

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc677378>

EDN: SDZLIY



Новая экспериментальная *in vitro* модель болезни Вильсона–Коновалова на основе человеческих клеток дефинитивной эндодермы

М.А. Берестовой^{1,2}, В.Д. Стародубова², Е.В. Карпухина³, А.С. Баранова², А.Г. Шохина^{1,2}

¹ Федеральный центр мозга и нейротехнологий Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия;

² Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия;

³ Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Москва, Россия

АННОТАЦИЯ

Обоснование. Болезнь Вильсона–Коновалова представляет собой редкое аутосомно-рецессивное заболевание, вызванное мутациями в гене *ATP7B*, который кодирует медь-транспортирующую АТФазу. Нарушение функции этого белка приводит к сбою в выведении меди через желчь, что вызывает её патологическое накопление в гепатоцитах. В настоящее время спектр доступных клеточных моделей для изучения молекулярных основ этой патологии и поиска новых терапевтических подходов значительно ограничен.

Цель. Разработка *in vitro* модели на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека для изучения молекулярных механизмов болезни Вильсона–Коновалова и скрининга терапевтических стратегий.

Методы. Мы создали 2D-клеточную модель на основе клеток дефинитивной эндодермы здорового донора, используя валидированные нами индуцированные плюрипотентные клетки с последующей дифференцировкой индукторами активином A и CHIR99021. Перегрузку медью, характерную для патогенеза болезни Вильсона–Коновалова, имитировали путём внесения экзогенной меди в ростовую среду. Для оценки относительной выживаемости клеток применяли краситель Alamar Blue.

Результаты. Используемая линия индуцированных плюрипотентных стволовых клеток демонстрирует нормальный кариотип; морфологию, характерную для эмбриональных стволовых клеток; экспрессирует маркёры плюрипотентных клеток *SOX2*, *OCT4*, *TRA-1-60* и *SSEA-4* и формирует ткани всех трёх зародышевых листков при спонтанной дифференцировке в эмбриоидных тельцах. Дифференцировка данных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток по предлагаемой методике приводит к получению клеток дефинитивной эндодермы с соответствующей морфологией, которые экспрессируют маркёры *SOX17*, *FOXA2* и *ATP7B*. Полученная модель демонстрирует чувствительность к перегрузке экзогенной медью с IC_{50} 197 мкМ.

Заключение. Созданная платформа на основе человеческих клеток дефинитивной эндодермы, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток здорового донора, позволяет моделировать перегрузку меди *in vitro*, имитируя нарушение клеточного метаболизма при болезни Вильсона–Коновалова. Таким образом, предлагаемая модель может быть использована как для фундаментальных исследований, так и для разработки новых терапевтических подходов.

Ключевые слова: ИПСК; болезнь Вильсона–Коновалова; *ATP7B*; перегрузка медью; дефинитивная эндодерма.

Как цитировать:

Берестовой М.А., Стародубова В.Д., Карпухина Е.В., Баранова А.С., Шохина А.Г. Новая экспериментальная *in vitro* модель болезни Вильсона–Коновалова на основе человеческих клеток дефинитивной эндодермы // Гены и клетки. 2025. Т. 20, № 3. С. 194–204. DOI: 10.17816/gc677378 EDN: SDZLIY

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc677378>

EDN: SDZLIY

A Novel Experimental *In Vitro* Human Definitive Endoderm Cell-Derived Model of Wilson Disease

Mikhail A. Berestovoy^{1,2}, Varvara D. Starodubova², Elizaveta V. Karpukhina³, Arina S. Baranova², Arina G. Shokhina^{1,2}

¹ Federal Center of Brain Research and Neurotechnologies, Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia;

² The Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov, Moscow, Russia;

³ The First Sechenov Moscow State Medical University, Moscow, Russia

ABSTRACT

BACKGROUND: Wilson disease is a rare autosomal recessive disorder involving mutations in the *ATP7B* gene, which encodes the copper-transporting ATPase. The dysfunctional protein disrupts biliary copper excretion, which results in copper accumulation in hepatocytes. The available range of cell models to investigate the molecular mechanisms of this disease and to identify novel therapeutic approaches is currently limited.

AIM: To develop an *in vitro* induced human pluripotent stem cell-derived model for investigating the molecular mechanisms of Wilson disease and evaluating therapeutic strategies.

METHODS: A 2D cell model has been developed using validated induced pluripotent definitive endoderm cells obtained from a healthy donor and differentiated by activin A and CHIR99021. The copper overload that is a hallmark of the pathogenesis of Wilson disease was simulated by introducing exogenous copper into the growth medium. Relative cell viability was measured by the Alamar Blue assay.

RESULTS: The induced pluripotent stem cells demonstrate a normal karyotype. Their morphology is typical of embryonic stem cells. They express pluripotency markers (*SOX2*, *OCT4*, *TRA-1-60*, and *SSEA-4*) and form tissues of all three germ layers during spontaneous differentiation in embryoid bodies. The differentiation of these induced pluripotent stem cells using the suggested procedure produces definitive endoderm cells that exhibit the expected morphology and express the markers *SOX17*, *FOXA2*, and *ATP7B*. The obtained model demonstrates sensitivity to exogenous copper overload at IC₅₀ 197 μM.

CONCLUSION: The developed platform of definitive endoderm cells obtained from healthy donor's induced pluripotent stem cells can be used to model the copper overload *in vitro*, simulating a cellular metabolic dysfunction associated with Wilson disease. Therefore, the proposed model can be used for both fundamental research and the development of novel therapeutic approaches.

Keywords: induced pluripotent stem cells; Wilson disease; *ATP7B*; copper overload; definitive endoderm.

To cite this article:

Berestovoy MA, Starodubova VD, Karpukhina EV, Baranova AS, Shokhina AG. A Novel Experimental *In Vitro* Human Definitive Endoderm Cell-Derived Model of Wilson Disease. *Genes & cells*. 2025;20(3):194–204. DOI: 10.17816/gc677378 EDN: SDZLIY

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Вильсона–Коновалова (БВК) обусловлена мутациями гена *ATP7B*, кодирующего медь-транспортирующую АТФазу, функциональная активность которой обеспечивает транспорт и выведение меди [1]. У здоровых людей избыток меди экскретируется с желчью и удаляется из организма. В случае, если человек наследует мутантные копии гена *ATP7B* от обоих родителей, экспорт меди нарушается, приводя к её накоплению в печени, а позднее — в центральной нервной системе и других органах. Неоднозначные и многочисленные клинические проявления затрудняют своевременную постановку диагноза, что может привести к терминальному повреждению печени и тяжёлым неврологическим симптомам.

