

TISSUE AND ORGAN REGENERATION

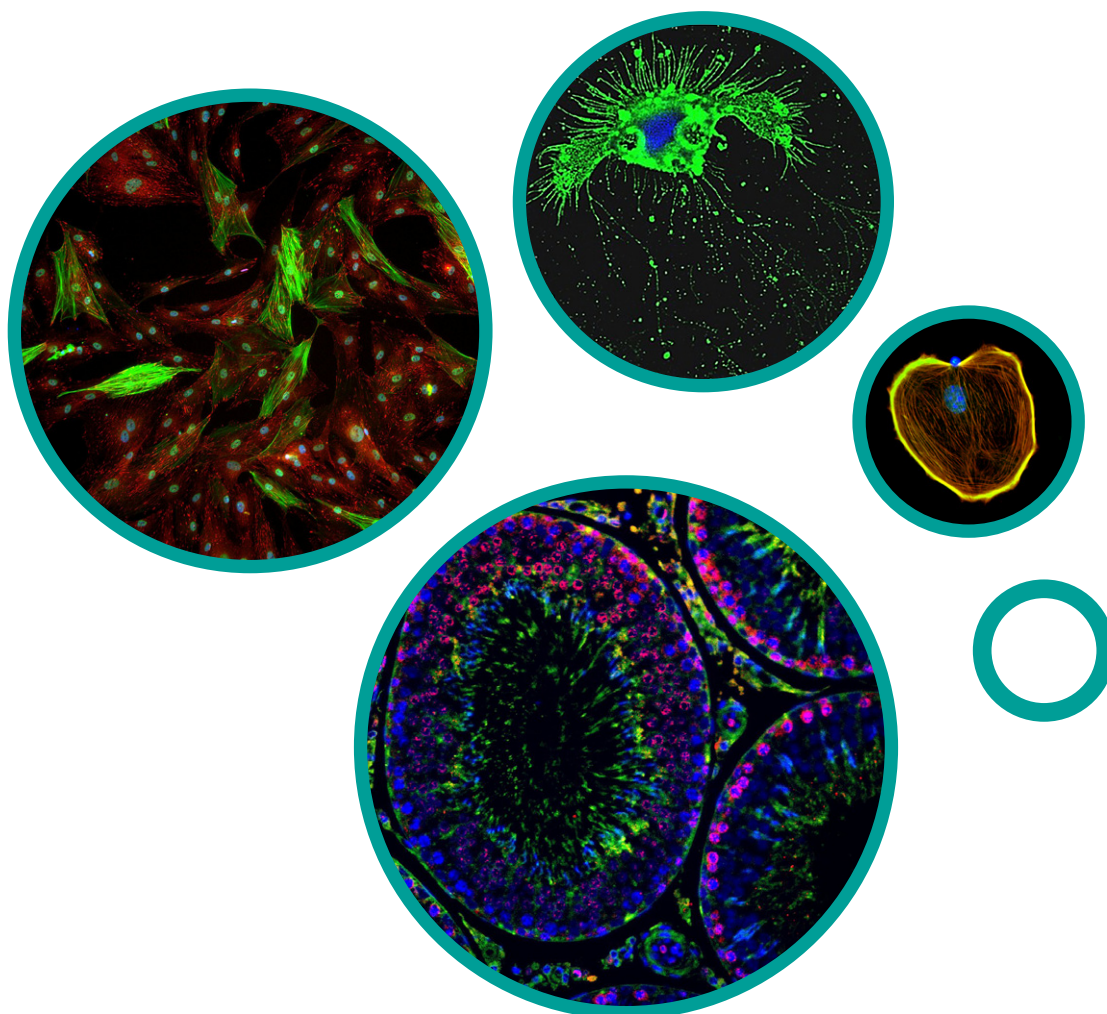
РЕГЕНЕРАЦИЯ

органов и тканей

Регенеративная биомедицина Евразии

3

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, д-р 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, д-р 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	30.09.2024
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, Dr. 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. Karagyaury, 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	30.09.2024
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 Началось регуляторное клиническое исследование оригинального отечественного биологического лекарственного препарата на основе секретомы мезенхимных стромальных клеток человека «МедиРег»® А.Ю. Ефименко	EDITORIAL The regulatory clinical trial has commenced for “MediReg”®, an original domestically developed biologic drug based on the secretome of human mesenchymal stromal cells Anastasia Yu. Efimenko
14	ОБЗОРЫ И КОММЕНТАРИИ Стволовые клетки для терапии нейродегенерации Р.А. Полтавцева, Е.В. Смирщевская, В.М. Чиков, Н.В. Бобкова, Г.Т. Сухих	REVIEWS AND COMMENTS Stem cells for therapy of neurodegeneration Rimma A. Poltavtseva, Elena V. Svirshchevskaya, Vladimir M. Tchikov, Natalia V. Bobkova, Gennady T. Sukhikh
33	Т-кадгерин как ключевой регулятор метаболизма в норме и при патологии. Мини-обзор К.А. Рубина, В.Ю. Сысоева, К.Ю. Кулебякин, Е.В. Семина	T-cadherin as a key regulator of metabolism in health and disease Kseniya A. Rubina, Veronika Yu. Sysoeva, Konstantin Yu. Kulebyakin, Ekaterina V. Semina
41	ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ Изменение внутриклеточной сигнализации, индуцированной норадреналином и серотонином, при старении мультипотентных мезенхимных стромальных клеток человека Е.С. Чечехина, К.Ю. Кулебякин, О.А. Григорьева, А.Ю. Ефименко, П.А. Тюрин-Кузьмин	ORIGINAL ARTICLES Changes in noradrenaline- and serotonin-dependent intracellular signaling in senescent multipotent mesenchymal stromal cells Elizaveta S. Chechekhina, Konstantin Yu. Kulebyakin, Olga A. Grigorieva, Anastasiya Yu. Efimenko, Pyotr A. Tyurin-Kuzmin
56	Формирование тканеинженерной конструкции хряща на основе микрочастиц децеллюляризованного хряща в перфузионном биореакторе Ю.Б. Басок, А.М. Григорьев, Л.А. Кирсанова, А.Д. Белова, А.М. Суббот, Е.А. Гусева, Е.А. Немец, В.И. Севастьянов	Formation of a tissue-engineered cartilage structure based on decellularized cartilage microparticles in a perfusion bioreactor Yulia B. Basok, Alexey M. Grigor'ev, Liudmila A. Kirsanova, Alexandra D. Belova, Anastasia M. Subbot, Ekaterina A. Guseva, Evgeny A. Nemets, Victor I. Sevastianov

Началось регуляторное клиническое исследование оригинального отечественного биологического лекарственного препарата на основе секрета мезенхимных стромальных клеток человека «МедиРег»®

А.Ю. Ефименко^{1,2}

¹ Центр регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного института ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Россия, 119192, Москва, Ломоносовский пр., 27к10

² Кафедра биохимии и регенеративной биомедицины Факультета фундаментальной медицины Медицинского научно-образовательного института ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Россия, 119192, Москва, Ломоносовский пр., 27к10

Адрес для корреспонденции: efimenkoay@my.msu.ru

Аннотация

На протяжении всей жизни клеточные компоненты тканей и органов нуждаются в своевременном обновлении и восстановлении после серьезных повреждений. Эту функцию выполняют стволовые клетки, которые во взрослом организме регулируются специфическим микроокружением, называемым нишей стволовых клеток. Нарушение функции ниши может приводить к утрате целостности и дисфункции ткани. Показано, однако, что ниша стволовой клетки способна к частичному восстановлению. Значительный вклад в этот процесс вносят мультипотентные мезенхимные стволовые/стромальные клетки (МСК), которые обнаружены в различных нишах тканеспецифичных стволовых клеток, где они участвуют в поддержании и восстановлении поврежденных ниш, предположительно за счет секреции широкого спектра факторов, комплекс которых называется секретомом, вовлеченных в регуляцию репарации и регенерации тканей. Использование секрета клеток, в частности МСК, в качестве продуктов для регенеративной медицины лежит в основе активно развивающегося нового направления клеточной терапии, так называемой «клеточной терапии без клеток» (cell-free cell therapy).

Недавно в РФ было впервые инициировано регуляторное клиническое исследование оригинального биологического лекарственного препарата «МедиРег»® на основе секрета МСК человека, разработанного и произведенного в МГУ имени М.В. Ломоносова, который предназначен для лечения тяжелых нарушений сперматогенеза за счет стимуляции восстановления поврежденной ниши сперматогониальных стволовых клеток. В данном коротком сообщении на примере препарата «МедиРег»® обсуждаются ключевые особенности разработки и доклинических исследований биологических препаратов на основе секрета МСК человека и перспективы их трансляции в клиническую практику.

Ключевые слова: регенеративная медицина, ниша стволовых клеток, мезенхимные стромальные клетки, секретом, клинические исследования, мужское бесплодие

Благодарности: работа выполнена в рамках государственного задания ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Конфликт интересов: автор является руководителем проекта «Фармацевтическая разработка, доклиническое и клиническое изучение оригинального препарата на основе секретомы мезенхимных стромальных клеток для лечения мужского бесплодия», выполняемого при поддержке федерального проекта «Медицинская наука для человека». Автор является членом редакционной коллегии 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: Ефименко А.Ю. Началось регуляторное клиническое исследование оригинального отечественного биологического лекарственного препарата на основе секретомы мезенхимных стромальных клеток человека «МедиРег»®. *Регенерация органов и тканей*. 2024;2(3):6–13. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-2-6-13>

Поступила 01.09.2024

Обработана 15.09.2024

Принята к публикации 22.09.2024

The regulatory clinical trial has commenced for “MediReg”®, an original domestically developed biologic drug based on the secretome of human mesenchymal stromal cells

Anastasia Yu. Efimenko

¹ Centre for Regenerative Medicine, Medical Research and Educational Institute, Lomonosov Moscow State University, Russia, 119192, Moscow, Lomonosovsky ave., 27–10

² Department of biochemistry and regenerative biomedicine, Faculty of Medicine, Medical Research and Educational Institute, Lomonosov Moscow State University, Russia, 119192, Moscow, Lomonosovsky ave., 27–10

Correspondence address: efimenkoay@my.msu.ru

Abstract

Throughout life, the cellular components of tissues and organs require timely renewal and repair following significant damage. This function is carried out by stem cells, which in adult organisms are regulated by a specialized microenvironment known as the stem cell niche. Dysfunction of the niche can lead to loss of tissue integrity and impaired function. However, it has been demonstrated that the stem cell niche is capable of partial recovery. A significant contribution to this process is made by multipotent mesenchymal stem/stromal cells (MSCs), which are found in various tissue-specific stem cell niches, where they participate in maintaining and repairing damaged niches, presumably through the secretion of a wide range of factors collectively referred to as the secretome, which are involved in regulating tissue repair and regeneration. The use of the cell secretome, particularly that of MSCs, as regenerative medicine products underlies an emerging field of cell therapy known as “cell-free cell therapy”.

Recently, the first regulatory clinical trial of an original biological drug, “MediReg”®, based on the secretome of human MSCs was initiated in the Russian Federation. Developed and manufactured

at Lomonosov Moscow State University, this drug is intended to treat severe impairments of spermatogenesis by stimulating the recovery of the damaged spermatogonial stem cell niche. In this brief communication, using “MediReg”® as an example, we discuss the key aspects of the development and preclinical studies of biological drugs based on the secretome of human MSCs, as well as the prospects for their translation into clinical practice.

Keywords: regenerative medicine, stem cell niche, mesenchymal stromal cells, secretome, clinical trials, male infertility

Acknowledgements: The work was carried under state assignment of Lomonosov Moscow State University.

Conflict of interests: The author is the head of the project “Pharmaceutical development, pre-clinical and clinical study of an original drug based on the secretome of mesenchymal stromal cells for the treatment of male infertility”, carried out with the support of the federal project “Medical Science for People”. The author has been a member of the editorial board of the journal “Tissue and organ regeneration” since 2023 but was not involved in the decision to publish this article. The article underwent the journal’s standard peer-review process. The author reported no other conflicts of interest.

For citation: Efimenko A.Yu. The regulatory clinical trial has commenced for “MediReg”®, an original domestically developed biologic drug based on the secretome of human mesenchymal stromal cells. *Tissue and organ regeneration*. 2024;2(3):6–13. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-2-6-13>

Received 01.09.2024

Revised 15.09.2024

Accepted 22.09.2024

Список сокращений:

МСК — мезенхимные стволовые/стромальные клетки

ССК — сперматогонияльные стволовые клетки

FDA — Food and Drug Agency

Важнейшим достижением современной медицинской науки стало формирование нового направления — регенеративной биомедицины, которая ставит перед собой задачу поиска эффективных подходов к продлению активной жизни и восстановлению здоровья человека за счет воссоздания структур и управления обновлением клеток и регенерацией тканей в его организме. В этих процессах ключевую роль играют постнатальные стволовые клетки. Накопленные к настоящему времени данные показывают, что физиологические функции стволовых клеток регулируются специализированным микроокружением, которое включает в себя различные клеточные и молекулярные компоненты и получило название «ниша стволовой клетки» [1, 2]. Нарушение функции ниши может приводить к утрате целостности и дисфункции ткани, поэтому умение управ-

лять процессами восстановления и поддержания ниши является перспективным подходом к лечению многих серьезных патологий. В различных нишах тканеспецифичных стволовых клеток обнаружены мультипотентные мезенхимные стволовые/стромальные клетки (МСК), и показано, что они являются важными участниками регуляции функционирования ниш, предположительно за счет секреции широкого спектра факторов [3]. Согласно накопленным данным секретом МСК представляет собой композицию биологически активных молекул, среди которых несколько сотен белков и пептидов, идентифицированных как белки внеклеточного матрикса, цито- и хемокины, факторы роста различных семейств, а также молекулы, включая биологически активные липиды, кодирующие и не кодирующие регуляторные РНК, содержащиеся в составе внеклеточных везикул.

Эти компоненты участвуют в регуляции функций стволовых клеток и их ниш, воспаления, ангио- и нейрогенеза, метаболических реакций, что опосредует влияние МСК на процессы репарации и регенерации тканей [1–3].

Благодаря эффектам своего секретома при введении в организм МСК демонстрируют способность стимулировать регенеративные процессы в тканях даже при низком уровне приживления [4]. Похожие эффекты наблюдались в случае использования и других типов клеток для терапии различных заболеваний, что легло в основу развития нового направления клеточной терапии, так называемой «клеточной терапии без клеток» (cell-free therapy). Введение секретома или его отдельных фракций позволяет воспроизвести положительные эффекты и в то же время избежать ряда рисков, связанных с клеточной терапией, например потенциальной канцерогенности или воспалительного ответа организма на введенные клетки [5].

В зарубежных странах и в РФ подходы бесклеточной терапии получают все большее распространение. С учетом накопленного опыта в МГУ имени М.В. Ломоносова на базе Медицинского научно-образовательного центра была создана технологическая платформа для разработки биологических лекарственных препаратов для стимуляции регенерации тканей, которая включает в себя комплекс технологических решений по получению препаратов на основе компонентов секретома МСК человека для решения широкого спектра клинических задач [6]. Биологические препараты, разрабатываемые на основе созданной платформы, являются мульти-таргентными и плеiotропными по механизму действия, который включает в себя ряд эффектов, направленных на запуск генетических программ клеточного обновления и восстановления тканей. Поскольку секретом МСК человека представляет собой композицию множества биологически активных веществ, различных по структуре и механизму действия, установить все молекулярные мишени для таких препаратов не представляется возможным, однако данные научных исследований позволяют назвать основные компоненты секретома, обладающие терапевтическим эффектом, и обосновать их мишени [7, 8].

В качестве первого биологического лекарственного препарата, разработанного на базе этой

платформы, был создан оригинальный препарат «МедиРег»® на основе секретома МСК человека для лечения тяжелых нарушений сперматогенеза, сопровождающихся развитием мужского бесплодия необструктивного генеза. Проблема бесплодия затрагивает от 8 до 17% пар в мире, причем мужской фактор является основной или единственной причиной примерно у 50% пар, а 10% из этого количества пациентов имеют крайне тяжелые варианты нарушений в виде азооспермии, криптозооспермии, тяжелой олигоастенотератозооспермии [9]. По степени тяжести неблагоприятных социальных последствий ВОЗ поставила проблему мужского бесплодия сразу вслед за проблемами онкологических и сердечно-сосудистых заболеваний. По данным различных исследований от 15 до 50% случаев мужского бесплодия определяются как идиопатические [9, 10]. В связи с невозможностью точного установления этиологии в этом случае терапевтические подходы включают вспомогательные репродуктивные технологии или эмпирическое лечение, например применение гормональной терапии или антиоксидантов. Современные методы лечения мужского бесплодия, включая вспомогательные репродуктивные технологии, обладают сравнительной эффективностью не выше 30%. Таким образом, очевидна необходимость поиска новых, более эффективных и безопасных терапевтических подходов к лечению мужского бесплодия [11].

Накопленные данные указывают на решающий вклад нарушений в работе ниши сперматогенетических стволовых клеток (ССК) в патогенез идиопатического мужского бесплодия, в связи с этим перспективной терапевтической стратегией является терапия, которая сможет привести к восполнению и/или поддержанию микроокружения ССК в семенниках [12, 13]. МСК представляют собой многообещающий терапевтический инструмент для решения этой задачи. Так, было показано, что применение МСК приводило к восстановлению продукции сперматозоидов посредством воздействия на компоненты микроокружения ССК, такие как клетки Лейдига и клетки Сертоли [14]. Интратестикулярная инъекция МСК костного мозга способствовала практически полной нормализации сперматогенеза при бусульфан-индуцированной азооспермии у хомяков [15]. Аналогичные результаты были получены на моделях бусульфан-индуцированной азооспермии и у других животных [16].

В наших исследованиях была доказана способность как МСК, так и их секретом стимулировать восстановление поврежденной ниши ССК. На модели экспериментального крипторхизма у крыс было установлено, что локальное введение секретом МСК жировой ткани человека под белочную оболочку яичка способствует уменьшению выраженности гипотрофии крипторхизированных яичек, восстанавливает уровень андрогенов в крови, оказывает выраженное стимулирующее действие на сперматогенез, повышая общее количество сперматозоидов и их подвижную фракцию, и в итоге приводит к частичному восстановлению фертильности самцов. Важно отметить, что этот эффект был сравним с результатами, полученными при локальном введении самих МСК человека, однако является более безопасным по сравнению с клеточной терапией [17, 18]. Ключевым механизмом восстановления сперматогенеза под действием секретом МСК являлось поддержание функции поврежденных или нарушенных компонентов ниши ССК [17].

Полученные данные легли в основу proof-of-concept исследования, демонстрирующего перспективность использования секретом МСК для разработки биологического лекарственного препарата для лечения тех случаев мужского бесплодия, которые связаны с повреждением ниши ССК. В дальнейших доклинических исследованиях подтверждение способности субстанции на основе секретом МСК человека стимулировать восстановление сперматогенеза было получено на второй модели доксорубин-индуцированного повреждения семенников у мышей [8]. На животных моделях были установлены механизмы специфической активности препарата на основе секретом МСК, опосредующие восстановление нарушений сперматогенеза различной этиологии. На клеточных моделях были уточнены механизмы специфической активности *ex vivo* (влияние секретом МСК на жизнеспособность сперматогониальных стволовых клеток, миграцию клеток Сертоли, синтетическую активность клеток Лейдига). Проведены исследования по первичной фармакодинамике с помощью ингибиторного анализа.

Установление классических фармакокинетических параметров для комплексного биологического препарата, исходя из локального пути введения, неприменимо, но на животной модели *in vivo* было показано отсутствие системной адсорбции при локальном введении. При изуче-

нии биораспределения с рекомбинантным GFP выявлено, что препарат действует локально, преимущественно в интерстициальном пространстве семенников. Учитывая комплексный состав биологического лекарственного средства на основе секретом МСК и плеiotропность его эффектов, были разработаны подходы к стандартизации состава препарата путем установления ключевых компонентов секретом, содержание которых коррелирует со специфической активностью препарата в моделях нарушения функционирования сперматогенной ниши *in vitro* и *in vivo* [8]. Было теоретически и экспериментально обосновано использование фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) как ключевого фармакодинамического маркера препарата «Медирег»® для восстановления сперматогенеза при тяжелых повреждениях ниши ССК.

По данным доклинических исследований токсичности препарата (изучение токсических свойств и местной переносимости при однократном и многократном применении у крыс, изучение иммунотоксических свойств у мышей, изучение репродуктивной (генеративной) токсичности, изучения субхронической токсичности, расширенной фармакологической безопасности и туморогенности на кроликах, в том числе для оценки биосовместимости и отсутствия нежелательных эффектов вспомогательных веществ) была продемонстрирована его хорошая переносимость, что дает основания отнести препарат «Медирег»® к группе малотоксичных средств [19–21].

Таким образом, доклинические исследования биологического лекарственного препарата «Медирег»® были выполнены в соответствии с международными и локальными нормативно-регуляторными требованиями и включали в себя исследования первичной фармакодинамики, фармакокинетики, специфической фармакологической активности, фармакологической безопасности (в составе токсикологических исследований), субхронической токсичности, специальные исследования (местно-раздражающего действия, иммунотоксичности), исследования репродуктивной и онтогенетической токсичности, туморогенности. В 2024 году инициированы также длительные исследования канцерогенной активности препарата на крысах (2,5 года).

Полученные результаты доклинического изучения эффективности и безопасности препа-

рата «МедиРег»® вошли в состав регистрационного досье с целью получения разрешения на проведение клинических исследований. Производство препарата осуществляется по запатентованной технологии на лицензированном Научно-производственном участке Центра регенеративной медицины МНОИ МГУ имени М.В. Ломоносова. На основании полученных данных Минздрав РФ выдал разрешение на клиническое исследование I/II фаз, которое проводится на базе Университетской клиники МНОИ МГУ имени М.В. Ломоносова и направлено на изучение эффективности и безопасности оригинального биологического лекарственного препарата МедиРег® (Секретом мезенхимных стромальных клеток человека), лиофилизат для приготовления раствора для инъекций, 1,0 мл/доза, для лечения мужского бесплодия. В 2024 году МГУ имени М.В. Ломоносова получил разрешение Минздрава на проведение регуляторного клинического исследования препарата «МедиРег»® по лечению мужского бесплодия и инициировал его в Университетской клинике МГУ.

Важно отметить, что в настоящее время зарегистрированных препаратов на основе секрета МСК нет, но есть опыт введения человеку в рамках клинических исследований препарата IMMUNA (Immunis, Inc., Калифорния, США), разработанного на основе секрета стволовых клеток для лечения мышечной атрофии, ассоциированной со старением. На данном этапе препарат проходит открытые клинические исследования I/IIa фаз, одобренные FDA. В исследовании задействованы три когорты пациентов (18 участников), которым проводят внутримы-

шечные инъекции два раза в неделю на протяжении четырех недель. Также на стадии клинических исследований с ускоренным режимом рассмотрения, одобренных FDA, находится препарат KPI-012, который представляет собой секретом МСК человека для лечения персистирующего эпителиального дефекта роговицы. В марте 2023 года было опубликовано, что у пациентов первой группы (2 человека), которых лечили препаратом в высокой дозе 3 ед./мл 4 раза в день, не было выявлено серьезных нежелательных явлений. В настоящее время проходит многоцентровое рандомизированное исследование II фазы клинического исследования по оценке безопасности и переносимости на второй когорте пациентов.

Таким образом, разработка биологических препаратов на основе секрета клеток, участвующих в регуляции процессов обновления и регенерации тканей, вместо трансплантации самих клеток является перспективным направлением регенеративной медицины. Для успешной трансляции подобных продуктов в клиническую практику профессиональное сообщество и регуляторные органы должны обеспечить дальнейшее изучение механизмов действия, состава, вариативности отдельных компонентов секрета и их композиций, разработку технических и нормативно-правовых документов, регламентирующих исследования эффективности и безопасности, а также обращение таких препаратов. В этом смысле крайне полезным может быть критический анализ опыта разработки и внедрения оригинальных препаратов, таких как «МедиРег»®, уже дошедших до стадии клинических исследований.

Литература

1. Scadden DT. Nice Neighborhood: Emerging Concepts of the Stem Cell Niche. *Cell*. 2014;157:41–50.
2. Hicks MR, Pyle AD. The emergence of the stem cell niche. *Trends Cell Biol*. 2023;33(2): 112–123.
3. Sagaradze GD, Basalova NA, Efimenko AY, Tkachuk VA. Mesenchymal Stromal Cells as Critical Contributors to Tissue Regeneration. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:576176.
4. Bormann D, Gugerell A, Ankersmit HJ, Mildner M. Therapeutic Application of Cell Secretomes in Cutaneous Wound Healing. *J Invest Dermatol*. 2023;143(6):893–912.
5. Praveen K, Kandoi S, Misra R, et al. The mesenchymal stem cell secretome: A new paradigm towards cell-free therapeutic mode in regenerative medicine. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2019;46:1–9.

6. Sagaradze G., Grigorieva O., Nimiritsky P., Basalova N., Kalinina N., Akopyan Z., Efimenko A. Conditioned medium from human mesenchymal stromal cells: towards the clinical translation. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(7):1–16.
7. Basalova N, Arbatskiy M, Popov V, et al. Mesenchymal stromal cells facilitate resolution of pulmonary fibrosis by miR-29c and miR-129 intercellular transfer. *Experimental and Molecular Medicine*. 2023;55:1399–1412.
8. Monakova A., Sagaradze G., Basalova N., Balabanyan V., Efimenko A. Novel Potency Assay for MSC Secretome-Based Treatment of Idiopathic Male Infertility Employed Leydig Cells and Revealed Vascular Endothelial Growth Factor as a Promising Potency Marker. *International Journal of Molecular Science*. 2022;23(16):9414.
9. Agarwal A., et al. Male infertility. *The Lancet*. 2021;397(10271):319–333.
10. Punab M., et al. Causes of male infertility: a 9-year prospective monocentre study on 1737 patients with reduced total sperm counts. *Human Reproduction*. 2017;32(1):18–31.
11. Chen G., et al. Medical management of male infertility: now and future. *Current Opinion in Urology*. 2023;33(1):10–15.
12. Diao L., et al. Roles of spermatogonial stem cells in spermatogenesis and fertility restoration. *Frontiers in Endocrinology*. 2022;13:895528.
13. Sagaradze GD, Monakova AO, Basalova NA, et al. Regenerative medicine for male infertility: a focus on stem cell niche injury models. *Biomedical Journal*. 2022;45(4):607–614.
14. Mohammed SS, Mansour MF, Salem NA. Therapeutic Effect of Stem Cells on Male Infertility in a Rat Model: Histological, Molecular, Biochemical, and Functional Study. *Stem Cells International*. 2021:8450721.
15. Tamadon A, et al. Induction of Spermatogenesis by Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells in Busulfan-induced Azoospermia in Hamsters. *International Journal of Stem Cells*. 2015;2(8):134–145.
16. Hajihoseini M, Vahdati A, Hosseini SE, et al. Induction of spermatogenesis after stem cell therapy of azoospermic guinea pigs. *Veterinarski arhiv*. 2017;87(3):333–350.
17. Sagaradze G, Basalova N, Kirpatovsky V, et al. A magic kick for regeneration: role of mesenchymal stromal cell secretome in spermatogonial stem cell niche recovery. *Stem cell research & therapy*. 2019;10(1):1–10.
18. Sagaradze GD, Basalova NA, Kirpatovsky VI, et al. Application of rat cryptorchidism model for the evaluation of mesenchymal stromal cell secretome regenerative potential. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2019;109:1428–1436.
19. Монакова А.О., Сагарадзе Г.Д., Балабаньян В.Ю., Басалова Н.А., Матичина А.А., Матичин А.А. и др. Изучение безопасности оригинального препарата на основе секретомы мезенхимных стромальных клеток при локальном введении в яички и при внутримышечном введении препарата крысам. Безопасность и риск фармакотерапии. 2024;12(1):99–116.
20. Монакова А.О., Балабаньян В.Ю., Вавилова В.А., Басалова Н.А., Попов В.С., Акопян Ж.А., Ефименко А.Ю. Изучение местной переносимости и фармакологической безопасности оригинального биологического лекарственного препарата МедиРег на основе секретомы мезенхимных стромальных клеток при локальном введении в семенники кроликам. Безопасность и риск фармакотерапии. 2025;13(2):213–228.
21. Монакова А.О. и др. Роль макрофагов в реализации эффектов секретомы мезенхимных стромальных клеток в нише сперматогонияльной стволовой клетки. Современные технологии в медицине. 2025;17(2):37–47.

Об авторе

Ефименко Анастасия Юрьевна — д.м.н., зав. лабораторией репарации и регенерации тканей, Центр регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного института МГУ имени М.В. Ломоносова; доцент кафедры биохимии и регенеративной биомедицины Факультета фундаментальной медицины Медицинского научно-образовательного института МГУ имени М.В. Ломоносова.

Author

Anastasia Yu. Efimenko — MD, Dr. Sci. (Medicine), Head of the Laboratory of Tissue Repair and Regeneration, Centre for Regenerative Medicine, Medical Research and Education Institute, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow; Assistant Professor of the Department of Biochemistry and Regenerative Biomedicine, Faculty of Medicine, Medical Research and Education Institute, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

Вклад автора

А.Ю. Ефименко — концепция, подготовка и редактирование статьи.

Author contribution statement

Anastasia Yu. Efimenko — the concept, preparation and editing of the article.

Стволовые клетки для терапии нейродегенерации

Р.А. Полтавцева^{1,2,*}, Е.В. Свирщевская^{1,2,3}, В.М. Чиков¹, Н.В. Бобкова⁴, Г.Т. Сухих¹

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Россия, 117997, Москва, ул. Академика Опарина, 4

² Сколковский институт науки и технологий, Россия, 121205, Москва, Большой бульвар, 30, стр. 1

³ ФГБУН «Государственный научный центр Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Россия, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

⁴ ГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», Россия, 142290, Московская область, г. Пущино, ул. Институтская, 3

* Адрес для корреспонденции: rimpol@mail.ru, r_poltavtseva@oparina4.ru

Аннотация

Регенеративная медицина является бурно развивающейся областью биомедицины, направленной на восстановление поврежденных тканей и органов. Перспективные направления исследований включают создание искусственных органов, разработку биоматериалов, персонализированную медицину при сердечно-сосудистых, нейродегенеративных, онкологических заболеваниях, сахарном диабете и многих других патологиях. Однако существенным препятствием на пути широкого внедрения регенеративной медицины в клиническую практику являются проблемы, связанные с иммунологическими реакциями, этическими вопросами и масштабированием технологий.

