

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Государственный научный центр Российской Федерации - Институт
медико-биологических проблем Российской академии наук

На правах рукописи

МАТВЕЕВА

Диана Константиновна

**ВЛИЯНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ *IN VITRO* НА СВОЙСТВА
ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ
СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК**

1.5.5. – Физиология человека и животных

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

в.н.с. лаборатории «Клеточной физиологии»

ГНЦ РФ – ИМБП РАН,

доктор биологических наук

Андреева Е.Р.

Москва - 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1. Матрисом как структурно-функциональный комплекс микроокружения клеток.....	10
1.2. Структурные компоненты внеклеточного матрикса (основной матрисом)	12
1.2.1. Коллагены.....	12
1.2.1. Гликопротеины	14
1.2.2. Протеогликаны.....	16
1.3. Матрисом-ассоциированные молекулы	18
1.3.1. Регуляторные молекулы.....	18
1.3.2. Секретируемые факторы	21
1.3.3. Матрикс-аффилированные молекулы.....	22
1.4. «Сигнальные» функции внеклеточного матрикса	23
1.4.1. Рецепторы, участвующие во взаимодействии клетка-матрикс	23
1.4.2. Матрикины	25
1.5. Внеклеточный матрикс – структурный компонент соединительной ткани.....	26
1.6. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки в локальном микроокружении ...	27
1.6.1. Влияние уровня O ₂ в микроокружении клеток на продукцию матрикса.....	30
1.7. Децеллюляризованный внеклеточный матрикс как инструмент для модификации свойств клеток	33
1.7.1. Особенности децеллюляризованного матрикса мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток из разных тканевых источников	35
1.7.2. Подходы для модификации внеклеточного матрикса.....	36
1.8. Перспективные направления использования ВКМ	39
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	41
2.1. Культивирование клеток.....	41
2.2. Полногеномный анализ транскриптома клеток и ОТ-ПЦР	44
2.3. Децеллюляризация внеклеточного матрикса и экстракция белков	45
2.4. Иммуноцитохимический анализ	46
2.5. Выявление коллагеновых и неколлагеновых белков внеклеточного матрикса и их полуколичественное определение	46
2.6. Хромато-масс-спектрометрический анализ	47
2.7. Подготовка проб кондиционированной среды	48
2.8. Активность матриксных металлопротеиназ.....	48
2.9. Иммуноферментный анализ	49

2.10. Мультиплексный анализ	49
2.11. Рецеллюляризация	49
2.12. Микроскопия	50
2.13. Обработка изображений.....	50
2.14. Статистическая обработка результатов	51
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	52
3.1. Характеристика матрикса, продуцируемого мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками при 20% или 5% O ₂	52
3.1.1. Дифференциальная экспрессия генов, кодирующих белки матрисома	52
3.1.2. Гистологический анализ компонентов внеклеточного матрикса	57
3.1.3. Содержание про-коллагена 1 в кондиционированной среде.....	59
3.1.4. Иммуноцитохимическая характеристика белков внеклеточного матрикса	61
3.1.5. Особенности упаковки молекул внеклеточного матрикса, продуцируемого мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками при различном уровне O ₂	62
3.1.6. Активность матриксных металлопротеиназ в кондиционированной среде	63
3.2. Характеристика структурных особенностей и белкового состава матрикса, полученного после децеллюляризации.....	69
3.2.1. Морфологическая характеристика препаратов децеллюляризованного внеклеточного матрикса.....	69
3.2.2. Протеомный профиль экстрактов децеллюляризованных матриксов.....	72
3.2.3. Анализ факторов роста, депонированных в децеллюляризованном матриксе	81
3.3. Оценка регуляторных свойств матриксов после рецеллюляризации	87
3.3.1. Экспансия мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток на децеллюляризованных матриксах	87
3.3.2. Паракринный профиль мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток после рецеллюляризации на матриксы.....	88
3.3.3. Дифференцировочный потенциал мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, культивируемых на матриксах	91
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	97
ВЫВОДЫ.....	100
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	101

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

МСК – мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки

ВКМ – внеклеточный матрикс

дцВКМ – децеллюляризированный ВКМ

HIF – фактор, индуцируемый гипоксией

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

ЛСМ — лазерно-сканирующая микроскопия

NH₄OH – гидроксид аммония

PBS – фосфатно-солевой буфер

MMP – матриксные металлопротеиназы

TIMP – тканевой ингибитор MMP

ADAM – адамализины

ADAMTS – содержащие мотив тромбоспондина-1 ADAM-протеазы

LOX – лизилоксидаза

LOXL – лизидоксидаза-подобный фермент

P4H – пролил-4-гидроксилаза

PLOD – проколлаген-лизил-3-оксиглутарат-5-дегидрогеназа

CD – кластер дифференцировки

ГАГ – гликозаминогликан

SLRP – малые лейцин-богатые протеогликаны

COMP – олигомерный матриксный белок хряща

TGF- β – трансформирующий фактор роста β

HGF – фактор роста гепатоцитов

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов

PDGF – тромбоцитарный фактор роста

TNF- α – фактор некроза опухоли α

HGF – фактор роста гепатоцитов

FGF – фактор роста фибробластов

IGF – инсулиноподобный фактор роста

uPA / tPA — урокиназный / тканевой активатор плазминогена

IL – интерлейкин

АФК – активные формы кислорода

RGD – аминокислотная последовательность (аргинин-глицин-аспарагиновая к-та)

FITC – флуоресцеин изотиоцианат

DAPI – 4,6-диамидино-2-фенилиндо

ВВЕДЕНИЕ

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (МСК) играют важную роль в гомеостазе и регенерации тканей благодаря своей способности к самообновлению, мультилинейной дифференцировке, паракринной активности (Caplan et al., 2011; Cho et al., 2014; Kumar et al., 2019; Asgari Taei et al., 2021). *In vivo* свойства МСК регулируются различными клеточными, биохимическими и биофизическими факторами их тканевой ниши (Chow et al., 2001; Spencer et al., 2014). При этом МСК высвобождают целый ряд биологически активных продуктов, которые оказывают влияние на локальную клеточную динамику (Kusuma et al., 2017; Chang et al., 2021). Важным продуктом секрета МСК является внеклеточный матрикс (ВКМ) (Sears, Ghosh, 2020; Yang et al., 2022).

ВКМ является неотъемлемым компонентом тканей организма, который обеспечивает их формирование и интеграцию клеточных популяций. За последние десятилетия накоплен значительный массив данных, указывающих на то, что ВКМ выступает как динамичный и многофункциональный регулятор различных клеточных систем, в том числе, ниш стволовых и прогениторных клеток (Gattazzo et al., 2014; Burgstaller et al., 2018; Lee-Thedieck et al., 2022). ВКМ регулирует различные клеточные процессы, такие как пролиферация, миграция, дифференцировка (Frantz et al., 2010; Clause, Barker, 2013; Hoshiba et al., 2016; Zhu 2019; Novoseletskaia et al., 2020). В настоящее время для комплексной характеристики всех связанных с ВКМ белков используется термин матрисом. Согласно базе данных MatrisomeBD, выделяют основной матрисом, включающий структурные компоненты - коллагены, гликопротеины и протеогликаны, и матрисом-ассоциированные белки, представленные секреторируемыми факторами, регуляторными и ВКМ-аффилированными молекулами (Naba et al., 2016; Ragelle et al., 2017).

Взаимодействие клеток с матриксом, безусловно, является двунаправленным: клетки постоянно синтезируют и ремоделируют ВКМ, а его состав, в свою очередь, определяет поведение клеток (Hynes, 2009; Ahmed et al., 2016; Sasikumar et al., 2019; Wang et al., 2020; Matveeva et al., 2023). Соответственно, при изменении состава микроокружения будет происходить модификация биохимических, биомеханических и физических свойств ВКМ и *vice versa*.

In vitro установлено, что даже после удаления клеток-продуцентов (децеллюляризации), ВКМ сохраняет способность передавать инструктивные свойства, обусловленные такими факторами как тканевой источник и уровень коммитированности (см. обзор Матвеева, Андреева, 2020). Например, дцВКМ, выделенных из хряща, сухожилий, или полученный от гладкомышечных клеток стимулирует хондрогенную (Xue et al., 2012), тендогенную (Zhang et

al., 2011) и миогенную (Rao Patabhi et al., 201) дифференцировки МСК, соответственно. В связи с этим ВКМ МСК представляет значительный интерес для оптимизации методов культивирования, которые модулируют нативную нишу и обеспечивают масштабную экспансию без риска потери функций клеток.

Низкий уровень O_2 является наиболее важным физическим фактором микроокружения в локальных нишах стволовых и прогениторных клеток (Haque et al., 2013; Ivanovic, 2017). В работах последних двух десятилетий убедительно продемонстрировано, что содержание O_2 может играть решающую роль в реализации функциональной активности МСК (Guzy and Schumacker, 2006; Ivanovic, 2009; Buravkova et al., 2014; 2014; Ivanovic, 2017; Noronha et al., 2019; Pattappa et al., 2019; Yusoff et al., 2022).

Роль снижения уровня O_2 – гипоксии, в продукции ВКМ рассматривается исследователями в основном в контексте сосудистых заболеваний и опухолевой прогрессии, при которых клетки испытывают гипоксический стресс (Gillies, Gatenby, 2007; Beyer et al., 2009; Winkler et al., 2020; Dekker et al., 2022). Регуляция ВКМ в таких условиях происходит через HIF-1-зависимый механизм. Показано, что транскрипционными мишенями этого фактора являются гены как структурных молекул ВКМ, так и ферментов, участвующих в его ремоделировании (Gilkes et al., 2013; Petrova et al., 2018; Wicks et al., 2022). Адаптация к гипоксическому стрессу сопровождается увеличением продукции, приобретением упорядоченности и жесткости структур ВКМ, что необходимо для обеспечения активации интегринов, усиления экспансии и повышения выживаемости клеток (Jean et al., 2011; Saed, Diamond, 2002; Deschene et al., 2012; Milner et al., 2008; Hu et al., 2014; Kalluri, 2016; Kumar et al., 2018). Однако работ, посвященных модификации ВКМ МСК при постоянном уровне O_2 , близком к тканевому – физиологической гипоксии, крайне мало. Некоторую информацию относительно длительных эффектов гипоксии на продукцию ВКМ можно получить из экспериментов по коммитированию МСК. Показано снижение остео-, адипо- и увеличение хондрогенной дифференцировок при гипоксии как на уровне транскрипции генов, так и трансляции тканеспецифичных белков, в том числе компонентов ВКМ (Fehrer et al., 2007; Volkmer 2010; Pei et al., 2012).

Анализ того, как тканевой уровень O_2 может влиять не только на фенотип МСК, но и на их секреторную активность, в частности продукцию ВКМ, необходим для более полного понимания механизмов функционирования этих клеток в микроокружении. Мы предполагаем, что дцВКМ от МСК при физиологической гипоксии может сохранять свои компетенции и воспроизводить их при последующей рецеллюляризации, что будет отражаться на свойствах вновь засеваемых клеток. Результаты исследования роли факторов микроокружения в

потенциале формируемого ВКМ внесут важный вклад в фундаментальные исследования МСК и будут востребованы для нужд регенеративной медицины.

Цель работы: Изучение свойств и регуляторной активности внеклеточного матрикса, продуцируемого мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками в условиях тканевого уровня O_2 (физиологической гипоксии).

Задачи:

1. Проанализировать дифференциальную экспрессию генов, кодирующих белки матрисома в мультипотентных мезенхимальных стромальных клетках, постоянно культивируемых при физиологической гипоксии (5% O_2) по сравнению со стандартным лабораторным уровне O_2 (20% O_2);
2. Гистохимически и иммунохимически охарактеризовать структурные компоненты внеклеточного матрикса, продуцируемого мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками при различных уровнях O_2 , а также определить активность ремоделирующих ферментов;
3. Выявить особенности упаковки структур внеклеточного матрикса при различных уровнях O_2 ;
4. С помощью масс-спектрометрического анализа охарактеризовать белковый состав внеклеточного матрикса, продуцируемого мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками при 20% и 5% O_2 ;
5. Изучить эффекты матрикса, продуцируемого мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками при различных уровнях O_2 , на свойства клеток после рецеллюляризации (адгезия, паракринный профиль, остеопотенциал).

Научная новизна

Впервые на транскриптомном уровне и на уровне белка проведена комплексная характеристика матрисома МСК при физиологической гипоксии *in vitro*. Установлено, что профиль генов, кодирующих структурные и регуляторные белки матрисома МСК, зависит от уровня O_2 в их микроокружении.

Впервые установлено, что структурные свойства ВКМ изменяются при физиологической гипоксии. Морфометрически продемонстрировано достоверное увеличение выровненности фибрилл и ветвистости сети ВКМ, продуцируемого МСК при 5% O_2 .

Впервые продемонстрировано, что ВКМ, полученный от МСК при 20% O_2 , содержит белки, тканеспецифичные для костной, а при 5% O_2 - хрящевой ткани.

Впервые описано замедление остеоккоммитирования и соответствующее изменение паракринного профиля МСК, культивируемых на дцВКМ, полученном при физиологической гипоксии.

Теоретическая и практическая значимость работы

Изучение механизмов поддержания тканевого гомеостаза и ремоделирования за счет взаимодействия клеточных и неклеточных составляющих тканевых ниш является необходимым элементом в системе формирования знаний о роли малодифференцированных предшественников в организме. Полученные данные указывают на важное значение уровня O_2 в формировании внеклеточного матрикса. Результаты исследования дополняют фундаментальные представления о регуляции судьбы МСК посредством сигналов из микроокружения и могут быть использованы для дальнейшего изучения механизмов взаимодействия ВКМ-клетка. Полученные данные о O_2 -зависимых изменениях свойств ВКМ могут быть востребованы для разработки новых протоколов *ex vivo* экспансии МСК с сохранением или приобретением свойств, необходимых для регенеративной медицины. Применение скаффолдов из дцВКМ, полученных от МСК при различных уровнях O_2 , может рассматриваться для разработки тканеинженерных конструкций.

Результаты работы используются в курсе лекций по клеточной физиологии для магистров ФКИ МГУ.

Положения, выносимые на защиту

1. Профиль генов, кодирующих структурные и регуляторные белки матрисома мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, зависит от уровня O_2 в их микроокружении *in vitro*.
2. Физиологическая гипоксия не влияет на содержание коллагеновых и неколагеновых белков матрикса, но определяет активность матриксных металлопротеиназ и структурные особенности (характер упаковки) внеклеточного матрикса.
3. Матрисом мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, культивируемых при 5% O_2 , обогащен белками, которые участвуют в активации пролиферации, ангиогенеза и хондрогенеза. Регуляция этих процессов является частью гипоксических компетенций этих клеток.
4. Уровень O_2 , при котором был получен внеклеточный матрикс, влияет на его активность при последующей рецеллюляризации.

Апробация работы

Основные результаты и положения диссертации были представлены и обсуждены на научных мероприятиях: XVIII конференция молодых учёных, специалистов и студентов, посвящённая 50-летию высадки человека на Луну (Россия, Москва, 2019); IV Национальный Конгресс по регенеративной медицине (Россия, Москва, 2019); VII молодёжная школа-конференция по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН (Россия, Санкт-Петербург, 2020); IV Сеченовский Международный Биомедицинский Саммит (Россия, Москва, 2020); Всероссийская Научная Конференция с международным участием "Регенеративная биология и медицина" (Россия, Москва, 2021); XIX Конференции молодых учёных, специалистов и студентов», посвящённая 60-летию первого полета человека в космос (Россия, Москва, 2021); VIII Молодежная школа-конференция по молекулярной биологии (Россия; Санкт-Петербург, 2022); V Национальный конгресс по регенеративной медицине (Россия, Москва, 2022); Международный конгресс CRISPR-2023 (Россия, Новосибирск, 2023).

По теме диссертации опубликовано 15 печатных работ, в том числе 5 статьи в журналах из перечня ВАК РФ и баз данных RSCI/Scopus/Web of Science и 10 тезисов докладов.

Связь работы с научными программами

Работа выполнена при частичной поддержке грантов Программы Президиума РАН № 43П и Российского научного фонда № 23-15-00062.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Матрисом как структурно-функциональный комплекс микроокружения клеток

Нормальный гомеостаз тканей и органов многоклеточных организмов является результатом взаимодействия клеточных и неклеточных компонентов, формирующих тканеспецифичное микроокружение. Гипотетическая тканевая ниша представляет собой ансамбль, включающий клетки, продукты их секреторной активности: ВКМ, растворимые и депонированные биологически активные медиаторы, и различные физические факторы микроокружения (Scadden et al., 2006; Gattazzo et al., 2014; Костюшев и др., 2014). Гомеостаз такой структурно-функциональной единицы регулируется по принципу обратной связи между клеточными и неклеточными элементами (Mannino et al., 2022).

На Рисунке 1 представлена схема, отражающая основные принципы взаимодействия клеток с ВКМ. Макромолекулы матрикса образует трехмерную молекулярную сеть вокруг клеток. Жесткость, топография, пористость, нерастворимость ВКМ обеспечивают заякоривание клеток и регулируют их пролиферацию, миграцию, дифференцировку и гибель (Streuli, 1999; Hynes, 2009; Rozario, DeSimone, 2010; Рогова и др., 2011; Воронкина и др., 2017; Новоселецкая и др., 2019).

ВКМ изолирует клетки от сигналов дифференцировки, контролируя доступность факторов роста и морфогенов, а также способствует эффективному обмену питательными веществами для поддержания долгосрочного роста и выживания клеток (Discher et al., 2009; Muncie, Weaver, 2018). В связи с этим ВКМ рассматривается как ключевой компонент ниши, который поддерживает состояние покоя малокоммитированных клеток (Gattazzo et al., 2014).

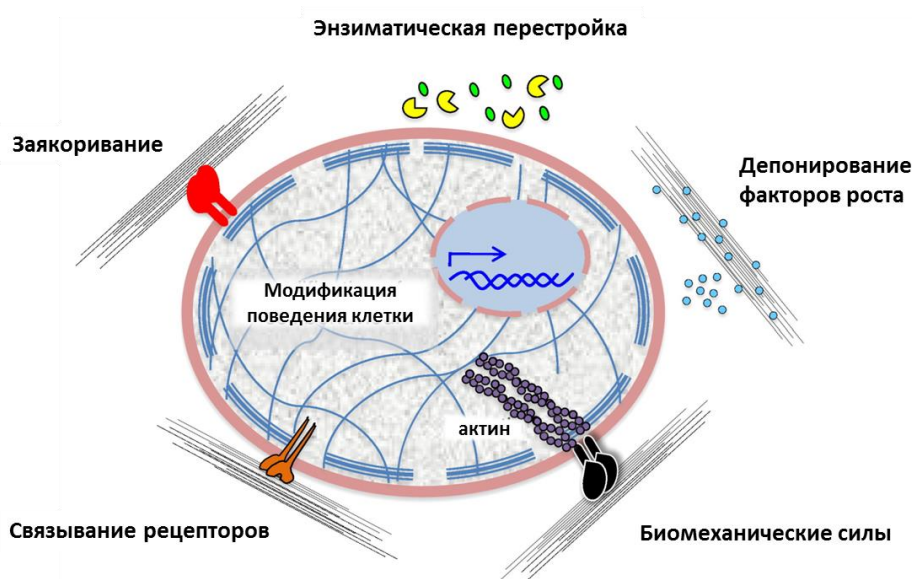


Рисунок 1. Внеклеточный матрикс как фактор микроокружения клеток.

Динамические взаимодействия рецептор-ВКМ способствуют циклам клеточной адгезии и миграции клеток. Структура и жесткость ВКМ во многом определяют направленную миграцию клеток – дюротаксис (Hadden et al., 2017). В зависимости от биомеханических свойств ВКМ после закоривания в клетках запускаются различные сигнальные пути, что приводит к изменениям в экспрессии генов и поведении клеток (Jansen et al., 2017).

Клетки, в свою очередь, за счет протеазной/антипротеазной активности их ферментов способны ремоделировать ВКМ, тем самым обеспечивая динамичность его структуры (Page-McCaw et al., 2007; Ahmed, Ffrench-Constant, 2016; Воронкина и др., 2017) и высвобождение депонированных факторов роста (Daley, 2007).

Для описания такого разнообразного комплекса, включающего как структурные элементы ВКМ, так и ассоциированные с ними молекулы, предложен термин матрисом (Hynes, Naba, 2011; Naba et al., 2012). В него включены белки основного матрисома, объединяющие структурные белки (коллагены, гликопротеины и протеогликаны), и матрисом-ассоциированные белки, включающие в себя регуляторные ферменты, секретируемые факторы и ВКМ-аффилированные молекулы (Рисунок 2).

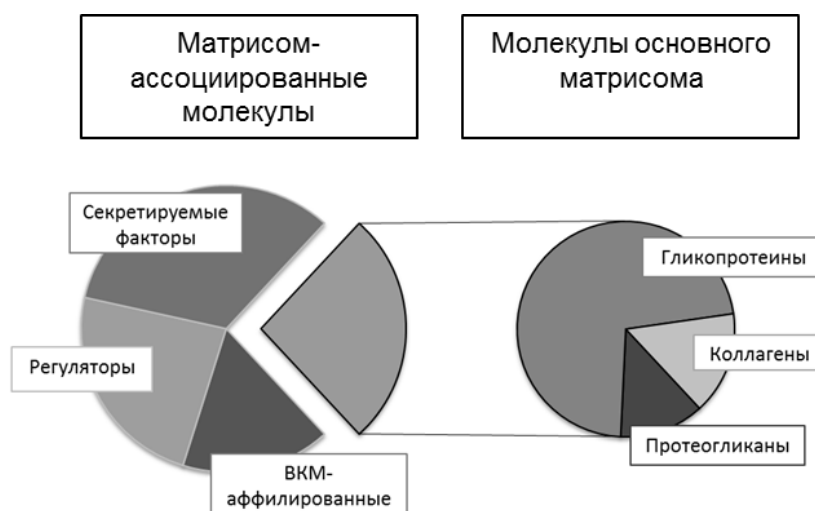


Рисунок 2. Компоненты матрисома клеток.

На основании данных масс-спектрометрического анализа был произведен отбор молекул и составлен атлас распределения белков ВКМ в матрисоме (Naba et al., 2016; Raghunathan et al., 2019). Однако поскольку многие молекулы ВКМ нерастворимы и трудно выделяются, молекулярные методы и биоинформатический анализ позволяют, на основании характерных для молекул матрикса доменов, предсказывать структуру, принадлежность к группе матрисома и свойства белков. Данные подходы значительно расширяют перечень ВКМ-ассоциированных молекул (Naba et al., 2012).

В настоящее время представление о матрисоме, как единой интегрированной системе, формирующей тканевую нишу, становится все более востребованным, поскольку позволяет комплексно описывать белковый состав, определяющий функционирование ВКМ в различных тканевых нишах клеток, или в тех или иных экспериментальных условиях.

1.2. Структурные компоненты внеклеточного матрикса (основной матрисом)

1.2.1. Коллагены

Коллагены – это суперсемейство белков ВКМ, состоящее из двадцати восьми различных молекул, которые образованы 46 полипептидными α -цепями, с концевыми N- и C-пропептидами. Определяющей особенностью коллагенов является структурный мотив, который образует спираль из трех полипептидных цепей, каждая из которых имеет повторяющийся триплет Gly-X-Y. Остатки глицина всегда занимают третье положение, а вместо X и Y, как правило, пролин и 4-гидроксипролин (Heino, 2007; Shoulders, Raines, 2009). Коллагены подразделяются на 7 типов: фибриллярные, сети-образующие, фибрилл-ассоциированные коллагены с прерывистыми тройными спиралями (FACITs), мембранно-связанные коллагены с прерывистыми тройными спиралями (MACIT), закоривающие фибриллы, коллагены, образующие «нити бисера» и группа коллагеноподобных белков с множественной тройной спиралью (MULTIPLEXIN) (Рисунок 3; Shoulders, Raines 2009; Theocharis et al., 2015).

Фибриллярные коллагены (типы I, II, III, V, XI, XXIV и XXVII) широко представлены в тканях и обеспечивают их прочность. После посттрансляционной модификации в эндоплазматическом ретикулуме (посредством гидроксилирования и гликозилирования (ферменты P3H, P4H) и образования дисульфидных мостиков) α -цепи, собираются в гомо- и гетеротримерные спирали в направлении от C- к N-концу, образуя тройную спираль проколлагена (Boudko, Bachinger, 2012). Ранний этап фибриллогенеза начинается с удаления обоих N- и C-концов классическими проколлагеновыми N-пептидазами (подгруппа семейства ADAMT) и проколлагеновой C-пептидазой (BMP-1) с образованием тройной спирали тропоколлагена (Paiva et al., 2019). Далее уже во внеклеточном пространстве тройные спирали тропоколлагена подвергаются самосборке и упаковываются с образованием микрофибриллы коллагена.

К классу сети-образующих коллагенов относятся типы IV, VIII и X. Они имеют разрывы в структуре тройной спирали, за счёт этого их молекулы становятся гибкими и способны взаимодействовать друг с другом, формируя обширные сети. Также данные коллагены могут взаимодействовать с различными компонентами ВКМ, создавая мультимолекулярные комплексы (San Antonio et al., 2012). Например, это важные компоненты базальных мембран,

которые необходимы для поддержания целостности тканей и играют важную роль в молекулярной фильтрации. Коллаген IV типа локализуется в большинстве базальных мембран, коллаген VIII типа находится в десцеметовой мембране и субэндотелиальных слоях сосудов, коллаген X типа локализован в зонах минерализации гиалинового хряща (Reichenberger et al., 1991; Greenhill et al., 2000; Kadler et al., 2007).

Фибрилл-ассоциированные коллагены FACITs имеют прерывистую и гибкую структуру. Данная группа объединяет большое количество коллагенов IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI, XXII типов. Они взаимодействуют с фибриллярными коллагенами, тем самым могут объединять их с другими компонентами ВКМ. Группа MACIT (коллагены XIII, XVII, XXIII, XXV типов) имеют трансмембранный и внеклеточный домены. Расщепление адамализинами коллагена XVII типа моделирует подвижность клеток (Franzke et al., 2002).

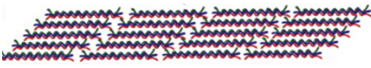
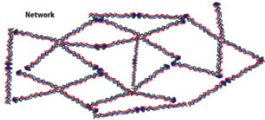
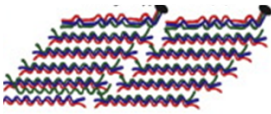
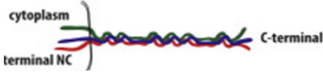
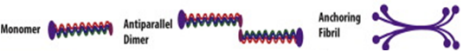
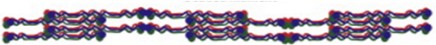
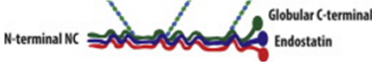
Название	Типы коллагенов	Строение
Фибриллярные коллагены	I, II, III, V, XI, XXIV, XXVII	
Сети-образующие коллагены	IV, VIII, X	
Фибрилл-ассоциированные коллагены с прерывистыми тройными спиралями (FACITs)	IX, XII, XIV, XVI, XX, XXI, XXII	
Мембранно-связанные коллагены с прерывистыми тройными спиралями (MACIT)	XIII, XVII, XXIII, XXV	
Закоривающие фибриллярные коллагены	VII	
Коллагены, образующие «нити бисера»	VI, XXVI, XXVIII	
Группа коллагеноподобных белков с множественной тройной спиралью (MULTIPLEXIN)	XV, XVIII	

Рисунок 3. Классификация и строение коллагенов (Адаптировано из Theocharis et al., 2015).

Коллагены, закоривающие фибриллы (тип VII) и образующие «нити бисера» (VI, XXVI, XXVIII), располагаются в базальной мембране. Последние взаимодействуют с различными белками ВКМ, гиалуроновой кислотой, протеогликанами, коллагеном IV типа (Kadler et al., 2007). Кроме того, установлены регуляторные свойства для данных коллагенов. Например, отмечается цитопротекторная функция коллагена VI типа (Cescon et al., 2015).

Коллагены XV и XVIII типов относятся к классу коллагеноподобных белков с множественной тройной спиралью (MULTIPLEXIN), содержатся в базальных мембранах эндотелиальных и эпителиальных клеток. Оба коллагена несут на С-конце эндостатиновые и эндостатиноподобные модули (Iozzo, Schaefer, 2015). Расщепление этой части высвобождает эндостатин, который взаимодействует с многочисленными рецепторами, включая интегрины $\alpha 5 \beta 1$, $\alpha \nu \beta 3$ и $\alpha \nu \beta 5$ и рецептор к фактору роста сосудов (VEGFR2), тем самым ингибируя ангиогенез посредством активации сигнальных каскадов (Theocharis et al., 2015).

1.2.1. Гликопротеины

Гликопротеины - многочисленная группа основного матрисома, компоненты которой выполняют целый ряд функций, включая структурную организацию ВКМ, участие в адгезии и связывании факторов роста (Halper, Kjaer, 2013).

Эластин - нерастворимый структурный полимерный гликопротеин. Тропоэластиновые мономеры самоорганизуются и модифицируются с помощью лизилоксидаз с образованием поперечных сшивок, придавая тканям упругие свойства (Chung et al., 2006). Эластиновое волокно состоит из центрального ядра эластина и периферических микрофибрилл, к которым относятся такие гликопротеины, как фибриллины, фибулины, эмилины. Основные составляющие микрофибрилл - фибриллины, обеспечивают долговременное поддержание структуры эластинового волокна. Фибриллин-1 также играет ключевую роль в тканевом гомеостазе, благодаря специфическим взаимодействиям с факторами роста (BMP, GDF, LTBP), интегринами клеточной поверхности и другими белками ВКМ (Jensen, Handford, 2016). Предполагается, что микрофибриллы обеспечивают каркас, который способствует выравниванию и сшиванию молекул эластина (Wagenseil, Mecham, 2017). Связанные с микрофибриллами гликопротеины (MFAP) могут играть важную роль в качестве связующих молекул между тропоэластином и фибриллинами (Mecham, Gibso, 2015). Фибулины участвуют в образовании эластических волокон, взаимодействуя с тропоэластином, фибриллин-1 и лизилоксидазами. Эмилин-1 может регулировать эластогенез путем стабилизации молекулярных взаимодействий между компонентами эластичных волокон, а также, взаимодействуя с интегринами, модулирует клеточную адгезию (Danussi et al., 2013).

Фибронектин - широко распространённый мультидоменный гликопротеин, который состоит из двух субъединиц, ковалентно связанных дисульфидными связями на своих С-концах (Potts, Campbell, 1994). Его многодоменность позволяет одновременно связываться с клеточными рецепторами, коллагенами, протеогликанами и факторами роста (Sabatier et al., 2009). Фибронектины представлены растворимыми молекулами плазмы и молекулами, которые образуют функционально активные фибриллярные структуры вокруг клеток (Mouw et al., 2014).

Фибронектин связывается с клеточной поверхностью посредством интегринов через RGD-домен и синдеканов через гепарин-связывающий домен. Данные взаимодействия опосредуют адгезию и миграцию клеток, а также внутриклеточную передачу сигналов (Zollinger, Smith, 2017).

Ламинины - это семейство больших мультидоменных, гетеротримерных гликопротеинов. Существует 16 тканеспецифичных изоформ ламининов, каждая из которых состоит из трех α , β и γ цепей (Domogatskaya et al., 2012). Ламинины образуют нерастворимую сеть в комплексе с коллагеном IV типа, которая играет ключевую структурную роль в организации базальной мембраны (Aumailley, Smyth, 1998). Взаимодействие ламининов с различными клеточными рецепторами (интегринами, протеогликанами, дистрогликанами) определяет закоривание клеток и регулирует стабильность фенотипа, жизнеспособность, миграцию и дифференцировку (Halper, Kjaer, 2014).

Относительно недавно среди гликопротеинов было предложено выделить группу матриклеточных белков (Рисунок 4) (Bornstein, 1995). К ним относятся тромбоспондины, белок олигомерного матрикса хряща (COMP), остеонектин, остеопонтин, периостин, тенасцины, фибулины и белки семейства CCN (CTGF, CYR61) (Murphy-Ullrich, Sage, 2014).

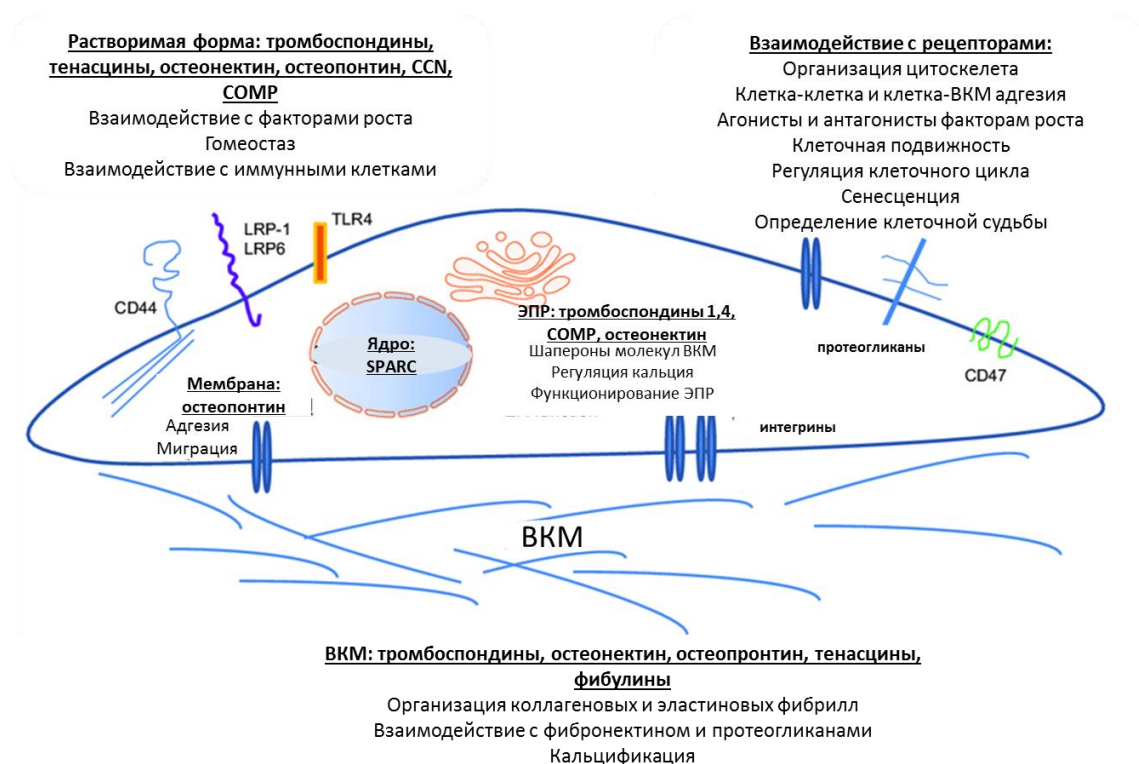


Рисунок 4. Характеристика матриклеточных белков (адаптировано из Murphy-Ullrich, Sage, 2014).

Данные молекулы локализуются внеклеточно, на мембранах и внутриклеточно. На внеклеточном уровне они участвуют в образовании фибрилл ВКМ, связывают разнообразные клеточные рецепторы (интегрины, синдеканы, CD44, CD36, LRP-6) и депонируют растворимые

факторы роста (например, VEGF, FGF-2 и латентный TGF- β). За счет этого модулируется клеточная активность (Schiemann et al., 2003; Nozaki et al., 2006; Garg et al., 2011). Во внутриклеточном пространстве тромбоспондины (1 и 4 типа), остеонектин и олигомерный белок хряща (COMP) регулируют уровень кальция в эндоплазматическом ретикулуме и выступают шаперонами для молекул ВКМ (Emerson et al., 2006). Матричные белки умеренно экспрессированы во взрослых тканях, тогда как в развивающихся тканях, а также при патологических состояниях их представленность увеличивается (Murphy-Ullrich, Sage, 2014).

1.2.2. Протеогликаны

Протеогликаны – это важнейшие структурные и функциональные компоненты ВКМ, которые состоят из корового ковалентно связанного белка и отрицательно заряженных гликозаминогликанов (ГАГ) (Maeda, 2015). Существует 6 типов ГАГ: галактозаминогликаны (хондроитин сульфат и дерматан сульфат), глюкозаминогликаны (гепаран сульфат, гепарин, кератан сульфат) и гиалуроновая кислота. Принято классифицировать протеоглики на четыре семейства: внутриклеточные, связанные с клеточной поверхностью, перичеллюлярные и внеклеточные протеоглики (Рисунок 5; Iozzo, Schaefer, 2015).

