

УДК 576.53

# Экспрессия RIPK3 в фибробластах в модели кожной раны *in vivo* и *in vitro*: противоречивый результат

И. С. Изюмов<sup>1</sup>, М. С. Шитова<sup>1</sup>, М. С. Сабилов<sup>1</sup>, С. А. Шелег<sup>1</sup>, О. Л. Черкашина<sup>1</sup>,  
Е. П. Калабушева<sup>1</sup>, Е. А. Воротеяк<sup>1,2</sup>, Е. И. Моргун<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН, Москва, 119334 Россия

<sup>2</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119234 Россия

\*E-mail: lady.morgun2016@yandex.ru

Поступила в редакцию 06.09.2023

Принята к печати 25.10.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.25452

**РЕФЕРАТ** Одной из проблем регенеративной медицины является образование гипертрофических и келоидных рубцов. Известно, что протеинкиназа RIPK3 участвует в некроптозе, при этом появляются данные в пользу ее неканонических функций, в том числе в развитии фиброза почек. В представленной работе изучена экспрессия RIPK3 в модели фибротических процессов в коже мыши и человека. Показано, что в келоидном рубце человека, а также в ране мыши присутствует субпопуляция RIPK3+Vim+-клеток, причем в раневом ложе мыши таких клеток достоверно больше, чем в нормальной коже. С помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) экспрессия *Ripk3*, а также биомаркеров фибробластов *Acta2*, *Fap*, *Colla1* и *Fn1* выявлена в клетках, выделенных из раневого ложа, что свидетельствует о возможном синтезе RIPK3 фибробластами раневого ложа. Показано увеличение интенсивности флуоресценции фибробластов человека, окрашенных антителами к RIPK3, под воздействием липополисахарида (ЛПС, 5, 10, 25, 50, 100 нг/мл) и TGF-β (0.1, 1, 2, 5 нг/мл) по сравнению с контролем. В то же время уровень экспрессии *RIPK3* и маркеров активации фибробластов на уровне генов под воздействием TGF-β и ЛПС не отличался достоверно от контроля. Возможно, экспрессия RIPK3 в раневых фибробластах не связана напрямую с фибротическими процессами, и RIPK3 играет другую, пока неизвестную, роль в заживлении ран.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** рубцевание, келоид, кожа, фибробласты, культура клеток, RIPK3.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени; ВКМ – внеклеточный матрикс; RIPK3 – Receptor-interacting serine/threonine protein kinase 3, взаимодействующая с рецептором серин/треониновая протеинкиназа 3; ПФА – параформальдегид; ДЭГ – дифференциально экспрессируемый ген; Vim – Vimentin, виментин; ЛПС – липополисахарид; Fn – Fibronectin, фибронектин; FAP – Fibroblast activation protein-α, белок активации фибробластов альфа; Colla1 – Collagen type I alpha 1, коллаген I типа альфа-1; UMAP – Uniform Manifold Approximation and Projection, алгоритм аппроксимации и проекции равномерного многообразия.

## ВВЕДЕНИЕ

Нарушения заживления ран кожи представляют значительную медицинскую проблему. К таким нарушениям относятся патологии, связанные с фибротическими процессами, в основе которых лежат чрезмерная пролиферация фибробластов и избыточный синтез внеклеточного матрикса (ВКМ) – гипертрофические и келоидные рубцы. На сегодняшний день разработаны подходы к лечению ран кожи [1], но проблема аномалий регенерации, таких, как фиброз, все еще не решена.

Протеинкиназа RIPK3 (Receptor-interacting serine/threonine protein kinase 3) – важный участник моле-

кулярного пути некроптоза – запрограммированной клеточной гибели с морфологическими признаками некроза. Известно, что RIPK3 вместе с протеинкиназой RIPK1 передает сигнал от таких рецепторов, как TNFR, FasR, TRAILR, TLR3, TLR4 и INFAR1, на белок MLKL, что приводит к гибели клетки [2, 3].

RIPK3 не только участвует в некроптозе, но и выполняет неканонические функции, например, в апоптозе и воспалении. Так, в дендритных клетках RIPK3 участвует в продукции цитокинов [4]. За последнее время опубликованы данные о возможном участии RIPK3 в развитии фибротических процессов, например, в почках или легких [5, 6],

в то же время в предварительных экспериментах нашей лаборатории экспрессия RIPK3 была обнаружена в коже мыши и человека [7]. Поэтому целью нашей работы стало изучение экспрессии RIPK3 в модели фибротических процессов в коже мыши и человека.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Биологический материал

В работе использовали 30 половозрелых самцов мышей линии C57Bl/6. Мышей содержали при температуре +23°C с неограниченным доступом к питьевой воде и корму (соответствуют ГОСТ 33215-2014). Все манипуляции с животными проводили под общим наркозом в соответствии с «Правилами для проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Россия, 2010) и «Международными рекомендациями (этический кодекс) по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (CIOMS и ICLAS, 2012) с одобрения Комиссии по биоэтике ИБР РАН (протоколы № 51 от 09.09.2021 и № 62 от 01.09.2022) при неукоснительном соблюдении этических принципов, установленных Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (Страсбург, 2006).

Помимо биологического материала мышей использовали по одному образцу келоидной ткани и нормальной кожи груди человека. Фрагменты кожи человека были получены после оперативного вмешательства с добровольного информированного согласия пациента, работа с культурами клеток проводилась с одобрения Комиссии по биоэтике ИБР РАН.

### Выделение клеток из ран и неповрежденной дермы мышей

Биоматериал промывали в растворе Хэнкса с добавлением раствора амфотерицина В (ОАО «Синтез», Россия) и раствора сульфата гентамицина (компания «БиоФармГарант», Россия). Затем ткани измельчали и помещали в 0.2% раствор диспазы (Gibco, каталожный номер 17105-041). Образцы инкубировали в термостате в течение 30 мин при +37°C. Далее с фрагментов ткани стерильно снимали эпидермис. Затем биоматериал ран помещали в 0.2% раствор коллагеназы I (Worthington Biochemical, каталожный номер LS004197) и IV (Gibco, каталожный номер 1704-019), а кожи в 0.2% раствор коллагеназы IV (Gibco, каталожный номер 1704-019). Далее полученный раствор центрифугировали при +4°C и трижды промывали стерильным ледяным раствором DPBS, после чего пипетировали осадок.