Использование стволовых клеток (СК), выделяемых ими органелл, в том числе малых внеклеточных везикул (мВВ), биологически активных соединений является альтернативным методом для лечения заболеваний, в терапии которых существующие традиционные методы лечения малоэффективны. Клеточная терапия на основе мезенхимальных, эмбриональных, нейральных и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток рассматривается как перспективный подход в лечении нейродегенеративных заболеваний, распространенность которых растет в связи с увеличением продолжительности жизни населения. Интерес к трансплантации мВВ объясняется не только их малыми размерами по сравнению с клетками, что облегчает их распространение в организме реципиента, но и сходством эффектов с действием материнских клеток. В данном обзоре приведены экспериментальные данные по анализу использования СК и их продуктов для терапии и профилактики нейродегенеративных заболеваний.

Ключевые слова: мезенхимальные, эмбриональные стволовые клетки, экзосомы, сфероиды, органоиды мозга, старение, нейродегенеративные заболевания

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 23-13-00035.

Для цитирования: Полтавцева Р.А., Свирщевская Е.В., Чиков В.М., Бобкова Н.В., Сухих Г.Т. Стволовые клетки для терапии нейродегенерации. *Регенерация органов и тканей*. 2024;2(3):14–32. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-2-14-32>

Поступила 18.06.2024

Обработана 22.08.2024

Принята к публикации 08.09.2024

Stem cells for therapy of neurodegeneration

Rimma A. Poltavtseva^{1,2,*}, Elena V. Svirshchevskaya^{1,2,3}, Vladimir M. Tchikov¹,
Natalia V. Bobkova⁴, Gennady T. Sukhikh¹

¹ National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology Named after Academician V. I. Kulakov, Russia, 117997, Moscow, Oparina str., 4

² Skolkovo Institute of Science and Technology, Russia, 121205, Moscow, Bolshoy Blvd, 30 p. 1

³ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of RAS, Russia, 117997, Moscow, Miklukho-Maklaya str., 16/10

⁴ Institute of Cell Biophysics of RAS, Russia, 142290, Moscow region, Pushchino, Institutskaya str., 3

* Correspondence address: rimpol@mail.ru, r_poltavtseva@oparina4.ru

Annotation

Regenerative medicine is an advanced field of biomedicine aimed at repairing damaged tissues and organs. Promising areas of research include the creation of artificial organs, the development of biomaterials and personalized medicine in the treatment of cardiovascular, neurodegenerative, oncological diseases, diabetes mellitus, and many others. Researchers face challenges related to immunological reactions, ethical issues, and technology scaling. Stem cells (SC) and their products, including small extracellular vesicles (sEV), are promising tools for the therapy of diseases that are currently difficult to treat with the existing approaches. Cell therapy based on mesenchymal, embryonic, neural, and induced pluripotent SC is a promising method for the treatment of neurodegenerative diseases, the prevalence of which is increasing due to an increase in life expectancy of the population. The interest in sEV is explained by the fact that the effect of sEV transplantation is comparable to that of maternal cells, and their small size gives them obvious advantages in distribution throughout the recipient's body. This review provides experimental and clinical data on the use of SC and their products for the treatment of neurodegenerative diseases and their prevention.

Keywords: mesenchymal, embryonic stem cells, neurodegeneration, extracellular vesicles, exosomes, spheroids, brain organoids, neurodegenerative diseases

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Funding: the work was supported by the Russian Science Foundation grant No. 23-13-00035.

For citation: Poltavtseva R.A., Svirshchevskaya E.V., Tchikov V.M., Bobkova N.V., Sukhikh G.T. Stem cells for therapy of neurodegeneration. *Tissue and organ regeneration*. 2024;2(3):14–32. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-2-14-32>

Received 18.06.2024

Revised 22.08.2024

Accepted 08.09.2024

Список сокращений:

БА — болезнь Альцгеймера

ИПСК — индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

КМ-МСК — мезенхимальные стволовые клетки, полученные из костного мозга

МСК — мезенхимальные стволовые клетки

НСК — нейральные стволовые клетки

ЦНС — центральная нервная система

ЭСК — эмбриональные стволовые клетки

Введение

Интерес к регенеративной медицине, в том числе к клеточной терапии, в лечении нейродегенеративных заболеваний растет, что обусловлено как недостаточно эффективным лечением этих заболеваний, так и увеличением их распространенности, связанной с увеличением продолжительности жизни населения [1]. К основным нейродегенеративным заболеваниям относят болезнь Альцгеймера (БА), болезнь Паркинсона и боковой амиотрофический склероз [1, 2]. При БА наблюдается значительное ухудшение памяти на фоне гибели нейронов, белок-предшественник бета-амилоида расщепляется специфическими ферментами с образованием изоформ, которые агрегируют с образованием нейротоксичных олигомеров, повреждающих мембраны нейральных клеток, что приводит к когнитивным нарушениям. В процессе старения организма клетки микроглии, астроциты и олигодендроциты формируют в мозге очаги воспаления, что способствует развитию БА [3].

Основными структурами мозга, страдающими при БА, являются гиппокамп и неокортекс. В отличие от большинства областей мозга взрослых млекопитающих, зубчатая извилина гиппокампа содержит нейральные стволовые клетки (НСК), которые обладают способностью генерировать новые нейроны — процесс, называемый нейрогенезом. С возрастом интенсивность нейрогенеза падает [2, 4], что коррелирует со снижением экспрессии даблкортина (DCX) — белка, экспрессируемого клетками — предшественниками нейронов и незрелыми нейронами в корковых структурах эмбрионов и взрослом организме [5]. Исследования на животных моделях БА и других нейродегенеративных заболеваний, а также при старении показывают, что целенаправленное воздействие на нейрогенез может улучшить когнитивную функцию.

Болезнь Паркинсона также является хроническим нейродегенеративным заболеванием, являющимся результатом дисфункции экстрапирамидной моторной системы и сниженной выработки дофамина в черной субстанции, что приводит к прогрессирующей гибели нейронов [6]. Боковой амиотрофический склероз — еще одно нейродегенеративное заболевание, при котором происходит поражение двигательных нейронов, что приводит к параличу и последующей атрофии мышц [7]. Терапия нейродегенеративных заболеваний

традиционными методами лечения недостаточно эффективна [8]. Имеющиеся препараты позволяют лишь замедлить прогрессирование болезни. В последние десятилетия проводятся многочисленные исследования с применением стволовых клеток и их продуктов с целью оценить возможность их использования для лечения нейродегенеративных заболеваний.

Значительная гибель нейронов при нейродегенеративных заболеваниях часто является необратимым процессом, например при боковом амиотрофическом склерозе, приводящем к гибели больного. Более перспективным направлением, с нашей точки зрения, является превентивная защита нейронов от гибели. Как правило, БА обнаруживается у людей старше 65 лет [9], но существует и ранняя семейная форма болезни Альцгеймера, связанная с генетическими мутациями в генах *PS1*, *PS2* и *APP* [10].

Болезнь Паркинсона также чаще всего диагностируется у пациентов старше 65 лет, а боковой амиотрофический склероз — в возрасте 58–60 лет [11]. Последние данные показывают, что к 2050 году распространенность нейродегенеративных заболеваний удвоится в Европе и утроится во всем мире [9–11].

Приведенные данные показывают, что процесс нейродегенерации после 60 лет уже может приобрести необратимую форму. Превентивное лечение желательно начинать за 10–20 лет до этого возраста, что может предупредить развитие клинической формы. Однако, в настоящее время отсутствуют препараты и методы такой превентивной терапии. СК и их продукты потенциально могли бы стать основой для разработки такой терапии.

Наибольший интерес исследователей и врачей привлекают мезенхимальные стволовые клетки (МСК).

Мезенхимальные стволовые клетки

МСК впервые были охарактеризованы в конце 1960-х годов как фибробластоподобные клетки, полученные из костного мозга и обладающие мультипотенциалом дифференцировки и самообновления. Иерархически МСК представляют собой постнатальные негемопоэтические стволовые клетки, которые могут быть выделены не только из костного мозга, но также из других тканей, например жировой ткани, ткани пла-

центы, периферической крови, из вартонова студня пупочного канатика, а также из пульпы зуба человека [12] и других тканей.

МСК происходят из мезодермы, однако исследования показали, что МСК могут быть дифференцированы в клетки глии и нейроны, по этой причине исследователи полагают, что МСК могут служить источником нервных клеток для потенциальной клеточной заместительной и/или стимулирующей терапии при нейродегенеративных заболеваниях [13, 14].

Многочисленные исследования показали, что МСК обладают низкой иммуногенностью за счет сниженной экспрессии молекул МНС I класса на их мембранах [15]. Однако на некоторых МСК уровень экспрессии может быть и достаточно высоким. С другой стороны, уровень экспрессии МНС I класса важен в том случае, если МСК выживают в организме хозяина в течение длительного времени. Многочисленные исследования на животных показали накопление МСК в легких при внутривенном введении [16–19], где клетки задерживаются в капиллярах и вскоре погибают (рис. 1). Leibacher и соавт. продемонстрировали быстрое разрушение и апоптоз МСК, полученных из костного мозга (КМ-МСК), после внутривенного введения мышам [18]. Furlani и соавт. выявили 25–40%-ную смертность у мышей, которым вводили различные дозы МСК [19]. В то же время многочисленные работы демонстрируют безопасность внутривенных инъекций МСК людям, что связано с меньшей плотностью МСК при пересчете на площадь капилляров [20–22]. При этом большая часть введенных МСК разрушается в капиллярах, что объясняет, почему в тканях регистрируется лишь небольшое количество МСК [23].

Нами было проведено специальное исследование по распределению МСК, нагруженных технецием-99m или флуоресцентным красителем, после внутривенного введения крысам. Через сутки основная доля (70%) метки находилась в легких, 17% регистрировалось в печени, 11% — в селезенке и 3% — в мочевом пузыре. Через 48 ч 67% МСК оставались в легких и 33% — в печени. При локальном введении МСК 94% метки регистрировалось в месте введения как через 24 часа, так и через 48 часов (рис. 1).

В ранних клинических исследованиях была обнаружена низкая терапевтическая эффек-

тивность МСК при внутривенном введении, и дальнейшие исследования были проведены методами локальных, например интрамиокардиальных, инъекций МСК [24] или путем целенаправленной доставки, например в артерию поджелудочной железы [25]. Было обнаружено, что использование этих методов приводит к массовой гибели МСК после инъекции, клеточная смерть МСК была вызвана некрозом при механической травме или гипоксическим микроокружением, а также индукцией апоптоза МСК при контакте, например, с клетками-киллерами и их последующим поглощением макрофагами.

Тем не менее в настоящее время в клинике используют внутривенный и/или локальный способы введения МСК. Наиболее востребованными являются КМ-МСК [26]. Так, компания Mesoblast производит аллогенные и аутологичные КМ-МСК (препарат Рионсил, Rextrocel-L), и Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) США одобрило в 2024 г. заявку компании Mesoblast на применение препарата у детей с острой реакцией «трансплантат против хозяина», резистентных к стероидам (<https://tinyurl.com/2wj9kcrz>). Компания Vericel получила сертификат FDA на применение препарата КМ-МСК Ixmyelocel-T для лечения прогрессирующей сердечной недостаточности (VCEL press release, May 10, 2017; <https://vcel.com>). В настоящее время проходят клинические исследования применения как аллогенных, так и аутологичных МСК для терапии остеоартроза коленного сустава, цирроза печени, ишемического инсульта и других заболеваний [27–30]. МСК получают из вартонова студня пупочного канатика, ткани плаценты, жировой ткани, костного мозга и могут вводить как локально, так и внутривенно.

Два клинических исследования оценивали эффект МСК терапии бокового амиотрофического склероза. В европейском исследовании NCT02166021 оценивали способ введения, безопасность и клиническую эффективность трансплантации МСК у пациентов с активным и прогрессирующим рассеянным склерозом. Пациенты получали интратекальные или внутривенные (10^6 /кг) инъекции МСК. Продолжительность исследования составила 14 месяцев. Серьезных проблем, связанных с безопасностью лечения, выявлено не было. Терапия вызвала кратковременный положительный эффект,

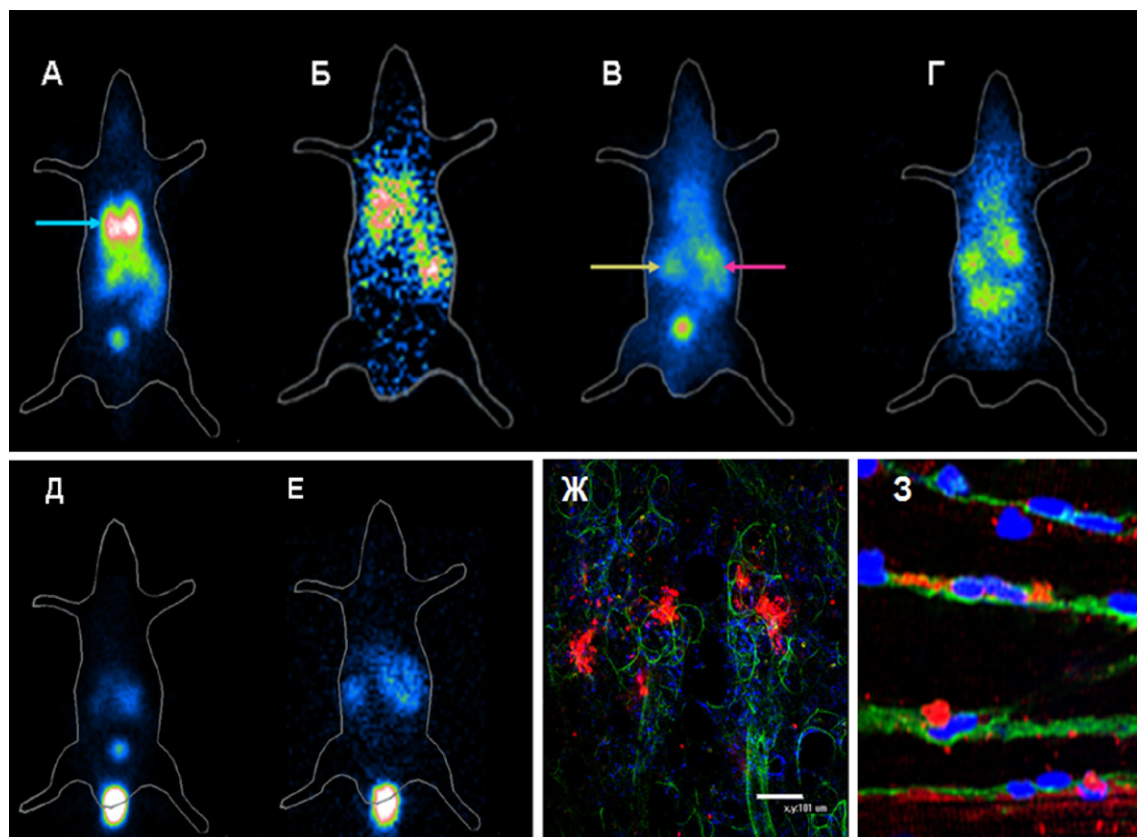


Рис. 1. Распределение МСК у крыс при внутривенном и подкожном введении. Крысам Wistar вводили МСК, нагруженные технецием-99m (А, Б) или раствор изотопа без клеток (В, Г) внутривенно в хвостовую вену или локально подкожно в основание хвоста (Д, Е). Компьютерная томография проведена на 24 ч (А, В, Д) и 48 ч (Б, Г, Е). Голубой стрелкой отмечены легкие, красной — печень, желтой — почки. В другом эксперименте крысам вводили внутривенно МСК, меченные PKH26 (красный), через 2 ч также внутривенно вводили крысиные IgG-FITC (зеленый), ещё через час крыс усыпляли, далее проводили конфокальную микроскопию криосрезов легких крыс (Ж, З). Ядра клеток дополнительно окрашивали красителем Хехст (синий). Показаны разрушенные МСК в легких (Ж) и фрагменты МСК при прохождении капилляров (З) (Фрагменты Ж, З приведены с согласия авторов статьи [16].)

Fig. 1. Distribution of MSCs in rats after intravenous and subcutaneous administration. MSCs labeled with the isotope technetium-99m (А, Б) or free-of-cells isotope solution (В, Г) were administrated in Wistar rats intravenously through tail vein or locally subcutaneously at the tail base (Д, Е). On 24 and 48 hours (А, В, Д) and (Б, Г, Е) respectively the rats were subjected to the computer tomography. The lungs, liver and kidney are indicated with the blue, red and yellow arrows, respectively. In another experiment, rats were injected intravenously with MSCs labeled with PKH26 (red), after 2 hours they were also injected intravenously with rat IgG-FITC (green), after another one hour the rats were euthanized, the cryosections of lung were performed and subjected to the confocal microscopy (Ж, З). The cell nuclei were additionally stained with Hoechst dye (blue). Destroyed MSCs in the lungs (Ж) and MSC fragments passing through capillaries (З) are shown. (Images G and H are used with the permission of the authors [16].)

особенно у пациентов с активным течением заболевания. Интратекальное введение оказалось более эффективным, чем внутривенное [31]. В близком по структуре американском исследовании NCT03280056 больным с боковым амиотрофическим склерозом вводили аутологичные КМ-МСК. Пациенты получили по три инъекции МСК, значительного снижения показателей нейровоспаления и нейродегенерации не наблюдали [32], что могло быть связано с необратимыми процессами в мозге.

В американском клиническом исследовании аутологичные КМ-МСК (Lomicil-B) вводили внутривенно пациентам с легкой формой БА [33]. Биомаркеры и томография мозга больных показали значительное улучшение в группе Lomicil-B по сравнению с группой плацебо. Исследование терапии легкой/средней степени тяжести БА с использованием МСК из вартонова студня было проведено в Корее (NCT03172117) [34]. Больным с БА до введения клеток формировали резервуар Оммаи (внутрижелудочковая кате-

терная система, которая используется для доставки лекарств/клеток в спинномозговую жидкость) в правом боковом желудочке. После трех инъекций с интервалом в 4 недели аллогенных клеток МСК у части больных наблюдали лихорадку, головную боль, тошноту, рвоту. В работе не сообщается об эффективности терапии.

Клиническое исследование эффективности МСК, введенных в желудочек мозга с использованием резервуара Оммайя, было проведено в Америке больным БА, болезнью Паркинсона, боковым амиотрофическим склерозом, прогрессирующим рассеянным склерозом, травматическим поражением спинного мозга и инсультом [35]. Аутологичные МСК получали из жировой ткани у пациента после липосакции. Инъекции повторяли каждые 2–3 месяца. Из 10 пациентов с БА у 8 показатели когнитивных тестов были стабильными или улучшились, однако у пациентов проявились и неблагоприятные побочные эффекты, аналогичные описанным выше. Особенно многообещающими были позитивные результаты в группах пациентов с рассеянным склерозом. Результатам клинического применения МСК при нейродегенеративных заболеваниях посвящены обзоры [36, 37].

Интересное исследование было выполнено вьетнамской группой, в котором проводилась ауто-трансплантация МСК, полученных из жировой ткани (внутривенно, 2 инъекции) 12 пациентам с сахарным диабетом, дислипидемией или ожирением, имеющим повышенный уровень провоспалительных цитокинов в крови [38]. Авторы показали, что подобная терапия снижала повышенный уровень провоспалительных цитокинов IL-1 α , IL-1 β , IL-8, IL-6 и TNF- α . В дальнейшем повышение уровней провоспалительных цитокинов в крови можно будет использовать как показатель для применения превентивной терапии с МСК.

При низкой выживаемости МСК, введенных внутривенно и локально, многочисленные исследования свидетельствуют о положительном терапевтическом эффекте при лечении нейродегенеративных заболеваний. В наших исследованиях, проведенных на мышах с болезнью Альцгеймера, мы также подтвердили положительное воздействие МСК, показали восстановление пространственной памяти у животных в модели БА [39]. Проведенные нами эксперименты на крысах с моделью черепно-мозговой

травмы также свидетельствовали, что внутривенная трансплантация МСК способствовала выживанию животных и снижению неврологического дефицита [40].

На основании анализа большого количества публикаций можно сделать вывод, что разрушение МСК после введения не препятствует проявлению терапевтического эффекта [41]. Возможно, продукты гибели МСК оказывают системное влияние на организм реципиента. Так, при формировании микротромбов в капиллярах и тканях активируется фибринолитическая система, а в процессе апоптоза МСК образуются апоптотические тельца и выделяются трофические факторы, способные оказывать иммуномодулирующее действие на организм [42]. Апоптоз стал рассматриваться как необходимый фактор для проявления иммуномодулирующего эффекта и терапевтического действия трансплантируемых стволовых клеток [43]. В частности, предполагается, что после попадания МСК в периферическую систему кровообращения и индукции апоптоза они быстро и неспецифически распознаются и интернализируются макрофагами (которые в этом случае называют эффероцитами), что способствует приобретению ими противовоспалительного фенотипа M2 и увеличению секреции противовоспалительных факторов для подавления воспалительной реакции и ускорения восстановления тканей, таким образом, играя иницирующую роль в проявлении иммуномодулирующих эффектов МСК [44, 45]. В связи с этим была предложена «бесклеточная терапия» путем введения пациенту мВВ, полученных от МСК, для индукции *in vivo* M2 поляризации макрофагов с целью их участия в восстановлении тканей и выработки противовоспалительных цитокинов [46].

Таким образом, представление о судьбе трансплантированных МСК и механизме их терапевтического действия прошло долгий путь: от МСК с их плохой выживаемостью после введения в организм до современного понимания того, что критическим аспектом механизма их действия являются продукты, выделяемые при разрушении МСК [47], возможно, включая и мВВ. В целом общей тенденцией в применении МСК является внутривенное введение аутологичных клеток, получаемых из костного мозга или жировой ткани пациента. Однако при этом необходимо иметь в виду, что введение МСК в ряде

случаев связано с риском возникновения тромбозов, а также проблем с преодолением гематоэнцефалического барьера.

Малые внеклеточные везикулы (экзосомы)

В качестве альтернативы МСК предложено использовать внеклеточные везикулы. Все клетки обмениваются информацией, необходимой для поддержания гомеостаза многоклеточных организмов. Так, во время инфекции иммунная система активируется в ответ на гуморальные факторы (цитокины, хемокины, гормоны), продуцируемые активированными эпителиальными и гемопоэтическими клетками. Гидрофобные молекулы, а также генетический материал (ДНК, РНК, мРНК) упаковываются в мембранные везикулы. Секретируемые везикулы, заключенные в мембрану, называемые внеклеточными везикулами, включают экзосомы, эктосомы, микровезикулы, микрочастицы, апоптотические тельца и другие [48]. Наибольший интерес вызывают экзосомы (малые внеклеточные везикулы, мВВ) размером 30–150 нм в диаметре, которые, как полагают, отвечают за «пакетный» сигналинг между клетками (рис. 2) [49]. По сравнению с МСК мВВ обладают рядом преимуществ: низкой иммуногенностью и отсутствием этических проблем, возможно-

стью длительного хранения в замороженном состоянии [50]. Перспективным методом введения мВВ является интраназальный путь. Мы показали эффективность такого способа введения мВВ в экспериментах на мышинной модели БА [51], а также возможность прохождения мВВ через гематоэнцефалический барьер у intactных мышей (рис. 2).

Несмотря на потенциальные преимущества «экзосомной терапии», прогресс в терапевтическом применении мВВ в качестве лечебного средства сдерживается из-за сложных для клинической лаборатории методов их выделения и стандартизации [48]. Ультрацентрифугирование и хроматография высокого давления требуют дорогостоящего оборудования и трудоемких операций. В последние годы появились новые методы выделения мВВ: иммуноаффинные, иммуномагнитные методы, полимерное осаждение, асимметричная фильтрация, микрофлюидные чипы, нанолитография и другие [49, 50, 52]. Отсутствие стандартных методов выделения мВВ является основным препятствием проведения клинических исследований. Аналогичная ситуация была и с терапией МСК, которая также требовала стандартизации МСК. В настоящее время есть как сертифицированные

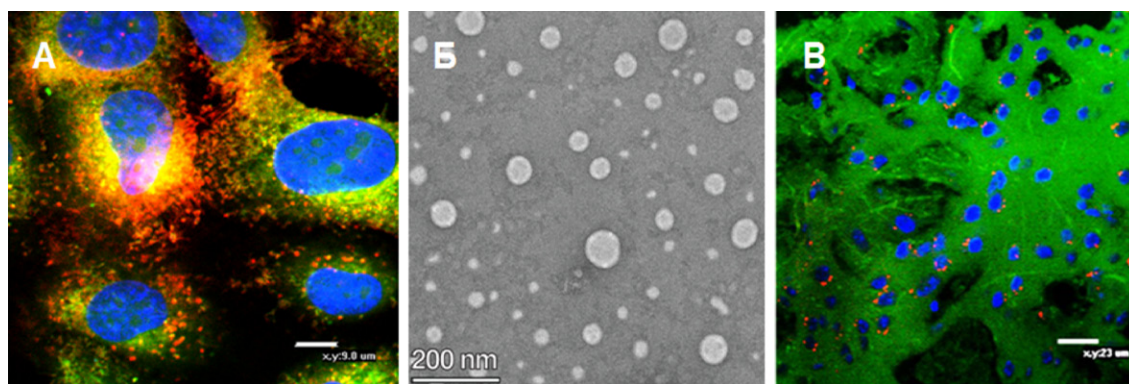


Рис. 2. Общий вид мВВ в клетках, тканях и под электронным микроскопом (ТЭМ). Внеклеточные везикулы продуцируются всеми клетками, имеют размер 30–150 нм в диаметре и могут проходить через гематоэнцефалический барьер. А — конфокальная микроскопия МСК, полученных из вартонова студня, окрашенных митохондриальным трекером (зеленый) и липофильным трекером (красный), ядра окрашены Хехст (синий). Б — размер мВВ в электронной микроскопии, шкала 200 нм. В — конфокальная микроскопия криосреза мозга мыши через 24 ч после интраназального введения 1010 мВВ, окрашенных липофильным трекером (красный), ткань окрашена митохондриальным трекером (зеленый), ядра — Хехст (синий). Шкала 23 мкм. (Фрагмент Б приведен с согласия авторов статьи [49].)

Fig. 2. Small extracellular vesicles (sEVs) in cells, tissue and under transmission electron microscope (TEM). sEVs (e.g., exosomes) generated by cells are 30–150 nm in diameter and can pass through the blood–brain barrier. A — confocal microscopy of Wharton jelly-derived MSCs stained with mitochondrial tracker (green) and lipophilic tracker (red), nuclei stained with Hoechst (blue). Б — TEM-photo of sEVs, scale bar 200 nm. В — confocal microscopy of a cryosection of mouse brain 24 h after intranasal administration of 1010 sEVs stained with a lipophilic tracker (red), tissue stained with a mitochondrial tracker (green), nuclei — Hoechst (blue). Scale bar 23 μm; (Fragments Б with the permission authors of [49].)

лаборатории, получающие МСК, так и стандартизованные протоколы, используемые в ряде клинических исследований.

Терапия нейродегенеративных заболеваний с помощью мВВ, несомненно, требует многократных введений. Способ введения влияет на биораспределение, терапевтическую эффективность и краткосрочные/долгосрочные биологические эффекты. В настоящее время основные способы введения мВВ для лечения нейродегенеративных заболеваний: внутривенное, интраназальное, пероральное, реже стереотаксическая инъекция [53, 54]. При внутривенной инъекции мВВ мышам APP/PS1 значительно улучшалась способность к обучению и запоминанию, снижалось отложение амилоидов, а также нормализовывался уровень воспалительных цитокинов в крови [55]. Эффект мВВ при интраназальном введении был показан нами в модели БА у бульбэктомированных мышей с выраженным нарушением пространственной памяти [51]. Аналогичные данные были получены Peng и соавт. в модели болезни Паркинсона [56]. Несмотря на то что пероральное введение хорошо воспринимается пациентами, оно редко используется в научных исследованиях [57].

В пилотном исследовании на семи пациентах с пневмонией, вызванной COVID-19, показано, что введение мВВ не вызывало аллергических реакций и других побочных явлений и способствовало уменьшению интенсивности поражений легких и сокращению продолжительности госпитализации при легких формах пневмонии [58]. В настоящее время интенсивно проводятся исследования по стандартизации мВВ, их таргетной доставке в структуры мозга и анализу механизмов их эффектов, что необходимо для разработки новых методов терапии нейродегенеративных заболеваний [59–62].

Механизмы нейропротективного действия МСК и мВВ

Первоначально полагали, что эффективность МСК связана со способностью к направленной миграции в патологический очаг и замещении погибших и видоизмененных клеток. В последнее время лечебный эффект МСК связывают с их паракринной и системной активностью, что проявляется в выделении целого ряда биологически активных соединений, таких как нейротрофический фактор глиального происхождения — GDNF, фактор роста нервов —

NGF и нейротрофический фактор мозга — BDNF, что способствует локальному подавлению патологического процесса [63–65]. Трансплантация МСК животным с моделями БА оказывала положительное неврологическое воздействие [66, 67] в результате индукции пролиферации эндогенных нейральных клеток-предшественников и усиления их дифференцировки в нейроны [67], а также благодаря стимуляции роста нейритов и интенсификации синаптогенеза на фоне снижения апоптоза и подавления уровня свободных радикалов, что приводит к уменьшению воспаления [68–70]. Недавние исследования показали наличие у МСК системных эффектов, в частности, проявляющихся в поддержании гомеостаза мозга [71, 72]. Помимо отмеченного выше общего иммуномодулирующего эффекта, вызванного поляризацией макрофагов, в отношении МСК, выделенных из вартонова студня пупочного канатика человека, известно, что они могут регулировать секрецию GDF-15, играющего ключевую роль в иммуносупрессии, нейропротекции и регуляции роста клеток, а также усиливать способность микроглиальных клеток к клиренсу бета-амиоида [73]. Эти МСК оказались относительно безопасными и эффективными нейропротекторами и иммуномодуляторами [74–77]. Помимо свободных биологически активных веществ, МСК выделяют в среду везикулы и экзосомы, содержащие различные цитокины, ангиогенные факторы и даже митохондрии [72, 78], которые попадают в клетки реципиента через механизм эндоцитоза, щелевые и межклеточные контакты классического типа [79–81] или благодаря образованию наноканалов от МСК к клеткам реципиента [82].

