogen, США). При пересеве в среду для культивирования добавляли ингибитор Rho киназы (ROCK) Y-27632 (STEMCELL Technologies, США) в концентрации 5 мкМ на одни сутки. ИПСК характеризовали по

морфологии с использованием инвертированного микроскопа Axiovert 40 CFL (Zeiss AG, Германия), оборудованного цифровой монохромной камерой AxioCam 202 mono (Zeiss AG, Германия), а также по экспрессии маркеров *POU5F1*, *NANOG*, *SOX2* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Дифференцировка ИПСК в ПМ. ИПСК выращивали по методике, описанной выше. При достижении 50 % конфлюэнтности проводили депривацию средой DMEM/F12 (HyClone, США), содержащей 100 ед./мл пенициллина, 100 ед./мл стрептомицина 2 мМ глютамина, 100 мкг/мл инсулина, 50 мкг/мл трансферрина (все ПанЭко, Россия), 10 нг/мл активина А (R&D Systems, США), 20 нг/мл фактора роста фибробластов (bFGF) (Sigma Aldrich, Германия), 20 нг/мл WNT-1 человека (Sigma Aldrich, Германия), и культивировали клетки в течение суток. Затем клетки культивировали в течение 6 суток в этой же среде, но без bFGF с добавлением 1 % концентрата липидов (Thermo Fisher Scientific, США), 40 мкМ тиоглицерола (Sigma Aldrich, Германия), заменяя среду каждый день. Образцы клеток собирали на 2 и 7 день культивирования. Полученные клетки характеризовали по морфологии, тестировали на экспрессию маркеров плюрипотентности *POU5F1*, *SOX2*, *NANOG*, а также оценивали уровень экспрессии маркеров параксиальной мезодермы эмбриона человека *TBXT*, *MIXL1*, *WNT5A*, *DLL1*, *MSGN1*, *MEOX1*.

Дифференцировка ИПСК в ЛМ. Клетки ЛМ получали по методике дифференцировки ИПСК в ПМ, приведенной в предыдущем абзаце, используя BMP4 человека (Sigma Aldrich, Германия) вместо WNT-1. Полученные клетки характеризовали по морфологии, тестировали на экспрессию маркеров плюрипотентности *POU5F1*, *SOX2*, *NANOG*, а также оценивали уровень экспрессии маркеров латеральной мезодермы эмбриона человека *TBXT*, *MIXL1*, *HAND1*, *HAND2*, *FOXF1*, *BMP4*.

Получение МСК из ЛМ и ПМ, дифференцированных из ИПСК. Для получения МСК ЛМ и ПМ, дифференцированные из ИПСК, культивировали в стандартной безсывороточной среде Advance Stem Cell Basal Medium (HyClone, США), поддерживающей рост недифференцированных мезенхимальных прогениторных клеток взрослого человека, содержащей 10 % смеси факторов роста Advance Stem Cell Growth Supplement, (HyClone, США), 100 ед./мл пенициллина, 100 Ед/мл стрептомицина (ПанЭко, Россия) в течение 3-х недель. При достижении плотности монослоя 80–90 % МСК рассевали в соотношении 1:3 с использованием раствора, содержащего 0.025 % трипсина и 0.01 % ЭДТА (HyClone, США). Полученные клетки тестировали на соответствие критериям, установленным для МСК [18] по экспрессии поверхностных маркеров CD90, CD73, CD105 и по способности дифферен-

цироваться в остеогенном, адипогенном и хондрогенном направлении.

Обратная транскрипция и количественная ПЦР в реальном времени. Выделение РНК из культивированных клеток проводили с использованием реагента TRIzol (Thermo Fisher Scientific, США) по методике, описанной в приложенном к набору руководстве пользователя. Определение концентрации РНК проводили по величине оптического поглощения на длине волны 260 нм (A260) с учетом коэффициента экстинкции $\epsilon_{260} = 0.025$ (мкг/мл)·1 см·1 на флюориметре Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкциям производителя с использованием набора QubitTM RNA Broad Range (BR) (Thermo Fisher Scientific, США). Качество РНК оценивали с помощью электрофореза в агарозном геле, образец РНК считали подходящим для ПЦР в случае четкой визуализации двух полос, соответствующих 28S и 18S субъединицам РНК. Синтез кДНК проводили с использованием набора MMLV RT kit (Евроген, Россия), согласно руководству пользователя, приложенному к набору, используя олиго-dT-праймеры, ревертазу MMLV, ингибитор рибонуклеаз дитиотреитол DTT, дезоксирибонуклеотиды dNTP. Для количественной ПЦР использовали реакционную смесь qPCRmix-HS-SYBR (Евроген, Россия), включающую интеркалирующий краситель SYBR Green I. ПЦР в реальном времени проводили в амплификаторе LightCycler 96 (Roche Diagnostics, Швейцария). В качестве праймеров использовали оригинальные специфические комплементарные пары олигодезоксинуклеотидов к анализируемым генам, представленные в табл. 1.

Специфичность продуктов ПЦР подтверждали анализом кривой плавления в LightCycler[®] 96 Software (Roche Diagnostics, Швейцария) и электрофорезом в 2 % агарозном геле. Для анализа размера фрагментов нуклеиновых кислот использовали маркеры молекулярного веса GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, США). Визуализацию нуклеиновых кислот проводили в геледокументирующей системе EBOX VX5/20LM (Vilber Lourmat, Франция).

При анализе содержания мРНК генов данные для каждого образца нормировали по экспрессии гена домашнего хозяйства (глицеральдегид-3-фосфат деhydroгеназы (GAPDH)). Все эксперименты дублировали для каждого образца. Относительную экспрессию генов рассчитывали с использованием метода $\Delta\Delta C_t$.

Статистическая обработка результатов исследований. Достоверность различий между группами оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали равным 0.05. Расчеты выполняли в программе Statistica 6.0.

Таблица 1. Последовательности олигонуклеотидных праймеров, специфичных для генов человека

Название гена		Последовательность нуклеотидов 5'-3'
<i>POU5F1</i>	F	CAAAGCAGAAACCCTCGTGC
	R	TGATCTGCTGCAGTGTGGG
<i>SOX2</i>	F	TTTGTCGGAGACGGAGAAGC
	R	TAAGTGTCCATGCGCTGGTT
<i>NANOG</i>	F	ATCTGCTTATTCAGGACAGCCC
	R	AAAGGCTGGGGTAGGTAGGT
<i>TBXT</i>	F	CCAATGGGGGTGGCTTCTT
	R	ATGGGTGAGGGGTGTGTAGT
<i>MIXL1</i>	F	CGAGTCCAGGATCCAGCTTTT
	R	CTCCAACCCCGTTTGGTTTCG
<i>HAND1</i>	F	ATCAAGACTCTGCGCCTAGC
	R	AGGAAACCTTCGTGCTGCT
<i>HAND2</i>	F	GCCAAGGACGACCAGAATGG
	R	GGTTTTCTTGTCGTTGCTGCT
<i>FOXF1</i>	F	CGGCTTCCGAAGGAAATGC
	R	CGGCAAGTGGCCGTTTCAT
<i>BMP4</i>	F	GGAGCTTCCACCACGAAGAA
	R	GGAAGCCCCTTTCCCAATCA
<i>WNT5A</i>	F	TAGCCTGAAGACATGCTGGC
	R	TGACCTGTACCAACTTGCCC
<i>MEOX1</i>	F	TTGCGGTAAACCTGGACCTC
	R	CTTGAGAGGCTGTGGAGTC
<i>DLL3</i>	F	CACCGCTATGTGTGCGAGTG
	R	GTTCATGGTCTCCGTCTCCC
<i>MSGN1</i>	F	TCCCCCTCTCAGAGCCTTTC
	R	TGACTTTGGTGCCCTTCTGG
<i>PDGFRB</i>	F	TGGCCCTCAAAGGCGAG
	R	TTCTTTGCGGGGGTATGTCC
<i>KDR</i>	F	GTAACCCGGAGTGACCAAGG
	R	AACCAAGGTACTTCGCAGGG
<i>APLNR</i>	F	ACCTACACGTACCGGGACTA
	R	GTGGTGCGTAACACCATGAC
<i>GAPDH</i>	F	ATGGCAAATTCATGGCACC
	R	GACTCCACGACGTACTCAGC

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Морфологическая характеристика клеток в процессе дифференцировки ИПСК в мезодермальном направлении

Ранее было показано, что в линиях эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) человека образование клеток примитивной полоски инициируется после

активации передачи сигналов трансформирующего фактора роста- β (TGF β), WNT и FGF [23, 24]. А бифуркация первичной полоски на латеральную и параксиальную мезодерму может быть вызвана компенсирующими сигналами BMP и WNT. Было показано, что активация WNT и блокирование передачи сигналов BMP аннулируют латеральную мезодерму и расширяют параксиальную мезодерму. Напротив, ингибирование WNT и экзогенный BMP индуцируют латеральную мезодерму [23].

