

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В.ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Примак Александра Леонидовна

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

Специальность 1.1.10. Биомеханика и биоинженерия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2026

Диссертация подготовлена на кафедре биохимии и регенеративной биомедицины факультета фундаментальной медицины Медицинского научно-образовательного института Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Научный руководитель: **Карагяур Максим Николаевич**
доктор биологических наук

Официальные оппоненты: **Зоров Дмитрий Борисович**
доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент Российской академии наук, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского, отдел функциональной биохимии биополимеров, заведующий отделом

Андреева Елена Ромуальдовна
доктор биологических наук, доцент, Институт медико-биологических проблем Российской академии наук, лаборатория клеточной физиологии, ведущий научный сотрудник

Меньшиков Михаил Юрьевич
доктор биологических наук, Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Институт экспериментальной кардиологии им. ак. В.Н. Смирнова, лаборатория ангиогенеза, ведущий научный сотрудник

Защита диссертации состоится 24 июня 2026 г. в 17:30 на заседании диссертационного совета МГУ.015.10 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 73, Факультет биоинженерии и биоинформатики, ауд. 221.

E-mail: dissovet@belozersky.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций Научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Москва, Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3966>

Автореферат разослан «__» мая 2026 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор химических наук



Д.В. Чистяков

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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. 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. 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. 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 искомых культур МСК является описанный ранее метод иммортализации, предполагающий сверхэкспрессию гена каталитической субъединицы теломеразы *hTERT* с помощью методов генной инженерии. 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 иммортализованные 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 иммортализации 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 (ЖТ-МСК), сверхэкспрессирующих *hTERT*, но не их свойств и характеристик в комплексе. Отсутствие системных исследований свойств культур МСК, иммортализованных 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.), секретом МСК как основа бесклеточной терапии – с работ Гнеччи 2005 г., наиболее активно – в последние 10 лет. Иммортализованные линии известны с 1950-х гг. с момента получения линии HeLa. Существуют коммерческие иммортализованные линии ЖТ-МСК: 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. Линия A41hWAT-SVF практически не охарактеризована. Согласно общедоступным опубликованным данным, отсутствуют клеточные линии ЖТ-МСК, удовлетворяющие всем необходимым свойствам релевантного модельного объекта для первичных клеточных культур. Существующие данные о влиянии сверхэкспрессии гена каталитической субъединицы теломеразы *hTERT*, полученной методами геной инженерии, на свойства получаемых культур являются противоречивыми. Влияние сверхэкспрессии *hTERT* на гормональную чувствительность культур МСК и на свойства их секретома не изучено.

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_{TERT}) 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 (β -галактозидаза).
2. Охарактеризовать свойства полученных культур МСК_{TERT} 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 секретома полученных культур МСК_{TERT} (для решения прикладных задач регенеративной биомедицины): состав (на примере основных нейротрофических и проангиогенных факторов (BDNF, HGF, VEGF-A, uPA), провоспалительных (IL-1 α , IL-6, TNF- α) и противовоспалительных факторов (IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β 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 ЖТ-МСК и их секретома. Так, впервые исследован состав секретома МСК_{TERT} на примере основных нейротрофических и проангиогенных факторов (BDNF, HGF, VEGF-A, uPA), провоспалительных (IL-1 α , IL-6, TNF- α) и противовоспалительных факторов (IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β 1, IDO), основных компонентов SASP (IL-6, MCP-1, PAI-1), внеклеточных везикул, исследована функциональная активность в моделях нейритогенеза и фиброза и трансформирующие свойства.

На примере созданной культуры МСК_{ТЕРТ} впервые показано, что методом сверхэкспрессии *hTERT* можно получить культуры ЖТ-МСК человека, одновременно сохраняющие 1) стандартные свойства МСК, определенные Международным обществом клеточной терапии (ISCT), 2) функциональную активность (чувствительность к гормональным стимулам, биологическую активность секрета в моделях нейритогенеза и фиброза), 3) свойства, свидетельствующие о безопасности клеточной культуры и получаемых на ее основе продуктов (стабильный кариотип, отсутствие в секрете компонентов теломеразы, отсутствие трансформирующей активности секрета), 4) состав секрета. Показано, что культуры МСК_{ТЕРТ} сохраняют эти свойства и при культивировании (по меньшей мере, до 30–40 пассажей).

На примере полученных культур МСК_{ТЕРТ} 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 результаты дополняют накопленные данные о влиянии сверхэкспрессии *hTERT* на 1) чувствительность ЖТ-МСК человека к широкому спектру гормональных стимулов, состав и свойства секрета (в т.ч. при культивировании) (не изучено ранее), 2) иммунофенотип, дифференцировочный потенциал, кариотип (по этим вопросам в литературе обнаружены противоречивые данные).

