

## ЛИНИИ ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ОТ ПАЦИЕНТА С БОЛЕЗНЬЮ ХАНТИНГТОНА КАК ПЕРСПЕКТИВНАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПАТОГЕНЕЗА ЗАБОЛЕВАНИЯ: ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА

© 2024 Н. Красковская<sup>1\*</sup>, А. Кольцова<sup>1</sup>, П. Парфенова<sup>1</sup>, А. Шатрова<sup>1</sup>, Н. Ярцева<sup>1</sup>,  
В. Назаров<sup>2</sup>, Е. Девяткина<sup>2</sup>, М. Хотин<sup>1</sup>, Н. Михайлова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии Российской академии наук,  
194064 Санкт-Петербург, Россия; электронная почта: [ninakraskovskaya@gmail.com](mailto:ninakraskovskaya@gmail.com)

<sup>2</sup> Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет  
им. акад. И.П. Павлова, 197022 Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 22.11.2023

После доработки 21.05.2024

Принята к публикации 13.06.2024

Болезнь Хантингтона (БХ) – наследственное неизлечимое заболевание, вызванное мутацией и увеличением числа повторов CAG в гене *HTT*, кодирующем белок хантингтин (НТТ). Несмотря на многочисленные исследования, проведённые на различных клеточных и животных моделях, конкретные механизмы, объясняющие биологическую роль мутантного хантингтина (mНТТ) и его токсичность для нейронов стриатума, до настоящего времени не установлены, эффективная терапия для пациентов не разработана. Нами получена и охарактеризована новая линия дермальных фибробластов HDDF (Huntington Disease Dermal Fibroblasts) от пациента с подтверждённым диагнозом БХ. Приведены ростовые характеристики линии HDDF, окраска на канонические маркеры, проведено кариотипирование и фенотипирование клеток. Проведена прямая дифференцировка фибробластов полученной линии в индуцированные нейроны стриатума. Новая линия фибробластов может быть использована в качестве клеточной модели для изучения биологической роли mНТТ и различных проявлений патогенеза БХ как на самих фибробластах, так и на индуцированных нейрональных клетках, полученных с помощью методов репрограммирования.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** фибробласты кожи, болезнь Хантингтона, CAG-повторы, хантингтин, полиглутамин, трансдифференцировка.

DOI: 10.31857/S0320972524070046 EDN: WNIDDL

### ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Хантингтона (БХ) представляет собой неизлечимое нейродегенеративное заболевание, наследуемое по аутосомно-доминантному типу и вызванное экспансией полиглутаминового повтора CAG в гене *HTT*, кодирующем белок хантингтин (НТТ). Болезнь развивается преимущественно в возрасте 30–50 лет, однако выделяют также ювенальные формы, развивающиеся в детском и подростковом возрасте. Болезнь развивается при наличии более 36 повторяющихся кодонов CAG, кодирующих аминокислоту глутамин.

Принятые сокращения: БХ – болезнь Хантингтона; ИП – индекс пролиферации.

\* Адресат для корреспонденции.

Характерными симптомами являются моторные и когнитивные нарушения, депрессия, психоэмоциональные изменения. Наиболее частым симптомом БХ является хорея – характерное нарушение двигательной активности, проявляющееся в виде неконтролируемых, отрывистых движений, обусловленных повреждением области стриатума и коры головного мозга пациентов [1]. Несмотря на идентификацию генетической причины заболевания, специфические механизмы, лежащие в основе дегенерации области стриатума и коры головного мозга, остаются неизвестными.

С периода раннего эмбрионального развития мутантный хантингтин (mНТТ) присутствует практически во всех клетках организма, но его точная функция неизвестна. На клеточном уровне mНТТ вызывает нарушения в функционировании

нейронов, несущих агрегаты мутантного белка, но не установлены причины, обуславливающие его токсичность для клеток. Однозначная связь между мутацией, агрегацией и дегенеративными изменениями в клетках до сих пор не установлена. Неудачи при выборе терапевтических стратегий при лечении БХ могут быть связаны с ограниченными возможностями получения релевантных моделей БХ для воспроизведения патогенеза, наблюдаемого у людей.

Значительный вклад в современное понимание природы БХ был сделан благодаря изучению посмертной мозговой ткани пациентов, а также использованию животных и клеточных моделей патологии. Хотя животные модели *in vivo* дают возможность изучать патологию заболевания, ни одна из них не воспроизводит полностью патологическую картину, наблюдаемую у человека [2], и представления о механизмах прогрессирования БХ всё ещё остаются крайне ограниченными.

Создание клеточной модели БХ с использованием клинически значимых типов клеток пациентов может иметь решающее значение для раскрытия сложных молекулярных и клеточных механизмов, лежащих в основе патогенеза этого заболевания. Перспективным объектом изучения могут стать дермальные фибробласты от пациентов с БХ. Дермальные фибробласты – клетки соединительной ткани кожи, которые имеют множество преимуществ: они обладают уникальными физиологическими функциями, продуцируют и ремоделируют внеклеточный матрикс, обеспечивают гомеостаз кожи, демонстрируют высокие пролиферативные характеристики, а также доступны для получения культур *in vitro* в связи с доступностью образцов кожи доноров. Дермальные фибробласты активно применяют для изучения нейродегенеративных заболеваний пациентов с наследственными мутациями, в том числе с болезнью Альцгеймера [3, 4], Паркинсона [5–7], боковым амиотрофическим склерозом [8–10] и т.д. В отличие от трансформированных клеточных линий, неиммortalизованные клеточные линии фибробластов поддерживают функции, критически важные для регуляции транскрипции *HTT* и целостности генома [11].

Фибробласты также используются для изучения роли *mHTT* при БХ. Согласно имеющимся литературным данным, фибробласты от пациентов с БХ отличаются морфологией, скоростью пролиферации, сниженной устойчивостью к различным факторам стресса, изменением морфологии оргanelл, для них показаны различия в уровне убиквитинизированных белков, более высокие уровни активных форм кислорода (АФК), *mHTT* и маркера аутофагии LAMP2A [12]. Также показано различие

в транскриптомах фибробластов от пациентов с БХ и здоровых доноров [13]. В ряде исследований на дермальных фибробластах было показано, что митохондриальные и биоэнергетические дефекты способствуют прогрессированию заболевания, хотя конкретный молекулярный механизм, с помощью которого *mHTT* влияет на энергетический обмен, остаётся неясным [14, 15]. В фибробластах, полученных от пациентов с ювенальной формой БХ, также наблюдалась повышенная активность протеасом [16].

Помимо изучения роли *mHTT* в делящихся клетках, фибробласты от пациентов также могут выступать в качестве «стартового материала» для получения индуцированных нейронов – как при помощи технологии получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток [17–20], так и при помощи прямого репрограммирования [21–23]. В настоящий момент оба подхода активно развиваются и совершенствуются. Кроме модели для изучения заболевания, популяции индуцированных нейронов могут использоваться в качестве платформы для скрининга и оценки эффективности потенциальных лекарственных препаратов, успешно зарекомендовавших себя на животных моделях [24, 25]. Также возлагаются большие надежды на технологии регенеративной медицины, связанные с замещением повреждённой ткани мозга индуцированными нейронами [26].

В настоящий момент в российских коллекциях клеточных культур отсутствуют паспортизированные линии фибробластов, полученные от пациентов с нейродегенеративными заболеваниями, в том числе с БХ. Цель данной работы – получение и характеристика неиммortalизованной линии дермальных фибробластов HDDF (Huntington Disease Dermal Fibroblasts) от пациента с подтверждённым диагнозом БХ. В задачи исследования входило получение образца ткани, получение культуры клеток фибробластов, их фенотипирование и кариотипирование, проведение исследований ростовых характеристик клеток, анализ репликативного старения и других характеристик, необходимых для паспортизации клеточной линии. Из дермальных фибробластов линии HDDF были получены индуцированные нейроны стриатума с использованием методики прямого репрограммирования.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Выделение клеток из биоптата кожи.** Перед забором ткани пациент прошёл медицинский осмотр. Получено заключение этической комиссии и информированное добровольное согласие донора. Клетки из фрагмента биоптата кожи

выделяли механическим способом – измельчали ткань хирургическим скальпелем и помещали в чашку Петри с добавлением ростовой среды, содержащей 90% DMEM/F12 («Биолот», Россия) + 10% эмбриональной бычьей сыворотки («Gibco», США). Их культивировали в инкубаторе при 37 °C и 95% CO<sub>2</sub> + 90% влажности. Клетки пересевали с использованием раствора трипсина (0,25%-версена (0,2%) при достижении ими 80%-ной конfluence. Кратность посева 1 : 3–1 : 5. Клетки культивировали в ростовой среде без добавления антибиотиков и антимикотика, что позволило регулярно, на всех этапах выполнения работ, контролировать отсутствие контаминации культуры бактериями и грибами визуально, при помощи светового микроскопа Nikon TS100 («Nikon», Япония). Для выявления контаминации клеток микоплазмой использовали метод прямого окрашивания ДНК клеток флуоресцентным красителем Hoechst 33258 и метод посева на селективные питательные среды. Процедуру анализа проводили в соответствии с ранее описанными методиками [27, 28]. Идентификацию клеточной линии и отсутствие кросс-контаминации другими клеточными линиями проводили посредством фрагментного анализа STR-маркеров человека. Работа выполнена ООО «ГОРДИЗ» (Россия).

