

Создание и характеристика культур мезенхимных стромальных клеток человека с пролонгированным пролиферативным потенциалом для задач регенеративной медицины

А.Л. Примак¹, Н.И. Калинина^{1,*}, М.Н. Скрябина¹, В.А. Усачев¹, В.И. Чечехин¹, М.А. Виговский¹, Е.С. Чечехина¹, Н.С. Волошин¹, К.Ю. Кулебякин^{1,2}, М.А. Кулебякина^{1,2}, О.А. Григорьева^{1,2}, П.А. Тюрин-Кузьмин¹, Т.К. Яковлева³, В.И. Турилова³, Е.И. Шагимарданова⁴, Г.Р. Газизова⁴, Н.А. Басалова^{1,2}, А.Ю. Ефименко^{1,2}, С.С. Джауари¹, Ю.Г. Антропова¹, И.В. Плющий¹, Ж.А. Акопян^{1,2}, В.Ю. Сысоева¹, В.А. Ткачук^{1,2}, М.Н. Карагяур^{1,2,*}

¹ Факультет фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119192, Ломоносовский проспект, 27, к. 10, Москва, Россия

² Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119192, Ломоносовский проспект, 27, к. 10, Москва, Россия

³ Институт цитологии Российской академии наук, 194064, Тихорецкий проспект, 4, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420012, ул. Карла Маркса, 76, Казань, Россия

* Адреса для корреспонденции: n_i_kalinina@mail.ru, m.karagyaur@mail.ru

Аннотация

Изучение молекулярных механизмов процессов регенерации требует удобных объектов для *in vitro* и *in vivo* исследований. *In vitro* такую функцию могут выполнять клеточные культуры. Существенным ограничением применения клеточных культур, полученных из тканей пациента, является их быстрое старение и утрата специфичных свойств исходной клеточной культуры. Возможным подходом к пролонгированию пролиферативной активности и сохранению свойств первичной клеточной культуры является повышение экспрессии каталитического компонента теломеразы (TERT). В данном исследовании мы оценили эффективность получения культур мезенхимных стромальных клеток (МСК) жировой ткани человека с пролонгированным пролиферативным потенциалом путем принудительной гиперэкспрессии гена TERT человека и изучили свойства полученных культур. Было установлено, что полученные культуры МСК способны преодолевать до 38–63 удвоений клеточной популяции (УКП), сохраняют чувствительность к нордреналину, серотонину, глутамату, ГАМК, паратиреоидному гормону, ангиотензину II и гистамину по меньшей мере до 26 УКП, сохраняют МСК-специфичный иммунофенотип до 36 УКП, а также способность к дифференцировке в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлении — не менее чем до 39 УКП. Более того, генетическая модификация культур МСК геном TERT человека (hTERT) позволяет стабилизировать качественный и количественный состав секретомы МСК при длительном пассировании (по меньшей мере

до 30 УКП). Полученные результаты позволяют рассматривать гиперэкспрессию TERT как перспективный подход к получению культур МСК с пролонгированной пролиферативной активностью, а сами культуры тМСК — как стабильный и удобный объект для решения широкого спектра фундаментальных и прикладных задач регенеративной медицины.

Ключевые слова: мезенхимные стромальные клетки, каталитический компонент теломеразы, дифференцировка, чувствительность к гормонам, кариотипирование, ростовые факторы

Конфликт интересов: Ткачук В.А. является главным редактором, Ефименко А.Ю., Карагаур М.Н. являются членами редколлегии журнала «Регенерация органов и тканей» с 2023 года, но не имеют отношения к решению о публикации данной статьи. Статья прошла принятую в журнале процедуру рецензирования. Об иных конфликтах интересов авторы не заявляли.

Для цитирования: Примак А.Л., Калинина Н.И., Скрябина 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., Карагаур М.Н. Создание и характеристика культур мезенхимных стромальных клеток человека с пролонгированным пролиферативным потенциалом для задач регенеративной медицины. *Регенерация органов и тканей*. 2024;2(2):24–45. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-2-24-45>

Поступила 03.03.2024

Обработана 16.05.2024

Принята к публикации 22.05.2024

Creation and characterization of human mesenchymal stromal cell cultures with prolonged proliferative potential for the tasks of regenerative medicine

Alexandra L. Primak¹, Natalia I. Kalinina^{1,*}, Mariya N. Skryabina¹, Vladimir A. Usachev¹, Vadim I. Chechekhin¹, Maksim A. Vigovskiy¹, Elizaveta S. Chechekhina¹, Nikita S. Voloshin¹, Konstantin Yu. Kulebyakin^{1,2}, Maria A. Kulebyakina^{1,2}, Olga A. Grigorieva^{1,2}, Pyotr A. Tyurin-Kuzmin¹, Tatiana K. Yakovleva³, Victoria I. Turilova³, Elena I. Shagimardanova⁴, Guzel R. Gazizova⁴, Nataliya A. Basalova^{1,2}, Anastasia Yu. Efimenko^{1,2}, Stalik S. Dzshauri¹, Yulia G. Antropova¹, Ivan V. Plyushchii¹, Zhanna A. Akopyan^{1,2}, Veronika Yu. Sysoeva¹, Vsevolod A. Tkachuk^{1,2}, Maxim N. Karagyaur^{1,2,*}

¹ Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University, 119192, Lomonosovsky prospect, 27/1, Moscow, Russia

² Institute for Regenerative Medicine, Medical Research and Education Center, Lomonosov Moscow State University, 119192, Lomonosovsky prospect, 27/10, Moscow, Russia

³ Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, 194064, Tikhoretsky prospect, 4, St. Petersburg, Russia

⁴ Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga Region) Federal University, 420012, K. Marx str, 76, Kazan, Russia

* Correspondence address: n_i_kalinina@mail.ru, m.karagyaur@mail.ru

Abstract

The study of molecular mechanisms of regeneration requires convenient models for in vitro and in vivo studies. In vitro cell cultures can fulfill such a function. However, their rapid aging and loss of initial specific properties in culture is a significant limitation of their use. Telomerase expression can help to overcome these limitations: it can prolong proliferative activity and stabilize the initial properties of a primary cell culture. Here, we created and studied the properties of human adipose tissue multipotent mesenchymal stromal cell (MSC) cultures that overexpress the catalytic protein subunit of human telomerase (hTERT). We found that these MSC cultures were able to proliferate up to 38–63 PD, kept sensitivity to noradrenaline, serotonin, glutamate, γ -aminobutyric acid, parathyroid hormone, angiotensin II and histamine until at least 26 PD, retained MSC-specific immunophenotype until at least 36 PD, and preserved the ability to adipogenic, osteogenic and chondrogenic differentiation until at least 39 PD. Moreover, overexpression of hTERT in MSC cultures stabilized the qualitative and quantitative composition of their secretome at long-term passaging (at least up to 30 PD). The obtained results allow us to consider telomerase hyperexpression as a promising approach to obtaining MSC cultures with prolonged proliferative activity, which can be used as a stable and convenient object for fundamental and applied studies in the field of regenerative medicine.

Keywords: mesenchymal stromal cells, telomerase catalytic protein subunit, differentiation, hormone sensitivity, karyotyping, growth factors

Conflict of interest: Vsevolod A. Tkachuk is the Editor-in-Chief, Anastasia Yu. Efimenko, Maxim N. Karagyaur are members of the editorial council of the journal “Organ and tissue regeneration” since 2023, but had no role in the decision to publish this article. The article has undergone the peer-review procedure adopted by the journal. The authors have declared no other conflicts of interest.

For citation: Primak A.L., Kalinina N.I., Skryabina M.N., Usachev V.A., Chechekhin V.I., Vigovskiy M.A., Chechekhina E.S., Voloshin N.S., Kulebyakin K.Yu., Kulebyakina M.A., Grigorieva O.A., Tyurin-Kuzmin P.A., Yakovleva T.K., Turilova V.I., Shagimardanova E.I., Gazizova G.R., Basalova N.A., Efimenko A.Yu., Dzhauari S.S., Yu.G. Antropova, I.V. Plyushchii, Akopyan Zh.A., Sysoeva V.Yu., Tkachuk V.A., Karagyaur M.N. Creation and characterization of human mesenchymal stromal cell cultures with prolonged proliferative potential for the tasks of regenerative medicine. *Tissue and organ regeneration*. 2024;2(2):24–45. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-2-24-45>

Received 03.03.2024

Revised 16.05.2024

Accepted 22.05.2024

Список сокращений

ГАМК — гамма-аминомасляная кислота

ЛВЧ — лентивирусные частицы

МСК — мультипотентные мезенхимные стромальные клетки

пМСК — первично выделенные мультипотентные мезенхимные стромальные клетки

ПТГ — паратиреоидный гормон

тМСК — культуры мультипотентных мезенхимных стромальных клеток с гиперэкспрессией гена TERT человека

УКП — удвоение клеточной популяции

ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота

5-НТ — 5-гидрокситриптамин

BDNF — Brain-derived neurotrophic factor, мозговой нейротрофический фактор

bFGF — basic Fibroblast Growth Factor, основной фактор роста фибробластов

CD73 — Cluster of differentiation, кластер дифференцировки

CTGF — Connective tissue growth factor, фактор роста соединительной ткани

- DMEM** — Dulbecco's Modified Eagle Medium, среда Игла, модифицированная Дульбекко
- EGF** — Epidermal Growth Factor, эпидермальный фактор роста
- FBS** — Fetal Bovine Serum, фетальная сыворотка плодов коров
- GABA** — γ -Aminobutyric acid, гамма-аминомасляная кислота
- GDNF** — Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor, глиальный нейротрофический фактор
- GMFB** — Glia Maturation Factor Beta, фактор созревания глии бета
- HDGF** — Heparin Binding Growth Factor, гепарин-связывающий фактор роста
- HLA-DR** — Human Leukocyte Antigen — DR isotype, лейкоцитарный антиген человека — изотип DR
- HNRNPU** — Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein U, гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин U
- HSP70** — Heat Shock Protein 70, белок теплового шока 70
- hTERT** — human Telomerase reverse transcriptase, каталитический компонент теломеразы обратной транскриптазы человека
- IGF-I** — Insulin-like Growth Factor 1, инсулиноподобный фактор роста 1
- IL-6** — Interleukin-6, интерлейкин-6
- ISCT** — International Society for Cellular Therapy, Международное общество клеточной терапии
- KGF** — Keratinocyte Growth Factor, фактор роста кератиноцитов
- LIF** — Leukemia inhibitory factor, фактор ингибирования лейкемии
- MANF** — Mesencephalic Astrocyte Derived Neurotrophic Factor, Мезенцефалический астроцитарный нейротрофический фактор
- MMP-2/-9** — Matrix metalloproteinase-2/-9, матриксная металлопротеиназа-2/-9
- MSC** — Multipotent mesenchymal stromal cells, мультипотентные мезенхимные стромальные клетки
- NDNF** — Neuron-derived Neurotrophic Factor, нейрональный нейротрофический фактор
- NEGR1** — Neuronal Growth Regulator 1, регулятор роста нейронов 1
- NENF** — Neudesin Neurotrophic Factor, нейдезин нейротрофический фактор
- OLFML3** — Olfactomedin-like protein 3, ольфактомединоподобный белок 3
- PDGF** — Platelet Derived Growth Factor, тромбоцитарный фактор роста
- PEDF** — Pigment Epithelium Derived Factor, фактор роста пигментного эпителия
- PIGF** — Placental growth factor, плацентарный фактор роста
- PD** — population doubling
- pRB** — retinoblastoma protein, белок ретинобластомы, один из регуляторов клеточного цикла
- RFTN1** — RFTN1 — Raftlin, Lipid Raft Linker 1, Рафтлин, липидный рафт-линкер 1
- SDF-1** — Stromal cell-derived factor-1, фактор-1, полученный из стромальных клеток
- TCN2** — Transcobalamin 2, транскобаламин-2
- TGF β 1** — Transforming Growth Factor beta 1, трансформирующий фактор роста бета 1
- TIMP** — Tissue Inhibitor of MetalloProteinase, тканевой ингибитор металлопротеиназы
- tPA** — Tissue-type Plasminogen Activator, тканевой активатор плазминогена
- uPA** — Urokinase-type Plasminogen Activator, урокиназный активатор плазминогена
- VASN** — Vasorin, вазорин
- VEGF-A** — Vascular Endothelial Growth Factor-A, фактор роста сосудистого эндотелия

Введение

Клеточные культуры являются удобным объектом для фундаментальных и прикладных исследований в области клеточной биологии и регенеративной медицины [1, 2]. Культуры клеток, выделенные из органов и тканей человека или животных или первично выделенные, характеризуются рядом особенностей: ограниченной способностью к пролиферации, быстрым старением клеточной культуры с утратой характерных свойств, выраженной гетерогенностью свойств культур, полученных от различных доноров [3]. Нестабильность (вариабельность) свойств таких клеточных культур ограничивает возможности их использования для продолжительных и повторных экспериментов, в том числе с применением технологий клеточного клонирования и геномного редактирования [4, 5]. Использование культур, способных длительно сохранять пролиферативный потенциал и характерные для них свойства, позволят преодолеть указанные ограничения.

