

КУЛЬТИВИРОВАННЫЕ КЛЕТКИ ВОЛОСЯНОГО ФОЛЛИКУЛА ЧЕЛОВЕКА СПОСОБНЫ ВСТРАИВАТЬСЯ В СТРУКТУРУ КОЖИ IN VIVO

© Э. С. Чермных,^{1,*} Н. В. Радюхина,² П. Н. Руткевич,² А. Я. Шевелев,² Т. Н. Власик,²
Е. А. Воротеляк,¹ А. В. Васильев,¹ В. В. Терских¹

¹ Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН,

и ² Институт экспериментальной кардиологии Российского кардиологического научно-производственного комплекса МЗ и СР РФ, Москва;

*электронный адрес: elinachermnykh@mail.ru

В настоящей работе было проведено мечение эпидермальных кератиноцитов и клеток дермальной папиллы волосяного фолликула человека с целью выявления их поведения при интрадермальной трансплантации. Клетки трансдуцировали с помощью лентивирусных векторов, содержащих маркерный ген, кодирующий зеленый флуоресцентный белок (сopGFP) или красный флуоресцентный белок (DsRed). Долю клеток, экспрессирующих трансген, оценивали на проточном цитофлуориметре. Предложенные генетические конструкции позволили добиться высокой (>95 %) эффективности трансдукции клеток волосяного фолликула человека. Трансдуцированные *in vitro* клетки вводили под эпидермис фрагментов кожи человека, которые затем пересаживали под кожу иммунодефицитным мышам. Инъецированные эпидермальные кератиноциты были главным образом найдены в составе волосяных фолликулов и частично в зоне межфолликулярного эпидермиса, а клетки дермальной папиллы — в папиллярной дерме. Результаты настоящего исследования показали, что выбранные генетические конструкции, полученные на основе лентивируса иммунодефицита человека, способны эффективно и стабильно трансдуцировать клетки кожи человека. Инъецированные клетки выживали и обнаруживались в соответствующих структурах кожи.

Ключевые слова: клетки дермальной папиллы, кератиноциты, лентивирусные векторы, трансдукция.

Принятое сокращение: ДП — дермальная папилла.

Метод клеточной трансплантации в настоящее время считается наиболее перспективным для стимуляции регенеративно-репаративных процессов в организме. Поэтому изучение поведения клеток, изолированных из их ниши (условий *in vivo*), а затем после культивирования *in vitro* возвращенных обратно, является актуальным направлением клеточных технологий. Трансплантированные в орган клетки могут заместить недостаток элементов в данном органе, а также стимулировать репаративные процессы.

Совместное культивирование клеток кожи широко используется в регенеративной медицине. Так, например, сконструированы эквиваленты кожи, содержащие культивируемые кератиноциты и фибробласты дермы, которые используют для лечения различных поражений кожи, в том числе язв, ран и ожогов (Terskikh, Vasiliev, 1999; Shakespeare, 2001). Такие структуры, кроме того, широко используются в изучении биологии и развития кожи (Smola et al., 1993; Breitkreutz et al., 1997; Falanga et al., 2002). Кокультивирование клеток волосяного фолликула может быть использовано для решения такой проблемы, как облысение. Для восстановления роста волос необходимо использование двух клеточных компонентов волосяного фолликула — эпителиальных и мезенхимных клеток. По-

пуляция мезенхимных клеток волосяного фолликула представляет собой фибробластоподобные клетки, которые формируют морфологически отличимую структуру, называемую дермальной папиллой (ДП). Эти клетки играют важную роль в эмбриональном развитии и поддержании функционирования волосяного фолликула и контролирования цикла роста волоса в постнатальном периоде. В 1966 г. впервые были описаны клетки ДП вибриссы крысы (Oliver, 1966), в 1984 г. — морфологические характеристики клеток ДП человека (Messenger, 1984). Некоторые работы были посвящены характеристике культуры этих клеток у крысы (Jahoda, Oliver, 1984) и у человека (Katsuoka et al., 1986, 1987; Messenger et al., 1986; Warren et al., 1992; Warren, Wong, 1994). Трансплантация клеток ДП в комбинации с эпителиальными стволовыми клетками создает предпосылки для реконструкции волосяного фолликула во взрослом организме *de novo* (Kishimoto et al., 1999).