**Кривая роста.** Для характеристики пролиферативной активности клетки были посеяны в одинаковой плотности на чашки Петри диаметром 30 мм. Количество живых клеток, а также уровень их автофлуоресценции и размер оценивались на приборе CytoFLEX («Beckman Coulter», США); для анализа полученных данных использовалось программное обеспечение CytExpert software v1.2. На протяжении 5 суток (120 ч) ежедневно проводили подсчёт клеток и на основании полученных данных высчитывали индекс пролиферации (ИП) популяции клеток как отношение числа клеток в текущий момент времени к исходному числу посеянных клеток и строили кривые роста клеточной популяции [29]. Для каждого экспериментального варианта было проанализировано по три параллели на каждую временную точку. Среднее время удвоения клеточной популяции высчитывалось по формуле (1):

$$a_0 = \frac{t * \ln 2}{\ln(M_t / M_0)}, \quad (1)$$

где  $t$  – время логарифмической фазы роста;  $M_t$  – количество клеток в момент, когда кривая роста выходит на плато;  $M_0$  – количество клеток в начале логарифмической фазы роста. За логарифмическую фазу роста принимали период выраженного прироста численности клеток. За начало периода считали временную точку, ИП на которой достоверно отличался от предшествующего ИП. Окон-

чание периода соответствует временной точке, на которой ИП клеточной популяции достоверно не отличается от ИП на последующей временной точке.

**Эффективность клонирования.** Клетки на анализируемых пассажах высевали в чашки Петри с плотностью 2–3 кл./см<sup>2</sup> (50 клеток на чашку Петри 60 мм ø). Для каждого эксперимента готовили 8 чашек. Через 14 суток клетки окрашивали 1%-ным водным раствором кристалл-виолета и считали колонии. Эффективность клонирования определяли в %, как отношение числа выросших колоний (клонов) к числу посеянных клеток. Учитывали колонии, состоящие из не менее 20 клеток.

**Проточная цитометрия.** Анализ экспрессии поверхностных антигенов проводили с помощью проточной цитофлуориметрии на цитометре марки CytoFlex S («Beckman Coulter»), оснащённом программой CytExpert (version 2.3, «Beckman Coulter»). Клетки снимали с чашек Петри раствором трипсина-версена, отмывали раствором PBS, осаждали и доводили до концентрации  $1 \times 10^6$  клеток в 1 мл буфера для окрашивания клеток (Cell staining buffer, «BioLegend», США). Иммунофенотипирование проводили путём окрашивания клеток антителами, конъюгированными с соответствующими флуорохромами (CD34, CD44, CD73, CD90, CD105 – PE-конъюгаты, и HLA-ABC, SSEA-3 – FITC-конъюгаты) в разведении, соответствующем рекомендациям фирм-производителей (табл. 1). Антитела, не обладающие специфичностью к ис-

**Таблица 1.** Перечень антител, используемых для проточной цитометрии

| Название                                   | Производитель   | Каталожный номер |
|--------------------------------------------|-----------------|------------------|
| Iso PE                                     | BD Pharmingen   | 554680           |
| CD90 PE                                    | BD Pharmingen   | 561970           |
| CD73 PE                                    | BD Pharmingen   | 550257           |
| CD105 PE                                   | BD Pharmingen   | 560839           |
| CD44 PE                                    | eBioscience     | 12-0441-81       |
| CD34 PE                                    | Beckman Coulter | IM1420           |
| HLA-DR PE                                  | BD Pharmingen   | 555812           |
| Iso FITC                                   | BD Pharmingen   | 555748           |
| HLA-ABC FITC                               | Beckman Coulter | IM1838U          |
| SSEA-3<br>Alexa Fluor 488,<br>clone MC-631 | Merck Millipore | FCMAB141A4       |

Таблица 2. Перечень антител, используемых для иммунофлуоресцентного окрашивания

| Название                         | Производитель            | Каталожный номер | Разведение |
|----------------------------------|--------------------------|------------------|------------|
| Антитело к $\beta$ -тубулину III | R&D systems              | MAB1195          | 1/1000     |
| Антитело к MAP2                  | Abcam                    | ab281588         | 1/1000     |
| Антитело к DARPP-32              | Thermo Fisher Scientific | MA5-32113        | 1/250      |
| Антитело к GABA                  | Sigma-Aldrich            | A2052            | 1/500      |
| Антитело к mHTT, клон mEM48      | Merck Millipore          | MAB5374          | 1/200      |
| Антитело к виментину             | Abclonal                 | A19607           | 1/2000     |
| Антитело к нестину               | Santa-Cruz Biotechnology | Sc-23927         | 1/50       |
| Антитело к $\alpha$ -актину      | Immunoglobe              | 0042-05          | 1/250      |
| Флуорофор Alexa 488 Anti-Rabbit  | Invitrogen               | R37116           | 1/1000     |
| Флуорофор Alexa 555 Anti-Mouse   | Abcam                    | ab150114         | 1/2000     |
| Флуорофор Alexa 488 Anti-Mouse   | Abcam                    | ab150078         | 1/2000     |
| Флуорофор Alexa 555 Anti-Rabbit  | Abcam                    | ab150113         | 1/2000     |

следуемым антигенам, но соответствующие классу и типу антител, использовали в качестве изотипических контролей.

**Кариотипирование.** Для накопления клеток на стадии метафазы в питательную среду добавляли раствор демиколцина в конечной концентрации 0,1 мкг/мл («Sigma-Aldrich», США) на 3 ч. Далее проводили гипотоническую обработку смесью растворов 0,55%-ного KCl и 1%-ного цитрата Na в соотношении 1 : 1 в течение 15–20 мин при 37 °C. Фиксацию суспензии проводили смесью метанола и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3 : 1 в течение 15 мин трижды. Для получения препаратов метафазных пластинок суспензию фиксированных клеток раскапывали на сухие предметные стекла над водяной баней при температуре воды 50–53 °C. Анализ хромосом осуществляли с использованием стандартного GTG-метода дифференциального окрашивания хромосом на G-диски [30]. Препараты хромосом, предварительно высушенные при 37 °C, обрабатывали 0,02%-ным раствором трипсина («Difco», США) в течение 2–3 мин. Действие фермента блокировали раствором GKN в течение 15 с. Далее препараты хромосом окрашивали 2%-ным раствором красителя Гимза («Merck Millipore», США) на фосфатном буфере в течение 4 мин. Анализ структурных перестроек хромосом фибробластов проводили автоматически с помощью аппаратно-программного комплекса, в состав которого входят: микроскоп Axio Skop A1 ProgRes MF («Carl Zeiss Microscopy», Германия), чёрно-белая CCD-

камера высокого разрешения («Jenoptik», Германия, 1360 × 1024 пикселя) и компьютер с установленным программным обеспечением «ВидеоТест Карио 3.1».

**Иммунофлуоресцентное окрашивание.** Перед проведением иммунофлуоресцентного окрашивания фибробласты отмывали от кондиционированной среды фосфатно-солевым буфером без  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  (PBS) и фиксировали в 10%-ном растворе формалина («Sigma-Aldrich») в течение 20 мин при комнатной температуре. Затем проводили серию промывок раствором PBS, пермеабиллизацию 0,25%-ным раствором Triton-X100 в PBS в течение 5 мин при комнатной температуре. Затем клетки 3 раза промывали PBS и инкубировали в блокирующем растворе, содержащем 3%-ный бычий сывороточный альбумин («Sigma-Aldrich»), разведённый в PBS, в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем клетки инкубировали с первичными антителами, разведёнными в блокирующем растворе в течение ночи при температуре +4 °C (концентрация/разведение приведены в табл. 2). После этого проводили серию промывок раствором PBS, после чего клетки инкубировали со вторичными антителами в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем проводили серию промывок раствором PBS и монтировали клетки на предметном стекле с помощью среды для заключения («Cell Signalling», США). Интенсивность флуоресценции детектировали при помощи лазерного конфокального микроскопа Olympus Fluoview FV3000.