### Культивирование клеток мыши

Суспензию клеток, выделенных из нормальной дермы мыши, фильтровали через сито с диаметром пор 100 мкм. Далее клетки, выделенные из раневого ложа и из нормальной дермы, ресуспендировали в среде DMEM и DMEM Advanced соответственно, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 1% глутамина и 1% пенициллина–стрептомицина, после чего высевали в 96-луночное плато. Из клеток, достигших монослоя, выделяли РНК.

### Культивирование клеток человека

Фибробласты человека были предоставлены УНУ «Коллекция клеточных культур для биотехнологических и биомедицинских исследований (общебиологического и биомедицинского направления)» Института биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН.

Фибробласты человека от трех различных доноров культивировали в 6-луночных планшетах по  $3 \times 10^5$  клеток на лунку, с использованием среды DMEM («ПанЭко») с 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 1% глутамина и 1% пенициллина-стрептомицина. Через 24 ч после введения в культуру клетки переводили на среду Opti-MEM с 1% эмбриональной телячьей сыворотки [5]. Затем через 60 мин клетки переводили в среду, содержащую TGF- $\beta$  в концентрации 0.1, 1, 2, 5, 10 нг/мл [5], липополисахарид (ЛПС) – 1, 5, 10, 25, 50, 100 нг/мл [8], а также смесь TGF- $\beta$  (10 нг/мл) и ЛПС (100 нг/мл). Через 24 ч клетки фиксировали и окрашивали антителами к RIPK3 по стандартному протоколу лаборатории. Далее эксперимент повторяли, но TGF- $\beta$  добавляли в концентрации 1 и 10 нг/мл, а ЛПС – 10 и 100 нг/мл. Через 24 ч выделяли тотальную РНК, используя колонки.

### Модель раны кожи мыши

Методологически мы опирались на работу [9], в которой использовали модели большой (квадратная рана площадью 1 см<sup>2</sup>) и малой раны мыши (круглая рана диаметром 4 мм). Нам требовалось смоделировать малую рану, однако выделить фибробласты на стадии пролиферации из раны диаметром 4 мм не представляется возможным, из-за ее малых размеров, поэтому мы использовали рану диаметром 8 мм.

Мышь наркотизировали путем внутрибрюшинного введения препарата Авертин. Для удаления шерсти в области операционного поля использовали крем для депиляции Veet (Франция). Далее при помощи трафарета на кожу спины мыши наносили по пять окружностей диаметром 8 мм, после чего иссекали ткань в границах нанесенных окружностей. Получившиеся раны накрывали пластырем (Tegaderm<sup>tm</sup>). Мышей выводили из эксперимента на 10-й день после операции. В качестве биологи-

ческого контроля использовали нормальную кожу спины мышей.

**Иммунофлуоресцентное окрашивание**

Препараты раны кожи на предметных стеклах и культуру клеток на пластике фиксировали с помощью 4% раствора ПФА в течение 10 мин, после чего промывали в фосфатно-солевом буфере (PBS, 3 раза по 5 мин). Затем на образцы наносили блокирующий раствор (5% сыворотки крови осла, 1% Triton на PBS) и инкубировали в течение 30 мин во влажной камере при комнатной температуре. Далее блокирующий раствор удаляли и наносили раствор первичных антител, после чего инкубировали во влажной камере при температуре +4°C в течение минимум 12 ч.

Затем образцы промывали в PBS, после чего на них наносили раствор вторичных антител и инкубировали во влажной камере при комнатной температуре в течение 1 ч, после чего ядра докрасивали DAPI и заключали в среду BrightMount/Plus (Abcam, Британия).

В работе использовали первичные антитела к RIPK3 (Sigma, каталожный номер HPA055087, разведение 1 : 500) и Vimentin (Abcam, каталожный номер ab24525, разведение 1 : 500), а также вторичные антитела AlexaFluor 488 (Abcam, Ab150173, разведение 1 : 500), AlexaFluor 594 (A21207, Invitrogen, разведение 1 : 500) и AlexaFluor 660 (A21074, Invitrogen, разведение 1 : 500). В качестве положительного контроля для антител к RIPK3 был выбран лимфоузел, для антител к Vimentin выбраны фибробласты. В качестве отрицательного контроля использован биоматериал без окрашивания первичными антителами.

**Флуоресцентная микроскопия**

Для флуоресцентной микроскопии и получения фотографий препаратов, окрашенных антителами, ис-

пользовали микроскоп Leica DMI6000. Фотографии обрабатывали и анализировали при помощи программного обеспечения BZ-II Analyzer (Keyence), LAS X (Leica), ImageJ (FiJi) и STATISTICA (StatSoft).

**Выделение РНК, обратная транскрипция, ПЦР с гель-электрофорезом и ПЦР-РВ**

РНК из клеток выделяли на колонках (Biolabmix и Zymo Research) согласно рекомендациям производителя (США, Россия). Далее проводили обработку ДНКазой (ThermoFisher и Zymo Research), затем синтезировали кДНК с помощью набора для обратной транскрипции MMLV RT kit («Евроген») с олиго(dT)праймером согласно протоколу, предоставленному производителем. ПЦР-анализ с детекцией в реальном времени проводили с применением смеси для ПЦР qPCRmix-HS SYBR («Евроген») по инструкциям производителя на приборе LightCycler 96 (Roche, Швейцария). Обычную ПЦР проводили с применением смеси для ПЦР ScreenMix («Евроген») согласно инструкции производителя на приборе T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, США). Горизонтальный электрофорез проводили в 2% агарозном геле, после чего визуализировали результаты на ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad).

Праймеры подбирали в программах PrimerBlast и PrimerSelect (табл. 1). Уровни экспрессии генов нормировали по экспрессии генов домашнего хозяйства – бета-актина (*Actb*) у мышей и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*GAPDH*) у человека.