Впервые предложена идея и экспериментально обоснована возможность применения метода сверхэкспрессии *hTERT* для стабилизации свойств клеток-продуцентов с целью получения клеточного стабильного по составу секрета в объеме, достаточном для широкомасштабного клинического применения. Созданная культура МСК_{ТЕРТ} может быть использована как клеточная модель и как продуцент секрета вплоть до 40х и 30х пассажей соответственно.

Применение таких культур позволит значительно расширить области применения регенеративных технологий. Полученные культуры МСК_{ТЕРТ} были использованы как клеточная платформа для улучшения фармакологических свойств секрета МСК и усиления его нейропротекторной активности в модели внутримозгового кровоизлияния у крыс. Предложенный подход 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.

Методология и методы 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 секретома МСК_{TERT} использовали две клеточные модели – нейритогенеза и TGF- β 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 (β -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 (2024 г.), Стипендией Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова (2022 г., 2023 г., 2025 г.), за статьи, опубликованные соискателем (в соавторстве) по теме диссертации, был присвоен статус «победитель» в Конкурсе работ 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, 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, разработал практические рекомендации,

участвовал в подготовке публикаций и представлял доклады на конференциях по теме исследования.

В работе M. Karagyaur et al. 2025 автором проведен анализ параметров секретома МСК_{ТЕРТ} - состава, биологической активности (модель нейритогенеза), трансформирующей активности. В А. Primak et al. 2025 автором предложена концепция, проведен анализ литературы и написан текст. В S. Dzhauari et al. 2025 автором получены и охарактеризованы МСК_{ТЕРТ} и получен секретом. В А. Primak et al. 2024 автором были получены и охарактеризованы линии МСК_{ТЕРТ} и написан текст. В А.Л. Примак и др. 2024, А. Primak et al. 2024, N. Basalova et al. 2023 и M. Karagyaur et al. 2022 автором проведен анализ литературы и написана часть текста. В S. Dzhauari et al. 2023 автором охарактеризованы МСК и получен секретом для исследования.

Публикации по теме работы

По материалам диссертации опубликовано 9 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных к защите в диссертационном совете МГУ по специальности и отрасли наук.

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 биоколлекций 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.), всероссийская конференция «Биохимия человека 2024» (2024 г.), международная конференция «TERMIS-AP 2023» (2023 г.).

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, четырех основных глав («Обзор литературы», «Материалы и метод», «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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Объектом исследования являлись клеточные культуры ЖТ-МСК человека, сверхэкспрессирующие *hTERT*, полученные трансдукцией лентивирусной системой III поколения. У них оценивали уровень экспрессии *hTERT* методом ПЦР-РВ, наличие белковой субъединицы теломеразы методом иммуноблоттинга, активность теломеразы с помощью Telomerase Activity Quantification qPCR Assay Kit, длину теломер с помощью Relative Human Telomere Length Quantification qPCR Assay Kit, пролиферативный потенциал фотофиксацией, клеточное старение - по гистохимическому окрашиванию на активность β -галактозидазы, дифференцировочный потенциал - цитохимическим окрашиванием и определением уровня экспрессии основных маркеров методом ПЦР-РВ, иммунофенотип - с помощью MSC Phenotyping Cocktail Kit, anti-human, REAfinity и клеточного сортера BD FACSAria III; гормональную чувствительность - по увеличению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} (окрашиванием Fluo-8 и флуоресцентной микроскопией), к инсулину - по инсулин-зависимой активации каскадов Ras/Erk и PI3K/Akt иммуноблоттингом. Для кариотипирования препараты метафазных хромосом дифференциально окрашивали на G-диски и проводили световую микроскопию. Секретом МСК получали на 7 сутки культивирования в бессывороточной культуральной среде. Состав секрета изучали с помощью протеомного анализа методом хромато-масс-спектрометрии, иммуноферментного анализа; уровень экспрессии провоспалительных и противовоспалительных факторов - ПЦР-РВ. Биологическую активность секрета подтверждали с помощью *in vitro* моделей нейритогенеза и фиброза; трансформирующую активность - с помощью soft agar colony formation assay, транскриптомного анализа, ПЦР-РВ и иммуноблоттинга.