**Анализ репликативного старения.** Оценивали активность фермента  $\beta$ -галактозидазы. Клетки выращивали в чашках Петри (3,5 мм, «Nunc», Дания) до образования конfluence, а затем окрашивали с помощью набора реактивов (Senescence Cells Histochemical Staining Kit, «Sigma-Aldrich») согласно инструкции. У клеток, вступающих в фазу репликативного старения, цитоплазма окрашивается в синий цвет. Анализ проводили с помощью инвертированного микроскопа («Nikon») на 7-м, 13-м, 20-м, 30-м и 40-м пассажах. Долю (%) окрашенных клеток определяли при подсчёте не менее 1000 клеток в разных полях зрения на одну временную точку.

**Трансдифференцировка в нейрональном направлении.** Получение индуцированных нейронов стриатума из дермальных фибробластов производили согласно методике, описанной ранее [31]. Фибробласты линии HDDF на 12-м пассаже культивировали в 6-луночном планшете до достижения монослоя. Клетки заражали лентивирусами, кодирующими микроРНК и транскрипционные факторы DLX2 и STIP2, после чего производили синхронизацию при помощи 1 мкМ рапамицина. После селекции антибиотиком фибробласты пересаживали на покровные стёкла, покрытые матригелем. Далее к клеткам добавляли лентивирус, кодирующий транскрипционный фактор MYT1L. Через 24 ч проводили смену среды на среду для репрограммирования, состоящую из Neurobasal-A, 2%-ного B-27, добавки GlutaMax, 1 мМ вальпроевой кислоты, 1 мкМ ретиноевой кислоты, 200 мкМ дибутил cAMP, 20 нг/мл нейротрофического фактора мозга, 20 нг/мл нейротрофина 3 типа, 20 нг/мл глиального нейротрофического фактора. Культивировали в течение 35–40 суток в присутствии доксициклина в конечной концентрации 1 мкг/мл, который добавляли каждые 48 ч.

**Определение количества повторов CAG.** Определение числа CAG-повторов в гене *HTT* осуществлялось с помощью метода ПЦР с праймингом тройных повторов и последующим разделением ПЦР-продукта с помощью фрагментного анализа. Для проведения исследования использовалась геномная ДНК, выделенная из клеточной культуры дермальных фибробластов. Экстракция ДНК проводилась с использованием набора QIAamp® DNA Mini Kit («Qiagen», Германия) в соответствии с инструкцией производителя.

Для проведения ПЦР была синтезирована пара праймеров со следующими последовательностями: прямой – HEX-ATGAAGGCSTTCGAGTCCSTCAAGTCC, обратный – CGGTGGCGGCTGTTGCTGCTGCTGCTGCT, согласно методике, описанной ранее [32]. Прямой праймер граничил с 5'-концом участка CAG-повторов и отступал на три нуклеотида во избежание нарушения связывания с комплементарной по-

следовательностью ДНК, возможного ввиду наличия полиморфизма в данном участке. Обратный праймер имел способность гибридизоваться с любым участком области CAG-повторов, но наличие «хвоста», комплементарного последовательности, граничащей с 3'-концом, позволяло добиться большей специфичности к последним 5 повторам. Для увеличения специфичности был использован ступенчатый протокол ПЦР. Разделение ПЦР-продукта проведено с помощью фрагментного анализа методом капиллярного гель-электрофореза на автоматическом анализаторе «Нанофор-05» («Синтол», Россия).

Для расчёта длины CAG-повторов использована формула (2):

$$CAGn = \frac{\text{Размер фрагмента} - 47}{3}, \quad (2)$$

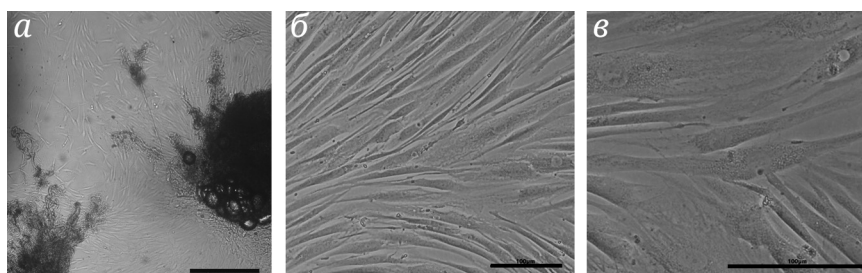
где размер фрагмента соответствует размеру пика с наибольшей высотой. Данная методика допускает погрешность  $\pm 2$  повтора.

**Статистический анализ.** Результаты представлены как среднее значение  $\pm$  ошибка среднего. Статистическое сравнение результатов, полученных в экспериментах, проводили с использованием критерия Стьюдента для сравнения двух групп и одностороннего анализа ANOVA с последующим тестом Тьюки для множественных сравнений между более чем двумя группами. Значения  $p$  указаны в подписях к рисункам. Результаты считали значимыми при значении  $p \leq 0,05$ .

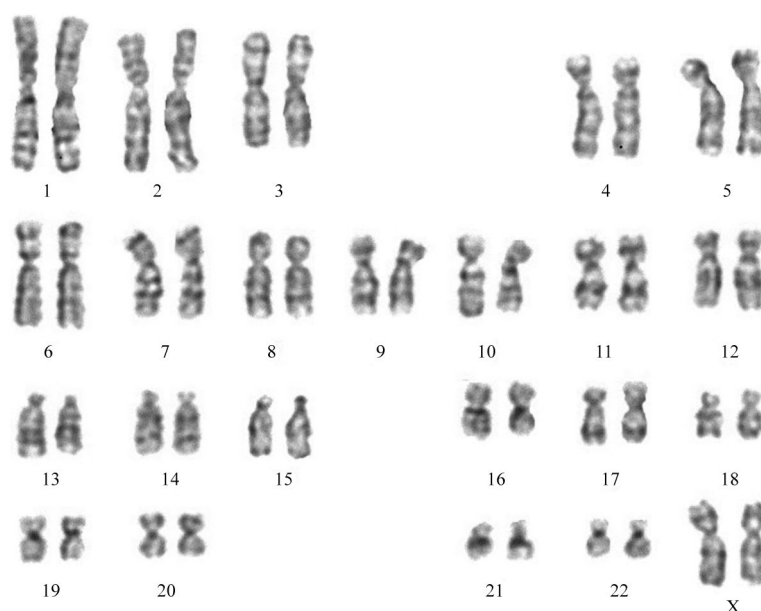
## РЕЗУЛЬТАТЫ

Биоптат кожи был получен от женщины 36 лет с подтверждённым диагнозом БХ. В результате генетического исследования пациента в последовательности гена обнаружено 47 повторов кодона CAG. Из фрагмента биоптата спустя две недели культивирования была получена первичная культура дермальных фибробластов (рис. 1, а).

В результате серии пассажей была получена клеточная линия, представленная гомогенной популяцией дермальных фибробластов и названная HDDF (Huntington Disease Dermal Fibroblasts) (рис. 1, б и в). В полученной клеточной линии не было выявлено контаминации бактериями, грибами и микоплазмой. STR-анализ подтвердил уникальность данной популяции и отсутствие кросс-контаминации другими клеточными линиями (не публикуется, информация будет размещена в паспорте клеточной линии). Также был проведён эксперимент по определению числа CAG-повторов в гене *HTT* полученной клеточной линии, выявивший количество повторов, равное  $46 \pm 2$ .