**Измерение интенсивности флуоресценции окрашенных культур фибробластов человека**

Среднюю интенсивность флуоресценции измеряли с помощью программы ImageJ (FiJi). Для сравнительного анализа интенсивности флуоресценции применяли съемку на одинаковой экспозиции различных образцов фибробластов, окрашенных флуо-

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров для ПЦР

Праймер	Последовательность прямого праймера	Последовательность обратного праймера
<i>hu FN1</i>	GCACCACCCAGACATTA	CGGGACTCAGGTTATCAAAAGTG
<i>hu FAP</i>	ATGGGCTGGTGGATTCTTTGT	ATGTTTGTAGCCATCCTTGTC
<i>hu COL1A1</i>	CCCCTGGAAAGAATGGAGATGA	CAAACCACTGAAACCTCTGTGTC
<i>hu GAPDH</i>	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTT	TTCTCAGCCTTGACGGTGC
<i>hu RIPK3</i>	ATGCTGCTGTCTCCACGGTAA	AAAGCCATCCATTTCTGTCCCTC
<i>mo Actb</i>	ACCCGCCACCAGTTTCG	AGCATCGTCGCCCCG
<i>mo Acta2</i>	CATTTGGGATGGAGTCAGCGG	GACAGGACGTTGTAGCATAGAGA
<i>mo Acta2</i>	CCCTGAAGAGCATCCGACAC	CAGAGTCCAGCACAAATACCAGT
<i>mo Fn1</i>	GAGGAAGAAGACAGGACAGGAA	GTCAGAGTCGCACTGGTAGAA
<i>mo Fap</i>	AAGAAGCTCAAAGACGGGGG	TGCAAGGACCACCATACACTT
<i>mo Ripk3</i>	ACACGGCACTCCTTGGTATC	CCTTGAGGCAGTAGTTCTTGGTG
<i>mo Col1a1</i>	TGACTGGAAGAGCGGAGAGTA	GGCTGAGTAGGGAACACACA

ресцентными антителами, после чего проводили измерения в 30 точках 3–5 полей зрения контрольной и экспериментальной групп. Результаты анализировали в программе GraphPad Prism 8 (США).

### Анализ экспрессии гена *RIPK3* в данных RNA-seq

**Сбор данных.** Три набора данных были извлечены из базы данных NCBI GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). Набор GSE113619 содержит данные массового секвенирования РНК из 27 образцов нормальной кожи человека (контроль) и 37 образцов кожи людей, имеющих наследственную склонность к образованию келоидных рубцов, с учетом биологических повторностей [10]. Набор GSE130973 включает данные секвенирования РНК индивидуальных клеток пяти образцов нормальной кожи человека [11]. Набор GSE163973 содержит данные секвенирования РНК индивидуальных клеток из трех образцов келоидного рубца человека [12].

**Анализ дифференциальной экспрессии генов.** Дифференциальную экспрессию генов в данных массового секвенирования РНК анализировали с использованием R-пакета Edger [13].

**Обработка и анализ данных секвенирования РНК индивидуальных клеток.** Для обработки и анализа данных использовали R-пакет Seurat v4.1.1 [14]. Фибробласты из наборов данных GSE113619 и GSE163973 были интегрированы методом канонического корреляционного анализа (CCA). Снижение размерности данных выполняли методом главных компонент (PCA) на 3000 высоковариабельных генах (HGV). Поиск ближайших соседей выполнен с помощью функции *FindNeighbors* на первых 30 PC's. Кластеризация выполнена с помощью функции *FindClusters* с параметром  $resolution = 0.1$ .

### Статистический анализ

Полученные данные анализировали с использованием программного обеспечения Excel, GraphPad Prism 8 (США). Для сравнения нескольких групп применяли однофакторный дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса. Для сравнения двух групп использовали U-критерий Манна–Уитни. Статистически значимым данные считали при  $P < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

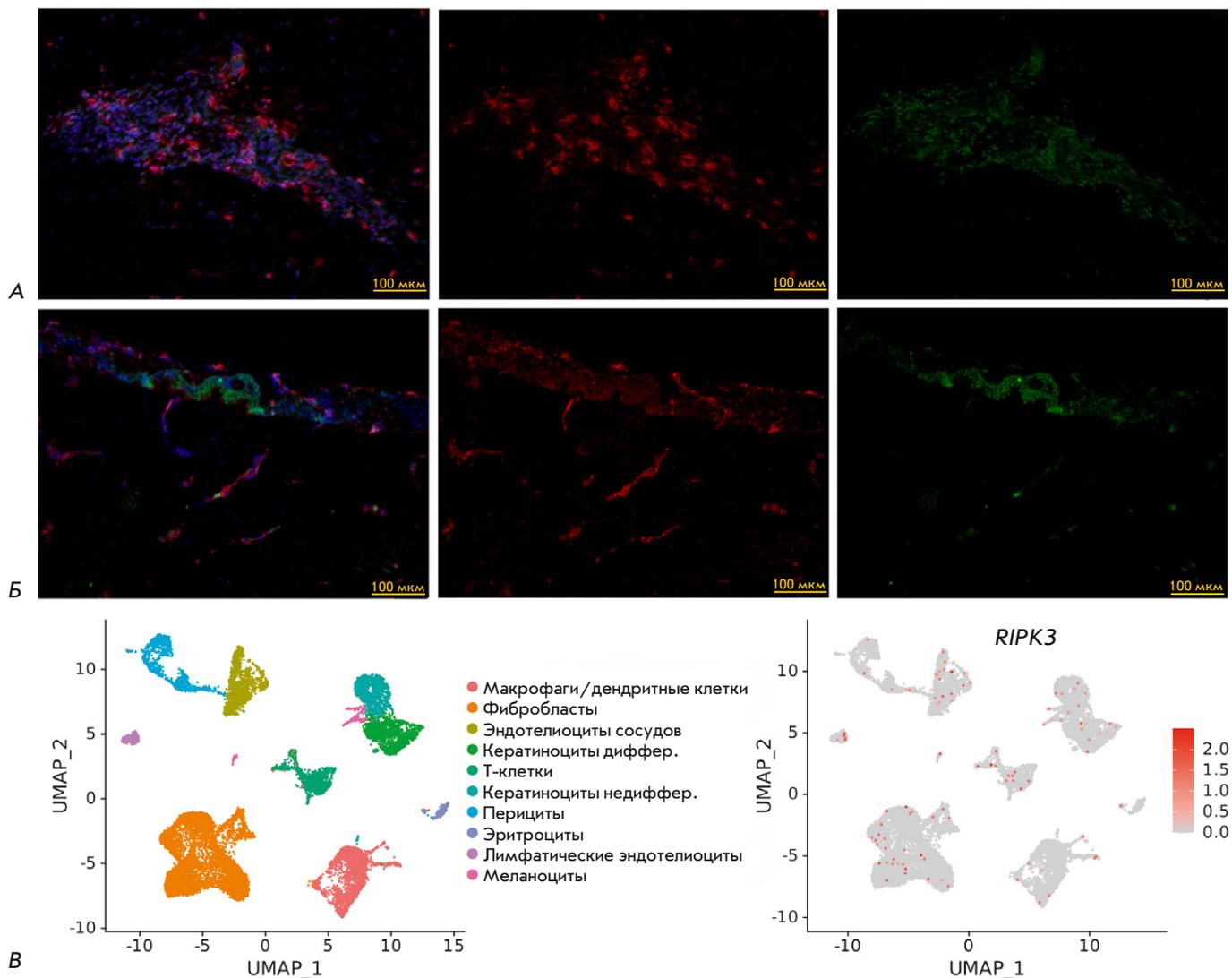
### Экспрессия *RIPK3* в рубцовой ткани и в нормальной коже человека

Иммунофлуоресцентное окрашивание келоида человека выявило экспрессию *RIPK3* во множествен-

ных Vimentin+-клетках (рис. 1А). При этом в дерме нормальной кожи обнаружены единичные *RIPK3*+клетки (рис. 1Б).