Результаты и обсуждение

1. Получение культур иммортализованных МСК жировой ткани

Трансдукцией лентивирусным вектором pVLT-EF1a-hTERT-puro, содержащим кДНК *hTERT*, были получены 3 культуры иммортализованных МСК (МСК_{TERT}) из первичных МСК подкожного жира здоровых доноров. Трансдукция привела к увеличению содержания мРНК *hTERT*, теломеразной активности и удлинению теломер (свойства не утрачивались при пассировании (рис. 1)), пролонгированию периода пролиферативной активности (время удвоения достоверно увеличивалось только к 37-40 пассажу, у пМСК – к 11 (рис. 2)), отсрочиванию процесса клеточного старения (на 37-42 пассаже доля клеток, имеющих активную β -галактозидазу, была значительно ниже, чем даже для

пМСК 5 пассажа (рис. 3)). Таким образом, МСК_{ТЕРТ} не являлись иммортализованными в строгом смысле, но важно, что в отличие от ASC252telo обладали контактным торможением, что подтверждает сохранность контроля за клеточным циклом и косвенно свидетельствует об отсутствии трансформированного фенотипа.

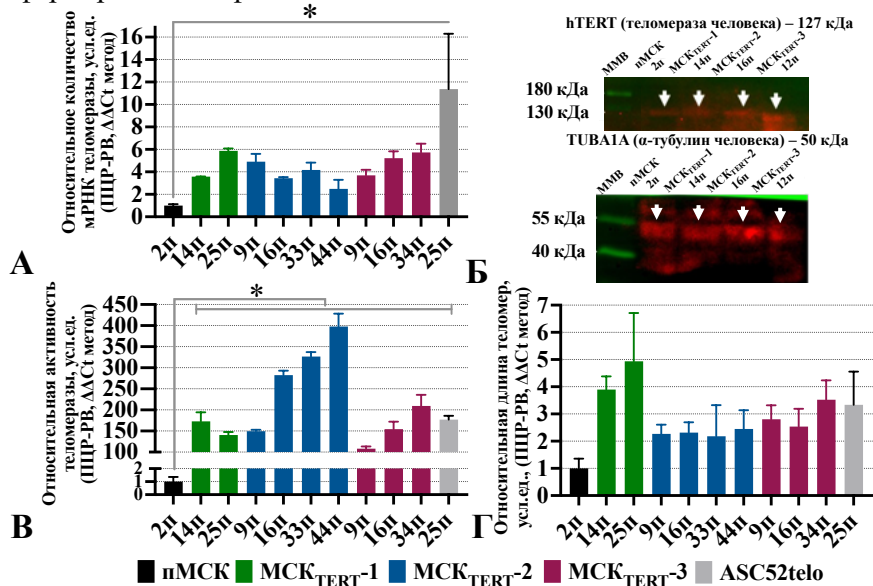


Рисунок 1. Получение культур МСК_{ТЕРТ}. **А.** Оценка уровня экспрессии hTERT методом ПЦР-РВ. **Б.** Оценка содержания белка теломеразы (127 кДа) иммуноблоттингом клеточных лизатов. **В.** Оценка активности теломеразы методом ПЦР-РВ. **Г.** Оценка относительной длины теломер методом ПЦР-РВ. n=3, * - p<0,05 (по сравнению с контрольной группой пМСК) (one-way ANOVA, метод Холма-Шидака). 14п – 14 пассаж и т.д., ММВ - маркер молекулярного веса.

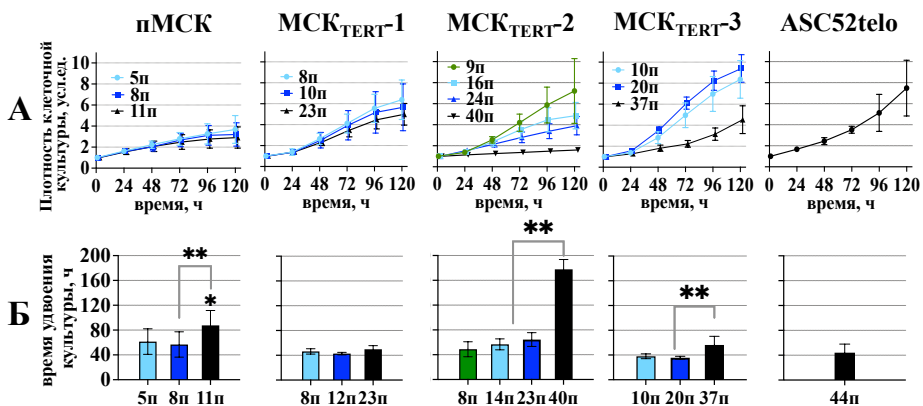


Рисунок 2. Проллиферативная активность культур пМСК, MCK_{TERT}, ASC52telo. А. Кривые роста. Б. Время удвоения клеточной культуры. * - $p < 0,05$, $n \geq 4$ (one-way ANOVA, тест Даннета), ** - $p < 0,05$, $n \geq 4$ (one-way ANOVA, метод Холма-Шидака).

