

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В.ЛОМОНОСОВА

ФАКУЛЬТЕТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ

*На правах рукописи*

**Примак Александра Леонидовна**

**Создание культуры иммортализованных мультипотентных мезенхимных  
стромальных клеток человека для задач регенеративной биомедицины**

1.1.10. Биомеханика и биоинженерия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

Доктор биологических наук

Карагяур Максим Николаевич

Москва – 2026

## Оглавление

|                                                                                                                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ВВЕДЕНИЕ.....                                                                                                                                                      | 5  |
| ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....                                                                                                                                     | 16 |
| 1.1. Регенеративная биомедицина: основные направления и объект исследований – мезенхимные стволовые/стромальные клетки (МСК).....                                  | 16 |
| 1.2. МСК: термины, свойства, функциональная роль в организме, применение в медицине, источники получения (сравнение), проблемы, возникающие при использовании..... | 18 |
| 1.2.1. МСК: термины .....                                                                                                                                          | 18 |
| 1.2.2. МСК: регенеративный потенциал и роль в организме.....                                                                                                       | 21 |
| 1.2.3. МСК: применение в медицине .....                                                                                                                            | 25 |
| 1.2.4. Характеристика МСК, выделенных из разных источников.....                                                                                                    | 28 |
| 1.2.5. Проблемы и ограничения, с которыми сталкиваются при применении МСК, и возможные пути решения .....                                                          | 33 |
| 1.3. Поведение МСК при культивировании и старение МСК: основные механизмы и способы воздействия на них.....                                                        | 37 |
| 1.3.1. Поведение МСК при культивировании .....                                                                                                                     | 37 |
| 1.3.2. Старение МСК: основные механизмы .....                                                                                                                      | 38 |
| 1.3.3. Способы воздействия на основные механизмы старения МСК.....                                                                                                 | 43 |
| 1.4. Иммуортализация: понятия «иммуортализация» и «трансформация», способы иммуортализации, преимущества и недостатки, безопасность и сопряженные риски...45       |    |
| 1.4.1. Иммуортализация: понятия «иммуортализация» и «трансформация» .....                                                                                          | 45 |
| 1.4.2. Существующие способы иммуортализации, преимущества и недостатки, безопасность и сопряженные риски.....                                                      | 50 |
| 1.4.2.1. Иммуортализация эктопической экспрессией гена белковой субъединицы теломеразы – hTERT .....                                                               | 51 |
| 1.4.2.2. Иммуортализация с помощью вирусных онкогенов .....                                                                                                        | 53 |
| 1.4.2.2.1. Иммуортализация с помощью большого Т-антигена полиомавируса обезьян (SV40) .....                                                                        | 55 |
| 1.4.2.2.2. E6/E7 вируса папилломы человека (HPV16) .....                                                                                                           | 56 |
| 1.4.2.3. Иммуортализация с помощью экспрессии генов транскрипционных факторов – клеточных протоонкогенов (c-MYC, BMI1) .....                                       | 58 |
| 1.4.2.3.1. c-MYC и v-MYC .....                                                                                                                                     | 58 |
| 1.4.2.3.2. BMI1 .....                                                                                                                                              | 60 |
| 1.4.2.4. Сравнение методов иммуортализации .....                                                                                                                   | 61 |
| 5. Общий вывод по разделу «Обзор литературы» .....                                                                                                                 | 63 |
| ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....                                                                                                                                  | 64 |
| 2.1. Клеточные культуры.....                                                                                                                                       | 64 |

|                                                                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.2. Получение immortalized MCK человека (MCK <sub>TERT</sub> ) .....                                                                                                | 65 |
| 2.3. Анализ успешности трансдукции .....                                                                                                                             | 67 |
| 2.3.1. Уровень экспрессии гена hTERT .....                                                                                                                           | 68 |
| 2.3.2. Наличие белковой субъединицы теломеразы в клеточных лизатах.....                                                                                              | 68 |
| 2.3.3. Активность теломеразы и длина теломер .....                                                                                                                   | 70 |
| 2.4. Оценка пролиферативного потенциала .....                                                                                                                        | 70 |
| 2.5. Оценка выраженности клеточного старения .....                                                                                                                   | 71 |
| 2.5.1. Окрашивание клеток на активность β-галактозидазы.....                                                                                                         | 71 |
| 2.5.2. Оценка содержания компонентов секреторного фенотипа, ассоциированного со старением (SASP).....                                                                | 72 |
| 2.6. Оценка дифференцировочного потенциала .....                                                                                                                     | 72 |
| 2.6.1. Адипогенная дифференцировка .....                                                                                                                             | 72 |
| 2.6.2. Остеогенная дифференцировка .....                                                                                                                             | 74 |
| 2.6.3. Хондрогенная дифференцировка .....                                                                                                                            | 75 |
| 2.7. Оценка иммунофенотипа.....                                                                                                                                      | 75 |
| 2.8. Оценка гормональной чувствительности.....                                                                                                                       | 76 |
| 2.9. Кариотипический анализ .....                                                                                                                                    | 78 |
| 2.10. Получение и концентрирование секрета MCK.....                                                                                                                  | 79 |
| 2.11. Изучение состава секрета MCK <sub>TERT</sub> : протеомный анализ.....                                                                                          | 79 |
| 2.12. Изучение количественного содержания компонентов секрета MCK <sub>TERT</sub> :<br>иммуноферментный анализ и ПЦР-РВ .....                                        | 80 |
| 2.13. Биологическая активность секрета MCK <sub>TERT</sub> .....                                                                                                     | 82 |
| 2.13.1. Модель нейритогенеза in vitro .....                                                                                                                          | 82 |
| 2.13.2. Модель дифференцировки фибробластов в миофибробласты .....                                                                                                   | 84 |
| 2.14. Безопасность секрета MCK <sub>TERT</sub> .....                                                                                                                 | 85 |
| 2.14.1. Содержание теломеразы (в виде ДНК, мРНК, белка) в секрете .....                                                                                              | 86 |
| 2.14.2. Soft agar colony formation assay .....                                                                                                                       | 86 |
| 2.14.3. Влияние секрета MCK <sub>TERT</sub> на экспрессию протоонкогенов и генов-<br>супрессоров опухолевого роста культивируемых в присутствии секрета клеток ..... | 88 |
| 2.15. Статистическая обработка данных .....                                                                                                                          | 88 |
| ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ .....                                                                                                                                            | 89 |
| 3.1. Получение культур immortalized MCK жировой ткани.....                                                                                                           | 90 |
| 3.1.1. Оценка теломеразного статуса MCK <sub>TERT</sub> : анализ экспрессии hTERT,<br>содержания белка hTERT, активности теломеразы и длины теломер .....            | 90 |
| 3.1.2. Характеристика пролиферативного потенциала и клеточного старения .....                                                                                        | 93 |

|                                                                                                                                                                     |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.2. Исследование свойств полученных клеточных культур МСК <sub>TERT</sub> как модельных объектов для фундаментальных исследований регенеративной биомедицины ..... | 96  |
| 3.2.1. Морфология культур МСК <sub>TERT</sub> .....                                                                                                                 | 97  |
| 3.2.2. Дифференцировочный потенциал культур МСК <sub>TERT</sub> .....                                                                                               | 97  |
| 3.2.3. Иммунофенотип культур МСК <sub>TERT</sub> .....                                                                                                              | 100 |
| 3.2.4. Ответ на гормоны культур МСК <sub>TERT</sub> .....                                                                                                           | 102 |
| 3.2.5. Кариотип культур МСК <sub>TERT</sub> .....                                                                                                                   | 104 |
| 3.3. Исследование свойств секрета полученных культур МСК <sub>TERT</sub> .....                                                                                      | 106 |
| 3.3.1. Состав секрета культур МСК <sub>TERT</sub> .....                                                                                                             | 106 |
| 3.3.1.1. Состав секрета полученных культур МСК <sub>TERT</sub> в сравнении с составом секрета первичных культур МСК .....                                           | 106 |
| 3.3.1.1.1. Состав: результаты протеомного анализа .....                                                                                                             | 106 |
| 3.3.1.1.2. Состав: результаты анализа компонентов методами ИФА и ПЦР-РВ .....                                                                                       | 108 |
| 3.3.1.2. Состав секрета полученных культур МСК <sub>TERT</sub> при длительном культивировании .....                                                                 | 110 |
| 3.3.2. Биологическая активность секрета культуры МСК <sub>TERT</sub> .....                                                                                          | 113 |
| 3.3.2.1. Модель нейритогенеза сенсорных дорсальных ганглиев мыши .....                                                                                              | 113 |
| 3.3.2.2. Модель фиброза .....                                                                                                                                       | 115 |
| 3.3.3. Безопасность: трансформирующий потенциал секрета культуры МСК <sub>TERT</sub> .....                                                                          | 117 |
| 3.3.3.1. Трансформирующий потенциал: soft agar colony formation assay .....                                                                                         | 118 |
| 3.3.3.2. Трансформирующий потенциал: влияние секрета МСК <sub>TERT</sub> на транскриптом обрабатываемых клеток .....                                                | 119 |
| 3.3.3.3. Трансформирующий потенциал: содержание компонентов теломеразы в секрете МСК <sub>TERT</sub> .....                                                          | 120 |
| ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ .....                                                                                                                                           | 122 |
| Рекомендации .....                                                                                                                                                  | 139 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....                                                                                                                                                    | 141 |
| ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ .....                                                                                                                                  | 143 |
| СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ .....                                                                                                                              | 144 |
| ПРИЛОЖЕНИЯ .....                                                                                                                                                    | 169 |
| Приложение 1. Анализ траекторий наночастиц (NTA) внеклеточных везикул культур пМСК и МСК <sub>TERT</sub> .....                                                      | 169 |



## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность

Регенеративная биомедицина является современным направлением медицины, нацеленным на изучение процессов репарации и регенерации тканей и органов человеческого организма и поиск перспективных подходов к направленной регуляции этих процессов, в частности с использованием методов генной и клеточной терапии [1-3]. Одним из основных объектов исследований регенеративной биомедицины являются мезенхимные стромальные клетки (МСК) человека как ключевые участники поддержания гомеостаза и обеспечения репаративных и регенеративных процессов. По этой причине культуры МСК рассматриваются как объекты для проведения фундаментальных исследований, позволяющих установить роль стромальных клеток в поддержании и рекрутинге тканеспецифичных стволовых клеток в ходе процессов онтогенеза, физиологического обновления и восстановления повреждённых тканей *in vivo*. Также культуры МСК могут выступать в качестве перспективной платформы для создания биомедицинских клеточных продуктов (БМКП) и биомедицинских бесклеточных продуктов (БМБП) на основе секрета МСК или его фракций для стимуляции регенеративных процессов [4-7]. Абсолютное большинство такого рода исследований проводится с использованием первичных клеточных культур. Однако их использование сопряжено с рядом ограничений, среди которых стоит выделить вариабельность результатов, получаемых разными научными группами, постоянную потребность в донорском материале, необходимость оценки микробиологической чистоты и активности каждой новой культуры, равно как и проблемы масштабируемости и стандартизации получаемых БМКП и БМБП ввиду гетерогенности, ограниченного пролиферативного потенциала и быстрого старения первичных клеточных культур [8,9]. Одним из возможных подходов к преодолению этих ограничений является создание культур МСК, сочетающих в себе сохранность ключевых свойств первичных культур МСК, но лишенных указанных недостатков и ограничений. Искомые клеточные культуры должны обладать способностью к длительной пролиферации, иметь отсроченное клеточное старение, сохранять при пассировании свойства как самой клеточной культуры, так и состав и биологическую активность продуктов их секреции (секрета).

Одним из возможных подходов к созданию искомым культур МСК является описанный ранее метод иммортализации, предполагающий сверхэкспрессию гена

каталитической субъединицы теломеразы *hTERT* с помощью методов генной инженерии [10-14]. Однако возможность применения данного подхода к решению задач регенеративной биомедицины окончательно не установлена. Так, научным сообществом не достигнут консенсус по вопросу возможности получения с его помощью полноценного клеточного модельного объекта с полностью сохранными ключевыми свойствами первичной клеточной культуры, поскольку существующие коммерческие immortalized клеточные линии не удовлетворяют всем необходимым критериям модельного объекта. В мировой литературе отсутствуют сведения о сохранности секреторных свойств клеточной культуры при сверхэкспрессии *hTERT*, и ни в одном из исследований не была изучена возможность применения этого метода immortalization для получения клеточных культур МСК, являющихся продуцентами секретома как модельного объекта и перспективного БМБП. Также большинство известных опубликованных исследований нацелено на изучение лишь отдельных свойств культур МСК жировой ткани человека, сверхэкспрессирующих *hTERT*, но не их свойств и характеристик в комплексе [15]. Отсутствие системных исследований свойств культур МСК, immortalized сверхэкспрессией *hTERT*, как объекта для фундаментальных исследований в области регенеративной биомедицины и перспективных продуцентов БМБП обуславливает актуальность настоящего исследования.

### **Степень разработанности темы**

Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК) изучаются с момента открытия А.Я. Фриденштейном (1968-1970 г.) [16], секретом МСК как основа бесклеточной терапии – с работ Гнеччи 2005 г. [17], но наиболее активно – в последние 10 лет [18]. Immortalized линии известны с 1950-х гг. с момента получения клеточной линии HeLa [19]. За это время было разработано множество методов immortalization и получены различные immortalized линии, включая линии МСК человека [20,21]. Существуют и коммерческие immortalized линии МСК жировой ткани человека: A41hWAT-SVF (CRL-3386TM) и ASC52telo (SCRC-4000TM). Однако линия ASC52telo не удовлетворяет всем необходимым критериям модельного объекта по причине сниженной чувствительности к инсулину и нарушенного адипогенного дифференцировочного потенциала, вследствие чего не может быть использована для исследований функционирования и регенерации жировой ткани, ее терморегуляторной и эндокринной функции в норме и при патологии [22]. Линия A41hWAT-SVF практически не

охарактеризована (отсутствуют опубликованные результаты). Согласно общедоступным опубликованным данным, отсутствуют клеточные линии МСК жировой ткани человека, удовлетворяющие всем необходимым свойствам релевантного модельного объекта для первичных клеточных культур. Существующие данные о влиянии сверхэкспрессии гена каталитической субъединицы теломеразы *hTERT*, полученной методами генной инженерии, на свойства получаемых культур являются противоречивыми. Влияние сверхэкспрессии *hTERT* на гормональную чувствительность культур МСК и на свойства их секрета остается не изученным.

### **Цель и задачи**

**Цель:** создать клеточные культуры мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (МСК) жировой ткани человека, сверхэкспрессирующих кДНК каталитической субъединицы теломеразы (*hTERT*), и изучить возможность их применения для решения задач регенеративной биомедицины.

### **Задачи:**

1. Создать клеточные культуры МСК жировой ткани человека (МСК<sub>TERT</sub>) посредством трансдукции лентивирусными частицами, несущими последовательность кДНК каталитической субъединицы теломеразы *hTERT*, и охарактеризовать уровень экспрессии и активность теломеразы, длину теломер при пассировании, пролиферативный потенциал культур и активность маркера, ассоциированного со старением ( $\beta$ -галактозидаза).
2. Охарактеризовать свойства полученных культур МСК<sub>TERT</sub> как модельного объекта (для решения фундаментальных задач регенеративной биомедицины): морфологию, иммунофенотип, дифференцировочный потенциал, чувствительность к гормонам, кариотип; сохранность этих свойств при пассировании.
3. Охарактеризовать свойства секрета полученных культур МСК<sub>TERT</sub> (для решения прикладных задач регенеративной биомедицины): состав (на примере основных нейротрофических и проангиогенных факторов (BDNF, HGF, VEGF-A, uPA), провоспалительных (IL-1 $\alpha$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) и противовоспалительных факторов (IL-4, IL-10, IL-13, TGF- $\beta$ 1, IDO), основных компонентов SASP (IL-6, MCP-1, PAI-1)), функциональную активность в моделях нейритогенеза и фиброза, потенциальные трансформирующие свойства; стабильность этих свойств при пассировании.

4. На основании критического анализа полученных данных определить возможность применения метода сверхэкспрессии последовательности кДНК каталитической субъединицы теломеразы *hTERT* для решения фундаментальных и прикладных задач регенеративной биомедицины.

### Научная новизна

В настоящей работе впервые проведено комплексное исследование влияния сверхэкспрессии *hTERT* на свойства получаемых культур МСК жировой ткани человека и их секретома. Впервые проведен анализ влияния сверхэкспрессии *hTERT* на чувствительность МСК жировой ткани человека к широкому спектру гормональных стимулов. Впервые исследовано влияние сверхэкспрессии *hTERT* на состав и свойства секретома культур МСК жировой ткани человека: исследован состав секретома на примере основных нейротрофических и проангиогенных факторов (BDNF, HGF, VEGF-A, uPA), провоспалительных (IL-1 $\alpha$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) и противовоспалительных факторов (IL-4, IL-10, IL-13, TGF- $\beta$ 1, IDO), основных компонентов SASP (IL-6, MCP-1, PAI-1), внеклеточных везикул, исследована функциональная активность в моделях нейритогенеза и фиброза, исследованы потенциальные трансформирующие свойства секретома.

На примере созданной культуры МСК<sub>TERT</sub> в данной работе впервые было показано, что методом сверхэкспрессии *hTERT* можно получить культуры МСК жировой ткани человека, одновременно сохраняющие 1) стандартные свойства МСК, определенные Международным обществом клеточной терапии (ISCT) (фибробластоподобная форма, адгезивность в пластику, иммунофенотип, дифференцировочный потенциал в адипо-, остео- и хондрогенном направлениях), 2) функциональную активность (чувствительность к гормональным стимулам: ангиотензину II, ГАМК, гистамину, глутамату, дофамину, инсулину, норадреналину, ПТГ, серотонину; биологическая активность секретома МСК<sub>TERT</sub> в моделях нейритогенеза и фиброза *in vitro*), 3) свойства, свидетельствующие о безопасности клеточной культуры и получаемых на ее основе продуктов (стабильный кариотип, отсутствие в секрете МСК<sub>TERT</sub> компонентов теломеразы, отсутствие трансформирующей активности секретома МСК<sub>TERT</sub>), 4) качественный и количественный состав секретома. Показано, что культуры МСК<sub>TERT</sub> сохраняют эти свойства и при культивировании (по меньшей мере, до 30-40 пассажей).

На примере полученных культур МСК<sub>TERT</sub> жировой ткани человека в нашей работе впервые показано, что метод сверхэкспрессии *hTERT* может быть применен и является

перспективным для получения больших объемов биологически активного секрета с постоянным составом и отсутствием трансформирующей активности благодаря отсрочиванию клеточного старения и продлению пролиферативно активного состояния клеточных культур, имеющих стабильные свойства при культивировании.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Полученные в работе результаты дополняют накопленные теоретические данные о влиянии сверхэкспрессии *hTERT* на свойства клеточных культур данными по 1) неизученным ранее вопросам - влиянию сверхэкспрессии *hTERT* на чувствительность МСК жировой ткани человека к широкому спектру гормональных стимулов (ангиотензину II, ГАМК, гистамину, глутамату, дофамину, инсулину, норадреналину, ПТГ, серотонину), влиянию сверхэкспрессии *hTERT* на состав и свойства секрета (в т.ч. при культивировании), 2) вопросам, относительно которых в литературе обнаружены противоречивые данные - влиянию сверхэкспрессии *hTERT* на основные свойства клеток (иммунофенотип, дифференцировочный потенциал) и их кариотип.

Полученные экспериментальные результаты обосновывают возможность и рациональность применения метода сверхэкспрессии *hTERT* для создания адекватных клеточных моделей с целью решения фундаментальных задач регенеративной биомедицины, равно как и для получения культур МСК как продуцентов секрета. Созданная в исследовании культура МСК<sub>TERT</sub> может быть использована как клеточная модель и как продуцент секрета вплоть до 40х и 30х пассажей соответственно. Полученные культуры МСК, сверхэкспрессирующие *hTERT*, были использованы в качестве клеточной платформы для улучшения фармакологических свойств секрета МСК и усиления его нейропротекторной активности в модели внутримозгового кровоизлияния у крыс [23].

В данной работе впервые была предложена идея применения метода сверхэкспрессии *hTERT* для стабилизации свойств клеток-продуцентов в культуре с целью получения клеточного секрета, стабильного по своим качественным и количественным характеристикам, в объеме, достаточном для широкомасштабного клинического применения.

Полученные результаты и предложенные алгоритмы по проведению исследований культур, сверхэкспрессирующих *hTERT*, могут лечь в основу рекомендаций по получению и применению таких клеточных культур в регенеративной биомедицине и

биофармакологии. Применение таких культур позволит значительно расширить возможности и области применения регенеративных технологий. Предложенный подход к иммортализации первичных культур МСК планируется использовать для получения культур клеток-продуцентов при создании перспективного оригинального препарата «НейроМедирег» для стимуляции нейропротекции и восстановления нервной ткани после повреждения.

Результаты исследования используются в материалах лекций и практических занятий для студентов ФФМ МНОИ МГУ имени М.В. Ломоносова в рамках курсов «Основы регенеративной медицины», «Молекулярная медицина», «Биомедицина и внутриклеточная сигнализация» и для магистров ФФМ МНОИ МГУ имени М.В. Ломоносова по программам подготовки «Регенеративная медицина» и «Промышленная фармация».

### **Методология исследования**

Работа выполнена на базе Кафедры биохимии и регенеративной биомедицины Факультета фундаментальной медицины Медицинского научно-образовательного института Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова. Методология исследования основана на современных принципах и подходах, изложенных в ключевых опубликованных исследованиях, и на критическом анализе. Обоснованно выбранные методы были использованы в соответствии с общепринятыми стандартами. В экспериментальной работе были использованы современные методы генной инженерии, методы работы с культурами бактериальных клеток и клеток млекопитающих, биохимические, гистологические и биоинформатические методы. Для оценки биологической активности секрета МСК<sub>TERT</sub> использовали две клеточные модели – нейритогенеза и TGF- $\beta$ 1 индуцированного фиброза.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Трансдукция первичных культур мультипотентных мезенхимных стромальных клеток жировой ткани человека лентивирусными частицами, несущими последовательность кДНК каталитической субъединицы теломеразы *hTERT*, позволяет пролонгировать время их существования, увеличивает пролиферативный потенциал их клеток, поддерживает длину теломер и активность теломеразы при

пассировании, а также отсрочивает появление активности маркера, ассоциированного со старением ( $\beta$ -галактозидаза).

2. Метод лентивирусной трансдукции частицами, несущими последовательность кДНК каталитической субъединицы теломеразы *hTERT*, позволяет стабилизировать основные свойства и характеристические признаки МСК жировой ткани человека при длительном пассировании в культуре: клеточную морфологию, иммунофенотип, кариотип, дифференцировочный потенциал и чувствительность к гормональным стимулам (показатели функциональной активности клеточной культуры).
3. Трансдукция МСК жировой ткани человека лентивирусными частицами, несущими последовательность кДНК каталитической субъединицы теломеразы *hTERT*, не влияет на белковый состав их секретома, позволяет сохранить его состав и биологическую активность при длительном культивировании МСК, и не приводит к появлению трансформирующей активности секретома.
4. Метод лентивирусной трансдукции частицами, несущими последовательность кДНК каталитической субъединицы теломеразы *hTERT*, может быть применен к МСК жировой ткани человека для создания релевантных и функциональных клеточных моделей, равно как и получения культур клеток-продуцентов секретома для решения фундаментальных и прикладных задач регенеративной биомедицины.

### **Степень достоверности полученных результатов**

Соискателем проведён анализ широкого спектра научной отечественной и зарубежной литературы, позволивший обоснованно выбрать объект и методы исследования, сформулировать цель и задачи. Исследование включало проведение серии независимых научных экспериментов с необходимым числом повторов. Для увеличения достоверности результатов проводились эксперименты с использованием разных методов. Результаты были статистически обработаны с помощью программ GraphPad Prism 10 и MS Excel 16.93 и критически проанализированы, что позволило получить обоснованные выводы.

Результаты исследования были доложены на российских и зарубежных конференциях и школах и опубликованы в рецензируемых научных журналах из списка Scopus, Web of Science, RSCI. На основании полученных результатов подана заявка на патент на изобретение РФ № 2026107924 от 23.03.2026.

Научная работа автора диссертации была отмечена Стипендией Президента Российской Федерации для аспирантов и адъюнктов, обучающихся по очной форме обучения в российских организациях, осуществляющих образовательную деятельность, и проводящих научные исследования в рамках реализации приоритетов научно-технологического развития Российской Федерации, определенных в Стратегии научно-технологического развития Российской Федерации (2024 г.), Стипендией Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова молодым сотрудникам, аспирантам и студентам, добившимся значительных результатов в педагогической и научно-исследовательской деятельности (2022 г., 2023 г., 2025 г.), за статьи, опубликованные соискателем (в соавторстве) по теме диссертации, был присвоен статус «победитель» в Конкурсе работ, способствующих решению задач Программы развития Московского университета в номинации «Выдающиеся научные статьи» (2023-2025 гг.).

### **Личный вклад автора**

Автором диссертационного исследования лично проведен системный анализ современных исследований по теме диссертации, определены нерешенные вопросы, сформулирована цель и задачи. Автором лично был предложен план и дизайн экспериментального исследования, автором лично или при непосредственном участии автора проведены экспериментальные работы по теме диссертации, получены и обработаны результаты и проведена их статистическая обработка. Автор лично провел критический анализ полученных результатов, сформулировал обоснованные выводы и разработал практические рекомендации по применению описанного в диссертационном исследовании подхода. Автор лично участвовал в подготовке публикаций и представлял доклады на конференциях по теме исследования.

В работе M. Karagaur et al. 2025 автором проведен анализ параметров секретома иммортализованных МСК - состава, биологической активности в *in vitro* модели нейритогенеза, потенциальной трансформирующей активности. В работе A.L. Primak et al. 2025 автором предложена концепция, проведен анализ литературы и написан текст обзорной статьи. В работе S.S. Dzhauari et al. 2025 автором были получены и охарактеризованы иммортализованные МСК и получен секретом для анализа. В работе A.L. Primak et al. 2024 автором были получены и охарактеризованы линии иммортализованных МСК и написан текст статьи. В работах А.Л. Примака и др. 2024, A.L. Primak et al. 2024, N.A. Basalova et al. 2023 и M. Karagaur et al. 2022 автором проведен



анализ литературы и написана часть текста статьи. В работе S. Dzhauari et al. 2023 автором были охарактеризованы МСК и получен секретом для исследования.

## Публикации

По материалам диссертации опубликовано 9 статей (объемом 16,286 п.л., в соавторстве) в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных к защите в диссертационном совете МГУ по специальности и отрасли наук.

1. Karagyaur M., **Primak A.**, Basalova N., Monakova A., Tolstoluzhinskaya A., Kulebyakina M., Chechekhina E., Skryabina M., Grigorieva O., Chechekhin V., Yakovleva T., Turilova V., Shagimardanova E., Gazizova G., Vigovskiy M., Kulebyakin K., Sysoeva V., Dyachkova U., Dzhauari S., Bozov K., Popov V., Akopyan Z., Efimenko A., Kalinina N., Tkachuk V. Safety and Regenerative Properties of Immortalized Human Mesenchymal Stromal Cell Secretome // **International Journal of Molecular Sciences**. - 2025. - V. 26. - № 19. – P. 9322. EDN: ROMNFP. Импакт-фактор 1,273/4,9 (SJР 2024/ JIF 2024). (3,1185/1,492)<sup>1</sup>.
2. **Primak A. L.**, Shkarina L. N., Illarionova M. E., Plyushchii I. V., Zakharova A. V., Tkachuk V. A., Karagyaur M. N. Immortalization of Cultured Cells in Regenerative Biomedicine: Approaches, Opportunities, and Limitations // **Biochemistry (Moscow)**. - 2025. - V. 90. - №8. — P.1000-1017. - EDN: UBZRJX. Импакт-фактор 0,659/2,2 (SJР 2024/ JIF 2024). (2,079/2,04435).
3. Dzhauari S.S., **Primak A.L.**, Basalova N.A., Kalinina N.I., Monakova A.O., Bozov K.D., Velichko A.Y., Illarionova M.E., Grigorieva O.A., Akopyan Z.A., Popov V. S., Malkov P. G., Efimenko A. Y., Tkachuk V. A., Karagyaur, M. N. Overexpression of BDNF and uPA Combined with the Suppression of Von Hippel–Lindau Tumor Suppressor Enhances the Neuroprotective Activity of the Secretome of Human Mesenchymal Stromal Cells in the Model of Intracerebral Hemorrhage // **International Journal of Molecular Sciences**. - 2025. - V. 26. - №14. - С. 1-19. - EDN: AVNUZM. Импакт-фактор 1,273/4,9 (SJР 2024/ JIF 2024). (2,1945/1,019).
4. **Primak A.**, Kalinina N., Skryabina M., Usachev V., Chechekhin V., Vigovskiy M., Chechekhina E., Voloshin N., Kulebyakin K., Kulebyakina M., Grigorieva O., Tyurin-Kuzmin P., Basalova N., Efimenko A., Dzhauari S., An-tropova Y., Plyushchii I., Akopyan Z., Sysoeva V., Tkachuk V., Karagyaur M. Novel Immortalized Human Multipotent Mesenchymal Stromal Cell Line for Studying Hormonal Signaling // **International Journal**

---

<sup>1</sup> В скобках приведен объем публикации в печатных листах и вклад автора в печатных листах.

**of Molecular Sciences.** - 2024. - V. 25. - № 4. – P.2421. - EDN: ACPGVC. Импакт-фактор 1,273/4,9 (SJR 2024/ JIF 2024). (1,617/1,304).

5. **Примак А.Л.**, Скрябина М.Н., Джауари С.С., Ткачук В.А., Карагяур М.Н. Секретом мезенхимных стромальных клеток как новая надежда в лечении острых повреждений головного мозга // **Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски.** - 2024. - Т. 124. - С. 83-91. - EDN: HFBXSS. Импакт-фактор 0,177 (SJR 2024). (1,0395/0,732).
6. **Primak A.L.**, Skryabina M.N., Dzhauari S.S., Tkachuk V.A., Karagyaur M.N. The Secretome of Mesenchymal Stromal Cells as a New Hope in the Treatment of Acute Brain Tissue Injuries // **Neuroscience and Behavioral Physiology.** - 2024. - V. 54. - № 5. - P. 673–681. - EDN: DQPEKG. -1,0395 п.л. (авт. 0,732 п.л.). – Импакт-фактор SJR 2024: 0,183. *Scopus*.
7. Basalova N.A., Dzhauari S.S., Yurshev Y.A., **Primak A.L.**, Efimenko A.Yu., Tkachuk V.A., Karagyaur M.N. State-of-the-Art: The Use of Extracellular Vesicles and Preparations Based on Them for Neuroprotection and Stimulation of Brain Tissue Regeneration after Injury // **Neurochemical Journal.** - 2023. - V. 17. - № 4. - P. 560–570. - EDN: PLKPBI. Импакт-фактор 0,183 (SJR 2024). (1,0395/0,732).
8. Dzhauari S., Basalova N., **Primak A.**, Balabanyan V., Efimenko A., Skryabina M., Popov V., Velichko A., Bozov K., Akopyan Z., Malkov P., Stambolsky D., Tkachuk V., Karagyaur M. The Secretome of Mesenchymal Stromal Cells in Treating Intracerebral Hemorrhage: The First Step to Bedside // **Pharmaceutics.** - 2023. - V. 15. - № 6. - P. 1608. - EDN: FATUUI. Импакт-фактор 1,075/5,5 (SJR 2024/JIF 2024). (1,848/0,5725).
9. Karagyaur, M., **Primak, A.**, Efimenko, A., Skryabina, M., Tkachuk, V. The Power of Gene Technologies: 1001 Ways to Create a Cell Model // **Cells.** - 2022. - V. 11. - № 20. - P. 3235. - EDN: HUFRKR. Импакт-фактор 1,670/5,2 (SJR 2024/JIF 2024). (1,7325/0,892).

### Апробация результатов

Официальная апробация работы была проведена на Кафедре биохимии и регенеративной биомедицины Факультета фундаментальной медицины Медицинского научно-образовательного института МГУ имени М.В. Ломоносова 10.04.2026. Результаты работы были представлены на всероссийских и международных конференциях и научно-практических школах: IV Международная научно-практическая конференция «Биобанкирование 2025: от биокolleкций к инновациям» (2025 г.), XXXII

Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2025» (2025 г.), Международная конференция «Умные технологии в медицине для достижения научно-технологического суверенитета» (2024 г.), VI Национальный конгресс по регенеративной медицине (2024 г.), IX Молодежная школа-конференция по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН (2024 г.), всероссийская конференция «Биохимия человека 2024» (2024 г.), XXXI Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2024» (2024 г.), международная конференция «TERMIS-AP 2023» (2023 г.), III Зимняя школа-конференция молодых ученых «Редактирование генома» (2022 г.).

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация состоит из введения, четырех основных глав («Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение»), заключения, выводов, списка литературы и приложения. Диссертация изложена на 169 страницах, содержит 11 таблиц, 33 рисунка, 1 приложение. Список литературы содержит 316 источников, из них 21 отечественный и 295 зарубежных.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ<sup>2</sup>

### 1.1. Регенеративная биомедицина: основные направления и объект исследований – мезенхимные стволовые/стромальные клетки (МСК)

Регенеративная биомедицина — новая отрасль медицины, комплексная система научно-исследовательских, практических и биоэтических мероприятий, нацеленная на создание лекарственных препаратов, вызывающих образование, гибель, дифференцировку и трансдифференцировку клеток, формирование/восстановление тканей и органов, на основе применения свойственных организму человека механизмов обновления тканей, регенерации и морфогенеза [1,24]. Это направление появилось в конце XXв. В 1992г. Л.Р. Кайзер предложил термин «регенеративная медицина» [25], но в современном понимании он был определен позднее, в 1999г., У. Хаселтайном [26]. Она включает в себя следующие направления: генная терапия, редактирование генома, клеточная терапия, тканевая инженерия, биоматериалы [3].

Область регенеративной биомедицины активно развивается [3]. К настоящему времени проводится более 5000 клинических исследований [27], некоторые из них уже завершены. К 2023г. в мире (преимущественно США, ЕС, Корею, Японию и Канаде) регуляторными органами было одобрено около 70 продуктов и технологий в области

---

<sup>2</sup> Положения раздела «Обзор литературы» опубликованы в следующих статьях, подготовленных автором лично или в соавторстве:

1. **Primak A. L.**, Shkarina L. N., Illarionova M. E., Plyushchii V. V., Zakharova A. V., Tkachuk V. A., Karagyaur M. N. Immortalization of Cultured Cells in Regenerative Biomedicine: Approaches, Opportunities, and Limitations // Biochemistry (Moscow). - 2025. - V. 90. - №8. — P.1000-1017. - EDN: UBZRJX. Импакт-фактор 0,659/2,2 (SJР 2024/ JIF 2024).
2. **Примак А.Л.**, Скрябина М.Н., Джауари С.С., Ткачук В.А., Карагяур М.Н. Секретом мезенхимных стромальных клеток как новая надежда в лечении острых повреждений головного мозга // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски. - 2024. Т. 124. - С. 83-91. - EDN: HFBXSS. Импакт-фактор 0,177 (SJР 2024).
3. Basalova N.A., Dzhauari S.S., Yurshev Y.A., **Primak A.L.**, Efimenko A.Yu., Tkachuk V.A., Karagyaur M.N. State-of-the-Art: The Use of Extracellular Vesicles and Preparations Based on Them for Neuroprotection and Stimulation of Brain Tissue Regeneration after Injury // Neurochemical Journal. - 2023. - V. 17. - № 4. - P. 560–570. - EDN: PLKPBI. Импакт-фактор 0,183 (SJР 2024).
4. Dzhauari S., Basalova N., **Primak A.**, Balabanyan V., Efimenko A., Skryabina M., Popov V., Velichko A., Bozov K., Akopyan Z., Malkov P., Stambolsky D., Tkachuk V., Karagyaur M. The Secretome of Mesenchymal Stromal Cells in Treating Intracerebral Hemorrhage: The First Step to Bedside // Pharmaceutics. - 2023. - V. 15. - № 6. - P. 1608. - EDN: FATUUI. Импакт-фактор 1,075/5,5 (SJР 2024/JIF 2024).
5. Karagyaur, M., **Primak, A.**, Efimenko, A., Skryabina, M., Tkachuk, V. The Power of Gene Technologies: 1001 Ways to Create a Cell Model // Cells. - 2022. - V. 11. - № 20. - P. 3235. - EDN: HUFRKR. Импакт-фактор 1,670/5,2 (SJР 2024/JIF 2024).

регенеративной биомедицины (продукты генной, клеточной терапии, тканевой инженерии, методы/продукты клеточной иммунотерапии и терапии пуповинной кровью) [3].

В реалиях современной России регенеративная биомедицина является одной из 14 научных платформ («программой исследований по приоритетным направлениям и критическим технологиям развития медицинской науки»), определенных в «Стратегии развития медицинской науки в Российской Федерации на период до 2025 года» [28].

По данным анализа публикационной активности наиболее разработанными в России поднаправлениями регенеративной биомедицины являются [3]:

- В клеточной терапии - свойства (включая ангиогенный потенциал) мезенхимных стромальных/стволовых клеток жировой ткани, регуляция роста и дифференцировки мезенхимных стромальных/стволовых клеток и способы воздействия на эти процессы, использование экзосом как средств доставки;
- В тканевой инженерии - применение внеклеточного матрикса, изготовление и свойства материалов на основе фиброина шелка, реконструкция мочевого пузыря и уретры, 3D-биопринтинг.

Разрабатывается и нормативная база. Так, в 2017 году вступил в силу ФЗ №180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах», что стимулирует исследования в рамках области клеточной терапии. К задачам этой области относится изучение фундаментальных основ функционирования и механизмов обновления имеющих значение для регенеративной биомедицины клеток с целью поиска подходов для стимулирования эндогенных процессов человеческого организма для улучшения его собственных способностей к самообновлению и регенерации, создание терапевтических препаратов на основе биомедицинских клеточных продуктов или продуктов культивирования клеток (секретом, его фракции или компоненты), разработка новых способов доставки лекарственных средств к органам-мишеням на основе клеток, разработка новых методов трансплантации клеток и др. [1].

Значимая часть исследований в области регенеративной медицины проводится с использованием стволовых клеток. Стволовые клетки (СК) – это недифференцированные клетки, обладающие способностью к пролиферации и самообновлению и потентностью (способностью дифференцироваться в разные типы тканей). Выделяют три группы стволовых клеток: эмбриональные СК (ЭСК), СК взрослого организма и индуцированные

плюрипотентные СК (ИПСК) [29]. ЭСК и ИПСК являются плюрипотентными (могут дифференцироваться в ткани - производные всех трех зародышевых листков), что поначалу обусловило высокий интерес к ним. Однако, ЭСК в настоящее время не применяются для регенеративной биомедицины вследствие этических проблем и высокой вероятности иммунного отторжения организмом реципиента [30]. ИПСК широко применяются, в т.ч. для создания органоидов, в качестве источника для получения на их основе дифференцированных клеток нужного типа ткани [30]. Однако они чаще дифференцируются не в полноценные зрелые клетки, а в клетки эмбрионального типа [31], также им свойственна генетическая нестабильность [29], и их использование сопряжено с риском развития тератом и опухолей [32]. Среди СК взрослого организма мультипотентные мезенхимные стволовые/стромальные клетки (МСК) нашли наибольшее применение в области клеточных технологий. Они присутствуют в большинстве тканей и органов человека и обладают способностью поддерживать тканевой гомеостаз, стимулировать собственные регенеративные процессы человеческого организма. МСК обладают низкой иммуногенностью, противовоспалительным и иммуномодулирующим действием [29]. Широкий терапевтический потенциал МСК был показан в многих клинических испытаниях (рис. 1) при лечении системной склеродермии, рассеянного склероза, ишемической болезни сердца, инфаркта миокарда, повреждений ЦНС, COVID-19, нарушения сперматогенеза и др.

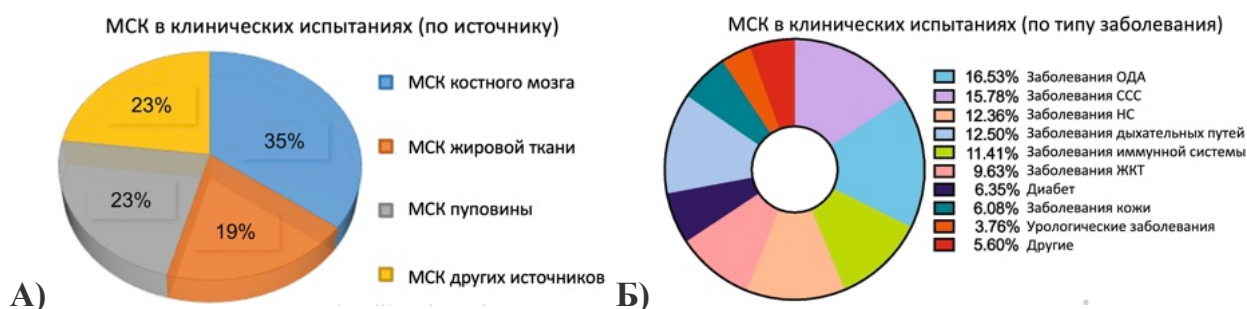


Рисунок 1. Представленность МСК в клинических испытаниях: А) – по источнику забора биологического материала [8], Б) по типу заболевания [33].

## 1.2. МСК: термины, свойства, функциональная роль в организме, применение в медицине, источники получения (сравнение), проблемы, возникающие при использовании

### 1.2.1. МСК: термины

Первооткрывателем МСК по праву считается А.Я. Фриденштейн, который в 1970-х гг. показал, что в костном мозге есть два вида мультипотентных стволовых клеток:

гемопоэтические стволовые клетки (ГСК; являются предшественниками всех типов клеток крови) и стромальные (мезенхимные) стволовые клетки (ССК) [16], которые могут дифференцироваться в клетки стромы костного мозга и трех тканей – жировой, хрящевой, костной [34]. С момента их открытия трактовка аббревиатуры МСК претерпела многочисленные изменения. Фриденштейн [35] называл такие клетки стромальными предшественниками, Морин Оуэн [36]) - стромальными стволовыми клетками, Каплан в 1990е гг. [37] ввел термин «мезенхимные стволовые клетки», вторым широко принятым на сегодняшний день термином является «мезенхимные стромальные клетки». Ещё более осложняет систему терминологии вышедшая в 2017 г. статья Каплана, в которой он предлагает следующие варианты трактовки: «медицинские сигнальные клетки», «магические сигнальные клетки» (magic signaling cells), «более стратегические клетки» (more strategic cells), «макси-секретирующие клетки» (maxi secreting cells), «наиболее чувствительные клетки» (most sensitive cells), «основные секретирующие клетки» (main secreting cells), «клетки, выделяющие сообщения» (message secreting cells) [38].

Учитывая разнообразие описанных терминов, мы считаем целесообразным рассмотреть особенности терминологии и обосновать выбранную нами трактовку.

Термин «стволовая клетка» предложен А.А. Максимовым в 1909. на заседании Берлинского гематологического общества. Согласно современным рекомендациям, стволовые клетки (СК) – клетки, которые *in vivo* способны к длительному самообновлению и дифференцировке в определенные (один или много) типы клеток (свойство потентности) [39], способные замещать поврежденные ткани путем делений и обладающие свойствами самообновления, трансплантируемости, пластичности, зависимости от сигналов ниши и поддержания целостности генома [40]. Стволовые клетки бывают циркулирующими и резидентными (они есть практически во всех тканях организма и занимают в них ниши стволовых клеток). Резидентными СК являются и мезенхимные стволовые клетки (хотя в случае повреждения ткани они могут покидать свою нишу). *Мезенхимные стволовые* клетки – негемопоэтические стволовые клетки мезенхимного происхождения, которые обеспечивают обновление тканей, происходящих из разных зародышевых листков (термин мезенхимный указывает на происхождение, но не дифференцировочный потенциал) [39].

Эти клетки, согласно рекомендациям ISCT [39], отличаются от *мезенхимных стромальных* клеток (МСК), основной задачей которых, в отличие от стволовых клеток,

является поддержание ниши стволовых клеток (за счет принятия и модулирования приходящих сигналов, паракринной активности, выработки компонентов внеклеточного матрикса, в случае необходимости временного принятия на себя функций стволовых клеток). Термин «стромальные» указывает на их *in situ* нахождение в строме. Отсутствие термина «стволовые» указывает на то, что выведенные *ex vivo* и культивируемые *in vitro* на пластике клетки могут и не обладать свойствами стволовости, но обладать необходимыми и достаточными критериями МСК. При этом считается, что некоторые, но не все, из прикрепившихся к пластику культивируемых *in vitro* МСК могут являться стволовыми (обладать признаками «стволовости») и этот термин может быть применен к такой субпопуляции, но только в случае подтверждения их стволовых свойств [39].

МСК разных тканей являются очень гетерогенными, поэтому существовала необходимость выработать критерии идентификации таких клеток. основополагающей работой, в которой определены минимальные достаточные критерии для отнесения исследуемых клеток к МСК является статья 2006г. [41]. Согласно этой статье мезенхимные стромальные клетки (МСК) – постнатальные стволовые клетки веретеновидной фибробластоподобной формы, которые характеризуются следующими признаками: адгезия к пластику, мультипотентный дифференцировочный потенциал (способность к дифференцировке *in vitro* в остеогенном, адипогенном и хондрогенном направлениях), >95% клеток популяции должны быть позитивны по поверхностным маркерам CD73 (5'-нуклеотидаза), CD90 (Thy-1), CD105 (эндоглин) и негативны (позитивны только <2% клеток популяции) по маркерам эндотелиальных, гематопозитических и иммунных клеток: CD14 или CD11b, CD34, CD45, CD79 или CD19, HLA-DR<sup>3</sup> [41] (рис. 2).

---

<sup>3</sup> CD45 - маркер лейкоцитов, CD34 - маркер гематопозитических и эндотелиальных клеток, CD14 и CD11b - маркеры моноцитов и макрофагов, CD79α и CD19 - маркеры В-клеток, HLA-DR – маркер активированных клеток иммунной системы; эти белки в норме не экспрессируются на поверхности МСК без стимуляции специфическими молекулами (например, IFN-γ) [41].



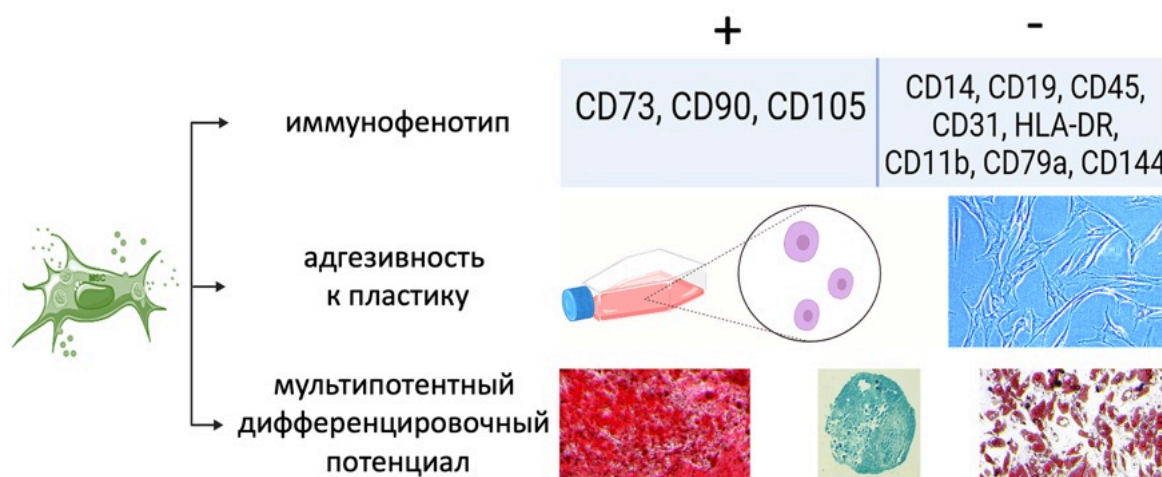


Рисунок 2. Основные свойства МСК (по [42] с изменениями).

Таблица 1. Основные маркеры МСК (по данным [43])

| Маркер | Ген         | Название белка                      | Функции                                                                           |
|--------|-------------|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| CD73   | <i>NT5E</i> | 5'-нуклеотидаза                     | Белок плазмалеммы, катализирует превращение внеклеточных нуклеотидов в нуклеозиды |
| CD90   | <i>THY1</i> | Thy-1 антиген клеточной поверхности | Клеточная адгезия и межклеточная коммуникация                                     |
| CD105  | <i>ENG</i>  | эндоглин                            | Трансмембранный белок, индуцирует активацию и пролиферацию эндотелиальных клеток  |

Принимая во внимание рекомендации ISCT [39], рекомендацию основоположника термина «мезенхимные стволовые клетки» - Каплана [38] отозвать такую трактовку, а также то, что в нашей работе мы исследуем свойства культивируемых *in vitro* МСК, характеризуя их согласно критериям ISCT [41], мы выбрали за основную трактовку аббревиатуры МСК термин «мезенхимные стромальные клетки».

### 1.2.2. МСК: регенеративный потенциал и роль в организме

МСК локализованы в нишах стволовых клеток стромально-сосудистого компонента большинства тканей и органов [44]. Они находятся во взаимной регуляции с клетками-компонентами ниши, а также принимают системные сигналы организма, поступающие из кровотока — гормоны, цитокины, метаболиты [44]. В ответ на поступающие сигналы МСК адаптивно подстраиваются и за счет межклеточных контактов и секреции паракринных растворимых факторов и внеклеточных везикул могут регулировать самоподдержание и дифференцировку резидентных тканеспецифичных

стволовых клеток, пополнять компоненты микроокружения стволовой клетки за счет дифференцировки или привлечения в нишу «поддерживающих» клеток [45], самообновляться для пополнения собственного пула [45], ремоделировать внеклеточный матрикс (ВКМ). Наряду со способностью МСК мигрировать в место повреждения, а также их трофическими, иммуномодулирующими, противовоспалительными, антиапоптотическими свойствами, это обуславливает крайне важную роль МСК в обеспечении гомеостаза, репаративных и регенеративных процессов тканей и органов.

Прорегенеративное действие МСК опосредовано следующими механизмами:

- 1) *дифференцировкой в клетки определенного типа*: показано, что *in vivo* МСК могут дифференцироваться в адипо-, остео-, хондрогенном направлениях, при определенных условиях *in vitro* МСК также могут дифференцироваться в клетки гладкой и поперечнополосатой мускулатуры, кардиомиоциты, гепатоциты, эндокринные клетки поджелудочной железы, клетки эндотелия сосудов и некоторые другие [46-48],
- 2) *паракринной активностью* (продукцией секрета - совокупности молекулярных факторов, выделяемых клеткой во внешнюю среду). Секретом МСК состоит из растворимой и нерастворимой фракции. К растворимой фракции относятся факторы роста, цитокины, хемокины, гормоны, к нерастворимой - факторы, заключенные в внеклеточные везикулы. Внеклеточные везикулы (ВВ) – общий термин, обозначающий совокупность всевозможных выделяемых клеткой мембранных пузырьков, к которым обычно относили микровезикулы, экзосомы и апоптотические тельца (также выделяют и другие ВВ - онкосомы, миграсомы, эктосомы, экзомы, супермеры и мембранные частицы [49]), но с 2018 г. их принято классифицировать по размеру на малые ВВ (меньше 100 нм или 200 нм) и средние/крупные ВВ (больше 200 нм) [50]. ВВ содержат белки (рецепторы клеточной поверхности, сигнальные белки, факторы транскрипции, ферменты, белки внеклеточного матрикса), липиды, нуклеиновые кислоты (микроРНК, мРНК и ДНК) [49]. Показано, что секретом МСК или ВВ МСК имеют биологическую активность сходную с самими МСК [8],
- 3) *передачей митохондрий* другим клеткам [51].

Согласно современной парадигме [52,53] основным механизмом прорегенеративных эффектов МСК считается именно паракринный (через выделение секрета).

Более подробно свойства МСК, основные опосредующие их механизмы действия и молекулярные факторы мы суммировали в таблице 2.

Таблица 2. Свойства МСК, основные опосредующие их механизмы и молекулярные факторы (составлена по [4,54-63])

| Механизм                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Молекулярные факторы                                                                                                                                                                                                                                                          |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>1. Мультипотентность</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Внутриклеточные сигнальные каскады                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Wnt/ $\beta$ -катенин, MAPK, Notch, Smad-3, -4 и др.                                                                                                                                                                                                                          |
| Действие транскрипционных факторов                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | PPAR- $\gamma$ 2, C/EBP- $\alpha/\beta$ (адипогенез), RUNX-2, Osterix/Sp7 (остеогенез), SOX9, SOX5, SOX6 (хондрогенез) и др.                                                                                                                                                  |
| <i>2. Способность к пролиферации</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Внутриклеточные сигнальные каскады                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | HIF-1, низкая/умеренная активация пути Wnt/ $\beta$ -катенин                                                                                                                                                                                                                  |
| <i>3. Способность мигрировать в место повреждения (хоуминг) (по кровеносному руслу, через эндотелий сосудов, в интерстиций тканей)</i>                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| За счет ремоделирования ВКМ                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Описано выше                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| За счет экспрессии молекул адгезии                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Интегрин $\alpha$ 1, Интегрин $\alpha$ 3, Интегрин $\alpha$ 4, Интегрин $\alpha$ 5, Интегрин $\beta$ 1 и др.                                                                                                                                                                  |
| За счет экспрессии хемокиновых рецепторов                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | CCR2, CCR7, CCR10, CXCR4, CXCR5, CXCR6 и др.                                                                                                                                                                                                                                  |
| <i>4. Трофические свойства (секреция факторов роста и хемокинов)</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Ангиогенез (привлечение эндотелиальных предшественников из костного мозга, стимуляция деления и миграции эндотелиальных клеток, образования сосудов)                                                                                                                                                                                                                               | Ang-1 (ангиопоэтин), EPO (эритропоэтин), VEGF (фактор роста сосудистого эндотелия), SDF-1 (CXCL12) (стромальный фактор роста-1) и др.                                                                                                                                         |
| Нейрогенез (стимуляция роста и восстановления нервных окончаний)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | GDNF (глиальный нейротрофический фактор), BDNF (нейротрофический фактор головного мозга), IGF-1 (инсулиноподобный фактор роста-1), SDF-1 (CXCL12) (стромальный фактор роста-1), NGF (фактор роста нервов), TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ (трансформирующий фактор роста) и др. |
| Плейотропное действие                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | EGF (эпителиальный фактор роста), FGF-1, -18 (фактор роста фибробластов), HGF (фактор роста гепатоцитов), PDGF-AB (тромбоцитарный фактор роста) и др.                                                                                                                         |
| Эпителизация                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | KGF (фактор роста кератиноцитов)                                                                                                                                                                                                                                              |
| <i>5. Противовоспалительные и иммуномодулирующие свойства (подавляют пролиферацию В-лимфоцитов, их дифференцировку в плазматические клетки и секрецию иммуноглобулинов, активацию Т-лимфоцитов, цитотоксическую активность натуральных киллеров и секрецию ими INF-<math>\gamma</math>, дифференцировку предшественников в дендритные клетки и экспрессию дендритными клетками</i> |                                                                                                                                                                                                                                                                               |

|                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| костимулирующих молекул (CD80, CD86), подавляют моноциты и макрофаги, стимулируют привлечение регуляторных или супрессивных субпопуляций иммунных клеток (M2-макрофагов, В-лимфоцитов и дендритных клеток, продуцирующих IL-10 и др.))       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Секреция растворимых факторов                                                                                                                                                                                                                | Интерлейкины (IL-4, IL-6, IL-10, TGF- $\beta$ 1, LIF, TSG-6), ферменты (НО-1 (гемоксигеназа 1), IDO (индоламин-2,3-диоксигеназа), синтаза оксида азота), простагландин-E2, галектин-1 и -3, SDF-1 (CXCL12), sTNF-R1 (растворимый рецептор фактора некроза опухоли-а), IL-1Ra (антагонист рецептора IL-1) и др. |
| В меньшей степени - через непосредственный контакт с иммунными клетками благодаря экспрессии мембранных белков                                                                                                                               | иммунорегуляторные белки семейства B7 (B7-H4, B7-H1, B7-DC), молекулы межклеточной адгезии (CD54 (ICAM-1), CD106 (VCAM-1)), CD95L (лиганд рецептора CD95) и др.                                                                                                                                                |
| <i>6. Регуляция ремоделирования внеклеточного матрикса (ВКМ)</i>                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Синтез белков ВКМ                                                                                                                                                                                                                            | коллагены (COL1A1, COL3A1, COL4A2, COL5A2, COL6A1, COL6A2, COL8A1, COL10A1, COL11A1, COL15A1 и др.), фибронектин, ламинины (LAMA2, LAMA4, LAMB) и др.                                                                                                                                                          |
| Синтез матриксных металлопротеиназ                                                                                                                                                                                                           | 2MT1-MMP, MMP-1, MMP-9 и др.                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Активация матриксных металлопротеиназ других клеток                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Синтез ингибиторов матриксных металлопротеиназ                                                                                                                                                                                               | TIMP-1, TIMP-2, TIMP-4 и др.                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| <i>7. Антиапоптотические свойства</i><br>(в основном опосредованы секретом МСК и переносом митохондрий)                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Эндогенный (митохондриальный) путь:<br>а) способствуют увеличению содержания антиапоптотического белка Bcl-2 и снижению содержания проапоптотического белка Bax<br>б) стимулируют экспрессию Bcl-2 в клетках-мишенях                         | а) IL-6, TGF- $\beta$ 1, простагландин-E2, miR-29a-3p, miR-125b-5p<br>б) miR-93, miR-150-5p, miR-UCA1                                                                                                                                                                                                          |
| Экзогенный путь (через «рецепторы смерти»): снижают апоптотические сигналы (содержание TNF- $\alpha$ , Fas-L и др.) в клеточном микроокружении и активность сигнальных путей «рецепторов смерти» (TLR3-зависимые пути MAPK и NF- $\kappa$ B) | miR-21-5p, miR-17                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Путь эндоплазматического ретикулаума (ЭПР) (приводит к накоплению неправильно свернутых белков): уменьшают стресс ЭПР                                                                                                                        | HGF, TSG-6 (TNF-inducible gene 6 Protein), miR-21                                                                                                                                                                                                                                                              |

|                                                                                                 |                                                                      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| Активируют антиапоптотический путь - секретируют факторы, активирующие сигнальный путь PI3K/AKT | miR-29b-3p, miR-223, miR-144, miR-486-5p, lncRNA KLF-AS1, miR-132-3p |
| Ингибируют проапоптотические пути –<br>а) активацию p53<br>б) JNK (MAPK)                        | а) miR-369-3p, miR-644-5p, miR-125b-5p<br>б) miR-455-3p, miR-19a     |
| Передают митохондрии клеткам, активируют аутофагию                                              |                                                                      |
| Ингибируют пироптоз                                                                             | circ-003564, miR-539-5p, circ-HIPK3, miR-223-3p, miR-26a-5p          |
| <i>8. Антимикробные свойства</i>                                                                |                                                                      |
| Вызывают лизис клетки-мишени                                                                    | LL-37 (секретируемый пептид семейства кателицидинов)                 |

### 1.2.3. МСК: применение в медицине

Плейотропный эффект МСК (способность активировать резидентные стволовые клетки, стимулировать ангиогенез и нейрогенез, подавлять воспаление, др.), их способность мигрировать к месту повреждения, низкая иммуногенность вследствие низкого уровня экспрессии человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) класса I и низкие уровни экспрессии HLA класса II [54], высокая паракринная активность обусловили крайне широкое применение как самих МСК в качестве биомедицинских клеточных продуктов (БМКП), так и бесклеточных продуктов на их основе в качестве терапевтических средств для лечения большого спектра заболеваний (рис. 3).