Установлено, что МСК могут восстанавливать когнитивные способности и память [83], что было подтверждено и в наших исследованиях при трансплантации фетальных нейрональных прогениторов и МСК, выделенных из костного мозга или вартонова студня пупочного канатика, на память ольфакторно-бульбэктомированных (ОБЭ) животных — модели спорадической формы БА [39, 84]. Позитивный эффект МСК может быть обусловлен активацией микроглии и очисткой мозговой ткани от патологических амилоидных бляшек, а также снижением амилоидогенного процессинга амилоидного белка — предшественника APP, подавлением апоптоза нейронов и активацией нейрогенеза [85, 86]. В наших исследованиях также была обнаружена способность МСК к дифференцированию в астроциты и нейроны

в зависимости от условий кокультивирования с гиппокампальной культурой мышей 5XFAD, моделирующей нейродегенеративный процесс в мозге при БА [87, 88].

Таким образом, терапия на основе МСК может иметь многообещающие перспективы. Однако во избежание неблагоприятных побочных эффектов трансплантации необходимо детально исследовать характер и последствия взаимного влияния донорских клеток и тканей реципиента. В наших экспериментах по кокультивированию МСК и культуры клеток гиппокампа трансгенных 5XFAD мышей была показана возможность повышать выживаемость МСК под влиянием примиряющего действия стресс-белков γ B-1 и HSP70, обладающих выраженным нейропротективным эффектом [89, 90].

Механизм нейропротективного и нейрорегенеративного эффектов мВВ остается не до конца выясненным. Действие мВВ может зависеть от дозы и длительности терапии, а также от состава, соотношения белков, аминокислот и нуклеотидов, присутствующих в них микроРНК и других биологически активных соединений, которые не обязательно являются полностью идентичными по своему составу родительским МСК. Эффекты экзосом зависят как от типа реципиентных клеток, так и от особенностей клеточных моделей, на которых испытывается действие экзосом, и даже их источников. Как уже указывалось выше, экзосомы оказались эффективны в разнообразных моделях нейродегенеративных заболеваний, включая и БА [91, 92], возможно, благодаря их синергичному действию на метаболизм, нейровоспаление и миграцию нейрональных предшественников, а также ангио-, нейро- и синаптогенез [93].

Детальные исследования молекулярно-клеточных механизмов эффектов мВВ были проведены с использованием клеточных моделей различных патологий. Было установлено, что при кокультивировании с экзосомами повышается выживаемость клеток в культуре гиппокампа трансгенных мышей 5XFAD — модели семейной формы БА. С использованием флуоресцентно меченных экзосом была установлена их способность колокализироваться с астроцитами, микроглией, олигодендроцитами и в меньшей степени с нейронами [94, 95]. В опытах *in vivo* на модели травмы мозга у крыс была показана способность трансплантированных в мозг экзосом вызывать

функциональное восстановление на фоне подавления нейровоспаления и апоптоза, но усиления нейрогенеза. При этом отмечено скопление экзосом в месте травмы [95].

Интересной особенностью экзосом оказалась их способность снижать уровень бета-амилоида и интенсивность фосфорилирования белка-тау — основных нейротоксических соединений, вызывающих гибель нейронов при БА. Одним из механизмов очистки мозга от бета-амилоида является активность фермента неприлизина, вызывающего деградацию токсичного белка [96]. Наряду с другими эндопептидазами неприлизин содержится в экзосомах, но снижен при БА [97, 98]. В других исследованиях была установлена возможность связывания бета-амилоида с мВВ благодаря присутствию на их мембранах сфингомиелина [99], с последующей интернализацией этого комплекса в микроглию и его фагоцитоза [100]. Оказалось, что экзосомы способны оказывать антиоксидантное действие благодаря присутствию в их составе фермента каталазы [93].

В условиях ишемии трансплантация экзосом вызывает увеличение аксональной плотности и иммунопозитивности к синаптофизину в пресинаптических окончаниях в области поражения на фоне стимуляции ангио- и нейрогенеза у крыс [101]. Наконец, оказалось, что позитивное действие экзосом на поведенческие проявления БА может быть обусловлено их прямым влиянием на экспрессию генов, связанных с обучением и памятью, и этот эффект может быть обусловлен их взаимодействием с митохондриями, характеризующимися дисфункцией при БА [102]. В этой связи важно отметить, что 10,3% в белковом содержании в экзосомах приходится на митохондриальные белки [103].

Все приведенные выше данные, несомненно, свидетельствуют о высоком терапевтическом потенциале мВВ, малый размер которых, наряду с низкой иммуногенностью, является неоспоримым преимуществом этих клеточных органелл [104].

Клеточные агрегаты

Развитие методов «хирургической имплантации» клеток в головной мозг является еще одним из подходов к терапии нейродегенеративных заболеваний [105, 106]. Ранее в наших работах при анализе неокортекса плодов человека было

установлено, что нейральные стволовые и прогениторные клетки при культивировании активно пролиферируют, образуя клеточные свободно плавающие сфероиды — нейросферы, клетки которых обладали способностью к спонтанной и направленной дифференцировке в зависимости от условий культивирования [107, 108].

Международным консорциумом в рамках клинического исследования I фазы (NCT03282760, EudraCT2015-004855-37) была получена клеточная линия АСТ hNSC 03/14b, обогащенная НСК. Аллогенные фетальные НСК человека, введенные в желудочки мозга, в сочетании с иммуносупрессией вызвали торможение прогрессирования рассеянного склероза без видимых серьезных осложнений [109]. Другим примером является имплантация островков Лангерганса поджелудочной железы, содержащих бета-клетки, вырабатывающие инсулин. Из-за ограниченного количества донорской ткани делаются попытки ксенотрансплантации от свиньи человеку [110–112]. Китайская группа исследователей получила 3D-кластеры аутологичных химически индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) бета-клеток, которые ввели под переднюю прямую мышцу живота пациенту с диабетом I типа. Наблюдение в течение года показало эффективность такой терапии [113].

Основными источниками клеток для генерации таких органоидов являются эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) и ИПСК. ЭСК мозга человека получают из внутренней клеточной массы бластоцисты на ранней стадии развития эмбриона и поддерживают в культуре *in vitro*. ИПСК генерируют из соматических клеток, в основном из кожи или крови, перепрограммируя их в эмбриональное состояние путем введения специфических факторов транскрипции плюрипотентности. Особенностью таких клеток является их способность самопроизвольно формировать небольшие трехмерные (3D) органоиды, которые можно поддерживать в течение многих лет [114–116]. Органоиды из ИПСК мозга получили различные названия, например нейральные (мозговые или церебральные) органоиды или химероиды — органоиды из нейральных клеток, полученные от нескольких доноров, которые развивались в «розетки» — структуры. Показано, что органоиды мозга человека, созданные в культуре из эмбриональных или ИПСК, могут структурно и функционально взаимодействовать с травмированным мозгом

крысы, а также реагировать на визуальные стимулы [117].

Трансплантация церебральных органоидов восстанавливает инфарктную зону коры и нарушенную функцию после смоделированного инсульта у мышей [118]. Интересным результатом этой работы является то, что трансплантация диссоциированных клеток не восстанавливала поврежденную ткань. По-видимому, органоиды, а не диссоциированные клетки, способны выживать в инфарктной зоне, что может быть связано с высокой самоорганизующейся структурой органоидов и способностью к самообновлению. Более того, церебральные органоиды по-разному дифференцируются в инфарктном ядре и перинфарктных областях. В целом было показано, что трансплантированные церебральные органоиды способны восстанавливать инфарктную кору после инсульта, посылая аксонные проекции на большие расстояния к отдаленным целевым объектам мозга и интегрируясь в нейронные цепи хозяина, тем самым восстанавливая нарушенную сенсомоторную функцию.

Согласно данным, представлены в журнале *Nature* в 2025 году, в настоящее время проводится более 100 клинических исследований с применением стволовых клеток для лечения онкологических заболеваний, диабета и нейродегенеративных расстройств, таких как болезнь Паркинсона. Такой масштабный объем клинических исследований может стать поворотным моментом в определении ближайших перспектив клеточной терапии [119].

Заключение

Применение МСК, обладающих большим потенциалом в регенеративной медицине для лечения широкого спектра заболеваний, является перспективным направлением в терапии. В настоящее время несколько препаратов на основе аллогенных мезенхимальных стволовых клеток одобрены регулирующими органами, включая FDA, для клинического применения для отдельных показаний. Большое количество текущих клинических исследований посвящены изучению возможности применения МСК для терапии ряда заболеваний, в том числе нейродегенеративных. В клинической практике используются как аутологичные МСК, например полученные из жировой ткани или костного мозга, так и аллогенные, полученные от молодых здоровых

доноров. Проблемы, связанные с низкой приживаемостью МСК, риском тромбозов, ограниченной эффективностью, требуют дополнительных исследований, но одновременно стимулируют поиск альтернативных продуктов, таких как внеклеточные везикулы. Исследования возможности применения мВВ находятся на стадии доклинических исследований, что связано с необходимостью стандартизации их получения. К преимуществам мВВ относятся: малый размер, отсутствие иммуногенности, наличие молекул адгезии на поверхности, способность преодолевать ГЭБ. мВВ можно «нагружать» ноотропными препаратами, что позволяет повысить эффективность терапии на их основе.

Хирургическая трансплантация органоидов, полученных из модифицированных МСК, открывает путь к более эффективной терапии, однако её сложность и высокая стоимость могут ограничить широкое применение. Результаты исследований по применению МСК и мВВ внутривенно и интраназально, включая данные, полученные нашим коллективом, указывают на большие перспективы данного подхода для терапии нейродегенеративных заболеваний. Масштабные клинические исследования стволовых клеток, проводимые в последние годы, в лечении ряда заболеваний, в том числе нейродегенеративных, подтверждают широкие перспективы клеточной терапии.

Литература

1. GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet*. 2020;396(10258):1204–1222. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30925-9
2. Babcock KR, Page JS, Fallon JR, Webb AE. Adult hippocampal neurogenesis in aging and Alzheimer's disease. *Stem Cell Rep*. 2021;16(4):681–693. DOI: 10.1016/j.stemcr.2021.01.019
3. Wang C, Zong S, Cui X, Wang X, Wu S, Wang L, et al. The effects of microglia-associated neuroinflammation on Alzheimer's disease. *Front Immunol*. 2023;14:1117172. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1117172
4. Moreno-Jiménez EP, Flor-García M, Terreros-Roncal J, Rábano A, Cafini F, Pallas-Bazarra N, et al. Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer's disease. *Nat Med*. 2019;25(4):554–560. DOI: 10.1038/s41591-019-0375-9
5. Flor-García M, Terreros-Roncal J, Moreno-Jiménez EP, Ávila J, Rábano A, Llorens-Martín M. Unraveling human adult hippocampal neurogenesis. *Nat Protoc*. 2020;15(2):668–693. DOI: 10.1038/s41596-019-0267-y
6. Bloem BR, Okun MS, Klein C. Parkinson's disease. *Lancet*. 2021;397(10291):2284–2303. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)00218-X
7. Feldman EL, Goutman SA, Petri S, Mazzini L, Savelieff MG, Shaw PJ, et al. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet*. 2022;400(10360):1363–1380. DOI: 10.1016/S0140-6736(22)01272-7
8. Rajput SN, Naeem BK, Ali A, Salim A, Khan I. Expansion of human umbilical cord derived mesenchymal Stem Cells. in regenerative medicine. *World J Stem Cells*. 2024;16(4):410–433. DOI: 10.4252/wjsc.v16.i4.410
9. Scheltens P, De Strooper B, Kivipelto M, Holstege H, Chételat G, Teunissen CE, et al. Alzheimer's disease. *Lancet*. 2021;397(10284):1577–1590. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)32205-4
10. Sehar U, Rawat P, Reddy AP, Kopel J, Reddy PH. Amyloid beta in aging and Alzheimer's disease. *Int J Mol Sci*. 2022;23(21):12924. DOI: 10.3390/ijms232112924
11. Ben-Shlomo Y, Darweesh S, Llibre-Guerra J, Marras C, San Luciano M, Tanner C. The epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet*. 2024;403(10423):283–292. DOI: 10.1016/S01406736(23)01419-8
12. Poltavtseva RA, Nikonova YA, Selezneva II, Yaroslavl'tseva AK, Stepanenko VN, Esipov RS, et al. Mesenchymal Stem Cells. from human dental pulp: isolation, characteristics, and potencies of targeted differentiation. *Bull Exp Biol Med*. 2014;158(1):164–169. DOI: 10.1007/s10517-014-2714-7

13. Bhatt A, Bhardwaj H, Srivastava P. Mesenchymal stem cell therapy for Alzheimer's disease: a novel therapeutic approach for neurodegenerative diseases. *Neuroscience*. 2024;555:52–68. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2024.07.019
14. Isaković J, Šerer K, Barišić B, Mitrečić D. Mesenchymal stem cell therapy for neurological disorders: the light or the dark side of the force? *Front Bioeng Biotechnol*. 2023;11:1139359. DOI: 10.3389/fbioe.2023.1139359
15. Hunt JS, Fishback JL, Andrews GK, Wood GW. Expression of class I HLA genes by trophoblast cells. Analysis by in situ hybridization. *J Immunol*. 1988;140(4):1293–1299.
16. Poltavtseva RA, Poltavtsev AV, Lutsenko GV, Svirshchevskaya EV. Myths, reality and future of mesenchymal stem cell therapy. *Cell Tissue Res*. 2019;375(3):563–574. DOI: 10.1007/s00441018-2961-4
17. Chin SP, Marzuki M, Tai L, Mohamed Shahrehan NA, Ricky C, Fanty A, et al. Dynamic tracking of human umbilical cord mesenchymal Stem Cells. (hUC-MSCs) following intravenous administration in mice model. *Regen Ther*. 2024;25:273–283. DOI: 10.1016/j.reth.2024.01.003
18. Leibacher J, Dauber K, Ehser S, Brixner V, Kollar K, Vogel A, et al. Human mesenchymal stromal cells undergo apoptosis and fragmentation after intravenous application in immune-competent mice. *Cytotherapy*. 2017;19(1):61–74. DOI: 10.1016/j.jcyt.2016.09.010
19. Furlani D, Ugurlucan M, Ong L, Bieback K, Pittermann E, Westien I, et al. Is the intravascular administration of mesenchymal Stem Cells. safe? *Mesenchymal Stem Cells. and intravital microscopy*. *Microvasc Res*. 2009;77(3):370–376. DOI: 10.1016/j.mvr.2009.02.001
20. Glassberg MK, Minkiewicz J, Toonkel RL, Simonet ES, Rubio GA, DiFede D, et al. Allogeneic human mesenchymal Stem Cells. in patients with idiopathic pulmonary fibrosis via intravenous delivery (AETHER): a phase I safety clinical trial. *Chest*. 2017;151(5):971–981. DOI: 10.1016/j.chest.2016.10.061
21. Packham DK, Fraser IR, Kerr PG, Segal KR. Allogeneic mesenchymal precursor cells (MPC) in diabetic nephropathy: a randomized, placebo-controlled, dose escalation study. *EBio-Medicine*. 2016;12:263–269. DOI: 10.1016/j.ebiom.2016.09.011
22. Skyler JS, Fonseca VA, Segal KR, Rosenstock J; MSB-DM003 Investigators. Allogeneic mesenchymal precursor cells in type 2 diabetes: a randomized, placebo-controlled, dose-escalation safety and tolerability pilot study. *Diabetes Care*. 2015;38(9):1742–1749. DOI: 10.2337/dc14-2830
23. De Becker A, Riet IV. Homing and migration of mesenchymal stromal cells: how to improve the efficacy of cell therapy? *World J Stem Cells*. 2016;8(3):73–87. DOI: 10.4252/wjsc.v8.i3.73
24. Patel AN, Henry TD, Quyyumi AA, Schaer GL, Anderson RD, Toma C, et al.; ixCELL-DCM Investigators. Ixmyelocel-T for patients with ischaemic heart failure: a prospective randomised double-blind trial. *Lancet*. 2016;387(10036):2412–2421. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)30137-4. Erratum in: *Lancet*. 2016 Jun 11;387(10036):2382. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)30739-5
25. See F, Seki T, Psaltis PJ, Sondermeijer HP, Gronthos S, Zannettino AC, et al. Therapeutic effects of human STRO-3-selected mesenchymal precursor cells and their soluble factors in experimental myocardial ischemia. *J Cell Mol Med*. 2011;15(10):2117–2129. DOI: 10.1111/j.15824934.2010.01241.x
26. Gronthos S, Fitter S, Diamond P, Simmons PJ, Itescu S, Zannettino AC. A novel monoclonal antibody (STRO-3) identifies an isoform of tissue nonspecific alkaline phosphatase expressed by multipotent bone marrow stromal stem cells. *Stem Cells. Dev*. 2007 Dec;16(6):953–963. DOI: 10.1089/scd.2007.0069
27. Matas J, Orrego M, Amenabar D, Infante C, Tapia-Limonchi R, Cadiz MI, et al. Umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells (MSCs) for knee osteoarthritis: repeated MSC dosing is superior to a single MSC dose and to hyaluronic acid in a controlled randomized phase I/II trial. *Stem Cells. Transl Med*. 2019;8(3):215–224. DOI: 10.1002/sctm.18-0053
28. Lee WS, Kim HJ, Kim KI, Kim GB, Jin W. Intra-articular injection of autologous adipose tissue-derived mesenchymal Stem Cells. for the treatment of knee osteoarthritis: a phase IIb, randomized, placebo-controlled clinical trial. *Stem Cells. Transl Med*. 2019;8(6):504–511. DOI: 10.1002/sctm.18-0122
29. Chung JW, Chang WH, Bang OY, Moon GJ, Kim SJ, Kim SK, et al.; STARTING-2 Collaborators. Efficacy and safety of intravenous mesenchymal Stem Cells. for ischemic stroke. *Neurology*. 2021;96(7):e1012–e1023. DOI: 10.1212/WNL.0000000000011440

30. Shi M, Li YY, Xu RN, Meng FP, Yu SJ, Fu JL, et al. Mesenchymal stem cell therapy in decompensated liver cirrhosis: a long-term follow-up analysis of the randomized controlled clinical trial. *Hepatol Int.* 2021;15(6):1431–1341. DOI: 10.1007/s12072-021-10199-2
31. Petrou P, Kassis I, Levin N, Paul F, Backner Y, Benoliel T, et al. Beneficial effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation in active progressive multiple sclerosis. *Brain.* 2020;143(12):3574–2588. DOI: 10.1093/brain/awaa333
32. Cudkowicz ME, Lindborg SR, Goyal NA, Miller RG, Burford MJ, Berry JD, et al. A randomized placebo-controlled phase 3 study of mesenchymal Stem Cells. induced to secrete high levels of neurotrophic factors in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve.* 2022 Mar;65(3):291–302. DOI: 10.1002/mus.27472. Erratum in: *Muscle Nerve.* 2022;66(4):E26–E27. DOI: 10.1002/mus.27697
33. Brody M, Agronin M, Herskowitz BJ, Bookheimer SY, Small GW, Hitchinson B, et al. Results and insights from a phase I clinical trial of Lomecel-B for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2023;19(1):261–273. DOI: 10.1002/alz.12651
34. Kim HJ, Cho KR, Jang H, Lee NK, Jung YH, Kim JP, et al. Intracerebroventricular injection of human umbilical cord blood mesenchymal Stem Cells. in patients with Alzheimer's disease dementia: a phase I clinical trial. *Alzheimers Res Ther.* 2021;13(1):154. DOI: 10.1186/s13195-021-00897-2
35. Duma C, Kopyov O, Kopyov A, Berman M, Lander E, Elam M, et al. Human intracerebroventricular (ICV) injection of autologous, non-engineered, adipose-derived stromal vascular fraction (ADSVF) for neurodegenerative disorders: results of a 3-year phase 1 study of 113 injections in 31 patients. *Mol Biol Rep.* 2019;46(5):5257–5272. DOI: 10.1007/s11033-01904983-5
36. Biglari N, Mehdizadeh A, Vafaei Mastanabad M, Gharaeikhezri MH, Gol Mohammad Pour Afrakoti L, Pourbala H, et al. Application of mesenchymal Stem Cells. (MSCs) in neurodegenerative disorders: history, findings, and prospective challenges. *Pathol Res Pract.* 2023;247:154541. DOI: 10.1016/j.prp.2023.154541
37. Shah S, Mansour HM, Aguilar TM, Lucke-Wold B. Mesenchymal stem cell-derived exosomes as a neuroregeneration treatment for Alzheimer's disease. *Biomedicines.* 2024;12(9):2113. DOI: 10.3390/biomedicines12092113
38. Nguyen NT, Phan HT, Le PM, Nguyen LT, Do TT, Phan TT, et al. Safety and efficacy of autologous adipose tissue-derived stem cell transplantation in aging-related low-grade inflammation patients: a single-group, open-label, phase I clinical trial. *Trials.* 2024;25(1):309. DOI: 10.1186/s13063-024-08128-3
39. Bobkova NV, Poltavtseva RA, Samokhin AN, Sukhikh GT. Therapeutic effect of mesenchymal multipotent stromal cells on memory in animals with Alzheimer-type neurodegeneration. *Bull Exp Biol Med.* 2013;156(1):119–121. DOI: 10.1007/s10517-013-2293-z
40. Poltavtseva RA, Silachev DN, Pavlovich SV, Kesova MI, Yarygin KN, Lupatov AY, et al. Neuroprotective effect of mesenchymal and neural stem and progenitor cells on sensorimotor recovery after brain injury. *Bull Exp Biol Med.* 2012;153(4):586–590. DOI: 10.1007/s10517-0121772-y
41. Abdelrazik H. Mesenchymal Stem Cells: A Hope or a Hype? *Int J Mol Sci.* 2023;24(17):13218. DOI: 10.3390/ijms241713218
42. Huang Y, Bai Z, Zhang K. A new insight for stem cell therapy: apoptotic Stem Cells. as a key player. *Signal Transduct Target Ther.* 2022;7(1):299. DOI: 10.1038/s41392-022-01066-z
43. Fu Y, He Y, Wu D, Sui B, Jin Y, Hu X, et al. Apoptotic vesicles: emerging concepts and research progress in physiology and therapy. *Life Med.* 2023;2(2):lnad013. DOI: 10.1093/life-medi/lnad013
44. Maksimova A, Shevela E, Sakhno L, Tikhonova M, Ostanin A, Chernykh E. Human Macrophages Polarized by Interaction with Apoptotic Cells Produce Fibrosis-Associated Mediators and Enhance Pro-Fibrotic Activity of Dermal Fibroblasts In Vitro. *Cells.* 2023;12(15):1928. DOI: 10.3390/cells12151928
45. Blinova GA, Yarygin KN, Kholodenko IV. Efferocytosis as One of the Mechanisms for Realizing the Therapeutic Effects of Mesenchymal Stem Cells. *Biomed Chem Res Methods.* 2024;7(3):e00221.
46. Soufhasanabad S, Mahmoudi M, Taghavi-Farahabadi M, Mirsanei Z, Lamouki RM, Abdalla JKM, et al. In vivo polarization of M2 macrophages by mesenchymal stem cell-derived

- extracellular vesicles: a novel approach to macrophage polarization and its potential in treating inflammatory diseases. *Med Hypotheses*. 2024;187:111353.
47. Schrodtt MV, Behan-Bush RM, Liszewski JN, Humpal-Pash ME, Boland LK, Scroggins SM, et al. Efferocytosis of viable versus heat-inactivated MSC induces human monocytes to distinct immunosuppressive phenotypes. *Stem Cell Res Ther*. 2023;14(1):206. DOI: 10.1186/s13287-023-03443-z
48. Lötval J, Hill AF, Hochberg F, Buzás EI, Di Vizio D, Gardiner C, et al. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J Extracell Vesicles*. 2014;3:26913. DOI: 10.3402/jev.v3.26913
49. Zhdanova DY, Bobkova NV, Chaplygina AV, Svirshchevskaya EV, Poltavtseva RA, Vodenikova AA, Chernyshev VS, Sukhikh GT. Effect of Small Extracellular Vesicles Produced by Mesenchymal Stem Cells. on 5xFAD Mice Hippocampal Cultures. *Int J Mol Sci*. 2025;26(9):4026. DOI: 10.3390/ijms26094026
50. Tan F, Li X, Wang Z, Li J, Shahzad K, Zheng J. Clinical applications of stem cell-derived exosomes. *Signal Transduct Target Ther*. 2024;9(1):17. DOI: 10.1038/s41392-023-01704-0
51. Zhdanova DY, Poltavtseva RA, Svirshchevskaya EV, Bobkova NV. Effect of Intranasal Administration of Multipotent Mesenchymal Stromal Cell Exosomes on Memory of Mice in Alzheimer's Disease Model. *Bull Exp Biol Med*. 2021;170(4):575–582. DOI: 10.1007/s10517021-05109-3
52. Chernyshev VS, Chuprov-Netochin RN, Tsydenzhapova E, Svirshchevskaya EV, Poltavtseva RA, Merdalimova A, et al. Asymmetric depth-filtration: A versatile and scalable method for high-yield isolation of extracellular vesicles with low contamination. *J Extracell Vesicles*. 2022;11(8):e12256. DOI: 10.1002/jev2.12256
53. Pan R, Chen D, Hou L, Hu R, Jiao Z. Small extracellular vesicles: a novel drug delivery system for neurodegenerative disorders. *Front Aging Neurosci*. 2023;15:1184435. DOI: 10.3389/fnagi.2023.1184435
54. Xu M, Feng T, Liu B, Qiu F, Xu Y, Zhao Y, et al. Engineered exosomes: desirable target-tracking characteristics for cerebrovascular and neurodegenerative disease therapies. *Theranostics*. 2021;11(18):8926–8944. DOI: 10.7150/thno.62330
55. Cui GH, Guo HD, Li H, Zhai Y, Gong ZB, Wu J, et al. RVG-modified exosomes derived from mesenchymal Stem Cells. rescue memory deficits by regulating inflammatory responses in a mouse model of Alzheimer's disease. *Immun Ageing*. 2019;16:10. DOI: 10.1186/s12979-019-0150-2
56. Peng H, Li Y, Ji W, Zhao R, Lu Z, Shen J, et al. Intranasal Administration of Self-Oriented Nanocarriers Based on Therapeutic Exosomes for Synergistic Treatment of Parkinson's Disease. *ACS Nano*. 2022;16(1):869–884. DOI: 10.1021/acsnano.1c08473
57. Agrawal AK, Aqil F, Jeyabalan J, Spencer WA, Beck J, Gachuki BW, et al. Milk-derived exosomes for oral delivery of paclitaxel. *Nanomedicine*. 2017;13(5):1627–1636. DOI: 10.1016/j.nano.2017.03.001
58. Chu M, Wang H, Bian L, Huang J, Wu D, Zhang R, et al. Nebulization Therapy with Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes for COVID-19 Pneumonia. *Stem Cell Rev Rep*. 2022;18(6):2152–2163. DOI: 10.1007/s12015-022-10398-w
59. Meng W, He C, Hao Y, Wang L, Li L, Zhu G. Prospects and challenges of extracellular vesicle-based drug delivery system: considering cell source. *Drug Deliv*. 2020;27(1):585–598. DOI: 10.1080/10717544.2020.1748758
60. Parada N, Romero-Trujillo A, Georges N, Alcayaga-Miranda F. Camouflage strategies for therapeutic exosomes evasion from phagocytosis. *J Adv Res*. 2021;31:61–74. DOI: 10.1016/j.jare.2021.01.001
61. Shi MM, Yang QY, Monsel A, Yan JY, Dai CX, Zhao JY, et al. Preclinical efficacy and clinical safety of clinical-grade nebulized allogenic adipose mesenchymal stromal cells-derived extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*. 2021;10(10):e12134. DOI: 10.1002/jev2.12134
62. Dong X. Current Strategies for Brain Drug Delivery. *Theranostics*. 2018;8(6):1481–93. DOI: 10.7150/thno.21254