Изучение молекулярных механизмов, лежащих в основе патогенеза заболевания, невозможно без адекватной клеточной модели. Однако в случае БВК моделирование *in vitro* в значительной степени затруднено. Клеточные модели на основе immortalized культур не передают в полной мере сложных взаимодействий между разными клеточными популяциями печени, а полученные на них результаты зачастую не удаётся транслировать дальше. По этой причине для наиболее полной имитации патофизиологии БВК наиболее предпочтительно использование первичных гепатоцитов человека и человеческих плюрипотентных стволовых клеток, включая эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) [2, 3]. Первичные гепатоциты человека лучше отражают функции печени, но доступ к ним ограничен, кроме того, их срок жизни в культуре невелик [4]. ИПСК можно получить от пациентов с конкретными мутациями *ATP7B*, например с распространённой мутацией R778L или H1069Q. ИПСК пациента сохраняют способность дифференцироваться, а полученные из них гепатоцитоподобные клетки демонстрируют дефекты транспорта меди и аномальную локализацию *ATP7B*, воспроизводя фенотип заболевания [5, 6]. Однако гепатоцитоподобные клетки, полученные из ИПСК, часто не достигают полной зрелости, что может ограничить их использование в определённых исследованиях [7]. Модели на основе человеческих ЭСК разрабатывали путём введения специфических мутаций с использованием технологии геномного редактирования CRISPR/Cas9. Например, гепатоцитоподобные клетки, полученные при дифференцировке человеческих ЭСК, несущих мутацию R778L, демонстрировали дефекты экспорта меди, аналогичные тем, что наблюдаются в моделях на основе клеток пациентов [8]. В этом случае моделирование БВК возможно без использования образцов пациентов. Однако использование ЭСК часто ограничено этическими соображениями, связанными с их происхождением из эмбрионов.

ЭСК менее доступны (по сравнению с ИПСК), что может затруднить их широкое применение в исследованиях.

Дефинитивная энтодерма является ключевым зародышевым листком, формирующимся на этапе гаструляции (15–17-й день эмбриогенеза человека) и дающим начало структурам печени, поджелудочной железы, лёгких, щитовидной железы и кишечной трубки [9, 10]. Процесс её развития начинается с имплантации бластоцисты в эндометрий, что инициирует переход от эмбриобласта к эпибласту — предшественнику всех трёх зародышевых листков. На стадии гаструляции клетки эпибласта мигрируют к срединной линии, образуя первичную полосу — структуру, регулируемую сигнальными путями WNT и NODAL [11]. Клетки, проходящие через узел Гензена (передний участок первичной полосы), под действием факторов Brachyury (T) и FOXA2 детерминируются в бипотентные мезендодермальные предшественники [12].

При дифференцировке *in vitro* естественные процессы развития стволовых клеток в дефинитивной энтодерме воспроизводят с помощью активина A (аналог NODAL) и ингибитора GSK3 β (CHIR99021). Под их воздействием мезендодермальные клетки дифференцируются в дефинитивную энтодерму, экспрессируя специфические маркеры *SOX17*, *FOXA2* и *CXCR4* [13]. Клиническая значимость дефинитивной энтодермы связана с её ролью в генерации функциональных клеток, в частности гепатоцитов и инсулин-продуцирующих β -клеток поджелудочной железы [14].

В данном исследовании мы представляем платформу, состоящую из клеток дефинитивной энтодермы, полученных путём дифференцировки ИПСК здорового донора. Энтодермальный этап — первая и самая короткая стадия дифференцировки ИПСК в гепатоциты, причём в этот момент ген *ATP7B* уже активно экспрессируется [6]. Использование клеток дефинитивной энтодермы позволяет получить полноценную модель, которая значительно выгоднее уже существующих аналогов по времени и в экономическом плане. Представленная методика в дальнейшем также может быть реализована и для клеток пациентов с БВК, несущих те или иные мутации гена *ATP7B*, что позволит получить персонифицированные модели. Используя этот инновационный подход, мы стремимся углубить понимание механизмов БВК, а также способствовать разработке таргетных терапевтических стратегий, адаптированных к индивидуальным профилям пациентов.

ЦЕЛЬ

Создание *in vitro* модели на основе клеток дефинитивной энтодермы человека, полученных из ИПСК здорового донора, для изучения молекулярных основ патогенеза БВК и тестирования различных терапевтических стратегий.

МЕТОДЫ

Культивирование индуцированных плюрипотентных стволовых клеток

Линию ИПСК культивировали без фидера в среде mTeSR plus (STEMCELL Technologies, Канада) с добавлением 50 ед./мл пенициллина–стрептомицина («ПанЭко», Россия) на покрытых «Матригелем» без факторов роста (Corning, США) чашках Петри во влажном инкубаторе при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Пассирование клеток проводили с помощью раствора Accutase (Himedia, Индия). При пассировании клеток к среде mTeSR plus добавляли 10 мкМ ROCK-ингибитора (STEMCELL Technologies, Канада). Отсутствие микоплазменной контаминации подтверждали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием набора MycoReport («Евроген», Россия).

Иммуноцитохимическое окрашивание

Клетки фиксировали 3,7% раствором параформальдегида в фосфатно-солевом буферном растворе — PBS («ПанЭко», Россия) в течение 20 мин при комнатной температуре, после чего трижды промывали 200 мкл PBS. В случае окраски эмбрионидных телец фиксировали их 30 мин при медленном перемешивании, отмывали 0,1% раствором Triton-X (PanReas, Италия) в PBS также при медленном перемешивании. Затем пермеабелизировали мембраны клеток 0,2% раствором Triton-X в PBS в течение 10 мин при комнатной температуре, после чего отмывали от Triton-X три раза с использованием 200 мкл PBS. В случае окраски эмбрионидных телец стадия пермеабелизации была объединена со стадией блокирования неспецифического связывания антител инкубацией в блокирующем буфере, представляющем собой раствор 0,3% Triton-X в PBS и 5% козьей сыворотки (Abcam, США),

при комнатной температуре в течение 2 ч при осторожном перемешивании. Затем вносили блокирующий буфер, 0,2% (в случае окраски эмбрионидных телец — 0,3%) Triton-X в PBS, 5% козьей сыворотки и инкубировали в течение 1 ч. Первичные антитела разводили в блокирующем буфере, представляющем собой раствор 0,2% (в случае окраски эмбрионидных телец — 0,3%) Triton-X в PBS и 5% козьей сыворотки, в соответствии с инструкциями производителя и инкубировали при 4 °С в течение ночи, после чего промывали 3 раза с использованием 200 мкл PBS в течение 10 мин. В случае окраски эмбрионидных телец их отмывали раствором 0,1% Triton-X в PBS при медленном перемешивании. Вторичные антитела, конъюгированные с флуорофором, разводили в блокирующем буфере, представляющем собой раствор 0,2% (в случае окраски эмбрионидных телец — 0,3%) Triton-X в PBS и 5% козьей сыворотки, в соответствии с инструкциями производителя и инкубировали в течение 1 ч в темноте, после чего промывали 3 раза 200 мкл раствора PBS в течение 10 мин. Для окрашивания ядер использовали краситель DAPI (Lumiprobe, Россия). Препараты культур клеток анализировали с помощью EVOS M7000 Imaging System (Thermo Fisher Scientific, США), а препараты эмбрионидных телец — с помощью конфокального микроскопа Eclipse Ti2 (Nikon, Япония). Список использованных в работе первичных антител приведён в табл. 1, вторичных антител — в табл. 2.