В нашей работе мы использовали линию ИПСК человека endo-iPS12, полученную в результате трансдукции эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVES) ретровирусными векторами, содержащими кДНК генов *Oct3/4*, *Sox2*, *KLF4* и *cMyc* [22]. Для индукции дифференцировки ИПСК в клетки примитивной полоски мы использовали среду, содержащую bFGF в течение суток. Затем для индукции ПМ использовали среду, содержащую WNT-1, а для индукции ЛМ использовали среду, содержащую BMP4, и культивировали клетки в течение 6 суток. Образцы собирали на 2 и 7 и 21 день культивирования. Морфологические изменения клеток при дифференцировке ИПСК в мезодермальном направлении представлены на рис. 1.

Исходные колонии ИПСК были плоские, имели ровный край. Мелкие, круглые клетки внутри колонии имели высокое ядерно-цитоплазматическое отношение, т.е. крупное ядро и небольшой объем цитоплазмы и были связаны плотными контактами (рис. 1a).

В процессе дифференцировки ИПСК в мезодермальном направлении клетки постепенно увеличивались в размерах и приобретали фибробластоподобную морфологию. Однако клетки ПМ и ЛМ все же различались по морфологии и размерам, что было особенно заметно к 7 дню культивирования. Клетки ПМ были более мелкими и относительно более округлыми по сравнению с клетками ЛМ (рис. 1b, d). Тем не менее и клетки ПМ, и клетки ЛМ при культивировании в стандартной безсывороточной среде, поддерживающей рост недифференцированных МСК, приобретали фенотипические характеристики МСК взрослого человека (рис. 1c, e).

Изменение экспрессии генов плюрипотентности при дифференцировке ИПСК в мезодермальном направлении

Изогенные культуры клеток, полученные в результате дифференцировки ИПСК в мезодермальном направлении, исследовали на экспрессию генов плюрипотентности *POU5F1*, *SOX2*, *NANOG*, генов, характерных для клеток примитивной полоски — *TBXT* и *MIXL1*, генов, экспрессирующих

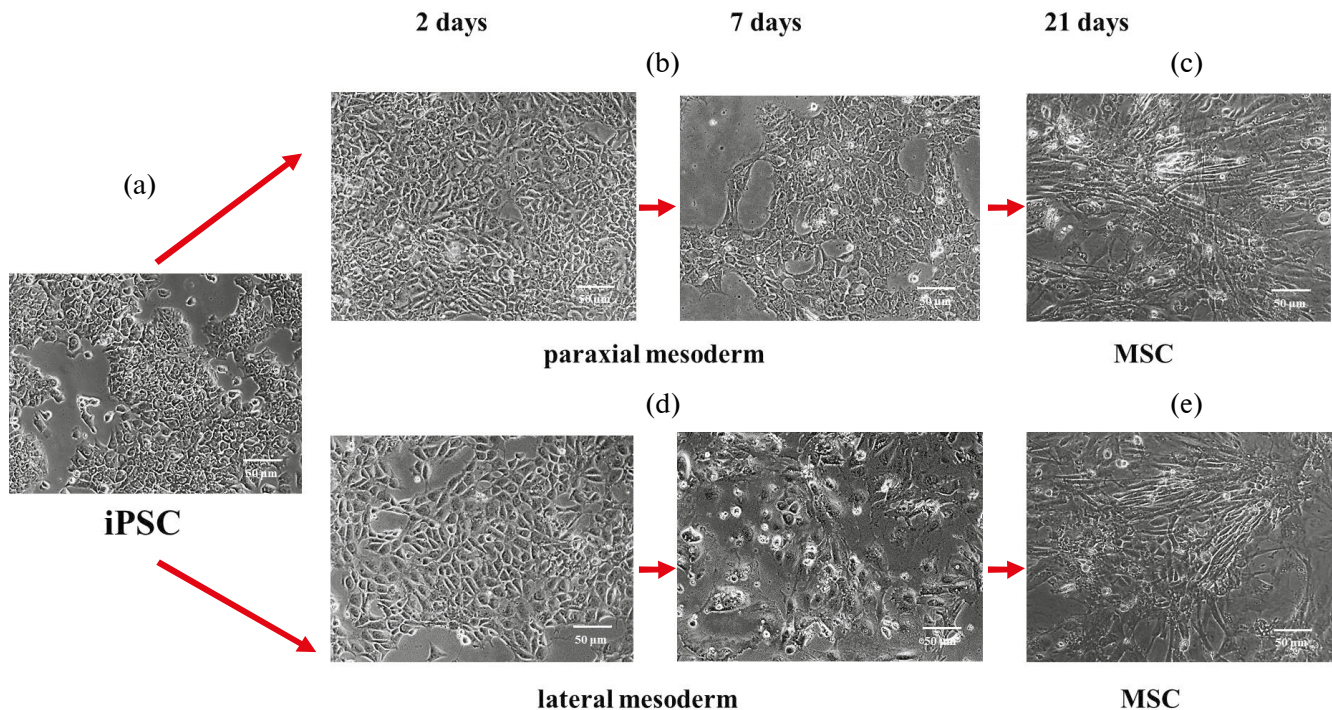


Рис. 1. Морфологические изменения клеток при дифференцировке ИПСК в мезодермальном направлении. (а) — исходная культура ИПСК. (б) — морфологические изменения клеток при индукции дифференцировки ИПСК в параксиальную мезодерму. (с) — МСК, полученные из клеток параксиальной мезодермы. (д) — морфологические изменения клеток при индукции дифференцировки ИПСК в латеральную мезодерму. (е) — МСК, полученные из клеток латеральной мезодермы. Фазовый контраст. iPSC — индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. MSC — мезенхимальные стромальные клетки.

ся в ПМ и ЛМ — *HAND1*, *HAND2*, *FOXF1*, *BMP4*, *WNT5A*, *DLL3*, *MSGN1*, *MEOX1*, а также рецепторов, характерных для МСК — *PDGFR*, *KDR* и *APLN*.

Клетки исходной культуры ИПСК экспрессировали гены плюрипотентности *POU5F1*, *SOX2*, *NANOG* (рис. 2а). В процессе дифференцировки уровень экспрессии этих генов в клетках ЛМ и ПМ, значительно снижался к 7 дню культивирования относительно исходной культуры ИПСК. К 21 дню культивирования в МСК экспрессия этих генов не обнаруживалась (рис. 2б, с).

Экспрессия генов примитивной полосы при индукции мезодермальной дифференцировки ИПСК

Ранее было показано, что для клеток примитивной полосы эмбриона человека характерна коэкспрессия генов *TBX1* и *MIXL1* [23, 24]. Исследование уровня экспрессии этих маркеров при мезодермальной дифференцировке ИПСК показало, что на второй день культивирования гены *TBX1* и *MIXL1* экспрессировались как в клетках ЛМ, так и в ПМ, (рис. 3а). Однако при дальнейшем культивировании уровень экспрессии этих генов в клетках обеих