63. Goncalves K, Przyborski S. The utility of Stem Cells. for neural regeneration. *Brain Neurosci Adv.* 2018;2:2398212818818071.
64. Behrstock S, Ebert AD, Klein S, Schmitt M, Moore JM, Svendsen CN, et al. Lesion-induced increase in survival and migration of human neural progenitor cells releasing GDNF. *Cell Transplant.* 2008;17(7):753–762. DOI: 10.3727/096368908786516819. PMID: 19044202.
65. Blurton-Jones M, Kitazawa M, Martinez-Coria H, Castello NA, Müller FJ, Loring JF, et al. Neural Stem Cells. improve cognition via BDNF in a transgenic model of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106(32):13594–13599. DOI: 10.1073/pnas.0901402106
66. Chaplygina AV, Zhdanova DY, Kovalev VI, Poltavtseva RA, Medvinskaya NI, Bobkova NV. Cell therapy as a way to correct impaired neurogenesis in the adult brain in a model of Alzheimer's disease. *J Evol Biochem Physiol.* 2022;58(1):117–137.
67. Kim S, Chang KA, Kim JA, Park HG, Ra JC, Kim HS, et al. The preventive and therapeutic effects of intravenous human adipose-derived Stem Cells. in Alzheimer's disease mice. *PLoS One.* 2012;7(9):e45757. DOI: 10.1371/journal.pone.0045757
68. Joyce N, Annett G, Wirthlin L, Olson S, Bauer G, Nolte JA, et al. Mesenchymal Stem Cells. for the treatment of neurodegenerative disease. *Regen Med.* 2010;5(6):933–946. DOI: 10.2217/rme.10.72
69. Xin D, Li T, Chu X, Ke H, Liu D, Wang Z, et al. MSCs-extracellular vesicles attenuated neuroinflammation, synapse damage and microglial phagocytosis after hypoxia-ischemia injury by preventing osteopontin expression. *Pharmacol Res.* 2021;164:105322. DOI: 10.1016/j.phrs.2020.105322
70. Nair S, Rocha-Ferreira E, Fleiss B, Nijboer CH, Gressens P, Mallard C, et al. Neuroprotection offered by mesenchymal Stem Cells. in perinatal brain injury: Role of mitochondria, inflammation, and reactive oxygen species. *J Neurochem.* 2021;158(1):59–73. DOI: 10.1111/jnc.15267
71. Bruno S, Kholia S, Deregibus MC, Camussi G. The Role of Extracellular Vesicles as Paracrine Effectors in Stem Cell-Based Therapies. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1201:175–193. DOI: 10.1007/978-3-030-31206-0_9
72. Yin K, Wang S, Zhao RC. Exosomes from mesenchymal stem/stromal cells: a new therapeutic paradigm. *Biomark Res.* 2019;7:8. DOI: 10.1186/s40364-019-0159-x
73. Kim DH, Lee D, Lim H, Choi SJ, Oh W, Yang YS, et al. Effect of growth differentiation factor-15 secreted by human umbilical cord blood-derived mesenchymal Stem Cells. on amyloid beta levels in in vitro and in vivo models of Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;504(4):933–940. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.09.012
74. Qin C, Lu Y, Wang K, Bai L, Shi G, Huang Y, et al. Transplantation of bone marrow mesenchymal Stem Cells. improves cognitive deficits and alleviates neuropathology in animal models of Alzheimer's disease: a meta-analytic review on potential mechanisms. *Transl Neurodegener.* 2020;9(1):20. DOI: 10.1186/s40035-020-00199-x
75. Yang H, Xie Z, Wei L, Yang H, Yang S, Zhu Z, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived neuron-like cells rescue memory deficits and reduce amyloid-beta deposition in an AβPP/PS1 transgenic mouse model. *Stem Cell Res Ther.* 2013;4(4):76. DOI: 10.1186/scrt227
76. Hernández AE, García E. Mesenchymal Stem Cell Therapy for Alzheimer's Disease. *Stem Cells. Int.* 2021;2021:7834421. DOI: 10.1155/2021/7834421
77. de Godoy MA, Saraiva LM, de Carvalho LRP, Vasconcelos-Dos-Santos A, Beiral HJV, Ramos AB, et al. Mesenchymal Stem Cells. and cell-derived extracellular vesicles protect hippocampal neurons from oxidative stress and synapse damage induced by amyloid-β oligomers. *J Biol Chem.* 2018;293(6):1957–1975. DOI: 10.1074/jbc.M117.807180
78. Carp DM, Liang Y. Universal or Personalized Mesenchymal Stem Cell Therapies: Impact of Age, Sex, and Biological Source. *Cells.* 2022;11(13):2077–2091. DOI: 10.3390/cells11132077
79. Ramkisoensing AA, Pijnappels DA, Swildens J, Goumans MJ, Fibbe WE, Schali J, et al. Gap junctional coupling with cardiomyocytes is necessary but not sufficient for cardiomyogenic differentiation of cocultured human mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2012;30(6):1236–1245. DOI: 10.1002/stem.1086
80. Matuskova M, Hlubinova K, Pastorakova A, Hunakova L, Altanerova V, Altaner C, et al. HSV-tk expressing mesenchymal Stem Cells. exert bystander effect on human glioblastoma cells. *Cancer Lett.* 2010;290(1):58–67. DOI: 10.1016/j.canlet.2009.08.028

81. Kikuchi-Taura A, Okinaka Y, Saino O, Takeuchi Y, Ogawa Y, Kimura T, et al. Gap junction-mediated cell-cell interaction between transplanted mesenchymal Stem Cells. and vascular endothelium in stroke. *Stem Cells*. 2021;39(7):904–912. DOI: 10.1002/stem.3360
82. Spees JL, Lee RH, Gregory CA. Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function. *Stem Cell Res Ther*. 2016;7(1):125. DOI: 10.1186/s13287-016-0363-7
83. Skok M. Mesenchymal Stem Cells. as a potential therapeutic tool to cure cognitive impairment caused by neuroinflammation. *World J Stem Cells*. 2021;13(8):1072–1083.
84. Poltavtseva RA, Samokhin AN, Bobkova NV, Alexandrova MA, Sukhikh GT. Effect of Transplantation of Neural Stem and Progenitor Cells on Memory in Animals with Alzheimer's Type Neurodegeneration. *Bull Exp Biol Med*. 2020;168(4):589–596. DOI: 10.1007/s10517-02004758-0
85. Yun HM, Kim HS, Park KR, Shin JM, Kang AR, Lee KI, et al. Placenta-derived mesenchymal Stem Cells. improve memory dysfunction in an A β 1-42-infused mouse model of Alzheimer's disease. *Cell Death Dis*. 2013;4(12):e958. DOI: 10.1038/cddis.2013.490
86. Bagheri-Mohammadi S. Microglia in Alzheimer's Disease: The Role of Stem Cell-Microglia Interaction in Brain Homeostasis. *Neurochem Res*. 2021;46(2):141–148. DOI: 10.1007/s11064020-03162-4
87. Chaplygina AV, Zhdanova DY, Kovalev VI, Poltavtseva RA, Bobkova NV. Interaction of mesenchymal stromal cells from Wharton's jelly of the umbilical cord with primary culture of hippocampal cells of 5xfad mice under various cultivation types [Article in Russian]. *Biol Membr*. 2023;40(3):217–232.
88. Panchenko MM, Poltavtseva RA, Bobkova NV, Velmeshev DV, Nesterova IV, Samokhin AN, et al. Localization and differentiation pattern of transplanted human multipotent mesenchymal stromal cells in the brain of bulbectomized mice. *Bull Exp Biol Med*. 2014;158(1):118–122. DOI: 10.1007/s10517-014-2706-7
89. Bobkova NV, Lyabin DN, Medvinskaya NI, Samokhin AN, Nekrasov PV, Nesterova IV, et al. The Y-Box Binding Protein 1 Suppresses Alzheimer's Disease Progression in Two Animal Models. *PLoS One*. 2015;10(9):e0138867. DOI: 10.1371/journal.pone.0138867
90. Evgen'ev M, Bobkova N, Krasnov G, Garbuz D, Funikov S, Kudryavtseva A, et al. The Effect of Human HSP70 Administration on a Mouse Model of Alzheimer's Disease Strongly Depends on Transgenic and Age. *J Alzheimers Dis*. 2019;67(4):1391–1404. DOI: 10.3233/JAD-180987
91. Zhang Y, Zhang Y, Chopp M, Pang H, Zhang ZG, Mahmood A, et al. MiR-17-92 Cluster-Enriched Exosomes Derived from Human Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells Improve Tissue and Functional Recovery in Rats after Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma*. 2021;38(11):1535–1550. DOI: 10.1089/neu.2020.7575
92. Reza-Zaldivar EE, Hernández-Sapiéns MA, Gutiérrez-Mercado YK, Sandoval-Ávila S, Gomez-Pinedo U, Márquez-Aguirre AL, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes promote neurogenesis and cognitive function recovery in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neural Regen Res*. 2019;14(9):1626–1634. DOI: 10.4103/1673-5374.255978
93. Reza-Zaldivar EE, Hernández-Sapiéns MA, Minjarez B, Gutiérrez-Mercado YK, Márquez-Aguirre AL, Canales-Aguirre AA. Potential Effects of MSC-Derived Exosomes in Neuroplasticity in Alzheimer's Disease. *Front Cell Neurosci*. 2018;12:317. DOI: 10.3389/fncel.2018.00317
94. Bodart-Santos V, de Carvalho LRP, de Godoy MA, Batista AF, Saraiva LM, Lima LG, et al. Extracellular vesicles derived from human Wharton's jelly mesenchymal Stem Cells. protect hippocampal neurons from oxidative stress and synapse damage induced by amyloid- β oligomers. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):332. DOI: 10.1186/s13287-019-1432-5
95. Chen Y, Li J, Ma B, Li N, Wang S, Sun Z, et al. MSC-derived exosomes promote recovery from traumatic brain injury via microglia/macrophages in rat. *Aging (Albany NY)*. 2020;12(18):18274–18296. DOI: 10.18632/aging.103692
96. Katsuda T, Tsuchiya R, Kosaka N, Yoshioka Y, Takagaki K, Oki K, et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal Stem Cells. secrete functional neprilysin-bound exosomes. *Sci Rep*. 2013;3:1197. DOI: 10.1038/srep01197
97. Huang SM, Mouri A, Kokubo H, Nakajima R, Suemoto T, Higuchi M, et al. Neprilysin-sensitive synapse-associated amyloid-beta peptide oligomers impair neuronal plasticity and cognitive function. *J Biol Chem*. 2006;281(26):17941–17951. DOI: 10.1074/jbc.M601372200

98. Chen YA, Lu CH, Ke CC, Chiu SJ, Jeng FS, Chang CW, et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Ameliorate Alzheimer's Disease Pathology and Improve Cognitive Deficits. *Bio-medicines*. 2021;9(6):594. DOI: 10.3390/biomedicines9060594
99. Elia CA, Losurdo M, Malosio ML, Coco S. Extracellular Vesicles from Mesenchymal Stem Cells. Exert Pleiotropic Effects on Amyloid- β , Inflammation, and Regeneration: A Spark of Hope for Alzheimer's Disease from Tiny Structures? *Bioessays*. 2019;41(4):e1800199. DOI: 10.1002/bies.201800199
100. Yuyama K, Sun H, Sakai S, et al. Decreased amyloid- β pathologies by intracerebral loading of glycosphingolipid-enriched exosomes in Alzheimer model mice. *J Biol Chem*. 2014;289(35):24488–24498. DOI: 10.1074/jbc.M114.577213
101. Xin H, Li Y, Cui Y, et al. Systemic administration of exosomes released from mesenchymal stromal cells promote functional recovery and neurovascular plasticity after stroke in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2013;33(11):1711–1715. DOI: 10.1038/jcbfm.2013.152
102. Avetisyan AV, et al. Functional impairment of the mitochondria of the neocortex and hippocampus in mice with bulbectomy — model of Alzheimer's disease. *Biochemistry (Mosc)*. 2016;81(6):802–8012.
103. Choi DS, Kim DK, Kim YK, et al. Proteomics, transcriptomics and lipidomics of exosomes and ectosomes. *Proteomics*. 2013;13(10-11):1554–15571. DOI: 10.1002/pmic.201200329
104. Chen P, Zheng L, Wang Y, et al. Desktop-stereolithography 3D printing of a radially oriented extracellular matrix/mesenchymal stem cell exosome bioink for osteochondral defect regeneration. *Theranostics*. 2019;9(9):2439–59. DOI: 10.7150/thno.31017
105. Paşca AM, Sloan SA, Clarke LE, et al. Functional cortical neurons and astrocytes from human pluripotent Stem Cells. in 3D culture. *Nat Methods*. 2015;12(7):671–678. DOI: 10.1038/nmeth.3415
106. Wilson MN, Thunemann M, Liu X, et al. Multimodal monitoring of human cortical organoids implanted in mice reveal functional connection with visual cortex. *Nat Commun*. 2022;13(1):7945. DOI: 10.1038/s41467-022-35536-3
107. Aleksandrova MA, Poltavtseva RA, Marei MV, et al. Analysis of neural Stem Cells. from human cortical brain structures in vitro. *Bull Exp Biol Med*. 2016;161(1):197–208. DOI: 10.1007/s10517-016-3375-5
108. Poltavtseva RA, Marei MV, Dubrovina IV, et al. Development and differentiation of multipotent human neural cells in vitro. *Dokl Biochem Biophys*. 2001;379:304–308. DOI: 10.1023/a:1011675407770
109. Leone MA, Gelati M, Profico DC, et al. Phase I clinical trial of intracerebroventricular transplantation of allogeneic neural Stem Cells. in people with progressive multiple sclerosis. *Cell Stem Cell*. 2023;30(12):1597–1609. DOI: 10.1016/j.stem.2023.11.001
110. Müller-Ruchholtz W, Leyhausen G, Petersen P, et al. A simple methodological principle for large scale extraction and purification of collagenase-digested islets. *Transplant Proc*. 1987;19(1 Pt 2):911–915.
111. Winoto-Morbach S, Ulrichs K, Hering BJ, et al. Lectins for electromagnetic purification of islets from humans and large mammals. *Horm Metab Res Suppl*. 1990;25:51–54.
112. Cooper DKC, Mou L, Bottino R. A brief review of the current status of pig islet xenotransplantation. *Front Immunol*. 2024;15:1366530. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1366530
113. Wang S, Du Y, Zhang B, et al. Transplantation of chemically induced pluripotent stem cell-derived islets under abdominal anterior rectus sheath in a type 1 diabetes patient. *Cell*. 2024;187(22):6152–6164. DOI: 10.1016/j.cell.2024.09.004
114. Eiraku M, Takata N, Ishibashi H, et al. Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature*. 2011;472(7341):51–56. DOI: 10.1038/nature09941
115. Lancaster MA, Renner M, Martin CA, et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*. 2013;501(7467):373–379. DOI: 10.1038/nature12517
116. Hendriks D, Pagliaro A, Andreatta F, et al. Human fetal brain self-organizes into long-term expanding organoids. *Cell*. 2024;187(3):712–732. DOI: 10.1016/j.cell.2023.12.012
117. Jgamadze D, Lim JT, Zhang Z, et al. Structural and functional integration of human fore-brain organoids with the injured adult rat visual system. *Cell Stem Cell*. 2023;30(2):137–152. DOI: 10.1016/j.stem.2023.01.004

118. Cao SY, Yang D, Huang ZQ, et al. Cerebral organoids transplantation repairs infarcted cortex and restores impaired function after stroke. NPJ Regen Med. 2023;8(1):27. DOI: 10.1038/s41536-023-00301-7
119. Abbott A. Stem Cells. head to the clinic: treatments for cancer, diabetes and Parkinson's disease could soon be here. Nature. 2025;637(8044):18–20. DOI: 10.1038/d41586-024-04160-0

Об авторах

Полтавцева Римма Алексеевна — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории «Клинической иммунологии» ФГБУ «Национальный медицинский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации; старший научный сотрудник Центра фотоники и фотонных технологий, Сколковский институт науки и технологий.

Свищевская Елена Викторовна — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории «Клинической иммунологии» ФГБУ «Национальный медицинский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации; старший научный сотрудник отдела иммунологии ФГБУН «Государственный научный центр Российской Федерации «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук; старший научный сотрудник Центра фотоники и фотонных технологий, Сколковский институт науки и технологий.

Чиков Владимир Михайлович — к.ф.-м.н., внештатный научный сотрудник лаборатории «Клинической иммунологии» ФГБУ «Национальный медицинский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Бобкова Наталья Викторовна — к.б.н., заведующая лабораторией «Клеточных механизмов патологии памяти» Института биофизики клетки РАН — обособленное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований» Российской академии наук.

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

Authors

Rimma A. Poltavtseva — Cand. Sci. (Biology), Leading Research Associate of the Laboratory of Clinical Immunology, National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov; Senior Research Scientist Skoltech Center for Photonic Science and Engineering.

Elena V. Svirshchetskaya — Cand. Sci. (Biology), Senior Research Fellow of the Laboratory of Clinical Immunology, National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov; Department of immunology Shemyakin-Ovchinnikov Institute of bioorganic chemistry RAS; Senior Research Scientist Skoltech Center for Photonic Science and Engineering.

Vladimir M. Tchikov — Cand. Sci. (Phys. and Math.), non-staff scientist at the Laboratory of Clinical Immunology, National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov.

Natalia V. Bobkova — Cand. Sci. (Biology), head of Laboratory Cell Mechanisms of Memory Pathology, Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences — a Separate Division of Federal Research Center Pushchino Research Center for Biological Studies, Russian Academy of Sciences.

Gennady T. Sukhikh — MD, Dr. Sci. (Medicine), Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Director National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov.

Вклад авторов

Р.А. Полтавцева — постановка задачи, получение МСК, эксперименты с крысами, написание и редактирование статьи.

Е.В. Свирщевская — работа с крысами, конфокальная микроскопия, ТЭМ, написание статьи.

В.М. Чиков — подбор литературы, редактирование статьи.

Н.В. Бобкова — подбор литературы, написание статьи.

Г.Т. Сухих — редактирование статьи, замечания, общее руководство, постановка задачи.

Author contribution statement

Rimma A. Poltavtseva — problem setting, work with MSCs, experiments with rats, writing and editing the article.

Elena V. Svirshchevskaya — experiments with rats, confocal microscopy, TEM, writing the article.

Vladimir M. Tchikov — literature analysis, article editing.

Natalia V. Bobkova — literature selection, writing the article.

Gennady T. Sukhikh — problem setting, comments and general guidance, article editing.

<https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-3-33-40>

Т-кадгерин как ключевой регулятор метаболизма в норме и при патологии. Мину-обзор

К.А. Рубина*, В.Ю. Сысоева, К.Ю. Кулебякин, Е.В. Семина

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»,
Россия, 119192, Москва, Ленинский проспект, 27-1

* Адрес для корреспонденции: rkseniya@mail.ru

Аннотация

Т-кадгерин (также в литературе используются названия cadherin 13, N-cadherin (heart) и белок, кодируемый геном *CDH13*) является многофункциональным белком, играющим ключевую роль в регуляции метаболизма, адипогенеза и канцерогенеза. В обзоре приведены и сформулированы современные представления о структуре и функциях Т-кадгерина, его взаимодействии с лигандами, адипонектином и липопroteинами низкой плотности (ЛНП). Особое внимание уделено анализу роли Т-кадгерина в адипогенной дифференцировке мезенхимальных стромальных/стволовых клеток (МСК), а также влиянию Т-кадгерина на процессы накопления липидов и поддержания метаболического гомеостаза. Высказано предположение о том, что Т-кадгерин может выступать в качестве сенсора метаболических сигналов, регулируя баланс между адипогенезом и активацией стволовых/прогениторных клеток, что важно для поддержания клеточного гомеостаза жировой ткани.

В контексте онкологических заболеваний Т-кадгерин функционирует как потенциальный опухолевый супрессор. Потеря экспрессии Т-кадгерина характерна для многих типов рака, включая рак молочной железы, легких и колоректальный рак. Снижение уровня Т-кадгерина может быть связано с гиперметилированием промотора гена *CDH13* или потерей гетерозиготности. Т-кадгерин может также опосредовать защитное действие адипонектина, который обладает онкосупрессивными свойствами. Нарушение баланса между адипонектином и ЛНП при ожирении и метаболическом синдроме может способствовать развитию онкологических заболеваний.

Таким образом, Т-кадгерин может опосредовать взаимосвязь процессов ожирения и канцерогенеза. Способность Т-кадгерина регулировать адипогенез и взаимодействовать с лигандами, влияющими на метаболизм в целом, делает его перспективной мишенью для дальнейших исследований. Понимание молекулярных механизмов участия Т-кадгерина в этих процессах может открыть новые подходы к лечению ожирения и связанных с ним онкологических заболеваний.

Ключевые слова: ожирение, рак, адипонектин, Т-кадгерин, мезенхимальные стромальные/стволовые клетки, адипогенез

Конфликт интересов: К.А. Рубина и Е.В. Семина 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: исследование выполнено в рамках государственного задания № 03р-23/110-03 ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова». Разработка биоинформационных подходов проведена при финансовой поддержке гранта № 23-11-00205 (<https://rscf.ru/en/project/23-11-00205/>).

Для цитирования: Рубина К.А., Сысоева В.Ю., Кулебякин К.Ю., Семина Е.В. Т-кадгерин как ключевой регулятор метаболизма в норме и при патологии. Мини-обзор. *Регенерация органов и тканей*. 2024;2(3):33–40. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-2-33-40>

Поступила 17.07.2024

Обработана 14.08.2024

Принята к публикации 01.09.2024

T-cadherin as a key regulator of metabolism in health and disease

Kseniya A. Rubina*, Veronika Yu. Sysoeva, Konstantin Yu. Kulebyakin, Ekaterina V. Semina

Lomonosov Moscow State University, Russia, 119192, Moscow, Lomonosovsky ave., 27, bld. 1

* Correspondence address: rkseniya@mail.ru

Abstract

T-cadherin (also known as cadherin 13, H-cadherin (heart), and *CDH13*) is a multifunctional protein that plays a key role in metabolism regulation, adipogenesis, and carcinogenesis. The review presents current perspectives on the structure and functions of T-cadherin, interaction with its well-known ligands (adiponectin, and low-density lipoproteins (LDL)). Special attention is given to analysing the role of T-cadherin in adipogenic differentiation of mesenchymal stromal/stem cells (MSCs), as well as its effects on lipid accumulation and the maintenance of metabolic homeostasis. It is suggested that T-cadherin may act as a sensor of metabolic signals, regulating the balance between adipogenesis and the activation of stem/progenitor cells, which is crucial for maintaining cellular homeostasis in adipose tissue.

In the context of oncological diseases, T-cadherin functions as a potential tumor suppressor. Loss of T-cadherin expression is a hallmark of many cancers, including breast, lung, and colorectal cancer. Reduced levels of T-cadherin are associated with hypermethylation of the *CDH13* gene promoter or loss of heterozygosity in the *CDH13* gene region. T-cadherin may also mediate the protective effects of adiponectin, which has oncosuppressive properties. Imbalances between adiponectin and LDL in obesity and metabolic syndrome may contribute to the development of oncological diseases.

Thus, T-cadherin may mediate the link between obesity and carcinogenesis. Its ability to regulate adipogenesis and interact with ligands affecting overall metabolism, makes this protein a promising target for further research. Understanding the molecular mechanisms mediated by T-cadherin may open new avenues to treatment of obesity and related oncological diseases.

Keywords: obesity, cancer, adiponectin, T-cadherin, mesenchymal stem cells, adipogenesis

Conflict of interest: K.A. Rubina and E.V. Semina have been members of the editorial board of the journal “Regeneration of organs and tissues” since 2023, but have no relation to the decision to publish this article. The article has undergone the peer-review procedure adopted by the journal. The authors have not declared any other conflicts of interest.

Funding: this research was funded by Russian Science Foundation, grant No. 23-11-00205 (<https://rscf.ru/en/project/23-11-00205/>) and performed under the State Assignment # 03p-23/110-03 of Lomonosov Moscow State University.

For citation: Rubina K.A., Sysoeva V.Yu., Kulebyakin K.Yu., Semina E.V. T-cadherin as a key regulator of metabolism in health and disease. *Tissue and organ regeneration*. 2024;2(3):33–40. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-2-33-40>

Received 17.07.2024

Revised 14.08.2024

Accepted 01.09.2024

Введение

Ожирение является важным общепризнанным фактором риска развития онкологических заболеваний. Для некоторых типов рака установлена непосредственная связь с ожирением, например для рака эндометрия, аденокарциномы пищевода, колоректального рака, постменопаузального рака молочной железы, рака простаты и почек, а также для лейкемии, лимфом, множественной миеломы, злокачественной меланомы и опухолей щитовидной железы [1]. В литературе обсуждаются гипотезы, объясняющие такую взаимосвязь, однако конкретные механизмы, лежащие в основе, остаются не ясны. Известно, что для опухолевых клеток характерна активация процессов поглощения холестерина за счет усиленного эндоцитоза, опосредованного рецептором Гольдштейна — Брауна (ЛНП рецептор) [2; 3], а также активный внутриклеточный синтез холестерина. Биосинтетический путь холестерина рассматривается как перспективная терапевтическая мишень в онкологии, и ряд ингибиторов уже продемонстрировал эффективность при подавлении опухолевого роста, включая колоректальный рак и рак поджелудочной железы [2].

Помимо рецептора Гольдштейна — Брауна, описан ряд других рецепторов, участвующих в регуляции клеточного метаболизма, в том числе и Т-кадгерин [4]. На сегодняшний день Т-кадгерин рассматривается как многофункциональная молекула, играющая двойную роль: с одной стороны, Т-кадгерин участвует в гомофильной межклеточной адгезии, с другой — в передаче внутриклеточных сигналов.

Т-кадгерин: структура и функции

Исходно Т-кадгерин был идентифицирован как молекула межклеточной адгезии [5], относящаяся к семейству «классических» кадгеринов. Кадгерины представляют собой большое семейство молекул межклеточной адгезии, экспрессированных практически во всех органах и тканях и обеспечивающих их структурную организацию и целостность [6]. Внеклеточная часть Т-кадгерина содержит пять характерных для «классических» кадгеринов доменов, но, в отличие от них, Т-кадгерин не имеет трансмембранного и цитоплазматического доменов и закорен на мембране через гликозилфосфатидилинозитольный (ГФИ) якорь. Т-кадгерин располагается в участках плазматической мембраны (липидных плотях или рафтах) [7].

В силу своих структурных особенностей Т-кадгерин способен опосредовать лишь слабую гомофильную адгезию. На сегодняшний день Т-кадгерин скорее рассматривается как рецептор, регулирующий внутриклеточные сигнальные каскады [4]. Т-кадгерин функционирует как рецептор двух важнейших метаболических лигандов — адипонектина и липопротеинов низкой плотности (ЛНП), которые, по нашей гипотезе, могут конкурировать за связывание с Т-кадгерином [4]. Адипонектин продуцируется в основном белыми адипоцитами жировой ткани и действует системно. Он обладает ярко выраженными протективными свойствами и оказывает противовоспалительные, антипролиферативные и антиатерогенные эффекты в организме, а также оказывает онкосупрессивное действие [8].

Известно, что в крови человека концентрации циркулирующего высокомолекулярного адипонектина (~170 нмоль/л) и ЛНП (~180 нмоль/л) значительно превышают величины констант диссоциации комплекса Т-кадгерина с данными лигандами. Для высокомолекулярного адипонектина эта величина составляет ≤ 1 нмоль/л [4, 9], а для ЛНП она больше почти на порядок и составляет ~12 нмоль/л [4]. Это означает, что у здоровых доноров Т-кадгерин в сосудах должен быть преимущественно связан с адипонектином. Однако при метаболическом синдроме и ожирении концентрация адипонектина в крови резко снижается [10], а ЛНП повышается [4], и в такой ситуации Т-кадгерин будет оккупирован в основном ЛНП, что может нивелировать защитные эффекты адипонектина. Высокий уровень ЛНП в крови приводит к накоплению ЛНП в сосудистой стенке и ассоциируется с повышенным риском развития атеросклероза.

Роль Т-кадгерина в адипогенезе

Наши недавно опубликованные данные указывают на то, что Т-кадгерин участвует в регуляции адипоцитарной дифференцировки мезенхимальных стромальных/стволовых клеток (МСК) из жировой ткани [11]. Т-кадгерин экспрессируется в субпопуляции недифференцированных МСК из жировой ткани человека и мыши, которые также экспрессируют маркеры стволовых клеток, и уровень экспрессии Т-кадгерина падает при индукции адипогенеза [4, 11]. В нашей лаборатории было проведено исследование на мышах, дефицитных по Т-кадгерину (*Cdh13^{ΔExon3}* mice), показавшее,

что МСК, не экспрессирующие полноразмерный Т-кадгерин, обладают более высоким и выраженным адипогенным потенциалом [12]. МСК из жировой ткани *Cdh13*^{ΔExon3} мышей демонстрировали повышенный уровень экспрессии главных мастер-генов — регуляторов адипогенеза: *PPARγ* и *CEBPα* [13, 14]. Кроме того, такие МСК после индукции адипоцитарной дифференцировки в течение 10 дней имели увеличенную способность секретировать в среду культивирования адипонектин и лептин (маркеры дифференцированных адипоцитов) и легче дифференцировались в зрелые адипоциты с характерным накоплением крупных липидных капель (по данным фазово-контрастной микроскопии и специфическому окрашиванию с использованием флуоресцентного красителя нейтральных липидов Nile Red) [15, 16].

Далее для выявления функциональных особенностей Т-кадгерина как рецептора адипонектина и ЛНП мы провели сравнительный анализ, оценивая влияние ЛНП и адипонектина на адипогенную дифференцировку МСК в зависимости от экспрессии в них Т-кадгерина. Во-первых, наши результаты выявили противоположные эффекты этих двух лигандов. В то время как добавление ЛНП стимулировало адипоцитарную дифференцировку контрольных клеток, присутствие адипонектина в среде культивирования подавляло адипогенез. Во-вторых, в отсутствие полноразмерного Т-кадгерина специфическое действие ЛНП и адипонектина на адипогенез было более явно выражено. Наличие полноразмерного Т-кадгерина на плазматической мембране снижало влияние ЛНП на способность клеток к накоплению липидных капель по сравнению с клетками, дефицитными по Т-кадгерину (из *Cdh13*^{ΔExon3} мышей). Аналогичным образом в МСК, дефицитных по Т-кадгерину, отмечалась повышенная чувствительность к подавляющему действию адипонектина.

Таким образом, Т-кадгерин действует как фактор, регулирующий процессы адипоцитарной дифференцировки и опосредующий действие метаболитических лигандов на процесс накопления липидных капель. В контексте полученных данных было сделано предположение о том, что Т-кадгерин может играть роль сенсора метаболитических сигналов (ЛНП и адипонектина), регулируя процессы адипогенеза в зависимости от изменяющихся физиологических условий

за счет контроля дифференцировки стволовых/прогениторных клеток в зрелые адипоциты [15].

Т-кадгерин при онкологических заболеваниях

За последние 30 лет накопилось значительное количество данных, подтверждающих, что потеря экспрессии Т-кадгерина характерна для самых различных типов онкологических заболеваний. Ген *CDH13*, кодирующий белок Т-кадгерин, расположен на хромосоме 16q24 в области, для которой особенно характерна потеря гетерозиготности при различных солидных опухолях. Снижение экспрессии Т-кадгерина, вызванное либо аллельной потерей хромосомных участков 16q24.1–q24.2, либо гиперметилированием промотора гена *CDH13*, было выявлено при таких патологиях человека, как карцинома молочной железы и легких, аденома гипофиза, злокачественные В-клеточные лимфомы и назофарингеальная карцинома [16–20]. При остеосаркоме [21], раке яичников и эндометрия [22, 23], а также при раке желчного пузыря [24] снижение экспрессии Т-кадгерина было ассоциировано со злокачественным фенотипом и прогрессией заболевания. В литературе было высказано предположение, что Т-кадгерин функционирует как опухолевый супрессор. В то же время до сих пор достоверно не выявлены конкретные молекулярные или клеточные механизмы участия Т-кадгерина в озлокачествлении клеток или опухолевой прогрессии.

На сегодняшний день очевидно, что циркулирующие гормоны и факторы роста могут напрямую влиять на рост опухолей или косвенно изменять стромальное микроокружение в опухолевом узле (фибробласты, иммунные или сосудистые клетки), тем самым способствуя опухолевой прогрессии и метастазированию [25]. Например, значительное внимание в онкологических исследованиях было уделено адипонектину. В ряде публикаций была отмечена взаимосвязь между снижением адипонектина в плазме крови и риском развития онкологических заболеваний, ассоциированных с ожирением, а также высокой смертностью таких больных [26].

