

TISSUE AND ORGAN REGENERATION

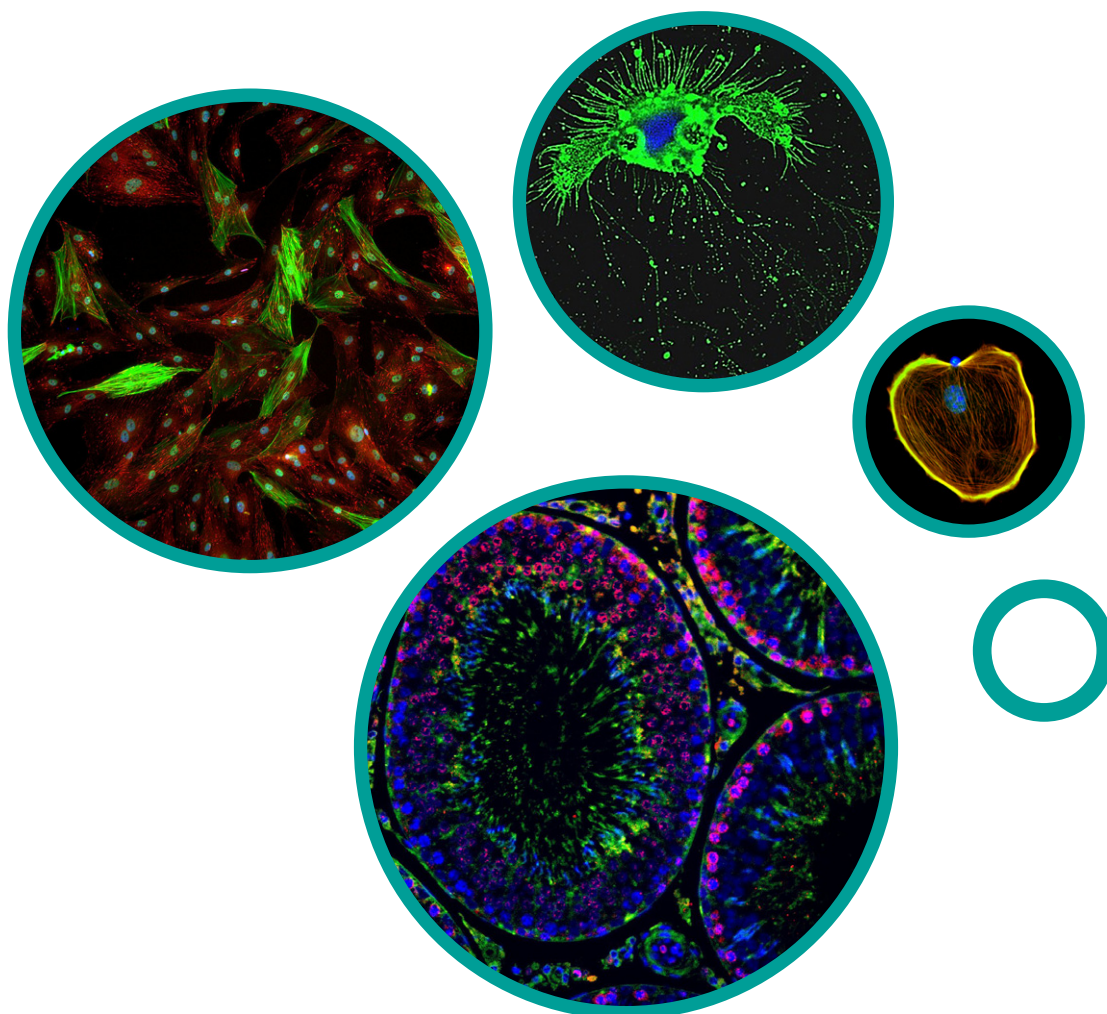
РЕГЕНЕРАЦИЯ

органов и тканей

Регенеративная биомедицина Евразии

2

Том (Vol.) 2
2024



ОБЩЕСТВО
РЕГЕНЕРАТИВНОЙ
МЕДИЦИНЫ

ISSN 2949-5938

Цели и задачи

Ключевой задачей журнала является создание площадки для освещения и диалога об основных достижениях, проблемах и задачах регенеративной биомедицины, а также обобщение современных представлений о фундаментальных механизмах регенерации тканей и органов.

Концепция журнала предусматривает всестороннее освещение вопросов, связанных с выяснением механизмов регенерации и обновления тканей, а также с возможностью разработки и практического применения подходов регенеративной биомедицины. Важным аспектом также является формирование и развитие этой отрасли науки как самостоятельного направления на стыке физиологии, клеточной биологии, биологии развития, биохимии и наук о материалах.

Главный редактор

В.А. Ткачук, д-р биол. наук, профессор, академик РАН, декан Факультета фундаментальной медицины, директор Института регенеративной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 5515-4266

Заместитель главного редактора

П.И. Макаревич, канд. мед. наук, заведующий лабораторией генно-клеточной терапии Института регенеративной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 7259-9180

Редактор выпуска

В.А. Ткачук, д-р биол. наук, профессор, академик РАН, декан Факультета фундаментальной медицины, директор Института регенеративной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 5515-4266

Редакционная коллегия

В.В. Белоусов, д-р биол. наук, чл.-корр. РАН, генеральный директор ФБГУ «Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России» (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 6517-8373

Л.Б. Буравкова, д-р мед. наук, профессор, чл.-корр. РАН, заместитель директора по научной работе ФГБУ «ГНЦ РФ — Институт медико-биологических проблем РАН» (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 8594-2532

Д.В. Бутнару, канд. мед. наук, доцент, проректор по международной деятельности, заместитель директора по научной работе ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет) (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 2408-5133

М.В. Воронцова, канд. мед. наук, заместитель декана по науке Факультета фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 4168-6851

Е.А. Воротеляк, д-р биол. наук, чл.-корр. РАН, руководитель лаборатории клеточной биологии ФГБУН «Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН» (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 2310-9118

М.М. Галагудза, д-р мед. наук, профессор, чл.-корр. РАН, директор Института экспериментальной медицины ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия) eLibrary SPIN: 2485-4176

И.И. Еремин, канд. мед. наук, заместитель директора по научной работе ФГБУН «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского» (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 6098-7226

А.Ю. Ефименко, канд. мед. наук, заведующий лабораторией репарации и регенерации тканей Института регенеративной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 5110-5998

М.Н. Карагяур, канд. биол. наук, доцент кафедры биохимии и регенеративной биомедицины Факультета фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 9504-4257

М.А. Лагарькова, д-р биол. наук, чл.-корр. РАН, генеральный директор ФГБУ «ФНКЦ физико-химической медицины им. акад. Ю.М. Лопухина ФМБА России» (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 4315-1701

М.А. Масчан, д-р мед. наук, профессор, заместитель генерального директора-директор Института молекулярной и экспериментальной медицины ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Минздрава России (Москва, Россия) Scopus Author ID: 562880

К.А. Рубина, д-р биол. наук, профессор РАН, руководитель лаборатории морфогенеза и репарации тканей Факультета фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 9471-2511

Е.В. Семина, д-р биол. наук, заместитель руководителя по развитию и проектной деятельности ОНК «Институт медицины и наук о жизни» ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта» (Калининград, Россия) eLibrary SPIN: 4586-4001

В.И. Севастьянов, д-р мед. наук, профессор, директор АНО «Институт медико-биологических исследований и технологий» (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 2895-1090

Н.С. Сергеева, д-р биол. наук, профессор, заведующая отделением прогноза эффективности консервативного лечения МНИОИ имени П.А. Герцена — филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 1805-8141

О.В. Степанова, канд. биол. наук, руководитель лаборатории клеточной биологии и регенеративной медицины отдела фундаментальной и прикладной нейробиологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Минздрава России (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 8229-8935

А.Н. Томилин, д-р биол. наук, чл.-корр. РАН, директор ФГБУН Институт цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия) eLibrary SPIN: 8079-5581

Редакционный совет

А.В. Васильев, д-р биол. наук, профессор, чл.-корр. РАН, директор ФГБУН «Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН» (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 7050-9087

В.В. Власов, д-р хим. наук, профессор, академик РАН, научный руководитель ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН» (Новосибирск, Россия) eLibrary SPIN: 6416-3640

С.В. Готье, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, директор ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 5969-5749

Н.И. Дризе, д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией физиологии кроветворения ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 1705-2900

С.М. Закиян, д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией эпигенетики развития ФИЦ «Институт цитологии и генетики СО РАН» (Новосибирск, Россия) eLibrary SPIN: 7274-2622

А.Д. Каприн, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, генеральный директор ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 1759-8101

С.А. Лукьянов, д-р биол. наук, профессор, академик РАН, Ректор ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 2920-8861

Е.В. Парфенова, д-р мед. наук, профессор, чл.-корр. РАН, Заместитель генерального директора — директор НИИ экспериментальной кардиологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова» Минздрава России (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 9042-7848

Г.Т. Сухих, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, директор ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 9374-5710

В.П. Чехонин, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, заведующий отделом медицинских нанобиотехнологий НИИ трансляционной медицины ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 8292-2807

Е.Л. Чойнзонов, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, директор НИИ онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН» (Томск, Россия) eLibrary SPIN: 2240-8730

Е.В. Шляхто, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, генеральный директор ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова» Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия) eLibrary SPIN: 6679-7621

К.Н. Ярыгин, д-р биол. наук, профессор, чл.-корр. РАН, заведующий лабораторией клеточной биологии ФГБНУ «НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича» (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 7567-1230

Периодичность	выходит 4 раза в год
Префикс DOI	https://doi.org/10.60043
ISSN	2949-5938
Свидетельство о регистрации средства массовой информации	Серия Эл № ФС77-83582 от 13 июля 2022 г. выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)
Учредитель, издатель, редакция	Региональная общественная организация «Общество регенеративной медицины» (ОГРН 1187700008165)
Адрес	119991, г. Москва, Ломоносовский пр-т, д. 27, к. 1
Телефон редакции	+7 (999) 922-41-19
Сайт	https://regmed-journal.ru/
e-mail	journal@regmedru.com
Выход в свет	31.03.2024
Копирайт	© Региональная общественная организация «Общество регенеративной медицины», оформление, 2024
Журнал открыт для ознакомления на сайте	https://regmed-journal.ru
Цена	распространяется бесплатно
Условия распространения материалов:	Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0 License.
Редакторы-корректоры	И.С. Пигулевская, Л.А. Зелексон
Верстка	О.В. Храмова

В оформлении обложки использованы микрофотографии, полученные д.б.н. Е.В. Семиной и к.б.н. Н.А. Басаловой.

Aims and scope

The key objective of the journal is to create a platform for coverage and dialogue about the main achievements, problems and tasks of regenerative biomedicine, as well as to summarize modern ideas about the fundamental mechanisms of tissue and organ regeneration.

The concept of the journal provides comprehensive coverage of issues related to elucidating the mechanisms of tissue regeneration and renewal, as well as the possibility of developing and practical application of regenerative biomedicine approaches. An important aspect is also the formation and development of this branch of science as an independent direction at the intersection of physiology, cell biology, developmental biology, biochemistry and materials sciences.

Editor-in-Chief

Vsevolod A. Tkachuk, Dr.Sci. (Medicine), Professor, Full Member of RAS, Dean of Faculty of medicine, Director of Institute for Regenerative Medicine, Moscow State University named after M.V. Lomonosov (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 5515-4266

Deputy Editor-in-Chief

Pavel I. Makarevich, MD, Cand.Sci. (Medicine), Head of the Laboratory of Gene and Cell Therapy, Institute for Regenerative Medicine, Moscow State University named after M.V. Lomonosov (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 7259-9180

Editor of the Issue

Vsevolod A. Tkachuk, Dr. Sci. (Biology), Professor, Full Member of RAS, Dean of Faculty of medicine, Director of Institute for Regenerative Medicine, Moscow State University named after M.V. Lomonosov (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 5515-4266

Editorial board

Vsevolod V. Belousov, Dr. Sci. (Medicine), Corresponding Member of RAS, General Director of the Federal Center for Brain and Neurotechnologies FMBA of Russia (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 6517-8373

Lyudmila B. Buravkova, Dr.Sci. (Medicine), Professor, Corresponding Member of RAS, Deputy Director, Institute of Medical and Biological Problems of RAS (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 8594-2532

Denis V. Butnaru, MD, Dr.Sci. (Medicine), Associate Professor, Vice-Rector for International Affairs, Deputy Director for Scientific Work of the Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education First Moscow State Medical University named after I.M. Sechenov, Ministry of Health of Russia (Sechenov University), (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 2408-5133

Maria V. Vorontsova, MD, Dr.Sci. (Medicine), Deputy Dean for Science, Faculty of Medicine, Moscow State University named after M.V. Lomonosov (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 4168-6851

Ekaterina A. Vorotelyak, Dr. Sci. (Biology), Corresponding Member of RAS, Head of the laboratory of cell biology of the Federal State Budgetary Institution Institute of Developmental Biology named after N.K. Koltsov of RAS (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 2310-9118

Mikhail M. Galagudza, Dr. Sci. (Biology), Professor, Corresponding Member of RAS, Director of the Institute of Experimental Medicine of the Federal State Budgetary Institution National Medical Research Center named after V. A. Almazov, Ministry of Health of Russia (St. Petersburg, Russia) eLibrary SPIN: 2485-4176

Ilya I. Eremin, MD, Dr.Sci. (Medicine), Deputy Director for Scientific Work of the Federal State Budgetary Institution

Russian Scientific Center for Chemistry named after Academician B.V. Petrovsky (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 6098-7226

Anastasia Yu. Efimenko, MD, Dr.Sci. (Medicine), Head of the Laboratory of Tissue Repair and Regeneration, Institute for Regenerative Medicine, Moscow State University named after M.V. Lomonosov (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 5110-5998

Maxim N. Karagyaur, MD, Dr.Sci. (Biology), Associate Professor of the Department of Biochemistry and Regenerative Medicine, Faculty of Medicine, Moscow State University named after M.V. Lomonosov (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 9504-4257

Maria A. Lagarkova, Dr. Sci. (Biology), Corresponding Member of RAS, Director General of the Federal State Budgetary Institution Federal Research Center for Physical and Chemical Medicine, Federal Medical and Biological Agency (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 4315-1701

Mikhail A. Maschan, MD, Dr. Sci. (Medicine), Professor, Deputy Director General, Director of the Institute of Molecular and Experimental Medicine of the Federal State Budgetary Institution National Medical Research Center for Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia) Scopus Author ID: 562880

Ksenia A. Rubina, Dr. Sci. (Biology), Professor of RAS, Head of the Laboratory of Morphogenesis and Tissue Reparation, Faculty of Medicine, Moscow State University named after M.V. Lomonosov (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 9471-2511

Ekaterina V. Semina, Dr. Sci. (Biology), Deputy Head for Development and Project Activities at the Institute of Medicine and Life Sciences, Immanuel Kant Baltic Federal University (Kaliningrad, Russia) eLibrary SPIN: 4586-4001

Viktor I. Sevastyanov, Dr. Sci. (Medicine), Professor, Director of the Institute of Biomedical Research and Technology (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 2895-1090

Natalya S. Sergeeva, Dr. Sci. (Biology), Professor, Head of the Department of Prediction of the Effectiveness of Conservative Treatment, Moscow Research Institute named after P.A. Herzen — branch of the Federal State Budgetary Institution National Medical Research Center of Radiology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 1805-8141

Olga V. Stepanova, Dr.Sci. (Biology), Head of the Laboratory of Cell Biology and Regenerative Medicine, Department of Fundamental and Applied Neurobiology Federal State Budgetary Institution National Medical Research Center for Psychiatry and Narcology named after V.P. Serbsky, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 8229-8935

Alexei N. Tomilin, Dr. Sci. (Biology), Corresponding Member of RAS, Director of the Federal State Budgetary Institution of Science Institute of Cytology RAS (Saint Petersburg, Russia) eLibrary SPIN: 8079-5581

Editorial Council

Andrey V. Vasiliev, Dr. Sci. (Biology), Professor, Corresponding Member of RAS, Director of the Federal State Budgetary Institution Institute of Developmental Biology named after N.K. Koltsov RAS (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 7050-9087

Valentin V. Vlasov, Dr. Sci. (Chemistry), Professor, Full Member of RAS, Scientific Director of the Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of SB RAS (Novosibirsk, Russia) eLibrary SPIN: 6416-3640

Sergey V. Gauthier, MD, Dr. Sci. (Medicine), Professor, Full Member of RAS, Director of the National Medical Research Center for Transplantology and Artificial Organs named after Academician V.I. Shumakov, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 5969-5749

Nina I. Drize, Dr. Sci. (Biology), Professor, Head of the Laboratory of Physiology of Hematopoiesis, National Medical Research Center of Hematology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 1705-2900

Suren M. Zakiyan, Dr. Sci. (Biology), Professor, Head of the Laboratory of Developmental Epigenetics, Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of SB RAS (Novosibirsk, Russia) eLibrary SPIN: 7274-2622

Andrey D. Kaprin, Dr.Sci. (Medicine), Professor, Full Member of RAS, Director General of the Federal State Budgetary Institution National Medical Research Center of Radiology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 1759-8101

Sergey A. Lukyanov, Dr. Sci. (Biology), Professor, Full Member of RAS, Rector of the Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 2920-8861

Yelena V. Parfyonova, Dr. Sci. (Medicine), Professor, Corresponding Member of RAS, Deputy General Director — Director of the Research Institute of Experimental Cardiology, Federal State Budgetary Institution National Medical Research Center for Cardiology named after Academician E.I. Chazov of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 9042-7848

Gennady T. Sukhikh, Dr. Sci. (Medicine), Professor, Full Member of RAS, Director of the Federal State Budgetary Institution National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 9374-5710

Vladimir P. Chekhonin, Dr. Sci. (Medicine), Professor, Full Member of RAS, Head of the Department of Medical Nanobiotechnologies, Research Institute of Translational Medicine, Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 8292-2807

Evgeny L. Choinzonov, Dr. Sci. (Medicine), Professor, Full Member of RAS, Director of the Oncology Research Institute of the Tomsk National Research Medical Center (Tomsk, Russia) eLibrary SPIN: 2240-8730

Evgeny V. Shlyakhto, Dr. Sci. (Medicine), Professor, Full Member of RAS, Director General of the Federal State Budgetary Institution National Medical Research Center named after V.A. Almazov, Ministry of Health of Russia (St. Petersburg, Russia) eLibrary SPIN: 6679-7621

Konstantin N. Yarygin, Dr. Sci. (Biology), Professor, Corresponding Member of RAS, Head of the Laboratory of Cell Biology, Research Institute of Biomedical Chemistry named after V.N. Orekhovich (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 7567-1230

Frequency	quarterly
DOI Prefix	https://doi.org/10.60043
ISSN	2949-5938
Certificate and Registry	Certificate of mass media registration series EI No. FS77-83582 dated July 13, 2022 issued by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technologies and Mass Communications (Roskomnadzor)
Founder, publisher, editorial office	Regional public organization “Society of Regenerative Medicine” (OGRN 1187700008165)
Address	119991, Moscow, Lomonosovsky Prospekt, 27, building 1
Editorial phone	+7 (999) 922-41-19
Website	https://regmedjournal.ru/
e-mail	journal@regmedru.com
The publication	31.03.2024
Copyright	© Regional public organization “Society of Regenerative Medicine”, layout, 2024
Online open access:	https://regmed-journal.ru
Price	free
Distribution	The content is distributed under the Creative Common License CC BY
Editors and proofreaders	Irina S. Pigulevskaya, Lev A. Zelexon
Layout	Olga V. Khranova

- 6** **ОТ РЕДАКЦИИ**
О проведении VI Национального конгресса по регенеративной медицине (13–15 ноября 2024 года, Санкт-Петербург)
В.А. Ткачук
- 10** **ОБЗОРЫ И КОММЕНТАРИИ**
Перспективы применения CAR-T-клеточной терапии при раке молочной железы: взгляд в будущее
Л.Е. Сорокина, А. М. Незлина, А.М. Красный, Г.Т. Сухих
- 24** Создание и характеристика культур мезенхимных стромальных клеток человека с пролонгированным пролиферативным потенциалом для задач регенеративной медицины
А.Л. Примак, Н.И. Калинина, М.Н. Скрябина, В.А. Усачев, В.И. Чечехин, М.А. Виговский, Е.С. Чечехина, Н.С. Волошин, К.Ю. Кулебякин, М.А. Кулебякина, О.А. Григорьева, П.А. Тюрин-Кузьмин, Т.К. Яковлева, В.И. Турилова, Е.И. Шагимарданова, Г.Р. Газизова, Н.А. Басалова, А.Ю. Ефименко, С.С. Джауари, Ю.Г. Антропова, И.В. Плющий, Ж.А. Акопян, В.Ю. Сысоева, В.А. Ткачук, М.Н. Карагяур
- 46** **ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ**
Сравнение культуральных сред для мезенхимных стромальных клеток жировой ткани человека как объекта исследования и производственного культивирования
О.А. Григорьева, Н.А. Басалова, И.О. Коробкина, В.Н. Бирюкова, П.И. Макаревич
- 59** Механизмы участия микроРНК эндотелиальных клеток в регуляции ангиогенеза
П.С. Климович, В.А. Дзреян, Е.В. Семина, К.А. Рубина
- EDITORIAL**
On holding of the VI National Congress on Regenerative Medicine (November 13-15, 2024, St. Petersburg)
Vsevolod A. Tkachuk
- REVIEWS AND COMMENTS**
Prospects for the use of CAR-T-cell therapy in breast cancer: A look into the future
Leya E. Sorokina, Alexandra L. Nezlina, Aleksey M. Krasnyi, Gennady T. Sukhikh
- Creation and characterization of human mesenchymal stromal cell cultures with prolonged proliferative potential for the tasks of regenerative medicine
Alexandra L. Primak, Natalia I. Kalinina, Mariya N. Skryabina, Vladimir A. Usachev, Vadim I. Chechekhin, Maksim A. Vigovskiy, Elizaveta S. Chechekhina, Nikita S. Voloshin, Konstantin Yu. Kulebyakin, Maria A. Kulebyakina, Olga A. Grigorieva, Pyotr A. Tyurin-Kuzmin, Tatiana K. Yakovleva, Victoria I. Turilova, Elena I. Shagimardanova, Guzel R. Gazizova, Nataliya A. Basalova, Anastasia Yu. Efimenko, Stalik S. Dzhauari, Yulia G. Antropova, Ivan V. Plyushchii, Zhanna A. Akopyan, Veronika Yu. Sysoeva, Vsevolod A. Tkachuk, Maxim N. Karagyaour
- ORIGINAL ARTICLES**
Comparison of culture media for human adipose tissue mesenchymal stromal cells as an object of research and industrial cultivation
Olga A. Grigorieva, Nataliya A. Basalova, Irina O. Korobkina, Victoria N. Biryukova, Pavel I. Makarevich
- Endothelial cells microRNAs participation in the angiogenesis regulation
Polina S. Klimovich, Valentina A. Dzreyan, Ekaterina V. Semina, Kseniya A. Rubina

О проведении VI Национального конгресса по регенеративной медицине (13–15 ноября 2024 года, Санкт-Петербург)

В.А. Ткачук^{1,2}

¹ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1

² РОО «Общество регенеративной медицины, 119191, Москва, Ломоносовский проспект, д. 1

Адрес для корреспонденции: info@regmedru.com

Аннотация

В статье кратко приведены основные итоги проведенного Программного комитета VI Национального конгресса по регенеративной медицине и освещены наиболее приоритетные направления формирования научной программы будущего мероприятия. Сообщение главного редактора и президента Общества регенеративной медицины — академика В.А. Ткачука является приглашением для ведущих специалистов в области регенеративной медицины к участию в Конгрессе.

Ключевые слова: научная коммуникация, регенеративная медицина, регенерация органов и тканей, научное мероприятие

Конфликт интересов: автор является главным редактором журнала «Регенерация органов и тканей» с 2023 года, но не имеет отношения к решению о публикации данной статьи. Статья прошла принятую в журнале процедуру рецензирования. Об иных конфликтах интересов автор не заявлял.

Для цитирования: Ткачук В.А. О проведении VI Национального конгресса по регенеративной медицине (13–15 ноября 2024 года, Санкт-Петербург). *Регенерация органов и тканей*. 2024;2(2):6–9. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-2-6-9>

Поступила 15.06.2024

Обработана 25.06.2024

Принята к публикации 29.06.2024

On holding of the VI National Congress on Regenerative Medicine (November 13–15, 2024, St. Petersburg)

Vsevolod A. Tkachuk^{1,2}

¹ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Leninskie Gory, 1, Russia

² Society for Regenerative Medicine, Moscow, Lomonosovsky prospect 27, b.1, Russia

Correspondence address: info@regmedru.com

Abstract

The article briefly presents the main results of the program committee of the VI National Congress on Regenerative Medicine and highlights the most priority areas for the formation of the scientific program of the future event. The message of the editor-in-chief and president of the Society for Regenerative Medicine — Academician V.A. Tkachuk is an invitation for leading specialists in the field of regenerative medicine to participate in the Congress.

Keywords: scientific communication; regenerative medicine, tissue and organ regeneration; scientific event.

Conflict of interests: Tkachuk V.A. is the Editor-in-Chief of “Tissue and Organ Regeneration” since 2023, but has no role in the decision to publish this article. The article has undergone the peer-review procedure adopted by the journal. The author has declared no other conflicts of interest.

For citation: Tkachuk V.A. On holding of the VI National Congress on Regenerative Medicine (November 13–15, 2024, St. Petersburg). *Tissue and organ regeneration*. 2024;2(2):6–9. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-2-6-9>

Received 15.06.2024

Revised 25.06.2024

Accepted 29.06.2024

Глубокоуважаемые коллеги, дорогие друзья!

Я рад сообщить о проведении VI Национального конгресса по регенеративной медицине. По решению Общего собрания членов Общества регенеративной медицины VI Национальный конгресс по регенеративной медицине пройдет 13–15 ноября 2024 года в г. Санкт-Петербурге. Соорганизаторами Конгресса в этом году выступят Институт цитологии РАН и Общество регенеративной медицины.

За прошедшие годы Национальный конгресс по регенеративной медицине стал самым масштабным научным мероприятием отрасли. Высочайший уровень Конгресса поддерживается с момента его основания, а интерес к нему про-

должает расти, привлекая ученых, врачей, представителей индустрии и государственных органов, считающих его ключевой дискуссионной площадкой, на которой определяются вектор развития и будущее регенеративной медицины.

Институт цитологии РАН многие годы активно развивает это направление и продолжает традиции научных школ академика Н.Н. Никольского и заслуженного деятеля науки, д.б.н., профессора Г.П. Пинаева. Научные сотрудники института многие годы являются активными участниками Конгрессов и Школ по регенеративной медицине, а также членами Общества регенеративной медицины.

В 2024 году российская наука отмечает 300-летие основания Российской академии наук, которое произошло в тогдашней столице Российской империи — Санкт-Петербурге. В этом отношении символично и проведение Конгресса в этом городе. В программу традиционно войдут пленарные и актовые лекции, а также параллельные симпозиумы и школы для молодых ученых, посвященные наиболее актуальным вопросам отрасли. В настоящее время в России сложились новые условия для внедрения методов регенеративной медицины — в особенности продуктов для клеточной и генной терапии. Некоторые из них еще недавно были связаны с существенными этическими и регуляторными ограничениями, а сейчас становятся флагманскими технологиями новой медицинской науки.

Большой прогресс произошел в области генной терапии моногенных орфанных заболеваний, которые традиционно считаются одними из неизлечимых и сложно поддающихся ремиссии состояний. Внедрение генотерапевтических препаратов отечественных и зарубежных производителей в корне меняет прогноз для таких пациентов, а раннее начало лечения позволяет добиваться стойкого излечения и продления их жизни.

15 марта и 28 июня 2024 года состоялись заседания Программного комитета Конгресса, на которых были приняты установочные решения.

Основными тематиками Конгресса были утверждены следующие.

1. Механизмы обновления клеток организма.
2. Регуляция процессов репарации и регенерации органов и тканей.
3. Клеточная терапия и тканевая инженерия.
4. Генная терапия и редактирование генома в регенеративной медицине.
5. Разработка, производство и внедрение платформ и технологий для регенеративной медицины.
6. Вопросы этического и правового регулирования регенеративной медицины.

В рамках Конгресса будет сохранена традиция проведения мемориальных симпозиумов, посвященных памяти ученых, которые активно работали в области регенеративной медицины, клеточной биологии, трансплантологии и фундаментальных аспектов регенерации организма. В 2024 году состоятся мемориальные симпозиумы памяти академика В.И. Шумакова, академика Н.Н. Никольского, профессора Г.П. Пинаева и профессора Р.К. Чайлахяна.

В ходе церемонии торжественного открытия Конгресса будут вручены медали Общества, посвященные памяти великих ученых А.А. Максимова, А.Я. Фриденштейна и В.П. Демихова. Кандидатуры лауреатов будут обсуждаться и утверждаться на заседании Программного комитета в октябре 2024 года, накануне проведения Конгресса.

В рамках Конгресса также пройдет конкурс молодых ученых и конкурс постерных сообщений, победителями которых станут талантливые ученые из разных городов России. Молодым ученым будет присвоено три премии:

- премия имени В.П. Демихова «За исследования в области тканевой инженерии и искусственных органов и трансплантологии»;
- премия имени А.Я. Фриденштейна «За исследования в области регенерации тканей и клеточной терапии»;
- премия имени А.А. Максимова «За исследования в области гематологии, иммунологии и онкологии».

Тезисы Конгресса будут приниматься до 1 сентября 2024 года и будут опубликованы в журнале «Морфология». Приглашаем вас представлять на рассмотрение тезисы по фундаментальным основам регенеративной медицины, клеточной и генной терапии, тканевой инженерии по трансляционным и клиническим исследованиям в этой области науки. Не менее важными с учетом индустриализации новой отрасли медицины будут и регуляторные аспекты обращения клеточных, тканеинженерных и генотерапевтических продуктов, а также работы по надлежащим практикам (GxP) в биомедицине.

В России сложилось высокопрофессиональное сообщество исследователей и разработчиков,

поэтому мы верим, что новые успехи ждут нас в ближайшее время, причем касаться они будут не только фундаментальных, но и практических достижений этой новой науки.

Мы надеемся, что в 2024 году Конгресс привлечет внимание всех специалистов, работаю-

щих в области регенеративной биомедицины, а также маститых и молодых ученых из смежных областей, что позволит содержательно и глубоко обсудить проблемы и перспективы нашей науки!

Желаю удачи всем участникам Конгресса!

*Главный редактор журнала
«Регенерация органов и тканей»,
председатель Программного комитета Конгресса,
президент Общества регенеративной медицины
академик В.А. Ткачук*

Об авторе

Ткачук Всеволод Арсеньевич — академик, главный редактор журнала «Регенерация органов и тканей», президент РОО «Общество регенеративной медицины»; директор Медицинского научно-образовательного института МГУ имени М.В. Ломоносова; декан факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Author

Vsevolod A. Tkachuk — Full Member of RAS, Editor-in-Chief “Tissue and Organ Regeneration”, President of the Society for Regenerative Medicine; Director of the Institute for Regenerative Medicine, Education and Research Medical Institute, Lomonosov Moscow State University; Dean of the Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University.

Перспективы применения CAR-T-клеточной терапии при раке молочной железы: взгляд в будущее

Л.Е. Сорокина, А. М. Незлина, А.М. Красный, Г.Т. Сухих

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Российская Федерация, 117997, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4

Адрес для корреспонденции: leva.sorokina@mail.ru

Аннотация

Клеточная иммунотерапия CAR-T (Chimeric Antigen Receptor T-Cell, или Т-клетки с химерным антигенным рецептором) является передовым подходом к лечению онкологических заболеваний. В настоящее время CAR-T-терапия показала высокую эффективность при лечении онкогематологических заболеваний. При этом предпринятые многочисленные попытки создания CAR-T-конструкций для терапии солидных опухолей, в частности рака молочной железы (РМЖ), не продемонстрировали выраженной клинической эффективности. Предполагается, что ключ к решению этих проблем лежит в разработке и внедрении новых генно-инженерных стратегий.

Целью данного обзора стало обобщение и систематизация существующих исследований с технологией CAR. В настоящей работе мы суммируем потенциальные мишени для лечения РМЖ, детализируем имеющиеся ограничения использования данных технологий и определяем важные будущие тенденции в данной области.