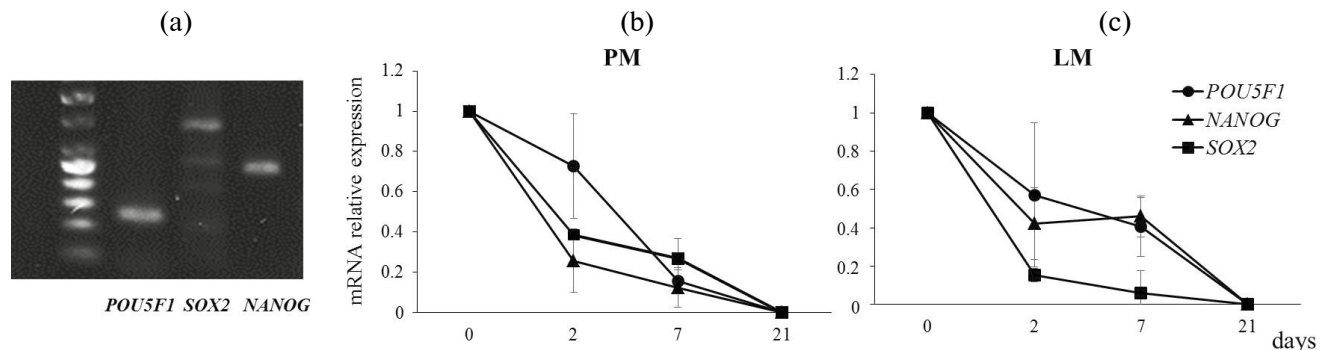


Рис. 2. Экспрессия маркеров плюрипотентности при дифференцировке ИПСК в мезодермальном направлении. (а) — Экспрессия генов *POU5F1*, *SOX2*, *NANOG* в исходной культуре ИПСК. Электрофореграмма продуктов ПЦР. Изменение экспрессии маркеров плюрипотентности в ИПСК в процессе дифференцировки в параксиальную мезодерму (б) и латеральную мезодерму (с). Представлены средние величины и их ошибки 3-х независимых экспериментов. РМ — параксиальная мезодерма. ЛМ — латеральная мезодерма.

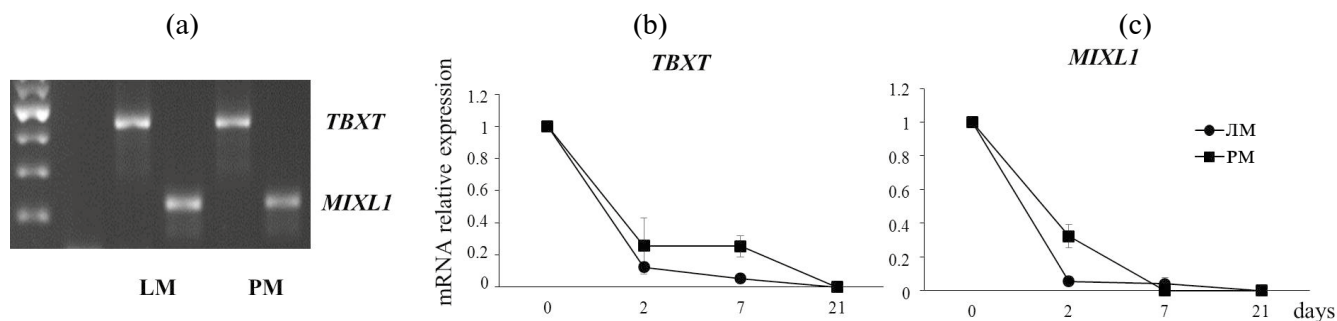


Рис. 3. Экспрессия генов примитивной полоски в клетках латеральной и параксиальной мезодермы, дифференцированных из ИПСК. (a) — коэкспрессия генов *TBXT* и *MIXL1* в клетках ЛМ и ПМ на 2 день культивирования. Электрофореграмма продуктов ПЦР. (b) и (c) — динамика изменения экспрессии генов *TBXT* и *MIXL1* в процессе дифференцировки ИПСК в ПМ и ЛМ. Представлены средние величины и их ошибки 3 независимых экспериментов. ПМ — параксиальная мезодерма. ЛМ — латеральная мезодерма.

культур быстро снижался. Этот факт указывает на то, что при дифференцировке ИПСК в мезодермальном направлении клетки в стадии примитивной полоски находятся кратковременно (рис. 3b, c).

Изменение экспрессионного профиля клеток ЛМ при дифференцировке из ИПСК

Клетки ЛМ получали из ИПСК через стадию примитивной полоски под воздействием комбинаций активина А, bFGF и BMP4. Образцы кле-

ток собирали на 2-й и 7-й день культивирования. В полученных клетках оценивали уровень экспрессии генов *HAND1*, *HAND2*, *FOXF1*, *BMP4*, *WNT5A*, *DLL3*, *MSGN1*, *PDGFR*, *KDR* и *APLN*. Мы показали, что уровень экспрессии генов *HAND1*, *HAND2*, и *BMP4*, характерных для клеток латеральной пластинки в эмбрионе человека, существенно возрастал в клетках ЛМ к 7-му дню культивирования по сравнению с исходной культурой ИПСК и клетками ПМ (рис. 4). Значимых различий в уровнях экспрессии остальных генов между ИПСК, клетками ЛМ и ПМ

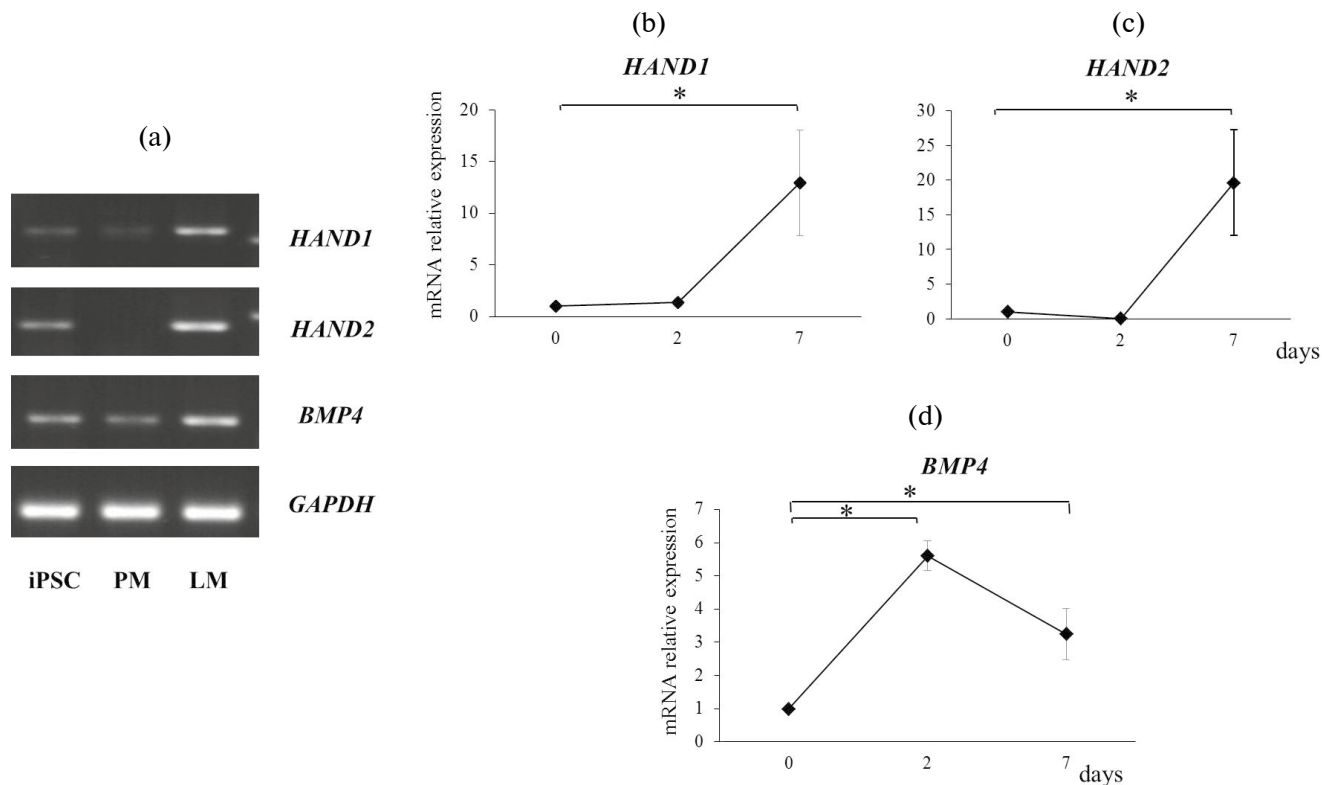


Рис. 4. Экспрессия генов *HAND1*, *HAND2*, *BMP4* в клетках ЛМ, дифференцированных из ИПСК. (a) — уровень экспрессии генов в ИПСК, клетках ЛМ и ПМ на 7-й день культивирования. Электрофореграмма продуктов ПЦР. Изменение экспрессии генов *HAND1* (b), *HAND2* (c), *BMP4* (d) в процессе дифференцировки ИПСК в ЛМ. Представлены средние величины и их ошибки 3 независимых экспериментов. Звездочка показывает достоверность различий при $p < 0.05$. iPSC — индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. ПМ — параксиальная мезодерма. ЛМ — латеральная мезодерма.