Одним из подходов к получению таких относительно стабильных и длительно пролиферирующих клеточных культур является повышение экспрессии каталитического компонента теломеразы, например посредством генетической модификации. Из данных литературы известно, что поддержание целостности теломеров стабилизирует ДНК и уменьшает вероятность хромосомных транслокаций/аббераций, что, в свою очередь, стабилизирует пролиферативный потенциал и свойства модифицированных клеточных культур [6, 7].

Ввиду роста интереса к регенеративной биомедицине и клеточной терапии разнообразие исследуемых клеточных культур из здоровых или патологических тканей человека и животных постоянно увеличивается, в то время как количество коммерчески доступных клеточных линий крайне ограничено [8]. Альтернативой приобретению коммерческих линий клеток является генетическая модификация геном TERT человека подходящих (требуемых) первичных культур клеток с последующим изучением и описанием их свойств.

В данной работе представлена сравнительная характеристика культур мезенхимных стромальных клеток (МСК), выделенных из жировой ткани человека, первичных и модифицированных геном TERT человека. Особое внимание

уделяется обсуждению преимуществ и ограничений предлагаемого подхода. Данный подход может быть рекомендован для увеличения продолжительности использования первичных культур МСК человека при постановке продолжительных и повторных экспериментов.

Материалы и методы

Клеточные культуры и среды

Для сборки лентивирусных частиц (ЛВЧ) использовали линию НЕК293Т (ATCC, #CRL-3216™). Для генетической модификации геном TERT человека, а также в качестве группы сравнения при изучении свойств полученных культур МСК (тМСК) использовали первично выделенные мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (пМСК) подкожного жира человека из биобанка Института регенеративной медицины МНОЦ МГУ имени М.В. Ломоносова (<https://human.depo.msu.ru>). Все доноры пМСК были практически здоровы, с индексом массы тела в диапазоне 18–25, не имели метаболических и эндокринных нарушений, подкожный жир был забран в ходе травматологических или плановых (герниопластика) операций: донор № 1 — мужчина, 19 лет; донор № 2 — мужчина, 26 лет; донор № 3 — женщина, 53 года. В качестве положительного контроля при оценке свойств полученных тМСК использовали коммерчески доступную линию МСК жировой ткани человека ASC52telo (ATCC, #SCRC-4000).

НЕК293Т культивировали в среде Игла, модифицированной Дульбекко (DMEM), с высоким содержанием глюкозы (Gibco, #11965092), содержащей 10% фетальной сыворотки плодов коров (FBS) (ThermoFisher Scientific, #26140079), 1x смесь антибиотика/антимикотика (Gibco, #15240062) и 1x L-Gln (Gibco, #11539876). Нарботку ЛВЧ проводили в аналогичной среде культивирования, содержащей 2% инактивированную фетальную сыворотку плодов коров (FBS) (ThermoFisher Scientific, #26140079).

МСК человека культивировали в среде Advance Stem Cell Basal Medium (HyClone, #SH30879.02), содержащей 10% добавки Advance Stem Cell Growth Supplement (HyClone, #SH30878.01) и 1x смесь антибиотика/антимикотика (Gibco, США, #15240062). Все перечисленные культуры клеток культивировали при 37 °C и 5% CO₂ в инкубаторе Binder CB150 (BINDER GmbH). Среду культивирования меняли каждые 3–4 суток. Все эксперименты с пМСК проводили до 20 удвоений

клеточной популяции (УКП) (13 пассажей), а с тМСК — до 66 УКП (44 пассажа). Все процедуры с образцами тканей пациентов были одобрены Этическим комитетом МГУ им. М.В. Ломоносова (#IRB00010587), протокол № 4 (2018 г.); их проводили в соответствии с Хельсинкской декларацией.

Получение лентивирусных частиц и трансдукция

Для гиперэкспрессии в МСК человека гена hTERT использовали ранее собранный вектор pVLT-EF1a-hTERT-puro, кодирующий каталитическую субъединицу теломеразы человека и ген устойчивости к пурамицину (рис. 1А). Сборку ЛВЧ, кодирующих TERT человека, осуществляли путем трансфекции линии НЕК293Т согласно описанно-

му ранее протоколу [9]. Через 64–72 ч после трансфекции собирали кондиционированную среду, содержащую ЛВЧ, и фильтровали через фильтры с диаметром пор 0.45 мкм. Полученные ЛВЧ использовали для трансдукции первично выделенных МСК, прошедших 3–7 УКП (2–5 пассажей), как это было описано ранее [10]. Для селекции трансдуцированных МСК через 7 суток после трансдукции в культуральную среду добавляли пурамицин до конечной концентрации 1 мкг/мл. Селекцию продолжали в течение 10–14 суток. Среду культивирования меняли каждые 2–3 суток. Для подтверждения активности пурамицина его вносили и в культуру нетрансдуцированных клеток (отрицательный контроль при селекции), которые погибали в течение 4–7 дней после начала селекции.

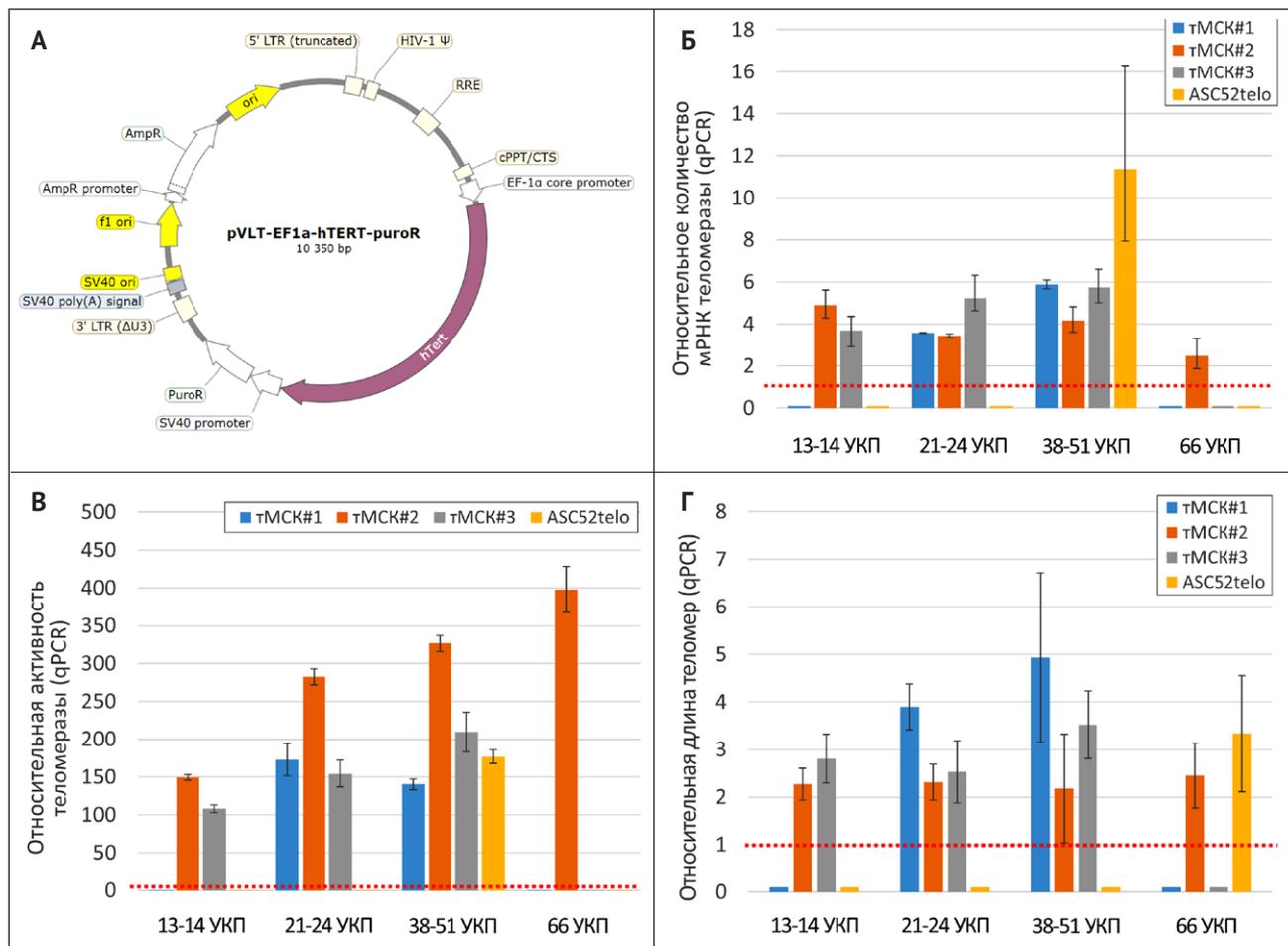


Рис. 1. Трансдукция культур МСК лентивирусом pVLT-hTERT-puro активирует экспрессию и увеличивает активность hTERT: А — карта генетической конструкции pVLT-hTERT-puro, использованной для генетической модификации клеточных культур МСК; Б, В и Г — относительный уровень экспрессии мРНК, активности каталитического компонента теломеразы и относительная длина теломер в генотипированных МСК в динамике соответственно, нормированный на уровень экспрессии и активности hTERT в культурах первично выделенных МСК 2-го пассажа, что соответствует 3 УКП (равен 1.0) — отмечен красной пунктирной линией

В рамках данной работы было получено 3 культуры МСК, модифицированных геном TERT человека: тМСК#1, тМСК#2 и тМСК#3. Набор тестов, проведенный для каждой из полученных культур, приведен в таблице 1.