**Рис. 1.** Общий вид полученной линии фибробластов. *a* – Прижизненная микрофотография фрагмента биоптата и первичных фибробластов. Световая микроскопия. Масштаб 200 мкм. *б* и *в* – Прижизненные микрофотографии линии дермальных фибробластов на 7-м пассаже с увеличением 10× и 20× соответственно. Световая микроскопия. Масштаб 100 мкм



**Рис. 2.** Кариотип клеток линии HDDF с нормальным числом хромосом 46 XX, без структурных перестроек хромосом

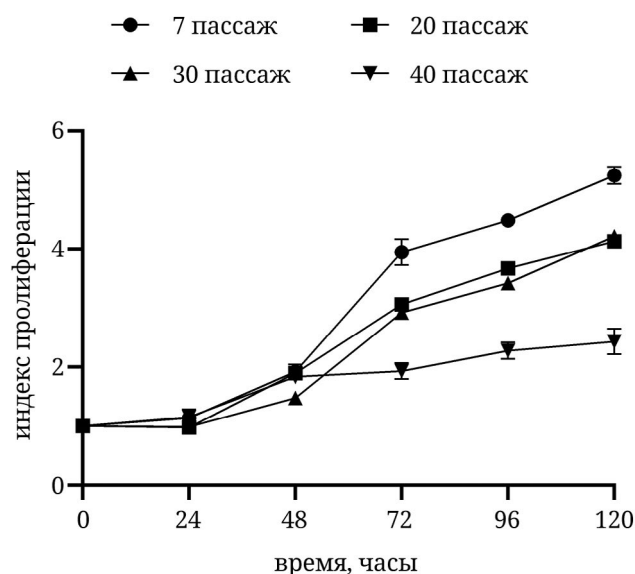
Полученные фибробласты имеют характерную для данного типа клеток веретенообразную форму (рис. 1, *в*). Клетки активно пролиферируют в процессе длительного культивирования, сохраняют высокую жизнеспособность после криоконсервации, которая составляет не менее 80%.

Кариотипический анализ клеточной линии HDDF проводили на 7-м пассаже. Анализ 100 метафазных пластинок показал, что клеточная линия фибробластов от больного БХ имеет нормальный кариотип – 46 XX. Долю полиплоидных клеток определяли, исследуя 500 метафаз, и она составила 2%. Для анализа структурных перестроек хромосом (СПХ) кариотипировали 25 метафаз. В клетках линии HDDF клональных и неклональных СПХ выявлено не было (рис. 2).

Далее была проведена оценка ростовых характеристик полученной клеточной линии в процессе длительного культивирования на 7-м, 20-м, 30-м и 40-м пассажах. На основании данных проточной цитометрии были вычислены ИП клеток

для разных суток культивирования и построены кривые роста культуры. На графике чётко видна тенденция постепенного снижения ИП клеточной культуры в процессе длительного культивирования и, как следствие, увеличение времени одного удвоения клеточной популяции в фазе её логарифмического роста. На 70-м пассаже время одного удвоения клеточной популяции составило 24 ч, на 20-м пассаже – 32 ч, на 30-м пассаже – 45 ч, на 40-м пассаже – 55 ч.

На графике видно, что существенное снижение ИП в процессе культивирования наблюдается только на 40-м пассаже (рис. 3, *а*). Интересно, что клетки сохраняли высокий пролиферативный потенциал до 30-го пассажа, после чего произошло снижение пролиферативной активности. Аналогичная тенденция проявлялась и при оценке эффективности клонирования: на 7-м пассаже она составила  $10 \pm 1,02\%$ , на 20-м пассаже эффективность клонирования составила  $23 \pm 1,4\%$ , на 30-м пассаже –  $11,75 \pm 2,01\%$ .



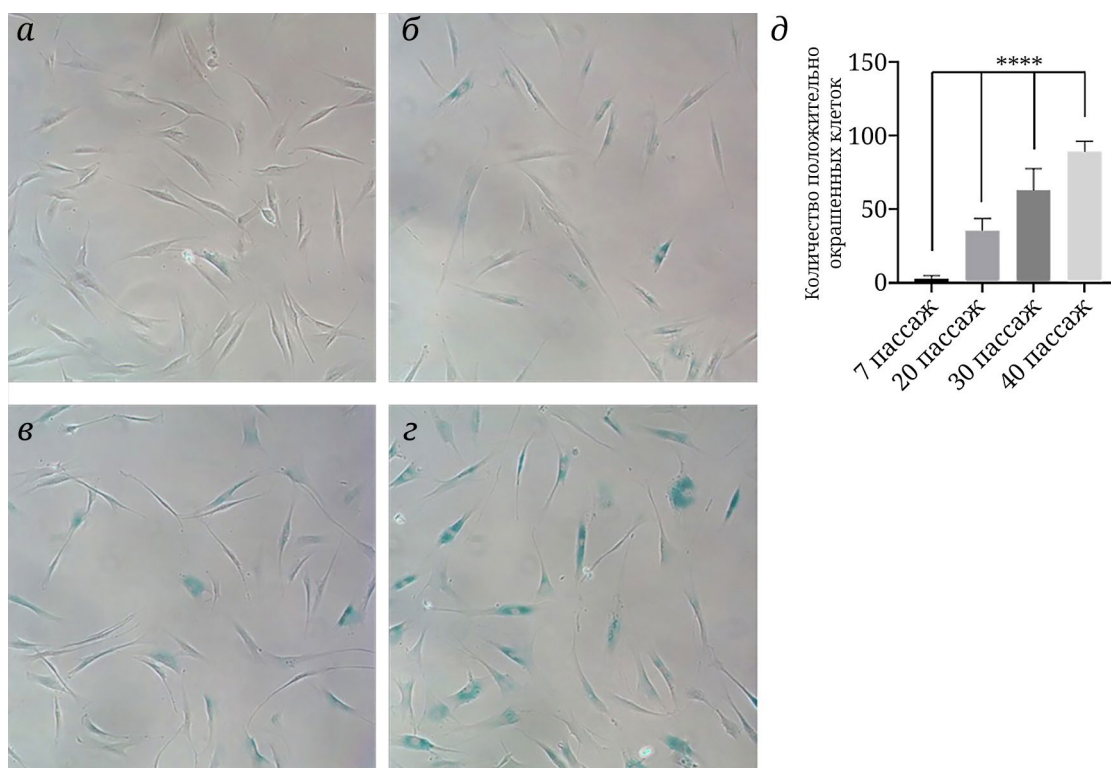
**Рис. 3.** Ростовые характеристики линии Hddf. График, иллюстрирующий кривую роста линии на 7-м, 20-м, 30-м и 40-м пассажах

Окраска на  $\beta$ -галактозидазу показала постепенное нарастание в культуре количества клеток, содержащих данный фермент. При этом интенсивность окраски вплоть до 30-го пассажа была

крайне слабой (рис. 4, в) по сравнению с интенсивностью в клетках на 40-м пассаже (рис. 4, г). Полученные данные подтверждают наличие процесса репликативного старения, характерного для всех неиммортизированных диплоидных клеточных линий, а также коррелируют с данными о постепенном снижении их пролиферативной активности в процессе длительного культивирования.

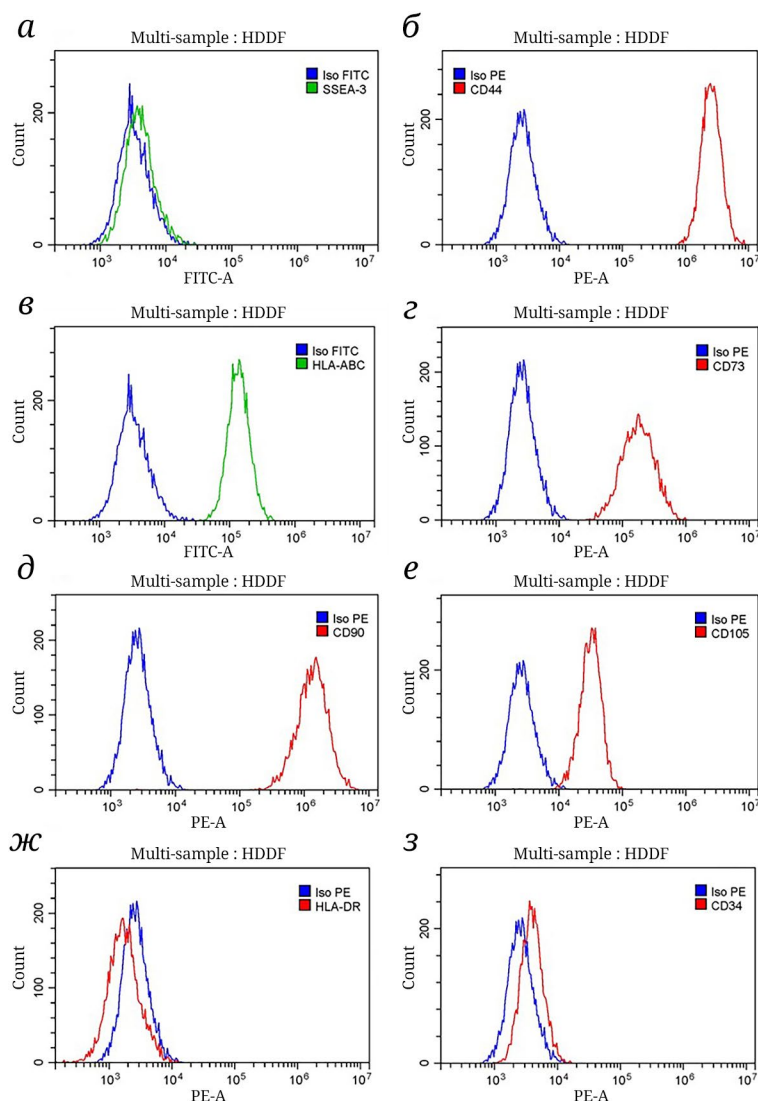
Далее было проведено фенотипирование клеток линии Hddf с помощью проточной цитофлуориметрии. Полученные результаты представлены в виде панели, иллюстрирующей экспрессию поверхностных маркеров, характерных для мезенхимных стволовых клеток (рис. 5). Анализ на 7-м пассаже показал, что исследуемые клетки позитивны по основным поверхностным маркерам, характерным для мезенхимных стволовых клеток CD44 ( $99,98 \pm 0,03$ ), CD73 ( $99,97 \pm 0,05$ ), CD90 ( $99,93 \pm 0,05$ ), CD105 ( $99,79 \pm 0,15$ ), и негативны по маркерам гемопоэтических клеток, таких как CD34 ( $2,25 \pm 0,26$ ), HLA-DR ( $0,12 \pm 0,03$ ), SSEA-3 ( $0,12 \pm 0,04$ ), что соответствует фенотипу мезенхимных стволовых клеток, присущему также и фибробластам.