в процессе дифференцировки выявлено не было (данные не представлены).

Изменение экспрессионного профиля клеток ПМ в процессе дифференцировки из ИПСК

Клетки ПМ получали из ИПСК через стадию примитивной полоски под воздействием комбинаций активина А, bFGF и морфогена WNT-1. Образцы клеток собирали на 2-й и 7-й дни культивирования. Полученные клетки, так же как и клетки ЛМ, тестировали на экспрессию генов *HAND1*, *HAND2*, *FOXF1*, *BMP4*, *WNT5A*, *DLL3*, *MSGN1*, *PDGFR*, *KDR* и *APLN*. Мы показали, что уровень экспрессии генов *HAND1*, *HAND2* и *BMP4* снижался в клетках ПМ к 7-му дню культивирования по сравнению с клетками ЛМ (рис. 5а, б, с). В полученных клетках ПМ экспрессировались гены *WNT5A*, *DLL3*, *MSGN1B*, характерные для клеток ПМ в эмбрионе человека. Однако значимых различий в уровнях экспрессии этих генов между клетками ЛМ и ПМ выявлено не было (данные не представлены). Было также обнаружено снижение уровня экспрессии гена *WNT5A* в ЛМ и ПМ по сравнению с исходной линией ИПСК (рис. 5д).

Параксиальная мезодерма у эмбрионов сегментирована на сомитомеры. Показано, что ранние предшественники сомитов при дифференцировке в культуре плюрипотентных клеток человека экспрессируют ген *MEOX1* [23, 25, 26]. В наших экспериментальных условиях мы не выявили экспрессии этого гена в клетках ПМ. Однако при одностадийной неспецифической мезодермальной дифференцировке ИПСК в условиях культивирования в стандартной среде, поддерживающей рост МСК взрослого человека на 7 день культивирования в клетках обнаруживалась экспрессия гена *MEOX1* (рис. 5е). Этот факт указывает на то, что протоколы многостадийной мезодермальной дифференцировки ИПСК, используемые в данной работе, не позволяют получить клетки пресомитной мезодермы. Однако полученные результаты подтверждают принципиальную возможность получения таких клеток из ИПСК *in vitro*.

Дифференцировка клеток ЛМ и ПМ в МСК

Далее клетки ЛМ и ПМ были дифференцированы в МСК посредством культивирования в стандартной среде для поддержания роста

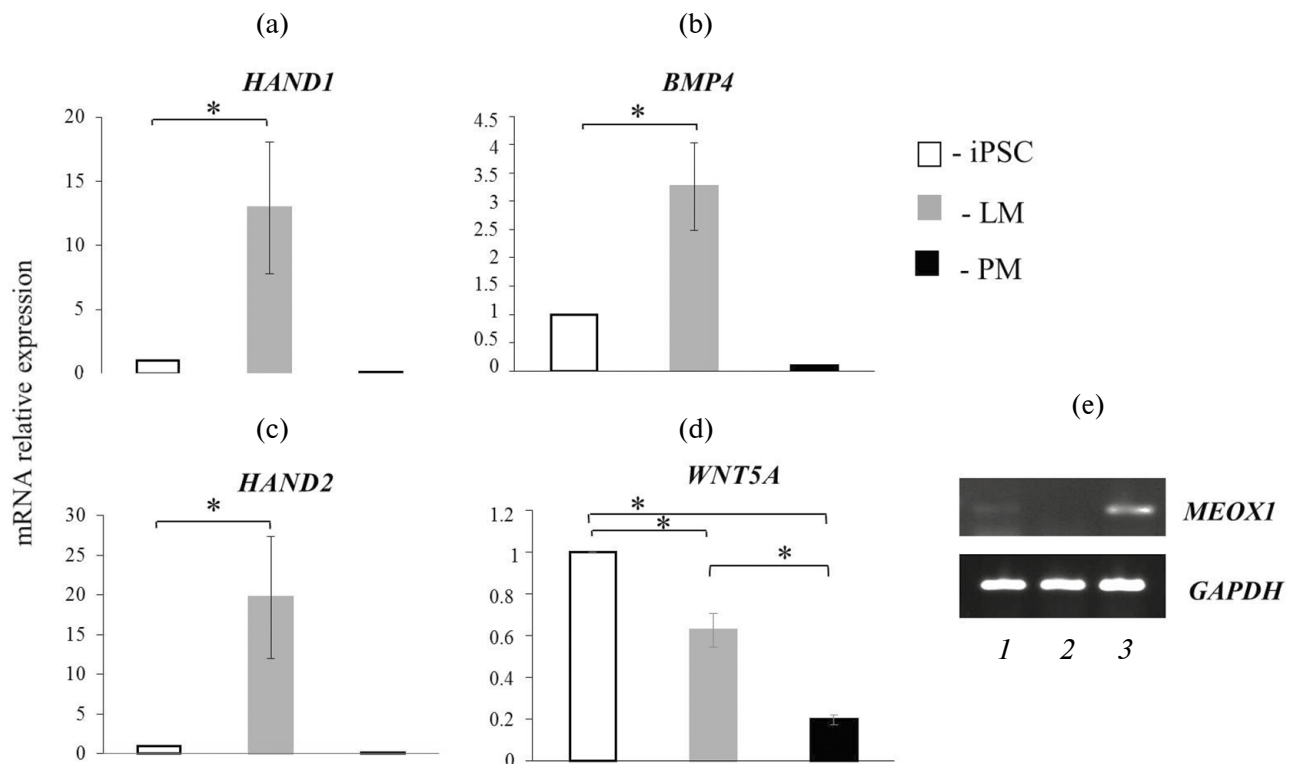


Рис. 5. Относительная экспрессия генов в клетках ПМ и ЛМ, дифференцированных из ИПСК. Уровень экспрессии генов *HAND1* (а), *HAND2* (б), *BMP4* (с) и *WNT5A* (д) на 7-й день дифференцировки относительно исходной культуры ИПСК. Представлены средние величины и их ошибки 3 независимых экспериментов. Звездочка показывает достоверность различий при $p < 0.05$. (е) — экспрессия гена пресомитной мезодермы *MEOX1* в клетках при специфической многостадийной и неспецифической одностадийной дифференцировке ИПСК в мезодермальном направлении на 7-й день культивирования. iPSC — индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. PM — параксиальная мезодерма. LM — латеральная мезодерма. 1 — клетки ЛМ, 2 — клетки ПМ, 3 — клетки, полученные в результате спонтанной мезодермальной дифференцировки ИПСК в стандартной среде для культивирования МСК.

недифференцированных МСК взрослого человека. Через три недели культивирования как из ЛМ, так и из ПМ были получены клетки фибробластоподобной морфологии, способные к адгезии к пластиковой поверхности. Исследование экспрессии панмезодермальных маркеров в МСК, дифференцированных из ЛМ и ПМ, не выявило различий между этими клетками. Полученные клетки обладали сходными уровнями экспрессии всех исследованных маркеров: *HAND1*, *HAND2*, *FOXF1*, *BMP4*, *WNT5A*, *DLL3*, *MSGN1*, *MEOX1*, *PDGFR*, *KDR* и *APLN*. Кроме того, полученные из ЛМ и ПМ клетки по экспрессии поверхностных маркеров CD105, CD90 и CD73, отсутствию экспрессии маркеров гемопоэтических клеток CD45, CD34 и HLA-DR, а также способности дифференцироваться в адипогенном, хондрогенном и остеогенном направлении соответствовали МСК взрослого человека (данные не представлены).