Кариотипирование

Для формирования метафазных пластинок находящиеся в стадии экспоненциального роста ИПСК обрабатывали раствором «Колцемида» (0,1 мкг/мл; «ПанЭко», Россия) в течение 30 мин при температуре 37 °С в CO₂-инкубаторе. Далее клетки открепляли от поверхности с помощью раствора Accutase (Himedia, Индия) и инкубировали в 0,56% растворе KCl (Sigma-Aldrich, США)

Таблица 1. Первичные антитела, использованные в работе

Table 1. Primary antibodies used in the study

Антитело	Производитель, страна	Кат. №
Rabbit anti-human OCT4 (OCT3) Antibody, Clone 3A2A20	STEMCELL Technologies, Канада	60093.1
Rabbit anti-SOX2 Antibody	Cell Signaling Technology, США	3579S
Mouse anti-human SSEA-4 Antibody, Clone MC-813-70	STEMCELL Technologies, Канада	60062
Rabbit anti-SOX17 Antibody	Affinity Biosciences, Китай	DF9090
Rabbit anti-FOXA2 Antibody	Merk, Германия	AB4125
Mouse anti-human TRA-1-60, Clone TRA-1-60R	STEMCELL Technologies, Канада	60064
Rabbit anti-CD31, EPR3094	Abcam, Великобритания	ab76533
Mouse anti-human NESTIN	Merk Millipore, США	ZMS1022-4X25UI
Rabbit anti-VIMENTIN	Thermo Fisher Scientific, США	RM-9120-S0
Rabbit anti-PAX6	BioLegend, США	901302
Mouse anti-human CK7, клон PBM-12F1	«ПраймБиоМед», Россия	10-310048-01
Rabbit anti-human ATP7B	Sigma-Aldrich, США	HPA013187

Таблица 2. Вторичные антитела, использованные в работе
Table 2. Secondary antibodies used in the study

Антитело	Производитель, страна	Кат. №	Разведение
Goat anti-rabbit IgG (H+L) cross-adsorbed conjugated antibody, Alexa Fluor 647	Thermo Fisher Scientific, США	A-21245	1/1000
Goat anti-rabbit IgG (H+L) cross-adsorbed conjugated antibody, Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific, США	A-11008	1/500
Goat anti-mouse IgG (H+L) cross-adsorbed conjugated antibody, Alexa Fluor 647	Thermo Fisher Scientific, США	A-21235	1/1000
Goat anti-mouse IgG (H+L) cross-adsorbed conjugated antibody, Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific, США	A-11001	1/1000

в течение 10 мин при температуре 42 °С на водяной бане. Затем суспензию ядер осаждали на центрифуге (300 g, 4 мин) и осадок фиксировали ледяным (–20 °С) раствором, содержащим метанол и уксусную кислоту (Sigma-Aldrich, США) в соотношении 6:1, после чего центрифугировали (300 g, 4 мин) и повторно фиксировали ядра тем же раствором. Затем снова центрифугировали (600 g, 4 мин) и ресуспендировали ядра в растворе, содержащем метанол и уксусную кислоту в соотношении 3:1. Образцы хранили при температуре –20 °С. Для проведения анализа кариотипа суспензию ядер по каплям наносили на холодные (4 °С) предметные стёкла Superfrost (Thermo Fisher Scientific, США), высушивали при комнатной температуре, после чего препараты инкубировали при 95 °С в течение 30 мин. Далее препараты обрабатывали 0,25% раствором трипсина («ПанЭко», Россия) в течение 9–11 с и окрашивали однократным раствором красителя Гимза («ПанЭко», Россия) в течение 1–2 мин, затем высушивали на воздухе. Анализ препаратов был произведён в Национальном медицинском исследовательском центре детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачёва.

Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

Тотальная РНК из фибробластов, ИПСК и дефинитивной эндодермы была выделена с помощью реагента RNA solo (BC034S; «Евроген», Россия), обратная транскрипция проведена с использованием 1 мкг РНК с помощью набора для синтеза первой цепи комплементарной ДНК MMLV RT kit (SK021; «Евроген», Россия). Анализ полимеразной цепной реакции в режиме реального времени выполнен с помощью набора 5X qPCRmix-HS SYBR (PK147L; «Евроген», Россия) с праймерами на *OCT4*, *SOX2*, *NANOG*, *FOXA2*, *SOX17*, *ACTB*, *TUBB3* (табл. 3). Использовали анализатор LightCycler® 96 Instrument (Roche Diagnostics, Германия). Программа включала преинкубацию в течение 5 мин при 95 °С, 3 стадии амплификации, повторенные 45 циклов (30 с при 95 °С; 30 с при 55 °С или 25 с при 59 °С; 30 с при 72 °С). Уровни экспрессии генов рассчитывали как кратное изменение экспрессии по сравнению с недифференцированными фибробластами. Относительный уровень экспрессии целевых генов был определён как $2^{-\Delta\Delta Ct}$. В качестве контрольных генов использовали β-тубулин III класса (*TUBB3*) или β-актин (*ACTB*). Каждая реакция была поставлена в двух биологических повторностях.

Таблица 3. Последовательности праймеров, использованных для количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией
Table 3. Primer sequences used for quantitative reverse transcription polymerase chain reaction

Ген	Последовательность праймера
<i>OCT4</i>	F 5'-CAATTTGCCAAGCTCCTGA-3'; R 5'-CGTTGGCTGAATACCTTCC-3'
<i>SOX2</i>	F 5'-TGCTGCCTCTTTAAGACTAGGAC-3'; R 5'-GCCGCCGATGATTGTTATTA-3'
<i>NANOG</i>	F 5'-TACCTCAGCCTCCAGCAGAT-3'; R 5'-TGCGTCACACCATTGCTATT-3'
<i>FOXA2</i>	F 5'-GGAGCGGTGAAGATGGAAGG-3'; R 5'-CGGCGTTCATGTTGCTCAC-3'
<i>SOX17</i>	F 5'-CAAGATGCTGGGCAAGTC-3'; R 5'-TGGTCTGCATGTGCTG-3'
<i>ACTB</i>	F 5'-AGGCATCCTCACCTGAAGTA-3'; R 5'-CACACGCAGCTCATTGTAGA-3'
<i>TUBB3</i>	F 5'-ACACAGGCGTCCACAGTT-3'; R 5'-GTTCCAGGTCCACCAGAATG-3'

Дифференцировка индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в клетки дефинитивной эндодермы

Использованный нами протокол дифференцировки был ранее описан в статье D.T. Peters и соавт. [15]. Для дифференцировки ИПСК в дефинитивную эндодерму клетки высевали на покрытые «Матригелем» без факторов роста лунки 96-луночного планшета в 100 мкл среды mTeSR plus (STEMCELL Technologies, Канада) с 10 мкМ ROCK-ингибитора (STEMCELL Technologies, Канада). На следующий день производили смену среды mTeSR plus на среду для дифференцировки, состоящую из DMEM/F12 (Himedia, Индия), 1% B27 plus supplement (Gibco, США), 50 ед./мл пенициллина–стрептомицина, а также содержащую 100 нг/мл активина А (STEMCELL Technologies, Канада) и 3 мкМ малой молекулы CHIR99021 (STEMCELL Technologies, Канада). Клетки культивировали в среде для дифференцировки 5 дней, ежедневно меняя среду.