Для того чтобы проследить за трансплантированными клетками, существует ряд подходов. Инфицирование лентивирусными векторами является высокоэффективным методом для доставки в клетки чужеродной ДНК *in vivo* и *in vitro*. Лентивирусные векторы широко используются для наблюдения за клетками и позволяют надежно метить

клетки многих тканей. Преимуществом использования лентивирусов по сравнению с онкогенными ретровирусами является то, что лентивирусы способны интегрироваться в геном непродлиферирующих клеток, в том числе дифференцированных и покоящихся стволовых клеток (Naldini et al., 1996; Ghazizadeh et al., 2004). Известно, что в культуре кератиноцитов и клеток ДП стволовые клетки сохраняются (Barrandon, Green, 1987).

В настоящем исследовании мы поместили кератиноциты и клетки ДП волосяного фолликула человека с использованием лентивирусных векторов и проследили судьбу этих клеток после трансплантации во фрагменты кожи человека, пересаженные бестимусным мышам. Было показано, что данные клеточные популяции способны встраиваться в соответствующие структуры кожи.

Материал и методика

Выделение кератиноцитов и получение базальных кератиноцитов человека. Фрагменты кожи лица, полученные в ходе хирургических операций, промывали в растворе Хэнкса, содержащем 80 мкг/мл гентамицина. Отделяли подкожную жировую клетчатку с помощью скальпеля. Полученные кусочки кожи разрезали на полоски размером 3×10 мм, помещали в 0.2%-ный раствор диспазы (Sigma, США) в среде DMEM на 14—16 ч при 4 °С. После этого эпидермис пинцетом отделяли от дермы по линии базальной мембраны и помещали в смесь растворов PBS и 0.25%-ного трипсина (1 : 1) при 37 °С на 7—10 мин. Действие трипсина ингибировали добавлением 5%-ной сыворотки плодов коровы (Биолот, Россия) и пипетированием получали суспензию кератиноцитов, которую осадили центрифугированием при 200 g в течение 5 мин. Осадок ресуспендировали в смеси сред DMEM и F12 (1 : 1) с добавлением 10%-ной сыворотки плодов коровы, 4 мМ L-глутамин (Sigma, США), 5 мкг/мл инсулина (Sigma, США), 10⁻⁶ М изопротеренола (Sigma, США) и 10 нг/мл эпидермального фактора роста (Sigma, США). Высеивали суспензию кератиноцитов в пластиковые культуральные флаконы (Nunc, США).

Для получения фракции базальных кератиноцитов конфлюэнтную культуру первичных кератиноцитов инкубировали в среде DMEM без кальция (ПанЭко, Россия) и митогенов в течение 48 ч с последующей заменой на полную среду.

Выделение клеток дермальной папиллы волосяного фолликула человека. Биоптаты кожи человека волосистой части головы, полученные в ходе хирургических операций, помещали в 0.2%-ный раствор диспазы (Sigma, США) в среде DMEM на 14—16 ч при 4 °С. После инкубации в диспазе кожу промывали в растворе Хэнкса и с помощью пинцета извлекали волосы вместе с волосными фолликулами. Выделенные волосы инкубировали в 0.1%-ном растворе коллагеназы I типа (Worthington, США) в среде DMEM в течение 7 ч при 37 °С. С помощью бинокулярного микроскопа отбирали ДП, промывали в растворе Хэнкса, клетки ресуспендировали в среде DMEM, содержащей 10 % сыворотки плодов коровы, 4 мМ L-глутамин, и культивировали при 37 °С в CO₂-инкубаторе. В работе использовали клетки ДП 1-го пассажа.

Упаковка лентивирусных частиц. Для получения псевдовирусных частиц на основе вируса иммунодефицита человека клетки линии 293T трансфицировали транспортной плазмидой pLA-CG-H1 (System Biosciences,

США), кодирующей зеленый флуоресцентный белок copGFP из копеподы *Pontellina plumata*, или транспортной плазмидой pLA-CMV-DsRed-HL (фирма Мона, Россия), кодирующей красный флуоресцентный белок DsRed из рифового коралла *Discosoma* sp. под контролем промотора ранних генов цитомегаловируса, и двумя упаковочными плазмидами — pVSV-G и pHIVpack (System Biosciences, США). Культуральную среду, содержащую псевдовирусные частицы, собирали через 36—72 ч после трансфекции и фильтровали через ацетат-целлюлозный фильтр с диаметром пор 0.45 мкм. Псевдовирусные частицы концентрировали с помощью полиэтиленгликоля, добавляя к вирусной суспензии 40%-ный раствор PEG-8000 до конечной концентрации полиэтиленгликоля 12 %. Суспензию инкубировали 1 сут при 4 °С, а затем центрифугировали 40 мин при 1500 g. Осадок суспендировали в среде RPMI, содержащей 25 мМ HEPES, и замораживали в аликвотах при -80 °С, а затем титровали с использованием клеток линии карциномы легкого человека H1299.