Наиболее часто низкий уровень адипонектина в плазме крови коррелирует с возникновением рака пищеварительной системы (аденокарцинома пищевода, рак желудка, печени и колоректальный рак) и гормонально-зависимыми видами рака (постменопаузальный рак молочной железы, эндометрия и простаты) [26–29]. Исследования

на клеточных линиях колоректального рака подтвердили роль адипонектина в подавлении роста опухолевых клеток: в клеточных линиях HCT116, HT29 и LoVo адипонектин ингибировал пролиферацию, миграцию и клоногенность путем модуляции клеточного метаболизма и регуляции клеточного цикла [30, 31].

В то же время ряд других исследований поставил под сомнение концепцию, согласно которой адипонектин может функционировать в качестве опухолевого супрессора. Например, высокий уровень адипонектина ассоциирован с повышенным риском рака печени у пациентов с хроническим гепатитом С [32]. Кроме того, повышенный уровень адипонектина был зарегистрирован при раке поджелудочной железы [33].

Отмеченные противоречия в отношении роли адипонектина при онкологических заболеваниях, возможно, обусловлены различными клеточными и биохимическими механизмами. Адипонектин может оказывать как положительное, так и отрицательное влияние на опухолевую трансформацию и малигнизацию в силу того, что не столько уровень адипонектина в плазме крови оказывается принципиально важен, сколько экспрессия его рецепторов на поверхности клеток, опосредующих сигнальные эффекты этого адипокина. Так, было показано, что рецепторы адипонектина AdipoR1 и AdipoR2 экспрессируются на плазматической мембране как в образцах толстой кишки в норме, так и при колоректальном раке у человека [34]. Однако при онкологических заболеваниях уровень этих рецепторов повышается, что предполагает наличие компенсаторного механизма увеличения экспрессии рецепторов адипонектина в ответ на снижение его концентрации в плазме крови [35].

В свете исследований, продемонстрировавших корреляцию между метилированием промотора *CDH13* и повышенным риском возникновения колоректального рака, наши представления о механизмах участия адипонектина и его рецепторов в значительной степени изменились за последнее время. Было обнаружено, что именно aberrантное метилирование промотора *CDH13*, приводящее к снижению экспрессии Т-кадгерина, является потенциальным диагностическим биомаркером для раннего выявления колоректального рака [36]. Наши недавно полученные с помощью биоинформационного анализа данные секвенирования РНК на одиночных

клетках (single-cell RNA sequencing, scRNA-seq) в сочетании с иммуногистохимическим (ИГХ) окрашиванием образцов тканей кишечника человека в норме и при колоректальном раке позволили нам идентифицировать клетки, экспрессирующие Т-кадгерин (по нашим оригинальным данным, находящимся в процессе публикации). В нормальной ткани Т-кадгерин преимущественно экспрессировался в МСК и эндотелиальных клетках. Однако в тканях колоректального рака экспрессия Т-кадгерина была значительно снижена или практически отсутствовала и обнаруживалась только в эндотелии. Примечательно, что клетки, экспрессирующие Т-кадгерин, и клетки, экспрессирующие ADIPOR1/ADIPOR2 (рецепторы адипонектина), или ЛНП-рецептор, не колокализировались при ИГХ окрашивании и относились к разным субпопуляциям и клеточным типам при биоинформационном анализе. Эти данные позволяют высказать предположение о том, что МСК, экспрессирующие Т-кадгерин, выполняют уникальную функцию и, возможно, обеспечивают необходимую регуляцию и защиту от онкологической трансформации клеток, тем самым обеспечивая протективные эффекты адипонектина.

Заключение

На сегодняшний день, чтобы систематизировать многообразие предполагаемых функций Т-кадгерина, мы предлагаем концепцию молекулярного хаба. Во-первых, Т-кадгерин экспрессируется в компартменте стволовых/прогениторных клеток и регулирует адипогенную дифференцировку МСК в зрелые адипоциты, секретирующие адипонектин. Это, в свою очередь, влияет на системную концентрацию этого адипокина в плазме крови. Во-вторых, Т-кадгерин функционирует как сенсор уровня важнейших лигандов, специфическим рецептором которых он является, — ЛНП и адипонектина, обеспечивая механизм обратной связи и регулируя адипогенную дифференцировку МСК в адипоциты. В-третьих, Т-кадгерин может выполнять роль специфического рецептора для адипонектина, опосредуя его защитное действие и предотвращая злокачественные новообразования. Сдвиг равновесия между содержанием лигандов Т-кадгерина, ЛНП и адипонектином может приводить к дисбалансу процессов пролиферации и дифференцировки стволовых/прогениторных клеток. Таким образом, Т-кадгерин может являться тем самым недостающим звеном, связывающим процессы канцерогенеза и ожирения.

Литература

1. De Pergola G, Silvestris F. Obesity as a major risk factor for cancer. *J Obes.* (2013) 291546. DOI: 10.1155/2013/291546
2. Xiao M, Xu J, Wang W, Zhang B, Liu J, Li J, et al. Functional significance of cholesterol metabolism in cancer: from threat to treatment. *Exp Mol Med.* 2023;55(9):1982–1995. DOI: 10.1038/s12276-023-01079-w
3. Gu J, Zhu N, Li HF, Zhao TJ, Zhang CJ, Liao DF, et al. Cholesterol homeostasis and cancer: a new perspective on the low-density lipoprotein receptor. *Cell Oncol (Dordr).* 2022;45(5):709–728. DOI: 10.1007/s13402-022-00694-5
4. Rubina KA, Semina EV, Kalinina NI, Sysoeva VY, Balatskiy AV, Tkachuk VA. Revisiting the multiple roles of T-cadherin in health and disease. *Eur J Cell Biol.* 2021;100(7–8):151183. DOI: 10.1016/j.ejcb.2021.151183
5. Vestal DJ, Ranscht B. Glycosyl phosphatidylinositol-anchored T-cadherin mediates calcium-dependent, homophilic cell adhesion. *J Cell Biol.* 1992;119(2):451–461. DOI: 10.1083/jcb.119.2.451
6. McWilliam, J. Cadherins types, structure and functions. Nova Science Publishers, 2020. 415 p.
7. Рубина КА, Ткачук ВА Навигационные рецепторы в нервной и сердечно-сосудистой системах. *Biochemistry (Moscow)* (2015);80(10):1503–1521.
8. Achari AE, Jain SK. Adiponectin, a Therapeutic Target for Obesity, Diabetes, and Endothelial Dysfunction. *Int J Mol Sci.* 2017;18(6):1321. DOI: 0.3390/ijms18061321
9. Rubina KA, Semina EV, Balatskaya MN, Plekhanova OS, Tkachuk VA. Mechanisms of regulation of the targeted growth of nerves and vessels by components of the fibrinolytic system and gpi-anchored navigation receptors. *Neuroscience and Behavioral Physiology.* 2020;50(2): 217–230. DOI: 10.1007/s11055-019-00890-1
10. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature.* 2003;423(6941):762–769. DOI: 10.1038/nature01705
11. Sysoeva V, Semina E, Klimovich P, Kulebyakin K, Dzreyan V, Sotskaya E, et al. T-Cadherin Modulates Adipogenic Differentiation in Mesenchymal Stem Cells: Insights into Ligand Interactions. *Front Cell Dev Biol.* 2024;12:1446363. DOI: 10.3389/fcell.2024.1446363
12. Popov VS, Brodsky IB, Balatskaya MN, Balatskiy AV, Ozhimalov ID, Kulebyakina MA, et al. T-cadherin deficiency is associated with increased blood pressure after physical activity. *International Journal of Molecular Sciences.* 2023;24(18) :14204. DOI: 10.3390/ijms241814204
13. Cao Z, Umek RM, McKnight SL. Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev.* 1991;5(9):1538–1552. DOI: 10.1101/gad.5.9.1538
14. Moseti D, Regassa A, Kim WK. Molecular Regulation of Adipogenesis and Potential Anti-Adipogenic Bioactive Molecules. *Int J Mol Sci.* 2016;17(1):124. DOI: 10.3390/ijms17010124
15. Cristancho AG, Lazar MA. Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12(11):722–734. DOI: 10.1038/nrm3198
16. Riener MO, Nikolopoulos E, Herr A, Wild PJ, Hausmann M, Wiech T, et al. Microarray comparative genomic hybridization analysis of tubular breast carcinoma shows recurrent loss of the CDH13 locus on 16q. *Hum Pathol.* 2008;39(11):1621–1629. DOI: 10.1016/j.humpath.2008.02.016
17. Toyooka KO, Toyooka S, Virmani AK, Sathyanarayana UG, Euhus DM, Gilcrease M, et al. Loss of expression and aberrant methylation of the CDH13 (H-cadherin) gene in breast and lung carcinomas. *Cancer Res.* 2001;61(11):4556–4560.
18. Qian ZR, Sano T, Yoshimoto K, Asa SL, Yamada S, Mizusawa N, et al. Tumor-specific down-regulation and methylation of the CDH13 (H-cadherin) and CDH1 (E-cadherin) genes correlate with aggressiveness of human pituitary adenomas. *Mod Pathol.* 2007;20(12):1269–1277. DOI: 10.1038/modpathol.3800965
19. Ogama Y, Ouchida M, Yoshino T, Ito S, Takimoto H, Shiote Y, et al. Prevalent hypermethylation of the CDH13 gene promoter in malignant B cell lymphomas. *Int J Oncol.* 2004;25(3):685–691.

20. Sun D, Zhang Z, Van doN, Huang G, Ernberg I, Hu L. Aberrant methylation of CDH13 gene in nasopharyngeal carcinoma could serve as a potential diagnostic biomarker. *Oral Oncol.* (2007)43(1):82–87. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2006.01.007
21. Zucchini C, Bianchini M, Valvassori L, Perdichizzi S, Benini S, Manara MC, et al. Identification of candidate genes involved in the reversal of malignant phenotype of osteosarcoma cells transfected with the liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene. *Bone.* 2004;34(4):672–679. DOI: 10.1016/j.bone.2003.12.008
22. Philippova M, Joshi MB, Kyriakakis E, Pfaff D, Erne P, Resink TJ. A guide and guard: the many faces of T-cadherin. *Cell Signal.* 2009;21(7):1035–1044. DOI: 10.1016/j.cellsig.2009.01.035
23. Suehiro Y, Okada T, Okada T, Anno K, Okayama N, Ueno K, et al. Aneuploidy predicts outcome in patients with endometrial carcinoma and is related to lack of CDH13 hypermethylation. *Clin Cancer Res.* 2008;14(11):3354–3361. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4609
24. Maruyama R, Toyooka S, Toyooka KO, Harada K, Virmani AK, Zöchbauer-Müller S, et al. Aberrant promoter methylation profile of bladder cancer and its relationship to clinico-pathological features. *Cancer Res.* 2001;61(24):8659–8663.
25. Hebbard L, Ranscht B. Multifaceted roles of adiponectin in cancer. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2014;28(1):59–69. DOI: 10.1016/j.beem.2013.11.005
26. Dalamaga M, Diakopoulos KN, Mantzoros CS. The role of adiponectin in cancer: a review of current evidence. *Endocr Rev.* 2012;33(4):547–594. DOI: 10.1210/er.2011-1015
27. Hefetz-Sela S, Scherer PE. Adipocytes: impact on tumor growth and potential sites for therapeutic intervention. *Pharmacol Ther.* 2013;138(2):197–210. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2013.01.008
28. Otake S, Takeda H, Suzuki Y, Fukui T, Watanabe S, Ishihama K, et al. Association of visceral fat accumulation and plasma adiponectin with colorectal adenoma: evidence for participation of insulin resistance. *Clin Cancer Res.* 2005;11(10):3642–3646. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-1868
29. Ishikawa M, Kitayama J, Kazama S, Hiramatsu T, Hatano K, Nagawa H. Plasma adiponectin and gastric cancer. *Clin Cancer Res.* 2005;11(2 Pt 1):466–472.
30. Ye P, Xi Y, Huang Z, Xu P. Linking Obesity with Colorectal Cancer: Epidemiology and Mechanistic Insights. *Cancers (Basel).* 2020;12(6):1408. DOI: 10.3390/cancers12061408
31. Moon HS, Liu X, Nagel JM, Chamberland JP, Diakopoulos KN, Brinkoetter MT, et al. Salutory effects of adiponectin on colon cancer: in vivo and in vitro studies in mice. *Gut.* 2013;62(4):561–570. DOI: 10.1136/gutjnl-2012-302092
32. Arano T, Nakagawa H, Tateishi R, Ikeda H, Uchino K, Enooku K, et al. Serum level of adiponectin and the risk of liver cancer development in chronic hepatitis C patients. *Int J Cancer.* 2011;129(9):2226–2235. DOI: 10.1002/ijc.25861
33. Dalamaga M, Migdalis I, Fargnoli JL, Papadavid E, Bloom E, Mitsiades N, et al. Pancreatic cancer expresses adiponectin receptors and is associated with hypoleptinemia and hyperadiponectinemia: a case-control study. *Cancer Causes Control.* 2009;20(5):625–633. DOI: 10.1007/s10552-008-9273-z
34. Yoneda K, Tomimoto A, Endo H, Iida H, Sugiyama M, Takahashi H, et al. Expression of adiponectin receptors, AdipoR1 and AdipoR2, in normal colon epithelium and colon cancer tissue. *Oncol Rep.* 2008;20(3):479–483.
35. Byeon JS, Jeong JY, Kim MJ, Lee SM, Nam WH, Myung SJ, et al. Adiponectin and adiponectin receptor in relation to colorectal cancer progression. *Int J Cancer.* 2010;127(12):2758–2767. DOI: 10.1002/ijc.25301
36. Duan BS, Xie LF, Wang Y. Aberrant Methylation of T-cadherin Can Be a Diagnostic Biomarker for Colorectal Cancer. *Cancer Genomics Proteomics.* 2017;14(4):277–284. DOI: 10.21873/cgp.20038

Об авторах

Рубина Ксения Андреевна — д.б.н., профессор РАН, заведующий лабораторией морфогенеза и репарации тканей Факультета фундаментальной медицины Медицинского научно-образовательного института ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Сысоева Вероника Юрьевна — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории морфогенеза и репарации тканей Факультета фундаментальной медицины Медицинского научно-образовательного института ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Кулебякин Константин Юрьевич — к.б.н., доцент кафедры биохимии и регенеративной биомедицины Факультета фундаментальной медицины Медицинского научно-образовательного института МГУ имени М.В. Ломоносова; ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной эндокринологии Центра регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного института ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Семина Екатерина Владимировна — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории морфогенеза и репарации тканей Факультета фундаментальной медицины Медицинского научно-образовательного института ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Authors

Kseniya A. Rubina — Dr. Sci. (Biology), Professor of the Russian Academy of Sciences, Head of the Laboratory of Morphogenesis and Tissue Repair, Faculty of Medicine, Research and Education Medical Institute, Lomonosov Moscow State University

Veronika Yu. Sysoeva — Cand. Sci. (Biology), Senior Research Fellow, Laboratory of Morphogenesis and Tissue Repair, Faculty of Medicine, Research and Education Medical Institute, Lomonosov Moscow State University

Konstantin Yu. Kulebyakin — Cand. Sci. (Biology), Associate Professor, Department of Biochemistry and Regenerative Biomedicine, Faculty of Medicine, Research and Education Medical Institute, Lomonosov Moscow State University; Senior Research Fellow, Laboratory of Molecular Endocrinology, Centre for Regenerative Medicine, Research and Education Medical Institute, Lomonosov Moscow State University

Ekaterina V. Semina — Dr. Sci. (Biology), Senior Research Fellow, Laboratory of Morphogenesis and Tissue Repair, Faculty of Medicine, Research and Education Medical Institute, Lomonosov Moscow State University

Вклад авторов

К.А. Рубина — анализ литературы, написание текста.

В.Ю. Сысоева — анализ литературы, редактирование текста.

К.Ю. Кулебякин — анализ литературы.

Е.В.Семина — анализ литературы.

Author contribution statement

Kseniya A. Rubina — collecting and analyzing literary sources, writing of the article.

Veronika Yu. Sysoeva — collecting and analyzing literary sources, editing of the article.

Konstantin Yu. Kulebyakin — collecting and analyzing literary sources.

Ekaterina V. Semina — collecting and analyzing literary sources.

<https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-3-41-55>



Изменение внутриклеточной сигнализации, индуцированной норадреналином и серотонином, при старении мультипотентных мезенхимных стромальных клеток человека

Е.С. Чечехина¹, К.Ю. Кулебякин^{1,2}, О.А. Григорьева^{1,2}, А.Ю. Ефименко^{1,2},
П.А. Тюрин-Кузьмин^{1,*}

¹ Кафедра биохимии и регенеративной биомедицины Факультета фундаментальной медицины Медицинского научно-образовательного института ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Россия, 119192, Москва, Ломоносовский пр., 27к10

² Центр регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного института ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Россия, 119192, Москва, Ломоносовский пр., 27к10

Адрес для корреспонденции: tyurinkuzminpa@my.msu.ru

Аннотация

В данной работе мы исследовали изменения гормональной регуляции стволовых клеток жировой ткани человека при старении и то, как эти изменения ассоциированы с адипогенной дифференцировкой этих клеток. В качестве объекта изучения гормональной регуляции использовали постнатальные стволовые клетки жировой ткани — мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК). Мы показали, что как МСК с индуцированным репликативным старением, так и МСК, полученные от пожилых доноров, обладают сниженным адипогенным потенциалом, также у этих клеток нарушены механизмы регуляции адипогенной дифференцировки при действии норадреналина и серотонина. Изучение внутриклеточных сигнальных каскадов позволило установить, что при старении в МСК проявляется пониженная активация как цАМФ-зависимых, так и фосфоинозитид/кальций-зависимых сигнальных каскадов. Кальциевые ответы на стимуляцию норадреналином и серотонином оказались отложенными во времени в МСК с индуцированным репликативным старением. Таким образом, старение приводит к снижению регуляторного воздействия гормонов-регуляторов на адипогенную дифференцировку МСК человека.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, адипогенная дифференцировка, норадреналин, серотонин, внутриклеточная сигнализация, сенесценция, клеточное старение

Конфликт интересов: Ефименко Анастасия Юрьевна является членом редакционной коллегии 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.

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

Для цитирования: Чечехина Е.С., Кулебякин К.Ю., Григорьева О.А., Ефименко А.Ю., Тюрин-Кузьмин П.А. Изменение внутриклеточной сигнализации, индуцированной норадреналином и серотонином, при старении мультипотентных мезенхимных

стромальных клеток человека. *Регенерация органов и тканей*. 2024;2(3):41–55. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-2-41-55>

Поступила 06.07.2024

Обработана 16.08.2024

Принята к публикации 10.09.2024

Changes in noradrenaline- and serotonin-dependent intracellular signaling in senescent multipotent mesenchymal stromal cells

Elizaveta S. Chechekhina¹, Konstantin Yu. Kulebyakin^{1,2}, Olga A. Grigorieva^{1,2}, Anastasiya Yu. Efimenko^{1,2}, Pyotr A. Tyurin-Kuzmin¹ *

¹ Department of Biochemistry and Regenerative Biomedicine, Faculty of Medicine, Medical Research and Educational Institute, M.V. Lomonosov Moscow State University, Russia, 119192, Moscow, Lomonosovskiy ave., 27–10

² Center for Regenerative Medicine, Medical Research and Educational Institute, M.V. Lomonosov Moscow State University, Russia, 119192, Moscow, Lomonosovskiy ave., 27–10

Correspondence address: tyurinkuzminpa@my.msu.ru

Abstract

In this work, we studied how hormonal regulation of human adipose tissue stem cells changes during aging and how changes in hormonal regulation are associated with adipogenic differentiation of these cells. Postnatal adipose tissue stem cells — multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs), were used as an object for studying hormonal regulation. We showed that both MSCs with induced replicative senescence and MSCs obtained from elderly donors have a reduced adipogenic potential. These cells have impaired mechanisms of regulation of adipogenic differentiation under noradrenaline and serotonin. The study of intracellular signaling cascades allowed us to establish that during senescence, MSCs exhibit reduced activation of both cAMP-dependent and phosphoinositide/calcium-dependent signaling cascades. Moreover, calcium responses to the addition of these hormones were delayed in time in MSCs with induced replicative aging. Thus, senescence leads to a decrease in the regulatory effect of hormones on the adipogenic differentiation of human MSCs.

Keywords: multipotent mesenchymal stromal cells, adipogenic differentiation, noradrenaline, serotonin, intracellular signaling, senescence

Conflict of interest: Efimenko Anastasia Yuryevna has been a member of the editorial board of the journal “Regeneration of organs and tissues” since 2023, but has nothing to do with the decision to publish this article. The article has undergone the peer-review procedure adopted by the journal. The authors have not declared any other conflicts of interest.

Funding: The study was supported by Russian Science Foundation, grant #19-75-30007, <https://rscf.ru/project/19-75-30007/>

For citation: Chechekhina E.S., Kulebyakin K.Yu., Grigorieva O.A., Efimenko A.Yu., Tyurin-Kuzmin P.A. Changes in noradrenaline- and serotonin-dependent intracellular signaling in senescent multipotent mesenchymal stromal cells. *Tissue and organ regeneration*. 2024;2(3):41–55. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-2-41-55>

Received 06.07.2024

Revised 16.08.2024

Accepted 10.09.2024

Список сокращений:**МСК** — мультипотентные мезенхимные стромальные клетки**ИБМХ** — изобутиметилксантин**Введение**

В последние десятилетия метаболические болезни, ассоциированные с нарушениями функционального состояния жировой ткани, приобрели характер пандемий. Проблема ожирения получила крайне широкое распространение во многих странах мира, в том числе и в России. Ожирение приводит к развитию таких тяжелейших и во многих случаях неизлечимых заболеваний, как сахарный диабет 2-го типа и метаболический синдром, серьезных заболеваний дыхательных путей, в том числе бронхиальной астмы, заболеваний органов пищеварения, нарушений половой и репродуктивной функций. Кроме того, при ожирении резко повышается вероятность возникновения некоторых видов раковых заболеваний [1, 2]. Недостаток жировой ткани также ведет к крайне негативным метаболическим последствиям в связи с недостаточной продукцией гормонов жировой ткани — адипокинов и дистрофией висцерального жира и связанными с ней нарушениями в работе внутренних органов.

Поддержание здорового состояния жировой ткани осуществляется за счет баланса между процессами липолиза и липогенеза, а также обновления клеток жировой ткани. Липидный баланс регулируется гормонами и паракринными факторами, действующими на адипоциты. Ключевую роль в поддержании гомеостаза жировой ткани играют резидентные мезенхимные стволовые/стромальные клетки (МСК) [3, 4]. С одной стороны, МСК выполняют регуляторную функцию, управляя процессами репарации и регенерации путем паракринной секреции факторов роста, цитокинов и других биологически активных молекул [5, 6]. С другой — МСК под действием специфических стимулов вступают в адипогенную дифференцировку, что приводит к стабильному и медленному обновлению жировой ткани, в процессе которой примерно 10% адипоцитов заменяется на новые каждый год [7].

МСК, являясь важными регуляторами функционирования ткани, сами подвержены строгой нейрогуморальной регуляции. МСК непо-

средственно контактируют с симпатическими нейронами, образуя с ними подобие синапсов, и, располагаясь периваскулярно, воспринимают гормональный фон организма [8]. Таким образом, под управлением гормонов, циркулирующих в крови, и нейромедиаторов симпатической нервной системы МСК осуществляют локальную регуляцию ключевых физиологических функций жировой ткани или сами дифференцируются в компоненты этой ткани.

Гормон и нейромедиатор норадреналин является ключевым регулятором функциональной активности МСК, которые экспрессируют все основные изоформы адренорецепторов, различные субтипы $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ - и β -адренорецепторов [9, 10], непосредственно взаимодействуют с симпатическими нейронами и способны отвечать на катехоламины в крови [8]. Норадреналин усиливает расщепление липидов в адипоцитах, подавляет адипогенную дифференцировку МСК, индуцирует превращение белых адипоцитов и МСК в бежевые адипоциты, которые, расщепляя жир, производят в организме тепло [11]. Серотонин в периферических тканях выступает в качестве гормона и паракринного фактора. Большая часть серотонина, синтезируемого вне мозга, производится энтерохромаффинными клетками кишечника и выделяется в кровь. Далее часть серотонина накапливается тромбоцитами в секреторных гранулах, а часть — действует как гормон, регулируя клетки-мишени [12]. Как мы ранее показали, МСК экспрессируют функционально активные рецепторы серотонина, в частности 5-НТ2b, 5-НТ6 и 5-НТ7 [13, 14]. Серотонин действует на функциональную активность МСК схожим с инсулином образом. Серотонин усиливает накопление жировых капель в зрелых адипоцитах, подавляет адипогенную дифференцировку МСК, превращение адипоцитов и МСК в бежевые адипоциты [15]. Таким образом, норадреналин с одной стороны и серотонин с другой являются гормонами-антагонистами на функциональном уровне для МСК. Точный баланс регуляторной активности различных гормонов — регуляторов функциональной активности МСК, а также, что не менее

важно, адекватного реагирования клеток-мишеней на них является залогом здорового функционирования жировой ткани.

Одним из основных факторов, приводящих к нарушению гомеостаза жировой ткани, является клеточное старение, или сенесценция. Под этим термином в первую очередь понимается так называемое «репликативное старение», характеризующееся прогрессирующей утратой клетками способности к делению, а также сопряженное с нарушением основных клеточных функций [16]. Считается, что ведущим процессом, определяющим прогрессию клеточного старения, является остановка деления клеток [17, 18]. В связи с этим именно МСК, обеспечивающие обновление жировой ткани за счет регулярного деления, в первую очередь подвержены старению. Накопление сенесцентных признаков в МСК ведет к значительному нарушению как паракринной активности этих клеток, так и их дифференцировочного потенциала [19]. В нашей лаборатории ранее было показано, что старение МСК может нарушать продукцию ими ангиогенных факторов [20]. Ослабление регуляторной и регенеративной функции МСК приводит к нарушению в функционировании всей ткани и может обуславливать развитие ряда патологий, ассоциированных с возрастом [21].

Материалы и методы

Выделение и культивирование МСК

Образцы подкожной жировой ткани для выделения МСК забирали во время проведения хирургических операций согласно разрешению локального этического комитета МНОИ МГУ имени М.В. Ломоносова (№ 4 от 04.06.2018) при условии подписания пациентом добровольного информированного согласия. Популяцию стволовых клеток жировой ткани МСК мы выделяли из подкожной жировой ткани, взятой из области живота или области бедренного сустава здоровых доноров разного возраста. Образцы забирали в виде биоптата. Критерием исключения служило наличие в анамнезе ожирения, хронических сердечно-сосудистых заболеваний, диабета или инфекционных заболеваний. МСК выделяли согласно ранее описанному протоколу [22, 23]. Кроме того, использовали иммортализованные МСК линии ASC-52Telo (ATCC).

МСК культивировали на чашках Петри для адгезионных культур в полной среде роста (DMEM

с низким содержанием глюкозы 1 г/л («ПанЭко», Россия), 10% фетальной бычьей сыворотки (HyClone, США), 1% раствора антибиотика-антимикотика (HyClone, США) в инкубаторе при 37 °C и с 5% CO₂. МСК пассировали с помощью растворов Версена и трипсина («ПанЭко», Россия). Первичную культуру МСК культивировали и использовали в экспериментах в течение 7-го пассажа, за исключением случаев намеренного получения репликативно старых клеток. Часть клеточных культур замораживали для возможности повторной работы с этой же культурой в дальнейшем при необходимости.

Получение сенесцентных МСК

Для получения сенесцентных МСК мы использовали два альтернативных подхода (рис. 1А, В). В одном из них мы забирали жировую ткань от доноров разного возраста: в первую группу входили доноры в возрасте 20–40 лет, во вторую группу — доноры старше 70 лет в другом — мы культивировали клетки в течение продолжительного времени (до 10–12 пассажей).

Адипогенная дифференцировка МСК

Для оценки клеточных эффектов гормонов — регуляторов адипогенной дифференцировки мы регистрировали процесс дифференцировки в динамике. Адипогенную дифференцировку индуцировали при помощи дифференцировочной смеси, состоящей из инсулина (10 нг/мл, Sigma, США), ингибитора фосфодиэстеразы изобутиметилксантина (IBMX, 0,5 мМ, Abcam, США) и глюкокортикоида дексаметазона (1 мкМ, Sigma, США), добавленных в полную среду роста (см. раздел «Выделение и культивирование МСК»). На протяжении дифференцировки дифференцировочную среду обновляли каждые 3–4 дня, в ней содержались все компоненты дифференцировочного коктейля. Норадреналином и серотонином мы обрабатывали клетки в течение 1 часа перед запуском адипогенной дифференцировки, после чего клетки отмывались от гормонов. Сама дифференцировка проходила в отсутствие действующих норадреналина и серотонина. Жировые капли хорошо видны в проходящем свете при использовании фазово-контрастной микроскопии. Благодаря этому процесс дифференцировки можно наблюдать под микроскопом без дополнительной окраски клеточных структур. В то же время мы подтвердили, что капли, наблюдаемые нами, действительно являются жировыми

каплями в цитоплазме. Для этого мы дополнительно окрашивали их при помощи специфического красителя нейтральных жиров OilRed O (данные не приведены). Долю дифференцированных клеток считали как отношение числа клеток, содержащих жировые капли, в поле зрения микроскопа, к общему числу клеток в данном поле зрения. Для статистической обработки брали не менее 3 полей зрения в каждом эксперименте. На протяжении разных дней наблюдения использовали для подсчета случайные поля зрения.