Таким образом, из одного источника ИПСК были созданы и охарактеризованы изогенные модели МСК и их предшественников: клеток ЛМ и ПМ. Обнаружено, что полученные в результате дифференцировки ИПСК клетки ПМ и ЛМ обладают существенными отличиями в эпигенетическом статусе по сравнению с исходными ИПСК и МСК взрослого организма. Показано, что полученные клетки ПМ и ЛМ обладают экспрессионным профилем, характерным для этих клеток в эмбрионе человека. Полученные изогенные линии клеток МСК, ПМ и ЛМ позволят изучать молекулярные механизмы регенерации тканей на различных стадиях развития организма.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Безрубцовое заживление ран с полным восстановлением первоначальной структуры ткани у плода млекопитающих первого и второго триместров развития было экспериментально продемонстрировано на овцах [27], кроликах [28], крысах [29] и мышах [30]. Кроме того, экспериментальная модель ран кожи плода человека была описана Лоренцем в 1992 г. [31]. Было показано, что замечательной особенностью ран у плодов в эти периоды развития является полное отсутствие миофибробластов, что контрастирует с их появлением в более поздние фетальные и постнатальные периоды [32, 33]. Было обнаружено, что в фетальных фибробластоподобных клетках (МСК) уровни α -SMA значительно снижены по сравнению со взрослыми [34]. У фетальных фибробластов менее выражена сократительная реакция на жесткий внеклеточный матрикс и TGF- β 1 по сравнению с их кожными аналогами у взрослых [35, 36]. После ранения фетальные фибробласты мигрируют в раны и пролиферируют там гораздо быстрее, чем у взрослых [37]. Однако антифибротическая активность фетальных фибробластов изу-

чена недостаточно и имеющиеся к настоящему времени данные, полученные на животных моделях, не позволяют выявить конкретные молекулярные механизмы, ответственные за безрубцовое заживление фетальных ран.

Возможность получения изогенных клеточных моделей, соответствующих различным стадиям развития человека, открывает новые пути для исследования фенотипических и функциональных особенностей мезодермальных клеток взрослого и плода в провоспалительном микроокружении для выяснения механизмов, ответственных за безрубцовое заживление.

В настоящее время разработано множество стратегий спонтанной и направленной дифференцировки ИПСК человека в специализированные клетки трех зародышевых листков [38, 39, 40]. При мезодермальной дифференцировке ИПСК была продемонстрирована возможность получения как гемопоэтических клеток, так и различных типов популяций стромальных мезенхимальных клеток, включая МСК, кардиомиоциты, теноциты, хондроциты [41–46].

Недавние исследования показали, что при дифференцировке ИПСК в мезодермальном направлении МСК могут быть получены через несколько промежуточных стадий, включая стадии примитивной полосы [24, 47], нервного гребня [41, 48], нейромезодермальных предшественников [49], мезодермы боковой пластинки [47, 50], параксиальной мезодермы и сомитов [26]. Было установлено, что сигнальные молекулы WNT, FGF, BMP и ACTIVIN/NODAL играют важную роль в индукции и навигации альтернативных мезодермальных путей при дифференцировке ИПСК в МСК [23, 25, 51, 52]. В этой работе мы предприняли попытку получения изогенных линий МСК и их предшественников из параксиальной и латеральной мезодермы при последовательной дифференцировке одной линии ИПСК.

В последнее время идентифицированы как индуктивные, так и репрессивные сигнальные молекулы, определяющие этапы, имитирующие последовательность событий, происходящих во время эмбрионального развития, преодолевая которые, ИПСК способны вырабатывать разнообразное мезодермальное потомство. Было обнаружено, что образование примитивной полосы в линиях ИПСК инициируется после активации сигнальных путей TGF β , WNT и FGF. В нескольких работах было показано, что полученные из ИПСК клетки примитивной полосы характеризуются коэкспрессией транскрипционных факторов BRACHYURY, кодируемого геном *TBXT*, и MIXL1 [23, 24]. В нашей работе мы обнаружили, что в результате воздействия bFGF и активина А в культуре ИПСК снижается уровень экспрессии маркеров плюрипотентности *POU5F1*, *SOX2*, *NANOG* и происходит коммитирование кле-

ток в мезодермальном направлении. В результате в культуре возникала популяция клеток, коэкспрессирующих *TBXT* и *MIXL1* и, следовательно, фенотипически относящихся к примитивной полоске. Однако такие клетки существовали в культуре краткосрочно, быстро переходя в следующую фазу дифференцировки.

Раздвоение первичной полоски на ЛМ и ПМ в плюрипотентных клетках человека может быть вызвано компенсирующей активацией сигнальных путей BMP и WNT. Ранее было показано, что активация WNT с одновременным блокированием сигналов BMP в плюрипотентных клетках человека блокирует образование ЛМ и усиливает развитие ПМ. Напротив, ингибирование WNT и добавление экзогенного BMP индуцируют развитие ЛМ. Было показано, что клетки ЛМ характеризуются экспрессией *HAND1* и *FOXF1*. Клетки ПМ определяются по экспрессии *DLL3* и *MSGN1* [23, 26, 50, 53]. В нашей работе воздействие BMP4 на клетки примитивной полоски вызывало усиление в них экспрессии генов *HAND1*, *HAND2* и *BMP4*. Ген *FOXF1* также экспрессировался в этих клетках. Однако уровень экспрессии *FOXF1* клетках не претерпевал значимых изменений в процессе дифференцировки в ЛМ. Таким образом, в результате использования протокола дифференцировки через стадию примитивной полоски, были получены клетки, фенотипически соответствующие клеткам ЛМ эмбриона человека. С другой стороны, в наших экспериментальных условиях при воздействии на клетки примитивной полоски морфогена WNT-1 в них происходило снижение уровня экспрессии генов *HAND1*, *HAND2* и *BMP4* по сравнению с клетками ЛМ. Эти клетки также экспрессировали гены *DLL3* и *MSGN1*. Следовательно, клетки, полученные из ИПСК через стадию примитивной полоски с использованием WNT-1, фенотипически можно отнести к клеткам ПМ эмбриона человека.

ПМ у эмбрионов сегментирована на сомитомеры. Ингибирование сигнальных путей FGF/ERK и WNT направляет дифференцировку клеток ПМ, происходящих из плюрипотентных клеток человека, в сторону ранних предшественников сомитов, экспрессирующих *MEOX1* и *FOXC2* [23, 25, 26]. В наших экспериментах клетки ПМ, полученные при дифференцировке ИПСК, не экспрессировали ген *MEOX1*. Следовательно, используемый нами протокол специфической дифференцировки ИПСК в ПМ, к сожалению, не позволяет получить клетки пресомитной мезодермы.

Полученные нами с использованием линейно-специфических протоколов дифференцировки ИПСК клетки ЛМ, так же как и клетки ПМ, были способны в дальнейшем давать начало клеткам, соответствующим МСК взрослого человека по паттернами экспрессии генов, по экспрессии поверхностных маркеров CD105, CD90 и CD73, отсут-

ствию экспрессии маркеров гемопоэтических клеток CD45, CD34 и HLA-DR, а также способности дифференцироваться в адипогенном, хондрогенном и остеогенном направлении. Таким образом, мы установили, что полученные нами клетки ПМ и ЛМ, дифференцированные из ИПСК, являются предшественниками МСК.

В работах других исследователей также было показано, что МСК, полученные из ИПСК, демонстрируют типичный профиль поверхностных маркеров и потенциал дифференцировки, однако приобретают некоторые эпигенетические, фенотипические и функциональные особенности, отличные от МСК, выделенных из тканей взрослого человека. В нескольких исследованиях было показано, что МСК, полученные из ИПСК, обладают усиленной пролиферативной активностью и более высоким уровнем экспрессии CD10 и CD24, чем у взрослых МСК [49, 50, 54, 55]. Более того, МСК, полученные из ИПСК через ЛМ и ПМ, продемонстрировали более высокий остеогенный и хондрогенный, но меньший адипогенный потенциал *in vitro* по сравнению со взрослыми МСК [26, 47, 50]. В нашей работе нам не удалось провести сравнения между изогенными МСК, дифференцированными из ИПСК через ЛМ и ПМ, и МСК взрослого человека, т.к. исходными клетками для получения ИПСК были клетки эндотелия HUVEC.

В нашей работе нам также не удалось выявить различия между МСК, полученными из ПМ и ЛМ, по экспрессии мезодермальных маркеров, которые мы использовали в этой работе. Однако в других работах было показано, что МСК, происходящие из ИПСК, приобретают сигнатуру генов, связанную с омоложением, в частности экспрессию *INHBE*, *DNMT3B*, *POU5F1P1*, *CDKN1C* и *GCNT2*, которые также экспрессируются в ИПСК, но не в родительских взрослых МСК [56, 57]. Детальное сравнение транскриптомов между МСК, происходящими из ИПСК, и МСК взрослых показало, что факторы транскрипции развития *HOXD1*, *NKX2-5*, *LHX2* и *FGF12*, а также маркеры *LIFR*, *PTGFRN*, *PVR* специфически активировались в МСК, происходящих из ИПСК [58].