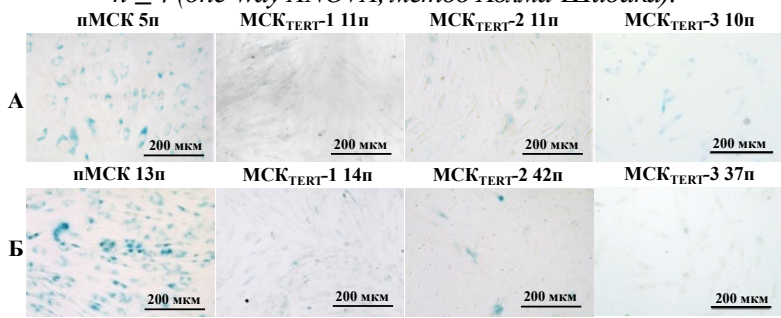


Рисунок 3. Клеточное старение нетрансдуцированных (пМСК) и трансдуцированных последовательно кДНК hTERT культур MCK_{TERT}. А – ранний пассаж, Б – поздний пассаж. Гистохимическое окрашивание на β-галактозидазу, ассоциированную со старением.

2. Исследование свойств полученных клеточных культур MCK_{TERT} как модельных объектов для фундаментальных исследований регенеративной биомедицины

MCK_{TERT} удовлетворяли критериям модельного объекта - критериям ISCT. Все культуры MCK_{TERT} имели фибробластоподобную форму. В отличие от ASC52telo, не дифференцирующейся в адипогенном направлении и не подходящей для исследований функционирования и регенерации жировой ткани, MCK_{TERT-2} и MCK_{TERT-3} дифференцировались в адипо-, остео- и хондрогенном направлениях (MCK_{TERT-3} хуже, чем пМСК) (рис. 4). MCK_{TERT} сохраняли MCK-специфичный иммунофенотип (до 40х пассажей): >90% клеток экспрессировали CD73, CD90, CD105, <5% - CD14, CD20, CD34, CD4.

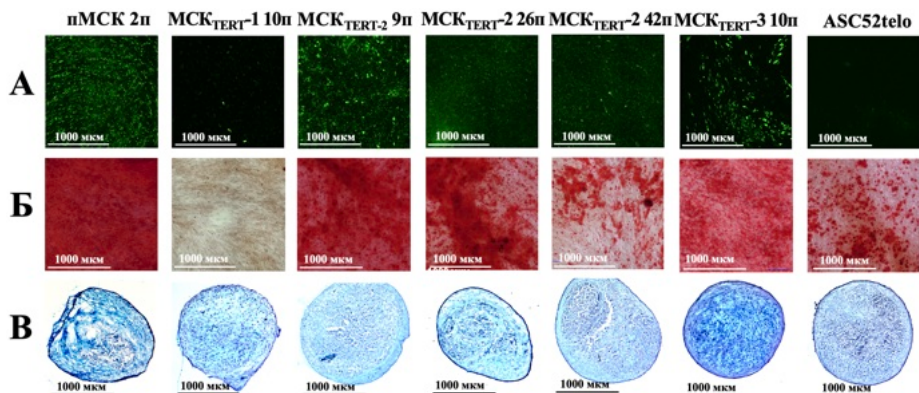


Рисунок 4. Дифференцировочный потенциал культур пМСК, МСК_{TERT} и линии ASC52telo. *А* - адипогенная дифференцировка (нильский красный), *Б* - остеогенная дифференцировка (ализариновый красный), *В* - хондрогенная дифференцировка (альциановый синий).

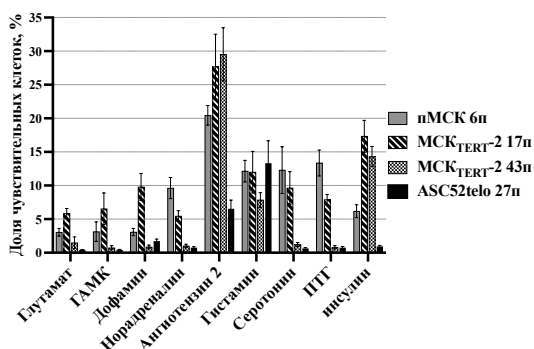


Рисунок 5. Чувствительность к гормонам культур пМСК, МСК_{TERT}-2, ASC52telo. Оценка доли клеток, отвечающих активацией кальциевой сигнализации..