Полученная линия фибробластов также была проанализирована при помощи иммунофлуоресцентного окрашивания (на 7-м пассаже)

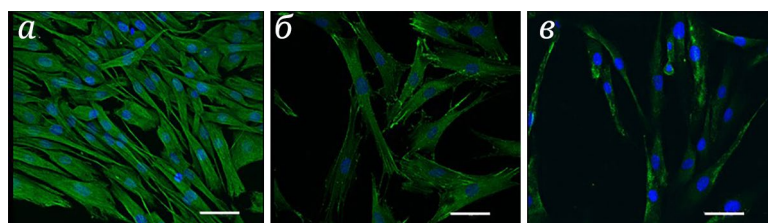


**Рис. 4.** Анализ репликативного старения линии Hddf на 7-м, 20-м, 30-м и 40-м пассажах. а, б, в, г — Микрофотографии, иллюстрирующие активность  $\beta$ -галактозидазы в клетках на 7-м, 20-м, 30-м и 40-м пассажах соответственно. д — Гистограмма, иллюстрирующая полученные результаты. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  ошибка среднего, \*\*\*\*  $p < 0,001$  согласно одностороннему анализу ANOVA с апостериорным тестом Данна. На каждом пассаже было проанализировано не менее 1000 клеток





**Рис. 5.** Фенотипирование клеток линии HDDF при помощи проточной цитофлуориметрии (а–з)



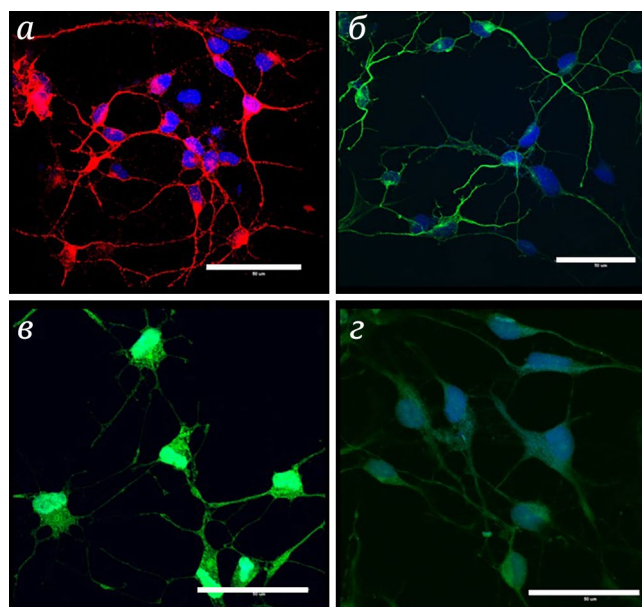
**Рис. 6.** Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток на маркеры фибробластов. а – Окрашивание антителами к виментину. б – Окрашивание антителами к  $\alpha$ -актину. в – Окрашивание антителами к нестину. Визуализация ядер осуществлялась красителем DAPI. Конфокальная микроскопия,  $\times 40$ . Масштаб 50 мкм

на канонические маркеры фибробластов, такие как виментин,  $\alpha$ -актинин (рис. 6). Также было проведено окрашивание на нестин, являющийся маркером дифференцировки в производные эктодермы. Согласно полученным результатам, подавляющее большинство клеток положительно окрашивалось на все проанализированные маркеры. На микрофотографиях клетки линии HDDF имеют

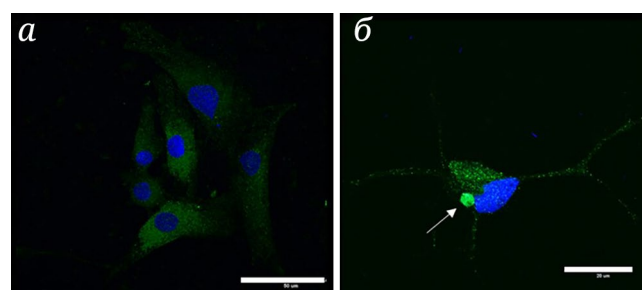
вытянутую веретенообразную форму, характерную для фибробластов и мезенхимных стволовых клеток.

Далее мы проанализировали способность фибробластов к трансдифференцировке в нейрональном направлении. Для этого был использован протокол на основе микроРНК, транскрипционных факторов и малых молекул, разработанный





**Рис. 7.** Микрофотографии индуцированных нейронов стриатума, полученных из фибробластов линии HDDF. *а* – Иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к маркеру MAP2. *б* – Иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к маркеру TUJ-1. *в* – Иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к маркеру GABA. *г* – Иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к маркеру DARPP-32. Конфокальная микроскопия,  $\times 60$ . Масштаб 50 мкм



**Рис. 8.** Визуализация mHTT в фибробластах и индуцированных нейронах линии HDDF. *а* – Иммунофлуоресцентное окрашивание фибробластов антителами к mHTT (клон мЕМ48). Конфокальная микроскопия,  $\times 60$ . Масштаб 50 мкм. *б* – Иммунофлуоресцентное окрашивание индуцированных нейронов стриатума, полученных из фибробластов линии HDDF, антителами мЕМ48 (вторичные антитела, конъюгированные с флуорофором Alexa 488), и окрашивание ядер красителем DAPI. Конфокальная микроскопия,  $\times 60$ . Масштаб 20 мкм

группой A.S. Yoo [21], с некоторыми дополнениями [31]. Фибробласты линии HDDF успешно проходили трансдифференцировку в нейрональном направлении, что подтверждается окрашиванием на маркеры TUJ-1, MAP2, GABA и DARPP-32 (рис. 7, *а* и *б*).

Наконец, мы проанализировали накопление агрегатов мутантного белка mHTT в индуцированных нейронах стриатума, полученных из дермальных фибробластов линии HDDF. На рис. 8, *а* представлены фибробласты, окрашенные антителами мЕМ48 и красителем DAPI (для визуализации ядер). mHTT распределён диффузно по цитоплазме клеток, без формирования агрегатов. В индуцированных нейронах стриатума, полученных из фибробластов линии HDDF, наблюдались агрегаты mHTT в соме нейронов и в некоторых

отростках (рис. 8, *б*). Стоит отметить, что доля клеток, содержащих агрегаты, была довольно низкой. В ядрах клеток агрегаты мутантного белка обнаружены не были.

## ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении нейродегенеративных заболеваний дистанция между моделированием заболеваний на животных и клиническими испытаниями особенно велика. Моделирование нейропатологий при помощи пациент-специфичных клеточных моделей может заполнить пробел между клиническими испытаниями и исследованиями на модельных организмах. Важную роль в таких исследованиях играют клеточные линии,

полученные из биологического материала пациентов. Изучение молекулярно-клеточных основ нейропатологии с использованием донорского материала от больных, несомненно, имеет свои преимущества, обусловленные учётом вклада генетического и эпигенетического статуса конкретного больного. Более того, всё больше исследователей считает необходимым валидировать модели с патологическими проявлениями заболеваний с использованием как животных, так и пациент-специфичных клеток во избежание артефактов [33, 34]. В связи с этим получение новых клеточных линий из донорского материала больных нейродегенеративными заболеваниями представляется актуальной задачей.