Инфицирование клеток лентивирусом. Для трансдукции клеток ДП использовали конструкцию pLA-CG-H1, а для трансдукции базальных кератиноцитов — конструкцию pLA-CMV-DsRed-HL.

Для трансдукции клетки высаживали в 24-луночный планшет и по достижении 2/3 конфлюэнтного монослоя инкубировали в 300 мкл среды, содержащей 10 % инактивированной нагреванием сыворотки с добавлением 20 или 80 мкл суспензии псевдовирусных частиц и 5 мкг/мл полибрена (Sigma, США). Культивировали при 37 °С и 5 % CO₂. Через 48 ч после инфицирования клетки отмывали и добавляли свежую среду.

Для определения доли клеток, экспрессирующих copGFP, клетки ДП анализировали на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (BD Immunocytometry Systems, США). В процессе культивирования также проводили оценку цитотоксического действия вирусных частиц на клетки ДП и кератиноциты.

Трансплантация меченных лентивирусным вектором клеток под кожу человека. Фрагменты кожи человека инкубировали в 2%-ном растворе ЭДТА (Sigma, США) на PBS (pH 8.0) в течение 2 ч при 37 °С, затем промывали в среде DMEM, не содержащей добавок. С помощью иглы калибром 30 G локально отделяли эпидермис от дермы, формируя небольшой карман. Донорские клетки человека (клетки ДП или их смесь с базальными кератиноцитами) в объеме 50 мкл (10 млн/мл) инъецировали в образованный карман и инкубировали в течение 12 ч при 37 °С. На следующий день фрагменты кожи имплантировали под кожу в области лопаток бестимусным мышам, полученным в питомнике ФИБХ РАН (Пушино). Гистологический и иммуногистохимический анализ трансплантатов проводили через 4 и 8 нед после имплантации. Фрагменты кожи извлекали и фиксировали в 4%-ном растворе параформальдегида в течение 1 ч. После трехкратной промывки в PBS кусочки кожи пропитывали 20%-ным раствором сахарозы в течение 12 ч, затем замораживали в парах азота. На криостате делали срезы толщиной 10 мкм.

Результаты и обсуждение

Для того чтобы выяснить, способны ли выращенные в культуре эпидермальные и мезенхимные клетки волосяного фолликула выживать и встраиваться в структуры