МСК_{TERT} также сохранили важный показатель функциональной активности - гормональную чувствительность к глутамату (10^{-6} М), ГАМК (10^{-6} М), дофамину ($5 \cdot 10^{-5}$ М), норадреналину (10^{-6} М), ангиотензину II ($5 \cdot 10^{-9}$ М), гистамину (10^{-6} М), серотонину (10^{-5} М), ПТГ (10^{-8} М), инсулину (10^{-7} М) (рис. 5), хотя к глутамату, ГАМК, дофамину, инсулину, норадреналину, серотонину, ПТГ она снизилась в 5-10 раз к 43 пассажу. Напротив, ASC52telo оказалась нечувствительна к ГАМК, глутамату и серотонину, и имела значительно сниженную чувствительность к норадреналину, ангиотензину, ПТГ и инсулину по сравнению с пМСК и МСК_{TERT} (рис. 5).

Важно, что трансдукция лентивирусными частицами, несущими последовательность кДНК *hTERT*, и последующая сверхэкспрессия теломеразы не изменили кариотип исходной клеточной культуры (рис. 6 А), и он оставался стабильным при пассировании (рис. 6 Б).

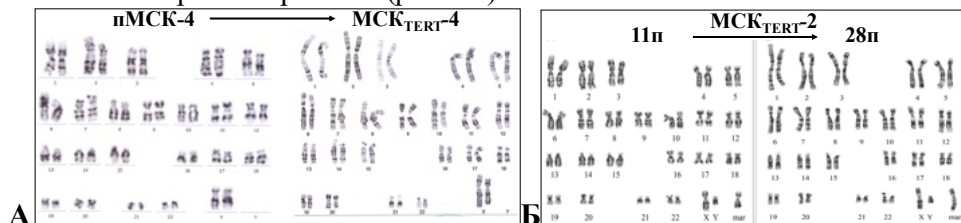


Рисунок 6. Стабильность кариотипа культур MCK_{TERT}. А. После лентивирусной трансдукции. Б. При культивировании.

3. Исследование свойств секретома полученных культур MCK_{TERT}

3.1. Состав секретома культур MCK_{TERT}

По данным протеомного анализа состав секретомов pMCK и MCK_{TERT} совпал на 94,5%. В нем присутствовало большинство факторов, важных для репарации и регенерации: нейротрофические (BDNF, GDNF), проангиогенные (VEGF-A, PDGF, uPA, uPAR), противовоспалительные (TGF-β), факторы роста; не были обнаружены некоторые известные факторы, такие как провоспалительные цитокины (IL-1A, IL-8, IL-12, TNFα, G-CSF, M-CSF) и противовоспалительные молекулы (IDO, IL-4, IL-10 и IL-13); не был обнаружен и белок теломеразы. По данным иммуноферментного анализа содержание в секретоме MCK_{TERT} и pMCK ключевых нейротрофических и проангиогенных факторов (BDNF, HGF, VEGF-A, uPA) значимо не отличалось (рис. 7 А). Важно, что их количество значимым образом не изменялось при культивировании (изучено до 43 пассажа) ($n=3$; *one-way ANOVA*) (рис. 7 Б).

Важно, что в секретоме MCK_{TERT} содержание компонентов SASP (IL-6 и PAI-1) было значимо ниже, чем в секретоме pMCK (рис. 8 А); это сохранялось и при пассировании (рис. 8 Б).

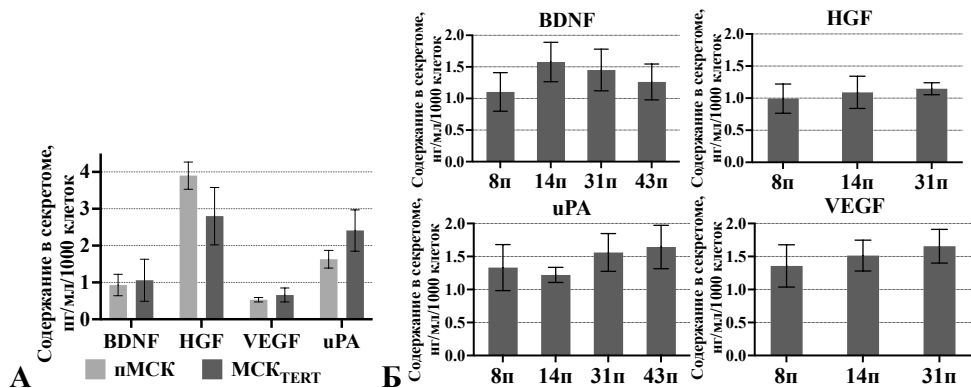


Рисунок 7. Содержание основных факторов нейрогенеза и ангиогенеза в секрете MCK_{TERT}. А. После лентивирусной трансдукции. Б. При культивировании.