Дермальные фибробласты могут служить перспективными клетками для всестороннего изучения патогенеза нейродегенеративных заболеваний. Получение биоптата малоинвазивно, практически безопасно для пациента, забор ткани производится с соблюдением асептических норм, полученный материал минимально подвержен контаминации. Фибробласты хорошо переносят культивирование, обладают хорошим пролиферативным потенциалом. Всё сказанное выше обуславливает широкое применение дермальных фибробластов в научно-исследовательской практике, в том числе и при изучении БХ. Различные группы исследователей применяют фибробласты человека – как диплоидные клеточные популяции, полученные от доноров [35], так и иммортализованные клеточные линии [11] – для изучения влияния мНТТ на метаболизм клетки и пролиферативные характеристики. Кроме того, индуцированные нейроны, полученные из фибробластов, успешно используются для изучения патологических проявлений заболевания на клеточном уровне [11, 17–19, 22, 36, 37].

В отечественных биобанках и коллекциях клеточных культур линии фибробластов от пациентов с БХ в настоящий момент не представлены, что затрудняет проведение экспериментальных работ. Паспортизованная клеточная линия HDDF будет помещена в Коллекцию культур клеток позвоночных ИНИЦ РАН и станет доступной для заказа пользователями – именно в этом состояла основная цель проведённых исследований.

В нашей работе представлена характеристика линии HDDF неиммортализованных диплоидных дермальных фибробластов, полученных от пациента с БХ. Показано, что основные характеристики клеточной линии HDDF во многом соответствуют фибробластам от здоровых доноров. Клетки имеют характерную вытянутую веретенообразную форму, которая сохраняется при длительном культивировании. Экспрессия поверхностных маркеров практически полностью сопоставима

со значениями, опубликованными ранее для линии DF1, полученной из кожи век здорового донора соответствующего пола и возраста [38]. В клетках обеих линий также подтверждена экспрессия основных белков, продуцируемых в фибробластах, таких как виментин, нестин,  $\alpha$ -актинин. Кариотип клеток линии HDDF не отличался от такового у здоровых клеток. Наши данные показали, что в клетках линии HDDF, так же как и в здоровых фибробластах, мНТТ распределён по всей цитоплазме диффузно. Была опубликована работа, описывающая образование агрегатов мНТТ, связанных с волокнами цитоскелета в фибробластах от пациентов с БХ [39], однако в клетках линии HDDF, как и в другой работе [22], видимых агрегатов не наблюдалось.

В литературе имеются противоречивые данные относительно пролиферативных характеристик фибробластов кожи от пациентов с БХ. В одной из работ показано, что эти клетки демонстрировали более высокую конfluэнтность и большее число удвоений популяции, которое превосходило контрольные значения [40]. Существенной разницы в темпах роста показано не было. Авторы также отмечали, что клетки от пациентов с БХ были меньшего размера и что из одиночных клеток развивались более крупные колонии [40]. В другой работе было отмечено, что клетки от пациентов с БХ вырастали до значительно более высокой конfluэнтности, чем контрольные клетки [41]. Однако в дальнейшем, на большей выборке клеточных линий, авторами не было выявлено существенных различий между клетками БХ и контрольными клетками ни по одному из вышеуказанных параметров. Ещё в одном исследовании авторы отмечали более эффективный рост фибробластов от пациентов с БХ при низкой плотности посева, а также экспоненциальный рост культур после рутинной трипсинизации, скорость которого была выше, чем у контрольных культур, а также способность клеток расти до значительно более высоких плотностей насыщения клеток [42]. Следует отметить, что авторам не удалось показать однозначную корреляцию между скоростью роста клеток от здоровых доноров и от пациентов с БХ, однако авторы отметили повышенную конfluэнтность в 4-х из 7 клеточных линий по сравнению с контролем. Показано, что фибробласты от пациентов с БХ лучше росли на обеднённой среде и лучше адгезировали к поверхности культурального пластика [40].

Наши данные согласуются с ранее опубликованными результатами – клетки линии HDDF характеризуются высокой пролиферативной активностью и сохраняют способность к делению до 43-го пассажа, после чего перестают делиться. Время удвоения для клеток линии HDDF на 7-м

и 20-м пассаже было меньше, чем у ранее описанной контрольной линии [38]. Клетки формируют колонии с эффективностью, соответствующей клеткам от доноров без нейропатологий, что соответствует ранее опубликованным данным [42]. Полученные данные могут указывать на взаимосвязь наличия mHTT с регуляцией клеточного цикла. Известно, что данный белок принимает участие в контроле митоза и регуляции нейрогенеза у млекопитающих [43]. Однако гипотез, объясняющих более высокий пролиферативный потенциал фибробластов от пациентов с БХ, чем у контрольных линий, до сих пор не предложено.

Выраженное репликативное старение, характерное для всех неиммортизированных клеток, наблюдалось на 40-м пассаже, что существенно позднее, чем для здоровых клеток, у которых репликативное старение наблюдается на 25-м пассаже [38]. Наши данные согласуются с ранее описанными наблюдениями, указывающими на более устойчивый к старению фенотип иммортизированных фибробластов от пациентов с БХ по сравнению с контролем [11].

Одно из самых перспективных применений фибробластов новой линии HDDF может заключаться в их использовании при получении индуцированных нейронов. Моделирование нейропатологий на индуцированных нейронах, полученных с помощью технологий репрограммирования, может значительно продвинуться в понимании патогенеза БХ и преодолеть трудности, связанные с поиском эффективных стратегий для лечения. В настоящий момент идёт активное накопление данных о влиянии mHTT непосредственно на нейроны, полученные для конкретных пациентов через нейрональную дифференцировку из iPSC либо с помощью прямого репрограммирования из дермальных фибробластов. Появились данные о транскриптомах, протеомах и секретомах нейрональных клеток, полученных от пациентов с БХ, необходимые для идентификации новых молекулярных мишеней и стратегий по купированию заболевания [17, 24, 25, 44].

Мы также продемонстрировали, что фибробласты линии HDDF могут быть дифференцированы в нейрональном направлении при помощи прямого репрограммирования для получения популяции индуцированных нейронов стриатума. Полученные индуцированные нейроны окрашивались на нейрональные маркеры MAP2, TUJ-1, GABA и DARPP-32, что свидетельствует об успеш-

ной дифференцировке. Мы показали, что в индуцированных нейронах стриатума, полученных из фибробластов новой линии HDDF, формируются агрегаты мутантного белка, что является основным гистопатологическим признаком данной нейропатологии. Полученные нами данные согласуются с ранее опубликованными результатами, свидетельствующими о том, что в индуцированных нейронах стриатума, полученных с помощью прямого репрограммирования, могут быть детектированы агрегаты mHTT [22, 36]. Таким образом, полученная нами клеточная линия HDDF может быть полезна для всестороннего изучения как биологической роли mHTT, так и его токсичности для клеток.

**Вклад авторов.** Н. Красковская, А. Кольцова, М. Хотин, Н. Михайлова – концепция и руководство работой; Н. Красковская, А. Кольцова, П. Парфенова, А. Шатрова, Н. Ярцева, В. Назаров, Е. Девяткина – проведение экспериментов; Н. Красковская, А. Кольцова, П. Парфенова, А. Шатрова, Н. Ярцева, В. Назаров, Е. Девяткина, М. Хотин, Н. Михайлова – обсуждение результатов исследования; Н. Красковская, А. Кольцова, П. Парфенова – написание текста; А. Шатрова, Н. Михайлова – редактирование текста статьи.

**Благодарности.** В работе было использовано оборудование ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных» Института цитологии РАН.

**Финансирование.** Исследование было поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение № 075-15-2021-1063 (Н.М.), и грантом РФ № 22-75-00106 (Н.К.). Финансовая поддержка распределялась следующим образом: эксперименты и результаты, представленные на рис. 1–6, финансировались за счёт соглашения № 075-15-2021-1063 (Н.М.); эксперименты и результаты, представленные на рис. 7 и 8, финансировались за счёт гранта РФ № 22-75-00106 (Н.К.).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и её последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. Получено информированное добровольное согласие донора.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Roos, R. A. (2010) Huntington's disease: a clinical review, *Orphanet J Rare Dis.*, 5, 40, <https://doi.org/10.1186/1750-1172-5-40>.