Так, трофические свойства МСК обусловили успешность их применения для лечения дегенеративных заболеваний (инфаркт миокарда, цирроз печени, острое повреждение почек, эмфизема легких, хроническая обструктивная болезнь легких, повреждения органов как осложнения диабета), нейродегенеративных заболеваний (боковой амиотрофический склероз, множественный склероз, болезнь Хантингтона, болезнь Паркинсона) [55].

Иммуносупрессивные свойства МСК крайне важны при лечении аутоиммунных заболеваний (ревматоидный артрит, системная красная волчанка, болезнь Крона) и при трансплантации тканей и органов для предотвращения их отторжения или предотвращения острой реакции «трансплантат против хозяина» [55].

Способность МСК предотвращать апоптоз других клеток позволяет использовать их для поиска терапевтических подходов к лечению сердечно-сосудистых (инфаркт миокарда) заболеваний, заболеваний нервной системы (нейродегенеративные заболевания, повреждения спинного мозга, гипоксическая ишемическая энцефалопатия),

заболеваний легких (острый респираторный дистресс-синдром, ишемически-реперфузионное повреждение легких, повреждение легких, обусловленное воздействием сигаретного дыма, вируса гриппа и др., легочный фиброз различной этиологии), повреждений почек, заболеваний печени (фиброз печени, печеночная недостаточность, ишемическое реперфузионное повреждение печени), преждевременной недостаточности яичников, панкреатита, остеоартрита и дегенерации межпозвоночных дисков [59]. Наряду с антиапоптотическими свойствами МСК могут оказывать и проапоптотическое действие (в основном на опухолевые клетки и клетки иммунной системы). Это свойство было использовано в исследованиях по лечению таких онкологических заболеваний, как миелоидная лейкемия, рак простаты, молочной железы, поджелудочной железы, миелома, глиома, лимфома, гепатоцеллюлярная карцинома, а также лечению аутоиммунных заболеваний (системного склероза, язвенного колита, анкилозирующего спондилита (болезнь Бехтерева)) [59].

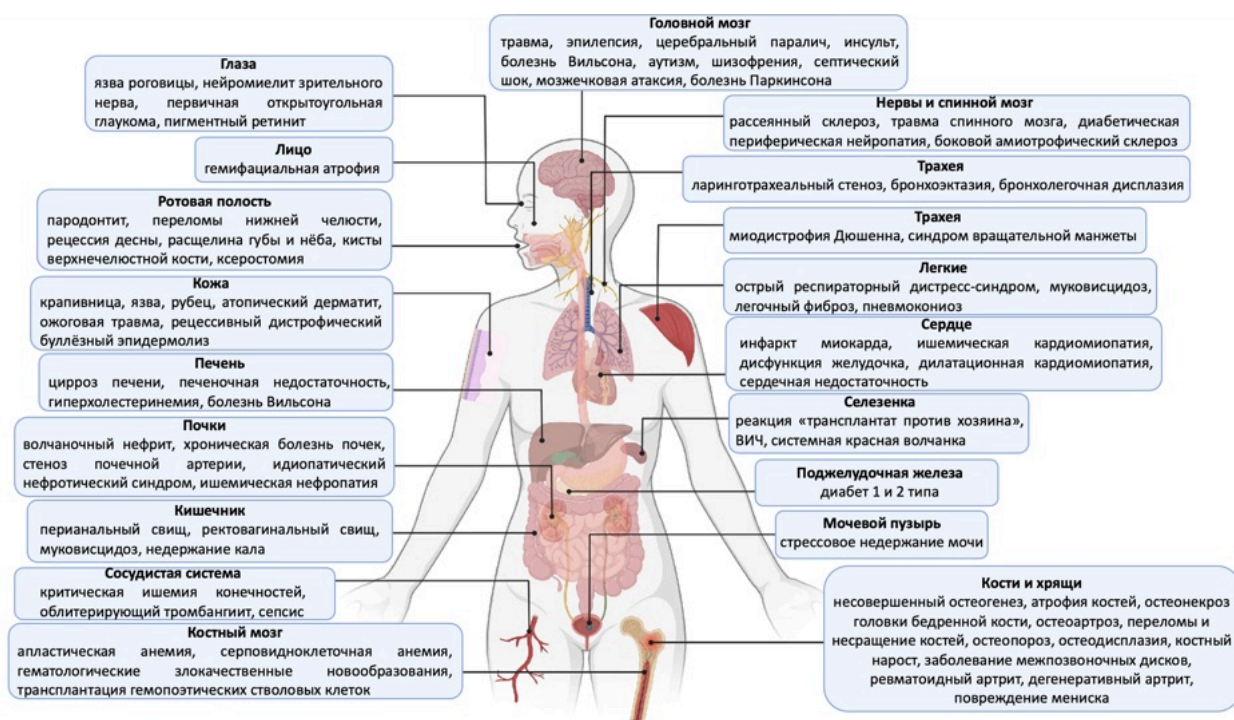


Рисунок 3. Применение МСК для лечения заболеваний (по [52]).

Доступность источников МСК, широкий терапевтический эффект и другие описанные свойства сделали МСК одними из главных объектов исследований в области регенеративной биомедицины – как фундаментальных (МСК человека являются модельным объектом), так и прикладных (на основе МСК или их секрета создаются клеточные и бесклеточные биомедицинские продукты для лечения целого ряда заболеваний). Неукоснительно растет число клинических испытаний самих МСК (>10000



по данным clinicaltrials.gov), включая МСК жировой ткани человека (553), а также секретомы МСК (37). Среди клеточных биомедицинских продуктов на основе МСК есть несколько выведенных на рынок в разных странах лекарственных препаратов, которые суммированы в таблице 3.

Таблица 3. Лекарственные препараты на основе МСК, одобренные для применения в разных странах мира (по [64-68])

| Название препарата                                                      | Описание препарата                                                                                                                                                                                                                                                    |
|-------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Alofisel (darvadstrocel) компании Takeda                                | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Препарат: аллогенные МСК жировой ткани человека</li> <li>• Для лечения: сложные анальные свищи у взрослых пациентов с болезнью Крона</li> </ul>                                                                              |
| Cartistem компании Medipost                                             | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Препарат: аллогенные МСК пуповинной крови</li> <li>• Для лечения: 4 стадия остеоартрита коленного хряща</li> </ul>                                                                                                           |
| Cellgram-AMI компании Pharmicell                                        | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Препарат: аутологичные МСК красного костного мозга</li> <li>• Для лечения: острый инфаркт миокарда</li> </ul>                                                                                                                |
| Cupistem компании Anterogen                                             | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Препарат: аутологичные МСК жировой ткани человека</li> <li>• Для лечения: свищи при болезни Крона</li> </ul>                                                                                                                 |
| Holoclar компании Chiesi Farmaceutici                                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Препарат: аутологичные стволовые клетки эпителия роговицы человека</li> <li>• Для восстановления: восстановления функционального эпителия роговицы в условиях дефицита лимбальных стволовых клеток при ожоге глаз</li> </ul> |
| Ixmyelocel компании Vericel                                             | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Препарат: комплекс аутологичных МСК, моноцитов, активированных макрофагов</li> <li>• Для лечения: сердечной недостаточности вследствие ишемической дилатационной кардиомиопатии</li> </ul>                                   |
| MesestroCell компании Cell Tech Pharmed                                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Препарат: аутологичные МСК красного костного мозга</li> <li>• Для лечения: остеоартрита</li> </ul>                                                                                                                           |
| Neuronata-R компании Corestem                                           | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Препарат: аутологичные МСК красного костного мозга</li> <li>• Для лечения: бокового амиотрофического склероза</li> </ul>                                                                                                     |
| Prochymal (Remestemcel-L/Ryoncil) компании MESOBLAST INTERNATIONAL SARL | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Препарат: аллогенные МСК взрослого человека, культивируемые <i>ex vivo</i></li> <li>• Для лечения: острой реакции «трансплантат против хозяина» у детей</li> </ul>                                                           |
| Queencell компании Anterogen                                            | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Препарат: аутологичные МСК жировой ткани человека</li> <li>• Для лечения: заболеваний соединительной ткани</li> </ul>                                                                                                        |
| Stemirac компании NIPRO CORP                                            | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Препарат: аутологичные МСК красного костного мозга человека</li> <li>• Для лечения: травм спинного мозга в острой фазе</li> </ul>                                                                                            |
| Stempeucel компании Stempeutics Research Pvt                            | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Препарат: пулированные аллогенные МСК взрослого человека, культивируемые <i>ex vivo</i></li> </ul>                                                                                                                           |

|                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|---------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Для лечения: критической ишемии нижних конечностей, вызванной болезнью Бюргера либо атеросклерозом периферических артерий</li> </ul>                                                                                                                |
| Temcell HS компании JCR Pharmaceuticals Co., Ltd. | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Препарат: аллогенные МСК человека</li> <li>• Для лечения: острой реакции «трансплантат против хозяина», хронической обструктивной болезни легких, острого лучевого поражения, сахарного диабета I типа, инфаркта миокарда, болезни Крона</li> </ul> |

Как мы уже отметили выше, терапевтический потенциал МСК в основном основан не на их мультипотентности (способности дифференцироваться в определенные клетки поврежденной ткани, тем самым напрямую замещая их), а на паракринной активности – способности синтезировать различные функционально активные компоненты [38,53]. Также применение самих МСК как терапевтических агентов сопряжено с рядом рисков, таких как потенциальная проонкогенность, провоспалительное действие и возникновение очагов фиброза [69]. Поэтому активно разрабатывается направление терапии – использование секрета МСК как бесклеточного биомедицинского продукта.

Биомедицинские бесклеточные продукты на основе секрета МСК начали активно исследоваться позднее, чем БМКП, возможно, именно поэтому к настоящему времени ни один из них не одобрен для применения в реальной клинической практике ни в одной из стран. Тем не менее, эта область активно развивается, растет количество доклинических и клинических испытаний секрета. Так, секретом МСК (или фракция ВВ МСК) исследуется в клинических испытаниях для лечения остеоартрита, цереброваскулярных заболеваний (включая ишемический и геморрагический инсульт), заболеваний нервной системы (включая болезнь Альцгеймера, детский центральный паралич), дыхательной системы (включая пневмонию и острый респираторный дистресс-синдром при COVID-19), сахарного диабета 1 типа, рефрактерной болезни Крона и рефрактерного язвенного колита, полиорганной недостаточности [6].

#### **1.2.4. Характеристика МСК, выделенных из разных источников**

МСК могут быть выделены из разных источников – костного мозга, жировой ткани, пульпы зуба, эндометрия, менструальной и периферической крови, так называемых перинатальных тканей (амниотической мембраны, амниотической жидкости, пуповинной крови, плаценты, ткани пуповины) [70]. Наибольшее применение в клинических испытаниях нашли МСК костного мозга, жировой ткани и пуповины [8].



Наиболее широко исследуемыми в области регенеративной биомедицины являются МСК костного мозга и жировой ткани [46,71].

*МСК костного мозга* (КМ-МСК) были открыты Фриденштейном в 1968 г. [16] и являются первыми открытыми МСК. КМ-МСК выстилают эндостальную поверхность костного мозга. Они могут быть выделены из гребня подвздошной кости, тел позвонков, головки плечевой кости и некоторых других источников [72]. КМ-МСК наиболее полно изучены и считаются «золотым стандартом» [73]. Они были исследованы в качестве терапевтических агентов для лечения многих заболеваний (в т.ч. цирроза печени, гломерулонефрита, нейродегенеративных заболеваний, перелома костей [73], повреждений скелетных мышц [74], тендинопатии ахиллова сухожилия [75] и др.). По данным Mello [9] на основе КМ-МСК сейчас создано наибольшее количество одобренных лекарственных препаратов. Тем не менее, КМ-МСК имеют ряд недостатков – процедура их выделения из донора инвазивна и болезненна (причем боль может становиться хронической [72]), они обладают низкой скоростью пролиферации и при культивировании быстро достигают состояния клеточного старения.

*МСК жировой ткани* (ЖТ-МСК) были впервые выделены Zuk P.A. и соавторами в 2001 году [76]. Они считаются хорошей альтернативой КМ-МСК, т.к. жировая ткань по сравнению с другими тканями наиболее обогащена МСК (например, позволяет получить в 100-500 раз больше МСК, чем костный мозг [77]), её легко выделить во время процедур липосакции, липопластики или липэктомии [73], получаемые МСК обладают лучшими характеристиками пролиферации [72] и проявляют признаки клеточного старения на более поздних пассажах, чем КМ-МСК. Благодаря наличию у ЖТ-МСК способности стимулировать ангиогенез, иммунорегуляторным и антиапоптотическим свойствам ЖТ-МСК их применение дало положительный результат в клинических испытаниях по стимулированию регенерации хрящей, костей, сухожилий, скелетных и сердечной мышц, заживления ран, регенерации нервов, при пересадке жира [31]. На основе ЖТ-МСК к настоящему времени создано 2 одобренных для клинического применения лекарственных препарата, 6 препаратов проходят клинические испытания [9].

*МСК пуповины* (П-МСК) – неонатальные МСК, которые могут быть выделены из 4 отделов пуповины – Вартонова студня (содержит их наибольшее количество), ткани, окружающей пупочные сосуды, пуповинной крови (впервые описаны Erices A. и соавторами в 2000 году [78]), субэндотелия пупочной вены [72]. Свойства МСК из разных

отделов пуповины отличаются [79], но общим является то, что их свойства и свойства секретомы [80] сильно отличаются от свойств МСК взрослого человека, включая КМ-МСК и ЖТ-МСК [72,81]. Терапевтический потенциал П-МСК обусловлен иммуномодулирующим, противовоспалительным, антифибротическим действием [82]. В последние годы П-МСК активно изучаются в силу удобства их использования, которое обусловлено большим количеством и легкостью забора донорского материала, отсутствием этических ограничений, высокой пролиферативной активностью и отсроченным наступлением клеточного старения. Показано, что П-МСК могут быть использованы для лечения повреждений спинного мозга, заболеваний головного мозга, печени, сердца, дыхательной системы, лечения диабета, артрита, системной красной волчанки [82]. Пуповинная кровь одобрена FDA для лечения лейкемии, лимфомы, серповидноклеточной анемии и синдрома Вискотта-Олдрича [79]. На основе П-МСК к настоящему времени создано 2 коммерчески доступных одобренных лекарственных препарата [9].

Особенности наиболее широко используемых МСК мы суммировали в таблице 4.

Таблица 4. Характеристики МСК, выделенных из разных источников (по [70,82-89])

|                              | МСК костного мозга (КМ-МСК)                                                                                                            | МСК жировой ткани (ЖТ-МСК)                                                                                   | МСК пуповины (П-МСК)                                                                                                                                |
|------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Клоногенный потенциал        | Нестабильный, снижается после 3-4 пассажа. Ниже, чем у ЖТ-МСК                                                                          | Высокий, выше, чем у КМ-МСК                                                                                  | Высокий, выше, чем у КМ-МСК, ниже, чем у ЖТ-МСК                                                                                                     |
| Пролиферативный потенциал    | Ниже, чем у ЖТ-МСК и П-МСК (большее время удвоения популяции (PDT))                                                                    | Меньшее время удвоения популяции (PDT) по сравнению с КМ-МСК                                                 | Высокий (наименьшее PDT по сравнению с ЖТ-МСК и КМ-МСК)                                                                                             |
| Дифференцировочный потенциал | Мультипотентный, увеличенный остеогенный и хондрогенный                                                                                | Мультипотентный, увеличенный адипогенный                                                                     | Мультипотентный                                                                                                                                     |
| Секретом: состав             | Содержит проангиогенные, нейротрофические и антиапоптотические факторы (VEGF-A, FGF-2, HGF, NGF, BDNF, ANG, HIF $\alpha$ , MMP9, Bcl2, | Содержит основные проангиогенные и нейротрофические факторы (VEGF-A, TGF- $\beta$ 1, FGF-2, HGF, NGF, BDNF); | Данные по секретируемым факторам отличаются: больше белков с проангиогенными свойствами (HGF, VEGF), либо меньше таких белков, чем КМ-МСК и ЖТ-МСК; |

|                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                       |
|-------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                             | <p>повышенный уровень VCAM1), sICAM-1;</p> <p>По сравнению с секретомом П-МСК более выраженный противовоспалительный профиль: меньше IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, но больше PDGFBB, MCP-1, SDF1, TGF-β1, VEGF;</p> <p>FGF-2, HGF, BDNF, sICAM-1 меньше, чем в секрете ЖТ-МСК и П-МСК</p> | <p>IL-6, MCP-1; большое количество IL-7 и IL-12;</p> <p>MMP1, MMP3, MMP13; sICAM-1, компоненты внеклеточного матрикса;</p> <p>Везикулы содержат больше проангиогенных факторов, чем везикулы секрета КМ-МСК</p>                                              | <p>Обогащен противовоспалительными цитокинами (IL-1RA, IFNα), провоспалительными цитокинами (IL-6, IL-8), митогенными факторами (HGF, TGF-β2, PDGFAA, GCSF);</p> <p>Содержит FGF-2, NGF, BDNF, KGF, EGF, цитокины, sICAM-1</p>        |
| Секретом: функциональная активность                         | <p>Иммуномодулирующая активность</p> <p>Нейропротективная активность (но ниже, чем у секрета ЖТ-МСК и П-МСК)</p> <p>Согласно некоторым исследованиям, имеет лучшие проангиогенные свойства, чем секретом ЖТ-МСК</p>                                                                  | <p>Проангиогенные свойства</p> <p>Иммуномодулирующая активность</p> <p>Нейропротективная активность</p>                                                                                                                                                      | <p>Иммуномодулирующая активность</p> <p>Нейропротективная активность</p> <p>Согласно некоторым исследованиям, имеет лучшие проангиогенные свойства, чем секретом ЖТ-МСК</p>                                                           |
| Изменение метаболической активности в бессывороточной среде | <p>Значительное, в т.ч. сильно снижается экспрессия VEGF-A и BDNF</p>                                                                                                                                                                                                                | <p>Экспрессия генов значительно не меняется (VEGF-A, HGF, TGF-β1, PDL-1, IL-6, IL-10, др.);</p> <p>увеличивается экспрессия BDNF, IDO</p>                                                                                                                    | <p>Экспрессия генов значительно не меняется (VEGF-A, TGF-β1, IL-6, IL-10, др.);</p> <p>увеличивается экспрессия HGF, COX2</p>                                                                                                         |
| Преимущества                                                | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Наиболее изучены и считаются золотым стандартом</li> <li>• Могут дифференцироваться в гепатоциты значительно лучше, чем ЖТ-МСК</li> <li>• Большая иммуномодулирующая активность по</li> </ul>                                               | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Доступность источника и легкость забора</li> <li>• Большое количество клеток</li> <li>• Большая скорость пролиферации, чем у КМ-МСК</li> <li>• Признаки клеточного старения проявляются на более поздних</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Доступность источника и легкость забора</li> <li>• Нет этических ограничений</li> <li>• Лучше пролиферативный потенциал, до клеточного старения больше PDT, чем у КМ-МСК и ЖТ-МСК</li> </ul> |

|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|            | сравнению с ЖТ-МСК и П-МСК                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | <p>пассажах, чем у КМ-МСК</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Более выраженные иммуносупрессивные свойства, чем у КМ-МСК</li> </ul>                                              | <ul style="list-style-type: none"> <li>Сохраняют стволовость в течение многих пассажей</li> <li>Практически не отторгаются при трансплантации</li> </ul>                                                                                                                                                                |
| Недостатки | <ul style="list-style-type: none"> <li>Инвазивность и болезненность забора, риск инфицирования донора</li> <li>Вариабельность количества получаемых клеток и дифференцировочного потенциала</li> <li>Низкая скорость пролиферации, PDT больше, чем у ЖТ-МСК, П-МСК</li> <li>Клеточное старение уже на 6-7 пассаже</li> <li>Наиболее чувствительны к стрессовым факторам</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Ухудшенная остеогенная и хондрогенная дифференцировка по сравнению с КМ-МСК</li> <li>Геномная нестабильность наблюдается к 10 пассажу</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Вероятность смещения клеток матери и плода при заборе материала донора =&gt; возможное увеличение гетерогенности свойств клеток и секретома</li> <li>Может быть нарушена адипогенная дифференцировка</li> <li>Транскриптом сильно изменяется после четвертого пассажа</li> </ul> |

Суммируя вышесказанное, отметим, что все исследуемые МСК, выделяемые из разных источников, обладают рядом преимуществ и имеют терапевтический потенциал для лечения различных заболеваний. Тем не менее, КМ-МСК хоть и являются «золотым стандартом», обладают рядом существенных недостатков, которые значительно затрудняют создание на их основе реальных клеточных и бесклеточных продуктов. П-МСК обладают целым рядом преимуществ, из-за чего набирают популярность и активно исследуются; тем не менее к настоящему времени они изучены в меньшей степени, чем КМ-МСК и ЖТ-МСК, и значительно отличаются от них по своим свойствам, что, можно ожидать, отсрочит их широкое внедрение в реальную медицинскую практику. ЖТ-МСК считаются одними из наиболее привлекательных объектов для регенеративной биомедицины, т.к. «процедура забора донорского материала позволяет получить большие его объемы, является наименее инвазивной, сопряжена с наименьшим риском тяжелых

осложнений и отсутствием этических ограничений, также жировая ткань содержит большую концентрацию МСК (по сравнению с костной тканью, пульпой, дермой, плацентой и пуповиной)», ЖТ-МСК обладают высокой мультипотентностью и паракринной активностью [31]. Также они широко изучены, их терапевтический потенциал доказан в множестве клинических испытаний. Поэтому мы выбрали ЖТ-МСК в качестве объекта исследования.

### **1.2.5. Проблемы и ограничения, с которыми сталкиваются при применении МСК, и возможные пути решения**

#### *Проблемы и ограничения*

На всех этапах использования МСК как в фундаментальных, так и в прикладных целях, могут возникать трудности, приводящие к сложности получения БМКП и бесклеточных продуктов, подходящих для реальной медицинской практики [8,9]:

- I. При получении донорского материала:
  1. Гетерогенность: свойства самих МСК и их секретома могут сильно отличаться как между донорами (в зависимости от их возраста, состояния здоровья), так и между тканями или даже в пределах одной ткани одного донора,
  2. Дефицит донорского материала: ограниченность объемов образцов тканей, относительно низкое содержание МСК в образцах ткани,
  3. Чистота получаемого образца: возможное наличие примесей других клеток в полученном образце, возможность наличия в образце вирусной/бактериальной/иной инфекции, что обуславливает необходимость тестирования биобезопасности каждого получаемого образца;
- II. Во время работы с МСК в условиях *in vitro*:
  1. Изменение свойств МСК и состава их секретома при культивировании МСК,
  2. Ограниченная способность к пролиферации: быстрое увеличение времени удвоения клеточной популяции, остановка пролиферации после нескольких (часто до 10) пассажей по достижении лимита Хейфлика,
  3. Быстрое клеточное старение: проявление признаков, ассоциированных со старением (SASP), остановка пролиферации;
- III. После введения МСК или секретома пациенту:
  1. Иммуносовместимость: исходная и изменение иммуносовместимости после введения пациенту,

2. Стабильность свойств,
  3. Сохранение миграционной способности МСК,
  4. Выживаемость МСК,
  5. Безопасность (способность вызывать образование тератом);
- IV. При создании лекарственных препаратов на основе МСК и секретома:
1. Отличия результатов, полученных разными группами, вследствие:
    - 1) Гетерогенности свойств МСК,
    - 2) Разных протоколов выделения, культивирования и масштабирования клеточных культур МСК,
    - 3) Разных протоколов криоконсервирования,
  2. Проблема выбора средства доставки (материала-носителя) для клеточной культуры,
  3. Проблема наличия и выбора адекватных методов исследования биологической активности,
  4. Проблема корректного определения терапевтической дозы, способа введения лекарственного препарата, терапевтического окна.
  5. Масштабируемость
  6. Стандартизация

Некоторые из приведенных пунктов мы рассмотрим подробнее.

#### *Стабильность свойств МСК [8]*

При культивировании МСК снижается экспрессия генов «стволовости». Продукты экспрессии этих генов участвуют в таких процессах как пролиферация, дифференцировка, миграция клеток. Поэтому при использовании МСК как в фундаментальных целях, так и при получении БМКП из-за необходимости их длительного культивирования возникает проблема изменения уровня экспрессии генов и сохранения «стволового» фенотипа МСК (сохранного высокого уровня пролиферации, мультипотентности, способности к миграции).

#### *Гетерогенность МСК [8]*

МСК обладают высокой степенью гетерогенности свойств (включая пролиферативную активность, уровень экспрессии поверхностных маркеров, экспрессия генов, способность к дифференцировке в том или ином направлении и др.). Их свойства отличаются в зависимости от индивидуальных особенностей донора (возраст, состояние здоровья, др.), типа ткани, из которой они были получены, также отличаются и свойства

МСК одной ткани, и даже одного клона. Так, например, даже если клеточная популяция получена от одного клона, клетки, растущие по периферии 2D культуры будут отличаться от клеток, растущих в центре (будет повышена экспрессия генов, ассоциированных с пролиферацией (MKI67 и PODXL), либо генов, кодирующих белки внеклеточного матрикса (VCAM1) соответственно). Увеличивают гетерогенность и различия методик выделения клеток из образцов ткани, условий культивирования, методик криоконсервирования и разморозки.

#### *Ограниченное размножение МСК [8,89,90]*

Для МСК характерен ограниченный пролиферативный потенциал, что выражается в репликативном старении - остановке клеточных делений по достижении лимита Хейфлика, который достигается часто после 4-10 пассажей. Также к снижению скорости пролиферации приводит высокая плотность клеточной культуры вследствие наличия контактного торможения.

#### *Иммуносовместимость МСК [8,91]*

Для МСК характерна низкая экспрессия HLA-I и отсутствие экспрессии HLA-II или костимулирующих молекул (CD40, CD80, CD86). Поэтому даже среди уже одобренных БМКП есть препараты на основе как аутологических, так и аллогенных МСК.

Однако иммуногенность МСК может повышаться под действием разных факторов – во время масштабирования при культивировании исходной клеточной популяции (например, культивирование при высокой плотности клеточной популяции или в условиях нехватки сыворотки), после введения МСК пациенту под действием провоспалительных сигналов организма пациента. Возникающая вторичная иммуногенность после введения МСК пациенту сопровождается и снижением жизнеспособности и потентности МСК в провоспалительных условиях, что суммарно может значительно уменьшать эффективность терапии. Также в случае необходимости создания БМКП с курсом многократного введения может возникнуть сложность при использовании аллогенных клеток, т.к. при повторных инъекциях они могут вызвать иммунный ответ реципиента.

#### *Направленная миграционная способность МСК [8]*

При использовании МСК в качестве БМКП возникает проблема обеспечения достаточной способности МСК мигрировать к месту очага повреждения *in vivo*. Она неизбежно возникает, во-первых, если на поверхности МСК мало экспрессированных хемокиновых рецепторов. В этом случае способность МСК узнать даже сильный

хемокиновый сигнал от очага повреждения будет недостаточной для обеспечения миграции. Во-вторых, показано, что при культивировании МСК снижается количество хемокиновых рецепторов, и только первичные МСК ранних пассажей обладают хорошей миграционной способностью.

#### *Решения существующих ограничений примерения МСК*

Многие из проблем групп I и II, а также проблемы масштабируемости и стандартизации (из группы IV) во многом обусловлены старением МСК при культивировании, которое одновременно сопровождается усугублением проблемы гетерогенности вследствие изменения множества свойств как самих МСК, так и их секретома. Поэтому многие из этих проблем могут быть решены с помощью подходящего метода, позволяющего предотвратить быстрое старение МСК и получить большое количество клеток с сохранными свойствами [8,92].

III группа проблем может быть решена использованием аутологичных клеток, либо в случае применения аллогенных клеток – использованием методов, направленных на снижение иммуногенности: прекондиционирование в провоспалительных условиях (с IFN- $\gamma$  или IL-1 $\beta$ ), культивирование с антиоксидантами (аскорбиновая кислота, глутатион, мелатонин, N-ацетилцистеин; куркумин, ресвератрол), 3D-культивирование, генетическая модификация МСК (нокаут генов, кодирующих HLA-II или СРТА) [93]; созданием генетически модифицированных МСК с увеличенной экспрессией генов хемокиновых рецепторов для улучшения миграционной способности вводимых *in vivo* МСК, подбором метода введения МСК в организм человека. В случае использования аутологичных клеток вторично возникает проблема получения большого количества клеток в условиях забора небольшого количества донорского материала.

IV группа проблем может быть решена выработкой унифицированного подхода к выбору доноров МСК, соблюдением рекомендаций органов-регуляторов и ISCT, оптимизацией и разработкой стандартных протоколов выделения, культивирования, масштабирования, криоконсервирования клеточных культур, контролем производственных процессов получения лекарственных препаратов на основе МСК.

Поскольку многие проблемы могут быть решены с помощью подходящего метода, позволяющего отсрочить или предотвратить клеточное старение МСК и, как следствие, 1) продлить период, во время которого клетки имеют сохранные свойства, 2) получить большее их количество, мы далее опишем процессы, которые происходят при



культивировании *in vitro* и обуславливают постепенное развитие клеточного старения, и способы воздействия на них.

### **1.3. Поведение МСК при культивировании и старение МСК: основные механизмы и способы воздействия на них**

#### **1.3.1. Поведение МСК при культивировании**

Клеточные работы проводятся в условиях *in vitro*. При этом клетка оказывается выведенной из условий нативной ниши и ей приходится адаптироваться к новым условиям, что сопровождается множеством изменений [94]. Для МСК эти изменения заключаются в следующем:

- 1) на уровне ДНК: изменяется паттерн экспрессии генов, происходят множественные эпигенетические изменения, в т.ч. метилирование ДНК [95], после длительного пассирования происходят хромосомные перестройки, меняется морфология хромосом [96], возникает анеуплоидия [97], увеличивается геномная нестабильность [98];
- 2) на уровне РНК: значительно изменяется профиль экспрессируемых РНК (мРНК, miRNA, lncRNAs, circRNAs) – часто уже после 4-5 пассажа [89,99, 100];
- 3) на уровне белка: изменяется состав и уровень экспрессии поверхностных клеточных маркеров [99], в т.ч. CD105 – основного маркера «стволовости» МСК [100];
- 4) всё это выражается в изменениях на уровне клеточного фенотипа: ухудшается дифференцировочный потенциал, и МСК теряют свойство мультипотентности [99-101], уже к 8-10 пассажу могут ухудшиться иммуносупрессивные свойства [100,102], и, как следствие, значительно снижается их регенеративный потенциал [96].

Эти изменения, во-первых, приводят к увеличению молекулярной и фенотипической гетерогенности между клетками одной культуры [103], что является препятствием для решения некоторых задач регенеративной медицины, в т.ч. создания устойчивых клеточных линий с заданными свойствами. Во-вторых, согласно современным представлениям, эти постепенно приобретаемые изменения считаются неотъемлемой частью длительного процесса старения клеток, который запускается сразу после перевода клеток из организма в *in vitro* условия [99]. Результатом процесса старения клеток является достижение лимита Хейфлика [104] и необратимая остановка клеточного цикла в стадии G1 или G2 (репликативное клеточное старение) [105]. Такие стареющие (сенесцентные) клетки характеризуются следующими признаками: остановка

пролиферации, клетки метаболически активны, многие морфологические и физиологические свойства клеток изменены, что обусловлено изменением профиля экспрессии генов [89], метилирования ДНК и хромосомными aberrациями [106]. Также для сенесцентных МСК человека показано [107] изменение профиля экспрессии поверхностных клеточных маркеров (снижение экспрессии CD90, CD105 и др. [107]), изменение дифференцировочного потенциала (данные о ухудшении/усилении отличаются) [106], ухудшение чувствительности к гормонам [108], иммуносупрессивных и прорегенеративных свойств [100], снижение эффективности аутофагии [106], появление SASP (секреторного фенотипа, ассоциированного со старением – 1) растворимых сигнальных факторов (провоспалительных цитокинов (IL-6 и др.), хемокинов (IL-8, MCP1 и др.), факторов роста), 2) протеаз (в т.ч. матриксных металлопротеиназ MMP-1, -3, -10, -12, -13, -14 и др.), 3) нерастворимых факторов (белки внеклеточного матрикса - коллаген, ламинин, фибронектин и др.) [109]). Секреция компонентов SASP посредством паракринного действия приводит к локальному, но устойчивому хроническому воспалению невысокой интенсивности и запускает процессы клеточного старения в близлежащих клетках [110].

Часть клеток может спонтанно или благодаря внешнему воздействию преодолеть состояние репликативного старения (фаза M1) и продолжить клеточные деления. Однако при этом теломеры продолжают укорачиваться, в результате чего через некоторое количество клеточных удвоений клетки достигают следующего пролиферативного барьера – кризиса (фаза M2) [111]. Он отличается от первого пролиферативного барьера – репликативного старения – сохранением клеточных делений при одновременной масштабной гибели клеток путем апоптоза. Те клетки, которые вошли в состояние кризиса и остаются живы, сталкиваются с проблемой настолько сильного укорочения теломер, что оно приводит к циклам «разрыв–слияние–мост» между концами хромосом, в результате чего увеличивается геномная нестабильность и может активироваться теломераза. Клетки, которые приобрели способность поддерживать длину теломер, преодолевают кризис (M2) и становятся immortalized [112].

### **1.3.2. Старение МСК: основные механизмы**

Подчеркнем, что в отличие от классического понимания старения как «конечного» состояния клетки, характеризующегося вышеперечисленной совокупностью признаков, включая стабильную остановку клеточного цикла, более корректным видится понимание

старения как континуального процесса, который для клеток, выведенных из нативной ниши, начинается сразу после перевода в *in vitro* условия [99]. Таким образом, сам перевод МСК в условия культивирования *in vitro* как неотъемлемый этап работы с клеточными культурами приводит к значительным проблемам поддержания стабильности состава и качества получаемой клеточной культуры и продуктов на ее основе, проблеме стандартизации и масштабирования. Поэтому при использовании клеток для задач медицины возникают дополнительные сложности: необходимо регулярно повторять исследования качества получаемых клеточных культур [113], в т.ч. числе на разных пассажах, и для каждой получаемой культуры подбирать возможное число пассирований, при которых клетки меняют свой фенотип незначительно [98] и др. Преодолеть эти трудности помогает воздействие на причины клеточного старения.

Старение МСК, как и других соматических клеток человека, может быть вызвано разными причинами и опосредовано несколькими механизмами. Авторы предлагают разные классификации видов старения в зависимости от вызывающей его причины, тем не менее, можно выделить следующие основные группы [106,110,114]:

1. *Репликативное*. Впервые было описано Хейфликом (и тогда названо «клеточным старением») в 1961г. [104], причину предложил А.М. Оловников в 1973г. [115]. Возникает из-за критического укорочения теломер.
2. *Стресс-индуцированное*. Может возникать в результате активации онкогенов или ингибирования генов супрессоров опухолей (иногда такое старение выделяют в отдельную группу - онкоген-индуцированное [116]), в ответ на повреждения ДНК (генотоксический стресс), изменения структуры теломер, эпигенетические изменения, дезорганизацию хроматина, в ответ на избыточные митогенные сигналы [114], облучение, воздействие химиотерапевтических агентов, активных форм кислорода (АФК) (окислительный стресс), тепловой шок [125], при дисфункции митохондрий, нарушении протеостаза, значительном снижении содержания питательных веществ.
3. *Физиологическое*. Наблюдается в живом организме в ходе эмбрионального развития, заживления ран, при воспалении и/или сигналах повреждения тканей, ремоделировании тканей и поддержании гомеостаза мозга.

Понимание молекулярных механизмов, опосредующих процессы старения, позволяет воздействовать на них с целью отсрочить наступление старения клеточной культуры.

Далее опишем основные молекулярные механизмы, опосредующие клеточное старение (рис. 4). Культивируемые *in vitro* клетки в основном подвергаются некоторым видам стресс-индуцированного старения и при длительном пассировании – репликативному старению. Физиологическое старение выходит за рамки проблематики этой работы, поэтому подробнее его рассматривать не будем.

Рисунок 4. Основные причины репликативного и стресс-индуцированного клеточного старения и опосредующие их молекулярные пути.

[120], в результате чего может нарушиться конформация Т-петли и 3' конец высвободится. Клеточные механизмы распознают такое событие как двунитевой разрыв ДНК, поэтому активируется ответ на повреждение ДНК (DDR – DNA damage response), что в результате приводит к репликативному клеточному старению (репликативное, т.к. его причиной является репликация ДНК).

Сигнальным путём, активирующимся в ответ на укорочение теломер, а также генотоксический (повреждение ДНК), окислительный и онкоген-индуцированный стрессы, является путь p53/p21<sup>4</sup> [114]. p53 является транскрипционным фактором. В норме его концентрация в клетке очень мала из-за MDM2 зависимой деградации в протеасомах, но при возникновении стресса p53 перестает убиквитинироваться, его концентрация быстро возрастает, и он стабилизируется посттрансляционными модификациями (фосфорилирование, метилирование, ацетилирование) [121]. В зависимости от длительности воздействия стрессового фактора активный p53 приводит либо к репарации ДНК и покою клетки (при кратковременном стрессе), либо к длительной остановке клеточного цикла (при длительном стрессе). Она начинается с активации АТМ киназы, которая фосфорилирует p53 либо напрямую [114], либо через промежуточного участника - Chk2 (Checkpoint kinase 2) (в фосфорилированном состоянии она может транслоцироваться в ядро). Фосфорилированный p53 напрямую связывается с промотором и индуцирует транскрипцию p21 (кодируется геном *CDKN1A*) - ингибитора циклин-зависимой киназы 1А – что является ключевым событием для инициирования остановки клеточного роста при старении [122]. p21 наряду с p27<sup>Kip1</sup> и p57<sup>Kip2</sup> образуют семейство белков CDKI - Cip/Kip, связывающих и инактивирующих комплексы циклин-циклин-зависимая киназа. При высокой концентрации p21 может инактивировать все CDK, в результате чего происходит ингибирование фосфорилирования семейства «карманных» белков ретинобластомы RB (p107 (ген *RBL1*), p130 (ген *RBL2*), pRb (ген *RBI*)). В нефосфорилированном состоянии p107 и p130 связываются с комплексом белков MuvB, в результате чего образуется репрессивный мультисубъединичный комплекс DREAM. DREAM комплекс, в свою очередь, связывается с CHR (cell cycle genes homology region) элементами промоторной области генов и сайтами связывания E2F, в результате чего подавляет экспрессию более чем 250 генов, важных для прохождения стадий G1-М клеточного цикла. p21 опосредованное

---

<sup>4</sup> p21 также известен как WAF1/CIP1/CDKN1A [122]. В тексте диссертации принято сокращенное обозначение – p21.

ингибирование фосфорилирования белка pRb приводит к образованию нефосфорилированным белком pRb репрессивного комплекса с E2F (RB/E2F) и предотвращает переход в S фазу клеточного цикла. Таким образом, увеличение концентрации p21 приводит к параллельному образованию двух репрессивных комплексов - DREAM и RB/E2F, которые действуют однонаправленно – вызывают остановку клеточного цикла [122], причем на любой его стадии.

После же индукции старения экспрессия p21 не сохраняется [114], но активируется другой механизм с участием вышеупомянутого белка pRb – сигнальный путь p16<sup>INK4A</sup>/pRb. Этот путь в основном активируется в ответ на эпигенетические изменения и стрессы, отличные от генотоксического и окислительного, но считается, что косвенно он также активируется и при укорочении теломер (репликативном старении) [114]. В ответ на эти стрессы активируется экспрессия локуса INK4/ARF. Этот локус содержит два гена, кодирующих три опухолевых супрессора – ген *CDKN2A* кодирует белки p16<sup>INK4A</sup> и p14<sup>ARF</sup> (также называется ARF), ген *CDKN2B* – белок p15<sup>INK4B</sup>. p16<sup>INK4A</sup> и p15<sup>INK4B</sup>, как и p21, являются ингибиторами циклин-зависимых киназ, но, в отличие от него, ингибируют только CDK4/6. Прямое связывание p16<sup>INK4A</sup> с CDK4/6 предотвращает образование комплекса с циклином D, в результате чего белок pRb остается нефосфорилированным и связывается в репрессивный комплекс с E2F. p14<sup>ARF</sup> транскрипционно активируется в ответ на активацию онкогенов [123]. Он играет отличную от p16<sup>INK4A</sup> и p15<sup>INK4B</sup> роль – связывается с белком MDM2 (Mouse double minute 2, для человека известен также как HDM2), предотвращая стимулируемую им деградацию p53 в протеасомах [124]. Таким образом, p14<sup>ARF</sup> обеспечивает взаимосвязь сигнальных путей p53/p21 и p16<sup>INK4A</sup>/Rb.

Таким образом, молекулярные механизмы клеточного старения крайне сложны, но в основном реализуются посредством двух сигнальных путей - p53/p21 и p16<sup>INK4A</sup>/pRb [125]. p16, и p21 ингибируют циклин-зависимые киназы, что приводит к образованию двух репрессивных комплексов: 1) белок pRb остается в гипофосфорилированном состоянии и связывается в репрессивный комплекс RB/E2F с транскрипционными факторами семейства E2F и 2) образуется комплекс DREAM. Белок p53 считается «центральной узлом», связывающим разные сигнальные пути и определяющим дальнейшую судьбу клетки – либо временную остановку клеточных делений, сопровождающуюся активацией механизмов репарации, и дальнейшую гибель в случае невозможности исправления накопившихся ошибок, либо клеточное старение

(постоянную остановку пролиферации) [126]. Представленное описание механизмов клеточного старения не является исчерпывающим, но представляет основные молекулярные факторы, которые наиболее часто подвергаются экспериментальному воздействию с целью замедления клеточного старения.

### 1.3.3. Способы воздействия на основные механизмы старения МСК

Отложить (стресс-индуцированное) старение клеток в культуре возможно [127]. Для этого можно применять методы, которые условно можно разделить на две группы - методы генной инженерии и остальные. К остальным относятся:

- аккуратный подбор и дальнейший контроль условий культивирования с минимизацией стрессовых воздействий (температурных колебаний, влажности, изменения состава питательных сред);
- использование питательных сред с низкой калорийностью (низким содержанием глюкозы) (улучшает пролиферацию, жизнеспособность, дифференцировочный потенциал, замедляет процессы клеточного старения и апоптоза) [128];
- культивирование при повышенном содержании  $H_2$  [129];
- прекондиционирование в гипоксических условиях для снижения окислительного стресса (для МСК из большинства источников – при концентрации  $O_2$  до 10%; улучшает регенеративный потенциал МСК – стволовость, способность к самообновлению, пролиферацию, дифференцировочный потенциал, секрецию факторов роста, проангиогенные свойства) [128];
- умеренный кратковременный тепловой шок (концепция гормезиса; улучшает пролиферацию, выживаемость клеток *in vitro*, выживаемость трансплантированных клеток, уменьшает процессы клеточного старения и апоптоза);
- добавление в культуральную среду различных веществ:
  - факторов роста и цитокинов для улучшения способности к самообновлению, выживаемости, паракринной активности, дифференцировочного потенциала, замедления процессов клеточного старения и апоптоза. Например,  $IL-1\beta$  стимулирует выживаемость, миграцию, адгезивность клеток, продукцию хемокинов, проангиогенные и иммуномодулирующие свойства [128]. Однако есть данные о ухудшении дифференцировочного потенциала при длительном культивировании в среде с добавлением ростовых факторов [125],

- антиоксидантов (N-ацетилцистеин (NAC), L-аскорбиновая кислота, L-аскорбиновой кислоты 2-фосфат, витамин Е, восстановленный глутатион, метформин, фуллерол, фукоидан, карведилол, никорандил, 5-азацитидин, мелатонин [106], [130]) для снижения окислительного стресса,
- рапамицина (усиливает аутофагию, уменьшает SASP),
- антагонистов лизофосфатидной кислоты [107],
- ингибиторов ДНК-метилтрансфераз (RG108) [130], ингибиторов гистоновых метилтрансфераз и ацетилтрансфераз для снижения клеточного старения, вызванного эпигенетическими перестройками [131],
- веществ растительного происхождения: полифенолов (ресвератрол и др.), транс-коричный альдегид, водно-спиртовой экстракт гуараны (*P. sirana*), др. в т.ч. для снижения окислительного стресса [127,130];
- сенолитиков для элиминации стареющих клеток запуском апоптоза [130];
- сеноморфиков для подавления образования компонентов SASP [130].

Среди методов генной инженерии, исследованных на человеческих МСК, в литературе описаны следующие [107]:

- сверхэкспрессия *SIRT3* (позволила снизить количество АФК),
- сверхэкспрессия *MIR10A* (miR-10a ингибирует опосредованную транскрипционным фактором KLF4 активацию проапоптотического BAX и способствует поддержанию концентрации антиапоптотического белка BCL-2, улучшая выживаемость МСК в условиях стресса (например, гипоксии); также miR-10a усиливает фосфорилирование Akt, способствуя выживанию клеток и ангиогенезу при ишемических состояниях) [132],
- сверхэкспрессия *LCN2* (позволила снизить клеточное старение, вызванное H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>),
- сверхэкспрессия *FGF21* (привела к снижению слияния митохондрий и увеличению деления митохондрий, что в результате снижает количество образуемых АФК [133])
- сверхэкспрессия *MIF* (стимулировала аутофагию МСК).

Однако все эти подходы позволяют лишь минимизировать стресс-индуцированное старение и тем самым на какое-то время отсрочить проявление признаков клеточного старения. После же прохождения всеми нормальными человеческими клетками характерного для них числа делений клетки подвергаются репликативному старению из-за достижения лимита Хейфлика. Для преодоления этого вида старения необходимо



воздействовать на основную причину его развития - укорочение теломер. В этом случае можно получить immortalized клетки. Далее мы рассмотрим immortalization как понятие, спонтанную и индуцированную immortalization, а также сопряженные с ними риски.

#### **1.4. Immortalization: понятия «immortalization» и «transformation», способы immortalization, преимущества и недостатки, безопасность и сопряженные риски**

##### **1.4.1. Immortalization: понятия «immortalization» и «transformation»**

При описании методов immortalization мы будем обращаться к вопросу безопасности получаемых клеточных линий, а именно их опухолевой transformation. Отметим, что в научной литературе существует проблема использования термина «transformation». Так, в нескольких статьях [134-136] термин «трансформированные клетки» применяли для обозначения изменений клеток при культивировании *in vitro*, но при этом клетки не вызывали образование опухолей при инъекции иммунодефицитным мышам. В статье [137] авторы сообщают о том, что МСК крысы часто спонтанно трансформируются *in vitro*, а человеческие нет, и доказывают это исключительно преодолением репликативного старения, не проверяя на наличие полноценного трансформированного фенотипа.

Поэтому мы видим необходимым ввести определения терминов «immortalized клетки» и «трансформированные клетки», которых мы будем придерживаться в данной работе.

«Immortalization – процесс спонтанного или индуцированного приобретения клеткой свойства immortalization. Immortalized клетки – это клетки, преодолевшие лимит Хейфлика (и стадию кризиса) и способные пролиферировать практически бесконечное число раз. Эта способность приобретается благодаря активации механизма поддержания теломер (часто это экспрессия белковой субъединицы TERT и, как следствие, активация теломеразы) [138]. У immortalized клеток сохранно контактное торможение, их рост зависит от прикрепленности к субстрату и наличия факторов роста [13], они чувствительны к ингибиторам роста и не способны вызывать развитие «злокачественных новообразований при трансплантации их восприимчивым животным» [139]. Такие клетки могут, хотя и не всегда, сохранять свой кариотип и отвечать на экзогенные стимулы сходным с не immortalized предшественниками образом.

*Трансформированные клетки* – клетки, подвергнувшиеся опухолевой трансформации - сложному многостадийному процессу постепенного увеличения доли транскриптов, ассоциированных с раком и приобретения клеточной культурой всё более агрессивного фенотипа [140], свойственного опухолевой клетке, а именно: 1) конститутивной экспрессии теломеразы, поддержания длины теломер [105] и иммортализации, 2) генетической нестабильности, 3) эпигенетических изменений, 4) независимости от внешних и внутренних регуляторных факторов ( 4.1) увеличенной пролиферативной активности и ее независимости от высокого содержания ростовых факторов в питательной среде и прикрепленности к субстрату, 4.2) снижения чувствительности к рост-ингибирующим факторам и, как следствие, отсутствие контактного торможения), 5) способности к уклонению от апоптоза, 6) часто - локомоторного фенотипа (снижения адгезивности и увеличения подвижности и, как следствие, инвазивности и способность к метастазированию), 7) способности стимулировать ангиогенез [13,141,142], 8) «способности индуцировать образование злокачественных новообразований при трансплантации восприимчивым животным» [139].

В контексте вопросов безопасности применения иммортализованных клеточных культур в регенеративной биомедицине важен вопрос о связи этого процесса с трансформацией - всегда ли они неразрывно связаны, или иммортализация может не сопровождаться приобретением трансформированного фенотипа. С учетом того, что часто ключевым событием иммортализации является приобретение клеткой активной формы теломеразы, а реактивация теломеразы, в свою очередь, наблюдается практически во всех типах опухолей [143], закономерным может показаться вывод о том, что иммортализация всегда неразрывно связана с трансформацией – либо происходит одновременно с приобретением трансформированного фенотипа, либо обязательно ведет к ней. » [144].

Первой концепции («иммортализация происходит одновременно с приобретением трансформированного фенотипа») придерживаются лишь некоторые исследователи, и она скорее является спекулятивной. Так, Duesberg and McCormack [145] экспериментально показали на нескольких клеточных линиях, что и иммортализованные, и трансформированные клетки имеют нестабильный кариотип, из чего они заключили, что, во-первых, иммортализация и трансформация являются одновременными процессами,

во-вторых, происходят именно из-за хромосомных перестроек, и ни эктопическая экспрессия теломеразы, ни комбинация ее экспрессии с онкогенами не являются определяющими процессами. Однако такая точка зрения не находит достаточного обоснования при проведении дополнительных исследований [140].

Вторая концепция («иммортиализация обязательно ведет к приобретению трансформированного фенотипа») подкреплена рядом экспериментальных данных. Так, некоторые исследователи наблюдали неопластическую трансформацию иммортиализованных теломеразой клеток [146]. В таких исследованиях авторы по-разному видят место иммортиализации в процессе приобретения трансформированного фенотипа – одни считают ее последним этапом, другие – первым. На наш взгляд, эти две позиции верны, но в некоторых и отличающихся случаях, приведенных ниже.

Если клетки культивируются *in vitro* и в норме не имеют активную теломеразу, то правильным видится мнение авторов [140]: в течении жизни клетка может приобретать мутации, через какое-то время такие клетки также достигнут лимита Хейфлика и войдут в состояние кризиса, при котором значительно увеличивается геномная нестабильность, что приводит к высокой вероятности мутаций. С учетом того, что протоонкогенов много, видится более вероятным первоначальное приобретение именно мутаций, активирующих протоонкогены, и только в случае, если какая-либо из мутаций (либо амплификация гена [147]) дополнительно привела к реактивации теломеразы (этот процесс видится менее вероятным), такие клоны станут также иммортиализованными (в этом случае – это последний этап трансформации), получают преимущество и продолжают делиться, в результате чего станут в полной мере трансформированными. Примером является работа [148]: авторы показали, что при длительном культивировании в МСК человека сначала произошла активация c-MYC и подавление p16, после чего активировалась теломераза и произошла делеция в локусе INK4A/ARF, в результате чего клетки спонтанно трансформировались

В случае если иммортиализация считается первым этапом трансформации, эта первая стадия называется стадией инициации [149]. На наш взгляд, это будет верно для клеток с реактивированной теломеразой, находящихся в организме *in vivo*, т.к. с учетом продолжительной жизни взрослого организма таким клоном, получившим возможность делиться бесконечно, может хватить времени для наступления вероятностного процесса приобретения мутаций, активирующих протоонкогены. Спонтанную трансформацию,

следующую за иммортализацией, по этой же причине с некоторой вероятностью можно ожидать и при крайне длительном культивировании *in vitro* человеческих клеток, в норме имеющих активную теломеразу (например, гемопоэтических клеток человека, некоторых клонов клеток кератиноцитов кожи [150,151]). Это, можно ожидать, будет верно и в случае *in vitro* индуцированной до достижения кризиса иммортализации с помощью TERT, но, подчеркнем, только в случае крайне длительного культивирования. В целом же, в случае активной теломеразы длина теломер будет поддерживаться на достаточном для предотвращения глобальных хромосомных перестроек и поддержания геномной стабильности уровне, и вероятность активирующих протоонкогенных мутаций будет значительно снижена. В таком случае иммортализация длительное время не будет сопровождаться трансформацией.

Это не противоречит общепринятой концепции о том, что «иммортализация является необходимым, но не достаточным процессом для трансформации клетки» [140,144,152]. Эта концепция подтверждается, если одновременно принять во внимание результаты следующих нескольких групп экспериментов: 1) в которых сверхэкспрессирующие теломеразу клетки лишь преодолевали ограничение в количестве клеточных делений (становились иммортализованными), но не приобретали способности образовывать опухоли при прививании животным, 2) в которых введение комбинации протоонкогенов (например, *MYC* и *RAS*, или *E1A* и *RAS*) без запуска иммортализации вызывало лишь изменение морфологии клеток, но не трансформацию, 3) по запуску апоптоза раковых клеток человека путем ингибирования теломеразы [152].

Таким образом, важно, что иммортализованные клетки отличаются от трансформированных, и иммортализация сама по себе хоть и необходима для канцерогенеза, но не является тождественным процессом и может быть достигнута без приобретения трансформированного фенотипа. Ярким примером трансформированного фенотипа без наличия активной теломеразы и механизма удлинения теломер является линия фибробластов крайней плоти, трансдуцированная генами *E1A*, *H-RAS<sup>V12</sup>*, *MDM2*, показавшая положительный результат на онкогенность как *in vitro* (soft agar colony assay), так и *in vivo* (после прививания бестимусным мышам) [13]. Также описанные соображения объясняют результаты большого количества работ, в которых было показано, что иммортализованные теломеразой клетки могут сохранять нормальный

нетрансформированный фенотип после множества делений [140] (суммированы в п. 4.2.1.).

Набор молекулярных отличий между иммортализацией и опухолевой трансформацией может быть разным для разных клеток (например, для эпителиальных клеток суммировано в обзоре [147]), для МСК человека - в обзоре [153]). Разными исследовательскими группами была проведена серия работ по выявлению факторов, достаточных для перевода нормальных эпителиальных клеток в истинно трансформированные. Несмотря на некоторые отличия в полученных данных, в качестве общего механизма приобретения трансформированного фенотипа была выделена необходимость пяти генетических изменений: активация hTERT, инактивация обоих сигнальных путей p53 и p16/CDK4/RB и обязательно два дополнительных, но менее консервативных фактора. Иммортализация же была достигнута либо эктопической экспрессией hTERT, либо Т-антигена вируса SV40. Для полной трансформации человеческих эпителиальных клеток молочных желез, эмбриональных фибробластов и меланоцитов требовалась 1) активация hTERT и инактивация пути p16/CDK4/RB (для всех трех типов клеток), 2) специфические для разных клеток изменения - инактивация p53, активация c-MYC, мутация RAS [153]. Молекулярные основы неопластической трансформации стволовых клеток человека на примере МСК были в деталях исследованы в работе [153]. Авторы показали, что МСК, иммортализованные hTERT, сохраняли нормальный фенотип вплоть до 70х пассажей, независимо от того, в каком соотношении были пассированы клетки (1:2, 1:4, 1:20). Отметим, что на этих пассажах у них отсутствовали мутации генов *BRAF*, *CDKN2A*, *KRAS*, *NRAS*. Появление же частично/полностью трансформированного фенотипа полностью коррелировало с приобретением дополнительных мутаций в перечисленных генах и происходило на значительно более поздних пассажах, причем способность вызывать образование опухоли при введении иммунодефицитным мышам появилась только у пассированных в соотношении 1:20 клеток на 256 пассаже. Даже если опухолевая трансформация наступает после воздействия одного экзогенного фактора, причина заключается в том, что этот фактор воздействует на многие молекулярные мишени, включая активацию теломеразы (например, см. [154]).

### 1.4.2. Существующие способы immortalization, преимущества и недостатки, безопасность и сопряженные риски

Решение многих задач регенеративной биомедицины требует получения immortalized клеточных культур (рассмотрено в п. 2.5.), но, как будет показано ниже, методы индуцированной immortalization могут, хотя и не всегда, приводить к опухолевой трансформации клеток. Поэтому крайне важно выбирать наиболее подходящий и безопасный метод immortalization с учетом особенностей используемых клеток. Далее мы опишем основные методы индуцированной immortalization.

Методы индуцированной immortalization основаны на воздействии на основные пути старения (упомянуты в п. 3.2 и на рис. 5). Для индуцированного преодоления клеточного старения используют методы, которые можно разделить на следующие группы:



Рисунок 5. Основные методы индуцированной immortalization (по [10-13]).

Рассмотрим подробнее каждый из этих методов на предмет механизма действия, преимуществ и недостатков (влияния на свойства получаемых клеток, безопасности), опыта применения разными группами исследователей.

#### 1.4.2.1. Иммуортализация эктопической экспрессией гена белковой субъединицы теломеразы – *hTERT*

Теломераза – мультисубъединичный фермент, удлиняющий теломеры. Состоит из каталитической белковой субъединицы (TERT, для человека также принято обозначение hTERT), выполняющей роль обратной транскриптазы, и РНК компонента (TR). TR присутствует практически во всех клетках, а TERT в норме не экспрессируется в соматических клетках человека [118]. Отсутствие активной теломеразы приводит к укорочению теломер при делении клеток, в результате чего активируются сигналы повреждения ДНК, которые посредством активации p53 приводят к остановке клеточного цикла и старению клетки [118]. Существуют разные способы увеличить активность теломеразы, например, с помощью веществ растительного происхождения [127]. Однако, самым широко распространенным методом является трансдукция геном *TERT* и последующая эктопическая экспрессия теломеразы.

Эктопической экспрессией hTERT могут быть иммуортализованы как клетки, находящиеся в пресенесцентном состоянии, так и клетки, прошедшие первый репликативный барьер, но ещё не вошедшие в фазу кризиса [14]. Этот способ был применен в 39,3% случаев иммуортализации МСК [155], а также для иммуортализации фибробластов, эндотелиальных, мезотелиальных клеток и пигментных эпителиальных клеток сетчатки человека [157] и многих других.