Ключевые слова: рак молочной железы, солидные опухоли, клеточная иммунотерапия, CAR-T-терапия, химерный антигенный рецептор

Конфликт интересов: Сухих Г.Т. является членом редакционного совета журнала «Регенерация органов и тканей» с 2023 года, но не имеет отношения к решению о публикации данной статьи. Статья прошла принятую в журнале процедуру рецензирования. Об иных конфликтах интересов авторы не заявляли.

Для цитирования: Сорокина Л.Е., Незлина А.М., Красный А.М., Сухих Г.Т. Перспективы применения CAR-T-клеточной терапии при раке молочной железы: взгляд в будущее. *Регенерация органов и тканей*. 2024;2(2):10–23. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-2-10-23>

Поступила 07.04.2024

Обработана 10.05.2024

Принята к публикации 17.05.2024

Prospects for the use of CAR-T-cell therapy in breast cancer: A look into the future

Leya E. Sorokina, Alexandra L. Nezlina, Aleksey M. Krasnyi, Gennady T. Sukhikh

Academician V.I. Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology, and Perinatology, Ministry of Health of Russia, Moscow, Russian Federation

Correspondence address: leya.sorokina@mail.ru

Abstract

Cellular immunotherapy CAR-T (Chimeric Antigen Receptor T-Cell, or T-cells with a chimeric antigen receptor) is an advanced approach to the treatment of oncological diseases. Currently, CAR-T-therapy has shown high efficiency in the treatment of oncohematological diseases. At the same time, numerous attempts to create CAR-T-constructs for the treatment of solid tumors, in particular breast cancer (BC), have not demonstrated significant clinical efficacy. It is assumed that the key to solving these problems lies in the development and implementation of new genetic engineering strategies. The purpose of this review was to summarize and systematize existing studies with CAR technology. In this paper, we summarize potential targets for the treatment of BC, detail the existing limitations of using these technologies and identify important future trends in this area.

Keywords: breast cancer, solid tumors, cellular immunotherapy, CAR-T-therapy, chimeric antigen receptor

Conflict of interest: Gennady T. Sukhikh is member 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: Sorokina L.E., Nezlina A.M., Krasny A.M., Sukhikh G.T. Prospects for the use of CAR-T-cell therapy in breast cancer: a look into the future. *Tissue and organ regeneration*. 2024;2(2):10–23. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-2-10-23>

Received 07.04.2024

Revised 10.05.2024

Accepted 17.05.2024

Введение

На протяжении последних десятилетий рак молочной железы (РМЖ) уверенно занимает лидирующие позиции в структуре онкологической заболеваемости и смертности среди женского населения развитых стран мира. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) ежегодно по всему миру диагностируется более 2,3 млн новых случаев заболевания [1]. Несмотря на значительные успехи современной фундаментальной медицины, а также революционные достижения в области молекулярной онкологии, число летальных исходов от заболевания по-прежнему остается высоким. Так, по состоянию на 2022 год по всему миру было зарегистрировано около 670 тыс. смертей от РМЖ [2]. Принято

считать, что ключевыми причинами, обуславливающими сохраняющуюся высокую смертность, остаются прогрессирование заболевания, а также недостаточная эффективность проводимого системного лечения.

Разнообразие особенностей и течения РМЖ объясняется различными молекулярно-биологическими характеристиками опухолевых клеток. Известно, что для РМЖ свойственна высокая гетерогенность как собственно опухолевых клеток, так и клеточного микроокружения, что, в свою очередь, может обуславливать множественную лекарственную резистентность опухоли и способствовать повышению ее метастатического потенциала [3].

На сегодняшний день, согласно мировым стандартам, выбор терапевтической стратегии и определение долгосрочного прогноза при РМЖ основывается именно на определении биологических характеристик и назначается с учетом ее молекулярных подтипов.

В рутинной практике определение гистологического подтипа опухоли молочной железы основывается на оценке экспрессии рецепторов эстрогенов и прогестерона, статусе рецептора эпидермального фактора роста Her2/неу, а также маркера клеточной пролиферации Ki67, что позволяет выделить 5 подтипов опухолей: люминальный тип А, люминальный тип В (Her2-отрицательный), люминальный тип В (Her2-положительный), Her2-положительный и базальноподобный (трижды негативный) [4].

В последние десятилетия хирургия, лучевая терапия, химиотерапия, эндокринная терапия, таргетная терапия и иммунотерапия улучшили выживаемость и качество жизни пациентов с раком молочной железы [5]. Между тем к числу основных причин, обуславливающих недостаточную терапевтическую эффективность и высокие показатели смертности от РМЖ, относится развитие резистентности опухоли к существующим методам лечения [6].

Иммунотерапевтические подходы в лечении РМЖ

На протяжении долгого времени РМЖ считался низкоиммуногенной опухолью. Тем не менее накопленные данные о роли иммунных клеток, ассоциированных с опухолью молочной железы, а также результаты исследований эффективности иммунной терапии при некоторых формах РМЖ способствовали пересмотру этой точки зрения.

На сегодняшний день иммунотерапия РМЖ включает в себя широкий спектр методов лечения, включая моноклональные антитела, вакцины, ингибиторы иммунных контрольных точек и адаптивную клеточную терапию [7].

В аспекте иммунологии опухолей молочной железы интерес ученых преимущественно обращен на субпопуляцию цитотоксических Т-лимфоцитов, которые играют ключевую роль в иммунно-опосредованном контроле рака. В мировой литературе накоплен значительный пул исследований, демонстрирующих, что цитотоксическая активность опухоль-инфильтрирующих

лимфоцитов (Tumor-infiltrating lymphocytes, TILs) является ключевым фактором при определении естественного прогрессирования различных видов рака [8]. Результаты ряда исследований продемонстрировали взаимосвязь между высокими уровнями TILs при постановке диагноза и лучшим ответом на химиотерапию [9], а также лучшим прогнозом при адъювантной химиотерапии [10], особенно при трижды негативном и Her2-положительном РМЖ.

За последние два десятилетия иммунная терапия на основе Т-клеток получила всеобщее признание благодаря своему многообещающему терапевтическому потенциалу в отношении различных видов злокачественных новообразований. Современная иммунная терапия на основе Т-клеток, как правило, основана на двух методах. Первый включает в себя изоляцию противоопухолевых Т-лимфоцитов из первичных опухолевых тканей пациентов. Однако из-за трудностей изоляции и культивирования TILs данная терапия ограничена несколькими типами опухолей с большим количеством TILs. Другой способ — генерировать Т-клетки с заранее определенной противоопухолевой специфичностью с помощью подходов, основанных на генной модификации [11]. Существуют две стратегии модификации генов, включая перенос генов TCR и перенос генов химерного антигенного рецептора (CAR), которые используются для придания Т-клеткам антигенной специфичности выбора.

Несомненно, что разработка CAR-T-технологий стала настоящим прорывом в области молекулярной онкологии. Способность Т-клеток распознавать антигены независимо от главного комплекса гистосовместимости (Human leukocyte antigen, HLA) является очевидным преимуществом и создает огромное количество вариантов для подбора терапии того или иного типа рака [12]. В настоящее время CAR-T-клетки показали высокую эффективность при лечении онкогематологических заболеваний [13]. При этом предпринятые многочисленные попытки создания CAR-T-конструкций для терапии солидных опухолей, в частности РМЖ, не продемонстрировали выраженной клинической эффективности. В связи с этим возникает необходимость в поиске и более подробном изучении эффективных опухолевых антигенов-мишеней, а также выборе оптимальной конструкции CAR, что во многом

будет определять свойства и клиническую эффективность полученного продукта. Количество исследований в области терапии CAR-T-клетками, нацеленной на различные антигены, постоянно растет. В этом обзоре мы описываем текущие достижения CAR-T-терапии в рамках лечения опухолей молочной железы, суммируем данные о потенциальных мишенях РМЖ, а также рассматриваем ограничения использования данных технологий и выдвигаем собственный взгляд на проблему использования CAR-T-конструкций. Данный обзор поможет лучше понять подходящие цели для дальнейшего развития CAR-T-клеточной терапии в реальной онкологической практике.

Строение и функция CAR-T-клетки

В 1989 году было сконструировано первое поколение CAR-T-клеток [14]. Предпосылками для этих разработок послужили исследования, проведенные в 60–80-х годах XX века, где описывалась противораковая активность адаптивной иммунной системы и роль HLA.

На поверхности Т-лимфоцитов находится белковый Т-клеточный рецептор (T-cell receptor, TCR), который распознает антигены, представленные на молекулах HLA. В норме именно благодаря этим молекулам Т-лимфоцит распознает подлежащие уничтожению клетки. Особенностью раковых клеток является утеря или изменение молекул HLA, что позволяет им быть невидимыми для иммунной системы. Сконструированный CAR-T-рецептор представлял собой активирующий клетку домен рецептора (ζ) и антитела (scFv) на поверхности клетки для связывания с целевым белком. Такое строение рецептора обеспечило HLA-независимое распознавание мишени Т-клетками. Механизм действия рецептора заключается в следующем: при связывании антитела с антигеном происходит активация внутриклеточных сигнальных путей, которые инициируют пролиферацию CAR-T-клеток и запуск механизма перфорин-гранзимной цитотоксичности [15]. На текущий момент существуют 5 поколений CAR-T-клеток, различающихся по структуре эндодомена (рис. 1).

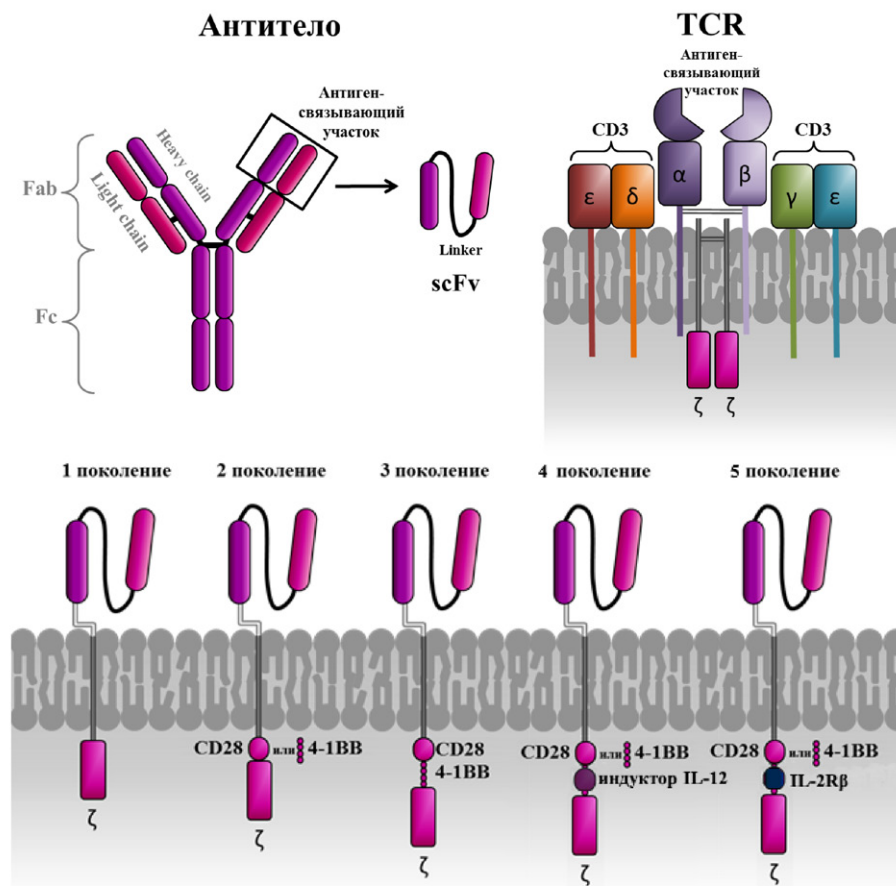


Рис. 1. Строение антител, TCR и CAR разных поколений

CAR-T-клетки первого поколения включали в себя лишь сигнальный домен на основе структуры TCR. По причине отсутствия костимулирующих сигналов CAR данного поколения демонстрировали ограниченную устойчивость, слабую пролиферацию и низкую противоопухолевую цитотоксичность [16]. Учитывая наличие двухэтапного процесса активации у Т-лимфоцитов в физиологических условиях, CAR-T-клеток второго поколения имели уже в своем составе костимулирующий домен, его наличие способствовало значительному улучшению передачи сигналов, экспансии и устойчивости [17]. Наиболее широко используемыми костимулирующими доменами являются CD28, 4-1BB, OX40 и CD27, которые увеличивают выработку CAR-клетками интерлейкина-2 (Interleukin-2, IL-2) [18]. Третье поколение содержит уже два костимулирующих домена, которые повышают пролиферацию и функциональную активность CAR-T-клеток. Разработка четвертого поколения CAR-клеток (бронированные CAR (TRUCK)) была направлена на антигеннеограниченную цитокин-инициируемую элиминацию опухолевых клеток. Появление группы дополнительных генов, индуцирующих экспрессию цитокинов (например, IL-2, IL-12 или IL-15), позволило обеспечить более мощный противоопухолевый потенциал указанным CAR-T-конструкциям [19]. Последующее, пятое поколение CAR-T-клеток основано на модификации и добавлении в структуру внутриклеточного домена второго поколения CAR-фрагментов цепи, отвечающих за активацию дополнительных сигнальных путей. В качестве такового используют укороченные внутриклеточные домены цитокиновых рецепторов (например, фрагмент цепи рецептора IL-2 — IL-2Rb) с мотивом для связывания факторов транскрипции, таких как STAT3/5, JAK. Таким образом, секретируемый сигнал не только заставляет CAR-T-клетки оставаться активными в течение длительного времени и генерировать Т-клетки памяти, но также реактивирует и стимулирует иммунную систему в целом. Считается, что CAR-T-конструкции пятого поколения также имеют лучший профиль безопасности и более широкое «терапевтическое окно» [20]. Сегодня на основе технологии CAR продолжают разрабатываться новые перспективные терапевтические подходы, которые мы подробнее обсудим в следующих разделах.

Несмотря на большое количество работ, проводимых в данном направлении, наибольшие успехи CAR-T-терапии на текущий момент до-

стигнуты лишь в лечении онкогематологических заболеваний. Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration, FDA) зарегистрировано 7 коммерческих препаратов на основе анти-CD19- и анти-BCMA-CAR-T-клеток, которые успешно применяются в мировой медицинской практике для лечения В-клеточного лимфобластного лейкоза и В-клеточной лимфомы [21]. При этом, несмотря на совершенствование технологий и положительные клинические результаты использования CAR-T-конструкций в онкогематологии, этот вид терапии при солидных опухолях все еще остается малоэффективным [22].

Целевые антигены для CAR-T-лимфоцитов при РМЖ

Критически важным аспектом для клеточной инженерной терапии является выбор целевых антигенов. Идеальная мишень должна в достаточном количестве экспрессироваться на поверхности опухолевых клеток и отсутствовать в здоровых тканях. Как указывалось ранее, для В-клеточных злокачественных новообразований в свое время была найдена своя идеальная мишень — CD19. Ни один антиген с эквивалентными характеристиками для солидных опухолей пока что не идентифицирован [23]. В отношении РМЖ на сегодняшний день накоплен значительный список антигенов, которые могут представлять потенциальные мишени для CAR-T-лимфоцитов, однако важным лимитирующим фактором для применения большинства из них остается факт экспрессированности на поверхности нормальных клетках.

Традиционно рассматривают 3 типа антигенов, экспрессируемых клетками злокачественных новообразований (ЗНО): опухоль-ассоциированные (Tumor-associated antigens, TAA), раково-зародышевые (Cancer germline antigen, CGA) и опухоль-специфичные (Tumor-specific antigens, TSA) [24]. Первая группа включает специфические пептиды из внутриклеточных белков, экспрессируемые на поверхности как опухолевых, так и здоровых клеток в составе HLA. Соответственно стратегия нацеливания на TAA несет риск развития системных иммуноопосредованных побочных эффектов в связи с потенциально возможной атакой CAR-T-лимфоцитами нормальных тканей. Выделяют дифференцировочные и гиперэкспрессируемые TAA. Дифференцировочные антигены характеризуются широкой представленностью на здоровых

клетках. Напротив, присутствие гиперэкспрессируемых антигенов более типично для клеток ЗНО, что делает их более привлекательными мишенями в контексте создания противоопухолевых клеточно-инженерных конструкций. Соответственно, можно минимизировать риски нежелательных явлений с помощью правильного выбора ТАА с наиболее высокой плотностью антигена для CAR-T-клеток.

Уникальной группой антигенов являются CGA, что обусловлено особенностями экспрессии данной группы антигенов. CGA определяются в опухолях различного гистологического происхождения и практически не экспрессируются в нормальных тканях (за исключением половых клеток и клеток трофобласта) [25]. Вполне вероятно, что связанная с aberrантной экспрессией генов представленность CGA на клетках ЗНО обусловлена феноменом гипометилирования ДНК. Анергия иммунной системы к этим клеткам объясняется отсутстви-

ем у них молекул HLA класса I, соответственно, зародышевые клетки не могут вызвать Т-клеточный ответ. Таким образом, будучи чужеродными для аутологичной иммунной системы, CGA делают опухолевые клетки, в которых они экспрессируются, специфичными мишенями для CAR-T-лимфоцитов.

Антигенные молекулы TSA являются наиболее перспективными мишенями с точки зрения эффективности и безопасности CAR-T-терапии. К TSA относятся антигены, являющиеся продуктом специфичной мутации (неоантигены) или экспрессии вирусных частиц. Такие антигены есть только в опухоли и не встречаются в нормальных тканях. Перечень наиболее перспективных антигенов, исследуемых для CAR-T-терапии РМЖ, представлен в таблице. Стоит отметить, что указанные антигены относятся к типу ТАА, что накладывает некоторые ограничения на использование CAR-T-конструкций для лечения данной онкопатологии.

Таблица. Целевые антигены для CAR T-лимфоцитов при РМЖ

Целевой антиген	Класс антигена	Функциональный и прогностический потенциал при РМЖ
Рецептор-2 эпидермального фактора роста человека HER2 (ERBB2)	Рецепторная тирозинкиназа (RTK)	Регуляция процессов роста и пролиферации клеток. Амплификация гена HER2 (ERBB2) и гиперэкспрессия белка у пациентов с РМЖ связана с прогрессированием заболевания, а также негативными клиническими исходами и неблагоприятным прогнозом [26]
Рецептор фактора роста гепатоцитов HGFR (сMET)	Рецепторная тирозинкиназа (RTK)	Активация каскадов сигналов фосфоинозитид-3-киназы (PI3K), активатора транскрипции Stat3, белков β-катенина и RAS. Гиперэкспрессия белка у пациентов с РМЖ связана с неблагоприятным прогнозом [27]
Трансмембранная рецепторная протеинтирозинкиназа ROR1	Рецепторная тирозинкиназа (RTK)	Гиперэкспрессия ROR1 индуцирует экспрессию переносчиков АТФ-связывающих кассет, таких как насос оттока Р-гликопротеина (также называемый белком множественной лекарственной устойчивости 1 (MDR1)). Обуславливает развитие химиорезистентности РМЖ и повышает риск рецидивирования опухоли [28]
Рецептор тирозинкиназы AXL	Рецепторная тирозинкиназа (RTK)	Участвует в активации некоторых сигнальных каскадов, включая пути PI3K, митоген-активируемой протеинкиназы (MAPK) и транскрипционного ядерного фактора (NF-κβ). Гиперэкспрессия AXL является предиктором неблагоприятных клинических исходов и низкой выживаемости [29]
Муцин MUC1	Поверхностный гликопротеин	Участвует в защите слизистых оболочек, передаче внутриклеточных сигналов и модуляции иммунной системы. Аберрантная гиперэкспрессия MUC1 связана с ангиогенезом и химиорезистентностью при РМЖ [30]
Мезотелин MSLN	Поверхностный гликопротеиновый антиген	Участвует в активации некоторых сигнальных каскадов, включая пути PI3K, MAPK и NF-κβ. Гиперэкспрессия MSLN обуславливает развитие химиорезистентности РМЖ и связана с неблагоприятным прогнозом [31]

Продолжение таблицы

Целевой антиген	Класс антигена	Функциональный и прогностический потенциал при РМЖ
Проминин 1 PROM1 (CD133)	Поверхностный гликопротеин	Участвует в клеточной дифференцировке, эпителиально-мезенхимальном переходе, модулирует эффекты широкого спектра цитокинов. Гиперэкспрессия CD133 связана с прогрессированием РМЖ и негативными клиническими исходами [32]
Изоформа интегрального клеточного гликопротеина CD44v6	Поверхностный гликопротеин	Участвует в межклеточных взаимодействиях и ремоделировании внеклеточного матрикса, выступает как корецептор для активации различных цитокинов и ростовых факторов. Является маркером опухолевого прогрессирования при РМЖ. Повышение регуляции CD44v6 было обнаружено преимущественно в клеточных линиях инвазивного РМЖ [33].
Молекула адгезии эпителиальных клеток ЕpCAM	Поверхностный гликопротеин	Участвует в процессах клеточной миграции, пролиферации и дифференцировки. Гиперэкспрессия ЕpCAM способствует росту опухоли, метастазированию и развитию химиорезистентности, что приводит к более короткой безрецидивной и общей выживаемости у пациентов с РМЖ [34]
Хондроитин-сульфат протеогликан 4 CSPG4	Поверхностный гликопротеин	Регулирует миграцию клеток и передачу пролиферативных сигналов. Гиперэкспрессия CSPG4 связана с прогрессированием и неоангиогенезом опухолей, что приводит к более короткой безрецидивной и общей выживаемости у пациентов с РМЖ [35]
Внутриклеточная молекула адгезии-1 ICAM1	Поверхностный гликопротеин	Облегчение эндотелиальной трансмиграции лейкоцитов и стабилизация межклеточных взаимодействий. Низкая экспрессия ICAM1 может быть связана с уходом от иммунного надзора, что приводит к развитию химиорезистентности [36]
Опухолевый эндотелиальный маркер 8 TEM8	Поверхностный гликопротеин	Способствует миграции эндотелиальных клеток. Гиперэкспрессия TEM8 связана с более высоким риском рецидива РМЖ [37]
Поверхностный антиген клеток трофобласта 2 TROP2	Поверхностный гликопротеин	Участвует в клеточной пролиферации и злокачественной трансформации клеток. Гиперэкспрессия TROP2 коррелирует с более короткой безрецидивной и общей выживаемостью у пациентов с РМЖ [38]
Рецептор фолиевой кислоты альфа FR α	Поверхностный гликопротеин	Участвует во внутриклеточном транспорте фолата, необходим для биосинтеза ДНК и облегчения метаболических реакций в процессе пролиферации клеток. При РМЖ гиперэкспрессия FR α коррелирует с более короткой безрецидивной и общей выживаемостью пациентов [39]
Дисиалоганглиозид GD2	Поверхностный гликофинголипид	Опосредует связь опухолевых клеток с белками внеклеточного матрикса. Гиперэкспрессия GD2 является предиктором прогрессирования заболевания и метастазирования РМЖ [40]
Активирующий рецептор NK-клеток и цитотоксических лимфоцитов NGK2D	Трансмембранный белок	Участвует в распознавании «стрессовых» лигандов на инфицированных или трансформированных клетках с последующим устранением этих клеток посредством цитотоксических механизмов. В образцах ткани молочной железы пациентов с РМЖ оценка экспрессии лиганда NKGD2 показала, что он экспрессируется только на опухолевых клетках [41]

Ограничения использования CAR-T-клеток при РМЖ

Ключевой особенностью РМЖ как солидной опухоли является наличие опухолевого очага, который имеет определенную форму, границы и может быть представлен различными типами клеток. При этом стоит отметить, что для опу-

холевых клеток характерен выраженный полиморфизм и генетический атипизм [42]. Эти особенности отличают солидные опухоли от гематологических и тем самым создают существенные трудности для создания эффективной таргетной терапии.

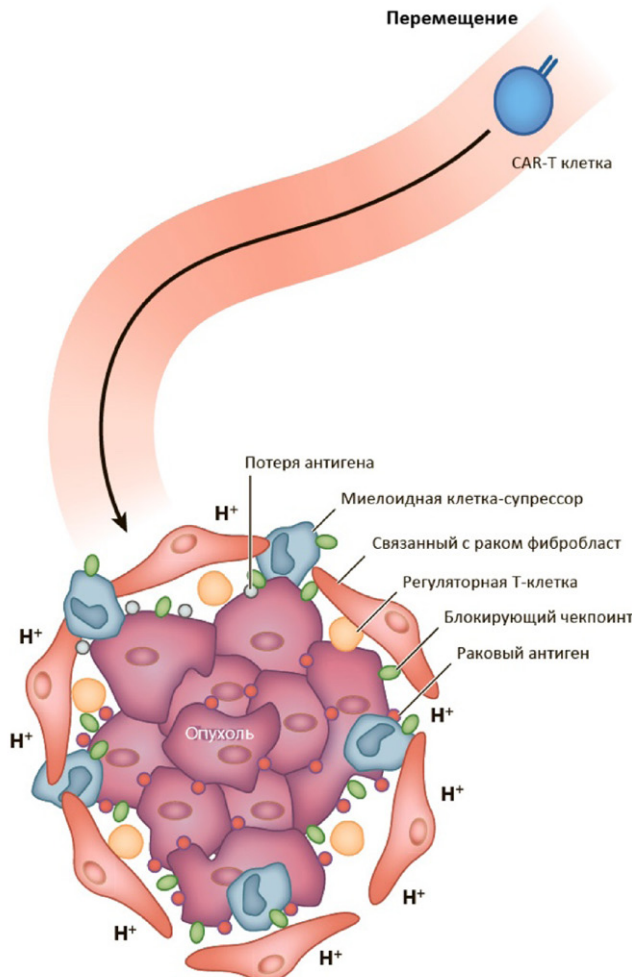
На ранних этапах канцерогенеза между раковыми клетками и компонентами опухолевого микроокружения развиваются динамические взаимоотношения, которые способствуют выживанию раковых клеток, локальной инвазии и метастатическому распространению. По мере прогрессирования внутри опухоли нарушаются трофика и оксигенация, что приводит к гипоксии и некрозу клеток в центре очага. Поэтому даже после успешного перемещения и инфильтрации Т-клетки быстро становятся дисфункциональными из-за враждебного микроокружения опухоли, которое под воздействием гипоксии начинает выделять факторы роста, стимулирующие рост сосудов вблизи опухоли и усиливающие поступление к ней питательных веществ, а также стимулирующие приток различных растворимых факторов и цитокинов, ингибирующих активность иммунных клеток [43]. Уста-

новлено, что сами онкобелки, продуцируемые опухолью, могут выполнять роль сигнальных молекул, стимулирующих неоангиогенез и оказывающих влияние на клетки опухолевого микроокружения, перепрограммируя их для ухода опухолевых клеток от иммунного надзора [44]. Все эти факторы приводят к созданию в опухоли иммуносупрессивного окружения, привлечению пула Т-регуляторных клеток (Treg) и перепрограммированию цитотоксических Т-лимфоцитов (рис. 2) [45].

Кроме того, критичным моментом, препятствующим активности CAR-T-клеточной терапии в очаге солидной опухоли, может быть наличие растворимых форм целевого антигена, способного связываться с CAR. Растворимые формы антигенов образуются в результате шеддинга — процесса, приводящий к отщеплению экстраклеточного домена трансмембранных полипептидов [46]. Шеддинг антигена может быть результатом активности протеаз, факторов микроокружения опухоли или клеточных процессов внутри раковых клеток.

Другими механизмами ухода опухолевых клеток от иммунного контроля являются генетические изменения и эпигенетические модификации антигена, иммунное редактирование и клональный отбор. Каждый из этих механизмов может способствовать снижению или потере экспрессии целевого антигена в опухолевых клетках, что приводит к развитию лекарственной резистентности и рецидиву заболевания. Указанные механизмы потери антигена не являются взаимоисключающими и могут происходить одновременно или последовательно [47]. Сложное взаимодействие между генетическими изменениями, эпигенетическими модификациями, иммунным редактированием, клональным отбором и шеддингом антигена усугубляет проблемы поддержания эффективности CAR-T-клеток с течением времени.

Стоит отметить, что указанные ограничения также не являются единственно возможными. Ряд авторов сходятся во мнении, что недостаточная экспансия или персистенция CAR-T-клеток является ключевой проблемой в повышении эффективности терапии солидных опухолей. Показано, что низкая устойчивость инфузионных CAR-T-лимфоцитов обратно коррелирует с длительностью клинической ремиссии у пациентов онкологического профиля [48].



Низкий pH/низкая концентрация кислорода/
низкое содержание питательных веществ

Рис. 2. Иммуносупрессивное микроокружение опухоли

Согласно литературным данным сами CAR-T-клетки также могут быть большой опасностью для организма, учитывая их потенциальную иммунореактивность и токсичность. Потенциальными осложнениями CAR-T-клеточной терапии являются синдром высвобождения цитокинов и синдромом нейротоксичности. Также есть и менее распространенные побочные эффекты: токсичность on-target/off-tumor, синдром лизиса опухоли, реакция «трансплантат против хозяина», аллергические реакции [49, 50].

Таким образом, понимание механизмов формирования указанных ограничений и разработка новых стратегий для их преодоления имеют решающее значение для повышения эффективности и безопасности терапии CAR-T-клетками.

Стратегии для повышения эффективности и безопасности использования CAR-T-конструкций в терапии солидных опухолей

Для каждой из вышеописанных проблем существуют различные решения, подбором комбинаций из которых и предстоит заниматься исследователям, направляющим CAR-T-клетки на борьбу с солидными опухолями. Ключ к решению этих проблем лежит в разработке и внедрении новых генно-инженерных стратегий.

Ряд авторов в своих исследованиях сосредоточен на модификации методологических подходов культивирования и генетического редактирования Т-лимфоцитов. Рассматриваются различные стратегии повышения устойчивости инфузионных CAR-T-клеток, включая оптимизацию процедуры отбора и условий культивирования Т-клеток *ex vivo* с использованием широкого профиля цитокинов и костимулирующих молекул; редактирование про- и противоапоптотических генов, участвующих в контроле жизненного цикла Т-лимфоцитов; регуляцию окислительно-восстановительного баланса клеток; модуляцию основных внутриклеточных сигнальных доменов (например, 4-1BB, CD28, TLR или CD40) в указанных генно-инженерных конструкциях [48]. Кроме того, возможно включение в геном CAR-T-лимфоцитов так называемых «суицидальных» генов (suicidal genes), продукты которых под действием специфических малых молекул запускают апоптоз Т-клеток [51, 52].

Одной из стратегий преодоления иммуносупрессивного воздействия является комбинированная терапия CAR-T-конструкциями с ингибиторами

контрольных точек иммунного ответа, например PD-1, для предотвращения «истощения» Т-клеток [53].

Для решения проблемы потери таргетируемого антигена ряд авторов указывают на необходимость создания биспецифичных CAR-T-клеток [54].

Одним из наиболее удачных решений, на наш взгляд, в проблеме повышения эффективности клеточной иммунотерапии было предложение использовать несколько вариантов CAR-T-клеток, нацеленных на разные антигены. Ученые из США предложили использовать универсальный CAR, имеющий биотин-связывающий домен мономерного стрептавидина 2 (mSA2), который при экспрессии на Т-клетках может нацеливаться на раковые клетки, покрытые биотинилированными антителами [55]. Такой способ дает возможность применять различные комбинации антител без необходимости повторной модификации Т-клеток, а также делает возможным создание универсальных CAR-T-клеток, благодаря чему сложный и дорогой метод CAR-T-клеточной терапии может стать более доступным и распространенным.

Широкие перспективы в области иммунотерапии ЗНО представляют субпопуляции инвариантных Т-лимфоцитов, экспрессирующих ограниченный репертуар TCR-рецепторов, которые рестриктируют спектр распознаваемых антигенов, что позволяет позиционировать эти клетки как промежуточные между врожденным и адаптивным иммунитетом. В 2020 году британскими учеными при проведении полногеномного скрининга CRISPR — Cas9 был описан новый высококонсервативный тип рецепторов в Т-клетках, подобный HLA — MR1 (MHC class I-related protein), экспрессирующийся всеми типами клеток человеческого организма [56]. В первоначальных исследованиях MR1 был описан на поверхности рестриктированных Т-клеток, ассоциированных со слизистой (Mucosal-associated invariant T-cells, MAIT).