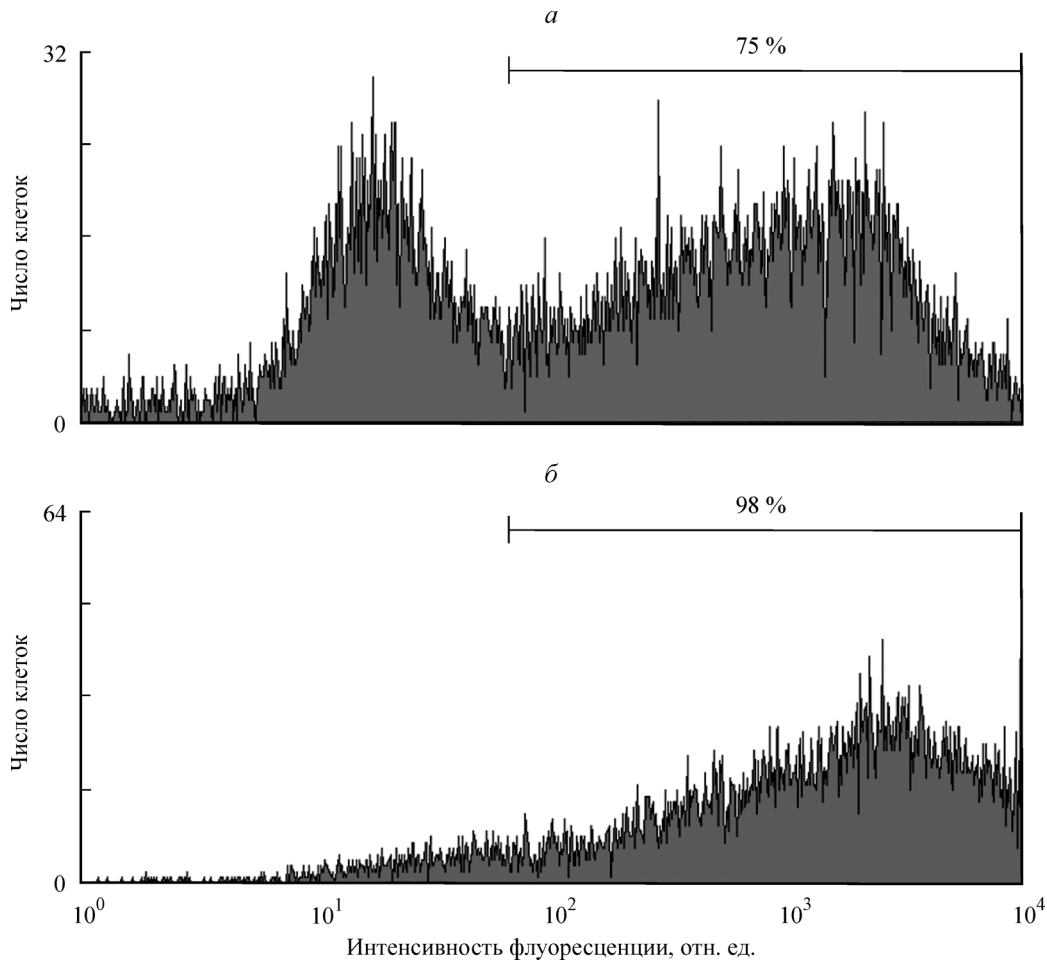


Рис. 1. Цитофлуориметрический анализ клеток ДП человека, экспрессирующих copGFP. Инкубация клеток ДП с 20 (а) и 80 (б) мкл суспензии псевдовиральных частиц (вектор pLA-cG-H1).

кожи, мы инъецировали клеточные популяции под эпидермис фрагментов кожи человека с последующей трансплантацией этих фрагментов бестимусным мышам. Для идентификации инъецированных клеток использовали лентивирусные конструкции, созданные на основе вируса иммунодефицита человека. В качестве репортерного гена конструкции содержали ген зеленого флуоресцентного белка copGFP (клетки ДП) или красного флуоресцентного белка DsRed (кератиноциты) под контролем промотора ранних генов цитомегаловируса.

Чтобы оценить влияние псевдовиральной инфекции на жизнеспособность клеток при мечении, проводили длительное культивирование и пассирование популяции меченых мезенхимных и эпителиальных клеток. Исследование клеток в течение 45 дней показало, что клетки сохраняют жизнеспособность и продолжают экспрессировать флуоресцентные белки.

Мы сравнили эффективность мечения клеток при культивировании в среде, содержащей 20 и 80 мкл суспензии псевдовиральных частиц. После трансдукции псевдовиральными частицами клетки ДП культивировали в течение 1 нед, а затем анализировали на проточном цитофлуориметре для определения доли клеток, экспрессирующих copGFP. Исследование экспрессии copGFP на проточном цитофлуориметре показало, что эффективность трансдукции клеток ДП при инкубации с 20 мкл суспензии вирусных частиц составляет 75 %, а с 80 мкл — 98 %

(рис. 1, а, б). Использование вирусных частиц в указанных объемах не оказывало цитотоксического эффекта во время культивирования (рис. 2, а). В связи с тем что при культивировании клеток с 80 мкл вирусной суспензии эффективность инфицирования была выше, для дальнейших экспериментов был выбран именно этот вариант заражения.

Популяцию эпителиальных клеток получали в результате ферментативной обработки эпидермиса. В состав полученной суспензии клеток входят кератиноциты как интерфолликулярного эпидермиса, так и волосяного фолликула. Волосяные фолликулы являются нишей стволовых эпидермальных клеток и, таким образом, вносят существенный вклад в развитие культуры. При инкубировании первичной культуры кератиноцитов в среде DMEM без кальция получали базальные кератиноциты, которые представляют собой аналог базального слоя эпидермиса. Выбор популяции базальных кератиноцитов для эксперимента был обусловлен тем, что по сравнению с первичной культурой базальные кератиноциты более однородны, менее дифференцированы, содержат высокую долю слабодифференцированных клеток. Кроме того, сравнение трансдукционных способностей популяции первичных и базальных кератиноцитов показало, что базальные кератиноциты в этом отношении являются также более удачным объектом (данные не показаны).