Модель перегрузки медью

Цитотоксическое действие меди на клетки дефинитивной эндодермы, полученные из ИПСК, оценивали с помощью красителя на основе резазурина — Alamar Blue

(Himedia, Индия). Для этого ИПСК дифференцировали в клетки дефинитивной эндодермы в 96-луночных планшетах в течение 5 дней. После дифференцировки среду меняли на среду для клеток дефинитивной эндодермы, состоящую из DMEM/F12 (Himedia, Индия), 1% B27 plus supplement (Gibco, США), 1% N2 supplement (Gibco, США), 1% Glutamax (Gibco, США), 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты (Bidepharm, Китай), 0,1% бычьего сывороточного альбумина (Sigma-Aldrich, США), 5 нг/мл фактора роста фибробластов 2 (SCI store, Россия), 20 нг/мл эпидермального фактора роста (SCI store, Россия), 10 нг/мл фактора роста эндотелия сосудов (SCI store, Россия), 3 мкМ CHIR99021 (STEMCELL Technologies, Канада), 0,5 мкМ ингибитора SB-431542 (STEMCELL Technologies, Канада). Такая среда обеспечивает выживание и пролиферацию клеток дефинитивной эндодермы. Состав среды для дефинитивной эндодермы адаптирован из статьи R.R. Zhang и соавт. [16]. В среду для клеток дефинитивной эндодермы добавляли дигидрат хлорида меди (Sigma-Aldrich, США) в диапазоне от 7,8 до 500 мкМ и инкубировали в течение 24 ч. По окончании инкубации клетки аккуратно промывали один раз 100 мкл PBS для удаления избытка CuCl_2 . Затем добавляли 100 мкл культуральной среды для дефинитивной эндодермы и вносили по 10 мкл раствора Alamar Blue. Интенсивность флуоресценции измеряли после 3-часового периода инкубации с помощью планшетного флуориметра Varioscan Lux (Thermo Fisher Scientific, США). Ингибирование жизнеспособности клеток рассчитывали по следующей формуле: ингибирование жизнеспособности клеток (%) = $100 - (\text{образец} - F_0) / (\text{контрольный образец} - F_0) \times 100$, где F_0 — интенсивность флуоресценции в образце без клеток, а контрольный образец — это образец с клетками без добавления CuCl_2 .

РЕЗУЛЬТАТЫ

Дифференцировка человеческих индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в дефинитивную эндодерму

В исследовании использована линия ИПСК FCBRNi001-A (<https://hpscereg.eu/cell-line/FCBRNi001-A>), ранее полученная в Федеральном центре мозга и нейротехнологий Федерального медико-биологического агентства России из фибробластов кожи здорового донора-мужчины [17]. Для перепрограммирования фибробластов в ИПСК был использован неинтегрирующий вирус Сендай с факторами транскрипции Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc. Клетки имели типичную морфологию ИПСК (рис. 1, а), а анализ кариотипа полученных в результате перепрограммирования клеток, проведённый нами на 12-м пассаже методом GTG-окрашивания метафазных пластинок, показал наличие нормального кариотипа (46, XY) (рис. 1, б). Плюрипотентные свойства были подтверждены нами с помощью иммуноцитохимического окрашивания

на маркёры плюрипотентности *SOX2*, *OCT4*, *TRA-1-60* и *SSEA-4* (рис. 1, д). Количественная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией также выявила 8000-кратное увеличение экспрессии *OCT4* ($p < 0,0001$), 5000-кратное — *SOX2* ($p < 0,0001$), 400-кратное — *NANOG* ($p < 0,0001$) по сравнению с исходными фибробластами (рис. 1, с). Полученная культура демонстрировала способность к образованию тканей всех трёх зародышевых листков (энто-, экто- и мезодермы) при спонтанной дифференцировке *in vitro* в составе эмбрионидных телец (рис. 1, е).

Для дальнейшей дифференцировки использовали ИПСК на 15–18 пассажах, что обеспечивает оптимальное соотношение геномной стабильности и дифференцировочного потенциала. Активацию TGF β -пути (активин А, 100 нг/мл) и ингибирование GSK3 β (CHIR99021, 3 мкМ) проводили в соответствии с протоколами, стандартизированными для спецификации дефинитивной эндодермы [18, 19]. Данная комбинация имитирует эмбриональные сигналы *Nodal* и *Wnt*, критичные для формирования первичной полоски и последующего разделения мезендодермы. На 5-е сутки дифференцировки >90% клеток демонстрировали морфологию, характерную для дефинитивной эндодермы: уплощённую эпителиоидную структуру с выраженными межклеточными контактами (рис. 2, а). Иммуноцитохимический анализ подтвердил ядерную локализацию транскрипционных факторов *SOX17* у (68,55 $\pm$ 4,91)% клеток ($p < 0,05$) и *FOXA2* — у (87,12 $\pm$ 3,98)% клеток ($p < 0,05$) (рис. 2, б), что согласуется с данными литературы [13]. Количественная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией выявила 200-кратное увеличение экспрессии *FOXA2* ($p < 0,01$) и 16-кратное — *SOX17* ($p < 0,0001$) по сравнению с исходными фибробластами (рис. 2, с). Таким образом, полученные нами путём дифференцировки из ИПСК клетки фенотипически и по профилю экспрессии характерных маркёров схожи с клетками дефинитивной эндодермы.

Модель перегрузки медью

Согласно данным литературы, ген *ATP7B* начинает демонстрировать активную экспрессию уже в клетках дефинитивной эндодермы [6]. Для подтверждения этого было проведено иммуноцитохимическое окрашивание дифференцированных нами из ИПСК клеток. Результаты анализа (рис. 3, а) подтвердили наличие в них белка ATP7B. Для имитации патологического накопления меди, характерного для патогенеза БВК, мы искусственно перегружали клетки CuCl_2 путём его внесения в среду. Полученные результаты демонстрируют выраженный дозозависимый эффект CuCl_2 на жизнеспособность клеток дефинитивной эндодермы (рис. 3, б). Полулетальная концентрация CuCl_2 (IC_{50}), при которой гибнет 50% клеток, составила 197 мкМ. Эти данные подтверждают чувствительность предложенной клеточной модели БВК к избытку меди в среде и её пригодность для изучения цитотоксических эффектов меди при патогенезе заболевания.