Установлено, что репертуар MR1 является высоковариабельным, а функциональный потенциал TCR MR1-Т-клеток широко варьирует в зависимости от экспонируемого антигена [57]. В ряде работ было продемонстрировано возможность распознавания комплекса MR1 с антигеном некоторыми клонами MR1-рестриктированных Т-клеток в случае

развития онкопатологии [56, 58]. Клетки MR1-T используют структуру TCR для обнаружения опухолей и активируют внутренний сигнал, который организует сигнализацию рецептора антигена для усиления и координации изменений в функции Т-лимфоцитов и индуцирует секрецию цитокинов [59]. В отличие от клеток CAR-T, клетки MR1-T могут инициировать нисходящую сигнализацию через нековалентный комплекс с гомодимером CD3 $\zeta\zeta$, гетеродимерами CD3 $\delta\epsilon$ и CD3 $\gamma\epsilon$ и в общей сложности десятком мотивами активации иммунорецепторов на основе тирозина (ITAM) [60].

Учитывая высокий профиль безопасности MR1-рестриктированных Т-клеток, данная стратегия открывает широкие перспективы для развития иммунотерапии солидных опухолей.

Для уменьшения токсичности и профилактики развития резистентности было предложено использовать комбинированные подходы, включающие в себя использование наряду с новыми методами CAR-T-терапии схем химио- и/или лучевой терапии [61, 62]. Результаты ряда исследований демонстрируют, что комбинированное лечение повышает эффективность CAR-T-терапии и способно уменьшить побочные эффекты [63]. Основными звеньями комбинированного подхода являются модификация опухолевого микроокружения, повышение экспрессии опухолевых антигенов, улучшение выживаемости иммунных клеток внутри опухоли и снижение токсичности терапии.

Заключение

Социально-медицинская значимость проблемы РМЖ, а также недостаточная результативность применяемых методов лечения побуждает к поиску и разработке новых терапевтических стратегий в отношении злокачественных новообразований молочной железы. CAR-T-клеточная терапия представляет собой новый, быстро развивающийся иммунотерапевтический подход, продемонстрировавший мощный потенциал в отношении гематологических злокачественных новообразований.

Учитывая иммуногенность РМЖ и наличие значительного количества потенциальных целевых антигенов на опухолевых клетках молочной железы, CAR-T-клеточная терапия в настоящее время рассматривается как перспективное направление в лечении пациентов с новообразованиями молочной железы.

При этом имеющиеся на сегодня CAR-T-конструкции при солидных опухолях оказались малоэффективными. Актуальными остаются ряд проблем, такие как антигенная гетерогенность данных опухолей, иммуносупрессивное микроокружение, слабая инфильтрация опухоли иммунными клетками, истощение и снижение пролиферативной активности и цитотоксичности CAR-T-клеток внутри опухоли, ускользание целевого антигена опухоли, токсичность терапии. В связи с этим возникает необходимость в продолжении исследований, направленных на совершенствование и улучшение методики CAR-T-технологий для лечения солидных опухолей.

Литература

1. Пак молочной железы. <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>
2. Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2024;74(3):229–263. DOI: 10.3322/caac.21834
3. Caswell-Jin JL, Lorenz C, Curtis C. Molecular heterogeneity and evolution in breast cancer. *Ann Rev Cancer Biol.* 2021;5(1):79–94. DOI: 10.1146/annurev-cancerbio-060220-014137
4. Harbeck N, Gnant M. Breast cancer. *Lancet.* 2017;389(10074):1134–1150. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)31891-8
5. Barzaman K, Karami J, Zarei Z, Hosseinzadeh A, Kazemi MH, Moradi-Kalbolandi S. et al. Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. *Int Immunopharmacol.* 2020;84:106535.
6. Palomer S, Ruiz-Martínez S, Puig T. Targeting Breast Cancer Stem Cells to Overcome Treatment Resistance. *Molecules.* 2018;23(9):2193. DOI: 10.3390/molecules23092193
7. Anuvab D, Subhrojyoti G, Shreya J, et al. Recent advancement in breast cancer treatment using CAR T cell therapy:-A review. 2023;7:100090. DOI: 10.1016/j.adcanc.2023.100090

8. Ciarka A, Piątek M, Pęksa R, Kunc M, Senkus E. Tumor-Infiltrating Lymphocytes (TILs) in Breast Cancer: Prognostic and Predictive Significance across Molecular Subtypes. *Bio-medicines*. 2024;12(4):763. DOI: 10.3390/biomedicines12040763
9. Denkert C, Loibl S, Noske A, et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J. Clin. Oncol*. 2010;28(1):105–113.
10. Dieci MV, Mathieu MC, Guarneri V, et al. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in two phase III randomized adjuvant breast cancer trials. *Ann. Oncol*. 2015;26(8):1698–1704
11. Кузнецова М.С., Шику Х., Караулов А.В., Сенников С.В. Современные Т-клеточные технологии иммунотерапии солидных опухолей. *Медицинская иммунология*. 2023;25(2):271–286. DOI: 10.15789/10.15789/1563-0625-MTC-2444
12. Elahi R., Khosh E., Tahmasebi S., Esmaeilzadeh A. Immune cell hacking: challenges and clinical approaches to create smarter generations of chimeric antigen receptor T cells. *Front Immunol*. 2018;9:1717. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01717
13. Fischer JW, Bhattarai N. CAR-T cell therapy: mechanism, management, and mitigation of inflammatory toxicities. *Front Immunol* 2021;12:693016. DOI: 10.3389/fimmu.2021.693016
14. Gross G, Waks T, Eshhar Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989;24(86):10024–10028.
15. Land CA, Musich PR, Haydar D, et al. Chimeric antigen receptor T-cell therapy in glioblastoma: charging the T cells to fight. *J Transl Med*. 2020;18(1):428. DOI: 10.1186/s12967-020-02598-0
16. Brocker T, Karjalainen K. Signals through T cell receptor- ζ chain alone are insufficient to prime resting T lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*. 1995;181(5):1653–1659.
17. Savoldo B, Ramos CA, Liu E, et al. CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells in lymphoma patients. *J Clin Invest*. 2011;121(5):1822–1826. DOI: 10.1172/JCI46110
18. Chavez JC, Bachmeier C, Kharfan-Dabaja MA. CAR T-cell therapy for B-cell lymphomas: clinical trial results of available products. *Ther Adv Hematol*. 2019;10:2040620719841581. DOI: 10.1177/2040620719841581
19. Poorebrahim M, Melief J, Pico de Coana Y, et al. Counteracting CAR T cell dysfunction. *Oncogene* 2021;40(2):421–435. DOI: 10.1038/s41388-020-01501-x
20. Tokarew N, Ogonek J, Endres S, et al. Teaching an old dog new tricks: next-generation CAR T cells. *Br J Cancer* 2019;120(1):26–37. DOI: 10.1038/s41416-018-0325-1
21. Fischer JW, Bhattarai N. CAR-T cell therapy: mechanism, management, and mitigation of inflammatory toxicities. *Front Immunol* 2021;12:693016. DOI: 10.3389/fimmu.2021.693016
22. Tahmasebi S, Elahi R, Esmaeilzadeh A. Solid tumors challenges and new insights of CAR T cell engineering. *Stem Cell Rev Rep*. 2019;15(5):619–636. DOI: 10.1007/s12015-019-09901-7
23. Morello A, Sadelain M, Adusumilli PS. Mesothelin-Targeted CARs: Driving T Cells to Solid Tumors. *Cancer Discov*. 2016;6(2):133–146. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-15-0583
24. Abbott RC, Cross RS, Jenkins MR. Finding the Keys to the CAR: Identifying Novel Target Antigens for T Cell Redirection Immunotherapies. *Int J Mol Sci*. 2020;21(2):515. DOI: 10.3390/ijms21020515
25. Scanlan MJ, Gure AO, Jungbluth AA, Old LJ, Chen YT. Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immunol Rev*. 2002;188:22–32. DOI: 10.1034/j.1600-065x.2002.18803.x
26. Pegram M, Slamon D. Biological rationale for HER2/neu (c-erbB2) as a target for monoclonal antibody therapy. *Semin Oncol*. 2000;27:13–19.
27. Ho-Yen CM, Jones JL, Kermorgant S. The clinical and functional significance of c-Met in breast cancer: a review. *Breast Cancer Res*. 2015;17:52.
28. Fultang N, Illendula A, Lin J, et al. ROR1 regulates chemoresistance in Breast Cancer via modulation of drug efflux pump ABCB1. *Sci Rep*. 2020;10:1821.

29. Goyette MA, Duhamel S, Aubert L, et al. The Receptor Tyrosine Kinase AXL Is Required at Multiple Steps of the Metastatic Cascade during HER2-Positive Breast Cancer Progression. *Cell Rep.* 2018;23:1476–1490.
30. Jing X, Liang H, Hao C, et al. Overexpression of MUC1 predicts poor prognosis in patients with breast cancer. *Oncol Rep.* 2019;41(2):801–810. DOI: 10.3892/or.2018.6887
31. Tang Z, Qian M, Ho M. The role of mesothelin in tumor progression and targeted therapy. *Anticancer Agents Med Chem.* 2013;13:276–280.
32. Joseph C, Arshad M, Kurozomi S, et al. Overexpression of the cancer stem cell marker CD133 confers a poor prognosis in invasive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2019;174:387–399.
33. Hu S, Cao M, He Y, et al. CD44v6 Targeted by miR-193b-5p in the Coding Region Modulates the Migration and Invasion of Breast Cancer Cells. *J Cancer.* 2020;11:260–271.
34. Mal A, Bukhari AB, Singh RK, et al. EpCAM-Mediated Cellular Plasticity Promotes Radiation Resistance and Metastasis in Breast Cancer. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:597673.
35. Wang X, Wang Y, Yu L, et al. CSPG4 in cancer: multiple roles. *Curr Mol Med.* 2010;10:419–429.
36. Zhou Q, Xu J, Xu Y, Sun S, Chen J. Role of ICAM1 in tumor immunity and prognosis of triple-negative breast cancer. *Front Immunol.* 2023;14:1176647. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1176647
37. Byrd TT, Fousek K, Pignata A, et al. TEM8/ANTXR1-Specific CAR T Cells as a Targeted Therapy for Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Res.* 2018;78:489–500.
38. Chen H, Wei F, Yin M, et al. CD27 enhances the killing effect of CAR T cells targeting trophoblast cell surface antigen 2 in the treatment of solid tumors. *Cancer Immunol Immunother.* 2021;70(7):2059–2071. DOI: 10.1007/s00262-020-02838-8
39. Ginter PS, McIntire PJ, Cui X, et al. Folate Receptor Alpha Expression Is Associated With Increased Risk of Recurrence in Triple-negative Breast Cancer. *Clin Breast Cancer.* 2017;17:544–549.
40. Ahmed M, Cheung NK. Engineering anti-GD2 monoclonal antibodies for cancer immunotherapy. *FEBS Lett.* 2014;588(2):288–297. DOI: 10.1016/j.febslet.2013.11.030
41. Groh V, Rhinehart R, Secrist H, Bauer S, Grabstein KH, Spies T. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:6879–6884.
42. Caswell-Jin JL, Lorenz C, Curtis C. Molecular heterogeneity and evolution in breast cancer. *Ann Rev Cancer Biol.* 2021;5(1):79–94. DOI: 10.1146/annurev-cancerbio-060220-014137
43. Newick K, O'Brien S, Moon E, Albelda SM. CAR T Cell Therapy for Solid Tumors. *Annu Rev Med.* 2017;68:139–152. DOI: 10.1146/annurev-med-062315-120245
44. Henke E., Nandigama R., Ergun S. Extracellular matrix in the tumor microenvironment and its impact on cancer therapy. *Front Mol Biosci* 2019;6:160. DOI: 10.3389/fmolb.2019.00160
45. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med* 2013;19(11):1423–1437. DOI: 10.1038/nm.3394
46. Sun L, Gao F, Gao Z, et al. Shed antigen-induced blocking effect on CAR-T cells targeting Glypican-3 in Hepatocellular Carcinoma. *J Immunother Cancer.* 2021;9(4):e001875. DOI: 10.1136/jitc-2020-001875
47. Mishra A, Maiti R, Mohan P, Gupta P. Antigen loss following CAR-T cell therapy: Mechanisms, implications, and potential solutions. *Eur J Haematol.* 2024;112(2):211–222. DOI: 10.1111/ejh.14101
48. Jafarzadeh L, Masoumi E, Fallah-Mehrjardi K, Mirzaei HR, Hadjati J. Prolonged Persistence of Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cell in Adoptive Cancer Immunotherapy: Challenges and Ways Forward. *Front Immunol.* 2020;11:702. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00702
49. Schubert ML, Schmitt M, Wang L, et al. Side-effect management of chimeric antigen receptor (CAR) T-cell therapy. *Ann Oncol* 2021;32(1):34–48. DOI: 10.1016/j.annonc.2020.10.478
50. Huang M., Deng J., Gao L., Zhou J. Innovative strategies to advance CAR T cell therapy for solid tumors. *Am J Cancer Res* 2020;10(7):1979–1992.
51. Li H, Zhao Y. Increasing the safety and efficacy of chimeric antigen receptor T cell therapy. *Protein Cell.* 2017;8(8):573–589. DOI: 10.1007/s13238-017-0411-9

52. Павлова А.А., Масчан М.А., Пономарев В.Б. Адоптивная иммунотерапия генетически модифицированными Т-лимфоцитами, экспрессирующими химерные антигенные рецепторы. Онкогематология. 2017;12(1):17–32. DOI: 10.17650/1818-8346-2017-12-1-17-32
53. Zhang H, Ye ZL, Yuan ZG, et al. New Strategies for the Treatment of Solid Tumors with CAR-T Cells. Int J Biol Sci 2016;12(6):718–729. DOI: 10.7150/ijbs.14405
54. Zah E, Lin MY, Silva-Benedict A, et al. T Cells Expressing CD19/CD20 Bispecific Chimeric Antigen Receptors Prevent Anti- gen Escape by Malignant B Cells. Cancer Immunol Res 2016;4(6):498–508. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0231
55. Lohmueller JJ, Ham JD, Kvorjak M, Finn OJ. mSA2 affinity-enhanced biotin-binding CAR T cells for universal tumor targeting. Oncoimmunology. 2017;7(1):e1368604. DOI: 10.1080/2162402X.2017.1368604
56. Crowther MD, Dolton G, Legut M, et al. Genome-wide CRISPR–Cas9 screening reveals ubiquitous T cell cancer targeting via the monomorphic MHC class I-related protein MR1. Nat Immunol. 2020;21:178–185. DOI: 10.1038/s41590-019-0578-8
57. Gherardin NA, McCluskey J, Rossjohn J, Godfrey DI. The diverse family of MR1-restricted T cells. J. Immunol. 2018;201:2862–2871. DOI: 10.4049/jimmunol.1801091
58. Lepore M, Kalinichenko A, Calogero S, et al. Functionally diverse human T cells recognize non-microbial antigens presented by MR1. Elife. 2017;6:e24476. DOI: 10.7554/eLife.24476
59. Chandran SS, Klebanoff CA. T cell receptor-based cancer immunotherapy: emerging efficacy and pathways of resistance. Immunol. Rev. 2019;290:127–147. DOI: 10.1111/imr.12772
60. Wang Z, Wang M, Chen J, et al. MR1-restricted T cells: the new dawn of cancer immunotherapy. Biosci Rep. 2020;40(11):BSR20202962. DOI: 10.1042/BSR20202962
61. Reits EA, Hodge JW, Herberts CA, et al. Radiation modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy. J Exp Med. 2006;203(5):1259–1271. DOI: 10.1084/jem.20052494
62. Laplagne C, Domagala M, Le Naour A, et al. Latest advances in targeting the tumor microenvironment for tumor suppression. Int J Mol Sci 2019;20(19):4719. DOI: 10.3390/ijms20194719
63. Murad JP, Tilakawardane D, Park AK, et al. Pre-conditioning modifies the TME to enhance solid tumor CAR T cell efficacy and endogenous protective immunity. Mol Ther. 2021;29(7):2335–2349. DOI:10.1016/j.ymthe.2021.02.024

Об авторах

Сорокина Лея Евгеньевна — м.н.с. лаборатории цитологии, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Незлина Александра Леонидовна — м.н.с. лаборатории цитологии, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Красный Алексей Михайлович — к.б.н., заведующий лабораторией цитологии, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Сухих Геннадий Тихонович — академик РАН, д.м.н., профессор, директор, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Authors

Leya E. Sorokina — Junior Researcher at the Cytology Laboratory, Academician V.I. Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Health of the Russian Federation.

Alexandra L. Nezlina — Junior Researcher at the Cytology Laboratory, Academician V.I. Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Health of the Russian Federation.

Aleksey M. Krasnyi — Cand. Sci. (Biology), Head of the Cytology Laboratory, Academician V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Health of Russia.

Gennady T. Sukhikh — Academician of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Professor, Director, V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Health of Russia.

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.karagyaour@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 норадреналину, 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 секретома МСК при длительном пассировании (по меньшей мере

© 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., Карагяур М.Н., 2024

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., Карагяур 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., Скрыбина М.Н., Усачев В.А., Чечехин В.И., Виговский М.А., Чечехина Е.С., Волошин Н.С., Кулебякин К.Ю., Кулебякина М.А., Григорьева О.А., Тюрин-Кузьмин П.А., Яковлева Т.К., Турилова В.И., Шагимарданова Е.И., Газизова Г.Р., Басалова Н.А., Ефименко А.Ю., Джауари С.С., Антропова Ю.Г., Плющий И.В., Акопьян Ж.А., Сысоева В.Ю., Ткачук В.А., Карагяур М.Н. Создание и характеристика культур мезенхимных стромальных клеток человека с пролонгированным пролиферативным потенциалом для задач регенеративной медицины. *Регенерация органов и тканей*. 2024;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. Dzhauari¹, 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. Karagayur 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., Karagayur 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-гидрокситриптамиин

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 HEK293T (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).

HEK293T культивировали в среде Игла, модифицированной Дульбекко (DMEM), с высоким содержанием глюкозы (Gibco, #11965092), содержащей 10% фетальной сыворотки плодов коров (FBS) (ThermoFisher Scientific, #26140079), 1х смесь антибиотика/антимикотика (Gibco, #15240062) и 1х 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 1х смесь антибиотика/антимикотика (Gibco, США, #15240062). Все перечисленные культуры клеток культивировали при 37 °C и 5% CO₂ в инкубаторе Binder CB150 (BINDER GmbH). Среда 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 пуromицину (рис. 1А). Сборку ЛВЧ, кодирующих TERT человека, осуществляли путем трансфекции линии HEK293T 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 пуromицин до конечной концентрации 1 мкг/мл. Селекцию продолжали в течение 10–14 суток. Среда культивирования меняли каждые 2–3 суток. Для подтверждения активности пуromицина его вносили и в культуру нетрансдуцированных клеток (отрицательный контроль при селекции), которые погибали в течение 4–7 дней после начала селекции.

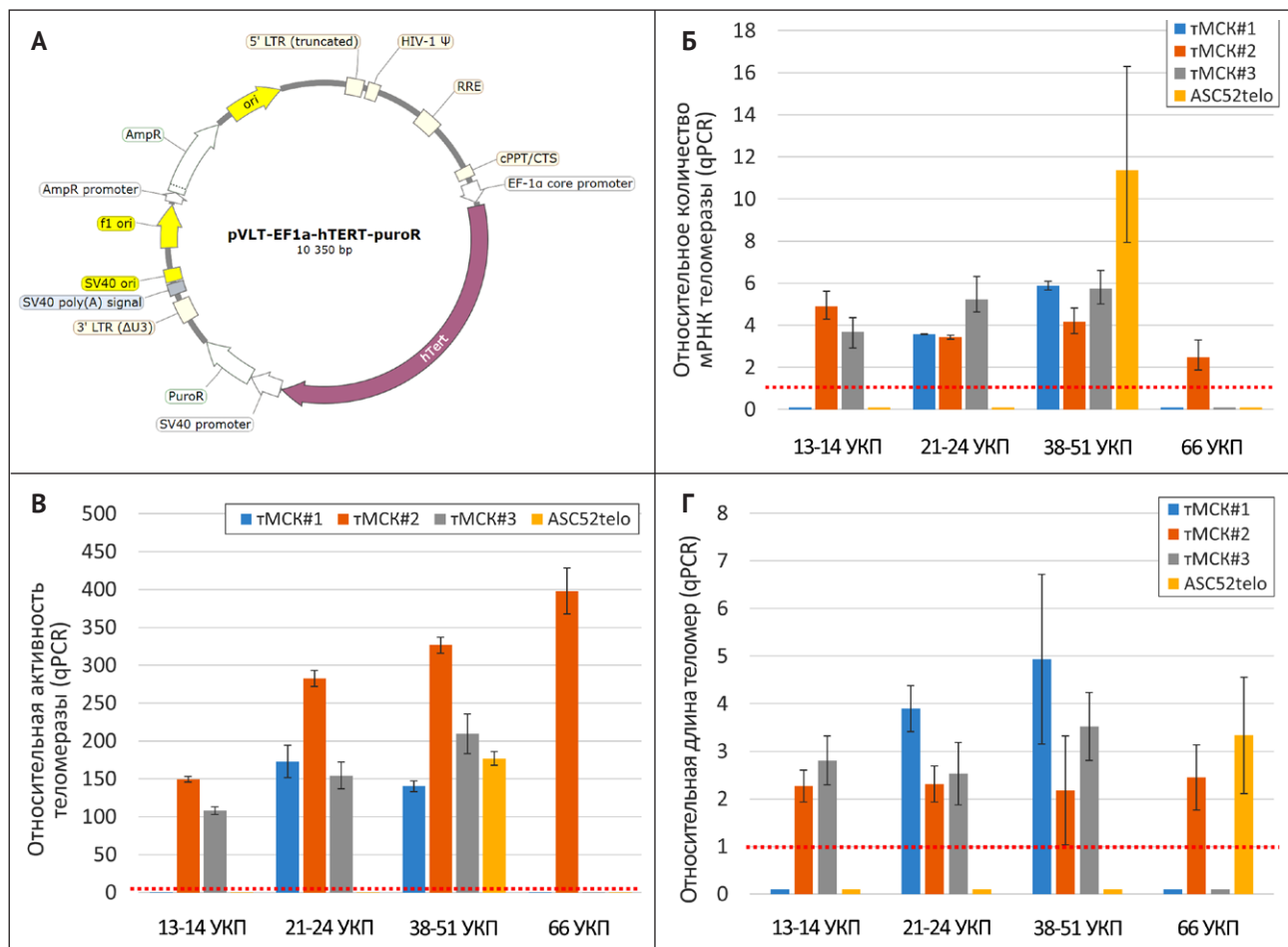


Рис. 1. Трансдукция культур МСК лентивирусом pVLT-hTERT-puro активирует экспрессию и увеличивает активность hTERT: А — карта генетической конструкции pVLT-hTERT-puro, использованной для генетической модификации клеточных культур МСК; Б, В и Г — относительный уровень экспрессии мРНК, активности каталитического компонента теломеразы и относительная длина теломер в геномодифицированных МСК в динамике соответствующих пассажей, 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

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.

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 секретома***	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 секретома проводили для культуры тМСК#2 как одной из наиболее перспективных (среди полученных) для получения секретома для решения задач регенеративной медицины

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 (ApexBio, #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 гематopoэтических 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 O.C.T. 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 KCl 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 иммуноферментный 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 иммуноферментного 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-карбоксиэтилфосфина

(Sigma-Aldrich, #C4706-10G) (1 час при 60 °C), с 4 мМ метиметантисульфата (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 (Applchem, #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 $\pm$ 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. 1Б). 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).

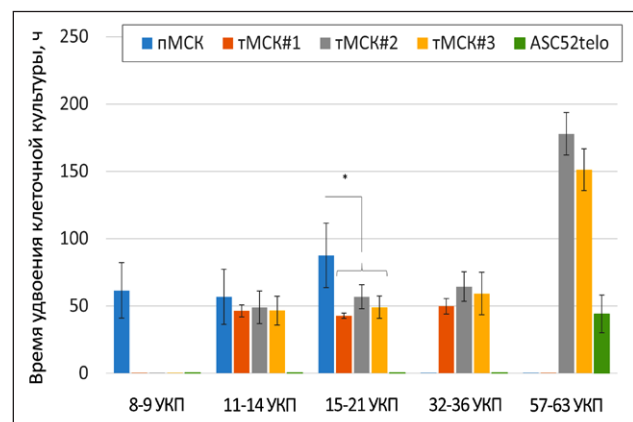


Рис. 2. Сравнительная динамика времени удвоения культур МСК человека, первично выделенных и с пролонгированным пролиферативным потенциалом. Среднее время удвоения клеточной культуры первично выделенных МСК получено на основании данных для МСК от 6–12 доноров (в зависимости от УКП). * $p < 0,01$, $n \geq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

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 гематopoэтических 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 демонстрировала 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%.

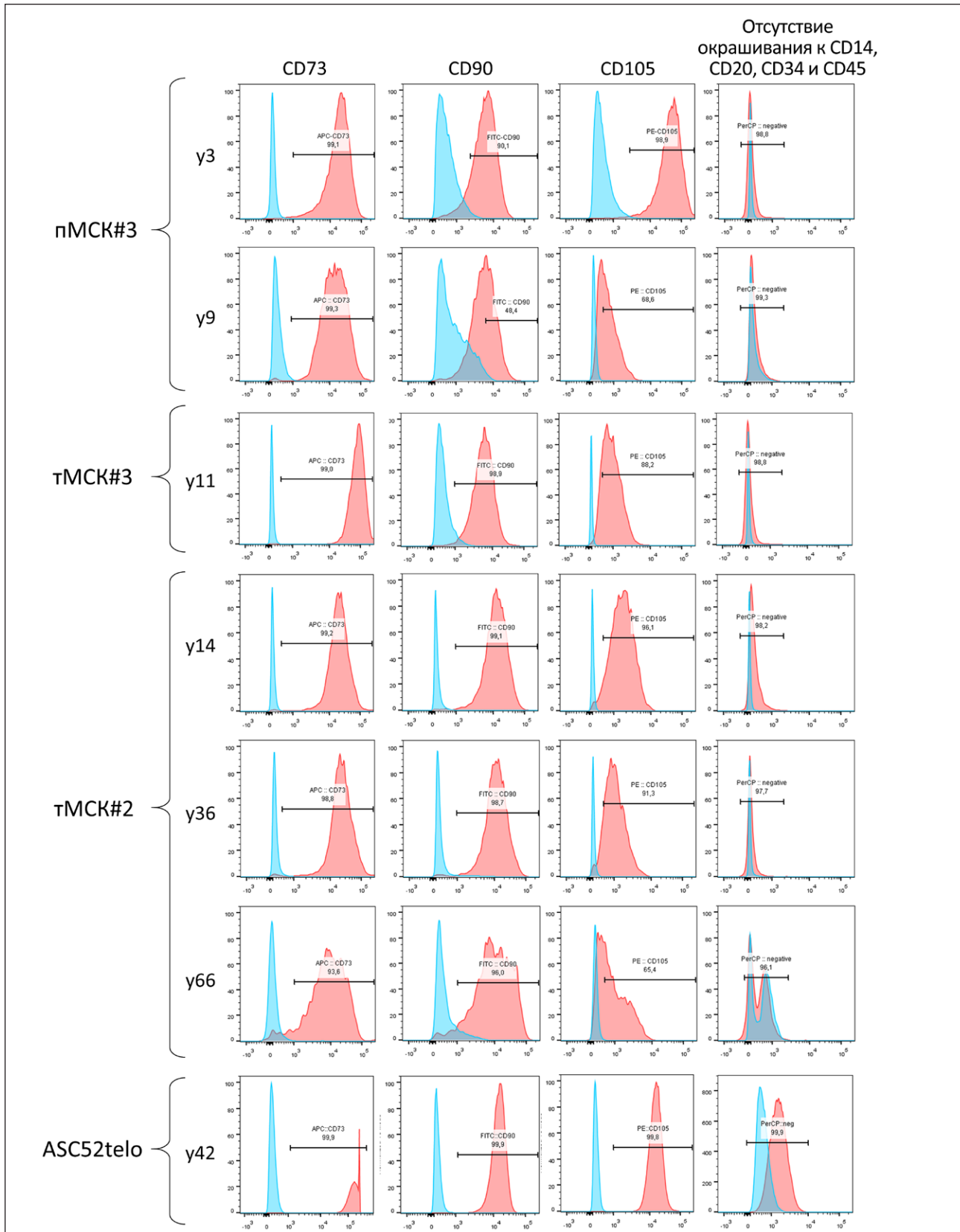


Рис. 3. Сравнительная динамика сохранности МСК-специфического иммунофенотипа в культурах МСК, первичных (пМСК#3) и с пролонгированным пролиферативным потенциалом (тМСК#2, тМСК#3 и ASC52telo). У3 – 3 УКП и т.д.