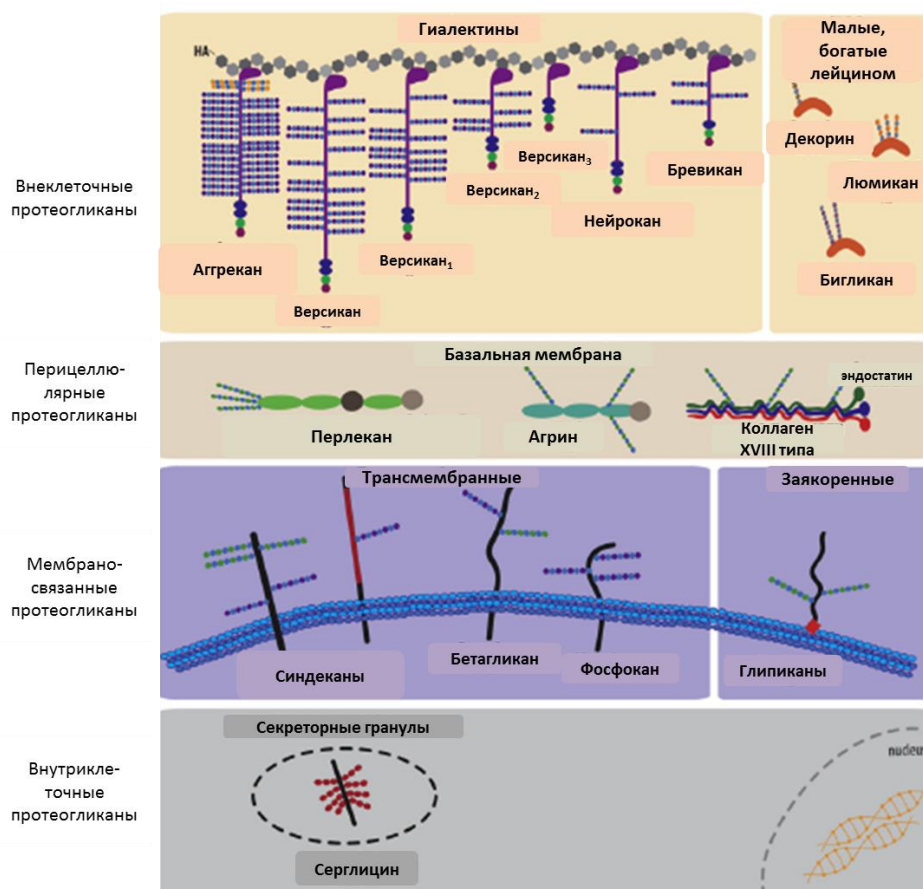


Рисунок 5. Классификация и схема расположения протеогликанов (Адаптировано из Theocharis et al., 2015).

На данный момент известен только 1 внутриклеточный протеогликан - серглицин, несущий гепарин в составе боковых цепей. Известно, что гранулоциты и лейкоциты в значительном количестве синтезируют серглицин и накапливают его в гранулах, где он взаимодействует с многочисленными медиаторами воспаления, такими как протеазы, хемокины, цитокины и факторы роста (Kolset, Pejler, 2011). Также было показано, что серглицин высоко экспрессируется опухолевыми клетками и может стимулировать воспалительный процесс в их микроокружении (Korpetinou et al., 2014).

Протеогликаны, несущие гепарансульфат (ГСПГ), преимущественно связаны с перичеллюлярным матриксом (перлекан, агрин), либо с плазматической мембраной через трансмембранные домены (синдеканы 1-4) или гликозилфосфатидил-инозитольный якорь (глипиканы 1-6) (Sarrazin et al., 2011). Данные молекулы связывают коллагены, фибронектин и тромбоспондины, а также различные факторы роста, такие как FGF, VEGF и PDGF. Секвестрирование факторов роста и молекул ВКМ посредством синдеканов на поверхности клеток позволяет собирать сигнальные комплексы в сочетании с другими рецепторами и запускать сигнальные каскады (Chung et al., 2016). Тем самым синдеканы регулируют адгезию, пролиферацию, миграцию клеток, в частности эндотелия (De Rossi et al., 2014).

Среди внеклеточных протеогликанов преобладает подсемейство гиалектинов, содержащее хондроитин сульфат (агрекан, версикан, нейрокан и бревикан). Данные молекулы функционируют как структурные компоненты ВКМ сложных тканей, таких как хрящи, мозг, сухожилия, роговица. Они обеспечивают вязкоупругие свойства, удерживая воду и поддерживая осмотическое давление, и определяют правильную организацию коллагена (Iozzo, Schaefer, 2015).

Также к внеклеточным относится группа малых богатых лейцином протеогликанов (SLRP), которые могут функционировать как структурные компоненты, так и в качестве сигнальных молекул. SLRP включает 6 классов. Класс I состоит из декорина, бигликана, аспорина, белков ВКМ (ECM2 и ECMX); класс II содержит фибромодулин, люмикан, богатый пролином/аргинином белок с лейциновыми повторами (PRELP), кератокан и остеoadгерин. Эпификан, оптицин и остеоглицин относятся к III классу. IV и V классы являются неканоническими, они не связываются с ГАГ, но имеют некоторые доменные сходства с данной группой протеогликанов (Iozzo, Schaefer, 2015). SLRP взаимодействуют с коллагенами, регулируют их фибрилlogenез, могут связываться с рецепторами тирозинкиназ и депонировать факторы роста (TGF β , PDGF, CTGF) (Geiger, Yamada, 2011; McQuitty et al., 2020).

Гиалуроновая кислота – уникальный ГАГ, который синтезируется без связи с коровой белковой молекулой, при этом может нековалентно связываться с другими протеогликанами, например, версиканом (Wu et al., 2005). Данная молекула локализуется в перичеллюлярном

пространстве, связана с плазматической мембраной через гликопротеиновый рецептор CD44 или со своими трансмембранными синтазами (HAS 1, 2, 3) (Turley et al., 2002; Garantziotis, Savani, 2019). Гиалуроновая кислота обеспечивает тканям высокую пластичность, поскольку может удерживать большое количество воды (1:1000) (Vigetti et al., 2014).

1.3. Матрисом-ассоциированные молекулы

1.3.1. Регуляторные молекулы

Структурная динамичность ВКМ обеспечивается регуляторной активностью клеток за счет продукции ВКМ-модифицирующих (сшивающих) и ремоделирующих протеаз и их ингибиторов (Page-McCaw et al., 2007). Лизиоксидазы и трансклутаминазы являются основными семействами ферментов, ответственных за образование связей между молекулами основного матрикса. Широкий спектр ферментов (металлопротеиназ, сериновых и цистеиновых протеаз) деградирует матриксные белки (Paiva et al., 2019). Протеолитическое расщепление ВКМ, как правило, сопровождается высвобождением депонированных факторов роста и образованием матрикинов (Jenkins et al., 2008).

Стоит отметить, что регуляция активности ремоделирующих ферментов должна быть строго контролируемой для обеспечения гомеостаза тканей. Избыточная продукция протеаз или их ингибиторов может быть причиной развития патологических процессов (опухолевой прогрессии, фиброзов и тд.) (Daley, 2007; Рукша и др., 2013).

1) ВКМ-модифицирующие ферменты

Лизиоксидаза и лизиоксидаза-подобные ферменты (LOX, LOXL 1, 2, 3, 4) формируют поперечные сшивки между коллагеновыми и эластиновыми фибриллами, придавая им механическую прочность (Myllyharju, Kivirikko, 2004). Трансклутаминазы (TGM и TGM2) участвуют в образовании ковалентных поперечных связей между молекулами коллагенов, а также коллагенов с другими компонентами ВКМ, включая фибронектин, нидоген, остеонектин, остеопонтин, ламинин, витронектин, фибриноген (Eckert et al., 2014). Эти поперечные связи проявляют высокую устойчивость к физической, химической и протеолитической деградации, главным образом к действию матриксными металлопротеиназами (Savoca et al., 2018).

2) металлопротеиназы и их ингибиторы

Матриксные металлопротеиназы (ММП) являются основными ферментами, участвующими в деградации ВКМ. Их активность низка в нормальных условиях, но повышается во время процессов восстановления или ремоделирования, а также в пораженных или воспаленных тканях (Page-McCaw et al., 2007). К настоящему времени идентифицировано 23 ММП человека с широкой специфичностью к субстрату (Рисунок 6). Большинство ММП

секретируются в виде зимогенов и впоследствии активируются во внеклеточном пространстве посредством расщепления про-домена. Каталитический домен содержит связывающий цинк мотив, который сохраняет ММР в не активном состоянии до удаления про-пептидного домена. В классическом понимании ММР функционируют как ферменты, расщепляющие молекулы ВКМ, что приводит к увеличению пространства для облегчения передвижения клеток, однако в последнее время расширились знания о том, как ММР могут влиять на поведение клеток. ММР могут генерировать специфические продукты деградации молекул ВКМ (матрикины), которые обладают сигнальными и регуляторными функциями отличными от исходных молекул (Sternlicht, Werb, 2001). ММР регулируют архитектуру эпителиальных тканей путем расщепления межклеточных контактов и базальной мембраны (Xu et al. 2001). Также ММР могут участвовать в активации друг друга (Sternlicht, Werb, 2001).

Подгруппы	Название	Субстрат
Коллагеназы	MMP-1	Коллагены I, II, III, VII, VIII, X, желатин
	MMP-8	Коллагены I, II, III, VII, VIII, X, аггрекан, желатин
	MMP-13	Коллагены I, II, III, IV, IX, X, XIV, желатин
Желатиназы	MMP-2	Желатин, Коллагены I, II, III, IV, VII, X
	MMP-9	Желатин, Коллагены IV, V
	MMP-3	Коллагены II, IV, IX, X, XI, желатин
Стромелизины	MMP-10	Коллаген IV, ламинин, фибронектин, эластин
	MMP-11	Коллаген IV, ламинин, фибронектин, аггрекан
	MMP-7	Фибронектин, ламинин, коллаген IV, желатин
Мембранно-связанные металлопротеиназы	MMP-26	Фибриноген, фибронектин, желатин
	MMP-14 (MT1-MMP)	Желатин, фибронектин, ламинин
	MMP-15 (MT2-MMP)	Желатин, фибронектин, ламинин
	MMP-16 (MT3-MMP)	Желатин, фибронектин, ламинин
	MMP-17 (MT4-MMP)	Фибриноген, фибрин
	MMP-24 (MT5-MMP)	Желатин, фибронектин, ламинин
	MMP-25 (MT6-MMP)	Желатин
	MMP-12	Эластин, фибронектин, коллаген IV
	MMP-19	Аггрекан, эластин, фибриллин, желатин
	MMP-20	Аггрекан
Другие	MMP-21	Аггрекан
	MMP-23	Желатин, казеин, фибронектин
	MMP-27	Неизвестно
	MMP-28	Неизвестно

Рисунок 6. Классификация матриксных металлопротеиназ по их субстратной специфичности к компонентам ВКМ (Адаптировано из Snoek-van Beurden, Von den Hoff, 2018).

Другими металло-зависимыми протеазами являются трансмембранные (ADAM) и секретируемые (ADAMTS) металлоэндопептидазы. Только шеддазы (ADAM-9, ADAM-10, ADAM-12 и ADAM-15) обладают протеазной активностью в отношении белков ВКМ (Reiss et al., 2009; Jabłońska-Trypuć et al., 2016). ADAMTS участвуют в процессинге коллагенов и протеолизе протеогликанов, таких как аггрекан, бревикан, версикан и нейрокан. Они вовлечены

в организацию соединительной ткани, а также в процессы воспаления, ангиогенеза и миграции клеток (Apte, 2004).

Существует 4 типа тканевых ингибиторов металлопротеиназ (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 и TIMP-4), которые блокируют активность MMP за счет встраивания в их активный центр. Кроме антипротеазной функции, TIMP могут взаимодействовать с рецепторами клеточной поверхности (Brew, Nagase, 2010) (Таблица 1).

Таблица 1. Различные типы TIMP и их субстраты – протеазы и клеточные рецепторы (Адаптировано из Cabral-Pacheco et al., 2020).

	TIMP-1	TIMP-2	TIMP-3	TIMP-4
Ингибирование MMP	MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, ADAM-10	MMP-2, MMP-9, MMP-14, MT1-MMP, ADAM-12	MMP-2, MMP-9, ADAM-10, ADAM-17, ADAMTS-4	MMP-2, MMP-26, MT1-MMP, ADAM-28
Взаимодействие с рецепторами	CD63, LRP1	$\alpha 3\beta 1$ интегрин, LRP1	EFEMP1, VEGFR2, AGTR1,2	CD63

Все типы TIMP локализуются на клеточной мембране, при этом TIMP-1, -2, -4 секретируются в растворимой форме, и только TIMP-3 связывается с молекулами ВКМ (Cabral-Pacheco et al., 2020).

Активность TIMP востребована во многих биологических процессах. Например, для всех TIMP установлена антиангиогенная активность, в том числе за счет ингибирования MT-MMP, необходимой для миграции эндотелиальных клеток (Handsley et al., 2005). Отмечено, что TIMP-1, -2, -3 способствуют уменьшению роста опухоли посредством нейтрализации MMP, что затормаживает метастазирование (Gomez et al., 1997). TIMP-1 и TIMP-2 обладают антиапоптотическими эффектами и стимулируют клеточный рост различных типов клеток, в том числе фибробластов (Qi, Anand-Apte, 2015). Напротив, TIMP-3 индуцирует апоптоз, как было показано *in vitro* на клетках меланомы (Brew, Nagase, 2010), эндотелия (Qi, Anand-Apte, 2015) и стромы (Koers-Wunrau et al., 2013).

3) Сериновые протеазы

Плазмин - сериновая протеаза, компонент фибринолитической системы крови. Однако активация данной молекулы связана с регуляцией не только деградации фибринового сгустка, но и ремоделирования ВКМ и миграции клеток (Law et al., 2013). Субстратная специфичность плазмина включает в себя молекулы адгезии и различные белки ВКМ (Jenkins, 2008). Также система плазминоген/плазмин активно участвует в динамическом взаимодействии между другими протеолитическими сетями, в частности с MMP, системой свертывания и комплемента (Ra, Park, 2007).

Плазмин генерируется за счет сериновых протеаз - активаторов плазминогена урокиназного (uPA) и тканевого (tPA) типов. tPA синтезируется в основном эндотелиальными

клетками и связан с контролем внутрисосудистой деградации фибрина. Тогда как uPA секретируется различными типами клеток и вызывает выработку плазмина во время миграции и инвазии клеток в физиологических и патологических условиях (Kwan et al., 2022). Связывание про-ферментативной формы uPA с его рецептором на клеточной поверхности (uPAR) увеличивает его активацию. Помимо этого uPAR взаимодействует с белками ВКМ (витронектин) и интегринами, колоколизация которых приводит к активации внутриклеточной передачи сигналов, влияющей на подвижность клеток (Wei et al., 2008).

Ферментативному каскаду противодействуют другие регуляторные молекул матрисома - серпины (ингибиторы активаторов плазминогена). Они необратимо подавляют активность протеаз, а также основного физиологического ингибитора плавмина ($\alpha 2$ -антиплазмина) и общего ингибитора протеаз ($\alpha 2$ -макроглобулина) (Schaller, Gerber, 2011).

4) цистеиновые протеазы

Основными и наиболее изученными членами семейства цистеиновых протеаз являются катепсины (B, C, F, H, L, K, O, S, V, X и W) (Rawlings et al., 2009). Протеолитическая специфичность и функции катепсинов зависят от их внутри- или внеклеточной локализации. Все катепсины синтезируются в виде неактивных предшественников, для оптимальной активации необходима слабокислая среда, такая как в лизосомах и эндосомах. Среди потенциальных внеклеточных мишеней катепсинов можно выделить ламинины, коллаген IV типа, белки клеточной адгезии, матриклеточные белки и про-uPA. Они участвуют в ремоделировании костной ткани (Stoch, Wagner, 2008), выработке гормонов (Funkelstein et al., 2008), а также презентации антигенов в иммунном ответе (Honey, Rudensky, 2003). Из-за закисленного pH внеклеточного микроокружения опухоли, цистеиновые катепсины участвуют в протеолитических путях, которые способствуют прогрессированию канцерогенеза (Mohamed, Sloane, 2006).

Внутриклеточные ингибиторы, такие как цистатины, контролируют активность катепсинов, защищая от случайного их высвобождения. Также активация катепсинов может регулироваться их взаимодействием с протеогликанами и действием других протеаз (Theocharis et al., 2014).

1.3.2. Секретируемые факторы

Помимо способности напрямую взаимодействовать с клетками, молекулы ВКМ регулируют их поведение путем неканонического представления факторов роста. Выступая в качестве резервуара для растворимых медиаторов, перичеселлюлярный ВКМ локализует регуляторные молекулы около поверхности клеток, а интерстициальный - обеспечивает их градиент. Компоненты ВКМ могут депонировать медиаторы, делая их неактивными, тем самым

ингибируют их взаимодействие с рецепторами на клеточной поверхности (Macri et al., 2007). Депонированные факторы роста и цитокины могут быть освобождены или активированы в результате протеазной активности клеток в ответ на сигналы микроокружения (Page-McCaw et al., 2007; Discher et al., 2009). Такая неструктурная функция ВКМ, контролирующая пространственно-временное представление биоактивных медиаторов клеткам, обуславливает механизмы участия ВКМ в физиологическом и репаративном гомеостазе (Schultz, Wysocki, 2009).

Компоненты основного матрикса могут связывать факторы роста. Такая активность определяется структурными особенностями данных молекул (Gattazzo et al., 2014). ГАГ, из-за большого количества сульфатных и карбоксильных групп, имеют отрицательный заряд, что обеспечивает абсорбцию ионов. Коллагены и гликопротеины, за счет своей мультидоменности часто имеют сайты связывания факторов роста (Macri et al., 2007). На Рисунке 7 приведены примеры депонирующей способности молекул ВКМ.

Молекулы ВКМ	Биоактивные молекулы
Тромбоспондин-1	Факторы роста: TGF- β 1
Агрин	Факторы роста: TGF- β 1, TGF- β 2
Гепаран сульфат	Факторы роста: TGF- β 1, TGF- β 2, FGF Хемокины: CXCL8
Гепарин	Факторы роста: FGF, VEGF, PDGF, HGF Цитокины: IL-4, IFN γ , RANTES, IL-7
Тенасцин-С	Факторы роста: семейство TGF- β , семейство FGF, VEGF, PDGF, IGF-BPs Цитокины: CCL21
Фибронектин плазмы	Факторы роста: VEGF, BMP-1, HGF, FGF-2, PDGF, TGF- β 1
Фибронектин тканевой	Цитокины: IL-7, IL-2, TNF- α
Ламинин	Цитокины: IL-7, IL-2, TNF- α
Фибриллин-1	Факторы роста: TGF- β 1, BMPs
Бигликан	Факторы роста: TGF- β 1, TNF- β , BMP-2, BMP-4, BMP-6, WISP1
ЕСМ-1	Факторы роста: TGF- β 1
Декорин	Факторы роста: TGF- β 1, PDGF, CTGF, WISP1,

Рисунок 7. Структурные компоненты ВКМ, участвующие в депонировании биоактивных молекул (адаптировано из Geiger, Yamada, 2011; McQuitty et al., 2020).

1.3.3. Матрикс-аффилированные молекулы

К ВКМ-аффилированным молекулам относятся мембрано-связанные протеоглики (синдеканы, глипиканы) и гликопротеины (семафорины), а также мембрано-ассоциированные секретируемые муцины, лектины, аннексины, галектины (Naba et al., 2012).

Семафорины (SEMA)- секретируемые или ассоциированные с мембраной гликопротеины. Только SEMA-3 и SEMA-7 экспрессируются клетками позвоночных. Передача сигналов

семафорами происходит преимущественно через плексиновые рецепторы и приводит к изменениям в цитоскелетном и адгезивном механизмах, которые регулируют клеточную морфологию (Alto, Terman, 2017).

Галектины – семейство лектинов животного происхождения, которые связывают β -галактозиды. Они не имеют специфичных рецепторов, однако способны связываться с различными гликопротеинами на клеточной поверхности и в ВКМ (Якушина и др., 2012). Наиболее изученными галектинами стромальных клеток являются галектин-1 и -3. Они вовлечены в реализацию иммуносупрессивной активности МСК (Leto Barone et al., 2013).

Лектины - большая группа мембранных белков, распознающих углеводные домены, также могут секретироваться во внеклеточное пространство. Лектины типа C, I, P и S участвуют во взаимодействии с ВКМ и влияют на его свойства (Gabius et al., 2011). Каждый из перечисленных подтипов обладает своей специфичностью распознавания лигандов и играет различную роль в развитии клеток.

1.4. «Сигнальные» функции внеклеточного матрикса

1.4.1. Рецепторы, участвующие во взаимодействии клетка-матрикс

Одним из важнейших свойств ВКМ, определяющего его влияние на клетки, является способность ковалентно связываться с клеточными рецепторами (Hynes, 2002). После взаимодействия рецепторов с ВКМ через трансмембранные комплексы фокальной адгезии транслируется сигнал на цитоскелет, а далее на ядерную оболочку и нуклеоскелет (Crisp et al., 2007). Такое преобразование механических стимулов в биохимические сигналы в результате каскадов называется механотрансдукция (Benoit et al., 2009; Zargham, 2010; Kim et al., 2011). На Рисунке 8 представлена схема взаимосвязи на всех четырех уровнях, начиная с ВКМ до нуклеоскелета.

Интегрины – семейство трансмембранных рецепторов, которые связываются с ВКМ посредством двух гетеродимерных субъединиц. Существует 18 α - субъединиц и 8 β -субъединиц, которые могут объединяться с образованием 24 различных димеров интегринов, каждый из которых обладает различной специфичностью связывания с лигандами – белками ВКМ (Hynes, 2002). Большинство интегринов, опосредуя адгезию, связываются с RGD (последовательность аминокислот Arg-Gly-Asp) содержащими белками (фибронектин, витронектин, коллагены и др.) (Takagi et al., 2003). Интегрины можно классифицировать по структурным особенностям, специфичности к лигандам и типам экспрессирующих их клеток. На стромальных клетках сочетания $\alpha1\beta1$, $\alpha2\beta1$, $\alpha10\beta1$ и $\alpha11\beta1$ специфичны к фибриллярным

коллагенам, пара $\alpha 5 \beta 1$ связывает фибронектин, $\alpha \nu \beta 5$ – витронектин и остеопонтин, а $\alpha \nu \beta 6$ и $\alpha \nu \beta 8$ распознают домен фибронектина, связывающий латентный TGF- β (Bachmann et al., 2019).

В дополнение к обеспечению функции в клеточной адгезии, интегрины – это основные механосенситивные посредники между ВКМ и цитоскелетом, передача сигналов посредством которых имеет двунаправленный характер (Hynes, 2002). После связывания молекул ВКМ с внеклеточным доменом интегринов запускается передача сигнала «снаружи – внутрь», что приводит к перестройке цитоскелета и изменению полярности, жизнеспособности и пролиферации клеток. При этом активация интегринов может происходить «изнутри – наружу» после связывания талина и киндлина с цитоплазматическим доменом, влияя на сродство интегринов к молекулам ВКМ, адгезию и миграцию клеток (Wrighton et al., 2013).

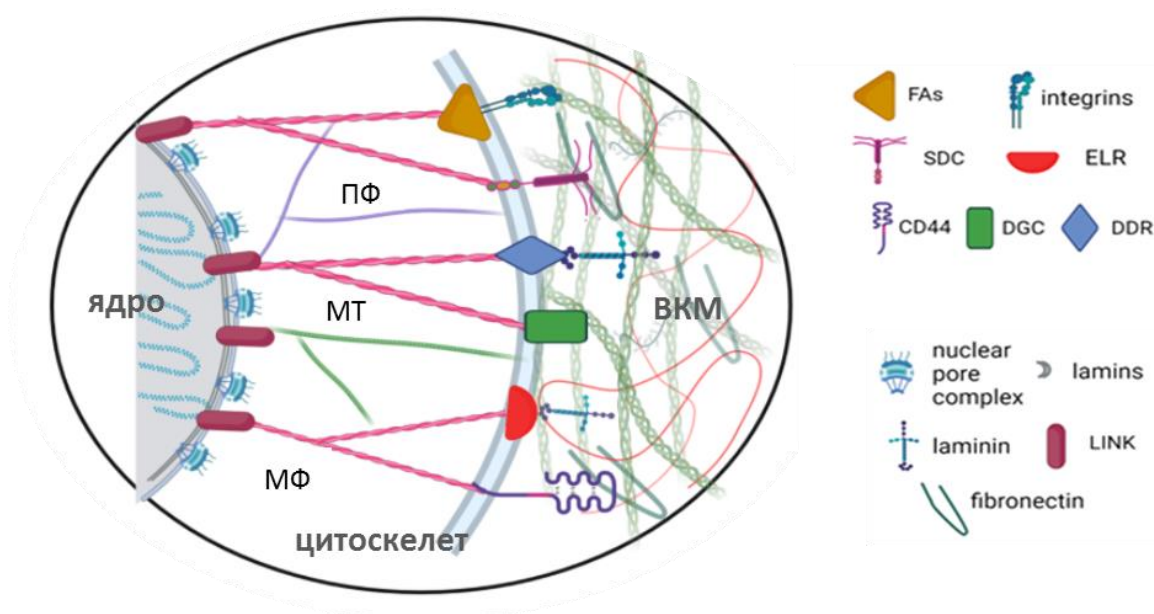


Рисунок 8. Взаимосвязь между внеклеточными и клеточными компартментами. Элементы цитоскелета: МФ – микрофиламенты; МТ – микротрубочки; ПФ – промежуточные филаменты. Трансмембранные комплексы: FAs - комплексы фокальной адгезии; DGC - гликопротеиновые комплексы дистрофина; DDR - рецепторы домена дискоидина; ELR - эластин–ламнининовые рецепторы; SDC - синдеканы; CD44 - рецепторы гиалуроновой кислоты; LINK - линкер нуклео-и цитоскелета. Адаптировано из Andreeva et al., 2022.

Рецепторы дискоидинового домена (DDR) связывают различные типы коллагенов, участвуют в ремоделировании ВКМ, влияя на выживание, миграцию, пролиферацию и дифференцировку клеток (Leitinger, 2014).

Дистрогликаны ассоциированы с белками базальной мембраны и ответственны за морфогенез, поляризацию и миграцию клеток. Мутации в дистрогликане или связанных с ним белках являются причиной мышечных патологий (Henry et al., 1996).

CD44 (гликопротеин 1) – многофункциональный N- и O-гликозилированный поверхностный рецептор, который взаимодействует с ГАГ и участвует в метаболизме гиалуроновой кислоты. Регуляция CD44 играет ключевую роль в процессах развития тканей,

роста аксонов, иммунной регуляции и кроветворения (Ponta et al., 2003). Широко изучается в контексте воспаления и опухолевых прогрессий (Misra et al., 2015).

Эластин-ламининовый рецептор (ЭЛР) – трансмембранный белок, связывающий гидрофобные мотивы эластина и ламинина (Hinek, 1996). Предполагается, что ЭЛР, наряду с интегринами, является механосенсором растяжения в гладкомышечных клетках. Изучается в контексте патологий сосудов и прогрессии атеросклероза (Spofford, Chilian, 2001).

Таким образом, взаимодействие молекул ВКМ с различными трансмембранными комплексами (Таблица 2) запускает различные сигнальные пути, направляя активность клетки (Crisp et al., 2006). Например, показана ВКМ-зависимая регуляция клеточного фенотипа, такая как определение формы клеток, их миграционной активности и дифференцировочного потенциала (Engler et al., 2006; Muncie, Weaver, 2018). Современные методы биоинформатического и протеомного анализа позволяют прогнозировать возможные направления модуляции функциональной активности клетки через ВКМ-индуцированную активацию путей передачи сигнала (Novoseletskaya et al., 2023).

Таблица 2. Взаимодействие компонентов ВКМ с их рецепторами (адаптировано из Andreeva et al., 2022)

Компоненты ВКМ (лиганд)	Трансмембранные комплексы (рецептор)
Коллагены	
Коллагены	Itg: $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 10\beta 1$, $\alpha 11\beta 1$; DDR; CD44
Коллагены (денатурированные)	Itg: $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 9\beta 1$, $\alpha V\beta 3$, $\alpha V\beta 5$
Коллагены/Ламинины	Itg: $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 8\beta 1$, $\alpha V\beta 8$
Гликопротеины	
Ламинины	Itg: $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$; DGC; ELR; CD44
Остеопонтин	Itg: $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 9\beta 1$, $\alpha V\beta 3$, $\alpha V\beta 5$; CD44
Фибронектин	Itg: $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 9\beta 1$, $\alpha 4\beta 7$, $\alpha V\beta 8$; CD44; SDC
Витронектин	Itg: $\alpha V\beta 3$, $\alpha 8\beta 1$, $\alpha V\beta 3$, $\alpha V\beta 5$
Тромбоспондины	Itg: $\alpha V\beta 3$
Эластин	ELR

Itg – субъединицы интегринов; DGC – гликопротеиновые комплексы дистрофина; DDR – рецептор домена дискоидина; ELR – эластин–ламининовый рецептор; SDC – синдеканы; CD44 – рецептор гиалуроновой кислоты.

1.4.2. Матрикины

Матрикины – фрагменты молекул ВКМ с биологическими функциями, отличными от исходных молекул. Они образуются в результате протеолитического расщепления молекул ВКМ протеазами (Wells et al., 2015). При физиологическом ремоделировании ВКМ локальная биоактивность матрикинов способствует гомеостазу тканей. Однако, в патологических ситуациях, когда деградация выходит из-под контроля, хроническое образование матрикинов

может внести значительный вклад в развитие заболеваний. Отмечена роль матрикинов в прогрессии фиброза, опухолей, заболеваниях легких и сердечно-сосудистой системы (Jariwala et al., 2022).

Большинство матрикинов влияют на поведение эндотелия, конкурируя с интактными компонентами ВКМ за взаимодействие с интегринами. Матрикины чаще всего образуются из компонентов базальной мембраны, таких как коллаген IV типа (аррестен, канстатин, тумстатин и метастатин) или из интерстициального матрикса, окружающего сосудистую сеть (эндостатин и неостатин, полученные из коллагена XVIII типа). Активные фрагменты других молекул ВКМ включают вастатин (коллаген VIII), рестин (коллаген XV), анастеллин (фибронектин) и эндорепеллин (перлекана) (Sivaraman, Shanthi, 2018). Все перечисленные выше матрикины проявляют антиангиогенную активность. При этом фрагменты из матриклеточных гликопротеинов, таких как остеонектин и тромбоспондины, и эластина, напротив, способны как усиливать ангиогенез, так и проявлять антиангиогенную активность с большей эффективностью, чем полноценные молекулы (в случае тромбоспондинов) (Argroo et al., 2010).

Установлено, что матрикины могут являться хемоаттрактантами для иммунных клеток и изменять их активность (Sorokin, 2010). Продукты деградации коллагена I типа способствуют адгезии макрофагов, в то время как цельные фибриллы, напротив, индуцируют активацию MMP9 в культуре U937 (Gowen et al., 2000; Veres et al., 2015). Низкомолекулярная гиалуроновая кислота способствует поляризации макрофагов в провоспалительный фенотип, тогда как интактная полимеризованная гиалуроновая кислота демонстрирует противовоспалительные эффекты за счет стимуляции продукции IL-10 макрофагами (Rayahin et al., 2015). Аналогично, в работе Yakovlev и Medved (2018) продемонстрировано, что матрикины, образуемые из фибрина, рекрутируют лейкоциты с их последующей провоспалительной активацией.

1.5. Внеклеточный матрикс – структурный компонент соединительной ткани

Отличительной характеристикой соединительной ткани является преобладающее количество ВКМ по сравнению с клетками, что определяет ее биомеханические, морфогенетические и трофические функции. Выделяют соединительную ткань с специализированной функцией (опорно-двигательная система), и рыхлую волокнистую, которая выступает стромой многих органов (Omelyanenko et al., 2014).

Классификация ВКМ на тканевом уровне выделяет фибриллярные и аморфные компоненты (Быков, 2002). Фибриллярный ВКМ образуется коллагеновыми белками (фибриллярные коллагены и ретикулярные волокна (коллаген III типа)) и эластиновыми волокнами (эластин и фибриллин). Аморфные компоненты состоят из нефибриллярных коллагенов, фибронектиновых микрофибрилл, различных конъюгатов из гликопротеинов,

протеогликанов и гиалуроновой кислоты (Omelyanenko et al., 2014). Также выделяется 2 основных компартмента, различающиеся по структуре и составу: перичеллюлярный и интерстициальный матрикс (Jarvelainen et al., 2009; Theocharis et al., 2015).

Клеточный компартмент соединительной ткани образуется клетками мезенхимного происхождения (Omelyanenko et al., 2014). Они подразделяются на собственные клетки соединительной ткани, синтезирующие и ремоделирующие ВКМ (ранние предшественники и дифференцированные клетки костей, хрящей, мышц, связок, жировой ткани, фибробласты), и клетки, заселяющие соединительную ткань, но не продуцирующие ВКМ (макрофаги, тучные клетки, гранулоциты, лимфоциты).

1.6. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки в локальном микроокружении

Стромальные предшественники мезенхимального происхождения являются резидентными клеточными компонентами постнатальной соединительной ткани (da Silva Meirelles et al., 2006; Caplan 2017). Однако до сих пор МСК остаются малоизученной клеточной популяцией с точки зрения их происхождения и физиологических функций, поскольку их исследование проводится ретроспективно при длительном культивировании (Murray, Péault, 2015; Pittenger et al., 2019).

Считается, что МСК способны длительно сохранять некоммитированный статус в тканевых нишах и обладают выраженным регенеративным потенциалом. МСК способны мигрировать в место повреждения и обновлять пул клеток стромального дифферона (Knight, Hankenson, 2013; Vishvanath et al., 2016). Благодаря своей пластичности, МСК способны специфически реагировать на стимулы из микроокружения (Murray, Péault, 2015). Активация МСК сопровождается модификацией их секреторного фенотипа, включающего в себя цитокины и факторы роста, внеклеточный матрикс, везикулы. В связи с этим МСК рассматриваются как одна из важнейших популяций, участвующих в поддержании гомеостаза в различных тканях (Sagaradze et al., 2020).

Наиболее исследованы МСК в периваскулярной нише, которая образована разными типами клеток, таких как эндотелий, мононуклеары, гладкомышечные клетки и другие тканеспецифичные клетки (Рисунок 9 А). Не меньшую роль играют неклеточные факторы, такие как внеклеточный матрикс, растворимые медиаторы и физические параметры. Совокупность клеточных, биохимических и физических свойств микроокружения МСК регулирует их функции и свойства.

Расположение в стромально-васкулярном компартменте объясняет тот факт, что МСК могут быть получены практически из любой васкуляризированной ткани. Известно, что впервые МСК были изолированы из костного мозга (Фриденштейн и др., 1986). В настоящее

время в исследованиях описана возможность получения МСК из других тканей, таких как кожа, плацента, пуповинная и жировая ткани, легкие, менструальная кровь и эндометрий, крайняя плоть и пульпа (Мусина и др., 2008; Yamada et al., 2010; Земелько и др., 2011; Orciani, Primio, 2013; Nagamura-Inoue, He, 2014; Pelekanos et al., 2016; Rolandsson et al., 2016; Крылова и др., 2018).

Культивирование дает возможность выделять, поддерживать и управлять свойствами МСК с последующим ауто-/аллогенным введением в организм, что представляется крайне актуальным для нужд регенеративной медицины. Международным сообществом по клеточной терапии были сформулированы критерии для идентификации МСК *in vitro*: адгезивность к пластику, мультилинейная дифференцировка в адипо-, хондо- и остеогенном направлениях, а также наличие фенотипических маркеров CD90, CD105, CD73 и отсутствие CD45, CD34, CD11b, CD14, CD79a и HLA-DR (Dominici et al., 2006).

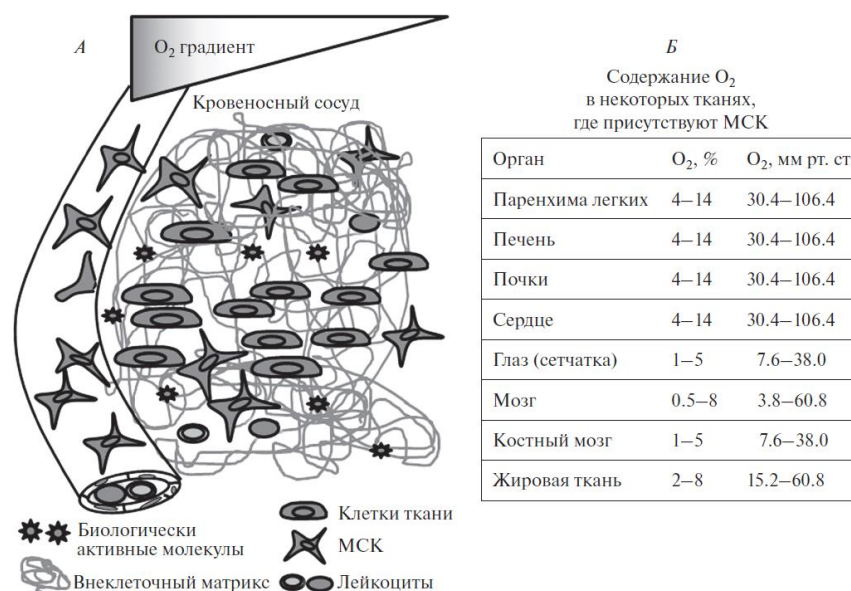


Рисунок 9. Свойства ниши МСК: А) совокупность различных клеточных популяций и биологических активных молекул в микроокружении МСК; Б) физиологическая гипоксия как тканевой уровень O_2 (Андреева, Матвеева, 2018).