Как показало микроскопическое исследование, вся популяция базальных кератиноцитов, инкубированных

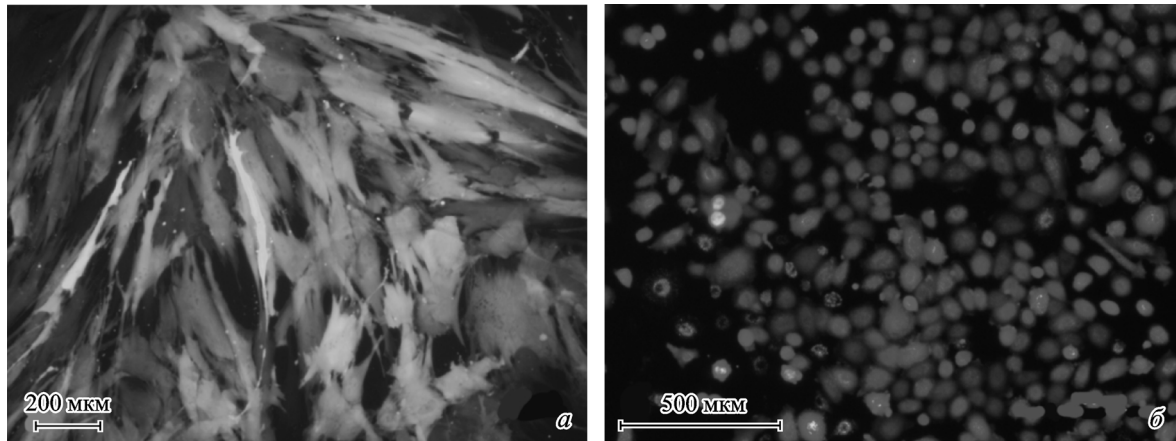


Рис. 2. Флуоресцентный анализ трансдуцированных клеток волосяного фолликула на 7-й день культивирования. *a* — синтез белка sorGFP в культуре клеток ДП, трансдуцированных вектором pLA-cG-H1 (80 мкл); *б* — синтез белка DsRed в культуре базальных кератиноцитов, трансдуцированных вектором pLA-CMV-DsRed-HL (20 мкл).

как с 80, так и 20 мкл суспензии псевдовиральных частиц, содержала репортерный белок DsRed, однако использование 80 мкл суспензии псевдовиральных частиц приводило к цитотоксическому эффекту: кератиноциты не пролиферировали и погибали. Использование 20 мкл суспензии не только позволило сохранить эффективность трансдукции, но и оказывало минимальный цитотоксический эффект (рис. 2, *б*). Поэтому для мечения кератиноцитов использовали 20 мкл суспензии псевдовиральных частиц.

Таким образом, в нашем исследовании было показано, что конструкции, созданные на основе лентивируса, являются надежным способом мечения как мезенхимных, так и эпителиальных клеток кожи.

Суспензию меченых культивированных клеток человека, представлявших собой клетки ДП либо их смесь с базальными кератиноцитами, инъецировали под эпидермис фрагмента кожи человека. Фрагменты далее под-

шивали под кожу спины бестимусным мышам. Такая система трансплантации позволила изучать поведение клеток в условиях, максимально приближенных к ситуации *in vivo*.

Через 4 и 8 нед проводили исследование срезов фрагментов кожи с помощью флуоресцентного микроскопа. Кератиноциты были мечены геном DsRed и обнаруживались по красному свечению; клетки ДП были мечены геном sorGFP и обнаруживались по зеленому свечению. Результаты эксперимента показали, что инъецированные клетки выживают в течение времени эксперимента и располагаются в соответствующих структурах кожи. Эпидермальные кератиноциты были главным образом найдены в составе волосяных фолликулов и частично в зоне межфолликулярного эпидермиса (рис. 3, *a, a'*), а клетки ДП — в папиллярной дерме (в ДП и соединительнотканной оболочке волосяного фолликула; рис. 3, *б, б'*). Мече-