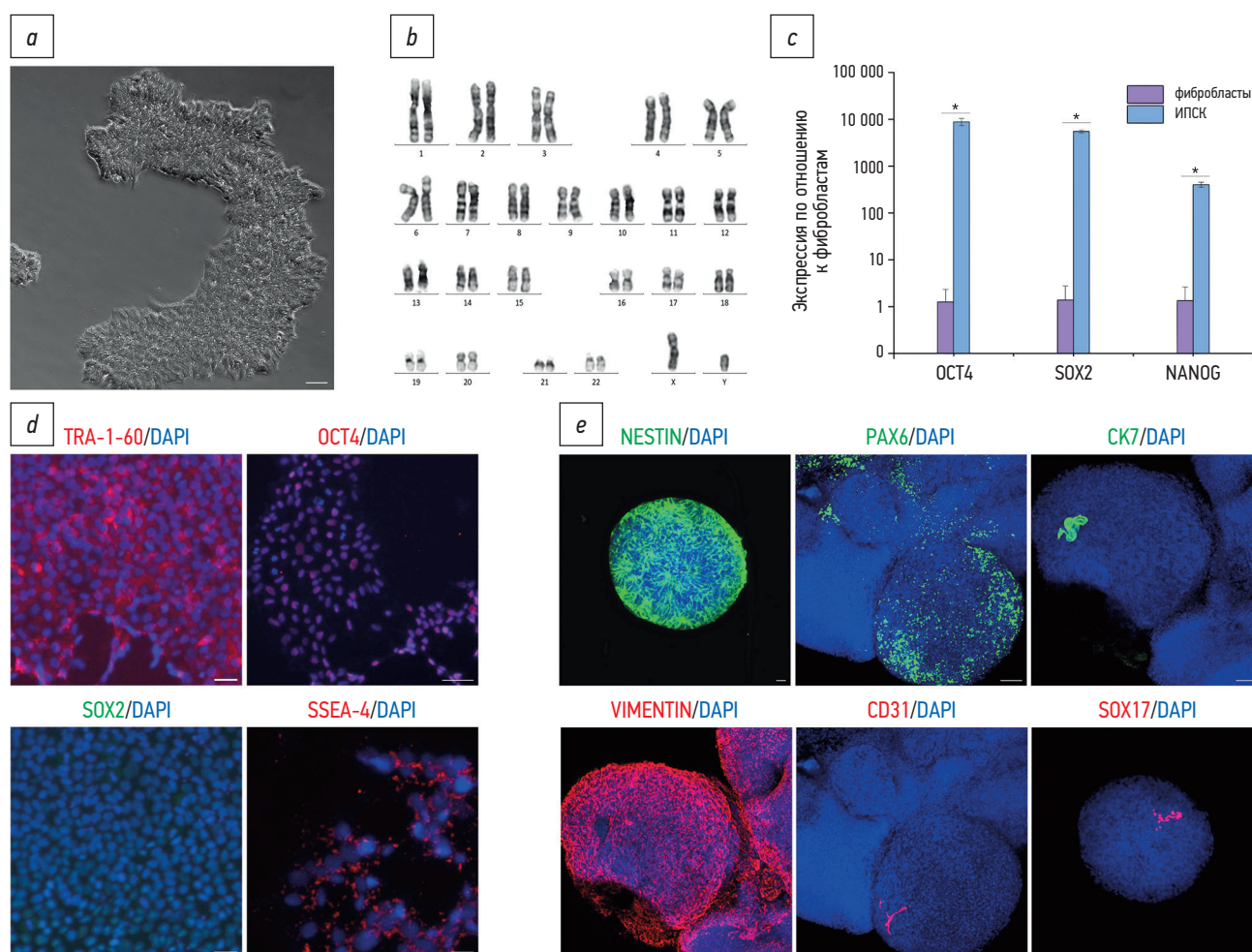


Рис. 1. Характеристика линии ИПСК FCBRNi001-A: *a* — морфология клеток; *b* — анализ кариотипа линии ИПСК; *c* — результаты количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией на маркёры плюрипотентности OCT4, SOX2, NANOG; * статистически значимые различия, $p < 0,0001$; *d* — иммуноцитохимическое окрашивание на маркёры плюрипотентности SOX2, OCT4, TRA-1-60 и SSEA-4; окраска ядер: DAPI (синий), исследуемый маркёр (красный или зелёный); *e* — иммуноцитохимическое окрашивание эмбриоидных тел, сформированных из ИПСК, при спонтанной дифференцировке в ткани трёх зародышевых листков; окраска ядер: DAPI (синий), исследуемый маркёр (красный или зелёный). Маркёры эктодермы — NESTIN, PAX6, ЦИТОКЕРАТИН 7 (CK7); мезодермы — VIMENTIN, CD31; энтодермы — SOX17. Бар 50 мкм. ИПСК — индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.

Fig. 1. FCBRNi001-A induced pluripotent stem cell line: *a*, cell morphology; *b*, karyotyping of the induced pluripotent stem cell line; *c*, quantitative reverse transcription polymerase chain reaction for pluripotency markers: OCT4, SOX2, NANOG; *, statistically significant differences, $p < 0.0001$; *d*, immunocytochemical staining for pluripotency markers: SOX2, OCT4, TRA-1-60, and SSEA-4. DAPI (blue) nuclear staining, red/green marker staining; *e*, immunocytochemical staining of embryoid bodies obtained from induced pluripotent stem cells during spontaneous differentiation in the tissue of three germ layers: DAPI (blue) nuclear staining, red/green marker staining. Ectoderm markers include NESTIN, PAX6, CYTOKERATIN 7 (CK7); mesoderm markers include VIMENTIN, CD31; endoderm marker is SOX17. Scale bar = 50 μ m; ИПСК, induced pluripotent stem cells.

ОБСУЖДЕНИЕ

В этом исследовании мы использовали линию ИПСК FCBRNi001-A, полученную из фибробластов кожи здорового мужчины с помощью неинтегрирующего вируса Сендай, кодирующего факторы транскрипции Oct4, Sox2, Klf4 и с-Мус [17]. Этот подход обеспечил геномную стабильность, подтверждённую анализом кариотипа на 12-м пассаже (нормальный кариотип 46, XY). ИПСК демонстрировали типичные маркёры плюрипотентности (SOX2, OCT4, TRA-1-60, SSEA-4) и способность к спонтанной дифференцировке во все три зародышевых листка, что согласуется с данными реестра. Использование активина A и CHIR99021 для имитации сигнальных путей *Nodal*

и *Wnt* позволило эффективно дифференцировать ИПСК в дефинитивную энтодерму, при этом более 90% клеток приобретали эпителиоидную морфологию, (68,55±4,91)% клеток экспрессировали SOX17 и (87,12±3,98)% — FOXA2. Эти результаты подтверждают воспроизводимость протоколов дифференцировки дефинитивной энтодермы и подчёркивают полезность пациент-специфичных ИПСК для моделирования моногенных заболеваний, таких как БВК.

Обнаружение экспрессии *ATP7B* в клетках дефинитивной энтодермы подчёркивает раннюю роль этого транспортера меди в спецификации гепатической линии. Эксперименты с перегрузкой меди показали дозозависимую цитотоксичность ($IC_{50}=197$ мкМ), что отражает