Определение уровня цАМФ при помощи иммуноферментного анализа

Для определения уровня цАМФ мы проводили иммунофлуоресцентный анализ с помощью *cAMP Direct Immunoassay Kit (ab138880)* по протоколу производителя. За сутки до эксперимента клетки рассаживали с плотностью 3×10^4 – 10^6 на лунку в 96-луночный планшет. Используя 100 мкМ *cAMP standards*, разводили стандарты в различных концентрациях для построения калибровочной прямой. Проводили полную аспирацию среды роста в чашках. Добавляли 100 мкл *Cell lysis buffer* на лунку. Оставляли на 10 минут при комнатной температуре. Центрифугировали в течение 5 минут при 4 °C на высокой скорости для удаления нерастворимого материала. Собирали и перемещали в новую пробирку, после чего убирали на лед. Затем добавляли пробы и стандарты в 96-луночный планшет, после чего оставляли на 5–10 минут при комнатной температуре. Готовили раствор цАМФ, конъюгированного с пероксидазой хрена, $1 \times$ *HRP-cAMP working solution* путем разбавления $50 \times$ стокового *HRP-cAMP раствора в Assay buffer*. Перемешивали и оставляли на льду. Добавляли 25 мкл приготовленного раствора в каждую лунку. Инкубировали течение 2-х часов при комнатной температуре на шейкере. Аспирировали содержимое лунок. Далее промывали 4 раза $1 \times$ раствором для промывки (*Wash solution*) 200 мкл на лунку. Подготавливали раствор красителя *AbRed working solution* путем разбавления 50 мкл $200 \times$ *AbRed stock solution* и 11,5 мкл пероксида водорода в 10 мл *Substrate Buffer*. Добавляли 100 мкл *AbRed working solution* в каждую лунку. Инкубировали при комнатной температуре 10 минут в темном месте. Измеряли флуоресценцию ($E_x/E_m = 540/590$ nm) и визуализировали результаты с помощью планшетного ридера с флуоресцентным модулем PerkinElmer EnVision (США).

Регистрация активности протеинкиназы А на уровне единичных клеток при помощи генетически кодируемого биосенсора PKA-SPARK

Для регистрации активации протеинкиназы А с помощью биосенсора PKA-Spark мы использовали трансдуцированные биосенсором immortalized МСК, описанные нами ранее [24]. Используемая культура клеток была получена на основе коммерчески доступной линии immortalized МСК человека ASC52-telo. Эти клетки постоянно экспрессируют биосенсор в результате лентивирусной трансдукции. Клетки высаживали в 24- или 48-луночных планшетах при низкой плотности, чтобы предотвратить межклеточные коммуникации во время визуализации сигнала. Перед началом эксперимента ростовую среду меняли на сбалансированный солевой раствор Хенкса («ПанЭко», Россия) с 20 мМ ХЕПЕС (HyClone, Logan, UT, США). Для анализа функциональной активности на клетки воздействовали 1 μ М норадреналина (Abcam, США), 10 μ М серотонина (Abcam, США), 1 μ М активатора аденилатциклаза форсколина (Abcam, США) или 100 μ М прямого активатора протеинкиназы А 6-Bnz-cAMP (Biolog, Германия). Активацию протеинкиназы А измеряли в отдельных клетках с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse Ti, оснащенного объективом CFI Plan Fluor DLL 10X/0.3 (Nikon, Япония) и цифровой охлаждаемой монохромной CCD-камерой Nikon DS-Qi1 (Nikon, Япония). Для увеличения количества анализируемых клеток использовали одновременное измерение 6×6 полей зрения в режиме Large Image. Видеозаписи анализировали с помощью программ NIS-Elements (Nikon) и ImageJ (NIH, Bethesda, MD, США). В связи с тем что для регистрации активации протеинкиназы А необходимо, чтобы биосенсор PKA-Spark экспрессировался в клетках на высоком уровне [24], в данном эксперименте анализировали только МСК, экспрессирующие PKA-Spark на уровне, превышающем установленный порог. Сигнал PKA-Spark рассчитывали как сумму площадей всех флуоресцентных капель после вычитания фона с помощью инструмента «Rolling-ball» (программа ImageJ, Bethesda, MD, США).

Регистрация внутриклеточной кальциевой сигнализации на уровне одиночных клеток

Кальциевые ответы МСК на гормоны регистрировали на уровне одиночных клеток. За 1 день до эксперимента клетки высаживали на 48-луночный планшет в плотности 15–30% от монослоя. Такая плотность посадки обусловлена

необходимостью анализа чувствительности к норадреналину отдельных клеток. В монослое МСК образуют щелевые контакты, что способствует перетеканию ионов и вторичных посредников и распространению воспринимаемого сигнала на соседние клетки [25, 26]. Клеточные ответы МСК на норадреналин и серотонин определяли по изменению концентрации кальция в клетках. Для этого клетки окрашивали с помощью проникающего через мембрану красителя Fluo-8 AM, который после отщепления ацетометильных групп становится чувствительным к изменениям внутриклеточного уровня кальция (Abcam, Великобритания, ab142773). Чтобы снизить уровень аутофлуоресценции среды, перед окрашиванием клетки промывали 3 раза с помощью 0,3 мл раствора Хэнкса. Затем добавляли Fluo-8 AM в концентрации 4×10^{-6} моль/л в растворе Хэнкса с 20 мМ ХЕПЕС. Клетки окрашивали в течение 1 часа в инкубаторе при 37 °C и 5% CO₂. Флуоресценцию клеток регистрировали с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse Ti2, оснащенного объективом CFI Plan Fluor DLL 10X/0.3 (Nikon, Япония) и sCMOS камерой Photometrics Kinetix (Teledyne Photometrics, США). Для регистрации кальциевых ответов на добавление норадреналина на уровне одиночных клеток сначала записывали базальную активность клеток в течение 5–10 минут. Затем, не останавливая записи фильма, прямо под микроскопом добавляли к клеткам раствор гормона в 2-кратной концентрации и в объеме, равном объему среды над клетками, для эффективного перемешивания сред. Далее записывали фильм в течение необходимого времени (обычно дополнительно 10–15 мин). Изменение концентрации внутриклеточного кальция детектировали индивидуально в каждой клетке по изменению интенсивности флуоресценции Fluo-8 относительно состояния той же клетки перед добавлением гормона с помощью программного обеспечения NIS-Elements (Nikon, Япония).

Статистический анализ

Статистический анализ полученных результатов проводили с использованием программного обеспечения SigmaPlot 12.5 (Systat Software Inc., США). Нормальность распределения данных оценивали с помощью критерия Шапиро — Уилка. Результаты представляли как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего. Для сравнения нормально распределенных данных использовали *t*-критерий Стьюдента для двух

независимых групп. Для ненормально распределенных данных использовали тест Манна — Уитни для двух независимых групп. Сравнение трех и более независимых групп выполняли с помощью однофакторного дисперсионного анализа (One-way ANOVA). Чтобы определить, какие именно пары средних значений статистически значимо различаются, использовали тест Даннета. Статистическую значимость определяли как значение $p < 0,05^*$.

Результаты и их обсуждение

В данной работе мы исследовали, как изменяется гормональная регуляция стволовых клеток жировой ткани человека при старении и как эти изменения ассоциированы с адипогенной дифференцировкой МСК. При старении, согласно литературным данным, меняется морфология МСК, происходят хромосомные aberrации и индуцируется клеточное старение [27, 28]. Как видно на рисунке 1Г, Д, клетки, полученные от пожилого донора, имеют сильно измененную морфологию. Они оказываются существенно более распластанными, в цитоплазме появляются высококонтрастные включения, клетки медленнее растут и у них в большей степени развито контактное торможение, о чем свидетельствует то, что клетки не наползают друг на друга, а равномерно заполняют свободное пространство. В то же время известно, что способность к формированию клеточных пластов является важной чертой, характерной для МСК, которая в настоящее время используется в некоторых подходах регенеративной медицины [29]. Таким образом, МСК при старении изменяют как морфологию, так и функциональный фенотип.

Адипогенная дифференцировка МСК

На рисунке 2 показана скорость адипогенной дифференцировки МСК, оцененная по появлению клеток с липидными включениями в цитоплазме. Как видно на рисунке 2А, старение клеток, как хронологическое, так и репликативное, снижает эффективность и скорость адипогенной дифференцировки. На рисунках 2Б–Г показано влияние старения клеток на регуляторное воздействие норадреналина и серотонина на адипогенную дифференцировку МСК. Видно, что не только снижается эффективность дифференцировки нестимулированных клеток, но и пропадает регуляторное воздействие этих гормонов. При этом выявляется заметная гетерогенность функциональных свойств МСК, выделенных от разных доноров. В связи с этим

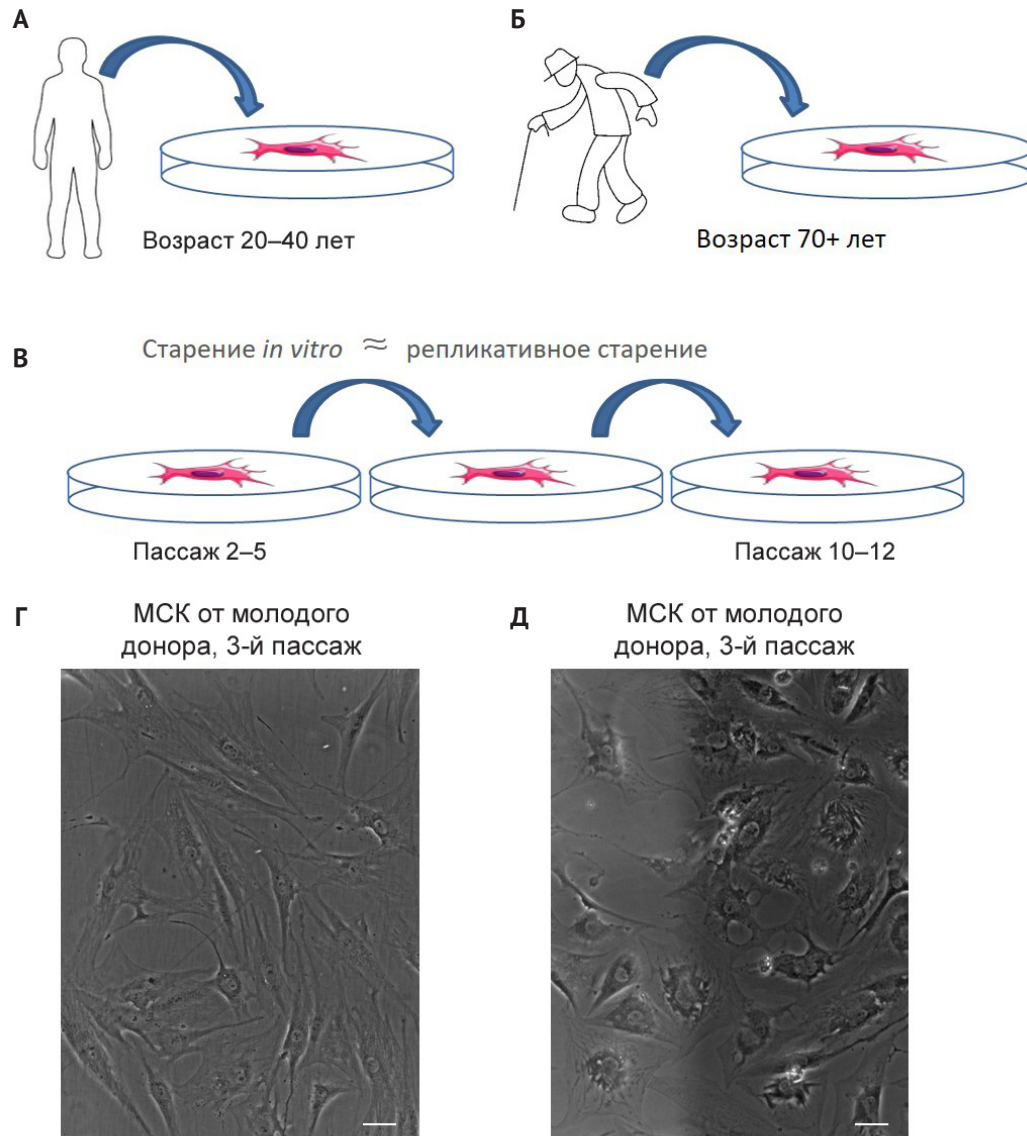


Рис. 1. А–В. Описание методик получения клеток, ассоциируемых с молодыми и «старыми» МСК: А – молодые МСК выделяли из жировой ткани пациентов 20–40 лет без хронических заболеваний; Б – МСК пожилых доноров выделяли из жировой ткани пациентов старше 70 лет; В – дополнительно использовали модель репликативного старения, при которой клетки культивировали до 10–12 пассажей; Г–Д: микрофотографии МСК 3-го пассажа, полученных от молодого (Г) и пожилого (Д) доноров, в проходящем свете (масштабный отрезок 20 мкм)

Fig. 1. A–B. Description of the methods for obtaining cells associated with young and senescent MSCs: A – young MSCs were isolated from the adipose tissue of patients 20–40 years old without chronic diseases; Б – MSCs from elderly donors were isolated from the adipose tissue of patients over 70 years old; В – A replicative aging model was additionally used, in which the cells were cultured for up to 10–12 passages. Г–Д. Microphotographs of passage 3 MSCs obtained from young (Г) and elderly (Д) donors in phase contrast (scale bar 20 μ m)

при усреднении абсолютных значений числа дифференцированных клеток в поле зрения микроскопа возникает очень большая вариабельность результатов. В МСК ранних пассажей, полученных от молодых доноров, серотонин и норадреналин оказывают заметное и закономерное влияние на адипогенную дифферен-

цировку: норадреналин подавляет ее, а серотонин — усиливает. В то же время в состарившихся клетках, как полученных путем репликативного старения, так и в клетках, полученных от пожилых доноров, регуляторное действие норадреналина и серотонина либо пропадает, либо становится неоднозначным и непредсказуемым.

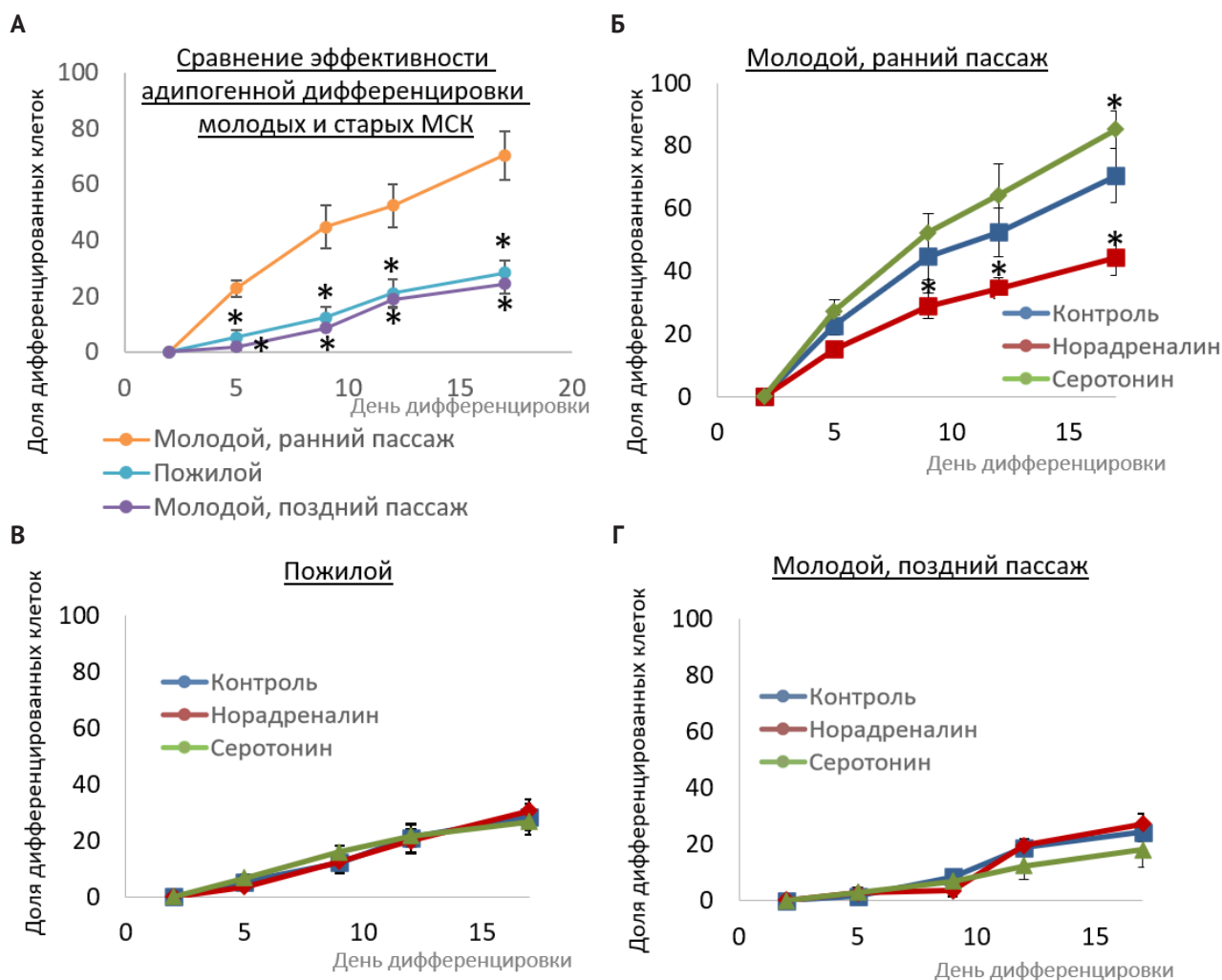


Рис. 2. Влияние норадреналина и серотонина на динамику адипогенной дифференцировки МСК: А — динамика адипогенной дифференцировки в контрольных условиях МСК, полученных от молодых пациентов, на ранних пассажах (оранжевая кривая, «Молодой, ранний пассаж»), МСК, полученных от пожилых пациентов, (голубая кривая, «Пожилой») и МСК, полученных от молодых пациентов, на поздних пассажах (фиолетовая кривая, «Молодой, поздний пассаж»); Б — динамика адипогенной дифференцировки МСК, полученных от молодых пациентов, в контрольных условиях (синяя кривая), после обработки 1 μM норадреналина (бордовая кривая) или 10 μM серотонина (зеленая кривая); В — динамика адипогенной дифференцировки МСК, полученных от молодых пациентов, репликативно состаренных (поздний пассаж). Концентрации добавленных гормонов и цветовая кодировка графиков те же; Г — динамика адипогенной дифференцировки МСК, полученных от пожилых пациентов. Концентрации добавленных гормонов и цветовая кодировка графиков те же. Данные представлены как среднее $\pm$ ст. ош., $n = 4-9$, * $p < 0,05$ относительно молодых МСК в А и относительно контрольных условий в Б. Сравнение трех независимых групп выполняли с помощью однофакторного дисперсионного анализа с последующим применением теста Даннета. Для получения результатов в каждой группе использовали МСК, выделенные от 2–4 различных доноров

Fig. 2. Effect of noradrenaline and serotonin on the dynamics of adipogenic differentiation of MSCs: A — dynamics of adipogenic differentiation in control conditions of MSCs obtained from young patients at early passages (orange curve, «Young, early passage»), MSCs obtained from elderly patients (blue curve, «Elderly») and MSCs obtained from young patients at late passages (purple curve, «Young, late passage»); Б — dynamics of adipogenic differentiation of MSCs obtained from young patients under control conditions (blue curve), after treatment with 1 μM noradrenaline (burgundy curve) or 10 μM serotonin (green curve); В — dynamics of adipogenic differentiation of MSCs obtained from young patients, replicatively aged (late passage). The concentrations of added hormones and the color coding of the graphs were the same; Г — the dynamics of adipogenic differentiation of MSCs obtained from elderly patients. The concentrations of added hormones and the color coding of the graphs were the same. Data are presented as mean $\pm$ standard deviation, $n = 4-9$, * $p < 0.05$ relative to young MSCs in A and relative to control conditions in B. Comparison of three independent groups was performed using one-way ANOVA followed by Dunnett's test. To obtain the results, MSCs isolated from 2–4 different donors were used in each group

Измерение сигнализации в МСК

Для выяснения того, какие из сигнальных каскадов, активируемых гормонами — модуляторами адипогенной дифференцировки МСК, норадреналином и серотонином, изменяются при клеточном старении, мы проанализировали ключевые сигнальные каскады, запускаемые рецепторами этих гормонов. Различные изоформы семидоменных рецепторов норадреналина и серотонина могут быть ассоциированы с сигнальными каскадами, приводящими либо к увеличению уровня внутриклеточного кальция, либо к изменению уровня внутриклеточного цАМФ. МСК представляют собой гетерогенную популяцию клеток [30]. Как мы ранее установили на примере норадреналина, не все клетки в популяции МСК единообразно отвечают на действие этого гормона. Несмотря на то что адренергические рецепторы экспрессируются практически на всех отдельных клетках популяции МСК, функционально активными оказываются рецепторы лишь в 7% клеток [9, 10]. Клетки, не отвечающие на норадреналин, тем не менее способны отвечать на другие гормоны [13]. В связи с этим измерение сигнальных процессов в МСК крайне желательно производить на уровне одноклеточных клеток.

цАМФ-зависимая сигнализация

Бета-адренорецепторы, а также 4, 6 и 7-я изоформы серотониновых рецепторов (HTR4, HTR6, HTR7) ассоциированы с тримерным Gs-белком, который активирует аденилатциклазу и синтез цАМФ. Одной из ключевых сигнальных мишеней цАМФ является протеинкиназа А. Активность этого сигнального каскада в данной работе мы регистрировали на двух уровнях. Во-первых, при помощи иммуноферментного анализа мы определили, как изменяется уровень цАМФ после стимуляции клеток гормонами серотонином и норадреналином. Мы выяснили, что в МСК, полученных от молодых доноров, на ранних пассажах в ответ на норадреналин и серотонин повышается внутриклеточный уровень цАМФ (рис. 3). При этом в клетках, подверженных клеточному старению, как репликативному, так и хронологическому, повышения цАМФ не происходит. Более того, в клетках, полученных от пожилых доноров, наблюдается тенденция к снижению уровня цАМФ, что может свидетельствовать о преимущественной активации альфа2-адренорецепторов, ассоциированных с Gi-тримерным белком, подавляющим активацию аденилатциклазы. Таким образом, при клеточном старении возникают нарушения активации

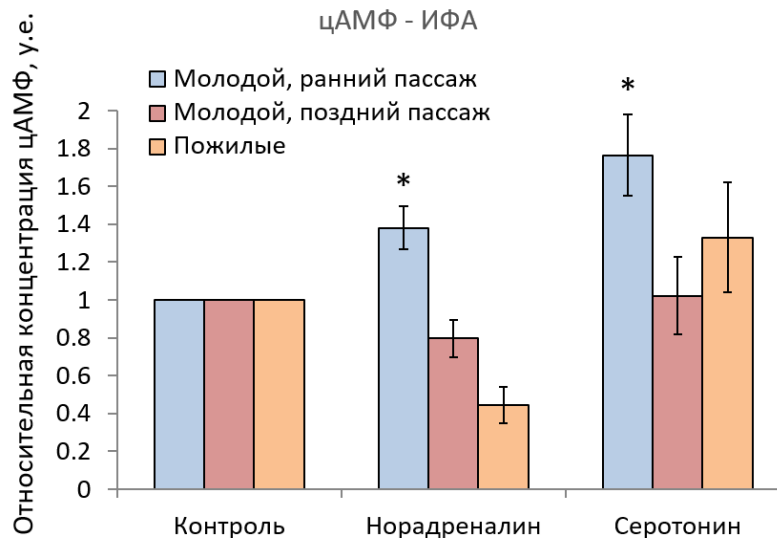


Рис. 3. Измерение уровня цАМФ в молодых и старых МСК после воздействия норадреналина и серотонина. Данные нормированы на значения цАМФ, определенные для того же донора в контрольных условиях. $N = 3$, среднее $\pm$ ст. ош., * $p < 0,05$. Сравнение трех независимых групп выполняли с помощью однофакторного дисперсионного анализа с последующим применением теста Даннета. Для получения результатов в каждой группе использовали МСК, выделенные от 2 различных доноров

Fig. 3. Measurement of cAMP levels in young and senescent MSCs after exposure to noradrenaline and serotonin. Data were normalized to cAMP values measured for the same donor under control conditions. $N = 3$, mean $\pm$ standard deviation, * $p < 0.05$. Three independent groups were compared using one-way ANOVA followed by Dunnett's test. MSCs isolated from 2 different donors were used in each group to obtain results

аденилатциклазной системы в ответ на действие как серотонина, так и норадреналина.

Наблюдаемые нарушения цАМФ-зависимой сигнализации могут быть следствием изменения паттерна экспрессии рецепторов к изучаемым гормонам, или же может происходить нарушение передачи внутриклеточного сигнала. Для проверки второй гипотезы мы регистрировали активацию протеинкиназы А в ответ на действие норадреналина и серотонина

на уровне одиночных клеток. Для этого мы использовали флуоресцентный генетически кодируемый биосенсор PKA-Spark, который чувствителен к активации протеинкиназы А. Биосенсор PKA-Spark содержит в своем составе пептидную последовательность, которую специфически фосфорилирует протеинкиназа А. При фосфорилировании молекулы биосенсора подвергаются олигомеризации, сигнал флуоресцентного белка обратимо меняет локализацию в цитоплазме, собираясь в агрегаты,

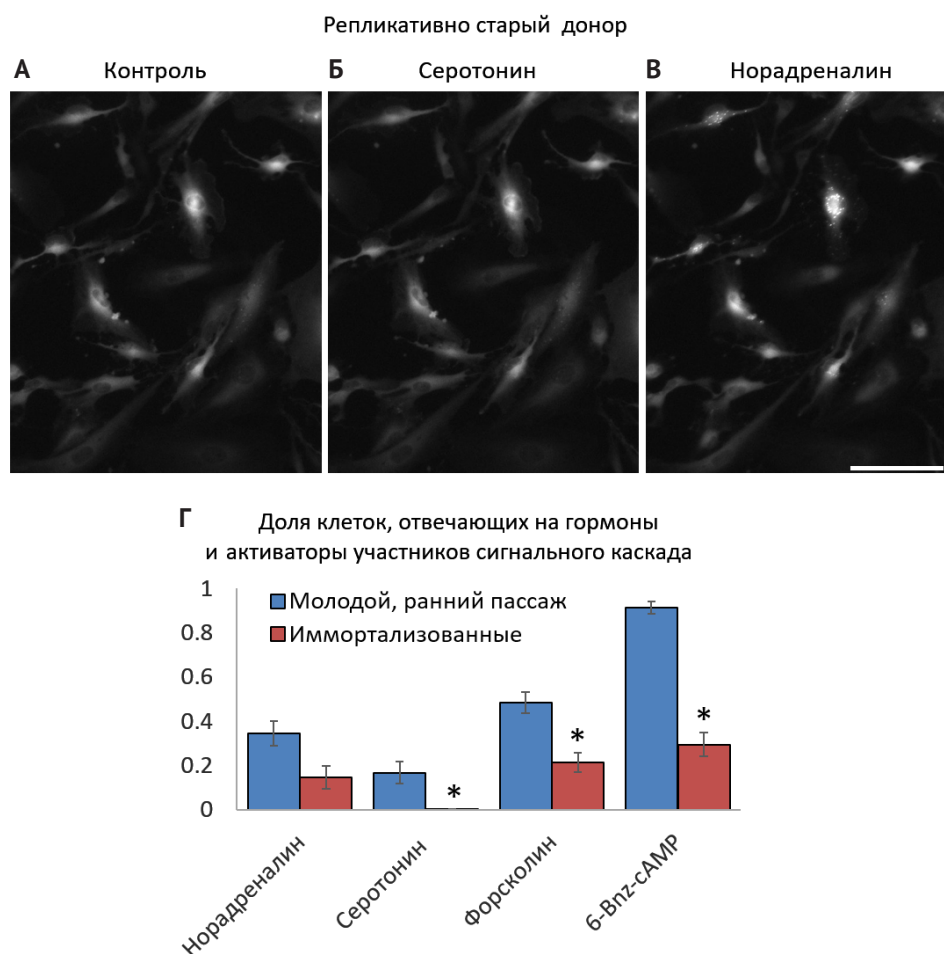


Рис. 4. Регистрация активации протеинкиназы А в МСК жировой ткани человека с помощью биосенсора PKA-Spark: А–В. Репрезентативные изображения клеток immortalized MSC линии ASC52-telo в контрольных условиях (А) и в ответ на добавление серотонина (Б) и норадреналина (В). Клетки последовательно были простимулированы сначала серотином, потом норадреналином. Г — статистическая обработка результатов измерения активации протеинкиназы А в ответ на действие норадреналина, серотонина, активатора аденилатциклаз форсколина (1 μ M) и прямого активатора протеинкиназы А 6-Bnz-cAMP (100 μ M). $N = 3$, среднее $\pm$ ст. ош. ср., * $p < 0,05$. Для сравнения двух групп с ненормально распределенными данными использовали тест Манна — Уитни для двух независимых групп

Fig. 4. Registration of protein kinase A activation in human adipose-derived MSCs using the PKA-Spark biosensor: А–В. Representative images of immortalized ASC52-telo MSC cells under control conditions (А) and in response to the addition of serotonin (Б) and noradrenaline (В). The cells were sequentially stimulated with serotonin and noradrenaline. Г — statistical analysis of the results of measuring protein kinase A activation in response to noradrenaline, serotonin, the adenylate cyclase activator forskolin (1 μ M), and the direct activator of protein kinase A 6-Bnz-cAMP (100 μ M). $N = 3$, mean $\pm$ SEM, * $p < 0.05$. The Mann–Whitney test for two independent groups was used to compare two groups with non-normally distributed data

тем самым позволяя наблюдать за активацией протеинкиназы А [31].

Мы определили функциональную гетерогенность цАМФ-зависимых ответов МСК, полученных от молодых доноров, и клеток с индуцированным репликативным старением. МСК, полученные от пожилых пациентов, подвергались вирусной трансдукции существенно хуже, чем молодые МСК. Кроме того, попытка получения репликативно старых МСК из клеток, в которых был экспрессирован биосенсор, также не увенчалось успехом, поскольку экспрессия биосенсора подавлялась в МСК по мере их культивирования. В качестве компромиссной модели клеток с репликативным старением мы взяли иммортализованные МСК, которые, как мы ранее описали, по ряду направлений проявляют признаки репликативного старения, несмотря на экспрессию в них теломеразы [32, 33].