Чтобы оценить изменения уровня экспрессии гена *RIPK3* в фибробластах келоидного рубца *in vivo*, мы проанализировали данные секвенирования РНК образцов кожи человека. Для начала использовали данные массового секвенирования РНК, полученные Onoufriadis и соавт. (GSE113619), чтобы выяснить, относится ли *RIPK3* к дифференциально экспрессируемым генам (ДЭГ) при сравнении нормальной кожи и кожи индивидов с наследственной склонностью к образованию келоидов [10]. Набор данных содержал 27 образцов нормальной кожи и 37 образцов кожи лиц с наследственной склонностью к образованию келоидов. Сравнение экспрессии генов в нормальной коже и в коже лиц с наследственной склонностью к образованию келоидов показало, что *RIPK3* не является ДЭГ ( $logFC = -0.07619307$ ,  $P_{adjusted} = 1$ ). Из рис. 1Ж видно, что распределение счетов этого гена в нормальной коже (светло-фиолетовая диаграмма размаха) не отличается от распределения в коже людей с наследственной склонностью к формированию келоидов (светло-золотистая диаграмма размаха). В обоих случаях медиана распределения счетов равна 1.

Низкий уровень экспрессии *RIPK3* в данных массового секвенирования РНК потенциально можно объяснить немногочисленной специфической популяцией клеток, где этот ген активен. Поэтому мы проанализировали результаты секвенирования РНК индивидуальных клеток нормальной кожи и келоидного рубца. Образцы нормальной кожи взяли из работы Solé-Boldo и соавт. (GSE130973) и визуально оценили экспрессию *RIPK3* среди клеток различных типов [11]. В нормальной коже экспрессию гена *RIPK3*, т.е. *RIPK3*+клетки, удалось детектировать в крайне незначительном количестве (рис. 1В). Данные секвенирования РНК индивидуальных клеток в келоидном рубце были взяты из работы Deng и соавт. (GSE163973) [12]. Если визуально оценивать представленность *RIPK3*+клеток, то можно заметить, что таких клеток достаточно много среди эндотелиальных клеток и фибробластов келоидного рубца (рис. 1Г). Чтобы провести сравнительный анализ фибробластов из здоровой кожи и келоидного рубца, анализируемые данные были объединены и интегрированы. Всего объект содержал 11710 клеток, 5948 из которых соответствовали фибробластам нормальной кожи, а 5762 – фибробластам келоидного рубца. Мы получили четыре кластера клеток фибробластов, как и в работе Solé-Boldo и соавт., и оценили распределение *RIPK3*+клеток по кластерам. Как уже показано на наборо-



**Рис. 1.** Паттерны экспрессии RIPK3 в коже человека. Препараты келоидного рубца человека (А) и нормальной дермы (Б), иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к Vim (красный) и RIPK3 (зеленый), ядра докрашены DAPI, увеличение  $\times 20$ , масштабные отрезки 100 мкм. В – График UMAP-кластеров клеток с аннотацией из образцов нормальной кожи (слева) и распределение RIPK3+–клеток в этих данных (справа). Г – График UMAP-кластеров клеток с аннотацией из образцов нормального шрама и келоидного рубца (слева), распределение RIPK3+–клеток в этих данных (справа). Д – График UMAP-кластеров клеток в фибробластах из образцов нормальной кожи и келоидного рубца (слева) и распределение RIPK3+–клеток в этих данных (справа). Е – Процент RIPK3+–клеток в фибробластах нормальной кожи и келоидного рубца среди четырех кластеров клеток (справа) и сравнение долей RIPK3+–клеток во всех фибробластах из нормальной кожи и келоидного рубца (слева), \*\*\**P*-значение < 0.001 (точный тест Фишера). Ж – Распределение счетов гена RIPK3 в данных массового секвенирования РНК в образцах нормальной кожи и кожи лиц с наследственной склонностью к образованию келоидных рубцов

рах данных, содержащих все типы клеток кожи (рис. 1В,Г), среди фибробластов келоидного рубца увеличивается количество RIPK3+–клеток (рис. 1Д). При этом RIPK3+–фибробласты не формируют отдельный кластер, а возникают произвольным образом. Далее мы сравнили гены с дифференциальной экспрессией в клетках нормальной кожи и келоидного рубца. Как и в случае с данными массового секвенирования РНК (рис. 1Ж), RIPK3 нельзя от-

нести к генам ДЭГ, экспрессия которых различается в фибробластах нормальной кожи и келоидного рубца. Более того, из-за небольшого количества клеток, экспрессирующих этот ген, он не учитывается в анализе.

Тем не менее, мы видим, что процент RIPK3+–клеток в фибробластах келоидного рубца значительно больше, чем в фибробластах нормальной кожи среди всех полученных кластеров клеток