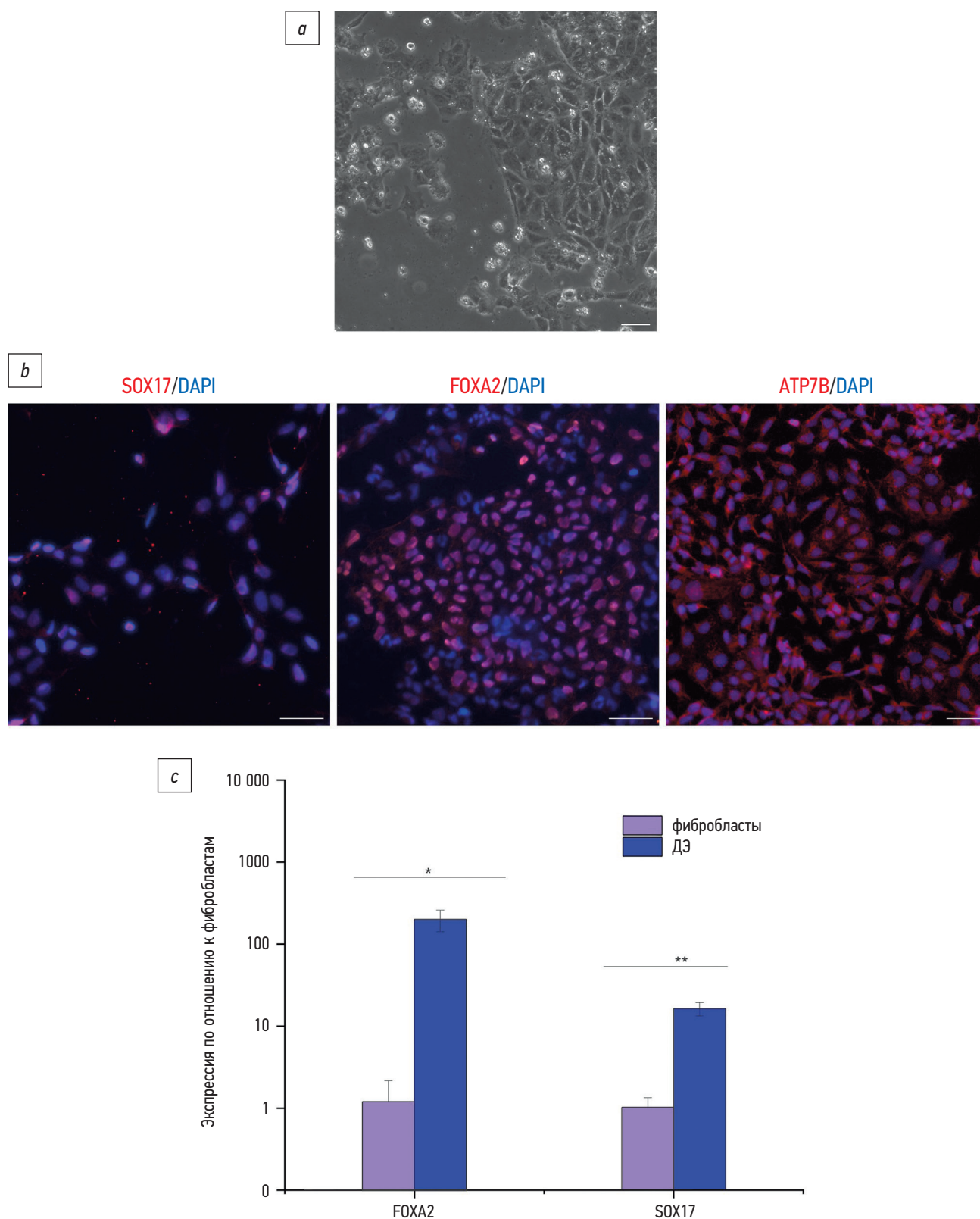


Рис. 2. Характеристика клеток дефинитивной энтодермы, дифференцированных из ИПСК: *a* — морфология клеток; *b* — иммуноцитохимическое окрашивание на маркеры дефинитивной энтодермы SOX17, FOXA2; окраска ядер: DAPI (синий), исследуемый маркер (красный). Бар 50 мкм; *c* — результат количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией на маркеры дефинитивной энтодермы FOXA2, SOX17; * различие с фибробластами статистически значимо, $p < 0,01$; ** различие с фибробластами статистически значимо, $p < 0,0001$. ДЭ — дефинитивная энтодерма; ИПСК — индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.

Fig. 2. Definitive endoderm cells differentiated from induced pluripotent stem cells: *a*, cell morphology; *b*, immunocytochemical staining for definitive endoderm markers (SOX17, FOXA2); DAPI (blue) nuclear staining, red marker staining. Scale bar = 50 μ m; *c*, quantitative reverse transcription polymerase chain reaction for definitive endoderm markers (FOXA2, SOX17); *, difference with fibroblasts is statistically significant, $p < 0.01$; **, difference with fibroblasts is statistically significant, $p < 0.0001$. ДЭ, definitive endoderm; ИПСК, induced pluripotent stem cells.