Как показано на рисунке 4, молодые МСК отвечают повышением внутриклеточного уровня кальция и на норадреналин, и на серотонин. Доля клеток популяции, отвечающих на норадреналин, в репликативно старых клетках более чем в два раза ниже, чем в молодых МСК. Более того, на серотонин репликативно старые клетки не отвечают вовсе. Как мы ранее показали, в популяции МСК присутствует гетерогенность по чувствительности к цАМФ-зависимым гормонам, связанная с различной экспрессией аденилатциклазы [24]. Более чем в половине клеток популяции не экспрессируется ни одна из 10 изоформ аденилатциклазы [24]. Такие клетки не демонстрировали ответ на активатор аденилатциклазы форсколин, но отвечали на прямой активатор протеинкиназы А негидролизуемый аналог цАМФ 6-Bnz-cAMP. По сравнению с МСК ранних пассажей репликативно старые МСК проявляли существенно более слабый ответ на форсколин и, что более важно, показывали небольшое число клеток, отвечающих на 6-Bnz-cAMP. Это, по-видимому, означает, что большая часть репликативно старых клеток лишена не только функциональной аденилатциклазы, но еще и протеинкиназы А.

Кальциевая сигнализация

Помимо цАМФ-зависимых сигнальных каскадов, норадреналин и серотонин активируют также кальциевую сигнализацию. Альфа1-адренорецепторы и серотониновые 5HT₂ рецепторы, экспрессирующиеся в МСК, ассоциированы

с Gq-тримерным белком, который запускает фосфоинозитидный обмен, синтез IP₃ и выход кальция из внутриклеточных депо [10, 34]. Кроме того, Gi-ассоциированные семидоменные рецепторы могут активировать кальциевую сигнализацию посредством активации $\beta\gamma$ -субъединиц (при этом запускается как выход кальция из внутриклеточных депо при активации фосфолипазы C, так и вход кальция извне за счет $\beta\gamma$ -зависимой активации кальциевых каналов плазматической мембраны).

Изменение внутриклеточного уровня кальция мы регистрировали с помощью флуоресцентного кальциевого зонда Fluo8. Как показано на рисунке 5А, не все клетки отвечали на норадреналин кальциевой сигнализацией. Доля функционально активных клеток составляла порядка 40%. При этом если на поздних пассажах МСК молодых доноров чувствительность к норадреналину существенно не изменялась, то в клетках, полученных от пожилых доноров, она имела тенденцию к снижению. Рисунок 5В показывает кальций-зависимые ответы МСК на добавление серотонина. Как видно, при индукции старения клеток происходит снижение доли клеток, отвечающих изменением внутриклеточной концентрации кальция на действие серотонина.

Стоит отметить, что при репликативном старении клеток увеличивалось время, проходящее от момента добавления гормона до развития кальциевого ответа (рис. 5В, Г). В клетках, полученных от пожилых доноров, время развития кальциевого сигнала после добавления как норадреналина, так и серотонина не увеличивалось, но проявлялась тенденция к возрастанию продолжительности кальциевого сигнала. Увеличение продолжительности кальциевого сигнала может быть связано с нарушением механизмов терминации кальциевого сигнала, например десенситизации рецептора.

Таким образом, при старении МСК снижается чувствительность клеток к норадреналину и серотонину при проведении сигнала как цАМФ-зависимыми сигнальными путями, так и Ca²⁺-зависимыми. Установленные изменения в механизмах гормональной регуляции МСК в процессе клеточного старения могут обуславливать нарушения функционирования всей жировой ткани, что, в свою очередь, может приводить к ожирению или к дистрофии жировой ткани.

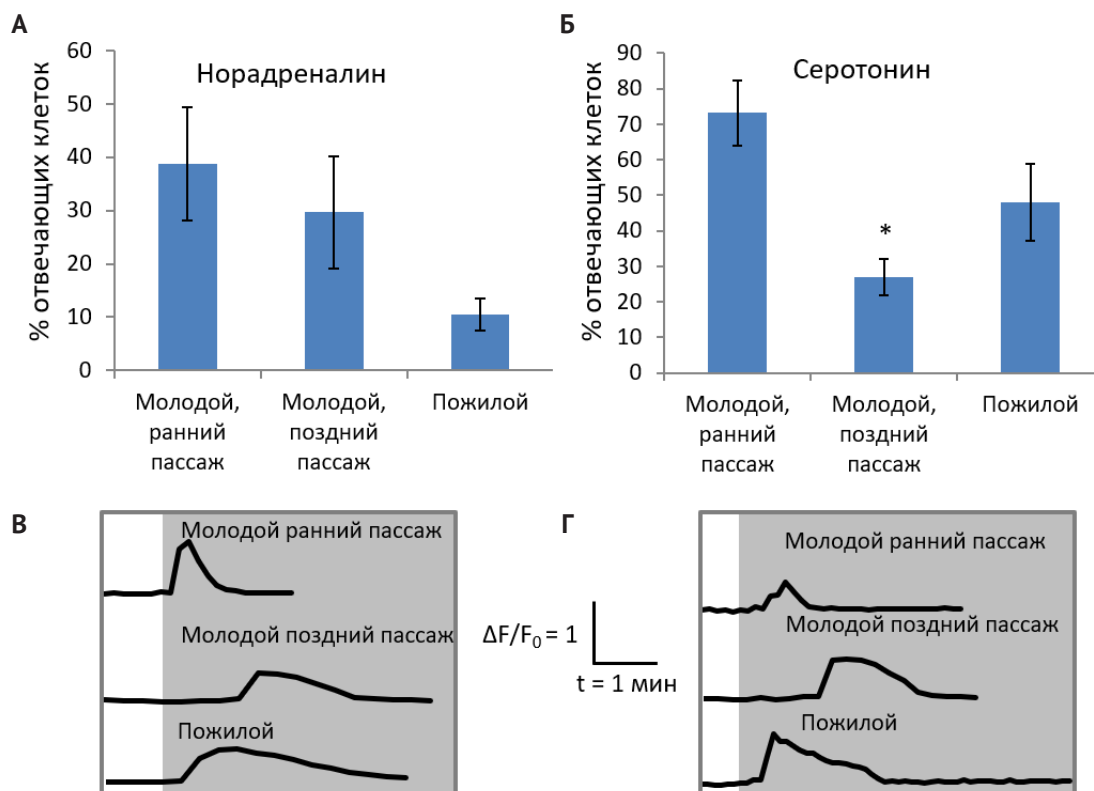


Рис. 5. Кальциевая сигнализация в МСК в ответ на действие норадреналина и серотонина: А — доля клеток молодых на раннем пассаже, молодых на поздних пассажах (репликативно старых), МСК, выделенных из жировой ткани пожилых пациентов, отвечающих на норадреналин; Б — доля клеток молодых на раннем пассаже, молодых на поздних пассажах (репликативно старых), МСК, выделенных из жировой ткани пожилых пациентов, отвечающих на серотонин. $N = 12-19$, среднее $\pm$ ст. ош. ср., * $p < 0,05$. Сравнение трех независимых групп выполняли с помощью однофакторного дисперсионного анализа с последующим применением теста Даннета. Для получения результатов в каждой группе использовали МСК, выделенные из 2 различных доноров; В — репрезентативные кальциевые ответы молодых и старых одиночных МСК на норадреналин; Г — репрезентативные кальциевые ответы молодых и старых МСК на серотонин. Серым цветом отмечены периоды времени, когда клетки находились в окружении добавленного гормона. Обозначение шкал и масштабных отрезков для рисунков (В) и (Г) единое и приведено посередине между панелями рисунков

Fig. 5. Calcium signaling in MSCs in response to noradrenaline and serotonin: A — proportion of MSCs isolated from young donors at early passages, MSCs isolated from young donors at late passages (replicatively old), MSCs isolated from adipose tissue of elderly patients, responding to norepinephrine; Б — proportion of MSCs isolated from young donors at early passages, MSCs isolated from young donors at late passages (replicatively old), MSCs isolated from adipose tissue of elderly patients, responding to serotonin. $N = 12-19$, mean $\pm$ SEM, * $p < 0.05$. Comparison of three independent groups was performed using one-way ANOVA followed by Dunnett's test. To obtain the results, MSCs isolated from 2 different donors were used in each group; В — representative calcium responses of individual cells to norepinephrine; Г — representative calcium responses of individual cells to serotonin. The periods of time when the hormone was added are marked in gray. The time bars for figures (B) and (D) are the same and are given in the middle between the panels of the figures

Литература

1. Lee CH, Olson P, Evans RM. Minireview: lipid metabolism, metabolic diseases, and peroxisome proliferator-activated receptors. *Endocrinology*. 2003;144(6):2201–2207.
2. Bjorntorp P. Body fat distribution, insulin resistance, and metabolic diseases. *Nutrition*. 1997;13(9):795–803.
3. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytherapy*. 2006;8(4):315–317.

4. 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.
5. Калинина Н, Сысоева В, Рубина К, Парфенова ЕВ, Ткачук ВА. Мезенхимальные стволовые клетки в процессах роста и репарации тканей. *Acta Naturae*. 2011;3(4):32–39.
6. Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair — current views. *Stem Cells*. 2007;25(11):2896–2902.
7. Arner E, Westermark PO, Spalding KL, Britton T, Ryden M, Frisen J, et al. Adipocyte turnover: relevance to human adipose tissue morphology. *Diabetes*. 2010;59(1):105–109.
8. Mendez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, Lira SA, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*. 2010;466(7308):829–834.
9. Tyurin-Kuzmin PA, Dyikanov DT, Fadeeva JI, Sysoeva VY, Kalinina NI. Flow cytometry analysis of adrenoceptors expression in human adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells. *Sci Data*. 2018;5:180196.
10. Tyurin-Kuzmin PA, Fadeeva JI, Kanareikina MA, Kalinina NI, Sysoeva VY, Dyikanov DT, et al. Activation of beta-adrenergic receptors is required for elevated alpha1A-adrenoceptors expression and signaling in mesenchymal stromal cells. *Sci Rep*. 2016;6:32835.
11. Wu J, Bostrom P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*. 2012;150(2):366–376.
12. Amireault P, Sibon D, Cote F. Life without peripheral serotonin: insights from tryptophan hydroxylase 1 knockout mice reveal the existence of paracrine/autocrine serotonergic networks. *ACS Chem Neurosci*. 2013;4(1):64–71.
13. Kotova PD, Sysoeva VY, Rogachevskaja OA, Bystrova MF, Kolesnikova AS, Tyurin-Kuzmin PA, et al. Functional expression of adrenoreceptors in mesenchymal stromal cells derived from the human adipose tissue. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1843(9):1899–1908.
14. Chechekhin VI, Ivanova AM, Kulebyakin KY, Antropova YG, Karagyaour MN, Skryabina MN, et al. Peripheral 5-HT/HTR6 axis is responsible for obesity-associated hypertension. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2024;1871(2):119651.
15. Crane JD, Palanivel R, Mottillo EP, Bujak AL, Wang H, Ford RJ, et al. Inhibiting peripheral serotonin synthesis reduces obesity and metabolic dysfunction by promoting brown adipose tissue thermogenesis. *Nat Med*. 2015;21(2):166–172.
16. Sethe S, Scutt A, Stolzing A. Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Res Rev*. 2006;5(1):91–116.
17. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 1961;25(3):585–621.
18. Оловников А. Недорепликация ДНК на краю матрицы (маргинотомия) и проблемы развития организмов. В сб: Проблемы биологии старения М.: Наука, 1983:40–48.
19. Voynova E, Kulebyakin K, Grigorieva O, Novoseletskaya E, Basalova N, Alexandrushkina N, et al. Declined adipogenic potential of senescent MSCs due to shift in insulin signaling and altered exosome cargo. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2022;10:01-14.
20. Efimenko A, Dzhoysashvili N, Kalinina N, Kochegura T, Akchurin R, Tkachuk V, et al. Adipose-derived mesenchymal stromal cells from aged patients with coronary artery disease keep mesenchymal stromal cell properties but exhibit characteristics of aging and have impaired angiogenic potential. *Stem Cells Transl Med*. 2014;3(1):32–41.
21. Kim M, Kim C, Choi YS, Kim M, Park C, Suh Y. Age-related alterations in mesenchymal stem cells related to shift in differentiation from osteogenic to adipogenic potential: implication to age-associated bone diseases and defects. *Mechanisms of ageing and development*. 2012;133(5):215–225.
22. Mushahary D, Spittler A, Kasper C, Weber V, Charwat V. Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytometry Part A*. 2018;93(1):19–31.

23. Chechekhin VI, Kulebyakin KY, Kalinina NI, Tyurin-Kuzmin PA. Noradrenaline and serotonin-dependent sensitization of MSCs to noradrenaline. *MethodsX*. 2024;12:102587.
24. 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. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(12):4442.
25. Batra N, Kar R, Jiang JX. Gap junctions and hemichannels in signal transmission, function and development of bone. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2012;1818(8):1909–1918.
26. Valiunas V, Doronin S, Valiuniene L, Potapova I, Zuckerman J, Walcott B, et al. Human mesenchymal stem cells make cardiac connexins and form functional gap junctions. *The Journal of physiology*. 2004;555(3):617–626.
27. Лобанова МВ, Ратушный АЮ, Буравкова ЛБ. Экспрессия генов, ассоциированных со старением, в мультипотентных мезенхимальных стромальных клетках при длительном культивировании в условиях разного содержания кислорода. *Доклады Академии наук*. 2016;470(2):227–229.
28. Turinetti V, Vitale E, Giachino C. Senescence in Human Mesenchymal Stem Cells: Functional Changes and Implications in Stem Cell-Based Therapy. *Int J Mol Sci*. 2016;17(7):1–18.
29. Makarevich PI, Boldyreva MA, Gluhanyuk EV, Efimenko AY, Dergilev KV, Shevchenko EK, et al. Enhanced angiogenesis in ischemic skeletal muscle after transplantation of cell sheets from baculovirus-transduced adipose-derived stromal cells expressing VEGF165. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6:204.
30. Tyurin-Kuzmin PA, Hayashi Y, Kulebyakin K. Functional heterogeneity of stem cells. *Frontiers Media SA*; 2023:1179911.
31. Zhang Q, Huang H, Zhang L, Wu R, Chung CI, Zhang SQ, et al. Visualizing Dynamics of Cell Signaling In Vivo with a Phase Separation-Based Kinase Reporter. *Mol Cell*. 2018;69(2):347.
32. Tyurin-Kuzmin PA, Chechekhin VI, Ivanova AM, Dyikanov DT, Sysoeva VY, Kalinina NI, et al. Noradrenaline Sensitivity Is Severely Impaired in Immortalized Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell Line. *Int J Mol Sci*. 2018;19(12):1–11.
33. 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. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021;9:662078.
34. Stunes A, Reseland JE, Hauso Ø, Kidd M, Tømmerås K, Waldum H, et al. Adipocytes express a functional system for serotonin synthesis, reuptake and receptor activation. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2011;13(6):551–558.

Об авторах

Чечехина Елизавета Сергеевна — аспирант кафедры биохимии и регенеративной биомедицины Факультета фундаментальной медицины Медицинского научно-образовательного института ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Кулебякин Константин Юрьевич — к.б.н., доцент кафедры биохимии и регенеративной биомедицины Факультета фундаментальной медицины Медицинского научно-образовательного института МГУ имени М.В. Ломоносова; ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной эндокринологии Центра регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного института ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Григорьева Ольга Александровна — к.б.н., старший научный сотрудник Научно-исследовательской лаборатории генных и клеточных технологий кафедры биохимии и регенеративной биомедицины Факультета фундаментальной медицины Медицинского научно-образовательного института МГУ имени М.В. Ломоносова; научный сотрудник лаборатории репарации и регенерации тканей Центра регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного института ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Ефименко Анастасия Юрьевна — д.м.н., заведующая лабораторией репарации и регенерации тканей Центра регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного института МГУ имени М.В. Ломоносова; доцент кафедры биохимии и регенеративной биомедицины Факультета фундаментальной медицины Медицинского научно-образовательного института ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Тюрин-Кузьмин Петр Алексеевич — д.б.н., доцент, доцент кафедры биохимии и регенеративной биомедицины Факультета фундаментальной медицины Медицинского научно-образовательного института ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Authors

Elizaveta S. Chechekhina — PhD student of Department of Biochemistry and Regenerative Biomedicine, Faculty of Medicine, Medical Research and Educational Institute, Lomonosov Moscow State University

Konstantin Yu. Kulebyakin — Dr. Sci. (Biology), Associate Professor of Department of Biochemistry and Regenerative Biomedicine, Faculty of Medicine, Medical Research and Education Institute, M.V. Lomonosov Moscow State University; lead scientific fellow, laboratory of molecular endocrinology, Center for Regenerative Medicine, Medical Research and Education Institute, M.V. Lomonosov Moscow State University.

Olga A. Grigorieva — Dr. Sci. (Biology), senior scientist of Laboratory of Gene and Cellular Biology, Faculty of Medicine, Medical Research and Educational Institute, M.V. Lomonosov Moscow State University; scientist in Laboratory of Tissue Repair and Regeneration, Center for Regenerative Medicine, Medical Research and Educational Institute, M.V. Lomonosov Moscow State University.

Anastasiya Yu. Efimenko — MD, Dr. Sci. (Medicine), head of Laboratory of Tissue Repair and Regeneration, Center for Regenerative Medicine, Medical Research and Education Institute, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow; Department of Biochemistry and Regenerative Biomedicine, Faculty of Medicine, Medical Research and Education Institute, M.V. Lomonosov Moscow State University.

Pyotr A. Tyurin-Kuzmin — Dr. Sci. (Biology), Associate Professor of Department of Biochemistry and Regenerative Biomedicine, Faculty of Medicine, Medical Research and Educational Institute, M.V. Lomonosov Moscow State University.

Вклад авторов

Е.С. Чечехина — выполняла эксперименты, обрабатывала данные, писала текст статьи.

К.Ю. Кулебякин — выполнял эксперименты, участвовал в формулировании идеи, писал текст статьи.

О.А. Григорьева — выполняла эксперименты, обрабатывала данные.

А.Ю. Ефименко — участвовала в формулировании идеи, писала текст статьи.

П.А. Тюрин-Кузьмин — выполнял эксперименты, участвовал в формулировании идеи, писал текст статьи, выполнял общее руководство работой.

Author contribution statement

Elizaveta S. Chechekhina — performing the experiments, experimental data processing, manuscript writing.

Konstantin Yu. Kulebyakin — performing the experiments, conceptualization, manuscript writing.

Olga A. Grigorieva — performing the experiments, manuscript writing.

Anastasiya Yu. Efimenko — conceptualization, manuscript writing.

Pyotr A. Tyurin-Kuzmin — performing the experiments, conceptualization, manuscript writing, supervision.

Формирование тканеинженерной конструкции хряща на основе микрочастиц децеллюляризованного хряща в перфузионном биореакторе

Ю.Б. Басок^{1,*}, А.М. Григорьев¹, Л.А. Кирсанова¹, А.Д. Белова¹, А.М. Суббот²,
Е.А. Гусева¹, Е.А. Немец¹, В.И. Севастьянов^{1,3}

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, 123182, ул. Щукинская, 1, Москва, Россия

² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт глазных болезней имени М.М. Краснова», 119021, ул. Россолимо, 11а, Москва, Россия

³ АНО «Институт медико-биологических исследований», 123557, ул. Большой Тишинский переулок, 43/20, стр. 2, Москва, Россия

* Адрес для корреспонденции: bjb2005@mail.ru

Аннотация

Формирование тканевого эквивалента на основе инъекционной формы микродисперсного скаффолда — микрочастиц децеллюляризованного хряща свиньи (ДецХс) — представляется перспективной технологией для восстановления дефектов хрящевой ткани. **Целью** данной работы было получение и сравнительное исследование тканеинженерной конструкции (ТИК) на основе микрочастиц ДецХс и мезенхимальных стромальных клеток (МСК) в статических условиях и в перфузионном биореакторе. **Материалы и методы.** Процесс децеллюляризации включал циклы замораживания и оттаивания (-196...+37 °C), использование поверхностно-активных веществ (Triton X-100 и додецилсульфат натрия), а также обработку ДНКазой. Морфология поверхности и ближайшего подповерхностного слоя образцов была исследована с помощью сканирующей электронной микроскопии. Каждая ТИК состояла из 5×10^5 МСК и 5 мг ДецХс. **Результаты.** Установлено, что по сравнению со статическими условиями культивирования МСК на микрочастицах ДецХс в перфузионном биореакторе в течение 14 суток позволяет увеличить пролиферативную активность клеток с последующей хондрогенной дифференцировкой, о чем говорит способность клеточной компоненты ТИК синтезировать внеклеточный матрикс (ВКМ), гистохимический анализ которого выявил наличие коллагена и гликозаминогликанов (ГАГ). **Заключение.** Показана возможность формирования ТИК хряща на основе ДецХс и МСК в условиях 3D-культивирования как в статических условиях, так и в перфузионном биореакторе. Культивирование МСК на ДецХс в условиях потока при скорости 1 мм/мин способствовало увеличению пролиферативной активности клеток по сравнению со статическими условиями, а также поддерживало способность клеток синтезировать ВКМ, гистохимический анализ которого выявил наличие общего коллагена и ГАГ, что может являться подтверждением хондрогенной дифференцировки МСК.

Ключевые слова: проточный биореактор, хрящевая ткань, тканевая инженерия

Конфликт интересов: Севастьянов В.И. является членом редакционной коллегии 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: Басок Ю.Б., Григорьев А.М., Кирсанова Л.А., Белова А.Д., Суббот А.М., Гусева Е.А., Немец Е.А., Севастьянов В.И. Формирование тканеинженерной конструкции хряща на основе микрочастиц децеллюляризованного хряща в перфузионном биореакторе. *Регенерация органов и тканей*. 2024;2(3):56–66. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-2-56-66>

Поступила 06.06.2024
Обработана 17.07.2024
Принята к публикации 23.07.2024

Formation of a tissue-engineered cartilage structure based on decellularized cartilage microparticles in a perfusion bioreactor

Yulia B. Basok^{1,*}, Alexey M. Grigor'ev¹, Liudmila A. Kirsanova¹,
Alexandra D. Belova¹, Anastasia M. Subbot², Ekaterina A. Guseva¹,
Evgeny A. Nemets¹, Victor I. Sevastianov^{1,3}

¹ Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, 123182, Shchukinskaya St., 1, Moscow, Russia

² Research Institute of Eye Diseases, 119021, Rossolimo St., 11A, Moscow, Russia

³ Institute of Biomedical Research and Technology, 123557, Bol'shoj Tishinskij pereulok, 43/20, str. 2, Moscow, Russia

Abstract

The formation of a tissue equivalent based on injectable form of microdispersed scaffold — microparticles of decellularized porcine cartilage (DecCp) — seems to be a promising technology for repairing cartilage tissue defects. The aim of this work was to obtain and comparatively study a tissue-engineering construct (TEC) based on DecCp microparticles and mesenchymal stromal cells (MSCs) under static conditions and in perfusion bioreactor. **Materials and methods.** The decellularization process included freeze-thaw cycles (−196 °C...+37 °C), the use of surfactants (Triton X-100 and sodium dodecyl sulfate), as well as DNase treatment. The morphology of the surface and the nearest subsurface layer of the samples was studied using scanning electron microscopy. Each TEC consisted of 5×10^5 MSCs and 5 mg DecCp. **Results.** It was found that, compared with static conditions, the cultivation of MSCs on DecCp microparticles in a perfusion bioreactor for 14 days allows increasing the proliferative activity of cells with subsequent chondrogenic differentiation, as evidenced by the ability of the cellular component of cartilage to synthesize extracellular matrix (ECM), characteristic of cartilage tissue, histochemical analysis of which revealed the presence of collagen and glycosaminoglycans (GAG). **Conclusion.** The possibility of forming cartilage TECs based on DecCp and MSCs under 3D cultivation conditions both under static conditions and in a perfusion bioreactor was shown. Cultivation of MSCs on DecCp under flow conditions at a rate of 0.5 ml/min contributed to an increase in cell proliferative activity compared with static conditions, and also supported the ability of cells to synthesize ECM, characteristic of cartilage tissue, histochemical analysis of which revealed the presence of total collagen and GAG, which may be evidence of chondrogenic differentiation of MSCs.

Keywords: flow bioreactor, cartilage tissue, tissue engineering.

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Basok Yu.B., Grigor'ev A.M., Kirsanova L.A., Belova A.D., Subbot A.M., Guseva E.A., Nemets E.A., Sevastianov V.I. Formation of a tissue-engineered cartilage structure

based on decellularized cartilage microparticles in a perfusion bioreactor. *Tissue and organ regeneration*. 2024;2(3):56–66. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-2-56-66>

Received 06.06.2024

Revised 17.07.2024

Accepted 23.07.2024

1. Введение

Гиалиновый суставной хрящ — это соединительная ткань, основными функциями которой являются амортизация при нагрузках и обеспечение гладкой поверхности сустава для облегчения подвижности. Суставной хрящ состоит из внеклеточного матрикса (ВКМ), основными компонентами которого являются различные типы коллагена и протеогликаны, и высокоспециализированных резидентных клеток — хондроцитов, которые составляют всего от 1 до 5% объема хрящевой ткани и активно участвуют в поддержании динамического равновесия между синтезом и катаболизмом ВКМ [1, 2].

Коллаген составляет приблизительно 60% сухого веса гиалинового хряща, являясь основным белком в составе ВКМ. Особенно важен коллаген II типа, составляющий 90% всего коллагена, поскольку его взаимодействие с другими белками и протеогликанами напрямую влияет на поддержание физиологического гомеостаза и обеспечение фиксации хондроцитов, молекул ВКМ и факторов роста. Коллаген II типа также является важной сигнальной молекулой, которая может регулировать пролиферацию, метаболизм и дифференцировку хондроцитов [3, 4].

В отличие от большинства тканей, в суставном хряще отсутствуют кровеносные сосуды, кроме того, хондроциты имеют низкий пролиферативный потенциал, поэтому способность хрящевой ткани к регенерации ограничена [1, 5].

Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) представляются многообещающим клеточным материалом для восстановления дефектов суставного хряща, так как по своей природе они способны дифференцироваться в различные мезенхимальные ткани, включая хрящевую. С другой стороны, терапевтический эффект МСК при внутрисуставном введении основан на паракринной секреции широкого спектра цитокинов и факторов роста, которые стимулируют пролиферацию хондроцитов и синтез ВКМ, предотвращают апоптоз клеток

и воспаление. Кроме того, иммуномодулирующие свойства МСК предоставляют возможность использования аллогенных клеток [6].

Для доставки и удержания МСК в области дефекта хрящевой ткани, а также для обеспечения жизнедеятельности клеток на достаточный для запуска процессов восстановления срок используются биорезорбируемые скаффолды (матрицы, клеточные носители), среди которых чаще всего применяются материалы на основе коллагена [7]. В настоящее время перспективными представляются также матрицы, полученные путем децеллюляризации исходных тканей и органов [8]. Процедура децеллюляризации обеспечивает разрушение и удаление клеток и клеточного детрита с максимальным сохранением состава ВКМ (основным компонентом которого является коллаген), белки которого, в отличие от клеток, не несут антигенов, вызывающих реакцию отторжения, благодаря молекулярному эволюционному консерватизму [9]. В связи с этим перспективной выглядит технология получения тканеинженерных конструкций (ТИК) хряща, основанных на коллагенсодержащих микрочастицах децеллюляризованного хряща свиньи (ДецХс). Этап микронизации ДецХс позволяет увеличить площадь контакта матрикса со средой при сохранении его общего объема, что улучшает адгезию и пролиферацию клеток. В настоящее время в клинической практике активно используются децеллюляризованные кожа, мочевого пузыря, тонкая кишка и сердечный клапан свиньи, однако хрящевые ткани пока не применяются.

Для улучшения качества ТИК, формирующихся *in vitro*, необходимо как можно точнее воспроизвести биохимические и биомеханические стимулы, обеспечивающие жизнедеятельность клеток в организме [10]. Для этого применяют метод формирования ТИК в перфузионном биореакторе, который моделирует естественные условия для клеток, обеспечивая не только питание, транспорт газов к ним и выведение метаболитических

продуктов благодаря постоянной замене культурной среды, но и запускают физиологические сигналы механотрансдукции [11, 12].

Целью данной работы было получение и сравнительное изучение ТИК хряща на основе микрочастиц ДецХс и МСК в статических условиях и в перфузионном биореакторе.

2. Материалы и методы

2.1. Децеллюляризация хрящевой ткани

Бедренные и коленные суставы свиней были получены на бойне (АПК ПРОМАГРО, Россия). Для получения микрочастиц хряща свиньи применяли метод криопомола с использованием криомельницы CryoMill (Retch, Германия). Децеллюляризацию ткани проводили в соответствии с методикой, опубликованной ранее [13]. Высокая плотность ткани и отсутствие пор в суставном хряще определили включение в процесс децеллюляризации стадии микронизации исходной ткани, а также использование трех циклов замораживания/оттаивания ($-196...+37$ °C) в дополнение к обработке поверхностно-активными веществами (три смены раствора, включающего 0,1% додецилсульфата натрия и Triton X-100 (1, 2, 3% соответственно) (все — Sigma-Aldrich, США)) и инкубацией в растворе ДНКазы I типа («СайСторЛаб», Россия).

Диаметр микрочастиц ДецХс определяли с использованием лазерного дифракционного анализатора размеров частиц SALD-7101 (Shimadzu, Япония).

2.2. Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ)

Морфологию поверхности и ближайшего подповерхностного слоя образцов исследовали с помощью СЭМ с использованием лантаноидного контрастирования BioREE («Глаукон», Россия), который позволяет наблюдать незафиксированные биологические образцы в режиме низкого вакуума после выдерживания их в насыщенном растворе редкоземельного металла. Данный метод позволяет максимально сохранить исходное состояние исследуемого объекта благодаря отсутствию повреждающей процедуры пробоподготовки, а изображение, полученное в режиме детектирования обратно рассеянных электронов, позволяет контрастировать кальций и фосфоросодержащие структуры. Наблюдения проводились с использованием сканирующего электронного микроскопа EVO LS10 (Carl

Zeiss, Германия) в режиме низкого вакуума (ЕР, 70 Па) при ускоряющем напряжении 20 кВ.

2.3. Определение содержания ДНК

Количественную оценку содержания ДНК в образцах исходной ткани и ДецХс проводили с применением набора для выделения ДНК DNeasy Blood&Tissue Kit (QIAGEN, Германия) согласно инструкции производителя. Для исследования брали навеску 10 мг исходного хряща ($n = 3$) или ДецХс ($n = 3$). Для количественного определения двухцепочечной ДНК использовали набор с флуоресцентным красителем Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kits and dsDNA Reagents (Invitrogen, США) в соответствии с инструкцией производителя. Для подсчета количества ДНК в образцах использовали планшетный спектрофлуориметр Tecan Spark 10M (Tecan Trading, Швейцария) при длине волны 520 нм.