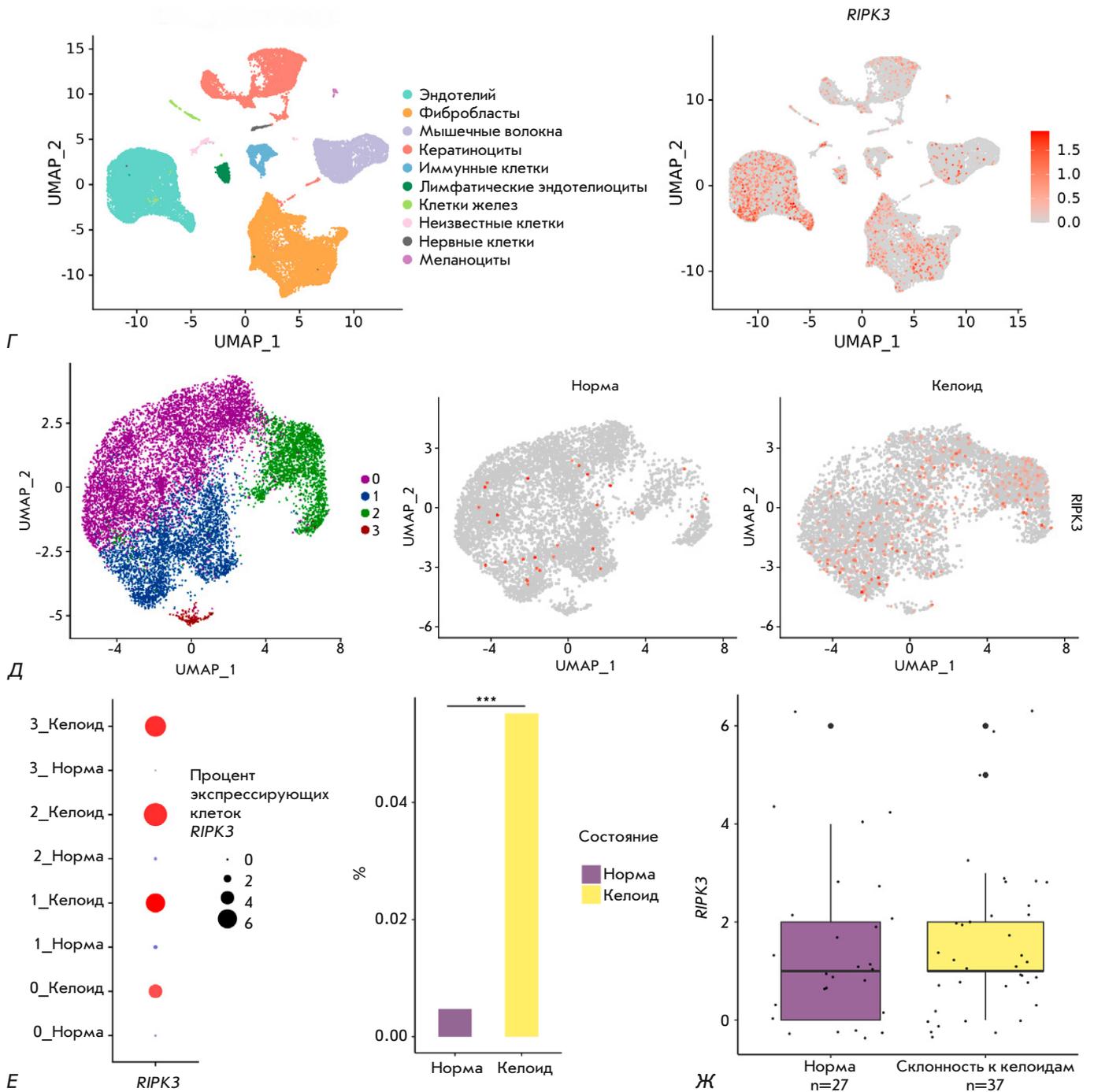


Рис. 1 (продолжение).

(рис. 1Е, слева). Разница в количестве *RIPK3*+фибробластов (28 из 5948 для клеток нормальной кожи, 318 из 5762 для клеток келоида) является статистически значимой (точный тест Фишера, *P*-значение < 0.001) (рис. 1Е, справа). Таким образом, экспрессия гена *RIPK3* в фибробластах келоидного рубца не увеличивается в *RIPK3*+клетках и соответствует определенному физиологическому уровню, как и в фибробластах нормальной кожи.

При этом значительное (более чем в 10 раз) увеличение числа клеток, которые экспрессируют ген *RIPK3*, может быть связано с переходом фибробластов в активированное состояние.

### Экспрессия *RIPK3* в ране и в нормальной коже мыши

Моделирование фибротических процессов кожи на лабораторных мышах не предполагает полного

переноса процессов, происходящих в организме человека, на мышь, учитывая существенные морфофункциональные различия в ее строении у мыши и человека [15]. Например, для мышей характерно наличие мышцы *panniculus carnosus*, обуславливающей быструю регенерацию раны путем сокращения, а также индуцированный ранением неогенез волос, что не характерно для кожи человека. Тем не менее, имеются работы по изучению фибротических процессов на мышах. Так, согласно данным Lim и соавт. и Ito и соавт., процессы, происходящие в малых и больших ранах, сопровождаются активацией различных сигнальных путей, и поэтому имеют разный результат [9, 16]. В работе Lim и соавт. регенерация больших ран – от 1 см<sup>2</sup> и больше – сопровождалась повышением экспрессии *Shh* и, как следствие, рано-индуцированным неогенезом волос в раневом ложе, после чего заканчивалась полным структурно-функциональным восстановлением кожи. При заживлении малых ран повышения экспрессии *Shh* не происходило и, как следствие, не наблюдалось рано-индуцированного неогенеза волоса, вместо этого имел место фиброз. Поэтому мы использовали модель малой раны мыши. Исходя из того, что избыточное рубцевание может возникать вследствие усиленной фазы пролиферации [17], а сам рубец морфофункционально напоминает рану в стадии пролиферации, мы определили временную точку в регенерации раны мыши, когда она находится в стадии пролиферации – 10 сутки после нанесения раны. На препаратах раны мыши в данной временной точке мы наблюдали закрытие раны гиперпролиферирующим эпидермисом, грануляционную ткань с преобладанием клеточного компонента над волокнами и отсутствие волосяных фолликулов, что можно рассматривать как незрелый рубец.

Иммунофлуоресцентное исследование выявили RIPK3+Vim+, RIPK3-Vim+, RIPK3+Vim-, RIPK3-Vim--клетки в раневом ложе мыши на 10 сутки регенерации и в нормальной коже (рис. 2А). В ране преобладала субпопуляция клеток RIPK3+Vim+, RIPK3+Vim+-клеток в раневом ложе было достоверно больше, чем в нормальной коже (рис. 2А,В). В свою очередь, в нормальной дерме доминировала RIPK3-Vim+-субпопуляция клеток, их было достоверно больше, чем в ране (рис. 2Б,В). Этот результат свидетельствует о том, что RIPK3+ мезенхимных клеток в ране было достоверно больше, чем в нормальной дерме. Вместе с тем, виментин экспрессируют не только фибробласты, но и эндотелиоциты и некоторые клетки воспаления. ПЦР с гель-электрофорезом первичной культуры клеток, выделенных из раневого ложа мыши, выявила экспрессию маркеров синтеза внеклеточного матрикса