Анализ экспрессии и оценка функциональной активности TERT человека в культурах тМСК
Экспрессию гена TERT человека в тМСК подтверждали с помощью ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Для выделения тотальной РНК из клеточных лизатов использовали набор Direct-zol RNA Miniprep (Zymo Research, #R2052). Обратную транскрипцию осуществляли с помощью набора MMLV RT (Евроген, #SK021), а для ПЦР-РВ использовали набор 5X qPCRmix-HS SYBR (Евроген, #PK147L). Для детекции мРНК TERT использовали праймеры 5'-ACCGTGGTTTCTGTGTGGTG и 5'-TCGCCTGAGGAGTAGAGGAA (температура отжига — 58 °С, длина ампликона — 211 bp). Нормировку полученного сигнала между образцами осуществляли по уровню экспрессии гена 36B4 (housekeeping gene), мРНК которого детектировали с помощью праймеров 5'-CGACCTGGAAGTCSAАСТАС и 5'-ATCTGCTGCATCTGCTTG (температура отжига — 53 °С, длина ампликона — 109 bp). Функциональную активность гена TERT человека и относительную длину теломеров в полученных культурах тМСК оценивали с помощью

Таблица 1. Перечень исследований, проведенных для каждой из культур тМСК

Проведенные исследования	Культуры тМСК
Экспрессия и активность hTERT	1, 2 и 3
Пролиферативная активность	1, 2 и 3
Гормональная чувствительность*	1 и 2
Дифференцировочный потенциал*	1 и 2
Иммунофенотипирование**	2 и 3
Кариотипирование**	2 и 3
Протеомный анализ секрета***	2

Примечание: * культуры тМСК#1 и тМСК#2 были получены раньше, чем тМСК#3; оценку гормональной чувствительности и дифференцировочного потенциала осуществляли для культур тМСК#1 и тМСК#2; ** ввиду ограниченности ресурсной базы иммунофенотипирование и кариотипирование проводили для наиболее перспективных (дольше сохраняющих пролиферативный потенциал) культур тМСК: тМСК#2 и тМСК#3; *** ввиду ограниченности ресурсной базы протеомный анализ секрета проводили для культуры тМСК#2 как одной из наиболее перспективных (среди полученных) для получения секрета для решения задач регенеративной медицины

коммерческих наборов Telomerase Activity Quantification qPCR Assay Kit (Sciencell, #8928) и Relative Human Telomere Length Quantification qPCR Assay Kit (Sciencell, #8908) соответственно согласно рекомендациям производителя.

Оценка пролиферативного потенциала культур тМСК

Согласно данным литературы гиперэкспрессия гена hTERT должна увеличивать пролиферативный потенциал клеточной культуры [11, 12], поэтому было проведено сравнительное исследование скорости пролиферации пМСК и тМСК в динамике (на различных пассажах), а также была оценена максимальная продолжительность пассирования культур пМСК и тМСК до момента радикального замедления пролиферативной активности (репликативное старение). Каждое пассирование проводили в соотношении 1:3 (для культур тМСК вплоть до ~35–44 пассажей, что соответствует 53–66 УКП).

Для оценки скорости пролиферации клетки высаживали в лунки 6-луночного планшета в количестве 100 тыс. клеток на лунку с последующей автоматической фотофиксацией с использованием системы IncuCyte® ZOOM Live Cell Analysis System (EssenBioscience) в течение 120 часов (16 полей зрения на 1 лунку). Анализ полученных изображений осуществляли с помощью встроенного программного обеспечения путем наложения «маски» и высчитыванием процента клеточной конfluентности, который напрямую коррелирует с клеточной пролиферацией.

Оценка гормональной чувствительности культур тМСК

Генетическая модификация клеточной культуры может существенно изменить свойства клеточной культуры, в том числе ее чувствительность к гормонам и дифференцировочный потенциал. Поскольку одной из задач данного исследования являлось создание долгоживущей культуры мезенхимных стромальных клеток человека, которая может быть использована в качестве модельного объекта для изучения механизмов гетерологической сенситизации, коммитирования судьбы клеток в процессах онтогенеза и регенерации, а также роли гормонов в процессах обновления и регенерации тканей, нами была оценена чувствительность полученных геномодифицированных культур МСК к ряду гормонов.

Гормональную чувствительность тМСК оценивали по их способности отвечать активацией Gq/11-phospholipase-C сигнального каскада на воздействие норадреналина, 5-НТ (серотонина), глутамата, ГАМК, дофамина, паратиреоидного гормона (ПТГ), ангиотензина II и гистамина.

Активацию рецепторов, связанных с G-белками, оценивали с помощью визуализации Ca^{2+} после обработки культур МСК 1 мкМ норадреналина (Abcam, #ab120717) или 10 мкМ 5-НТ (Abcam, #ab120528), или 1 мкМ глутамата (Abcam, #ab120049), или 1 мкМ ГАМК (Abcam, #ab120359), или 50 мкМ дофамина (Sigma-Aldrich, #H8502), или 10 нМ ПТГ (AprexBio, #A1129), или 5 нМ ангиотензина II (Abcam, #ab120183), или 1 мкМ гистамина (Sigma-Aldrich, #H7125). Клетки культивировали в низкой плотности, чтобы предотвратить межклеточную коммуникацию во время кальциевой визуализации. За 1 ч до начала эксперимента клетки загружали 4 мкМ кальций чувствительного флуоресцентного сенсора Fluo-8 AM (Abcam, #ab142773) в растворе Хенкса, забуференного 20 мМ HEPES. В течение 5 минут регистрировали базовый уровень клеточного ответа, а затем однократно добавляли один из перечисленных выше гормонов. Изменения яркости клеточной флуоресценции фиксировали с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse Ti с объективом CFI Plan Fluor DLL 10X/0.3 (Nikon) и цифровой EMCCD-камерой Andor iXon 897 (Andor Technology) и Nikon Eclipse Ti2 с объективом CFI Plan Fluor DL 10XF CH, NA0.3 (Nikon) и цифровой sCMOS-камерой Photometrics Kinetix. Для увеличения количества анализируемых клеток использовали одновременное измерение полей зрения 4×4.

Полученные видеозаписи анализировали с помощью программ NIS-Elements (Nikon) и ImageJ. Изменения цитозольного Ca^{2+} количественно оценивали по относительным изменениям интенсивности флуоресценции Fluo-8 в отдельных клетках. Процент ответивших клеток определяли как отношение числа ответивших клеток к числу всех проанализированных клеток.

Иммунофенотипическая характеристика полученных культур тМСК

Сохранность МСК-специфичного иммунофенотипа у тМСК в сравнении с пМСК осуществляли с помощью набора MSC Phenotyping Cocktail Kit, anti-human, REAfinity (Miltenyi Biotec, #130-125-285) согласно инструкции производителя

по наличию МСК-специфичных маркеров CD73, CD90 и CD105 и отсутствию гематопоэтических и эндотелиальных поверхностных маркеров CD14, CD20, CD34 и CD45, с последующей оценкой процента окрашенных клеток на клеточном сортере BD FACS Aria III (BD).

Оценка дифференцировочного потенциала культур тМСК

Сохранность дифференцировочного потенциала тМСК оценивали по их способности дифференцироваться в остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлении в условиях клеточной культуры.

Остеогенная дифференцировка

Для оценки остеогенного потенциала клетки культивировали в 12-луночной планшете в среде DMEM + 10% FBS до достижения плотного монослоя. Индукцию остеогенной дифференцировки проводили с использованием Mesenchymal Stem Cell Osteogenesis Kit (Chemicon; #SCR028) в соответствии с инструкцией производителя. Вкратце: индукцию осуществляли в среде DMEM low Glucose, содержащей 10% FBS, 100 мг/л $CaCl_2$, 0,1 мкМ дексаметазона, 0,2 мМ аскорбиновой кислоты, 10 мМ глицерол-2-фосфата и 2 мМ L-глутамин в течение 15 дней; среду меняли каждые 2 дня. Контрольные клетки культивировали в среде DMEM low Glucose с добавлением 10% FBS. На 15-й день среду отбирали и клетки фиксировали в 70% этаноле в течение 1 ч. После последующего двукратного промывания водой клетки окрашивали ализариновым красным (Sigma, #A5533-25G) и по интенсивности окраски минеральных отложений внеклеточного матрикса оценивали эффективность дифференцировки. Изображения получали на микроскопе Nikon Eclipse Ti2, оборудованном цветной камерой Nikon DS-Ri2 (Nikon). Анализ полученных изображений осуществляли с помощью программного обеспечения NIS Elements AR 5.40.02.

Адипогенная дифференцировка

Для оценки адипогенного потенциала клетки культивировали в 12-луночной планшете в среде DMEM + 10% FBS до достижения монослоя. Индукцию адипогенной дифференцировки проводили в среде DMEM low Glucose, содержащей 10% FBS, 10 мкг/мл инсулина, 0,5 мМ IBMX и 1 мкМ дексаметазона согласно описанной ранее методике [13]. Контрольные клетки культивировали в среде DMEM low Glucose + 10% FBS. Эффективность адипогенной дифференцировки

оценивали по окрашиванию дифференцированных клеток липофильным красителем Nile Red (Sigma, #19123). Для этого клетки отмывали раствором Хэнкса с 20 нМ HEPES и затем инкубировали 1 ч при 37 °С в клеточном инкубаторе в растворе Хэнкса, содержащем 20 нМ HEPES и 1 мМ Nile Red. Изображения получали на микроскопе Nikon Eclipse Ti2, оборудованном монохромной камерой Kinetix (Teledyne Photometrics). Длина волны возбуждения — 488 нм, длины волн эмиссии — 515–547 нм. Анализ полученных изображений осуществляли с помощью программного обеспечения NIS Elements AR 5.40.02.

Хондрогенная дифференцировка

Для оценки хондрогенного потенциала клетки культивировали в стандартной среде DMEM + 10% FBS до достижения 60–80% клеточной конfluence. Хондрогенную дифференцировку проводили с помощью StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit (Gibco, #A1007101) согласно рекомендациям производителя. Вкратце: капли суспензии клеток объемом 5 мкл с концентрацией $1,6 \times 10^7$ клеток/мл наносили в лунки 24-луночного планшета, инкубировали в течение 2 ч при 37 °С в клеточном инкубаторе при повышенной влажности, после чего добавляли дифференцировочную среду, которую меняли каждые 2–3 суток. Сфероиды, полученные после 14 дней дифференцировки, замораживали в О.С.Т. compound Tissue-Tek (Sakura Finetek USA, Inc., #4583), готовили срезы толщиной 10 мкм на криотоме Leica CM1850 (Leica). Полученные срезы фиксировали в забуференном формалине (Panreac, #131328), окрашивали альциановым синим (Sigma-Aldrich, #6A3217) и заключали под покровное стекло. Окрашенные препараты визуализировали и фотографировали с помощью микроскопа Zeiss, оборудованного камерой AxioCam (Carl Zeiss).

Кариотипический анализ культур геномодифицированных МСК человека

Для приготовления препаратов метафазных хромосом в культуральную среду вносили колленид в конечной концентрации 0,1 мкг/мл. Через 3 часа клетки деадгезировали с поверхности культивирования смесью трипсина-ЭДТА 0,25% (ПанЭко, #П043п). Гипотоническую обработку клеток проводили смесью 0,55 % раствора КСl и 1 % раствора цитрата натрия в соотношении 1:1 в течение 20 минут при комнатной температуре. Клетки фиксировали смесью метанола и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3:1 три раза по 20 минут. Полученную суспензию клеток

в небольшом количестве фиксатора раскапывали на предметные стекла над водяной баней при температуре 48 °С. Дифференциальное окрашивание хромосом на G-диски выполняли в соответствии с методом, предложенным ранее Ozkinay и Mitelman [14]. Для подсчета числа хромосом в клетках, кариотипирования и оценки доли полиплоидных клеток в популяции использовали микроскоп Axio Scope.A1 (Carl Zeiss), оборудованный системой анализа изображений хромосом «ВидеоТест-Карио 3.1» (ВидеоТест) и микроскоп Axio Imager A2 (Carl Zeiss), оснащенный Ikaros4 Karyotyping System (MetaSystems). Для каждой из исследованных клеточных культур анализировали не менее 50 метафазных пластинок. Кариотипы клеток и структурно перестроенные хромосомы описывали в соответствии с Международной номенклатурой хромосом человека [15].