Помимо уникальной способности к обширной экспансии *in vitro* и мультилинейного дифференцировочного потенциала, секреция трофических факторов, способствующих ремоделированию тканей, и иммунорегуляторная активность делают МСК привлекательными для регенеративной медицины. МСК, как предшественники клеток стромального дифферона, продуцируют значительное количество ВКМ, что актуально для разработки протоколов тканевой инженерии. Кроме того, в настоящее время использование продуктов секрета МСК позиционируется как более безопасный и не менее эффективный инструмент для терапии (Kumar et al., 2019).

Ключевые иммуномодулирующие цитокины, с помощью которых МСК предотвращают пролиферацию и функционирование иммунных клеток, включают простагландин 2, TGF- β 1, HGF, CXCL-12, индоламин 2,3-диоксигеназу, IL-4, IL-6, IL-10, антагонист рецептора IL-1 и TNF- α (Jin et al. 2016). Также при аллогенной терапии отсутствие на некоммутированных МСК молекул HLA-DR позволяет «скрываться» от иммунной системы хозяина (Le Blanc et al., 2003).

Секретом МСК влияет на микроокружение при повреждении, способствуя цитопротекции и восстановлению тканей, в том числе из-за модуляции эндотелиальных клеток. Ангиогенные факторы, высвобождаемые МСК, включают FGF-2, VEGF, TGF- β , PDGF, ангиопоэтин-1, IL-6 и MCP-1 (Tao et al., 2016). Кроме того МСК опосредуют ангиогенез за счет состава своих внеклеточных везикул, включающих некодирующие РНК (Shabbir et al., 2015; Kalinina et al., 2015; Ge et al., 2021).

Различные клеточные и неклеточные факторы микроокружения МСК определяют их особенности. Установлено, что МСК, полученные из различных источников, обладают схожими свойствами, однако их секреторный фенотип и дифференцировочный потенциал могут несколько различаться (Hass et al., 2011; Pizzute et al., 2015; Berebichez-Fridman, Montero-Olvera, 2018). Очевидно, что ВКМ также варьирует в различных тканях и органах по биохимическим и биофизическим параметрам (Hynes, 2009).

Стромальные клетки *in vitro* секретируют ВКМ, состав которого отражает их тканеспецифичность. Например, масс-спектрометрическая оценка показала, что матрисом дермальных фибробластов обогащен гликопротеинами, тогда как в матрисомах МСК, выделенных из жировой ткани и костного мозга, разнообразнее состав коллагеновых белков. Установлены индивидуальные различия: тенасцин-Х детектирован исключительно в жтМСК, тогда как коллаген XIV α 1 типа только в кмМСК (Ragelle et al., 2017). В других работах установлено, что матрисом кмМСК обогащен галектинами (Marinkovic et al., 2016), тенасцином-С (Enes et al., 2017), коллагеном VI типа и гепаран сульфатами (Enes et al., 2017), а матрисом жтМСК – декорином, люмиканом (Marinkovic et al., 2016), коллагенами (I, II, III, IV типами) и эластином (Mahmoud et al., 2005). Иммуноцитохимически установлены различия в характере упаковки коллагена VI типа: в ВКМ от жтМСК он формировал плотные и неструктурированные пучки, а в ВКМ км-МСК обнаружены упорядоченные волокна меньшего диаметра (Marinkovic et al., 2016).

Матрисом МСК, выделенных из легочной ткани, обогащен глипиканом-1 и HGF (Enes et al., 2017). Сообщалось, что МСК из Вартонова студня не секретируют коллаген II и IV типов, а также декорин, ламинин и агрекан (Mahmoud et al., 2005).

Применение продуктов секрета клеток могут быть востребованными для репаративных процессов. Сравнительный анализ матрисомов позволяет предполагать, какие тканевые

источники стромальных клеток будут наиболее актуальными для получения скаффолдов. Описанные выше особенности состава белков ВКМ из различных источников могут быть использованы для прогнозирования терапии. Например, HGF, продуцируемый легочными МСК, рассматривается как важный фактор, опосредующий регенерацию поврежденных печени и легких (Enes et al., 2017). ЖтМСК могут быть полезными для регенерации сухожилий и кожи за счет обогащения коллагеном IV типа, PDGF-BB и эластина (Mahmoud et al., 2005). КмМСК могут рассматриваться в качестве кандидатов для регенерации костей, сухожилий и хрящей, поскольку для них характерна продукция коллагенов и пониженная секреция протеаз MMP-1 и MMP-3, вовлеченных в деградацию этих молекул (Mahmoud et al., 2005). В то время как МСК, выделенные из Вартоновского студня, наоборот, не подходят для получения эксплантатов для хрящевой ткани, поскольку не продуцируют коллаген II типа и аггрекан.

1.6.1. Влияние уровня O_2 в микроокружении клеток на продукцию матрикса

Неклеточные факторы микроокружения МСК, такие как pH, напряжение O_2 , температура, механические стимулы, регуляторные молекулы, растворимые факторы роста и метаболиты, могут также определять специфику продукции ВКМ (Wu et al., 2007; Gattazo et al., 2014; Petrova et al., 2018).

Ранее было установлено, что содержание O_2 в тканевых нишах МСК значительно ниже атмосферного (Рисунок 9 Б) и может различаться в зависимости от удаления от сосуда и типа ткани (Naque et al., 2013; Паюшина, 2015). Например, в эндостальной зоне костного мозга МСК локализуются в условиях близких к аноксии (0,5- 2% O_2), а периваскулярной нише жировой ткани концентрация O_2 составляет около 2-8% (Pasarica et al., 2009; Eliasson, Jonsson, 2010)

Поскольку для многих клеток пониженный уровень O_2 не является как таковым гипоксическим, а соответствует физиологическим условиям, был предложен термин нормоксия *in situ* или физиологическая гипоксия (Guzy and Schumacker, 2006; Ivanovic, 2009).

Исследование механизмов влияния уровня O_2 на клеточную физиологию крайне важно как для фундаментальных исследований, так и для клинической медицины. Гипоксическое прекондиционирование МСК используется для имитации ниши МСК и повышения терапевтической эффективности (Bader et al., 2015; Beegle et al., 2015). Адаптация клеток к снижению уровня O_2 в микроокружении происходит посредством регуляции (через активацию индуцированных гипоксией транскрипционных факторов HIF) процессов гликолиза, ангиогенеза, клеточного цикла, апоптоза, развития и дифференцировки (Semenza, 2012; Naque et al., 2013; Buravkova et al., 2014). Исследования демонстрируют, что культивирование МСК при пониженном содержании O_2 способствует повышению жизнеспособности, пролиферации и сохранению некоммитированного статуса (Buravkova et al., 2013; Погодина, Буравкова, 2014;

Маркина, Андреева, 2016). В работах Горностаевой и др., отмечен феномен усиления иммуномодуляторных свойств МСК при физиологической гипоксии (Gornostaeva et al., 2018; Gornostaeva et al., 2020). Препрекондиционирование гипоксией индуцирует антиапоптотические механизмы через повышенную экспрессию BCL-XL и BAG-1 и снижение активности каспазы-3/7 (Bader et al., 2015), а также стимулирует ангиогенный потенциал МСК (Zhang et al., 2012; Ездакова и др., 2015; Ge et al., 2021).

Изучение функционирования ВКМ при гипоксии крайне интересно с точки зрения тканевого гомеостаза. Однако рассмотрение роли гипоксии в ремоделировании ВКМ в основном опирается на исследование острого гипоксического/ишемического влияния на клетки, которое характерно для сосудистых заболеваний и опухолевой прогрессии (Gillies, Gatenby, 2007; Beyer et al., 2009). При снижении уровня O_2 регуляция продукции ВКМ происходит также через HIF-1 α , транскрипционными мишенями которого являются как структурные, так и регуляторные молекулы ВКМ (Chen et al., 2014; Petrova et al., 2018; Wicks, Semenza, 2022). Адаптация к гипоксическим условиям характеризуется усилением синтеза компонентов ВКМ (Kalluri, 2016; Kumar et al., 2018). Установлено HIF-1 α -зависимое увеличение экспрессии генов коллагенов (Berg et al., 1998; Saed, Diamond, 2002; Deschene et al., 2012), фибронектина (Milner et al., 2008; Hu et al., 2014), фибулинов и агреккана (Hu et al., 2014).

Протеомный анализ кММСК и внеклеточных везикул после культивирования при 1% O_2 (48 часов) выявил снижение количества коллагенов I, III типов и белков, связанных с организацией внеклеточного матрикса, таких как TIMP2, FBLN2, FBN1, COL14A2, LAMA5, ECM1 и SPARC. Анализ реактомов изменившихся в гипоксических клетках и везикулах белков выявил пути, связанные с метаболизмом гликозаминогликанов, организацией внеклеточного матрикса, в том числе эластиновых волокон, и деградацией хондроитин сульфата/дерматан сульфата (Braga et al., 2022). С помощью масс-спектрометрического анализа кондиционированной среды от жтМСК после кондиционирования 1% O_2 (24 часа) были обнаружены некоторые изменения белков, ассоциированных с ВКМ. Основные эффекты заключались в увеличении накопления белков, обеспечивающих прочность на растяжение, трехмерное сворачивание и механическую стабильность коллагеновых фибрилл (Riis et al., 2017).

В других исследованиях эффектов гипоксического воздействия также описано изменение посттрансляционной модификации коллагенов, которая обеспечивает выровненность фибрилл и увеличение жесткости ВКМ (Jean et al., 2011; Gilkes et al., 2014). HIF-1-регулируемая экспрессия пролигидроксилазы (*P4HA*) и лизилгидроксилаз (*PLOD*) - ключевых ферментов внутриклеточной модификации молекул про-коллагена, отмечена в различных типах клеток, в том числе опухолевых и опухоли-ассоциированной стромы (Aro et al., 2012, Eisinger-Mathason et

al., 2013; Gilkes et al., 2013). А также выявлена гипоксия-зависимая внеклеточная модификация фибриллярных коллагенов за счет увеличения продукции лизилоксидаз (LOX) и лизилоксидаз-подобных ферментов (LOXL-2 и LOXL-4), которые обеспечивают образование поперечных сшивок между коллагеновыми волокнами (Barker et al., 2012; Cox et al., 2013; Gilkes et al., 2014). Образование таких тонких упорядоченных фибрилл способствует миграции клеток. Гипоксия-зависимая активация ремоделирующих ферментов, изменяющих взаимодействие ВКМ-интегрины, опосредует инвазию клеток. Было установлено увеличение транскрипции матричных металлопротеиназ *MMP2* и *MMP9*, а также активатора плазминогена урокиназного типа и его рецептора (*PLAU*, *UPAR*) (Munoz-Najar, 2006; Choi et al., 2011). Через гипоксия-зависимый (HIF-1 α и pVHL) путь регулируется взаимодействие клетка-ВКМ посредством изменения экспрессии субъединиц интегринов (Walton et al., 2000; Wykoff et al., 2004; Cowden-Dahl et al., 2005).

Количество работ, целью которых является изучение модификации ВКМ МСК при длительной депривации O₂, значительно уступает числу исследований коротких гипоксических воздействий. На Рисунке 10 представлена краткая схема известных изменений ВКМ при различных сроках воздействия гипоксии на МСК.

Из экспериментов по изучению коммитирования МСК можно получить некоторую информацию относительно длительных эффектов гипоксии на продукцию ВКМ. Накопление специфичных матричных молекул характерно для дифференцировочных процессов (Ejtehadifar et al., 2015). После остеоиндукции МСК, культивируемых при физиологической гипоксии, установлено снижение экспрессии «остео» генов, кодирующих белки ВКМ: остеопонтин, остеокальцин, коллаген I типа (Volkmer et al., 2010; Yang et al., 2011); и снижение минерализации матрикса (Salim et al., 2004). При этом отмечено увеличение продукции компонентов матрикса, характерных для ткани хряща: несulfатированных гликозаминогликанов и хондроитин-4-сульфата (Wang et al., 2005), агрекана (Mwale et al., 2011), коллагена II, IX, XI типов (Khan et al., 2010).

Развитие хрящевой ткани связано с низким содержанием O₂ (Shang et al., 2014; Taheem et al., 2018). В ряде работ представлены данные о том, что длительная экспансия клеток хряща, в том числе ранних предшественников, в условиях гипоксии может быть многообещающим для применения в тканевой инженерии хряща (Brinckmann et al., 2005; Wang et al., 2012; Xie et al., 2022). Это связано как с описанным выше увеличенным накоплением хондрогенного ВКМ, так и его модификацией. Makris et al. в своей работе показали, что культивирование хондроцитов при 4% O₂ в течение 3-4 недель, значительно увеличивало экспрессию гена *LOX*, с сопутствующим увеличением числа поперечных сшивок между фибриллами коллагена и увеличением жесткости ВКМ (Makris et al., 2013).

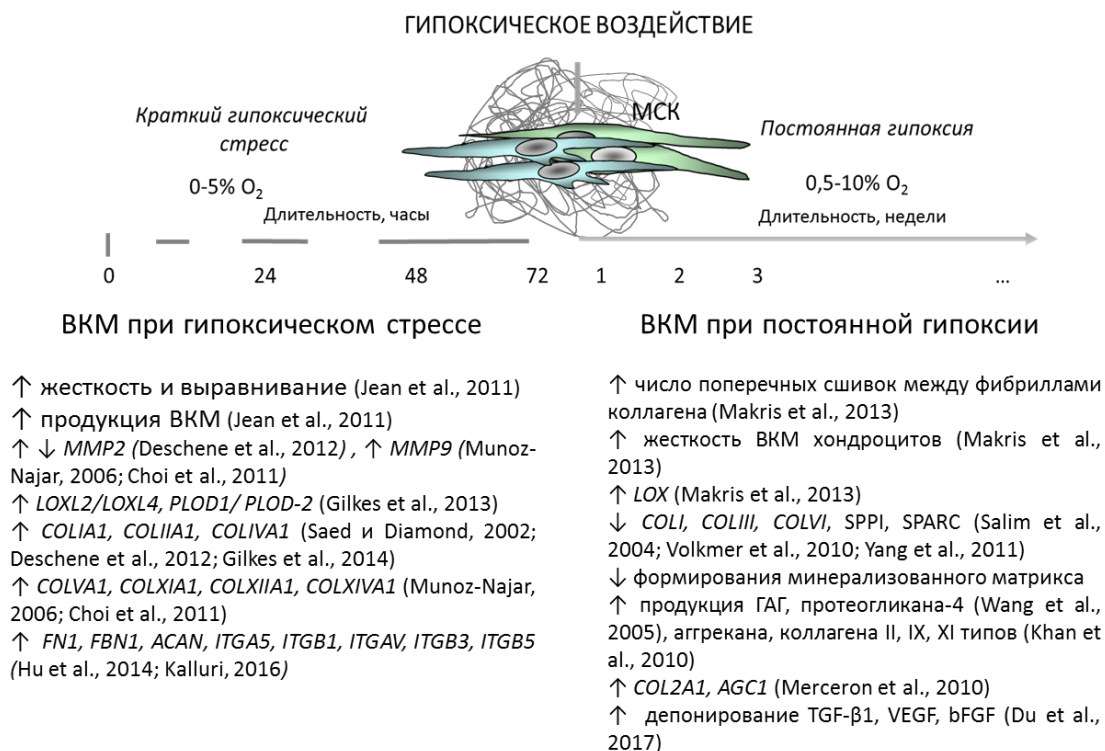


Рисунок 10. Характеристика изменений ВКМ в зависимости от срока воздействия пониженного уровня O_2 на клетки *in vitro*.

Изучение изменений ВКМ при гипоксии, с точки зрения депонирования факторов роста, также важно для протоколов регенеративной медицины. На модели дефекта кожи у мышей было показано, что применение дцВКМ от МСК, культивируемых с добавлением $CoCl_2$ – миметика гипоксии, увеличивало ранозаживляющую способность. Данные препараты дцВКМ были обогащены факторами роста TGF-β1, VEGF, FGF-2, которые могут способствовать мобилизации клеток, образованию грануляционной ткани и ангиогенезу (Du et al., 2017).

1.7. Децеллюляризованный внеклеточный матрикс как инструмент для модификации свойств клеток

В настоящее время активно разрабатываются скаффолды для экспансии клеток и их эффективной доставки в места повреждения. При этом преимущество использования децеллюляризованного ВКМ для репарации тканей и поддержания функциональной активности клеток заключается в сохранении биосовместимости, топологии и биохимических свойств (Noth et al., 2010; Hoshiba et al., 2010).

Для имитации сигналов микроокружения создаются конструкции из сочетания полимеров и одиночных белков ВКМ (фибронектин, коллаген, ламинин и др.) или совокупности белков и факторов роста (Матригель), которые демонстрируют позитивные эффекты на активность клеток (Lindner et al., 2010). Однако применение много компонентных матриксов имеет

преимущества перед одиночными молекулами (Joddar et al., 2014). ДцВКМ, полученный от отдельных типов клеток *in vitro*, в том числе МСК, является доступным и перспективным источником для разработки скаффолдов и позволяет оценить вклад отдельных популяций в гомеостаз тканей (Hoshiba et al., 2010; Kusuma et al., 2017).

Целью децеллюляризации является удаление клеточных остатков и ДНК для минимизации иммунологических реакций и сохранения целостности, состава и топологии ВКМ (Keane et al., 2015). Существует несколько подходов децеллюляризации с использованием физических (циклы замораживания-размораживания, ультразвук), химических (детергенты, кислоты) и биологических (протеазы в сочетании с нуклеазами) агентов (Crapo et al., 2011). Для каждого метода описано сохранение фибриллярной сети, толщины волокон и механических свойств, однако имеются и недостатки. Кислотные, щелочные и детергирующие агенты (Triton X-100, SDS, CHAPS), эффективно удаляют клеточные мембраны и ДНК, но при этом отмечена частичная потеря ГАГ (Brown et al., 2009). Физическое воздействие, как правило, приводит к разрушению компонентов матрикса и неполному удалению клеточных остатков (Hashimoto et al., 2010). Наиболее популярным способом для получения дцВКМ от стромальных клеток в культуре является сочетанное воздействие гидроксида аммония с детергентом Triton X-100 (Rao Patabhi et al., 2014; Xing et al., 2015; Kusuma et al., 2017). Данные агенты эффективно лизируют клеточные и ядерные мембраны, для удаления контаминации нуклеиновыми кислотами препараты обрабатывают дополнительно ферментами.

Полученные дцВКМ являются продуктами секреторной активности клеток с сохранением физико-биохимических свойств и депонированных сигналов. Использование таких препаратов позволяет модулировать нативное микроокружение клеток и управлять их функциональной активностью. Например, культивирование на дцВКМ способствует увеличению пролиферации и миграции (Van et al., 2018), снижает уровень внутриклеточного содержания активных форм кислорода, за счет усиления работы антиоксидантных систем (супероксиддисмутазы и каталазы) (Pei et al., 2011; Liu et al., 2016), поддерживает колониобразующую способность и дифференцировку МСК (Xiong et al., 2015).

Кроме того, экспансия клеток на дцВКМ возможна без добавления ксеногенной сыворотки в культуральную среду, что крайне важно для подготовки МСК для клеточной терапии. Для поддержания пролиферации и метаболизма клеток в лабораторных условиях используют сыворотку крови крупного рогатого скота, однако для клинического применения необходимо бессывороточное культивирование во избежание передачи заболеваний и контроля состава среды (Anitua et al., 2013; Rakian et al., 2015). В работе Van et al., (2018) производили оценку пролиферативной активности МСК на пластике и дцВКМ, продуцируемого фибробластами из легочной ткани. Было продемонстрировано, что снижение концентрации

сыворотки до 2% при культивировании на дцВКМ не угнетает пролиферативную активность МСК по сравнению с пластиком. Для первичной культуры кмМСК продемонстрировано, что культивирование на дцВКМ в среде без сыворотки, позволяет поддерживать их стромальный фенотип (Rakian et al., 2015).

1.7.1. Особенности децеллюляризованного матрикса мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток из разных тканевых источников

Тот факт, что продуцируемый ВКМ имеет особенности в зависимости от тканевого источника МСК, вызывает интерес к изучению возможностей сохранения этих компетенций после децеллюляризации при последующем заселении клетками.

В литературе отмечен феномен индукции дифференцировочного потенциала МСК сонаправлено с тканеспецифичностью ВКМ. ДцВКМ, полученный из хрящевой ткани, сухожилий и костного мозга способствует хондро-, тендо-, и остеоккомитированию МСК, соответственно (Zhang et al., 2011; Xue et al., 2012; Zhang et al., 2014). Rao Patabhi et al., (2014) подтвердили приобретение МСК фенотипа миофибробластов при культивировании на дцВКМ, продуцированном гладкомышечными клетками.

Интересно, что для продуцируемого клетками ВКМ кроме тканеспецифичности белков установлены различия в механической жесткости. Например, дцВКМ от кмМСК обладает показателем жесткости в 3 раза выше, чем дцВКМ от жтМСК (Marinkovic et al., 2016). Аналогично в работе Prewitz et al., (2013) был проведен анализ по измерению показателей жесткости дцВКМ, полученного от кмМСК, эмбриональных и неонатальных фибробластов кожи, а также эндотелия пупочного канатика, с помощью атомно-силовой микроскопии. Установлено, что дцВКМ от кмМСК наилучшим образом воспроизводит показатели эластичности и жесткости схожие с нативным костным мозгом.

Эти данные коррелируют с представлением о том, что *in vivo* МСК локализуются в областях с различными биофизическими свойствами. Топология матрикса воспринимается посредством различных клеточных рецепторов. За счет механотрансдукции в зависимости от свойств субстрата изменяется экспрессия генов и функционирование клеток (Lu et al., 2011). Ранее было установлено (Engler et al., 2006; Smith et al., 2018), что жесткость ВКМ модулирует дифференцировку МСК: адипогенная, нейральная стимулируется на мягких субстратах, тогда как на жестких покрытиях индуцируются мио-, хондро- и остеогенная.

В работе Hoshiba и Lu отмечено, что адгезия хондроцитов происходит эффективнее на дцВКМ, полученном от хондроцитов, чем на дцВКМ от фибробластов дермы или МСК. Однако повышенное содержание фибронектина в последних двух препаратах, значительно стимулирует их пролиферацию (Hoshiba, Lu 2011). В ряде исследований, показано, что дцВКМ,

полученный от МСК из синовиальной жидкости, пупочного канатика и костного мозга, положительно влияет на пролиферацию хондроцитов в культуре (Pei et al., 2012; Yang et al., 2018; Zhang et al., 2019). Эти данные крайне актуальны для получения тканеинженерных конструктов для репарации хрящевой ткани. Поскольку *in vitro* хондроциты быстро подвергаются дедифференцировке, воспроизведение нативных условий с помощью дцВКМ позволяет эффективно поддерживать их экспансию (Pei et al., 2012).

1.7.2. Подходы для модификации внеклеточного матрикса

Современные подходы в *in vitro* исследованиях для стимуляции функциональной активности клеток или для моделирования сигналов из микроокружения включают в себя использование различных биологически активных молекул для добавления в среду культивирования. Для стимуляции продукции ВКМ существует несколько подходов.

Все больший интерес привлекает макромолекулярный краудинг. Данный подход заключается в добавлении в культуральную среду инертных и полидисперсных макромолекул (например, фикол, каррагинан, декстрансульфат). При использовании этих высокомолекулярных соединений было показано усиление накопления ВКМ клетками даже в низкой плотности и при депривации сыворотки (Satyam et al., 2004; Kumar et al., 2015). Cigognini et al., продемонстрировали усиление продукции ВКМ в культивируемых при 20% и 5% O₂ кМСК в присутствии каррагинана и фикола. Различий в накоплении ВКМ при различном уровне O₂ не отмечалось. Стоит отметить, что макромолекулярный краудинг не повлиял на стромальный фенотип данных клеток и гипоксия-зависимую стимуляцию хондрогенной дифференцировки (Cigognini et al., 2016).

В экспериментах *in vitro* широко используют аскорбат натрия (2-фосфо-L-аскорбат Na) для усиления синтеза компонентов ВКМ, таких как коллагены и ГАГ (Lin et al., 2005). При этом отмечается усиление пролиферации (Choi et al., 2008), дифференцировки (Lin et al., 2005) и снижение АФК в МСК, благодаря антиоксидантной активности аскорбата (Choi et al., 2008).

Одним из направлений при исследовании модификации свойств ВКМ является получение препаратов дцВКМ от клеток, культивируемых с добавлением аскорбата натрия или индукторов дифференцировок, для изучения их регуляторных свойств при рецеллюляризации. Целью ряда работ, перечисленных ниже, было рассмотрение полученных препаратов для применения в инженерии тканей.

Prewitz et al., показали, что значительных изменений в составе дцВКМ, полученного при добавлении аскорбата или остео-индукторов в среду культивирования МСК, не обнаружено. Масс-спектрометрически установлено обогащение проб коллагенами, гликопротеинами (фибронектин, витронектин, нидоген, тенасцины, тромбоспондины) и протеогликанами

(глипикан, декорин). Также была продемонстрирована способность стимулировать пролиферацию и коммитирование МСК на обоих типах дцВКМ по сравнению с пластиком и фибронектиновым покрытием. Отмечалось, что дцВКМ от остеодифференцированных МСК индуцирует коммитирование в ранние остеобласты при повторном заселении даже в отсутствие индукционных стимулов (Rao Patabhi et al., 2013). Интересно, что дцВКМ, полученный при стимуляции только аскорбатом, демонстрировал большую эффективность в отношении экспансии гемопоэтических предшественников. Полученные данные могут быть использованы при моделировании ниши костного мозга *in vitro* (Prewitz et al., 2013).

Для инженерии жировой ткани рассматривается использование дцВКМ от жтМСК, содержащихся в культуральной среде с добавлением адипогенных стимулов (Zhang et al., 2019). Было установлено, что дцВКМ от коммитированных клеток обогащается ламинином, но при этом снижается содержание фибронектина в сравнении с нативными МСК. Отмечено, что в рецеллюляризированных клетках усиливается экспрессия интегрина α_v , который связывается с фибронектином, что может быть причиной повышения их миграционной активности на нативном дцВКМ. При этом на дцВКМ, полученном от предшественников адипоцитов, усиливается дифференцировка МСК в адипонаправление, подтвержденная по накоплению жировых капель и экспрессии *PPAR γ* и *FABP4*, а также клетки приобретают округлую форму и меняется спектр интегринов на α_6 и α_7 (Zhang et al., 2019). В работе Guneta et al., было также подтверждено, что дцВКМ от МСК, культивируемых с адипо-индукторами, стимулирует раннее коммитирование МСК (экспрессия *PPAR γ*). Однако это не приводит к ускорению полной дифференцировки в адипоциты, подтвержденной по окраске Oil Red и экспрессии гена адипонектина (Guneta et al., 2017).

Добавление в среду культивирования для МСК хондрогенных индукторов приводит к упорядочиванию структуры фибрилл ВКМ и обогащению агреканом и гиалуроновой кислотой. После рецеллюляризации МСК на данные препараты происходила стимуляция пролиферации и увеличение жизнеспособности (Thakkar et al., 2013). Отмечен эффект усиления хондрогенной дифференцировки МСК (маркеры Sox9, агрекан) на дцВКМ, полученном в хондрогенной среде (Lua et al., 2011; Thakkar et al., 2013). Депонирование BMP-2 и коллагена II типа в значительной мере определяют склонность к коммитированию в предшественники хондроцитов (Kwon et al., 2013). В исследовании Guneta et al., (2017) отмечено, что использование дцВКМ от нестимулированных клеток также эффективно для индукции хондродифференцировки. При этом при децеллюляризации хондроцитов, как правило, теряется больше компонентов ВКМ по сравнению с МСК. Такие эффекты, вероятно, связаны с усилением адгезивности по мере дифференцирования (Guneta et al., 2017).

На рисунке 11 представлена схема, объединяющая основные подходы в изучении свойств дцВКМ МСК *in vitro*. Белковый состав, структурные особенности, биофизические свойства ВКМ во многом определяются тканевым источником МСК. Важную роль в формировании ВКМ играют условия культивирования, которые моделируют взаимоотношения с другими типами клеток и физические параметры (pH, уровень O_2 и т.д.), а также включают в себя прекондиционирование с различными биологически активными молекулами, такими как факторы роста, цитокины, макромолекулы, индукторы дифференцировки. *In vitro* возможно как сочетание различных компонентов микроокружения, так и изучение вклада отдельных параметров на свойства дцВКМ. Все эти «программируемые» качества получаемых дцВКМ отражаются на функциональной активности рецеллюляризируемых клеток. Отмечается модуляция их фенотипа, пролиферации, миграции и секреторной активности. Разнообразные подходы позволяют моделировать физиологические и патологические процессы, в регуляции которых задействованы структурные и регуляторные молекулы матрисома МСК.

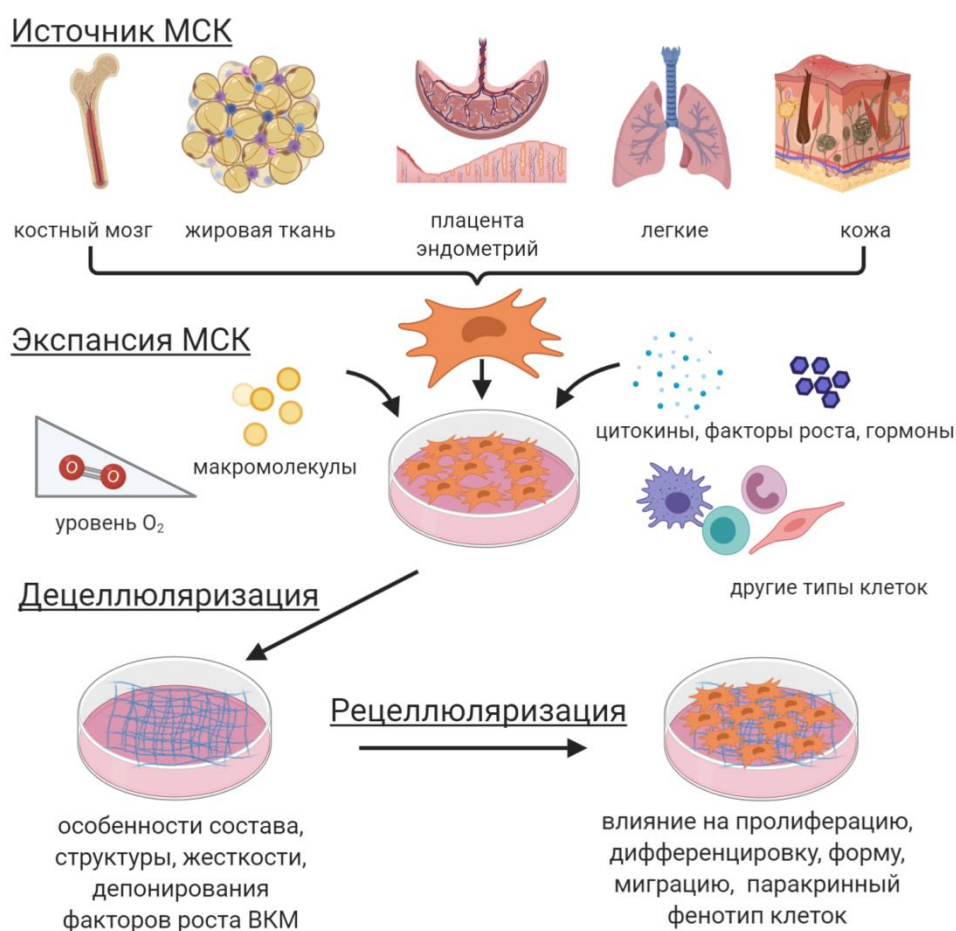


Рисунок 11. Изучение свойств децеллюляризованного внеклеточного матриса *in vitro*.

1.8. Перспективные направления использования ВКМ

In vitro экспансия первичных клеток, в том числе прогениторных, для последующей доставки их в места повреждений, имеет некоторые ограничения, поскольку показано, что клетки при длительном культивировании могут терять свою функциональную активность, дедифференцироваться, подвергаются старению (Lai et al., 2010; Pei et al., 2012). Это связано в первую очередь с потерей связи со своей тканевой нишей. ВКМ поддерживает рост клеток и эффективно обеспечивает диффузию питательных веществ и представление факторов роста, необходимые для клеток (Весегга et al., 2011). Поэтому использование нативного ВКМ в качестве скаффолдов является передовым направлением для нужд регенеративной медицины и тканевой инженерии. Целью тканевой инженерии является сочетание культивируемых клеток с поддерживающими биомолекулярными каркасами, которые заменяют естественную внеклеточную среду. В зависимости от состава, архитектуры, физико-химических и механических свойств скаффолды по-разному влияют на поведение клеток. Эти конструкции позволяют направлять и контролировать клетки через молекулярные и механические сигналы. Кроме того, они предполагают направленную и локальную трансплантацию клеток, способствуя регенерации поврежденной ткани *in vivo* (Hamada et al., 2005).

В качестве скаффолдов разрабатывают биоинженерные конструкции из различных материалов: синтетических (полимолочная и полигликолевая кислота, поликапролактон) или натуральных (хитозан и белки внеклеточного матрикса (коллаген, фибрин, гликозаминогликаны)). Каркасы должны быть пористыми для проникновения клеток, а также для доступа кислорода и питательных веществ. Кроме того они должны быть биоразлагаемыми для правильной репарации поврежденной ткани (Uradhyay, 2017). Современные протоколы позволяют создавать как двумерные подложки, так и 3D-скаффолды на основе синтетических полимеров с определенной пористостью, жесткостью, физико-химическими свойствами. Однако следующим этапом стала необходимость сочетать эти биоматериалы с адгезивными молекулами, факторами роста и цитокинами для того, чтобы повышать жизнеспособность и дифференцировку заселенных клеток (Kim et al., 2017, Kwon et al., 2018).

Большое разнообразие синтетических и натуральных биоматериалов позволяет имитировать некоторые элементы ниши клеток и поддерживать их свойства. Тем не менее, все еще трудно воспроизводить сложную структуру нативного ВКМ. Децеллюляризация рассматривается как перспективная альтернатива, поскольку сохраняется структурно-функциональный комплекс белков, а также биоактивные молекулы, которые вовлечены в регуляторные свойства. За счет этого такие субстраты поддерживают тканевой гомеостаз и способствуют процессу регенерации. ДцВКМ внедряется в тканевую инженерию с помощью

дизайна биологических пластов, инъекционных гидрогелей и разнообразных покрытий в сочетании с синтетическими полимерами. На настоящий момент исследуют как применение децеллюляризированных органов и тканей со сложно трехмерной структурой, так и децеллюляризированных пластов, полученных от культивированных клеток одного типа. Последние имеют преимущества в связи с тем, что *in vitro* исследование ВКМ клеток, включая и стволовые, и дифференцированные, позволяет оценить вклад отдельных клеток в функционировании ткани, что невозможно при изучении дцВКМ целых органов (Choudhury et al., 2018). Использование субстратов дцВКМ, полученных от культивируемых клеток, для создания конструкций кровеносных сосудов и клапанов сердца показало определенный успех в доклинических и клинических исследованиях (McAllister et al., 2009; Quint et al., 2012; Syedain et al., 2014). Однако использование субстратов дцВКМ, полученных от клеточных культур, для биомедицинских приложений на данный момент затрудняется в связи с дороговизной и длительностью подготовки в сравнении с полимерными конструкциями (Hussey et al., 2019).

Таким образом, продукция широкого профиля биологически активных метаболитов и хорошо развитого ВКМ рассматривается в качестве основных принципов участия МСК в поддержании тканевого гомеостаза и их участия в репаративных процессах. Взаимодействие с компонентами микроокружения во много определяет функциональную активность МСК, а также модулируют их секреторную активность.

Многочисленные исследования *in vitro* демонстрируют, что МСК способны продуцировать ВКМ со специфическими свойствами в зависимости от их источника и условий культивирования. Физиологическая гипоксия является важнейшим фактором микроокружения МСК, однако крайне мало комплексных (полногеномных и протеомных) исследований их матрисома в данных условиях. Также являются актуальными исследования, направленные на выяснение влияния гипоксии на вовлечение ВКМ в обеспечение баланса самообновляющихся и коммитированных МСК за счет способности депонировать/высвобождать факторы роста и образовывать временные сигнальные молекулы - матрикины. Кроме того, необходимо детальное исследование ВКМ клеток стромального дифферона различной коммитированности, поскольку от этого может зависеть как их вовлечение в физиологические и репаративные процессы *in vivo*. Проведенный в настоящем обзоре анализ данных позволяет полагать, что культивирование МСК на дцВКМ способствует модуляции и поддержанию функций МСК. ДцВКМ может служить в качестве скаффолда для доставки клеток, что обуславливает актуальность его применения для регенерации различных тканей в протоколах регенеративной медицины и тканевой инженерии.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали оборудование: ламинарный шкаф БМБ-II-«Ламинар-С»-1,2 NEOTERIC (LAMSYSTEMS, Россия), CO₂-инкубатор (Sanyo, Япония), мультигазовый инкубатор (Sanyo, Япония), световой фазово-контрастный инвертированный микроскоп Leica DM5000B (Германия), флуоресцентный фазово-контрастный микроскоп Nikon Eclipse TiU (Nikon, Япония), вортекс (Elmi, Латвия), центрифуга Eppendorf 5417 R (Eppendorf, Германия), водяная баня (BioSan, США), проточный цитофлуориметр CytoFlex S (Beckman Coulter, США) с программным обеспечением для создания и анализа гистограмм Kaluza (Beckman Coulter, США), амплификаторы 2720 Thermal cycler (Applied Biosystems, США) и Mx300P (Stratagene, США), ПЦР-бокс, оснащенный ультрафиолетовой лампой (BioSan, Латвия), ультрацентрифуга Eppendorf 5417R, вортекс-центрифуга (Elmi, Латвия), аналитические весы Adventure (Ohaus, Китай), планшетный спектрофотометр (Bio-Rad, США), спектрофотометр NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, США), флуориметр Fluoroskan Ascent FL (Thermo Scientific), автоматические дозаторы (Eppendorf, Германия), дозатор для серологических пипеток (Biohit, Финляндия), шприцевые фильтры (Millipore, США), гемоцитометр (Bright Line, США), холодильник (Indesit, Россия) и низкотемпературный холодильник (Sanyo, Япония), термостат (Смоленское СКТБ СПУ, Россия), сосуды Дьюара для жидкого азота (НПО Гелиймаш, Россия).