Влияние эктопической экспрессии теломеразы на свойства получаемых клеток и безопасности такой иммуортализации обусловлена вовлеченностью теломеразы в различные молекулярные пути (подробнее см. в [14]). Эктопическая экспрессия TERT вызывает в клетке двоякий эффект, связанный с её локализацией в разных органоидах клетки – ядре или митохондриях – и обусловленный наличием «теломерных» и «внетеломерных» функций.

Теломераза, локализованная в ядре, выполняет следующие функции:

1. С одной стороны, «теломерные»: поддерживает длину теломер, предотвращая возникновение избыточной геномной нестабильности и последующих потенциально проонкогенных мутаций.
2. С другой стороны, «внетеломерные»: может стимулировать онкотрансформацию [158]. Так, теломераза может функционировать как транскрипционный фактор: связывается с промотором VEGF и стимулирует ангиогенез, напрямую

контролирует EGFR, стимулирует сигнальный путь Wnt/ $\beta$ -катенин через образование активирующего комплекса с ремоделером хроматина SMARCA4, что приводит к прямой активации c-Myc и VEGF, связываясь с NF- $\kappa$ B вызывает изменение экспрессии зависимых генов, опосредующих онкотрансформацию, взаимодействует с TF и ZEB1, стимулируя проонкогенный эффект сигнального пути TGF- $\beta$ . c-Myc, в свою очередь, связывается с промотором гена *TERT* и стимулирует его экспрессию, что приводит к появлению функционально активной теломеразы [118].

Теломераза, локализованная в митохондриях, поддерживает их функции, защищая от окислительного стресса митохондриальную ДНК [158]:

1. Непосредственно экранируя ее,
2. Усиливая экспрессию супероксиддисмутазы и белков ЭТЦ.

РНК-мотив теломеразы имеет менее изученные функции, но есть данные о том, что транскрипт с его альтернативной рамки считывания является белком, защищающим клетки от апоптоза даже в отсутствие активной белковой субъединицы TERT [158]. Более подробно суммировано в [118,159].

Анализ исследований, в которых для иммортализации разных человеческих клеток был применен такой подход, показал, что клетки, иммортализованные TERT, часто сохраняют нормальный кариотип (например, [160,161]). Также их свойства сходны со свойствами исходной клеточной культуры [157,162-165]. Особенно важно, что большинство полученных путем эктопической экспрессии TERT иммортализованных клеточных линий не приобретали трансформированный фенотип [164,166-176]. Нам удалось найти только две работы [153,177], в которых авторы показали возможность случайной трансформации иммортализованных эктопической экспрессией hTERT клеток – МСК и фибробластов соответственно. Стоит отметить, что в обоих случаях она произошла при длительном культивировании - на 256 пассаже МСК и после 153 удвоений фибробластов, и была напрямую связана с появлением дополнительных генетических и эпигенетических изменений. В случае МСК трансформации предшествовала делеция INK4/ARF локуса (в результате был ингибирован и сигнальный путь p53, хотя в самом гене p53 мутаций не наблюдалось) и гиперметилирование DBCCR1 (как следствие прекращение его экспрессии). В случае фибробластов – снижение экспрессии INK4/ARF локуса (что коррелировало с приобретением независимости роста от прикрепленности к



субстрату и устойчивости к старению, вызванному Ras) и последующими мутациями p53 и сверхэкспрессией c-MYC. Причём на наш взгляд немаловажно, что первичные фибробласты были получены от пожилого донора в возрасте 102 лет, поэтому можно ожидать, что они исходно были более склонны к трансформации.

#### **1.4.2.2. Иммуортализация с помощью вирусных онкогенов**

Некоторые типы клеток не могут быть иммуортализованы стимуляцией экспрессии только TERT [170]. Это было показано для клеток молочной железы человека, кератиноцитов, эпителиальных клеток дыхательных путей. Некоторым авторам не удалось иммуортализовать таким способом и ЖТ-МСК [178]. В таком случае для преодоления репликативного старения необходимы дополнительные манипуляции, направленные на ингибирование основных сигнальных путей, запускающих старение – путей p53 и pRB.

Таким подходом является использование комбинаций вирусных онкогенных белков:

1. большого Т-антигена и малого t-антигена обезьяньего полиомавируса - SV40,
2. Е6 и Е7 вируса папилломы человека (ВПЧ),
3. белков Е1А и Е1В аденовирусов.

Каждый из перечисленных вирусов кодирует набор необходимых для репликации вируса онкогенов. Один из продуктов этих онкогенов (большой Т-антиген обезьяньего полиомавируса SV40, белок Е7 ВПЧ, белок Е1А аденовируса) связывается с белком pRb, что сохраняет факторы транскрипции E2F в активном состоянии; они, в свою очередь, стимулируют репликацию ДНК. Другой белок в данной комбинации нацелен на инактивацию белка p53 (Т-антиген, Е1В, Е6) [179], который может направить клетку в апоптоз, что помешает размножению вируса. Таким образом, общим механизмом действия всех этих вирусных онкогенных белков является связывание с белками контрольных точек клеточного цикла - p53 и pRB, что приводит к их инактивации путем убиквитин-зависимой деградации в протеасомах (например, показано для Е6 [180]). Инактивация pRB и p53 приводит к неостанавливающимся клеточным делениям, в результате которых клетки неизбежно входят в описанное выше состояние кризиса. Прохождение этого кризиса возможно только при активации механизмов удлинения теломер. Это становится возможно благодаря увеличивающейся геномной

нестабильности, а также взаимодействию вирусных онкогенных белков с транскрипционными факторами, регулирующими транскрипцию hTERT. Так, например, белок E6 приводит к активации экспрессии hTERT посредством связывания с c-MYC и последующей более эффективной активации им промотора hTERT, связыванием с убиквитин-зависимой лигазой E6-AP и последующей деградацией NFX1-91 - репрессора транскрипции hTERT [13]. Если введение вирусных онкогенов не приводит к иммортализации клеток, то его комбинируют с введением гена TERT.



Рисунок 6. Основные молекулярные мишени методов индуцированной иммортализации.

Основные риски использования для иммортализации вирусных белков связаны с тем, что они имеют множество молекулярных мишеней, из-за чего, во-первых, приводят к достаточно непредсказуемым изменениям свойств клеток, во-вторых, могут приводить к геномной нестабильности и хромосомным перестройкам, как следствие, увеличивать риск трансформации клетки и еще больше изменять свойства клеток.

Мы рассмотрим два наиболее широко используемых метода иммортализации – с помощью большого Т-антигена полиомавируса обезьян (SV40) и белков E6/E7 вируса папилломы человека (HPV16).

К подходам для иммортализации также относят использование онкогенов Т-лимфотропного вируса человека (HTLV), аденовируса, вируса Эпштейна-Барра (EBV) [181]. Тем не менее, нам не удалось найти иммортализованные линии человеческих клеток, полученные с помощью первых двух методов. Поэтому их мы рассматривать не будем. Иммортализация с помощью онкогенов EBV имеет узкое применение - для В-лимфоцитов, поэтому подробно останавливаться на ней тоже не будем. Более детально эти методы описаны в [182-185].

#### **1.4.2.2.1. Иммуортализация с помощью большого Т-антигена полиомавируса обезьян (SV40)**

В качестве иммуортализующего агента МСК на втором месте после TERT стоит большой Т антиген вируса SV40, хотя чаще он применяется для МСК животных (54.5% случаев), а не человека [155]. Отметим, что SV40 напрямую не удлиняет теломеры, поэтому полноценно иммуортализованными такие клетки могут считаться только в случае активации механизма удлинения теломер [156]. Реже это происходит спонтанно - спонтанная реактивация теломеразы [186,187], либо активация механизма ALT (alternative lengthening of telomeres), чаще - сверхэкспрессия TERT методами генной инженерии [188-192].

С помощью большого Т антигена вируса SV40 были иммуортализованы КМ-МСК [193,194], стволовые клетки зубов [195], клетки альвеолярной кости [196], разные эпителиальные клетки [197,198] и др.

Ингибирование SV40 белков p53 и pRb приводит к изменению дифференцировочного потенциала клеток [192,195] и значительными кариотипическим изменениям [160,187], хотя известны случаи получения линий МСК с сохраненными поверхностными маркерами и дифференцировочным потенциалом [195,204]. При коэкспрессии SV40 с TERT свойства получаемых клеточных линий чаще отличаются от свойств первичных линий, также может возникать геномная нестабильность (как следствие, анеуплоидия, полиплоидность) [189,190]. Хотя существуют работы, в которых были получены линии клеток с сохраненными свойствами – например, в [199] с помощью адаптирования метода спинокуляции (инокуляции центрифугированием) для последовательной трансдукции генов SV40 и TERT были успешно получены КМ-МСК пожилых доноров с сохраненными чертами клеток мезенхимного происхождения и дифференцировочным потенциалом.

Основные риски иммуортализации с помощью SV40 связаны с тем, что белки вируса SV40 имеют множество молекулярных мишеней, взаимодействие с которыми приводит к опухолевой трансформации зараженных клеток. Так, большой Т-антиген вируса SV40 ингибирует основные супрессоры опухолей p53 и pRB, в норме вызывающие остановку клеточного цикла [195], связывается с белками Bub1 и Bub3 митотической контрольной точки, что может приводить к геномной нестабильности и коррелирует с вызываемой им трансформацией [200], активирует сигнальный путь PI3K/Akt, ингибируя апоптоз,

связывается с транскрипционными ко-активаторами, что может приводить, например, к нарушению дифференцировочного потенциала в адипогенном направлении (при связывании с p300/CBP) [201,202]. Трансдукция большого Т-антигена SV40 может приводить к выходу теломеразы из ядра в цитоплазму, что является признаком трансформированных клеток [203].

Поэтому ожидаемо, что иммортализация посредством Т-антигена SV40 будет с высокой вероятностью сопровождаться трансформацией клеток (показано, например, в [198,199]), хотя нельзя не отметить случаи получения таким способом клеточных линий, которые показали отрицательный результат в тестах на туморогенность [189,190,199,204,205]. В [199] 2 из 4 полученных одинаковым способом линий МСК вызывали образование опухолей в бестимусных мышцах. Даже линия BEAS-2B (линия иммортализованных клеток эпителия бронхов человека), которая долго считалась «нормальной» и широко использовалась в разных исследованиях, оказалась способной спонтанно трансформироваться при пассировании [206]. Поэтому неудивительно, что создатели иммортализованных Т-антигеном SV40 линий иногда параллельно разрабатывают условия и для возможности эксцизии гена: Cre/loxP рекомбинация [207], FLP рекомбиназа [204].

В целом, можно сказать, что использование большого Т-антигена вируса SV40 в качестве иммортализирующего агента может быть полезно для задач изучения канцерогенеза [187], но не получения стабильных клеточных линий с увеличенной продолжительностью жизни в культуре.

#### **1.4.2.2.2. Е6/Е7 вируса папилломы человека (HPV16)**

Белок Е7 вируса HPV инактивирует pRb, белок Е6 инактивирует p53 [180] и активирует TERT [13], что позволяет инфицированной клетке пройти репликативный барьер М1. Поэтому введения в клетку белков Е6 и Е7 вируса HPV (в комбинации или по одиночке) бывает достаточно для иммортализации клеток. Так, для иммортализации фибробластов эмбриона человека было достаточно либо экспрессии Е6, либо Е7, причем экспрессия Е6 приводила к активации теломеразы, а Е7 к активации ALT механизма [208]. С помощью комбинации Е6 и Е7 были иммортализованы человеческие эпителиальные клетки молочной железы [209], клетки кожного сосочка волосяного фолликула [210], МСК пуповинной крови [211], стромальные клетки простаты [212], кератиноциты [191]. Часто Е6 и Е7 (оба или по отдельности) также применяют в комбинации с TERT.

Например, комбинацией HPV16 E7 и hTERT были immortalizованы преадипоциты, стромальные клетки костного мозга и эпителиальные клетки поверхности яичников [13], комбинацией HPV16 E6 и hTERT - МСК костного мозга [211], HPV16 E6/E7 и hTERT - эпителиальные клетки пищевода [213], МСК жировой ткани [178], UE6E7T-3 (оригинальное название ThMSC3) (линия МСК костного мозга) [214] и др.

С помощью метода коэкспрессии HPV E6/E7 с TERT можно получить клетки с сохраненными свойствами, например, линия hASC-TE (МСК жировой ткани человека) сохраняла дифференцировочный потенциал в адипогенном и остеогенном направлениях [178]. Однако белки E6 и E7 могут приводить к геномной нестабильности [215]. Так, в [216] в результате прямого сравнения immortalizованных разными способами фибробластов человеческого эмбриона (с помощью SV40, E6/E7 или комбинации экспрессии мутантной CDK4, циклина D1 и TERT) показано, что использование вирусных онкогенов приводило к значительным хромосомным перестройкам. Согласуются с этими данными и результаты [211]: кариотип сохранялся в течение года только у МСК пуповинной крови человека, immortalizованных TERT, три другие линии человеческих МСК, полученные immortalizацией HPV16E6/E7 (МСК пуповинной крови), либо комбинациями hTERT с HPV16E6 или Bmi-1 с hTERT (МСК костного мозга), характеризовались геномными мутациями, общей из которых являлась потеря 13й хромосомы. Сходные результаты, а именно более стабильный кариотип при immortalizации TERT, но не TERT в комбинации с HPV16E6/E7, были получены и для эпителиальных клеток пищевода [213]. Хромосомные перестройки наблюдались и в других исследованиях. В ряде работ авторы immortalizовали клетки (например, клетки костного мозга, преадипоциты, поверхностные эпителиальные клетки яичника [209]) с помощью E7 в комбинации с TERT, но, что важно, без применения E6. Интересно, что полученные таким образом клеточные линии практически не несли геномные и хромосомные мутации, что может быть объяснено тем, что в отсутствии белка E6, который подавляет экспрессию p53, эта контрольная точка клеточного цикла остается сохранной и препятствует размножению клеток с нерепарированными повреждениями ДНК и хромосомными перестройками. При трансдукции же клеток только белком E7 наблюдались значительные хромосомные перестройки [217].

Считается, что экспрессии в клетке только белков E6/E7 вируса HPV16 или других штаммов HPV высокого риска недостаточно для развития опухоли в организме *in vivo*

[218]. На примере линии клеток шейки матки NC104-E6/E7 было показано, что введение таких immortalized клеток не вызывало образование опухолей у бестимусных мышей, но дополнительной экспрессии miR-135a опухоль образовывалась [218]. Действительно, есть не одна линия immortalized клеток, созданных путем экспрессии HPV16E6/E7, либо коэкспрессии HPV16E6/E7 с TERT, которая показала отрицательный результат в тестах на tumorigenicity: MCK костного мозга [219], IHOSE (клетки эпителия поверхности яичников человека) [205], NC104-E6/E7 [218] и NE3-E6E7-hTERT (NE3) (клетки эпителия) [220] соответственно. Другие линии обладали tumorigenic свойствами. Так, линия NEcA6-E6E7-hTERT (NEcA6) вызывала образование опухолей при введении бестимусным мышам [220]. На кератиноцитах человека было показано, что клетки, immortalized только экспрессией E6 и E7, не обладали tumorigenicностью, но после дополнительного введения гена TERT они показывали положительный результат как в soft agar colony assay, так и при введении иммунодефицитным мышам [221]. У линии immortalized MCK костного мозга UE6E7T-3 (оригинальное название ThMSC3), полученной трансдукцией и HPV16 E6/E7, и hTERT, при длительном пассировании (после 252 удвоений) наблюдалась потеря 13й хромосомы, после чего значительно менялась экспрессия множества генов, в т.ч. активировались онкогены, происходили геномные мутации, в результате клетки подвергались трансформации и вызывали образование сарком при инъекции бестимусным мышам [214].

Таким образом, можно сказать, что белок E7 вируса HPV нельзя считать предпочтительным в качестве immortalizing агента для получения генетически стабильных клеточных линий MCK.

#### **1.4.2.3. Иммутиализация с помощью экспрессии генов транскрипционных факторов – клеточных протоонкогенов (*c-MYC*, *BM11*)**

##### **1.4.2.3.1. *c-MYC* и *v-MYC***

Для иммутиализации применяют ген *c-MYC* и его вирусный гомолог *v-MYC*. Транскрипционный фактор *c-MYC* стимулирует прогрессию клеточного цикла ингибированием ингибиторов циклин-зависимых киназ p15<sup>INK4B</sup>, p27<sup>KIP1</sup>, при неактивном p53 также ингибированием p21, и увеличением экспрессии некоторых циклин-зависимых киназ и циклинов [13]. *c-MYC* также напрямую активирует TERT, связываясь с сайтами посадки на её промоторе [13].

Иммортализацией с помощью *c-MYC* были получены фибробласты [222] и клетки эпителия простаты человека [223]. Интересен пример создания линии HuES9.E1 immortalized MСК эмбриона человека [224] как продуцентов экзосом для терапевтических целей. Экзосомы этих клеток не содержали гена *c-MYC* и, как и сами клетки, не вызывали образование опухолей при введении иммунодефицитным мышам [225]. В результате применение экзосом этой линии для лечения псориаза было доведено до клинических испытаний [226]. Однако ведение гена *c-MYC* или *v-MYC* чаще используется для иммортализации нейронов [227] или нервных стволовых клеток (НСК) [228-230] с целью получения моделей для изучения заболеваний нервной системы, например, болезни Паркинсона [229,231], демиелинизирующих заболеваний [232]. При этом обычно не предполагается введение полученных immortalized клеток в живые организмы, поэтому в большинстве работ полученные клетки не проверяли на наличие трансформации. Нам удалось найти только две работы, в которых авторы напрямую вводили immortalized клетки *in vivo*. Так, в [228] клетки линии IhNSCs (immortalized нервные стволовые клетки) вводили мышам в мозг и хвостовую вену и не наблюдали образование опухолей. В [231] полученные ранее [229] immortalized нервные стволовые клетки линии hVM1 трансплантировали крысам с гемипаркинсонизмом. Эти клетки выживали, интегрировались в ткань мозга и дифференцировались в дофаминэргические нейроны. С целью разработки новых подходов для лечения геморрагического инсульта была разработана другая линия - B10 - immortalized с помощью *v-MYC* МСК костного мозга эмбриона человека. Полученные клетки были успешно трансплантированы в головной мозг мышей с смоделированным геморрагическим инсультом, причем они выжили и дифференцировались в астроциты и нейроны, что сопровождалось улучшением поведения животных [233]. Иногда применяют коэкспрессию *c-MYC* и *TERT*. Так, например, были получены immortalized гранулезные клетки [234], стромальные стволовые клетки роговицы человека (хотя этот способ оказался менее предпочтительным, чем иммортализация с помощью Т-антигена SV40) [235]. Отметим, что дифференцировочный потенциал immortalized с помощью *c-MYC* нервных стволовых клеток часто оказывается сохранен или улучшен [229,232], в то время как дифференцировочный потенциал immortalized МСК (особенно в адипогенном направлении), часто нарушен [224,235].

Учитывая всё вышесказанное, можно утверждать, что immortalization с помощью генов *c-MYC* и *v-MYC* не является предпочтительной для МСК.

#### 1.4.2.3.2. *BM1*

*BM1* – прото-онкоген, кодирующий белок комплекса polycomb 1 (PRC1). Основными механизмами действия этого белка считается подавление экспрессии  $p16^{INK4A}$ , стимуляция репарации двухцепочечных разрывов ДНК и активация теломеразы в некоторых клетках [236-238]. Если клеточного ответа оказывается недостаточно для immortalization, то могут применять комбинированное действие с сверхэкспрессией TERT и/или инактивацией  $p16^{INK4A}$ . Коэкспрессией *BM1* с *TERT* были получены человеческие МСК костного мозга [209], МСК жировой ткани [239], миобласты, кератиноциты дермы, эпителиальные клетки мелких дыхательных путей и молочной железы [209]. Коэкспрессией *BM1* и *TERT* с дополнительной инактивацией  $p16^{INK4A}$  была получена линия эпителиальных клеток носоглотки [236].

При таком способе получения immortalized линий наблюдается меньше хромосомных перестроек, чем при immortalization вирусными онкогенами. Так, в [209] на примере эпителиальных клеток молочной железы в результате прямого сравнения разных способов immortalization было показано, что все клетки, immortalized только TERT, либо его комбинацией с *BM1* или shRNA, инактивирующей  $p16$ , были почти диплоидными с отсутствием транслокаций. Отметим, что immortalization МСК жировой ткани была достигнута только коэкспрессией *BM1* и TERT, одного *BM1* оказалось недостаточно. Полученная линия не вызывала образование опухолей при введении иммунодефицитным мышам [239]. Immortalization с помощью *BM1* оправданно применять, если стоит задача сохранить свойства получаемой клеточной линии, например, для создания репрезентативной модели, а исходная первичная культура уже имела повышенный уровень экспрессии *Bmi-1*. Поэтому, он был применен, например, для получения immortalized линии эпителиальных клеток носоглотки как модели изучения развития носоглоточной карциномы, при которой наблюдается повышенный уровень экспрессии *Bmi-1* [236]. Проблема безопасности также практически не актуальна в случае, если этот метод используется для задач масштабирования клеток-предшественников, из которых далее будут получены дифференцированные клетки-потомки. Наиболее ярким примером применения метода в таком качестве является полученная линия immortalized эритробластов для наработки нужного количества



клеток для терапии анемии и больших кровопотерь. Далее эти клетки были успешно дифференцированы в зрелые эритроциты, инъецированы мышам, после чего выжили и циркулировали в кровотоке [240].

#### **1.4.2.4. Сравнение методов immortalization**

Учитывая описанные выше механизмы разных методов immortalization, можно заключить следующее. Вирусные белки в качестве immortalizing агента для МСК менее предпочтительны, чем теломераза, т.к. напрямую воздействуют на ключевые белки контрольных точек клеточного цикла - p53 и pRb, которые стоят на пересечении множества молекулярных путей. Поэтому при таком методе можно ожидать, во-первых, во многом непредсказуемый клеточный ответ, который будет зависеть от молекулярного контекста. Во-вторых, потеря функции контрольных точек позволит клеткам продолжать делиться даже при значительно укороченных теломерах, из-за чего усилятся циклы «разрыв–слияние–мост» между концами хромосом, в результате чего увеличится геномная нестабильность и значительно усилится вероятность появления трансформированного фенотипа. В-третьих, показано, что вирусные белки могут напрямую способствовать хромосомным aberrациям [216] и трансформации [200].

Immortalized же теломеразой клетки либо сохраняют нормальный кариотип [160], либо имеют меньше изменений кариотипа, чем immortalized Т-антигеном вируса SV40 ([160], впервые напрямую показано в [187]) или коэкспрессией TERT с другими онкогенами (например, с E6/E7 вируса HPV16 или с BMI1 и E6 вируса HPV16 [211]). С другой стороны, теломераза имеет двоякий эффект: с одной стороны, удлиняя теломеры, снижает вероятность появления геномной нестабильности и мутаций, с другой стороны, внетеломерные функции теломеразы могут иметь онкогенный эффект, способствуя выживанию клетки. Однако немаловажно следующее: во-первых, существуют человеческие опухоли с неактивной теломеразой (порядка 5-10% всех известных). Во-вторых, были получены и клеточные линии, которые становились трансформированными, но при этом в них не запускали эктопическую экспрессию теломеразы, а лишь «комбинировали» некоторые онкогены [139]. Это во многом может быть обусловлено наличием теломераза-независимых механизмов удлинения теломер – ALT (в некоторых опухолях человека) и посредством транспозонов (у некоторых грибов, водорослей, животных). Причём в случае, если запускается такой механизм их удлинения, то это тем больше стимулирует геномную нестабильность клетки, что

принципиально отличает такое состояние клетки от состояния удлинения теломер посредством теломеразы. Более того, хоть активная теломераза и часто (в порядка 85% случаев) необходима для опухолевых клеток, но сама по себе не является индуктором опухолеобразования, а лишь способствует выживанию уже трансформированной в опухолевом направлении клетки [241]. Таким образом, опасность появления трансформированного фенотипа возникает и при отсутствии активной теломеразы. Также отметим, что случайная трансформация клеток, иммортализованных теломеразой, может происходить в силу сторонних причин, не связанных с функционированием самой теломеразы – возможного стимулирования генетических изменений используемым маркером селекции (например, неомицином [242]), местом интеграции вектора в геном, уровнем эктопической экспрессии теломеразы, плотностью посева клеток, условиями культивирования [139,242]. Из найденных нами источников только в одном случае была аккуратно показана возможность трансформации, но, что важно, при очень длительном культивировании (256 пассаж) иммортализованных TERT человеческих клеток (МСК) [153]. Второй найденный случай [177] мы не можем считать доказательным в силу того, что первичные клетки были взяты у донора возрастом 102 года.

В некоторых исследованиях было проведено прямое сравнение метода иммортализации с помощью эктопической или сверхэкспрессии TERT и других методов:

- В [211] на примере П-МСК и КМ-МСК было показано, что иммортализация сверхэкспрессией TERT не привела к хромосомным aberrациям при пассировании в течение года. Но в результате иммортализации с помощью E6/E7 вируса HPV16, либо комбинации Vmi-1 с TERT, либо комбинации E6/E7 вируса HPV16 с TERT происходили хромосомные aberrации, причем чаще всего они заключались в потере 13 хромосомы, которая содержит гены-супрессоры опухолевого роста *RB1* и *BRCA2*.
- В [213] на примере человеческих эпителиальных клеток, клеток легких и молочной железы было также показано отсутствие хромосомных мутаций в случае иммортализации с помощью TERT и наличие хромосомных транслокаций и анеуплоидии в случае иммортализации сверхэкспрессией E6/E7 вируса HPV16, либо комбинацией E6/E7 вируса HPV16 с TERT, либо комбинацией TERT с короткой шпилечной РНК к p16INK4A.
- Хромосомная стабильность при иммортализации с помощью сверхэкспрессии TERT или комбинации TERT с BMI1 была подтверждена и в [228] на примере ЖТ-МСК.

Эти клетки также сохраняли свои свойства. Использование коэкспрессии TERT с большим Т-антигеном SV40 приводило к появлению хромосомных aberrаций.

По результатам проведенного анализа можно заключить, что для цели получения стабильной не трансформированной клеточной линии с сохранными свойствами и геномной стабильностью наиболее оправдан метод сверхэкспрессии гена каталитической субъединицы *TERT*.

## 5. Общий вывод по разделу «Обзор литературы»

Таким образом, на основании всего вышеизложенного в разделе «Обзор литературы» мы можем предложить следующую схему, иллюстрирующую основные проблемы, возникающие при использовании МСК для задач регенеративной биомедицины, и наиболее обоснованное на наш взгляд решение (рис. 7).



Рисунок 7. Проблемы, возникающие при использовании МСК для задач регенеративной биомедицины, и возможное решение. Цветовые обозначения: кирпичный – проблемы и ограничения, зеленый – решение.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Клеточные культуры

В работе использовали культуры клеток:

- НЕК293Т (ATCC, #CRL-3216™) - для продукции лентивирусных частиц, несущих ген каталитической субъединицы теломеразы *hTERT*,
- первичные культуры мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (МСК) человека из коллекции биобанка Центра регенеративной медицины МНОИ МГУ имени М.В. Ломоносова, ID коллекции: MSU\_FB (<https://human.depo.msu.ru>) - в качестве отрицательного контроля и для иммортализации. «Культуры МСК были получены из подкожного жира в ходе травматологических или плановых (герниопластика) операций от здоровых доноров, которые имели индекс массы тела 18-25 и не имели метаболических/эндокринных нарушений: донор №1 - мужчина (19 лет), донор №2 – мужчина (26 лет), донор №3 – женщина (53 года)» [165],
- ASC52telo (ATCC, #SCRC-4000, США) - коммерческую линию иммортализованных МСК жировой ткани человека – в качестве положительного контроля,
- первичные культуры фибробластов дермы человека из коллекции биобанка Центра регенеративной медицины МНОИ МГУ имени М.В. Ломоносова, ID коллекции: MSU\_FB (<https://human.depo.msu.ru>) - для изучения трансформирующей активности секрета иммортализованных МСК (п. 2.14).

Все культуры коллекции биобанка Центра регенеративной медицины МНОИ МГУ имени М.В. Ломоносова получены от доноров по их добровольному информированному согласию. Коллекции регулируются решением институционального локального этического комитета МНОЦ МГУ имени М.В. Ломоносова, IRB00010587 (протокол №4 от 04.06.2018).

В качестве культуральной среды для НЕК293Т и первичных культур фибробластов дермы человека использовали среду DMEM (модифицированная среда Игла Дульбекко) с высоким содержанием глюкозы 4500 мг/л (Gibco, #11995065, США) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) (ThermoFisher Scientific, #26140079, США), смеси 100ед/мл пенициллина и 100мкг/мл стрептомицина (Gibco, #15240062, США) и в случае необходимости 2мМ L-глутамин (Gibco, #11539876, США). Для наработки лентивирусных частиц (ЛВЧ) среду меняли на среду аналогичного состава, но содержащую 2% инактивированной бычьей сыворотки (FBS) (ThermoFisher Scientific,

#26140079, США). Сыворотку инактивировали путем инкубации в водяной бане при 56°C в течение 30 мин.

В качестве культуральной среды для первичных и immortalized культур МСК, а также линии ASC52telo использовали DMEM (модифицированная среда Игла Дульбекко) с низким содержанием глюкозы 1 г/л (Gibco, #11885084, США) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) (ThermoFisher Scientific, #26140079, США), смеси 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Gibco, #15240062, США) и в случае необходимости 2 мМ L-глутамин (Gibco, #11539876, США).

Клетки культивировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в чашках Петри диаметром 10 см. Замену культуральной среды проводили каждые 2–3 дня. Клетки пассировали по достижении культурой 80% конfluence монослоя в соотношении 1:3. Для посева клеток на чашки Петри клетки отслаивали промыванием с помощью раствора Версена (ПанЭко, #P080п, Россия) и последующей инкубацией в растворе Версена и трипсина (Кат. №: П034, ПанЭко, Россия) в соотношении 1:1 при 37°C в течение 3–5 мин. Для очистки суспензии клеток от раствора трипсина клетки центрифугировали при 300 g в течение 5 минут, осадок ресуспендировали в среде культивирования и высевали на чашки Петри.

## 2.2. Получение immortalized МСК человека (МСК<sub>TERT</sub>)

Первичные культуры МСК человека immortalized с помощью сверхэкспрессии гена каталитической субъединицы теломеразы человека *hTERT*, который был доставлен в МСК лентивирусной трансдукцией. Использовали лентивирусную систему III поколения.

В качестве вектора переноса использовали pVLT (Евроген). Трансген *hTERT* получали в виде кДНК путем обратной транскрипции тотальной мРНК МСК человека (ее получали, как описано в п. 2.3.1). Для амплификации использовали праймеры: прямой: 5'-CCACCGAATTCGCCACCATGCCGCGCGCTCCCCGCTGCCGAGCCGTGCGCT-3' и обратный: 5' — GCGTCGTCGACTCAGTCCAGGATGGTCTTGAAGTCTGAGGGCAGTGCCGGGTTG-3', содержащие последовательности сайтов рестрикции EcoRI и SalI, по которым трансген встраивали в вектор pVLT; программа: 95°C 4 мин, 35 циклов (денатурация: 95°C 25 сек, отжиг праймеров: 68°C 25 сек, элонгация: 72°C 3 мин), 72°C 10 мин; размер получаемого фрагмента ДНК — 3430 пар оснований (п.о.). Также в вектор pVLT встраивали экспрессионную кассету гена пурамицин N-ацетилтрансферазы (содержащую промотор

SV40 и ген *PuroR*) по сайтам рестрикции SalI и KpnI для обеспечения выживаемости клеток при селекции на культуральной среде, содержащей пурамицин (<1 мкг/мл). Эту экспрессионную кассету клонировали из вектора Babe-mTERT-SV40-puro (Addgene, #36413, США) с помощью праймеров прямого: 5'-CCACCGTCGACCCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAG-3' и обратного: 5'-

CCACCGGTACCTGTTCCATCTGTTCCCTGACSTTGATCTGAACTTCTCTATTCTCAGTTATGTA-3', при температуре отжига 64°C, размер получаемого фрагмента 1190 п.о.

На рисунке 8 показана карта результирующего вектора переноса pVLT-EF1a-hTERT-puro.

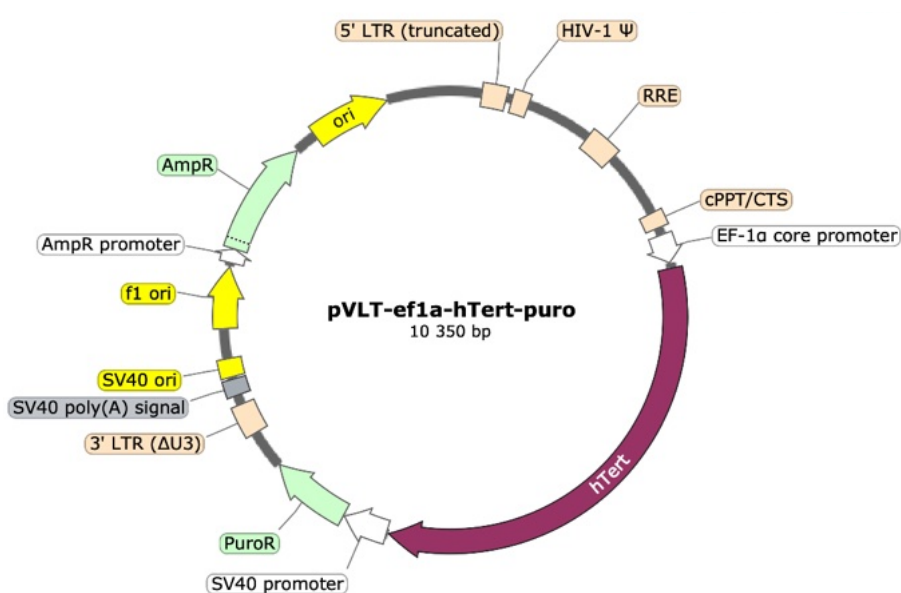


Рисунок 8. Карта лентивирусного вектора переноса pVLT-EF1a-hTERT-puro, который кодирует кДНК *hTERT* и ген *puroR*.

#### *Трансфекция с целью сборки лентивирусных частиц*

Плазмидами трансфицировали клетки линии HEK293, культивируемые в чашках Петри диаметром 10см, по протоколу [243] с небольшими изменениями. Готовили трансфицирующую смесь, состоящую из смеси четырех плазмид (0,925 мкг/мл лентивирусного вектора переноса pVLT-EF1a-hTERT-puro, 0,925 мкг упаковочной плазмиды, кодирующей гены *Gag* и *Pol* (pMDLg/pRRE (Addgene, #12251)), 0,475 мкг/мл плазмиды, кодирующей ген *Rev* (pRSV-Rev (Addgene, #12253)), 0,175 мкг/мл плазмиды оболочки, кодирующей гликопротеин вируса везикулярного стоматита (pMD2.G (Addgene, #12259)) и 0,0125% раствора полиэтиленимина (PEI, Polyethylenimine Linear MW 25000, Transfection Grade (PEI 25K™) (Polysciences, #23966-1, США)),

приготовленного в буфере Opti-MEM. Трансфицирующую смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 15-20 мин, после этого наносили на клетки и инкубировали их в течение 12 ч в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>.

После трансфекции трансфицирующую смесь заменяли на культуральную среду (DMEM с 4500 мг/л глюкозы, 10% FBS, 100ед/мл пенициллина и 100мкг/мл стрептомицина), в которой далее культивировали клетки в течение 18 ч в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>.

Для получения лентивирусных частиц (ЛВЧ) по истечении 18 ч культуральную среду заменяли на культуральную среду для получения ЛВЧ – аналогичную по составу, но содержащую 2% инактивированной FBS, и культивировали в ней клетки в течение 65-72 ч. Для сбора ЛВЧ собирали полученную кондиционированную культуральную среду и очищали ее от клеточного дебриса фильтрацией с помощью фильтров (диаметр пор 0,45 мкм). Титр ЛВЧ оценивали с помощью Lenti-X™ p24 Rapid Titer Kit (Takara Bio, #632200).

#### *Трансдукция*

Полученные ЛВЧ использовали для трансдукции МСК человека и до момента трансдукции хранили их при температуре +4°C. Для трансдукции использовали МСК 2-3 пассажа, культивируемые в 6-луночных планшетах и достигшие 30-40% конфлюентности. Процесс трансдукции заключался в нанесении на культуры МСК 1,2 мл культуральной среды, содержащей ЛВЧ с титром  $2,8 \cdot 10^6$  вирусных частиц в 1 мл кондиционированной среды, и центрифугировании планшетов при 300 g и комнатной температуре в течение 1,5 ч с целью повышения эффективности трансдукции. Эту процедуру повторяли 2 раза. Между процедурами трансдукции МСК инкубировали в стандартной культуральной среде в течение 8 ч в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. После трансдукции МСК культивировали в стандартной культуральной среде в течение 7 суток, после чего производили селекцию успешно трансдуцированных клонов путем добавления в культуральную среду 1 мкг/мл пуромицина (InvivoGen, #ant-pr-5b, США) в течение 14 суток (культуральную среду, содержащую 1 мкг/мл пуромицина, меняли каждые 2-3 дня). Контролем успешности селекции служила культивируемая первичная культура МСК, которая не подвергалась процедуре трансдукции.

### **2.3. Анализ успешности трансдукции**

Успешность трансдукции определяли по уровню экспрессии гена *hTERT*, наличию белковой субъединицы теломеразы в лизатах клеток, активности теломеразы и длине

теломер. Для всех этих экспериментов были использованы следующие отрицательный и положительный контроли: первичная культура МСК жировой ткани человека второго пассажа (пМСК 2п) и линия ASC52telo (ATCC, #SCRC-4000, США), соответственно.

### 2.3.1. Уровень экспрессии гена *hTERT*

Уровень экспрессии гена *hTERT* по относительному количеству мРНК белковой субъединицы теломеразы анализировали с помощью ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Для этого выделяли тотальную РНК из лизатов МСК<sub>TERT</sub> с помощью коммерческого набора Direct-zol RNA Miniprep (Zymo Research, #R2052, США) согласно протоколу производителя; все процедуры проводили на льду; все реактивы имели марку «RNase-free»; выделенную тотальную РНК хранили при температуре -80°C не более 1 мес. Далее получали тотальную кДНК обратной транскрипцией согласно протоколу производителя; использовали коммерческий набор MMLV RT (Евроген, #SK021, Россия), Oligo(dT)<sub>15</sub> праймер (Евроген, #SB001, Россия), в качестве матрицы - 1-2 мкг выделенной тотальной РНК на 20 мкл реакционной смеси. Полученную тотальную кДНК хранили при температуре -80°C не более 1 недели и использовали для определения относительного количества мРНК TERT с помощью ПЦР-РВ. ПЦР-РВ проводили с помощью набора 5X qPCRmix-HS SYBR (Евроген, #PK147L, Россия) согласно протоколу производителя. мРНК TERT детектировали с помощью прямого праймера 5'-ACCGTGGTTTCTGTGTGGTG-3' и обратного праймера 5'-TCGCCTGAGGAGTAGAGGAA' (отжиг при 58°C, синтезируемый ампликон имеет длину 211 пар оснований). Количество мРНК TERT нормировали на количество мРНК гена *36B4* (ген «домашнего хозяйства»), который детектировали с помощью прямого праймера 5'-CGACCTGGAAGTCCAАСТАС-3' и обратного праймера 5'-ATCTGCTGCATCTGCTTG-3' (отжиг при 53°C, синтезируемый ампликон имеет длину 109 п.о.). Данные анализировали с помощью метода  $\Delta\Delta C_t$  [244].

### 2.3.2. Наличие белковой субъединицы теломеразы в клеточных лизатах

Наличие белковой субъединицы теломеразы определяли в лизатах первичных культур МСК и МСК<sub>TERT</sub> с помощью иммуноблоттинга (вестерн-блоттинга).

Для подготовки образцов лизатов клетки снимали с чашек Петри обработкой трипсином (как это описано в п. 2.1), производили подсчет клеток с помощью камеры Горяева и отбирали 1 млн клеток каждого образца, после чего его центрифугировали при



300 g в течение 5 мин, осадок ресуспендировали в 80 мкл лизис-буфера 2x Laemmli Sample buffer (Bio-Rad, #1610737, США) и инкубировали при 95°C в течение 5 мин. В случае высокой вязкости лизатов их несколько раз пропускали через инсулиновый шприц (U-100 1мл с иглой 26G 0,45x12мм, SFM, Германия).

Сначала проводили электрофорез образцов в 12% полиакриламидном геле (SDS-PAGE) в денатурирующих условиях согласно стандартному протоколу (при напряжении 80 В до момента концентрирования образцов на границе концентрирующего и разделяющего гелей, при напряжении 180 В – с момента перехода образцов в разделяющий гель). Далее осуществляли влажный электроперенос белков из геля на предварительно промытую дистиллированной водой и смоченную в течение 5-10 мин буфером для влажного переноса PVDF-мембрану (Immobilon, Millipore), параметры - 2 ч, сила тока 290 мА с последующим охлаждением до +4...+6 °С. С целью предотвращения неспецифической сорбции на мембране первичных и вторичных антител после электропереноса проводили блокирование не связавших белок участков мембраны инкубированием в 5% растворе обезжиренного молока (Диаэм, #3912.0500, Россия), приготовленного в буфере PBST (состава 0,01 М фосфатно-солевой буфер (PBS) (Диаэм, #4436.0500, Россия), 0,1 % Tween 20 (PanReac Applichem, #A4974,1000, Германия)) в течение 1 ч при комнатной температуре или до 48 ч при 4°C. Далее инкубировали PVDF-мембрану с разведенными в соотношении 1:1000 первичными антителами, приготовленными в 5% растворе обезжиренного молока в буфере PBST, в течение 2 ч при комнатной температуре или до 48 ч при 4°C. Использовали первичные антитела к теломеразе человека - Anti-Telomerase reverse transcriptase antibody [2C4] (Abcam, #ab5181, Великобритания), и первичные антитела к альфа-тубулину (TUBA1A) - alpha Tubulin Antibody (B-5-1-2) (Santa Cruz, #sc-23948, США) (для нормировки). Далее мембрану промывали 4 раза в течение 4 мин в буфере PBST и инкубировали с разведенными в соотношении 1:6000 вторичными антителами, приготовленными в 5% растворе обезжиренного молока в буфере PBST, в течение 1,5 ч при комнатной температуре. В качестве вторичных антител использовали антитела кролика к иммуноглобулинам IgG, IgA, IgM мыши, меченные пероксидазой хрена (Имтек, #P-RAM Iss, Россия). В качестве маркера молекулярной массы использовали PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa (ThermoFisher Scientific, #26616, США). Окрашивание PVDF-мембраны проявляли с помощью набора Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad, #1705060, США),

сигнал регистрировали с помощью Bio Rad ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad, США).

### **2.3.3. Активность теломеразы и длина теломер**

Функциональную активность теломеразы подтверждали с помощью коммерческого набора Telomerase Activity Quantification qPCR Assay Kit (Sciencell, #8928, США) согласно протоколу производителя. Для этого собирали 2-5 млн клеток каждого образца согласно методике, описанной в п. 2.1.

Также определяли активность теломеразы по длине теломер с помощью коммерческого набора Relative Human Telomere Length Quantification qPCR Assay Kit (Sciencell, #8908, США) согласно протоколу производителя. Для этого выделяли геномную ДНК из клеток каждого образца фенол-хлороформным методом. Для этого 1 млн клеток лизировали в 1 мл лизис-буфера, содержащем 50 мМ Трис-НСl, 100 мМ ЭДТА, рН 8,0, 0,5% SDS и 0,6 мг/мл протеиназы К, при 55°C в течение 1-2ч. Далее к образцу добавляли равный объем фенола, перемешивали в течение 20сек, центрифугировали при 16000 g в течение 1 мин при 24°C и переносили верхнюю водную фазу в новую пробирку. Далее добавляли равный объем хлороформа и центрифугировали при 16000 g в течение 1 мин при 24°C. Отбирали верхнюю фракцию и добавляли в нее 3М ацетат аммония (в объеме 10% от объема образца), после чего – изопропанол (в объеме 70% от объема образца). После этого пробирку замораживали при -20°C в течение 2-12 ч для преципитации ДНК. Далее центрифугировали при 16000 g в течение 30 мин при 4°C. Отбирали осадок, к нему добавляли 100мкл 70% этанола и центрифугировали при 16000 g в течение 2 мин при 4°C. Далее удаляли супернатант и центрифугировали при 16000 g в течение 30 мин при 4°C. Сбрасывали капли 70% этанола коротким центрифугированием, убирали остатки этанола, образец ДНК ресуспендировали в 30 мкл деионизованной воды свободной от нуклеаз.

### **2.4. Оценка пролиферативного потенциала**

Перед оценкой скорости пролиферации клетки высаживали в культуральные чашки диаметром 60 мм и производили подсчет клеток с помощью разработанного лаборантом кафедры биохимии и регенеративной биомедицины ФФМ МГУ имени М.В. Ломоносова Н.С. Волошиным плагина NuclePhaser к Napari [245] (метод основан на обнаружении и подсчете ядер клеток). В течение 30 мин после подсчета одинаковое количество клеток

(до 100 тыс. клеток на лунку) разных образцов высаживали в лунки 12-луночного культурального планшета (по 3 лунки на один образец) и культивировали в стандартных условиях, замену среды производили каждые 2-3 дня. Во время культивирования производили фотофиксацию с применением фазово-контрастной микроскопии (микроскоп Nikon Eclipse Ti с камерой Nikon DS-Qi1Mc, объективом Nikon Plan Fluor 10x/0.3 и программным обеспечением NIS Elements AR 5.40.02). Первую фотофиксацию производили через 4 ч после высаживания клеток в планшет (нулевая точка отсчета), далее - каждые 24 ч в течение 120 ч. Фотографировали одни те же поля зрения и клетки, что достигали с помощью запоминания координат для механического столика в модуле ND Acquisition; большое поле зрения составляло 36 мм<sup>2</sup> (6x6 мм, 9204x9204 пикселей).

По полученным сериям изображений производили подсчет клеток, как описано выше. Кривые роста клеток представляли как зависимость отношения числа клеток к числу клеток в нулевую точку отсчета (в усл.ед.) от времени (в ч). Время удвоения клеточной популяции (PDT) рассчитывали по стандартной формуле  $PDT = T \times \ln 2 / \ln(N_T/N_{T_0})$ , где T – продолжительность эксперимента (ч),  $N_T$  – число клеток, измеренное в момент времени T,  $N_{T_0}$  – число клеток, измеренное в нулевую точку отсчета ( $T_0$ ).

## **2.5. Оценка выраженности клеточного старения**

### **2.5.1. Окрашивание клеток на активность β-галактозидазы**

Выраженность признаков клеточного старения оценивали по окрашиванию клеток на активность β-галактозидазы, ассоциированной со старением (является одним из универсальных маркеров). Для этого клетки культивировали в 6-луночном планшете (клетки одного образца в 2 лунках) до достижения 20-30% конfluence. Далее клетки фиксировали согласно протоколу [246]. Для этого отбирали среду культивирования и инкубировали клетки в фиксирующем растворе состава 0,037 М K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,033 М NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.3), 0,2 % глутаровый альдегид, 5 мМ EGTA (pH 7.3), 100 мМ MgCl<sub>2</sub> на холоде в течение 5 мин. После фиксации культуры клеток промывали буфером 0,1 М PBS (pH 7,4) 3 раза в течение 5 мин. Далее клетки инкубировали в растворе для окрашивания состава 1 мг/мл 5-бром-4-хлор-3-индолил-β-D-галактозида (X-Gal), 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5 мМ ферроцианида калия, 5 мМ феррицианида калия, 0,01% дезоксихолата натрия, 0,02% Нонидет-Р40 при 37°C в течение ночи. На следующее утро производили фотофиксацию

на цветной камере DS-Fi3 (Nikon, Мелвилл, США) микроскопа Nikon Eclipse Ti2 (Nikon, Япония).

### **2.5.2. Оценка содержания компонентов секреторного фенотипа, ассоциированного со старением (SASP)**

Получали секретом, как описано в п 2.10. Содержание компонентов SASP (IL-6, MCP-1, PAI-1) в секретоме МСК оценивали с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческих наборов Human IL-6 Quantikine™ ELISA Kit (R&D Systems, #D6050, США), Human CCL2/MCP-1 Quantikine™ ELISA Kit (R&D Systems, #DCP00, США), Human Serpin E1/PAI-1 Quantikine™ ELISA Kit (R&D Systems, #DSE100, США), соответственно, согласно протоколу производителя. Результат ИФА детектировали с помощью спектрофотометра xMark™ Microplate Absorbance Spectrophotometer (BioRad, США). Полученное количество белков нормировали на количество клеток каждого образца, от которых был получен соответствующий образец секретомы.

## **2.6. Оценка дифференцировочного потенциала**

### **2.6.1. Адипогенная дифференцировка**

Для оценки способности клеточных культур к адипогенной дифференцировке использовали методику, описанную в [22]. Перед индукцией адипогенной дифференцировки клетки культивировали в 12-луночной планшете в стандартных условиях (в среде DMEM, содержащей 1 г/л глюкозы, 10% FBS, 100ед/мл пенициллина и 100мкг/мл стрептомицина) до достижения 100% конfluence. Клетки каждого образца культивировали в 6 лунках – 3 экспериментальных, 3 контрольных. По достижении монослоя культуральную среду отбирали и заменяли на индукционную среду состава DMEM, 1 г/л глюкозы, 10% FBS, 10 мкг/мл инсулина, 0.5 мМ IBMX (3-изобутил-1-метилксантин) (Millipore, Billerica, MA, США), 1 мкМ дексаметазона, 100ед/мл пенициллина и 100мкг/мл стрептомицина. В индукционной среде клетки культивировали 14 дней, смену среды проводили каждые 2-3 дня.

Выраженность адипогенной дифференцировки оценивали с помощью цитохимического окрашивания липофильным красителем нильским красным (Nile Red) (Sigma-Aldrich, #19123, Германия) и по уровню экспрессии генов основных маркеров адипогенной дифференцировки – адипонектина (ген *ADIPOQ*) и PPARγ (ген *PPARG*).

Перед окрашиванием клетки промывали раствором Хенкса (ПанЭко, #P020п, Россия), содержащим 20нМ ХЕПЕС (Диаэм, #3350.0100, Россия). Далее клетки инкубировали в растворе Хенкса, содержащем 20нМ ХЕПЕС и 1мМ Nile Red в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение 1ч. На следующее утро производили фотофиксацию монохромной камерой Kinetix (Teledyne Photometrics) микроскопа Nikon Eclipse Ti2 (Nikon, Япония), параметры флуоресценции: длина волны возбуждения - 488 нм, диапазон регистрируемых длин волн эмиссии - 515-547 нм. Изображения анализировали с помощью программного обеспечения NIS Elements AR 5.40.02.

Уровень экспрессии генов основных маркеров адипогенной дифференцировки – адипонектина и PPAR $\gamma$  - анализировали с помощью ПЦР-РВ. Для этого получали лизаты клеток сразу после их окрашивания Nile Red и выделяли из них (сразу или после хранения при температуре -80°C) тотальную РНК фенол-хлороформной экстракцией с помощью коммерческого набора ExtractRNA (Евроген, #BC032, Россия) согласно протоколу производителя. Далее получали тотальную кДНК обратной транскрипцией согласно протоколу производителя; использовали коммерческий набор MMLV RT (Евроген, #SK021, Россия) и Oligo(dT)<sub>15</sub> праймер (Евроген, #SB001, Россия). Полученную тотальную кДНК использовали в качестве матрицы для ПЦР-РВ, который проводили с помощью набора 5X qPCRmix-HS SYBR (Евроген, #PK147L, Россия) согласно протоколу производителя. В таблице 5 представлены праймеры, использованные для ПЦР-РВ. Данные для адипонектина анализировали с помощью метода  $\Delta$ Ct (т.к. он не экспрессируется без индукции адипогенной дифференцировки, т.е. в контрольной группе), для PPAR $\gamma$  - с помощью метода  $\Delta\Delta$ Ct [244].

Таблица 5. Праймеры и параметры ПЦР-РВ, использованные для детекции уровня экспрессии генов адипонектина (*ADIPOQ*) и PPAR $\gamma$  (*PPARG*)

| Ген           | Праймеры                                                                         | Температура отжига, °C | Длина ампликона, п.о. |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------|------------------------|-----------------------|
| <i>ADIPOQ</i> | Прямой: 5'-GACCAGGAAACCACGACTCA-3'<br>Обратный:<br>5'-TTTCACCGATGTCTCCCTTAGG-3'  | 59                     | 199                   |
| <i>PPARG</i>  | Прямой: 5'- TCAGGTTTGGGCGGATGC-3'<br>Обратный:<br>5'-TCAGCGGGAAGGACTTTATGTATG-3' | 59,5                   | 147                   |

## 2.6.2. Остеогенная дифференцировка

Для оценки способности клеточных культур к остеогенной дифференцировке их культивировали в 12-луночной планшете в стандартных условиях до достижения 100% конфлюентности. Клетки каждого образца культивировали в 9 лунках – 6 экспериментальных, 3 контрольных. По достижении монослоя культуральную среду отбирали и заменяли на индукционную среду состава DMEM, 1 г/л глюкозы, 10% FBS, 100 мг/л CaCl<sub>2</sub>, 0,1 мкМ дексаметазона, 0,2мМ аскорбиновой кислоты, 10мМ глицерол-2-фосфата, 0,11 мг/мл пирувата, 2 мМ L-глутамина. В индукционной среде клетки культивировали 14 дней, смену среды проводили каждые 2-3 дня.

Выраженность остеогенной дифференцировки оценивали с помощью цитохимического окрашивания красителем ализариновым красным (Alizarin Red) (Sigma-Aldrich, #A5533-25G, Германия) и по уровню экспрессии генов основных маркеров остеогенной дифференцировки – остеокальцина (ген *OCN*) и RUNX2 (ген *RUNX2*).

Перед окрашиванием отбирали индукционную среду и фиксировали клетки в предварительно охлажденном 70% этаноле при комнатной температуре в течение 1ч. Далее клетки промывали дистиллированной водой (не содержащей кальций) 2 раза по 5-10 мин, после чего воду отбирали и добавляли раствор Alizarin Red, в котором инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. После инкубации клетки промывали дистиллированной водой 4 раза. Для фотофиксации клетки заливали дистиллированной водой для предотвращения пересыхания. Фотофиксацию производили с помощью цветной камеры Nikon DS-Ri2 (Nikon) микроскопа Nikon Eclipse Ti2 (Nikon, Япония). Изображения анализировали с помощью программного обеспечения NIS Elements AR 5.40.02.

Уровень экспрессии генов основных маркеров остеогенной дифференцировки – остеокальцина и RUNX2 - анализировали так же, как и маркеров адипогенной дифференцировки (описано в п. 2.6.1). Для получения лизатов использовали не окрашенные Alizarin Red клетки. В таблице 6 представлены праймеры, использованные для ПЦР-РВ. Данные для остеокальцина и RUNX2 анализировали с помощью метода  $\Delta\Delta C_t$  [244].

Таблица 6. Праймеры и параметры ПЦР-РВ, использованные для детекции уровня экспрессии генов остеокальцина (*OCN*) и *RUNX2* (*RUNX2*)

| Ген          | Праймеры                                                                       | Температура отжига, °C | Длина ампликона, п.о. |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------|------------------------|-----------------------|
| <i>OCN</i>   | Прямой: 5'-AGCAAAGGTGCAGCCTTTGT-3'<br>Обратный: 5'-CGCCTGGGTCTCTTCACT-3'       | 58                     | 62                    |
| <i>RUNX2</i> | Прямой: 5'-TCTTAGAACAATTTCTGCCCTTT-3'<br>Обратный: 5'-TGCTTTGGTCTTGAAATCACA-3' | 56                     | 136                   |

### 2.6.3. Хондрогенная дифференцировка

Перед индукцией хондрогенной дифференцировки клетки культивировали в стандартных условиях до достижения 60-80% конфлюентности. Для оценки способности клеточных культур к хондрогенной дифференцировке использовали коммерческий набор StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit (Gibco, #A1007101, США), операции проводили согласно протоколу производителя: в лунки 24-луночного планшета наносили капли (объем 5 мкл) клеточной суспензии ( $1,6 \cdot 10^7$  клеток/мл) и инкубировали их в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение 2ч при 37°C в условиях увеличенной влажности. Далее к клеткам добавляли дифференцировочную среду, в которой культивировали их в течение 14 дней, смену среды проводили каждые 2-3 дня. Полученные сфероиды замораживали в реагенте для криоблоков Tissue-Tek® O.C.T. Compound (Sakura Finetek USA, Inc., #4583, США), после чего подготавливали срезы толщиной 10 мкм на криотоме Leica CM1850 (Leica, Германия). Полученные срезы фиксировали в формальдегиде, стабилизированном метанолом (Panreac, #131328, Испания), окрашивали раствором 0,1% альцианового синего (Sigma-Aldrich, #6A3217, Германия) и накрывали покровным стеклом. Фотофиксацию полученных препаратов производили с помощью камеры Axioscam (Carl Zeiss, Германия) микроскопа Axioskop 40 (Carl Zeiss, Германия). Работа была проведена при методической поддержке с.н.с. МНОИ МГУ имени М.В. Ломоносова Ю.Г. Антроповой.

### 2.7. Оценка иммунофенотипа

Для анализа иммунофенотипа (доли клеток (в %), экспрессирующих CD73, CD90, CD105 и не экспрессирующих CD14, CD20, CD34, CD45) клетки снимали с культуральных чашек, как описано в п.2.1. Иммунофенотип определяли с помощью коммерческого набора MSC Phenotyping Cocktail Kit, anti-human, REAfinity (Miltenyi Biotec, #130-125-285, США) согласно методике производителя. Анализ клеток

осуществляли с помощью клеточного сортера BD FACSAria III (BD, Franklin Lakes, NJ, США).

## 2.8. Оценка гормональной чувствительности

Исследовали способность МСК в ответ на воздействие ангиотензина II (5 нМ; Abcam, #ab120183, Великобритания), гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК; 1 мкМ; Abcam, #ab120359, Великобритания), гистамина (1 мкМ; Sigma-Aldrich, #H7125, Германия), глутамата (1 мкМ; Abcam, #ab120049, Великобритания), дофамина (50 мкМ; Sigma-Aldrich, #H8502, Германия), паратиреоидного гормона (ПТГ; 10 нМ; АрехБио, #A1129, США), норадреналина (1 мкМ; Abcam, #ab120717, Великобритания) и серотонина (5-НТ; 10 мкМ; Abcam, #ab120528, Великобритания) активировать сигнальный каскад  $G_{q/11}$ -фосфолипаза C, что выражается в увеличении внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$ . Использовали методику [247] с изменениями. Концентрацию внутриклеточного (цитозольного)  $Ca^{2+}$  количественно оценивали по интенсивности флуоресценции Fluo-8 в отдельных клетках. Fluo-8 AM является зеленым флуоресцентным сенсором, чувствительным к ионам  $Ca^{2+}$  – интенсивность его флуоресценции увеличивается пропорционально количеству связанных ионов  $Ca^{2+}$ ; длина волны возбуждения его максимальной флуоресценции составляет 490 нм, длина волны эмиссии – 520 нм.