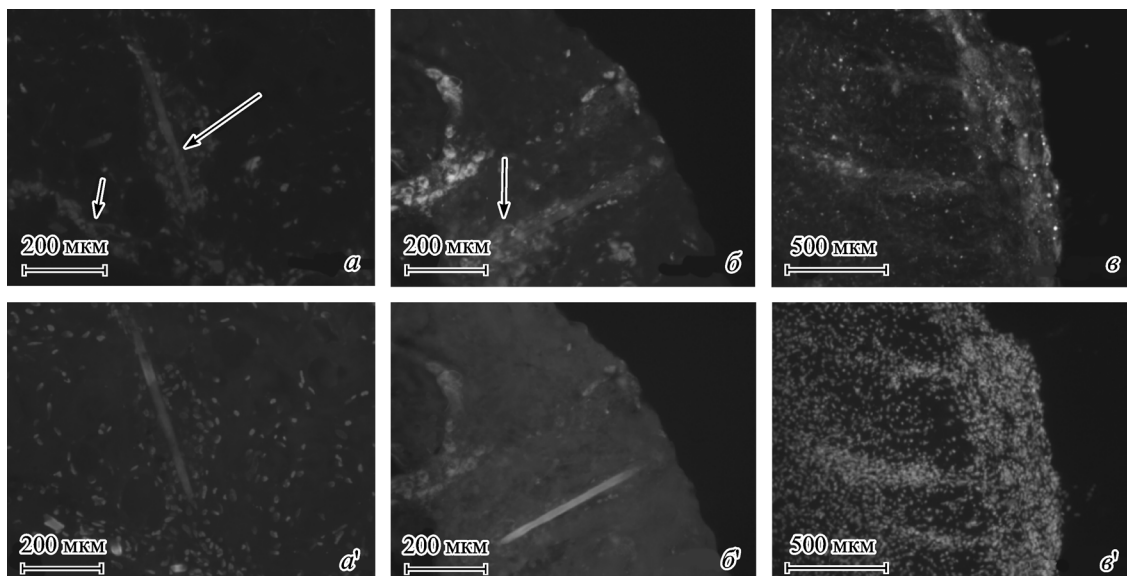


Рис. 3. Распределение клеток волосяного фолликула, меченных лентивирусными векторами, во фрагменте кожи человека. *a* — распределение базальных кератиноцитов (флуоресценция DsRed); *длинной и короткой стрелками* указаны волосяной фолликул и межфолликулярный эпидермис соответственно. *б* — распределение клеток ДП (флуоресценция sorGFP); *стрелкой* указана структура волосяного фолликула. *в* — фолликулоподобные структуры, полученные при инъекции клеток ДП (флуоресценция sorGFP). *a'*—*в'* — ядра клеток, окрашенные Hoechst 33342. Свечение стержня волоса — автофлуоресценция.

ные клетки ДП были обнаружены не только в месте инъекции, но и в примыкающей дерме, что свидетельствует о том, что происходила миграция клеток в направлении от места их введения (на что указывает диффузная окраска).

Встраивание инъекционных клеток ДП в структуры волосяного фолликула (или в дерму вблизи волосяных фолликулов) могло происходить несколькими путями: во-первых, волосяные фолликулы могли сформироваться *de novo* в результате повреждения, и меченые клетки встроились туда в процессе морфогенеза; во-вторых, эти фолликулы могли быть повреждены, и инъекционные клетки были задействованы в регенерации волосяного фолликула; в-третьих, некоторые окрашенные клетки могли активно мигрировать в дермальный компонент неповрежденного волосяного фолликула. Последнее объяснение кажется наиболее вероятным, поскольку меченые клетки были обнаружены не только в области инъекции, но и в интактной дерме.

В нашей работе мы использовали кожу лица, которая содержала собственные фолликулы, поэтому выявить индукцию роста волос или формирования новых волосяных фолликулов в результате трансплантации компетентных клеточных популяций не представляется возможным. Однако при трансплантации клеток ДП мы обнаружили ряд фолликулоподобных структур в месте инъекций, которые отличались от эндогенных фолликулов (рис. 3, в, в'). Эти структуры располагались с высокой плотностью вблизи друг друга и не содержали стержня волоса. Эпидермис этой области характеризовался значительным утолщением. При этом только часть клеток подобных структур экспрессировала *scpGFP*. Таким образом, инъекционные клетки могли стимулировать рост новых волосяных фолликулов из собственных клеток кожи человека, но не формировали новых волосяных фолликулов *de novo*. Неудивительно, что при имплантации клеток под эпидермис кожи человека формирования новых волосяных фолликулов не происходило, поскольку есть данные о том, что формирование волосяных фолликулов происходит только при трансплантации интактных ДП вибриссы мыши под эпидермис уха, а культивируемые клетки ДП в комбинации с эпителиальными клетками волосяного фолликула не проявляют подобных свойств (Gharzi et al., 2003). Формирования волосяных фолликулов также не происходит при трансплантации эквивалента кожи, содержащего культивируемые клетки ДП овцы 1-го пассажа, иммунодефицитным мышам (Watson et al., 1994). В то же время в литературе есть ряд указаний на то, что культивируемые клетки ДП вибриссы крысы способны к индукции формирования новых волосяных фолликулов при их совместном трансплантировании с различными типами эпителиальных клеток (Reynolds, Jahoda, 1992; Jahoda, Reynolds, 1996).