Сравнительный иммуоферментный анализ секретомов тМСК и пМСК человека

Содержание ключевых нейротрофических и проангиогенных факторов роста (BDNF, uPA, VEGF и HGF) в составе секрета МСК до и после генетической модификации определяли с помощью коммерческих наборов для иммуоферментного анализа согласно инструкциям производителя: Human Free BDNF Quantikine ELISA Kit (R&D, #DBD00), Human uPA ELISA Kit (URK) (Abcam, #ab119611), Human VEGF Quantikine ELISA Kit (R&D, #DVE00) и Human HGF Quantikine ELISA Kit (R&D, #DHG00)) соответственно.

Сравнительный протеомный анализ секретомов тМСК и пМСК человека

Для получения секрета для протеомного анализа использовали клеточные культуры, достигшие 80% конfluence монослоя (по 5–7 100 мм культуральных чашек на 1 образец). Их депривировали в течение 16 часов в бессывороточной среде DMEM Low Glucose без фенолового красного (Gibco, #11054020). После чего среду меняли на аналогичную и нарабатывали кондиционированную среду в течение 24 часов. Далее белки кондиционированной среды концентрировали более чем в 100 раз на фильтре с диаметром пор 10 кДа.

Для получения пептидов образцы секретируемых белков, содержащие ~10–30 мкг белка, разводили до концентрации 0,1–0,3 мкг/мкл в 50 мМ бикарбонат-аммонийном буфере, pH 8,5, с добавлением 0,05% реагента RapiGest (Waters, #186001861), затем последовательно инкубировали с 2 мМ трис-карбоксивилфосфина

(Sigma-Aldrich, #C4706-10G) (1 час при 60 °C), с 4 мМ метиметантисульфоната (Sigma-Aldrich, #64306) (15 минут при комнатной температуре) и с 4 нг/мкл трипсина (ПанЭко, № 9002-07-7) (16 часов при 37 °C). После этого к образцам добавляли муравьиную кислоту (Applichem, #131030) до концентрации 0,1% и очищали полученные пептиды на колонках HLB Oasis (Waters, # WAT106202).

Хромато-масс-спектрометрический анализ пептидов (n = 2) проводили на базе ЦКП ГНЦ ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН на приборах Ultimate 3000nano UPLC и TIMS-TOF-PRO. Полученные данные обрабатывали с использованием ПО MaxQuant согласно рекомендациям разработчиков.

Статистический анализ

Статистический анализ проводили с использованием программы SigmaPlot11.0 (Systat Software, Inc., Германия). Численные данные оценивали на нормальность распределения с помощью критерия Колмогорова — Смирнова. Различия между экспериментальной и контрольной группами анализировали с использованием t-критерия Стьюдента, дисперсионного анализа (ANOVA) или ANOVA on ranks (критерий Данна) в зависимости от количества сравниваемых групп и нормальности распределения. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение или медиана (25%; 75%) в зависимости от используемого теста. Значимыми считали различия между группами при $p < 0,05$.

Результаты

Эктопическая экспрессия каталитического компонента теломеразы человека увеличивает пролиферативный потенциал и стабилизирует свойства МСК человека в культуре

Результаты анализа ПЦР-РВ показали, что уровень мРНК каталитического компонента теломеразы человека (hTERT) в культурах тМСК и ASC52telo был достоверно выше ($p < 0,05$, $n = 3$), чем в культуре пМСК — отмечен красной пунктирной линией (рис. 1Б). Более того, при пассировании тМСК (вплоть до 66 УКП) экспрессия гена TERT оставалась стабильно высокой и достоверно отличалась от таковой для пМСК (рис. 1Б). Уровень экспрессии мРНК hTERT коррелировал с активностью каталитического компонента теломеразы в лизатах тМСК.

В культурах ASC52telo наблюдали меньшую активность hTERT относительно уровня экспрессии ее мРНК по сравнению с культурами тМСК (рис. 1В). Сравнительный анализ относительной длины теломер между тМСК и пМСК показал, что теломеры в тМСК в 2–5 раз длиннее, чем в пМСК, причем существенных различий в длине теломер с увеличением пассажа культивирования (с 9 по 44 пассаж, что соответствует с 14 по 66 УКП) в тМСК не выявлено. В коммерчески доступной линии ASC52telo длина теломер составила в среднем в $3,3 \pm 1,2$ раза больше, чем в первично выделенной культуре МСК (рис. 1Г).

Полученные культуры тМСК сохраняли пролиферативную активность значительно дольше, чем пМСК. Так, скорость пролиферации пМСК с 8 по 17 УКП упала в 1,7 раза, а время УКП возросло с $61,5 \pm 20,6$ до $87,6 \pm 24,0$ ч. В то же время скорость пролиферации тМСК в диапазоне 8–17 УКП практически не изменялась, а среднее время удвоения составило $57,6 \pm 12,1$ ч. При 15–16 УКП наблюдается достоверное различие в среднем времени удвоения культур пМСК и тМСК ($p < 0,05$, $n \geq 6$). Для тМСК также было отмечено замедление пролиферативной активности с пассированием, однако оно было отсрочено во времени по сравнению с пМСК. Так, достоверное снижение скорости пролиферации тМСК наблюдали к 57–66 УКП, что проявлялось в увеличении времени удвоения клеточной популяции с $64,4 \pm 11,1$ ч к 36 УКП до $177,8 \pm 15,8$ ч к 57–66 УКП — на примере культуры тМСК#2 ($p < 0,05$, $n = 3$) (рис. 2).

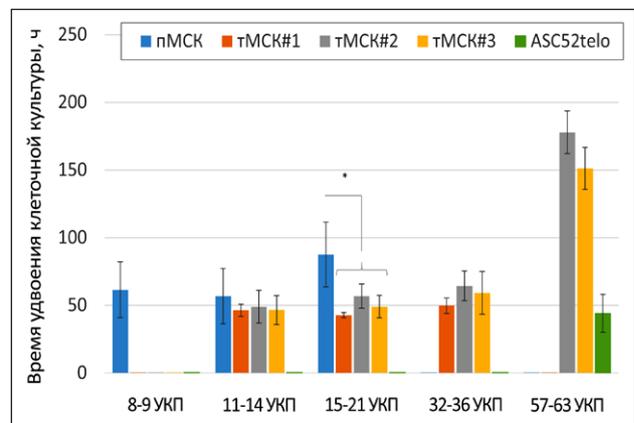


Рис. 2. Сравнительная динамика времени удвоения культур МСК человека, первично выделенных и с пролонгированным пролиферативным потенциалом. Среднее время удвоения клеточной культуры первично выделенных МСК получено на основании данных для МСК от 6–12 доноров (в зависимости от УКП). * $p < 0,01$, $n \geq 4$

Влияние процедуры генетической модификации на иммунофенотип культуры МСК оценивали в соответствии с рекомендациями ISCT [16–18], согласно которым МСК характеризуются наличием маркеров CD73, CD90 и CD105, а также отсутствием экспрессии поверхностных маркеров, свойственных для гематопоэтических и эндотелиальных клеток: CD14, CD19, CD20, CD34, CD45 и HLA-DR [16–18].

Было установлено, что пМСК, использованные в работе, соответствовали данным критериям (рис. 3), а гиперэкспрессия hTERT не влияла на профиль экспрессируемых ими поверхностных маркеров (рис. 3, сравнить пМСК#п6 и тМСК#п7).

При культивировании тМСК дольше сохраняли МСК-специфичный иммунофенотип по сравнению с таковым у пМСК: не менее 36 УКП у тМСК#2 (рис. 3, тМСК#п24), в то время как пМСК#3 к 9 УКП значительно утрачивали экспрессию CD90 (с 90,1 до 48,4%) и CD105 (с 98,9 до 68,6%) (рис. 3, пМСК#п6). В то же время в культуре тМСК с пассированием также наблюдается постепенная частичная утрата экспрессии МСК-специфичных маркеров. Так, к 66 УКП в культуре тМСК#2 экспрессия CD73 снижается с 99,2 до 93,6%, CD90 — с 99,1 до 96,0%, CD105 — с 96,1 до 65,4% (рис. 3, тМСК#п44). Иммунофенотипический профиль коммерческой линии ASC52telo к 42 УКП не отличался от такового для пМСК#3п2.

Оценка гормональной чувствительности тМСК к глутамату (10^{-5} М), ГАМК (2×10^{-5} М), дофамину (10^{-5} М), норадреналину (10^{-6} М), ангиотензину II (10^{-8} М), гистамину (10^{-6} М), серотонину (10^{-5} М) и паратиреоидному гормону (10^{-8} М) показала, что тМСК (не менее чем до 26 УКП) сохранили чувствительность ко всему спектру протестированных гормонов, на которые отвечают и пМСК (рис. 4). Коммерчески доступная линия ASC52telo (39–41 УКП) оказалась нечувствительна к серотонину, ГАМК и глутамату, а также обладала сниженной чувствительностью к дофамину, норадреналину и паратгормону по сравнению культурами тМСК ($p < 0,05$, $n \geq 4$). Исследования, проведенные на культуре тМСК#2 на поздних пассажах (43 пассаж, что соответствует 65 УКП), также показали выраженное снижение (в 5–10 раз) чувствительности к серотонину, ГАМК, дофамину, норадреналину, паратгормону и глутамату по сравнению с ранними пассажами. Однако даже при этом куль-

тура тМСК#2 сохраняла большую чувствительность к гормонам по сравнению с ASC52telo.

Важным интегральным критерием оценки физиологической активности МСК является их способность к дифференцировке. Согласно рекомендациям Международного общества клеточной терапии (ISCT) [16–18] культура МСК характеризуется способностью дифференцироваться в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлениях, что и было изучено на полученных культурах МСК тМСК#1 и тМСК#2 в сравнении с первично выделенной культурой МСК и коммерчески доступной линией ASC52telo.

Было установлено, что культура тМСК#2 полностью сохраняет способность к дифференцировке в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлениях после генетической модификации как на ранних (15 УКП), так и более поздних пассажах (39 УКП), хотя и наблюдается некоторое снижение адипогенного и остеогенного потенциалов к 39 УКП. К 63 УКП наблюдается полная утрата способности к дифференцировке в адипогенном направлении и выраженное снижение способности к дифференцировке в остеогенном направлении, что косвенно свидетельствует о старении культуры тМСК#2 (рис. 5 тМСК#2). Клеточная культура тМСК#1 проявила выраженное снижение способности к дифференцировке в адипо- и остеогенном направлениях к 32 УКП, однако сохранила способность дифференцироваться в хрящ (рис. 5 тМСК#1). Коммерчески доступная линия МСК ASC52telo продемонстрировала выраженную способность к дифференцировке в остеогенном и хондрогенном направлениях, однако оказалась практически неспособна к дифференцировке в адипогенном направлении.