За один день до эксперимента клетки высаживали в 24-луночные планшеты в низкой плотности (такой, чтобы конfluence во время эксперимента составляла 10-20%), чтобы избежать воздействия на кальциевую сигнализацию межклеточной коммуникации. За 1 ч до начала эксперимента культуральную среду отбирали и заменяли ее раствором Хенкса (ПанЭко, #P020п, Россия), содержащего 20 мМ ХЕПЕС (Диаэм, #3350.0100, Россия) и 4 мкМ Fluo-8 AM (Abcam, #ab142773, Великобритания), pH 7,2. Инкубировали клетки в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение 1ч (чтобы Fluo-8 успел проникнуть внутрь клеток). Через час регистрировали базовый уровень клеточного ответа (уровень  $Ca^{2+}$ ) в течение 5 мин, после чего добавляли один из гормонов (объем равный объему среды в лунке, содержащий двойную концентрацию гормона, добавляли непосредственно на клетки для достижения лучшего перемешивания) и сразу (не снимая планшет с микроскопа и не останавливая процесс съемки) проводили регистрацию уровня  $Ca^{2+}$  (16 полей зрения на лунку, 10-15 мин). Флуоресценцию регистрировали с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse Ti, оснащенного объективом CFI Plan Fluor



DLL 10X/0.3 (Nikon) и цифровой EMCCD-камерой Andor iXon 897 (Andor Technology), или Nikon Eclipse Ti2 (Nikon, Япония), оснащенного объективом CFI Plan Fluor DL 10XF CH, NA0.3 (Nikon) и цифровой sCMOS-камерой Photometrics Kinetix. Полученные видеозаписи анализировали с помощью программ NIS-Elements 5.21.02 (Nikon BioImaging Lab, Япония, <https://www.microscope.healthcare.nikon.com/>) и ImageJ 1.52i ([251], <https://imagej.net/ij/>), а именно измеряли изменение интенсивности флуоресценции для каждой клетки относительно ее интенсивности флуоресценции до добавления гормона. Считали, что клетка ответила на гормональную стимуляцию, если интенсивность ее флуоресценции после добавления гормона изменилась. Далее определяли процент ответивших на гормональную стимуляцию клеток, а именно отношение числа ответивших клеток к числу всех клеток, попавших в поля зрения при съемке. Число клеток определяли с помощью модели segment.ai в NIS Elements. Контролем служили клетки того же образца, но не подвергшиеся гормональной стимуляции.

Чувствительность МСК к инсулину оценивали по инсулин-зависимой активации каскадов Ras/Erk и PI3K/Akt (фосфорилированию Akt и Erk) с помощью иммуноблоттинга (вестерн-блоттинга). Для этого клетки культивировали в культуральных 6-луночных планшетах до достижения 70% конфлюентности. За 24 ч до добавления инсулина (100 нМ; (Sigma-Aldrich, #I3536, США)) культуральную среду меняли на бессывороточную. Лунки инкубировали в среде с инсулином в течение 5 мин, 15 мин, 30 мин, 60 мин). Далее клетки (включая контрольные клетки, не подвергавшиеся воздействию инсулина) промывали раствором Версена и лизировали в 100 мкл буфера Лэммли 2X Laemmli Sample Buffer (Biorad, #1610737, США), после чего инкубировали на льду в течение 5 мин и хранили до момента исследования при -80°C. Далее в образцы вносили β-меркаптоэтанол в соотношении 1:20, после чего инкубировали в течение 5 мин при 95°C и в случае необходимости замораживали при -20°C. Далее проводили электрофорез образцов в 10% полиакриламидном геле (SDS-PAGE) в денатурирующих условиях согласно стандартному протоколу (параметры - 30-40 мин, постоянное напряжение 100 В; маркер молекулярной массы PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa (Thermo Scientific™, #26619, США)) и осуществляли влажный перенос на PVDF-мембрану (параметры - 60 мин, сила тока 300 мА) в холодной комнате. С целью предотвращения неспецифической сорбции на мембране первичных и вторичных антител после электропереноса проводили

блокирование не связавших белок участков мембраны инкубированием в 5% бычьего сывороточного альбумина (BSA), приготовленного в буфере TBST (состава 20 мМ Трис-НСl pH 7,6, 150 мМ NaCl, 0,1% Tween 20) в течение 1 ч при комнатной температуре. PVDF-мембрану инкубировали с первичными антителами к фосфорилированной форме Akt (Phospho-Akt (Thr308) (244F9) Rabbit mAb) (Cell Signaling Technology Inc., #4056, США) и Erk1/2 (Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (E10) Mouse mAb) и винкулину (белок «домашнего хозяйства») (Sigma-Aldrich, #V9131, Германия) в течение 8-12 ч при 4 °С. Далее мембрану промывали 3 раза по 5 мин в буфере TBST, после чего инкубировали с вторичными антителами, меченными пероксидазой хрена - Goat Anti-Rabbit IgG Peroxidase Conjugate (Sigma-Aldrich, #DC03L, Германия) и Goat Anti-Mouse IgG Peroxidase Conjugate (Sigma-Aldrich, #DC02L, Германия), в течение 1 ч при комнатной температуре. В качестве маркера молекулярной массы использовали PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa (ThermoFisher Scientific, #26616, США). Окрашивание PVDF-мембраны проявляли с помощью набора Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (для усиленной хемилюминесценции) (Pierce™, США) и системы визуализации ChemiDoc™ Touch Imaging System (Bio-Rad, США).

## 2.9. Кариотипический анализ

«Для анализа кариотипа готовили препараты метафазных хромосом. Для этого останавливали митоз на стадии метафазы путем добавления в культуральную среду 0.1 мкг/мл колцемида. Через 3 ч клетки снимали с чашек Петри 0,25% раствором трипсина-ЭДТА (ПанЭко, #П043п, Россия). Далее проводили их гипотоническую обработку, для чего культуральную среду отбирали и инкубировали в смеси растворов 0,55 % KCl и 1 % цитрата натрия в соотношении 1:1 в течение 20 мин при комнатной температуре. Далее клетки фиксировали смесью метанола и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3:1 три раза по 20 мин. Полученную суспензию клеток в небольшом количестве фиксатора раскапывали на предметные стекла над водяной баней при температуре 48°C. Дифференциальное окрашивание хромосом на G-диски выполняли методом, описанным в [248]. Для подсчета числа хромосом в клетках, кариотипирования и оценки доли полиплоидных клеток в популяции использовали микроскоп Axio Scope.A1 (Carl Zeiss, Германия), оборудованный системой анализа изображений хромосом «ВидеоТесТ-Карио 3.1.» (ВидеоТесТ) и микроскоп Axio Imager A2 (Carl Zeiss, Германия), оснащенный Ikaros4 Karyotyping System (MetaSystems). Для каждой из исследованных клеточных линий

анализировали не менее 50 метафазных пластинок. Кариотипы клеток и структурно перестроенные хромосомы описывали в соответствии с Международной номенклатурой хромосом человека [249]» [165].

## **2.10. Получение и концентрирование секрета МСК**

Для получения кондиционированной среды МСК (секрета) клетки культивировали в стандартных условиях до достижения 80-100% конfluence. Далее клетки промывали раствором Хенкса (ПанЭко, #P020п, Россия) 2 раза по 10 мин, после чего добавляли бессывороточную среду DMEM (Gibco, #11054020, США) без фенолового красного, содержащую 1 г/л глюкозы (Gibco, #11885084, США), 1 мМ пирувата (Thermo Fischer Scientific, США), 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Gibco, #15240062, США). Клетки культивировали в этой среде в стандартных условиях в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение 7 суток. На седьмые сутки секретом собирали и центрифугировали при 300 g в течение 10 мин для очистки от клеточного дебриса. Далее секретом концентрировали с помощью концентраторов центрифужных с пределом эксклюзии 10 кДа Vivaspin® 20 MWCO 10 kDa (Sartorius, #VS2002, Германия) при 4000 g с целью получения тотальной белковой фракции (полученный секретом содержал и везикулы, и растворимые белки). Секретом концентрировали в зависимости от задачи, вплоть до 100 раз. Образцы концентрированного секрета быстро замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -80°C.

В случае использования секрета для анализа методом ИФА для предотвращения деградации белков перед заморозкой в образцы добавляли 1 мМ PMSF (ингибитор сериновых протеаз) (ThermoFisher Scientific, #36978), разведенного в изопропанолу.

## **2.11. Изучение состава секрета МСК<sub>ТЕРТ</sub>: протеомный анализ**

Для определения качественного состава секрета проводили протеомный анализ хромато-масс-спектрометрическим методом. Для этого клетки культивировали в стандартных условиях до достижения 80-100% конfluence (для 1 образца - 7 чашек Петри диаметром 10 см). Для получения секрета этих клеток их культивировали в среде, описанной в п. 2.10, в течение 16 ч, после чего промывали 2 раза раствором Хенкса по 10 мин, добавляли культуральную среду аналогичного состава и культивировали в ней в течение 24 ч. Полученный секретом концентрировали в 100 раз, как описано в п. 2.10.

Для подготовки секрета к протеомному анализу сначала получали пептиды методом трипсинолиза, для чего образцы секрета с количеством белка 10-30 мкг разводили в 50 мМ буфере гидрокарбонат-аммония (pH 8,5), содержащем 0,05% солюбилизирующего реагента RapiGest (Waters, #186001861, США), до конечной концентрации белка 10 мкг/мкл. Далее образцы последовательно инкубировали 1) в восстанавливающих условиях (в растворе 2 мМ трис-карбоксиэтилфосфина (Sigma-Aldrich, #C4706-10G, Германия) в течение 1 ч при 60°C), 2) в условиях алкилирования аминокислотных остатков цистеина (в растворе 4мМ метилметантиосульфата (Sigma-Aldrich, #64306, Германия) в течение 15 мин при комнатной температуре), 3) в условиях получения пептидов (в растворе 4 нг/мкл модифицированного свиного трипсина (ПанЭко, #9002-07-7, Россия)) в течение 16 часов при 37°C. По истечении 16 ч для остановки процесса трипсинолиза добавляли муравьиную кислоту (Applichem, #131030, Германия) до конечной концентрации 0,1%. Смесь полученных пептидов очищали с помощью хроматографических колонок HLB Oasis (Waters, #WAT106202, США) согласно методике производителя. Полученные пептиды хранили при температуре -80°C до проведения хромато-масс-спектрометрического анализа. Хромато-масс-спектрометрический анализ полученных пептидов проводили на базе ЦКП ГНЦ ФГБУН Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН на приборах Ultimate 3000nano UPLC (ThermoFisher Scientific, США) и timsTOF Pro (Bruker, США). Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения MaxQuant v2.6.7.0 (Max Planck Institute of biochemistry, Германия, [250]) согласно рекомендации разработчиков.

## **2.12. Изучение количественного содержания компонентов секрета МСК<sub>ТЕСТ</sub>: иммуноферментный анализ и ПЦР-РВ**

Исследовали количественное содержание:

- основных нейропротективных и проангиогенных факторов, которые играют ключевую роль в процессах реиннервации и васкуляризации регенерирующей ткани (BDNF, HGF, VEGF-A, uPA), с помощью метода ИФА; образцы секрета получали, как описано в п. 2.10; использовали коммерческие наборы Human Free BDNF Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, #DBD00, США), Human HGF Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, #DHG00, США), Human VEGF Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, #DVE00, США), Human uPA ELISA Kit (URK) (Abcam, #ab119611, Великобритания) и рекомендации производителя; результат ИФА

детектировали с помощью прибора xMark™ Microplate Absorbance Spectrophotometer (BioRad, США); полученное количество белков нормировали на количество клеток каждого образца, от которых был получен соответствующий образец секрета,

- основных компонентов SASP (описано в п. 2.5.2).

Оценку содержания провоспалительных и противовоспалительных молекул проводили на основании измерения уровня экспрессии их генов с помощью метода ПЦР-РВ (описано в п. 2.3.1, использованные праймеры представлены в таблице 7):

- основных провоспалительных молекул (IL-1 $\alpha$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ),
- основных противовоспалительных молекул (IL-4, IL-10, IL-13, TGF- $\beta$ 1, IDO).

Таблица 7. Праймеры и параметры ПЦР-РВ, использованные для детекции уровня экспрессии генов нейропротективных и проангиогенных, провоспалительных и противовоспалительных факторов

| Целевая мРНК   | Праймеры (прямой и обратный соответственно)               | Температура отжига, °C | Длина ампликона, п.о. |
|----------------|-----------------------------------------------------------|------------------------|-----------------------|
| BDNF           | 5'-TTAGGGGTCAAGGTGGGCTA-3'<br>5'-AGGCTCCAAGGGAACCTTGTG-3' | 57                     | 236                   |
| HGF            | 5'-ACCACACCGGCACAAATTCT-3'<br>5'-ATCCCAACGCTGACATGGAAT-3' | 58                     | 274                   |
| VEGF-A         | 5'-ATCAAACCTCACCAAGGCCAG-3'<br>5'-AGGCCACAGGGAACGC-3'     | 58,5                   | 183                   |
| uPA            | 5'-ATTGCGACTGCCTGAATGGA-3'<br>5'-TCCGACCTGCACATAACACC-3'  | 58                     | 326                   |
| IL-1 $\alpha$  | 5'-AGTAGCAACCAACGGGAAGG-3'<br>5'-ATGTAATGCAGCAGCCGTGA-3'  | 58                     | 256                   |
| IL-6           | 5'-TGCAATAACCACCCCTGACC-3'<br>5'-ATTTGCCGAAGAGCCCTCAG-3'  | 57,5                   | 150                   |
| TNF- $\alpha$  | 5'-CTCTCTGCCATCAAGAGCCC-3'<br>5'-TCCCAAAGTAGACCTGCCCA-3'  | 58                     | 181                   |
| IL-4           | 5'-TTTGCTGCCTCCAAGAACAC-3'<br>5'-GTTCTGTCTGAGCCGTTTCA-3'  | 57                     | 171                   |
| IL-10          | 5'-TGCTCTGTTGCCTGGTCCT-3'<br>5'-GTCTGGGTCTTGGTTCTCAGC-3'  | 58,5                   | 296                   |
| IL-13          | 5'-CATCCGCTCCTCAATCCTCTC-3'<br>5'-GGGTCTTCTCGATGGCACTG-3' | 58                     | 286                   |
| TGF- $\beta$ 1 | 5'-AAGTGGACATCAACGGGTTC-3'<br>5'-GAGGCAGAAGTTGGCATGGT-3'  | 56                     | 272                   |
| IDO            | 5'-CAACCCCCAGCTATCAGACG-3'<br>5'-GGAGGAACTGAGCAGCATGT-3'  | 58                     | 161                   |

## 2.13. Биологическая активность секрета МСК<sub>ТЕРТ</sub>

### 2.13.1. Модель нейритогенеза *in vitro*

Изучали стимуляцию роста нейритов сенсорных дорсальных корешковых ганглиев мышей в присутствии секрета МСК в культуральной среде. Для проведения экспериментальной работы были использованы мыши CD-1 (возраст 3 месяца, вес 21-24 г) вивария Факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова. Все процедуры с экспериментальными животными проводили в строгом соответствии с Директивой 2010/63/ЕС и разрешениями Комитета по биоэтике МГУ имени М.В. Ломоносова (№3.4 от 21.03.2021 г., №3.5 от 17.03.2022 г.).

Мышей умерщвляли путем медленного повышения концентрации углекислого газа во вдыхаемом воздухе, проводили эксангвинацию, вскрывали кожу и выделяли сенсорные дорсальные ганглии, расположенные паравертебрально. После извлечения их очищали механическим способом от остатков соединительных тканей и помещали среду культивирования DMEM с низким содержанием глюкозы 1 г/л (Gibco, #11054020, США) с добавлением смеси 400 ед/мл пенициллина и 400 мкг/мл стрептомицина (Gibco, #15240062, США). В стерильных условиях в боросиликатные камеры Nunc™ Lab-Tek™ Borosilicate Chambered Coverglass (Thermo Scientific™, #155383, США) наносили капли матригеля Corning® Matrigel® Growth Factor Reduced (GFR) Basement Membrane Matrix (Corning, #354230, США), инкубировали их при 37°C в течение 5 мин, после чего аккуратно наносили на них ганглии. Далее аккуратно наносили бессывороточную среду DMEM (Gibco, #11054020, США), содержащую 1% L-глутамина (Gibco, #11539876, США) и 100ед/мл пенициллина и 100мкг/мл стрептомицина (Gibco, #15240062, США) с добавлением 10% 50-кратно концентрированного секрета пМСК или МСК<sub>ТЕРТ</sub>. В образцы отрицательного контроля наносили среду аналогичного состава, но без добавления секрета. Ганглии культивировали в течение 7-14 суток в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в стандартных условиях при повышенной влажности. Для регистрации динамики роста нейритов каждые 3 дня проводили фотофиксацию с помощью инвертированного микроскопа Nikon Eclipse Ti2 (Nikon, Япония), оснащенного цифровой монохромной камерой Kinetix (Teledyne Photometrics, США) и цветной камерой Ri2 (Nikon, Токио, Япония). Анализ полученных изображений осуществляли в программах NIS Elements AR 5.40.02 и ImageJ v. 1.54c (<https://imagej.net/ij/index.html>).

Для подтверждения того, что выросшие из ганглия отростки являются нейритами, использовали иммунофлуоресцентное окрашивание. Все процедуры проводили при 37°C для избежания деполимеризации матригеля, промывки образцов до процедуры «забивки» проводили с помощью буфера PBS, содержащего 0,01% азид натрия ( $\text{NaN}_3$ ). Перед окрашиванием образцы промывали в течение 1 ч. Далее образцы фиксировали добавлением теплого раствора 4% формальдегида в буфере PBS в течение 4-6 ч, после чего промывали в течение 4-6 ч. Далее проводили пермеабиллизацию. Для этого образцы инкубировали в буфере состава PBS, 0,2% Triton X-100, 0,01%  $\text{NaN}_3$  в течение 12 ч, после чего промывали в течение 4-6 ч. Все последующие процедуры проводили в буфере PBS с добавлением детергента 0,25% Triton X-100 и 0,01%  $\text{NaN}_3$ . Проводили «забивку» для блокировки неспецифического связывания вторичных антител. Для этого образцы инкубировали в буфере PBS с добавлением 5% BSA, 0,25% Triton X-100, 0,01%  $\text{NaN}_3$  в течение 12 ч. Далее в каждую лунку наносили 250 мкл раствора разведенных в соотношении 1:100 первичных антител мыши к высокомолекулярному NF200 белку нейрофиламентов человека, мыши и крысы Anti-NF200 antibody (monoclonal) mouse (MyBioSource, #MBS175078, США), приготовленных в буфере аналогичного состава и инкубировали образцы в течение 12 ч, после чего образцы промывали в течение 4-6 ч. Далее добавляли 350 мкл раствора разведенных в соотношении 1:1000 вторичных антител козы Goat anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 594 (ThermoFisher Scientific, #A11032, США) и инкубировали в течение 12 ч, после чего образцы промывали в течение 4-6 ч. В качестве отрицательного контроля использовали мышиные неспецифические IgG1, κ (BD Pharmingen™, BD Biosciences, #555746, США). Далее окрашивали ядра мигрировавших из ганглиев клеток с помощью флуоресцентного красителя DAPI. Для этого в лунки наносили 400 мкл раствор DAPI, разведенного 1:10000 в буфере PBS, содержащем 0,01%  $\text{NaN}_3$  в течение 4-6 ч, после чего образцы промывали в буфере PBS, содержащем 0,01%  $\text{NaN}_3$ , в течение 4-6 ч. Далее раствор заменяли на буфер PBS, содержащий 0,01%  $\text{NaN}_3$  и проводили фотофиксацию на конфокальном микроскопе LSM 780, оснащенным программным обеспечением ZEN2010 (Zeiss, Германия). Обработку изображений проводили в программе ImageJ (NIH) 1.52i ([251], <https://imagej.net/ij/>).

### 2.13.2. Модель дифференцировки фибробластов в миофибробласты

Моделирование дифференцировки фибробластов в миофибробласты проводили в условиях *in vitro* с использованием культур клеток фибробластов кожи человека. Для этого клетки высевали в культуральные планшеты в концентрации  $1,5 \times 10^4$  клеток/см<sup>2</sup> и культивировали в течение 24 ч в среде DMEM с низким содержанием глюкозы 1 г/л (Gibco, #10567014, США) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) (ThermoFisher Scientific, #26140079, США), смеси 100ед/мл пенициллина и 100мкг/мл стрептомицина (Gibco, #15240062, США). Далее культуральную среду заменяли на среду аналогичного состава, но не содержащую FBS, и культивировали в течение 16 ч. Далее культуральную среду заменяли на свежую среду, не содержащую FBS: либо с добавлением 5 нг/мл TGF- $\beta$ 1 (Cell Signaling Technology, #75362, США) для индукции дифференцировки фибробластов в миофибробласты (положительный контроль), либо без добавления TGF- $\beta$ 1 (отрицательный контроль), либо с добавлением 5 нг/мл TGF- $\beta$ 1 и фракции секрета МСК, обогащенной внеклеточными везикулами в концентрации 5х (экспериментальные образцы), и культивировали клетки в течение 4 дней в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°C.

По истечении 4 суток клетки исследовали с помощью иммуоцитохимии. Для этого их промывали раствором Хенкса (ПанЭко, #P020п, Россия), после чего фиксировали раствором 4% параформальдегида (PanReas Applichem, #141328, Германия), приготовленном на фосфатно-солевом буферном растворе Дульбекко (DPBS) (ПанЭко, #P061, Россия), в течение 10 мин при комнатной температуре, и далее пермеабелизировали раствором 0,1% Triton X-100 в течение 10 мин при комнатной температуре. Далее блокировали неспецифическое связывание антител инкубированием в растворе, содержащем 10% нормальной козьей сыворотки и 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА) (ПанЭко, #PM-T1725.50, Россия). Далее клетки инкубировали с антителами кролика к альфа-гладкомышечному актину ( $\alpha$ -SMA) (Abcam, #ab32575, Великобритания) или с изотипическими IgG кролика (Santa Cruz Biotechnology, #NSC-2025, США) в течение ночи при 4°C. Для окрашивания F-актина клетки в тех же лунках инкубировали с фаллоидином, меченным флуоресцентным Alexa 594 (Invitrogen™, #A12381, США), согласно протоколу производителя, в течение ночи при 4°C. Далее для детекции первичных антител добавляли вторичные антитела, конъюгированные с Alexa Fluor 488 (Invitrogen™, #A11037, США), и инкубировали в темноте в течение 1 ч при



комнатной температуре. Ядра окрашивали с помощью DAPI (Sigma-Aldrich, #D9542, США) согласно протоколу производителя. Для получения изображений использовали микроскоп Leica, оснащенный флуоресцентным модулем DMi8 и камерой DFC 7000 T (Leica Microsystems GmbH, Германия). Полученные изображения обрабатывали с помощью программного обеспечения LasX (Leica Microsystems GmbH, Германия) и FIJI (GitHub Inc., США).

Содержание  $\alpha$ -SMA в клетках определяли с помощью иммуноблоттинга (вестерн-блоттинга). Для этого клетки культивировали на 6-луночных планшетах до достижения 80-90% конфлюента, после чего лизировали с помощью 1% SDS раствора (приготовленного на буфере PBS (ПанЭко, #P071-1/B-60201, Россия)). Определяли количество белка с помощью коммерческого набора Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific™, #A65453, США), далее проводили электрофорез образцов в 12% полиакриламидном геле (SDS-PAGE) в денатурирующих условиях согласно стандартному протоколу и осуществляли влажный перенос на PVDF-мембрану, параметры 45 минут, 110 В. С целью предотвращения неспецифической сорбции на мембране первичных и вторичных антител после электропереноса проводили блокирование не связавших белок участков мембраны инкубированием в 5% растворе обезжиренного молока, приготовленного в буфере PBST (состава 0,01 М фосфатно-солевой буфер (PBS, 4436.0500, diaGene, Россия), 0,001 % Tween 20) в течение 1 ч при комнатной температуре. PVDF-мембрану инкубировали с разведенными в соотношении 1:1000 первичными антителами к  $\alpha$ -SMA (Abcam, #ab32575, Великобритания) и винкулину (Sigma-Aldrich, #V4139) в течение ночи при 4 °C. Далее мембрану промывали в буфере TBST, после чего инкубировали с разведенными в соотношении 1:6000 вторичными антителами, меченными пероксидазой хрена (Имтек, P-GAR Iss, Россия), в течение 1 ч при комнатной температуре. В качестве маркера молекулярной массы использовали PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa (ThermoFisher Scientific, #26616, США). Окрашивание PVDF-мембраны проявляли с помощью набора Clarit Western ECL Substrate (BioRad, #170506, США) (для усиленной хемилюминесценции) и системы визуализации ChemiDoc™ Touch Imaging System (Bio-Rad, США).

#### **2.14. Безопасность секретома MCK<sub>ТЕРТ</sub>**

В качестве параметров оценки безопасности секретома MCK<sub>ТЕРТ</sub> были выбраны следующие: 1) отсутствие теломеразы (ее ДНК, мРНК, белка) в составе секретома, 2)

отсутствие стимуляции опухолевой трансформации, выражающейся в образовании колоний при воздействии секрета МСК<sub>TERT</sub> на клетки человека в soft agar colony formation assay, 3) отсутствие увеличения экспрессии онкогенов при воздействии секрета МСК<sub>TERT</sub> на клетки человека (на примере фибробластов; по данным транскриптомного анализа).

#### **2.14.1. Содержание теломеразы (в виде ДНК, мРНК, белка) в секрете**

Секретом МСК<sub>TERT</sub> получали и концентрировали в 100 раз (для увеличения вероятности обнаружения теломеразы), как описано в п. 2.10.

ДНК теломеразы детектировали с помощью ПЦР-РВ. Для этого тотальную ДНК выделяли из 100-кратно концентрированного секрета МСК<sub>TERT</sub> фенол-хлороформным методом (описан в п. 2.3.3) с переосаждением изопропанолом и использовали в качестве матрицы для ПЦР-РВ, который проводили, как описано в п. 2.3.1.

мРНК теломеразы детектировали с помощью ПЦР-РВ. Для этого тотальную РНК выделяли из 100-кратно концентрированного секрета МСК<sub>TERT</sub>, на ее основе получали тотальную кДНК, которую использовали в качестве матрицы для ПЦР-РВ, как описано в п. 2.3.1.

Белок теломеразы в составе 100-кратно концентрированного секрета детектировали с помощью вестерн-блоттинга, как описано в п. 2.3.2.

#### **2.14.2. Soft agar colony formation assay**

Трансформирующая активность секрета может проявляться в его способности стимулировать опухолевую трансформацию обработанных клеток, что выражается в образовании ими колоний в условиях разреженной популяции на мягком агаре (soft agar colony formation assay).

Для этого метода были использованы первичные культуры фибробластов дермы человека от двух доноров, доведенные до 5-8 пассажа. Фибробласты человека культивировали и снимали с культуральных чашек, как описано в п. 2.1. Перед посадкой в культуральные планшеты, суспензии фибробластов очищали от клеточных агрегатов с помощью фильтрации суспензии через клеточное сито Falcon® 40 µm Cell Strainer (Corning, #352340, США); подсчет клеток осуществляли с помощью камеры Горяева. В лунки планшета наносили клеточную суспензию фибробластов, подготовленную следующим способом (из расчета 500 клеток/500 мкл (на 1 лунку)): смешивали с

раствором (имеющим температуру 39°C), состоящим из предварительно стерилизованного автоклавированием раствора 0,8% агарозы (приготовленном в культуральной среде DMEM с низким содержанием глюкозы 1 г/л (Gibco, #11885084, США), не содержащей сыворотку и пенициллин/стрептомицин) и предварительно стерилизованного с помощью фильтров с диаметром пор 0,2 мкм раствора культуральной среды DMEM (DMEM, 4мМ L-глутамин (Gibco, #11539876, США), 200ед/мл пенициллина, 200мкг/мл стрептомицина (Gibco, #15240062, США), 5% BSA (ThermoFisher Scientific, #26140079, США)) в соотношении 1:1.

Перед нанесением суспензии фибробластов 12-луночные планшеты подготавливали следующим способом. Дно покрывали стерилизованным автоклавированием раствором 1% агарозы (Panreac AppliChem, #A2114,0250, Германия), приготовленном в культуральной среде DMEM с низким содержанием глюкозы 1 г/л (Gibco, #11885084, США), не содержащей сыворотку и пенициллин/стрептомицин, и инкубировали до достижения полной полимеризации агарозы. После нанесения суспензии клеток, планшет также инкубировали в течение 40 мин при комнатной температуре в стерильных условиях для полимеризации агарозы. По достижении полимеризации в лунки наносили 500 мкл жидких растворов: в экспериментальные образцы – 10-кратно концентрированный секретом, для отрицательного контроля - культуральную среду для фибробластов (описана в п. 2.1), для положительного контроля - культуральную среду для фибробластов, содержащую 3мМ NaNO<sub>2</sub> (согласно [252]), либо 0,01% диметилсульфата (DMS) (согласно [253]). Фибробласты культивировали в стандартных условиях в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение 2 недель, жидкие растворы меняли каждые 3 суток. В силу того, что DMS вызывает полную гибель клеток после 24 ч воздействия, для группы положительного контроля, индуцированной DMS, через 6 ч после нанесения раствора DMS жидкую среду заменяли на полную среду роста фибробластов и продолжали культивирование в ней.

Фотофиксацию образования колоний осуществляли следующим образом: сразу после нанесения жидких растворов (точка сравнения), далее - на 3й, 7й, 14й день с помощью инвертированного микроскопа Nikon Eclipse Ti2 (Nikon, Япония) в проходящем свете. По полученным изображениям подсчитывали абсолютное и относительное количество одиночных клеток, клеточных дуплетов и колоний.

### **2.14.3. Влияние секрета МСК<sub>ТЕРТ</sub> на экспрессию протоонкогенов и генов-супрессоров опухолевого роста культивируемых в присутствии секрета клеток**

Трансформирующая активность секрета может проявляться в его способности изменять транскрипционную активность культивируемых в его присутствии клеток и стимулировать в них увеличение экспрессии протоонкогенов или снижение экспрессии генов-супрессоров опухолевого роста (антионкогенов). Поэтому был проведен транскриптомный анализ первичных культур фибробластов дермы человека, культивируемых в условиях присутствия секрета в культуральной среде.

Были использованы культуры клеток от двух доноров, доведенные до 5-8 пассажа. Фибробласты человека культивировали на чашках Петри диаметром 10 см и снимали с них, как описано в п. 2.1. По достижении 80-90% конфлюентности клеточной культуры культуральную среду заменяли: для экспериментальных образцов - на неконцентрированный секрет МСК (первичных культур или immortalized), для отрицательного контроля - на культуральную среду для фибробластов (п. 2.1), для положительного контроля - на культуральную среду для фибробластов, содержащую 3мМ NaNO<sub>2</sub> (согласно [252]), либо 0,01% диметилсульфата (DMS) (согласно [253]). Далее клетки культивировали, как описано в п. 2.13.2. по прошествии 7 дней культивирования фибробласты снимали с культуральных чашек (как описано в п. 2.1), полученные суспензии промывали два раза последовательным центрифугированием и заменой супернатанта на стерильный раствор Хенкса (ПанЭко, #P020п, Россия), клетки подсчитывали с помощью камеры Горяева и замораживали в жидком азоте, после чего хранили при температуре -80°C. Образцы осадков фибробластов далее использовали для выделения тотальной РНК (как описано в п. 2.3.1), которую использовали для проведения транскриптомного анализа (был выполнен к.б.н. Е.И. Шагимардановой (в.н.с. Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО "Казанский (Приволжский) федеральный университет"). При транскриптомном анализе исследовали изменение экспрессии протоонкогенов и генов-супрессоров опухолевого роста. Биоинформатический анализ полученных результатов был проведен Е.С. Чечехиной (м.н.с. МГУ им. М.В.Ломоносова) и к.м.н. В.И. Чечехиным (ст. преп. МГУ им. М.В.Ломоносова).

### **2.15. Статистическая обработка данных**

Статистическую обработку данных проводили с помощью программ GraphPad Prism 10.4.1 (GraphPad Software, Boston, Massachusetts USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)) и MS

Excel 16.93. Для определения статистической значимости различий между двумя независимыми выборками (включая контрольную и экспериментальную группы) использовали U-критерий Манна-Уитни, в случае множественных сравнений проводили коррекцию уровня значимости по методу Холма-Шидака. Для определения статистической значимости различий между параметрами нескольких клеточных линий использовали однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA); в случае подтверждения достоверности различий – с последующей коррекцией уровня значимости по методу Даннета (при сравнении экспериментальных групп с контрольной) или методу Холма-Шидака (при сравнении некоторых экспериментальных групп между собой). Данные представляли как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение. Критерием значимости различий между группами считали  $p < 0,05$ .

### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ<sup>5</sup>

В регенеративной медицине стоят фундаментальные и прикладные задачи, для решения которых создаваемые клеточные культуры должны обладать свойствами модельного объекта и должны позволять получать на их основе биомедицинские клеточные и бесклеточные продукты. Поэтому наше исследование мы построили по схеме, представленной на рисунке 9, согласно которой для полноценной характеристики клеточной культуры необходимо было ответить на каждый из поставленных вопросов.

---

<sup>5</sup> Положения раздела «Результаты» опубликованы в следующих статьях, подготовленных автором лично или в соавторстве:

1. Karagyaour M., **Primak A.**, Basalova N., Monakova A., Tolstoluzhinskaya A., Kulebyakina M., Chechekhina E., Skryabina M., Grigorieva O., Chechekhin V., Yakovleva T., Turilova V., Shagimardanova E., Gazizova G., Vigovskiy M., Kulebyakin K., Sysoeva V., Dyachkova U., Dzhauari S., Bozov K., Popov V., Akopyan Z., Efimenko A., Kalinina N., Tkachuk V. Safety and Regenerative Properties of Immortalized Human Mesenchymal Stromal Cell Secretome // International Journal of Molecular Sciences. - 2025. - V. 26. - № 19. – P. 9322. EDN: ROMNFP. Импакт-фактор 1,273/4,9 (SJR 2024/ JIF 2024).
2. **Primak A.**, Kalinina N., Skryabina M., Usachev V., Chechekhin V., Vigovskiy M., Chechekhina E., Voloshin N., Kulebyakin K., Kulebyakina M., Grigorieva O., Tyurin-Kuzmin P., Basalova N., Efimenko A., Dzhauari S., An-tropova Y., Plyushchii I., Akopyan Z., Sysoeva V., Tkachuk V., Karagyaour M. Novel Immortalized Human Multipotent Mesenchymal Stromal Cell Line for Studying Hormonal Signaling // International Journal of Molecular Sciences. - 2024. - V. 25. - № 4. – P.2421. - EDN: ACPGVC. Импакт-фактор 1,273/4,9 (SJR 2024/ JIF 2024).



Рисунок 9. Схема исследования.

### 3.1. Получение культур иммортализованных МСК жировой ткани

#### 3.1.1. Оценка теломеразного статуса МСК<sub>TERT</sub>: анализ экспрессии *hTERT*, содержания белка *hTERT*, активности теломеразы и длины теломер

Трансдукцией лентивирусным вектором pVLT-EF1a-*hTERT*-puro, несущим последовательность кДНК *hTERT*, были получены 3 культуры иммортализованных МСК (МСК<sub>TERT</sub>) из культур первичных МСК подкожного жира «здоровых доноров, которые имели индекс массы тела 18-25 и не имели метаболических/эндокринных нарушений: МСК<sub>TERT</sub>-1 (от донора мужчины возраста 19 лет), МСК<sub>TERT</sub>-2 (от донора мужчины возраста 26 лет), МСК<sub>TERT</sub>-3 (от донора женщины возраста 53 года)» [165].

Полученные культуры МСК<sub>TERT</sub> характеризовали по следующим параметрам: 1) уровень экспрессии гена *hTERT* (содержание мРНК белковой субъединицы теломеразы), 2) наличие белковой субъединицы теломеразы, 3) активность теломеразы, 4) длина теломер. В качестве отрицательного контроля использовали первичную культуру МСК жировой ткани человека второго пассажа (пМСК 2п), в качестве положительного контроля – коммерческую линию иммортализованных МСК жировой ткани человека ASC52telo (ATCC, #SCRC-4000, США).

1) Уровень экспрессии гена *hTERT* (содержания мРНК белковой субъединицы теломеразы) анализировали методом ПЦР-РВ (рис. 10 А). Значения нормировали на уровень экспрессии *hTERT* культур пМСК второго пассажа. Относительное

количество мРНК *hTERT* было в 2,5-6 раз больше в культурах МСК<sub>TERT</sub> по сравнению с пМСК. При пассировании экспрессия гена *hTERT* сохранялась (исследовано до 44 пассажа включительно) – относительное количество мРНК значимо не уменьшалось.

- 2) Одним из двух важных компонентов функционально активной теломеразы является ее белковая субъединица, которая обычно отсутствует в соматических дифференцированных клетках человека и клетках поздних пассажей. Ее наличие подтверждали с помощью вестерн-блоттинга, в качестве белка для нормировки использовали  $\alpha$ -тубулин. Согласно результатам, все полученные культуры МСК<sub>TERT</sub> содержали белок теломеразы. Он также детектировался и в клеточном лизате нетрансдуцированных МСК второго пассажа (рис. 10 Б), что согласуется с данными Trachana et al. [254]. Отметим, что ввиду этого вестерн-блоттинг является менее предпочтительным при валидации успешности получения immortalized культур, чем анализ активности теломеразы.
- 3) Активность теломеразы анализировали методом ПЦР-РВ с помощью коммерческого набора Telomerase Activity Quantification qPCR Assay Kit (Sciencell, #8928, США). Значения нормировали на активность теломеразы культур пМСК второго пассажа. Результаты показали, что несмотря на наличие белкового компонента теломеразы в культурах пМСК (рис. 10 Б), теломераза в них практически не активна (рис. 10 В). Во всех же полученных культурах МСК<sub>TERT</sub> теломераза функционально активна (активность в 108-398 раз выше, чем в культурах пМСК); активное состояние сохраняется при пассировании, причем у двух культур (МСК<sub>TERT</sub>-2 и МСК<sub>TERT</sub>-3) активность теломеразы при пассировании возрастала (рис. 10 В).
- 4) Подтверждением активности теломеразы является также поддержание длины теломер клеток при пассировании. Длину теломер анализировали методом ПЦР-РВ с помощью коммерческого набора Relative Human Telomere Length Quantification qPCR Assay Kit (Sciencell, #8908, США). Трансдукция геном *hTERT* привела к увеличению длины теломер по сравнению с нетрансдуцированными культурами пМСК в более чем 2 раза, что было характерно и для положительного контроля - линии ASC52telo. При пассировании длина теломер полученных культур МСК<sub>TERT</sub> не уменьшалась (рис. 10 Г).

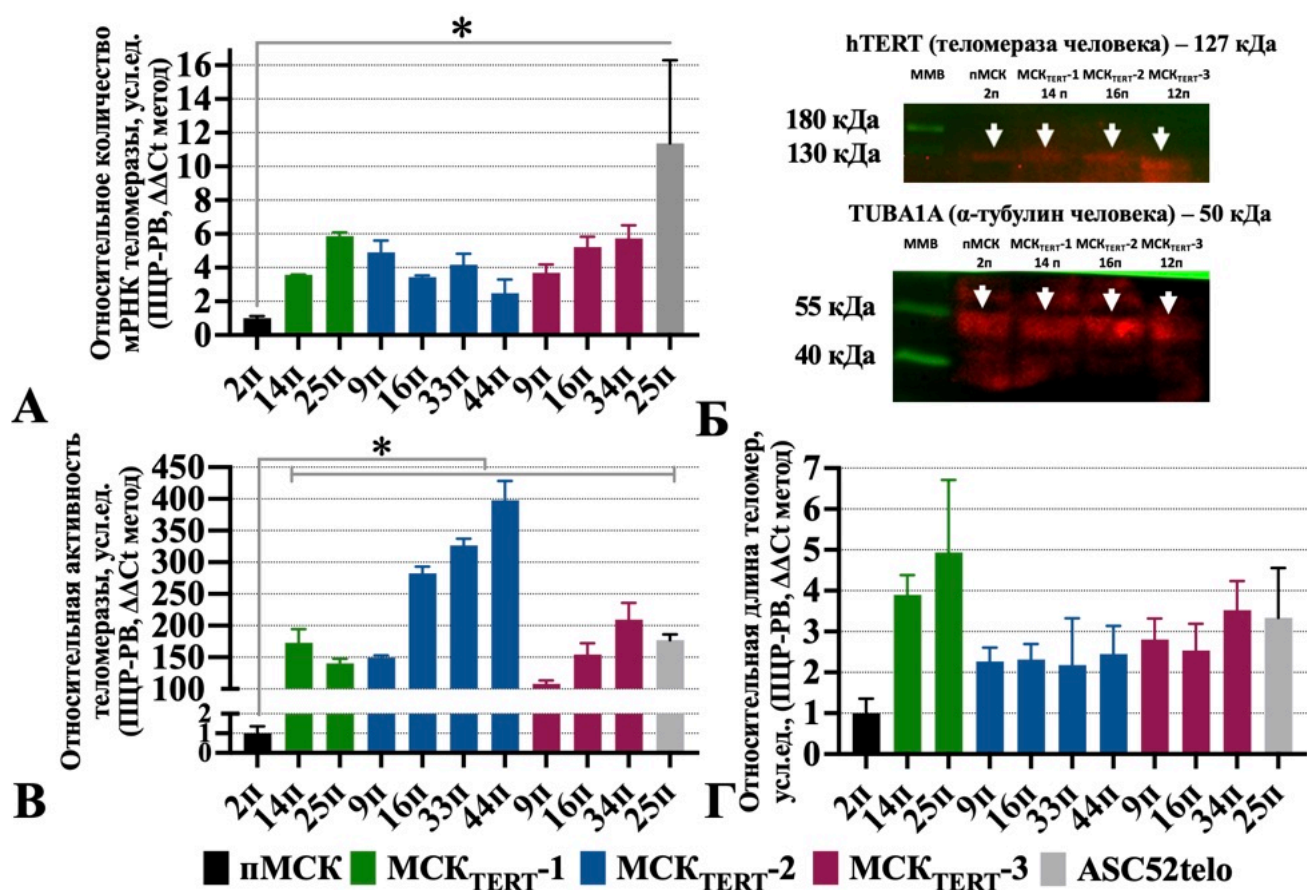


Рисунок 10. Получение культур immortalized MCK жировой ткани человека (MCK<sub>TERT</sub>). **А.** Оценка уровня экспрессии гена *hTERT* в культурах пМСК и MCK<sub>TERT</sub> методом ПЦР-РВ. **Б.** Оценка содержания белка теломеразы (127 кДа) методом вестерн-блоттинга лизатов культур пМСК и MCK<sub>TERT</sub>. Верхняя панель – содержание белковой субъединицы теломеразы, нижняя панель – содержание  $\alpha$ -тубулина человека. **В.** Оценка активности теломеразы в культурах пМСК и MCK<sub>TERT</sub> методом ПЦР-РВ. **Г.** Оценка относительной длины теломер в культурах пМСК и MCK<sub>TERT</sub> методом ПЦР-РВ.  $n=3$ , \* -  $p<0,05$  (по сравнению с контрольной группой пМСК) (ANOVA, метод Холма-Шидака). Обозначения: 14п – 14 пассаж и т.д., ММВ – маркер молекулярного веса.

Таким образом, несмотря на то что содержание белковой субъединицы теломеразы обнаруживалось в клетках как до, так и после трансдукции лентивирусным вектором, несущим ген *hTERT*, такая трансдукция привела к увеличению содержания мРНК *hTERT*, значительному увеличению теломеразной активности и удлинению теломер. Также важно, что эти свойства не утрачивались при пассировании (изучено вплоть до 44 пассажей). В совокупности это показывает, что полученные культуры MCK<sub>TERT</sub>, в отличие от пМСК ранних пассажей, обладают необходимым свойством immortalized клеток – активным механизмом поддержания теломер, предотвращающим репликативное старение.



### 3.1.2. Характеристика пролиферативного потенциала и клеточного старения

#### *Пролиферативный потенциал*

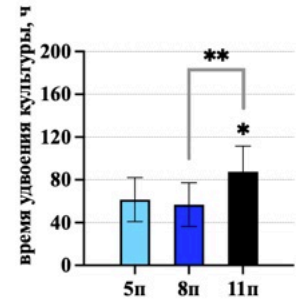
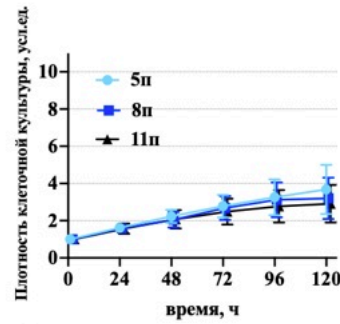
Для использования клеточных культур в фундаментальных и прикладных целях важна принципиальная возможность быстро получить большое количество клеток. Поэтому у полученных трансдуцированных культур были охарактеризованы показатели пролиферации - кривые роста и время удвоения клеточной культуры, а также выраженность признаков клеточного старения на разных пассажах.

Полученные культуры МСК<sub>TERT</sub> имели лучшие характеристики пролиферативной активности по сравнению с пМСК (рис. 11, табл. 8):

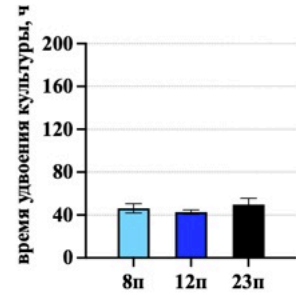
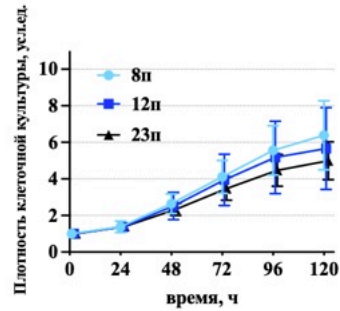
- на ранних пассажах (8-10 и 5-8, соответственно) - большую скорость пролиферации (что выражалось в меньшем времени удвоения и более быстром увеличении плотности культур за 120 ч наблюдений (плотность культур 8-10 пассажей увеличивалась в  $6 \pm 1,9$ ,  $7 \pm 3$ ,  $8 \pm 1,8$  (МСК<sub>TERT</sub>-1, МСК<sub>TERT</sub>-2, МСК<sub>TERT</sub>-3, соответственно) по сравнению с  $3 \pm 1,1$  (пМСК))),
- не менее, чем до 23 пассажа клетки культур МСК<sub>TERT</sub> сохраняли практически неизменное время удвоения; оно достоверно увеличивалось к 37-40 пассажам (в 1,5-3,6 раза), в то время как у пМСК - уже к 10 пассажу (в 1,44 раза) ( $p < 0,05$ ,  $n \geq 4$  (one-way ANOVA, метод Холма-Шидака)),
- пМСК переставали пролиферировать по достижении 12 пассажа, в то время как МСК<sub>TERT</sub> пролиферировали значительно дольше (исследовано до 37-40 пассажей)

По сравнению с коммерческой линией ASC252telo полученные культуры МСК<sub>TERT</sub> обладали контактным ингибированием, что выражалось в замедлении скорости роста плотности клеточных культур при достижении большой плотности (рис. 11 А), в отличие от ASC252telo, скорость пролиферации клеток которой не уменьшалась при увеличении плотности. Это косвенно свидетельствует об отсутствии трансформированного фенотипа полученных культур МСК<sub>TERT</sub>, что может объяснять, почему у полученных культур МСК<sub>TERT</sub> к 37-40 пассажам значительно увеличивалось время удвоения (не становятся трансформированными) в отличие от ASC252telo, которая сохраняла высокую скорость пролиферации (время удвоения  $44 \pm 13,9$  ч) и на 44 пассаже.

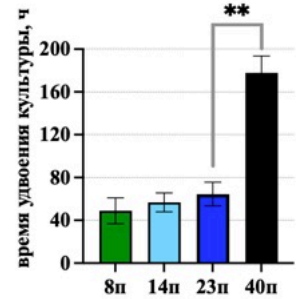
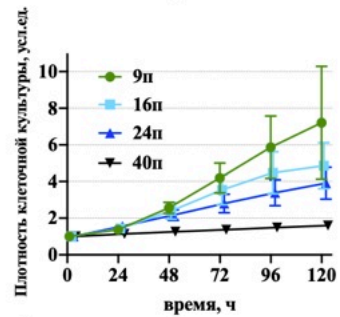
пМСК



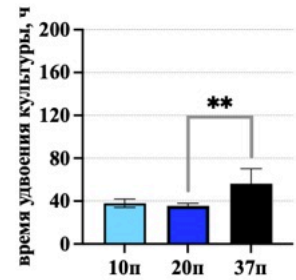
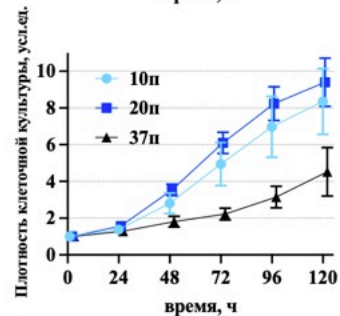
МСК<sub>TERT-1</sub>



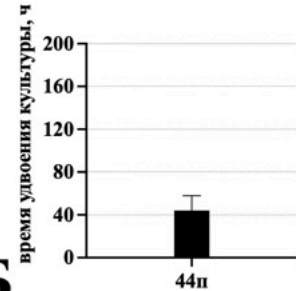
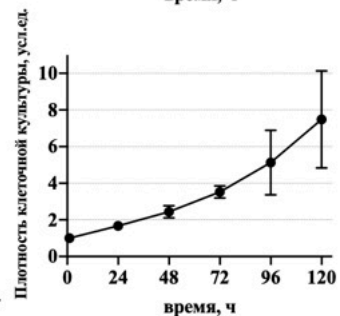
МСК<sub>TERT-2</sub>



МСК<sub>TERT-3</sub>



ASC52telo



А

Б

Рисунок 11. Пролиферативная активность культур пМСК, МСК<sub>TERT</sub>, ASC52telo. А. Кривые роста. Б. Время удвоения клеточной культуры. \* -  $p < 0,05$ ,  $n \geq 4$  (one-way ANOVA, тест Даннета), \*\* -  $p < 0,05$ ,  $n \geq 4$  (one-way ANOVA, метод Холма-Шидака).

Таблица 8. Значения времени удвоения (вр.уд.) (среднее  $\pm$  стандартное отклонение) клеточных культур пМСК, МСК<sub>TERT</sub> и ASC252telo на разных пассажах (п.)

| пМСК |               | МСК <sub>TERT</sub> -1 |              | МСК <sub>TERT</sub> -2 |                | МСК <sub>TERT</sub> -3 |               | ASC252telo |               |
|------|---------------|------------------------|--------------|------------------------|----------------|------------------------|---------------|------------|---------------|
| п.   | вр.уд.        | п.                     | вр.уд.       | п.                     | вр.уд.         | п.                     | вр.уд.        | п.         | вр.уд.        |
| 5    | 61 $\pm$ 20,7 | 8                      | 46 $\pm$ 4,4 | 9                      | 49 $\pm$ 12,1  | 10                     | 38 $\pm$ 3,9  | 44         | 44 $\pm$ 13,9 |
| 8    | 57 $\pm$ 20,5 | 12                     | 43 $\pm$ 2,0 | 16                     | 57 $\pm$ 8,9   | 20                     | 35 $\pm$ 2,3  |            | -             |
| 11   | 88 $\pm$ 24,0 | 23                     | 50 $\pm$ 5,8 | 24                     | 64 $\pm$ 11,1  | 37                     | 56 $\pm$ 13,9 |            | -             |
| -    | -             | -                      | -            | 40                     | 178 $\pm$ 15,9 | -                      | -             |            | -             |

Суммируя вышесказанное, отметим, что во всех трех полученных культурах иммортализованных МСК жировой ткани трансдукция последовательностью кДНК *hTERT* не привела к появлению способности клеток делиться неограниченное число раз, т.е. полученные культуры не являются иммортализованными в строгом смысле, но имеют пролонгированный период пролиферативной активности (как минимум до 37-40 пассажей). При этом по форме кривых роста и постепенному уменьшению скорость роста при пассировании они ближе к пМСК, чем к трансформированным культурам и ASC252telo.

### ***Клеточное старение***

Наличие признаков клеточного старения определяли по одному из наиболее широко используемых маркеров – увеличенному содержанию в стареющих клетках активной  $\beta$ -галактозидазы [255] - с помощью цитохимического окрашивания. Согласно результатам окрашивания клеточное старение культур МСК<sub>TERT</sub> наступает значительно позднее по сравнению с пМСК (рис. 12). Так, большинство клеток культуры пМСК имели активную  $\beta$ -галактозидазу уже на 5 пассаже, в то время как большинство клеток культур МСК<sub>TERT</sub> не имели активную  $\beta$ -галактозидазу как на сравнимых с пМСК пассажах – 10-11 и 13 соответственно, так и на поздних пассажах - 37-42 и 13 соответственно. Результаты цитохимического окрашивания на активную  $\beta$ -галактозидазу хорошо согласуются с результатами оценки пролиферативного потенциала культур МСК<sub>TERT</sub>. Отметим, что для культур МСК<sub>TERT</sub> было характерно снижение доли позитивных по окрашиванию клеток при пассировании, что может свидетельствовать о проявлении на ранних пассажах стресс-индуцированного старения, обусловленного процедурой трансдукции, которое исчезает при пассировании при соблюдении условий культивирования. Другим объяснением данного явления может быть гибель клеток, экспрессирующих недостаточный уровень

*hTERT*, в результате их ограниченного пролиферативного потенциала и негативной селекции при пассировании.

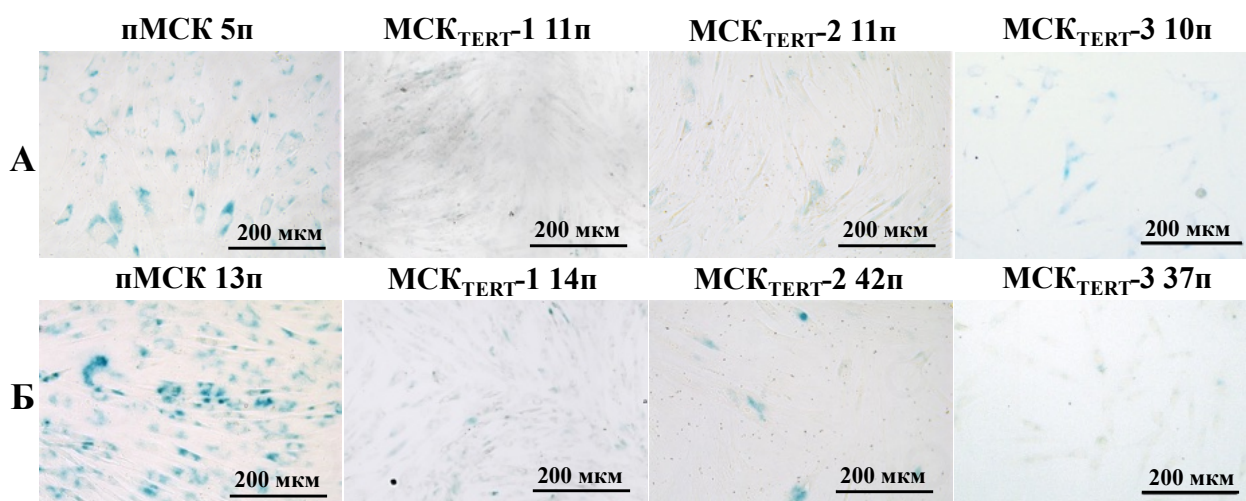


Рисунок 12. Клеточное старение нетрансдуцированных (пМСК) и трансдуцированных последовательно кДНК *hTERT* культур МСК<sub>TERT</sub>: **А** – ранний пассаж, **Б** – поздний пассаж. Оценка методом гистохимического окрашивания на маркер, ассоциированный со старением (β-галактозидаза).

**Вывод по п. 3.1:** таким образом, хоть трансдукции первичных культур МСК жировой ткани человека лентивирусным вектором, несущим ген *hTERT*, оказалось недостаточно для обеспечения полноценной иммортализации, но она привела, во-первых, к стабильному поддержанию теломеразы в активном состоянии и удлинению теломер, во-вторых, к значительному продлению пролиферативной активности вплоть до 37-40х пассажей и ускорению пролиферации (уменьшению времени удвоения клеточных культур) на сравнимых/ранних пассажах, в-третьих, к значительному уменьшению степени выраженности и замедлению появления признаков клеточного старения. Важно отметить, что введение гена *hTERT* не привело к потере контактного торможения, которая наблюдается у коммерческой линии ASC52telo, что является одним из признаков отсутствия трансформированного фенотипа и важным промежуточным результатом.

### 3.2. Исследование свойств полученных клеточных культур МСК<sub>TERT</sub> как модельных объектов для фундаментальных исследований регенеративной биомедицины

Необходимым условием использования полученных культур МСК<sub>TERT</sub> в качестве модельного объекта для регенеративной медицины является сохранение ими отличительных признаков МСК. Такие признаки определены Международным обществом клеточной терапии (ISCT) [41,255] – это 1) способность адгезировать к пластику, 2) способность дифференцироваться в адипоциты, хондроциты, остециты, 3)

экспрессия поверхностных маркеров CD73, CD90, CD105 и отсутствие экспрессии маркеров CD14, CD19, CD20, CD34, CD45 и HLA-DR.

### 3.2.1. Морфология культур МСК<sub>TERT</sub>

После трансдукции геном *hTERT* морфология клеток не изменилась (рис. 13). Полученные клетки имели фибробластоподобную форму, адгезировали к пластику.

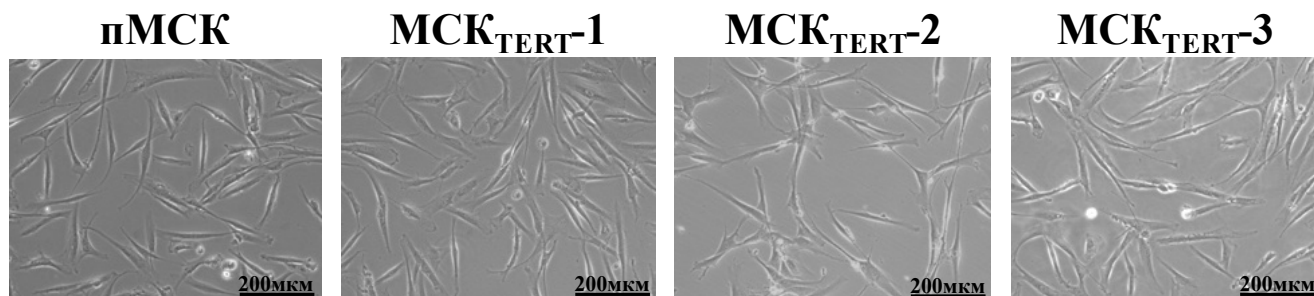


Рис. 13. Морфология полученных культур МСК<sub>TERT</sub>

### 3.2.2. Дифференцировочный потенциал культур МСК<sub>TERT</sub>

Полученные культуры клеток МСК<sub>TERT</sub> на раннем (9м) пассаже были проанализированы на предмет сохранности дифференцировочного потенциала с помощью цитохимического окрашивания и определения уровня экспрессии основных генов-маркеров методом ПЦР-РВ: адипогенного - окрашивание нильским красным, маркеры - адипонектин и PPAR $\gamma$ ; остеогенного - окрашивание ализариновым красным, маркеры - остеокальцин и RUNX2; хондрогенного - окрашивание альциановым синим.