В нескольких исследованиях сообщалось, что помимо линейно-специфической дифференцировки МСК могут быть получены непосредственно из ИПСК без какого-либо сигнального контроля промежуточных стадий с использованием сред, содержащих сыворотку [59–61]. В этой работе мы также опробовали протокол одностадийной неспецифической дифференцировки ИПСК в МСК с использованием стандартной среды для культивирования МСК. На 7-й день культивирования в культуре появлялись популяции клеток, экспрессирующих панмезодермальные маркеры, в том числе *MEOX1*. Полученные результаты указывают на то, что при такой неспецифической дифференцировке в культуре могут

одновременно образовываться популяции клеток, фенотипически относящихся к разным по развитию клонально-специфическим мезодермальным предшественникам.

Фенотипические свойства и функциональное состояние МСК в значительной степени зависят от сигналов, поступающих из внешнего микроокружения, и определяют успешность заживления раны, а также степень рубцевания. Ранее нами было показано, что у взрослого человека воздействие IFN- γ и рецепторное взаимодействие молекул HLA-DR и костимуляторных молекул CD80/CD86 на МСК с их контррецепторами CTLA4/CD28 на Т-лимфоцитах, индуцируя синтез IDO в МСК, образуют регуляторную петлю с положительной обратной связью, способствующую снижению активации и пролиферации активированных иммунных клеток и затуханию воспалительной реакции в хронических ранах [14, 62–64]. Однако функциональная активность МСК в ранах взрослого человека, хотя и стимулирует заживление, не препятствует образованию рубца [64].

Мы полагаем, что создание линий изогенных мезодермальных клеток различных стадий развития человека, дифференцированных из ИПСК, и сравнительный анализ их функциональной активности при рецептор-зависимой активации провоспалительных сигнальных путей позволит выявить ключевые молекулы и терапевтические мишени, минимизирующие образование рубцов. Понимание механизмов заживления ран предоставит возможности для разработки новых терапевтических средств, основанных на точном ингибировании или стимуляции элементов пути заживления ран.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных и участием людей в качестве объектов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 23-24-00026).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (С.Ю.Г.), проведение экспериментов и сбор данных (С.А.В., К.Е.В.), обработка данных (С.Ю.Г., С.А.В.), написание и редактирование текста статьи (С.Ю.Г., К.С.Л.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shaw TJ, Martin P (2009) Wound repair at a glance. *J Cell Sci* 122(Pt 18):3209–3213. <https://doi.org/10.1242/jcs.031187>
2. Marshall CD, Hu MS, Leavitt T, Barnes LA, Lorenz HP, Longaker MT (2018). Cutaneous Scarring: Basic Science, Current Treatments, and Future Directions. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 7(2):29–45. <https://doi.org/10.1089/wound.2016.0696>
3. Hu MS, Maan ZN, Wu JC, Rennert RC, Hong WX, Lai TS, Cheung AT, Walmsley GG, Chung MT, McArdle A, Longaker MT, Lorenz HP (2014) Tissue engineering and regenerative repair in wound healing. *Ann Biomed Eng* 42(7):1494–1507. <https://doi.org/10.1007/s10439-014-1010-z>
4. Kim EY, Hussain A, Khachemoune A (2022) Evidence-based management of keloids and hypertrophic scars in dermatology. *Arch Dermatol Res* 315(6):1487–1495. <https://doi.org/10.1007/s00403-022-02509-x>
5. Colwell AS, Longaker MT, Lorenz HP (2003) Fetal wound healing. *Front Biosci* 1;8: s1240–1248. <https://doi.org/10.2741/1183>
6. Moore AL, Marshall CD, Barnes LA, Murphy MP, Ransom RC, Longaker MT (2018) Scarless wound healing: Transitioning from fetal research to regenerative healing. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 7(2):10.1002/wdev.309. <https://doi.org/10.1002/wdev.309>
7. Suzdaltseva Y, Kiselev SL (2023) Mesodermal Derivatives of Pluripotent Stem Cells Route to Scarless Healing. *Int J Mol Sci* 24(15):11945. <https://doi.org/10.3390/ijms241511945>
8. Pittenger MF, Discher DE, Péault BM, Phinney DG, Hare JM, Caplan AI (2019) Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. *NPJ Regen Med* 4:22. <https://doi.org/10.1038/s41536-019-0083-6>. eCollection 2019
9. Fu Y, Karbaat L, Wu L, Leijten J, Both SK, Karperien M (2017) Trophic Effects of Mesenchymal Stem Cells in Tissue Regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 23(6):515–528. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2016.0365>
10. Han Y, Yang J, Fang J, Zhou Y, Candi E, Wang J, Hua D, Shao C, Shi Y (2022) The secretion profile of mesenchymal stem cells and potential applications in treating human diseases. *Signal Transduct Target Ther* 7(1):92. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00932-0>
11. Kusuma GD, Carthew J, Lim R, Frith JE (2017) Effect of the Microenvironment on Mesenchymal Stem Cell Paracrine Signaling: Opportunities to Engineer the Therapeutic Effect. *Stem Cells Dev* 26(9):617–631. <https://doi.org/10.1089/scd.2016.0349>
12. Le Blanc K, Davies LC (2015) Mesenchymal stromal cells and the innate immune response. *Immunol Lett* 168(2):140–146. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2015.05.004>
13. Weiss ARR, Dahlke MH (2019) Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells (MSCs): Mechanisms of Action of Living, Apoptotic, and Dead MSCs. *Front Immunol* 10:1191. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01191>