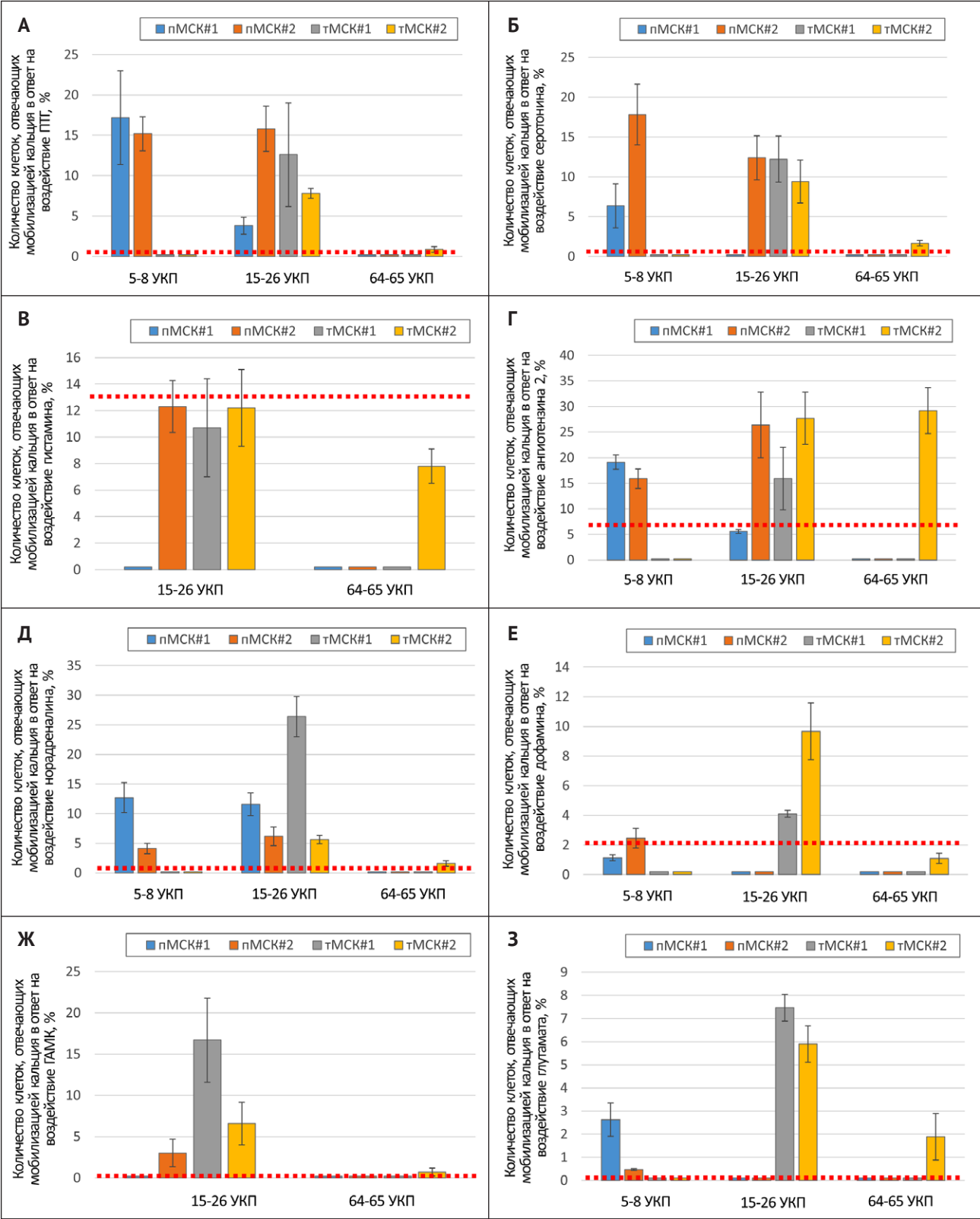


Рис. 4. Сравнение гормональной чувствительности культур МСК: первичных (пМСК#1 и пМСК#2 – 5–15 УКП) и с пролонгированным пролиферативным потенциалом (тМСК#1 и тМСК#2 – 26–65 УКП) в динамике. Красной пунктирной линией отмечены соответствующие значения для коммерчески доступной иммортализованной линии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

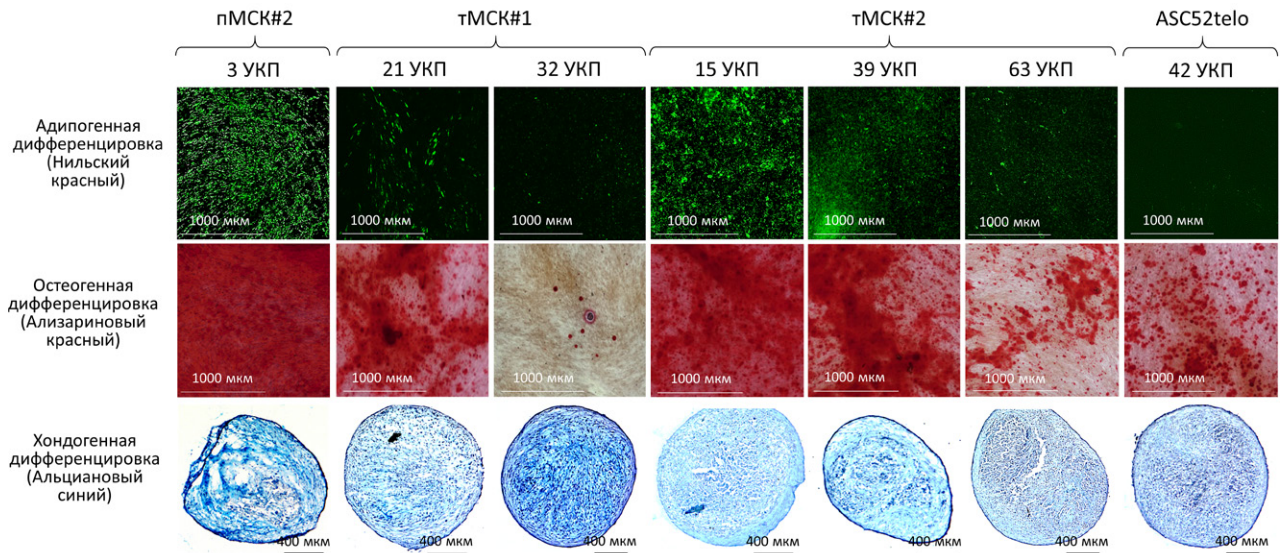


Рис. 5. Динамика сохранности дифференцировочного потенциала культур МСК с пролонгированным пролиферативным потенциалом: тМСК#1 и тМСК#2. Для сравнения приведены данные по дифференцировке первичной культур МСК (пМСК#2 3 УКП) и коммерчески доступной иммортализованной линии МСК ASC52telo (42 УКП)

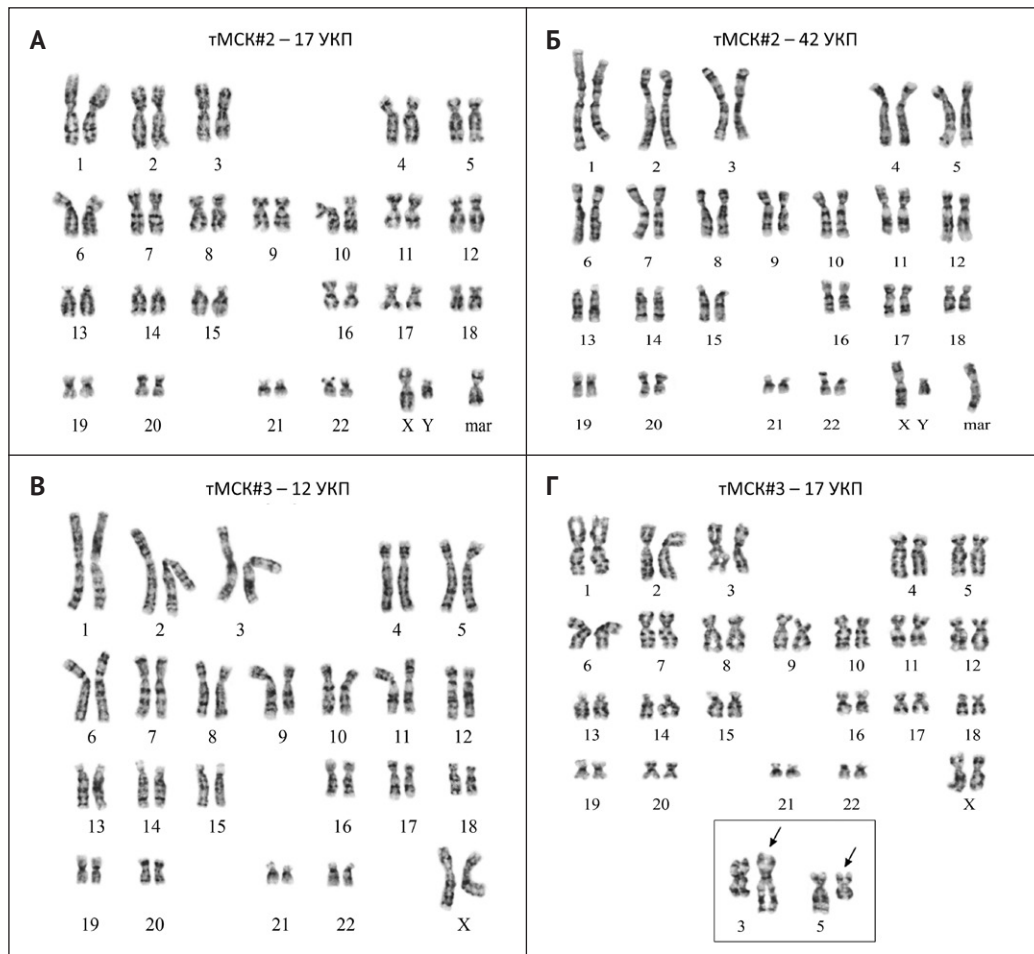


Рис. 6. Кариотипический анализ культур МСК с пролонгированным пролиферативным потенциалом: тМСК#2 и тМСК#3 с 12 по 42 УКП. Для культуры тМСК#3 показана идентифицированная транслокация $t(3;5)(q26;q11.2)$

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 секретоме 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 секретомы 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 секретома тМСК#2. В секретоме пМСК#2 и тМСК#2 не было обнаружено признаков hTERT.

Количественный анализ секретома 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, $n \geq 3$).

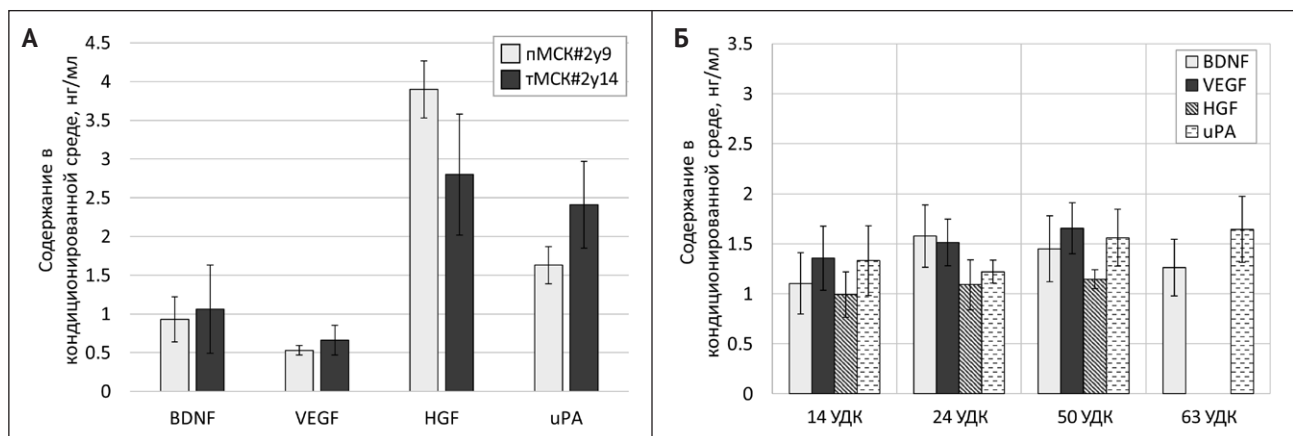


Рис. 7. Продукция проангиогенных и нейротрофических факторов культурой МСК с пролонгированным пролиферативным потенциалом. А — влияние гиперэкспрессии гена hTERT в культурах МСК на продукцию основных нейротрофических и ангиогенных факторов; Б — продукция основных нейротрофических и ангиогенных факторов 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 нейтротрофических 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, демонстрировала 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 пациент-специфичной 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 Neuropathol*. 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.

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.

Карагяур 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. Dzhaui — 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. Karagyaury — Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, Institute for Regenerative Medicine, Lomonosov Moscow State University; Associate Professor, Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University.

Сравнение культуральных сред для мезенхимных стромальных клеток жировой ткани человека как объекта исследования и производственного культивирования

О.А. Григорьева^{1,2}, Н.А. Басалова¹, И.О. Коробкина¹, В.Н. Бирюкова^{1,2}, П.И. Макаревич¹⁻³

¹ Центр регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного института ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», 119192, Москва, Ломоносовский проспект, 27, к. 10, Россия

² Факультет фундаментальной медицины Медицинского научно-образовательного института ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», 119192, Москва, Ломоносовский проспект, 27, к. 1, Россия

³ ООО «Генная и клеточная терапия», 119234, Москва, тер. Ленинские Горы, д. 1 стр. 77, Россия

Адрес для корреспонденции: makarevichpi@my.msu.ru

Аннотация

Выбор условий культивирования клеточных линий является лимитирующим фактором для процедур получения, размножения клеток *in vitro*, а также для разработки лекарственных препаратов на их основе. В данной работе мы проанализировали характеристики первичных линий мезенхимных стромальных клеток (МСК) человека, полученных из жировой ткани, выделенных и культивированных в среде роста с добавлением сыворотки AdvanceSTEM™ (Cytiva) и бессывороточной среде CellCor™ Serum free CDM for hMSC (Xcell). Использование двух типов сред позволяло получить жизнеспособные клеточные линии МСК из жировой ткани человека. При этом скорость пролиферации в бессывороточной среде оказалась выше, что выражалось в укорочении PDT, lag-фазы, времени между пассажами как при культивировании свежесывороточных клеток, так и после разморозки линий, изначально культивированных на среде с сывороткой. Однако использование стандартного протокола криоконсервации клеток, выделенных и культивированных на среде CellCor™, не позволило эффективно выводить эти линии из разморозки. Кроме того, была обнаружена склонность МСК собираться в кластеры при использовании этой среды, что свидетельствует о необходимости дальнейшего подбора условий работы с ней. МСК являются одними из наиболее перспективных клеток для разработки продуктов для регенеративной медицины, в частности за счет секретируемых этими клетками белков. Концентрации факторов роста VEGF, IGF, HGF и ангиопоэтина-1 в кондиционированной клетками среде роста значительно не отличались при культивировании в двух средах. Также не было обнаружено статистически значимых различий в концентрации и размерах внеклеточных везикул в среде. Таким образом, применение бессывороточной среды CellCor™ позволяет освободиться от ксеногенных продуктов и может уменьшить время наработки клеточной массы МСК, что является важным параметром при разработке клеточных продуктов, не изменяя секреторные свойства этих клеток по сравнению с культивированием в среде AdvanceSTEM™, однако требуется дальнейший подбор условий для оптимизации протоколов.

Ключевые слова: культуральная среда, МСК, клеточная культура, жировая ткань

Конфликт интересов: П.И. Макаревич является генеральным директором ООО «Генная и клеточная терапия» и членом 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: Григорьева О.А., Басалова Н.А., Коробкина И.О., Бирюкова В.Н., Макаревич П.И. Сравнение культуральных сред для мезенхимных стромальных клеток жировой ткани человека как объекта исследования и производственного культивирования. *Регенерация органов и тканей*. 2024;2(2):46–58. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-2-46-58>

Поступила 11.05.2024

Обработана 06.06.2024

Принята к публикации 15.06.2024

Comparison of culture media for human adipose tissue mesenchymal stromal cells as an object of research and industrial cultivation

Olga A. Grigorieva^{1,2}, Nataliya A. Basalova¹, Irina O. Korobkina¹, Victoria N. Biryukova^{1,2}, Pavel I. Makarevich^{1–3}

¹ Centre for Regenerative Medicine, Medical Research and Education Institute, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Lomonosovsky prospect 27, b. 10, Russia, 119192

² Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Lomonosovsky prospect, 27, b. 1, Russia, 119192

³ LLC “Gene and cell therapy”, Moscow, ter. Leninskie gory, 1, b. 77, Russia, 119234

Correspondence address: makarevichpi@my.msu.ru

Abstract

The choice of cell culturing conditions is a limiting factor for the procedures of obtaining and expanding cells in vitro, as well as for developing drugs based on them. In this work, we analyzed the characteristics of primary human mesenchymal stromal cell (MSC) lines obtained from adipose tissue, isolated and cultured in a growth medium supplemented with AdvanceSTEM™ serum (Cytiva) and a serum-free medium CellCor™ Serum free CDM for hMSC (Xcell). The use of two types of media made it possible to obtain viable MSC cell lines from human adipose tissue. At the same time, the proliferation rate in the serum-free medium was higher, which was expressed in shortening of PDT, lag phase, time between passages, both during cultivation of freshly isolated cells and after defrosting of lines initially cultured in a medium with serum. However, the use of a standard cryopreservation protocol for cells isolated and cultured in CellCor™ medium did not allow for the effective recovery of these lines from thawing. In addition, a tendency for MSCs to form clusters was found when using this medium, indicating the need for further selection of working conditions with it. MSCs are among the most promising cells for the development of products for regenerative medicine, in particular, due to the proteins secreted by these cells. The concentrations of growth factors VEGF, IGF, HGF and angiopoietin-1 in the cell-conditioned growth medium did not differ significantly when cultured in the two media. Also, no statistically significant differences were found in the concentration and size of extracellular vesicles in the medium. Thus, the use of the serum-free CellCor™ medium allows for the elimination of xenogenic products and can reduce the time of MSC cell mass production, which is an important parameter in the development of cell products, without changing the secretory properties of these cells compared to cultivation in the AdvanceSTEM™ medium, however, further selection of conditions is required to optimize the protocols.

Keywords: growth medium, MSCs, cell culture, adipose tissue

Conflict of interests: P.I. Makarevich is the CEO of “Gene and cell therapy” LLC and the editorial board member of the journal “Regeneration of Organs and Tissues” 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: Grigorieva O.A., Basalova N.A., Korobkina I.O., Biryukova V.N., Makarevich P.I. Comparison of culture media for human adipose tissue mesenchymal stromal cells as an object of research and industrial cultivation. *Tissue and organ regeneration*. 2024;2(2):46–58. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-2-46-58>

Received 11.05.2024

Revised 06.06.2024

Accepted 15.06.2024

Список сокращений

ВВ — внеклеточные везикулы

ИФА — иммуноферментный анализ

МСК — мезенхимные стромальные клетки

ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота

Angiopoietin-1 — ангиопозтин 1-го типа

HGF — фактор роста гепатоцитов

IGF — инсулиноподобный фактор роста

PDT — время удвоения популяции

VEGF — фактор роста эндотелия сосудов

Введение

Культуры и линии первичных клеток широко применяются для детального изучения механизмов внутриклеточных процессов, оценки терапевтической эффективности и безопасности фармацевтических препаратов, анализа патогенеза, диагностики и терапии различных заболеваний [1]. Несмотря на непрерывное развитие науки и медицины, существуют патологии, для которых доступные терапевтические методы длительное время казались исчерпанными. Однако с постепенным укреплением в мире новой области биомедицины — регенеративной медицины, направленной на восстановление утраченных функций организма за счет активации эндогенных регенераторных ресурсов организма, появились перспективы для персонализированной терапии и инновационных подходов к лечению таких заболеваний с использованием клеток человека и продуктов на их основе [2]. Ключевую роль в получении продуктов на основе клеток человека для регенеративной медицины играют реагенты и расходные материалы, качество которых должно обеспечить высокую эффективность и безопасность препарата.

Одним из ключевых компонентов, определяющих успех культивирования, является питательная среда, способная обеспечить наиболее благоприятные контролируемые условия для культивирования клеток и, следовательно, наработки клеточного продукта высокого качества. Среда культивирования должна в жидкой форме заменить естественную среду клеток, выступая в роли источника энергии, кислорода и других веществ, поддерживая солевой баланс и pH и удерживая метаболиты и остатки клеточного дебриса [3].

В настоящее время одним из наиболее популярных клеточных типов, используемых для исследований в области регенеративной биомедицины и создания тканеинженерных и клеточных продуктов, стали мезенхимные стромальные клетки (МСК), выделяемые из различных тканей и органов. Несмотря на их высокий регенераторный потенциал, обусловленный их физиологическими функциями [4–6], в настоящее время не существует достаточного количества стандартизованных культуральных сред для их масштабной

наработки. Более того, в значительной степени устоялся и тренд на уход от ксеногенных продуктов (сыворотки крупного рогатого скота) и активное продвижение в сторону бессывороточных сред с химически определенным составом. В связи с этим мы провели анализ и в рамках дальнейшего расширения работ в сторону трансляционных исследований предложили для использования среду CellCor™ Serum free CDM for hMSC компании XCell (Южная Корея). Эта бессывороточная среда с химически определенным составом позиционируется производителем как оптимальная для культивирования и масштабирования производства МСК человека. Настоящее исследование представляет собой экспериментальную оценку ее свойств для критических этапов работы с МСК: их выделения, культивирования, криоконсервации и получения препарата их секретомы, содержащего факторы роста и внеклеточные везикулы (ВВ), в сравнении со специализированной средой, поддерживающей пролиферацию недифференцированных МСК человека в культуре, которая используется с добавлением сыворотки.

Материалы и методы

Источник жировой ткани и этическое одобрение исследования

Все описанные исследования были проведены на базе Медицинского научно-образовательного Института МГУ (МНОИ МГУ). Перед проведением инвазивных процедур было получено информированное согласие доноров на забор биологического материала, выделение клеток и их использование в экспериментах. Все процедуры с использованием образцов тканей пациентов были выполнены в соответствии

с Хельсинкской декларацией и были одобрены комитетом по этике МГУ имени М.В. Ломоносова (IRB00010587), протокол № 4 (2018). Всего было получено 3 линии МСК жировой ткани человека.

Культуральные среды

Экспериментальная работа была направлена на оценку критических параметров МСК жировой ткани человека при культивировании в двух средах роста. В качестве контрольной была использована среда AdvanceSTEM™ (Cytiva, США), которая используется с добавлением сыворотки. Данная среда рекомендована производителем для культивирования недифференцированных МСК человека и успешно используется в нашем коллективе для данной задачи [7, 8] (табл. 1).

Выделение МСК

МСК жировой ткани человека выделяли по стандартному протоколу [9] из одинакового объема ткани (для каждого донора) в параллели. Образец ткани механически измельчали в стерильных условиях, помещали в раствор, содержащий 200 ед/мл коллагеназы I типа (Worthington, США) и 40 ед/мл диспазы (Corning, США), на 30–60 минут при 37 °С. После этого к смеси добавляли объем полной среды роста, равный объему использованного фермента, и центрифугировали при 200 g 10 минут. Полученный осадок ресуспендировали в соответствующей среде роста, фильтровали через клеточный фильтр с размером пор 100 мкм (BD Falcon Cell Strainer) и высаживали в чашки Петри подходящего диаметра в примерной концентрации 10⁴ кл./см². Выделенные клетки культивировали в стандартных условиях при 37 °С и 5% CO₂.

Таблица 1. Перечень используемых сред для культивирования

Название, производитель	Каталожный номер	Описание	Добавки
Тестируемая среда CellCor™ Serum free CDM for hMSC, XCell (Южная Корея)	YSP002	Бессывороточная питательная среда с идентифицированным химическим составом, синтезированная для культивирования МСК человека	Антибиотик (Gibco, 15140122)
Контрольная среда AdvanceSTEM™, Cytiva (США)	SH30879.01	Специализированная питательная среда для культивирования недифференцированных МСК человека	Заменитель сыворотки (10% смесь факторов роста (AdvanceSTEM™ Cell Growth Supplement, HyClone™, SH30878.01), антибиотик

Криоконсервация, вывод МСК из заморозки и оценка жизнеспособности

Криоконсервацию МСК жировой ткани человека, культивируемых в стандартных условиях, осуществляли на втором пассаже. Клетки открепляли с помощью последовательной обработки раствором Версена («ПанЭко»), а затем TrypLE (Gibco), осаждали центрифугированием при 200 g в течение 5 минут и ресуспендировали в среде для криоконсервации Synth-a-Freeze (Gibco) в концентрации 10^6 кл./мл. Суспензию помещали в криоприбирки, которые переносили в штатив для заморозки CoolCell (Corning). Далее штатив переносили в кельвинатор ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) на 24 часа, после чего пробирки помещали в автоматизированное криохранилище, где их хранили в парах жидкого азота. Размораживали клетки по стандартному протоколу в параллели, высаживали на тестируемую или контрольную среду роста. Через 24 часа определяли эффективность разморозки оценкой жизнеспособности путем открепления клеток и подсчета с окрашиванием трипановым синим. Жизнеспособность (via) клеточной линии определяли по формуле:

$$\text{Via} = (\text{количество жизнеспособных клеток} / \text{общее количество клеток}) \times 100\%.$$

Оценка времени удвоения с помощью системы Incucyte Zoom

На втором пассаже после выделения или следующем пассаже после разморозки МСК высаживали в культуральные планшеты в концентрации 4000 кл./см². Планшет помещали в автоматический анализатор IncucyteZOOM или BioTek Cytation. В IncucyteZOOM осуществляли цейтраферную съемку в течение 7 дней каждый час. На полученных микрофотографиях с помощью программного обеспечения анализировали площадь конфлюента, занятую клетками, и время появления первых митозов. Для анализа в системе BioTek Cytation в выбранные временные промежутки добавляли флуоресцентную метку Hoechst для мечения ядер и, используя программу Gen5, подсчитывали количество клеток по количеству меченых ядер. На основании полученных данных строили кривую роста клеточной линии и определяли время lag-фазы. Время удвоения популяции (PDT) рассчитывали на линейном участке логарифмической фазы кривой роста по формуле

$$\text{PDT} = t / [\log_2(N/N_0)],$$

где t — время прироста популяции, N_0 — исходное число клеток (площадь, занятая клетками), N — число клеток (площадь, занятая клетками) через время t .

Получение кондиционированной среды, оценка содержания белковых факторов роста и внеклеточных везикул

Образцы клеточной линии высаживали в одинаковой концентрации — 20 000 кл./см². Через сутки после посадки в среду культивирования отбирали культуральную среду, после чего отмывали трижды раствором Хэнкса («ПанЭко», Россия) и добавляли порцию среды DMEM (Gibco, США) с низкой глюкозой без фенолового красного. Инкубировали клеточные линии в течение 30 мин (для анализа фона) и 2 суток (для получения кондиционированной среды, обогащенной внеклеточными везикулами) или 7 дней (для получения кондиционированной среды, обогащенной факторами роста), после чего собирали кондиционированную клетками среду. Центрифугировали образцы среды при 300 g в течение 10 минут для осаждения клеточного дебриса, отбирали супернатант. Полученные образцы сохраняли при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ для дальнейшего анализа уровня белковых факторов роста (VEGF, HGF, IGF, Angiopoietin-1) и концентрации внеклеточных везикул. Уровень секретируемых факторов оценивали методом ИФА с помощью коммерческих наборов (R&D) согласно инструкции производителя. Определение размера и количества частиц во фракции, обогащенной внеклеточными везикулами, с помощью метода анализа траектории наночастиц было выполнено с помощью прибора ZetaView (Particle Metrix, Германия). Регистрировали параметры для фонового и экспериментального образцов, рассчитывали изменение значений концентрации наночастиц между образцами. Для обработки результатов использовали приложение ZetaView Analyzer (Particle Metrix, Германия).

Статистическая обработка

Описательные статистики рассчитывались в пакете GraphPad Prism, данные приведены в виде среднего $\pm$ стандартное отклонение.

Результаты

Эффективность выделения МСК жировой ткани

Всего были выделены культуры клеток из жировой ткани трех пациентов. Оценку морфологии клеток проводили на 1–3–5-е сутки после вы-

деления — визуально с помощью фазово-контрастной микроскопии (рис. 1А). Оценку количества выделившихся клеток проводили путем подсчета числа клеток на микрофотографиях в 3–5 полях зрения на 1–3-и сутки после выделения (табл. 2). Для оценки скорости роста 0 пассажа определяли время после выделения до первого пассирования. Оценку жизнеспособности проводили при первом пассировании методом окрашивания трипановым синим и подсчетом числа жизнеспособных клеток.

Значительных различий в эффективности выделения, жизнеспособности полученных клеточных линий и скорости роста между клетками в контрольной и тестируемой средах выявлено не было. Был сделан вывод о возможности использования тестируемой среды для получения первичных культур МСК человека из жировой ткани.

Поскольку выделение клеток на тестируемой среде происходило эффективно, клеточные линии, выделенные на тестируемой и контрольной средах, культивировали до второго пассажа. При культивировании на тестируемой среде

Таблица 2. Оценка эффективности выделения МСК жировой ткани в тестируемые среды

Показатель	Контрольная среда	Тестируемая среда
Количество выделившихся клеток, кл./п. зр.	79 ± 20	81 ± 21
Время от выделения до 1 пассирования, дни	6,0 ± 1,0	6,5 ± 0,5
Жизнеспособность, %	95,7 ± 4,0	94,5 ± 0,5

клетки меньше распластывались по поверхности культуральной посуды, а также обладали тенденцией спонтанно после пассирования формировать «кластеры» (рис. 1Б).

Таким образом была показана возможность культивирования выделенных из жировой ткани человека МСК на тестируемой среде культивирования до второго пассажа, при этом наблюдалось уменьшение размера и степени расплывчатости клеток, а также была отмечена тенденция МСК спонтанно образовывать «кластеры» при культивировании в тестируемой среде.

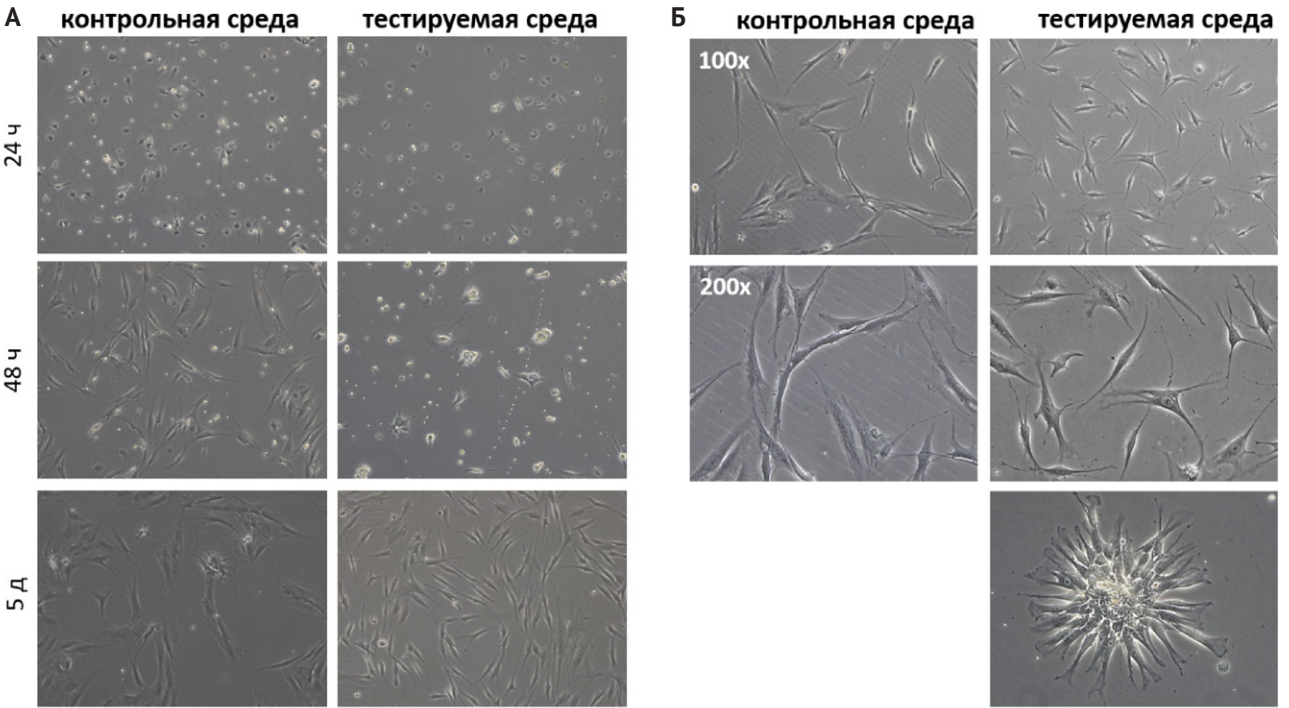


Рис. 1. Репрезентативные микрофотографии клеточной линии МСК жировой ткани человека. Фазово-контрастная микроскопия: А — 0 пассажа, через 1, 3 и 5 суток культивирования при выделении и культивировании в контрольной и тестируемой среде роста. Увеличение ×100; Б — 1-й пассаж, при культивировании в контрольной и тестируемой среде роста. Увеличение ×100 и ×200 соответственно

Оценка эффективности заморозки после культивирования на контрольной и тестируемой средах

Осуществляли криоконсервацию по стандартному протоколу линии МСК 2–3-го пассажа, культивируемых в стандартных условиях или в тестируемой среде, в количестве 3–4 ампул.

Через 24 часа определяли эффективность заморозки путем открепления клеток и подсчета с окрашиванием трипановым синим. Мы показали, что выживаемость клеток после разморозки значимо не различалась. Вновь было отмечено, что клетки в тестируемой среде имели тенденцию собираться в кластеры и снижали пролиферативную активность. У всех трех доноров наблюдали гибель клеток в тестируемой среде через 2–6 дней после разморозки (рис. 2).

Таким образом, линии МСК жировой ткани человека, выделенные и культивированные до момента заморозки на тестируемой среде роста, не удастся успешно вывести после криоконсервации и криохранения по стандартному

протоколу. Возможно, требуется подбор нового протокола заморозки или другого раствора для криопротекции.