Результаты кариотипического анализа культур геномодифицированных МСК

Результаты кариотипического анализа полученных культур тМСК#2 и тМСК#3 показали, что клетки популяции тМСК#2, характеризуются кариотипом 47 XY, +mar — аномальный мужской кариотип, содержащий дополнительную неидентифицированную хромосому. Такой кариотип характерен для 100% клеток и не меняется с 17 по 42 УКП, что свидетельствует о высокой стабильности кариотипа трансдуцированных клеток, несмотря на исходно аномальный кариотип (рис. 6А и 6Б). Доля тетраплоидных клеток в линии тМСК#2 к 17 УКП составила 13,4%, а к 42 УКП — 4,9%.

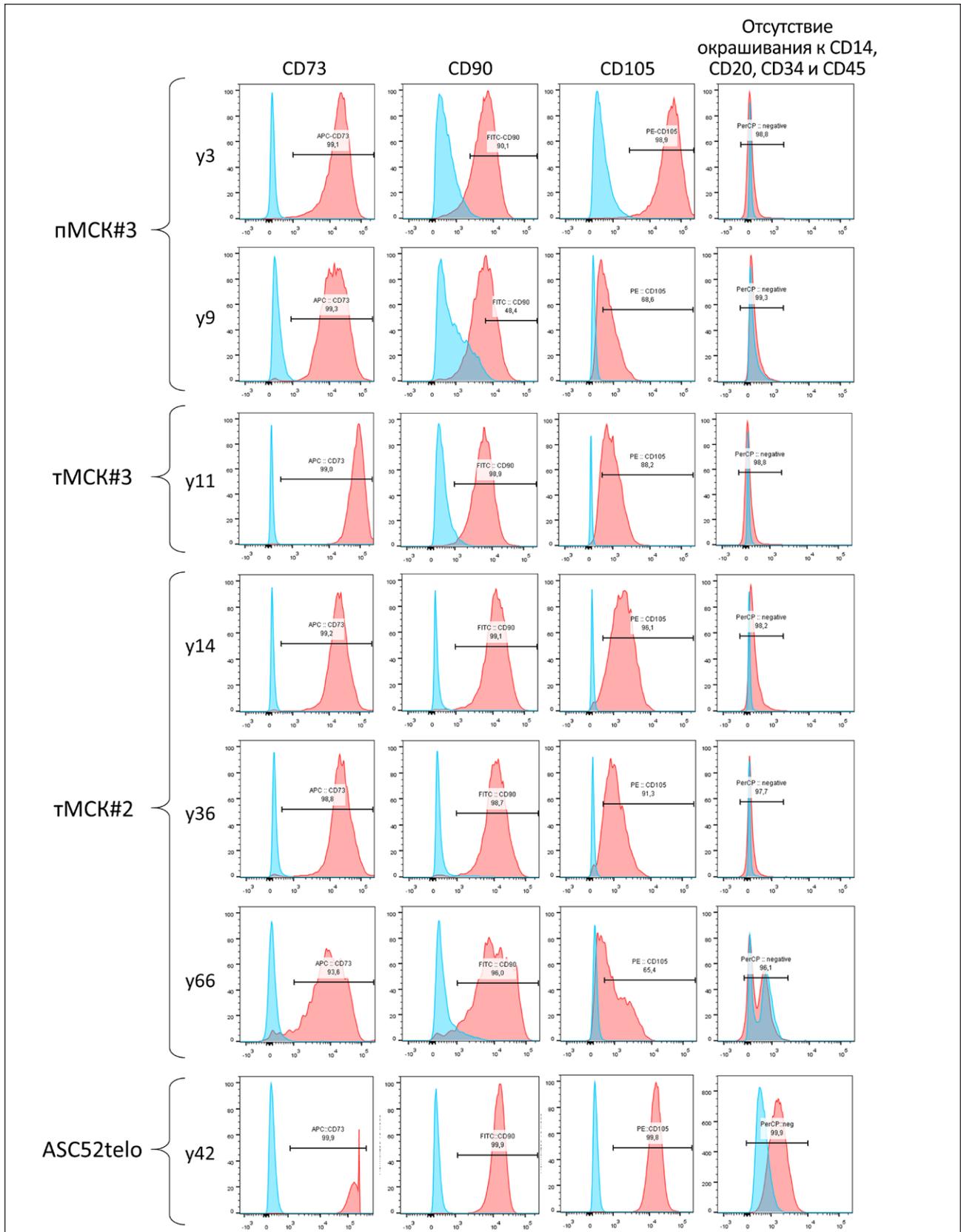


Рис. 3. Сравнительная динамика сохранности МСК-специфического иммунофенотипа в культурах МСК, первичных (пМСК#3) и с пролонгированным пролиферативным потенциалом (тМСК#2, тМСК#3 и ASC52telo). У3 – 3 УКП и т.д.

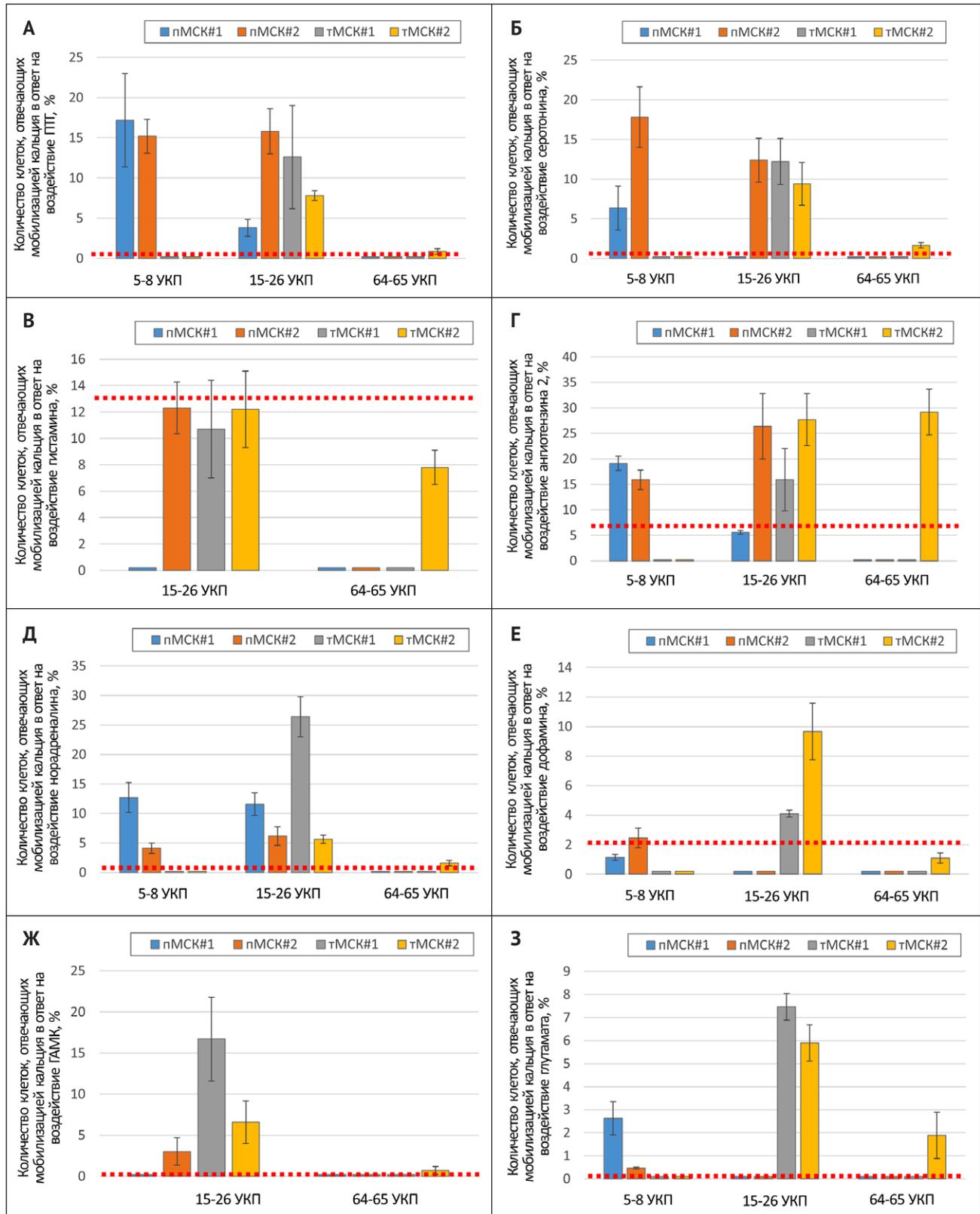


Рис. 4. Сравнение гормональной чувствительности культур МСК: первичных (пМСК#1 и пМСК#2 – 5–15 УКП) и с пролонгированным пролиферативным потенциалом (тМСК#1 и тМСК#2 – 26–65 УКП) в динамике. Красной пунктирной линией отмечены соответствующие значения для коммерчески доступной иммортализованной линии МСК ASC52telo – 39–41 УКП

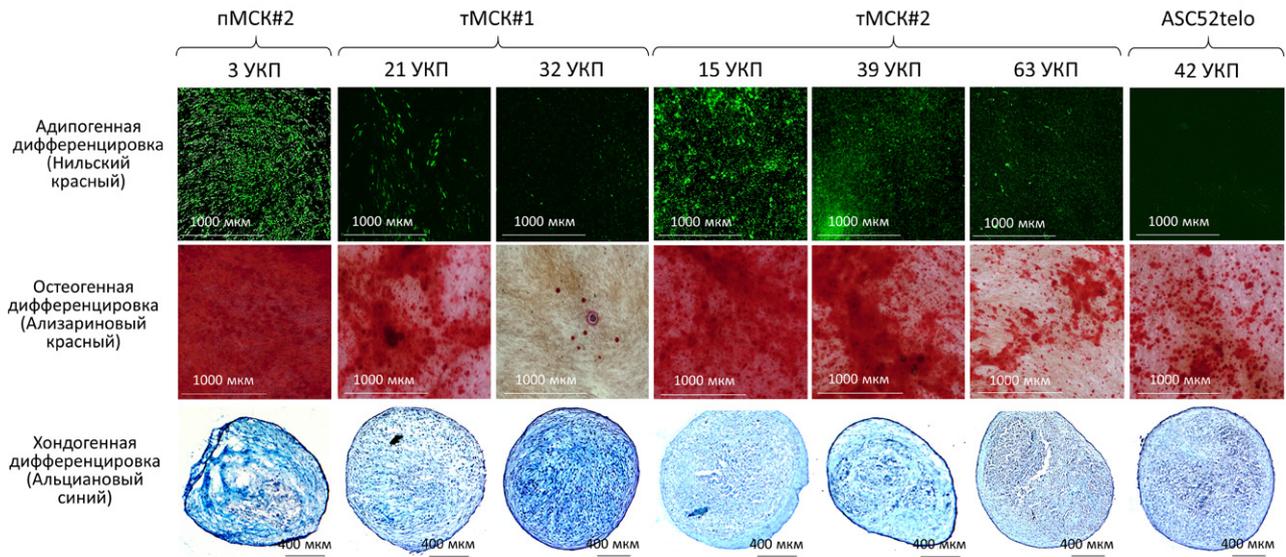


Рис. 5. Динамика сохранности дифференцировочного потенциала культур МСК с пролонгированным пролиферативным потенциалом: тМСК#1 и тМСК#2. Для сравнения приведены данные по дифференцировке первичной культур МСК (пМСК#2 3 УКП) и коммерчески доступной иммортализованной линии МСК ASC52telo (42 УКП)