14. *Suzdaltseva Y, Goryunov K, Silina E, Manturova N, Stupin V, Kiselev SL* (2022) Equilibrium among Inflammatory Factors Determines Human MSC-Mediated Immunosuppressive Effect. *Cells* 11(7):1210.
<https://doi.org/10.3390/cells11071210>
15. *Guillén MI, Platas J, Pérez Del Caz MD, Mirabet V, Alcaraz MJ* (2018) Paracrine Anti-inflammatory Effects of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells in Human Monocytes. *Front Physiol* 31(9):661.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00661>
16. *Mareschi K, Castiglia S, Sanavio F, Rustichelli D, Mura-ro M, Defedele D, Bergallo M, Fagioli F* (2016) Immunoregulatory effects on T lymphocytes by human mesenchymal stromal cells isolated from bone marrow, amniotic fluid, and placenta. *Exp Hematol* 44(2):138–150.e1.
<https://doi.org/10.1016/j.exphem.2015.10.009>
17. *Jiang D, Scharffetter-Kochanek K* (2020) Mesenchymal Stem Cells Adaptively Respond to Environmental Cues Thereby Improving Granulation Tissue Formation and Wound Healing. *Front Cell Dev Biol* 8:697.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00697>
18. *Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E* (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8(4):315–317.
<https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
19. *Cheung C, Bernardo AS, Trotter MW, Pedersen RA, Sinha S* (2012) Generation of human vascular smooth muscle subtypes provides insight into embryological origin-dependent disease susceptibility. *Nat Biotechnol* 30(2):165–173.
<https://doi.org/10.1038/nbt.2107>
20. *Isern J, García-García A, Martín AM, Arranz L, Martín-Pérez D, Torroja C, Sánchez-Cabo F, Méndez-Ferrer S* (2014) The neural crest is a source of mesenchymal stem cells with specialized hematopoietic stem cell niche function. *Elife* 3: e03696.
<https://doi.org/10.7554/eLife.03696>
21. *Sheng G* (2015) The developmental basis of mesenchymal stem/stromal cells (MSCs). *BMC Dev Biol* 15:44.
<https://doi.org/10.1186/s12861-015-0094-5>
22. *Shutova MV, Bogomazova AN, Lagarkova MA, Kiselev SL* (2009) Generation and characterization of human induced pluripotent stem cells. *Acta Naturae* 1(2):91–92.
<https://doi.org/10.1007/PMC3347519>
23. *Loh KM, Chen A, Koh PW, Deng TZ, Sinha R, Tsai JM, Barkal AA, Shen KY, Jain R, Morganti RM, Shyh-Chang N, Fernhoff NB, George BM, Wernig G, Salomon REA, Chen Z, Vogel H, Epstein JA, Kundaje A, Talbot WS, Beachy PA, Ang LT, Weissman IL* (2016) Mapping the Pairwise Choices Leading from Pluripotency to Human Bone, Heart, and Other Mesoderm Cell Types. *Cell* 166(2):451–467.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.011>
24. *Tran NT, Trinh QM, Lee GM, Han YM* (2012) Efficient differentiation of human pluripotent stem cells into mesenchymal stem cells by modulating intracellular signaling pathways in a feeder/serum-free system. *Stem Cells Dev* 21(7):1165–1175.
<https://doi.org/10.1089/scd.2011.0346>
25. *Xi H, Fujiwara W, Gonzalez K, Jan M, Liebscher S, Van Handel B, Schenke-Layland K, Pyle AD* (2017) In Vivo Human Somitegenesis Guides Somite Development from hPSCs. *Cell Rep* 18(6):1573–1585.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.01.040>
26. *Nakajima T, Shibata M, Nishio M, Nagata S, Alev C, Sakurai H, Toguchida J, Ikeya M* (2018) Modeling human somite development and fibrodysplasia ossificans progressiva with induced pluripotent stem cells. *Development* 145(16): dev165431.
<https://doi.org/10.1242/dev.165431>
27. *Burrington JD* (1971) Wound healing in the fetal lamb. *J Pediatr Surg* 6(5):523–528.
[https://doi.org/10.1016/0022-3468\(71\)90373-3](https://doi.org/10.1016/0022-3468(71)90373-3)
28. *Somasundaram K, Prathap K* (1970) Intra-uterine healing of skin wounds in rabbit foetuses. *J Pathol* 100(2):81–86.
<https://doi.org/10.1002/path.1711000202>
29. *Goss AN* (1977) Intra-uterine healing of fetal rat oral mucosal, skin and cartilage wounds. *J Oral Pathol* 6(1):35–43.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.1977.tb01792.x>
30. *Gnyawali SC, Sinha M, El Masry MS, Wulff B, Ghatak S, Soto-Gonzalez F, Wilgus TA, Roy S, Sen CK* (2020) High resolution ultrasound imaging for repeated measure of wound tissue morphometry, biomechanics and hemodynamics under fetal, adult and diabetic conditions. *PLoS One* 15(11): e0241831.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241831>
31. *Lorenz HP, Longaker MT, Perkocha LA, Jennings RW, Harrison MR, Adzick NS* (1992) Scarless wound repair: a human fetal skin model. *Development* 114(1):253–259.
<https://doi.org/10.1242/dev.114.1.253>
32. *Estes JM, Vande Berg JS, Adzick NS, MacGillivray TE, Desmoulière A, Gabbiani G* (1994) Phenotypic and functional features of myofibroblasts in sheep fetal wounds. *Differentiation* 56(3):173–181.
<https://doi.org/10.1046/j.1432-0436.1994.5630173.x>
33. *Cass DL, Sylvester KG, Yang EY, Crombleholme TM, Adzick NS* (1997) Myofibroblast persistence in fetal sheep wounds is associated with scar formation. *J Pediatr Surg* 32(7):1017–1021.
[https://doi.org/10.1016/s0022-3468\(97\)90390-0](https://doi.org/10.1016/s0022-3468(97)90390-0)
34. *Satish L, Johnson S, Wang JH, Post JC, Ehrlich GD, Kathju S* (2010) Chaperonin containing T-complex polypeptide subunit eta (CCT-eta) is a specific regulator of fibroblast motility and contractility. *PLoS One* 5(4): e10063.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010063>
35. *Moulin V, Tam BY, Castilloux G, Auger FA, O'Connor-McCourt MD, Philip A, Germain L* (2001) Fetal and adult human skin fibroblasts display intrinsic differences in contractile capacity. *J Cell Physiol* 188(2):211–222.
<https://doi.org/10.1002/jcp.1110>
36. *Jerrell RJ, Leih MJ, Parekh A* (2019) The altered mechanical phenotype of fetal fibroblasts hinders myofibroblast differentiation. *Wound Repair Regen* 27(1):29–38.
<https://doi.org/10.1111/wrr.12677>
37. *Brink HE, Miller GJ, Beredjiklian PK, Nicoll SB* (2006) Serum-dependent effects on adult and fetal tendon fibroblast migration and collagen expression. *Wound Repair Regen* 14(2):179–186.
<https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2006.00108.x>

38. Nekrasov ED, Vigont VA, Klyushnikov SA, Lebedeva OS, Vassina EM, Bogomazova AN, Chestkov IV, Semashko TA, Kiseleva E, Suldina LA, Bobrovsky PA, Zimina OA, Ryazantseva MA, Skopin AY, Illarionovskiy SN, Kaznacheyeva EV, Lagarkova MA, Kiselev SL (2016) Manifestation of Huntington's disease pathology in human induced pluripotent stem cell-derived neurons. *Mol Neurodegener* 11:27. <https://doi.org/10.1186/s13024-016-0092-5>
39. Philonenko ES, Shutova MV, Khomyakova EA, Vassina EM, Lebedeva OS, Kiselev SL, Lagarkova MA (2017) Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells into Mesodermal and Ectodermal Derivatives Is Independent of the Type of Isogenic Reprogrammed Somatic Cells. *Acta Naturae* 9(1):68–74. <https://PMC5406662>
40. Panova AV, Klementieva NV, Sycheva AV, Korobko EV, Sosnovtseva AO, Krasnova TS, Karpova MR, Rubtsov PM, Tikhonovich YV, Tiulpakov AN, Kiselev SL (2022) Aberrant Splicing of INS Impairs Beta-Cell Differentiation and Proliferation by ER Stress in the Isogenic iPSC Model of Neonatal Diabetes. *Int J Mol Sci* 23(15):8824. <https://doi.org/10.3390/ijms23158824>
41. Chijimatsu R, Ikeya M, Yasui Y, Ikeda Y, Ebina K, Moriguchi Y, Shimomura K, Hart DA, Hideki Y, Norimasa N (2017) Characterization of Mesenchymal Stem Cell-Like Cells Derived From Human iPSCs via Neural Crest Development and Their Application for Osteochondral Repair. *Stem Cells Int* 2017:1960965. <https://doi.org/10.1155/2017/1960965>
42. Kimura M, Furukawa H, Shoji M, Shinozawa T (2019) Increased mesodermal and mesendodermal populations by BMP4 treatment facilitates human iPSC line differentiation into a cardiac lineage. *J Stem Cells Regen Med* 15(2):45–51. <https://doi.org/10.46582/jsrm.1502009>
43. Wang Y, Wang H, Guo J, Gao J, Wang M, Xia M, Wen Y, Su P, Yang M, Liu M, Shi L, Cheng T, Zhou W, Zhou J (2020) LGR4, Not LGR5, Enhances hPSC Hematopoiesis by Facilitating Mesoderm Induction via TGF- β Signaling Activation. *Cell Rep* 31(5):107600. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107600>
44. Kamatani T, Hagizawa H, Yarimitsu S, Morioka M, Koyamatsu S, Sugimoto M, Kodama J, Yamane J, Ishiguro H, Shichino S, Abe K, Fujibuchi W, Fujie H, Kaito T, Tsumaki N (2022) Human iPS cell-derived cartilaginous tissue spatially and functionally replaces nucleus pulposus. *Biomaterials* 284:121491. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2022.121491>
45. Philonenko ES, Tan Y, Wang C, Zhang B, Shah Z, Zhang J, Ullah H, Kiselev SL, Lagarkova MA, Li D, Dai Y, Samokhvalov IM (2021) Recapitulative haematopoietic development of human pluripotent stem cells in the absence of exogenous haematopoietic cytokines. *J Cell Mol Med* 25(18):8701–8714. <https://doi.org/10.1111/jcmm.16826>
46. Nakajima T, Ikeya M (2021). Development of pluripotent stem cell-based human tenocytes. *Dev Growth Differ* 63(1):38–46. <https://doi.org/10.1111/dgd.12702>
47. Liu TM, Yildirim ED, Li P, Fang HT, Denslin V, Kumar V, Loh YH, Lee EH, Cool SM, Teh BT, Hui JH, Lim B, Shyh-Chang N (2020) Ascorbate and Iron Are Required for the Specification and Long-Term Self-Renewal of Human Skeletal Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cell Reports* 14(2):210–225. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2020.01.002>
48. Fukuta M, Nakai Y, Kirino K, Nakagawa M, Sekiguchi K, Nagata S, Matsumoto Y, Yamamoto T, Umeda K, Heike T, Okumura N, Koizumi N, Sato T, Nakahata T, Saito M, Otsuka T, Kinoshita S, Ueno M, Ikeya M, Toguchida J (2014) Derivation of mesenchymal stromal cells from pluripotent stem cells through a neural crest lineage using small molecule compounds with defined media. *PLoS One* 9(12):e112291. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112291>. eCollection 2014
49. Wang H, Li D, Zhai Z, Zhang X, Huang W, Chen X, Huang L, Liu H, Sun J, Zou Z, Fan Y, Ke Q, Lai X, Wang T, Li X, Shen H, Xiang AP, Li W (2019) Characterization and Therapeutic Application of Mesenchymal Stem Cells with Neuromesodermal Origin from Human Pluripotent Stem Cells. *Theranostics* 9(6):1683–1697. <https://doi.org/10.7150/thno.30487>. eCollection 2019
50. Wei Y, Wang B, Jia L, Huang W, Xiang AP, Fang C, Liang X, Li W (2022) Lateral Mesoderm-Derived Mesenchymal Stem Cells With Robust Osteochondrogenic Potential and Hematopoiesis-Supporting Ability. *Front Mol Biosci* 9:767536. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.767536>. eCollection 2022
51. Umeda K, Zhao J, Simmons P, Stanley E, Elefanty A, Nakayama N (2012) Human chondrogenic paraxial mesoderm, directed specification and prospective isolation from pluripotent stem cells. *Sci Rep* 2:455. <https://doi.org/10.1038/srep00455>
52. Kishimoto K, Iwasawa K, Sorel A, Ferran-Heredia C, Han L, Morimoto M, Wells JM, Takebe T, Zorn AM (2022) Directed differentiation of human pluripotent stem cells into diverse organ-specific mesenchyme of the digestive and respiratory systems. *Nat Protoc* 17(11):2699–2719. <https://doi.org/10.1038/s41596-022-00733-3>
53. Smith CA, Humphreys PA, Naven MA, Woods S, Mancini FE, O'Flaherty J, Meng QJ, Kimber SJ (2023) Directed differentiation of hPSCs through a simplified lateral plate mesoderm protocol for generation of articular cartilage progenitors. *PLoS One* 18(1):e0280024. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0280024>
54. Kimbrel EA, Kouris NA, Yavanian GJ, Chu J, Qin Y, Chan A, Singh RP, McCurdy D, Gordon L, Levinson RD, Lanza R (2014) Mesenchymal stem cell population derived from human pluripotent stem cells displays potent immunomodulatory and therapeutic properties. *Stem Cells Dev* 23(14):1611–1624. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0554>
55. Eto S, Goto M, Soga M, Kaneko Y, Uehara Y, Mizuta H, Era T (2018) Mesenchymal stem cells derived from human iPS cells via mesoderm and neuroepithelium have different features and therapeutic potentials. *PLoS One* 13(7):e0200790. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200790>. eCollection 2018