Эффективность вывода из заморозки МСК жировой ткани, выращенных с использованием контрольной среды

Поскольку после криоконсервации на тестируемой среде не был достигнут удовлетворительный результат, мы протестировали возможность разморозки клеточных культур из полученных ранее на контрольной среде коллекций (Биобанк Центра регенеративной медицины, МГУ имени М.В. Ломоносова, <https://human.depo.msu.ru>, $n = 3$). Жизнеспособность клеточной линии на тестируемой среде через сутки после разморозки в среднем оказалась на 10% ниже ($69,3 \pm 7,4\%$), чем в контрольной среде ($79,2 \pm 4,3\%$). Кроме того, мы вновь обнаружили описанную после выделения МСК из ткани тенденцию клеток собираться в «кластеры» при культивировании в тестируемой среде. Таким образом, данную способность МСК сохраняли и после этапа криоконсервации. Морфология клеток

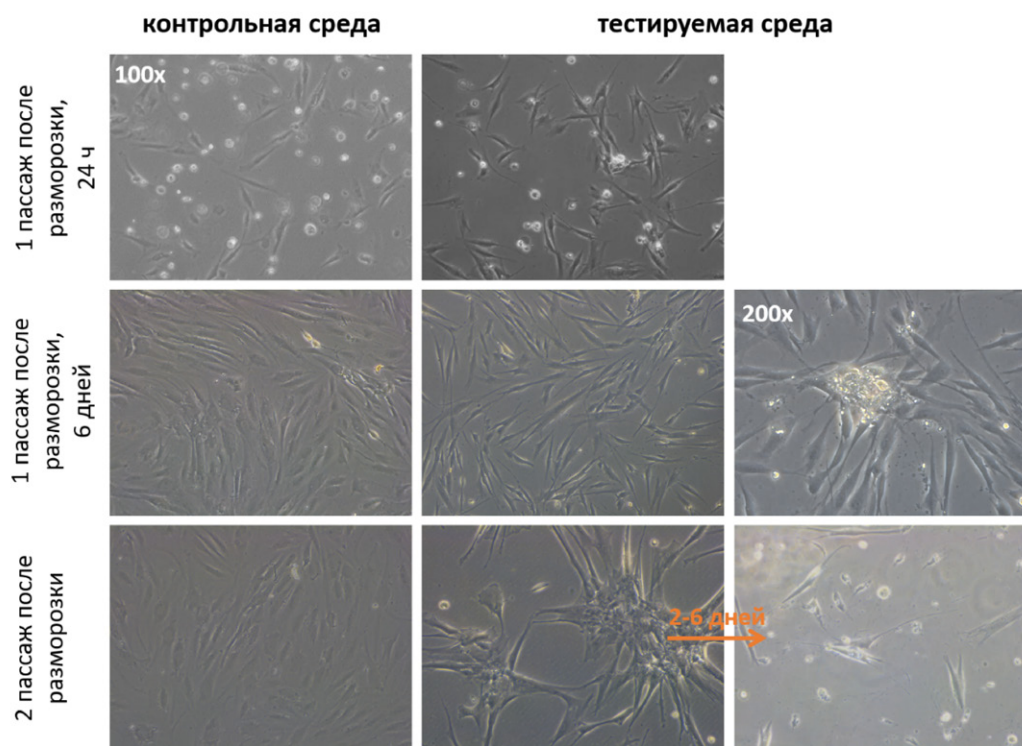


Рис. 2. Репрезентативные микрофотографии клеточной линии МСК жировой ткани человека, 1-й и 2-й пассаж после разморозки при культивировании в контрольной и тестируемой средах роста. Оранжевая стрелка указывает на репрезентативную микрофотографию, отображающую изменение морфологии клеток в тестируемой среде роста через 2–6 дней после культивирования на 2-м пассаже после разморозки. Фазово-контрастная микроскопия. Увеличение $\times 100$ и $\times 200$ соответственно

через 24 и 48 часов после разморозки представ-
лена на рисунке 3.

**Эффективность культивирования МСК
жировой ткани**

После разморозки осуществляли культиви-
рование клеток с использованием контрольной
и тестируемой среды до 7–8-го пассажа, контр-
олируя параметры морфологии (визуальное на-
блюдение) и скорости роста клеточной линии
(продолжительность роста пассажа с момента
адгезии до пассирования при достижении плот-
ности 80–90%) (рис. 4). Время от посадки до сле-
дующего пассирования в среднем было меньше
в тестируемой среде, в то время как количество
клеток, которое снимали с чашки при достиже-
нии плотности 80–90%, было выше, что говорит
о более высокой скорости пролиферации в тести-
руемой среде по сравнению с контрольной (табл.
3). При этом в тестируемой среде клетки занима-
ют меньшую площадь (меньше распластываются)
по сравнению с контрольной средой и имеют тен-
денцию сбиваться в «кластеры» (рис. 4).

На следующем пассаже после разморозки ана-
лизировали скорость пролиферации клеточных
линий с помощью автоматизированного анали-
затора. При культивировании в тестируемой сре-
де время удвоения популяции и длительность
лаг-фазы оказалась меньше, то есть выделенные
клетки значительно быстрее пролиферировали
по сравнению с контрольной средой (табл. 4).

Таким образом, при выведении из разморозки
на тестируемую среду МСК жировой ткани че-
ловека имели жизнеспособность в среднем ниже
на 10% по сравнению с контрольной средой, более

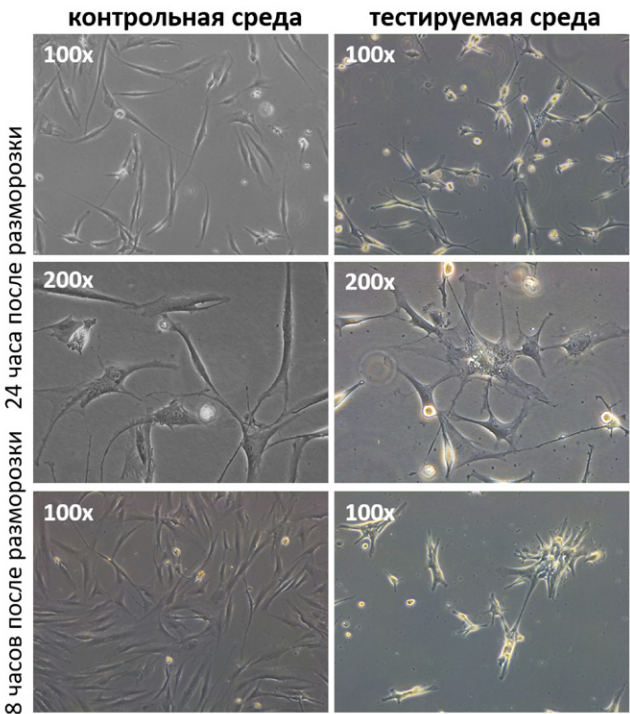


Рис. 3. Репрезентативные микрофотографии клеточной
линии МСК жировой ткани человека через 24 и 48 часов
после разморозки клеточной линии в контрольной и те-
стируемой средах роста. Фазово-контрастная микроско-
пия. Увеличение $\times 100$ и $\times 200$ соответственно

Таблица 3. Оценка эффективности длительного куль-
тивирования МСК в тестируемых средах после крио-
консервации

Показатель	Контрольная среда	Тестируемая среда
Среднее время от посадки до пассирования, дни	$8,9 \pm 0,2$	$6,2 \pm 0,2$
Среднее количество клеток, тыс. кл.	153 ± 36	234 ± 65

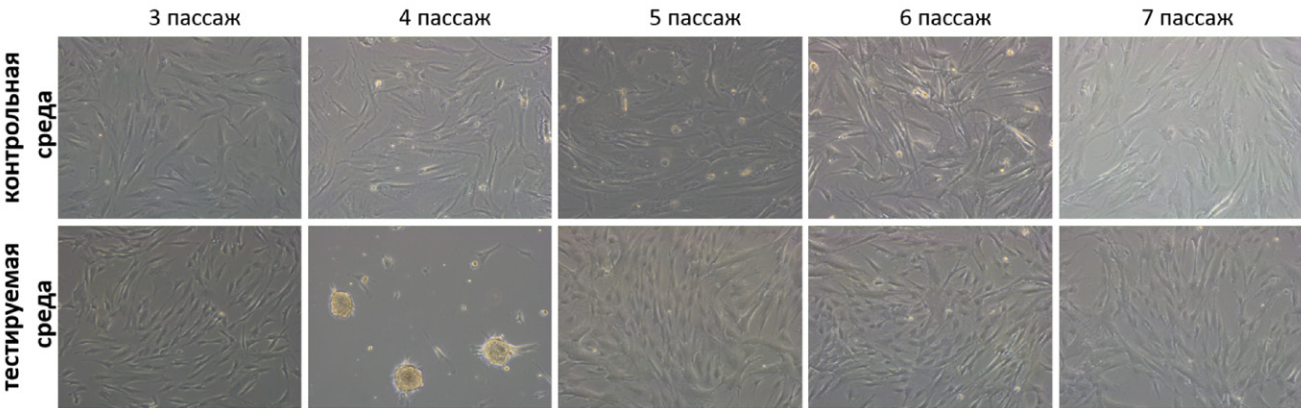


Рис. 4. Репрезентативные микрофотографии морфологии клеточной линии МСК жировой ткани человека 3–7-го пасса-
жа после разморозки и культивирования в контрольной и тестируемой средах роста. Фазово-контрастная микро-
скопия. Увеличение $\times 100$

Таблица 4. Параметры пролиферативной активности МСК после разморозки

Показатель	Контрольная среда	Тестируемая среда
PDT, ч	91,4 ± 20,8	51,6 ± 20,9
Время lag-фазы, ч	26,0 ± 2,6	17,3 ± 1,2

высокую скорость пролиферации, что выражалось в снижении времени удвоения популяции в 1,8 раза и времени lag-фазы в 1,5 раза, снижении времени между посадкой и пассированием между 3-м и 8-м пассажами в 1,4 раза и ростом количества клеток, открепляемых с чашки, в 1,5 раза.

Эффективность получения кондиционированной среды МСК, содержащей компоненты их секретомата

Одним из ключевых механизмов регенераторного действия МСК является продукция ими факторов роста, цитокинов и внеклеточных везикул (ВВ), которые способны передавать ши-

рокий спектр сигналов другим типам клеток и получили название секретомата. Кроме того, это свойство стало основой для создания целого класса биологических лекарственных препаратов, получаемых из кондиционированной среды МСК. В связи с этим мы провели оценку содержания основных факторов роста в кондиционированной среде, полученной после культивирования МСК на контрольной или тестируемой средах (рис. 5А).

Вторым важнейшим параметром является обогащение среды ВВ макромолекулярными комплексами, в том числе участвующими в переносе нуклеиновых кислот, белковых агрегатов, липидов и метаболитов между клетками и тканями. Оценка количества частиц в препаратах кондиционированной среды, полученных после культивирования МСК в сравниваемых средах, не выявила отличий (рис. 5Б). В то же время при сравнении размера частиц мы наблюдали тенденцию к уменьшению в тестируемой среде.

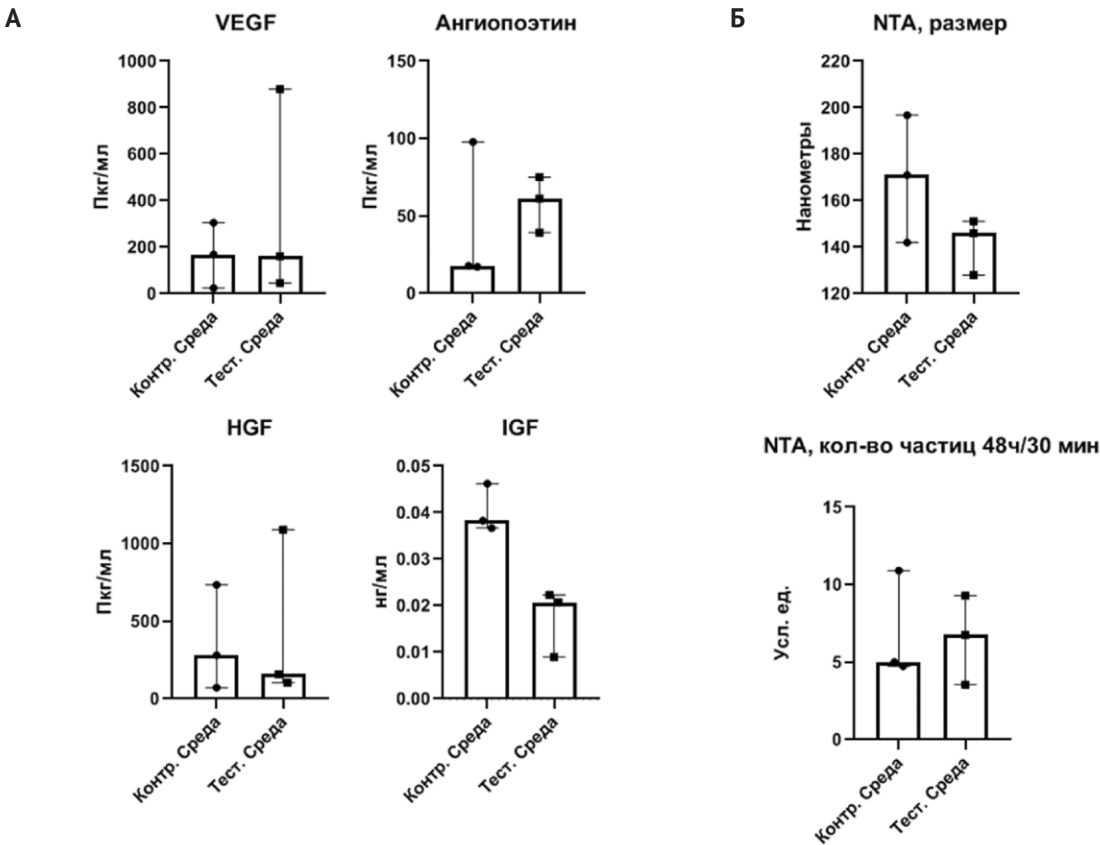


Рис. 5. Оценка секретируемых компонентов в кондиционированной среде МСК: А — оценка уровня секреции факторов роста МСК жировой ткани человека, культивированных на контрольной и тестируемой средах. Не было обнаружено статистически значимых различий между образцами в контрольной и тестируемой средах; Б — количество и размер внеклеточных везикул, секретируемых МСК жировой ткани, культивированных на контрольной и тестируемой средах. Не было обнаружено достоверно значимых различий между группами

Таким образом, не наблюдалось статистически значимого изменения уровня секретируемых факторов роста VEGF, HGF, IGF, ангиопоэтина-1, а также числа BV при культивировании в тестируемой среде по сравнению с контрольной. В то же время можно было отметить тенденцию к увеличению секреции ангиопоэтина-1, а также снижению содержания IGF и размера детектируемых частиц после культивирования в тестируемой среде.

Определение оптимальных условий для культивирования МСК

На жизнеспособность и пролиферативную активность клеточной линии помимо среды роста значительно влияние могут оказывать и другие факторы, среди которых критическими могут стать адгезивная поверхность, тип покрытия пластика, а также тип используемого раствора для дезагрегации клеток при пассировании. Учитывая трудности, с которыми мы столкнулись при разморозке (гибель клеток) и пассировании (склонность к формированию кластеров)

на тестируемой среде, мы протестировали различные варианты растворов для открепления клеток. Производитель тестируемой среды рекомендует использование TrypLE в качестве такого раствора. Мы протестировали возможность разморозки клеточной линии и ее дальнейшее пассирование в тестируемой среде с использованием раствора трипсина (0,05%) в ЭДТА (Gibco) и показали, что в таких условиях клетки получалось пассировать успешно несколько пассажей после разморозки. Кроме того, при сравнении пластика SPL Life science (Китай) и высокоадгезивного Greiner (США) в обоих случаях активная пролиферация МСК в тестируемой среде происходила при использовании раствора трипсин-ЭДТА, в то время как использование TrypLE может приводить к кластеризации МСК независимо от вида пластика (рис. 6А). По рекомендации производителя мы в ряде экспериментов покрывали пластик для культивирования раствором 0,1% стерильного желатина, однако при этом наблюдали гибель клеток в случае работы с TrypLE (рис. 6Б).

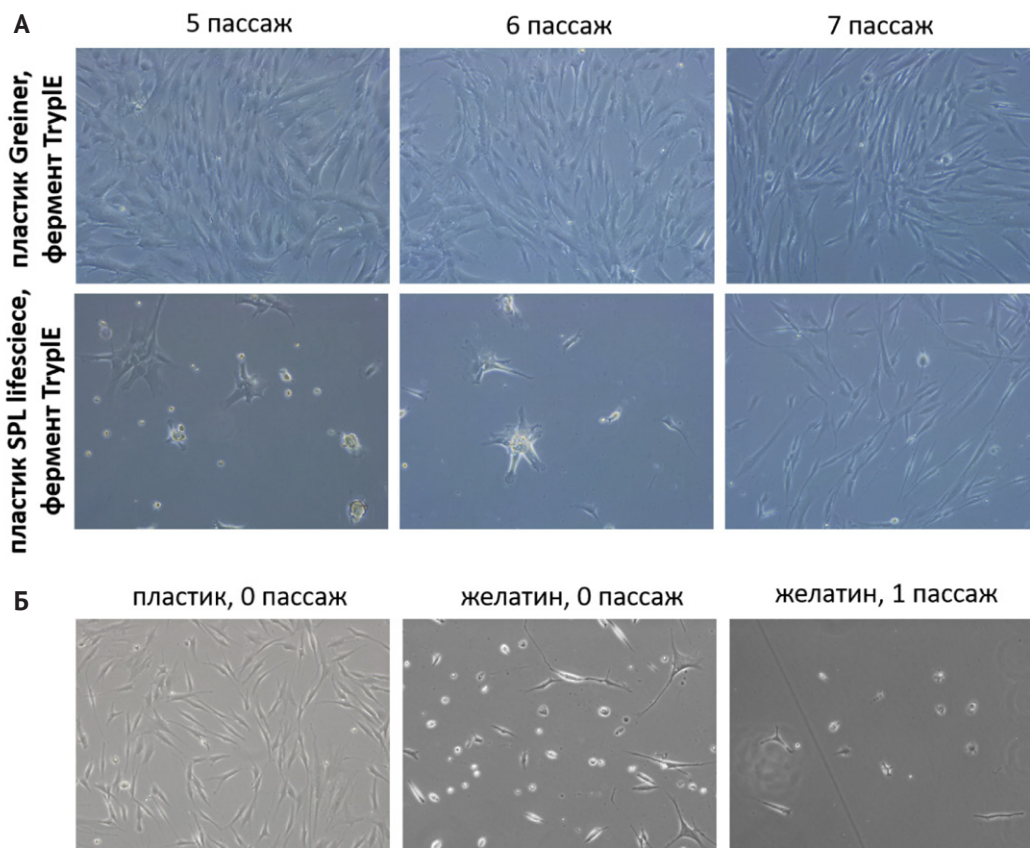


Рис. 6. Репрезентативные микрофотографии морфологии клеточной линии МСК жировой ткани человека после разморозки и культивирования в тестируемой среде роста. Фазово-контрастная микроскопия. Увеличение $\times 100$: А — сравнение пластика Greiner и SPL, используемого для культивирования клеток; Б — сравнение пластика и желатина

Обсуждение и заключение

На сегодняшний день количество исследований, описывающих влияние среды культивирования на характерные свойства МСК, в том числе для их использования для производства лекарственных препаратов на основе факторов, секретируемых этими клетками (секретом), крайне ограничено. Поэтому результаты, полученные в процессе проведенной работы, позволят в будущем более эффективно оптимизировать условия культивирования МСК, в том числе для экономически выгодного производства биологических лекарственных препаратов на их основе.

Изучая влияние сред культивирования на свойства МСК, выделенных из жировой ткани человека, мы выяснили, что выделение клеток возможно на тестируемую нами среду с эффективностью, сравнимой с контрольной средой. Вместе с тем в тестируемой среде наблюдаются нехарактерные для МСК изменения в морфологии, проявляющиеся в виде спонтанной агрегации и росте в форме кластеров. Известно, что адгезия клеток к поверхности пластика происходит посредством адгезивных белков внеклеточного матрикса (фибронектина, витронектина и других), которые в большом количестве содержатся в сыворотке [10]. Адгезия клеток в бессывороточной среде может быть затруднена при недостатке таких белков. Сниженное содержание таких белков в бессывороточной среде может объяснять морфологические особенности (меньшую степень расплывания, меньшие размеры клеток и, как следствие, большую плотность клеток на 1 см²) и склонность к формированию кластеров, которые могут возникать как следствие большей склонности формировать межклеточные контакты, нежели контакты «клетка — матрикс», по сравнению с культивированием в среде с добавлением сыворотки. Возможным подходом здесь может рассматриваться предварительное покрытие культурального пластика компонентами внеклеточного матрикса, такими как коллаген I типа, фибронектин, полилизин, или использование высокоадгезивного пластика.

Также стоит отметить, что линии, культивируемые на тестируемой среде, не сформировали культуру, пригодную к использованию после криоконсервации. Вероятно, необходим дальнейший подбор условий культивирования, например смена адгезионной поверхности, для оптимизации процесса культивирования

и предотвращения кластеризации. По нашим предварительным данным, значительное влияние на успех роста и криоконсервации МСК в тестируемой среде может иметь раствор, используемый для дезагрегации клеток.

Интересно отметить, что возможно наращивание культуры на тестируемой среде из криоколлекций, полученных на других ростовых средах, как минимум на AdvanceStem™. После криоконсервации, несмотря на сохраненную способность к спонтанному формированию кластеров, клетки в тестируемой среде характеризуются существенно (в 1,8 раза) более коротким PDT. Более того, мы отметили, что при одинаковой плотности клеток в культуре, выращенной на тестируемой среде, примерно в 1,5 раза больше, чем в контрольной. Эти факты говорят о возможности использования тестируемой среды для быстрого наращивания клеточной массы.

Вместе с тем существуют данные, что образование многоклеточных агрегатов может способствовать повышенной секреции МСК прогенераторных факторов, так как известно, что секретирующий профиль МСК может быть связан с морфологией клеток [11], а в 3D-условиях МСК способны секретировать более высокие уровни таких молекул, как VEGF, IL-11, FGF-2, ангиогенин [6, 12]. Мы показали, что наблюдаемые особенности в морфологии не сказываются на секреторной активности МСК в тестируемой среде. Так, мы показали, что статистически значимого изменения уровня секретируемых факторов роста VEGF, HGF, IGF, ангиопоэтина-1, а также числа частиц, совпадающих по размерам с BB при культивировании в тестируемой среде по сравнению с контрольной не происходит. Вместе с тем наблюдается уменьшение размера секретируемых частиц, что может говорить о сдвиге профиля секреции в сторону экзосомальной, но не микровезикулярной фракции.

Таким образом, с учетом отсутствия животных компонентов тестируемая среда Cellcor™ представляется оптимальным выбором для индустриального масштабирования культуры МСК, не уступая референсному аналогу AdvanceSTEM™. Другим преимуществом данной среды является быстрая пролиферация мезенхимных стромальных клеток с сохранением их фенотипа и секреторного профиля, что делает ее привлекательной для масштабирования

при производстве клеточных продуктов и препаратов на их основе. Однако требуется дальнейшее уточнение условий для подбора оптимальных протоколов культивирования.

Финансирование: Работы проведены в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова. Авторы

благодарят ООО «Внешбиоторг» за предоставленные реагенты для ряда экспериментов.

Funding: The work was carried out under state assignment of Lomonosov Moscow State University. The authors express their gratitude to «Vneshbiotorg» LLC for reagent supply.

Литература

1. Charwat V, Kasper C, Lavrentieva A. Cell Culture Technology. Cham: Springer International Publishing; Imprint: Springer; 2018.
2. Ciccocioppo R, Cantore A, Chaimov D, Orlando G. Regenerative medicine: the red planet for clinicians. Intern Emerg Med. 2019;14(6):911–921.
3. Freshney RI, Capes-Davis A, Gregory C, Przyborski S. Culture of animal cells : a manual of basic technique and specialized applications. Seventh edition. ed. Hoboken, New Jersey: Wiley Blackwell; 2016. xxxviii, 684 p.
4. Caplan AI, Correa D. The MSC: an injury drugstore. Cell Stem Cell. 2011;9(1):11–15.
5. Krampera M, Le Blanc K. Mesenchymal stromal cells: Putative microenvironmental modulators become cell therapy. Cell Stem Cell. 2021;28(10):1708–1725.
6. Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, Schneider J, Perez-Fernandez R. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. Int J Mol Sci. 2017;18(9), 1852.
7. 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.
8. Sagaradze G, Grigorieva O, Nimiritsky P, Basalova N, Kalinina N, Akopyan Z, et al. Conditioned Medium from Human Mesenchymal Stromal Cells: Towards the Clinical Translation. Int J Mol Sci. 2019;20(7), 1656.
9. Grigorieva O, Arbatskiy M, Novoseletskaia E, Dyachkova U, Ishkin A, Kalinina N, et al. Platelet-Derived Growth Factor Induces SASP-Associated Gene Expression in Human Multipotent Mesenchymal Stromal Cells but Does Not Promote Cell Senescence. Biomedicines. 2021;9(10), 1290.
10. Uzman A. Molecular Cell Biology (4th edition): Harvey Lodish, Arnold Berk, S. Lawrence Zipursky, Paul Matsudaira, David Baltimore and James Darnell; Freeman & Co., New York, NY, 2000, 1084 p. ISBN 0-7167-3136-3. Biochemistry and Molecular Biology Education. 2001;29(3):126-8.
11. Leuning DG, Beijer NRM, du Fosse NA, Vermeulen S, Lievers E, van Kooten C, et al. The cytokine secretion profile of mesenchymal stromal cells is determined by surface structure of the microenvironment. Sci Rep. 2018;8(1):7716.
12. Potapova IA, Gaudette GR, Brink PR, Robinson RB, Rosen MR, Cohen IS, et al. Mesenchymal stem cells support migration, extracellular matrix invasion, proliferation, and survival of endothelial cells in vitro. Stem Cells. 2007;25(7):1761–1768.

Об авторах

Григорьева Ольга Александровна — к.б.н., н.с. лаборатории репарации и регенерации тканей Центра регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного института МГУ имени М.В. Ломоносова; с.н.с. НИЛ генных и клеточных технологий факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Басалова Наталия Андреевна — к.б.н., м.н.с. лаборатории репарации и регенерации тканей Центра регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного

Григорьева О.А. и соавт.

Сравнение сред для производственного культивирования МСК

института МГУ имени М.В. Ломоносова; м.н.с. НИЛ генных и клеточных технологий факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Коробкина Ирина Олеговна — ведущий инженер Центра регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного института МГУ имени М.В. Ломоносова.

Бирюкова Виктория Николаевна — аспирант кафедры биохимии и регенеративной биомедицины Факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Макаревич Павел Игоревич — к.м.н., заведующий лабораторией медицинской биоинженерии Центра регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного института МГУ имени М.В. Ломоносова; доцент кафедры биохимии и регенеративной биомедицины Факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова; генеральный директор ООО «Генная и клеточная терапия».

Authors

Nataliya A. Basalova — Cand. Sci. (Biology), junior research assistant of the Laboratory of Tissue Repair and Regeneration of the Centre for Regenerative Medicine of the Medical Research and Educational Institute of Lomonosov Moscow State University; junior research assistant of the Research Institute of Gene and Cellular Technologies of the Faculty of Medicine of Lomonosov Moscow State University.

Olga A. Grigorieva — Cand. Sci. (Biology), research assistant of the Laboratory of Tissue Repair and Regeneration of the Centre for Regenerative Medicine of the Medical Research and Educational Institute of Lomonosov Moscow State University; senior research assistant of the Research Institute of Gene and Cellular Technologies of the Faculty of Medicine of Lomonosov Moscow State University.

Irina O. Korobkina — leading engineer of the Centre for Regenerative Medicine of the Medical Research and Educational Institute of Lomonosov Moscow State University.

Victoria N. Biryukova — post-graduate researcher, Department of Biochemistry and Regenerative Biomedicine of the Faculty of Medicine of Lomonosov Moscow State University.

Pavel I. Makarevich — M.D., Cand. Sci. (Medicine), head of the Laboratory of Medical bioengineering, Centre for Regenerative Medicine of the Medical Research and Educational Institute of Lomonosov Moscow State University; Associate Professor of the Department of Biochemistry and Regenerative Biomedicine of the Faculty of Medicine of Lomonosov Moscow State University; CEO at “Gene and cell therapy”, LLC.

<https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-2-11-32>



Механизмы участия микроРНК эндотелиальных клеток в регуляции ангиогенеза

П.С. Климович^{1,2}, В.А. Дзряня¹, Е.В. Семина¹, К.А. Рубина¹

¹ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», 119192, г. Москва, Ленинские горы, 1, Россия

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова» Минздрава России, 121552 ул. Академика Чазова, 15а, Москва, Россия

Адрес для корреспонденции: dzreya2016@mail.ru

Аннотация

XX век ознаменовался пониманием того, что более 80% генов имеют дополнительную биологическую функцию в клетке, связанную с регуляцией экспрессии других генов. С таких генов могут экспрессироваться некодирующие регуляторные РНК различного типа, в том числе и микроРНК, способные изменять экспрессию белков в клетке. МикроРНК представляют собой одноцепочечные последовательности РНК длиной 20–25 нуклеотидов, которые регулируют экспрессию генов на посттранскрипционном уровне посредством деградации или репрессии трансляции целевой мРНК. В настоящем обзоре рассмотрены аспекты биогенеза микроРНК в клетках млекопитающих, а также их функции в эндотелиальных клетках и в регуляции ангиогенеза.

Ключевые слова: микроРНК, некодирующие РНК, эндотелиальные клетки, ангиогенез, сосуды, *Plaur-miR1*, микроРНК сосудов

Конфликт интересов: Е.В. Семина и К.А. Рубина являются членами редакционной коллегии 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.

Финансирование: Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства здравоохранения РФ в рамках научного проекта ГЗ НИР № НИОКТР 124020200013-3 «Некодирующие РНК как перспективное направление в регуляции обновления и репарации сердечно-сосудистой системы».

Для цитирования: Климович П.С., Дзряня В.А., Семина Е.В., Рубина К.А. Механизмы участия микроРНК эндотелиальных клеток в регуляции ангиогенеза. *Регенерация органов и тканей*. 2024;2(2):59–81. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-2-11-32>

Поступила 15.03.2024

Обработана 22.05.2024

Принята к публикации 15.06.2024

Endothelial cells microRNAs participation in the angiogenesis regulation

Polina S. Klimovich^{1,2}, Valentina A. Dzreyan¹, Ekaterina V. Semina¹, Kseniya A. Rubina¹

¹ Lomonosov Moscow State University, Russian Federation, Moscow, Leninskie Gory, 1, 119991

² Chazov National Medical Research Centre of Cardiology, 121552 St. Academician Chazova, 15A, Moscow, Russian.

Correspondence address: dzreyan2016@mail.ru

Abstract

The 20th century marked the understanding that more than 80% of genes have an additional biological function in the cell associated with the regulation of the expression of other genes. Non-coding sequential-type RNA regulators, including microRNAs, capable of changing the expression of proteins in the cell, can be expressed with such genes. MicroRNAs are single-stranded RNA sequences 20–25 nucleotides in length that regulate gene expression at the post-transcriptional level through degradation or repression of mRNA translation. This review examines aspects of the biogenesis of microRNAs in mammalian cells, as well as their functions in endothelial cells and in the regulation of angiogenesis.

Keywords: microRNA, non-coding RNA, endothelial cells, angiogenesis, blood vessels, *Plaur-miR1*, vascular microRNA

Conflict of interest: Ekaterina V. Semina, Kseniya A. Rubina 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.

Funding: This work was supported by the Ministry of Health of the Russian Federation (state assignment SRW No. RTD 124020200013-3 “Non-coding RNAs as a promising tool for repair and regeneration of cardiovascular system”).

For citation: Klimovich P.S., Dzreyan V.A., Semina E.V., Rubina K.A. Endothelial cells microRNAs participation in the angiogenesis regulation. *Tissue and organ regeneration*. 2024;2(2):59–81. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-2-11-32>

Received 15.03.2024

Revised 22.05.2024

Accepted 15.06.2024

Список сокращений

ЭК — эндотелиальные клетки (endothelial cells)

ФН — фибронектин (fibronectin)

ЕРС — эндотелиальные прогениторные клетки (endothelial progenitor cells)

HSS — высокое напряжение сдвига (high shear stress)

LSS — низкое напряжение сдвига (low shear stress)

MMP-2 — матриксная металлопротеиназа 2 (matrix metalloproteinase 2)

PIK3R2 — регуляторная бета-субъединица фосфатидилинозитол-3-киназы (phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit 2)

PPAR α — рецептор- α , активируемый пролифератором пероксисом (peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-alpha)

RISC — РНК-индуцируемый комплекс выключения гена (RNA-induced silencing complex)

SCF — фактора стволовых клеток (stem cell factor)

SIRT1 — деацетилаза сиртуин-1 (Sirtuin 1)

SS — напряжение сдвига на эндотелий (shear stress on the endothelium)

uPA — урокиназа (urokinase)

uPAR — урокиназный рецептор (urokinase receptor)

VEGF — фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor)

Введение

МикроРНК относятся к группе некодирующих РНК и представляют собой одноцепочечные последовательности РНК длиной 20–25 нуклеотидов, которые могут регулировать экспрессию генов на уровне как трансляции, так и транскрипции. Чаще всего у животных микроРНК нацелены на последовательности в 3'-нетранслируемых областях (3'UTR) мРНК. Хотя микроРНК лишь частично комплементарны мРНК, они способны вызывать репрессию синтеза белка. Формируя сложную регуляторную сеть, микроРНК в совокупности изменяют экспрессию более 60% генов человека [1, 2].