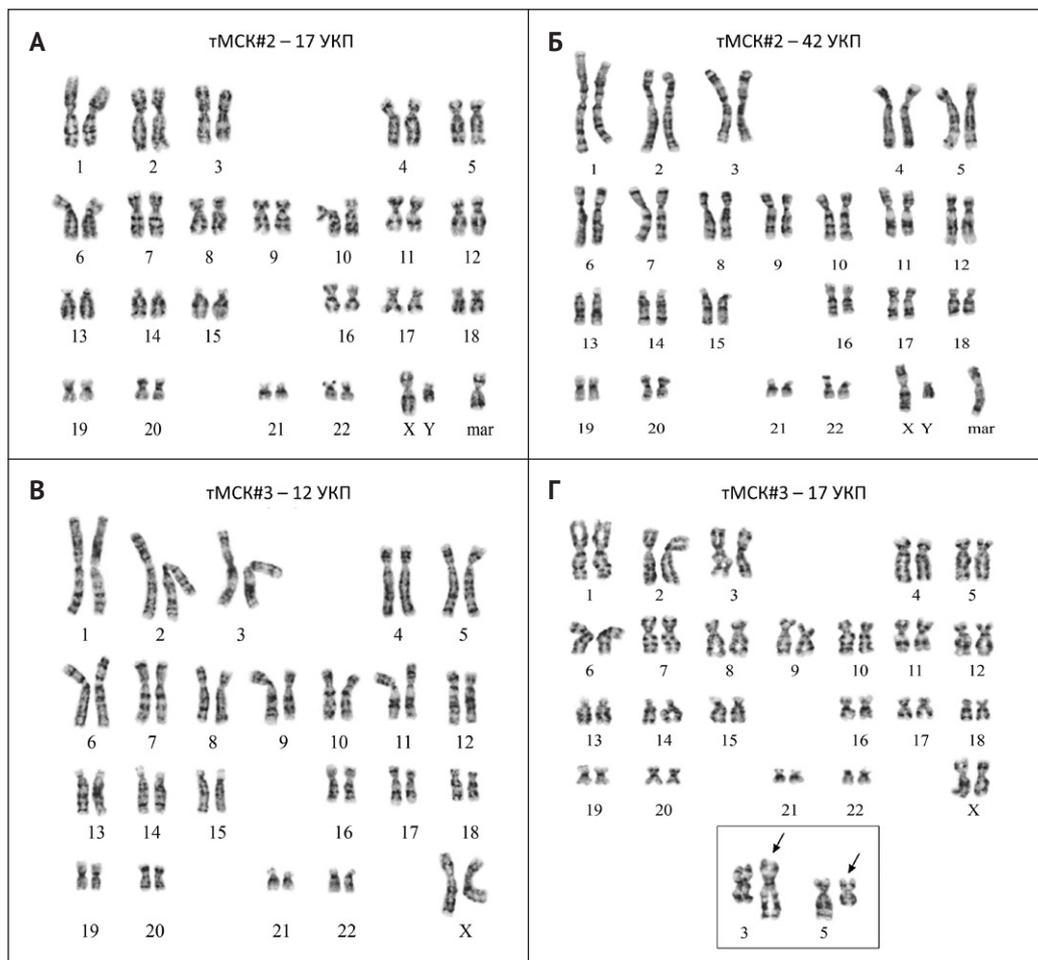


Рис. 6. Кариотипический анализ культур МСК с пролонгированным пролиферативным потенциалом: тМСК#2 и тМСК#3 с 12 по 42 УКП. Для культуры тМСК#3 показана идентифицированная транслокация $t(3;5)(q?26;q11.2)$

Кариотип клеточной популяции тМСК#3 представляет собой нормальный кариотип женщины, 46XX (рис. 6В и 6Г), однако в 17,1% клеток к 17 УКП выявлена клональная транслокация хромосом 3 и 5 — $t(3;5)(q?26;q11.2)$. Доля тетраплоидных клеток в культуре тМСК#2 к 12 УКП составила 6,4%, а к 17 УКП — 2,7%.

Гиперэкспрессия hTERT позволяет стабилизировать качественный и количественный состав секретома МСК

Чтобы оценить, как гиперэкспрессия hTERT изменяет качественный состав секретома, мы провели протеомный анализ секретомов культур пМСК#2 и тМСК#2. В ходе протеомного анализа было идентифицировано 1338 белков: 1207 белков в секретоме пМСК#2 и 1214 белков в секретоме тМСК#2. Секретомы пМСК#2 и тМСК#2 совпадали на 94,5%. Они включали нейротрофические факторы и нейропозитивные цитокины (BDNF, GDNF, MANF, NDNF, NENF, IL-6); проангиогенные факторы (VEGF-A, uPA, tPA, PlGF, PDGF, ангиопоэтин, ангиопоэтиноподобные белки-2/-4, фоллистатин, ингибин А, мидкин, MMP-2/-9, TIMP-1/-2, лептин, VASN); противовоспалительные цитокины (TGf β); факторы роста (bFGF, EGF, IGF-I, KGF, SDF-1, нейрегулины, TCN2, NEGR1, GMFB, HDGF, CTGF, PEDF, белки, связывающие инсулиноподобный фактор роста); матричные белки (фибронектин, коллаген-1a1/-4a1, ламинин-a2/b2, периостин, нейролигин-2, нидоген-1/-2); белки теплового шока (HSP70, HSP74, HSP90B1 и др.), а также молекулы, участвующие в процессе сортировки и упаковки микроРНК (в том числе нейропротекторных) во внеклеточные

везикулы (HNRNPU) [19, 20]. Ряд белков, идентифицированных в секретомах как первичных, так и геномодифицированных МСК, представляют собой внутриклеточные белки: цитоплазматические, ядерные, рибосомальные, митохондриальные и мембранные. Эти белки становятся частью клеточного секретома в результате гибели клеточных культур при кондиционировании и их включении в состав внеклеточных везикул, которые являются неотъемлемой частью клеточного секретома. Потенциальная роль таких белков в стимулировании процессов регенерации тканей не установлена.

Между секретомами пМСК#2 и тМСК#2 были обнаружены незначительные различия по содержанию молекул с доказанной протективной и прорегенеративной активностью. Так, LIF и VEGF-C были обнаружены только в секретоме пМСК#2, а RFTN1 (белок внеклеточных везикул) и OLFML3 (секретируемый матриксный белок с проангиогенными свойствами) были уникальны для секретомы тМСК#2. В секретоме пМСК#2 и тМСК#2 не было обнаружено признаков hTERT.

Количественный анализ секретомы МСК на содержание ключевых нейротрофических и проангиогенных молекул (BDNF, VEGF, uPA и HGF) показал, что гиперэкспрессия hTERT не вызвала значительных количественных изменений этих факторов роста в секретоме МСК (рис. 7А, $n \geq 3$). Концентрация этих факторов роста в секретоме тМСК#2 также не претерпела значительных изменений при пассировании с 13 по 63 УКП (рис. 7В, $n \geq 3$).

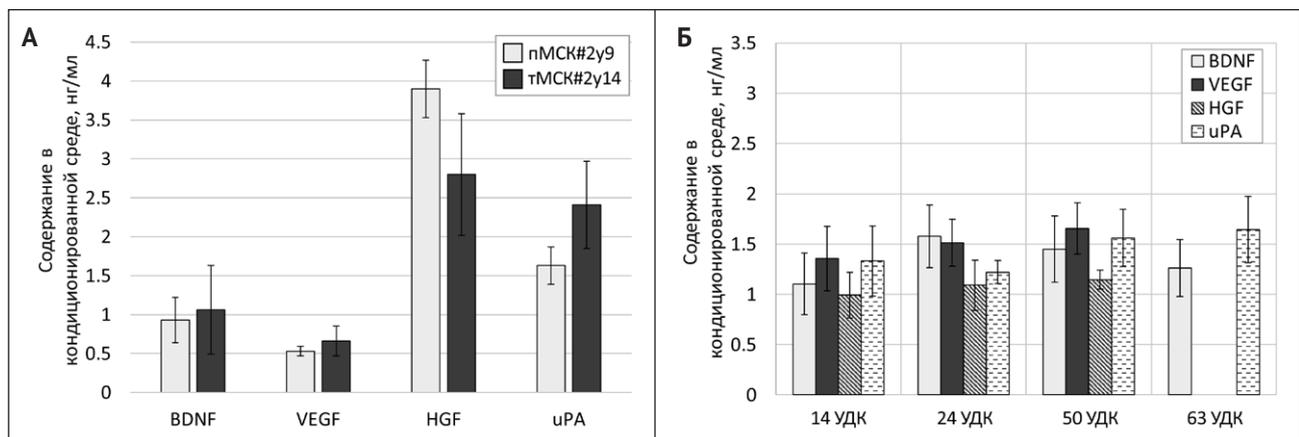


Рис. 7. Продукция проангиогенных и нейротрофических факторов культурой МСК с пролонгированным пролиферативным потенциалом. А — влияние гиперэкспрессии гена hTERT в культурах МСК на продукцию основных нейропротективных и ангиогенных факторов; Б — продукция основных нейропротективных и ангиогенных факторов культурой МСК с пролонгированным пролиферативным потенциалом (тМСК#2) в динамике (ИФА). y9 — 9 УКП и т.д., $n = 3$.

Обсуждение

Гиперэкспрессия гена каталитического компонента теломеразы человека в клеточных культурах значительно расширяет возможности их использования в фундаментальных и трансляционных исследованиях, поскольку не только пролонгирует их пролиферативный потенциал и стабилизирует их свойства, но и позволяет задействовать технологии клонирования и геномного редактирования для получения клеточных культур с искомыми свойствами [5, 21]. Так, эктопическая экспрессия гена hTERT в культурах первичных МСК человека позволила пролонгировать их пролиферативный потенциал до 38–60 УКП против 23–27 УКП, свойственных для первично выделенных культур МСК. Вопреки ожиданиям пролиферативный потенциал таких клеточных культур не был безлимитным, они старели, утрачивали свои свойства и замедляли пролиферацию, хотя и значительно позже, чем немодифицированные первичные МСК.

Ограниченный эффект гиперэкспрессии гена hTERT человека на пролонгирование жизни клеточной культуры может объясняться тем, что одно только удлинение теломер не способно предотвратить накопление мутаций в ДНК, что неизбежно приводит к активации p53 и pRB сигнальных каскадов, и в конечном итоге к блокировке клеточного цикла [22, 23]. Инактивирующие мутации в генах (p14, p16, pRB, p53 и др.), ограничивающих прогрессию клеточного цикла, позволяют преодолеть ингибирующее влияние повреждений ДНК и способствуют поддержанию высокого уровня пролиферации клеточной культуры, однако при этом такая клетка зачастую утрачивает контроль за целостностью ДНК, теряет способность к контактному торможению и утрачивает характерные свойства исходной клеточной культуры [24]. По данным литературы, существует целый ряд подходов, призванных пролонгировать пролиферативную активность клеточной культуры, однако повышение экспрессии каталитического компонента теломеразы считается одним из наименее разрушительных для физиологии клетки [25, 26], что и подтверждается результатами данного исследования.