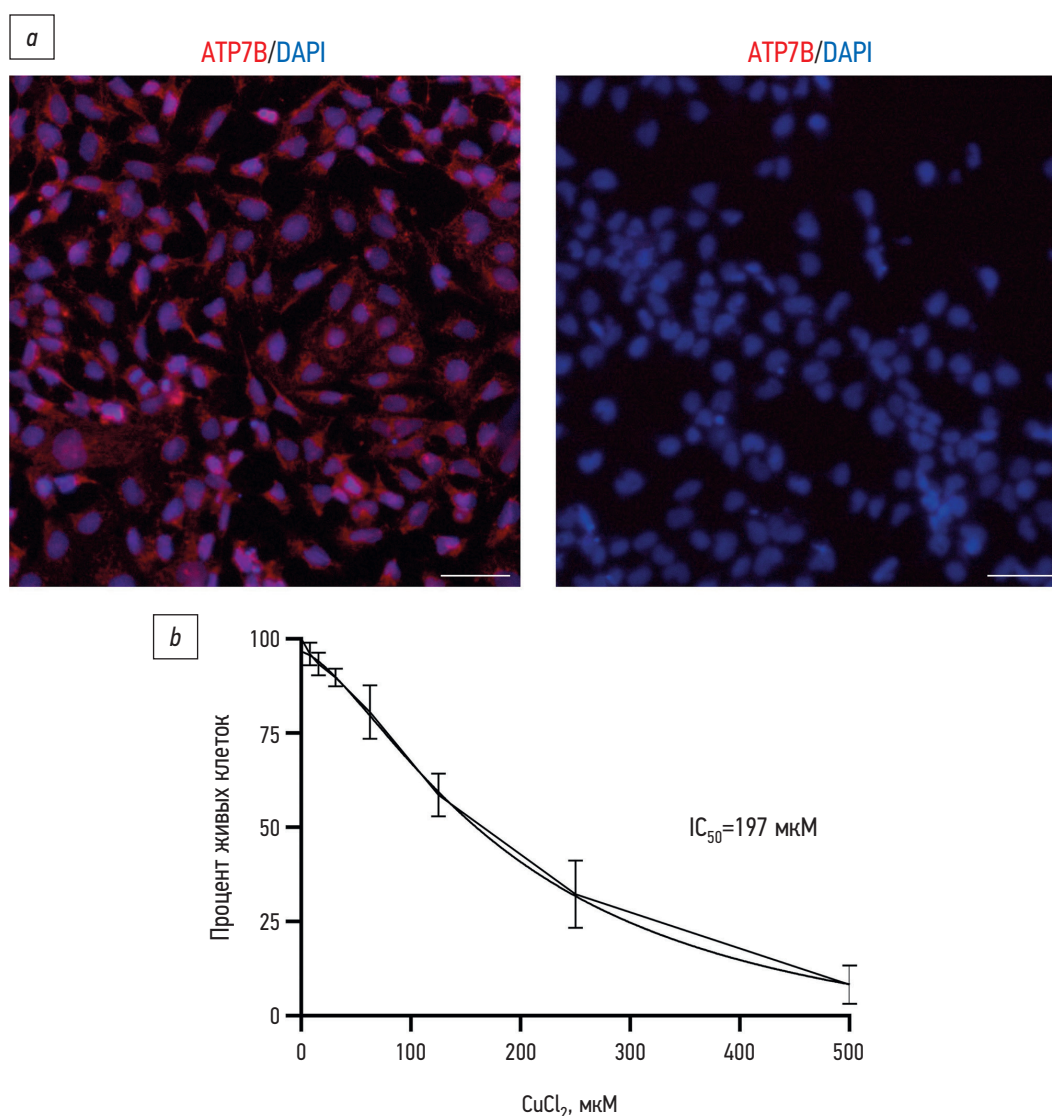


Рис. 3. Клеточная модель болезни Вильсона–Коновалова на основе человеческих клеток дефинитивной энтодермы: *a* — иммуноцитохимическая окраска клеток дефинитивной энтодермы (микрофотография слева) на экспрессию *ATP7B*; окраска ядер DAPI (синий), *ATP7B* (красный). В качестве отрицательного контрольного образца были использованы фибробласты человека (микрофотография справа). Бар 50 $\mu\text{м}$; *b* — кривая ингибирования жизнеспособности клеток дефинитивной энтодермы при добавлении дигидрата хлорида меди. Жизнеспособность клеток дефинитивной энтодермы оценивали через 24 ч после внесения добавки в сравнении с контролем (без добавления CuCl_2). На графике представлены средние значения жизнеспособности и стандартные отклонения в трёх биологических повторностях. Статистическую обработку результатов и определение полулетальной концентрации (IC_{50}) проводили с помощью программы GraphPad Prism.

Fig. 3. Human definitive endoderm cell-derived model of Wilson disease: *a*, immunocytochemical staining of definitive endoderm cells (left micrograph) for *ATP7B* expression: DAPI (blue) nuclear staining, *ATP7B* (red) staining. Human fibroblasts were used as a negative control (right micrograph). Scale bar = 50 μm ; *b*, dose-response curve of cell viability inhibition for definitive endoderm cells treated with copper(II) chloride dihydrate. Cell viability was assessed 24 h after copper(II) chloride dihydrate treatment relative to the untreated control (without CuCl_2). Data represent mean viability values $\pm$ standard deviation from three biological replicates. Statistical analysis and determination of the half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) were performed using GraphPad Prism.

патологическое накопление меди, наблюдаемое при БВК. Эта модель преодолевает ограничения иммортализованных культур, которые лишены физиологических взаимодействий между клетками, и первичных гепатоцитов, имеющих короткий срок жизни. Однако неполная зрелость клеток дефинитивной энтодермы остаётся ограничением, поскольку они могут не полностью воспроизводить функции взрослых гепатоцитов. Будущие исследования могут включать использование 3D-систем кокультивирования

для повышения зрелости и моделирования мультиклеточных ниш печени.

Этический контроль и согласие донора являются важными сильными сторонами этого исследования. Линия FCB RNi001-A соответствует международным стандартам, с анонимизированными данными донора и одобрением локального этического комитета. Хотя линия доступна для исследований, ограничения на клиническое или коммерческое использование соответствуют этическим рекомендациям.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование предлагает надёжную модель БВК на основе ИПСК линии FCBRNi001-A, которая воспроизводит ключевые аспекты дисрегуляции меди. Протокол дифференцировки приводит к получению клеток дефинитивной эндодермы, экспрессирующих *ATP7B*, что позволяет моделировать токсичность меди с IC_{50} 197 мкМ. Полученные результаты демонстрируют полезность модели для высокопроизводительного скрининга препаратов и механистических исследований патогенеза БВК. Будущие направления включают оптимизацию зрелости дефинитивной эндодермы с помощью 3D-систем и редактирование генома CRISPR-Cas9 для введения пациент-специфичных мутаций гена *ATP7B* (например, R778L). Эта платформа может сократить разрыв между *in vitro* моделями и клиническими приложениями, продвигая стратегии персонализированной терапии для БВК и связанных с ней метаболических расстройств.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Вклад авторов. М.А. Берестовой — разработка методологии, проведение исследования, формальный анализ, написание черновика, пересмотр и редактирование рукописи; В.Д. Стародубова — проведение исследования, формальный анализ, написание черновика, пересмотр и редактирование рукописи; Е.В. Карпукхина — проведение исследования; А.С. Баранова — проведение исследования; А.Г. Шохина — разработка концепции, написание черновика, пересмотр и редактирование рукописи, административное руководство исследовательским проектом, получение финансирования. Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты работы, гарантируя надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой её части.

Благодарности. Авторы выражают признательность врачу-неврологу, научному сотруднику Федерального центра мозга и нейротехнологий Федерального медико-биологического агентства (Москва, Россия) М.А. Солдатову за обеспечение участия донора в исследовании и научному сотруднику Федерального центра мозга и нейротехнологий Федерального медико-биологического агентства В.С. Усатовой за содействие в проведении экспериментов.

Этическая экспертиза. Проведение исследования одобрено локальным этическим комитетом Федерального центра мозга и нейротехнологий Федерального медико-биологического агентства (протокол № 02/14-10-24 от 14.10.2024). Участник исследования добровольно подписал форму информированного согласия до включения в исследование. Исследование не регистрировали.

Согласие на публикацию. Авторы получили письменное информированное добровольное согласие пациента на публикацию персональных данных в научном журнале «Гены и Клетки», включая его электронную версию (дата подписания 21.10.2024). Объём публикуемых данных с пациентом согласован.

Источники финансирования. Исследование проведено с использованием денежных средств гранта Российского научного фонда № 24-74-10106. Финансирующая организация не устанавливала ограничений на использование данных и распространение результатов исследования.

Раскрытие интересов. Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

Оригинальность. При создании настоящей работы авторы не использовали ранее опубликованные сведения (текст, иллюстрации, данные).

Доступ к данным. Все данные, полученные в настоящем исследовании, доступны в статье.

Генеративный искусственный интеллект. При создании настоящей статьи технологии генеративного искусственного интеллекта не использовались.

Рассмотрение и рецензирование. Настоящая работа подана в журнал в инициативном порядке и рассмотрена по обычной процедуре. В рецензировании участвовали один член редакционной коллегии, один внешний рецензент и научный редактор издания.

ADDITIONAL INFORMATION

Author contributions: M.A. Berestovoy: methodology, investigation, formal analysis, writing—original draft, writing—review & editing; V.D. Starodubova: investigation, formal analysis, writing—original draft, writing—review & editing; E.V. Karpukhina: investigation; A.S. Baranova: investigation; A.G. Shokhina: conceptualization, writing—original draft, writing—review & editing, project administration, and funding supervision. All the authors approved the version of the manuscript to be published and agree to be accountable for all aspects of the work, ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Acknowledgments: The authors would like to express their gratitude to M.A. Soldatov, a neurologist and researcher at the Federal Center for Brain and Neurotechnology of the Federal Medical and Biological Agency (Moscow, Russia), for coordinating the donor's participation in the study, and to V.S. Usatova, a researcher at the Federal Center for Brain and Neurotechnology of the Federal Medical and Biological Agency, for her assistance in the experimental phase.

Ethics approval: The study was approved by the Local Ethics Committee of the Federal Center for Brain and Neurotechnology of the Federal Medical and Biological Agency (Protocol No. 02/14-10-24, October 14, 2024). The participant voluntarily signed a written informed consent form before enrollment in the study. The study was not registered.

Consent for publication: The authors received the voluntary written informed consent from the patient to publish personal data in the scientific journal *Genes & cells*, including its electronic version (signed on October 21, 2024). The scope of the published data was approved by the patients.

Funding sources: The study was supported by Grant No. 24-74-10106 from the Russian Science Foundation. The funding source did not impose any restrictions on how the study results could be used or disseminated.