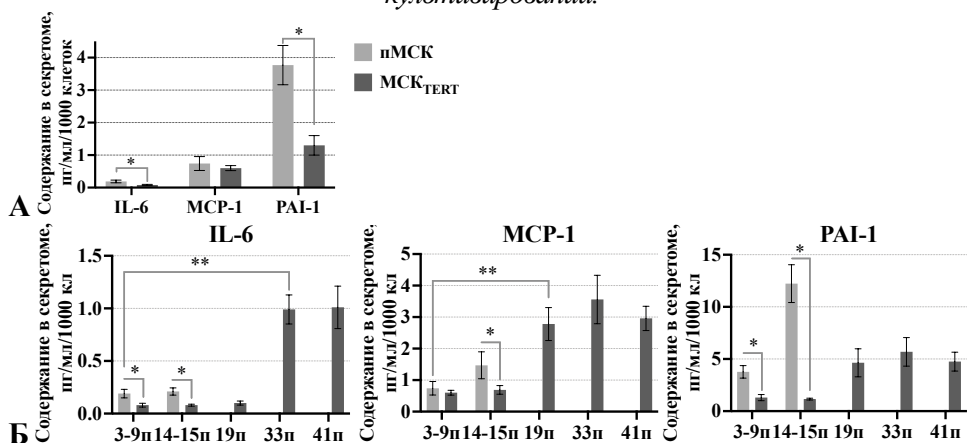


Рисунок 8. Содержание основных компонентов SASP в секрете MCK_{TERT}. А. После лентивирусной трансдукции. Б. При культивировании.

* - $p < 0,05$, $n \geq 3$ (непарный U-критерий Манна-Уитни, метод Холма-Шидака);

** - $p < 0,05$, $n \geq 3$ (непарный U-критерий Манна-Уитни).

3.2. Биологическая активность секрета культуры MCK_{TERT}

Для обоснования возможности использования в регенеративной биомедицине секрета MCK_{TERT}, продемонстрировали сохранность его биологической активности в двух *in vitro* моделях: нейрогенеза сенсорных дорсальных ганглиев мыши и фиброза. Секретом MCK_{TERT}, как и пMCK, стимулировал образование нейритов (рис. 9) и снижал содержание α -SMA и количество стресс-фибрил, в которые встроился α -SMA, в дифференцировавшихся в миофибробласты фибробластов (эффект сохранялся при пассировании) (рис. 10).

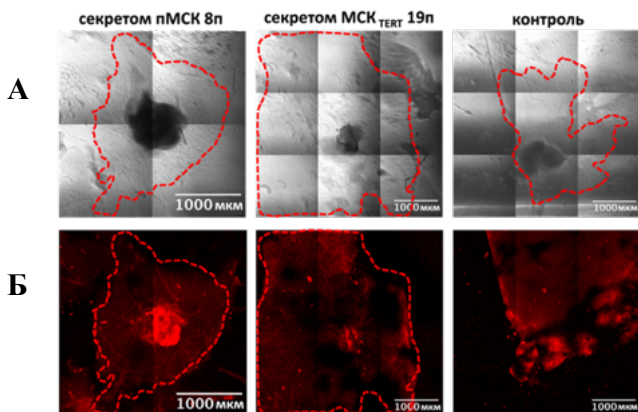


Рисунок 9. Микрофотографии сенсорных дорсальных ганглиев мышцы, культивируемых в Матригле в среде DMEM, содержащей секретом pMCK или MCK_{TERT}, на 20 сутки культивирования. *А.* В проходящем свете. *Б.* В флуоресцентном канале (окрашивание антителами к белку нейрофиламентов NF200 (группы pMCK и MCK_{TERT}) либо мышинными неспецифическими IgG1 (группа контроля).