С одной стороны, клеточные культуры, полученные через гиперэкспрессию hTERT, обладают хоть и пролонгированным, но все же ограниченным пролиферативным потенциалом, а с другой — они сохраняют все основные свойства

первичных нетрансформированных клеток: потребность в адгезии к матриксу и присутствию факторов роста, способность к контактному торможению и старению, не говоря уже о сохранности иммунофенотипического профиля, способности к дифференцировке и гормональной чувствительности. Так, анализ полученных геномодифицированных культур МСК показал, что они сохраняли чувствительность к широкому спектру гормонов не менее чем до 26 УКП, МСК-специфичный иммунофенотип — не менее чем до 36 УКП, способность к дифференцировке в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлениях — не менее чем до 39 УКП.

Одной из задач данного исследования являлось создание долгоживущей культуры мезенхимных стромальных клеток человека, которая может быть использована в качестве модельного объекта для изучения механизмов гетерологической сенситизации [27], коммитирования судьбы клеток в процессах онтогенеза и регенерации, а также роли гормонов в процессах обновления и регенерации тканей [28]. Установление данных механизмов требует применения технологий геномного редактирования, обладающих ограниченной эффективностью, что требует проведения селекции и валидации (а соответственно, и длительного культивирования) модифицированной культуры МСК. Первично выделенные культуры МСК быстро стареют в культуре (12–15 УКП), что делает их применение невозможным в таких исследованиях. Существующая коммерчески доступная линия МСК человека ASC52telo практически утратила природную чувствительность МСК к широкому спектру гормонов, что показано в данном исследовании и ранее проведенных нами исследованиях [29, 30], что подтолкнуло нас к необходимости получения новых культур МСК, обладающих продвинутым пролиферативным потенциалом и более близких по своим свойствам к природному аналогу.

Результаты оценки гормональной чувствительности показали, что полученные геномодифицированные МСК сохраняют свою чувствительность к большинству гормонов по крайней мере до 26 УКП, а к некоторым гормонам и до 65 УКП, что делает возможным использование таких клеточных культур для проведения исследований роли гормонов в процессах обновления и регенерации тканей, в том числе с использованием технологий редактирования генома.

Кариотипический анализ полученных тМСК показал, что по крайней мере часть из них несут хромосомные аберрации. Так, 17,1% клеток в культуре тМСК#3 несли клональную хромосомную транслокацию $t(3;5)(q26;q11.2)$. Одним из возможных объяснений возникшей хромосомной транслокации может являться гомологичная рекомбинация между последовательностями лентивирусного генома, интегрировавшегося в различные хромосомы целевых клеток [31, 32]. В то же время клеточная популяция тМСК#2 сохранила стабильный кариотип с 17 по 42 УКП. Поскольку интеграция лентивируса носит по большей части случайный характер, снизить вероятность хромосомных рекомбинаций можно за счет подбора оптимальных титров лентивирусных частиц, несущих ген hTERT, и раннего кариотипического скрининга полученных культур или клонов тМСК.

Полученные данные не позволяют однозначно оценить влияние процедуры генетической модификации на стабильность кариотипа МСК. Есть основания полагать, что длительная повышенная активность каталитического компонента теломеразы и пролонгирование пролиферативного потенциала клеток не приводят к дестабилизации их генома, что подтверждается рядом ранее опубликованных данных [33, 34]. Для подтверждения этого факта требуется проведение дополнительных исследований на большей выборке клеточных культур.

Важным результатом изучения свойств культуры МСК, гиперэкспрессирующей hTERT, является тот факт, что процедура генетической модификации практически не повлияла на качественный белковый состав продуктов секреции культуры МСК, а также стабилизировала количественное содержание основных проангиогенных и нейротрофических факторов, считающихся основными стимуляторами регенеративных процессов, в составе секрета МСК [35, 36].

Возможность отсрочить старение культур МСК человека позволяет использовать их в целом ряде продолжительных исследований, посвященных изучению вопросов гетерогенности культур МСК, особенностей их внутриклеточной сигнализации (в том числе с применением технологий редактирования генома) и стабилизации качественного и количественного состава секрета МСК и др. (собственные неопу-

бликованные данные). Коммерчески доступная линия МСК ASC52telo, в противоположность полученным культурам тМСК, продемонстрировала ряд свойств, характерных для трансформированных клеточных культур: нарушение дифференцировочного потенциала, отсутствие контактного торможения и сниженная чувствительность к присутствию факторов роста, что накладывает определенные ограничения на экстраполирование данных, полученных с ее использованием, на первично выделенные культуры МСК.

Для большей объективности данного исследования стоит упомянуть ограничения данной технологии. Прежде всего, полученные культуры тМСК обладают ограниченным пролиферативным потенциалом и со временем стареют, хотя и значительно позже по сравнению с первичными МСК, т.е. не удалось добиться истинной их иммортализации, предполагающей безграничную пролиферацию клеток. Предложенный подход по продлению пролиферативной активности клеточной культуры через гиперэкспрессию hTERT является действенным и актуальным лишь для ряда клеточных популяций (МСК, фибробластов). Попытка воспроизвести данный протокол в культурах первичных моноцитов, эпителиоцитов и клеток Лейдига успехом не увенчались (собственные неопубликованные данные). Это согласуется с данными литературы, что эффективная иммортализация большинства клеточных линий требует коэкспрессии hTERT и, по крайней мере, одного из ингибиторов регуляторов клеточного цикла (p14, p16 или pRB) [24]. Значимым ограничением предлагаемого подхода является возможность возникновения хромосомной транслокации в модифицируемой культуре клеток, что, предположительно, может быть обусловлено одномоментной интеграцией генома лентивирусной частицы в различные хромосомы эукариотической клетки с последующей гомологичной рекомбинацией по данным участкам. Впрочем, данное ограничение может быть преодолено подбором оптимального титра лентивирусных частиц, а также проведением раннего скрининга кариотипа культур МСК, гиперэкспрессирующих hTERT. Крайне важным при анализе свойств полученных культур тМСК является проведение сравнения с исходными культурами ввиду высокой тканеспецифичности и пациентспецифичной гетерогенности свойств первичных культур МСК. Причем полное совпадение

свойств пМСК и полученных из них тМСК не является обязательным — критически важным является соответствие изучаемых свойств.

Таким образом, проведенное исследование показало, что гиперэкспрессия в культурах МСК каталитического компонента теломеразы (хотя и с перечисленными ограничениями) является эффективным и достаточно воспроизводимым подходом получения культур тМСК с пролонгированным пролиферативным потенциалом при сохранности широкого спектра МСК-специ-

фичных свойств. Полученные культуры тМСК являются стабильным и удобным объектом для исследований и могут быть использованы для решения широкого спектра фундаментальных и прикладных задач.

Финансирование: Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №19-75-30007), <https://rscf.ru/project/19-75-30007/>

Funding: The study was funded by the Russian Science Foundation No 19-75-30007, <https://rscf.ru/project/19-75-30007/>

Литература

1. Varier P, Raju G, Madhusudanan P, Jerard C, Shankarappa SA. A Brief Review of In Vitro Models for Injury and Regeneration in the Peripheral Nervous System. *Int J Mol Sci.* 2022;23(2):816. DOI: 10.3390/ijms23020816
2. Karagyaur M, Primak A, Efimenko A, Skryabina M, Tkachuk V. The Power of Gene Technologies: 1001 Ways to Create a Cell Model. *Cells.* 2022;11(20):3235. DOI: 10.3390/cells11203235
3. Voloshin N, Tyurin-Kuzmin P, Karagyaur M, Akopyan Z, Kulebyakin K. Practical Use of Immortalized Cells in Medicine: Current Advances and Future Perspectives. *Int J Mol Sci.* 2023;24(16):12716. DOI: 10.3390/ijms241612716
4. Lenz LS, Wink MR. The other side of the coin: mesenchymal stromal cell immortalization beyond evasion of senescence. *Hum Cell.* 2023;36(5):1593–1603. DOI: 10.1007/s13577-023-00925-3
5. Basalova N, Illarionova M, Skryabina M, Vigovskiy M, Tolstoluzhinskaya A, Primak A, et al. Advances and Obstacles in Using CRISPR/Cas9 Technology for Non-Coding RNA Gene Knockout in Human Mesenchymal Stromal Cells. *Noncoding RNA.* 2023;9(5):49. DOI: 10.3390/ncrna9050049
6. Hahn WC. immortalization and transformation of human cells. *Mol Cells.* 2002;13(3):351–361, DOI: 10.1016/S1016-8478(23)15045-X
7. Meltzer PS, Guan XY, Trent JM. Telomere capture stabilizes chromosome breakage. *Nat Genet.* 1993;4(3):252–255. DOI: 10.1038/ng0793-252
8. Richter M, Piwocka O, Musielak M, Piotrowski I, Suchorska WM, Trzeciak T. From Donor to the Lab: A Fascinating Journey of Primary Cell Lines. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:711381. DOI: 10.3389/fcell.2021.711381
9. Longo PA, Kavran JM, Kim MS, Leahy DJ. Transient mammalian cell transfection with polyethylenimine (PEI). *Methods Enzymol.* 2013;529:227–240. DOI: 10.1016/B978-0-12-418687-3.00018-5
10. Tyurin-Kuzmin PA, Karagyaur MN, Kulebyakin KY, Dyikanov DT, Chechekhin VI, Ivanova AM, et al. Functional Heterogeneity of Protein Kinase A Activation in Multipotent Stromal Cells. *Int J Mol Sci.* 2020;21(12):4442. DOI: 10.3390/ijms21124442
11. Böcker W, Yin Z, Drosse I, Haasters F, Rossmann O, Wierer M, et al. Introducing a single-cell-derived human mesenchymal stem cell line expressing hTERT after lentiviral gene transfer. *J Cell Mol Med.* 2008;12(4):1347–1359. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2008.00299.x
12. Jun ES, Lee TH, Cho HH, Suh SY, Jung JS. Expression of telomerase extends longevity and enhances differentiation in human adipose tissue-derived stromal cells. *Cell Physiol Biochem.* 2004;14(4–6):261–268. DOI: 10.1159/000080335
13. Kulebyakin K, Tyurin-Kuzmin P, Efimenko A, Voloshin N, Kartoshkin A, Karagyaur M, et al. Decreased Insulin Sensitivity in Telomerase-Immortalized Mesenchymal Stem Cells Affects Efficacy and Outcome of Adipogenic Differentiation in vitro. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:662078. DOI: 10.3389/fcell.2021.662078