Известно, что индуктивные свойства клеток ДП снижаются при культивировании (Jahoda et al., 1984; Horne et al., 1986; Lichti et al., 1993; Weinberg et al., 1993; Kishimoto et al., 2000) и клетки ДП начинают приобретать признаки интерфолликулярных фибробластов, которые не способны индуцировать фолликулогенез (Gharzi et al., 2003). Так, показано, что в клетках ДП вибриссы мыши после прохождения одного пассажа происходит снижение активности щелочной фосфатазы (маркер индукционной способности клеток ДП), а в результате последующего пассирования активность щелочной фосфатазы проявляют лишь 5 % клеток (Rendl et al., 2008). При помещении в культуру клетки ДП лишены естественного микрокру-

жения, что, по-видимому, и является причиной потери их специфических свойств. Выявлен ряд факторов, играющих важную роль в процессе формирования волосяных фолликулов в эмбриогенезе и способствующих сохранению их свойств в культуре. Так, было показано, что клетки ДП мыши, культивируемые в среде, содержащей белки морфогенеза кости, сохраняют способность индуцировать рост волос (Rendl et al., 2008).

Проведенное нами исследование показало, что выбранные генетические конструкции, полученные на основе лентивируса иммунодефицита человека, способны эффективно и стабильно трансдуцировать эпителиальные и мезенхимные клетки кожи; культивируемые клетки полностью сохраняют способность встраиваться в структуру кожи, находя там свою нишу. Показано также, что культуры эпидермальных и мезенхимных клеток кожи имеют перспективу использования для реконструкции волосяных фолликулов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-00611-а).

Список литературы

- Barrandon Y., Green H. 1987. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 84 : 2302—2306.
- Breitkreutz D., Stark H. J., Mirancea N., Tomakidi P., Steinbauer H., Fusenig N. E. 1997. Integrin and basement membrane normalization in mouse grafts of human keratinocytes — implications for epidermal homeostasis. *Differentiation.* 61 : 195—209.
- Falanga V., Isaacs C., Paquette D., Downing G., Kouttab N., Butmarc J., Badiavas E., Hardin-Young J. 2002. Wounding of bioengineered skin: cellular and molecular aspects after injury. *J. Invest. Dermatol.* 119 : 653—660.
- Gharzi A., Reynolds A. J., Jahoda C. A. B. 2003. Plasticity of hair follicle dermal cells in wound healing and induction. *Exp. Dermatol.* 12 (2) : 126—136.
- Ghazizadeh S., Katz A. B., Harrington R., Taichman L. B. 2004. Lentivirus-mediated gene transfer to human epidermis. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* 9 : 269—275.
- Horne K. A., Jahoda C. A., Oliver R. F. 1986. Whisker growth induced by implantation of cultured vibrissa dermal papilla cells in the adult rat. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 97 : 111—124.
- Jahoda C. A., Horne K. A., Oliver R. F. 1984. Induction of hair growth by implantation of cultured dermal papilla cells. *Nature.* 311 (5986) : 560—562.
- Jahoda C. A., Oliver R. F. 1984. Vibrissa dermal papilla cell aggregative behaviour *in vivo* and *in vitro*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 79 : 211—224.
- Jahoda C. A., Reynolds A. J. 1996. Dermal — epidermal interactions. Adult follicle-derived cell populations and hair growth. *Dermatol. Clin.* 14 : 573—583.
- Katsuoka K., Schell H., Hornstein O. P., Deinlein E., Wessel B. 1986. Comparative morphological and growth kinetics studies of human hair bulb papilla cells and root sheath fibroblasts *in vitro*. *Arch. Dermatol. Res.* 279 : 20—25.
- Katsuoka K., Schell H., Wessel B., Hornstein O. P. 1987. Effects of epidermal growth factor, fibroblast growth factor, minoxidil and hydrocortisone on growth kinetics in human hair bulb papilla cells and root sheath fibroblasts cultured *in vitro*. *Arch. Dermatol. Res.* 279 : 247—250.
- Kishimoto J., Burgeson R. E., Morgan B. A. 2000. Wnt signaling maintains the hair-inducing activity of the dermal papilla. *Genes Develop.* 14 : 1181—1185.
- Kishimoto J., Ehama R., Wu L., Jiang S., Jiang N., Burgeson R. E. 1999. Selective activation of the versican promoter by

epithelial—mesenchymal interactions during hair follicle development. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 96 : 7336—7341.