56. *Spitzhorn LS, Megges M, Wruck W, Rahman MS, Otte J, Degistirici Ö, Meisel R, Sorg RV, Oreffo ROC, Adjaye J* (2019) Human iPSC-derived MSCs (iMSCs) from aged individuals acquire a rejuvenation signature. *Stem Cell Res Ther* 10(1):100. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1209-x>
57. *Wruck W, Graffmann N, Spitzhorn LS, Adjaye J* (2021) Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Mesenchymal Stem Cells Acquire Rejuvenation and Reduced Heterogeneity. *Front Cell Dev Biol* 9:717772. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.717772>
58. *Billing AM, Ben Hamidane H, Dib SS, Cotton RJ, Bhagwat AM, Kumar P, Hayat S, Yousri NA, Goswami N, Suhre K, Rafii A, Graumann J* (2016) Comprehensive transcriptomic and proteomic characterization of human mesenchymal stem cells reveals source specific cellular markers. *Sci Rep* 6:21507. <https://doi.org/10.1038/srep21507>
59. *Liu Y, Goldberg AJ, Dennis JE, Gronowicz GA, Kuhn LT* (2012) One-step derivation of mesenchymal stem cell (MSC)-like cells from human pluripotent stem cells on a fibrillar collagen coating. *PLoS One* 7(3): e33225. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033225>
60. *Villa-Diaz LG, Brown SE, Liu Y, Ross AM, Lahann J, Parent JM, Krebsbach PH* (2012) Derivation of mesenchymal stem cells from human induced pluripotent stem cells cultured on synthetic substrates. *Stem Cells* 30(6):1174–1181. <https://doi.org/10.1002/stem.1084>
61. *Diederichs S, Tuan RS* (2014) Functional comparison of human-induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal cells and bone marrow-derived mesenchymal stromal cells from the same donor. *Stem Cells Dev* 23(14):1594–1610. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0477>
62. *Rubtsov Y, Goryunov K, Romanov A, Suzdaltseva Y, Sharonov G, Tkachuk V* (2017) Molecular Mechanisms of Immunomodulation Properties of Mesenchymal Stromal Cells: A New Insight into the Role of ICAM-1. *Stem Cells Int* 2017:6516854. <https://doi.org/10.1155/2017/6516854>
63. *Suzdaltseva YG, Goryunov KV, Rubtsov YP* (2018) The Role of Intercellular Contacts in Induction of Indoleamine-2,3-Dioxygenase Synthesis in MMSC from Adipose Tissue. *Cell and Tissue Biology* 12: 391–401. <https://doi.org/10.1134/S1990519X18050085>
64. *Suzdaltseva Y, Zhidkih S, Kiselev SL, Stupin V* (2020) Locally Delivered Umbilical Cord Mesenchymal Stromal Cells Reduce Chronic Inflammation in Long-Term Non-healing Wounds: A Randomized Study. *Stem Cells Int* 2020:5308609. <https://doi.org/10.1155/2020/5308609>

EXPRESSION PROFILE OF THE ISOGENIC EARLY MESODERMAL CELLS DIFFERENTIATED FROM INDUCED PLURIPOTENT HUMAN STEM CELLS

A. V. Selezneva, E. V. Korobko, S. L. Kiselev, and Y. G. Suzdaltseva[#]

Vavilov Institute of General Genetics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

[#] e-mail: yu_suzdaltseva@mail.ru

Scar formation during normal regeneration of damaged tissue can lead to noticeable cosmetic and functional defects of organs and significantly affect the quality of life. However, it is known that fetal tissues before the third trimester of pregnancy are capable of complete regeneration with the restoration of the original architecture and functional activity. Understanding the cellular and molecular mechanisms of fetal wound regeneration will provide the basis for the development of successful treatments aimed to minimize scarring. Mesenchymal stromal cells (MSCs) play an important role in tissue repair, since the cytokines, chemokines, growth factors and extracellular vesicles they secrete are involved in the regulation of migration, angiogenesis, synthesis and remodeling of the extracellular matrix. Mesodermal differentiation of human induced pluripotent stem cells (iPSCs) makes possible to reproduce the successive stages of embryogenesis in vitro and to create isogenic cell models of MSCs corresponding to different stages of human development. In this work, we performed the directed multistage mesodermal differentiation of iPSCs into isogenic cell lines of the primitive streak, lateral and paraxial mesoderm and a comparative analysis of their expression profiles was carried out. It was shown that the resulting cells of the lateral mesoderm (LM) and paraxial mesoderm (PM) are precursors for MSCs. MSCs obtained as a result of differentiation of both LM and PM cells had a similar profile for the expression of pan-mesodermal markers. Comparative analysis of the functional activity of MSCs and their precursors in a pro-inflammatory microenvironment will provide molecular tools for a better understanding of the fundamental mechanisms of fetal tissue regeneration and identify therapeutic targets to minimize scarring and pathological processes characterized by excessive fibroplasia.

Keywords: mesenchymal stromal cells; human pluripotent stem cells differentiation; tissue regeneration