2. Monk, R., and Connor, B. (2021) Cell reprogramming to model Huntington's disease: a comprehensive review, *Cells*, **10**, 1565, <https://doi.org/10.3390/cells10071565>.
3. Lopez-Toledo, G., Silva-Lucero, M. D., Herrera-Diaz, J., Garcia, D. E., Arias-Montano, J. A., and Cardenas-Aguayo, M. D. (2022) Patient-derived fibroblasts with presenilin-1 mutations, that model aspects of Alzheimer's disease pathology, constitute a potential object for early diagnosis, *Front. Aging Neurosci.*, **14**, 921573, <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.921573>.
4. Xicota, L., Lagarde, J., Eysert, F., Grenier-Boley, B., Rivals, I., Botte, A., Forlani, S., Landron, S., Gautier, C., Gabriel, C., Bottlaender, M., Lambert, J. C., Chami, M., Sarazin, M., and Potier, M. C. (2023) Modifications of the endosomal compartment in fibroblasts from sporadic Alzheimer's disease patients are associated with cognitive impairment, *Transl. Psychiatry*, **13**, 54, <https://doi.org/10.1038/s41398-023-02355-z>.
5. Teves, J. M. Y., Bhargava, V., Kirwan, K. R., Corenblum, M. J., Justiniano, R., Wondrak, G. T., Anandhan, A., Flores, A. J., Schipper, D. A., Khalpey, Z., Sligh, J. E., Curiel-Lewandrowski, C., Sherman, S. J., and Madhavan, L. (2017) Parkinson's disease skin fibroblasts display signature alterations in growth, redox homeostasis, mitochondrial function, and autophagy, *Front. Neurosci.*, **11**, 737, <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00737>.
6. Thomas, R., Moloney, E. B., Macbain, Z. K., Hallett, P. J., and Isacson, O. (2021) Fibroblasts from idiopathic Parkinson's disease exhibit deficiency of lysosomal glucocerebrosidase activity associated with reduced levels of the trafficking receptor LIMP2, *Mol. Brain*, **14**, 16, <https://doi.org/10.1186/s13041-020-00712-3>.
7. Auburger, G., Klinkenberg, M., Drost, J., Marcus, K., Morales-Gordo, B., Kunz, W. S., Brandt, U., Broccoli, V., Reichmann, H., Gispert, S., and Jendrach, M. (2012) Primary skin fibroblasts as a model of Parkinson's disease, *Mol. Neurobiol.*, **46**, 20-27, <https://doi.org/10.1007/s12035-012-8245-1>.
8. Gerou, M., Hall, B., Woof, R., Allsop, J., Kolb, S. J., Meyer, K., Shaw, P. J., and Allen, S. P. (2021) Amyotrophic lateral sclerosis alters the metabolic aging profile in patient derived fibroblasts, *Neurobiol. Aging*, **105**, 64-77, <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2021.04.013>.
9. Konrad, C., Kawamata, H., Bredvik, K. G., Arreguin, A. J., Cajamarca, S. A., Hupf, J. C., Ravits, J. M., Miller, T. M., Maragakis, N. J., Hales, C. M., Glass, J. D., Gross, S., Mitsumoto, H., and Manfredi, G. (2017) Fibroblast bioenergetics to classify amyotrophic lateral sclerosis patients, *Mol. Neurodegener.*, **12**, 76, <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0217-5>.
10. Rubio, M. A., Herrando-Grabulosa, M., Velasco, R., Blasco, I., Povedano, M., and Navarro, X. (2022) TDP-43 cytoplasmic translocation in the skin fibroblasts of ALS patients, *Cells*, **11**, 209, <https://doi.org/10.3390/cells11020209>.
11. Hung, C. L., Maiuri, T., Bowie, L. E., Gotesman, R., Son, S., Falcone, M., Giordano, J. V., Gillis, T., Mattis, V., Lau, T., Kwan, V., Wheeler, V., Schertzer, J., Singh, K., and Truant, R. (2018) A patient-derived cellular model for Huntington's disease reveals phenotypes at clinically relevant CAG lengths, *Mol. Biol. Cell*, **29**, 2809-2820, <https://doi.org/10.1091/mbc.E18-09-0590>.
12. Fernandez-Estevez, M. A., Casarejos, M. J., Lopez Sendon, J., Garcia Caldentey, J., Ruiz, C., Gomez, A., Perucho, J., de Yébenes, J. G., and Mena, M. A. (2014) Trehalose reverses cell malfunction in fibroblasts from normal and Huntington's disease patients caused by proteasome inhibition, *PLoS One*, **9**, e90202, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090202>.
13. Marchina, E., Misasi, S., Bozzato, A., Ferraboli, S., Agosti, C., Rozzini, L., Borsani, G., Barlati, S., and Padovani, A. (2014) Gene expression profile in fibroblasts of Huntington's disease patients and controls, *J. Neurol. Sci.*, **337**, 42-46, <https://doi.org/10.1016/j.jns.2013.11.014>.
14. Vanisova, M., Stufkova, H., Kohoutova, M., Rakosnikova, T., Krizova, J., Klempir, J., Rysankova, I., Roth, J., Zeman, J., and Hansikova, H. (2022) Mitochondrial organization and structure are compromised in fibroblasts from patients with Huntington's disease, *Ultrastruct. Pathol.*, **46**, 462-475, <https://doi.org/10.1080/01913123.2022.2100951>.
15. Reddy, P. H., Mao, P., and Manczak, M. (2009) Mitochondrial structural and functional dynamics in Huntington's disease, *Brain Res. Rev.*, **61**, 33-48, <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2009.04.001>.
16. Aladdin, A., Kiraly, R., Boto, P., Regdon, Z., and Tar, K. (2019) Juvenile Huntington's disease skin fibroblasts respond with elevated parkin level and increased proteasome activity as a potential mechanism to counterbalance the pathological consequences of mutant huntingtin protein, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 5338, <https://doi.org/10.3390/ijms20215338>.
17. Nekrasov, E. D., Vigont, V. A., Klyushnikov, S. A., Lebedeva, O. S., Vassina, E. M., Bogomazova, A. N., Chestkov, I. V., Semashko, T. A., Kiseleva, E., Suldina, L. A., Bobrovsky, P. A., Zimina, O. A., Ryazantseva, M. A., Skopin, A. Y., Illarioshkin, S. N., Kaznacheyeva, E. V., Lagarkova, M. A., and Kiselev, S. L. (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>.
18. Vera, E., Bosco, N., and Studer, L. (2016) Generating late-onset human iPSC-based disease models by inducing neuronal age-related phenotypes through telomerase manipulation, *Cell Rep.*, **17**, 1184-1192, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.09.062>.