Первая микроРНК (*lin-4*) была идентифицирована у нематоды *Caenorhabditis elegans* еще в 1993 г., однако толчком к началу активного изучения микроРНК у позвоночных и беспозвоночных стало обнаружение второй микроРНК (*let-7*) у *C. elegans* в 2000 г. [3, 4]. К настоящему моменту микроРНК обнаружены у животных, растений, протистов и вирусов [5]. Данные о микроРНК хранятся в ряде баз данных, таких как miRBase, microRNA.org, MicroRNadb, miR2Disease, HMDD, PhenomiR miRcode, miRDB, galaxy, KEGG databases, miRTarBase, miRecords, MirGeneDB, TargetScan и DIANA-microT. МикроРНК являются высококонсервативными молекулами [6]. Эволюционно родственные микроРНК объединены в 239 различных семейств, члены которых имеют высокогомологичные последовательности и некоторые общие мишени [5].

По данным последней версии miRBase 22.1 (<http://mirbase.org/>), всего у 271 вида найдено 48 860 зрелых микроРНК [5]. Геномы позвоночных содержат тысячи микроРНК: например, геном человека содержит 2654 зрелых последовательности. При этом геном *Caenorhabdi-*

tis elegans — 437 зрелых последовательностей, а *Arabidopsis thaliana* 428 зрелых последовательностей [5, 6]. На сегодняшний день накоплен большой массив данных, свидетельствующих о важной роли микроРНК в таких процессах, как эмбриогенез и морфогенез, репарация и регенерация органов и тканей [2].

Исследования последних лет показали, что микроРНК необходимы для нормального развития различных физиологических систем организмов и поддержания клеточного гомеостаза. МикроРНК играют важную регуляторную роль в пролиферации, дифференцировке, миграции клеток, а изменение их экспрессии и/или функционирования сопряжено с развитием многих болезней человека, включая онкологические, инфекционные, аутоиммунные, нейродегенеративные и сердечно-сосудистые заболевания [2, 7, 8].

Недавние исследования выявили важную роль микроРНК в регуляции функционирования эндотелиальных клеток (ЭК) и ангиогенеза [8]. Ангиогенез — комплексный процесс формирования новых кровеносных сосудов в органах и тканях из предсуществующих сосудов [9–11]. Ангиогенез необходим при регенерации органов и тканей, поскольку кровеносные сосуды обеспечивают снабжение питательными веществами и кислородом. Образование новых кровеносных сосудов происходит за счет миграции, пролиферации и дифференцировки ЭК, а также последующей стабилизации вновь образовавшихся сосудистых отростков с участием перитцитов и гладкомышечных клеток [8–12]. Известно, что процессы регуляции ангиогенеза часто оказываются нарушены при онкологических, сердечно-сосудистых и ряде других заболеваний человека, характеризующихся избыточным или недостаточным формированием кровеносных сосудов [8, 9, 13].

Было показано, что для мышей со специфичной для ЭК делецией *Dicer*, ключевого фермента биосинтеза микроРНК, характерны нарушения постнатального ангиогенеза и дефекты формирования сосудов. [14].

В англоязычной литературе используется термин «angiomir» для обозначения микроРНК, регулирующих процессы ангиогенеза [9, 15, 16]. На сегодняшний день описаны angiomirs, участвующие в регуляции ангиогенеза *in vivo*. Некоторые из этих angiomirs важны для поддержания целостности сосудов и контролируют эмбриональный ангиогенез, другие модулируют опухолевый неоангиогенез. Считается, что манипуляции angiomirs при патологической васкуляризации представляют собой новый терапевтический подход [9]. Тем не менее роль микроРНК в регуляции процессов ангиогенеза все еще мало изучена.

В настоящем обзоре мы остановимся на биогенезе и механизмах действия микроРНК, а затем рассмотрим данные последних лет о механизмах участия микроРНК ЭК в регуляции ангиогенеза, уделяя особое внимание miR-126 как главному регулятору физиологического ангиогенеза, а также влиянию новой микроРНК Plaur-miR1, экспрессируемой с гена урокиназного рецептора *Plaur*, на ранние этапы ангиогенеза, такие как на миграция/пролиферация сосудистых клеток и формирование капиллярноподобных структур.

Номенклатура микроРНК

Вначале познакомимся с кратким описанием номенклатуры микроРНК, чтобы избежать путаницы в обозначении микроРНК в дальнейшем. Для обозначения гена, кодирующего микроРНК, ее предшественника, а также для обозначения зрелой молекулы микроРНК существует специальная номенклатура. Для гена, кодирующего микроРНК, используют две аббревиатуры: *mir*, или *MIR*, например *mir126* или *MIR126*. Аббревиатуру «*mir*» используют также для обозначения первичной микроРНК и пре-микроРНК, а зрелую микроРНК называют «*miR*». Принадлежность *miR* к какому-либо виду обозначают тремя буквами: «*hsa*» — перед *miR* человека (*Homo sapiens*) и «*rno*» — перед *miR* крысы (*Rattus norvegicus*) или «*mmu*» — перед *miR* мыши (*Mus musculus*). Например, *hsa-miR-126*, или *rno-miR-126*, или *mmu-miR-126*. Группы близкородственных микроРНК, обладающих сходной последовательностью, объединяют в семейства, обозначаемые

номерами (например, *miR-133*), а внутри одного семейства выделяют отдельные микроРНК, добавляя к названию однобуквенный суффикс, например, *miR-133a* и *miR-133b*. Пре-микроРНК, дающие начало идентичным зрелым микроРНК, но кодируемые в разных локусах генома, имеют в названии дополнительную цифру, отделенную дефисом, например из предшественников *hsa-mir-121-1* и *hsa-mir-121-2* получается идентичная зрелая микроРНК *hsa-miR-121*. Если известно, какая из цепей микроРНК-дуплекса преимущественно связывается с мРНК-мишенью (так называемая «направляющая» цепь), то ее обозначают, например, *miR-126*, а комплементарную ей нестабильную («пассажирскую») цепь помечают звездочкой (например, *miR-126**). Если данные о функциональной активности цепей микроРНК-дуплекса отсутствуют, то указывают, с каким из концов пре-микроРНК соотносится образовавшаяся в результате процессинга цепь микроРНК-дуплекса, например *miR-126-5p* (5'-конец пре-микроРНК) и *miR-126-3p* (3'-конец пре-микроРНК).

Биогенез и механизм действия микроРНК

Большинство микроРНК кодируется участками, расположенными в интронах генов, кодирующих белки; однако некоторые микроРНК могут локализоваться в экзонах, 5'- и 3'-нетранслируемых участках генов или в межгенных областях. Биогенез микроРНК начинается в ядре, а затем продолжается в цитоплазме до формирования зрелых одноцепочечных микроРНК длиной около 22 нуклеотидов (рис.). Гены микроРНК транскрибируются полимеразой II (хотя описаны варианты транскрипции полимеразой III), что приводит к образованию первичного предшественника (*primary*, *pri-miRNA*) — при-микроРНК, имеющего петлевую (шпильчатую) структуру и длину в среднем 100–1000 нуклеотидов. Эти транскрипты при-микроРНК часто кэпированы, сплайсированы и полиаденилированы и могут кодировать сразу несколько микроРНК. Данная структура внутри ядра процессируется микропроцессорным комплексом Дроша (*Drosha*), который состоит из эндонуклеазы типа РНКазы-III в сочетании с РНК-связывающим белком DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region 8*, 8 критической области синдрома ДиДжорджа) (у *Drosophila* данный белок называется Паша (*Pasha*), у *Caenorhabditis elegans* — *PASH-1*), а также других кофакторов, таких как РНК-хеликаз DEAD-бокса *p68/DDX5* и *p72/DDX17* (канонический путь процессинга) [17].

Микропроцессорный комплекс распознает вторичную структуру петли при-микроРНК, что приводит к вырезанию и высвобождению ~70 нуклеотидных шпилек-предшественников, называемых прекурсорной пре-микроРНК (pre-miRNA) [18, 19]. Недавние исследования показывают, что активность компонентов микропроцессорного комплекса регулируется по принципу обратной связи: Drosha может расщеплять и дестабилизировать DGCR8, в то время как сам DGCR8 стабилизирует белок Drosha. Предполагается, что эта ауторегуляция обратной связи контролирует синтез микроРНК и минимизирует клеточные колебания активности микропроцессорного комплекса [19].

Еще один подкласс микроРНК, именуемый митронами, также кодируется в интронах генов, но может обходить Drosha-опосредованный процессинг и генерировать предшественники пре-микроРНК непосредственно из побочных продуктов альтернативного сплайсинга [20]. В конечном итоге оба варианта пре-микроРНК экспортируются из ядра в цитоплазму с участием комплекса экспортина-5/Ran-GTP. [18, 21]. Попав в цитоплазму, пре-микроРНК процессируется РНКазой Dicer в комплексе с РНК-связывающим белком TAR (TRBP) и белком Argonaute (AGO1-4), что приводит к образованию дуплекса микроРНК-миРНК* из ~22 нуклеотидов.

Только одна цепь дуплекса, называемая «направляющей» цепью и обычно являющаяся термодинамически наименее стабильной, а именно 5'-цепь, загружается в большой мультибелковый рибонуклеопротеиновый комплекс микроРНК (миРНКП, также называемый RISC, или RNA-induced silencing complex), который модулирует экспрессию целевых генов. «Пассажирская» 3'-цепь дуплекса миРНК-миРНК* (называемая миРНК*) исключается из комплекса RISC и впоследствии деградирует. Существуют случаи, когда обе цепи дуплекса миРНК-миРНК* стабильны и входят в RISC-комплекс, нацеливаясь на отдельные подмножества мРНК (рис.).

Для связывания микроРНК в составе комплекса RISC с мРНК-мишенью критичным является небольшой участок микроРНК размером 6–8 нуклеотидов — «seed region» (затравочная область). Степень комплементарности между этим участком микроРНК и мРНК-мишенью во многом определяет механизм регуляции экспрессии генов. Полное комплементарное свя-

зывание микроРНК с мРНК приводит к разрезанию и деградации последней. При неполной комплементарности микроРНК и мРНК-мишени трансляция мРНК подавляется на стадиях инициации или элонгации, мРНК дестабилизируется в результате отщепления полиА-последовательности и направляется в Р-тельца (processing bodies) рибосомы, представляющие собой цитоплазматические гранулы, обогащенные факторами деградации мРНК и подавления трансляции, но лишенные рибосом и факторов инициации трансляции [19, 22].

Транскрипция самих микроРНК регулируется на уровне промотора. Факторы транскрипции с-Мус и р53 могут связываться с различными промоторными элементами генов микроРНК и модулировать их экспрессию. Определенные локусы микроРНК также находятся под эпигенетическим контролем и метилируются ДНК-метилтрансферазами (DNMT1, DNMT3b) в зависимости от стадии клеточного цикла [19]. Функционирование микроРНК характеризуется вырожденностью (избыточностью) и плейотропностью. Способность одной микроРНК «нацеливаться» на несколько мРНК, особенно на те, которые функционируют в одном и том же внутриклеточном пути, а также возможность связывания с одной мРНК нескольких микроРНК обуславливают широкий спектр регуляции экспрессии генов: изменение экспрессии одной микроРНК может приводить к изменениям в профиле экспрессии многих мРНК-мишеней. Однако для каждой отдельной мРНК конечный эффект будет зависеть также от связывания со всеми регулируемыми ее микроРНК [9]. Показано, что микроРНК могут в совокупности привести к изменению экспрессии 60% генов организма [23].

Недавние работы показали, что способность одной микроРНК взаимодействовать сразу с несколькими мРНК часто встречается среди кластеризованных микроРНК, которые могут совместно транскрибироваться и, следовательно, вместе экспрессироваться. Так, например, Chawla с коллегами (2016) показали, что у дрозофилы существуют две совместно транскрибируемые с общего полицистронного транскрипта микроРНК, let-7 и miR-125 (локус *let-7-Complex*), которые регулируют общую мишень — транскрипционный фактор Chinmo (Chronologically Inappropriate Morphogenesis), который участвует в формировании пола, развитии нервной системы и регуляции полимеризации актинового

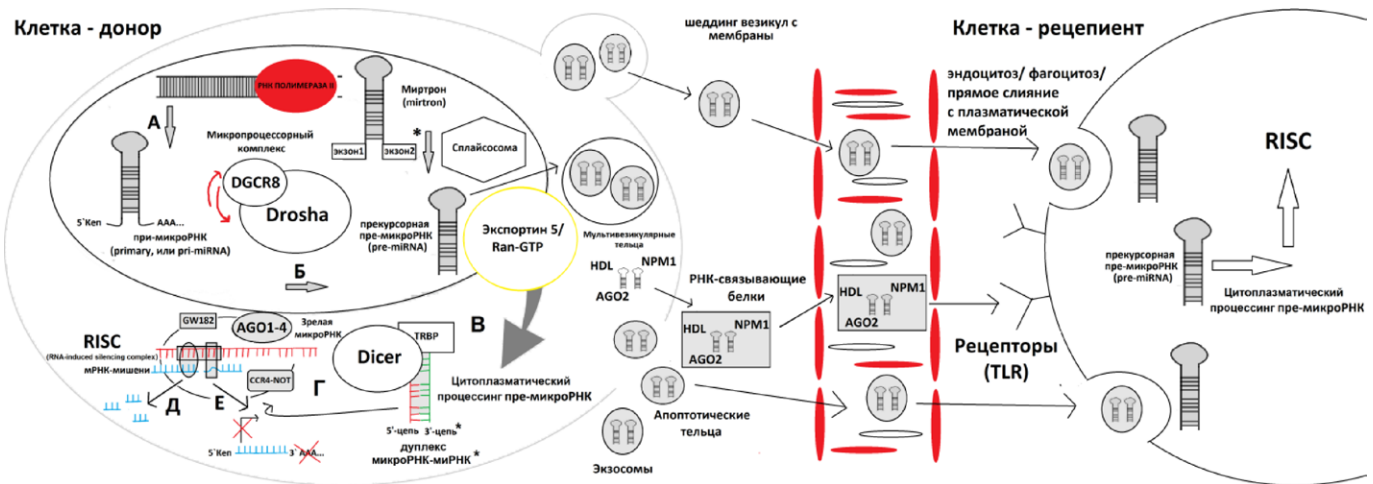


Рис. Биогенез, упаковка и транспорт микроРНК. МикроРНК обычно транскрибируются РНК-полимеразой II в виде первичного предшественника при-миРНК (primary, pri-miRNA) (А), которые в дальнейшем расщепляются микропроцессорным комплексом, состоящим из РНКазы III Дроша и белком DGCR8, а также других кофакторов (РНК-хеликаз DEAD-бокса р68/DDX5 и р72/DDX17), с получением предшественников микроРНК в форме шпильки, называемых прекурсорной пре-микроРНК (pre-miRNA) (Б). Известен также неканонический путь, при котором пре-микроРНК образуется в результате сплайсинга митрона и последующего вырезания пре-микроРНК с помощью белка Ldb. Далее пути объединяются (*). Пре-миРНК затем экспортируются в цитоплазму с помощью фактора ядерного экспорта Exportin-5/Ran GTP (В), где они далее процессируются до дуплексов микроРНК:миРНК* цитоплазматическим ферментом РНКазой Dicer с участием белка TRBP и белков AGO1-4. Впоследствии зрелая микроРНК включается в РНК-индуцируемый комплекс выключения гена (миРНК, или RNA-induced silencing complex, RISC) и связывается с 3'-нетранслируемыми областями (3'UTR) мРНК в определенных затравочных последовательностях (затравочная область, seed region) (Г) и вызывает либо расщепление (Д), либо подавление трансляции целевых мРНК (Е). МикроРНК могут попадать в кровоток путем пассивного транспорта из поврежденных клеток, например в составе апоптотических телец, путем активной секреции через везикулы (экзосомы) и в процессе шеддинга везикул с мембраны либо совместно с РНК-связывающим белком. Примерами РНК-связывающих белков являются NPM1, HDL и AGO2. После секреции микроРНК транспортируются по жидкостям организма и доставляются к клеткам-реципиентам. Клетками-реципиентами микроРНК могут захватываться через интернализацию везикул путем эндоцитоза, фагоцитоза или прямого слияния с плазматической мембраной. МикроРНК, секретируемые в составе РНК-связывающего белка, могут поглощаться через специфические рецепторы на поверхности клетки, например TLRs. Экзоны 1 и 2 — экзоны гена, в интроне которого расположен ген микроРНК. AGO1-4 — Argonaute1-4; HDL — high-density lipoprotein; NPM1 — nucleophosmin 1; TLR — Toll-like receptors. Рисунок составлен автором

Fig. Biogenesis, packaging, and transport of microRNAs. MicroRNAs are typically transcribed by RNA polymerase II as primary pri-miRNAs (A), which are then cleaved by the microprocessor complex consisting of Drosha RNase III and the DGCR8 protein, as well as other cofactors (DEAD-box RNA helicases p68/DDX5 and p72/DDX17), to yield hairpin-shaped microRNA precursors called precursor pre-miRNAs (B). A non-canonical pathway is also known in which pre-miRNAs are formed by mirtron splicing and subsequent excision of the pre-miRNA by the Ldb protein. The pathways then merge (*). Pre-microRNAs are then exported to the cytoplasm by the nuclear export factor Exportin-5/Ran GTP (B), where they are further processed to microRNA:miRNA* duplexes by the cytoplasmic RNase Dicer with the participation of TRBP and AGO1-4 proteins. Subsequently, mature miRNA is recruited into the RNA-induced gene silencing complex (RISC) and binds to the 3'-untranslated regions (3'UTRs) of mRNAs at specific seed regions (D) and causes either cleavage (E) or translational repression of target mRNAs (E). MicroRNAs can enter the bloodstream by passive transport from damaged cells, such as within apoptotic bodies, by active secretion through vesicles (exosomes), by vesicle shedding from the membrane, or together with an RNA-binding protein. Examples of RNA-binding proteins are NPM1, HDL, and AGO2. After secretion, microRNAs are transported through body fluids and delivered to recipient cells. MicroRNAs can be taken up by recipient cells through vesicle internalization by endocytosis, phagocytosis, or direct fusion with the plasma membrane. MicroRNAs secreted within an RNA-binding protein can be taken up through specific cell surface receptors, such as TLRs. Exons 1 and 2 are the exons of the gene in whose intron the microRNA gene is located. AGO1-4 — Argonaute1-4; HDL — high-density lipoprotein; NPM1 — nucleophosmin 1; TLR — Toll-like receptors. Figure provided by the authors

цитоскелета. При этом роли let-7 и miR-125 в регуляции Chinmo различны: let-7 подавляет Chinmo в эмбриогенезе, а miR-125 — в постнатальном развитии, то есть действие этих микроРНК разнесено во времени. Активность этих микроРНК контролируется скоростью и степенью их деградации. Pre-let-7 и pre-miR-125 транскрибируются, но зрелая let-7 накапливается быстрее, чем зрелая miR-125, во время эмбрионального развития из-за более высокой скорости процессинга с участием Drosha и Dicer. При этом более длинный период полураспада miR-125 приводит к выраженному относительному накоплению этой микроРНК во взрослом состоянии и, соответственно, обеспечивает подавление экспрессии Chinmo у взрослой особи. Такая дифференциальная по времени экспрессия обеспечивает различные функции этих двух микроРНК в течение жизни, а именно, две совместно транскрибируемые микроРНК функционируют независимо друг от друга на разных стадиях развития, регулируя общую мишень [24, 25].

В ряде случаев работает механизм, посредством которого связывание микроРНК с определенными белковыми комплексами может не подавлять, а, наоборот, увеличивать экспрессию генов-мишеней по принципу прямого или опосредованного механизмов [19, 26]. К примеру, было показано, что ряд микроРНК могут взаимодействовать со своими мишенями через промоторы генов или через 5'UTR элементы мРНК и стимулировать транскрипцию генов и трансляцию белка по такому же принципу, как малые РНК, связанные с промоторными областями в ядре, могут активировать транскрипцию генов — явление, называемое активацией РНК (RNAa, small RNA-induced gene activation) [27, 28].

Более того, одни и те же микроРНК могут быть как репрессорами, так и активаторами экспрессии в зависимости от стадии клеточного цикла: в пролиферирующих клетках они могут подавлять трансляцию, тогда как при аресте G1/G0, который часто предшествует дифференцировке, они опосредуют активацию. Sh. Vasudevan, Y. Tong и J.A. Steitz (2007) подтвердили, что две широко известные микроРНК — Let-7 и синтетическая микроРНК miRscr4 — вызывают усиление трансляции целевых мРНК при остановке клеточного цикла, однако подавляют их трансляцию в пролиферирующих клетках [26].

В обзоре Breving и Esquela-Kerscher (2010) подробно описаны механизмы, как микроРНК могут переключаться между активацией и репрессией целевого гена в зависимости от стадии клеточного цикла [19]. На примере регуляции экспрессии фактора некроза опухоли альфа (TNF-альфа) было показано, что в условиях депривации сыворотки микроРНК активирует его трансляцию за счет связывания с AU-богатыми элементами (ARE), расположенными в 3'-нетранслируемых областях (3'UTR) мРНК этого цитокина, тогда как в пролиферирующих клетках происходит подавление экспрессии за счет комплекса Argonaute 2 (AGO2) и белка-гомолога FXR [19].

Недавно было показано, что микроРНК негативно регулируют экспрессию новой группы ультраконсервативных генов (ultraconserved genes, UCG). UCG представляют собой некодирующие транскрипты РНК, обнаруженные в геноме человека, которые имеют высокую степень консервативности в геноме человека по сравнению с генами у других видов позвоночных и, таким образом, предположительно являются функционально важными. Это мнение подтверждается тем фактом, что некоторые UCG по-разному экспрессируются при раке человека, например при хроническом лимфоцитарном лейкозе, и могут напрямую модулировать процессы опухолевой прогрессии [19, 29, 30].

Сейчас известно, что микроРНК функционируют не только внутри отдельных клеток, но также могут транспортироваться в кровяное русло и действовать на другие клетки организма у животных. Внеклеточная зрелая микроРНК (90–99%) в плазме крови находится в основном в комплексе с белками семейства AGO2. Другие белки, которые связывают и доставляют микроРНК к клеткам-реципиентам, включают нуклеофосмин 1 [31] и липопротеины высокой плотности (ЛПВП) [32]. Кроме того, пре-микроРНК и их зрелые формы могут секретироваться в кровяное русло в составе экзосом и/или мультивезикулярных телец. Экзосомы, в свою очередь, могут захватываться клетками-реципиентами, в цитоплазме которых пре-микроРНК процессируются и превращаются в зрелые микроРНК [33–35].

Многие исследования показывают, что везикулы (экзосомы) различного клеточного происхождения содержат уникальный набор микроРНК, который может отличаться от микроРНК самих

клеток-доноров [36–38]. Кроме того, известно, что микроРНК могут пассивно высвобождаться из гибнущих клеток и апоптотических телец [39, 40], а также активно секретироваться в виде комплексов «РНК — белок» [32, 41].

Экспрессия и регуляция микроРНК в эндотелиальных клетках (ЭК)

Эндотелий сосудов является необходимым участником регенерации органов и тканей и вовлечен в процессы атеросклероза и опухолевого роста. При этом микроРНК играют важную роль в регуляции функционирования эндотелиальных клеток и процессов ангиогенеза, обладая как про-, так и антиангиогенной активностью. Так, было показано, что при нарушении (подавлении) активности *Dicer* и *Drosha*, двух ключевых ферментов биогенеза микроРНК, функция эндотелия и процессы ангиогенеза оказываются нарушены [14].

В норме РНКазы *Dicer* начинают экспрессироваться на 7 день эмбрионального развития и увеличивается вплоть до 17 дня, достигая максимума в сердце и печени, то есть в высоко васкуляризованных органах, что может свидетельствовать о более специализированной функции *Dicer* в этих органах [42]. Полный нокаут *Dicer* у мышей приводит к летальности уже на 7 день (E07) эмбрионального развития, при этом сами эмбрионы имеют дефекты развития: эмбрионы очень маленькие, у них не формируется основная ось тела, из которой впоследствии формируется хорда, а при окрашивании на Oct4 (маркер плюрипотентных стволовых клеток) наблюдается почти полное отсутствие экспрессии этого фактора плюрипотентности [14].

Эмбрионы гетерозиготных мышей *Dicerex1/2* умирают между E12,5 и E14,5 стадиями эмбрионального развития и при этом имеют дефекты формирования сосудов, что было подтверждено окрашиванием на один из основных маркеров эндотелия *Pecam1* (ортолог у человека — PECAM1, также известный как CD31) [42]. При этом у некоторых эмбрионов полностью отсутствовали сосуды желточного мешка. Эти дефекты были связаны с нарушением экспрессии фактора роста эндотелия сосудов *Vegfa* (ортолог у человека — VEGFA, vascular endothelial growth factor) и его рецепторов *Kdr* (ортолог у человека — KDR, также известный как VEGFR2) и *Flt1* (ортолог у человека — FLT-1, также известный как VEGFR1), а также рецептора ангиопоэтина-2,

Tie1. В совокупности эти данные указывают на то, что роль *Dicer* в регуляции эмбрионального ангиогенеза реализуется через его функцию в биосинтезе микроРНК, а значит, эмбриональный ангиогенез также может находиться под контролем микроРНК, регулирующих, в свою очередь, экспрессию ключевых ангиогенных факторов.

Нокдаун *DICER* или *DROSHA in vitro* в ЭК человека приводит к нарушению формирования капиллярноподобных структур в Матригеле, хотя эффект нокдауна *DROSHA* менее выражен, чем эффект нокдауна *DICER*. Такое различие объясняется существованием *DROSHA*-независимого биогенеза микроРНК, что характерно для митохондрий, также кодируемых в интронах генов, но способных обходить *DROSHA*-опосредованный процессинг и генерировать предшественники пре-микроРНК непосредственно из побочных продуктов альтернативного сплайсинга (рис. 1) [20].

Специфическая делеция *Dicer* в ЭК у мышей *in vivo* показала, что эндотелиальные микроРНК необходимы для полноценного постнатального ангиогенеза [43]. В этом исследовании авторы при помощи системы *LoxP-Cre* [44] создали две мышинные модели для достижения специфической инактивации *Dicer* в ЭК: мышей с «флоксированными» аллелями *Dicer* (*Dicer^{flox/flox}*) [45], которые экспрессировали либо *Cre*-рекомбиназу под регуляцией эндотелиально-специфичного промотора/энхансера *Tie2* [46], либо *Cre*-рекомбиназу, экспрессия которой была индуцирована тамоксифеном (*Cre-ER T2*), под регуляцией промотора *VE-кадгерина*, специфичного для сосудистого эндотелия (*Tie2-Cre;Dicer^{flox/flox}* и *VECad-Cre;Dicer^{flox/flox}* мыши соответственно) [47]. Обе линии мышей имели нарушения эмбрионального ангиогенеза и сниженную реакцию на ангиогенные стимулы в постнатальном развитии. Так, специфичный нокаут *Dicer* в ЭК приводил к усилению экспрессии тромбоспондина-1 (*Tsp-1*), мощного ингибитора ангиогенеза, а также к изменению экспрессии других ключевых регуляторов ангиогенеза, таких как *TEK/Tie2*, *KDR /VEGFR2*, *Tie-1*, *eNOS* и *IL-8*. *Tsp-1* является предполагаемой мишенью микроРНК семейства *Let-7* и *miR-17~92*. Ингибиторы этих микроРНК нарушают формирование капиллярноподобных структур ЭК *in vitro*. И наоборот, трансфекция ЭК компонентами кластера *miR -17~92*, особен-

но miR-18a, восстанавливала дефекты пролиферации и морфогенеза ЭК, вызванные потерей *Dicer* [9].

Анализ экспрессионного профиля микроРНК в ЭК пупочной вены человека (HUVEC) выявил повышенную экспрессию miR-221/222, miR-21, семейства let-7, кластера miR-17~92, кластера miR-23~24 и miR-126. [9, 48–50]. Известно, что ангиогенные факторы роста, включая VEGF [51] и фактор роста фибробластов 2 (fibroblast growth factor 2, bFGF), являются основными индукторами экспрессии эндотелиальных микроРНК. Sessa и соавторы (2008) показали, что VEGF индуцирует дифференцированную по времени экспрессию miR-191, -155, -31, -17-5p, -18a и miR-20a, miR-126 и miR-222 [43]. Следует отметить, что этот набор VEGF-индуцируемых микроРНК обычно оказывается гиперэкспрессирован в опухолях человека и вовлечен в процессы опухолевого роста, выживаемости и опухолевого неоангиогенеза [9, 52].

Роль отдельных микроРНК в регуляции функций эндотелиальных клеток

В настоящее время появляется все больше работ, направленных на выявление конкретных функций отдельных микроРНК в ангиогенезе,

в том числе при опухолевом неоангиогенезе. При этом данные микроРНК могут осуществлять регуляцию либо клеточно-автономно, когда микроРНК эндотелиальных клеток регулируют ангиогенный ответ на множественные факторы роста, действуя на ангиогенные факторы, рецепторы и сигнальные молекулы, либо не-клеточно-автономно, когда неэндотелиальные клетки, например опухолевые клетки, экспрессируют микроРНК, которые могут регулировать экспрессию ангиогенных факторов или ингибиторов, тем самым модулируя ангиогенез. Сюда же следует отнести действие микроРНК в составе везикул (экзосом) как участников межклеточной коммуникации [9].

Исследования, в которых изучалась роль отдельных микроРНК ЭК в регуляции ангиогенеза, суммированы в таблице.

miR-126

miR-126 считается основным регулятором физиологического ангиогенеза. В литературе ее называют мастер-регулятором по аналогии с генами мастер-регуляторами [53]. Некоторые микроРНК экспрессируются повсеместно в органах и тканях, для других характерна тканеспецифическая экспрессия. Примером тканеспеци-

Таблица. Некоторые микроРНК ЭК и их участие в ангиогенезе

Table. Certain endothelial cells microRNAs and their involvement in angiogenesis

МикроРНК	Роль	Мишень	Ссылка
Семейство miR-221/222	Модулирует ангиогенную активность SCF, действуя на его рецептор c-Kit, контролируя способность ЭК формировать новые капилляры. Ингибирует пролиферацию и миграцию ЭК во время ангиогенеза и восстановления сосудов. Снижает адгезию лейкоцитов и экспрессию VCAM-1. Усиливает апоптоз	c-Kit STAT5A p27/p57 VCAM-1 eNOS	[48, 50, 101, 102]
miR-21	Регуляция экспрессии и эффекты miR-21 зависят от типа напряжения сдвига на эндотелий: в HUVEC miR-21, индуцированная высоким напряжением сдвига, усиливает активность пути PI3K/Akt/eNOS посредством подавления проапоптотической фосфатазы PTEN, отрицательного регулятора пути PI3K/Akt/eNOS, тем самым снижая апоптоз. Напротив, низкое напряжение сдвига может также повышать экспрессию miR-21, которая нацелена на (PPAR α), и запускает петлю положительной обратной связи, подавляя онкоген Jun (AP-1) с последующим усилением воспалительной реакции и увеличением адгезии моноцитов к ЭК	PTEN PPAR α	[48, 103]
miR-17~92	miR-92a ингибирует ангиогенез посредством подавления eNOS и интегрина α 5, ингибирует пролиферацию за счет угнетения циклина D1. miR-17 и miR-20a ингибируют ангиогенез, миграцию ЭК и одновременно индуцируют их пролиферацию через подавление Jak1 и p21 и продукцию фибронектина	eNOS интегрин α 5 Jak1 ФН p21 циклин D1	[101, 104]
miR-155	Активируется при HSS и ограничивает воспалительную реакцию, индуцированную ангиотензином II, путем подавления AT1R и ETS-1	AT1R ETS-1	[48]

Продолжение таблицы

МикроРНК	Роль	Мишень	Ссылка
miR-126	Основной регулятор физиологического ангиогенеза. Способствует ангиогенезу и целостности сосудов во время эмбриогенеза путем воздействия на фактор роста эндотелия сосудов VEGF, PIK3R2 и белок SPRED1. Во время неоангиогенеза, индуцированного ишемией, подавляет CXCL12. В составе экзосом подавляет RGS16, ингибитор CXCR4, который активирует CXCR4-зависимую экспрессию CXCL12 в ЭК и, таким образом, усиливает репарацию эндотелия и ограничивает атеросклероз. Противовоспалительные эффекты через репрессию VCAM-1	Egfl7 Spred-1 PIK3R2 VCAM-1	[9, 48, 54, 58, 59, 64]
miR-19a	Ингибирует пролиферацию эндотелиальных клеток посредством негативной регуляции циклина D1	циклин D1	[105]
miR-146a	Подавляет киназу IRAK	IRAK1	[106]
miR-10a	Уменьшает пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток пупочной вены мыши и образование просвета сосудов. Ингибирует экспрессию Hmga2 в эндотелиальных клетках-предшественниках	BMP2 Hmga2	[107, 108]
miR-296	Регулирует HGS и способствует ангиогенезу в HUVEC	HGS	[109]
miR-23~27~24	Ингибирует экспрессию SEMA6A и SPROUTY (белок развития, ингибирующий MAPK/ERK сигналинг), способствуя ангиогенезу	SEMA6A, SPROUTY	[110]
miR-217	Ингибирует SIRT1 и регулирует FoxO1, что приводит к нарушению ангиогенеза и старению ЭК	SIRT1	[75]

Список сокращений: ФН – фибронектин; AT1R – рецептор ангиотензина II типа 1 (angiotensin II receptor type 1); EPC – эндотелиальные прогениторные клетки (endothelial progenitor cells); ETS-1 – вирус эритробластоза V-Ets E26 Онкоген Гомолог 1 (V-Ets Erythroblastosis Virus E26 Oncogene Homolog 1 или E26 transformation-specific, или E-twenty-six (Erythroblast Transformation Specific); FoxO1 – белок O1 с вилкообразным боксом (forkhead box protein O1); HGS – субстрат тирозинкиназы, регулируемой фактором роста гепатоцитов (hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate); Hmga2 – AT-Hook 2 группы высокой подвижности (High Mobility Group AT-Hook 2); HSS – высокое напряжение сдвига (high shear stress); IRAK – interleukin-1 receptor-associated kinase 1; LSS – низкое напряжение сдвига (low shear stress); MMP-2 – матриксная металлопротеиназа 2 (matrix metalloproteinase 2); PIK3R2 – регуляторная бета-субъединица фосфатидилинозитол-3-киназы (phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit 2); PPAR α – рецептор- α , активируемый пролифератором пероксисом; RGS16 – regulator of G Protein Signaling 16; RISC – РНК-индуцируемый комплекс выключения гена (RNA-induced silencing complex); SCF – фактора стволовых клеток (stem cell factor); SEMA6A – semaphorin 6A; SIRT1 – гистондеацетилаза Sirtuin 1; SPRED1 – белок 1, содержащий домен EVH1, связанный с прорастанием (sprouty-related, EVH1 domain-containing protein 1); SS – напряжение сдвига на эндотелий (shear stress on the endothelium); VEGF – фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor).