Для культивирования клеток использовали чашки Петри диаметром 35 мм и 100 мм (Corning, США), а также 24-луночные планшеты (Nunc, Дания). Для работы с клетками использовали серологические пипетки и центрифужные пробирки различного объема (Corning, США), микропробирки (Eppendorf, Германия), автоматические пипетки и наконечники (Eppendorf, Германия). Криоконсервацию клеток проводили в криопробирках (Corning, США). Для микроскопии клеточных культур использовали покровные и предметные стёкла MENZEL-GLÄSER (Gerhard Menzel GmbH, Германия). Окрашивание и анализ поверхностных антигенов проводили в пробирках для проточной цитофлуориметрии (Greiner bio-one, Германия). При проведении количественной ПЦР использовали наконечники с двойным фильтром (Eppendorf, Германия), микропробирки (Axygen, США), стрипы и планшеты (Eppendorf, Германия), имеющие маркировку “RNase&DNase free”.

2.1. Культивирование клеток

В работе использовали МСК из стромально-васкулярной фракции жировой ткани человека из криоколлекции лаборатории Клеточной физиологии ИМБП РАН. Протоколы экспериментов одобрены Комиссией ИМБП РАН по медицинской биоэтике (550/МСК от 22 июля 2020 г.). Популяции МСК регулярно проверяли на соответствие минимальным критериям сформулированных Международным обществом клеточной терапии (Dominici et al., 2006).

Стромальный фенотип МСК характеризовали по экспрессии антигенов: CD73, CD105, CD90 (маркеры МСК) и отсутствию экспрессии CD34, CD45, а также по способности к мультилинейной дифференцировке в остеогенном и адипогенном направлениях (Рисунок 12). Для выявления упомянутых антигенов кластеров дифференцировки применяли антитела, конъюгированные с флуоресцентным красителем: anti-CD73-FITC, anti-CD105- PE, anti-CD90-FITC, anti-CD45-ECD, anti-CD34-FITC, в качестве контроля использовали соответствующие IgG-FITC и IgG-PE (Immunotech, Франция). Клетки постоянно культивировали в среде α -MEM (Gibco, Великобритания) с добавлением пенициллина/стрептомицина (100 ед/мл и 100 мг/мл, соответственно, ПанЭко, Россия) и фетальной телячьей сыворотки (10% об/об, HyClone, США) при 20% O₂ в CO₂-инкубаторе или в мультигазовом инкубаторе при 5% O₂ (оба Sanyo, Япония). Эксперименты проводили на клетках 2-6 пассажей. Плотность посадки составляла 3-3,5 тыс. клеток/см². Среду обновляли каждые 3-4 суток.

Остеогенная дифференцировка: Для исследования потенциала к остеогенной дифференцировке в среду культивирования к монослою МСК 80% конfluenceности добавляли остеогенные стимулы (индуцированная дифференцировка) или продолжали культивировать в стандартной среде роста (спонтанное коммитирование). Индукционная среда содержала дексаметазон (0,01 мкМ), β -глицерофосфат (10 мМ), и фосфат-L-аскорбиновой кислоты (0,2 мМ) (все Sigma-Aldrich, США). Период индукции составлял 7 (ранняя) и 21 (поздняя) день с заменой среды каждые 3-4 дня. Ранние этапы оценивали путем гистохимического выявления активности щелочной фосфатазы при помощи коммерческого набора «Alkaline phosphatase kit» (Sigma-Aldrich, США) согласно инструкции производителя. Перед окрашиванием удаляли среду, клетки промывали буфером, фиксировали 20 минут в 4% параформальдегиде, затем промывали PBS. Краситель готовили непосредственно перед использованием, окрашивали 1 час в темноте при комнатной температуре. После окраски препараты отмывали дистиллированной водой и высушивали. Для полуколичественной оценки нерастворимый продукт экстрагировали диметилсульфоксидом и измеряли интенсивность окраски с помощью спектрофотометра при $\lambda=550$ нм (Biorad, США). На поздних этапах определяли степень минерализации матрикса путем гистохимического выявления солей кальция ализариновым красным S. Клетки фиксировали 4% раствором параформальдегида в течение 15 минут при комнатной температуре, после чего несколько раз промывали PBS. Затем добавляли раствор 40 мМ ализаринового красного S, содержащий 2,8% гидроксида аммония, на 2 минуты при комнатной температуре, после чего реагент сливали, пробы аккуратно промывали дистиллированной водой. Ализариновый красный в ходе реакции придает красное окрашивание кальцифицированным компонентам матрикса. После окраски проводили фотосъемку случайным образом выбранных 3-5 полей зрения в культуральных чашках при помощи

микроскопа Nikon Eclipse Ti-U. Для полуколичественной оценки нерастворимый продукт экстрагировали диметилсульфоксидом и измеряли интенсивность окраски с помощью спектрофотометра при $\lambda=405$ нм (Biorad, США).

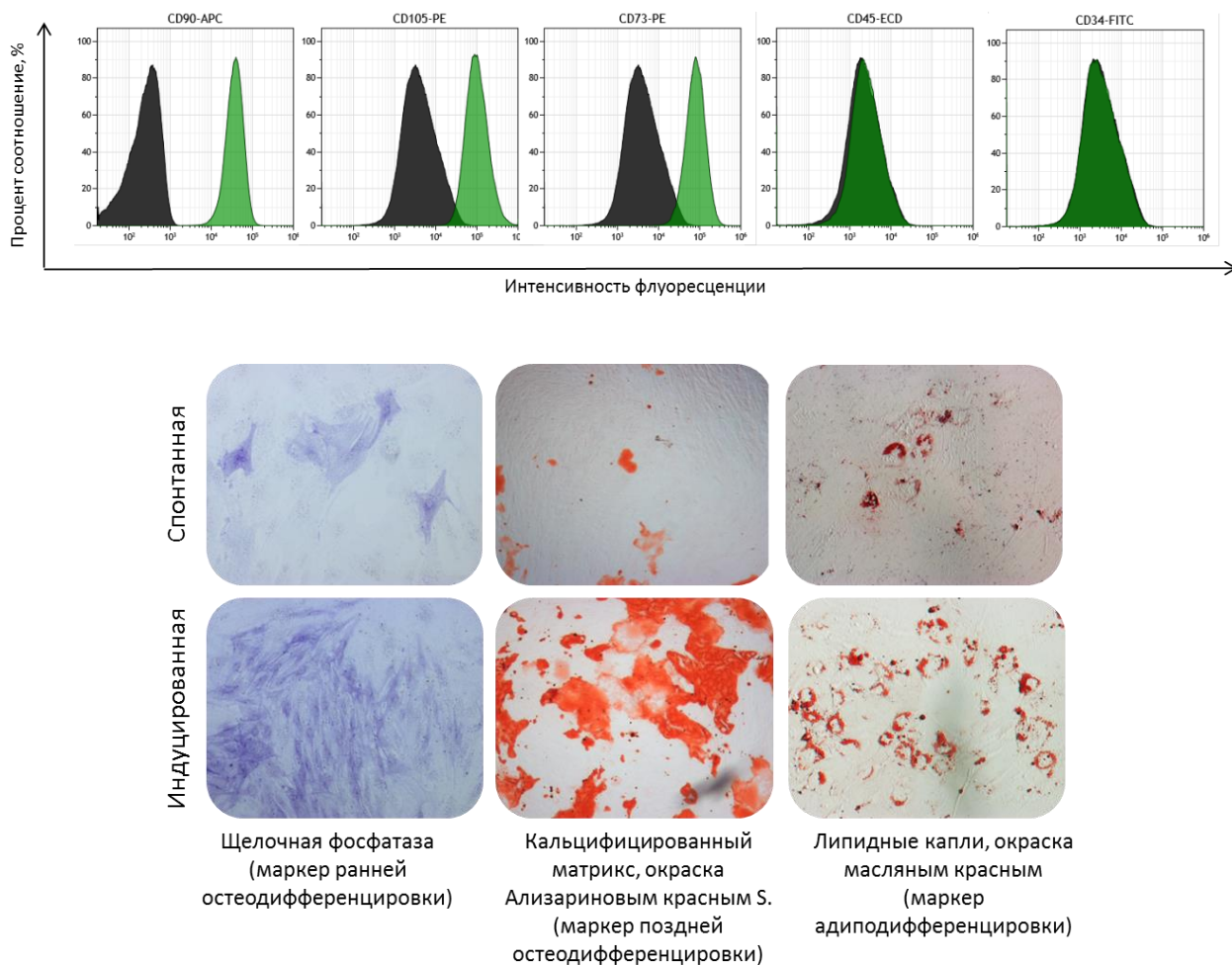


Рисунок 12. Характеристика фенотипа МСК: А) репрезентативные гистограммы иммунофенотипического анализа культивируемых МСК, цветовая кодировка: черный – неокрашенный контроль, зеленый - клетки с добавлением соответствующих меченых флуорохромом антител; б) дифференцировка МСК в адипогенном и остеогенном направлении. Увеличение 10х.

Адипогенная дифференцировка: Адипогенную дифференцировку осуществляли в полной ростовой среде α MEM, содержащей 10^{-6} М дексаметазона, 200 μ M индометацина, 0,5 мМ изобутил-метилксантина (IBMX) и 10 μ M инсулина (все Sigma-Aldrich, США). Дифференцировка длилась 10 суток. Результат адипогенной дифференцировки оценивали путем визуализации жировых капель 0,36% раствором масляного красного (Oil Red O). Исходный раствор красителя готовили в концентрации 0,5%, в качестве растворителя использовали 98%-ный изопропанол. Рабочий раствор красителя готовили за 10 минут до окрашивания. Для этого исходный раствор разводили в дистиллированной воде в соотношении 3:2 и пропускали через фильтр с порами 0,22 мкм. Клетки фиксировали 4% раствором

параформальдегида в течение 15 минут при комнатной температуре, после чего несколько раз промывали PBS и один раз 60% изопропанолом. Затем добавляли 0,36% раствор масляного красного в 60% изопропанол. Окрашивание осуществляли 15 минут при комнатной температуре, после чего реагент сливали, клетки промывали 60% изопропанолом и в конце – дистиллированной водой два раза. Oil Red O окрашивает липидные капли в красный цвет. После окраски проводили фотосъемку случайным образом выбранных 3-5 полей зрения. Для полуколичественной оценки связавшийся краситель растворяли в 100% изопропанол, после чего измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 490 нм с помощью спектрофотометра (Biorad, США).

2.2. Полногеномный анализ транскриптома клеток и ОТ-ПЦР

Для выделения суммарной РНК из культивируемых МСК проводили фенол-хлороформную экстракцию с помощью реагента ExtractRNA (Евроген, Россия). Для удаления остатков геномной ДНК концентрацию суммарных нуклеиновых кислот доводили до 200 мкг/мл, после чего добавляли 10-кратный буфер для ДНКазы, содержащий $MgCl_2$ (LifeTechnologies) и 1 мкл ДНКазы (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, США) и инкубировали при 37 °С 30 минут. Для очистки РНК использовали набор CleanRNA Standard (Евроген, Россия) с применением спин-колонок по протоколу производителя. Оценку концентрации РНК на всех этапах выделения проводили с помощью спектрофотометра «Nanodrop 2000» (Thermo Fisher, Швеция).

Анализ полногеномной экспрессии у МСК, постоянно культивированных при 5% O_2 или 20% O_2 , производился с помощью Sentrix® HumanRef-8 Expression BeadChips (Illumina, США) с дальнейшим биоинформатическим анализом на коммерческой основе сотрудниками фирмы ООО «Геноаналитика». 200 нг РНК было амплифицировано с помощью набора Illumina® TotalPrep™ RNA Amplification Kit (Ambion, США). Амплифицированная РНК подвергалась гибридизации на микрочипах Human-Ref8 (Illumina, США), согласно протоколу производителя. Подсчет и анализ полученных данных производился с помощью программного обеспечения GenomeStudio software (Illumina, США) с использованием статистического модуля для анализа экспрессии генов. Различия считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Для верификации генов, кодирующих молекулы матрисома, использовали базу данных MatrisomeDB (<https://matrisomedb.org>) (Shao et al., 2019). Дифференциально изменившиеся гены матрисома классифицировали с точки зрения их принадлежности к биологическим процессам Gene Ontology с помощью веб-ресурсов DAVID (<https://david.ncifcrf.gov>) и STRING (<https://string-db.org>).

Для обратной транскрипции использовали реагенты «Евроген». 2000 нг полученной РНК разбавляли в 6 мкл воды, к смеси добавляли по 20 мкМ праймеров – Random и OligodT. Для

отжига образцы инкубировали 2 минуты при 70 °С, после чего в образец добавляли 4 мкл буфера для кДНК, 20 мМ dNTP, 40 мМ DTT и 100 ед. ревертазы. Для температурной инкубации использовали термоциклер 2750 Thermal Cycler, Applied Biosystems (США). Температурная кривая включала элонгацию в течении 45 минут при 42 °С и деградацию ревертазы в течение 10 минут при 70 °С.

Методом ОТ-ПЦР в реальном времени с помощью набора праймеров RT Profiler PCR Array – Human Extracellular matrix & Adhesion Molecules (Qiagen, США) производили оценку уровня экспрессии вышеперечисленных генов. Нормировали на транскрипцию 5 генов “домашнего хозяйства” (*ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *HPRT1*, *RPLP0*), входящих в состав набора. Для количественной ОТ-ПЦР в реальном времени генов «остео» маркеров (*RUNX2*, *ALPL*, *COL1A1*) использовали соответствующие коммерческие праймеры (Qiagen, США). Для нормализации использовали гены «домашнего хозяйства» - *HPRT* и *RPLP0*. Уровень экспрессии генов при 5% O₂ относительно 20% O₂ характеризовали с использованием метода $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Изменение уровня мРНК оценивали по интенсивности включения флуоресцентного красителя SYBR Green (Синтол, Россия) в кДНК. Температурная кривая включала интервалы: 7 минут при 95 °С, 40 циклов – 20 сек. 94 °С, 30 сек. 57 °С, 30 сек. 72 °С и постепенное понижение температуры с 95 °С до 4 °С для детекции неспецифических продуктов. Для ПЦР использовали амплификатор «Stratagene 3000» (Stratagene, США).

2.3. Децеллюляризация внеклеточного матрикса и экстракция белков

Для анализа продукции внеклеточного матрикса МСК рассеивали на культуральный пластик или стекла в высокой плотности (7,5 тыс. клеток/см²) и культивировали при различном содержании O₂ (20% и 5%) в течение 14 суток. Для стимуляции продукции компонентов ВКМ к монослою клеткок с 80% конfluence в питательную среду добавляли 2-фосфо-L-аскорбат натрия в концентрации 50 мкг/мл (Fluka, Германия).

Для анализа внеклеточного матрикса на обескелеченных препаратах использовали метод децеллюляризации. Культивируемые МСК, полученные по методике, описанной выше, трижды промывали PBS от остатков питательной среды и обрабатывали детергирующим агентом. Использовали изотонический раствор 0,5% Triton X-100 в PBS, содержащий 20 мМ NH₄OH при 37 °С в течение 5 мин. Лизирование клеток отслеживали с помощью фазово-контастной микроскопии. После инкубации удаляли клеточный дебрис с помощью PBS. Затем децеллюляризованный матрикс (дцВКМ) промывали дистиллированной водой и замораживали -20 °С.

Экстракцию белков из дцВКМ проводили с помощью 2М раствора мочевины в 150 мМ растворе NaCl при +4°C в течение 2 суток с добавлением ингибиторов протеаз, в том числе металопроотеиназ (Thermo Scientific, США). Полученные экстракты центрифугировали при 2000

rpm 5 минут при +4 °C (5417R, Eppendorf, Германия) и отбирали супернатант. Измерение концентрации белков проводили с помощью набора (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, США) согласно протоколу производителя.

2.4. Иммуноцитохимический анализ

Иммуноцитохимический анализ основных белков матрикса проводили на клеточных и децеллюляризированных препаратах. Клетки промывали дважды PBS и фиксировали 4% параформальдегидом с добавлением 0,2 % Triton-X100 для пермебиализации при 37 °C 15 мин (дцВКМ препараты фиксировали без добавления Triton X-100). Далее с помощью 1% бычьего сывороточного альбумина (Sigma, США) блокировали неспецифическое связывание антител 15 мин при комнатной температуре. Клеточные препараты инкубировали с первичными кроличьими антителами к коллагену 1 (5 мкг/мл, ИМТЕК, Россия) и фибронектину (20 мкг/мл, ИМТЕК, Россия), витронектину (5 мкг/мл, Abcam, Великобритания) и версикану (5 мкг/мл, Abcam, Великобритания) человека в течение ночи при +4 °C во влажной камере. Для визуализации использовали набор Novocasta Novolink Polymer Detection Systems (Leica Biosystems, Великобритания), включающий в себя полимер, конъюгированный с пероксидазой, специфически связывающийся с Ig-G кролика. В качестве субстрата для пероксидазы использовали 3,3'-диамибензидин. Препараты заключали в монтирующую среду Polymount (PolyScience, США). Препараты дцВКМ инкубировали с первичными кроличьими антителами к фибронектину (20 мкг/мл, ИМТЕК, Россия) человека в течение ночи при +4 °C во влажной камере. Для негативного контроля использовали PBS вместо раствора первичных антител. Затем проводили инкубацию со вторичными козьими антителами против кроличьих иммуноглобулинов, мечеными флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) (10 мкг/мл, ИМТЕК, Россия) в течение 30 мин при комнатной температуре во влажной камере. Между окрашиваниями промывали PBS 3 раза по 3 минуты. Препараты заключали в монтирующую среду Fluoroshield, содержащую ядерный краситель Dapi (Sigma-Aldrich, США). По окрашиванию Dapi оценивали ДНК-контаминацию в препаратах дцВКМ.

2.5. Выявление коллагеновых и неколлагеновых белков внеклеточного матрикса и их полуколичественное определение

Для количественного определения белков ВКМ использовали колориметрический анализ коллагеновых и неколлагеновых белков, селективно окрашенных Sirius Red F3BA и Fast Green FCF (оба Sigma-Aldrich, США), соответственно. Клеточные препараты МСК получали в 24-луночном планшете. Половину клеток культивировали в полной культуральной среде α -MEM, а другие с добавлением в полную среду 2-фосфо-L-аскорбат натрия в концентрации 50 мкг/мл (Fluka, Германия). Для приготовления насыщенной пикриновой кислоты 1,2 грамма кислоты растворяли в 100 мл дистиллированной воды на водяной бане. Красители готовились каждый

раз свежие, порошок растворяли в насыщенной пикриновой кислоте и получали 0,1 % раствор. Клетки инкубировали в водном растворе насыщенной пикриновой кислоты, содержащем 0,1% Sirius Red F3BA или 0,1 % Fast Green FCF, в течение 30 минут при комнатной температуре на ротационном шейкере. В качестве контроля использовали раствор насыщенной пикриновой кислоты, не содержащий красителей. После инкубации жидкости аспирировали и образцы промывали водой. Затем краситель, связавшийся с ВКМ, растворяли в 200 мкл смеси 0,1% NaOH и абсолютного метанола (1:1) и полученный элюат анализировали с помощью спектрофотометра (BioRad США) при 550 и 620 нм. Для оценки общего количества белка, клетки окрашивали с помощью 0,5% Crystal Violet (Sigma, США) в абсолютном метаноле в течение 15 минут при комнатной температуре, затем промывали дистиллированной H₂O и экстрагировали 96% этанолом. Степень окрашивания оценивали спектрофотометрически при 550 нм (BioRad, США).

2.6. Хромато-масс-спектрометрический анализ

Для анализа белкового состава экстрагированного дцВКМ использовали метод протеомного анализа совместно с лабораторией протеомики ИМБП (с.н.с. Каширина Д.Н.). Подготовка образцов экстрагированных мочевиной белков дцВКМ состояла из восстановления 0,1 М дитиотреитолом в 0,1 М Трис буфере (pH 8,5), содержащем 8 М мочевины, при 50° С в течение 45 мин, алкилирования 0,05 М йодоацетатом и инкубации в темноте при комнатной температуре в течение 20 мин. Затем белки осаждали в течение ночи при -20° С пятью объемами ацетона в присутствии 0,1% трифторуксусной кислоты. Белковый осадок промывали сначала ацетоном, затем 96% спиртом, отделяя осадок с помощью центрифугирования при 16000g при 4° С в течение 10 минут. К образцу белкового субстрата добавляли 100 мкл 0,05 М аммоний-бикарбонатного буфера и раствор смеси трипсина с IysC с концентрацией 1 мкг/мкл в 0,1% уксусной кислоте до соотношения 1:100 по массовым долям к белку. Смесь инкубировали в течение ночи в термостате при 37° С при перемешивании со скоростью 750 rpm. Затем добавляли 1 мкл 10% раствора муравьиной кислоты для инактивации трипсина и осаждения дезоксихолата. Образцы центрифугировали при 21 000g в течение 10 минут и аликвоту супернатанта переносили в новую пробирку для последующего хромато-масс-спектрометрического анализа. Полученные смеси триптических пептидов анализировали методом жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии на основе системы нано-ВЭЖХ Dionex Ultimate3000 (Thermo Fisher Scientific, США) и масс-спектрометра TimsTOF Pro (Bruker Daltonics, США). Пептиды разделяли с помощью насадочной эмиссионной колонки (C18, 25 см × 75 мкм × 1,6 мкм) (Ion Optics, Парквилл, Австралия) при скорости потока 400 нл/мин посредством градиентного элюирования 4-90% фазы В в течение 40 мин. Мобильная фаза А состояла из 0,1% муравьиной кислоты в воде, а мобильная фаза В - из 0,1% муравьиной

кислоты в ацетонитриле. Масс-спектрометрический анализ проводили с использованием метода параллельного накопления при последовательной фрагментации (PASEF). Источник электрораспылительной ионизации (ESI) работал при напряжении на капилляре 1 500 В, смещении концевой пластины 500 В при температуре 180 °С. Измерения проводились в диапазоне m/z от 100 до 1 700 Th. Подвижность ионов находилась в диапазоне от 0,60 до 1,60 В с/см². Общее время цикла составило 1,88 с, а количество сканирований PASEF MS/MS было установлено на 10. Полученные данные LC-MS/MS были проанализированы с помощью PEAKS Studio 8.5. Каждый белок определяли по, как минимум, одному уникальному пептиду. Для полуколичественных анализов использовался метод "label-free" с дополнительной опцией "match between the runs". Заданные ограничительные параметры были следующими: допуск на ошибку исходной массы - 20 ppm; допуск на ошибку массы фрагмента - 0,03 Da; фермент - трипсин; максимальное число пропущенных связей - 3; фиксированная модификация - карбамидометил (C); вариабельная модификация - окисление (M), ацетилирование (N-конец). Порог частоты ложных обнаружений (FDR) был установлен на уровне 0,01.

2.7. Подготовка проб кондиционированной среды

После аспирации кондиционированной среды из культуральной посуды проводили центрифугирование при 3200 rpm при +4° С в течение 10 минут. Далее отбирали супернатант, замораживали и хранили при -20 ° С.

2.8. Активность матриксных металлопротеиназ

Измерения активности MMP, содержащихся в кондиционированной среде культивируемых МСК, производили с помощью SensoLyte® 520 Generic MMP Assay Kit *Fluorimetric* (AnaSpec, США). Данная методика основана на технологии Фёрстеровского переноса энергии. Субстратом для MMP является 5-FAM/QXL™520, где флуоресценция 5-FAM (5-карбоксифлуоресцеина) подавляется QXL 520. Расщепление пептида ферментом приводит к высвобождению донора из акцептора и восстановлению флуоресценции 5-FAM.

MMP содержатся в кондиционированной среде в виде про-фермента, которые активировали с помощью 1 mM 4-аминофенилртуутьацетатом (APMA) непосредственно перед экспериментом. Для активации MMP-1, MMP-2, MMP-9 кондиционированную среду с добавлением APMA инкубировали при +37 °С 3, 1, 2 часа, соответственно. Активированные MMP разводили в буфере для анализа до соответствующих концентраций и добавляли в лунки микропланшета с тестируемыми соединениями. Положительным контролем являлись рекомбинантные MMP, отрицательным – буфер для анализа.

Для получения кинетических показаний измеряли интенсивность флуоресценции при $E_x/E_m=490$ нм/520 нм на планшетном флуориметре (Fluoroscanner Ascent FL, Thermo Scientific, США) каждые пять минут в течение 60 минут в относительных единицах флуоресценции

(RFU). Преобразование RFU в концентрацию продукта ферментативной реакции, использовали эталон флуоресценции, входящий в комплект.

2.9. Иммуноферментный анализ

Для оценки содержания в полученных экстрактах дцВКМ факторов роста, которые депонируются в ВКМ и сохраняются при децеллюляризации, использовали иммуноферментный анализ. Применяли наборы Human VEGF DuoSet ELISA и Human TGF β DuoSet ELISA (R&D, США) согласно протоколу производителя. Для оценки содержания молекул про-коллагена 1 типа в кондиционированной среде использовали набор Human Pro-COL1 α 1 DuoSet ELISA (R&D, США) согласно протоколу производителя.

2.10. Мультиплексный анализ

Профиль цитокинов исследовали в кондиционированной среде МСК с помощью мультиплексного анализа по технологии xMAP и системы MagPix (Luminex Corporation) по инструкции производителя (набор Human Cytokine/Chemokine/Growth Factor Panel A 48 Plex; Merck). Панель содержала гранулы, конъюгированные с антителами к следующим цитокинам и хемокинам: EGF, FGF-2, эотаксин, TGF- α , G-CSF, Fit-3L, GMCSF, фракталкин, IFN- α 2, IFN γ , GRO, IL-10, MCP-3, IL-12p40, MDC, IL-12p70, PDGF-AA, IL-13, PDGF-AB/BB, IL-15, sCD40L, IL-17A, IL-1RA, IL-1 α , IL-9, IL-1b, IL-2, IL-3, IL-4, IL5, IL-6, IL-7, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1b, RANTES, TNF α , TNF β , VEGF. Для определения концентрации молекул в пробе использовали стандартные кривые, построенные по известным концентрациям стандартов. Анализ образцов проводился на приборе MAGPIX (Luminex, США). Концентрации вычисляли автоматически в программном обеспечении xPONENT 4.2 (Luminex, США).

2.11. Рецеллюляризация

Для оценки влияния децеллюляризованного матрикса на функциональную активность МСК, культивируемые при 20% O₂, высевались с плотностью 3,5 тыс/см² в 35 мм чашки Петри или стекла, покрытые дцВКМ от МСК в нормоксии или гипоксии (далее «дцВКМ-Норм» и «дцВКМ-Гип», соответственно). В качестве контроля использовали чашки, покрытые коллагеном крысы первого типа (далее «коллаген») в концентрации 10 мкг белка на 1 см² (Имтек, Россия).

Морфологию и актиновый цитоскелет МСК изучали через 30 мин высевания на дцВКМ-нор/дцВКМ-Гип/коллаген. После инкубации все неадгезированные клетки удаляли, а прикрепившиеся МСК фиксировали 4% параформальдегидом 10 минут при + 37 °C. После промывки (3 раза по 5 минут PBS) в клетках выявляли F-актин с помощью Alexa488-меченого фаллоидина (1:100, Molecular Probes, США) 30 минут при комнатной температуре во влажной камере.

Для подсчета эффективности адгезии клеток к коллагену или дцВКМ на конфокальном микроскопе выбирались по 3 панорамные области площадью 4 мм^2 , а после проводили подсчет клеток на 1 мм^2 . Далее отдельно подсчитывали количество клеток каждого типа распластывания (подробности в тексте), различающихся по размеру и организации актинового цитоскелета, и делили на общее количество клеток на единице площади, получая процент каждого морфологического типа.

Для исследования остеопотенциала рецеллюляризированных МСК, культивируемых на дцВКМ-нор/дцВКМ-Гип/коллагене, в среду добавляли остеогенные стимулы («индукция») или продолжали культивировать в стандартной ростовой среде («контроль»). После 7 суток оценивали результат коммитирования МСК в остеогенном направлении по активности щелочной фосфатазы. Подробная информация приведена в разделе «Культивирование МСК», описанном выше.

2.12. Микроскопия

Светлопольную и фазово-контрастную микроскопию проводили с использованием микроскопа Nikon Eclipse Ti-U, оснащенного цветной цифровой камерой DS-Ri1 (Япония).

Для флуоресцентного анализа использовали лазерно-сканирующую микроскопию (ЛСМ) LSM-780 (Carl Zeiss, Германия). Структурный анализ дцВКМ на ЛСМ проводили на фиксированных 4% параформальдегидом образцах.

С помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) анализа выявляли ультраструктуру ВКМ на клеточных и дцВКМ препаратах. Образцы дважды промывали PBS и фиксировали смесью 2,5% глутаральдегида и 2% параформальдегида (Merck, Германия) на PBS pH=7,2 в течение ночи. Образцы были обезвожены в возрастающих концентрациях спирта (30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% и 100%) с последующей заменой этанола на ацетон (Химмед, Россия). Образцы высушивали в критической точке, после чего покрывали распылением золотом-палладием и исследовали на CamScanZ2 (Cambridge Instruments, Англия).

2.13. Обработка изображений

Обработку изображений производили с помощью программы ImageJ (NIH, США). На изображениях настраивали яркость и контраст, производили наложение каналов флуоресценции и выставляли масштабные оттенки.

Ориентация волокон была количественно измерена с использованием плагина OrientationJ с помощью программного обеспечения Fiji (NIH, США) на ЛСМ и СЭМ изображениях. Плагин определяет локальную ориентацию и когерентность для каждого пикселя изображения. Черно-белые изображения ЛСМ (8-bit) были проанализированы с точки зрения углового распределения волокон. Волокна дцВКМ раскрашивались картами с цифровой кодировкой оттенок-насыщенность-яркость (HSB), где цвет соответствовал углу ориентации локального

волокна от -90° до $+90^\circ$ относительно горизонтали. На изображениях, полученных с помощью СЭМ, измеряли когерентность, которая отражает степень ориентации волокон дцВКМ. На каждом СЭМ – изображении было выбрано 6 случайных областей интересов (ROI) (в общей сложности 36 ROI для каждой группы), площадью 2 мкм^2 . Плагин строит эллипсы в заданном ROI, чем уже эллипс, тем выше значение когерентности ($=1$), при котором волокна полностью выровнены, в то время как идеальный круг указывает на более низкое значение когерентности ($=0$), при котором фибриллы ВКМ имеют случайное распределение.

2.14. Статистическая обработка результатов

Статистический анализ проводился с помощью программного обеспечения GraphPad. Все эксперименты проводились как минимум в трех независимых условиях ($N=3-6$). В качестве характеристик полученных выборок использовали среднее и стандартное отклонение ($M \pm SD$). Статистическую достоверность различий между двумя группами данных оценивали с помощью непараметрических критерия Манна-Уитни и t-критерия Уилкоксона для малых групп при выбранном уровне значимости $p < 0,05$.

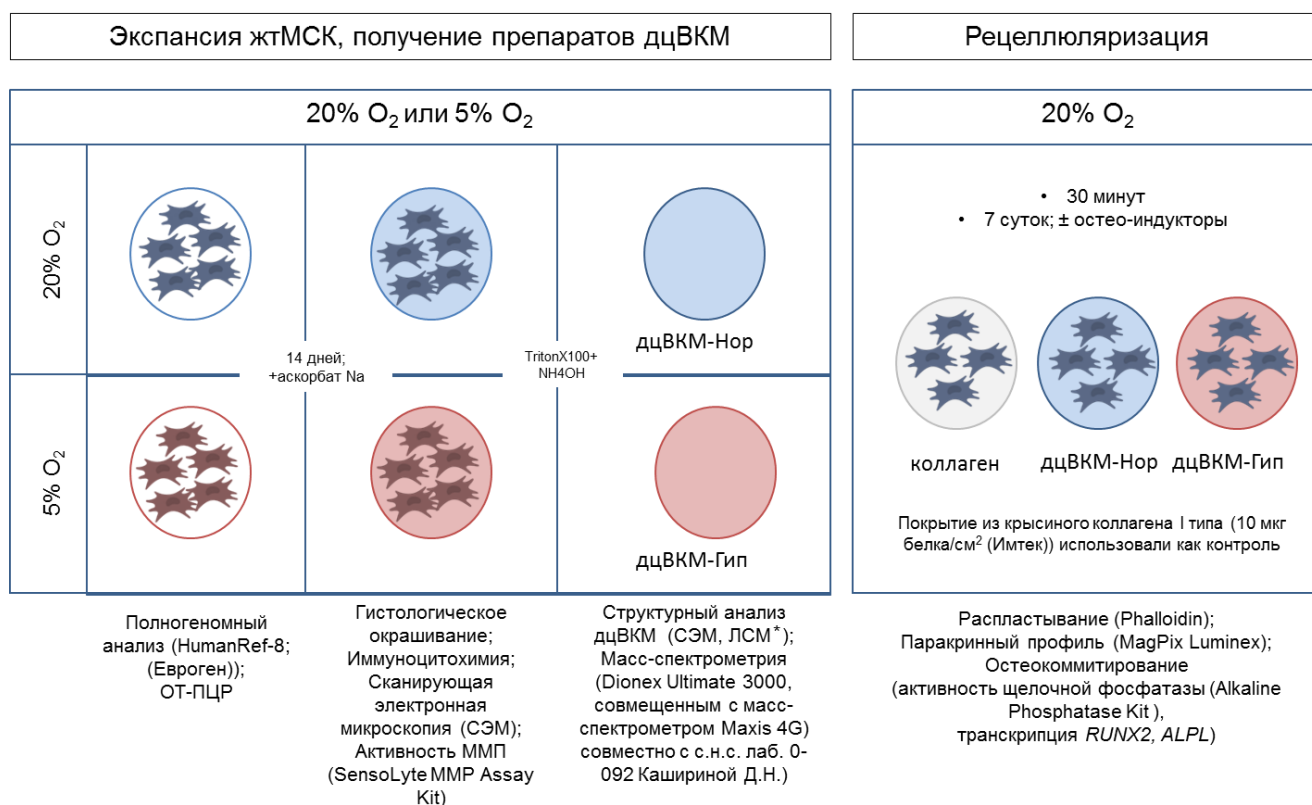


Рисунок 13. Методология исследования.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Характеристика матрикса, продуцируемого мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками при 20% или 5% O₂

Для изучения изменений матрисома при физиологической гипоксии по сравнению со стандартным лабораторным уровнем O₂ оценивали транскрипционный профиль генов МСК, кодирующих ВКМ-ассоциированные белки, а также состав структурных и регуляторных молекул продуцируемого ВКМ.

3.1.1. Дифференциальная экспрессия генов, кодирующих белки матрисома

Полногеномный анализ экспрессии генов был выполнен на МСК, выделенных из трех образцов жировой ткани человека и постоянно культивируемых при различных уровнях O₂. Во всех образцах около 20% среди всех дифференциально измененных генов МСК (при 5% по сравнению с 20% O₂) относились к матрисому (гены аннотированы согласно базе данных MatrisomeDB (<https://matrisomedb.org>)). У образца №1 выявлено наибольшее число дифференциально экспрессированных генов ВКМ и ассоциированных с ним молекул (96 генов), по сравнению с образцами №2 (46 генов) и №3 (21 ген).

Для каждого образца МСК была проведена классификация всех дифференциально измененных генов по ключевым группам матрисома (Рисунок 14). Интересно, что вне зависимости от количества генов, изменившихся при физиологической гипоксии, для каждого образца было характерно схожее процентное соотношение генов основного матрисома и матрисом-ассоциированных молекул, составляющее примерно 1:1. Таким образом O₂-зависимыми являются как структурные, так и регуляторные молекулы матрисома МСК. Учитывая тот факт, что коллагены, гликопротеины и протеогликаны составляют около 30% от всех генов матрисома человека (Naba et al., 2015), то, вероятно, структурные молекулы ВКМ наиболее чувствительны к физиологической гипоксии на уровне транскрипции.

На Рисунке 15 представлены данные о дифференциальной экспрессии генов матрисома для каждого образца в отдельности. Стоит отметить, что состав изменившихся генов несколько различался качественно по представленности генов и количественно по уровню их экспрессии. Это может указывать на индивидуальные особенности доноров и гетерогенность популяций МСК.