Результаты цитохимического окрашивания сравнивали с показателями дифференцировки первичных клеточных культур на 2м пассаже (рис. 14). Клетки одной из полученных культур (МСК<sub>TERT</sub>-1) не дифференцировались в адипогенном и остеогенном направлении. Культура МСК<sub>TERT</sub>-3 имела сохраненный адипогенный и хондрогенный потенциал, но имела сниженную способность дифференцироваться в остеогенном направлении. Культура МСК<sub>TERT</sub>-2 на ранних пассажах обладала сохранным дифференцировочным потенциалом (по данным цитохимического окрашивания), сопоставимым с пМСК, и сохранным профилем экспрессии основных генов-маркеров остеогенной дифференцировки (рис. 15). Экспрессия маркеров адипогенной дифференцировки - PPAR $\gamma$  (основной необходимый регулятор адипогенеза, маркер терминальной дифференцировки преадипоцитов в зрелые адипоциты) и адипонектина (маркер зрелых адипоцитов) [257] - была ниже, чем у культур пМСК (рис. 15). Наряду с данными цитохимического окрашивания это показывает, что культура МСК<sub>TERT</sub>-2 может

дифференцироваться в адипогенном направлении, но имеет сниженный уровень экспрессии основного транскрипционного фактора (PPAR $\gamma$ ), необходимого для запуска такой дифференцировки, чем может объясняться и сниженный уровень экспрессии адипонектина. При пассировании культура МСК<sub>TERT-2</sub> сохранила способность к хондрогенной дифференцировке вплоть до 42 пассажа и способность к адипогенной и остеогенной дифференцировке вплоть до 26 пассажа (рис. 16), после которого постепенно утрачивала способность дифференцироваться в адипоциты и остециты, что стало наиболее заметно к 42 пассажу. Т.е. иммортализованные МСК могут постепенно терять стволовые свойства при пассировании. Однако созданная культура МСК<sub>TERT-2</sub> значительно превосходила коммерческую линию ASC52telo, клетки которой не дифференцируются в адипогенном направлении и хуже подвергаются остеогенной дифференцировке (из-за чего она не подходит для исследований функционирования и регенерации жировой ткани, ее терморегуляторной и эндокринной функции в норме и при патологии) (рис. 14), и по этому признаку лучше удовлетворяла критериям модельного клеточного объекта для регенеративной биомедицины по сравнению с МСК<sub>TERT-1</sub>, МСК<sub>TERT-3</sub> и ASC52telo.

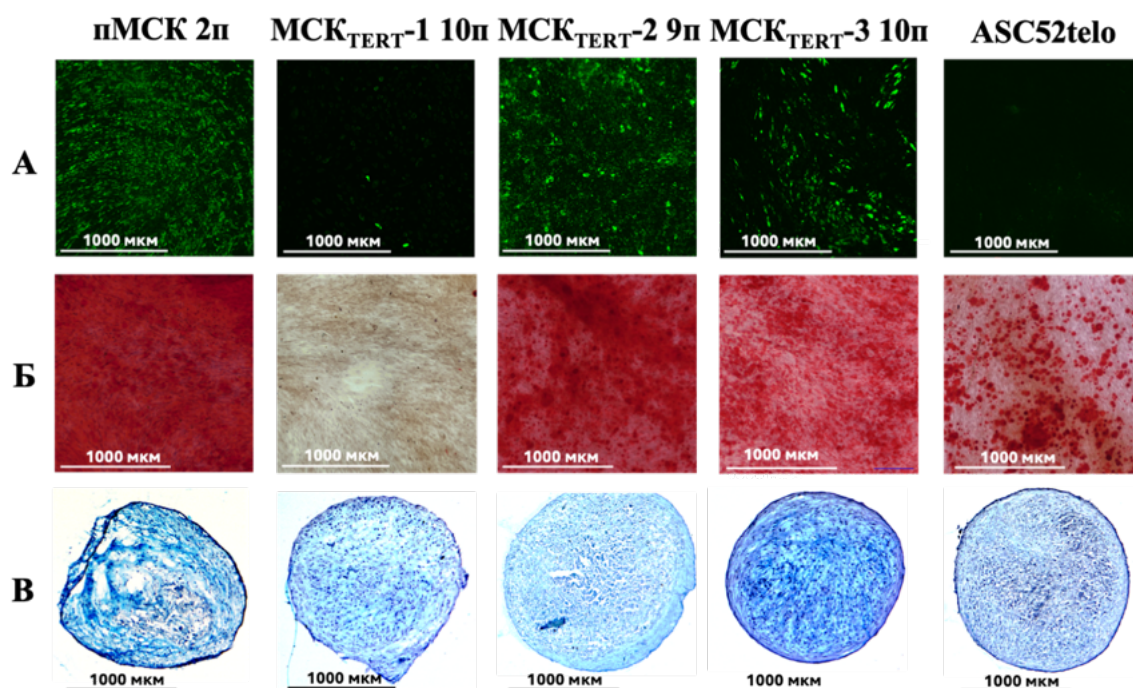


Рисунок 14. Дифференцировочный потенциал культур пМСК и МСК<sub>TERT</sub> на ранних пассажах (2 и 9-10 соответственно) и линии ASC52telo: **А** - адипогенная дифференцировка (цитохимическое окрашивание нильским красным), **Б** - остеогенная дифференцировка (цитохимическое окрашивание ализариновым красным), **В** - хондрогенная дифференцировка (цитохимическое окрашивание альциановым синим).



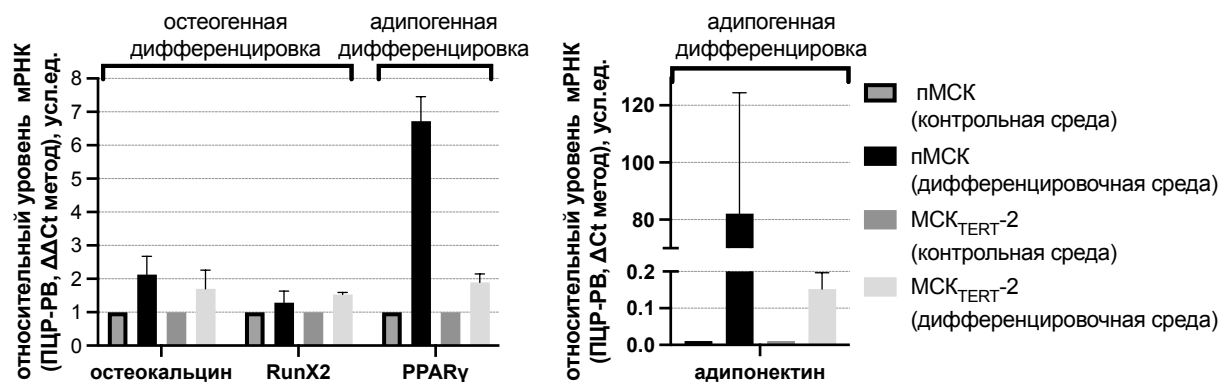


Рисунок 15. Уровень экспрессии основных генов-маркеров остеогенной (RUNX2 (ген *RUNX2*), остеокальцин (ген *OCN*)) и адипогенной дифференцировки (PPARγ (ген *PPARG*), адипонектин (ген *ADIPOQ*)) в культуре МСК<sub>TERT</sub>-2: определение относительного уровня мРНК методом ПЦР-РВ. За условную единицу принят уровень экспрессии в контрольных культурах клеток (культивируемых в стандартной питательной среде без индукторов).

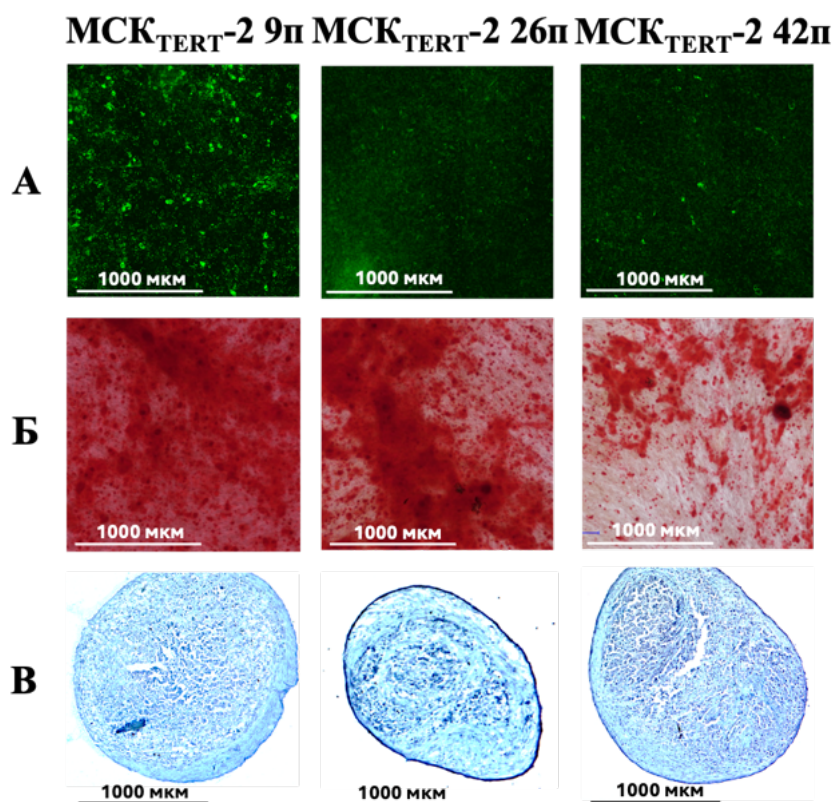


Рисунок 16. Дифференцировочный потенциал культур МСК<sub>TERT</sub>-2 при пассировании (9-42 пассажи): **А** - адипогенная дифференцировка (цитохимическое окрашивание нильским красным), **Б** - остеогенная дифференцировка (цитохимическое окрашивание ализариновым красным), **В** - хондрогенная дифференцировка (цитохимическое окрашивание альциановым синим).

### 3.2.3. Иммунофенотип культур МСК<sub>TERT</sub>

По результатам анализа на предыдущих этапах для дальнейших исследований были выбраны две культуры - МСК<sub>TERT</sub>-2 (т.к. она обладала сохранным дифференцировочным потенциалом – параметр, необходимый для создания на ее основе клеточной модели) и МСК<sub>TERT</sub>-3 (т.к. она обладала хоть и сниженным дифференцировочным потенциалом, но лучшими характеристиками пролиферативной активности, что является важным свойством для возможности получения на ее основе больших объемов биомедицинских бесклеточных продуктов). Анализ иммунофенотипа (доли клеток (в %), экспрессирующих CD73, CD90, CD105 и не экспрессирующих CD14, CD20, CD34, CD45) провели с помощью набора набора MSC Phenotyping Kit, human (Miltenyi Biotec, #130-095-198, США). Сравнивали клетки сходных пассажей до и после трансдукции (7 и 7-9 соответственно). Согласно результатам проведенного анализа (рис. 17, табл. 9) после трансдукции геном *hTERT* МСК<sub>TERT</sub> сохраняют МСК-специфичный иммунофенотип: доля клеток культур пМСК и МСК<sub>TERT</sub>-2, МСК<sub>TERT</sub>-3, экспрессирующих CD73, CD90, CD105, составила >90%; менее 5% МСК<sub>TERT</sub> экспрессировали CD14, CD20, CD34, CD45 (рис. 17, табл. 9).

Т.к. увеличенный пролиферативный потенциал полученных культур МСК<sub>TERT</sub> предполагает возможность их использования при длительном пассировании, мы также экспериментально подтвердили, что профиль МСК-специфичных маркеров сохраняется вплоть до 40х пассажей, но на 44 пассаже происходит значительное (в 1,4 раза) уменьшение доли клеток, экспрессирующих CD105 (рис. 17). Это согласуется с литературными данными о том, что при длительном культивировании МСК может наблюдаться снижение экспрессии CD105 [70].



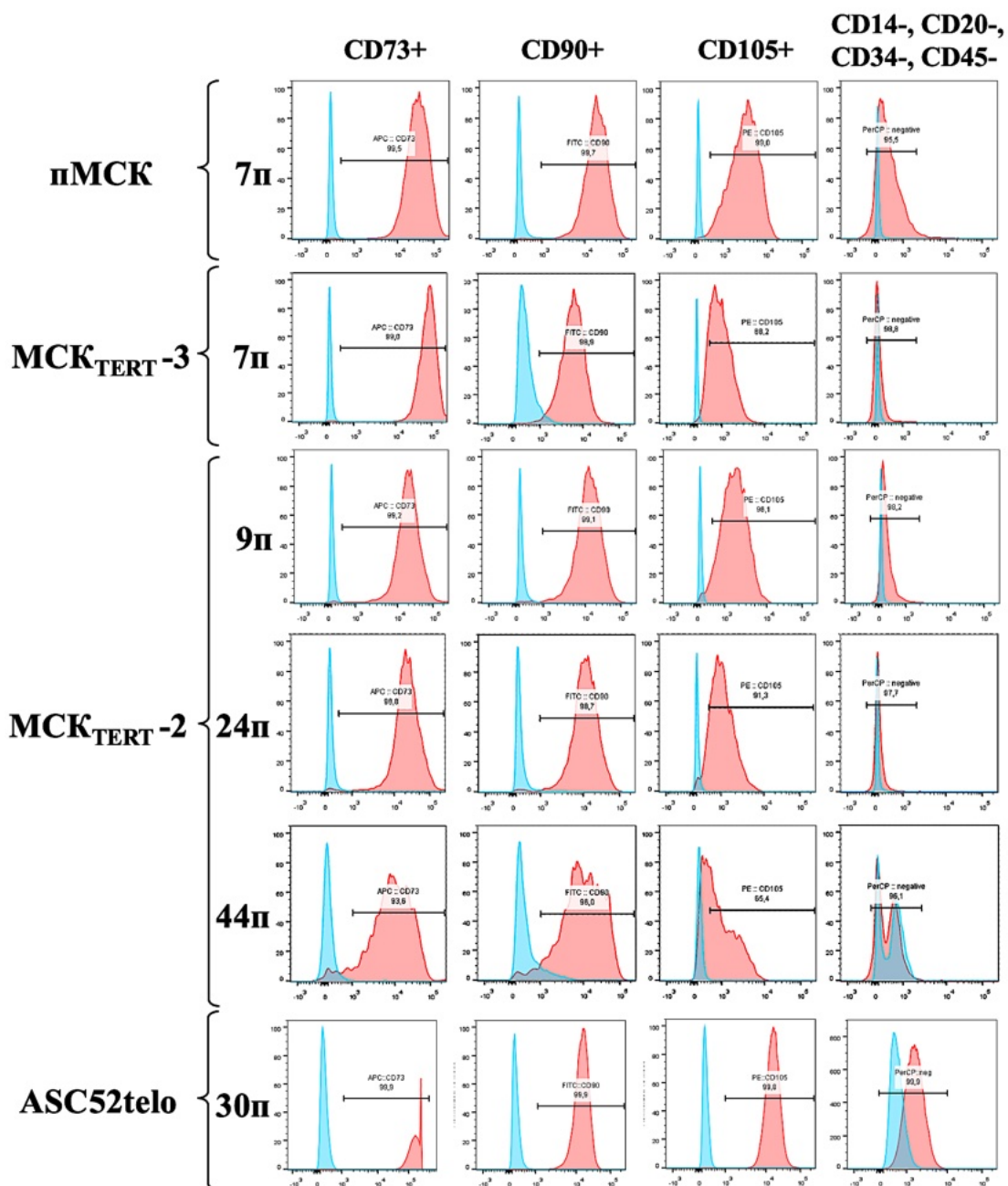


Рисунок 17. Иммунофенотип культур пМСК, МСК<sub>TERT-2</sub>, МСК<sub>TERT-3</sub>, ASC52telo. п – пассаж.

Таблица 9. Численные значения доли клеток (%) исследованных культур, экспрессирующих CD73, CD90, CD105 и не экспрессирующих CD14, CD20, CD34, CD45)

|                           | CD73+ | CD90+ | CD105+ | CD14-, CD 20-, CD 34-, CD45- |
|---------------------------|-------|-------|--------|------------------------------|
| пМСК 7п                   | 99,5  | 99,7  | 99     | 95,5                         |
| МСК <sub>TERT-3</sub> 7п  | 99    | 98,9  | 88,2   | 98,8                         |
| МСК <sub>TERT-2</sub> 9п  | 99,2  | 98,7  | 91,3   | 97,7                         |
| МСК <sub>TERT-2</sub> 24п | 98,8  | 98,7  | 91,3   | 97,7                         |
| МСК <sub>TERT-2</sub> 44п | 93,6  | 96    | 65,4   | 96,1                         |
| ASC52telo                 | 99,9  | 99,9  | 99,8   | 99,9                         |

Таким образом, согласно описанным выше результатам, полученная культура МСК<sub>TERT-2</sub> удовлетворяет всем критериям МСК, установленным ISCT. Поэтому далее мы проанализировали ее по дополнительным параметрам, важным для возможности создания на ее основе клеточной модели для регенеративной биомедицины.

#### 3.2.4. Ответ на гормоны культур МСК<sub>TERT</sub>

Способность МСК отвечать на различные гормоны не входит в стандартный набор критериев МСК, но является важной при реализации ими физиологических функций *in vivo*, поэтому ее сохранность важна при создании клеточных моделей для фундаментальных исследований.

Поэтому мы исследовали, влияет ли трансдукция геном *hTERT* на ответ МСК на гормональный сигнал. Под понятием «гормон» будем понимать не классическое определение, а современную более широкую дефиницию: «гормоны — это непищевые межклеточные передатчики информации химической природы, которые действуют в микромолярном (и менее) диапазоне концентраций» [258]. В качестве гормонов выбрали следующие: ангиотензин II ( $5 \cdot 10^{-9}$  М), ГАМК ( $10^{-6}$  М), гистамин ( $10^{-6}$  М), глутамат ( $10^{-6}$  М), дофамин ( $5 \cdot 10^{-5}$  М), инсулин ( $10^{-7}$  М), норадреналин ( $10^{-6}$  М), паратиреоидный гормон ( $10^{-8}$  М), серотонин ( $10^{-5}$  М). Классическими сигнальными каскадами, активирующимися в ответ на воздействие инсулина, являются Ras/Erk и PI3K/Akt. На все остальные гормоны согласно литературным данным [259-264] МСК могут отвечать активацией  $G_{q/11}$ -фосфолипаза C сигнального каскада, что выражается в увеличении внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$ . Поэтому мы окрашивали клетки проникающим в цитоплазму  $Ca^{2+}$ -чувствительным красителем Fluo-8 и с помощью флуоресцентной микроскопии анализировали долю клеток, в которых увеличивалась концентрация внутриклеточного  $Ca^{2+}$ . Наличием чувствительности считали ненулевой процент отвечающих клеток.

Согласно результатам (рис. 18 А) после трансдукции МСК<sub>TERT-2</sub> сохраняла характерную для пМСК чувствительность к глутамату, ГАМК, дофамину, норадреналину, ангиотензину II, гистамину, серотонину, ПТГ, инсулину. Характер ответа на воздействие инсулина посредством активации сигнальных путей Ras/Erk и PI3K/Akt соответствовал таковому для пМСК (Рис. 18 Б). При пассировании после 17 пассажа постепенно происходило «снижение доли клеток чувствительных к глутамату, ГАМК, дофамину, инсулину, норадреналину, серотонину, ПТГ (к 43 пассажу - в 5-10 раз)» [165]. Напротив, клетки коммерческой линии ASC52telo оказались нечувствительны к воздействию ГАМК,

глутамата и серотонина, а также имели значимо сниженную чувствительность к норадреналину, ангиотензину, ПТГ и инсулину по сравнению с пМСК и МСК<sub>TERT</sub> (one-way ANOVA, метод Холма-Шидака;  $p < 0,05$ ,  $n \geq 4$ ). Таким образом, полученная нами культура МСК<sub>TERT</sub>-2 по сохранности гормональной чувствительности превосходила линию ASC52telo.

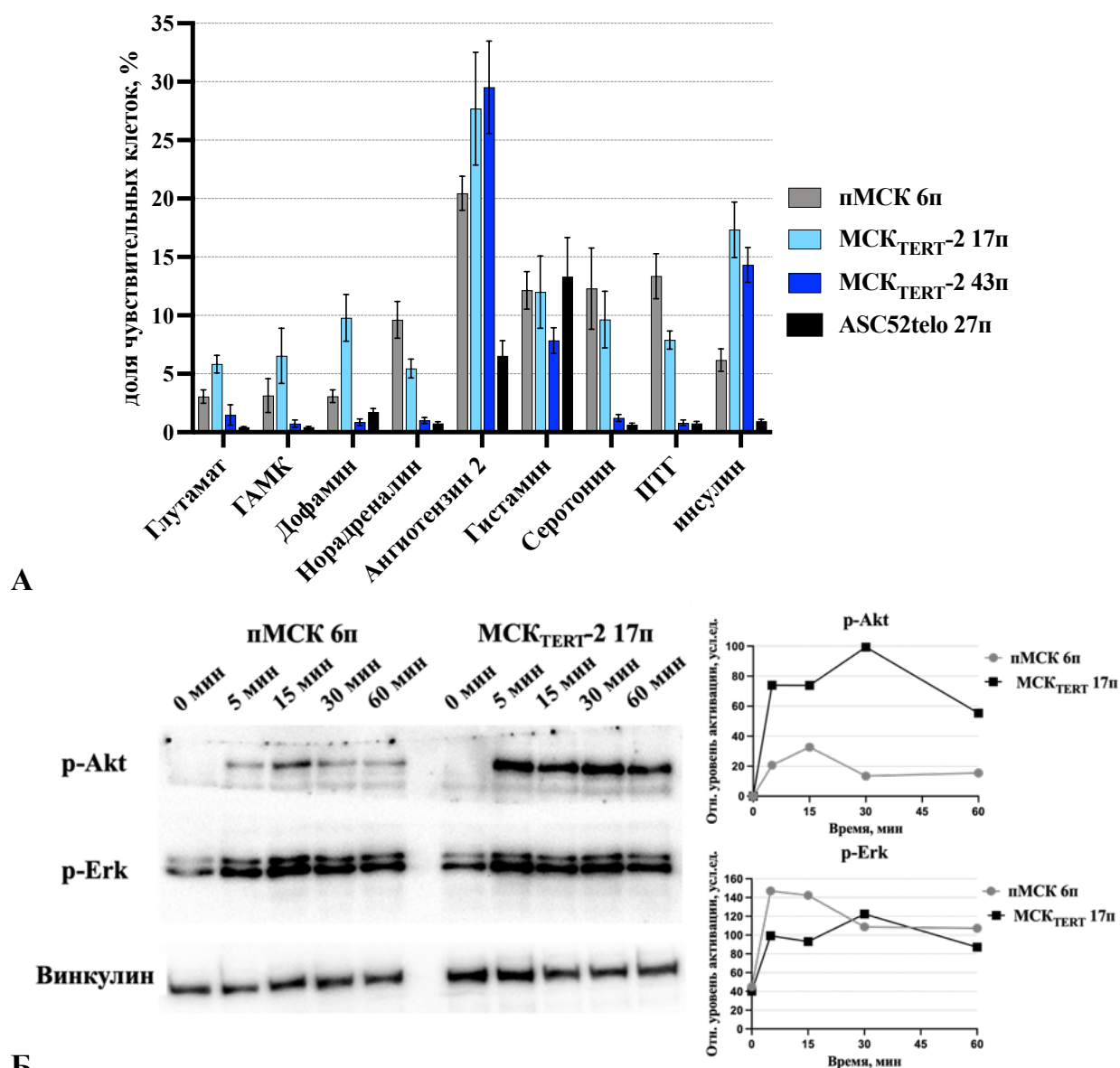


Рисунок 18. Чувствительность к гормонам культур пМСК, МСК<sub>TERT</sub>-2, ASC52telo. **А.** Оценка доли клеток, отвечающих активацией кальциевой сигнализации на глутамат ( $10^{-6}$  М), ГАМК ( $10^{-6}$  М), дофамин ( $5 \cdot 10^{-5}$  М), норадреналин ( $10^{-6}$  М), ангиотензин II ( $5 \cdot 10^{-9}$  М), гистамин ( $10^{-6}$  М), серотонин ( $10^{-5}$  М), паратиреоидный гормон ( $10^{-8}$  М), инсулин ( $10^{-7}$  М). **Б.** Оценка ответа на инсулин по фосфорилированию Erk и Akt вестерн-блоттингом. п – пассаж.

### 3.2.5. Кариотип культур МСК<sub>TERT</sub>

Согласно литературным данным [266] при культивировании *in vitro* после 5-7 пассажа у МСК жировой ткани проявляется геномная нестабильность. В то же время стабильность кариотипа и его соответствие исходной клеточной культуре важна для обеспечения возможности использования клеточных культур как модельного объекта при длительном пассировании и для обеспечения безопасности применения клеточных продуктов в регенеративной и трансляционной медицине. Для оценки хромосомной стабильности полученной культуры МСК<sub>TERT-2</sub> мы провели ее кариотипический анализ после получения и на 28 пассаже. Все клетки культуры МСК<sub>TERT-2</sub> имели «кариотип 47,XY,+mar - аномальный мужской кариотип, содержащий дополнительную неидентифицированную хромосому. Такой кариотип характерен для 100% клеток и не меняется с 11 по 28 пассаж. Это свидетельствует об очень важном свойстве - высокой стабильности кариотипа трансдуцированных лентивирусными частицами, несущими последовательность кДНК *hTERT*, клеток, даже несмотря на исходно аномальный кариотип (рис. 19). Доля тетраплоидных клеток в линии МСК<sub>TERT-2</sub> на 11 пассаже составила 13.4 %, а на 28 пассаже – 4.9 %» [165]. Все клетки полученной культуры МСК<sub>TERT-3</sub> имели «нормальный кариотип женщины, 46,XX (рис. 19), однако, в 17.1% клеток на 11 пассаже была выявлена клональная транслокация хромосом 3 и 5 - t(3;5)(q?26;q11.2). Доля тетраплоидных клеток в культуре МСК<sub>TERT-3</sub> на 8 пассаже составила 6,4 %, а на 11 пассаже – 2,7 %» [165].

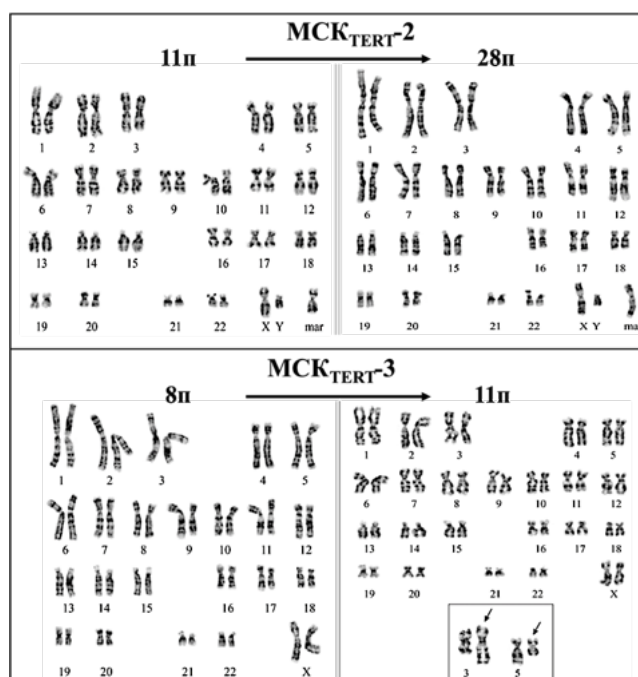


Рисунок 19. Кариотип культур МСК<sub>TERT</sub> при пассировании.

Сам процесс трансдукции последовательностью кДНК *hTERT* и последующая сверхэкспрессия теломеразы не изменяет кариотип. Это было подтверждено анализом кариотипа линии ASC52telo и двух дополнительных культур MCK<sub>TERT</sub>-4 и MCK<sub>TERT</sub>-5 (рис. 20), которые имели соответственно нормальный кариотип женщины 46,XX, нормальный кариотип женщины 46,XX и нормальный кариотип мужчины 46,XY.

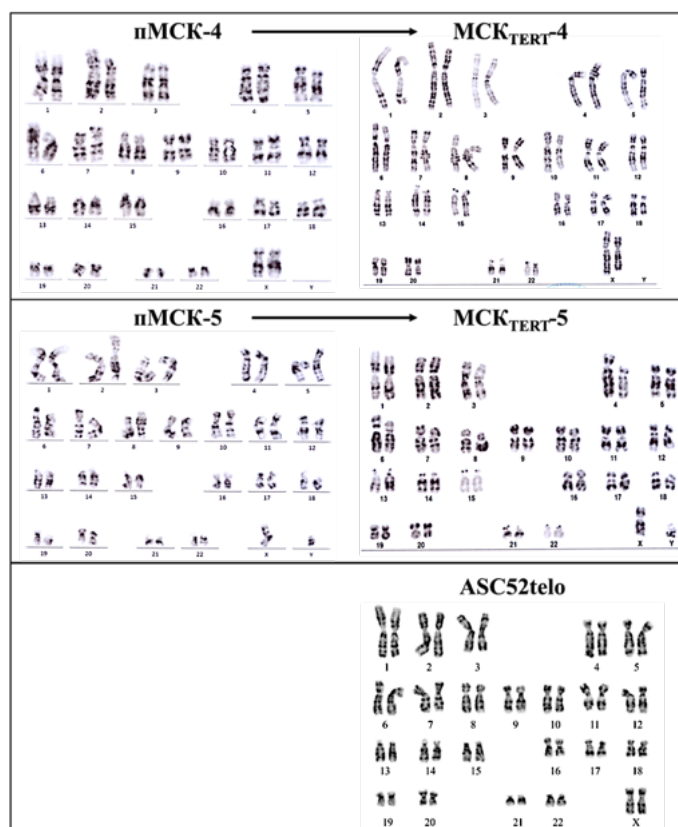


Рисунок 20. Кариотип культур MCK<sub>TERT</sub> после лентивирусной трансдукции последовательностью кДНК *hTERT*.

Таким образом, при получении клеточных культур методом лентивирусной трансдукции геном *hTERT* и при их дальнейшем длительном пассировании можно получить культуры с сохранным стабильным кариотипом.

**Вывод по п. 3.2:** таким образом, метод лентивирусной трансдукции МСК жировой ткани человека последовательностью кДНК *hTERT* позволяет получить культуры с улучшенным пролиферативным потенциалом (отложенным достижением лимита Хейфлика и большей скоростью пролиферации) и одновременно сохранными признаками, характерными для первичных культур МСК (морфологией, дифференцировочным потенциалом, гормональной чувствительностью, кариотипом). Поэтому такие культуры могут быть использованы в качестве модельного объекта для

регенеративной медицины, хотя и требуют тщательной оценки и всесторонней характеристики.

### **3.3. Исследование свойств секретома полученных культур МСК<sub>TERT</sub>**

К двум основным подходам решения прикладных задач регенеративной биомедицины с использованием клеточных культур относятся 1) создание и использование биомедицинских клеточных продуктов (БМКП; клеток, тканеинженерных конструкций, тканей, органов) и 2) получение и использование биомедицинских бесклеточных продуктов (секретома, его фракций или компонентов). Перспективы создания БМКП на основе immortalized клеток видятся маловероятными в силу сопряженных высоких рисков опухолеобразования после введения таких клеток пациенту. Использование же биомедицинских бесклеточных продуктов сопряжено с меньшими рисками, при этом в настоящее время использование immortalized клеток для создания таких продуктов остается недостаточно разработанной проблемой. Также свойства секретома можно рассматривать как одну из характеристик клеточной культуры как модельного объекта.

Поэтому далее мы исследовали влияние лентивирусной трансдукции геном *hTERT* на 1) состав секретома, 2) биологическую активность секретома, 3) безопасность секретома.

#### **3.3.1. Состав секретома культур МСК<sub>TERT</sub>**

##### ***3.3.1.1. Состав секретома полученных культур МСК<sub>TERT</sub> в сравнении с составом секретома первичных культур МСК***

###### **3.3.1.1.1. Состав: результаты протеомного анализа**

Для определения влияния лентивирусной трансдукции последовательностью кДНК каталитической субъединицы теломеразы *hTERT* на состав секретома получаемых культур МСК жировой ткани человека мы провели протеомный анализ секретома культур пМСК и МСК<sub>TERT</sub>-2. Полученные первичные данные протеомного анализа доступны в репозитории PRIDE (<https://www.ebi.ac.uk/pride/archive/projects/PXD067843>). Ввиду ограниченного финансирования было проведено однократное измерение, поэтому результаты были использованы для сравнения компонентного состава, но не количества белков, и они не были обработаны статистическими методами. Согласно результатам анализа идентичность компонентов секретомов пМСК и МСК<sub>TERT</sub> составила 94,5%. При анализе состава особое внимание уделяли группам белков, опосредующим



прорегенеративные свойства МСК (описаны в п. 1.2.2). Были идентифицированы белки, опосредующие следующие свойства секрета МСК (в скобках указаны названия генов):

- Иммуномодулирующие: трансформирующий фактор роста  $\beta$ -1 (*TGFB1*), стромальный фактор роста 1 (*CXCL12*), колониестимулирующий фактор-1 (*CSF1*), фоллистатин-подобный белок (*FSTL1*),
- Трофические - ангиогенез: ангиопоэтин-подобные белки (*ANGPTL2*, *ANGPTL4*), гепарин-связывающий фактор роста (*HDGF*), фактор роста сосудистого эндотелия (*VEGFA*), стромальный фактор роста 1 (*CXCL12*), урокиназа и урокиназный рецептор (*PLAU*, *PLAUR*), белок богатый цистеином 61 (*CYR61*) и др.,
- Трофические - нейрогенез: неудезин (*NENF*), рецептор семейства GDNF  $\alpha$ 1 (*GFRA1*), семафорины (*SEMA3C*, *SEMA7A*), нейротрофический фактор, происходящий из нейронов (*NDNF*), нейрональный фактор роста 1 (*NEGR1*),
- Трофические – плеiotропные: фактор дифференцировки роста-15 (*GDF15*), миелоидный фактор роста (*MYDGF*), лейкемия-ингибирующий фактор (*LIF*), тромбоцитарные факторы роста (*PDGFC*, *PDGFD*), интерлейкин-6 (*IL-6*), фактор роста соединительной ткани (*CTGF*) (участвует в заживлении ран), фоллистатин (*FST*), мезэнцефалический астроцитарный нейротрофический фактор (*MANF*), аденомедуллин (*ADM*),
- Образование внеклеточного матрикса (как белки ВКМ, так и молекулярные факторы, необходимые для их правильного образования): белки ВКМ - коллагены (*COL1A1*, *COL1A2*, *COL2A1*, *COL3A1*, *COL4A1*, *COL4A2*, *COL5A1*, *COL5A2*, *COL5A3*, *COL6A1*, *COL6A2*, *COL6A3*, *COL7A1*, *COL11A1*, *COL12A1*, *COL14A1*, *COL15A1*, *COL16A1*, *COL18A1*), ламинины (*LAMA1*, *LAMA2*, *LAMA4*, *LAMB1*, *LAMB2*), остеонектин (*SPARC*), периостин (*POSTN*), тенасцин (*TNC*), тромбоспондины (*THBS1*, *THBS2*, *THBS3*) (они стимулируют синаптогенез и хондрогенную дифференцировку, обладают выраженным иммуносупрессивным действием), фибриллины (*FBN1*, *FBN2*), фибронектин 1 (*FNI*), фибулины (*FBLN1*, *FBLN2*, *FBLN5*), лизилоксидаза (*LOX*), лизилоксидаза-подобные белки (*LOXL1*-*LOXL3*) и др., матриксные металлопротеиназы (*MMP1*, *MMP2*, *MMP3*, *MMP14*), тканевой активатор плазминогена (*tPA*), ингибиторы матриксных металлопротеиназ (*TIMP1*, *TIMP2*, *TIMP3*).

Некоторые известные молекулы детектированы не были (провоспалительные цитокины IL-1A, IL-8, IL-12, TNF $\alpha$ ; противовоспалительные молекулы IDO, IL-4, IL-10, IL-13). Важно отметить, что в секрете не была детектирована теломераза.

#### **3.3.1.1.2. Состав: результаты анализа компонентов методами ИФА и ПЦР-РВ**

Секретом как биомедицинский бесклеточный препарат для регенеративной биомедицины должен стимулировать эндогенные репаративные и регенеративные процессы организма человека – рост сосудов, нервов, др., модулировать иммунный ответ, а также не должен активировать деструктивные процессы в клетках-мишенях и окружающих тканях (включая значительное усиление воспалительных процессов, активацию процессов клеточного старения). Поэтому мы исследовали содержание в секрете культуры МСК<sub>TERT</sub> 8-9 пассажа:

- основных факторов нейрогенеза и ангиогенеза, которые играют ключевую роль в процессах реиннервации и васкуляризации регенерирующей ткани (BDNF, HGF, VEGF-A, uPA) методами ПЦР-РВ и ИФА,
- основных компонентов SASP методом ИФА;

а также на основании измерения уровня экспрессии с помощью ПЦР-РВ оценили содержание:

- основных провоспалительных молекул (IL-1 $\alpha$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ),
- основных противовоспалительных молекул (IL-4, IL-10, IL-13, TGF- $\beta$ 1, IDO).

Данные сравнивали с содержанием соответствующих факторов в секрете культуры пМСК 2-3 пассажа.

Согласно полученным результатам (рис. 21 А) экспрессия генов факторов нейрогенеза и ангиогенеза на примере BDNF, HGF, VEGF-A и uPA значимо не отличалась в культурах пМСК и МСК<sub>TERT</sub>. Также не было выявлено значимых различий в содержании этих факторов в составе секрета (рис. 21 Б).



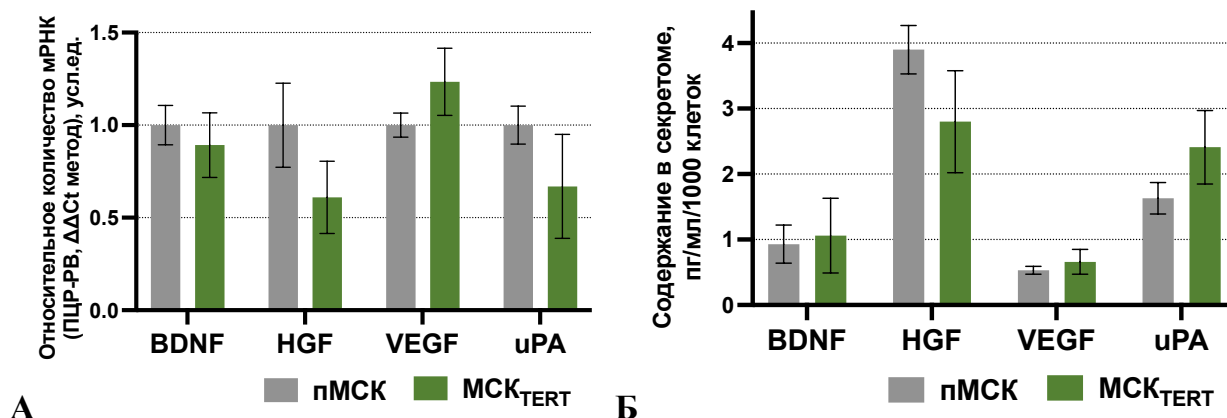


Рисунок 21. Содержание основных факторов нейрогенеза и ангиогенеза в секретоме культур пМСК и МСК<sub>TERT</sub>. **А.** ПЦР-РВ (за условную единицу принят уровень экспрессии факторов в пМСК). **Б.** ИФА. Статистически достоверных различий не выявлено (n=3; непарный U-критерий Манна-Уитни, метод Холма-Шидака).

В секретоме культуры МСК<sub>TERT</sub> (рис. 22) было выявлено статистически значимое сниженное содержание компонентов SASP (IL-6 и PAI-1) по сравнению с пМСК 2-3 пассажа.

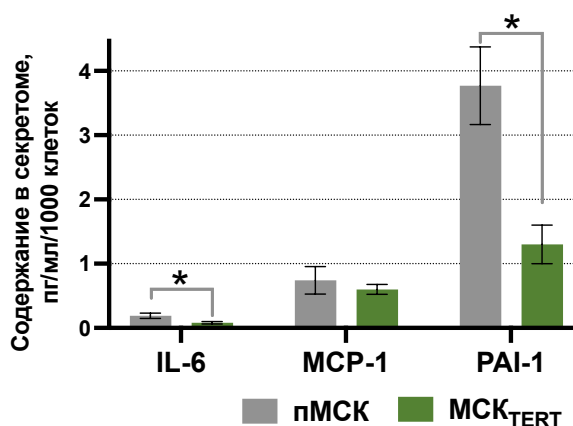


Рисунок 22. Содержание основных компонентов SASP (IL-6, MCP-1, PAI-1) в секретоме культур пМСК и МСК<sub>TERT</sub>, метод ИФА. \* -  $p < 0,05$ , n=3 (непарный U-критерий Манна-Уитни, метод Холма-Шидака).

Экспрессия генов основных провоспалительных и противовоспалительных молекул значимо не отличалась в культурах пМСК (2-3 пассажа) и МСК<sub>TERT</sub> (рис. 23).

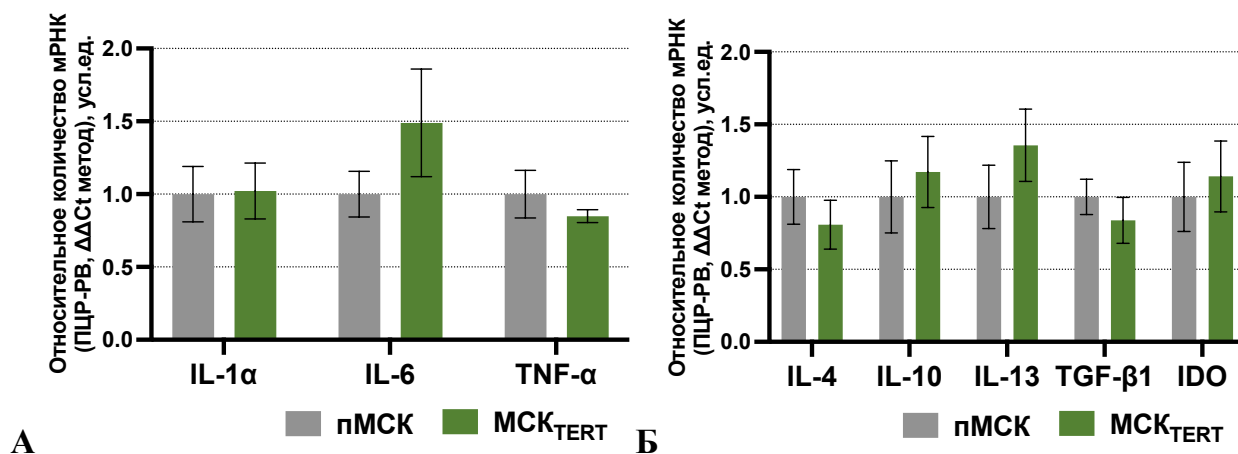


Рисунок 23. Экспрессия генов основных провоспалительных (А) и противовоспалительных (Б) факторов в культурах пМСК и МСК<sub>TERT</sub>, метод ПЦР-РВ. Статистически достоверных различий не выявлено (n=3; непарный U-критерий Манна-Уитни, метод Холма-Шидака).

Таким образом, применение метода лентивирусной трансдукции последовательностью кДНК *hTERT* МСК жировой ткани человека не вызывает значительных изменений белкового состава секрета (по данным протеомного анализа), не изменяет уровень экспрессии мРНК основных протестированных факторов нейrogenеза и ангиогенеза, а также провоспалительных и противовоспалительных молекул (различия статистически недостоверны). При этом в секрете получаемых культур МСК<sub>TERT</sub> снижено содержание основных компонентов SASP (статистическая значимость показана для IL-6 и PAI-1).

### 3.3.1.2. Состав секрета полученных культур МСК<sub>TERT</sub> при длительном культивировании

Далее мы изучили, насколько длительно сохраняется состав секрета МСК<sub>TERT</sub> при культивировании (на примере всех групп молекул, описанных в предыдущем параграфе).

Согласно полученным результатам (рис. 24) содержание факторов нейrogenеза и ангиогенеза на примере BDNF, HGF, VEGF-A и uPA в составе секрета значимо не изменялось при пассировании (для HGF и VEGF-A изучено вплоть до 31 пассажа, для BDNF и uPA - до 43 пассажа).

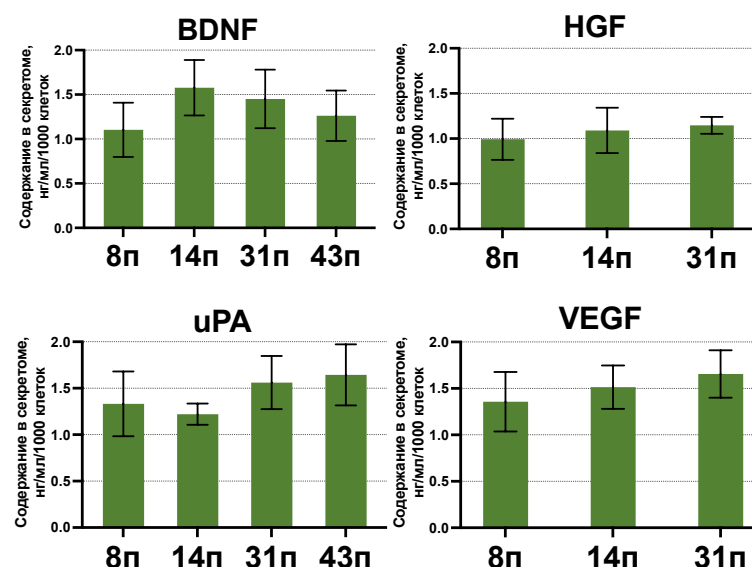


Рисунок 24. Содержание основных факторов нейrogenеза и ангиогенеза в секретоме культуры МСК<sub>ТЕРТ</sub> при длительном культивировании, метод ИФА. Статистически достоверных различий не выявлено (n=3; one-way ANOVA).

При пассировании сохранялась общая закономерность для всех трех изученных компонентов SASP: их содержание в секретоме МСК<sub>ТЕРТ</sub> было достоверно ниже, чем в секретоме пМСК на сопоставимых пассажах (рис. 25). Т.к. после 14 пассажа пМСК переставали делиться, содержание компонентов SASP на более поздних пассажах было проанализировано только для культуры МСК<sub>ТЕРТ</sub>. Согласно полученным результатам (рис. 25) выраженное увеличение содержания IL-6 происходило к 33 пассажи (в 9,9 раз), MCP-1 и PAI-1 – к 19 пассажи (в 4 и 4 раза соответственно). Содержание IL-6 и MCP-1 в секретоме МСК<sub>ТЕРТ</sub> 33 и 19 пассажей соответственно было достоверно выше, чем в секретоме пМСК раннего пассажа, при этом содержание PAI-1 значимо не отличалось от такового, характерного для секретоме пМСК ранних пассажей (рис. 25).

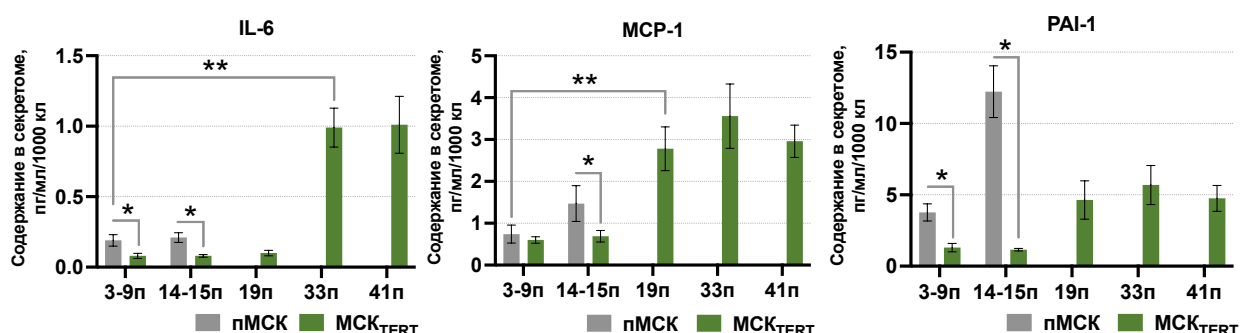


Рисунок 25. Содержание основных компонентов SASP (IL-6, MCP-1, PAI-1) в секретоме культур пМСК и МСК<sub>ТЕРТ</sub> при длительном культивировании, метод ИФА. \* -  $p < 0,05$ ,  $n \geq 3$  (непарный U-критерий Манна-Уитни, метод Холма-Шидака); \*\* -  $p < 0,05$ ,  $n \geq 3$  (непарный U-критерий Манна-Уитни).

Для оценки продукции культурой МСК<sub>TERT</sub> основных провоспалительных и противовоспалительных факторов была проанализирована экспрессия соответствующих генов методом ПЦР-РВ. Согласно результатам (рис. 26) экспрессия этих факторов значительно не изменялась при длительном культивировании (изучено вплоть до 43 пассажа).

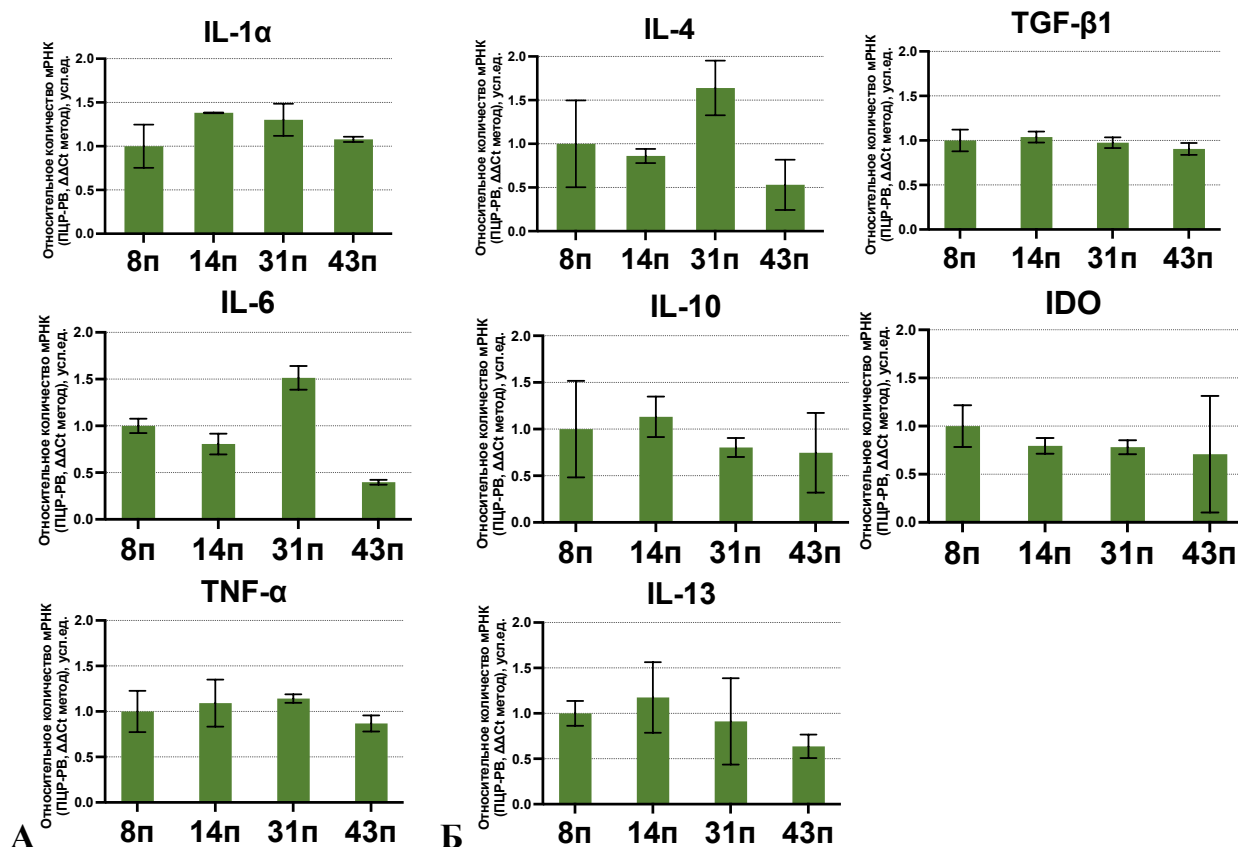


Рисунок 26. Экспрессия генов основных провоспалительных (А) и противовоспалительных (Б) факторов в культуре МСК<sub>TERT</sub>, метод ПЦР-РВ. Статистически достоверных различий не выявлено (n=3; one-way ANOVA). Данные представлены нормированными на уровень экспрессии соответствующего гена в культуре МСК<sub>TERT</sub> 8 пассажа (8п).

**Вывод по п. 3.3.1:** таким образом, лентивирусная трансдукция последовательностью кДНК *hTERT* значительно не изменила белковый состав секрета по данным протеомного анализа, позволила стабилизировать состав секрета при культивировании культуры-продуцента до 43 пассажа и отсрочить увеличение содержания компонентов SASP в секрете до 19-33 пассажа (для МСР-1, PAI-1 и IL-6 соответственно). Эти данные свидетельствуют о том, что полученные культуры МСК<sub>TERT</sub> могут быть использованы в качестве культур клеток-продуцентов секрета при длительном пассировании, что открывает возможности получения БМБП со стабильным качественным и количественным составом в количествах, достаточных для масштабного клинического применения.

### 3.3.2. Биологическая активность секрета культуры МСК<sub>TERT</sub>

Известно, что секретом немодифицированных МСК обладает биологической активностью в различных моделях [6]. Для обоснования возможности трансляции в регенеративную биомедицину метода лентивирусной трансдукции последовательностью кДНК *hTERT* МСК жировой ткани человека для получения секрета необходимо продемонстрировать отсутствие влияния применения данного метода на сохранность биологической активности секрета. Для анализа биологической активности мы выбрали две принципиально различные модели – 1) *in vitro* модель нейритогенеза сенсорных дорсальных ганглиев мыши как показатель сохранности трофических свойств секрета МСК<sub>TERT</sub> на примере стимуляции нейрогенеза и 2) *in vitro* модель фиброза как показатель сохранности антифибротического действия секрета МСК<sub>TERT</sub>.

#### 3.3.2.1. Модель нейритогенеза сенсорных дорсальных ганглиев мыши

Нейротрофическую биологическую активность исследовали с помощью ранее опубликованной нашими коллегами *in vitro* модели нейритогенеза сенсорных дорсальных ганглиев мыши [266-268]. Ганглии культивировали в культуральной среде DMEM без добавления сыворотки (отрицательный контроль), либо с добавлением секрета пМСК и МСК<sub>TERT</sub>. Видимые в проходящем свете прорастающие отростки валидировали на предмет соответствия нейритам с помощью иммуногистохимического окрашивания антителами к высокомолекулярному белку нейрофиламентов NF200. Специфичность окрашивания нейритов подтверждали отсутствием окрашивания нейритов с помощью мышиных неспецифических антител IgG1 (рис. 27 «контроль»).

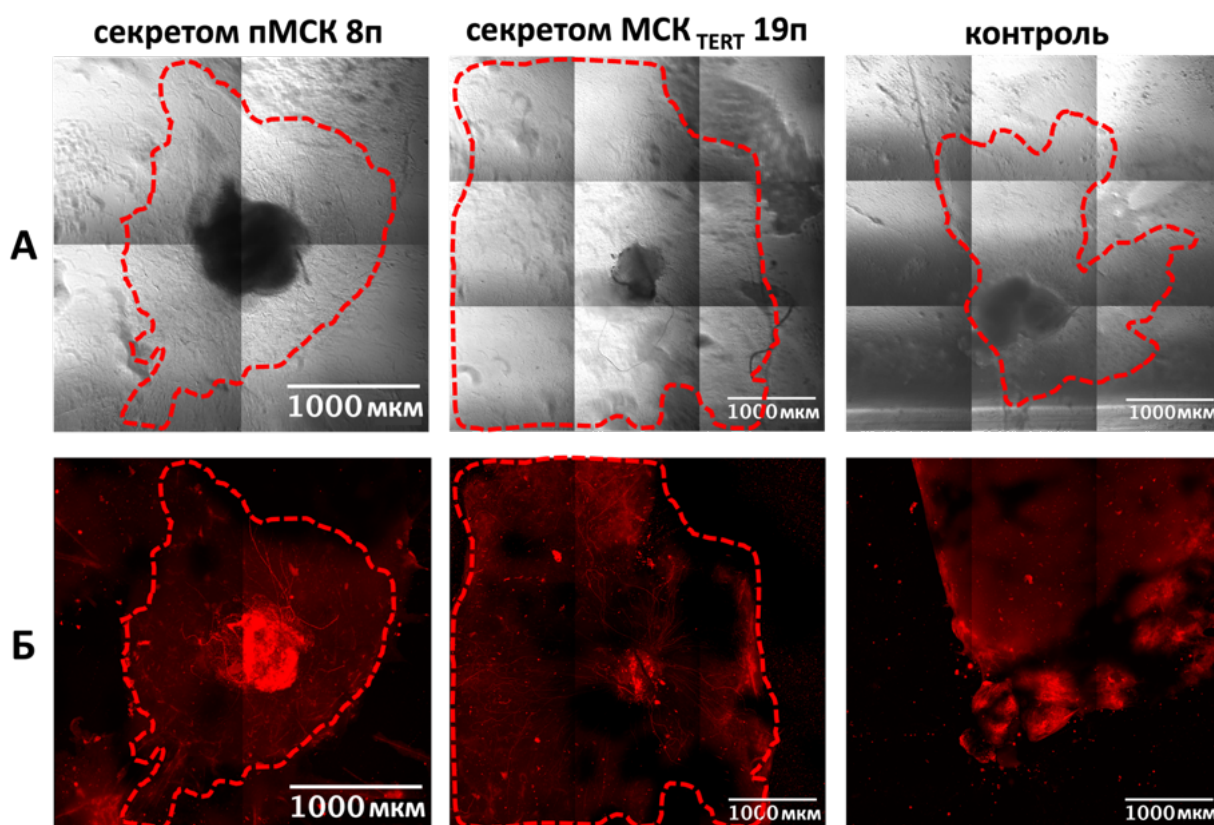


Рисунок 27. Микрофотографии сенсорных дорсальных ганглиев мыши, культивируемых в Матригеле в среде DMEM, содержащей секретом пМСК или МСК<sub>ТЕРТ</sub>, на 20 сутки культивирования: **А** – в проходящем свете, **Б** – в флуоресцентном канале (окрашивание антителами к белку нейрофиламентов NF200 (группы пМСК и МСК<sub>ТЕРТ</sub>) либо мышинными неспецифическими IgG1 (группа контроля)).