List of abbreviations: FN - fibronectin; AT1R - angiotensin II receptor type 1; EPC - endothelial progenitor cells; ETS-1 – V-Ets Erythroblastosis Virus E26 Oncogene Homolog 1; FoxO1 – forkhead box protein O1; HGS – hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate; Hmga2 – High Mobility Group AT-Hook 2; HSS – high shear stress; IRAK – interleukin-1 receptor-associated kinase 1; LSS – low shear stress; MMP-2 – matrix metalloproteinase 2 metalloproteinase 2; PIK3R2 – phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit 2; PPAR α – peroxisome proliferator-activated receptor- α ; RGS16 – regulator of G Protein Signaling 16; RISC – RNA-induced silencing complex; SCF – stem cell factor; SEMA6A – semaphorin 6A; SIRT1 – histone deacetylase Sirtuin 1; SPRED1 – sprouty-related, EVH1 domain-containing protein 1; SS – shear stress on the endothelium; VEGF – vascular endothelial growth factor.

фической экспрессии является как раз miR-126, которая экспрессируется только в зрелых ЭК и в эндотелиальных прогениторных клетках (endothelial progenitor cells, EPC). Во взрослом организме экспрессия микроРНК-126 выявляется в хорошо васкуляризированных тканях, таких как сердце, легкие и печень.

miR-126 также является первой микроРНК, которая была нокаутирована у мышей. У таких мышей были описаны различные дефекты,

а именно: хрупкость сосудов, кровоизлияния, нарушения пролиферации и миграции эндотелиальных клеток, что в итоге приводило к гибели эмбрионов у мышей [53, 54].

При эмбриональном васкулогенезе эта микроРНК участвует в индукции ангиогенного сигнального пути, стимулирует дифференцировку эмбриональных стволовых клеток в эндотелиальные прогениторы и зрелые ЭК. Во взрослом организме miR-126 обеспечивает

физиологический гомеостаз в сосудистой стенке, сдерживая избыточный ангиогенез и способствуя поддержанию фенотипа покоящихся ЭК сосудов. miR-126 способна подавлять пролиферацию и миграцию ЭК, что необходимо для поддержания целостности и стабильности сосудов. В случае повреждения сосудистой стенки и/или в условиях гипоксии повышение уровня miR-126 активирует эндотелиальные прогениторные и зрелые ЭК, тем самым способствуя регенерации за счет формирования новых сосудов. У miR-126 также описаны протективные эффекты в сосудистой стенке и антиатерогенные свойства. В настоящее время в силу описанных проангиогенных свойств использование miR-126 считается перспективным подходом в терапии сердечно-сосудистых заболеваний, таких как инфаркт миокарда, сердечная недостаточность и другие патологии.

Кроме того, miR-126 интересна с точки зрения того, что у нее реализуются все варианты регуляции, описанные выше: эта микроРНК механочувствительная, и на определенной стадии развития сердечно-сосудистой системы происходит переключение с проангиогенных на антиангиогенные свойства miR-126. Кроме того, miR-126 способна транспортироваться обратно в ядро и там регулировать экспрессию генов, связываясь напрямую с промоторами генов *VEGF-α*, *MMP9*, *CXCL12* и инсулинового рецептора (IR), регулируя фенотип ЭК и целостность сосудов, стабильность сосудистой стенки.

miR-126 представляет собой интронную микроРНК, которая экспрессируется с гена *Egfl7*, кодирующего EGF-like domain-containing protein 7 — пептид, действующий как хемоаттрактант для эндотелиальных клеток и ингибитор миграции гладкомышечных клеток. Campragnolo с коллегами (2005) впервые показали, что EGFL7 действует как хемоаттрактант для эмбриональных ЭК и в меньшей степени для эмбриональных фибробластов [55]. Soncin и коллеги (2003) обнаружили, что EGFL7 подавляет миграцию гладкомышечных клеток, вызванную тромбоцитарным фактором роста [56].

miR-126 процессируется с образованием двух зрелых форм: miR-126-3p (известная как miR-126) и miR-126-5p (также известная как miR-126*) — обе являются активными [54]. Последовательности обеих зрелых изоформ miR-126 различаются лишь на 1 нуклеотид [53].

Egfl7 и miR-126 коэкспрессируются, при этом miR-126 регулирует избыток *Egfl7*, избыточная экспрессия которого вызывает эмбриональную летальность. Интересно, что мыши с нокаутом miR-126 имеют такие же сосудистые аномалии, что и мыши с полным нокаутом *Egfl7*, а именно: отеки, дефекты краниальных сосудов и васкуляризации сетчатки [54]. Эти данные вызвали дискуссию относительно того, каков механизм действия и какая именно молекула отвечает за наблюдаемый фенотип. У мышей miR-126^{-/-} экспрессия *Egfl7* оставалась неизменной как на уровне мРНК, так и на уровне белка [54]. Однако данные об экспрессии miR-126 у мышей, нокаутных по *Egfl7*, отсутствовали. В другом исследовании были созданы мыши с флоксированными аллелями *Egfl7* (*Egfl7^Δ*) и miR-126 (*miR-126^Δ*) [57]. Мыши с нокаутом *Egfl7* (*Egfl7^{Δ/Δ}*), но с сохраненной экспрессией miR-126 были фенотипически нормальны; тогда как мыши с нормальной экспрессией *Egfl7*, но нокаутом по изучаемой микроРНК (*miR-126^{Δ/Δ}*) демонстрировали многочисленные нарушения сосудистой системы. Направленная делеция miR-126 у мышей вызывала повышенную проницаемость сосудов, кровоизлияния и частую гибель эмбрионов. [54, 57]. Эти результаты и ряд других работ [54, 57, 58] подтверждают важную роль miR-126 в процессах ангиогенеза и поддержания целостности сосудов у мышей [9, 54, 57].

miR-126 играет важную роль в эмбриональном васкулогенезе за счет того, что она может ингибировать сигнальные пути своих мишеней: Sprd-1 (Sprouty-related EVH domain-containing protein) и регуляторной субъединицы 2 PI3K (PIK3R2/p85-β). miR-126 повышает чувствительность ЭК к VEGF и FGF [59]. Ингибирование PIK3R2 с участием miR-126 приводит к повышению экспрессии проангиогенного фактора ангиопоэтина-1 [9]. В то же время miR-126 ингибирует переход эндотелиальных клеток-предшественников в мезенхимальные клетки (endothelial-to-mesenchymal transition) через сигнальный путь PIK3R2-PI3K/Akt [60].

Интересным аспектом регуляции miR-126 является то, что она механочувствительна. Как только у плода начинает биться сердце, а сосуды приобретают способность к регуляции тонуса, происходит переключение с проангиогенных на антиангиогенные свойства этой микроРНК с участием фактора транскрипции ETS-2 [48, 61–63]. При этом снижается экспрессия EGFL,

VEGFA, MMP9, хемокина CXCL12, а также инсулинового рецептора (IR). Это, в свою очередь, приводит к подавлению пролиферации и миграции, но способствует поддержанию зрелого фенотипа ЭК и целостности сосудов [35, 53]. Помимо Spred-1 и PIK3R2, VCAM-1 также является мишенью miR-126, что влияет на адгезию лейкоцитов к ЭК и предполагает роль miR-126-126 в воспалении [64, 65]. Сообщалось также, что miR-126 ингибирует опухолевый рост и инвазию раковых клеток. При этом CRK (adapter molecule crk, proto-oncogene c-Crk, p38) и PIK3R2 являются основными мишенями для репрессии с участием miR-126 в раковых клетках [66–68].

Влияние гемодинамики на экспрессию miR-126 и роль этой микроРНК при атеросклерозе пока остается неясными. Генетический нокаут miR-126 у мышей ингибировал формирование неоинтимы на модели полного лигирования сонных артерий, тогда как локальное введение miR-126 нокаутным мышам усиливало образование неоинтимы [69]. Это позволило авторам высказать предположение о том, что miR-126 обладает проатерогенными свойствами. В другом исследовании, наоборот, было показано, что локальное применение специфичного для miR-126-5p, но не для miR-126-3p антагомира (синтезированные химически модифицированные антисмысловые РНК-олигонуклеотиды) уменьшало формирование атеросклеротических поражений сонных артерий у мышей *ApoE* $-/-$ [70]. Важным результатом данного исследования оказалось то, что 5p цепь miR-126 также является активной. Авторы связывали антиатерогенный эффект miR-126-5p с тем, что ее мишенью является ингибитор Notch1 — DLP1 (гомолог дельта-подобного пептида 1), который способствует пролиферации ЭК. Однако основные механизмы, с помощью которых miR-126-5p ингибирует атеросклероз, еще предстоит выяснить. [35, 62].

miR-21

Схожий механизм регуляции был описан для miR-21, роль которой в ангиогенезе опосредуется изменением гемодинамических сил, а именно, изменением напряжения сдвига на эндотелий (shear stress on the endothelium, SS) стенки сосуда. Повышенная экспрессия miR-21 после сосудистого повреждения способствует росту неоинтимы, вероятно, за счет подавления PTEN и активации Bcl-2. В ЭК miR-21, индуцированная высоким напряжением сдвига (HSS),

подавляет PTEN. Напротив, низкое напряжение сдвига повышает экспрессию miR-21, которая активирует PPAR α (рецептор- α , активируемый пролифератором пероксисом), и запускает положительную обратную связь, подавляя онкоген Jun (AP-1) (табл.) [48].

miR-129-1 и miR-133

Еще одним примером микроРНК с двумя функциональными цепями и играющими роль в ангиогенезе являются miR-129-1 и miR-133. Однако результаты исследований, посвященных изучению их экспрессии в ЭК в процессе формирования кровеносных сосудов, противоречивы.

Так, было показано, что VEGFR2 и FGFR1 являются мишенями miR-129-1 и miR-133 соответственно. miR-133a является одной из так называемых *myo-miRNAs*, которая экспрессируется преимущественно в мышечной ткани. ЭК экспрессируют очень низкий уровень miR-133a в физиологических условиях, однако ее экспрессия сильно увеличивается в эндотелии при повреждении [71]. Было обнаружено, что miR-129-1 и miR-133, подавляя экспрессию мРНК своих мишеней, снижают жизнеспособность, пролиферацию и миграцию ЭК пупочной вены человека HUVEC в условиях *in vitro* [16]. Также сообщалось, что ингибирование miR-133a улучшает реперфузию ишемизированных конечностей у мышей с диабетом [72].

В то же время в исследовании Чжу и др. (2021) была продемонстрирована противоположная роль miR-133a и обнаружены ее эффекты как положительного регулятора ангиогенеза [73]. Впоследствии было показано, что данное противоречие объясняется разными мишенями двух зрелых цепей miR-133a. Гиперэкспрессия как miR-133a-3p, так и miR-133a-5p ингибировала формирование капиллярноподобных структур, пролиферацию и миграцию HUVEC, стимулированных VEGFA. Аналогичный эффект был продемонстрирован на клетках эндотелия аорты человека (Human Aortic Endothelial Cells, HАоЕС). Однако эффекты miR-133a-5p были менее эффективны. Было показано, что miR-133a-3p реализует свой антиангиогенный эффект через повышение экспрессии генов, кодирующих белки сигнального пути DLL4/Notch, активация которых подавляет ангиогенез (DLL4, Hey1, Jag2, Notch4, NRARP, Hes4), тогда как miR-133a-5p в основном не оказывала на эти гены никакого влияния (за исключением DLL4). При этом miR-133a-3p и -5p в одинаковой

степени подавляли экспрессию CD44 и ID1, которые известны как стимуляторы ангиогенеза. Снижение уровня экспрессии *CD44* и *ID1* в клетках, экспрессирующих miR-133a, коррелировало с негативным влиянием miR-133a на формирование капиллярноподобных структур.

В клетках HUVEC и HAoEC, трансфицированных miR-133a-3p, было обнаружено значительное снижение экспрессии генов, кодирующих регуляторы клеточного цикла, такие как циклин-зависимая киназа 1 (*CDK1*), циклин A2 (*CCNA2*) и циклин B1 (*CCNB1*), а также генов инициации репликации генома, таких как белок поддержания мини-хромосомы 2 (*MCM2*) и 4 (*MCM4*). В то же время уровни экспрессии генов, кодирующих циклин D3 (*CCND3*) и G1 (*CCNG1*), были повышены. miR-133a-5p оказывала аналогичный эффект на гены, ингибируемые miR-133a-3p, но не изменила экспрессию *CCNG1* и *CCND3*, что позволило предположить, что эти два гена специфично связываются с цепью miR-133a-3p [12]. Эти результаты опосредованных miR-133a-3p изменений в экспрессии ключевых регуляторов клеточного цикла совпадают с наблюдаемым снижением пролиферации клеток и данными проточной цитометрии, согласно которым в популяции HUVEC, трансфицированных miR-133a-3p, был обнаружен более высокий процент клеток в фазах G0/G1, но меньший — в фазах S и G2/M клеточного цикла [12]. Кроме того, экспрессия miR-133a-3p подавляла экспрессию ключевых медиаторов миграции эндотелиальных клеток, таких как uPAR и моэзин [12].

В дополнение к описанной роли микроРНК в регуляции ангиогенеза Nikolajevic с соавторами (2022) недавно опубликовали данные о роли микроРНК в старении ЭК [74]. Так, было показано, что miR-217 ингибирует SIRT1 и регулирует FoxO1, что приводит к нарушению процессов ангиогенеза и старению ЭК, о чем свидетельствовало увеличение процента клеток, положительных по SA- β -gal, и снижение активности теломеразы (табл.) [74, 75].

Plaur-miR1

Совсем недавно (Rysenkova et al., 2022) была идентифицирована абсолютно новая микроРНК Plaur-miR1, которая экспрессируется с гена *Plaur* и процессируется с образованием двух зрелых форм Plaur-miR1-3p и Plaur-miR1-5p [76]. Однако функции Plaur-miR1 в настоящий момент остаются малоизученными.

Урокиназный рецептор (uPAR), являясь частью системы активаторов плазминогена, фокусирует протеолитическую активность урокиназы (uPA), активатора плазминогена урокиназного типа, на поверхности ЭК, тем самым способствуя ангиогенезу. uPA при связывании с uPAR вызывает превращение плазминогена в плазмин, который разрушает внеклеточный матрикс, облегчая миграцию ЭК [77]. Урокиназная система продолжает интенсивно изучаться, в том числе нашей группой [78–80] и нашими коллегами [81–83]. Уже известны ее различные эффекты в сердечно-сосудистой системе, включая индукцию экспрессии матриксной металлопротеиназы 2 (MMP-2), активацию рецептора VEGF 2 (VEGFR2; Flk-1/KDR), стимуляцию формирования ламеллоподий за счет взаимодействия с витронектином, и др. [84]. Кроме того, показано, что в отсутствие uPAR процессы ангиогенеза ингибируются. Так, в миокарде у мышей C57BL/129 (uPAR^{-/-}) с нокаутом гена *Plaur* наблюдаются признаки васкулопатии: уменьшение количества капилляров/артериол, ремоделирование сосудистой стенки и отложение компонентов внеклеточного матрикса. Эти изменения коррелируют с увеличением экспрессии урокиназы и активных форм Tgfb1 [85]. Однако наблюдаемые множественные эффекты нокаута гена *Plaur* сложно объяснить одними лишь белковыми взаимодействиями, что позволило нам сделать предположение о том, что эти процессы могут регулироваться на уровне экспрессии микроРНК с гена *Plaur*.

Ген *Plaur* состоит из семи экзонов и шести интронов, и прежде в нем не было обнаружено последовательностей микроРНК. Общий размер гена *Plaur* составляет 16 000 п.н., тогда как зрелая мРНК (только экзоны) состоит всего из 1000 п.н. [86]. Предполагается, что некодирующие РНК, включая микроРНК, могут быть закодированы в этом гене. В итоге мы подтвердили Plaur-зависимую экспрессию Plaur miR1-3p и Plaur miR1-5p в мозге мыши и в клетках мышинной нейробластомы Neuro2a [76]. Возможные функции Plaur miR1-3p и Plaur miR1-5p заключаются в определении судьбы клеток и имеют решающую роль в апоптозе нейронов в развивающейся центральной нервной системе, что реализуется через целевые гены этих микроРНК: *Emx2* и *Mef2d*, *Nrip3* и *Snrnp200*. Экспрессия *Emx2*, *Mef2d* и *Snrnp200* в мозге мыши, а также *Mef2d* и *Snrnp200* в клетках Neuro2a коррелирует с экспрессией самого гена *Plaur*,

а также с экспрессией Plaur-miR1-3p и Plaur-miR1-5p. Кроме того, показана Plaur-miR1-5p-опосредованная активация экспрессии гена *Mef2d* в клетках Neuro2a и мозге мыши. Эти данные подтверждают гипотезу о том, что, помимо классического механизма действия микроРНК, основанного на подавлении генов-мишеней, возникающего при связывании микроРНК с 3'-нетранслируемой областью гена-мишени, существует активирующая функция микроРНК, реализуемая посредством взаимодействия микроРНК с 3'-UTR. Доказательства, подтверждающие эту концепцию, были опубликованы в 2020 году Chu и соавторами [87], а также и ранее другими научными группами [19]. Кроме того, недавно (апрель 2022 г.) был предложен механизм, включающий белки, которые связывают микроРНК Argonaute 2 (AGO-2) и белок FXR. Показано, например, что микроРНК повышают экспрессию белков и гликанов посредством прямой активации в пролиферирующих клетках [88]. Таким образом, накопленные данные требуют дальнейшего изучения канонического и неканонического действия микроРНК.

Широко известно, что функции многих микроРНК не ограничиваются их внутриклеточной экспрессией, но также возможна их секреция в кондиционированную среду в составе везикул (экзосом), что также характерно и для МСК [89]. Было показано, что одна из зрелых форм (Plaur-miR1-5p) входит в состав везикул, выделенных из кондиционированной среды от МСК из жировой ткани мышей дикого типа, при этом Plaur-miR1-3p там обнаружено не было, а значит, 3p микроРНК действует только внутриклеточно [76]. Отличия в регуляции и функциях 3p и 5p микроРНК до сих пор недостаточно изучены. Например, имеются данные литературы о том, что одна из цепей может являться менее стабильной и лишь «направляющей», необходимой для того, чтобы микроРНК проходила процессинг комплексом RISC, после чего она деградирует. В то же время другие данные литературы свидетельствуют о том, что каждая из цепей микроРНК может быть стабильна и имеет свои мишени [3]. Возможно, Plaur-miR1-5p более стабильна, чем Plaur-miR1-3p, благодаря чему может быть упакована в мультивезикулярные тельца. С другой стороны, мультивезикулярные тельца, как и экзосомы, защищают молекулы микроРНК от деградации РНКазой фосфолипидного бислоя. Фактически экзосомальные микроРНК более стабильны и устойчивы к де-

градации во времени и циклов замораживания-оттаивания, чем клеточные микроРНК [36].

Среди мишеней Plaur-miR1-5p оказались гены как стимулирующие (*Emcn*, *Prkx*, *Rhoj*, *Col4a3*, *Prokr1*), так и подавляющие ангиогенез (*Mmrn2*). На эксплантной модели сосудистого колечка в Матригеле [90, 91] было показано, что везикулы от МСК из жировой ткани мышей стимулируют миграцию сосудистых клеток Plaur-зависимым образом. При этом везикулы от МСК из жировой ткани мышей *Plaur*^{-/-}, не экспрессирующих Plaur-miR1-5p, стимулируют миграцию сосудистых клеток еще сильнее, однако при этом не оказывая стимулирующего эффекта на миграцию ЭК и формирование ими капиллярноподобных структур [76]. Однако эти везикулы усиливали миграцию/пролиферацию других сосудистых клеток, не экспрессирующих VE-кадгерин — основной маркер эндотелиальных клеток [92]. Известно, что в данной модели из эксплантов в Матригель помимо эндотелиальных клеток могут мигрировать гладкомышечные клетки, перicytes или МСК [13, 90, 93]. Предполагается, что экзосомальная Plaur-miR1-5p, полученная из кондиционированной среды МСК жировой ткани мышей дикого типа, может транспортироваться и непосредственно проникать в ЭК сосудов нашей модели либо оказывать на них действие паракринным образом и тем самым способствовать миграции ЭК. Однако это утверждение является дискуссионным и требует ряда дополнительных исследований.

Эти новые данные углубляют понимание фундаментальных процессов регуляции ангиогенеза с участием внеклеточных везикул и содержащихся в них микроРНК, а также расширяют представления о функции самого гена *Plaur* как ангиогенном факторе ЭК, реализующим свое действие через Plaur-miR1-5p.

Таким образом, на примерах рассмотренных микроРНК становится очевидно, насколько сложна регуляция с участием этих малых молекул, способных влиять на развитие целого организма в эмбриогенезе, а также процессы регенерации в норме и в контексте патологий.

Терапевтическая и клиническая значимость микроРНК в ЭК

МикроРНК представляют собой привлекательную мишень для терапии широкого спектра заболеваний, включая патологии, связанные

с нарушением ангиогенеза [94]. Однако основным ограничением микроРНК в данном контексте является их низкая стабильность и проблема доставки в клетки. Одним из способов доставки микроРНК в клетки является использование углеродных нанотрубок [95].

Другой и более перспективный способ доставки — это разработка аналогов экзосом с использованием липидов. Липидные наночастицы представляют собой передовую платформу для клинически одобренной доставки РНК-препаратов [96]. Aday и коллеги (2021) показали, что искусственные экзосомы на основе липидных наночастиц, несущие let-7b-5p, способствуют ангиогенезу *in vitro* и *in vivo* [96]. Другая научная группа, используя каркас из коллаген-наногидроксиапатита (coll-nHA) в сочетании с наночастицами проникающего в клетки пептида (RALA), разработала эффективную систему доставки miR-26a для регенерации дефектов костей *in vivo*. Этими авторами был разработан и внедрен новый готовый продукт, способный лечить сложные травмы костей [97]. Кроме того, было показано, что использование miR-542-3p в составе экзосом, полученных из МСК костного мозга, для обработки кожной раны у мышей способствует заживлению [98].

Стоит также сказать о перспективной роли микроРНК, индуцирующих ангиогенез, в такой активно развивающейся области, как тканевая инженерия. Регулирующие ангиогенез микроРНК, а также их антагомиры или миметики [99] являются многообещающими инструментами для создания тканеинженерных конструкций, для которых необходимым условием функциональности является обеспечение кровоснабжением. Следует отметить, что в ближайшем будущем особое внимание следует уделить оптимизации способов доставки микроРНК для повышения их эффективности. Однако также следует с осторожностью рассматривать возможность использования описанных микроРНК для активации ангиогенеза при недостаточности кровоснабжения в связи с их потенциальным стимулирующим влиянием на опухолевый рост [100].

Заключение и перспективы

Описанные в обзоре данные указывают на сложность и многообразие генетических механизмов регуляции с участием микроРНК, помимо хорошо известных и давно описанных белок-белковых взаимодействий. МикроРНК представляют

собой один из крупнейших классов регуляторов генов, обладающих способностью контролировать экспрессию множества различных мРНК, что делает их биологическую активность чрезвычайно многообразной. Вероятно, эволюция привела к развитию целой плеяды механизмов для осуществления четкого контроля за функционированием микроРНК на уровне транскрипции, процессинга и взаимодействия с мишенями микроРНК.

Эндотелий играет ключевую роль в регенерации тканей, вовлечен в процессы атеросклероза и опухолевого роста. Возможность влиять на процессы дифференцировки, специализации и функционирования эндотелиальных клеток кажется перспективной стратегией для лечения целого ряда заболеваний человека. МикроРНК, обладающие как про-, так и антиангиогенной активностью, представляют собой уникальный инструмент, позволяющий осуществлять тонкие настройки в регуляции дифференцировки и функционирования эндотелиальных клеток. Возможность управлять процессами роста и регрессии сосудов с помощью микроРНК кажется исключительно привлекательной.

Идентификация микроРНК ЭК как ключевых регуляторов ангиогенеза открывает новые возможности для терапии сердечно-сосудистых заболеваний. Использование микроРНК может в будущем оказаться высоко эффективно при лечении целого ряда сердечно-сосудистых заболеваний, не обладая при этом побочными эффектами в виде токсичности или развивающейся лекарственной устойчивости. Регулирующие ангиогенез микроРНК и их антагомиры или миметики с про- либо антиангиогенной активностью могут быть использованы для стимуляции ангиогенеза в патологических условиях недостаточного кровоснабжения, таких как инфаркт миокарда и ишемия, и, наоборот, при патологической васкуляризации (опухолевый неоангиогенез или ретинопатии). Так, например, поскольку известно, что miR-126 необходима для стимуляции ангиогенеза после инфаркта миокарда, использование миметиков miR-126 может оказаться эффективно для улучшения кровоснабжения при этой патологии.

Потенциальные проблемы в клинике, которые могут возникнуть при использовании микроРНК ЭК, включают недостаточную эффективность системы доставки и неполное понимание

биологических механизмов действия отдельных микроРНК [100]. Ожидается, что исследования в ближайшем будущем будут сосредоточены на выявлении новых функций все расширяющегося семейства микроРНК, регулирующих ангиогенез *in vivo*. Особое внимание будет уделено

идентификации спектров мишеней этих микроРНК, специфического для каждого типа ткани и клеток, а также комбинаторным эффектам родственных микроРНК. Между тем набор специфичных для каждого конкретного заболевания микроРНК еще предстоит идентифицировать.