В МСК-О1 была изменена в 2 раза и более транскрипция 96 генов, кодирующих структурные и регуляторные молекулы, ассоциированные с ВКМ. Из них экспрессия 70% генов была снижена. Для группы основного матрисома выявлено снижение экспрессии всех структурных коллагеновых белков (коллагены I, II, III, IV, V, VIII, IX, XI, XII, XVI типов), а

также генов большинства протеогликанов, которые участвуют в определении механических свойств ВКМ и депонировании факторов роста (агрекан, бигликан, глипикан). Также сниженную экспрессию имели гены структурных (*ELN*, *FBLN5*, *MFAP4-5*, *DPT*, *MGP*, *COMP*), адгезионных (*FN1*, *THBS1*, *POSTN*) и регуляторных (*SPARC*, *MXRA5*, *GRIM1*, *CYR61*, *CTGF*) гликопротеинов. К генам гликопротеинов с повышенной экспрессией относились адгезивные (*LAMA1*, *EGFLAM*, *ABI3BP*) и вовлеченные в миграцию (*SLIT2*, *ESM1*, *SPRX2*) молекулы. Анализ направления изменений экспрессии матрисом-ассоциированных генов МСК-О1 показал, что большая часть секретируемых факторов и ВКМ-аффилированных молекул имели сниженную экспрессию, тогда как в группе регуляторов транскрипция 50% генов, кодирующих ферменты, была увеличена: это матриксные металлопротеиназы (*MMP2*, *MMP3*), катепсины (*CTSK*, *CTSH1*, *CTSL1*), адамализин (*ADAM23*), лизилоксидаза подобный фермент (*LOXL4*), мембранная металлоэндопептидаза (*MME*), активатор плазминогена урокиназного типа (*PLAU*). Сниженная транскрипция была характерна для генов ингибиторов протеаз (*TIMP3*, *A2M*), катепсинов (*CST6*) и сериновых пептидаз (*SERPINB7*, *SERPINH1*) и регуляторов, отвечающих за организацию (*LOXL1*, *TGM2*, *LEPRE*) и ремоделирование (*MMP23*, *ADAM19*, *ADAMTS1*) ВКМ.

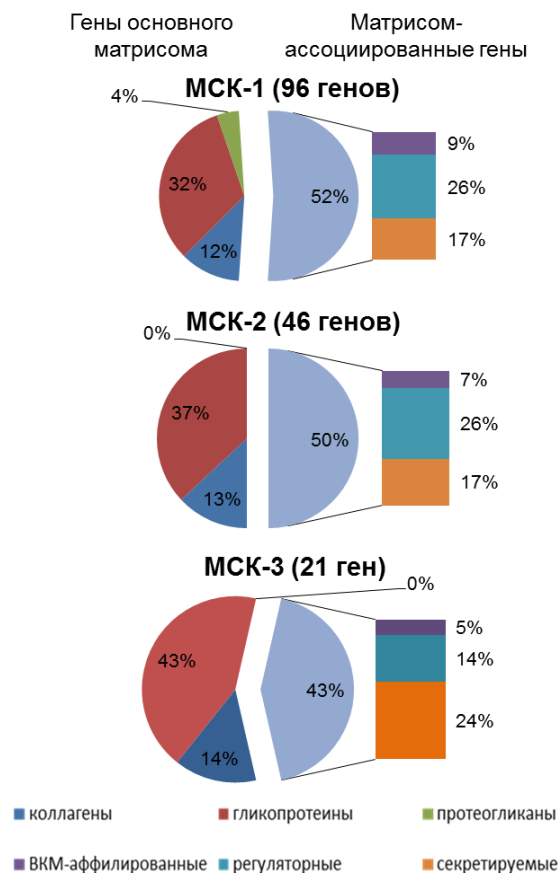


Рисунок 14. Распределение дифференциально экспрессированных генов в компартаментах матрикса МСК (5% O₂ против 20% O₂).

В МСК-О2 транскрипция 60% дифференциально экспрессированных генов увеличивалась. Это коллагены (*COL6A1*, *COL6A2*, *COL6A3*, *COL15A1*, *COL18A1*) и гликопротеины, которые модулируют образование коллагенового матрикса (*AEBP1*, *PCOLCE*). Было выявлено увеличение транскрипции генов, кодирующих адгезивные (*SPON1*, *FBLN1*) и вовлеченных в костных обмен (*SPP1*, *WISP2*) гликопротеины. При этом снижалась транскрипция генов, продукты которых задействованы в организации неколлагеновых волокон (*ELN*, *COMP*, *FRAS1*).

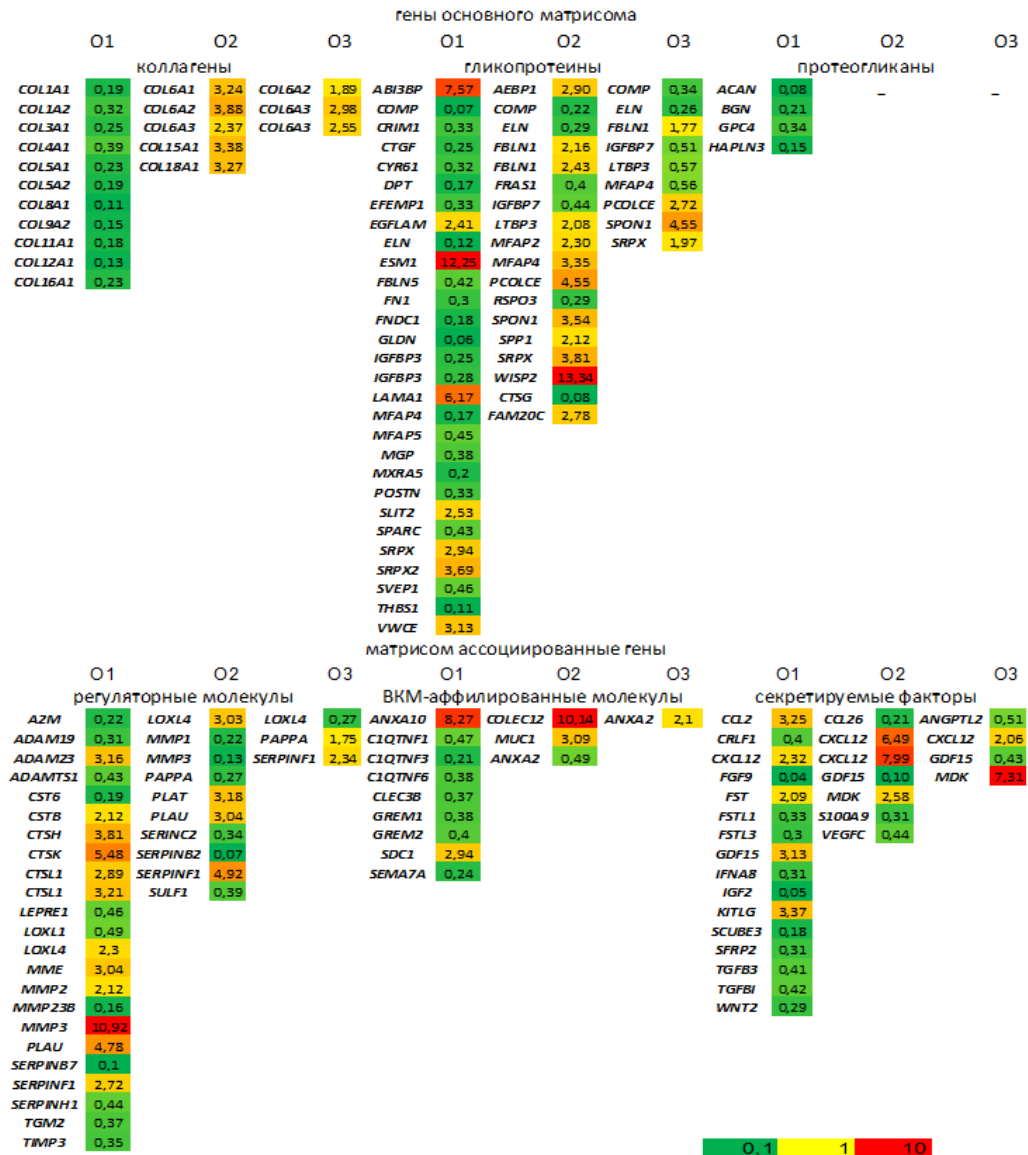


Рисунок 15. Тепловая карта дифференциально экспрессированных генов матрикса в 3 образцах МСК (O1, O2, O3) при различном уровне O₂ (5% vs 20% O₂). Цветовая шкала, расположенная в правом нижнем углу отражает уровень экспрессии.

Изменений экспрессии генов, кодирующих белки протеогликанов, не было обнаружено. Для генов ключевых матричных ферментов отмечены двунаправленные изменения. Снизилась экспрессия генов ферментов, ответственных за деградацию волокон ВКМ, таких как *MMP1*,

MMP3, сульфатаза (*SULF1*), катепсин (*GTSG*). При этом увеличилась транскрипция генов ферментов, ассоциированных с синтезом коллагеновых волокон (*LOXL4*) и участвующих в биоминерализации (*FAM20*). Также увеличивалась экспрессия генов активаторов плазминогена (*PLAU*, *PLAT*) с одновременным снижением ингибитора uPA (*SERPINB2*).

МСК-О3 имели наименьшее число дифференциально экспрессированных генов матрисома, по сравнению с двумя другими образцами. Среди 23 таких генов транскрипция изменялась разнонаправленно. В основном матрисоме увеличивалась экспрессия генов адгезионных белков, таких как коллаген VI типа (*COL6A2*, 3), спондин и фибулин, и снижалась транскрипция генов гликопротеинов, ответственных за организацию неколлагенового ВКМ (*COMP*, *ELN*, *MFAP4*). Среди протеогликанов не было выявлено дифференциально экспрессированных генов. Среди матрисом-ассоциированных генов отмечено значительное увеличение экспрессии ингибитора ангиогенеза (*SERPINF1*) и протеазы, расщепляющей IGF-связывающие белки (*PAPPA*). Секретируемые факторы изменялись подобно МСК-О2: увеличивалась экспрессия генов цитокинов *CXCL12* и *MDK* и снижалась транскрипция *ANGPTL2* и *GDF15*.

Несмотря на обнаруженную гетерогенность в транскрипционной активности генов матрисома, полногеномный анализ выявил набор генов, которые изменились в двух или трех образцах МСК (Рисунок 16).

Во всех трех случаях обнаружено 8 одинаковых генов, экспрессия 5 из них изменилась сонаправлено: снизилась транскрипция генов гликопротеинов *COMP* и *ELN*, и увеличилась - гликопротеина *SRPX*, ингибитора серпиновых пептидаз *SERPINF1* и хемокина *CXCL12*. Наибольшее число схожих генов было идентифицировано у О2 и О3 – 18 генов, из них 13 изменялись сонаправлено: коллагены (*COL6A2*, *COL6A3*), гликопротеины (*COMP*, *ELN*, *FBLN1*, *IGFBP7*, *PCOLCE*, *SPON1*, *SRPX*), секретируемые факторы (*CXCL12*, *GDF15*, *MDK*). А также в двух из трех образцов увеличилась экспрессия генов активатора плазминогена урокиназного типа *PLAU* и лизилоксидаза-подобный фермент (*LOXL4*) (Рисунок 16 А).

Дифференциально измененные гены матрисома были проанализированы с точки зрения белок-белковых взаимодействий между кодируемыми ими молекулами с помощью веб-ресурсов DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) и STRING (<https://string-db.org>) (Рисунок 16 Б). Было выделено 5 кластеров генов, аннотированных в общих биологических процессах согласно базе данных Gene Ontology (Рисунок 16 В).

Первый кластер объединяет гены коллагена VI типа (*COL6A2*, *COL6A3*) и гены *PCOLCE* и *LOXL4*, кодирующие ферменты, модифицирующие структуру коллагеновых белков. Экспрессия этих генов была увеличена в 2 из 3 образцов. Второй кластер генов объединяет неколлагеновые молекулы, участвующие в формировании эластиновых волокон (*ELN*, *MFAP4*, *FBLN1*, *LTBP3*).

Транскрипция большинства из них снижалась. Молекулы данных двух групп также объединяются в общей функциональной группе в качестве адгезионных белков. Среди них отмечены изменения транскрипции в направлении увеличения (*COL6A2*, *COL6A3*, *SPON1*, *FBLN1*) и снижения (*COMP*, *MFAP4*, *IGFBP7*) экспрессии.

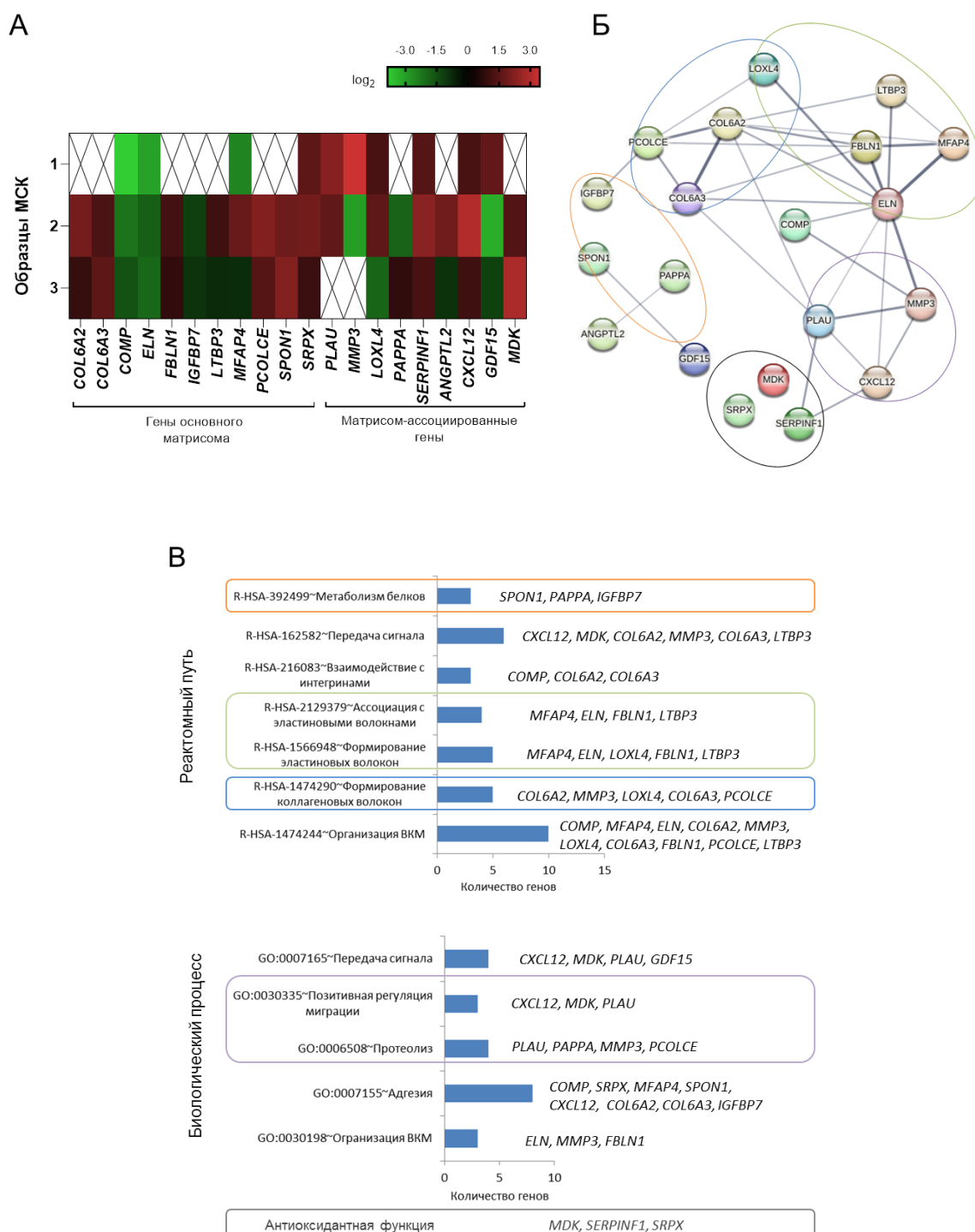


Рисунок 16. Дифференциально экспрессированные гены матрикса (5% vs 20% O₂), которые изменились в двух или трех образцах МСК: А) тепловая карта, иллюстрирующая уровень экспрессии (log₂); Б) кластеры генов с наиболее значимыми связями; В) насыщение групп по функциональной принадлежности к путям и биологическим процессам изменившимися кластерами генов.

Аннотирован кластер генов, продукты которых участвуют в метаболизме белков (*SPON1*, *IGFBP7*, *PAPPA*). Однако значимых связей между ними не установлено, как и общих закономерностей в их регуляции.

Особый интерес вызвали кластеры, состоящих из двух типов молекул: 1) гены, продукты которых вовлечены в регуляцию клеточной миграции (*CXCL12*, *PLAU*, *MDK*, *MMP3*) и 2) гены, кодирующие молекулы с антиоксидантной функцией (*SRPX*, *SERPINF1*, *MDK*). Стоит отметить, что экспрессия генов всех этих молекул была увеличена при физиологической гипоксии.

Поскольку анализ дифференциальной экспрессии генов МСК показал, что их матрисом значительно регулируется физиологической гипоксией на транскрипционном уровне, представлялось важным исследовать, как данный физический фактор микроокружения МСК повлияет на продукцию белков ВКМ.

3.1.2. Гистологический анализ компонентов внеклеточного матрикса

Для выявления коллагеновых и неколлагеновых белков ВКМ использовали гистологические красители Sirius Red F3BA и Fast Green FCF, соответственно, которые специфически связываются с этими белками. Окрашенные структуры ВКМ были выявлены под монослоем МСК, а также внутри клеток (Рисунок 17).

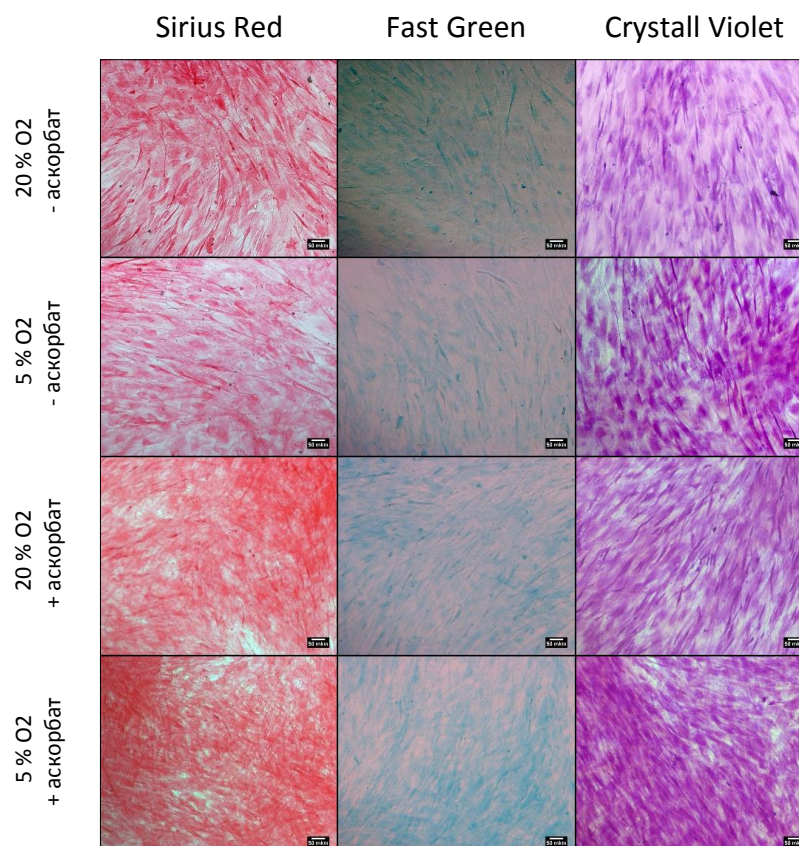


Рисунок 17. Гистологическое выявление коллагеновых (Sirius Red) и неколлагеновых (Fast Green) белков, а также общего белка (Crystall Violet) в МСК, постоянно культивируемых при 20 или 5% O_2 в стандартной ростовой среде и при добавлении 2-фосфо-L-аскорбата натрия. Репрезентативные микрофотографии. Масштабный отрезок 50мкм.

Внутриклеточное выявление коллагенов, вероятно, определяется связыванием красителей с про-формами белков, процессинг и модификация которых происходит в компартментах клетки. Для многих же неколлагеновых белков характерно не только структурная роль в формировании ВКМ, но внутриклеточное функционирование (Murphy-Ullrich, Sage, 2014; Theocharis et al., 2015). Иммуноцитохимическая идентификация белков будет представлена ниже.

Для полуколичественного анализа связавшиеся красители экстрагировали и оценивали спектрофотометрически (Рисунок 18 А). Тотальное содержание белков в МСК (на единицу площади, см^2) имело тенденцию к снижению коллагеновых и увеличению неколлагеновых белков в условиях физиологической гипоксии по сравнению с 20% O_2 (данные не представлены).

Достоверное увеличение суммарного белка, выявленного с помощью окрашивания Crystall Violet, может быть обусловлено увеличением плотности клеток в монослое МСК при 5% O_2 (Рисунок 18 Б). При пересчете значений показателей оптической плотности в элюатах, экстрагированных Sirius Red и Fast Green, на показатели оптической плотности Crystall Violet, сохранилась тенденция к снижению содержания коллагеновых белков в МСК, постоянно культивируемых при 5% O_2 , однако изменения были не достоверными.

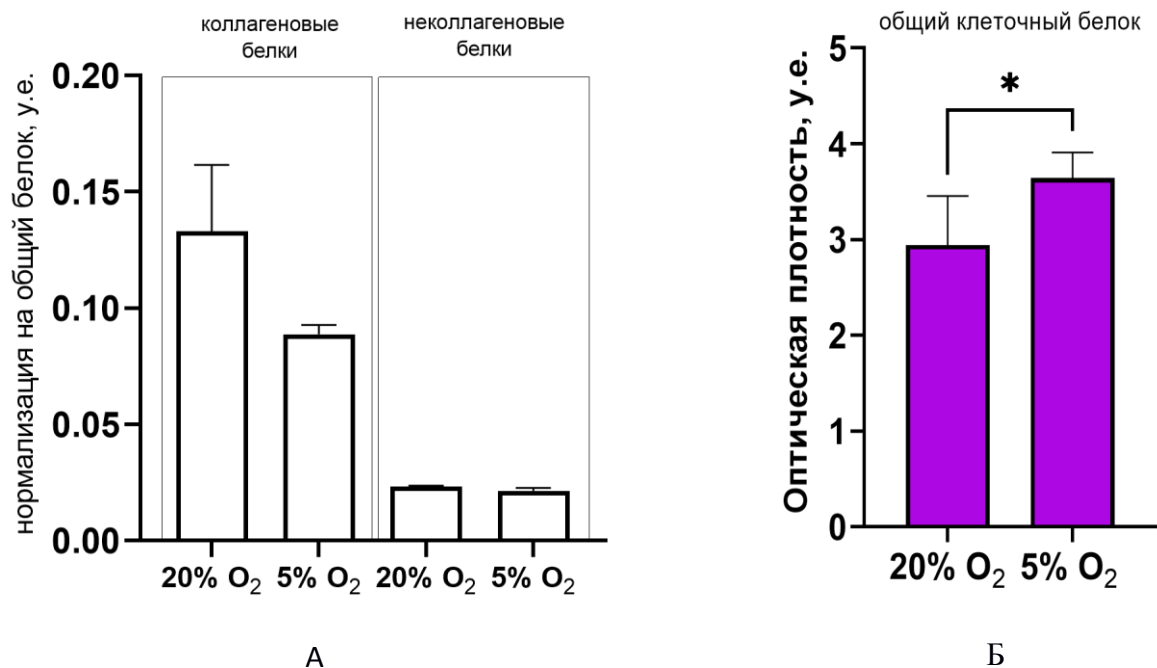


Рисунок 18. Полуколичественная спектрофотометрическая оценка содержания коллагеновых белков (Sirius Red, 550 нм), неколлагеновых белков (Fast Green, 620 нм) (А) и общего клеточного белка (Crystall Violet, 550 нм) (Б). Значения показателей оптической плотности в элюатах, экстрагированных Sirius Red и Fast Green, нормированы на показатели оптической плотности Crystall Violet. Данные представлены как $\text{mean} \pm \text{SD}$, $n=6$, $*p<0,05$.

Добавление в культуральную среду производного витамина С (2-фосфо-L-аскорбата натрия) является общепринятым подходом для стимуляции продукции фибриллярного ВКМ *in vitro* (Peterkofsky, 1991; Choi et al., 2008; Trackman et al., 2017). Выявлено достоверное увеличение накопления коллагеновых белков в МСК как при 20% (в 1,4 раза), так и при 5% O₂ (в 1,85 раз). В МСК при физиологической гипоксии этот эффект был более выраженным. При нормировании на общий белок было установлено достоверное увеличение продукции в 2 раза. Культивирование при 20% O₂ с добавлением аскорбата способствовало увеличению количества МСК в монослое, о чем свидетельствует окрашивание Crystall Violet. На накопление неколлагеновых белков аскорбат не повлиял (Таблица 3).

Таблица 3. Полуколичественный анализ содержания коллагеновых и неколлагеновых белков в ВКМ МСК, постоянно культивируемых при 20 и 5 % O₂.

	Уровень O ₂	Экспериментальная группа	Оптическая плотность (M±SD)	Кратность изменений	Достоверность
Sirius Red	20% O ₂	- 2-фосфо-L-аскорбат	0,39±0,08	1,4	p=0,03
		+2-фосфо-L-аскорбат	0,55±0,12		
	5% O ₂	- 2-фосфо-L-аскорбат	0,32±0,01	1,85	p=0,006
		+ 2-фосфо-L-аскорбат	0,6±0,09		
Fast Green	20% O ₂	- 2-фосфо-L-аскорбат	0,07±0,01	1	—
		+2-фосфо-L-аскорбат	0,07±0,01		
	5% O ₂	- 2-фосфо-L-аскорбат	0,08±0,02	1	—
		+ 2-фосфо-L-аскорбат	0,08±0,01		
Crystall Violet	20% O ₂	- 2-фосфо-L-аскорбат	2,94±0,51	1,4	p=0,03
		+2-фосфо-L-аскорбат	3,64±0,46		
	5% O ₂	- 2-фосфо-L-аскорбат	3,64±0,27	1	—
		+ 2-фосфо-L-аскорбат	3,81±0,25		
Sirius Red/ Crystall Violet	20% O ₂	- 2-фосфо-L-аскорбат	0,14±0,04	1,1	—
		+2-фосфо-L-аскорбат	0,15±0,03		
	5% O ₂	- 2-фосфо-L-аскорбат	0,08±0,02	2	p=0,005
		+ 2-фосфо-L-аскорбат	0,16±0,03		

3.1.3. Содержание про-коллагена 1 в кондиционированной среде

Помимо того, что было определена тотальная продукция коллагеновых белков в клеточных монослоях, мы исследовали секрецию про-коллагена 1α1 в кондиционированную среду с использованием иммуноферментного анализа.

Во всех исследуемых группах было обнаружено значительное количество про-коллагена до 1,5 мкг/мл в группах культивирования в стандартной ростовой среде и до 5мкг/мл - с добавлением аскорбата натрия. Более высокое содержание растворимого про-коллагена 1 α 1 было выявлено в кондиционированной среде от МСК в условиях физиологической гипоксии. Однако при нормировании на общий клеточный белок (окраска Crystall Violet) этот эффект нивелировался (Рисунок 19).

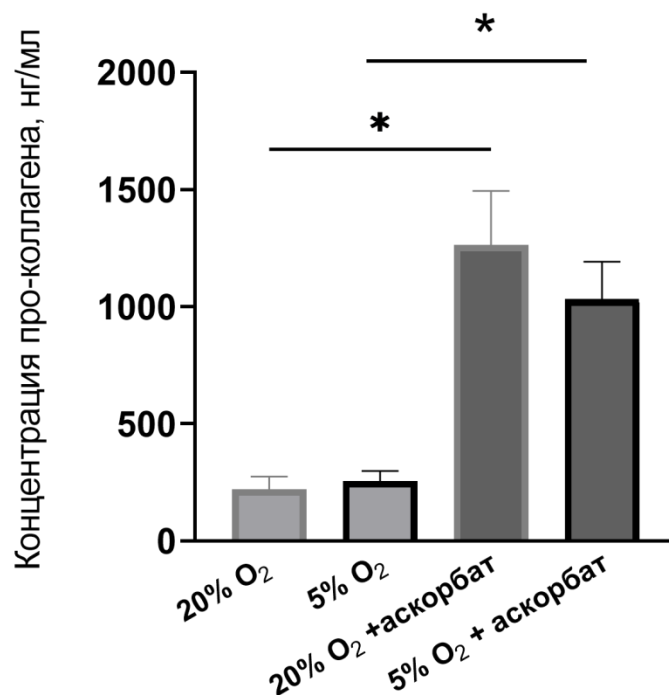


Рисунок 19. Содержание про-коллагена 1 α 1, выявляемое с помощью иммуноферментного анализа, в кондиционированной среде МСК, культивируемых при 20 или 5 % O₂ в стандартной среде культивирования и с добавлением аскорбата. Данные нормированы на общий клеточный белок (Crystall Violet). Данные представлены как M $\pm$ SD, n=6. * – p < 0,05.

После добавления аскорбата к среде культивирования продукция про-коллагена 1 α 1 значительно возрастала: при 20% O₂ в 6 раз, а при 5% O₂ в 3,7 раз. Достоверных различий между группами по содержанию про-коллагена в присутствии аскорбата не было выявлено (Рисунок 19).

Поскольку добавление аскорбата приводит к значительному усилению продукции белков ВКМ, а эффекты уровня O₂ на их продукцию не изменяются, в дальнейшем в среду культивирования МСК для стимуляции накопления белков ВКМ добавлялся аскорбат натрия.

3.1.4. Иммуноцитохимическая характеристика белков внеклеточного матрикса

В культивируемых МСК иммуноцитохимически были идентифицированы молекулы ВКМ, относящиеся к коллагенам (коллаген 1 типа), гликопротеинам (фибронектин и остеоонектин) и протеогликанам (версикан) (Рисунок 20).

Коллаген 1 типа был выявлен межклеточно в виде тонких нитей, а также внутриклеточно в эндоплазматическом компартменте, где про-коллагеновые молекулы модифицируются для последующей сборки во внеклеточном пространстве (Boudko, Bachinger, 2012; Paiva et al., 2019). Молекулы фибронектина образовывали равномерную плотную сеть под монослоем клеток. Остеонектин был идентифицирован как во внутриклеточном везикулярном аппарате, так и перицеллюлярно. При этом «гранулярность» остеоонектина внутри МСК, культивируемых при 20%, была выше, чем при 5% O₂, что может указывать на его увеличенную продукцию в первом случае. Версикан выявлялся точечно в перицеллюлярном пространстве, а также в ядре. Показано, что внутриядерная локализация версикана характерна для пролиферирующих стромальных клеток (Carthy et al., 2015). Не было выявлено отличий в упаковке описанных белков ВКМ при различных уровнях O₂.

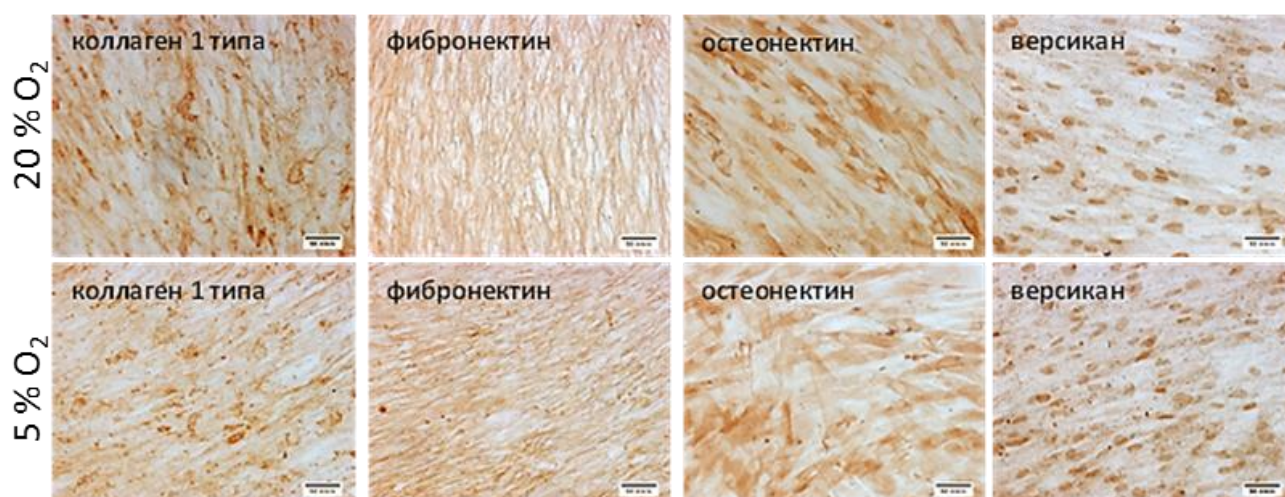


Рисунок 20. Выявление белков ВКМ МСК, постоянно культивируемых при 20% и 5% O₂, с помощью пероксидазной иммуноцитохимии. Репрезентативные микрофотографии. Масштабный отрезок 50 мкм.

Было также показано, что физиологическая гипоксия не влияла на транскрипционную активность генов коллагена 1 типа (*COL1A1*), фибронектина (*FN1*) и версикана (*VCAN*). Но идентифицировано достоверное снижение экспрессии гена остеоонектина (*SPARC*) (Рисунок 21).

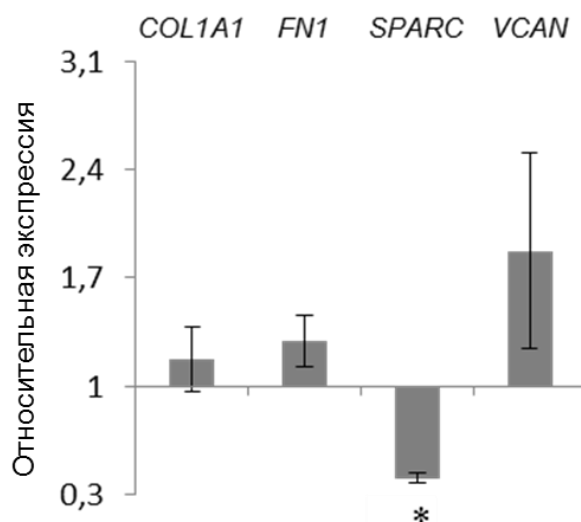


Рисунок 21 Дифференциальная экспрессия генов МСК, кодирующих белки ВКМ: коллаген I типа (*COL1A1*), фибронектин (*FN1*), остеоонектин (*SPARC*), версикан (*VCAN*) (5% O_2 по сравнению с 20% O_2). Экспрессия генов в МСК при 20% O_2 принята за 1. Данные представлены как $M \pm SD$ и нормированы на экспрессию *ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *HPRT1*, *RPLP0*; * - $p \leq 0,05$, $n=3$.

3.1.5. Особенности упаковки молекул внеклеточного матрикса, продуцируемого мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками при различном уровне O_2

Следующим этапом было изучение ультраструктуры ВКМ с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). На микрофотографиях СЭМ монослоев МСК при различных уровнях O_2 отметили, что клетки при физиологической гипоксии были менее распластанными и меньше в размере по сравнению с МСК при 20% O_2 (Рисунок 22). Приобретение такой морфологии в условия пониженного уровня O_2 было показано ранее (Гринаковская и др., 2009; Буравкова и др., 2009).

На больших увеличениях в промежутках между клетками были хорошо видны структуры ВКМ в виде сети волокон с различной толщиной фибрилл, что совпадает с первичным представлением о структуре стромы. При этом ВКМ МСК при 20% O_2 состоял из толстых пучков с нерегулярно пересекающимися тонкими нитями, т.е. формировал так называемую «мембранно-подобную» форму. При 5% O_2 ВКМ образовывал сеть, представленную в основном тонкими пересекающимися фибриллами. Также были отмечены области с единичными плотными структурами (Рисунок 22).