Lichti U., Weinberg W. C., Goodman L., Ledbetter S., Doolley T., Morgan D., Yuspa S. H. 1993. *In vivo* regulation of murine hair growth: insights from grafting defined cell population onto nude mice. J. Invest. Dermatol. 101 : 124S—129S.

Messenger A. G. 1984. The culture of dermal papilla cells from human hair follicles. Br. J. Dermatol. 110 : 685—689.

Messenger A. G., Senior H. J., Bleehen S. S. 1986. The *in vitro* properties of dermal papilla cell lines established from human hair follicles. Br. J. Dermatol. 114 : 425—430.

Naldini L., Blömer U., Gallay P., Ory D., Mulligan R., Gage F. H., Verma I. M., Trono D. 1996. *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. Science. 272 : 263—267.

Oliver R. F. 1966. Regeneration of dermal papillae in rat vibrissae. J. Invest. Dermatol. 47 : 496—497.

Rendl M., Polak L., Fuchs E. 2008. BMP signaling in dermal papilla cells is required for their hair follicle-inductive properties. Genes Develop. 22 : 543—557.

Reynolds A. J., Jahoda C. A. 1992. Cultured dermal papilla cells induce follicle formation and hair growth by transdifferentiation of an adult epidermis. Development. 115 : 587—593.

Shakespeare P. 2001. Burn wound healing and skin substitutes. Burns. 27 : 517—522.

Smola H., Thiekotter G., Fusenig N. E. 1993. Mutual induction of growth factor gene expression by epidermal—dermal cell interaction. J. Cell Biol. 122 : 417—429.

Tersikh V. V., Vasiliev A. V. 1999. Cultivation and transplantation of epidermal keratinocytes. Int. Rev. Cytol. 188 : 41—72.

Warren R., Chestnut M. H., Wong T. K., Otte T. E., Lambers K. M., Meili M. L. 1992. Improved method for the isolation and cultivation of human scalp dermal papilla cells. J. Invest. Dermatol. 98 : 693—699.

Warren R., Wong T. K. 1994. Stimulation of human scalp papilla cells by epithelial cells. Arch. Dermatol. Res. 286 : 1—5.

Watson S. A., Pisansarakit P., Moore G. P. 1994. Sheep vibrissa dermal papillae induce hair follicle formation in heterotypic skin equivalents. Br. J. Dermatol. 131 : 827—835.

Weinberg W. C., Goodman L. V., George C., Morgan D. L., Ledbetter S., Yuspa S. H., Lichti U. 1993. Reconstitution of hair follicle development *in vivo*: determination of follicle formation, hair growth, and hair quality by dermal cells. J. Invest. Dermatol. 100 : 229—236.

Поступила 13 VII 2009

CULTIVATED HUMAN HAIR FOLLICLE CELLS ARE CAPABLE OF INTEGRATING TO SKIN STRUCTURE *IN VIVO*

E. S. Chermnykh,^{1,*} N. V. Radyukhina,² P. N. Rutkevich,² A. Y. Shevelyov,² T. N. Vlasik,²
E. A. Vorotelyak,¹ A. V. Vasiliev,¹ V. V. Tersikh¹

¹ N. K. Koltzov Institute of Developmental Biology RAS
and ² Institute of Experimental Cardiology, Cardiology Research-and-Production Complex,
Federal Agency for Health Care and Social Development, Moscow;

* e-mail: elinachermnykh@mail.ru

In the present study, human keratinocytes and dermal papilla cells were labeled to investigate their behavior after intradermal transplantation. Cells were transduced by lentiviral vectors that bore marker gene encoding green fluorescent protein (copGFP) or red fluorescent protein (DsRed). A portion of transgene expressing cells was evaluated by flow cytometry. Genetic constructions that we used provided high level (> 95 %) of transduction of hair follicle cells. *In vitro* transduced cells were injected under the epidermis of human skin fragments, and these fragments were then transplanted under the skin of immunodeficient mice. Injected epidermal keratinocytes were found, mainly, in hair follicles and partially in a zone of interfollicular epidermis, while dermal papilla cells were found in papilla derma. The results of the present research show that the chosen genetic constructions obtained on a basis of human immunodeficiency lentivirus are capable of effective and stable transduction of human skin cells. Injected cells survived and were found in the corresponding structures of the skin.

Key words: dermal papilla cells, keratinocytes, lentivirus vectors, transduction.