Согласно полученным результатам секретом МСК<sub>ТЕРТ</sub>, как и пМСК обладает нейротрофической активностью. Так, при культивировании сенсорных дорсальных ганглиев в среде, не содержащей секретом, на 20й день наблюдали отсутствие прорастающих нейритов, что объясняется отсутствием в культуральной среде ростовых факторов. Отметим, что в контроле нейриты визуализировались на 8й день, что можно объяснить остаточным содержанием в Матригеле ростовых факторов (согласно протоколу производителя), которые, однако, не способны обеспечить длительное выживание нейритов. При культивировании в среде, содержащей как секретом пМСК, так и секретом МСК<sub>ТЕРТ</sub>, наблюдали постепенное увеличение длины прорастающих нейритов и площади покрытия (рис. 28). «Полученные данные коррелируют с результатами тестирования нейропротективной активности секрета иммортализованных МСК в *in vivo* модели геморрагического инсульта головного мозга крыс [23]» [269].



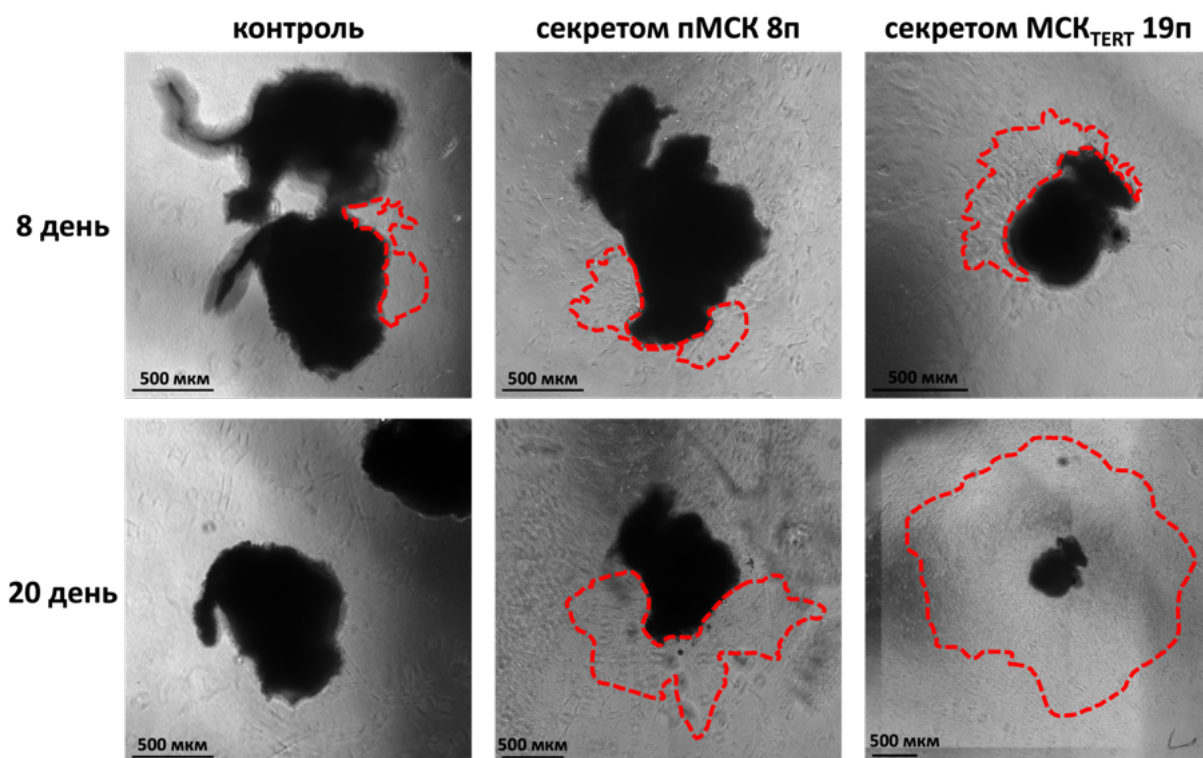


Рисунок 28. Репрезентативные микрофотографии в проходящем свете сенсорных дорсальных ганглиев мыши, культивируемых в Матригеле в среде DMEM, не содержащей секретом (контроль), и среде, содержащей секретом пМСК или МСК<sub>TERT</sub>, на 8 и 20 сутки культивирования.

### 3.3.2.2. Модель фиброза

Нашими коллегами было показано, что везикулярная фракция секретома первичных МСК обладает антифибротическим действием. Так, в модели фиброза [270] она препятствовала индуцированной с помощью TGF- $\beta$ 1 дифференцировке фибробластов человека в миофибробласты [271]. Мы исследовали, сохраняет ли секретом МСК<sub>TERT</sub> такое действие, в том числе при длительном культивировании. Для этого сначала мы подтвердили, что сверхэкспрессия *hTERT* не оказывает значительного влияния на состав и свойства внеклеточных везикул (анализ траектории наночастиц (NTA) показал, что секретом МСК<sub>TERT</sub> достоверно не отличается от секретома пМСК по концентрации и размеру ВВ (Приложение 1)).

Общепринятым маркером миофибробластов является альфа гладкомышечный актин ( $\alpha$ -SMA). Антифибротический эффект в *in vitro* моделях подтверждается снижением экспрессии  $\alpha$ -SMA и снижением доли стресс-фибрилл, в которые встроился  $\alpha$ -SMA.

Мы проанализировали содержание  $\alpha$ -SMA в лизате фибробластов, культивированных в среде, содержащей 5 нг/мл TGF- $\beta$ 1 и везикулярную фракцию

секретома МСК<sub>ТЕРТ</sub>. Отрицательным контролем являлся лизат культур МСК, культивированных в среде, не содержащей TGF- $\beta$ 1, положительным контролем - лизат культур МСК, культивированных в среде, содержащей 5 нг/мл TGF- $\beta$ 1.

Результаты вестерн-блоттинга показали, что при добавлении везикулярной фракции как секретома пМСК, так и секретома МСК<sub>ТЕРТ</sub> содержание  $\alpha$ -SMA в лизатах дифференцировавшихся в миофибробласты фибробластов значительно ниже, чем в положительном контроле (в 4,06 и 9,7 раз соответственно) (рис. 29). Содержание  $\alpha$ -SMA было также значительно (в 5,3-6,9 раз) ниже, чем в положительном контроле и при культивировании в среде, содержащей везикулярную фракцию секретома длительно культивированных МСК<sub>ТЕРТ</sub> (исследовано до 30 пассажа) (рис. 29). Согласно [270] терапевтически значимым уровнем снижения содержания  $\alpha$ -SMA считается снижение в  $\geq 2,5$  раза по сравнению с положительным контролем.

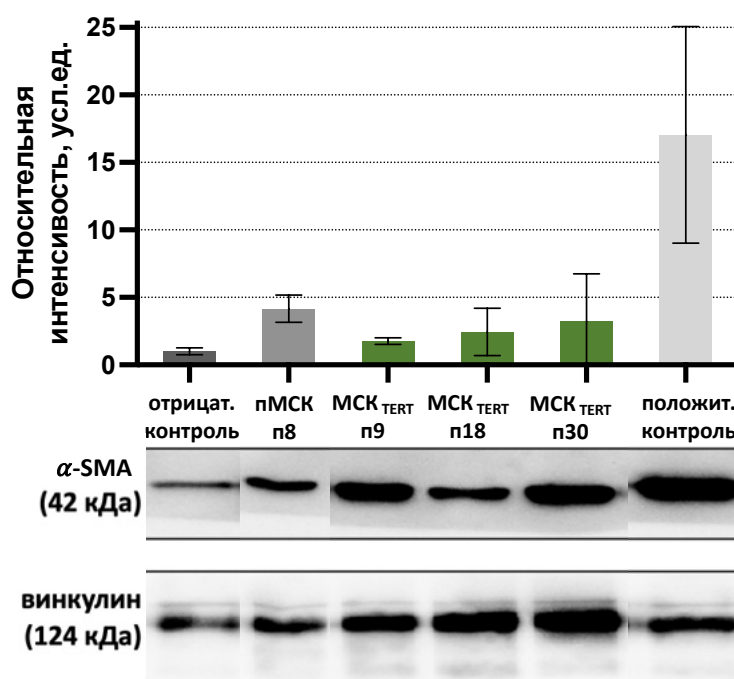


Рисунок 29. Антифибротические свойства секретома МСК (вестерн-блоттинг клеточных лизатов, окрашенных антителами к  $\alpha$ -SMA, сигнал нормирован на сигнал винкулина).

Антифибротический эффект был подтвержден и с помощью иммуноцитохимического окрашивания (рис. 30). Согласно результатам, при добавлении в дифференцировочную культуральную среду везикулярной фракции секретома как пМСК, так и МСК<sub>ТЕРТ</sub> сопоставимого пассажа, количество стресс-фибрил, в которые встроился  $\alpha$ -SMA, было значительно ниже, чем в клетках, культивируемых в дифференцировочной



среде без добавления секретома. Значительно сниженное количество стресс-фибрилл со встроеным  $\alpha$ -SMA наблюдалось и при добавлении секретома длительно культивированных МСК<sub>TERT</sub> (исследовано до 30 пассажа) (рис. 30).

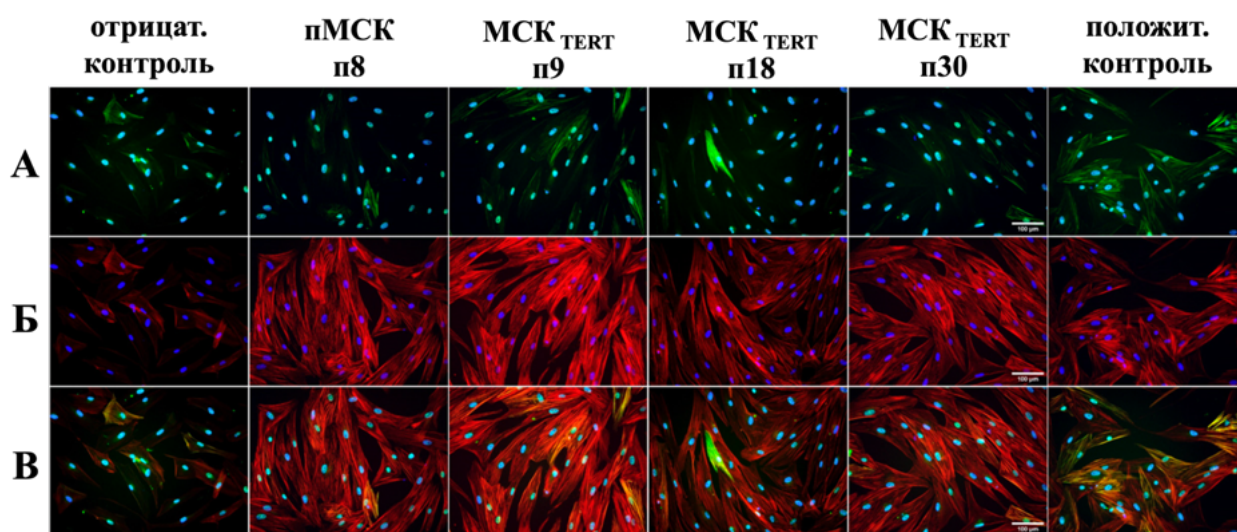


Рисунок 30. Антифибротические свойства секретома МСК (флуоресцентная микроскопия иммуноцитохимического окрашивания культур фибробластов, дифференцирующихся в миофибробласты). **А** - экспрессия  $\alpha$ -SMA, **Б** - экспрессия тотального актина (окрашивание фаллоидином), **В** – наложение каналов  $\alpha$ -SMA и тотального актина. Отрицательный контроль – культивирование в среде без индуктора TGF- $\beta$ 1, экспериментальные группы (пМСК, МСК<sub>TERT</sub>) – в среде с добавлением 5 нг/мл TGF- $\beta$ 1 и везикулярной фракции секретома, положительный контроль – в среде с 5 нг/мл TGF- $\beta$ 1).

**Вывод по п. 3.3.2:** суммируя результаты, описанные в п. 3.3.2, можно заключить, что на примере *in vitro* моделей нейритогенеза сенсорных дорсальных ганглиев мыши и фиброза мы показали, что метод лентивирусной трансдукции геном *hTERT* МСК жировой ткани человека не изменяет (не снижает) биологическую активность секретома получаемых культур (нейротрофическую и антифибротическую соответственно).

### 3.3.3. Безопасность: трансформирующий потенциал секретома культуры МСК<sub>TERT</sub>

Для обоснования возможности трансляции в регенеративную биомедицину метода лентивирусной трансдукции последовательностью кДНК *hTERT* МСК жировой ткани человека с целью получения секретома в количестве, достаточном для клинического применения, необходимо продемонстрировать, что данный метод не снижает безопасность секретома, которая свойственна секретому немодифицированных первичных культур МСК (последнее показано во многих исследованиях [272-275]. В качестве исследуемых параметров безопасности секретома МСК<sub>TERT</sub> были выбраны следующие: 1) отсутствие стимуляции опухолевой трансформации, выражающейся в

образовании колоний при воздействии секрета MCK<sub>TERT</sub> на клетки человека в soft agar colony formation assay, 2) отсутствие увеличения экспрессии протоонкогенов при воздействии секрета MCK<sub>TERT</sub> на клетки человека (на примере фибробластов; по данным транскриптомного анализа), 3) отсутствие теломеразы (ее ДНК, мРНК, белка) в составе секрета MCK<sub>TERT</sub>.

### 3.3.3.1. Трансформирующий потенциал: soft agar colony formation assay

В качестве метода проверки трансформирующей активности мы выбрали один из наиболее широко признанных *in vitro* методов - soft agar colony formation assay [276]. Метод основан на том, что трансформированные клетки обладают способностью к росту в независимости от прикрепленности к твердому субстрату росту и формируют колонии в мягком агаре. Первичные культуры фибробластов дермы человека 5-8 пассажа от двух доноров культивировали в мягком агаре, содержащем FBS (отрицательный контроль), секретом пМСК или MCK<sub>TERT</sub>, известные мутагены NaNO<sub>2</sub> или диметилсульфат (положительный контроль). Согласно результатам (рис. 31) присутствие в среде роста секрета MCK<sub>TERT</sub> и пМСК не приводило к появлению колоний фибробластов (0%), в то время как в присутствии мутагенов NaNO<sub>2</sub> или диметилсульфата ([277,278]) колонии образовывались (3% и 4% соответственно). При культивировании фибробластов во всех исследованных условиях наблюдались как одиночные клетки, так и пары клеток, что мы объясняем наличием митотически делящихся клеток в суспензии высаживаемых в мягкий агар фибробластов.

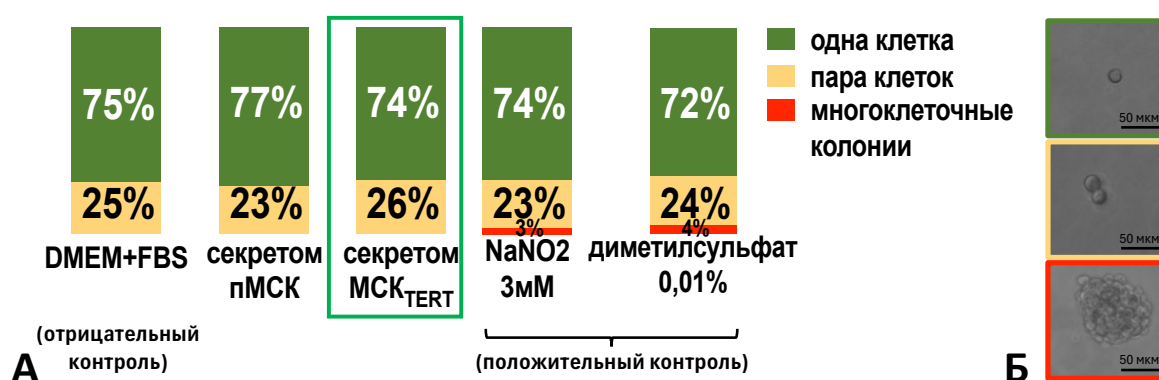


Рисунок 31. Отсутствие трансформирующей активности секрета MCK (soft agar colony formation assay). **А.** Процентное соотношение числа одиночных клеток, пары клеток, клеточных колоний фибробластов при культивировании в среде, содержащей FBS (отрицательный контроль), секретом пМСК или MCK<sub>TERT</sub>, NaNO<sub>2</sub> или диметилсульфат (положительный контроль), **Б.** Репрезентативные микрофотографии в проходящем свете одиночной клетки, пары клеток, клеточной колонии.

### 3.3.3.2. Трансформирующий потенциал: влияние секрета МСК<sub>ТЕРТ</sub> на транскриптом обрабатываемых клеток

Трансформирующая активность секрета может проявляться в его способности изменять транскрипционную активность обрабатываемых клеток и стимулировать в них увеличение экспрессии протоонкогенов или снижение экспрессии генов-супрессоров опухолевого роста. Поэтому был проведен транскриптомный анализ лизатов первичных культур фибробластов дермы человека, культивируемых в условиях присутствия секрета в культуральной среде. Полученные первичные результаты секвенирования доступны в репозитории GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE306748>).

Согласно результатам сравнения транскриптомов фибробластов, культивированных в стандартной культуральной среде (отрицательный контроль) и в среде, содержащей секретом (как пМСК, так и МСК<sub>ТЕРТ</sub>), содержание в культуральной среде секрета пМСК и МСК<sub>ТЕРТ</sub> не приводит к изменению экспрессии протоонкогенов и генов-супрессоров опухолевого роста.

При культивировании фибробластов в среде, содержащей секретом МСК<sub>ТЕРТ</sub>, изменился уровень экспрессии 57 генов (0,29% от определенных 19336 генов) относительно экспрессии генов в фибробластах, культивируемых в среде, содержащей секретом пМСК: уровень экспрессии 3 генов повысился, 54 – понизился. При этом важно, что ни один из генов, изменение экспрессии которого было детектировано, не является протоонкогеном или геном-супрессором опухолевого роста (рис. 32).

Отметим, что при анализе изменения транскриптома фибробластов, культивированных в присутствии диметилсульфата либо NaNO<sub>2</sub> (положительный контроль) было выявлено изменение экспрессии большего числа генов (0,6% и 0,8% соответственно), однако среди них не было протоонкогенов (в т.ч. *MYC*, *EGFR* и др.) и генов-супрессоров опухолевого роста (в т.ч. *BRCA1*, *VHL*, *TP53* и др.). Предположительно, это можно объяснить тем, что лишь малая доля клеток подверглась трансформации (что в том числе выразилось в образовании многоклеточных колоний в мягком агаре - 4% и 3% соответственно), из-за чего чувствительности метода не хватило для детекции изменений на уровне транскриптома. Использование же более высоких концентраций диметилсульфата и NaNO<sub>2</sub> в эксперименте было невозможно, т.к. приводило к массовой гибели клеток.

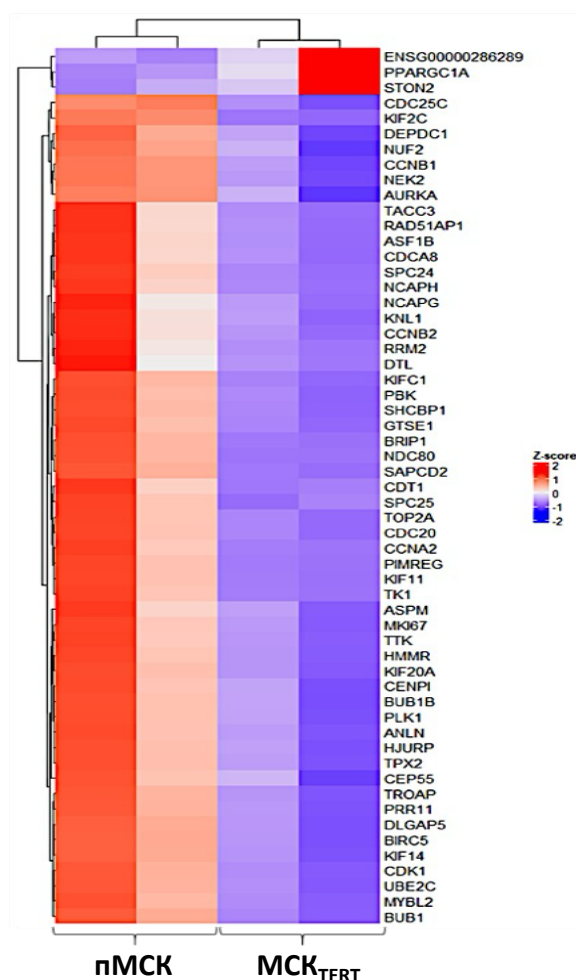


Рисунок 32. Транскриптомный анализ лизатов первичных культур фибробластов дермы человека, культивированных в среде, содержащей неконцентрированный секретом пMCK и MCK<sub>TERT</sub>.

### 3.3.3.3. Трансформирующий потенциал: содержание компонентов теломеразы в секрете MCK<sub>TERT</sub>

Учитывая потенциальную роль теломеразы в процессе канцерогенеза, было необходимо оценить содержание в секрете ее компонентов. Для этого определяли в стократно сконцентрированном секрете MCK<sub>TERT</sub> (сконцентрирован для увеличения чувствительности метода) содержание гена (кДНК) и мРНК каталитической субъединицы теломеразы (методом ПЦР-РВ), и каталитической субъединицы теломеразы (методом вестерн-блоттинга). Согласно полученным результатам в стократно сконцентрированном секрете MCK<sub>TERT</sub> не детектировались ни ген (кДНК), ни мРНК гена каталитической субъединицы теломеразы (данные не показаны, т.к. кДНК и мРНК не детектировались при ПЦР-РВ), ни каталитическая субъединица теломеразы, что было подтверждено в независимых экспериментах (на рис. 33 показаны результаты двух повторов).

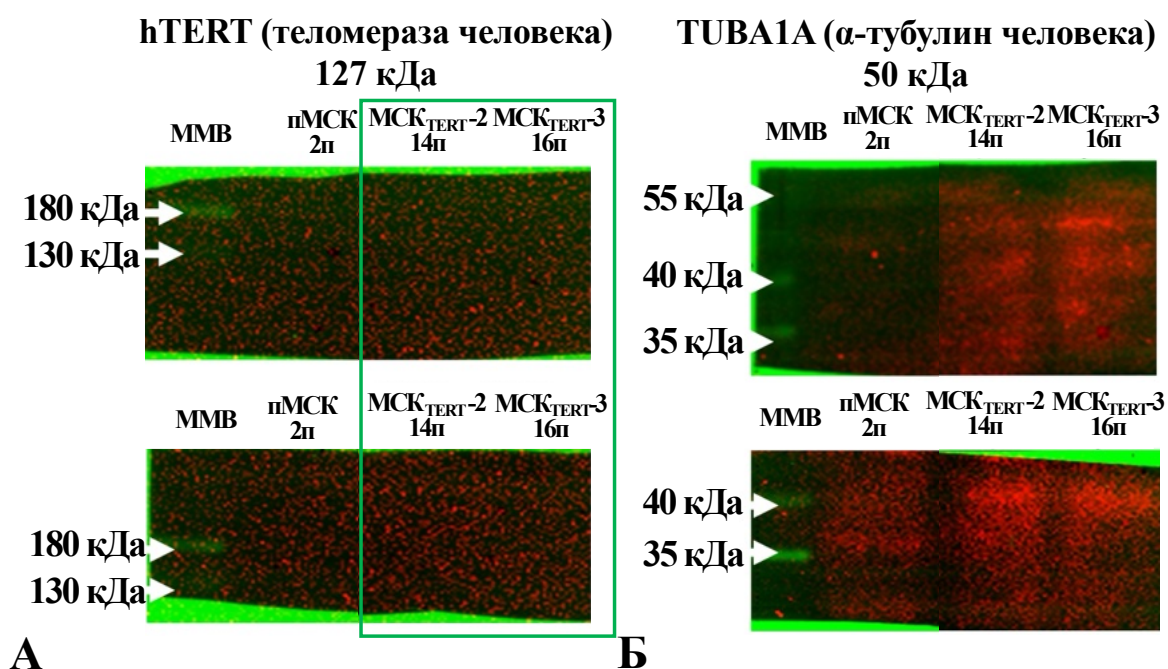


Рисунок 33. Вестерн-блоттинг стократно сконцентрированного секретома pMCK и MCK<sub>TERT</sub>. **А.** Содержание каталитической субъединицы теломеразы (окрашивание антителами к теломеразе человека), **Б.** Содержание  $\alpha$ -тубулина (окрашивание антителами к TUBA1A для демонстрации чувствительности процедуры вестерн-блоттинга к обнаружению внутриклеточных белков в составе секретома). Показаны результаты двух независимых экспериментов (верхняя и нижняя панель соответственно). MMB – маркер молекулярного веса.

**Вывод по п. 3.3.3:** суммируя результаты, описанные в п. 3.3.3, можно заключить, что метод лентивирусной трансдукции геном *hTERT* MCK жировой ткани человека не приводит к появлению трансформирующего потенциала секретома получаемых культур.

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ<sup>6</sup>

### *Объект, цель, задачи, основной метод исследования.*

Настоящее исследование выполнено в области регенеративной медицины – новой отрасли медицины, существующей около 30 лет, направленной на восстановление поврежденных или утраченных тканей, органов, функций человеческого организма. Для решения этих проблем развиваются такие основные направления как генная и РНК-терапия, терапия на основе стволовых клеток, органоидов, скаффолдов, трансплантология [279]. Среди стволовых клеток наибольший исследовательский интерес направлен на МСК как ключевых участников репаративных и регенеративных процессов [29], и МСК жировой ткани считаются одними из наиболее привлекательных МСК для регенеративной медицины, поэтому они были выбраны в качестве объекта настоящего исследования.

При этом их применение в виде первичных клеточных культур сопряжено с многими трудностями: гетерогенностью свойств МСК (и секретома) разных популяций одной ткани/разных тканей/разных доноров, дефицитом донорского материала, изменением свойств МСК и секретома при культивировании *in vitro*, ограниченным пролиферативным потенциалом, клеточным старением, которое сопровождается увеличением риска генетических перестроек, изменения фенотипа и опухолевой трансформации, что в результате затрудняет создание, использование, стандартизацию получаемых клеточных линий, проведение фундаментальных исследований, масштабирование и стандартизацию процесса получения биомедицинских клеточных и бесклеточных продуктов [89,100,281]. Немаловажно, что при использовании первичных культур клеток также могут возникать проблемы безопасности, обусловленные ненулевой вероятностью спонтанной иммортализации и опухолевой трансформации клеток, длительно культивируемых *in*

---

<sup>6</sup> Положения раздела «Обсуждение» опубликованы в следующих статьях, подготовленных автором лично или в соавторстве:

1. **Primak A. L.**, Shkarina L. N., Illarionova M. E., Plyushchii I. V., Zakharova A. V., Tkachuk V. A., Karagyaur M. N. *Immortalization of Cultured Cells in Regenerative Biomedicine: Approaches, Opportunities, and Limitations // Biochemistry (Moscow)*. - 2025. - V. 90. - №8. — P.1000-1017. - EDN: UBZRJX. Импакт-фактор 0,659/2,2 (SJR 2024/ JIF 2024).
2. Dzhauari S.S., **Primak A.L.**, Basalova N.A., Kalinina N.I., Monakova A.O., Bozov K.D., Velichko A.Y., Illarionova M.E., Grigorieva O.A., Akopyan Z.A., Popov V. S., Malkov P. G., Efimenko A. Y., Tkachuk V. A., Karagyaur, M. N. *Overexpression of BDNF and uPA Combined with the Suppression of Von Hippel–Lindau Tumor Suppressor Enhances the Neuroprotective Activity of the Secretome of Human Mesenchymal Stromal Cells in the Model of Intracerebral Hemorrhage // International Journal of Molecular Sciences*. - 2025. - V. 26. - №14. - С. 1-19. - EDN: AVNUZM. Импакт-фактор 1,273/4,9 (SJR 2024/ JIF 2024).

*vitro*. Такая спонтанная трансформация экспериментально показана в том числе и для МСК человека [166,281]. Для преодоления этих трудностей необходимо создавать клеточные линии с стабильными свойствами однородными в клеточной популяции и продленным периодом пролиферативной активности. К настоящему времени существует много методов отсрочивания клеточного старения, направленных на воздействие на основные причины клеточного старения или на ключевые молекулярные факторы, опосредующие его. Наиболее долгосрочный эффект достигается методами генной инженерии. Выбор метода иммортализации зависит от задач исследования, также он должен быть эффективным и безопасным. В нашем исследовании одной из задач являлось создание клеточной культуры как модельного объекта для изучения первичных культур МСК жировой ткани человека. Для этой задачи был выбран метод сверхэкспрессии гена *hTERT*, т.к. он вносит наименьшие изменения в молекулярные сети функционирования клетки и поэтому может считаться наиболее физиологичным. Также он воздействует именно на причину развития одного из основных типов клеточного старения (репликативного) – укорочение теломер, которое неизбежно наступает при длительном культивировании и при этом не может быть полноценно нивелировано простыми методами, такими как аккуратное соблюдение условий культивирования (что позволяет предотвратить развитие другого основного типа старения - стресс-индуцированного). Отметим, что согласно литературным данным (и подтверждено в нашем исследовании) такого подхода может оказаться недостаточно для достижения полной иммортализации, и часто требуется коэкспрессия *hTERT* с вирусными онкогенами или одновременное применение других методов инактивации ключевых контрольных точек, включая p53. Но такие подходы 1) вносят значительные изменения в молекулярные сети, ведущие к изменению физиологии клеток, что часто противоречит целям исследования, 2) релевантны, если задачей исследования является создание клеточных моделей не нормальных соматических клеток человека, а специфических, например клеток опухолей или микроокружения опухолей (именно поэтому, например, в [202] была применена сверхэкспрессия *hTERT* и нокаут p53, т.к. мутации p53 часто наблюдаются в клетках опухолевого микроокружения), 3) могут вести к геномной нестабильности и появлению трансформированного фенотипа [187,211,213,228]. Таким образом, согласно результатам проведенного анализа литературы метод иммортализации посредством сверхэкспрессии гена *hTERT* был выбран как наиболее безопасный и наиболее оправданный для задач



настоящего исследования. Поэтому мы поставили цель изучить возможность применения клеточных культур, сверхэкспрессирующих ген *hTERT*, для решения задач регенеративной медицины.

В качестве вектора был выбран лентивирусный как один из трех наиболее широко используемых (наряду с аденовирусами и аденоассоциированными вирусами), предпочтительных для доставки трансгенов *ex vivo* и одобренных органами-регуляторами. Этот вектор подходит для трансдукции как клеток в активной фазе деления, так и постмитотических, обладает емкостью упаковки до 9 т.п.о. (наша целевая вставка имела размер около 7 т.п.о.), позволяет достичь стабильной экспрессии целевого гена благодаря интеграции в геном клетки-хозяина, обладают достаточно низкой цитотоксичностью [282,283].

Задачи определяли, основываясь на следующем: существуют два принципиальных подхода применения МСК в исследовательских целях и для решения прикладных задач:

- 1) применение самих МСК как модельного объекта или биомедицинского клеточного продукта (БМКП);
- 2) применение продуктов паракринной активности МСК – секретома, его фракций или компонентов (включая везикулы).

Получаемые линии должны удовлетворять наибольшему возможному числу задач. Поэтому наше исследование включало два смысловых блока: 1) определение применимости таких культур как модельных объектов и 2) определение применимости таких культур как продуцентов секретома для терапевтических целей.

### **Результаты.**

#### *1) МСК жировой ткани, сверхэкспрессирующие *hTERT*, как модельные объекты*

##### *1.1) Свойства МСК, определенные ISCT, и функциональная активность*

Клеточная линия, используемая в качестве модельного объекта, должна сохранять основные свойства первичных клеток. Однако, к настоящему времени накоплено много противоречивых данных о влиянии сверхэкспрессии гена *hTERT* на свойства получаемых клеточных линий разных тканей (табл. 10), поэтому это проблемное поле оставалось открытым. В коллекции ATCC представлено только две коммерческие линии иммортализованных МСК жировой ткани человека - A41hWAT-SVF (CRL-3386<sup>TM</sup>) и ASC52telo (SCRC-4000<sup>TM</sup>). Линия A41hWAT-SVF мало изучена (нам удалось найти только одну статью [284], в которой она была использована). Более широко используемая линия



ASC52telo не может являться полноценным модельным объектом для регенеративной биомедицины, т.к. имеет сниженную чувствительность к инсулину [22] и нарушенный адипогенный потенциал [285]. Также нет ни одной опубликованной клеточной линии МСК жировой ткани человека, которая бы удовлетворяла всем необходимым свойствам модельного объекта для первичных культур. В нашем исследовании впервые получена клеточная культура МСК жировой ткани человека, обладающая всеми необходимыми свойствами: имеет сохранную морфологию, иммунофенотип, потенциал к дифференцировке в адипогенном, остеогенном, хондрогенном направлениях, чувствительность к широкому спектру гормонов (глутамату, ГАМК, дофамину, норадреналину, ангиотензину II, гистамину, серотонину, ПТГ, инсулину) вплоть до 40х пассажей. Отметим, что сохранность чувствительности к гормональным стимулам является важным показателем функциональной активности МСК как ключевых участников поддержания гомеостаза, репарации и регенерации. В нашей работе впервые проведен анализ влияния сверхэкспрессии *hTERT* на чувствительность МСК жировой ткани человека к широкому спектру гормональных стимулов и впервые этим методом создана клеточная линия, сверхэкспрессирующая *hTERT* и сохраняющая такую чувствительность [286].

По результатам сравнения трех полученных культур МСК<sub>TERT</sub> можем отметить, что мы не наблюдали корреляции между активностью теломеразы, длиной теломер, пролиферативной активностью и сохранностью дифференцировочного потенциала. Так, культура МСК<sub>TERT</sub>-2, которая показала сохранность всех исследованных свойств, обладала наибольшей активностью теломеразы, при этом характеризовалась наибольшим временем удвоения среди всех трех созданных культур МСК<sub>TERT</sub> и демонстрировала выраженное замедление пролиферации к 40 пассажу. Наряду со снижением остеогенного и адипогенного потенциала к 40 пассажу и снижением экспрессии CD105 это свидетельствовало о постепенном клеточном старении при сохранной активной теломеразе и стабильной длине теломер. Это коррелирует с данными о том, что сверхэкспрессии TERT не всегда достаточно для достижения полной иммортализации. Культура МСК<sub>TERT</sub>-1, которая характеризовалась наибольшей длиной теломер, имела при этом нарушенный остеогенный и адипогенный потенциал. Культура МСК<sub>TERT</sub>-3, которая имела стабильную длину теломер и меньшую активность теломеразы, чем у МСК<sub>TERT</sub>-2, при пассировании дольше проявляла признаки отсутствия клеточного старения –

большинство клеток не окрашивались на  $\beta$ -галактозидазу, и время удвоения на позднем пассаже (37) было значительно (в 3,2 раза) ниже, чем у МСК<sub>TERT-2</sub> на сравнимом (40) пассаже.

Поэтому можем заключить, что сверхэкспрессией *hTERT* возможно получить культуру МСК со свойствами, характерными для первичных культур, но необходимо оценивать для такой полученной культуры сохранность всего комплекса искомых свойств.

#### 1.2) *Стабильность кариотипа как свойство модельного объекта и показатель безопасности*

В литературе описаны случаи высокой вероятности приобретения клеточными линиями, сверхэкспрессирующими *hTERT*, хромосомных перестроек и геномной нестабильности (рассмотрено в п. 4.2.1.). В нашей работе эти результаты не подтвердились. Полученные результаты кариотипического анализа созданных культур МСК показали, что с помощью этого метода можно получить клеточные культуры с нормальным кариотипом и кариотипом стабильном при пассировании (в нашем исследовании 3 из 4 полученных культур), но в некоторых случаях могут происходить клональные транслокации (в нашем исследовании в 1 из 4 культур они наблюдались в 17,1% клеток). Отметим, что при получении всех четырех культур был использован одинаковый титр лентивирусов. Также стоит сказать, что первичные клетки культуры МСК<sub>TERT-3</sub>, в которой произошли хромосомные транслокации, были получены от донора 53 лет, при этом при культивировании *in vitro* до достижения состояния с выраженными признаками клеточного старения прошли заметно больше клеточных удвоений без замедления пролиферации; после трансдукции *hTERT* они демонстрировали наибольшую скорость пролиферации и наименьший размер клеток (по сравнению с другими исследованными культурами). Это свидетельствует о исходной предрасположенности первичных клеток этого донора к усиленной пролиферации, которая может быть обусловлена нарушением функционирования контрольных точек клеточного цикла, что, в свою очередь, коррелирует с большей вероятностью приобретением мутаций, и могло являться причиной наблюдаемых транслокаций. Это согласуется с данными других исследователей, сообщающих о высокой вероятности приобретения такими линиями хромосомных перестроек - в таких работах были использованы клетки не молодых доноров (в [287] – 102 года, в [161] – 52 года). К этому возрасту донорские клетки уже могут содержать большое количество мутаций, укороченные теломеры (что может

приводить к циклам «разрыв-слияние-мост» концов хромосом) и могут иметь нарушенные механизмы поддержания геномной стабильности. Полученные нами культуры клеток МСК<sub>TERT</sub>-4 и МСК<sub>TERT</sub>-5, которые имели нормальный кариотип, были получены от доноров **возраста ... и ...** соответственно. Также важно отметить, что опубликованные данные указывают на важность сохранения определенного соотношения (1:2 или 1:3) при пассировании клеточных культур для обеспечения геномной стабильности клеточной популяции, что согласуется с нашими данными. Так, в серии работ [153,170,243] авторы провели прямое сравнение поведения клеток при пассировании в различном соотношении и показали, что при пассировании в соотношении 1:2 МСК костного мозга, сверхэкспрессирующие *hTERT*, сохраняют нормальный кариотип, не приобретают мутации и признаки трансформированного фенотипа, в то время как при пассировании в соотношении 1:4 и 1:20 соответственно постепенно исчезает контактное ингибирование (признак постепенной трансформации) и достигается полная трансформация (100% клеточной популяции вызывали образование опухолей при введении иммунодефицитным мышам линии NOD/LtSz- Prkdc<sup>SCID</sup>). В нашем исследовании пассирование проводилось в соотношении 1:3, и клетки не приобрели трансформированный фенотип. Во время проведения экспериментальных исследований мы также наблюдали зависимость выраженности признаков клеточного старения (по окрашиванию на β-галактозидазу<sup>7</sup>) от условий культивирования – состава питательных сред, аккуратности проведения манипуляций с клетками. Так, при культивировании в среде DMEM (с 1 г/л глюкозы (Gibco, #11885084, США), 10% FBS (ThermoFisher Scientific, #26140079, США), смеси 100ед/мл пенициллина и 100мкг/мл стрептомицина (Gibco, #15240062, США)) клетки имели значительно менее выраженные признаки клеточного старения, чем при культивировании в среде DMEM с содержанием глюкозы 4,5 г/л. Это можно объяснить активацией процессов стресс-индуцированного клеточного старения при культивировании на некоторых питательных средах, которое может усиливать повреждающие процессы и приводить к геномной нестабильности.

Это подчеркивает необходимость аккуратного подбора донора, соблюдения условий культивирования (соотношения при пассировании, качества питательных сред) и включения анализа кариотипа на ранних и более поздних пассажах в необходимый

---

<sup>7</sup> Не существует единого высокоспецифичного универсального маркера клеточного старения. Окрашивание на β-галактозидазу, ассоциированную со старением, является одним из общепризнанных маркеров [<https://doi.org/10.3390/ijms242317089>], поэтому мы выбрали его при анализе выраженности клеточного старения.

перечень исследований при получении клеточных моделей с помощью сверхэкспрессии *hTERT*. При соблюдении этих условий можно получить культуры с нормальным стабильным кариотипом и не трансформированным фенотипом (что согласуется с данными других исследователей) (табл. 10).

Таблица 10. Свойства клеток человека (МСК костного мозга и жировой ткани, фибробластов, эпителиальных клеток пищевода и сетчатки, клеток эндометрия, гладких мышечных клеток сосудов), сверхэкспрессирующих *hTERT*

| свойства                                                                   | сохранность              | ссылки                                          |
|----------------------------------------------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------------------|
| Основные свойства клеток дикого типа                                       | + (сохранны)             | [164,170-172,176,254, 288-290]                  |
|                                                                            | - (не сохранны)          | [170,173,285,291,292]                           |
| Онкогенность                                                               | + (есть)                 | [153,161,174,242,293]                           |
|                                                                            | - (нет)                  | [14,161,164,167 -173, 175,176,288, 289,294-295] |
| Кариотип, молекулярные пути ответа на повреждение/генетические перестройки | + (сохранны/отсутствуют) | [14,167,168,170-172,288,289,292]                |
|                                                                            | - (нарушены/есть)        | [161,174,294,295]                               |
| Эпигенетический профиль                                                    | + (сохранен)             |                                                 |
|                                                                            | - (нарушен)              | [288]                                           |
| Терапевтический потенциал                                                  | + (сохранен/улучшен)     | [291,292]                                       |
|                                                                            | - (нарушен)              | [291]                                           |

2) *МСК жировой ткани, сверхэкспрессирующие hTERT, как продуценты секрета – в качестве модельного объекта и для терапевтических целей*

Ранее считалось, что терапевтический эффект МСК основан на их способности после введения мигрировать в место повреждения и дифференцироваться в клетки поврежденной ткани. Однако современная парадигма прорегенеративной способности МСК сдвинулась в сторону признания основной роли паракринного механизма - за счет продукции широкого спектра биологически активных молекул в составе секрета (факторов роста, цитокинов, белков матрикса, микроРНК и др), которые в совокупности обладают проангиогенным, нейропротективным и нейротрофическим, антиапоптотическим, иммуномодулирующим (в т.ч. противовоспалительным), противомикробным и противоопухолевым действием [296]. Также показано, что секретом МСК обладает прорегенеративным действием, сопоставимым с самими МСК. Наряду с тем, что подходы клеточной терапии сопряжены с большими проблемами выживаемости клеток после введения в организм, которая подчас остается крайне низкой (на уровне нескольких процентов), рисками иммунного отторжения, образования при дифференцировке вводимыми клетками эктопических тканей, риском образования

опухолей, которые нивелируются в случае использования секретомы, основной фокус современных исследований в области клинического применения прорегенеративного эффекта МСК направлен на использование именно секретомы [6], производство и хранение которого также обладает преимуществом большей экономической доступности и целесообразности. Нельзя не отметить, что внедрение секретомы как лекарственного средства в реальную клиническую практику может быть затруднено из-за приверженности фармацевтическим обществом считающейся основной в фармакологии парадигме «один ген – одно лекарство – одна болезнь». Однако еще в 2008 г. [297] была предложена и обоснована новая парадигма – сетевая фармакология, основанная на концепции полифармакологии, которая учитывает комплексность этиологии большинства заболеваний и постулирует необходимость воздействия лекарством на несколько молекулярных мишеней, являющихся ключевыми узлами в молекулярной сети этиологии заболевания. Концепция полифармакологии предлагает 3 подхода – 1) комбинированное лечение существующими индивидуальными лекарственными препаратами (ЛП), 2) создание многокомпонентных ЛП с несколькими действующими веществами и 3) подбор однокомпонентного ЛП, действующего на несколько мишеней. Эта парадигма наиболее оправдана для регенеративной биомедицины в силу необходимости воздействия на сложный комплекс процессов, происходящих при повреждении тканей и органов, и активации также сложного комплекса процессов репарации и регенерации; и секретомы как потенциальный ЛП удовлетворяет второму подходу. Поэтому применение секретомы оправдано, область его использования для создания биомедицинских бесклеточных продуктов активно развивается (к настоящему времени известно 37 клинических испытаний секретомы МСК по данным [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov)), и вероятность трансляции в клиническую практику на мировом уровне очень высока. Поэтому можно ожидать, что в ближайшие годы возникнет задача производства секретомы в промышленных масштабах.

Настоящее исследование на примере полученных линий МСК<sub>TERT</sub> обосновывает применимость метода сверхэкспрессии *hTERT*, который может стать удобным инструментом как в фундаментальных исследованиях по изучению секретомы (установлению ключевых прорегенеративных факторов и др.), так и в производственной фармацевтической практике.

### *2.1) Состав секретомы*

Для определения возможности использования секрета МСК, сверхэкспрессирующих *hTERT*, в этих целях в нашей работе был впервые исследован его протеом методом хромато-масс-спектрометрического анализа, определено содержание основных нейропротективных и проангиогенных факторов (BDNF, HGF, VEGF-A, uPA), провоспалительных (IL-1 $\alpha$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) и противовоспалительных факторов (IL-4, IL-10, IL-13, TGF- $\beta$ 1, IDO), основных компонентов SASP (IL-6, MCP-1, PAI-1) по сравнению с содержанием этих факторов в секрете пМСК.

Эти молекулы были выбраны как одни из ключевых, обеспечивающих процессы регенерации поврежденных тканей. Так, известно, что процесс регенерации обычно состоит из четырех фаз: гемостаза, воспаления, пролиферации и ремоделирования [18]:

- Первичное повреждение вызывает сужение кровеносных сосудов и активацию фазы гемостаза, которая обычно сопровождается секрецией клетками тромбоспондина, фактора фон Виллебранда, фибронектина и др. факторов свертывания крови, а также TGF- $\beta$  и PDGF, которые участвуют в привлечении иммунных клеток для инициации восстановления внеклеточного матрикса.
- Через 24 ч после травмы начинается фаза воспаления, во время которой привлекаются дополнительные иммунные клетки. Обычно она сопровождается секрецией цитокинов, хемокинов, факторов роста и ферментов – IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , PDGF, FGF, инсулиноподобного фактора роста 1, эластазы и матриксных металлопротеиназ.
- Во время следующей фазы – пролиферации - происходит пролиферация клеток с образованием грануляционной ткани для закрытия раны и формирование нового ВКМ вместо образованного во время фазы гемостаза. Обычно она сопровождается секрецией ММП, PDGF, VEGF, bFGF, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1 и др.), а также антиангиогенных факторов (ангиостатин, тромбоспондин, эндостатин, фактор роста пигментного эпителия).
- Во время фазы ремоделирования происходит преобразование грануляционной ткани в рубец. Обычно она сопровождается секрецией клетками таких факторов как отложение ретикулярного коллагена, коллагена I типа, лизилоксидазы, цинк-зависимых эндопептидаз, тканевых ингибиторов металлопротеиназ (TIMP), ММП-1, ММП-2, ММП-9, TGF- $\beta$  и TGF- $\beta$ 1.

*Факторы роста*

Факторы роста играют ключевую роль в фазу пролиферации и ремоделирования, стимулируя ангиогенез и нейрогенез, снижая апоптоз клеток. Из большого спектра факторов роста мы выбрали BDNF, HGF, VEGF-A, uPA, т.к. для них доказана роль в обеспечении регенеративного потенциала секрета МСК при повреждении многих тканей и терапевтического эффекта при лечении целого ряда заболеваний (табл. 11).

Таблица 11. Механизм действия и терапевтический эффект BDNF, HGF, VEGF-A, uPA

| фактор                                     | эффект                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | заболевания                                                                                                                                                                                  | ссылки |
|--------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Нейропротективные и проангиогенные факторы |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                              |        |
| BDNF                                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>Нейротрофический (стимулирует нейрогенез, олигодендрогенез, ремиелинизацию)</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Заболевания нервной системы                                                                                                                                                                  | [6]    |
| HGF                                        | Плейотропный: <ul style="list-style-type: none"> <li>Предотвращает апоптоз эпителиальных клеток</li> <li>Антифибротический</li> <li>Усиливает нейрорегенерацию и синаптогенез;</li> <li>Участвует в росте аксонов;</li> <li>Снижает уровень провоспалительных цитокинов (IFN-<math>\gamma</math>, IL-2, IL-17, TNF-<math>\alpha</math>, IL-12p70), увеличивает уровень противовоспалительных цитокинов (IL-4, IL-10)</li> <li>Проангиогенный</li> <li>Нейротрофический, ремиелинизирующий</li> </ul> | Повреждения легких<br>хронические воспалительные заболевания<br>фиброз (в т.ч. печени)<br>Рассеянный склероз<br>Болезнь Альцгеймера<br>Острое повреждение почек<br>Ишемия миокарда           | [6,52] |
| u-PA                                       | Плейотропный: <ul style="list-style-type: none"> <li>Активирует факторы роста</li> <li>Проангиогенный</li> <li>Нейротрофический</li> <li>Активирует систему противосвертывания крови</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Заболевания нервной системы, включая геморрагический инсульт                                                                                                                                 | [23]   |
| VEGF                                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>Проангиогенный</li> <li>Стимулирует развитие костей</li> <li>Нейротрофический</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Острое повреждение почек<br>Сердечно-сосудистые заболевания, включая инфаркт миокарда<br>Заживление ран<br>Ишемический инсульт<br>Регенерация костной ткани при дефектах костей свода черепа | [6,52] |

Согласно полученным результатам, сверхэкспрессия *hTERT* значимо не повлияла на содержание основных трофических факторов – как на уровне экспрессии их генов (*BDNF*, *HGF*, *PLAU*, *VEGFA*), так и на уровне содержания белков в составе секрета. Важно

отметить, что при культивировании МСК<sub>ТЕРТ</sub> содержание белков трофических факторов, которые являются ключевыми молекулярными участниками прорегенеративного потенциала МСК, в секретоме значимо не изменялось даже на пассажах, при которых наблюдалось увеличение содержания компонентов SASP (в нашем исследовании – включительно до 33-41 пассажей).

### *Цитокины*

Провоспалительные цитокины важны для регенерации в фазу воспаления. Есть данные о том, что повышенное содержание некоторых индивидуальных провоспалительных факторов в секретоме ассоциировано с терапевтическим эффектом. Так, для IL-6 показан терапевтический эффект в моделях регенерации нервной ткани, заболеваний почек благодаря антифибротическому эффекту, нейропротективной активности и способности поляризовать макрофаги в противовоспалительный фенотип M2; для TNF- $\alpha$  - антифибротический эффект в модели фиброза печени [6]. Однако значительное содержание провоспалительных цитокинов в последующие фазы регенерации может привести на клеточном уровне к активации образования компонентов SASP в близлежащих клетках [298], что в свою очередь будет вызывать клеточное старение окружающих клеток [110], на тканевом - к нежелательному усилению отека и сопутствующему повреждению тканей. Можно ожидать, что секретом МСК в качестве терапии будет применяться позднее фазы воспаления, т.к. низка вероятность успеть ввести его пациенту в первые 24 ч после травмы. Наряду с тем, что терапевтический эффект секретом МСК заключается в т.ч. в противовоспалительном действии [296], это обуславливает необходимость отсутствия значительно увеличенных количеств провоспалительных цитокинов в его составе. Поэтому мы определяли их содержание в секретоме полученных культур МСК<sub>ТЕРТ</sub>, и из большого спектра таких цитокинов выбрали те, которые являются основными согласно литературным данным - IL-1 $\alpha$ , IL-6, TNF- $\alpha$  [299].

Известно, что неостанавливающееся воспаление является одним из повреждающих механизмов на поздних фазах восстановления, поэтому для его снижения важно наличие противовоспалительных факторов, основными из которых являются цитокины IL-4, IL-10, IL-13 [300], TGF- $\beta$ 1 и фермент IDO (индоламин-пиррол 2,3-диоксигеназа; подавляет Т-клеточный ответ [33,52]).



Уровень экспрессии данных цитокинов определяли с помощью ПЦР-РВ, т.к. он является одним из двух наиболее распространенных методов, используемых для этих целей [301].

Согласно полученным результатам сверхэкспрессия *hTERT* не повлияла на экспрессию генов основных провоспалительных и противовоспалительных молекул. При культивировании МСК<sub>TERT</sub> экспрессия их генов также значимо не увеличивалась вплоть до 43 пассажа. Различия, которые мы наблюдали для IL-6 – увеличение экспрессии к 33 пассажу и снижение к 41 пассажу согласно результатам ПЦР-РВ, и значительное увеличение содержания в секрете к 33 пассажу согласно результатам ИФА, лишний раз свидетельствует о предпочтительном использовании методов прямой оценки содержания компонентов в составе секрета, включая ИФА, по сравнению с косвенными методами, такими как ПЦР-РВ.

### *SASP*

Стареющие МСК имеют значительно сниженные прорегенеративные способности. Для таких МСК характерен секреторный фенотип, ассоциированный со старением – SASP (секретом содержит увеличенное количество провоспалительных и митогенных цитокинов), который паракринно запускает процессы клеточного старения в близлежащих клетках [110]. Одной из задач применения метода сверхэкспрессии *hTERT* является отсрочивание появления клеточного старения и SASP, что важно при применении секрета в терапевтических целях. SASP характеризуется сложным составом (цитокины/хемокины (MCP-1, TNF- $\alpha$ ), интерлейкины (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10), ингибиторы протеаз (PAI-1), факторы роста (TGF- $\beta$ 1, EGF, HGF, IGF1, PDGF), матриксные металлопротеазы (MMP10, MMP12)) [302], который сильно зависит от типа клеток. Наиболее общим для разного типа клеток свойством SASP является увеличение экспрессии и содержания PAI-1, MCP-1, IL-8, IL-1 $\beta$  [303], причем увеличение содержания IL-6 в секрете является универсальным для большинства стареющих клеток [304,305], а PAI-1 является не только проверенным маркером, но и ключевым медиатором клеточного старения [306]. Поэтому для анализа в качестве основных компонентов SASP мы выбрали IL-6, MCP-1 (моноцитарный хемотаксический протеин-1, хемокин), PAI-1 (ингибитор активатора плазминогена-1).

Согласно полученным результатам сверхэкспрессия *hTERT* привела к статистически значимому уменьшению содержания в секрете МСК<sub>TERT</sub> IL-6 и PAI-1, и не повлияла на

содержание MCP-1 (его количество не отличалось от такового в секрете пМСК 2-3 пассажей). При культивировании МСК<sub>TERT</sub> содержание IL-6 в секрете значимо не изменялось до 33 пассажа, MCP-1 и PAI-1 – до 19 пассажа (по сравнению с содержанием на ранних пассажах). Согласно литературным данным PAI-1 способствует развитию клеточного старения окружающих клеток, увеличенная концентрация PAI-1 стимулирует развитие фиброза, тромбоза [306,307]; MCP-1 является ключевым хемокином для дендритных клеток, моноцитов, Т-клеток памяти, увеличение его концентрации ассоциировано с развитием атеросклероза, псориаза, ревматоидного артрита и некоторых других заболеваний [308]. Поэтому, во-первых, важно, что сверхэкспрессия *hTERT* позволила отсрочить увеличение их содержания в секрете МСК<sub>TERT</sub>. Во-вторых, увеличение их содержания при культивировании МСК<sub>TERT</sub> (в нашем исследовании - после 19 пассажа) может вызвать отрицательные эффекты при применении такого секрета в терапевтических целях. Поэтому важно при планировании применения секрета для введения человеку учитывать физиологические показатели концентрации соответствующих компонентов. Так, физиологическая концентрация PAI-1 различается в разных тканях организма (например, в плазме крови - 10-20 нг/мл [309,310], в тканях ЦНС – настолько низкая, что не детектируется [311]), и при патологических состояниях может возрастать в 3-25 раз [309]. Физиологическая концентрация MCP-1 в плазме крови составляет 100-300 пг/мл [310], повышенные концентрации наблюдаются при инсулиновой резистентности, атеросклерозе [312].

Учитывая вышесказанное, мы хотим подчеркнуть, что, во-первых, при оценке значимости концентрации компонентов SASP в секрете получаемых культур для безопасности секрета важно учитывать способ введения в организм. Во-вторых, тенденция увеличения содержания компонентов SASP в секрете МСК<sub>TERT</sub> при культивировании обуславливает критическую необходимость контроля состава секрета при пассировании используемых культур при трансляции метода сверхэкспрессии *hTERT* в производственную фармацевтическую практику для определения критического пассажа, после которого получаемый секретом использовать нельзя. Поэтому мы считаем, что их необходимо включить в линейку маркеров, необходимых для стандартизации состава секрета.

## 2.2) Биологическая активность секрета культур МСК, сверхэкспрессирующих *TERT*

Для оценки биологической активности использовали ранее опубликованные валидированные *in vitro* модели нейритогенеза [266-268] и фиброза [270,271].

Согласно полученным результатам секретом МСК<sub>TERT</sub>, как и пМСК обладал нейротрофической активностью - «стимулировал рост нейритов эксплантов чувствительных ганглиев задних корешков спинного мозга мышей. Полученные данные коррелируют с результатами тестирования нейропротективной активности секрета иммортализованных МСК в *in vivo* модели геморрагического инсульта головного мозга крыс [23]» [269].

Ранее в [271] было показано, что везикулярная фракция секрета (но не сам секрет) первичных культур МСК обладает антифибротическим действием, а именно может предотвращать индуцируемую TGF- $\beta$  дифференцировку фибробластов в миофибробласты. Поэтому в нашем исследовании мы сравнивали антифибротический эффект именно везикулярной фракции секрета МСК<sub>TERT</sub> и пМСК. Для этого сначала мы подтвердили, что сверхэкспрессия *hTERT* не оказывает значительного влияния на состав и свойства внеклеточных везикул (ВВ) (анализ траектории наночастиц (NTA) показал, что секретом МСК<sub>TERT</sub> достоверно не отличается от секрета пМСК по концентрации и размеру ВВ. Далее мы показали, что ВВ секрета МСК<sub>TERT</sub>, так же, как и пМСК, предотвращают индуцированную TGF- $\beta$  дифференцировку фибробластов в миофибробласты. Такая биологическая активность сохранялась при пассировании (исследовано до 30 пассажа) [269].

Биологическая активность полученного нами секрета МСК<sub>TERT</sub> была подтверждена и в других моделях, не вошедших в настоящее исследование, но опубликованных в наших с коллегами совместных статьях: геморрагического инсульта головного мозга крыс [23], стимуляции выделения тестостерона клетками Лейдига [269]. Полученные нами данные о сохранности биологической активности секрета МСК<sub>TERT</sub> согласуются с данными, опубликованными другими исследователями (ВВ секрета ASC52telo сохраняли регенеративный потенциал в модели повреждения ионизирующим излучением пигментного эпителия сетчатки [313], ВВ секрета МСК<sub>TERT</sub> Вартонова студня сохраняли противовоспалительные, антифибротические свойства и способность заживлять раны на моделях *in vitro* [314]).

В литературе практически отсутствуют данные о свойствах ВВ секрета клеток, сверхэкспрессирующих *hTERT*. Только в 2024 г. в [313] был впервые проведен обширный

анализ свойств ВВ секретома таких культур на примере линии ASC52telo. Авторы показали, что ВВ секретома ASC52telo значительно отличаются по свойствам (морфологии, размерам, составу переносимых компонентов) от ВВ секретома линий опухолевых клеток (карциномы простаты и колоректальной карциномы), что является важным косвенным индикатором безопасности секретома клеток, сверхэкспрессирующих *hTERT*. Однако существенным недостатком этой работы являлось отсутствие прямого сравнения свойств ВВ линии, сверхэкспрессирующей *hTERT* и первичных культур МСК, из которых она была получена. В нашей работе такое исследование было проведено впервые.

### *2.3) Безопасность секретома культур МСК, сверхэкспрессирующих TERT*

Известно, что парадигма применения секретома во многом основана на его большей безопасности в силу значительно более низкой способности индуцировать опухолеобразование в организме реципиента по сравнению с клеточными продуктами. Это важное свойство должно быть сохранно при получении модифицированных клеточных линий. Безопасность секретома как потенциального биомедицинского бесклеточного препарата должна быть оценена по многим показателям, многие из которых проводят на этапе доклинических испытаний (в т.ч. токсичность (цитотоксичность, генотоксичность), иммунологическая безопасность (в т.ч. иммуногенность, иммунотоксичность), влияние на репродуктивные функции, развитие плода, канцерогенность) [\*].