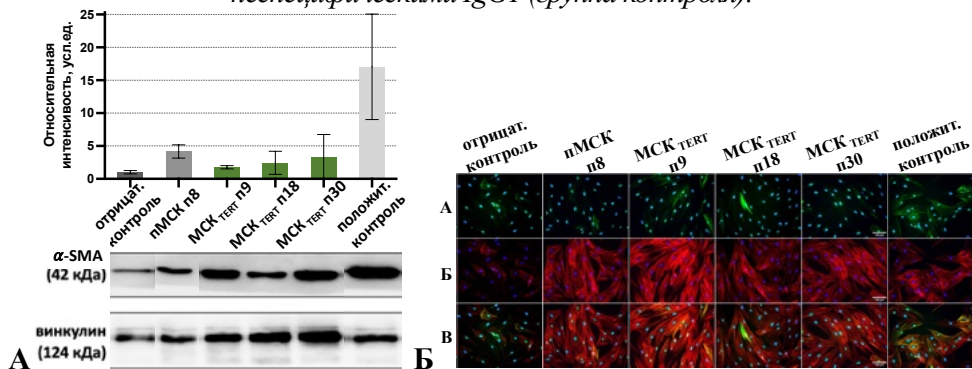


Рисунок 10. Антифибротические свойства секретома MCK_{TERT}. *А.* Иммуноблоттинг клеточных лизатов, окрашенных антителами к α-SMA, сигнал нормирован на сигнал винкулина. *Б.* Флуоресцентная микроскопия иммуноцитохимического окрашивания культур фибробластов, дифференцирующихся в миофибробласты: 1 - экспрессия α-SMA, 2 - экспрессия тотального актина (окрашивание фаллоидином), 3 – наложение каналов α-SMA и тотального актина. Отрицательный контроль – культивирование в среде без индуктора TGF-β1, экспериментальные группы (pMCK, MCK_{TERT}) – в среде с 5 нг/мл TGF-β1 и везикулярной фракции секретома, положительный контроль – в среде с 5 нг/мл TGF-β1.

3.3. Безопасность: трансформирующий потенциал секретома культуры МСК_{TERT}

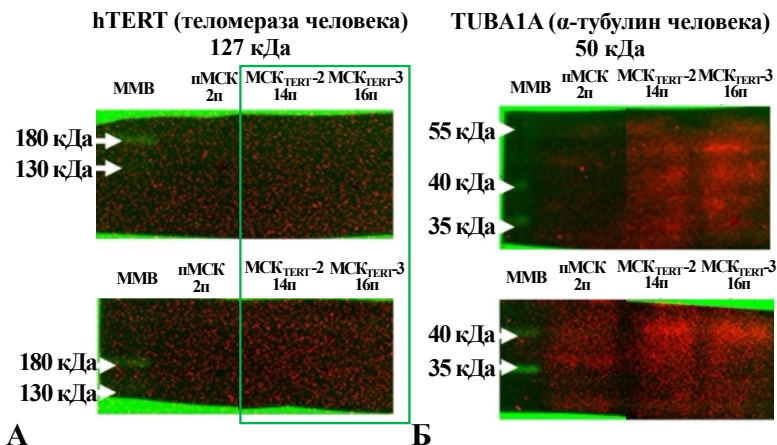


Рисунок 11. Отсутствие трансформирующей активности секретома МСК_{TERT}. Иммуноблоттинг стократно сконцентрированного секретома pMCK и MCK_{TERT}. **А.** содержание каталитической субъединицы теломеразы (окрашивание антителами к теломеразе человека). **Б.** Содержание α -тубулина (окрашивание антителами к TUBA1A для демонстрации чувствительности процедуры иммуноблоттинга). Верхняя и нижняя панель - результаты двух независимых экспериментов. MMB – маркер молекулярного веса.

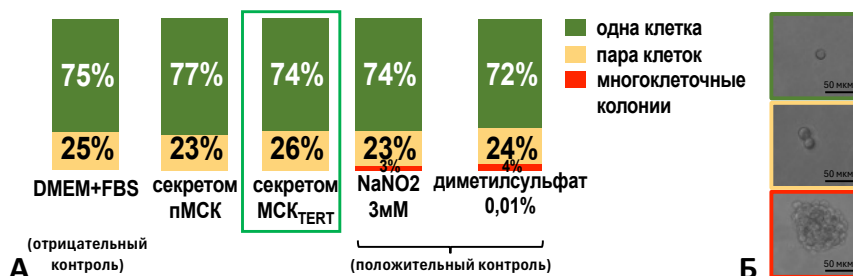


Рисунок 12. Отсутствие трансформирующей активности секретома МСК_{TERT} (soft agar colony formation assay). **А.** Процентное соотношение числа одиночных клеток, пары клеток, клеточных колоний фибробластов при культивировании в среде, содержащей FBS (отрицательный контроль), секретом pMCK или MCK_{TERT}, NaNO₂ или диметилсульфат (положительный контроль). **Б.** Репрезентативные микрофотографии в проходящем свете одиночной клетки, пары клеток, клеточной колонии.