Disclosure of interests: The authors declare no relationships, activities, or interests over the past three years involving third parties (commercial or non-commercial) whose interests could be affected by the content of this article.

Statement of originality: No previously published material (text, images, or data) was used in this work.

Data availability statement: All data generated or analyzed during this study are included in this article.

Generative AI: No generative artificial intelligence technologies were used in the preparation of this article.

Provenance and peer review: This paper was submitted unsolicited and reviewed following the standard procedure. The peer review process involved one external reviewer, one member of the editorial board, and an in-house scientific editor.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Huster D, Kühne A, Bhattacharjee A, et al. Diverse functional properties of Wilson disease ATP7B variants. *Gastroenterology*. 2012;142(4):947–956.e5. doi: 10.1053/j.gastro.2011.12.048
2. Corbett JL, Duncan SA. iPSC-Derived hepatocytes as a platform for disease modeling and drug discovery. *Front Med (Lausanne)*. 2019;6:265. doi: 10.3389/fmed.2019.00265 EDN: AXSPGW
3. Varghese DS, Alawathugoda TT, Ansari SA. Fine tuning of hepatocyte differentiation from human embryonic stem cells: Growth factor vs. small molecule-based approaches. *Stem Cells Int*. 2019;2019:5968236. doi: 10.1155/2019/5968236
4. Xie Y, Yao J, Jin W, et al. Induction and maturation of hepatocyte-like cells *in vitro*: focus on technological advances and challenges. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:765980. doi: 10.3389/fcell.2021.765980 EDN: TBQZVU
5. Zhang S, Chen S, Li W, et al. Rescue of ATP7B function in hepatocyte-like cells from Wilson's disease induced pluripotent stem cells using gene therapy or the chaperone drug curcumin. *Hum Mol Genet*. 2011;20(16):3176–3187. doi: 10.1093/hmg/ddr223 EDN: OKQRMF
6. Overeem AW, Klappe K, Parisi S, et al. Pluripotent stem cell-derived bile canaliculi-forming hepatocytes to study genetic liver diseases involving hepatocyte polarity. *J Hepatol*. 2019;71(2):344–356. doi: 10.1016/j.jhep.2019.03.031
7. Tricot T, Verfaillie CM, Kumar M. Current status and challenges of human induced pluripotent stem cell-derived liver models in drug discovery. *Cells*. 2022;11(3):442. doi: 10.3390/cells11030442 EDN: ISEKQ
8. Kim D, Kim SB, Ryu JL, et al. Human embryonic stem cell-derived wilson's disease model for screening drug efficacy. *Cells*. 2020;9(4):872. doi: 10.3390/cells9040872 EDN: CGKAVK
9. Zorn AM, Wells JM. Vertebrate endoderm development and organ formation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2009;25:221–251. doi: 10.1146/annurev.cellbio.042308.113344
10. Lee DH, Chung HM. Differentiation into Endoderm Lineage: Pancreatic differentiation from Embryonic Stem Cells. *Int J Stem Cells*. 2011;4(1):35–42. doi: 10.15283/ijsc.2011.4.1.35
11. Gadue P, Huber TL, Paddison PJ, Keller GM. Wnt and TGF-beta signaling are required for the induction of an *in vitro* model of primitive streak formation using embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(45):16806–16811. doi: 10.1073/pnas.0603916103
12. Wilkinson DG, Bhatt S, Herrmann BG. Expression pattern of the mouse T gene and its role in mesoderm formation. *Nature*. 1990;343(6259):657–659. doi: 10.1038/343657a0
13. Naujok O, Diekmann U, Lenzen S. The generation of definitive endoderm from human embryonic stem cells is initially independent from activin A but requires canonical Wnt-signaling. *Stem Cell Rev Rep*. 2014;10(4):480–493. doi: 10.1007/s12015-014-9509-0 EDN: QMUXIE
14. Schiesser JV, Wells JM. Generation of β cells from human pluripotent stem cells: are we there yet? *Ann N Y Acad Sci*. 2014;1311:124–137. doi: 10.1111/nyas.12369
15. Peters DT, Henderson CA, Warren CR, et al. Asialoglycoprotein receptor 1 is a specific cell-surface marker for isolating hepatocytes derived from human pluripotent stem cells. *Development*. 2016;143(9):1475–1481. doi: 10.1242/dev.132209
16. Zhang RR, Koido M, Tadokoro T, et al. Human iPSC-derived posterior gut progenitors are expandable and capable of forming gut and liver organoids. *Stem Cell Reports*. 2018;10(3):780–793. doi: 10.1016/j.stemcr.2018.01.006
17. Usatova VS, Mishina NM, Berestovoy MA, et al. Hydrogen peroxide is not generated intracellularly in human neural spheroids during ischemia-reperfusion. *Free Radic Biol Med*. 2024;212:234–240. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2023.12.039 EDN: DXYAMP
18. Huang J, Guo X, Li W, Zhang H. Activation of Wnt/ β -catenin signalling via GSK3 inhibitors direct differentiation of human adipose stem cells into functional hepatocytes. *Sci Rep*. 2017;7:40716. doi: 10.1038/srep40716 EDN: MPH DIN
19. Haridoss S, Yovchev MI, Schweizer H, et al. Activin A is a prominent autocrine regulator of hepatocyte growth arrest. *Hepatol Commun*. 2017;1(9):852–870. doi: 10.1002/hep4.1106

ОБ АВТОРАХ

*** Шохина Арина Геннадиевна**, канд. биол. наук;
адрес: Россия, 117513, Москва, ул. Островитянова, д. 1, стр. 1;
ORCID: 0000-0002-1769-4526;
eLibrary SPIN: 5873-7308;
e-mail: a.g.shokhina@yandex.ru

Берестовой Михаил Алексеевич, канд. биол. наук;
ORCID: 0000-0002-0462-2603;
eLibrary SPIN: 4348-8610;
e-mail: m.berestovoy1181@gmail.com

Стародубова Варвара Дмитриевна;
ORCID: 0009-0008-0793-8022;
e-mail: starodubova.varya@gmail.com

Карпухина Елизавета Владимировна;
ORCID: 0009-0005-5669-531X;
e-mail: lizabetta200240@gmail.com

Баранова Арина Сергеевна;
ORCID: 0009-0009-8355-5696;
e-mail: ari.baranova@bk.ru

AUTHORS' INFO

*** Arina G. Shokhina**, Cand. Sci. (Biology);
address: 1/1 Ostrovityanova st, Moscow, Russia, 117513;
ORCID: 0000-0002-1769-4526;
eLibrary SPIN: 5873-7308;
e-mail: a.g.shokhina@yandex.ru

Mikhail A. Berestovoy, Cand. Sci. (Biology);
ORCID: 0000-0002-0462-2603;
eLibrary SPIN: 4348-8610;
e-mail: m.berestovoy1181@gmail.com

Varvara D. Starodubova;
ORCID: 0009-0008-0793-8022;
e-mail: starodubova.varya@gmail.com

Elizaveta V. Karpukhina;
ORCID: 0009-0005-5669-531X;
e-mail: lizabetta200240@gmail.com

Arina S. Baranova;
ORCID: 0009-0009-8355-5696;
e-mail: ari.baranova@bk.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author