19. Vigont, V., Nekrasov, E., Shalygin, A., Gusev, K., Klushnikov, S., Illarioshkin, S., Lagarkova, M., Kiselev, S. L., and Kaznacheyeva, E. (2018) Patient-specific iPSC-based models of Huntington's disease as a tool to study store-operated calcium entry drug targeting, *Front. Pharmacol.*, **9**, 696, <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00696>.
20. Piechota, M., Latoszek, E., Liszewska, E., Hansikova, H., Klempir, J., Muhlback, A., Landwehrmeyer, G. B., Kuznicki, J., and Czeredys, M. (2023) Generation of two human iPSC lines from dermal fibroblasts of adult- and juvenile-onset Huntington's disease patients and two healthy donors, *Stem Cell Res.*, **71**, 103194, <https://doi.org/10.1016/j.scr.2023.103194>.
21. Victor, M. B., Richner, M., Hermansteyne, T. O., Ransdell, J. L., Sobieski, C., Deng, P. Y., Klyachko, V. A., Nerbonne, J. M., and Yoo, A. S. (2014) Generation of human striatal neurons by microRNA-dependent direct conversion of fibroblasts, *Neuron*, **84**, 311-323, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.10.016>.
22. Victor, M. B., Richner, M., Olsen, H. E., Lee, S. W., Monteys, A. M., Ma, C., Huh, C. J., Zhang, B., Davidson, B. L., Yang, X. W., and Yoo, A. S. (2018) Striatal neurons directly converted from Huntington's disease patient fibroblasts recapitulate age-associated disease phenotypes, *Nat. Neurosci.*, **21**, 341-352, <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0075-7>.
23. Oh, Y. M., Lee, S. W., Kim, W. K., Chen, S., Church, V. A., Cates, K., Li, T., Zhang, B., Dolle, R. E., Dahiya, S., Pak, S. C., Silverman, G. A., Perlmutter, D. H., and Yoo, A. S. (2022) Age-related Huntington's disease progression modeled in directly reprogrammed patient-derived striatal neurons highlights impaired autophagy, *Nat. Neurosci.*, **25**, 1420-1433, <https://doi.org/10.1038/s41593-022-01185-4>.
24. Zhang, N., Bailus, B. J., Ring, K. L., and Ellerby, L. M. (2016) iPSC-based drug screening for Huntington's disease, *Brain Res.*, **1638**, 42-56, <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.09.020>.
25. Eddings, C. R., Arbez, N., Akimov, S., Geva, M., Hayden, M. R., and Ross, C. A. (2019) Pridopidine protects neurons from mutant-huntingtin toxicity via the sigma-1 receptor, *Neurobiol. Dis.*, **129**, 118-129, <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.05.009>.
26. Choi, K. A., Hwang, I., Park, H. S., Oh, S. I., Kang, S., and Hong, S. (2014) Stem cell therapy and cellular engineering for treatment of neuronal dysfunction in Huntington's disease, *Biotechnol. J.*, **9**, 882-894, <https://doi.org/10.1002/biot.201300560>.
27. Chen, T. R. (1977) *In situ* detection of mycoplasma contamination in cell cultures by fluorescent Hoechst 33258 stain, *Exp. Cell Res.*, **104**, 255-262, [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(77\)90089-1](https://doi.org/10.1016/0014-4827(77)90089-1).
28. ATCC Collection (1985) *ATCC quality control methods for cell lines*, Rockville, Md.
29. Седова Г. П. (2008) Количественные аспекты злокачественного роста, *Математическая морфология*, **7**.
30. Ozkinay, C., and Mitelman, F. (1979) A simple trypsin-Giemsa technique producing simultaneous G- and C-banding in human chromosomes, *Hereditas*, **90**, 1-4, <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1979.tb01287.x>.
31. Kraskovskaya, N., Bolshakova, A., Khotin, M., Bezprozvanny, I., and Mikhailova, N. (2023) Protocol Optimization for Direct Reprogramming of Primary Human Fibroblast into Induced Striatal Neurons, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, <https://doi.org/10.3390/ijms24076799>.
32. Назаров В. Д., Лапин С. В., Гавриченко А. В., Хуторов Д. В., Лобачевская Т. В., Хальчицкий С. Е., Брачунов С. П., Красаков И. В., Виссарионов С. В., Баиндурашвили А. Г., Эмануэль В. Л., Тотолян А. А. (2017) Выявление экспансии тринуклеотидных повторов при болезни Гентингтона, *Медицинская генетика*, **3**, 24-29.
33. Mustaly-Kalimi, S., Gallegos, W., Marr, R. A., Gilman-Sachs, A., Peterson, D. A., Sekler, I., and Stutzmann, G. E. (2022) Protein mishandling and impaired lysosomal proteolysis generated through calcium dysregulation in Alzheimer's disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **119**, e2211999119, <https://doi.org/10.1073/pnas.2211999119>.
34. Ayabe, T., Takahashi, C., Ohya, R., and Ano, Y. (2022) beta-Lactolin improves mitochondrial function in Aβeta-treated mouse hippocampal neuronal cell line and a human iPSC-derived neuronal cell model of Alzheimer's disease, *FASEB J.*, **36**, e22277, <https://doi.org/10.1096/fj.202101366RR>.
35. Brandstaetter, H., Kruppa, A. J., and Buss, F. (2014) Huntingtin is required for ER-to-Golgi transport and for secretory vesicle fusion at the plasma membrane, *Dis. Model Mech.*, **7**, 1335-1340, <https://doi.org/10.1242/dmm.017368>.
36. Liu, Y., Xue, Y., Ridley, S., Zhang, D., Rezvani, K., Fu, X. D., and Wang, H. (2014) Direct reprogramming of Huntington's disease patient fibroblasts into neuron-like cells leads to abnormal neurite outgrowth, increased cell death, and aggregate formation, *PLoS One*, **9**, e109621, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109621>.
37. Huntington's disease Consortium (2020) Bioenergetic deficits in Huntington's disease iPSC-derived neuronal cells and rescue with glycolytic metabolites, *Hum. Mol. Genet.*, **29**, 1757-1771, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy430>.
38. Крылова Т. А., Мусорина А. С., Зенин В. В., Кольцова А. М., Кропачева И. В., Турилова В. И., Яковлева Т. К., Полянская Г. Г. (2016) Получение и характеристика неиммortalизованных клеточных линий дермальных фибробластов человека, выделенных из кожи век взрослых доноров разного возраста, *Цитология*, **58**, 850-864.

39. Pierzynowska, K., Gaffke, L., Cyske, Z., and Wegrzyn, G. (2019) Genistein induces degradation of mutant huntingtin in fibroblasts from Huntington's disease patients, *Metab. Brain Dis.*, **34**, 715-720, <https://doi.org/10.1007/s11011-019-00405-4>.
40. Archer, F. J., and Mancall, E. L. (1983) Cultured fibroblasts in Huntington's disease. II. Effects of glucosamine, *Arch. Neurol.*, **40**, 24-27, <https://doi.org/10.1001/archneur.1983.04050010044010>.
41. Barkley, D. S., Hardiwidjaja, S., and Menkes, J. H. (1977) Abnormalities in growth of skin fibroblasts of patients with Huntington's disease, *Ann. Neurol.*, **1**, 426-430, <https://doi.org/10.1002/ana.410010505>.
42. Scudiero, D. A., Meyer, S. A., Clatterbuck, B. E., Tarone, R. E., and Robbins, J. H. (1981) Hypersensitivity to N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in fibroblasts from patients with Huntington disease, familial dysautonomia, and other primary neuronal degenerations, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 6451-6455, <https://doi.org/10.1073/pnas.78.10.6451>.
43. Godin, J. D., Colombo, K., Molina-Calavita, M., Keryer, G., Zala, D., Charrin, B. C., Dietrich, P., Volvert, M. L., Guillemot, F., Dragatsis, I., Bellaiche, Y., Saudou, F., Nguyen, L., and Humbert, S. (2010) Huntingtin is required for mitotic spindle orientation and mammalian neurogenesis, *Neuron*, **67**, 392-406, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.06.027>.
44. Garcia, V. J., Rushton, D. J., Tom, C. M., Allen, N. D., Kemp, P. J., Svendsen, C. N., and Mattis, V. B. (2019) Huntington's disease patient-derived astrocytes display electrophysiological impairments and reduced neuronal support, *Front. Neurosci.*, **13**, 669, <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00669>.

## DERMAL FIBROBLAST LINES FROM A PATIENT WITH HUNTINGTON'S DISEASE AS A PROMISING MODEL FOR STUDYING THE PATHOGENESIS OF THE DISEASE: PRODUCTION AND CHARACTERIZATION

N. Kraskovskaya<sup>1\*</sup>, A. Koltsova<sup>1</sup>, P. Parfenova<sup>1</sup>, A. Shatrova<sup>1</sup>, N. Yartseva<sup>1</sup>,  
V. Nazarov<sup>2</sup>, E. Devyatkina<sup>2</sup>, M. Khotin<sup>1</sup>, and N. Mikhailova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences,  
194064 St. Petersburg, Russia; e-mail: [ninakraskovskaya@gmail.com](mailto:ninakraskovskaya@gmail.com)

<sup>2</sup> Pavlov First St. Petersburg State Medical University, 197022 St. Petersburg, Russia

Huntington's disease (HD) is an inherited, incurable disease caused by a mutation and expansion of CAG repeats in the *HTT* gene encoding the huntingtin protein (mHTT). Despite numerous studies conducted on various cellular and animal models, specific mechanisms explaining the biological role of mHTT and its toxicity to striatal neurons have not yet been established, and effective therapy for patients has not been developed. We obtained and characterized a new line of dermal fibroblasts HDDF (Huntington Disease Dermal Fibroblasts) from a patient with a confirmed diagnosis of HD. The growth characteristics of the HDDF line, staining for canonical markers, karyotyping and cell phenotyping were performed. Direct differentiation of fibroblasts from the resulting line into induced striatal neurons was carried out. The new fibroblast line can be used as a cell model to study the biological role of mHTT and various manifestations of HD pathogenesis both in fibroblasts themselves and in induced neuronal cells obtained using reprogramming methods.

**Keywords:** skin fibroblasts, Huntington's disease, CAG repeats, huntingtin, polyglutamine, transdifferentiation