Для обоснования возможности использования в регенеративной биомедицине секрета МСК_{TERT}, продемонстрировали отсутствие его трансформирующей активности. Так, у фибробластов дермы человека, культивируемых в присутствии секрета МСК_{TERT}, было детектировано изменение экспрессии лишь 0,3% генов, и важно, что уровень экспрессии основных протоонкогенов и генов-супрессоров опухолевого роста не изменился (рис. не показан). В стократно сконцентрированном секрете МСК_{TERT} также не детектировались компоненты теломеразы (рис. 11). Культивируемые в мягком агаре в присутствии секрета МСК_{TERT} первичные фибробласты дермы человека не образовывали колонии (рис. 12).

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 плейотропным 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 каталитической субъединицы теломеразы *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_{TERT} 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, ППП, серотонину; биологическая активность секретома МСК_{TERT} в моделях нейритогенеза и фиброза *in vitro*), 3) свойства, свидетельствующие о безопасности клеточной культуры и получаемых на ее основе продуктов (стабильный кариотип, отсутствие в секретома МСК_{TERT} компонентов теломеразы, отсутствие трансформирующей активности секретома МСК_{TERT}), 4) качественный и количественный состав секретома. Показано, что культуры МСК_{TERT} сохраняют эти свойства 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_{TERT} 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 секретома 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_{TERT} может быть использована как клеточная модель и как продуцент секретома (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 секретома, 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.

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_{TERT}, 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_{TERT} 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 секретома культур МСК жировой ткани, сверхэкспрессирующих каталитическую субъединицу теломеразы, идентичен на 94,5% составу секретома пМСК, стабилен при культивировании, имеет сохранныю биологическую активность в *in vitro* моделях нейритогенеза и фиброза, не обладает трансформирующей активностью. Полученные культуры МСК_{TERT} могут быть использованы в качестве клеток-продуцентов секретома для стимуляции регенеративных процессов в медицине.
4. Полученные результаты свидетельствуют в пользу применимости технологии сверхэкспрессии методами генной инженерии 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 ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности отрасли наук

1. Karagaur 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., Syssoeva 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. - Vol. 26, № 19. – P. 9322. - EDN: ROMNFP. Импакт-фактор 4,9 (JIF). (3,1185/1,492)¹.

2. **Primak A.**, Shkarina L., Illarionova M., Plyushchii I., Zakharova A., Tkachuk V., Karagyaur M. Immortalization of Cultured Cells in Regenerative Biomedicine: Approaches, Opportunities, and Limitations // **Biochemistry (Moscow)**. - 2025. - Vol. 90, № 8. — pp. 1000-1017. - EDN: UBZRJX. Импакт-фактор 2,2 (JIF). (2,079/2,04435).

3. Dzhauari S., **Primak A.**, Basalova N., Kalinina N., Monakova A., Bozov K., Velichko A., Illarionova M., Grigorieva O., Akopyan Z., Popov V., Malkov P., Efimenko A., Tkachuk V., Karagyaur M. 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. - Vol. 26, №14. - P. 6697. - EDN: AVNUZM. Импакт-фактор 4,9 (JIF). (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., 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. - Vol. 25, № 4. – P. 2421. - EDN: ACPGVC. Импакт-фактор 4,9 (JIF). (1,617/1,304).

5. **Примак А.Л.**, Скрыбина 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, №3. - С. 83-91. - EDN: HFBXSS. Импакт-фактор 0,177 (SJR). (1,0395/0,732).

6. **Primak A.**, Skryabina M., Dzhauari S., Tkachuk V., Karagyaur M. The Secretome of Mesenchymal Stromal Cells as a New Hope in the Treatment of Acute Brain Tissue Injuries // **Neuroscience and Behavioral Physiology**. - 2024. - Vol. 54, № 5. - pp. 673–681. - EDN: DQPEKG. Импакт-фактор 0,183 (SJR). (1,0395/0,732 п.л.).

7. Basalova N., Dzhauari S., Yurshev Y., **Primak A.**, Efimenko A., Tkachuk V., Karagyaur M. State-of-the-Art: The Use of Extracellular Vesicles and Preparations Based on Them for Neuroprotection and Stimulation of Brain Tissue Regeneration after

¹ В скобках приведен объем публикации в печатных листах и вклад автора в печатных листах.

Injury // **Neurochemical Journal**. - 2023. - Vol. 17, № 4. - pp. 560–570. - EDN: PLKPBI. Импакт-фактор 0,183 (SJR). (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. - Vol. 15, № 6. - P. 1608. - EDN: FATUUI. Импакт-фактор 5,5 (JIF). (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. - Vol. 11, № 20. - P. 3235. - EDN: HUFRRK. Импакт-фактор 5,2 (JIF). (1,7325/0,892).