2.4. Формирование ТИК хряща

Образцы жировой ткани массой 3–5 г ($n = 3$) получены с информированного письменного согласия здоровых доноров во время трансплантации печени под общим наркозом. Исследование проведено в соответствии с руководящими принципами Хельсинкской декларации и одобрено Локальным этическим комитетом при ФГБУ «НМИЦ ТИО им. акад. В.И. Шумакова» Минздрава России (15 ноября 2019 г., протокол № 151119-1/1е).

Ткань инкубировали в 0,1% растворе коллагеназы I типа при температуре $+37$ °C в течение 20 минут. После выделения МСК культивировали в питательной среде DMEM/F12 (1:1) с добавлением 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота, 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина сульфата и 2 мм L-глутамин (все — Gibco, США). В эксперименте использовали клетки 3-го пассажа.

Была исследована возможность образования в биореакторе ТИК хряща из микрочастиц ДецХс, нагруженных МСК. Для проведения экспериментов по культивированию 5×10^5 МСК на 5 мг ДецХс в условиях потока использовали модифицированную версию перфузионного биореактора, схема которого показана на рисунке 1 [14].

Скорость потока культуральной среды составляла 1 мм/мин. Первые сутки эксперимента в системе циркулировала полная ростовая среда, которую затем заменяли на хондрогенную дифференцировочную среду в объеме 110 мл.

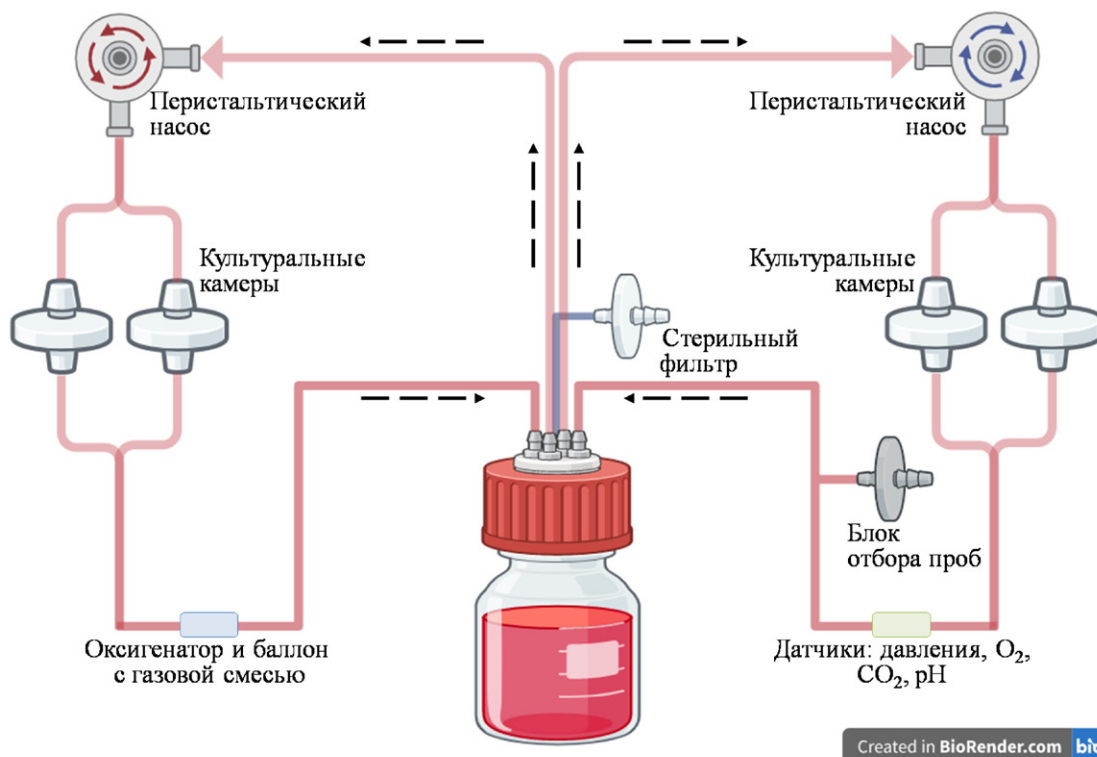


Рис. 1. Схема разработанного перфузионного биореактора. Создано с помощью BioRender.com

Fig. 1. The scheme of the developed perfusion bioreactor. Created with BioRender.com

Дифференцировочная среда включала DMEM с высоким содержанием глюкозы (Gibco, США), 10% ITS+ (Corning, США), 1% пируват натрия (Sigma-Aldrich, США), 0,25% аскорбат-2-фосфата (Sigma-Aldrich, США), 100 нМ дексаметазона (Sigma-Aldrich, США), 0,002% TGF- β 1 (PeproTech, США) и 1% пенициллин-стрептомицин-глутамин (Gibco, США). Замену среды осуществляли каждые 7 суток. На 14-е сутки культуральные камеры с ТИК извлекали из биореактора. Для сравнения аналогичные ТИК культивировали в статических условиях.

2.5. Определение жизнеспособности клеток

Оценку жизнеспособности клеток в составе ТИК исследовали на 14-е сутки культивирования методом флуоресцентного окрашивания с применением комплекса красителей LIVE/DEAD Cell Viability Assays (Thermo Fisher Scientific, США) и микроскопа Leica DMI8 Thunder (Leica Microsystems, ФРГ).

2.6. Гистологическое исследование

Образцы фиксировали в 10% растворе формалина и заливали в парафин. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином, альциановым синим

на гликозаминогликаны (ГАГ) и по методу Массона на коллаген. Анализ и съемку полученных препаратов проводили с помощью микроскопа Nikon Eclipse Ti (Nikon, Япония). Для определения количества клеток на единицу площади скаффолда в ТИК, полученных в статических и динамических условиях при культивировании МСК на микрочастицах ДецХс, на микрофотографиях гистологических препаратов ТИК подсчитывали количество окрашенных гематоксилином ядер и с использованием программного обеспечения для анализа изображений ImageJ (National Institutes of Health, США) измеряли площадь скаффолда. Для подсчета использовали 15 репрезентативных микрофотографий.

3. Результаты и обсуждение

3.1. Характеристика микрочастиц ДецХс

Значительная часть лакун на поверхности микрочастиц ДецХс, средний диаметр которых не превышал 220 мкм (рис. 2А), была свободна от клеток (рис. 2Б). Количественный анализ ДНК показал значительную степень удаления ДНК из ткани ($p < 0,05$): содержание ДНК снизилось с $366,95 \pm 3,0$ нг/мг ткани до $9,1 \pm 1,1$ нг/мг ткани.

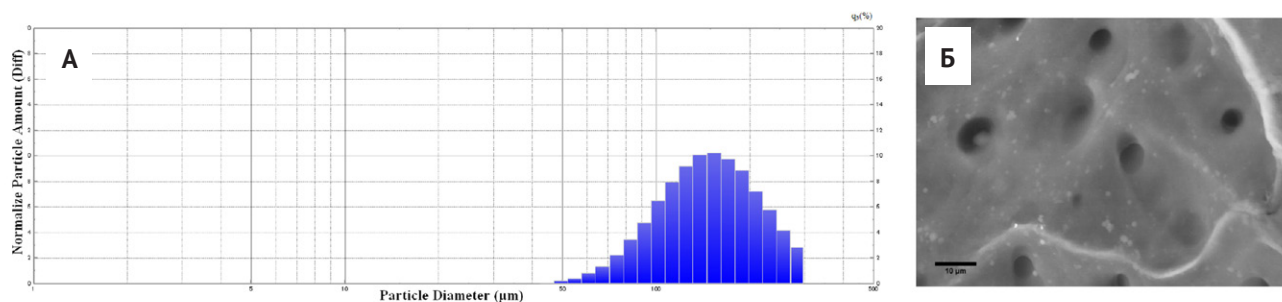


Рис. 2. Микрочастицы ДецХс: А – распределение частиц по размерам, Б – СЭМ

Fig. 2. DecCp microparticles. A – particle size distribution, B – SEM. Scale bar 10 μm. Original images (photos).

3.2. Культивирование ТИК в перфузионном биореакторе

Как видно на рисунках 3А и 3Б, основная масса клеток на поверхности микрочастиц ДецХс была жизнеспособна. Тем не менее небольшое количество мертвых клеток наблюдали в обоих образцах. Отметим, что доля мертвых клеток на поверхности ТИК, полученной при культивировании в биореакторе, была меньше, чем при культивировании в статических условиях, что может быть связано с наиболее эффективной доставкой питательных веществ и газов вглубь конструкции.

Заметим, что клетки прикреплялись ко всем микрочастицам ДецХс равномерно, но в случае с ТИК, сформированных в условиях биореактора, мы наблюдали более высокий уровень пролиферации клеток.

На 14 сутки культивирования было отмечено образование крупных конгломератов во всех образцах, представляющих собой микрочастицы ДецХс, соединенные клетками и наработанным ими ВКМ (рис. 4). На поверхности ДецХс визуализировался рост фибробластоподобных клеток, а соотношение количества клеток к площади скаффолда в ТИК при культивировании в биореакторе (рис. 4Б, Г, Е) было выше, чем в статических условиях (рис. 4А, В, Д). Количество клеток на единицу площади скаффолда, рассчитанное с использованием программы ImageJ, для образца, полученного в биореакторе, было в 7 раз выше по сравнению с образцом, культивированным в статических условиях ($0,020 \pm 0,004$ и $0,003 \pm 0,001$ клеток/мкм² для образцов, полученных в перфузионном биореакторе и в статических условиях, соответственно).

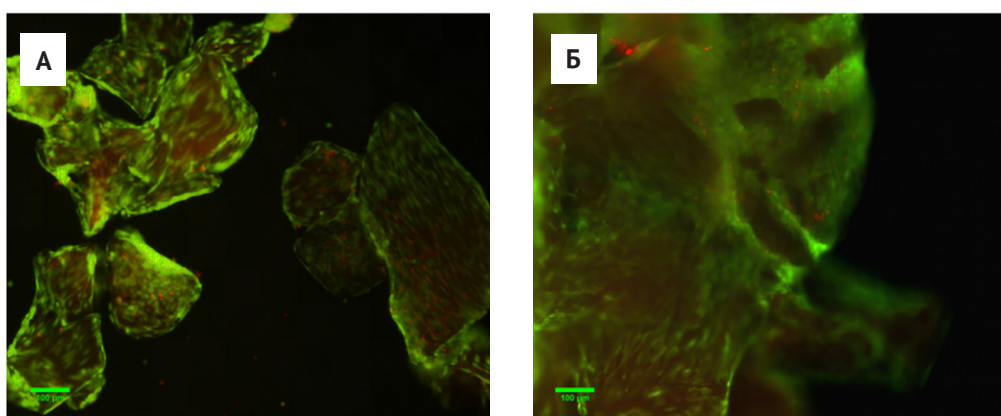


Рис. 3. Жизнеспособность МСК при культивировании на тканеспецифическом скаффолде из ДецХс в хондрогенной дифференцировочной среде в течение 14 суток: А – в статических условиях; Б – в проточном биореакторе при скорости потока 1 мм/мин. Окрашивание витальным красителем Live/Dead. $\times 100$.

Fig. 3. Viability of MSCs during cultivation on a tissue-specific scaffold from DecCp in a chondrogenic differentiation medium for 14 days: A – under static conditions, B – in a flowing bioreactor at a flow rate of 1 mm/min. Live/Dead. $\times 100$. Original images (photos)

Формирование ВКМ наблюдали во всех изученных образцах на фоне клеточной пролиферации. В ТИК, сформированной в биореакторе, визуализировались участки, в которых объем ВКМ значительно превышал содержание клеток (рис. 4Б, Г, Е). В ВКМ всех образцов визуализировали синие коллагеновые волокна (рис. 4В, Г). При этом ВКМ равномерно окрашивался альтиановым синим на ГАГ (рис. 4Д, Е). Полученные результаты указывают на дифференцировку МСК в составе ТИК в хондрогенном направлении. Это может быть связано с улучшенным транспортом питательных веществ и кислорода, а так-

же с удалением метаболитов, что способствует созданию более благоприятной микросреды для клеточного роста и дифференцировки. Дополнительно перфузия может активировать механорецепторы МСК, что, в свою очередь, способствует их дифференцировке в хондроциты и повышает продукцию ВКМ. Внешний вид полученных ТИК представлен на рисунках 4Ж, 3.

Следует отметить, что основным экспериментально определенным отличием ТИК, полученным в условиях динамического культивирования, была активная пролиферация клеток

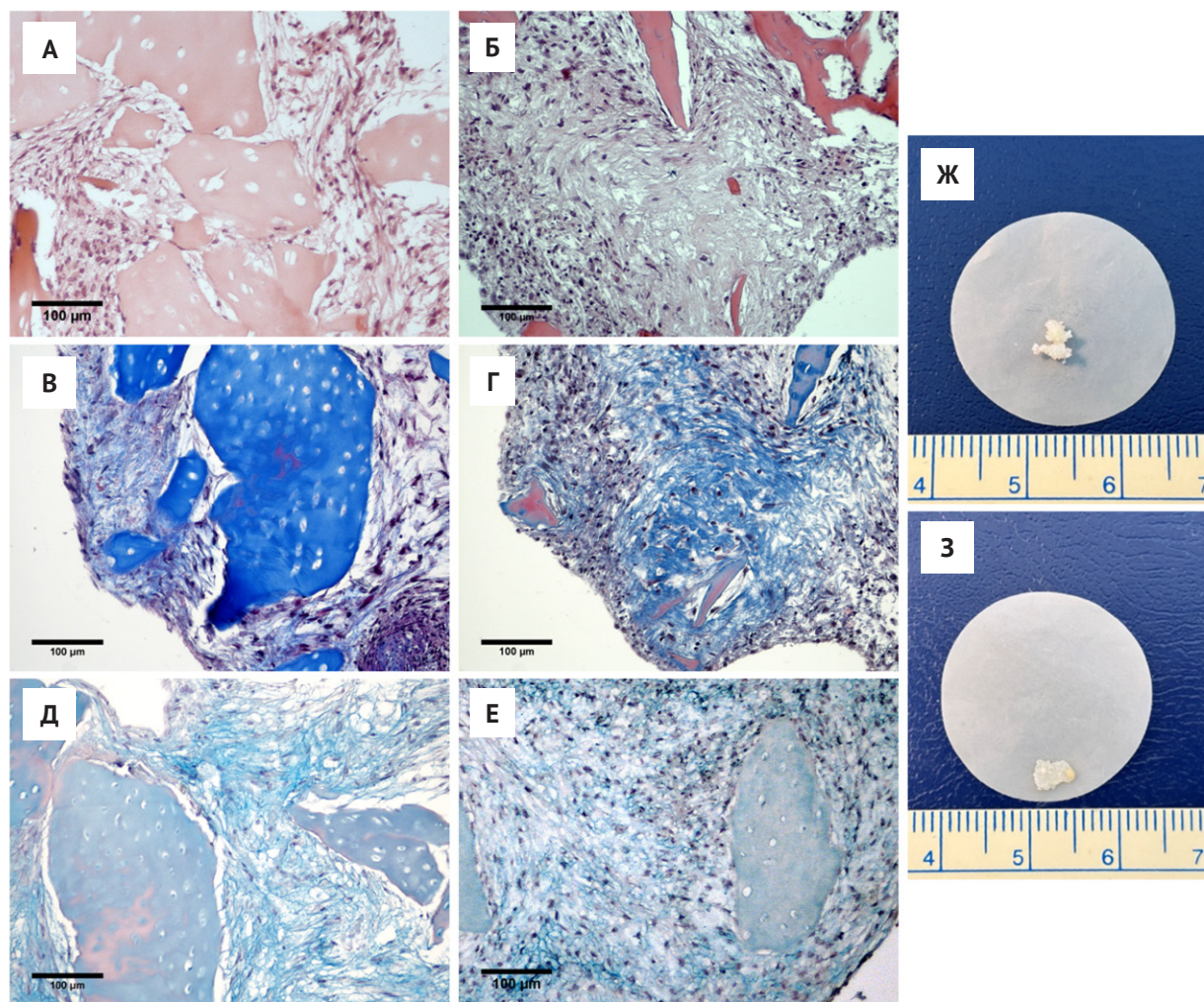


Рис. 4. Формирование ТИК хряща при культивировании МСК на тканеспецифическом скаффолде из ДецХс в хондрогенной дифференцировочной среде в течение 14 суток: А, В, Д, Ж – в статических условиях, Б, Г, Е, 3 – в перфузионном биореакторе при скорости потока 1 мм/мин. А, Б – окраска гематоксилином и эозином, В, Г – окраска по методу Массона на коллаген, Д, Е – окраска альтиановым синим на ГАГ. Ж, 3 – внешний вид ТИК

Fig. 4. Formation of cartilage TEC during MSCs cultivation on a tissue-specific scaffold from DecCp in a chondrogenic differentiation medium for 14 days: А, В, Д, Ж – under static conditions, Б, Г, Е, 3 – in a perfusion bioreactor at a flow rate of 1 mm/min. А, Б – hematoxylin and eosin staining, В, Г – Masson's staining on collagen, Д, Е – alcian blue staining on GAG. Scale bar 100 μ m. Ж, 3 – the appearance of the TEC. Original images (photos)

при сохранении способности синтезировать ВКМ, богатый коллагеном, и ГАГ.

Также усиленный рост клеток и колонизацию скаффолда наблюдали Theodoridis et al. при хондрогенной дифференцировке МСК жировой ткани человека [15]. Однако «разрастание» клеточной массы сопровождалось увеличением числа мертвых клеток. Авторы предположили, что это наблюдение может быть связано с высоким напряжением сдвига, создаваемым потоком жидкости [15]. Ту же гипотезу выдвинули Kosk et al., объясняя снижение хондрогенеза в ТИК, включающей МСК костного мозга (КМ) и пористый поликапролактон, в результате перфузии, что выражалось в снижении синтеза ГАГ [16].

С другой стороны, во многих исследованиях было продемонстрировано, что динамическое культивирование также может способствовать хондрогенной дифференцировке [17–20]. Например, было показано, что эмбриональные МСК при культивировании на губке из фиброина шелка в условиях перфузии не только пролиферировали, но и образовывали больше ГАГ и коллагена в ВКМ. При этом авторы подчеркнули необходимость предварительной оптимизации параметров динамического культивирования.

В качестве параметров оценки Tiğli et al. предлагают подсчитывать объем клеточной массы и нарабатанного ВКМ в ТИК хряща [18]. Показано, что МСК КМ синтезировали в 1,8 раза больше ГАГ в ВКМ при культивировании на пористом поликапролактоне в условиях потока, при этом экспрессия генов, ответственных за хондрогенную дифференцировку (Col II, ACAN, Sox9) в ТИК, образованной в биореакторе, также была выше [20]. Усиление хондрогенеза, характеризующееся возрастанием секреции коллагена и ГАГ, наблюдали при динамическом культивировании ТИК, представляющей собой хондро-

циты, инкапсулированные в агарозном геле [19]. На 21-е сутки увеличение секреции ГАГ при снижении содержания ДНК наблюдали Shulz et al. в схожей ТИК хряща [17]. Описанные противоречивые исследования подчеркивают важность выбора условий культивирования для успешной разработки ТИК.

Таким образом, полученные результаты указывают на необходимость продолжения разработки технологии формирования ТИК хряща на основе ДецХс и МСК жировой ткани человека, которая должна включать: оптимизацию режима потока, количественную оценку качества ТИК (количество нарабатанного клетками коллагена и ГАГ), а также изучение экспрессии специфических маркеров хондрогенеза, таких как коллаген I альфа 1 (COL1A1), коллаген II альфа 1 (COL2A1), агрекан (ACAN). В любом случае, проведенные исследования подтверждают перспективность применения перфузионных технологий для повышения эффективности и качества создаваемых ТИК для целей регенеративной медицины, что может существенно повлиять в будущем на клинические результаты в лечении заболеваний опорно-двигательного аппарата.

4. Заключение

Показана возможность формирования ТИК хряща на основе ДецХс и МСК в условиях 3D-культивирования как в статических условиях, так и в перфузионном биореакторе. Культивирование МСК на ДецХс в условиях потока при скорости 1 мм/мин способствовало увеличению пролиферативной активности клеток по сравнению со статическими условиями, а также поддерживало способность клеток синтезировать ВКМ, гистохимический анализ которого выявил наличие общего коллагена и ГАГ, что может являться подтверждением хондрогенной дифференцировки МСК.

Литература

1. Alcaide-Ruggiero L, Molina-Hernández V, Granados MM, Domínguez JM. Main and Minor Types of Collagens in the Articular Cartilage: The Role of Collagens in Repair Tissue Evaluation in Chondral Defects. *Int J Mol Sci.* 2021;22(24):13329. DOI: 10.3390/ijms222413329
2. Almonte-Becerril M, Navarro-Garcia F, Gonzalez-Robles A, Vega-Lopez MA, Lavalle C, Kouri JB. Cell death of chondrocytes is a combination between apoptosis and autophagy during the pathogenesis of Osteoarthritis within an experimental model. *Apoptosis.* 2010;15(5):631–638. DOI: 10.1007/s10495-010-0458-z

3. Suh DS, Yoo JC, Woo SH, Kwak AS. Intra-Articular Atelocollagen Injection for the Treatment of Articular Cartilage Defects in Rabbit Model. *Tissue Eng Regen Med.* 2021;18(4):663–670. DOI: 10.1007/s13770-021-00337-0
4. Lian C, Wang X, Qiu X, Wu Z, Gao B, Liu L, et al. Collagen type II suppresses articular chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis progression by promoting integrin β 1-SMAD1 interaction. *Bone Res.* 2019;7:8. DOI: 10.1038/s41413-019-0046-y
5. Carneiro DC, Araújo LT, Santos GC, Damasceno PKF, Vieira JL, Santos RRD, et al. Clinical Trials with Mesenchymal Stem Cell Therapies for Osteoarthritis: Challenges in the Regeneration of Articular Cartilage. *Int J Mol Sci.* 2023;24(12):9939. DOI: 10.3390/ijms24129939
6. Song Y, Jorgensen C. Mesenchymal Stromal Cells in Osteoarthritis: Evidence for Structural Benefit and Cartilage Repair. *Biomedicines.* 2022;10(6):1278. DOI: 10.3390/biomedicines10061278
7. Lam ATL, Reuveny S, Oh SK. Human mesenchymal stem cell therapy for cartilage repair: Review on isolation, expansion, and constructs. *Stem Cell Res.* 2020;44:101738. DOI: 10.1016/j.scr.2020.101738
8. Nemets EA, Lazhko AE, Basok YB, Kirsanova LA, Kirillova AD, Sevastianov VI. Preparation of Tissue-Specific Matrix from Decellularized Porcine Cartilage. *Russian Journal of Physical Chemistry B.* 2020;14(8):1245–1251. DOI: 10.1134/S1990793120080059
9. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials.* 2011;32(12):3233–3243. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.057
10. Reina-Mahecha A, Beers MJ, van der Veen HC, Zuhorn IS, van Kooten TG, Sharma PK. A Review of the Role of Bioreactors for iPSCs-Based Tissue-Engineered Articular Cartilage. *Tissue Eng Regen Med.* 2023;20(7):1041–1052. DOI: 10.1007/s13770-023-00573-6
11. Ravichandran A, Liu Y, Teoh SH. Review: bioreactor design towards generation of relevant engineered tissues: focus on clinical translation. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018;12(1):e7–e22. DOI: 10.1002/term.2270
12. Aprile P, Kelly DJ. Hydrostatic Pressure Regulates the Volume, Aggregation and Chondrogenic Differentiation of Bone Marrow Derived Stromal Cells. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021;15:8:619914. DOI: 10.3389/fbioe.2020.619914
13. Sevastianov VI, Basok YB, Grigoriev AM, Nemets EA, Kirillova AD, Kirsanova LA, et al. Decellularization of cartilage microparticles: Effects of temperature, supercritical carbon dioxide and ultrasound on biochemical, mechanical, and biological properties. *J Biomed Mater Res A.* 2023;111(4):543–555. DOI: 10.1002/jbm.a.37474
14. Севастьянов ВИ, Басок ЮБ, Григорьев АМ, Кирсанова ЛА, Василец ВН. Применение технологии тканевой инженерии для формирования хрящевой ткани человека в проточном биореакторе. *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2017;19(3):81–92. DOI: 10.15825/1995-1191-2017-3-81-92
15. Theodoridis K, Aggelidou E, Manthou M, Demiri E, Bakopoulou A, Kritis A. Assessment of cartilage regeneration on 3D collagen-polycaprolactone scaffolds: evaluation of growth media in static and in perfusion bioreactor dynamic culture. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2019;183:110403. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2019.110403
16. Kock LM, Malda J, Dhert WJ, Ito K, Gawlitta D. Flow-perfusion interferes with chondrogenic and hypertrophic matrix production by mesenchymal stem cells. *J Biomech.* 2014;47(9):2122–2129. DOI: 10.1016/j.jbiomech.2013.11.006
17. Schulz RM, Wüstneck N, van Donkelaar CC, Shelton JC, Bader A. Development and validation of a novel bioreactor system for load- and perfusion-controlled tissue engineering of chondrocyte-constructs. *Biotechnol Bioeng.* 2008;101(4):714–728. DOI: 10.1002/bit.21955
18. Tigli RS, Cannizaro C, Gümüşderelioğlu M, Kaplan DL. Chondrogenesis in perfusion bioreactors using porous silk scaffolds and hESC-derived MSCs. *J Biomed Mater Res A.* 2011;96(1):21–28. DOI: 10.1002/jbm.a.32949
19. Nazempour A, Quisenberry CR, Abu-Lail NI, Van Wie BJ. Combined effects of oscillating hydrostatic pressure, perfusion and encapsulation in a novel bioreactor for enhancing extracellular matrix synthesis by bovine chondrocytes. *Cell Tissue Res.* 2017;370(1):179–193. DOI: 10.1007/s00441-017-2651-7

20. Silva JC, Moura CS, Borrecho G, et al. Extruded Bioreactor Perfusion Culture Supports the Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem/Stromal Cells in 3D Porous Poly(ϵ -Caprolactone) Scaffolds. *Biotechnol J.* 2020;15(2):e1900078. DOI: 10.1002/biot.201900078

Об авторах

Басок Юлия Борисовна — д.б.н., заведующий отделом биомедицинских технологий и тканевой инженерии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России.

Григорьев Алексей Михайлович — к.б.н., старший научный сотрудник отдела биомедицинских технологий и тканевой инженерии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России.

Кирсанова Людмила Анфилофьевна — к.б.н., старший научный сотрудник отдела биомедицинских технологий и тканевой инженерии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России.

Белова Александра Дмитриевна — к.б.н., старший научный сотрудник отдела биомедицинских технологий и тканевой инженерии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России.

Суббот Анастасия Михайловна — к.м.н., руководитель лаборатории фундаментальных исследований в офтальмологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт глазных болезней имени М.М. Краснова».

Гусева Екатерина Алексеевна — лаборант-исследователь отдела биомедицинских технологий и тканевой инженерии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России.

Немец Евгений Абрамович — д.б.н., ведущий научный сотрудник отдела биомедицинских технологий и тканевой инженерии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России.

Севастьянов Виктор Иванович — д.б.н., профессор, главный специалист отдела подготовки научных и медицинских кадров ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России; директор АНО «Институт медико-биологических исследований».

Authors

Yulia B. Basok — Dr. Sci. (Biology), Head of the Department of Biomedical Technologies and Tissue Engineering Department, Shumakov National Medical Research Center of Transplantation and Artificial Organs.

Alexey M. Grigor'ev — Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, Department of Biomedical Technologies and Tissue Engineering, Shumakov National Medical Research Center of Transplantation and Artificial Organs.

Liudmila A. Kirsanova — Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, Department of Biomedical Technologies and Tissue Engineering, Shumakov National Medical Research Center of Transplantation and Artificial Organs.

Alexandra D. Belova — Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, Department of Biomedical Technologies and Tissue Engineering, Shumakov National Medical Research Center of Transplantation and Artificial Organs.

Басок Ю.Б. и соавт.

Получение тканеинженерного хряща с помощью биореактора

Anastasia M. Subbot — MD, Cand. Sci. (Medicine), Head of the Laboratory of Fundamental Research in Ophthalmology, Research Institute of Eye Diseases

Ekaterina A. Guseva — Research Laboratory Assistant, Department of Biomedical Technologies and Tissue Engineering, Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs.

Evgeny A. Nemets — Dr. Sci. (Biology), Leading Researcher, Department of Biomedical Technologies and Tissue Engineering, Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs.

Victor I. Sevastianov — Dr. Sci. (Biology), Professor of Biophysics, Senior Specialist, Department of Scientific and Medical Personnel Training, Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs; Head of the Biomedical Research and Technology Institute.

Вклад авторов

Ю.Б. Басок — разработка конструкции перфузионного биореактора; сбор данных, их анализ и интерпретация; подготовка рукописи.

А.М. Григорьев — разработка конструкции перфузионного биореактора; проведение экспериментов по выделению МСК ЖТч и их культивированию.

Л.А. Кирсанова — проведение гистологического исследования образцов.

А.Д. Белова — определение содержания ДНК в образцах, подготовка рукописи.

А.М. Суббот — исследование образцов с помощью СЭМ.

Е.А. Гусева — проведение процедуры децеллюляризации хрящевой ткани.

Е.А. Немец — сбор данных, их анализ и интерпретация.

В.И. Севастьянов — окончательное одобрение варианта статьи для опубликования.

Author contribution statement

Yulia B. Basok — development of the perfusion bioreactor design; data collection, analysis and interpretation; manuscript preparation.

Aleksey M. Grigoriev — development of the perfusion bioreactor design; conducting experiments on the isolation of adipose-tissue MSC and their cultivation.

Lyudmila A. Kirsanova — conducting histological examination of samples.

Alexandra D. Belova — determination of DNA content in samples, manuscript preparation.

Anastasia M. Subbot — SEM examination of samples.

Ekaterina A. Guseva — conducting the cartilage tissue decellularization procedure.

Evgeny A. Nemets — data collection, analysis and interpretation.

Viktor I. Sevastyanov — final approval of the article version for publication.