Нам не удалось найти ни одной работы, в которой была бы оценена безопасность секретома МСК, сверхэкспрессирующих *hTERT*; наше исследование в этой области является одним из первых. В то же время, ввиду временных и финансовых ограничений, мы не ставили целью провести весь комплекс доклинических испытаний безопасности. По некоторым из тестов (в т.ч. цитотоксичность и генотоксичность) можно ожидать отрицательные результаты с учетом широко доказанного прорегенеративного действия секретома, а также отсутствия визуально наблюдаемых мертвых клеток в проведенных нами *in vitro* исследованиях биологической активности и показанной в нашем исследовании высокой степенью сходства состава секретома МСК<sub>TERT</sub> с пМСК, для которого безопасность была доказана другими исследователями [272-275]. Оценка же трансформирующей активности секретома культур МСК<sub>TERT</sub> является одной из наиболее приоритетных научных задач. Для ее исследования мы определили содержание

компонентов теломеразы в секрете МСК<sub>TERT</sub>, для оценки функциональной безопасности использовали один из наиболее распространенных тестов – soft agar colony assay, и анализировали изменение активности экспрессии генов обработанных секретом первичных клеточных культур.

Согласно всем проведенным нами тестированиям, сверхэкспрессия *hTERT* не снижает безопасность секрета: в нем отсутствовали детектируемые количества белка теломеразы (согласно результатам протеомного анализа и вестерн-блоттинга), а также кДНК и мРНК теломеразы; фиброласты, культивируемые в среде, содержащей секретом МСК<sub>TERT</sub>, не приобретали трансформированный фенотип (способность формировать колонии расти в мягком агаре), также в них не увеличивалась экспрессия протоонкогенов и не снижалась экспрессия антионкогенов. Экспериментальное исследование и подтверждение функциональной безопасности секрета МСК<sub>TERT</sub> в нашем исследовании проведено впервые. Полученные данные коррелируют с косвенно свидетельствующими об отсутствии трансформирующей активности такого секрета результатами его применения в *in vivo* модели геморрагического инсульта головного мозга крыс, в которой был показан терапевтический эффект и не сообщалось о побочных эффектах и образовании тератом [23]. Также в [315] показан защитный эффект секрета сверхэкспрессирующих *TERT* стволовых клеток сердца *in vivo*, при этом не сообщается об образовании опухолей.

### ***Подведение итогов и определение перспектив исследования***

Суммируя все вышесказанное, можно заключить, что на примере полученных линий МСК<sub>TERT</sub> в нашем исследовании показано, что культуры МСК человека, сверхэкспрессирующие ген *hTERT*, могут быть использованы как самостоятельные модельные объекты и как модельные объекты для изучения секрета, а также как продуценты секрета, т.к. имеют свойства схожие с пМСК и состав секрета идентичный на 94,5% составу секрета пМСК, причем он сохраняется при культивировании вплоть до 30х пассажей, имеет сохранную биологическую активность (показано в *in vitro* моделях нейритогенеза и фиброза) и безопасность (отсутствующий трансформирующий потенциал). Многие из описанных результатов получены впервые. Также важно отметить, что ни в одном из ранее проведенных исследований не было проведено одновременное изучение влияния сверхэкспрессии *hTERT* на такой обширный комплекс свойств МСК жировой ткани человека [15]: 1) стандартных, определенных ISCT

(морфология, иммунофенотип, дифференцировочный потенциал), 2) свидетельствующих о функциональной активности (чувствительность МСК<sub>TERT</sub> к гормональным стимулам, биологическая активность секретома), 3) свидетельствующих о безопасности (кариотип, передача компонентов теломеразы в составе секретома, трансформирующая активность секретома, воздействие секретома на клетки-мишени), 4) свидетельствующих о возможности масштабирования и стандартизации (пролиферативный потенциал, состав секретома), что не позволяло получить исчерпывающее понимание применимости метода сверхэкспрессии *hTERT* для разных задач регенеративной биомедицины. В нашей работе такой комплекс исследований был выполнен впервые.

Таким образом, в настоящем исследовании на примере созданных культур МСК<sub>TERT</sub> жировой ткани человека экспериментально обоснована концепция возможности применения метода иммортализации МСК посредством сверхэкспрессии гена *hTERT* для широкого круга фундаментальных и прикладных задач регенеративной медицины. В рамках фундаментальных исследований перспективным является использование как самих клеток, так и секретома МСК<sub>TERT</sub>, в области прикладных исследований особенно перспективно применение секретома МСК<sub>TERT</sub> для трансляции в производственную фармацевтическую практику при создании биомедицинских бесклеточных продуктов на основе секретома. Разработка таких продуктов в мире находится в активной фазе, число клинических испытаний еще не велико, но быстро растет. С учетом преимущества применения секретома как продукта более безопасного и более дешевого при производстве по сравнению с БМКП можно ожидать, что в ближайшие годы возникнет задача производства именно секретома в промышленных масштабах, и можно ожидать, что этот метод станет необходимым и неотъемлемым этапом производственного процесса. Также мы ожидаем, что этот метод может сыграть важную роль в развитии персонализированной медицины, т.к. может как позволить масштабировать культуры клеток пациента даже в случае небольшого количества материала донора и низкого выхода количества выделяемых первичных клеток, так и делает клетки более восприимчивыми к генетическим модификациям, что может быть удобно в случае задач модификации секретома с учетом индивидуальных особенностей пациента.

В этой связи перспективой настоящего исследования является подбор оптимального метода и условий для масштабирования процесса культивирования МСК<sub>TERT</sub> (наиболее перспективным на наш взгляд является перевод в суспензию, он

принципиально возможен [316]) и условий и методик для производства и стандартизации секретома МСК<sub>TERT</sub> согласно стандартам GMP, а также проведение доклинических и клинических испытаний секретома МСК<sub>TERT</sub> согласно стандартам GLP и GCP, включая расширенную панель исследований безопасности (не можем не отметить эту необходимость в силу того, что в некоторых случаях (например, наличия у пациента опухолей) секретом может стимулировать развитие опухолей, и это необходимо учитывать при определении диапазона применимости секретома как потенциального лекарственного препарата).

### **Рекомендации**

На основании вышесказанного мы можем предложить следующие рекомендации при получении клеточных линий, сверхэкспрессирующих *hTERT*, для задач регенеративной биомедицины:

- использование первичных культур клеток на ранних пассажах, имеющих сохраненные характеристики МСК и полученных от здоровых молодых доноров,
- пассирование МСК<sub>TERT</sub> в соотношении 1:2 или 1:3,
- аккуратный контроль и соблюдение условий культивирования, подбор оптимальной среды культивирования на ранних этапах работы для минимизации рисков развития стресс-индуцированного клеточного старения,
- после получения линии первоочередными необходимыми тестами являются анализ сохранности кариотипа, основных признаков МСК, определенных ISCT, после чего следует выбирать субпопуляции/клоны, удовлетворяющие задачам исследования, но соблюдать компромисс между улучшенными и сохранными свойствами, такими как скорость пролиферации, время удвоения клеточной популяции, чтобы избежать отбора «агрессивных» клонов, которые имеют предрасположенность к опухолевой трансформации,
- при определении степени иммортализованности полученной культуры необходимо ориентироваться не только на результаты анализа активности теломеразы и длины теломер, но и на оценку пролиферации и клеточного старения при длительном культивировании,
- при длительном культивировании полученной линии необходимо повторять основные тесты, т.к. сверхэкспрессия *hTERT* в культурах МСК жировой ткани человека может не

привести к их полной иммортализации и клетки постепенно будут стареть, из-за чего будут меняться их свойства и свойства их секретома.

- необходимо прецизионно определять предельный пассаж, до которого полученные культуры и их секретом сохраняют свои свойства (эти пассажи для разных культур могут не совпадать).



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Регенеративная биомедицина изучает сложные процессы репарации и регенерации живых организмов, а также ищет способы их регуляции. Активно развиваемые клеточные технологии позволяют создавать биомедицинские клеточные и бесклеточные продукты (БМКП и БМБП), обладающие плеiotропным эффектом, обуславливающим их высокую терапевтическую эффективность. При использовании клеточных культур в фундаментальных исследованиях и при переходе от создания БМКП и БМБП к применению их в производственной фармацевтической практике возникают такие проблемы как масштабируемость и стандартизация, обусловленные гетерогенностью, ограниченным пролиферативным потенциалом и быстрым клеточным старением первичных клеточных культур. Метод сверхэкспрессии гена *hTERT* как способ иммортализации, позволяющей решить эти проблемы, известен, но ни в одном из известных исследований не было проведено комплексного изучения его влияния на широкий спектр свойств получаемых культур и, что особенно важно, их секрета. Нашим исследованием мы закрываем часть этого проблемного поля в контексте МСК жировой ткани человека и на примере полученных культур МСК<sub>TERT</sub> впервые предлагаем экспериментально обоснованную идею применения метода сверхэкспрессии *hTERT* для получения клеточного секрета со стандартным качественным и количественным составом в количестве, достаточном для масштабного клинического применения.

Так в данной работе впервые показано, что методом сверхэкспрессии *hTERT* можно получить культуры МСК жировой ткани человека, одновременно сохраняющие 1) стандартные свойства МСК, определенные ISCT (фибробластоподобная форма, адгезивность в пластику, иммунофенотип, дифференцировочный потенциал в адипо-, остео- и хондрогенном направлениях), 2) функциональную активность (чувствительность к гормональным стимулам - ангиотензину II, ГАМК, гистамину, глутамату, дофамину, инсулину, норадреналину, ПТГ, серотонину; биологическая активность секрета МСК<sub>TERT</sub> в моделях нейритогенеза и фиброза *in vitro*), 3) свойства, свидетельствующие о безопасности клеточной культуры и получаемых на ее основе продуктов (стабильный кариотип, отсутствие в секрете МСК<sub>TERT</sub> компонентов теломеразы, отсутствие трансформирующей активности секрета МСК<sub>TERT</sub>), 4) качественный и количественный состав секрета. Показано, что культуры МСК<sub>TERT</sub> сохраняют эти свойства и при культивировании вплоть до 30-40 пассажей, что в совокупности крайне важно для

создания и использования клеточных моделей для фундаментальных исследований в области регенеративной биомедицины.

Помимо этого, на примере полученных культур МСК<sub>TERT</sub> жировой ткани человека в нашей работе впервые показано, что метод сверхэкспрессии *hTERT* является перспективным для решения прикладных задач регенеративной биомедицины и может позволить получить большие объемы биологически активного безопасного секрета с постоянным составом благодаря отсрочиванию клеточного старения и продлению пролиферативно активного состояния культур клеток-продуцентов, сохраняющих стабильность своих свойств при культивировании вплоть до 30-40 пассажей.

Созданная в работе культура МСК<sub>TERT</sub> может быть использована как клеточная модель и как продуцент секрета (БМБП) вплоть до 40х и 30х пассажей соответственно.

Критический анализ полученных результатов позволяет сформулировать **ряд рекомендаций** по получению и характеристике клеточных культур, сверхэкспрессирующих *hTERT*: 1) оценку успешности иммортализации следует проводить не только по анализу активности теломеразы и длине теломер, но и по оценке пролиферации и клеточного старения при длительном культивировании, 2) сравнительный анализ кариотипов исходной и иммортализованной культур необходимо включить в перечень обязательных тестов, 3) в зависимости от целей получения иммортализованной культуры необходимо оценивать влияние процедуры иммортализации на интегральные показатели, отражающие физиологическое состояние клеточной культуры (гормональная чувствительность, дифференцировочный потенциал), и/или состав, биологическую и потенциальную трансформирующую активность секрета, 4) необходимо прецизионно определять предельный пассаж, до которого полученные культуры и их секретом сохраняют свои свойства (эти пассажи для разных культур могут не совпадать).

Полученные результаты углубляют понимание применимости метода сверхэкспрессии *hTERT* для фундаментальных и прикладных задач регенеративной биомедицины и могут быть полезны научному и фармацевтическому сообществам.

Проведенное исследование не является исчерпывающим и имеет следующие перспективы: расширение спектра изучаемых свойств культур МСК<sub>TERT</sub> - функциональной активности МСК как модельных объектов и активности и безопасности секрета как БМБП и кандидата в лекарственные средства, подбор оптимального метода

и условий для масштабирования процесса культивирования МСК<sub>TERT</sub> и условий и методик для производства и стандартизации секрета МСК<sub>TERT</sub> согласно стандартам GMP, а также проведение доклинических и клинических испытаний секрета МСК<sub>TERT</sub> согласно стандартам GLP и GCP.

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Путем трансдукции первично выделенных культур мультипотентных мезенхимных стромальных клеток жировой ткани человека лентивирусными частицами, несущими последовательность кДНК каталитической субъединицы теломеразы (*hTERT*), были получены культуры МСК<sub>TERT</sub>, обладающие достоверно более высокой активностью теломеразы и большей длиной теломер. Данные культуры характеризовались пролонгированным пролиферативным потенциалом, отсроченным замедлением клеточной пролиферации и отложенным проявлением маркеров клеточного старения; при этом обладали сохранным контактным торможением.
2. Полученные культуры МСК<sub>TERT</sub> удовлетворяют свойствам модельного объекта для регенеративной биомедицины: сохраняют свою морфологию, иммунофенотип, способность к дифференцировке в адипогенном, остеогенном, хондрогенном направлениях, чувствительность к гормональным стимулам вплоть до 40х пассажей, стабильный кариотип.
3. Показано, что белковый состав секрета культур МСК жировой ткани, сверхэкспрессирующих каталитическую субъединицу теломеразы, идентичен на 94,5% составу секрета пМСК, стабилен при культивировании, имеет сохранную биологическую активность в *in vitro* моделях нейритогенеза и фиброза, не обладает трансформирующей активностью. Полученные культуры МСК<sub>TERT</sub> могут быть использованы в качестве клеток-продуцентов секрета для стимуляции регенеративных процессов в медицине.
4. Полученные результаты свидетельствуют в пользу применимости технологии сверхэкспрессии кДНК каталитической субъединицы теломеразы (*hTERT*) в культурах МСК для создания модельных объектов и культур клеток-продуцентов БМБП для регенеративной биомедицины. На основании полученных результатов был сформулирован ряд рекомендаций по получению и характеристике клеточных культур, сверхэкспрессирующих *hTERT*.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ткачук В.А. Регенеративная биомедицина в биологии и медицине // Регенерация органов и тканей. – 2023. – Т. 1. - №. 1. – С. 7–15. doi: 10.60043/2949-5938-2023-1-7-15
2. Пронина Е. А., Попыхова Э. Б., Степанова Т. В., Иванов А. Н.. Современные направления и перспективы развития регенеративной медицины // Современные проблемы науки и образования. – 2019. – №. 3. – С. 197. – EDN HRCUBD.
3. Канев А.А., Кураков Ф.А., Черченко О.В., Цветкова Л.А. Развитие регенеративной медицины в России и в мире: исследователи-лидеры и технологические драйверы // Экономика науки. – 2022. – Т. 8. - №. 3-4. – С. 202-219. doi: 10.22394/2410-132X-2022-8-3-4-202-219
4. Н. И. Калинина, В. Ю. Сысоева, К. А. Рубина Е.В. Парфенова, В.А. Ткачук. Мезенхимальные стволовые клетки в процессах роста и репарации тканей // Acta Naturae. – 2011. – Т. 3. - № 4(11). – С. 32-39. – EDN OXLGSH.
5. Zhidu S., Ying T., Rui J., Chao Z. Translational potential of mesenchymal stem cells in regenerative therapies for human diseases: challenges and opportunities // Stem Cell Research & Therapy. – 2024. – Т. 15. – С. 266. <https://doi.org/10.1186/s13287-024-03885-z>
6. Trigo C.M., Rodrigues J.S., Camões S.P., Solá S., Miranda J.P. Mesenchymal stem cell secretome for regenerative medicine: Where do we stand? // Journal of Advanced Research. – 2025. – Т. 70. - С. 103-124. doi: 10.1016/j.jare.2024.05.004.
7. Múzes G., Sipos F. Mesenchymal Stem Cell-Derived Secretome: A Potential Therapeutic Option for Autoimmune and Immune-Mediated Inflammatory Diseases // Cells. – 2022. – Т. 11. - №. 15. – С. 2300. doi: 10.3390/cells11152300.
8. Zhou T., Yuan Z., Weng J., Duanqing P., Xin D., Chang H., Peilong L. Challenges and advances in clinical applications of mesenchymal stromal cells // Journal of Hematology & Oncology. – 2021. - Т. 14. - №. 24. <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01037-x>
9. Mello D.B., Mesquita F.C.P., Silva dos Santos D., Asensi K.D., Dias M.L., Campos de Carvalho A.C., Goldenberg R.C.d.S., Kasai-Brunswick T.H. Mesenchymal Stromal Cell-Based Products: Challenges and Clinical Therapeutic Options // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2024. Т. 25. №. 11. – С. 6063. <https://doi.org/10.3390/ijms25116063>
10. Choi M., Lee C. Immortalization of Primary Keratinocytes and Its Application to Skin Research // Biomolecules and therapeutics (Seoul). – 2015. Т. 23. - №. 5. - С. 391-399. doi: 10.4062/biomolther.2015.038.
11. Maqsood M.I., Matin M.M., Bahrami A.R., Ghasroldasht M.M. Immortality of cell lines: challenges and advantages of establishment // Cell Biology International. – 2013. – т. 37. - №. 10. С. 1038-1045. doi: 10.1002/cbin.10137.
12. de Bardet J.C., Cardentey C.R., González B.L., Patrone D., Mulet I.L., Siniscalco D., Robinson-Agramonte M.L.A. Cell Immortalization: In Vivo Molecular Bases and In Vitro Techniques for Obtention // BioTech (Basel). - 2023. – Т. 12. - №. 1. – С.14. doi: 10.3390/biotech12010014.
13. Voloshin N., Tyurin-Kuzmin P., Karagyaur M., Akopyan Z., Kulebyakin K. Practical Use of Immortalized Cells in Medicine: Current Advances and Future Perspectives // *International*

- Journal of Molecular Sciences.* – 2023. – T. 24. – №. 16. – C. 12716. doi: 10.3390/ijms241612716.
14. Bodnar A.G., Ouellette M., Frolkis M., Holt S.E., Chiu C.P., Morin G.B., Harley C.B., Shay J.W., Lichtsteiner S., Wright W.E. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells // *Science.* – 1998. – T. 279. – №. 5349. – C. 349-352. doi: 10.1126/science.279.5349.349.
  15. Shitova M., Alpeeva E., Vorotelyak E. Review of hTERT-Immortalized Cells: How to Assess Immortality and Confirm Identity // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2024. – T. 25. – №. 23. – C. 13054. <https://doi.org/10.3390/ijms252313054>
  16. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues // *Transplantation.* – 1968. – T. 6. – №. 2. – C. 230-247. PMID: 5654088
  17. Gneccchi M., He H., Liang O., Melo L.G., Morello F., Mu H., Noiseux N., Zhang L., Pratt R.E., Ingwall J.S., Dzau V.J. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells // *Nature Medicine.* – 2005. – T. 11. – C. 367–368. <https://doi.org/10.1038/nm0405-367>
  18. Da Silva K., Kumar P., Choonara Y.E. The paradigm of stem cell secretome in tissue repair and regeneration: Present and future perspectives // *Wound Repair and Regeneration.* – 2025. – T. 33. – №. 1. – C. e13251. doi: 10.1111/wrr.13251.
  19. Masters J. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly // *Nature Reviews Cancer.* – 2002. – T. 2. – C. 315–319. <https://doi.org/10.1038/nrc775>
  20. Primak A.L., Shkarina L.N., Illarionova M.E., Plyushchiy I.V., Zakharova A.V., Tkachuk V.A., Karagyaour M.N. Immortalization of Cultured Cells in Regenerative Biomedicine: Approaches, Opportunities, and Limitations // *Biochemistry (Moscow).* – 2025. – T. 90. – №. 8. – C. 1000-1017. doi: 10.1134/S0006297925601698.
  21. Примак А.Л., Шкарина Л.Н., Илларионова М.Е., Плющий И.В., Захарова А.В., Ткачук В.А., Карагяур М.Н. Иммуортализация клеточных культур для регенеративной биомедицины: подходы, возможности и ограничения // *Биохимия.* – 2025. – Т. 90. – №8. – С. 1093-1112. doi: 10.31857/S0320972525080021
  22. Kulebyakin K., Tyurin-Kuzmin P., Efimenko A., Voloshin N., Kartoshkin A., Karagyaour M., Grigorieva O., Novoseletskaya E., Sysoeva V., Makarevich P., Tkachuk V. Decreased Insulin Sensitivity in Telomerase-Immortalized Mesenchymal Stem Cells Affects Efficacy and Outcome of Adipogenic Differentiation in vitro // *Frontiers in Cell and Developmental Biology.* – 2021. – T. 9. – C. 662078. doi: 10.3389/fcell.2021.662078
  23. Dzhauari S.S. Primak A.L. Basalova N.A. Kalinina N.I. Monakova A.O. Bozov K.D. Velichko A.Y. Illarionova M.E., Grigorieva O.A., Akopyan Z.A., Popov V. S., Malkov P. G., Efimenko A. Y., Tkachuk V. A., Karagyaour M. N. Overexpression of BDNF and uPA Combined with the Suppression of Von Hippel–Lindau Tumor Suppressor Enhances the Neuroprotective Activity of the Secretome of Human Mesenchymal Stromal Cells in the Model of Intracerebral Hemorrhage // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2025. – T. 26. – C. 6697. <https://doi.org/10.3390/ijms26146697>

24. Makarevich P.I., Tkachuk V.A. Fundamental and Practical Perspectives in Regenerative Medicine // International Journal of Molecular Sciences. – 2024. – Т. 25. - №. 21. – С. 11508. doi: 10.3390/ijms252111508..
25. Хмелевская С. А. Регенеративная медицина - путь к биологическому бессмертию человека? // Вестник Московского университета. Серия 7: Философия. – 2019. – № 2. – С. 38-54. – EDN ANDZBY.
26. Haseltine W.A. The Emergence of Regenerative Medicine: A New Field and a New Society // The Journal of Regenerative Medicine. - 2001. – Т. 2. - №. 4. – С. 17-23. doi:10.1089/152489001753309652
27. Petrosyan A., Martins P.N., Solez K., Uygun B.E., Gorantla V.S., Orlando G. Regenerative medicine applications: An overview of clinical trials // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2022. – Т. 10. – С. 942750. doi: 10.3389/fbioe.2022.942750.
28. Распоряжение Правительства РФ от 28.12.2012 N 2580-р (ред. от 06.11.2024) <Об утверждении Стратегии развития медицинской науки в Российской Федерации на период до 2025 года>. - 2012. - 30 с.
29. Gopalarethinam J., Nair A.P., Iyer M., Vellingiri B., Subramaniam M.D. Advantages of mesenchymal stem cell over the other stem cells // Acta Histochem. – 2023. – Т. 125. - №. 4. – С. 152041. doi: 10.1016/j.acthis.2023.152041.
30. Poliwoda S., Noor N., Downs E., Schaaf A., Cantwell A., Ganti L., Kaye A.D., Mosel L.I., Carroll C.B., Viswanath O., Urits I. Stem cells: a comprehensive review of origins and emerging clinical roles in medical practice // Orthopedic Reviews (Pavia). – 2022. – Т. 14. - №. 3. – С. 37498. doi: 10.52965/001c.37498.
31. Qin Yю, Ge Gю, Yang Pю, Wang Lю, Qiao Yю, Pan Gю, Yang Hю, Bai Jю, Cui Wю, Geng D. An Update on Adipose-Derived Stem Cells for Regenerative Medicine: Where Challenge Meets Opportunity // Advanced Science (Weinheim). – 2023. – Т. 1. - №. 20. – С. e2207334. doi: 10.1002/advs.202207334.
32. Priester C., MacDonald A., Dhar M., Bow A. Examining the Characteristics and Applications of Mesenchymal, Induced Pluripotent, and Embryonic Stem Cells for Tissue Engineering Approaches across the Germ Layers // Pharmaceuticals. - 2020. – Т. 13. - №. 11. – С. 344. doi: 10.3390/ph13110344
33. Maldonado V.V., Patel N.H., Smith E.E., Barnes C.L., Gustafson M.P, Rao R.R., Samsonraj R.M. Clinical utility of mesenchymal stem/stromal cells in regenerative medicine and cellular therapy // Journal of Biological Engineering. - 2023. – Т. 17. - №. 44. doi: 10.1186/s13036-023-00361-9
34. Веремеев А. В., Болгарин Р. Н., Петкова М. А., Кац Н., Нестеренко В.Г. Стромально-васкулярная фракция жировой ткани как альтернативный источник клеточного материала для регенеративной медицины // Гены и Клетки. – 2016. – Т. 11. - № 1. – С. 35-42. – EDN WCLJAP.
35. Le Moine A., Goldman M., Abramowicz D. Multiple pathways to allograft rejection // Transplantation. 2002. – Т. 73. - №. 9. – С. 1373-81. doi: 10.1097/00007890-200205150-00001.

36. Owen M. Marrow stromal stem cells // *Journal of Cell Science Supplements*. – 1988. – T. 10. – C. 63-76. doi: 10.1242/jcs.1988.supplement\_10.5.
37. Caplan AI. Mesenchymal stem cells // *Journal of Orthopaedic Research*. – 1991. – T. 9. - №. 5. – C. 641-650. doi: 10.1002/jor.1100090504.
38. Caplan AI. Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! // *STEM CELLS Translational Medicine*. – 2017. – T. 6. - №. 6. – C. 1445-1451. doi: 10.1002/sctm.17-0051.
39. Horwitz E.M., Le Blanc K., Dominici M., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F.C., Deans R.J., Krause D.S., Keating A., International Society for Cellular Therapy. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement // *Cytotherapy*. - 2005. – T. 7. - №. 5. – C. 393-5. doi: 10.1080/14653240500319234.
40. Beumer J., Clevers H. Hallmarks of stemness in mammalian tissues // *Cell Stem Cell*. – 2024. – T. 31. - №. 1. – C. 7-24. doi: 10.1016/j.stem.2023.12.006.
41. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop Dj., Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement // *Cytotherapy*. – 2006. – T. 8. - №. 4. – C. 315-317. doi: 10.1080/14653240600855905.
42. Kostecka A., Kalamon N., Skoniecka A., Koczkowska M., Skowron P.M., Piotrowski A., Piłka M. Adipose-derived mesenchymal stromal cells in clinical trials: Insights from single-cell studies // *Life Sciences*. - 2024. - T. 351. – C. 122761. doi: 10.1016/j.lfs.2024.122761.
43. Czerwec K., Zawrzykraj M., Deptuła M., Skoniecka A., Tymińska A., Zieliński J., Kosiński A., Piłka M. Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells in Basic Research and Clinical Applications // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – T. 24. - №. 4. – C. 3888. <https://doi.org/10.3390/ijms24043888>
44. Liu P., An Y., Zhu T., Tang S., Huang X., Li S., Fu F., Chen J., Xuan K. Mesenchymal stem cells: Emerging concepts and recent advances in their roles in organismal homeostasis and therapy // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – 2023. - T. 13. – C. 1131218. doi: 10.3389/fcimb.2023.1131218
45. Sagaradze G.D., Basalova N.A., Efimenko A.Y., Tkachuk V.A. Mesenchymal Stromal Cells as Critical Contributors to Tissue Regeneration // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2020. – T. 8. – C. 576176. doi: 10.3389/fcell.2020.576176
46. Pittenger M.F., Discher D.E., Péault B.M., Phinney D.G., Hare J.M., Caplan A.I. Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress // *npj Regenerative Medicine*. – 2019. – T. 4. – C. 22. doi: 10.1038/s41536-019-0083-6
47. Galitsyna E.V., Kulikova E.A., Pavelyev Y.A., Paveliev I.A., Kuznetsova O.S., Senina A.S., Gusev A.B. Cell-based medicinal products: a review of current research // *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. – 2024. – T. 24. – №. 4. – C. 428–442. doi: 10.30895/2221-996X-2024-557
48. Xu Q., Hou W., Zhao B., Fan P., Wang S., Wang L., Gao J. Mesenchymal stem cells lineage and their role in disease development // *Molecular Medicine*. – 2024. – T. 30. – №. 1. – C. 207. doi: 10.1186/s10020-024-00967-9
49. Kumar M.A., Baba S.K., Sadida H.Q., Marzooqi S.Al., Jerobin J., Altemani F.H., Algehainy N., Alanazi M.A., Abou-Samra A.-B., Kumar R., Al-Shabeeb Akil A.S., Macha M.A., Mir R.,

- Bhat A.A.. Extracellular vesicles as tools and targets in therapy for diseases // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2024. – Т. 9. - №. 1. – С. 27. doi: 10.1038/s41392-024-01735-1
50. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, et.al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines // *J Extracell Vesicles*. - 2018 – Т. 7. - №. 1. – С. 1535750. doi: 10.1080/20013078.2018.1535750.
  51. Liu Q., Zhang X., Zhu T., Xu Z, Dong Y., Chen B. Mitochondrial transfer from mesenchymal stem cells: Mechanisms and functions // *Mitochondrion*. - 2024. – Т. 79. – С. 101950. doi: 10.1016/j.mito.2024.101950.
  52. Han Y., Yang J., Fang J. *et al.* The secretion profile of mesenchymal stem cells and potential applications in treating human diseases // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2022. – Т. 7. – №. 92. doi: doi.org/10.1038/s41392-022-00932-0
  53. Han X., Liao R., Li X. *et al.* Mesenchymal stem cells in treating human diseases: molecular mechanisms and clinical studies // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2025. – Т. 10. - №. 262. doi: doi.org/10.1038/s41392-025-02313-9
  54. Murphy M.B., Moncivais K., Caplan A.I. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine // *Experimental & Molecular Medicine*. – 2013. – Т. 45. - №. 11. – С. e54. doi: 10.1038/emm.2013.94.
  55. Naji A., Eitoku M., Favier B., Deschaseaux F., Rouas-Freiss N., Suganuma N. Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2019. – Т. 76. - №. 17. – С. 3323-3348. doi: 10.1007/s00018-019-03125-1
  56. Ayala-Cuellar A.P., Kang J.H., Jeung E.B., Choi K.C. Roles of Mesenchymal Stem Cells in Tissue Regeneration and Immunomodulation // *Biomol Ther (Seoul)*. – 2019. – 27. - №. 1. – С. 25-33. doi: 10.4062/biomolther.2017.260.
  57. Lozito T.P., Jackson W.M., Nesti L.J., Tuan R.S. Human mesenchymal stem cells generate a distinct pericellular zone of MMP activities via binding of MMPs and secretion of high levels of TIMPs // *Matrix Biology*. – 2014. - Т. 34. – С. 132-143. doi: 10.1016/j.matbio.2013.10.003.
  58. Amable P.R., Teixeira M.V.T., Carias R.B.V. et al. Protein synthesis and secretion in human mesenchymal cells derived from bone marrow, adipose tissue and Wharton's jelly // *Stem Cell Research & Therapy*. – 2014. – Т. 5. - №. 53. doi: doi.org/10.1186/scrt442
  59. Chen Z., Xia X., Yao M. et al. The dual role of mesenchymal stem cells in apoptosis regulation // *Cell Death & Disease*. – 2024. – Т. 15. – №. 250. doi: doi.org/10.1038/s41419-024-06620-x
  60. Wu X., Jiang J., Gu Z., Zhang J., Chen Y., Liu X. Mesenchymal stromal cell therapies: immunomodulatory properties and clinical progress // *Stem Cell Research & Therapy*. – 2020. – Т. 11. - №. 1. – С. 345. doi: 10.1186/s13287-020-01855-9
  61. Пинегин Б. В., Карсонова М. И. Роль антимикробного пептида LL-37 в развитии аутоиммунного процесса // *Иммунология*. - 2012. – Т. 33. - №5. - С. – 276-280
  62. Almalki S.G., Agrawal D.K. Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells // *Differentiation*. – 2016. – 92. - №. 1-2. – С. 41-51. doi: 10.1016/j.diff.2016.02.005.



63. Liu T.M., Tew W., Yang Z., Lim B., Hui J.H.P., Lee E.H., Loh Y.H., Cool S. Understanding the molecular basis of mesenchymal stem cell stemness: implications for clinical applications // *Cell Death & Disease*. – 2025. – T. 16. – №. 1. – C. 778. doi: 10.1038/s41419-025-08094-x
64. Hwang J.J., Rim Y.A., Nam Y., Ju J.H. Recent Developments in Clinical Applications of Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – T. 12. – C. 631291. doi: 10.3389/fimmu.2021.631291
65. Shahrabaf M.A., Ataei Fashtami L., Vosough M. The First Live-Cell Based Product in The Iranian Drug List; ReColorCell® // *Cell Journal*. – 2023. – T. 25. – №. 3. – C. 212-214. doi: 10.22074/cellj.2023.1978336.1183.
66. Fernández-Garza L.E., Barrera-Barrera S.A., Barrera-Saldaña H.A. Mesenchymal Stem Cell Therapies Approved by Regulatory Agencies around the World // *Pharmaceuticals*. – 2023. – T. 16. – №. 9. – C. 1334. <https://doi.org/10.3390/ph16091334>
67. Sugai K., Nakamura M., Okano H., Nagoshi N. Stem cell therapies for spinal cord injury in humans: A review of recent clinical research // *Brain and Spine*. – 2025. – T. 5. – C. 104207. doi: 10.1016/j.bas.2025.104207.
68. Gupta A. StemOne™/Stempeucel®: CDSCO Approved, Adult Human Bone Marrow-Derived, Cultured, Pooled, Allogenic Mesenchymal Stem Cells for Knee Osteoarthritis // *Biomedicines*. – 2023. – T. 11. – №. 11. – C. 2894. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11112894>
69. Han Y., Li X., Zhang Y., Han Y., Chang F., Ding J. Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine // *Cells*. – 2019. – T. 8. – №. 8. – C. 886. <https://doi.org/10.3390/cells8080886>
70. Calcat-i-Cervera S., Sanz-Nogués C., O'Brien T. When Origin Matters: Properties of Mesenchymal Stromal Cells From Different Sources for Clinical Translation in Kidney Disease // *Frontiers in Medicine*. – 2021. – T. 8. – C. 728496. doi: 10.3389/fmed.2021.728496
71. Pont J., Singh P., Singh V.P., Patterson K. Comparative Study of Adipose-Derived and Bone Marrow-Derived Mesenchyme Stem Cells for Intervertebral Disc Regeneration in Patients with Degenerative Disc Disease // *Journal of Stem Cell Research*. – 2025. – T. 6. – №. 2. – C. 75. doi: 10.52793/JSCR.2025.6(2)-75
72. Giai Via A., Frizziero A., Oliva F. Biological properties of mesenchymal Stem Cells from different sources // *Muscles, Ligaments and Tendons Journal*. – 2012. – T. 2. – №. 3. – C. 154–162.
73. Aithal A.P., Bairy L.K., Seetharam R.N. Safety and therapeutic potential of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in regenerative medicine // *Stem Cell Investigation*. – 2021. – T. 8. – №. 10. doi: 10.21037/sci-2020-036
74. Wang Y.H., Wang D.R., Guo Y.C., Liu J.Y., Pan J. The application of bone marrow mesenchymal stem cells and biomaterials in skeletal muscle regeneration // *Regenerative Therapy*. – 2020. – T. 15. – C. 285-294. doi: 10.1016/j.reth.2020.11.002
75. Goldberg A.J., Masci L., O'Donnell P., Green R., Brooking D., Bassett P., Lowdell M.W., Smith R.K.W. Autologous bone marrow derived mesenchymal stem cells are safe for the treatment of Achilles tendinopathy // *Scientific Reports*. – 2024. – T. 14. – №. 1. – C. 11421. doi: 10.1038/s41598-024-61399-3.

76. Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J.W., Katz A.J., Benhaim P., Lorenz H.P., Hedrick M.H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies // *Tissue Engineering*. – 2001. – T. 7. – № 2. – C. 211–228. doi: 10.1089/107632701300062859.
77. Zhao A.G., Shah K., Freitag J. Differentiation Potential of Early- and Late-Passage Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Cultured under Hypoxia and Normoxia // *BioMed Research International*. – 2020. – C. 8898221. doi: 10.1155/2020/8898221.
78. Erices A., Conget P., Minguell J.J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood // *British Journal of Haematology*. – 2000. – T. 109. – № 1. – C. 235–242. doi: 10.1046/j.1365-2141.2000.01986.x.
79. Velarde F., Castañeda V., Morales E., Ortega M., Ocaña E., Álvarez-Barreto J., Grunauer M., Eguiguren L., Caicedo A. Use of Human Umbilical Cord and Its Byproducts in Tissue Regeneration // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2020. – T. 8. – C. 117. doi: 10.3389/fbioe.2020.00117.
80. Hodgson-Garms M., Moore M.J., Martino M.M., Kelly K., Frith J.E. Proteomic profiling of iPSC and tissue-derived MSC secretomes reveal a global signature of inflammatory licensing // *npj Regenerative Medicine*. – 2025. – T. 10. – № 1. – C. 7. doi: 10.1038/s41536-024-00382-y.
81. Gottipamula S., Bhat S., Udaykumar, Seetharam R.N. Mesenchymal stromal cells: Basics, classification, and clinical applications // *Journal of Stem Cells*. – 2018. – T. 13. – № 1. – C. 24–47.
82. Xie Q., Liu R., Jiang J., Peng J., Yang C., Zhang W., Wang S., Song J. What is the impact of human umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation on clinical treatment? // *Stem Cell Research & Therapy*. – 2020. – T. 11. – № 1. – C. 519. doi: 10.1186/s13287-020-02011-z.
83. Costela-Ruiz V.J., Melguizo-Rodríguez L., Bellotti C., Illescas-Montes R., Stanco D., Arciola C.R., Lucarelli E. Different Sources of Mesenchymal Stem Cells for Tissue Regeneration: A Guide to Identifying the Most Favorable One in Orthopedics and Dentistry Applications // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – T. 23. – № 11. – C. 6356. doi: 10.3390/ijms23116356.
84. Loewendorf A., Csete M. Concise review: immunologic lessons from solid organ transplantation for stem cell-based therapies // *Stem Cells Translational Medicine*. – 2013. – T. 2. – № 2. – C. 136–142. doi: 10.5966/sctm.2012-0125.
85. Parvin Nejad S., Lecce M., Mirani B., Machado Siqueira N., Mirzaei Z., Santerre J.P., Davies J.E., Simmons C.A. Serum- and xeno-free culture of human umbilical cord perivascular cells for pediatric heart valve tissue engineering // *Stem Cell Research & Therapy*. – 2023. – T. 14. – № 1. – C. 96. doi: 10.1186/s13287-023-03318-3.
86. Choudhery M.S., Badowski M., Muise A., Harris D.T. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose and cord tissue // *Cytotherapy*. – 2013. – T. 15. – № 3. – C. 330–343. doi: 10.1016/j.jcyt.2012.11.010.
87. Petrenko Y., Vackova I., Kekulova K., Chudickova M., Koci Z., Turnovcova K., Kupcova Skalnikova H., Vodicka P., Kubinova S. A Comparative Analysis of Multipotent Mesenchymal

- Stromal Cells derived from Different Sources, with a Focus on Neuroregenerative Potential // Scientific Reports. – 2020. – T. 10. – № 1. – C. 4290. doi: 10.1038/s41598-020-61167-z.
88. Calcat-I-Cervera S., Rendra E., Scaccia E., Amadeo F., Hanson V., Wilm B., Murray P., O'Brien T., Taylor A., Bieback K. Harmonised culture procedures minimise but do not eliminate mesenchymal stromal cell donor and tissue variability in a decentralised multicentre manufacturing approach // Stem Cell Research & Therapy. – 2023. – T. 14. – № 1. – C. 120. doi: 10.1186/s13287-023-03352-1.
  89. Wiese D.M., Ruttan C.C., Wood C.A., Ford B.N., Braid L.R. Accumulating Transcriptome Drift Precedes Cell Aging in Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stromal Cells Serially Cultured to Replicative Senescence // Stem Cells Translational Medicine. – 2019. – T. 8. – № 9. – C. 945–958. doi: 10.1002/sctm.18-0246.
  90. Beijer N.R.M., Nauryzgaliyeva Z.M., Arteaga E.M., Pieuchot L., Anselme K., van de Peppel J., Vasilevich A.S., Groen N., Roumans N., Hebels D.G.A.J., de Boer J. Dynamic adaptation of mesenchymal stem cell physiology upon exposure to surface micropatterns // Scientific Reports. – 2019. – T. 9. – № 1. – C. 9099. doi: 10.1038/s41598-019-45284-y.
  91. Alagesan S., Brady J., Byrnes D., Fandiño J., Masterson C., McCarthy S., Laffey J., O'Toole D. Enhancement strategies for mesenchymal stem cells and related therapies // Stem Cell Research & Therapy. – 2022. – T. 13. – № 1. – C. 75. doi: 10.1186/s13287-022-02747-w.
  92. Li Y., Wu Q., Wang Y., Li L., Bu H., Bao J. Senescence of mesenchymal stem cells (Review) // International Journal of Molecular Medicine. – 2017. – T. 39. – № 4. – C. 775-782. doi: 10.3892/ijmm.2017.2912.
  93. Li Y., Jin M., Guo D., Shen S., Lu K., Pan R., Sun L., Zhang H., Shao J., Pan G. Unveiling the immunogenicity of allogeneic mesenchymal stromal cells: Challenges and strategies for enhanced therapeutic efficacy // Biomedicine & Pharmacotherapy. – 2024. – T. 180. – C. 117537. doi: 10.1016/j.biopha.2024.117537.
  94. Ruparel N.B., Affonso de Almeida J.F., Henry M.A., Diogenes A. Characterization of a stem cell of apical papilla cell line: effect of passage on cellular phenotype // Journal of Endodontics. – 2013. – T. 39. – № 3. – C. 357–363. doi: 10.1016/j.joen.2012.10.027.
  95. De Witte S.F.H., Peters F.S., Merino A., Korevaar S.S., Van Meurs J.B.J., O'Flynn L., Elliman S.J., Newsome P.N., Boer K., Baan C.C., Hoogduijn M.J. Epigenetic changes in umbilical cord mesenchymal stromal cells upon stimulation and culture expansion // Cytotherapy. – 2018. – T. 20. – № 7. – C. 919–929. doi: 10.1016/j.jcyt.2018.05.005.
  96. Jiang T., Xu G., Wang Q., Yang L., Zheng L., Zhao J., Zhang X. In vitro expansion impaired the stemness of early passage mesenchymal stem cells for treatment of cartilage defects // Cell Death & Disease. – 2017. – T. 8. – № 6. – C. e2851. doi: 10.1038/cddis.2017.215.
  97. Roemeling-van Rhijn M., de Klein A., Douben H., Pan Q., van der Laan L.J.W., Ijzermans J.N.M., Betjes M.G.H., Baan C.C., Weimar W., Hoogduijn M.J. Culture expansion induces non-tumorigenic aneuploidy in adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells // Cytotherapy. – 2013. – T. 15. – № 11. – C. 1352–1361. doi: 10.1016/j.jcyt.2013.07.004.
  98. Pustovalova M., Grekhova A., Astrelina T., Nikitina V., Dobrovolskaya E., Suchkova Y., Kobzeva I., Usupzhanova D., Vorobyeva N., Samoylov A., Bushmanov A., Ozerov I.V., Zhavoronkov A., Leonov S., Klovov D., Osipov A.N. Accumulation of spontaneous  $\gamma$ H2AX

- foci in long-term cultured mesenchymal stromal cells // *Aging* (Albany NY). – 2016. – T. 8. – № 12. – C. 3498–3506. doi: 10.18632/aging.101142.
99. Wagner W., Horn P., Castoldi M., Diehlmann A., Bork S., Saffrich R., Benes V., Blake J., Pfister S., Eckstein V., Ho A.D. Replicative Senescence of Mesenchymal Stem Cells: A Continuous and Organized Process // *PLoS ONE*. – 2008. – T. 3. – № 5. – C. e2213. doi: 10.1371/journal.pone.0002213.
  100. Wang S., Wang Z., Su H., Chen F., Ma M., Yu W., Ye G., Cen S., Mi R., Wu X., Deng W., Feng P., Zeng C., Shen H., Wu Y. Effects of long-term culture on the biological characteristics and RNA profiles of human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells // *Molecular Therapy – Nucleic Acids*. – 2021. – T. 26. – C. 557–574. doi: 10.1016/j.omtn.2021.08.013.
  101. Muraglia A., Cancedda R., Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model // *Journal of Cell Science*. – 2000. – T. 113. – № 7. – C. 1161–1166. doi: 10.1242/jcs.113.7.1161.
  102. de Witte S.F.H., Lambert E.E., Merino A., Strini T., Douben H.J.C.W., O'Flynn L., Elliman S.J., de Klein A.J.E.M.M., Newsome P.N., Baan C.C., Hoogduijn M.J. Aging of bone marrow- and umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells during expansion // *Cytotherapy*. – 2017. – T. 19. – № 7. – C. 798–807. doi: 10.1016/j.jcyt.2017.03.071.
  103. Yang Y.-H.K., Ogando C.R., See C.W., Chang T.-Y., Barabino G.A. Changes in phenotype and differentiation potential of human mesenchymal stem cells aging in vitro // *Stem Cell Research & Therapy*. – 2018. – T. 9. – № 1. – C. 131. doi: 10.1186/s13287-018-0876-3.
  104. Hayflick L., Moorhead P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains // *Experimental Cell Research*. – 1961. – T. 25. – C. 585–621. doi: 10.1016/0014-4827(61)90192-6.
  105. Shay J.W., Wright W.E. Role of telomeres and telomerase in cancer // *Seminars in Cancer Biology*. – 2011. – T. 21. – № 6. – C. 349–353. doi: 10.1016/j.semcancer.2011.10.001.
  106. Al-Azab M., Safi M., Idiatullina E., Al-Shaebi F., Zaky M.Y. Aging of mesenchymal stem cell: machinery, markers, and strategies of fighting // *Cellular & Molecular Biology Letters*. – 2022. – T. 27. – № 1. – C. 69. doi: 10.1186/s11658-022-00366-0.
  107. Liu J., Ding Y., Liu Z., Liang X. Senescence in Mesenchymal Stem Cells: Functional Alterations, Molecular Mechanisms, and Rejuvenation Strategies // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2020. – T. 8. – C. 258. doi: 10.3389/fcell.2020.00258.
  108. Voynova E., Kulebyakin K., Grigorieva O., Novoseletskaya E., Basalova N., Alexandrushkina N., Arbatskiy M., Vigovskiy M., Sorokina A., Zinoveva A., Bakhchinyan E., Kalinina N., Akopyan Z., Tkachuk V., Tyurin-Kuzmin P., Efimenko A. Declined adipogenic potential of senescent MSCs due to shift in insulin signaling and altered exosome cargo // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2022. – T. 10. – C. 1050489. doi: 10.3389/fcell.2022.1050489.
  109. Бородкина А.В., Дерябин П.И., Грюкова А.А., Никольский Н.Н. «Социальная жизнь» стареющих клеток: что такое SASP и зачем его изучать? // *Acta Naturae*. – 2018. – T. 10. – № 1. – C. 4–14. doi: 10.32607/20758251-2018-10-1-4-14.
  110. Mi L., Hu J., Li N., Gao J., Huo R., Peng X., Zhang N., Liu Y., Zhao H., Liu R., Zhang L., Xu K. The Mechanism of Stem Cell Aging // *Stem Cell Reviews and Reports*. – 2022. – T. 18. – № 4. – C. 1281–1293. doi: 10.1007/s12015-021-10317-5.
  111. Romanov S.R., Kozakiewicz B.K., Holst C.R., Stampfer M.R., Haupt L.M., Tlsty T.D. Normal human mammary epithelial cells spontaneously escape senescence and acquire genomic changes // *Nature*. – 2001. – T. 409. – № 6820. – C. 633–637. doi: 10.1038/35054579.

112. Counter C.M., Avilion A.A., LeFeuvre C.E., Stewart N.G., Greider C.W., Harley C.B., Bacchetti S. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity // *EMBO Journal*. – 1992. – Т. 11. - №. 5. – С. 1921-9. doi: 10.1002/j.1460-2075.1992.tb05245.x.
113. Panwar U., Mishra K., Patel P., Bharadva S., Vaniawala S., Shah A., Vundinti B.R., Kothari S.L., Ghosh K. Assessment of Long-Term in vitro Multiplied Human Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells prior to Their Use in Clinical Administration // *Cells Tissues Organs*. – 2021. – Т. 210. – № 4. – С. 239–249. doi: 10.1159/000517423.
114. Kumari R., Jat P. Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2021. – Т. 9. – С. 645593. doi: 10.3389/fcell.2021.645593.
115. Olovnikov A.M. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon // *Journal of Theoretical Biology*. – 1973. – Т. 41. – № 1. – С. 181–190. doi: 10.1016/0022-5193(73)90198-7.
116. Масютина А.М., Пашенков М.В., Пинегин Б.В. Клеточное старение: механизмы и клиническое значение // *Иммунология*. – 2024. – Т. 45. – № 2. – С. 221–234. doi: 10.33029/1816-2134-2024-45-2-221-234
117. Зверева М.Э., Щербакова Д.М., Донцова О.А. Теломераза: структура, функции и пути регуляции активности // *Успехи биологической химии*. – 2010. – Т. 50. – С. 155-202.
118. Ghareghomi S., Ahmadian S., Zarghami N., Kahroba H. Fundamental insights into the interaction between telomerase/TERT and intracellular signaling pathways // *Biochimie*. – 2021. – Т. 181. – С. 12–24. doi: 10.1016/j.biochi.2020.11.015.
119. de Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres // *Genes & Development*. – 2005. – Т. 19. – № 18. – С. 2100–2110. doi: 10.1101/gad.1346005.
120. Griffith J.D., Comeau L., Rosenfield S., Stansel R.M., Bianchi A., Moss H., de Lange T. Mammalian telomeres end in a large duplex loop // *Cell*. – 1999. – Т. 97. – № 4. – С. 503–514. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80760-6.
121. Wang H., Guo M., Wei H., Chen Y. Targeting p53 pathways: mechanisms, structures, and advances in therapy // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2023. – Т. 8. – № 1. – С. 92. doi: 10.1038/s41392-023-01347-1.
122. Engeland K. Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling // *Cell Death & Differentiation*. – 2022. – Т. 29. – № 5. – С. 946–960. doi: 10.1038/s41418-022-00988-z
123. Чумаков М.П. Белок p53 и его универсальные функции в многоклеточном организме // *Успехи биологической химии*. – 2007. - Т. 47. - С. 3–52
124. Kowalczyk D., Nakasone M.A., Smith B.O., Huang D.T. Bivalent binding of p14ARF to MDM2 RING and acidic domains inhibits E3 ligase function // *Life Science Alliance*. – 2022. – Т. 5. – № 12. – С. e202201472. doi: 10.26508/lsa.202201472.
125. Turinetto V., Vitale E., Giachino C. Senescence in Human Mesenchymal Stem Cells: Functional Changes and Implications in Stem Cell-Based Therapy // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2016. – Т. 17. – № 7. – С. 1164. doi: 10.3390/ijms17071164.
126. Bartas M., Brázda V., Volná A., Červeň J., Pečinka P., Zawacka-Pankau J.E. The Changes in the p53 Protein across the Animal Kingdom Point to Its Involvement in Longevity // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Т. 22. – № 16. – С. 8512. doi: 10.3390/ijms22168512.
127. Tousian H., Razavi B.M., Hosseinzadeh H. Looking for immortality: Review of phytotherapy for stem cell senescence // *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. – 2020. – Т. 23. – № 2. – С. 154–166. doi: 10.22038/IJBMS.2019.40223.9522.

128. Choudhery M.S. Strategies to improve regenerative potential of mesenchymal stem cells // *World Journal of Stem Cells*. – 2021. – T. 13. – № 12. – C. 1845–1862. doi: 10.4252/wjsc.v13.i12.1845.
129. Chen S., Yu Y., Xie S., Liang D., Shi W., Chen S., Li G., Tang W., Liu C., He Q. Local H<sub>2</sub> release remodels senescence microenvironment for improved repair of injured bone // *Nature Communications*. – 2023. – T. 14. – № 1. – C. 7783. doi: 10.1038/s41467-023-43618-z.
130. Roato I., Visca M., Mussano F. Suppressing the Aging Phenotype of Mesenchymal Stromal Cells: Are We Ready for Clinical Translation? // *Biomedicines*. – 2024. – T. 12. – № 12. – C. 2811. doi: 10.3390/biomedicines12122811.
131. Sun Y., Zhang H., Qiu T., Liao L., Su X. Epigenetic regulation of mesenchymal stem cell aging through histone modifications // *Genes & Diseases*. – 2023. – T. 10. – № 6. – C. 2443–2456. doi: 10.1016/j.gendis.2022.10.030.
132. Dong J., Zhang Z., Huang H., Mo P., Cheng C., Liu J., Huang W., Tian C., Zhang C., Li J. miR-10a rejuvenates aged human mesenchymal stem cells and improves heart function after myocardial infarction through KLF4 // *Stem Cell Research & Therapy*. – 2018. – T. 9. – № 1. – C. 151. doi: 10.1186/s13287-018-0895-0.
133. Li X., Hong Y., He H., Jiang G., You W., Liang X., Fu Q., Han S., Lian Q., Zhang Y. FGF21 Mediates Mesenchymal Stem Cell Senescence via Regulation of Mitochondrial Dynamics // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2019. – C. 4915149. doi: 10.1155/2019/4915149.
134. Furlani D., Li W., Pittermann E., Klopsch C., Wang L., Knopp A., Jungebluth P., Thedinga E., Havenstein C., Westien I., Ugurlucan M., Li R.-K., Ma N., Steinhoff G. A transformed cell population derived from cultured mesenchymal stem cells has no functional effect after transplantation into the injured heart // *Cell Transplantation*. – 2009. – T. 18. – № 3. – C. 319–331. doi: 10.3727/096368909788534906.
135. Ahmadbeigi N., Shafiee A., Seyedjafari E., Gheisari Y., Vassei M., Amanpour S., Amini S., Bagherizadeh I., Soleimani M. Early spontaneous immortalization and loss of plasticity of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells // *Cell Proliferation*. – 2011. – T. 44. – № 1. – C. 67–74. doi: 10.1111/j.1365-2184.2010.00731.x.
136. Boukamp P., Petrussevska R.T., Breitkreutz D., Hornung J., Markham A., Fusenig N.E. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line // *Journal of Cell Biology*. – 1988. – T. 106. – № 3. – C. 761–771. doi: 10.1083/jcb.106.3.761.
137. He L., Zheng Y., Wan Y., Song J. A shorter telomere is the key factor in preventing cultured human mesenchymal stem cells from senescence escape // *Histochemistry and Cell Biology*. – 2014. – T. 142. – № 3. – C. 257–267. doi: 10.1007/s00418-014-1210-5.
138. Kim N.W., Piatyszek M.A., Prowse K.R., Harley C.B., West M.D., Ho P.L., Coviello G.M., Wright W.E., Weinrich S.L., Shay J.W. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer // *Science*. – 1994. – T. 266. – №. 5193. – C. 2011–2015. doi: 10.1126/science.7605428.
139. Stepanenko A.A., Kavsan V.M. Immortalization and malignant transformation of eukaryotic cells // *Cytology and Genetics*. – 2012. – T. 46. – № 2. – C. 96–129. doi: 10.3103/S0095452712020041.
140. Mondello C., Chiodi I. Cellular immortalization and neoplastic transformation: Simultaneous, sequential or independent? Telomeres, telomerase or karyotypic variations? // *Cell Cycle*. – 2013. – T. 12. – № 11. – C. 1804–1805. doi: 10.4161/cc.24940.
141. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions // *Cancer Discovery*. – 2022. – T. 12. – № 1. – C. 31–46. doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.

142. Копнин Б.П. Неопластическая клетка: основные свойства и механизмы их возникновения // Практическая онкология. – 2002. – Т. 3. – № 4. – С. 229–235.
143. Akincilar S.C., Unal B., Tergaonkar V. Reactivation of telomerase in cancer // Cellular and Molecular Life Sciences. 2016. – Т. 73. – №. 8. – С. 1659-1670. doi: 10.1007/s00018-016-2146-9.
144. Примак А.Л., Шкарина Л.Н., Илларионова М.Е., Плющий И.В., Захарова А.В., Ткачук В.А., Карагяур М.Н. Иммортализация клеточных культур для регенеративной биомедицины: подходы, возможности и ограничения // Биохимия. – 2025. – Т. 90. – №8. – С. 1093-1112. doi: 10.31857/S0320972525080021
145. Duesberg P., McCormack A. Immortality of cancers: a consequence of inherent karyotypic variations and selections for autonomy // Cell Cycle. – 2013. – Т. 12. – № 5. – С. 783–802. doi: 10.4161/cc.23720.
146. Belgiovine C., Chiodi I., Mondello C. Telomerase: cellular immortalization and neoplastic transformation. Multiple functions of a multifaceted complex // Cytogenetic and Genome Research. – 2008. – Т. 122. – № 3–4. – С. 255–262. doi: 10.1159/000167811.
147. Sato M., Shay J.W., Minna J.D. Immortalized normal human lung epithelial cell models for studying lung cancer biology // Revista de Investigación Clínica. – 2020. – Т. 58. – № 5. – С. 344–354. doi: 10.1016/j.resinv.2020.04.005.
148. Rubio D., Garcia S., Paz M.F., De la Cueva T., Lopez-Fernandez L.A., Lloyd A.C., Garcia-Castro J., Bernad A. Molecular Characterization of Spontaneous Mesenchymal Stem Cell Transformation // PLoS ONE. – 2008. – Т. 3. – № 1. – С. e1398. doi: 10.1371/journal.pone.0001398
149. Сапун А. С., Квитко О. В., Конева И. И., Шейко Я.И., Балащенко Н.А., Дромашко С.Е. Иммортализация и онкотрансформация в популяциях соматических клеток // Молекулярная и прикладная генетика. – 2011. – Т. 12. – С. 119-129.
150. Härle-Bachor C., Boukamp P. Telomerase activity in the regenerative basal layer of the epidermis in human skin and in immortal and carcinoma-derived skin keratinocytes // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1996. – Т. 93. – № 13. – С. 6476–6481. doi: 10.1073/pnas.93.13.6476.
151. Pavez Lorie E., Stricker N., Plitta-Michalak B., Chen I.-P., Volkmer B., Greinert R., Jauch A., Boukamp P., Rapp A. Characterisation of the novel spontaneously immortalized and invasively growing human skin keratinocyte line HaSKpw // Scientific Reports. – 2020. – Т. 10. – № 1. – С. 15196. doi: 10.1038/s41598-020-71315-0.
152. Hahn W.C. Immortalization and transformation of human cells // Molecules and Cells. – 2002. – Т. 13. – № 3. – С. 351–361. PMID: 12132573.
153. Serakinci N., Guldberg P., Burns J.S., Abdallah B., Schrødder H., Jensen T., Kassem M. Adult human mesenchymal stem cell as a target for neoplastic transformation // Oncogene. – 2004. – Т. 23. – № 29. – С. 5095–5098. doi: 10.1038/sj.onc.1207651.
154. Speiseder T., Hofmann-Sieber H., Rodríguez E., Schellenberg A., Akyüz N., Dierlamm J., Spruss T., Lange C., Dobner T. Efficient Transformation of Primary Human Mesenchymal Stromal Cells by Adenovirus Early Region 1 Oncogenes // Journal of Virology. – 2017. – Т. 91. – № 1. – С. e01782-16. doi: 10.1128/JVI.01782-16.
155. Stricker P.E.F., de Oliveira N.B., Mogharbel B.F., Lührs L., Irioda A.C., Abdelwahid E., Cavalli L.R., Zotarelli-Filho I.J., de Carvalho K.A.T. Meta-analysis of the Mesenchymal Stem Cells Immortalization Protocols: A Guideline for Regenerative Medicine // Current Stem Cell Research & Therapy. – 2024. – Т. 19. – № 7. – С. 1009–1020. doi: 10.2174/011574888X268464231016070900.