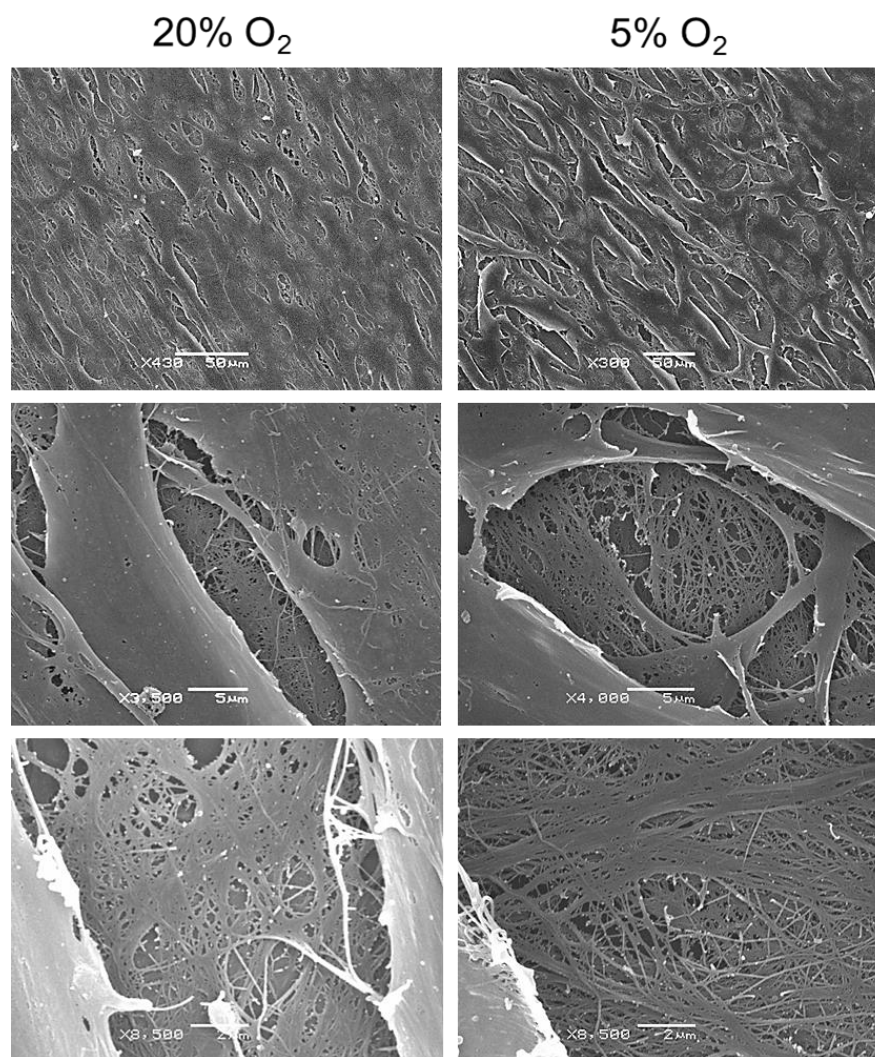


Рисунок 22. Морфология МСК и продуцируемого ВКМ при 20% O_2 или 5% O_2 . Сканирующая электронная микроскопия CamScanZ2. Репрезентативные микрофотографии.

3.1.6. Активность матричных металлопротеиназ в кондиционированной среде

Выше описано, что физиологическая гипоксия вызывает разнонаправленные изменения транскрипции генов ремоделирующих молекул. ОТ-ПЦР анализ верифицировал снижение транскрипции *MMP1*, *MMP2*, *MMP3* более чем в 1,5 раза и увеличение экспрессии их ингибитора *TIMP3* (Рисунок 23 А). При этом значимых изменений в транскрипции *MMP10*, *MMP11*, *MMP14*, *MMP16* и *TIMP1*, *TIMP2* не было установлено.

Анализ активности MMP-1 и MMP-2 в кондиционированной среде МСК показал снижение их способности к деградации соответствующих субстратов в условиях физиологической гипоксии (в 2,1 и 1,9 раз, соответственно). При этом активность MMP-1 преобладала над MMP-2 по количеству расщепленного субстрата (Рисунок 23 Б).

Приведенные выше результаты убедительно демонстрируют, что исследование влияния уровня O_2 в локальном микроокружении на функции МСК важно для понимания их физиологии. В нашей работе мы сосредоточились на изучении свойств ВКМ. Поскольку

матрисом объединяет и структурные компоненты, накапливающиеся под монослоем клеток, и молекулы, функционирующие внутриклеточно, а также секретируемые в кондиционированную среду ферменты и цитокины, полногеномная оценка позволяет комплексно оценивать реакцию матрисома МСК на физиологическую гипоксию по уровню экспрессии соответствующих генов.

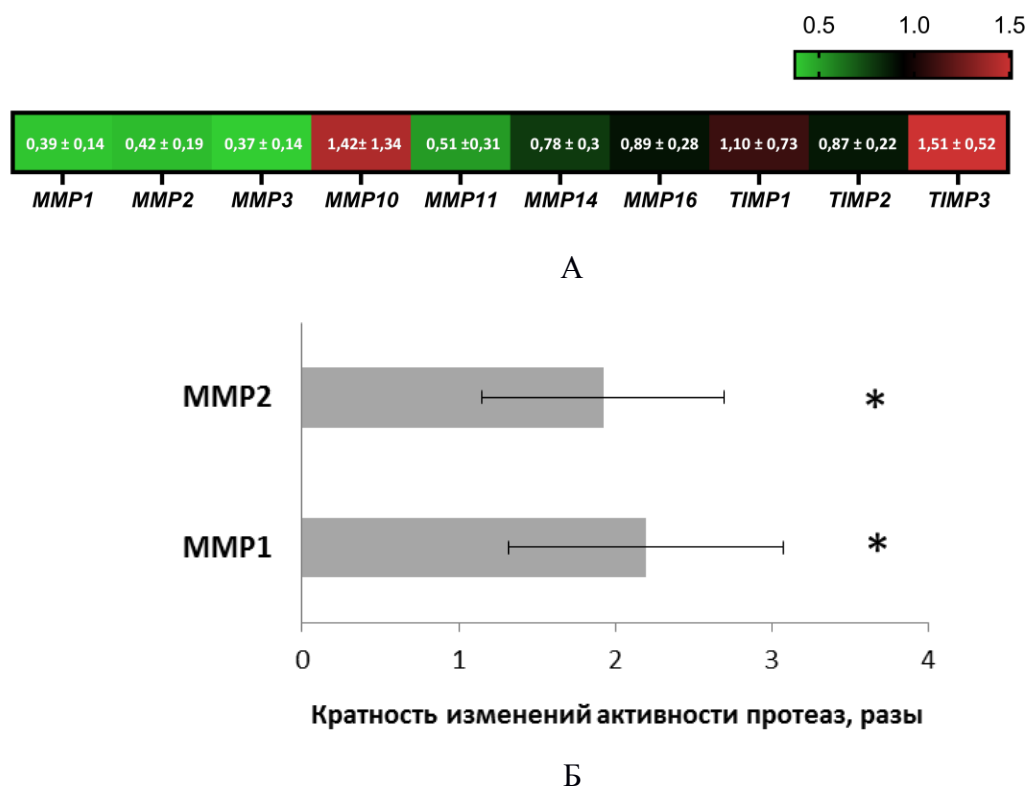


Рисунок 23. Характеристика продукции регуляторных молекул матрисома МСК: А) дифференциальная экспрессия генов, выявленная методом ОТ-ПЦР, матричных металлопротеиназ и их ингибиторов в МСК, культивируемых при 5% O₂ по сравнению с 20% O₂ (за единицу приняты значения экспрессии данных генов у МСК при 20% O₂); данные представлены как M ± SD, n=3; Б) активность матричных металлопротеиназ (MMP-1, MMP-2), секретируемых в кондиционированную МСК при 20% и 5% O₂ (за единицу приняты значения при 5% O₂); метод флуориметрического анализа; данные представлены как M ± SD, n=3. * – p < 0,05

Приведенные выше результаты убедительно демонстрируют, что исследование влияния уровня O₂ в локальном микроокружении на функции МСК важно для понимания их физиологии. В нашей работе мы сосредоточились на изучении свойств ВКМ. Поскольку матрисом объединяет и структурные компоненты, накапливающиеся под монослоем клеток, и молекулы, функционирующие внутриклеточно, а также секретируемые в кондиционированную среду ферменты и цитокины, полногеномная оценка позволяет комплексно оценивать реакцию матрисома МСК на физиологическую гипоксию по уровню экспрессии соответствующих генов.

Анализ МСК, выделенных из стромально-васкулярной фракции трех образцов жировой ткани человека, показал, что, помимо общих дифференциально экспрессированных генов

матрисома, присутствуют уникальные, которые могли определяться особенностями доноров и гетерогенностью популяций МСК. Вероятно, имеет место индивидуальная реакция МСК на физиологическую гипоксию, как на уровне активации сигнальных путей, так и на уровне регуляторных микроРНК. Подобные наблюдения по неоднородности МСК в культуре описаны в работах, где отмечено, что даже клетки от одного донора могут демонстрировать функциональную гетерогенность (включая скорость пролиферации, количество образующихся колоний, потенциал дифференцировки) при одинаковых условиях культивирования (Russell et al., 2010; Паюшина, Домарацкая, 2015).

Данные о процентном соотношении измененных генов позволили выявить общее направление изменения матрисома МСК в ответ на физиологическую гипоксию. Также удалось установить специфический профиль дифференциально экспрессированных генов матрисома, которые изменились сонаправлено у образцов МСК и могут быть маркерами ответа клеток на физиологическую гипоксию.

Среди коллагенов отмечено увеличение экспрессии генов, кодирующих альфа цепи коллагена VI типа (*COL6A2*, *COL6A3*), который действует как адгезионный белок, а также взаимодействует с другими компонентами ВКМ. Коллаген VI типа оказывает широкий спектр цитопротекторных эффектов, которые включают противодействие апоптозу и окислительному повреждению, регулирует аутофагию и дифференцировку, способствует поддержанию стволовости сателлитных клеток в мышечной ткани (Cescon et al., 2015). Его продукция клетками стромально-васкулярной фракции жировой ткани имеет практическое значение в репаративных процессах (McCulloch et al., 2015). Трансплантация в нокаутных мышей (*col6a1*^{-/-}) продемонстрировала потенциал МСК из жировой ткани, благодаря их способности секретировать и процессировать микрофибриллы коллагена VI типа, для их терапевтического применения при мышечных дистрофиях (Alexeev et al., 2014).

Для неколлагеновых белков отмечено снижение экспрессии генов гликопротеинов эластина (*ELN*) и матриклеточных белков, таких как олигомерный матриксный белок (*COMP*) и остеонектин (*SPARC*). Особенность последних заключается, в том что они имеют как внеклеточную функцию, взаимодействуя с другими компонентами ВКМ, рецепторами и связывая ионы кальция, так и внутриклеточную в качестве регуляторов уровня кальция в ЭПР и шаперонов для молекул ВКМ (Murphy-Ullrich, Sage, 2014). Снижение остеонектина при 5% O₂ было подтверждено на уровне гена с помощью ОТ-ПЦР и иммуноцитохимически. Остеонектин является одним из ключевых компонентов костной ткани и обладает высоким сродством к коллагену I типа и гидроксиапатитам (Termine et al., 1981). Известно, что кости мышей с дефектным геном остеонектина имеют меньшую прочность и минеральную плотность, а МСК, выделенные из их костного мозга, демонстрируют замедление остеодифференцировки и

склонность к адиподифференцировке (Rosset et al., 2016). Регуляция секреции остеоонектина МСК при физиологической гипоксии может являться одной из причин снижения остеокоммитирования МСК.

Среди других гликопротеинов отмечено увеличение экспрессии генов адгезионных белков фибулина 1 (*FBLN1*) и спондина (*SPON1*). Накопление в ВКМ лигандов, обеспечивающих взаимодействие с клетками, может способствовать направленной миграции клеток – гаптотаксису (Wen et al., 2015). Установлено усиление экспрессии генов *PLAU* и *CXCL12*, кодирующих промиграционные молекулы. Активатор плазминогена урокиназного типа секретируется различными типами клеток и активирует превращение плазминогена в плазмин во время миграции и инвазии клеток в физиологических и патологических условиях (Heissig et al., 2015). *CXCL-12* вовлечен в активацию и индукцию миграции различных типов клеток, в том числе стромальных (Dillenburg-Pilla et al., 2015; Liu et al., 2016). Показано, что эти молекулы являются HIF-зависимыми и их экспрессия и продукция усиливается при пониженных уровнях O_2 . В дополнение к гипоксия-зависимому усилению регуляции генов промиграционных молекул, в нашей работе отмечено увеличение общего клеточного белка при 5% O_2 . Учитывая меньший размер клеток, это подтверждает увеличение прироста МСК. Эти данные могут дать основания предположить, что в случае повреждения и депривации O_2 *in vivo*, эти клетки окажутся более «подготовленными» к реализации репаративных свойств, таких как миграция и пролиферация.

Мы отметили увеличение фибриллярности ВКМ под монослоем МСК, содержащихся при 5% O_2 по сравнению с 20% O_2 . Такое изменение характера упаковки может быть связано с изменениями среди ремоделирующих ферментов. Полногеномный анализ МСК при 5% O_2 идентифицировал увеличение экспрессии гена лизилоксидаза-подобного белка (*LOXL4*). Ранее было установлено, что в условиях острой гипоксии возрастает продукция лизилоксидазы (*LOX*) и лизилоксидаз-подобных ферментов (*LOXL-2* и *LOXL-4*). Эти белки обеспечивают образование поперечных сшивок между коллагеновыми волокнами, что обуславливает созревание коллагеновых фибрилл (Barker et al., 2012; Cox et al., 2013; Gilkes et al., 2014). Такие изменения коррелируют с увеличением выровненности фибрилл и жесткости ВКМ (Jean et al., 2011; Gilkes et al., 2014). Эти данные указывают на некоторые общие принципы O_2 -зависимой регуляции сшивающих коллагены ферментов. Однако стоит отметить, что при коротких гипоксических воздействиях, как правило, происходит увеличение продукции ВКМ и посттрансляционной модификации коллагена (HIF-1-регулируемая экспрессия пролилгидроксилаз (P4HA) и лизилгидроксилаз (PLOD)) в опухолевых и опухоле-ассоциированных стромальных клетках (Aro et al., 2012; Eisinger-Mathason et al., 2013; Gilkes et al., 2014; Kalluri et al., 2016). Тогда как в МСК при физиологической гипоксии не было

отмечено значительных изменений в тотальной продукции белков ВКМ по сравнению с 20% O₂.

Среди других регуляторных молекул матрисома, участвующих в ремоделировании ВКМ, наш интерес привлекли матриксные металлопротеиназы. MMP играют важную роль в репаративных процессах, создавая условия для продвижения клеток посредством расщепления плотной сети ВКМ (Bellay et al., 2009). Полногеномный анализ выявил в МСК при физиологической гипоксии разнонаправленное изменение транскрипции генов ремоделирующих молекул в зависимости от образца. При этом ПЦР анализ верифицировал снижение транскрипции матриксных металлопротеаз *MMP1*, *MMP2*, *MMP3* и увеличение экспрессии их ингибитора *TIMP3*. Острые гипоксические условия, индуцирующие фиброз в тканях, вызывают дисбаланс MMP/TIMP и коллагенов, что приводит к ограничению регенерации тканей (Zhou et al., 2021). В работе Deschene с коллегами использовали гипоксический миметик и выявили HIF-1-зависимое увеличение экспрессии гена коллагена 1 и снижение *MMP2*, что может объяснять сопутствующее острым гипоксическим состояниям в тканях развитие фиброзов (Deschene et al., 2012). Напротив, при ревматоидных воспалительных процессах в фибробластах синовиальной жидкости нарушается баланс ферментов с увеличением MMP (*MMP-1* и *MMP-3*), снижением их ингибитора (*TIMP-1*), что приводит к избыточной деградации ВКМ хрящевой и костной тканей (Cha et al., 2003). Активность MMP в кондиционированных средах отражает потенциал деградации ВКМ. В нашем исследовании было отмечено, что активность MMP-1 и MMP-2, определяемых в кондиционированной среде, была ниже для МСК при 5% O₂. С учетом отсутствия изменений в продукции про-коллагена 1 типа, можно предположить, что физиологическая гипоксия не способствует как профиброзным состояниям, так и избыточной деградации ВКМ. Снижение активности MMP может указывать на сохранение «состояния покоя» МСК при постоянном воздействии 5% O₂, тогда как 20% O₂ может провоцировать активацию МСК, в том числе запускаящую перестройку ВКМ.

Культивирование МСК при физиологической гипоксии привело к увеличению экспрессии матрисом-ассоциированных генов, кодирующих белки не со структурной, а регуляторной функцией. В МСК при физиологической гипоксии отмечено увеличение транскрипции гена *SERPINF1*, кодирующего фактор, полученный из пигментного эпителия (PEDF). Показано, что PEDF проявляет свои антиангиогенные эффекты за счет воздействия на эндотелиальные клетки (He et al., 2015). Сообщалось, что PEDF блокирует ядерную транслокацию HIF-1 и подавляет активность промотора VEGF в условиях гипоксии в эндотелиальных клетках капилляров сетчатки (Zhang et al., 2016). Воздействие PEDF активирует p38 для противодействия миграции эндотелиальных клеток, стимулируемой FGF-2 (Konson et al., 2011). Было продемонстрировано, что PEDF подавляет экспрессию и активность MMP-2/9 в сетчатке с выраженной

неоваскуляризацией, а также экспрессию *PAI1* у HUVEC (Haurigot et al., 2012; Matsui et al., 2013). Эти данные подчеркивают сложность гипоксия-зависимой регуляции процессов, в частности прорастание сосудов. На примере супрессии ангиогенеза в сетчатке продемонстрировано, что возможна тканеспецифичная реакция на снижение уровня O_2 в микроокружении.

Регуляторная активность мидкина, экспрессия гена (*MDK*) которого увеличивалась при 5% O_2 , обеспечивается взаимодействием с рецепторами, в частности протеогликановыми, на клеточной поверхности (Zhao et al., 2014). Показано его влияние на процессы, обеспечивающие регенерацию тканей, такие как адгезия, миграция, пролиферация, дифференцировка, выживание клеток, воспалительный ответ. Также мидкин способствует росту и самообновлению мышинных эмбриональных стволовых клеток (Yao et al., 2010).

Кроме того показано, что PEDF защищает перicytes от апоптоза, вызванного высоким содержанием глюкозы и H_2O_2 , благодаря своей антиоксидантной и противовоспалительной активности (Yamagishi et al., 2002; Amano et al., 2005). Аналогично увеличивается экспрессия гена гликопротеина *SRPX*. Биоинформатический анализ показывает, что белок *SRPX* относится к семейству пероксиредоксинов, которые контролируют уровни перекиси, индуцированные воздействием цитокинов, в клетках млекопитающих (Pawłowski et al., 2010). Мидкин проявляет цитопротекторную активность в раковых клетках за счет усиления экспрессии антиапоптотического фактора Bcl-2 и ингибирует каспазо-зависимое повреждение клеток за счет ингибирования c-Jun N-концевой киназы (JNK) в культивируемых нейронах (Owada et al., 1999). В работе Zhao et al., сверхэкспрессия мидкина в МСК частично предотвращала индуцированный гипоксией апоптоз и увеличивала жизнеспособность клеток. А также такие МСК оказывали цитопротекторные свойства на экспонированные в аноксии кардиомиобласты, за счет усиленной продукции CXCL-12, VEGF и TGF- β (Zhao et al., 2014).

Острые гипоксические состояния рассматриваются как медиаторы апоптоза в связи с избыточной выработкой активных форм кислорода (АФК) клетками в этих условиях (Robey et al., 2008). Избыток АФК в клетках повреждает мембрану, ДНК и белки, приводя к изменению или потере функций клеток, ингибированию пролиферации и индукции апоптоза (Dröge, 2002). Напротив, низкие уровни АФК необходимы для пролиферации и дифференцировки клеток. В нашем исследовании мы отметили, что культивирование МСК при физиологической гипоксии увеличивает экспрессию генов, кодируемые молекулы которых обладают цитопротекторной и антиоксидантной функцией, что свидетельствует о вовлеченности компонентов матрисома в регуляцию клеточного ответа на уровень O_2 и его метаболитов (АФК). Кроме того в двух из трех образцов МСК отмечено уменьшение экспрессии *GDF15* при физиологической гипоксии. *GDF-15* секретируется в различных типах клеток, действует как плейотропный цитокин и

участвует в ответе клеток на стресс после клеточного повреждения (Park et al., 2016; Asundi et al., 2023). Повышенные уровни белка связаны с патологическими состояниями, такими как тканевая гипоксия, воспаление, острая травма и окислительный стресс. Можно рассматривать это в качестве аргумента тому, что постоянное культивирование при уровне O_2 , близком к тканевому, не является стрессом для МСК, в отличие от коротких гипоксических экспозиций.

Таким образом, с помощью полногеномного анализа охарактеризованы паттерны изменения в составе ВКМ при 5% O_2 . Культивирование МСК при физиологической гипоксии, способствует накоплению ВКМ без значительных изменений в общей продукции белков ВКМ. При этом меняется характер упаковки белков и активность ММП.

3.2. Характеристика структурных особенностей и белкового состава матрикса, полученного после децеллюляризации

Следующий этап исследования заключался в получении децеллюляризованных препаратов, оценке структурных особенностей и белкового состава ВКМ, полученного от МСК при 20% или 5% O_2 .

3.2.1. Морфологическая характеристика препаратов децеллюляризованного внеклеточного матрикса

В настоящее время в большинстве работ, связанных с децеллюляризацией ВКМ стромальных клеток, используется сочетание щелочного агента гидроксида аммония с детергентом Triton X-100, действие которых направлено на лизис клеточной и ядерной мембраны, а также белковых и нуклеиновых компонентов (Rao Pattabhi et al., 2014; Xing et al., 2015; Kusuma et al., 2017). Ранее в нашей лаборатории также были проведены исследования по подбору оптимальных протоколов получения децеллюляризованных препаратов из монослоя МСК (Матвеева и др., 2018). Нами был выбран в качестве лизирующего клетки агента изотонический раствор 0,5% TritonX100 в сочетании с 20 mM NH_4OH (5 минут при 37 °C). Этот метод является наиболее эффективным и воспроизводимым. После инкубации и отмывки препараты контролировались на отсутствие мембранных и ядерных остатков с помощью фазово-контрастной микроскопии. В результате были получены децеллюляризованные препараты ВКМ от МСК, культивируемых при 20% или 5% O_2 , далее дцВКМ-Нор и дцВК-Гип, соответственно (Рисунок 24 А).

Для идентификации компонентов ВКМ, сохранившихся после децеллюляризации, использовали гистологические и иммуноцитохимические методики (Рисунок 24 Б). С помощью красителя Sirius Red подтверждено сохранение густой сети коллагеновых белков и

фибронектина после децеллюляризации. Уровень O_2 , при котором культивировали МСК, на структуру, морфологию и накопление фибронектина значительно не повлиял.

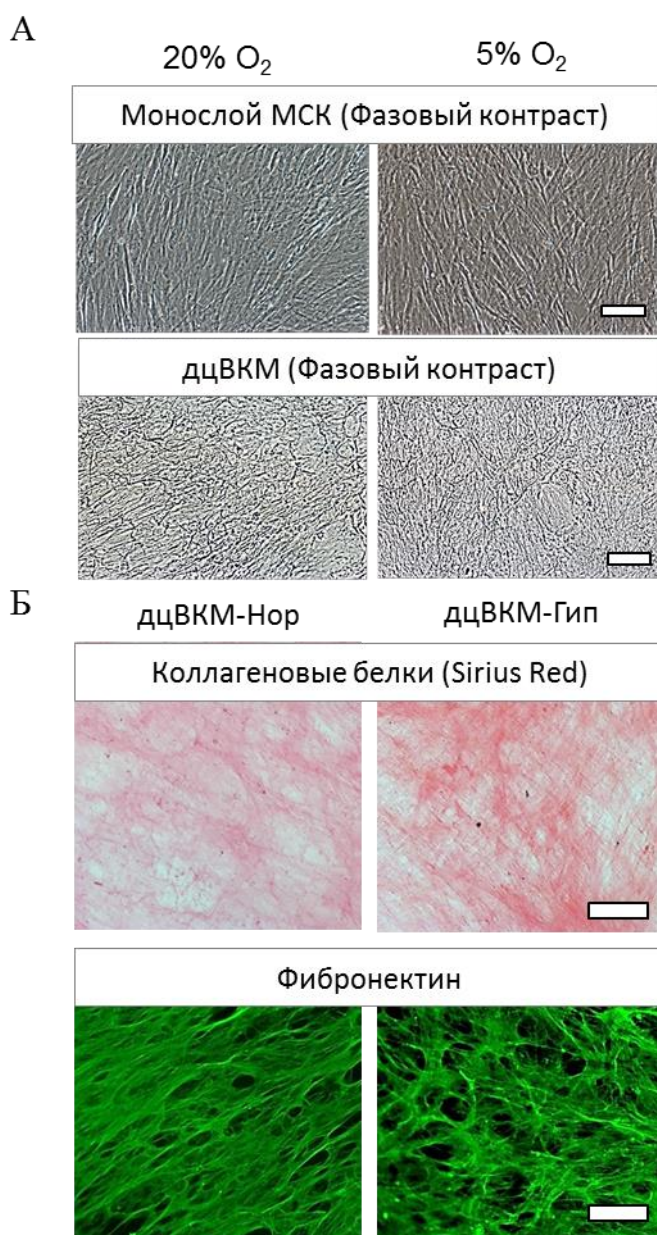


Рисунок 24. Децеллюляризованный ВКМ, полученный от МСК при 20% (дцВКМ-Нор) или 5% (дцВКМ-Гип) O_2 : А) получение препаратов дцВКМ с помощью обработки монослоя МСК децеллюляризирующим агентом. Фазовый контраст. Репрезантативные микрофотографии. Масштабный отрезок — 100мкм; Б) гистохимическое и иммуноцитохимическое выявление коллагеновых белков и фибронектина, соответственно. Репрезентативные микрофотографии. Масштабный отрезок – 50 мкм.

Далее с помощью конфокальной и сканирующей электронной микроскопии изучали ультраструктуру децеллюляризованных препаратов. Некоторые молекулы ВКМ, такие как коллагены и эластин, при фиксации альдегидами обладают автофлуоресценцией при длине волны 488 нм (Monici, 2005). Поэтому с помощью конфокальной микроскопии изучили строение тотального слоя дцВКМ без разделения на компоненты.

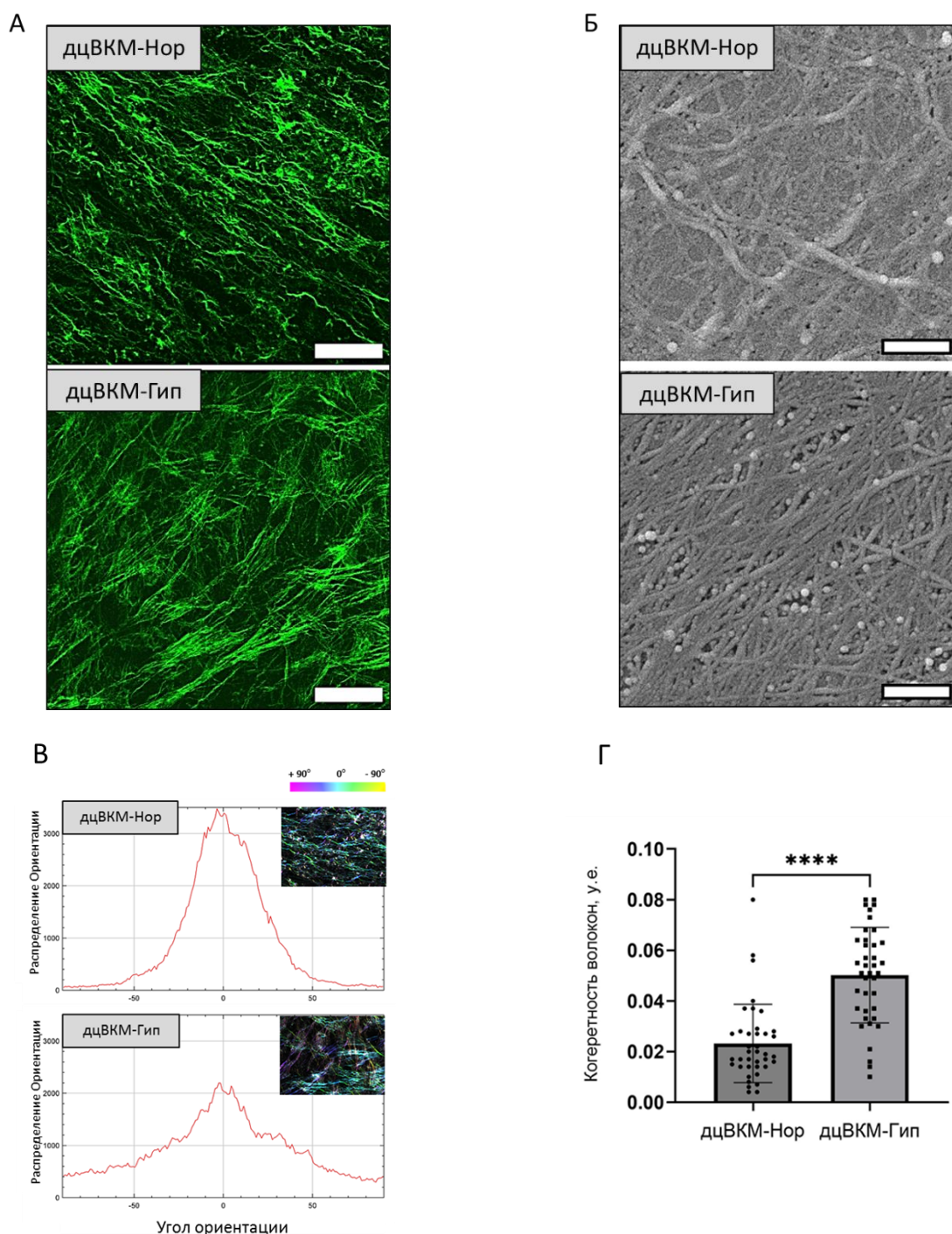


Рисунок 25. Структура дцВКМ, продуцируемого МСК при 20 % (дцВКМ-Нор) или 5 % (дцВКМ-Гип) O₂. А) лазерно-сканирующая конфокальная микроскопия (LSM 780, Carl Zeiss), автофлуоресценция дцВКМ при 488 нм, Масштабный отрезок - 50 мкм; Б) сканирующая электронная микроскопия (CamSnanZ2), масштабный отрезок - 500 нм; В) угловое распределение направлений фибрилл, вставки - карты оттенка, насыщенности и яркости (HSB), созданные с помощью плагина OrientationJ; Г) анализ когерентности дцВКМ. Данные представлены как $M \pm SD$, **** $p < 0,0001$ (n = 6).

Это позволило оценить структуру волокон и их пересечений в сети дцВКМ. Были выявлены различия в характере упаковки: в дцВКМ-Нор волокна ВКМ формировали плотную сеть из изогнутых фибрилл, в дцВКМ-Гип волокна образовывали островки из пересеченных

выровненных фибрилл с более выраженными промежутками между ними. Анализ с помощью СЭМ подтвердил эти наблюдения. Поскольку СЭМ визуализирует волокна на большом разрешении до нескольких нанометров, нам удалось подробнее изучить их ультраструктуру. Действительно, в дцВКМ-Норм мы наблюдали мембраноподобные структуры перекрещенных извилистых фибрилл разного размера. Тогда как дцВКМ-Гип был представлен равномерно выровненными коаксиальными фибриллами, собранными в решетчатые структуры (Рисунок 25 А, Б).

Целью количественного анализа ориентации волокон ВКМ было охарактеризовать угол ориентации (т.е. отклонение волокна от горизонтального направления) и изотропные свойства ВКМ. Черно-белые конфокальные изображения были проанализированы в плагине OrientationJ программы FIJI, с помощью которого волокна принимали цвет (карты оттенка, насыщенности и яркости (HSB)) так, чтобы оттенок пикселя соответствовал углу ориентации локального волокна, который мог варьироваться от -90° до $+90^\circ$ относительно горизонтали (Рисунок 25 В). Предварительное выравнивание по горизонтали определило доминантную ориентацию фибрилл на 0° . График распределения ориентации показывает, что волокна в дцВКМ-Гип имеют разнонаправленное отклонение от доминантного направления, что указывает на большее число пересечений фибрилл, чем у дцВКМ-Норм. Нами было установлено достоверное увеличение когерентности волокон дцВКМ-Гип (Рисунок 25 Г) ($p < 0,0001$). Значение когерентности указывает степень ориентации волокон от 0 до 1. Если угловое отклонение фибрилл изменяется от 90° в любом направлении, когерентность увеличивается.

Такие различия в плотности и выровненности волокон, вероятно, определяются свойствами ВКМ, определяемыми составом как структурных, так и регуляторных компонентов. Поэтому следующим этапом работы был масс-спектрометрический анализ белков, содержащихся в дцВКМ.

3.2.2. Протеомный профиль экстрактов децеллюляризованных матриц

Существует несколько методик по экстракции белков ВКМ из децеллюляризованных препаратов. Принципиальное разделение заключается в получении растворимой и нерастворимой фракций. Первая объединяет аморфные компоненты высокой молекулярной массы (такие белки как фибронектин, ламинин, и тд.), и выделяется с помощью мочевины. Экстракция с помощью пепсина в сочетании с HCl позволяет растворять белки с молекулярной массой сходной с коллагенами. В работе Лин с коллегами исследовали регуляторную активность обеих фракций, покрывая ими культуральный пластик. Было установлено, что именно растворимые компоненты дцВКМ имеют наиболее выраженные биоактивные эффекты

на МСК. Продemonстрировано усиление пролиферации, адгезии, миграции, и дифференцировки в остео- и адипонаправлениях (Lin et al., 2012).

Нами были получены экстракты растворимых в мочеvine белков дцВКМ-Норм/дцВКМ-Гип. В образцах с помощью масс-спектрометрического анализа было идентифицировано 89 белков, имеющих отношение к функционированию ВКМ. 80% белков было представлено как в пробах дцВКМ-Норм, так и дцВКМ-Гип. Кроме того выявлены уникальные протеины в каждой из перечисленных групп (8 и 9, соответственно). На Рисунок 26 представлена диаграмма Венна, характеризующая распределение белков в образцах дцВКМ.

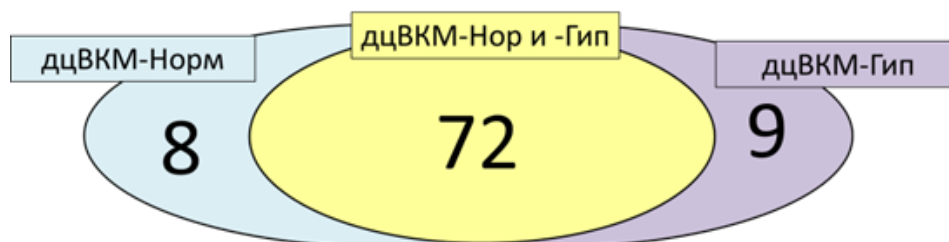


Рисунок 26. Диаграмма Венна. Распределение белков матрисома, представленных в образцах экстрактов дцВКМ от МСК, культивируемых при 20% или 5% O₂. Белки идентифицированы на основе аннотации UniProtKB и базы данных MatrisomeDB.

Соотношение белков, относящихся к основному матрисому и матрисом-ассоциированным компонентам, составило 65% и 35%, соответственно. Установлено, что среди детектируемых во всех образцах дцВКМ наибольшее число белков приходится на гликопротеины (40%) и регуляторные молекулы (16%) (Таблица 4). Среди уникальных для дцВКМ-Норм обнаружено 2 гликопротеина, 4 регуляторные молекулы, и по 1 в группах секретируемых и ВКМ-аффилированных молекул. Уникальные для дцВКМ-Гип молекулы относились к коллагенам (3), гликопротеинам (4) и регуляторам (2).

Таблица 4. Количественное распределение идентифицированных масс-спектрометрически белков в экстрактах дцВКМ-Норм и дцВКМ-Гип по группам матрисома.

Группы матрисома	Компоненты матрисома	5% vs 20% O ₂			20% O ₂ уникальные	5% O ₂ уникальные
		↑	=	↓		
	ВСЕГО	11	37	24	8	9
Основной матрисом	коллагены	1	5	3	0	3
	гликопротеины	2	18	9	2	4
	протеогликаны	3	5	1	0	0
Матрисом-ассоциированные белки	регуляторные	1	7	8	4	2
	секретируемые	2	0	2	1	0
	аффилированные	2	2	1	1	0

Для дальнейшего анализа мы объединили детектируемые белки в 3 группы:

- 1) белки, относительное содержание которых не различалось в группах дцВКМ-Нор и дцВКМ-Гип (Таблица 5);
- 2) белки, относительное содержание которых было более чем 1,5 раза меньше в дцВКМ-Гип, а также уникальные для дцВКМ-Нор (Таблица 6);
- 3) белки, относительное содержание которых было более чем 1,5 раза больше в дцВКМ-Гип, а также уникальные для дцВКМ-Гип (Таблица 7).

Таблица 5. Белки, относительное содержание которых не различалось в группах дцВКМ-Нор и дцВКМ-Гип.