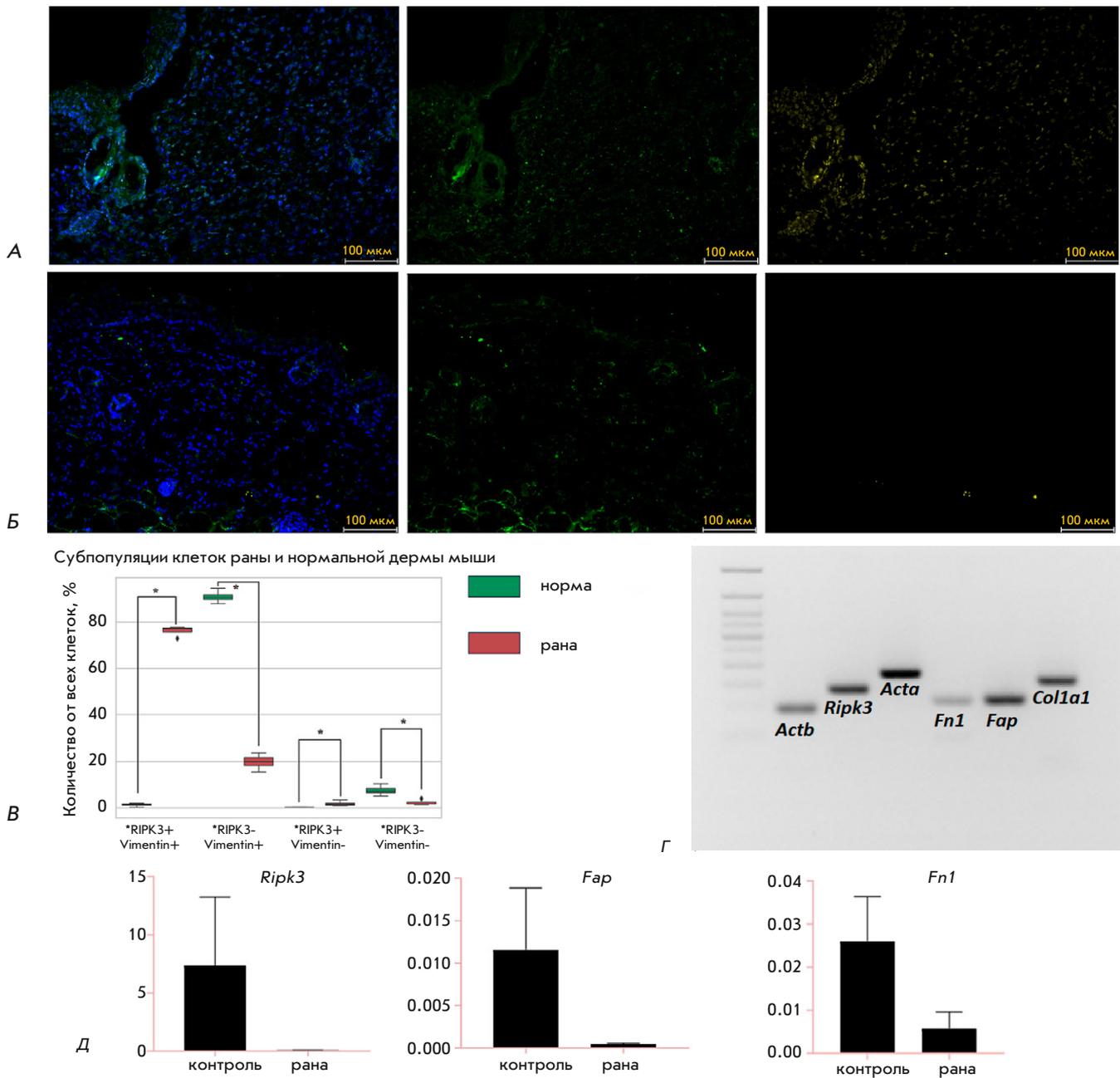
(ВКМ) и формирования миофибробластов – процессов, имеющих место при фиброзе: *Acta2*, *Fap*, *Colla1* и *Fn1*, а также на *Ripk3* (рис. 2Г). Кроме того, эти клетки имели морфологию фибробластов. На основании полученных результатов мы сделали вывод о том, что RIPK3+-клетки раневого ложа мыши являются фибробластами. В то же время методом ПЦР-РВ не были показаны достоверные различия в экспрессии генов *Ripk3*, *Fap* и *Fn1* в культуре клеток раневого ложа и культуре клеток, выделенных из нормальной дермы, что могло быть вызвано сменой фенотипа фибробластов при культивировании на пластике (рис. 2Д). Возможно, введение фибробластов нормальной дермы в культуру и их прикрепление к пластику приводит к их активации *de novo*, тогда как фибробласты грануляционной ткани уже активированы и продолжают активно пролиферировать в культуре, после чего профиль экспрессии соответствующих генов снижается.

#### Экспрессия RIPK3 в дермальных фибробластах человека под воздействием TGF-β1 и ЛПС в модели *in vitro*

Согласно данным Imamura, в фибробластах эмбриона мыши линии NIH 3T3 TGF-β вызывал дозозависимое увеличение экспрессии RIPK3 [5]. Показано также, что после воздействия TGF-β1 на фибробласты RIPK3 может активировать серин/треониновую протеинкиназу АКТ, которая в свою очередь может фосфорилировать АТФ-цитратлиазу (ACL), участвующую в активации фибробластов [18–20].

В то же время возможен и другой путь регуляции RIPK3 в фибротических процессах. В работе Guo и соавт. предполагается роль передачи сигналов TLR4/NF-κB в активации фибробластов, что приводит к развитию миомы матки. ЛПС индуцировал в фибробластах CD90+ экспрессию коллагена 1, TGF-β и FAP [8]. При этом известно, что ЛПС активирует экспрессию RIPK3. Таким образом, можно предположить, что RIPK3 участвует в ЛПС-индуцированной активации сигнального пути TLR4/NF-κB в фибробластах [21].