156. Darimont C., Avanti O., Tromvoukis Y., Vautravers-Leone P., Kurihara N., Roodman G.D., Colgin L.M., Tullberg-Reinert H., Pfeifer A.M.A., Offord E.A., Mace K. SV40 T antigen and telomerase are required to obtain immortalized human adult bone cells without loss of the differentiated phenotype // *Cell Growth & Differentiation*. – 2002. – Т. 13. – № 2. – С. 59–67. PMID: 11864909.
157. Kamal S., Junaid M., Ejaz A., Bibi I., Akash M.S.H., Rehman K. The secrets of telomerase: Retrospective analysis and future prospects // *Life Sciences*. – 2020. – Т. 257. – С. 118115. doi: 10.1016/j.lfs.2020.118115.
158. Robinson N.J., Schieman W.P. Telomerase in Cancer: Function, Regulation, and Clinical Translation // *Cancers (Basel)*. – 2022. – Т. 14. – № 3. – С. 808. doi: 10.3390/cancers14030808.
159. Rubtsova M., Dontsova O. Human Telomerase RNA: Telomerase Component or More? // *Biomolecules*. – 2020. – Т. 10. – № 6. – С. 873. doi: 10.3390/biom10060873.
160. Yalvaç M.E., Yilmaz A., Mercan D., Aydin S., Dogan A., Arslan A., Demir Z., Salafutdinov I.I., Shafigullina A.K., Sahin F., Rizvanov A.A., Palotás A. Differentiation and neuro-protective properties of immortalized human tooth germ stem cells // *Neurochemical Research*. – 2011. – Т. 36. – № 12. – С. 2227–2235. doi: 10.1007/s11064-011-0546-7.
161. Cheung P.Y., Deng W., Man C., Tse W.W., Srivastava G., Law S., Tsao S.W., Cheung A.L.M. Genetic alterations in a telomerase-immortalized human esophageal epithelial cell line: implications for carcinogenesis // *Cancer Letters*. – 2010. – Т. 293. – № 1. – С. 41–51. doi: 10.1016/j.canlet.2009.12.015.
162. Boukamp P., Popp S., Kronic D. Telomere-Dependent Chromosomal Instability // *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*. – 2005. – Т. 10. – № 2. – С. 89–94. doi: 10.1111/j.1087-0024.2005.200401.x.
163. O'Sullivan J., Karlseder J. Telomeres: protecting chromosomes against genome instability // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2010. – Т. 11. – С. 171–181. doi: 10.1038/nrm2848.
164. Franco S., MacKenzie K.L., Dias S., Alvarez S., Rafii S., Moore M.A. Clonal variation in phenotype and life span of human embryonic fibroblasts (MRC-5) transduced with the catalytic component of telomerase (hTERT) // *Experimental Cell Research*. – 2001. – Т. 268. – № 1. – С. 14–25. doi: 10.1006/excr.2001.5264.
165. Примак А.Л., Калинина Н.И., Скрыбина М.Н., Усачев В.А., Чечехин В.И., Виговский М.А., Чечехина Е.С., Волошин Н.С., Кулебякин К.Ю., Кулебякина М.А., Григорьева О.А., Тюрин-Кузьмин П.А., Яковлева Т.К., Турилова В.И., Шагимарданова Е.И., Газизова Г.Р., Басалова Н.А., Ефименко А.Ю., Джауари С.С., Антропова Ю.Г., Плющий И.В., Акопян Ж.А., Сысоева В.Ю., Ткачук В.А., Карагяур М.Н. Создание и характеристика культур мезенхимных стромальных клеток человека с пролонгированным пролиферативным потенциалом для задач регенеративной медицины // *Регенерация органов и тканей*. – 2024. – Т. 2. – № 2. – С. 24–45 doi: 10.60043/2949-5938-2024-2-24-45
166. Serakinci N., Christensen R., Fahrioglu U. Transformation of Mesenchymal Stem Cells // *Cancer Stem Cells - The Cutting Edge*. – 2011. – С. 207–226. doi: 10.13140/2.1.2423.3922
167. Vaziri H., Squire J.A., Pandita T.K., Bradley G., Kuba R.M., Zhang H., Gulyas S., Hill R.P., Nolan G.P., Benchimol S. Analysis of genomic integrity and p53-dependent G1 checkpoint in telomerase-induced extended-life-span human fibroblasts // *Molecular and Cellular Biology*. – 1999. – Т. 19. – № 3. – С. 2373–2379. doi: 10.1128/MCB.19.3.2373.
168. Morales C.P., Holt S.E., Ouellette M., Kaur K.J., Yan Y., Wilson K.S., White M.A., Wright W.E., Shay J.W. Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase // *Nature Genetics*. – 1999. – Т. 21. – № 1. – С. 115–118. doi: 10.1038/5063.



169. Jiang X.R., Jimenez G., Chang E., Frolkis M., Kusler B., Sage M., Beeche M., Bodnar A.G., Wahl G.M., Tlsty T.D., Chiu C.P. Telomerase expression in human somatic cells does not induce changes associated with a transformed phenotype // *Nature Genetics*. – 1999. – T. 21. – № 1. – C. 111–114. doi: 10.1038/5056.
170. Simonsen J.L., Rosada C., Serakinci N., Justesen J., Stenderup K., Rattan S.I.S., Jensen T.G., Kassem M. Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells // *Nature Biotechnology*. – 2002. – T. 20. – № 6. – C. 592–596. doi: 10.1038/nbt0602-592.
171. Qin S.Q., Kusuma G.D., Al-Sowayan B., Pace R.A., Isenmann S., Pertile M.D., Gronthos S., Abumaree M.H., Brennecke S.P., Kalionis B. Establishment and characterization of fetal and maternal mesenchymal stem/stromal cell lines from the human term placenta // *Placenta*. – 2016. – T. 39. – C. 134–146. doi: 10.1016/j.placenta.2016.01.018.
172. Mihara K., Imai C., Coustan-Smith E., Dome J.S., Dominici M., Vanin E., Campana D. Development and functional characterization of human bone marrow mesenchymal cells immortalized by enforced expression of telomerase // *British Journal of Haematology*. – 2003. – T. 120. – № 5. – C. 846–849. doi: 10.1046/j.1365-2141.2003.04217.x.
173. Shi S., Gronthos S., Chen S., Reddi A., Counter C.M., Robey P.G., Wang C.-Y. Bone formation by human postnatal bone marrow stromal stem cells is enhanced by telomerase expression // *Nature Biotechnology*. – 2002. – T. 20. – № 6. – C. 587–591. doi: 10.1038/nbt0602-587.
174. Hoch A.I., Leach J.K. Concise review: optimizing expansion of bone marrow mesenchymal stem/stromal cells for clinical applications // *Stem Cells Translational Medicine*. – 2014. – T. 3. – № 5. – C. 643–652. doi: 10.5966/sctm.2013-0196.
175. Klinger R.Y., Blum J.L., Hearn B., Lebow B., Niklason L.E. Relevance and safety of telomerase for human tissue engineering // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2006. – T. 103. – № 8. – C. 2500–2505. doi: 10.1073/pnas.0508184103.
176. Huang Z.-X., Mao X.-M., Lin D.-C., Hong Y.-H., Liang G.-S., Chen Q.-X., Chen Q.-H. Establishment and characterization of immortalized human eutopic endometrial stromal cells // *American Journal of Reproductive Immunology*. – 2020. – T. 83. – № 3. – C. e13213. doi: 10.1111/aji.13213.
177. Zongaro S., de Stanchina E., Colombo T., D'Incalci M., Giulotto E., Mondello C. Stepwise neoplastic transformation of a telomerase immortalized fibroblast cell line // *Cancer Research*. – 2005. – T. 65. – № 24. – C. 11411–11418. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1140.
178. Balducci L., Blasi A., Saldarelli M., Soleti A., Pessina A., Bonomi A., Coccè V., Dossena M., Tosetti V., Ceserani V., Navone S.E., Falchetti M.L., Parati E.A., Alessandri G. Immortalization of human adipose-derived stromal cells: production of cell lines with high growth rate, mesenchymal marker expression and capability to secrete high levels of angiogenic factors // *Stem Cell Research & Therapy*. – 2014. – T. 5. – № 3. – C. 63. doi: 10.1186/scrt452.
179. Levine A.J. The common mechanisms of transformation by the small DNA tumor viruses: The inactivation of tumor suppressor gene products: p53 // *Virology*. – 2009. – T. 384. – № 2. – C. 285–293. doi: 10.1016/j.virol.2008.09.034.
180. Li S., Hong X., Wei Z., Xie M., Li W., Liu G., Guo H., Yang J., Wei W., Zhang S. Ubiquitination of the HPV Oncoprotein E6 Is Critical for E6/E6AP-Mediated p53 Degradation // *Frontiers in Microbiology*. – 2019. – T. 10. – C. 2483. doi: 10.3389/fmicb.2019.02483.

181. Chalak M., Hesarakı M., Mirbahari S.N., Yeganeh M., Abdi S., Rajabi S., Hemmatzadeh F. Cell Immortality: In Vitro Effective Techniques to Achieve and Investigate Its Applications and Challenges // *Life (Basel)*. – 2024. – T. 14. – № 3. – C. 417. doi: 10.3390/life14030417
182. Tosato, G. and Cohen, J.I. Generation of Epstein-Barr Virus (EBV)–Immortalized B Cell Lines // *Current Protocols in Immunology*. – 2007. – T. 76. – C. 7.22.1-7.22.4. doi: 10.1002/0471142735.im0722s76
183. Nakayama T., Fujisawa R., Izawa D., Hieshima K., Takada K., Yoshie O. Human B cells immortalized with Epstein-Barr virus upregulate CCR6 and CCR10 and downregulate CXCR4 and CXCR5 // *Journal of Virology*. – 2002. – T. 76. – № 6. – C. 3072–3077. doi: 10.1128/JVI.76.6.3072-3077.2002.
184. Darekar S., Georgiou K., Yurchenko M., Yenamandra S.P., Chachami G., Simos G., Klein G., Kashuba E. Epstein-Barr virus immortalization of human B-cells leads to stabilization of hypoxia-induced factor 1 alpha, congruent with the Warburg effect // *PLoS ONE*. – 2012. – T. 7. – № 7. – C. e42072. doi: 10.1371/journal.pone.0042072.
185. Wang J., Nagy N., Masucci M.G. The Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 upregulates the cellular antioxidant defense to enable B-cell growth transformation and immortalization // *Oncogene*. – 2020. – T. 39. – № 3. – C. 603–616. doi: 10.1038/s41388-019-1003-3.
186. Li P., Wu Y., Goodwin A.J., Halushka P.V., Wilson C.L., Schnapp L.M., Fan H. Generation of a new immortalized human lung pericyte cell line: a promising tool for human lung pericyte studies // *Laboratory Investigation*. – 2021. – T. 101. – № 5. – C. 625–635. doi: 10.1038/s41374-020-00524-y.
187. Toouli C.D., Huschtscha L.I., Neumann A.A., Noble J.R., Colgin L.M., Hukku B., Reddel R.R. Comparison of human mammary epithelial cells immortalized by simian virus 40 T-Antigen or by the telomerase catalytic subunit // *Oncogene*. – 2002. – T. 21. – № 1. – C. 128–139. doi: 10.1038/sj.onc.1205014.
188. Lenz L.S., Wink M.R. The other side of the coin: mesenchymal stromal cell immortalization beyond evasion of senescence // *Human Cell*. – 2023. – T. 36. – № 5. – C. 1593–1603. doi: 10.1007/s13577-023-00925-3.
189. Wang Z., Wang S., Jia Z., Zhao Y., Yang M., Yan W., Chen T., Xiang D., Shao R., Liu Y. Establishment and characterization of an immortalized epithelial cell line from human gallbladder // *Frontiers in Oncology*. – 2022. – T. 12. – C. 994087. doi: 10.3389/fonc.2022.994087.
190. Mihajlovic M., Hariri S., Westphal K.C.G., Janssen M.J., Oost M.J., Bongiovanni L., van den Heuvel L.P., de Bruin A., Hilbrands L.B., Masereeuw R. Safety evaluation of conditionally immortalized cells for renal replacement therapy // *Oncotarget*. – 2019. – T. 10. – № 51. – C. 5332–5348. doi: 10.18632/oncotarget.27152.
191. Jahn M., Lang V., Diehl S., Back R., Kaufmann R., Fauth T., Buerger C. Different immortalized keratinocyte cell lines display distinct capabilities to differentiate and reconstitute an epidermis in vitro // *Experimental Dermatology*. – 2024. – T. 33. – № 1. – C. e14985. doi: 10.1111/exd.14985.
192. Schwob A.E., Nguyen L.J., Meiri K.F. Immortalization of neural precursors when telomerase is overexpressed in embryonal carcinomas and stem cells // *Molecular Biology of the Cell*. – 2008. – T. 19. – № 4. – C. 1548-1560. doi: 10.1091/mbc.e06-11-1013..
193. Nishioka K., Fujimori Y., Hashimoto-Tamaoki T., Kai S., Qiu H., Kobayashi N., Tanaka N., Westerman K.A., Leboulch P., Hara H. Immortalization of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells by removable simian virus 40T antigen gene: Analysis of the ability to support expansion of cord blood hematopoietic progenitor cells // *International Journal of Oncology*. – 2003. – T. 23. – № 4. – C. 925–932. doi: 10.3892/ijo.23.4.925.

194. Bhatia R., McGlave P.B., Miller J.S., Verfaillie C.M. BCR-ABL plasmid DNA can immortalize a human bone marrow stromal cell line // *Blood*. – 1994. – T. 83. – № 7. – C. 1799–1808. PMID: 8142648.
195. Sanz-Serrano D., Sánchez-de-Diego C., Mercade M., Ventura F. Dental Stem Cells SV40, a new cell line developed in vitro from human stem cells of the apical papilla // *International Endodontic Journal*. – 2023. – T. 56. – № 4. – C. 502–513. doi: 10.1111/iej.13887.
196. Salih V., Knowles J.C., O'Hare M.J., Olsen I. Retroviral transduction of alveolar bone cells with a temperature-sensitive SV40 large T antigen // *Cell and Tissue Research*. – 2001. – T. 304. – № 3. – C. 371–376. doi: 10.1007/s004410100391.
197. Reddel R.R., Ke Y., Gerwin B.I., McMenamin M.G., Lechner J.F., Su R.T., Brash D.E., Park J.B., Rhim J.S., Harris C.C. Transformation of human bronchial epithelial cells by infection with SV40 or adenovirus-12 SV40 hybrid virus, or transfection via strontium phosphate coprecipitation with a plasmid containing SV40 early region genes // *Cancer Research*. – 1988. – T. 48. – № 7. – C. 1904–1909. PMID: 2450641.
198. Masuda A., Kondo M., Saito T., Yatabe Y., Kobayashi T., Okamoto M., Suyama M., Takahashi T., Takahashi T. Establishment of human peripheral lung epithelial cell lines (HPL1) retaining differentiated characteristics and responsiveness to epidermal growth factor, hepatocyte growth factor, and transforming growth factor beta1 // *Cancer Research*. – 1997. – T. 57. – № 21. – C. 4898–4904. PMID: 9354455.
199. Piñero-Ramil M., Castro-Viñuelas R., Sanjurjo-Rodríguez C., Rodríguez-Fernández S., Hermida-Gómez T., Blanco-García F.J., Fuentes-Boquete I., Díaz-Prado S. Immortalizing Mesenchymal Stromal Cells from Aged Donors While Keeping Their Essential Features // *Stem Cells International*. – 2020. – T. 2020. – C. 5726947. doi: 10.1155/2020/5726947.
200. Cotsiki M., Lock R.L., Cheng Y., Williams G.L., Zhao J., Perera D., Freire R., Entwistle A., Golemis E.A., Roberts T.M., Jat P.S., Gjoerup O.V. Simian virus 40 large T antigen targets the spindle assembly checkpoint protein Bub1 // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2004. – T. 101. – № 4. – C. 947–952. doi: 10.1073/pnas.0308006100
201. Darimont C., Macé K. Immortalization of human preadipocytes // *Biochimie*. – 2003. – T. 85. – № 12. – C. 1231–1233. doi: 10.1016/j.biochi.2003.10.015.
202. Rakhmatullina A.R., Mingaleeva R.N., Gafurbaeva D.U., Glazunova O.N., Sagdeeva A.R., Bulatov E.R., Rizvanov A.A., Miftakhova R.R. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell (MSC) Immortalization by Modulation of hTERT and TP53 Expression Levels // *Journal of Personalized Medicine*. – 2023. – T. 13. – № 11. – C. 1621. doi: 10.3390/jpm13111621
203. Wong J., Kusdra L., Collins K. Subnuclear shuttling of human telomerase induced by transformation and DNA damage // *Nat Cell Biol*. – 2002. – T. 4. – C. 731–736. <https://doi.org/10.1038/ncb846>
204. Shu Y., Yang C., Ji X., Zhang L., Bi Y., Yang K., Gong M., Liu X., Guo Q., Su Y., Qu X., Nan G., Zhao C., Zeng Z., Yu X., Zhang R., Yan S., Lei J., Wu K., Wu Y., An L., Huang S., Gong C., Yuan C., Liu W., Huang B., Feng Y., Zhang B., Dai Z., Shen Y., Luo W., Wang X., Haydon R.C., Luu H.H., Reid R.R., Wolf J.M., Lee M.J., He T.-C., Li Y. Reversibly immortalized human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (UC-MSCs) are responsive to BMP9-induced osteogenic and adipogenic differentiation // *Journal of Cellular Biochemistry*. – 2018. – T. 119. – № 11. – C. 8872–8886. doi: 10.1002/jcb.27140
205. Shin H.Y., Yang W., Lee E.J., Han G.H., Cho H., Chay D.B., Kim J.H. Establishment of five immortalized human ovarian surface epithelial cell lines via SV40 T antigen or HPV E6/E7 expression // *PLoS One*. – 2018. – T. 13. – № 10. – C. e0205297. doi: 10.1371/journal.pone.0205297.

206. Reddel R.R., Salghetti S.E., Willey J.C., Ohnuki Y., Ke Y., Gerwin B.I., Lechner J.F., Harris C.C. Development of tumorigenicity in simian virus 40-immortalized human bronchial epithelial cell lines // *Cancer Research*. – 1993. – T. 53. – № 5. – C. 985–991. PMID: 8094998.
207. Wall I.B., Toledo G.S., Jat P.S. Recent advances in conditional cell immortalization technology // *Cell Gene Therapy Insights*. – 2016. – T. 2. – №. 3. – C. 339-355. doi: 10.18609/cgti.2016.044
208. Yamamoto A., Kumakura S.-i., Uchida M., Barrett J.C., Tsutsui T. Immortalization of normal human embryonic fibroblasts by introduction of either the human papillomavirus type 16 E6 or E7 gene alone // *International Journal of Cancer*. – 2003. – T. 106. – № 3. – C. 301–309. doi: 10.1002/ijc.11219.
209. Haga K., Ohno S.-i., Yugawa T., Narisawa-Saito M., Fujita M., Sakamoto M., Galloway D.A., Kiyono T. Efficient immortalization of primary human cells by p16INK4a-specific short hairpin RNA or Bmi-1, combined with introduction of hTERT // *Cancer Science*. – 2007. – T. 98. – № 2. – C. 147–154. doi: 10.1111/j.1349-7006.2006.00373.x.
210. Kim S., Jeon K.-B., Park H.-M., Kim J., Lim C.-M., Yoon D.-Y. Establishment and Characterization of Immortalized Human Dermal Papilla Cells Expressing Human Papillomavirus 16 E6/E7 // *Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2024. – T. 34. – № 3. – C. 506–515. doi: 10.4014/jmb.2310.10035.
211. Stepanenko A.A., Andreieva S.V., Korets K.V., Mykytenko D.O., Baklaushev V.P., Huleyuk N.L., Kovalchuk O.O., Kavsan V.M. Step-by-step immortalization of normal human fibroblasts by telomerase // *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*. – 2007. – T. 43. – № 3-4. – C. 129–138. doi: 10.1007/s11626-007-9021-9.
212. Liu M.-C., Chen W.-H., Chiou C.-S., Lo W.-C., Dubey N.K., Chen Y.-C., Lai W.-F.T., Yeh S.-D., Chiang H.-S., Deng W.-P. Inhibition of chronic prostate inflammation by hyaluronic acid through an immortalized human prostate stromal cell line model // *PLoS ONE*. – 2017. – T. 12. – № 5. – C. e0178152. doi: 10.1371/journal.pone.0178152.
213. Zhang H., Jin Y., Chen X., Jin C., Law S., Tsao S.-W., Kwong Y.-L. Cytogenetic aberrations in immortalization of esophageal epithelial cells // *Cancer Genetics and Cytogenetics*. – 2006. – T. 165. – № 1. – C. 25–35. doi: 10.1016/j.cancergencyto.2005.07.016.
214. Takeuchi M., Higashino A., Takeuchi K., Hori Y., Koshiba-Takeuchi K., Makino H., Monobe Y., Kishida M., Adachi J., Takeuchi J., Tomonaga T., Umezawa A., Kameoka Y., Akagi K.-I. Transcriptional Dynamics of Immortalized Human Mesenchymal Stem Cells during Transformation // *PLoS ONE*. – 2015. – T. 10. – № 5. – C. e0126562. doi: 10.1371/journal.pone.0126562.
215. Duensing S., Duensing A., Flores E.R., Do A., Lambert P.F., Münger K. Centrosome abnormalities and genomic instability by episomal expression of human papillomavirus type 16 in raft cultures of human keratinocytes // *Journal of Virology*. – 2001. – T. 75. – № 16. – C. 7712–7716. doi: 10.1128/JVI.75.16.7712-7716.2001.
216. Stepanenko A.A., Andreieva S.V., Kavsan V.M. Step-by-step immortalization of normal human fibroblasts by telomerase: 14 years later // *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*. – 2021. – T. 57. – № 10. – C. 998–1005. doi: 10.1007/s11626-021-00631-0.
217. Hashida T., Yasumoto S. Induction of chromosome abnormalities in mouse and human epidermal keratinocytes by the human papillomavirus type 16 E7 oncogene // *Journal of General Virology*. – 1991. – T. 72. – № 7. – C. 1569–1577. doi: 10.1099/0022-1317-72-7-1569.
218. Leung C.O.N., Deng W., Ye T.-M., Ngan H.Y.S., Tsao S.W., Cheung A.N.Y., Pang R.T.K., Yeung W.S.B. miR-135a leads to cervical cancer cell transformation through regulation of  $\beta$ -

- catenin via a SIAH1-dependent ubiquitin proteosomal pathway // *Carcinogenesis*. – 2014. – T. 35. – № 9. – C. 1931–1940. doi: 10.1093/carcin/bgu032.
219. Hung S.-C., Yang D.-M., Chang C.-F., Lin R.-J., Wang J.-S., Ho L.L.-T., Yang W.K. Immortalization without neoplastic transformation of human mesenchymal stem cells by transduction with HPV16 E6/E7 genes // *International Journal of Cancer*. – 2004. – T. 110. – № 3. – C. 313–319. doi: 10.1002/ijc.20126
  220. Zeng F.M., Xie Y.M., Liao L.D., Li L.Y., Chen B., Xie J.J., Xu L.Y., Li E.M. Biological characterization of three immortalized esophageal epithelial cell lines // *Molecular Medicine Reports*. – 2016. – T. 14. – № 5. – C. 4802–4810. doi: 10.3892/mmr.2016.5813.
  221. Wang A., Zhou D., Krawczyk E., Li T., Simic V., Lu J., Liu X., Schlegel R., Yuan H. Overexpression of the telomerase holoenzyme induces EMT and tumorigenesis of HPV-immortalized keratinocytes // *Journal of Medical Virology*. – 2023. – T. 95. – № 4. – C. e28681. doi: 10.1002/jmv.28681.
  222. Benanti J.A., Wang M.L., Myers H.E., Robinson K.L., Grandori C., Galloway D.A. Epigenetic down-regulation of ARF expression is a selection step in immortalization of human fibroblasts by c-Myc // *Molecular Cancer Research*. – 2007. – T. 5. – № 11. – C. 1181–1189. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-06-0372.
  223. Gil J., Kerai P., Lleonart M., Bernard D., Cigudosa J.C., Peters G., Carnero A., Beach D. Immortalization of primary human prostate epithelial cells by c-Myc // *Cancer Research*. – 2005. – T. 65. – № 6. – C. 2179–2185. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-03-4030.
  224. Chen T.S., Arslan F., Yin Y., Tan S.S., Lai R.C., Choo A.B.H., Padmanabhan J., Lee C.N., de Kleijn D.P.V., Lim S.K. Enabling a robust scalable manufacturing process for therapeutic exosomes through oncogenic immortalization of human ESC-derived MSCs // *Journal of Translational Medicine*. – 2011. – T. 9. – C. 47. doi: 10.1186/1479-5876-9-47.
  225. Tan T.T., Lai R.C., Padmanabhan J., Sim W.K., Choo A.B.H., Lim S.K. Assessment of Tumorigenic Potential in Mesenchymal-Stem/Stromal-Cell-Derived Small Extracellular Vesicles (MSC-sEV) // *Pharmaceuticals (Basel)*. – 2021. – T. 14. – № 4. – C. 345. doi: 10.3390/ph14040345.
  226. Lai R.C., Tan T.T., Sim W.K., Zhang B., Lim S.K. A roadmap from research to clinical testing of mesenchymal stromal cell exosomes in the treatment of psoriasis // *Cytotherapy*. – 2023. – T. 25. – № 8. – C. 815–820. doi: 10.1016/j.jcyt.2023.03.015.
  227. Akimov S.S., Jiang M., Kedaigle A.J., Arbez N., Marque L.O., Eddings C.R., Ranum P.T., Whelan E., Tang A., Wang R., DeVine L.R., Talbot C.C., Cole R.N., Ratovitski T., Davidson B.L., Fraenkel E., Ross C.A. Immortalized striatal precursor neurons from Huntington's disease patient-derived iPS cells as a platform for target identification and screening for experimental therapeutics // *Human Molecular Genetics*. – 2021. – T. 30. – № 24. – C. 2469–2487. doi: 10.1093/hmg/ddab200.
  228. De Filippis L., Lamorte G., Snyder E.Y., Malgaroli A., Vescovi A.L. A novel, immortal, and multipotent human neural stem cell line generating functional neurons and oligodendrocytes // *Stem Cells*. – 2007. – T. 25. – № 9. – C. 2312–2321. doi: 10.1634/stemcells.2007-0040.
  229. Villa A., Liste I., Courtois E.T., Seiz E.G., Ramos M., Meyer M., Juliusson B., Kusk P., Martínez-Serrano A. Generation and properties of a new human ventral mesencephalic neural stem cell line // *Experimental Cell Research*. – 2009. – T. 315. – № 11. – C. 1860–1874. doi: 10.1016/j.yexcr.2009.03.011.
  230. Cacci E., Villa A., Parmar M., Cavallaro M., Mandahl N., Lindvall O., Martinez-Serrano A., Kokaia Z. Generation of human cortical neurons from a new immortal fetal neural stem cell line // *Experimental Cell Research*. – 2007. – T. 313. – № 3. – C. 588–601. doi: 10.1016/j.yexcr.2006.11.001.

231. Courtois E.T., Castillo C.G., Seiz E.G., Ramos M., Bueno C., Liste I., Martínez-Serrano A. In vitro and in vivo enhanced generation of human A9 dopamine neurons from neural stem cells by Bcl-XL // *Journal of Biological Chemistry*. – 2010. – T. 285. – № 13. – C. 9881–9897. doi: 10.1074/jbc.M109.054312.
232. De Filippis L., Ferrari D., Rota Nodari L., Amati B., Snyder E., Vescovi A.L. immortalization of human neural stem cells with the c-myc mutant T58A // *PLoS ONE*. – 2008. – T. 3. – № 10. – C. e3310. doi: 10.1371/journal.pone.0003310.
233. Nagai A., Kim W.K., Lee H.J., Jeong H.S., Kim K.S., Hong S.H., Park I.H., Kim S.U. Multilineage potential of stable human mesenchymal stem cell line derived from fetal marrow // *PLoS ONE*. – 2007. – T. 2. – № 12. – C. e1272. doi: 10.1371/journal.pone.0001272.
234. Muto M., Onodera Y., Matsuura S., Fujita M., Nagashima T., Ichikawa G., Nakahara E., Arata S., Nakagawa H., Tsubouchi H., Hotta K., Tsuruma K., Shimazawa M., Hara H. Establishment and characterization of a PCOS and a normal human granulosa cell line // *Cytotechnology*. – 2020. – T. 72. – № 6. – C. 833–845. doi: 10.1007/s10616-020-00426-3.
235. Dos Santos A., Lyu N., Balayan A., Knight R., Zhuo K.S., Sun Y., Xu J., Funderburgh M.L., Funderburgh J.L., Deng S.X. Generation of Functional Immortalized Human Corneal Stromal Stem Cells // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – T. 23. – № 21. – C. 13399. doi: 10.3390/ijms232113399.
236. Yip Y.L., Pang P.S., Deng W., Tsang C.M., Zeng M., Hau P.M., Man C., Jin Y., Yuen A.P.W., Tsao S.W. Efficient immortalization of primary nasopharyngeal epithelial cells for EBV infection study // *PLoS ONE*. – 2013. – T. 8. – № 10. – C. e78395. doi: 10.1371/journal.pone.0078395.
237. Lin X., Ojo D., Wei F., Wong N., Gu Y., Tang D. A Novel Aspect of Tumorigenesis—BMI1 Functions in Regulating DNA Damage Response // *Biomolecules*. – 2015. – T. 5. – № 4. – C. 3396–3415. doi: 10.3390/biom5043396.
238. Dimri G.P., Martinez J.-L., Jacobs J.J.L., Keblusek P., Itahana K., Van Lohuizen M., Campisi J., Wazer D.E., Band V. The Bmi-1 oncogene induces telomerase activity and immortalizes human mammary epithelial cells // *Cancer Research*. – 2002. – T. 62. – № 16. – C. 4736–4745. PMID: 12183433.
239. Tátrai P., Szepesi Á., Matula Z., Szigeti A., Buchan Gy., Mádi A., Uher F., Németh K. Combined introduction of Bmi-1 and hTERT immortalizes human adipose tissue-derived stromal cells with low risk of transformation // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2012. – T. 422. – № 1. – C. 28–35. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.04.088.
240. Liu S., Wu M., Lancelot M., Deng J., Gao Y., Roback J.D., Chen T., Cheng L. BMI1 enables extensive expansion of functional erythroblasts from human peripheral blood mononuclear cells // *Molecular Therapy*. – 2021. – T. 29. – № 5. – C. 1918–1932. doi: 10.1016/j.ymthe.2021.01.022
241. Soo J.K., Mackenzie Ross A.D., Kallenberg D.M., Milagre C., Heung Chong W., Chow J., Hill L., Hoare S., Collinson R.S., Hossain M., Keith W.N., Marais R., Bennett DC. Malignancy without immortality? Cellular immortalization as a possible late event in melanoma progression // *Pigment Cell & Melanoma Research*. – 2011. – T. 24. – № 3. – C. 490–503. doi: 10.1111/j.1755-148X.2011.00850.x.
242. Burns J.S., Abdallah B.M., Guldberg P., Rygaard J., Schröder H.D., Kassem M. Tumorigenic heterogeneity in cancer stem cells evolved from long-term cultures of telomerase-immortalized human mesenchymal stem cells // *Cancer Research*. – 2005. – T. 65. – № 8. – C. 3126–3135. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-2218.

243. Longo P.A., Kavran J.M., Kim M.-S., Leahy D.J. Transient mammalian cell transfection with polyethylenimine (PEI) // *Methods in Enzymology*. – 2013. – T. 529. – C. 227–240. doi: 10.1016/B978-0-12-418687-3.00018-5.
244. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method // *Methods*. – 2001. – T. 25. – № 4. – C. 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
245. Voloshin N., Putlyaev E., Chechekhina E., Usachev V., Karagyaour M., Bozov K., Grigorieva O., Tyurin-Kuzmin P., Kulebyakin K. NuclePhaser: a YOLO-based framework for cell nuclei detection and counting in phase contrast images of arbitrary size with support of fast calibration and testing on specific use cases // *bioRxiv*. - 2025. doi: 10.1101/2025.05.13.653705
246. Ma W., Rogers K., Zbar B., Schmidt L. Effects of different fixatives on beta-galactosidase activity // *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. – 2002. – T. 50. - №. 10. – C. 1421-1424. doi: 10.1177/002215540205001015.
247. Chechekhin V.I., Kulebyakin K.Y., Kalinina N.I., Tyurin-Kuzmin P.A. Noradrenaline and serotonin-dependent sensitization of MSCs to noradrenaline // *MethodsX*. – 2024. – T. 12. – C. 102587. doi: 10.1016/j.mex.2024.102587.
248. Ozkinay C., Mitelman F. A simple trypsin-Giemsa technique producing simultaneous G- and C-banding in human chromosomes // *Hereditas*. – 1979. – T. 90. – № 1. – C. 1–4. doi: 10.1111/j.1601-5223.1979.tb01287.x
249. Liehr T. International System for Human Cytogenetic or Cytogenomic Nomenclature (ISCN): Some Thoughts // *Cytogenet Genome Res*. – 2021. – T. 161. - №. 5. – C. 223-224. doi: 10.1159/000516654.
250. Tyanova S., Temu T., Cox J. The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics // *Nature Protocols*. – 2016. – T. 11. - №. 12. – C. 2301-2319. doi: 10.1038/nprot.2016.136.
251. Schneider C.A., Rasband W.S., Eliceiri K.W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis // *Nature Methods*. – 2012. – T. 9. - №. 7. – C. 671-5. doi: 10.1038/nmeth.2089.
252. Kodama F., Umeda M., Tsutsui T. Mutagenic effect of sodium nitrite on cultured mouse cells // *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. - 1976. – T. 40. – №. 2. – C. 119-24. doi: 10.1016/0165-1218(76)90006-9.
253. Mykhailenko V., Kyrychenko V., Bragin A., Chuiko D. Generation, Evaluation, and Prospects of Further Use of Mutations Based on New Homozygous Self-Pollinated Sunflower Lines // *Genotoxicity and Mutagenicity - Mechanisms and Test Methods*. – 2019. doi: 10.5772/intechopen.89563
254. Trachana V., Petrakis S., Fotiadis Z., Siska E.K., Balis V., Gonos E.S., Kaloyianni M., Koliakos G. Human mesenchymal stem cells with enhanced telomerase activity acquire resistance against oxidative stress-induced genomic damage // *Cytotherapy*. - 2017. - T. 19. - №. 7. – C. 808-820. doi: 10.1016/j.jcyt.2017.03.078.
255. González-Gualda E., Baker A.G., Fruk L., Muñoz-Espín D. A guide to assessing cellular senescence in vitro and in vivo // *FEBS Journal*. – 2021. – T. 288. - №. 1. – C. 56-80. doi: 10.1111/febs.15570.
256. Viswanathan S., Shi Y., Galipeau J., Krampera M., Leblanc K., Martin I., Nolte J., Phinney D.G., Sensebe L. Mesenchymal stem versus stromal cells: International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT®) Mesenchymal Stromal Cell committee position statement on nomenclature // *Cytotherapy*. – 2019. – T. 21. - №. 10. – C. 1019-1024. doi: 10.1016/j.jcyt.2019.08.002.

257. Шатова О. П., Заболотнева А. А., Шестопапов А. В. Современное понимание молекулярных механизмов адипогенеза и пластичности жировой ткани // Успехи современной биологии. – 2021. – Т. 141. – №. 5. – С. 428-442. doi: 10.31857/S0042132421050082.
258. В.А. Ткачук. Основы молекулярной эндокринологии. Рецепция и внутриклеточная сигнализация: учебное пособие / В. А. Ткачук, А. В. Воротников, П. А. Тюрин-Кузьмин; под ред. В. А. Ткачука. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2017. — 240 с.: ил. ISBN 978-5-9704-4264-7.
259. Sysoeva V.Y., Ageeva L.V., Tyurin-Kuzmin P.A., Sharonov G.V., Dyikanov D.T., Kalinina N.I., Tkachuk V.A. Local angiotensin II promotes adipogenic differentiation of human adipose tissue mesenchymal stem cells through type 2 angiotensin receptor // Stem Cell Research. - 2017. - Т. 25. – С. 115-122. doi: 10.1016/j.scr.2017.10.022.
260. Marcoli M., Candiani S., Tonachini L., Monticone M., Mastrogiacomio M., Ottonello A., Cervetto C., Paluzzi P., Maura G., Pestarino M., Cancedda R., Castagnola P. In vitro modulation of gamma amino butyric acid (GABA) receptor expression by bone marrow stromal cells // Pharmacological Research. - 2008. – Т. 5. - №. (5). – С. 374-82. doi: 10.1016/j.phrs.2008.03.012.
261. Nemeth K., Wilson T., Rada B., Parmelee A., Mayer B., Buzas E., Falus A., Key S., Masszi T., Karpati S., Mezey E. Characterization and function of histamine receptors in human bone marrow stromal cells // Stem Cells. - 2012. – Т. 30. - №. 2. – С. 222-31. doi: 10.1002/stem.771.
262. Kotova P.D., Sysoeva V.Y., Rogachevskaja O.A., Bystrova M.F., Kolesnikova A.S., Tyurin-Kuzmin P.A., Fadeeva J.I., Tkachuk V.A., Kolesnikov S.S. Functional expression of adrenoreceptors in mesenchymal stromal cells derived from the human adipose tissue // Biochimica et Biophysica Acta. – 2014. – Т. 1843. - №. 9. – С. 1899-908. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.05.002.
263. Chechekhin V.I., Ivanova A.I., Kulebyakin K.Y., Antropova Y.G., Karagyaur M.N., Skryabina M.N., Chechekhina E.S., Basalova N.A., Grigorieva O.A., Sysoeva V.Y., Kalinina N.I., Tkachuk V.A., Tyurin-Kuzmin P.A. Peripheral 5-HT/HTR6 axis is responsible for obesity-associated hypertension // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research. – 2024. - Т. 1871. - №. 2. – С. 119651. Doi: 10.1016/j.bbamcr.2023.119651.
264. Tyurin-Kuzmin P., Dyikanov D., Fadeeva J., Sysoeva V., Kalinina N. Flow cytometry analysis of adrenoreceptors expression in human adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells // Sci Data. – 2018. - Т. 5. – С. 180196. doi: 10.1038/sdata.2018.196
265. Malagutti-Ferreira M.J., Crispim B.A., Barufatti A., Cardoso S.S., Guarnier L.P., Rodríguez F.F., Soares M.R., Antunes R.N.S., Ribeiro-Paes J.T. Genomic instability in long-term culture of human adipose-derived mesenchymal stromal cells // Brazilian Journal of Medical and Biological Research. – 2023. – Т. 56. – С. e12713. doi: 10.1590/1414-431X2023e12713.
266. Semina E.V., Rubina K.A., Sysoeva V.Y., Stepanova V., Tkachuk V. Three-dimensional model of biomatrix as a method of studying blood vessels and nerve growth in tissue engineering structures // Moscow University Chemistry Bulletin. – 2016. – Т. 71. – С. 172–177. doi: 10.3103/S0027131416030081
267. Klimovich P.S., Semina E.V. Mechanisms of Participation of the Urokinase Receptor in Directed Axonal Growth // Молекулярная биология. – 2020. – Т. 54. – С. 89–98. doi: 10.1134/S0026893320010094.
268. Smith P.R., Meyer A., Loerch S., Campbell Z.T. Protocol for the isolation and culture of mouse dorsal root ganglion neurons for imaging applications // STAR Protocols. – 2023. – Т. 4. - №. 4. – С. 102717. doi: 10.1016/j.xpro.2023.102717.



269. Karagyaour M., Primak A., Basalova N., Monakova A., Tolstoluzhinskaya A., Kulebyakina M., Chechekhina E., Skryabina M., Grigorieva O., Chechekhin V., Yakovleva T., Turilova V., Shagimardanova E., Gazizova G., Vigovskiy M., Kulebyakin K., Sysoeva V., Dyachkova U., Dzhauari S., Bozov K., Popov V., Akopyan Z., Efimenko A., Kalinina N., Tkachuk V. Safety and Regenerative Properties of Immortalized Human Mesenchymal Stromal Cell Secretome // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2025. – Т. 26. – №. 19. – С. 9322. doi: 10.3390/ijms26199322.
270. Дьячкова У.Д., Басалова Н.А., Виговский М.А., Ефименко А.Ю., Григорьева О.А. Создание клеточных моделей для оценки специфической активности биологических препаратов для лечения фибротических заболеваний // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. – 2025. – Т. 14. - №. 3. – С. 168-176. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-3-2095>
271. Basalova N., Sagaradze G., Arbatskiy M., Evtushenko E., Kulebyakin K., Grigorieva O., Akopyan Z., Kalinina N., Efimenko A. Secretome of Mesenchymal Stromal Cells Prevents Myofibroblasts Differentiation by Transferring Fibrosis-Associated microRNAs within Extracellular Vesicles // *Cells*. - 2020. – Т. 9. - №. 5. – С. 1272. doi: 10.3390/cells9051272.
272. Abdullah M., Pawitan J.A., Irawan C., Rahyussalim, Aditjaningsih D., Liem I.K., Sinto R., Susilo A, Yulianti M., Handayani R.R.D., Pratomo I.P., Burhan E., Damayanti T., Wibowo H., Dilogio I.H., Muliawan H.S., Elhidsi M. Effectiveness and safety profile of mesenchymal stem cell secretome as a treatment for severe cases of COVID-19: a randomized controlled trial // *F1000Research*. – 2022. – Т. 11. – С. 143. doi: 10.12688/f1000research.75580.2.
273. Sánchez Huerta V., Quiroz-Mercado H., Graue-Hernández E.O., Navas A., Alford S., Kharabi D., Pflugfelder S. Safety and Efficacy of a Mesenchymal Stem Cell Secretome Therapy (KPI-012) for Persistent Corneal Epithelial Defects: A Phase 1b Trial // *Current Therapeutic Research*. – 2025. - Т. 103. – С. 100799. doi: 10.1016/j.curtheres.2025.100799.
274. Morita Y., Izawa H., Ohga H., Sugie H., Yamamoto T., Hirano A., Nakamura M., Isozaki S., Seino K.-i., Yonei Y. Safety and clinical efficacy on intranasal administration of mesenchymal stem cell-derived secretome in patients with Alzheimer's disease and its future prospect // *Glycative Stress Research*. – 2024. – Т. 11. – С. 103-110. doi: 10.24659/gsr.11.3\_103.
275. Ghasemi M., Roshandel E., Mohammadian M., Farhadihosseinabadi B., Akbarzadehlaleh P., Shamsasenjan K. Mesenchymal stromal cell-derived secretome-based therapy for neurodegenerative diseases: overview of clinical trials // *Stem Cell Research & Therapy*. – 2023. – Т. 14. – № 1. – С. 122. doi: 10.1186/s13287-023-03264-0.
276. Borowicz S., Van Scoyk M., Avasarala S., Rathinam M.K.K., Tauler J., Bikkavilli R.K., Winn R.A. The soft agar colony formation assay // *Journal of Visualized Experiments*. – 2014. – № 92. – С. e51998. doi: 10.3791/51998.
277. Routledge M.N., Mirsky F.J., Wink D.A., Keefer L.K., Dipple A. Nitrite-induced mutations in a forward mutation assay: influence of nitrite concentration and pH // *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. – 1994. – Т. 322. - №. 4. – С. 341-6. doi: 10.1016/0165-1218(94)90110-4.
278. Hoffmann G.R. Genetic effects of dimethyl sulfate, diethyl sulfate, and related compounds // *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. - 1980. – Т. 75. - №. 1. – С. 63-129. doi: 10.1016/0165-1110(80)90028-7.
279. Altyar A.E., El-Sayed A., Abdeen A., Piscopo M., Mousa S.A., Najda A., Abdel-Daim M.M. Future regenerative medicine developments and their therapeutic applications // *Biomed Pharmacother*. 2023. – Т. 158. – С. 114131. doi: 10.1016/j.biopha.2022.114131.

280. Baranovskii D.S., Klabukov I.D., Arguchinskaya N.V., Yakimova A.O., Kisel A.A., Yatsenko E.M., Ivanov S.A., Shegay P.V., Kaprin A.D. Adverse events, side effects and complications in mesenchymal stromal cell-based therapies // *Stem Cell Investigation*. - 2022. - T. 9. - №. 7. doi: 10.21037/sci-2022-025.
281. Rubio D., Garcia-Castro J., Martín M.C., Fuente R., Cigudosa J.C., Lloyd A.C., Bernad A. Spontaneous Human Adult Stem Cell Transformation // *Cancer Res*. - 2005. - T. 65. - №. 8. - C. 3035–3039. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-4194
282. Bulcha J.T., Wang Y., Ma H., Tai P.V.L., Gao G. Viral vector platforms within the gene therapy landscape // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. - 2021. - T. 6. - №. 53. doi: 10.1038/s41392-021-00487-6
283. Lundstrom K. Viral Vectors in Gene Therapy: Where Do We Stand in 2023? // *Viruses*. - 2023. - T. 15. - №. 3. - C. 698. <https://doi.org/10.3390/v15030698>
284. Huang Z., Zhang Z., Moazzami Z., Heck R., Hu P., Nanda H., Ren K., Sun Z., Bartolomucci A., Gao Y., Chung D., Zhu W., Shen S., Ruan H.B. Brown adipose tissue involution associated with progressive restriction in progenitor competence // *Cell Reports*. - 2022. - T. 39. - №. 2. - C. 110575. doi: 10.1016/j.celrep.2022.110575.
285. Masnikov D., Stafeev I., Michurina S., Zubkova E., Mamontova E., Ratner E., Menshikov M., Parfyonova Y. hTERT-immortalized adipose-derived stem cell line ASC52Telo demonstrates limited potential for adipose biology research // *Analytical Biochemistry*. - 2021. - T. 628. - C. 114268. doi: 10.1016/j.ab.2021.114268.
286. Primak A., Kalinina N., Skryabina M., Usachev V., Chechekhin V., Vigovskiy M., Chechekhina E., Voloshin N., Kulebyakin K., Kulebyakina M., Grigorieva O., Tyurin-Kuzmin P., Basalova N., Efimenko A., Dzhauari S., Antropova Y., Plyushchii I., Akopyan Z., Sysoeva V., Tkachuk V., Karagyaur M. Novel Immortalized Human Multipotent Mesenchymal Stromal Cell Line for Studying Hormonal Signaling // *International Journal of Molecular Sciences*. - 2024. - T. 25. - №. 4. - C. 2421. doi: 10.3390/ijms25042421.
287. Mondello C., Chiesa M., Rebuzzini P., Zongaro S., Verri A., Colombo T., Giulotto E., D'Incalci M., Franceschi C., Nuzzo F. Karyotype instability and anchorage-independent growth in telomerase-immortalized fibroblasts from two centenarian individuals // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. - 2003. - T. 308. - №. 4. - C. 914-21. doi: 10.1016/s0006-291x(03)01484-0. PMID
288. Skårn M., Noordhuis P., Wang M-Y., et al. Generation and Characterization of an Immortalized Human Mesenchymal Stromal Cell Line // *Stem Cells and Development*. - 2014. - T. 23. - №. 19. - C. 2377-2389. doi:10.1089/scd.2013.0599
289. Huang G., Zheng Q., Sun J., Guo C., Yang J., Chen R., Xu Y., Wang G., Shen D., Pan Z., Jin J., Wang J. Stabilization of cellular properties and differentiation mutilpotential of human mesenchymal stem cells transduced with hTERT gene in a long-term culture // *Journal of Cellular Biochemistry*. - 2008. - T. 103. - C. 1256-1269. doi: 10.1002/jcb.21502
290. Beckenkamp L.R., da Fontoura D.M.S., Korb V.G. et al. Immortalization of Mesenchymal Stromal Cells by TERT Affects Adenosine Metabolism and Impairs their Immunosuppressive Capacity // *Stem Cell Reviews and Reports*. - 2020. - T. 16. - C. 776–791. doi: 10.1007/s12015-020-09986-5
291. Iacomì D.-M., Rosca A.-M., Tutuianu R., Neagu T.P., Pruna V., Simionescu M., Titorencu I. Generation of an Immortalized Human Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cell Line Suitable for Wound Healing Therapy // *International Journal of Molecular Sciences*. - 2022. - T. 23. - №. 16. - C. 8925. doi: 10.3390/ijms23168925

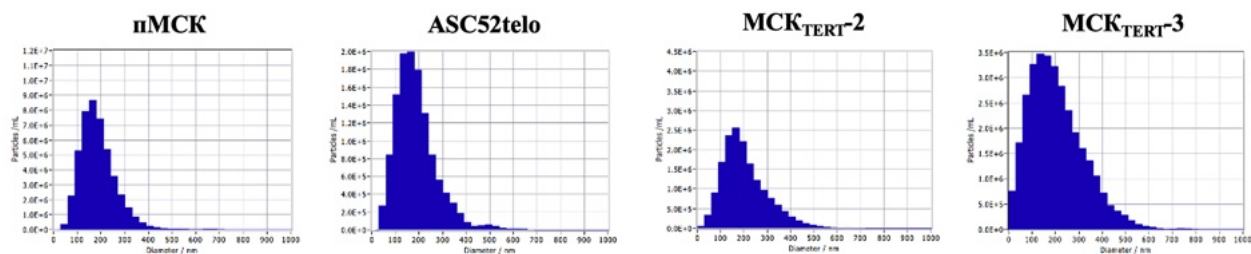
292. Jun E.S., Lee T.H., Cho H.H., Suh S.Y., Jung J.S. Expression of telomerase extends longevity and enhances differentiation in human adipose tissue-derived stromal cells // *Cell Physiology and Biochemistry*. – 2004. – T. 14. – № 4-6. – C. 261–268. doi: 10.1159/000080335
293. Milyavsky M., Shats I., Erez N., Tang X., Senderovich S., Meerson A., Tabach Y., Goldfinger N., Ginsberg D., Harris C.C., Rotter V. Prolonged culture of telomerase-immortalized human fibroblasts leads to a premalignant phenotype // *Cancer Research*. - 2003. – T. 63. - №. 21. – C. 7147-57.
294. Christensen R., Alsner J., Brandt Sorensen F., Dagnaes-Hansen F., Kolvraa S., Serakinci N. Transformation of human mesenchymal stem cells in radiation carcinogenesis: long-term effect of ionizing radiation // *Regenerative Medicine*. – 2008. – T. 3. - №. 6. – C. 849-861. doi: 10.2217/17460751.3.6.849.
295. Serakinci N., Christensen R., Graakjaer J., Cairney C.J., Keith W.N., Alsner J., Saretzki G., Kolvraa S. Ectopically hTERT expressing adult human mesenchymal stem cells are less radiosensitive than their telomerase negative counterpart // *Experimental Cell Research*. - 2007. – T. 313. - №. 5. – C. 1056-67. doi: 10.1016/j.yexcr.2007.01.002.
296. Vizoso F.J., Eiro N., Cid S., Schneider J., Perez-Fernandez R. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2017. – T. 18. - №. 9. – C. 1852. doi: 10.3390/ijms18091852
297. Hopkins A.L. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery // *Nature Chemical Biology*. – 2008. – T. 4. - №. 11. – C. 682-90. doi: 10.1038/nchembio.118.
298. Fan H., Qiao Z., Li J., Shang G., Shang C., Chen S., Leng Z., Su H., Kou H., Liu H. Recent advances in senescence-associated secretory phenotype and osteoporosis // *Heliyon*. – 2024. – T. 10. - №. 4. – C. e25538. doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e25538.
299. Turner M.D., Nedjai B., Hurst T., Pennington D.J. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. – 2014. - T. 1843. - №. 11. - C. 2563-2582. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.05.014.
300. Zhang J.M., An J. Cytokines, inflammation, and pain // *International Anesthesiology Clinics*. – 2007. – T. 45. - №. 2. – C. 27-37. doi: 10.1097/AIA.0b013e318034194e.
301. Liu C., Chu D., Kalantar-Zadeh K., George J., Young H. A., Liu G. Cytokines: From Clinical Significance to Quantification // *Advanced Science*. – 2021. – T. 8. - C. 2004433. doi: 10.1002/advs.202004433
302. Dyachkova U., Vigovskiy M., Basalova N., Efimenko A., Grigorieva O. M2-Macrophage-Induced Chronic Inflammation Promotes Reversible Mesenchymal Stromal Cell Senescence and Reduces Their Anti-Fibrotic Properties // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – T. 24. - №. 23. – C. 17089. doi: 10.3390/ijms242317089
303. Siraj Y., Galderisi U., Alessio N. Senescence induces fundamental changes in the secretome of mesenchymal stromal cells (MSCs): implications for the therapeutic use of MSCs and their derivatives // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2023. – T. 11. – C. 1148761. doi: 10.3389/fbioe.2023.1148761
304. Samsonraj R.M., Law S.F., Chandra A., Pignolo R.J. An unbiased proteomics approach to identify the senescence-associated secretory phenotype of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells // *Bone Reports*. - 2023. – T. 18. – C. 101674. doi: 10.1016/j.bonr.2023.101674.
305. Weng Z., Wang Y., Ouchi T., Liu H., Qiao X., Wu C., Zhao Z., Li L., Li B. Mesenchymal Stem/Stromal Cell Senescence: Hallmarks, Mechanisms, and Combating Strategies // *Stem Cells Translational Medicine*. - 2022. – T. 11. - №. 4. – C. 356-371. doi: 10.1093/stcltm/szac004.

306. Vaughan D.E., Rai R., Khan S.S., Eren M., Ghosh A.K. Plasminogen Activator Inhibitor-1 Is a Marker and a Mediator of Senescence // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. – 2017. - T. 37. - №. 8. – C. 1446-1452. doi: 10.1161/ATVBAHA.117.309451.
307. Loskutoff D.J., Quigley J.P. PAI-1, fibrosis, and the elusive provisional fibrin matrix // *Journal of Clinical Investigation*. – 2000. – T. 106. - №. 12. – C. 1441-3. doi: 10.1172/JCI11765.
308. Kolotov K.A., Rasputin P.G. Monocyte chemotactic protein-1 in physiology and medicine // *Perm Medical Journal*. - 2018. -T. XXXV. - №. 3. – C. 99-105. doi: 10.17816/pmj35399105
309. Gupta K.K., Xu Z., Castellino F.J., Ploplis V.A. Plasminogen activator inhibitor-1 stimulates macrophage activation through Toll-like Receptor-4 // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. - 2016. - T. 477. - №. 3. - C. 503-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.06.065.
310. Silbernagel G., Machann J., Häring H.U., Fritsche A., Peter A. Plasminogen activator inhibitor-1, monocyte chemoattractant protein-1, e-selectin and C-reactive protein levels in response to 4-week very-high-fructose or -glucose diets // *European Journal of Clinical Nutrition*. – 2014. – T. 68. - №. 1. – C. 97-100. doi: 10.1038/ejcn.2013.228.
311. Jeon H., Kim, JH., Kim JH. et al. Plasminogen activator inhibitor type 1 regulates microglial motility and phagocytic activity // *Journal of Neuroinflammation*. – 2012. - T. 9. - №. 149. doi: 10.1186/1742-2094-9-149
312. Sartipy P., Loskutoff D.J. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2003. – T. 100. - №. 12. – C. 7265-70. doi: 10.1073/pnas.1133870100.
313. Hindle J., Williams A., Kim Y., Kim D., Patil K., Khatkar P., Osgood Q., Nelson C., Routenberg D.A., Howard M., Liotta L.A., Kashanchi F., Branscome H. hTERT-Immortalized Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles: Large-Scale Manufacturing, Cargo Profiling, and Functional Effects in Retinal Epithelial Cells // *Cells*. – 2024. – T. 13. - №. 10. – C. 861. doi: 10.3390/cells13100861
314. Brancolini A., Bobbili M.R., Pultar M., Mazidi Z., Wieser M., Gamauf J., Roefs M.T., Corso G., Nivarthi H., Paredes M.B.A., Bettelheim D., Arcalis E., Dmitry S., Jacak J., Gerner I., Bileck A., Gerner C., Hackl M., Grillari J., Grillari-Voglauer R. Immortalization of mesenchymal stromal cells by hTERT does not affect the functional properties of secreted extracellular vesicles // *Journal of Biotechnology*. – 2026. - T. 414. - C. 124-145. doi: 10.1016/j.jbiotec.2026.03.010.
315. Park C.-Y., Choi S.-C., Kim J.-H., Choi J.-H., Joo H.J., Hong S.J., Lim D.-S. Cardiac Stem Cell Secretome Protects Cardiomyocytes from Hypoxic Injury Partly via Monocyte Chemotactic Protein-1-Dependent Mechanism // *International Journal of Molecular Sciences*. - 2016. – T. 17. - №. 6. – C. 800. doi: 10.3390/ijms17060800
316. Silva Couto P., Stibbs D.J., Carrillo Sanchez B., Khalife R., Panagopoulou T.I., Barnes B., George V., Taghizadeh R.R., Rafiq Q.A. Generating suspension-adapted human mesenchymal stromal cells (S-hMSCs) for the scalable manufacture of extracellular vesicles // *Cytherapy*. – 2024. – T. 26. – №. 12. – C. 1532–1546. doi: 10.1016/j.jcyt.2024.06.011

## ПРИЛОЖЕНИЯ

### Приложение 1. Анализ траекторий наночастиц (NTA) внеклеточных везикул культур *nMCK* и *MCK<sub>TERT</sub>*.

Значимых различий в размере и концентрации везикул не обнаружено.



|                                       | nMCK                                        | ASC52telo                                   | MCK <sub>TERT</sub> -2                      | MCK <sub>TERT</sub> -3                      |
|---------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|
| Размер на пике, нм (ср±ст.откл.)      | 167,02 ± 7,06                               | 157,43 ± 16,58                              | 163,06 ± 4,29                               | 158,15 ± 12,69                              |
| Концентрация, частиц/мл (ср±ст.откл.) | 4,78*10 <sup>8</sup> ± 1,46*10 <sup>8</sup> | 3,94*10 <sup>8</sup> ± 2,11*10 <sup>8</sup> | 2,57*10 <sup>8</sup> ± 1,27*10 <sup>8</sup> | 3,38*10 <sup>8</sup> ± 5,56*10 <sup>7</sup> |