14. Ozkinay C, Mitelman F. A simple trypsin-Giemsa technique producing simultaneous G- and C-banding in human chromosomes. *Hereditas*. 1979;90(1):1–4. DOI: 10.1111/j.1601-5223.1979.tb01287.x
15. An International System for Human Cytogenomic Nomenclature. Eds. McGowan-Jordan J, Hastings RS, Moore S. S.Karger AG, Basel (Switzerland), 2020. DOI: 10.1159/isbn.978-3-318-06867-2
16. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, et al. Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement. *Cytotherapy*. 2006;8:315–317. DOI: 10.1080/14653240600855905
17. Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*. 2013;15(6):641–648. DOI: 10.1016/j.jcyt.2013.02.006
18. Viswanathan S., Shi Y., Galipeau J., Krampera M., Leblanc K., Martin I. et al. Mesenchymal Stem versus Stromal Cells: International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT®) Mesenchymal Stromal Cell Committee Position Statement on Nomenclature. *Cytother*. 2019;21(10):1019–1024. DOI: 10.1016/j.jcyt.2019.08.002
19. Zietzer A, Hosen MR, Goody PR, Werner N, Nickenig G, Jansen F. HnRNPU regulates intra- and intercellular microRNA trafficking in a sequence specific manner, *Europ Heart J*. 2020;41(Suppl. 2):ehaa946.3611. DOI: 10.1093/ehjci/ehaa946.3611
20. Zietzer A, Hosen MR, Wang H, Goody PR, Sylvester M, Latz E, et al. The RNA-binding protein hnRNPU regulates the sorting of microRNA-30c-5p into large extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*. 2020;9(1):1786967. DOI: 10.1080/20013078.2020.1786967
21. Karagyaur M, Primak A, Efimenko A, Skryabina M, Tkachuk V. The Power of Gene Technologies: 1001 Ways to Create a Cell Model. *Cells*. 2022;11(20):3235. DOI: 10.3390/cells11203235
22. Chen J. The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016;6(3):a026104. DOI: 10.1101/cshperspect.a026104
23. Engeland K. Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling. *Cell Death Differ*. 2022;29(5):946–960. DOI: 10.1038/s41418-022-00988-z
24. Simon M, Köster G, Menon AG, Schramm J. Functional evidence for a role of combined CDKN2A (p16-p14(ARF))/CDKN2B (p15) gene inactivation in malignant gliomas. *Acta Neuro-pathol*. 1999;98(5):444–452. DOI: 10.1007/s004010051107
25. Toouli CD, Huschtscha LI, Neumann AA, Noble JR, Colgin LM, Hukku B, Reddel RR. Comparison of human mammary epithelial cells immortalized by simian virus 40 T-Antigen or by the telomerase catalytic subunit. *Oncogene*. 2002;21(1):128–139. DOI: 10.1038/sj.onc.1205014
26. Jiang XR, Jimenez G, Chang E, Frolkis M, Kusler B, Sage M, et al. Telomerase expression in human somatic cells does not induce changes associated with a transformed phenotype. *Nat Genet*. 1999;21(1):111–114. DOI: 10.1038/5056
27. Tyurin-Kuzmin PA, Karagyaur MN, Kulebyakin KY, Dyikanov DT, Chechekhin VI, Ivanova AM, et al. Functional Heterogeneity of Protein Kinase A Activation in Multipotent Stromal Cells. *Int J Mol Sci*. 2020;21(12):4442. DOI: 10.3390/ijms21124442
28. Воронцова МВ, Кулебякин КЮ, Маказан НВ, Созаева ЛС, Тюрин-Кузьмин ПА. Паратиреоидный гормон в регуляции процессов роста и резорбции кости в норме и патологии. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2021;76(5):506–517. [Vorontsova MV, Kulebyakin KY, Makazan NV, Sozaeva LS, Tyurin-Kuzmin PA. Parathyroid hormone in the regulation of bone growth and resorption processes in norm and pathology. *Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2021;76(5):506-517].
29. Kulebyakin K, Tyurin-Kuzmin P, Efimenko A, Voloshin N, Kartoshkin A, Karagyaur M, et al. Decreased Insulin Sensitivity in Telomerase-Immortalized Mesenchymal Stem Cells Affects Efficacy and Outcome of Adipogenic Differentiation in vitro. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:662078. DOI: 10.3389/fcell.2021.662078
30. Tyurin-Kuzmin PA, Chechekhin VI, Ivanova AM, Dyikanov DT, Sysoeva VY, Kalinina NI, Tkachuk VA. Noradrenaline Sensitivity Is Severely Impaired in Immortalized

- Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell Line. *Int J Mol Sci.* 2018;19(12):3712. DOI: 10.3390/ijms19123712
31. Cai Y, Laustsen A, Zhou Y, Sun C, Anderson MV, Li S, et al. Targeted, homology-driven gene insertion in stem cells by ZFN-loaded ‘all-in-one’ lentiviral vectors. *Elife.* 2016;5:e12213. DOI: 10.7554/eLife.12213
 32. Kane NM, Nowrouzi A, Mukherjee S, Blundell MP, Greig JA, Lee WK, et al. Lentivirus-mediated Reprogramming of Somatic Cells in the Absence of Transgenic Transcription Factors. *Mol Ther.* 2010;18(12):2139–2145. DOI: 10.1038/mt.2010.231
 33. Barsov EV. Telomerase and primary T cells: biology and immortalization for adoptive immunotherapy. *Immunotherapy.* 2011;3(3):407–421. DOI: 10.2217/imt.10.107
 34. Dos Santos A, Lyu N, Balayan A, Knight R, Zhuo KS, Sun Y, et al. Generation of Functional Immortalized Human Corneal Stromal Stem Cells. *Int J Mol Sci.* 2022;23(21):13399. DOI: 10.3390/ijms232113399
 35. Kalinina N, Kharlampieva D, Loguinova M, Butenko I, Pobeguts O, Efimenko A, et al. Characterization of secretomes provides evidence for adipose-derived mesenchymal stromal cells subtypes. *Stem Cell Res Ther.* 2015;6:221. DOI: 10.1186/s13287-015-0209-8
 36. Carvalho MM, Teixeira FG, Reis RL, Sousa N, Salgado AJ. Mesenchymal stem cells in the umbilical cord: phenotypic characterization, secretome and applications in central nervous system regenerative medicine. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2011;6(3):221–228. DOI: 10.2174/157488811796575332

Об авторах

Примак Александра Леонидовна — аспирант, лаборант-исследователь НИЛ генных и клеточных технологий, факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Калинина Наталья Игоревна — к.б.н., ведущий научный сотрудник, Научно-исследовательская лаборатория генных и клеточных технологий, факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Скрябина Мария Никитична — студентка, факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Усачев Владимир Александрович — лаборант, межфакультетская научно-исследовательская лаборатория трансляционной медицины, факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Чечехин Вадим Игоревич — к.б.н., младший научный сотрудник, НИЛ генных и клеточных технологий, факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Виговский Максим Александрович — лаборант, лаборатория репарации и регенерации тканей, Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр МГУ имени М.В. Ломоносова.

Чечехина Елизавета Сергеевна — лаборант, кафедра биохимии и регенеративной биомедицины, факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Волошин Никита Сергеевич — лаборант, кафедра биохимии и регенеративной биомедицины, факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Кулебякин Константин Юрьевич — к.б.н., доцент, кафедра биохимии и регенеративной биомедицины, факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Кулебякина Мария Александровна — младший научный сотрудник, НИЛ генных и клеточных технологий, факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Григорьева Ольга Александровна — к.б.н., научный сотрудник, лаборатория репарации и регенерации тканей, Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр МГУ имени М.В. Ломоносова.

Примак А.Л. и соавт.

Доставка TERT для получения культур МСК

Тюрин-Кузьмин Петр Алексеевич — к.б.н., доцент, факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Яковлева Татьяна Кирилловна — к.б.н., старший научный сотрудник, лаборатория морфологии клетки ФГБУН «Институт цитологии» РАН.

Турилова Виктория Игоревна — ведущий инженер, лаборатория морфологии клетки ФГБУН «Институт цитологии» РАН.

Шагимарданова Елена Ильясовна — к.б.н., ведущий научный сотрудник, Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский федеральный (Приволжский) университет.

Газизова Гузель Рашитовна — научный сотрудник, Институт фундаментальной медицины и биологии Казанского федерального (Приволжского) университета.

Басалова Наталия Андреевна — к.б.н., младший научный сотрудник, Институт регенеративной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Ефименко Анастасия Юрьевна — к.м.н., зав. лабораторией, Институт регенеративной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова; доцент, факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Джауари Сталик Станиславович — аспирант, лаборант-исследователь НИЛ генных и клеточных технологий, факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Антропова Юлия Георгиевна — к.б.н., старший научный сотрудник, кафедра биохимии и регенеративной биомедицины, факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Плющий Иван Владимирович — магистр, кафедра биохимии и регенеративной биомедицины, факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Акопян Жанна Алексеевна — к.м.н., заместитель директора, Медицинский научно-образовательный центр МГУ имени М.В. Ломоносова; заведующий кафедрой, факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Сысоева Вероника Юрьевна — к.б.н., ведущий научный сотрудник, лаборатория морфогенеза и репарации тканей, факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Ткачук Всеволод Арсеньевич — академик РАН, директор Института регенеративной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова; декан факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Карагаюр Максим Николаевич — к.б.н., старший научный сотрудник, Институт регенеративной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова; доцент, факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Authors

Alexandra L. Primak — post-graduate researcher, Laboratory Researcher, Laboratory of Gene and Cell Technologies, Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University.

Natalia I. Kalinina — Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Gene and Cell Technologies, Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University.

Maria N. Skryabina — student, Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University.

Vladimir A. Usachev — PhD student, Laboratory Assistant, Laboratory of Translational Medicine, Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University.

Vadim I. Chechekhin — Cand. Sci. (Biology), Junior Researcher, Laboratory of Gene and Cell Technologies, Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University.

Maksim A. Vigovskiy — PhD student, Laboratory Assistant, Laboratory of Tissue Repair and Regeneration, Institute for Regenerative Medicine, Lomonosov Moscow State University.

Elizaveta S. Chechekhina — PhD student, Laboratory Assistant, Department of Biochemistry and Regenerative Biomedicine, Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University.

Nikita S. Voloshin — PhD student, Laboratory Assistant, Department of Biochemistry and Regenerative Biomedicine, Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University.

Konstantin Yu. Kulebyakin — Cand. Sci. (Biology), Associate Professor, Department of Biochemistry and Regenerative Biomedicine, Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University.

Maria A. Kulebyakina — PhD student, Junior Researcher, Laboratory of Gene and Cell Technologies, Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University.

Olga A. Grigorieva — Cand. Sci. (Biology), Research Associate, Laboratory of Tissue Repair and Regeneration, Institute for Regenerative Medicine, Lomonosov Moscow State University.

Pyotr A. Tyurin-Kuzmin — Cand. Sci. (Biology), Associate Professor, Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University.

Tatiana K. Yakovleva — Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Cell Morphology, Institute of Cytology Russian Academy of Sciences.

Victoria I. Turylova — Leading Engineer, Laboratory of Cell Morphology, Institute of Cytology Russian Academy of Sciences.

Elena I. Shagimardanova — Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal (Volga Region) University.

Guzel R. Gazizova — Researcher, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal (Volga Region) University.

Natalia A. Basalova — Cand. Sci. (Biology), Junior Researcher, Institute for Regenerative Medicine, Lomonosov Moscow State University.

Anastasia Yu. Efimenko — Cand. Sci. (Medicine), Head of Laboratory, Institute for Regenerative Medicine, Lomonosov Moscow State University; Associate Professor, Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University.

Stalik S. Dzhuari — post-graduate researcher, Laboratory Researcher, Laboratory of Gene and Cell Technologies, Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University.

Yulia G. Antropova — Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, Department of Biochemistry and Regenerative Biomedicine, Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University.

Ivan V. Plyushchii — Master's Student, Department of Biochemistry and Regenerative Biomedicine, Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University.

Zhanna A. Akopyan — Cand. Sci. (Medicine), Deputy Director, Medical Research and Education Centre, Lomonosov Moscow State University; Head of the Department, Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University.

Veronika Yu. Sysoeva — Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Morphogenesis and Tissue Repair, Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University.

Vsevolod A. Tkachuk — Academician of the Russian Academy of Sciences, Director of the Institute for Regenerative Medicine, Lomonosov Moscow State University; Dean of the Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University.

Maxim N. Karagyaur — Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, Institute for Regenerative Medicine, Lomonosov Moscow State University; Associate Professor, Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University.