Группа матрисома	Символ	Название белка
коллаген	CO1A1	коллаген 1 типа альфа1
коллаген	CO1A2	коллаген 1 типа альфа2
коллаген	CO6A2	коллаген 6 типа альфа2
коллаген	CO6A3	коллаген 6 типа альфа3
коллаген	CO12A1	коллаген 12 типа альфа1
гликопротеин	ELN	эластин
гликопротеин	FN1	фибронектин
гликопротеин	TENA	тенасцин-а
гликопротеин	TENX	тенасцин-х
гликопротеин	FBLN1	фибулин 1
гликопротеин	FBLN3	EGF-содержащий фибулин-подобный белок 1
гликопротеин	FBLN4	EGF-содержащий фибулин-подобный белок 2
гликопротеин	FBN1	фибриллин-1
гликопротеин	SPON1	спондин
гликопротеин	ECM1	белов матрикса 1
гликопротеин	MXRA5	белок, ассоциированный с ремоделированием ВКМ
гликопротеин	AEBP1	белок1 , связывающий энхансер адипоцитов
гликопротеин	LTBP2	белок 2, связывающий латентный TGFb
гликопротеин	ALB	сывороточный альбумин
гликопротеин	PCOC1	энхансер С-эндопептидазы проколлагена 1
гликопротеин	POSTN	периостин
гликопротеин	THBS1	тромбоспондин-1
протеогликан	LUM	люмикан
протеогликан	DCN	декорин
протеогликан	VCAN	версикан
протеогликан	HSPG2	перлекан
протеогликан	PRELP	проларгин
регуляторный	HTRA3	сериновая протеаза
регуляторный	SERPINH1	серпин Н1 (белок теплового шока 47)
регуляторный	LOX	лизин-6-оксидаза
регуляторный	LOXL1	гомолог лизилоксидазы 1
регуляторный	LOXL2	гомолог лизилоксидазы 2
регуляторный	CTHRC1	белок, содержащий альфа цепи коллагена 1
регуляторный	F13A1	коагуляционный фактор XIII А
ВКМ-аффил.	LGALS1	галектин1
ВКМ-аффил.	LGALS3	галектин3

Молекулы в каждой группе оценивали с точки зрения их принадлежности к биологическим процессам по базе данных GO (<http://geneontology.org/>). Также оценивали их белок-белковые взаимодействия и принадлежность к реакционным путям (на основании базы данных <https://string-db.org/>).

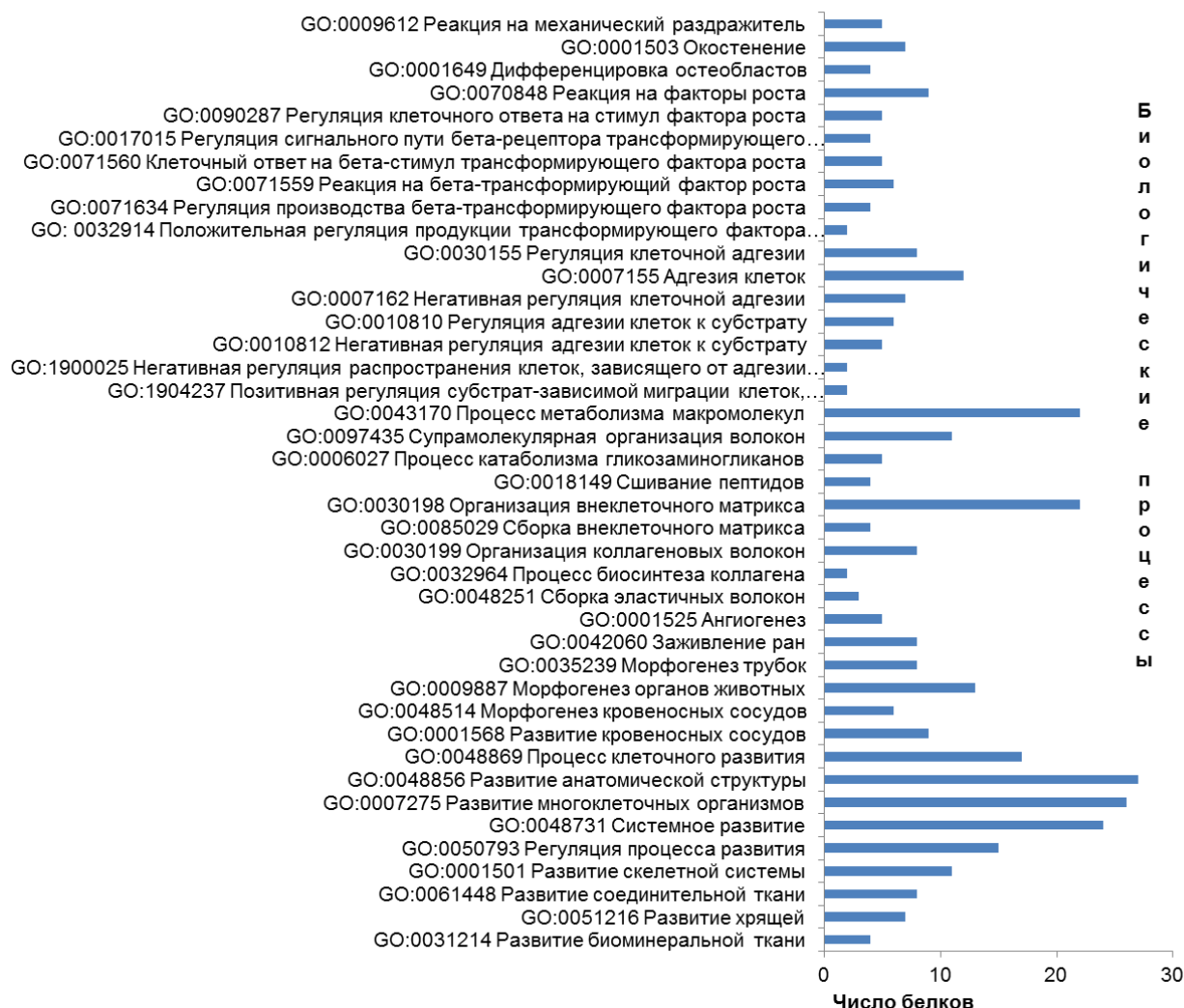


Рисунок 27. Характеристика белков, относительное содержание которых не различалось в группах дцВКМ-Нор и дцВКМ-Гип. Насыщение групп по функциональной принадлежности к биологическим процессам согласно <http://geneontology.org/>.

Среди белков, представленность которых не различалась в образцах дцВКМ-Нор и дцВКМ-Гип (Рисунок 27), преобладающее число участвует в организации ВКМ или в метаболизме макромолекул. Например, отмечены белки, вовлеченные в организацию коллагеновых волокон (COL1A1, COL12A1, LOX, LOXL2, LUM, SERPINH1) и метаболизм коллагенов (COL1A1, SERPINH1, TEXB), организацию эластиновых волокон (ELN1, TNXB, LOX) и супрамолекулярных фибрилл в целом (COL1A1, COL12A1, LUM, EFEMP2, LTBP2, LOX, LOX2, SERPINH1, ELN, TNXB).

Стоит отметить участие большинства детектируемых белков в таких процессах, как адгезия (COL6A1, COL12A1, FN1, SPON1, FBN1, TNXB, TNC, POSTN, VCAN) и регуляция адгезии (COL1A1, FBLN1, POSTN, THBS1), в том числе негативное воздействие на взаимодействие клетка-ВКМ (TNC, LGALS1, LGALS3), клеточная миграция (COL1A1, FN1, THBS1, CTHRC1, VCAN, LOX, LOXL2, LGALS3) и ее регуляция (COL1A1, FN1, FBLN1, THBS1, LGALS1). Представлены молекулы, участвующие в ангиогенезе и морфогенезе сосудов (FN1, ECM1, THBS1, HSPG2, LOX, LOXL2, COL1A1, COL1A2).

Среди детектируемых белков матрисома аннотирована функциональная группа, участвующая в процессах дифференцировки стромальных клеток и образования хрящевой и костной тканей. Например, белки, участвующие в развитии хряща (COL1A1, LUM), хондроцитов (COL6A2, COL6A3, COL12A1, SERPINH1), а также в дифференцировке остеобластов (COL1A1, TNC, VCAN, LOX), оксификации (COL1A1, COL1A2, ECM, VCAN, TNC, CTHRC1, LOX) и биоминерализации тканей (COL1A1, COL1A2, ECM1, LOX).

Среди 37 идентифицированных белков отмечена функциональная группа, вовлеченная в регуляцию ответа на факторы роста: стимуляция клеточного ответа (LTBP2, FBN1, POSTN, COL1A1) и негативная регуляция (FBN1, DCN, THBS1, HTRA3). Отмечены молекулы, участвующие в передаче сигнала (THBS1, FBN1, HTRA3, LOX) и клеточном ответе (COL1A1, FBN1, MXRA5, POSTN, LTBP2) на TGF- β , в позитивной (THBS1, LUM) и негативной регуляции (FN1, FBLN1) его продукции клетками.

На следующем этапе была проанализирована группа белков, относительное содержание которых было более чем 1,5 раза меньше в дцВКМ-Гип, а также уникальные для дцВКМ-Нор (Таблица 6). С помощью визуализации интерактивной сети белок-белковых взаимоотношений и анализа основных реактозных путей можно выделить 4 кластера белков представленных на Рисунке 28.

Первый кластер представлен коллагеновыми белками (COL3A1, COL5A1, COL6A1, COL16A1), которые задействованы в образовании волокон, а также участвуют во взаимодействии с различными клеточными рецепторами (интегринами, синдеканами, кадгеринами) и сигналинге PDGF. 2-ой кластер образован молекулами, по большей части гликопротеинами, ответственными за формировании эластиновых волокон (MFAP5, FBLN5, FBLN2, VTN, LTBP1, EMILIN1, LOXL4). 3-ий кластер белков объединяет VTN, SERPINE1, SERPINE2, SERPINC1, F5, TIMP3, участвующие в поддержании гомеостаза, регуляции образования фибринового сгустка и дегрануляции тромбоцитов. И 4-ый кластер включает молекулы GPS6, THSD4, ADAMTSL1, ADAMTSL4, вовлеченные в патологии гликозилирования, при которых происходит нарушения метаболизма ГАГ и гликолипидов. При

этом 3 белка из 4-го кластера являются уникальными для дцВКМ-Нор: GPS6, ADAMTSL1, ADAMTSL4.

15 белков из группы со сниженным содержанием при 5% O₂ ответственны за организацию ВКМ (COL3A1, COL5A1, COL6A1, SPARC, FBLN2, LTBP1, EMILIN1, VTN, MFAP1, MFAP5, SERPINE1, LOXL4, CTSK), в том числе коллагеновых (COL3A1, COL5A1, LOXL4) и эластиновых (FBLN5, EMILIN1, MFAP5, THSD4) фибрилл.

Большинство детектируемых коллагенов и гликопротеинов участвуют в адгезии клетка-ВКМ (COL3A1, COL16A1, FBLN5, VTN, EMILIN1) и ее регуляции (COL15A1, COL16A1, EMILIN1, VTN, FBLN2, SERPINE1, SERPINE2, TGM2). Установлено функционирование белков в регуляции клеточной миграции (COL3A1, EMILIN1, SPARC, IGFBP3, SERPINE1, SULF1, SEMA7A), в том числе гладкомышечных клеток (VTN, IGFBP3, SERPINE1). Для белков со сниженным относительным содержанием в ВКМ МСК при 5% O₂ отмечена функциональная принадлежность к процессам оссификации (COL5A1, COL6A1, SPARC, IGFBP3, CTSK, SEMA7A) и негативной регуляции ангиогенеза (SPARC, FBLN5, EMILIN1, SULF1, SERPINE1).

Таблица 6. Белки, относительное содержание которых было более чем 1,5 раза меньше в дцВКМ-Гип, а также уникальные для дцВКМ-Нор.

Группа матрисома	Символ	Название белка
коллаген	CO3A1	коллаген 3 типа альфа1
коллаген	CO5A2	коллаген 5 типа альфа1
коллаген	CO6A1	коллаген 6 типа альфа1
коллаген	COGA1	коллаген 16 типа альфа1
гликопротеин	FBLN2	фибулин 2
гликопротеин	LTBP1	белок 1, связывающий латентный TGFβ
гликопротеин	FNDC1	белок 1, содержащий домен фибронектина 3
гликопротеин	EMIL1	эмилилин-1
гликопротеин	VTNC	витронектин
гликопротеин	IBP3	белок 3, связывающий IGF
гликопротеин	FBLN5	фибулин-5
гликопротеин	SPRC	остеонектин
гликопротеин	MFAP1	белок, ассоциированный с микрофибриллами 1
гликопротеин	MFAP5	белок, ассоциированный с микрофибриллами 5
протеогликан	MAMC2	белок 2, содержащий МАМ-домен
регуляторный	NEP	неприлизин (ММЕ)
регуляторный	PAI1	ингибитор активатора плазминогена 1
регуляторный	GDN	нексин, полученный из глии
регуляторный	FA5	фактор коагуляции 5
регуляторный	CATK	катепсин К
регуляторный	TIMP3	ингибитор металлопротеиназ 3
регуляторный	ANT3	антитромбин-3
секретируемый	GDF15	фактор роста/дифференцировки 15
секретируемый	GREM2	гремлин-2
ВКМ-аффил.	GPC6	глипикан-6

Выявлен кластер белков (SERPINE1, SERPINE2, SERPINC1, VTN, F5, TIMP3), вовлеченных в регуляцию свертывания крови, дегрануляции тромбоцитов и негативную регуляцию плазминогена и эндопептидаз. Для идентифицированных белков (VTN, LTBP1, GREM2, EMILIN1, SULF1) отмечено участие в клеточном ответе на воздействие факторов роста. LTBP1, GREM2 в том числе секвестрируют цитокины семейства TGF- β , сохраняя их в латентном состоянии и ограничивая их связь с рецепторами.

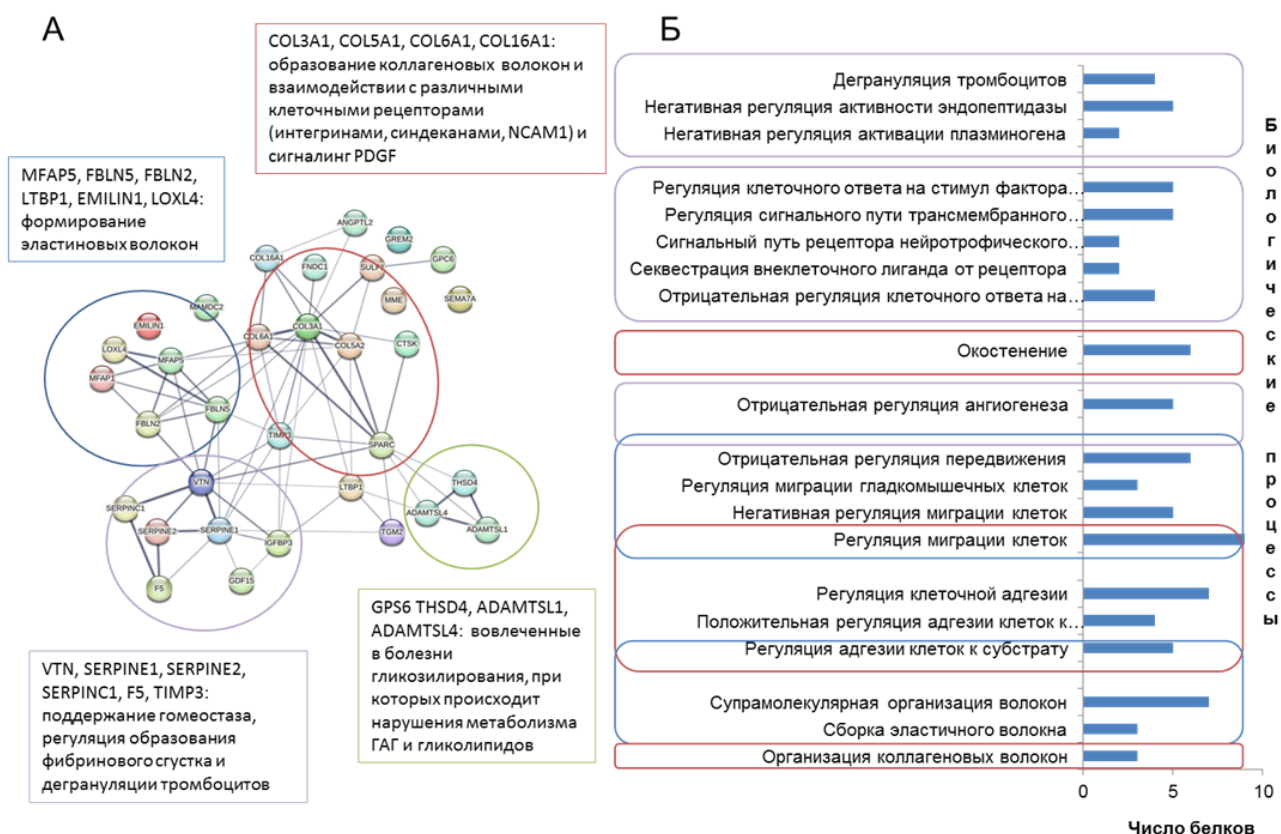


Рисунок 28. Характеристика белков, относительное содержание которых было снижено в дцВКМ-Гип по сравнению с дцВКМ-Нор, или уникальных для дцВКМ-Нор: А) интерактивная сеть белок-белковых взаимосвязей среди молекул, детектируемых масс-спектрометрически (<https://string-db.org/>); Б) насыщение групп по функциональной принадлежности к биологическим процессам согласно <http://geneontology.org/>.

Анализ белок-белковых взаимоотношений молекул, относительное содержание которых было увеличено в дцВКМ-Гип по сравнению с дцВКМ-Нор (Таблица 7), позволил выделить 3 кластера белков с сильными связями, представленными на Рисунок 29. Они образовывались группой коллагеновых белков (коллагены 5, 12, 14, 15, 16 типов), протеогликанов (BGN, FMOD, NAPLN1, CILP), а также группой секретируемых и ВКМ-аффилированных молекул (FGF2, CTGF, GREM1, SRPX2).

Наибольшее число белков, уровень которых был увеличен в дцВКМ-Гип, аннотированы по функциональной принадлежности к организации ВКМ (12), развитию (10) и морфогенезу (9) тканей. Большинство детектируемых белков данной группы участвует в клеточной адгезии (COL5A1, COL12A1, COL14A1, COL15A1, THBS4, FBLN5, NPNT, HAPLN1, CTGF, SRPX2), организации (COL5A1, COL12A1, COL14A1, FMOD, ADAMTS3, P4HA1, GREM1) и метаболизме (COL5A1, COL15A1, ADAMTS3) коллагеновых волокон.

Интересно, что большое количество белков, которыми обогащены экстракты дцВКМ-Гип, участвуют в регуляции пролиферации клеточных популяций (GREM1, FGF2, CTGF, IGFBP5, TGM2, THBS4, FBLN5), в том числе гладкомышечных клеток (FGF2, IGFBP5, TGM2). Отмечена роль в ангиогенезе (COL14A1, GREM1, FGF2, CTGF, SRPX2) и его регуляции (THBS2, THBS4, FBLN5), а также развитии кровеносных сосудов (COL5A1, COL15A1, GREM1, FGF2, CTGF, SRPX2).

Таблица 7. Белки, относительное содержание которых было более чем 1,5 раза больше в дцВКМ-Гип, а также уникальные для дцВКМ-Нор.

Группа матрисома	Символ	Название белка
коллаген	COL5A1	коллаген 5 типа альфа 1
коллаген	COL12A1	коллаген 12 типа альфа 1
коллаген	COL14A1	коллаген 14 типа альфа 1
коллаген	COL15A1	коллаген 15 типа альфа 1
коллаген	COL23A1	коллаген 23 типа альфа 1
гликопротеин	THBS2	тромбоспондин-2
гликопротеин	NPNT	нефронектин
гликопротеин	IGFBP5	белок 5, связывающий инсулиноподобный фактор роста
гликопротеин	CILP	белок, промежуточного слоя хряща
гликопротеин	THBS4	тромбоспондин-4
гликопротеин	FBLN5	фибулин-5
протеогликан	BGN	бигликан
протеогликан	FMOD	фибромодули
протеогликан	HAPLN1	гиалуронан и протеогликан связывающий белок 1
регуляторный	P4HA1	пролил-4-гидроксилаза альфа 1
регуляторный	TGM2	транс-глутаминаза 2
регуляторный	ADAMTS3	дисинтегриновая металлопротеиназа с тромбомпондиновым доменом
секретируемый	CTGF	фактор роста соединительной ткани
секретируемый	FGF2	фактор роста фибробластов 2
ВКМ-аффил.	GREM1	гремлин-1
ВКМ-аффил.	SRPX2	белок 2 с повторами sushi

Среди белков с увеличенной экспрессией при 5% O₂ детектированы молекулы, участвующие в морфогенезе (COL5A1, COL12A1, COL15A1, GREM1, FGF2, IGFBP5, NPNT, TGM2) и ремоделировании (IGFBP5, BGN, THBS4, TGM2) тканей. Особый интерес представляет увеличенное количество белков, вовлеченных в процессы образования и организации структур хондроцитов в пластинке роста хряща (COL12A1, COL14A1) и его

развития (COL12A1, COL14A1, BGN, CTGF, FGF2). Установлено насыщение дцВКМ-Гип протеогликанами, такими как бигликан и фибромодулин, ответственными за формирование коллагеновых волокон, в том числе в хрящевой ткани.

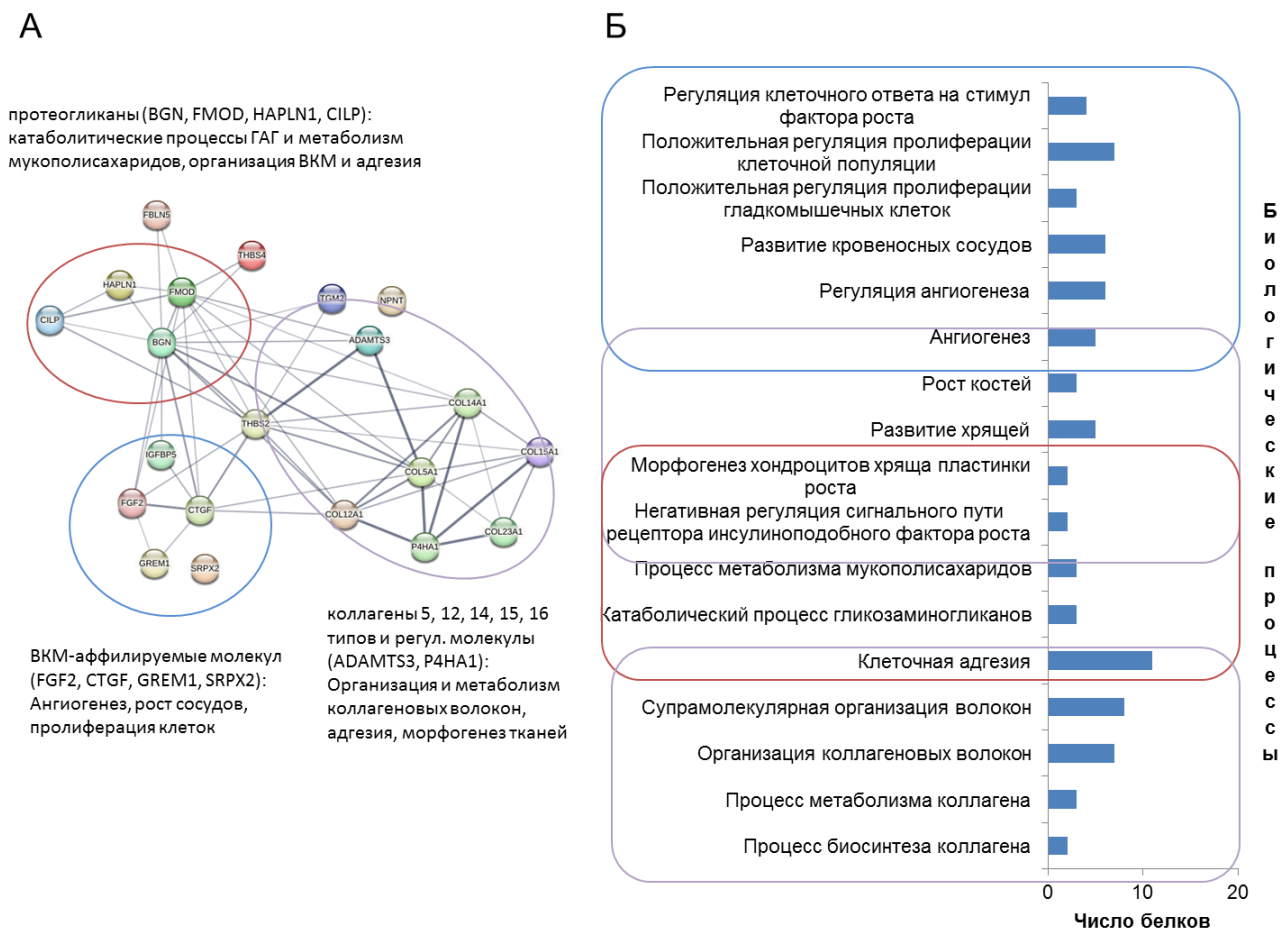


Рисунок 29. Характеристика белков, относительное содержание которых было увеличено в дцВКМ-Гип по сравнению с дцВКМ-Нор, или уникальных для дцВКМ-Гип: А) интерактивная сеть белок-белковых взаимосвязей среди молекул, детектируемых масс-спектрометрически (<https://string-db.org/>); Б) насыщение групп по функциональной принадлежности к биологическим процессам согласно <http://geneontology.org/>.

Далее были проанализированы 2 группы белков с повышенным накоплением или уникальных для дцВКМ-Нор или дцВКМ-Гип, с точки зрения их распространения в тканях (Рисунок 30; на основании базы данных Tissue expression database). Большая часть из них в каждой группе относилась к тканеспецифичным для плаценты, соединительной ткани и скелетной системы.

Но при этом интересно, что ВКМ, продуцируемый МСК при 20% O₂, обогащен белками COL3A1, COL5A1, COL6A1, SPARC, CTSK специфичными для кожи, фибробластов и костной ткани. При этом ВКМ, продуцируемый МСК при 5% O₂, насыщен специфичными белками для хондроцитов и хрящевой ткани, а также плодных оболочек и эмбриональных структур. К ним относятся HAPLN1, CTGF, CILP, GREM1. Для уникальных для дцВКМ-Гип гликопротеинов

IGFBP5 и CLIP аннотирована негативная регуляция передачи сигналов через рецептор инсулиноподобного фактора роста, который влияет на пролиферацию хондроцитов.

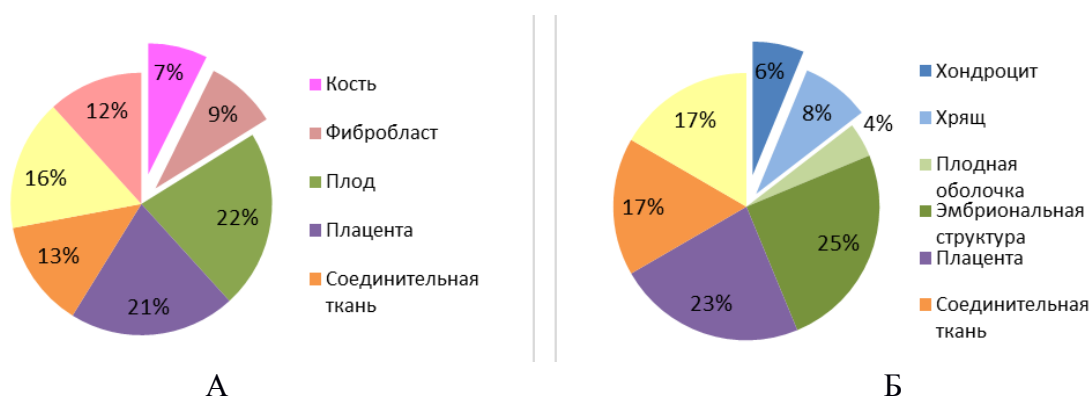


Рисунок 30. Распределение белков матрисома по представленности в тканях (Tissue expression database): А) группа белков, уровни которых были увеличены или уникальные в дцВКМ-Нор; Б) группа белков, уровни которых были увеличены или уникальные в дцВКМ-Гип.

3.2.3. Анализ факторов роста, депонированных в децеллюляризованном матриксе

С помощью протеомного анализа в экстрактах дцВКМ-Гип было идентифицировано повышенное содержание факторов роста, таких как FGF-2 и CTGF (Рисунок 31 А). Также мы оценили некоторые факторы роста, которые могут быть связаны с молекулами ВКМ, с помощью иммуоферментного анализа. Нами были выбраны TGF- β и VEGF, которые являются факторами роста и участвуют в реализации трофических и репаративных свойств МСК (Hofer, Tuan, 2016; Miceli et al., 2021).

Концентрацию целевых молекул нормировали на общий белок в экстракте дцВКМ. Далее производили попарное сравнение в экстрактах дцВКМ для каждого эксперимента с использованием t-критерия Вилкоксона. Использование такого подхода было необходимо, чтобы избежать больших разбросов концентраций тотальных белков ВКМ в биологических повторях.

Было выявлено достоверное снижение накопления TGF- β и увеличение - VEGF в экстракте дцВКМ-Гип по сравнению с дцВКМ-Нор (Рисунок 31 Б).

Анализ детектируемых масс-спектрометрически белков в образцах дцВКМ, с точки зрения литературных данных об их способности к связыванию факторов роста (Geiger, Yamada, 2011; McQuitty et al., 2020), позволил соотнести молекулы ВКМ с их лигандами (Рисунок 31 В). Большинство структурных белков ВКМ с депонирующей функцией количественно не различались в пробах дцВКМ или их накопление было снижено в дцВКМ-Гип (данные молекулы отмечены курсивом на Рисунок 31 В). Однонаправленный эффект в снижении уровня содержания белков LTBP1, остеоонектина, витронектина и фактора роста TGF- β отмечен в

пробах ВКМ, полученных при физиологической гипоксии. Однако схожих эффектов для других факторов роста не было установлено.

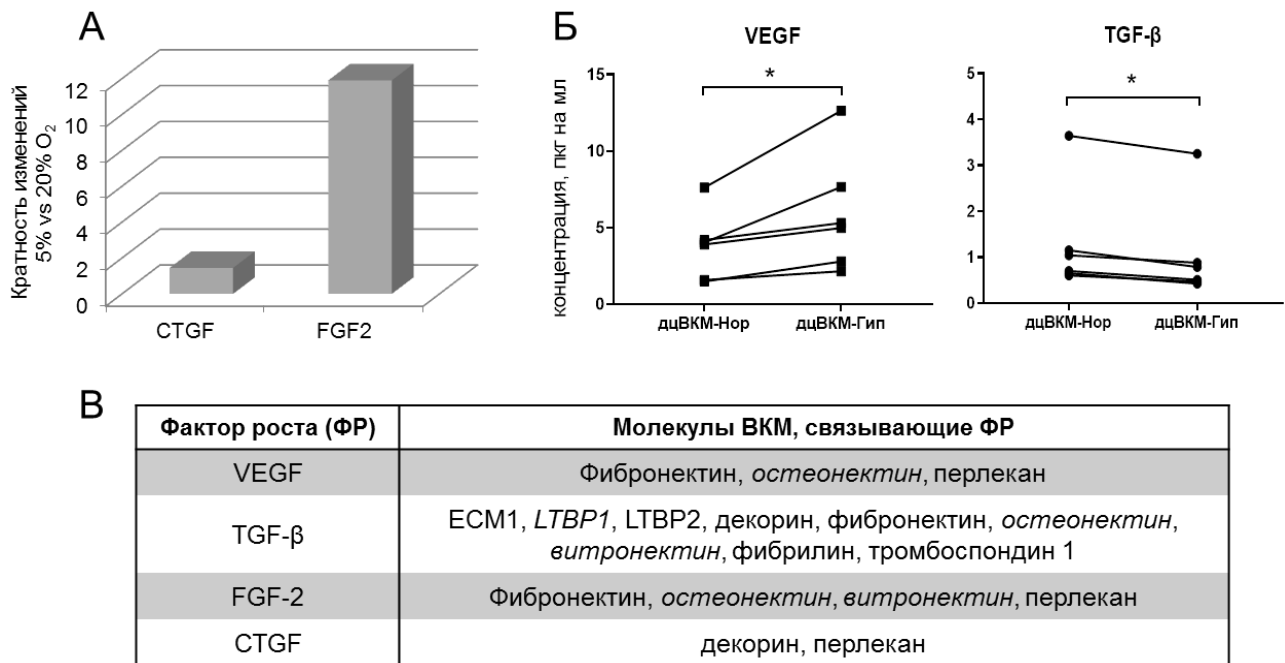


Рисунок 31. Содержание факторов роста в экстрактах дцВКМ-Нор/дцВКМ-Гип, выявленное с помощью масс-спектрометрического (А) и иммуноферментного (Б) анализов; В) детектируемые масс-спектрометрически компоненты ВКМ, депонирующие факторы роста. Курсивом отмечены белки, содержание которых различалось в дцВКМ-Нор и дцВКМ-Гип.

Применение препаратов ВКМ, по сравнению с использованием биоинженерных скаффолдов, предполагает биосовместимость и сохранение архитектуры и биохимических свойств, что может быть критичным для эффективной репарации тканей, поддержания жизнеспособности и функциональной активности клеток (Noth et al., 2010; Hoshiba et al., 2010). ДцВКМ нативных тканей или культивируемых клеток широко внедряется в регенеративную медицину, как источник биологических скаффолдов для реконструкции тканей. Исследования *in vitro* позволяют оценить вклад отдельных типов клеток в продукцию и ремоделирование матрикса. ДцВКМ представляется отличным субстратом для структурного, молекулярного и биофизического анализа свойств ВКМ, продуцируемого клетками (Harris et al., 2018).

Клетки стромального дифферона, в том числе МСК, как ключевые компоненты соединительной ткани, при культивировании синтезируют достаточное количество ВКМ (Kusuma et al., 2017). Однако на примере культуры фибробластов отмечено, что ВКМ, продуцируемый клетками в стандартных лабораторных условиях, не имеет ориентации (Harris et al., 2018). В нашей работе мы продемонстрировали, что длительная экспансия МСК при 5% O₂ приводит к изменению топологии ВКМ по сравнению с 20% O₂: дцВКМ от МСК, культивируемых в нормоксических условиях, был сформирован мембрано-подобными

структурами перекрещенных извилистых фибрилл разного размера, тогда как дцВКМ от МСК при физиологической гипоксии был представлен равномерно выровненными фибриллами, собранными в решетчатые структуры.

Такие различия в плотности и выровненности волокон, вероятно, определяются составом ВКМ, как структурных компонентов, так и регуляторных, например, сшивающих ферментов матрисома. В работе Makris et al. показано, что культивирование хондроцитов при пониженном уровне O_2 (4%) в течение 3-4 недель приводит к значительному увеличению экспрессии гена лизилоксидазы *LOX*, с сопутствующим увеличением числа поперечных сшивок между фибриллами коллагена (Makris et al., 2015). Нами установлено увеличение экспрессии гена лизилоксидаза-подобного белка (*LOXL4*), что может оказывать влияние на формирование фибриллярной структуры дцВКМ-Гип. При этом масс-спектрометрически лизилоксидазы (*LOX*, *LOXL1*, *LOXL2*) были детектированы на одинаковом уровне в дцВКМ-Норм и дцВКМ-Гип, однако, могла отличаться активность данных ферментов.

Показано, что гипоксия-зависимое усиление пост-трансляционной модификации коллагена может обеспечивать выровненность фибрилл и увеличение жесткости ВКМ (Jean et al., 2011; Aro et al., 2012; Eisinger-Mathason et al., 2013; Gilkes et al., 2014). Выявленные изменения могут косвенно указывать на увеличение жесткости ВКМ, полученных от МСК при физиологической гипоксии, однако требуют подтверждения с помощью атомно-силовой микроскопии.

Протеомный анализ позволил оценить состав структурных белков в матрисомах МСК, культивируемых при различных уровнях O_2 . Стоит отметить, что как в дцВКМ-Норм, так и в дцВКМ-Гип выявлено большое количество структурных и адгезионных белков, представленность и относительное содержание которых не различались.

Основной матрисом МСК при 20% O_2 обогащен молекулами эластина и эластин-ассоциированных белков (*ELN*, *FBLN5*, *EMILIN1*, *MFAP5*, *THSD4*). Эти данные коррелируют с установленным нами снижением транскрипции кластеров генов, ответственных за организацию эластиновых волокон. Данные особенности состава могут объяснять извилистую структуру дцВКМ-Норм по сравнению с выравненной в дцВКМ-Гип.

Матрисом МСК при физиологической гипоксии обогащен тканеспецифичными коллагенами, такими как коллаген 12 и 14 типа, и протеогликанами (*BGN*, *FMOD*, *HAPLN1*, *CILP*), которые участвуют в метаболизме ГАГ, обеспечивают упругие свойства ВКМ и участвуют в организации коллагеновых волокон. В работе Amofa et al., (2017) также показано, что тканевая гипоксия способствует накоплению ГАГ и гиалуроновой кислотой в ВКМ клапанов сердца взрослых мышей *in vivo*.

В литературе описаны изменения белков матрисома при коротких гипоксических воздействиях. Описанные данные частично совпадают с изменением профиля белков в ВКМ МСК при физиологической гипоксии. Протеомный анализ кмМСК и внеклеточных везикул после культивирования при 1% O₂ (48 часов) выявил снижение количества коллагенов COL1A2, COL1A1 и COL3A1, и белков, связанных с организацией ВКМ, таких как TIMP2, FBLN2, FBN1, COL14A2, LAMA5, ECM1 и SPARC. Анализ насыщения групп по функциональной принадлежности среди белков, изменившихся в гипоксических клетках и везикулах, выявил процессы, связанные с метаболизмом ГАГ, организацией ВКМ, в том числе эластиновых волокон (Braga et al., 2022). С помощью масс-спектрометрического анализа кондиционированной среды от жтМСК после кондиционирования 1% O₂ (24 часа) было обнаружено некоторые изменения белков, ассоциированных с ВКМ. Основные эффекты отражались на белках, обеспечивающих прочность на растяжение, трехмерное сворачивание и механическую стабильность коллагеновых фибрилл (Riis et al., 2016).