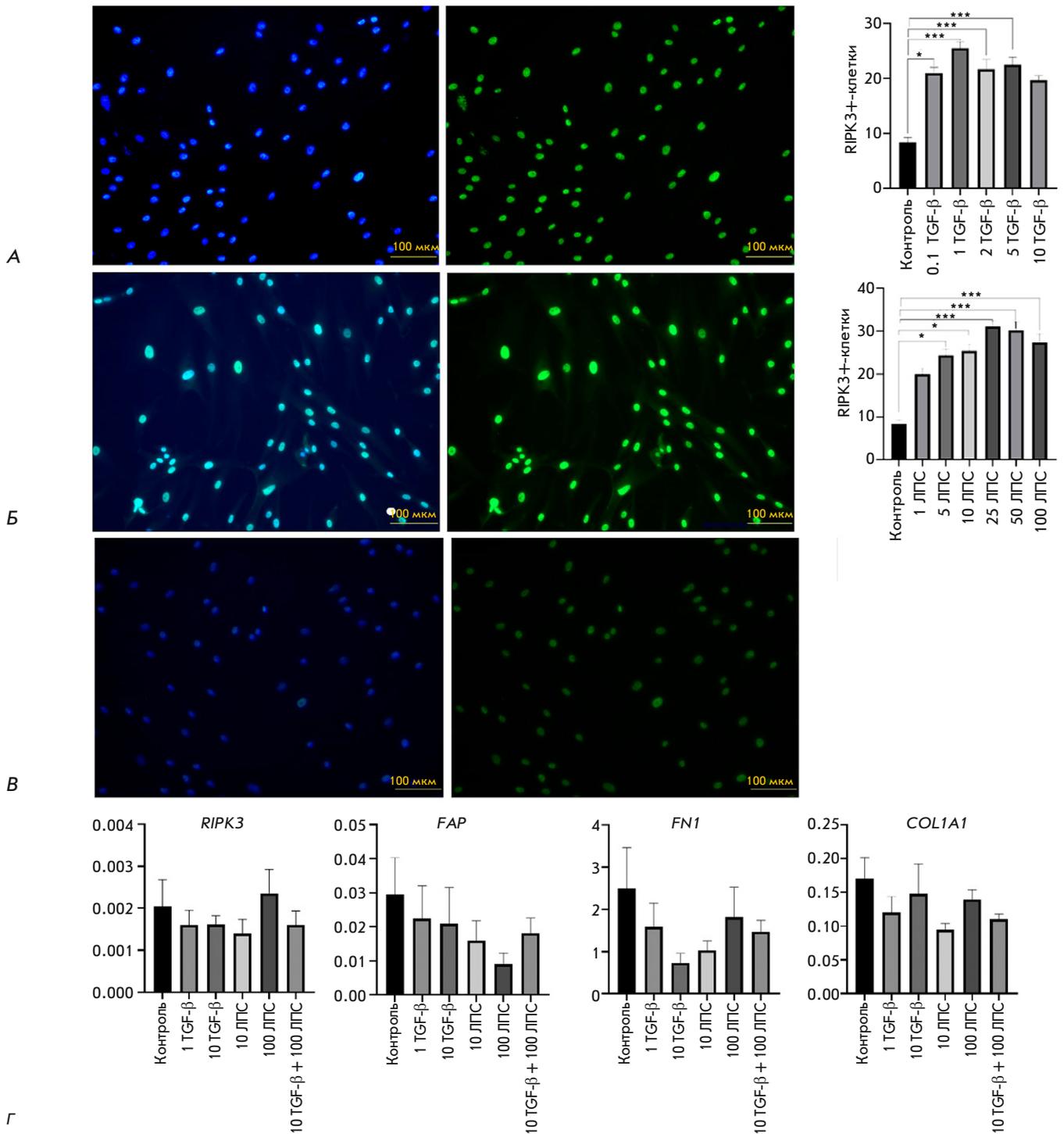
Анализ дермальных фибробластов человека, окрашенных антителами к RIPK3, показал, что воздействие TGF-β в концентрации 0,1, 1, 2, 5 нг/мл (рис. 3А) и ЛПС – 5, 10, 25, 50, 100 нг/мл (рис. 3Б) приводит к достоверному увеличению интенсивности флуоресценции, что говорит о том, что экспрессия RIPK3 может регулироваться TGF-β1 и/или сигналами TLR4/NF-κB. Однако сравнение результатов ПЦР-РВ на *RIPK3* не выявило достоверных различий между контрольными и опытными клетками (рис. 3Г). Вместе с тем, ПЦР-РВ-анализ маркеров активированных фибробластов *FAP*, *FN1* и *COL1A1*



**Рис. 2.** Паттерны экспрессии RIPK3 в коже мыши. Препараты раны в стадии пролиферации (А) и нормальной кожи мыши (Б), иммунофлуоресцентное окрашивание антителами против Vim (зеленый) и RIPK3 (желтый), ядра докрашены DAPI, увеличение  $\times 20$ , масштабные отрезки 100 мкм. В – Статистический анализ субпопуляций клеток в нормальной дерме и раневом ложе мыши,  $*P < 0.05$  (U-критерий Манна–Уитни). Экспрессия маркеров синтеза ВКМ и *Ripk3*: Г – в культуре клеток раневого ложа мыши, ПЦР с гель-электрофорезом; Д – в культуре клеток раневого ложа и нормальной дермы, ПЦР-РВ,  $P > 0.05$  (U-критерий Манна–Уитни, данные экспрессии генов представлены в виде средних значений с разбросом в виде ошибки среднего)

не показал значимых различий между экспериментальными группами и контролем. Такой результат также может быть связан с изменением фенотипа клеток в условиях 2D. Известно, что фенотип фибробластов изменяется в зависимости от субстрата. Так показано, что при культивировании на гидроге-

лях с различной жесткостью фибробласты легких мыши могут приобретать различные фенотипы – с высоким уровнем экспрессии  $\alpha$ -SMA ( $\alpha$ -SMA Hi) и FAP (FAP Hi). В случае  $\alpha$ -SMA Hi наблюдается прямая корреляция экспрессии генов с жесткостью субстрата, в случае FAP Hi – обратная [22]. Кроме



**Рис. 3.** Паттерны экспрессии RIPK3 и маркеров синтеза ВКМ в дермальных фибробластах человека. Фибробласты дермы человека, культивируемые в среде, содержащей TGF-β (А), ЛПС (Б) и без воздействия (В), окрашенные антителами к RIPK3; ядра докрасены DAPI, увеличение ×20 (слева), масштабные отрезки 100 мкм. Статистический анализ интенсивности флуоресценции выполнен с использованием критерия Краскела–Уоллиса, \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ , данные интенсивности флуоресценции представлены в виде средних значений с разбросом в виде ошибки среднего (справа). Экспрессия маркеров синтеза ВКМ и RIPK3 под воздействием TGF-β и ЛПС в культуре фибробластов дермы человека, ПЦР–РВ  $P > 0.05$  (U-критерий Манна–Уитни), данные экспрессии генов представлены в виде средних значений с разбросом в виде ошибки среднего (Г)