Литература

1. Pelletier D, Rivera B, Fabian MR, Foulkes WD. miRNA biogenesis and inherited disorders: clinico-molecular insights. *Trends Genet.* 2023 May;39(5):401–414. DOI: 10.1016/j.tig.2023.01.009. Epub 2023 Feb 28. PMID: 36863945
2. Jafri I. MiRNA a New Insight in Metabolic and Human Diseases: A Review. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2023 Aug 31;69(8):102–110. DOI: 10.14715/cmb/2023.69.8.16. PMID: 37715412
3. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004 Jan 23;116(2):281–297. DOI: 10.1016/s0092-8674(04)00045-5. PMID: 14744438
4. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 2000 Feb 24;403(6772):901–906. DOI: 10.1038/35002607. PMID: 10706289
5. Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res.* 2019 Jan 8;47(D1):D155–D162. DOI: 10.1093/nar/gky1141. PMID: 30423142; PMCID: PMC6323917
6. Tastsoglou S, Alexiou A, Karagkouni D, Skoufos G, Zacharopoulou E, Hatzigeorgiou AG. DIANA-microT 2023: including predicted targets of virally encoded miRNAs. *Nucleic Acids Res.* 2023 Jul 5;51(W1):W148–W153. DOI: 10.1093/nar/gkad283. PMID: 37094027; PMCID: PMC10320106
7. Sen CK. MicroRNAs as new maestro conducting the expanding symphony orchestra of regenerative and reparative medicine. *Physiol Genomics.* 2011 May 1;43(10):517–520. DOI: 10.1152/physiolgenomics.00037.2011. Epub 2011 Apr 5. PMID: 21467158; PMCID: PMC3110892
8. Sun LL, Li WD, Lei FR, Li XQ. The regulatory role of microRNAs in angiogenesis-related diseases. *J Cell Mol Med.* 2018 Oct;22(10):4568–4587. DOI: 10.1111/jcmm.13700. Epub 2018 Jun 29. PMID: 29956461; PMCID: PMC6156236
9. Wang S, Olson EN. AngiomiRs--key regulators of angiogenesis. *Curr Opin Genet Dev.* 2009 Jun;19(3):205–211. DOI: 10.1016/j.gde.2009.04.002. Epub 2009 May 14. PMID: 19446450; PMCID: PMC2696563
10. Senger DR, Davis GE. Angiogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011 Aug 1;3(8):a005090. DOI: 10.1101/cshperspect.a005090. PMID: 21807843; PMCID: PMC3140681
11. Ghafouri-Fard S, Shoorei H, Mohaqiq M, Taheri M. Non-coding RNAs regulate angiogenic processes. *Vascul Pharmacol.* 2020 Oct-Nov;133-134:106778. DOI: 10.1016/j.vph.2020.106778. Epub 2020 Aug 9. PMID: 32784009
12. Ahmed S, Kurusamy S, David ELS, Khan K, Kalyanakrishnan K, Ian-Gobo M, et al. Aberrant expression of miR-133a in endothelial cells inhibits angiogenesis by reducing pro-angiogenic but increasing anti-angiogenic gene expression. *Sci Rep.* 2022 Aug 30;12(1):14730. DOI: 10.1038/s41598-022-19172-x. PMID: 36042288; PMCID: PMC9427859
13. Davis PJ, Leinung M., Mousa SA. *Anti-Angiogenesis Strategies in Cancer Therapeutics.* Academic Press (2017). 194 p, DOI <https://doi.org/10.1016/C2014-0-02385-4>
14. Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, Li MZ, et al. Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet.* 2003 Nov;35(3):215–217. DOI: 10.1038/ng1253. Epub 2003 Oct 5. Erratum in: *Nat Genet.* 2003 Nov;35(3):287. PMID: 14528307
15. Lam B, Nwadozi E, Haas TL, Birot O, Roudier E. High Glucose Treatment Limits Drosha Protein Expression and Alters AngiomiR Maturation in Microvascular Primary Endothelial Cells via an Mdm2-dependent Mechanism. *Cells.* 2021 Mar 27;10(4):742. DOI: 10.3390/cells10040742. PMID: 33801773; PMCID: PMC8065922

16. Soufi-Zomorrod M, Hajifathali A, Kouhkan F, Mehdizadeh M, Rad SM, Soleimani M. MicroRNAs modulating angiogenesis: miR-129-1 and miR-133 act as angio-miR in HUVECs. *Tumour Biol.* 2016 Jul;37(7):9527–9534. DOI: 10.1007/s13277-016-4845-0. Epub 2016 Jan 20. PMID: 26790441
17. Malan-Müller S, Hemmings SM, Seedat S. Big effects of small RNAs: a review of microRNAs in anxiety. *Mol Neurobiol.* 2013 Apr;47(2):726–739. DOI: 10.1007/s12035-012-8374-6. Epub 2012 Nov 13. PMID: 23150170; PMCID: PMC3589626
18. Johnson KC, Johnson ST, Liu J, Chu Y, Arana C, Han Y, et al. Consequences of depleting TNRC6, AGO, and DROSHA proteins on expression of microRNAs. *RNA.* 2023 Aug;29(8):1166–1184. DOI: 10.1261/rna.079647.123. Epub 2023 May 11. PMID: 37169394; PMCID: PMC10351893
19. Breving K, Esquela-Kerscher A. The complexities of microRNA regulation: mirandering around the rules. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010 Aug;42(8):1316–1329. DOI: 10.1016/j.biocel.2009.09.016. Epub 2009 Sep 30. PMID: 19800023
20. Chan SP, Slack FJ. And now introducing mammalian mirtrons. *Dev Cell.* 2007 Nov;13(5):605–607. DOI: 10.1016/j.devcel.2007.10.010. PMID: 17981129
21. Nakanishi K. Anatomy of RISC: how do small RNAs and chaperones activate Argonaute proteins? *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2016 Sep;7(5):637–660. DOI: 10.1002/wrna.1356. Epub 2016 May 16. PMID: 27184117; PMCID: PMC5084781
22. Liu J, Rivas FV, Wohlschlegel J, Yates JR 3rd, Parker R, Hannon GJ. A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nat Cell Biol.* 2005 Dec;7(12):1261–1266. DOI: 10.1038/ncb1333. Epub 2005 Nov 13. Erratum in: *Nat Cell Biol.* 2006 Jan;8(1):100. PMID: 16284623; PMCID: PMC1804202
23. Diao L, Marçais A, Norton S, Chen KC. MixMir: microRNA motif discovery from gene expression data using mixed linear models. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(17):e135. DOI: 10.1093/nar/gku672. Epub 2014 Jul 31. PMID: 25081207; PMCID: PMC4176157
24. Chawla G, Deosthale P, Childress S, Wu YC, Sokol NS. A let-7-to-miR-125 MicroRNA Switch Regulates Neuronal Integrity and Lifespan in *Drosophila*. *PLoS Genet.* 2016 Aug 10;12(8):e1006247. DOI: 10.1371/journal.pgen.1006247. PMID: 27508495; PMCID: PMC4979967
25. Sokol NS. Small temporal RNAs in animal development. *Curr Opin Genet Dev.* 2012 Aug;22(4):368–373. DOI: 10.1016/j.gde.2012.04.001. Epub 2012 May 9. PMID: 22578317; PMCID: PMC3419770
26. Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science.* 2007 Dec 21;318(5858):1931–1934. DOI: 10.1126/science.1149460. Epub 2007 Nov 29. PMID: 18048652
27. Janowski BA, Younger ST, Hardy DB, Ram R, Huffman KE, Corey DR. Activating gene expression in mammalian cells with promoter-targeted duplex RNAs. *Nat Chem Biol.* 2007 Mar;3(3):166–173. DOI: 10.1038/nchembio860. Epub 2007 Jan 28. PMID: 17259978
28. Li LC, Okino ST, Zhao H, Pookot D, Place RF, Urakami S, et al. Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006 Nov 14;103(46):17337–17342. DOI: 10.1073/pnas.0607015103. Epub 2006 Nov 3. PMID: 17085592; PMCID: PMC1859931
29. Bejerano G, Pheasant M, Makunin I, Stephen S, Kent WJ, Mattick JS, Haussler D. Ultraconserved elements in the human genome. *Science.* 2004 May 28;304(5675):1321–1325. DOI: 10.1126/science.1098119. Epub 2004 May 6. PMID: 15131266
30. Bozgeyik I. The dark matter of the human genome and its role in human cancers. *Gene.* 2022 Feb 15;811:146084. DOI: 10.1016/j.gene.2021.146084. Epub 2021 Nov 26. PMID: 34843880
31. Wang K, Zhang S, Weber J, Baxter D, Galas DJ. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 2010 Nov;38(20):7248–7259. DOI: 10.1093/nar/gkq601. Epub 2010 Jul 7. PMID: 20615901; PMCID: PMC2978372
32. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol.* 2011 Apr;13(4):423–433. DOI: 10.1038/ncb2210. Epub 2011 Mar 20. Erratum in: *Nat Cell Biol.* 2015 Jan;17(1):104. PMID: 21423178; PMCID: PMC3074610
33. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvald JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007 Jun;9(6):654–659. DOI: 10.1038/ncb1596. Epub 2007 May 7. PMID: 17486113

34. Hergenreider E, Heydt S, Tréguer K, Boettger T, Horrevoets AJ, Zeiher AM, et al. Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs. *Nat Cell Biol.* 2012 Feb 12;14(3):249–256. DOI: 10.1038/ncb2441. PMID: 22327366
35. Zerneck A, Bidzhekov K, Noels H, Shagdarsuren E, Gan L, Denecke B, et al. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci Signal.* 2009 Dec 8;2(100):ra81. DOI: 10.1126/scisignal.2000610. PMID: 19996457
36. Salido-Guadarrama I, Romero-Cordoba S, Peralta-Zaragoza O, Hidalgo-Miranda A, Rodríguez-Dorantes M. MicroRNAs transported by exosomes in body fluids as mediators of intercellular communication in cancer. *Onco Targets Ther.* 2014 Jul 21;7:1327–1338. DOI: 10.2147/OTT.S61562. PMID: 25092989; PMCID: PMC4114916
37. Mayers JR, Audhya A. Vesicle formation within endosomes: An ESCRT marks the spot. *Commun Integr Biol.* 2012 Jan 1;5(1):50–56. DOI: 10.4161/cib.18208. PMID: 22482010; PMCID: PMC3291314
38. Skog J, Würdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol.* 2008 Dec;10(12):1470–1476. DOI: 10.1038/ncb1800. Epub 2008 Nov 16. PMID: 19011622; PMCID: PMC3423894
39. Shah MY, Calin GA. The mix of two worlds: non-coding RNAs and hormones. *Nucleic Acid Ther.* 2013 Feb;23(1):2–8. DOI: 10.1089/nat.2012.0375. Epub 2012 Oct 10. PMID: 23051203; PMCID: PMC3569955
40. Ji X, Takahashi R, Hiura Y, Hirokawa G, Fukushima Y, Iwai N. Plasma miR-208 as a biomarker of myocardial injury. *Clin Chem.* 2009 Nov;55(11):1944–1949. DOI: 10.1373/clinchem.2009.125310. Epub 2009 Aug 20. PMID: 19696117
41. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011 Mar 22;108(12):5003–5008. DOI: 10.1073/pnas.1019055108. Epub 2011 Mar 7. PMID: 21383194; PMCID: PMC3064324
42. Yang WJ, Yang DD, Na S, Sandusky GE, Zhang Q, Zhao G. Dicer is required for embryonic angiogenesis during mouse development. *J Biol Chem.* 2005 Mar 11;280(10):9330–9335. DOI: 10.1074/jbc.M413394200. Epub 2004 Dec 21. PMID: 15613470
43. Suárez Y, Fernández-Hernando C, Yu J, Gerber SA, Harrison KD, Pober JS, et al. Dicer-dependent endothelial microRNAs are necessary for postnatal angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Sep 16;105(37):14082–14087. DOI: 10.1073/pnas.0804597105. Epub 2008 Sep 8. PMID: 18779589; PMCID: PMC2544582
44. Rajewsky K, Gu H, Kühn R, Betz UA, Müller W, Roes J, Schwenk F. Conditional gene targeting. *J Clin Invest.* 1996 Aug 1;98(3):600–603. DOI: 10.1172/JCI118828. PMID: 8698848; PMCID: PMC507466
45. Cobb BS, Nesterova TB, Thompson E, Hertweck A, O'Connor E, Godwin J, et al. T cell lineage choice and differentiation in the absence of the RNase III enzyme Dicer. *J Exp Med.* 2005 May 2;201(9):1367–1373. DOI: 10.1084/jem.20050572. PMID: 15867090; PMCID: PMC2213187
46. Kisanuki YY, Hammer RE, Miyazaki J, Williams SC, Richardson JA, Yanagisawa M. Tie2-Cre transgenic mice: a new model for endothelial cell-lineage analysis in vivo. *Dev Biol.* 2001 Feb 15;230(2):230–242. DOI: 10.1006/dbio.2000.0106. PMID: 11161575
47. Monvoisin A, Alva JA, Hofmann JJ, Zovein AC, Lane TF, Iruela-Arispe ML. VE-cadherin-CreERT2 transgenic mouse: a model for inducible recombination in the endothelium. *Dev Dyn.* 2006 Dec;235(12):3413–3422. DOI: 10.1002/dvdy.20982. PMID: 17072878
48. Wei Y, Schober A, Weber C. Pathogenic arterial remodeling: the good and bad of microRNAs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2013 Apr 15;304(8):H1050–H1059. DOI: 10.1152/ajpheart.00267.2012. Epub 2013 Feb 8. PMID: 23396454
49. Kuehnbacher A, Urbich C, Zeiher AM, Dimmeler S. Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis. *Circ Res.* 2007 Jul 6;101(1):59–68. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.107.153916. Epub 2007 May 31. PMID: 17540974
50. Poliseno L, Tuccoli A, Mariani L, Evangelista M, Citti L, Woods K, et al. MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs. *Blood.* 2006 Nov 1;108(9):3068–3071. DOI: 10.1182/blood-2006-01-012369. Epub 2006 Jul 18. PMID: 16849646

51. Chamorro-Jorganes A, Lee MY, Araldi E, Landskroner-Eiger S, Fernández-Fuertes M, Sahraei M, et al. VEGF-Induced Expression of miR-17-92 Cluster in Endothelial Cells Is Mediated by ERK/ELK1 Activation and Regulates Angiogenesis. *Circ Res*. 2016 Jan 8;118(1):38–47. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.307408. Epub 2015 Oct 15. PMID: 26472816; PMCID: PMC4703066
52. Amini S, Abak A, Sakhinia E, Abhari A. MicroRNA-221 and MicroRNA-222 in Common Human Cancers: Expression, Function, and Triggering of Tumor Progression as a Key Modulator. *Lab Med*. 2019 Oct 10;50(4):333–347. DOI: 10.1093/labmed/lmz002. PMID: 31049571
53. Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. The role of miR-126 in embryonic angiogenesis, adult vascular homeostasis, and vascular repair and its alterations in atherosclerotic disease. *J Mol Cell Cardiol*. 2016 Aug;97:47–55. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2016.05.007. Epub 2016 May 12. PMID: 27180261
54. Wang S, Aurora AB, Johnson BA, Qi X, McAnally J, Hill JA, et al. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Dev Cell*. 2008 Aug;15(2):261–271. DOI: 10.1016/j.devcel.2008.07.002. PMID: 18694565; PMCID: PMC2685763
55. Campagnolo L, Leahy A, Chitnis S, Koschnick S, Fitch MJ, Fallon JT, et al. EGFL7 is a chemoattractant for endothelial cells and is up-regulated in angiogenesis and arterial injury. *Am J Pathol*. 2005 Jul;167(1):275–284. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)62972-0. PMID: 15972971; PMCID: PMC1451775
56. Soncin F, Mattot V, Lionneton F, Spruyt N, Lepretre F, Begue A, Stehelin D. VE-cadherin, an endothelial repressor of smooth muscle cell migration. *EMBO J*. 2003 Nov 3;22(21):5700–5711. DOI: 10.1093/emboj/cdg549. PMID: 14592969; PMCID: PMC275406
57. Kuhnert F, Mancuso MR, Hampton J, Stankunas K, Asano T, Chen CZ, Kuo CJ. Attribution of vascular phenotypes of the murine *Egfl7* locus to the microRNA miR-126. *Development*. 2008 Dec;135(24):3989–3993. DOI: 10.1242/dev.029736. Epub 2008 Nov 5. PMID: 18987025
58. Fish JE, Santoro MM, Morton SU, Yu S, Yeh RF, Wythe JD, et al. miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. *Dev Cell*. 2008 Aug;15(2):272–284. DOI: 10.1016/j.devcel.2008.07.008. PMID: 18694566; PMCID: PMC2604134
59. Lu W, Du X, Zou S, Fang Q, Wu M, Li H, Shi B. IFN- γ enhances the therapeutic efficacy of MSCs-derived exosome via miR-126-3p in diabetic wound healing by targeting SPRED1. *J Diabetes*. 2024 Jan;16(1):e13465. DOI: 10.1111/1753-0407.13465. Epub 2023 Aug 30. PMID: 37646268; PMCID: PMC10809290
60. Zhang J, Zhang Z, Zhang DY, Zhu J, Zhang T, Wang C. microRNA 126 inhibits the transition of endothelial progenitor cells to mesenchymal cells via the PI3K2-PI3K/Akt signalling pathway. *PLoS One*. 2013 Dec 13;8(12):e83294. DOI: 10.1371/journal.pone.0083294. PMID: 24349482; PMCID: PMC3862723
61. Nicoli S, Standley C, Walker P, Hurlstone A, Fogarty KE, Lawson ND. MicroRNA-mediated integration of haemodynamics and Vegf signalling during angiogenesis. *Nature*. 2010 Apr 22;464(7292):1196–1200. DOI: 10.1038/nature08889. Epub 2010 Apr 4. Erratum in: *Nature*. 2010 Sep 16;467(7313):356. PMID: 20364122; PMCID: PMC2914488
62. Kumar S, Kim CW, Simmons RD, Jo H. Role of flow-sensitive microRNAs in endothelial dysfunction and atherosclerosis: mechanosensitive athero-miRs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014 Oct;34(10):2206–2216. DOI: 10.1161/ATVBAHA.114.303425. Epub 2014 Jul 10. PMID: 25012134; PMCID: PMC4169332
63. Kobus K, Kopycinska J, Kozłowska-Wiechowska A, Urasinska E, Kempinska-Podhorodecka A, Haas TL, et al. Angiogenesis within the duodenum of patients with cirrhosis is modulated by mechanosensitive Kruppel-like factor 2 and microRNA-126. *Liver Int*. 2012 Sep;32(8):1222–1232. DOI: 10.1111/j.1478-3231.2012.02791.x. Epub 2012 May 10. PMID: 22574900
64. Harris TA, Yamakuchi M, Ferlito M, Mendell JT, Lowenstein CJ. MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008 Feb 5;105(5):1516–1521. DOI: 10.1073/pnas.0707493105. Epub 2008 Jan 28. PMID: 18227515; PMCID: PMC2234176
65. Asgeirsdóttir SA, van Solingen C, Kurniati NF, Zwiers PJ, Heeringa P, van Meurs M, et al. MicroRNA-126 contributes to renal microvascular heterogeneity of VCAM-1 protein expression in acute inflammation. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012 Jun 15;302(12):F1630–F1639. DOI: 10.1152/ajprenal.00400.2011. Epub 2012 Mar 14. PMID: 22419694

66. Yue S, Shi H, Han J, Zhang T, Zhu W, Zhang D. Prognostic value of microRNA-126 and CRK expression in gastric cancer. *Onco Targets Ther.* 2016 Oct 11;9:6127–6135. DOI: 10.2147/OTT.S87778. PMID: 27785060; PMCID: PMC5066993
67. Tang X, Chen Y, Luo H, Bian Q, Weng B, Yang A, et al. miR-126 Controls the Apoptosis and Proliferation of Immature Porcine Sertoli Cells by Targeting the PIK3R2 Gene through the PI3K/AKT Signaling Pathway. *Animals (Basel).* 2021 Jul 30;11(8):2260. DOI: 10.3390/ani11082260. PMID: 34438716; PMCID: PMC8388524
68. Miko E, Margitai Z, Czimmerer Z, Várkonyi I, Dezsó B, Lányi A, et al. miR-126 inhibits proliferation of small cell lung cancer cells by targeting SLC7A5. *FEBS Lett.* 2011 Apr 20; 585(8):1191–1196. DOI: 10.1016/j.febslet.2011.03.039. Epub 2011 Mar 23. PMID: 21439283
69. Zhou J, Li YS, Nguyen P, Wang KC, Weiss A, Kuo YC, et al. Regulation of vascular smooth muscle cell turnover by endothelial cell-secreted microRNA-126: role of shear stress. *Circ Res.* 2013 Jun 21;113(1):40–51. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.113.280883. Epub 2013 Apr 19. PMID: 23603512; PMCID: PMC3772783
70. Schober A, Nazari-Jahantigh M, Wei Y, Bidzhekov K, Gremse F, Grommes J, et al. MicroRNA-126-5p promotes endothelial proliferation and limits atherosclerosis by suppressing Dlk1. *Nat Med.* 2014 Apr;20(4):368–376. DOI: 10.1038/nm.3487. Epub 2014 Mar 2. PMID: 24584117; PMCID: PMC4398028
71. Li P, Yin YL, Guo T, Sun XY, Ma H, Zhu ML, et al. Inhibition of Aberrant MicroRNA-133a Expression in Endothelial Cells by Statin Prevents Endothelial Dysfunction by Targeting GTP Cyclohydrolase 1 in Vivo. *Circulation.* 2016 Nov 29;134(22):1752–1765. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.017949. Epub 2016 Oct 20. PMID: 27765794; PMCID: PMC5120771
72. Chen L, Liu C, Sun D, Wang T, Zhao L, Chen W, et al. MicroRNA-133a impairs perfusion recovery after hindlimb ischemia in diabetic mice. *Biosci Rep.* 2018 Jul 2;38(4):BSR20180346. DOI: 10.1042/BSR20180346. PMID: 29789398; PMCID: PMC6028757
73. Zhu W, Sun L, Zhao P, Liu Y, Zhang J, Zhang Y, et al. Macrophage migration inhibitory factor facilitates the therapeutic efficacy of mesenchymal stem cells derived exosomes in acute myocardial infarction through upregulating miR-133a-3p. *J Nanobiotechnology.* 2021 Feb 27; 19(1):61. DOI: 10.1186/s12951-021-00808-5. PMID: 33639970; PMCID: PMC7916292
74. Nikolajevic J, Ariaee N, Liew A, Abbasnia S, Fazeli B, Sabovic M. The Role of MicroRNAs in Endothelial Cell Senescence. *Cells.* 2022 Mar 31;11(7):1185. DOI: 10.3390/cells11071185. PMID: 35406749; PMCID: PMC8997793
75. Menghini R, Casagrande V, Cardellini M, Martelli E, Terrinoni A, Amati F, et al. MicroRNA 217 modulates endothelial cell senescence via silent information regulator 1. *Circulation.* 2009 Oct 13;120(15):1524–1532. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.864629. Epub 2009 Sep 28. PMID: 19786632
76. Rysenkova KD, Troyanovskiy KE, Klimovich PS, Bulyakova TR, Shelomentseva EM, Shmakova AA, et al. Identification of a Novel Small RNA Encoded in the Mouse Urokinase Receptor uPAR Gene (Plaur) and Its Molecular Target Mef2d. *Front Mol Neurosci.* 2022 Jul 6;15:865858. DOI: 10.3389/fnmol.2022.865858. PMID: 35875662; PMCID: PMC9298986
77. Larusch GA, Merkulova A, Mahdi F, Shariat-Madar Z, Sitrin RG, Cines DB, Schmaier AH. Domain 2 of uPAR regulates single-chain urokinase-mediated angiogenesis through β 1-integrin and VEGFR2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2013 Aug 1;305(3):H305–H320. DOI: 10.1152/ajpheart.00110.2013. Epub 2013 May 24. PMID: 23709605; PMCID: PMC3742872
78. Semina E, Rubina K, Sysoeva V, Rysenkova K, Klimovich P, Plekhanova O, Tkachuk V. Urokinase and urokinase receptor participate in regulation of neuronal migration, axon growth and branching. *Eur J Cell Biol.* 2016 Sep;95(9):295–310. DOI: 10.1016/j.ejcb.2016.05.003. Epub 2016 Jun 3. PMID: 27324124
79. Klimovich PS, Semina EV, Karagyaur MN, Rysenkova KD, Sysoeva VY, Mironov NA, et al. Urokinase receptor regulates nerve regeneration through its interaction with α 5 β 1-integrin. *Biomed Pharmacother.* 2020 May;125:110008. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110008. Epub 2020 Feb 28. PMID: 32187956
80. Rysenkova KD, Klimovich PS, Shmakova AA, Karagyaur MN, Ivanova KA, Aleksandrushkina NA, et al. Urokinase receptor deficiency results in EGFR-mediated failure to transmit

- signals for cell survival and neurite formation in mouse neuroblastoma cells. *Cell Signal*. 2020 Nov;75:109741. DOI: 10.1016/j.cellsig.2020.109741. Epub 2020 Aug 18. PMID: 32822758
81. Dzhauro S, Litvinova S, Efimenko A, Aleksandrushkina N, Basalova N, Abakumov M, et al. Urokinase-Type Plasminogen Activator Enhances the Neuroprotective Activity of Brain-Derived Neurotrophic Factor in a Model of Intracerebral Hemorrhage. *Biomedicines*. 2022 Jun 8;10(6):1346. DOI: 10.3390/biomedicines10061346. PMID: 35740368; PMCID: PMC9220139
 82. Shmakova A, Balatskiy A, Kulebyakina M., et al. Urokinase Receptor uPAR Overexpression in Mouse Brain Stimulates the Migration of Neurons into the Cortex during Embryogenesis. *Russ J Dev Biol* 2021;52:53–63. DOI: 10.1134/S1062360421010069
 83. Karagyaur M, Dyikanov D, Makarevich P, Semina E, Stambolsky D, Plekhanova O, et al. Non-viral transfer of BDNF and uPA stimulates peripheral nerve regeneration. *Biomed Pharmacother*. 2015 Aug;74:63–70. DOI: 10.1016/j.biopha.2015.07.002. Epub 2015 Jul 28. PMID: 26349964
 84. Prager GW, Breuss JM, Steurer S, Mihaly J, Binder BR. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces rapid prourokinase (pro-uPA) activation on the surface of endothelial cells. *Blood*. 2004 Feb 1;103(3):955–962. DOI: 10.1182/blood-2003-07-2214. Epub 2003 Oct 2. PMID: 14525763
 85. Dergilev KV, Beloglazova IB, Tsokolaeva ZI, Vasilets YD, Parfenova EV. Deficiency of Urokinase-Type Plasminogen Activator Receptor Is Associated with the Development of Perivascular Fibrosis in Mouse Heart. *Bull Exp Biol Med*. 2022 May;173(1):5–9. DOI: 10.1007/s10517-022-05480-9. Epub 2022 May 27. PMID: 35622258
 86. Kjaergaard M, Hansen LV, Jacobsen B, Gardsvoll H, Ploug M. Structure and ligand interactions of the urokinase receptor (uPAR). *Front Biosci*. 2008 May 1;13:5441–5461. DOI: 10.2741/3092. PMID: 18508598
 87. Chu Y, Kilikevicius A, Liu J, Johnson KC, Yokota S, Corey DR. Argonaute binding within 3'-untranslated regions poorly predicts gene repression. *Nucleic Acids Res*. 2020 Jul 27; 48(13):7439–7453. DOI: 10.1093/nar/gkaa478. PMID: 32501500; PMCID: PMC7367155
 88. Faezeh Jame-Chenarboo, Hoi Hei Ng, Dawn Macdonald, Lara K. Mahal. miRNA upregulate protein and glycan expression via direct activation in proliferating cells. *bioRxiv*. 2022.04.01.486772; doi: <https://doi.org/10.1101/2022.04.01.486772>
 89. Basalova N. et al. Mesenchymal stromal cells facilitate resolution of pulmonary fibrosis by miR-29c and miR-129 intercellular transfer. *Exp Mol Med*. 2023 Jul;55(7):1399–1412. DOI: 10.1038/s12276-023-01017-w. Epub 2023 Jul 3. PMID: 37394579; PMCID: PMC10393964
 90. Kanugula AK, Adapala RK, Guarino BD, Bhavnani N, Dudipala H, Paruchuri S, Thodeti CK. Studying Angiogenesis Using Matrigel In Vitro and In Vivo. *Methods Mol Biol*. 2024;2711:105–116. DOI: 10.1007/978-1-0716-3429-5_9. PMID: 37776452
 91. Mehta V, Mahmoud M. Ex Vivo Mouse Aortic Ring Angiogenesis Assay. *Methods Mol Biol*. 2022;2475:229–238. DOI: 10.1007/978-1-0716-2217-9_17. PMID: 35451762
 92. Vestweber D. VE-cadherin: the major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008 Feb;28(2):223–232. DOI: 10.1161/ATVBAHA.107.158014. Epub 2007 Dec 27. PMID: 18162609
 93. Nicosia RF. The aortic ring model of angiogenesis: a quarter century of search and discovery. *J Cell Mol Med*. 2009 Oct;13(10):4113–4136. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2009.00891.x. Epub 2009 Sep 1. PMID: 19725916; PMCID: PMC4496118
 94. Celluzzi A, Paolini A, D'Oria V, Risoluti R, Materazzi S, Pezzullo M, et al. Biophysical and biological contributions of polyamine-coated carbon nanotubes and bidimensional buckypapers in the delivery of miRNAs to human cells. *Int J Nanomedicine*. 2017 Dec 18;13:1–18. DOI: 10.2147/IJN.S144155. Erratum in: *Int J Nanomedicine*. 2018 Jun 27;13:3729. DOI: 10.2147/IJN.S172673. PMID: 29296082; PMCID: PMC5739113
 95. Masotti A, Miller MR, Celluzzi A, Rose L, Micciulla F, Hadoke PW, et al. Regulation of angiogenesis through the efficient delivery of microRNAs into endothelial cells using polyamine-coated carbon nanotubes. *Nanomedicine*. 2016 Aug;12(6):1511–1522. DOI: 10.1016/j.nano.2016.02.017. Epub 2016 Mar 22. PMID: 27013131; PMCID: PMC4949379
 96. Aday S, Hazan-Halevy I, Chamorro-Jorganes A, Anwar M, Goldsmith M, Beazley-Long N, et al. Bioinspired artificial exosomes based on lipid nanoparticles carrying let-7b-5p

- promote angiogenesis in vitro and in vivo. *Mol Ther*. 2021 Jul 7;29(7):2239–2252. DOI: 10.1016/j.ymthe.2021.03.015. Epub 2021 Mar 18. PMID: 33744469; PMCID: PMC8261169
97. Sadowska JM, Ziminska M, Ferreira C, Matheson A, Balouch A, Bogle J, et al. Development of miR-26a-activated scaffold to promote healing of critical-sized bone defects through angiogenic and osteogenic mechanisms. *Biomaterials*. 2023 Dec;303:122398. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2023.122398. Epub 2023 Nov 13. PMID: 37979514
 98. Xiong QH, Zhao L, Wan GQ, Hu YG, Li XL. Engineered BMSCs-Derived Exosomal miR-542-3p Promotes Cutaneous Wound Healing. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2023;23(3):336–346. DOI: 10.2174/1871530322666220523151713. PMID: 35616673
 99. Murata K, Ito H, Yoshitomi H, Yamamoto K, Fukuda A, Yoshikawa J, et al. Inhibition of miR-92a enhances fracture healing via promoting angiogenesis in a model of stabilized fracture in young mice. *J Bone Miner Res*. 2014 Feb;29(2):316–326. DOI: 10.1002/jbmr.2040. PMID: 23857760
 100. Ding MH, Lozoya EG, Rico RN, Chew SA. The Role of Angiogenesis-Inducing microRNAs in Vascular Tissue Engineering. *Tissue Eng Part A*. 2020 Dec;26(23–24):1283–1302. DOI: 10.1089/ten.TEA.2020.0170. Epub 2020 Oct 1. PMID: 32762306
 101. Bonauer A, Boon RA, Dimmeler S. Vascular microRNAs. *Curr Drug Targets*. 2010 Aug;11(8):943–49. DOI: 10.2174/138945010791591313. PMID: 20415654
 102. Suárez Y, Fernández-Hernando C, Pober JS, Sessa WC. Dicer dependent microRNAs regulate gene expression and functions in human endothelial cells. *Circ Res*. 2007 Apr 27;100(8):1164–1173. DOI: 10.1161/01.RES.0000265065.26744.17. Epub 2007 Mar 22. PMID: 17379831
 103. Weber M, Baker MB, Moore JP, Searles CD. MiR-21 is induced in endothelial cells by shear stress and modulates apoptosis and eNOS activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Mar 19;393(4):643–648. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.02.045. Epub 2010 Feb 12. PMID: 20153722; PMCID: PMC3717387
 104. Yang P, Cai L, Zhang G, Bian Z, Han G. The role of the miR-17-92 cluster in neurogenesis and angiogenesis in the central nervous system of adults. *J Neurosci Res*. 2017 Aug;95(8):1574–1581. DOI: 10.1002/jnr.23991. Epub 2016 Nov 21. PMID: 27869313
 105. Qin X, Wang X, Wang Y, Tang Z, Cui Q, Xi J, et al. MicroRNA-19a mediates the suppressive effect of laminar flow on cyclin D1 expression in human umbilical vein endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010 Feb 16;107(7):3240–3244. DOI: 10.1073/pnas.0914882107. Epub 2010 Jan 27. PMID: 20133739; PMCID: PMC2840357
 106. Olivieri F, Lazzarini R, Recchioni R, Marcheselli F, Rippo MR, Di Nuzzo S, et al. Procopio AD. MiR-146a as marker of senescence-associated pro-inflammatory status in cells involved in vascular remodelling. *Age (Dordr)*. 2013 Aug;35(4):1157–1172. DOI: 10.1007/s11357-012-9440-8. Epub 2012 Jun 13. PMID: 22692818; PMCID: PMC3705128
 107. Li J, Zhang Y, Zhao Q, Wang J, He X. MicroRNA-10a Influences Osteoblast Differentiation and Angiogenesis by Regulating β -Catenin Expression. *Cell Physiol Biochem*. 2015;37(6):2194–2208. DOI: 10.1159/000438576. Epub 2015 Nov 27. PMID: 26610149
 108. Zhu S, Deng S, Ma Q, Zhang T, Jia C, Zhuo D, et al. MicroRNA-10A* and MicroRNA-21 modulate endothelial progenitor cell senescence via suppressing high-mobility group A2. *Circ Res*. 2013 Jan 4;112(1):152–164. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.112.280016. Epub 2012 Oct 16. PMID: 23072816; PMCID: PMC3719009
 109. Grundmann S, Hans FP, Kinniry S, Heinke J, Helbing T, Bluhm F, et al. MicroRNA-100 regulates neovascularization by suppression of mammalian target of rapamycin in endothelial and vascular smooth muscle cells. *Circulation*. 2011 Mar 8;123(9):999–1009. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.000323. Epub 2011 Feb 21. PMID: 21339483
 110. Zhou Q, Gallagher R, Ufret-Vincenty R, Li X, Olson EN, Wang S. Regulation of angiogenesis and choroidal neovascularization by members of microRNA-23-27-24 clusters. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011 May 17;108(20):8287–8292. DOI: 10.1073/pnas.1105254108. Epub 2011 May 2. PMID: 21536891; PMCID: PMC3100947

Об авторах

Климович Полина Сергеевна — к.б.н., старший научный сотрудник факультета фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии им. ак. Е.И. Чазова.

Дзрелян Валентина Александровна — к.б.н., научный сотрудник факультета фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова.

Семина Екатерина Владимировна — д.б.н., ведущий научный сотрудник факультета фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова.

Рубина Ксения Андреевна — д.б.н., заведующая лабораторией морфогенеза и репарации тканей факультета фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова.

Authors

Polina S. Klimovich — Cand. Sci. (Biology), Senior researcher of Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University and of Chazov National Medical Research Centre of Cardiology.

Valentina A. Dzreyan — Cand. Sci. (Biology), researcher of Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University.

Ekaterina V. Semina — Dr. Sci. (Biology), Leading researcher of Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University.

Kseniya A. Rubina — Dr. Sci. (Biology), Head of the laboratory of morphogenesis and tissue repair of Faculty of Fundamental Medicine of Lomonosov Moscow State University.

Вклад авторов

Климович П.С. — разработка концепции, анализ литературы, написание текста.

Дзрелян В.А. — написание текста.

Семина Е.В. — редактирование статьи.

Рубина К.А. — редактирование статьи.

Authors' contribution

Polina S. Klimovich — concept development, collecting and analyzing literary sources, writing of the article.

Valentina A. Dzreyan — writing of the article.

Ekaterina V. Semina — editing of the article.

Kseniya A. Rubina — editing of the article.