того, наше исследование проведено на первичных дермальных фибробластах человека и мыши, которые по своим свойствам отличаются от клеток, использованных в работах, на которые мы опирались методологически и концептуально. Так, исследование Imamura было выполнено на эмбриональных фибробластах мыши линии NIH 3T3 и фибробластах почки человека, в работе Guo и соавт. использованы фибробласты миомы матки человека [5, 8]. Таким образом, модель фиброза *in vitro* могла оказаться не самой подходящей для исследования активации фибробластов дермы человека и роли RIPK3 в ней. Для дальнейшего понимания функций RIPK3 в заживлении ран необходимо разработать другую модель *in vitro*. Возможно, перспективным для решения данной проблемы может быть, например, культивирование фибробластов в коллагеновом геле или в органоидах, учитывающих эпителиально-мезенхимальные взаимодействия.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Биоинформатический анализ данных показал, что ткань келоидного рубца человека содержит значительно больше RIPK3<sup>+</sup>-фибробластов, чем нормальная кожа. RIPK3<sup>+</sup>Vim<sup>+</sup>-клетки обнаружены в раневом ложе мыши, а также в келоиде человека. Во время регенерации кожи мыши количество Vimentin<sup>+</sup>RIPK3<sup>+</sup>-клеток было достоверно выше, чем в нормальной дерме. Экспрессия *Ripk3* и маркеров синтеза ВКМ *Acta2*, *Fap*, *Colla1* и *Fn1* в клетках,

выделенных из раневого ложа мыши, свидетельствует о том, что эти клетки являются фибробластами. Интенсивность флуоресценции при окрашивании антителами к RIPK3-фибробластам человека, обработанным ЛПС в концентрации 5, 10, 25, 50, 100 нг/мл и TGF- $\beta$  в концентрации 0.1, 1, 2, 5 нг/мл была достоверно выше, чем в контроле. Не обнаружено достоверных различий в определенном методом ПЦР-РВ уровне экспрессии генов маркеров синтеза ВКМ – *FAP*, *FN1* и *COL1A1* и *RIPK3* – в дермальных фибробластах человека, обработанных этими веществами, и в контроле. Этот результат является противоречивым и требует дальнейших исследований. Возможно, экспрессия RIPK3 в раневых фибробластах не связана напрямую с фибротическими процессами, а RIPK3 играет другую, пока неизвестную, роль в заживлении ран. ●

*Авторы выражают благодарность Центру высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ИБГ РАН за возможность выполнения биоинформатического анализа, а также Л.Ш. Измайловой и О.И. Сутягиной за консультацию.*

*Работа выполнена в рамках проекта № 21-74-30015 Российского научного фонда. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Meleshina A.V., Bystrova A.S., Rogovaya O.S., Vorotelyak E.A., Vasiliev A.V., Zagaynova E.V. // *Sovremennye tehnologii v medicine*. 2017. V. 9. № 1. P. 198–220.
- Pasparakis M., Vandenabeele P. // *Nature*. 2015. V. 517. № 7534. P. 311–320.
- Varfolomeev E., Vucic D. // *Cytokine*. 2018. V. 101. P. 26–32.
- Moriwaki K., Balaji S., McQuade T., Malhotra N., Kang J., Chan F.K.M. // *Immunity*. 2014. V. 41. № 4. P. 567–578.
- Imamura M., Moon J.S., Chung K.P., Nakahira K., Muthukumar T., Shingarev R., Ryter S.W., Choi A.M., Choi M.E. // *JCI insight*. 2018. V. 3. № 3. e94979.
- Mou F., Mou C. // *Med. Sci. Monitor: Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* 2020. V. 26. e919739-1–e919739-9.
- Morgun E.L., Pozdniakova E.D., Vorotelyak E.A. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2020. V. 494. № 1. P. 252–255.
- Guo J., Zheng L., Chen L., Luo N., Yang W., Qu X., Liu M., Cheng Z. // *Internat. J. Clin. Exp. Pathol.* 2015. V. 8. № 9. P. 10014.
- Lim C.H., Sun Q., Ratti K., Lee S.H., Zheng Y., Takeo M., Lee W., Rabbani P., Plikus M.V., Cain J.E., et al. // *Nat. Commun.* 2018. V. 9. № 1. P. 4903.
- Onoufriadis A., Hsu C.K., Ainali C., Ung C.Y., Rashidghamat E., Yang H.S., Huang H.Y., Niazi U., Tziotziou C., Yang J.C., et al. // *J. Investig. Dermatol.* 2018. V. 138. № 12. P. 2690–2693.
- Solé-Boldo L., Raddatz G., Schütz S., Mallm J.P., Rippe K., Lonsdorf A.S., Rodríguez-Paredes M., Lyko F. // *Commun. Biol.* 2020. V. 3. № 1. P. 188.
- Deng C.C., Hu Y.F., Zhu D.H., Cheng Q., Gu J.J., Feng Q.L., Zhang L.X., Xu Y.P., Wang D., Rong Z., et al. // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. № 1. P. 3709.
- Robinson M.D., McCarthy D.J., Smyth G.K. // *Bioinformatics*. 2010. V. 26. № 1. P. 139–140.
- Hao Y., Hao S., Andersen-Nissen E., Mauck W.M. 3rd., Zheng S., Butler A., Lee M.J., Wilk A.J., Darby C., Zager M., et al. // *Cell*. 2021. V. 184. № 13. P. 3573–3587. e29.
- Rippa A.L., Kalabusheva E.P., Vorotelyak E.A. // *Cells*. 2019. V. 8. № 6. P. 607.
- Ito M., Yang Z., Andl T., Cui C., Kim N., Millar S.E., Cot-sarelis G. // *Nature*. 2007. V. 447. № 7142. P. 316–320.
- Gantwerker E.A., Hom D.B. // *Clinics in plastic surgery*. 2012. V. 39. № 1. P. 85–97.
- Horowitz J.C., Lee D.Y., Waghray M., Keshamouni V.G., Thomas P.E., Zhang H., Cui Z., Thannickal V.J. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 2. P. 1359–1367.
- Berwick D.C., Hers I., Heesom K.J., Moule S.K., Tavare J.M. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 37. P. 33895–33900.
- Zaidi N., Swinnen J.V., Smans K. // *Cancer Res.* 2012. V. 72. № 15. P. 3709–3714.
- Yun M., Park S.H., Kang D.H., Kim J.W., Kim J.D., Ryu S., Lee J., Jeong H.M., Hwang H.R., Song K.S. // *J. Cell. Mol. Med.* 2022. V. 26. № 21. P. 5506–5516.
- Avery D., Govindaraju P., Jacob M., Todd L., Monslow J., Puré E. // *Matrix Biology*. 2018. V. 67. P. 90–106.