Различия в белковом составе матрисома у МСК при различном уровне O₂ может приводить к дивергенции функциональной активности дцВКМ. Анализ биологических сетей - это мощный инструмент для понимания того, как взаимодействие различных белков регулирует процессы, связанные с физиологическими и патологическими состояниями (Gonzalez, Kann, 2012). Полученные данные могут быть востребованными для прогнозирования их влияния на функциональную активность клеток при рецеллюляризации.

Например, то, что в дцВКМ-Гип найдены молекулы, вовлеченные в регуляцию клеточной пролиферации и ангиогенез, указывает на возможность модулировать активность эндотелиальных клеток при экспансии после рецеллюляризации. Интересно, что регуляция этих процессов является частью гипоксических компетенций МСК, и соответственно отражается на составе матрисома. Исследования, проведенные в том числе в нашей лаборатории, по изучению физиологии МСК при длительной депривации кислорода демонстрируют усиление их пролиферации и продукции ангиогенных цитокинов (Zhang et al., 2012; Ездакова и др., 2015; Ge et al., 2021).

В работе Ma et al., продемонстрировано, что культивирование эндотелиальных клеток на дцВКМ, полученном от МСК, значительно усиливает их способность к ангиогенезу (Ma et al., 2022). Подкожная имплантация нанопористого коллагенового каркаса, покрытого дцВКМ от содержащихся в гипоксии фибробластов (10 суток), индуцировала направленный ангиогенный ответ в течение 1 недели (Nadjiapanayi et al., 2011). Вероятно, стимуляция данного процесса происходит за счет активации сигнальных путей, благодаря прямому (адгезия ВКМ-клетка) и непрямоу (представление факторов роста) воздействию ВКМ. То, что в дцВКМ-Гип отмечено увеличенное накопление секретируемых FGF-2 и CTGF, а также ВКМ-аффилированных

молекул GREM1 и SRPX2, для которых описаны проангиогенные свойства (Miljkovic-Licina et al., 2009; Mitola et al., 2010), может быть использовано для разработки тканеинженерных конструкций, способствующих быстрой васкуляризации.

Интересные данные были получены по тканеспецифичным белкам, накапливаемым в дцВКМ при различных уровнях O_2 . Коллагеновые белки (Keene et al., 1991), остеоонектин (Termine et al., 1981), катепсин К (Mandelin et al., 2006), содержание которых было увеличено в дцВКМ-Нор, необходимы для формирования и ремоделирования костной ткани. ДцВКМ-Гип обогащен протеогликанами. Известно, что HAPLN1 способствует взаимодействию между цепями агрекана и гиалуронана, что стабилизирует ВКМ хондроцитов (Jang et al., 2021). Бигликан и фибромодулин играют важную роль в регуляции хондрогенеза и ремоделировании ВКМ (Embree et al., 2010). Полученные данные коррелируют с описанными в литературе феноменами снижения остео- (Fehrer et al., 2007; Гринаковская и др., 2009; Valorani et al., 2012; Буравкова и др., 2020) и увеличения хондродифференцировки (Lee, Kemp, 2006; Pei et al., 2017) МСК при физиологической гипоксии. В связи с этим наши результаты позволяют утверждать, что белковый состав ВКМ может определяться условиями, при которых он был получен, а при последующей рецеллюляризации может способствовать обеспечению направления дифференцировки МСК.

Помимо способности напрямую взаимодействовать с клетками, молекулы ВКМ также регулируют физиологию клеток путем неканонического представления факторов роста. Компоненты ВКМ могут депонировать факторы роста, делая их неактивными, тем самым ингибируя их взаимодействие с рецепторами на клеточной поверхности (Macri et al., 2007). Исследования *in vitro* подтверждают, что каркасы на основе дцВКМ образуют градиент факторов роста, с последующим высвобождением их в среду культивирования (Liguori et al., 2021).

Масс-спектрометрический анализ имеет некоторые ограничения в детекции низкопредставленных белков в пробе (Hawkrigde, 2014), поэтому факторы роста, которые могут депонироваться в дцВКМ, могли быть не выявлены. При протеомном профилировании были идентифицированы FGF-2 и CTGF, чьи уровни были увеличены в дцВКМ-Гип. Мы также использовали иммуноферментный анализ для определения концентрации ключевых факторов роста, таких как VEGF и TGF- β , в экстрактах дцВКМ. Было установлено, что при физиологической гипоксии происходит усиление депонирования VEGF и снижение - TGF- β . Сообщалось, что иммобилизация TGF- β , VEGF и FGF-2 в дцВКМ может способствовать усилению пролиферативной активности клеток (Prewitz et al., 2013).

VEGF - ключевой медиатор развития и роста кровеносных сосудов (Shibuya et al., 2011; Claesson-Welsh et al., 2013). Гипоксическое preconditionирование стимулирует экспрессию

гена *VEGF*, кодируемого им белка *VEGF* и ангиогенез (Claesson-Welsh et al., 2013). В работе Buczek-Thomas продемонстрировано, что в условиях гипоксии (1% O₂, 48 часов) увеличивается содержание *VEGF* в ВКМ ретинального пигментного эпителия, что связывают с изменением структуры гепаран сульфатных протеогликанов (Buczek-Thomas et al., 2019). Показано повышение ранозаживляющей способности на модели дефекта кожи у мышей с использованием дцВКМ от МСК, кондиционированных CoCl₂ - миметиком гипоксии (7 суток). Вероятно, обогащение ВКМ коллагенами I и III типа, а также TGF-β1, *VEGF*, FGF-2 через активацию HIF-1α, способствовало усилению формирования грануляционной ткани, ангиогенезу и быстрой реэпитализации (Du et al., 2017).

FGF-2 регулирует ряд процессов, таких как митогенез, миграция, ангиогенез и заживление ран (Ornitz, Itoh, 2001). В работе Kakudo et al., показано, что HIF-зависимая продукция FGF-2 вовлечена в позитивную регуляцию пролиферации жтМСК через активацию сигнального пути ERK-Akt (Kakudo et al., 2015). Kim и Ma показали, что дцВКМ от МСК при 20% и 5% O₂ обладали различной способностью к связыванию FGF-2. С помощью иммуноферментного анализа было показано, что дцВКМ-Гип связывал в 1,7 раз больше FGF-2, чем дцВКМ-Нор сразу после децеллюляризации, а также сильнее связывал FGF-2 из кондиционированной среды от МСК при 20% и 5% O₂ до децеллюляризации и экзогенный FGF-2 (но уже в меньшей степени) (Kim, Ma, 2013).

При коротких гипоксических воздействиях продукция TGF-β возрастает, что способствует развитию фиброзов (Hung et al., 2013). Однозначных данных о продукции TGF-β при физиологической гипоксии не было представлено. Сигнальный путь, запускаемый TGF-β, важен для дифференцировки МСК в остеогенном и хондрогенном направлении (Li et al., 2005; Kulterer et al., 2007). При этом TGF-β стимулирует синтез целого ряда компонентов ВКМ, которые регулируют его собственную доступность и передачу сигналов (Verrecchia, Mauviel, 2002). LTBP1 один из белков, секвестрирующих TGF-β и сохраняющих его в латентном состоянии (Horiguchi et al., 2012). Остеонектин также модулирует активность TGF-β, что определяет правильную сборку коллагена I типа (Bradshaw, Sage, 2001). Относительно содержание данных гликопротеинов было увеличено в дцВКМ-Нор по сравнению с дцВКМ-Гип.

Показано, что TGF-β способен усиливать синтез эластина (Kuang et al., 2007), а также ограничивать его деградацию путем снижения активности соответствующих протеаз (Dai et al., 2005). Установлено как *in vitro*, так и *in vivo*, что FGF-2, наоборот, является мощным ингибитором эластогенеза (Takamiya et al., 2003). Соответственно, обнаруженные нами морфологические и белковые особенности дцВКМ-Гип могут также объясняться изменением в депонировании факторов роста.

Таким образом установлено, что экспансия МСК при физиологической гипоксии сопровождается модификацией матрисома, что отражается в изменении упаковки структур ВКМ и белкового профиля. Децеллюляризация позволяет получать ВКМ, с сохранением особенностей МСК, определяемых тканевым уровнем O_2 . Описанные особенности в топологии, накоплении регуляторных белков и факторов роста в дцВКМ позволяют предполагать модуляцию клеточного поведения при последующей рецеллюляризации.

3.3. Оценка регуляторных свойств матриксов после рецеллюляризации

Чтобы охарактеризовать влияние уровней O_2 , при котором были получены дцВКМ, на функциональную активность клеток, на полученные препараты дцВКМ-Нор и дцВКМ-Гип были рецеллюляризованы МСК. В качестве контроля использовали покрытие из коллагена. Суспензию МСК высевали на различные субстраты и дальнейшее культивирование проводили при стандартных лабораторных условиях 20% O_2 .

3.2.1. Экспансия мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток на децеллюляризованных матриксах

Быстрое прикрепление к субстрату является одним из критериев для идентификации стромальных клеток (Dominici et al., 2006). Для прикрепления МСК и начала их распластывания достаточно 30 мин (Lin et al., 2012). Рецеллюляризованные МСК на коллаген/дцВКМ-Нор/дцВКМ-Гип были гетерогенны по размеру и морфологии.

В соответствии с (Александрова, Пинаев, 2014; Сахенберг и др., 2014) мы выделили следующие морфологические типы (Рисунок 32 А): (1) мелкие нераспластанные клетки (до 50 мкм); (2) среднего размера дискообразные или вытянутые клетки с F-актином в пространстве под плазмалеммой (в виде кольца или активного переднего края) (50-100 мкм); (3) крупные уплощенные клетки с псевдоподиями (100-200 мкм). Популяция МСК на коллагене была обогащена мелкими МСК (Тип 1), в то время как на дцВКМ преобладали крупные уплощенные МСК с множественными псевдоподиями (Тип 3). Доля таких МСК была значительно выше среди прикрепленных к дцВКМ-Гип (Рисунок 32 Б). Необходимо отметить, что в МСК на дцВКМ по сравнению с коллагеном изменялась структура актиновых филаментов. F-актин был представлен скоплением глобул в центре клеток и на концах псевдоподий. На коллагене клетки имели структуру F-актина в виде стресс-фибрилл. Ранее в работах было показано, что на мягких субстратах клетки распластываются с формированием древовидных отростков, а на жестких субстратах образуют развитую сеть стресс-фибрилл (Riveline et al., 2001; Smith et al., 2018). В работе Сахенберг и др., отмечено, что в определении морфологии при распластывании

стромальных клеток также играют роль отдельные компоненты ВКМ, такие как фибронектин, ламинин, коллаген (Сахенберг и др., 2014).

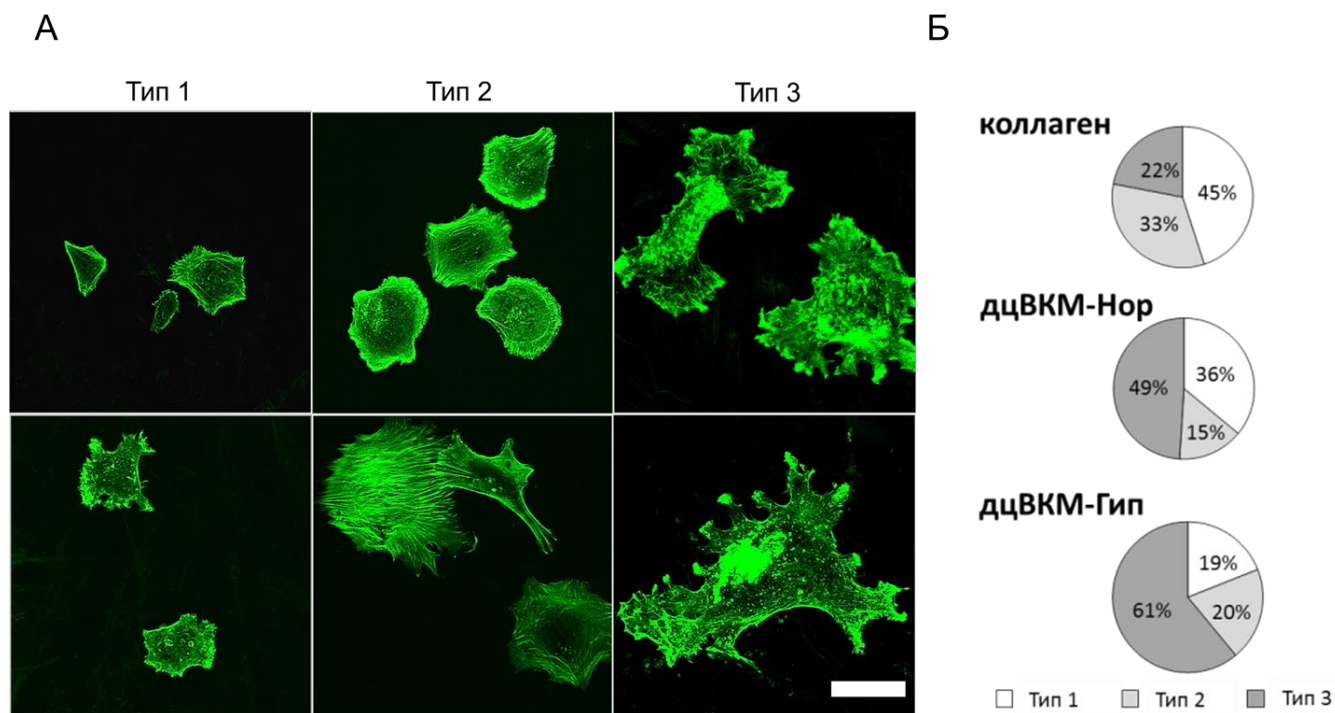


Рисунок 32. Прикрепление и распластывание МСК на различных субстратах: А) гетерогенность распространения МСК, окрашенных Alexa488-фаллоидином. Репрезентативные изображения. Масштабный отрезок - 50 мкм; Б) доля МСК разной формы после 30 мин адгезии на коллагене/дцВКМ-Нор/дцВКМ-Гип.

На 3 сутки МСК на различных субстратах значительно отличались морфологически. На коллагене они были уплощены и имели больший размер (Рисунок 33). Интересно, что на дцВКМ-Нор МСК имели округлую форму с несколькими отростками, направленными в разные стороны, в то время как на дцВКМ-Гип клетки имели веретенообразную форму с четкой биполярной ориентацией. МСК на дцВКМ-Гип формировали параллельные тяжи сонаправлено волокнам, что указывает на важную роль структуры ВКМ в регуляции клеточного роста.

Через 7 дней культивирования монослои МСК на обоих дцВКМ выглядели схоже (Рисунок 33). Клетки имели типичный фибробластоподобный вид с узким и вытянутым телом. При этом на коллагене монослой МСК был более неоднородным, присутствовали как распластаные, так и веретенообразные клетки.

3.3.2. Паракринный профиль мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток после рецеллюляризации на матриксы

После 7 суток культивирования с помощью иммунофлуоресцентного мультиплексного анализа было определено 48 цитокинов и факторов роста в кондиционированной среде МСК, рецеллюляризованных на коллаген, дцВКМ-Нор и дцВКМ-Гип (Таблица 8).

Некоторые из них не детектировались или были на пороге чувствительности метода. Из достоверно детектируемых цитокинов уровни IL-6, MCP-1, IP-10, FRACTALKINE и RANTES не зависели от типа субстрата.

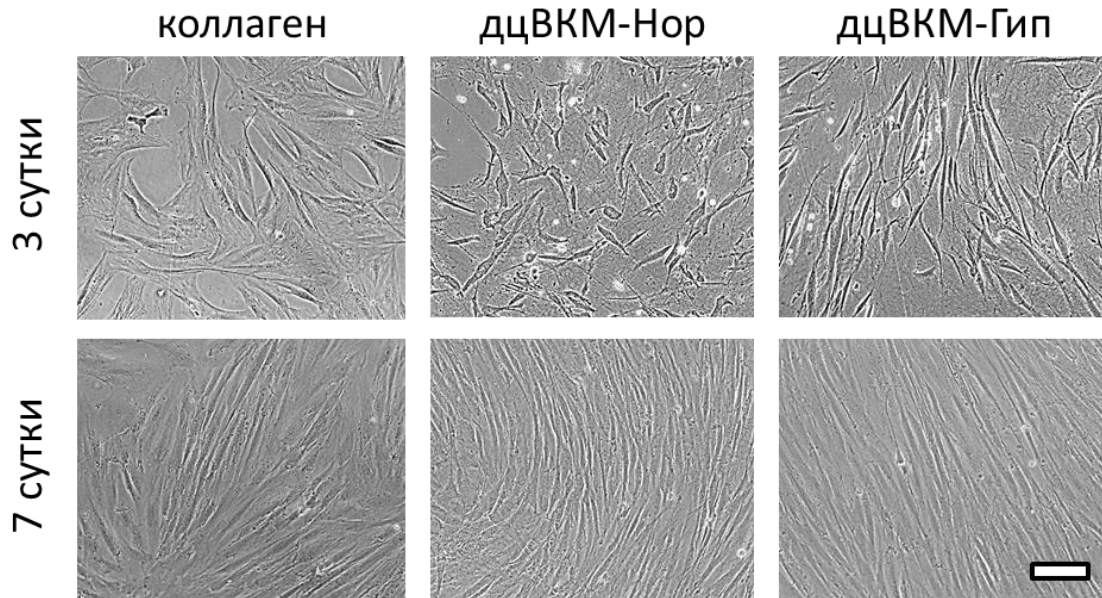


Рисунок 33. Культура МСК на 3 и 7 сутки после рецеллюляризации на коллаген/ дцВКМ-Нор/дцВКМ-Гип. Репрезентативные изображения, фазовый контраст, масштабный отрезок - 100 мкм.

Культивирование МСК на дцВКМ способствовало усилению продукции IL-8, FGF-2, GRO-α, Eotaxin по сравнению с коллагеновым покрытием (Рисунок 34). В кондиционированной среде МСК, рецеллюляризованных на дцВКМ-Гип, было обнаружено достоверное снижение уровня FGF-2 и повышение уровней IL-8, GRO-α и Eotaxin по сравнению с дцВКМ-Нор (Рисунок 34).

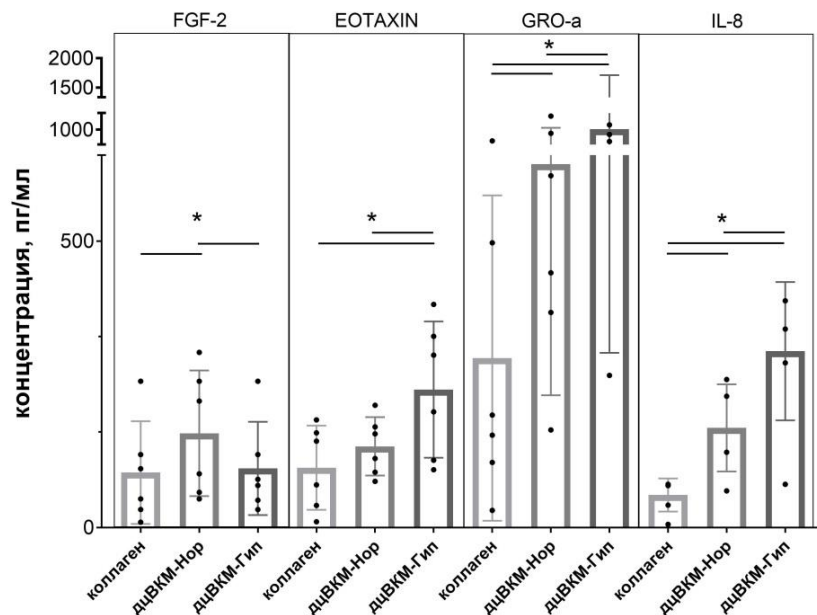


Рисунок 34. Продукция растворимых медиаторов МСК после рецеллюляризации на коллаген/дцВКМ-Нор/дцВКМ-Гип, определенная с помощью мультиплексного анализа. Данные представлены как $M \pm SD$, * $p < 0,05$ ($n=6$).

Таблица 8. Паракринная активность МСК, рецеллюляризованных на коллаген/дцВКМ-Нор/дцВКМ-Гип. Мультиплексный анализ.

Цитокины	Коллаген	дцВКМ-Нор	дцВКМ-Гип
	Концентрация, пг/мл		
EGF	5,86 ± 2,36	5,69 ± 2,20	5,23 ± 2,08
FGF-2	95,97 ± 89,67	164,47 ± 109,6	103,182 ± 81,47
Eotaxin	104,44 ± 73,42	141,65 ± 51	240,62 ± 118,87
TGF-A	ND	ND	ND
G-CSF	237,18 ± 330,33	461,9825 ± 530,96	300,49 ± 334,60
Fit3L	7,81 ± 2,086	7,76 ± 3,79	9,23 ± 2,68
GM-CSF	80,63 ± 9,34	291,275 ± 334,28	46,24 ± 51,85
Fractalkine	111,57 ± 81,66	164,59 ± 182,72	99 ± 51
IFNa2	20,24 ± 7,96	21,21 ± 10,26	24,29 ± 10,13
IFNy	ND	ND	ND
GRO	295,69 ± 283,87	634,2 ± 403,4	1009,43 ± 704,48
IL-10	ND	ND	ND
MCP-3	208,22 ± 203,79	227,63 ± 239,89	220,57 ± 185,67
IL-12p40	2,85 ± 2,04	3,27 ± 1,64	3,31 ± 1,98
MDC	19,14 ± 8,21	27,85 ± 16,81	27,88 ± 13,19
IL-12p70	ND	ND	ND
PDGF-AA	ND	ND	ND
IL-13	ND	ND	ND
PDGF-AB/BB	36,29 ± 6	41,54 ± 9,22	38,42 ± 6B91
IL-15	4,14 ± 1,31	4,57 ± 2,68	4,87 ± 2,51
sCD40L	18,83 ± 13,17	17,48 ± 2,68	14,71 ± 5,10
IL17-A	ND	ND	ND
IL-1RA	2,84 ± 1,59	5,25 ± 4,79	3,44 ± 1,77
IL-1A	ND	ND	ND
IL-9	ND	ND	ND
IL-1B	ND	ND	ND
IL-2	ND	ND	ND
IL-3	ND	ND	ND
IL-4	76,725 ± 69,17	82,18 ± 77,18	78,34 ± 61,55
IL-5	ND	ND	ND
IL-6	3602,75 ± 1693,58	4070 ± 856,21	4117,5 ± 1092,41
IL-7	7,43 ± 1,86	7,76 ± 1,83	8,07 ± 1,71
IL-8	56,91 ± 28,94	173,85 ± 76,1	307,9 ± 120,73
IP-10	4278,13 ± 7169,52	3075 ± 3476,06	3343,42 ± 4219,62
MCP-1	6568,25 ± 2084,44	6612,25 ± 2566,37	8435,75 ± 879,45
MIP-1a	11,61 ± 3,25	16,92 ± 16,84	12,93 ± 13,68
MIP-1b	ND	ND	ND
RANTES	1628,74 ± 2504,23	1344,18 ± 1500,75	1573,18 ± 1738,53
TNFa	ND	ND	ND
TNFb	ND	ND	ND
VEGF	ND	ND	ND

Данные представлены как M±SD, n=6. ND (не детектированные) – цитокины, уровни которых были выше (VEGF) или ниже (остальные) чувствительности прибора.

3.3.3. Дифференцировочный потенциал мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, культивируемых на матриксах

После 7 дней рецеллюляризации на коллаген и препараты дцВКМ оценивали в МСК признаки спонтанного коммитирования и ответ на остеоиндукцию (Рисунок 35).

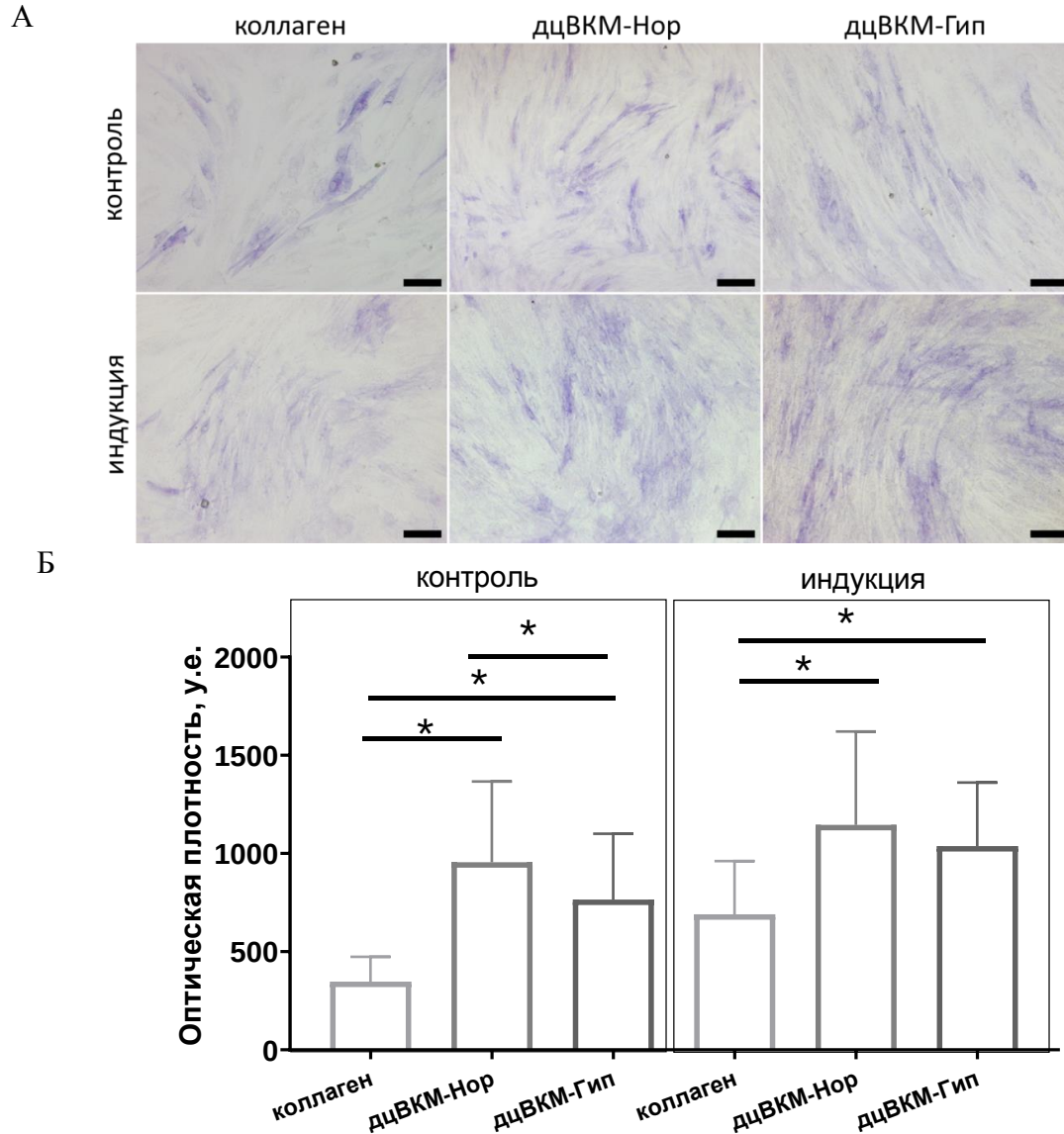


Рис. 35 Спонтанная и индуцированная дифференцировка МСК в остеогенном направлении, культивируемых на коллагене/дцВКМ-Нор/дцВКМ-Гип, в течение 7 суток. Активность щелочной фосфатазы: А) репрезентативные фотографии, масштабный отрезок - 50мкм; Б) спектрофотометрическое определение интенсивности окраски, 550 нм. Данные представлены как $M \pm SD$, $n=6$; * - $p \leq 0,05$.

Гистохимически оценивали активность щелочной фосфатазы (ЩФ) - раннего маркера остеодифференцировки (Рисунок 35 А). Популяция МСК была неоднородна по активности ЩФ. Выявлены клетки с высоким, средним и низким уровнем окрашивания. При этом гетерогенность была более выражена среди МСК без остеоиндукции. МСК с высокой ЩФ-активностью на коллагене были представлены крупными клетками, а на дцВКМ присутствовали как крупные, так и мелкие веретенообразные положительно окрашенные

клетки. Остеоиндукция привела к увеличению количества ЩФ-позитивных МСК на всех дцВКМ. На коллагене окрашенные МСК образовывали небольшие скопления, тогда как ЩФ-положительные МСК были распределены на дцВКМ более равномерно (Рисунок 35 А).

Полуколичественный колориметрический анализ показал, что в спонтанно остеоккоммитированных МСК интенсивность ЩФ-окрашивания была значительно выше на дцВКМ, чем на коллагене, при этом на дцВКМ-Норм окраска была в 1,5 раза интенсивнее, чем на дцВКМ-Гип (Рисунок 35 Б). Этот эффект отменялся после остеоиндукции. Интенсивность окрашивания ЩФ увеличивалась и была одинаковой как в группах дцВКМ-Норм, так и дцВКМ-Гип (Рисунок 35 Б).

Далее мы исследовали транскрипционную активность генов, связанных с остеогенезом: транскрипционного фактора *RUNX2* - мастер-гена остеодифференцировки, *ALPL* - гена, кодирующего ЩФ (Рисунок 36). В отсутствие остеоиндукторов *RUNX2* был повышен в МСК дцВКМ-Норм по сравнению с коллагеном и дцВКМ-Гип. Уровень транскрипции *ALPL* во всех группах не различался. После остеоиндукции наблюдалась лишь тенденция к повышению уровня *ALPL* и *RUNX2*. При этом повышение было более выраженным на дцВКМ-Гип по сравнению с дцВКМ-Норм. По изменению активности ЩФ и экспрессии «остео» маркеров у МСК при индукции было установлено, что МСК на дцВКМ-Гип более чувствительны остеостимулам.

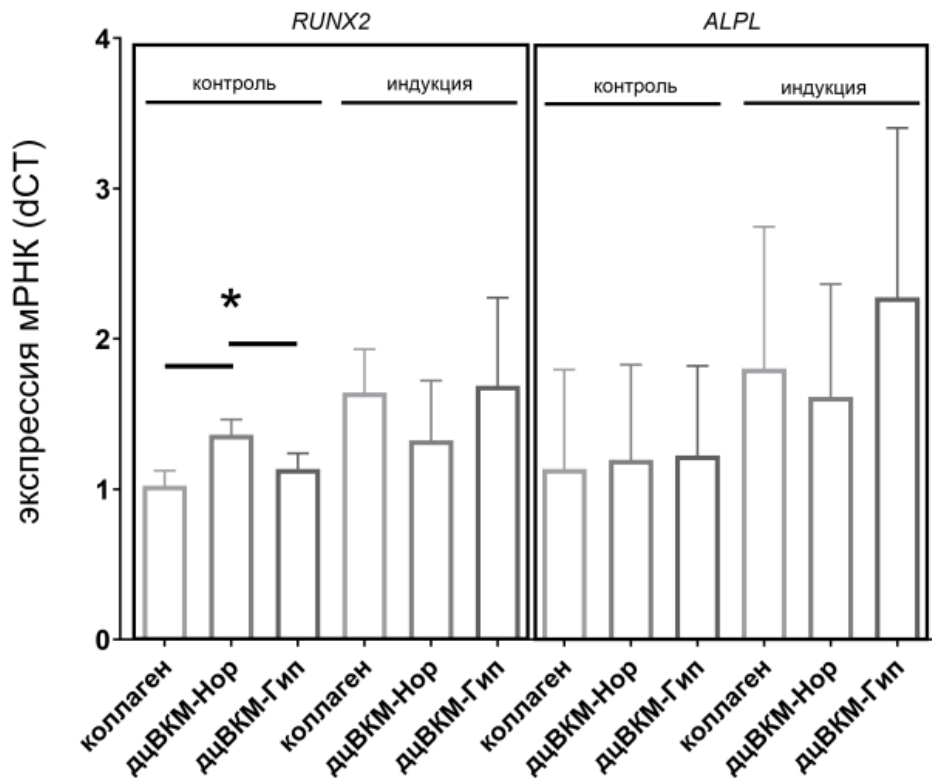


Рис. 36 Экспрессия генов остео-маркеров (*RUNX2*, *ALPL*) в МСК, культивируемых на коллагене/дцВКМ-Норм/дцВКМ-Гип, в течение 7 суток с добавлением (индукция) или без (контроль) индукторов остеодифференцировки. Данные представлены как $M \pm SD$, $n=3$, $*p<0,05$.

Далее помимо оценки активности щелочной фосфатазы и экспрессии «остео» генов мы оценили продукцию биомаркеров костной ткани, таких как остеопротегерин, остеокальцин, остеопонтин и склеростин, с помощью мультиплексного анализа (Рисунок 37).

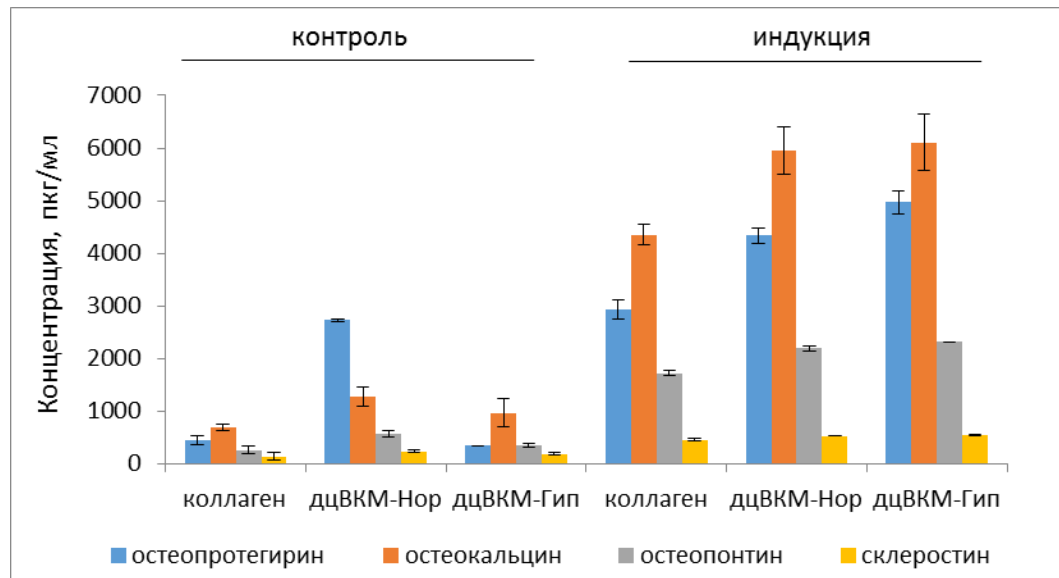


Рис. 37 Содержание биомаркеров костной ткани в кондиционированной среде МСК, культивируемых на коллагене/дцВКМ-Nор/дцВКМ-Гип, выявленное методом мультиплексного анализа. Данные представлены как $M \pm SD$, $n=2$.

Для всех этих молекул было характерно увеличение их продукции в МСК, которые культивировали на дцВКМ-Nор. Концентрация в кондиционированной среде данных маркеров увеличивалась при индукции. Стоит отметить, что аналогично щелочной фосфатазе разница между группами дцВКМ-Nор и дцВКМ-Гип нивелировалась, но оставалась выше в сравнении с коллагеном.

Взаимодействие клетка-ВКМ является двунаправленным. Физические силы, передаваемые через ВКМ, могут непосредственно активировать ядерные регуляторы транскрипции, направляя судьбу клетки (Crisp et al., 2006). Например, показана ВКМ-зависимая пространственно-механическая регуляция клеточного фенотипа, такая как определение формы клеток, их миграционной активности и дифференцировочного потенциала (Muncie, Weaver, 2018). Описанные в разделе 3.2 особенности белкового состава, структуры и топологии ВКМ МСК, определяемые физиологической гипоксией, представляются многообещающими с точки зрения модуляции клеточного поведения. Для изучения эффектов ВКМ, продуцируемого МСК при различных уровнях O_2 , на свойства клеток после рецеллюляризации было проведено несколько физиологических тестов, в том числе анализ прикрепления, характера роста, способности к коммитированию в остеогенном направлении и паракринного профиля.

Приведенные данные о характере распластывания в течение 30 минут подтверждают зависимость специфики формы клеток от свойств субстрата. Ранее было показано, что фибробласты в первые 2-24 часа после прикрепления к пластику претерпевают

последовательные этапы изменения формы клеток: дискообразную, поляризованную с активным краем, вытянутую фибробластоподобную (Александрова, Пинаев, 2011). Различные формы МСК (тип 1, тип 2, тип 3) в одной и той же временной точке могут свидетельствовать о скорости распластывания и потенциале к движению. Можно утверждать, что физические и топографические свойства дцВКМ могли сократить время прикрепления МСК, что позволило им быстрее стать дисковидными/удлиненными, а затем уплощенными. В пользу этого предположения говорит уменьшение доли мелких нераспластанных и увеличение процента уплощенных МСК, особенно на дцВКМ-Гип. Адгезия и миграция клеток регулируется не только химическим составом, но и, в частности, топографическими сигналами, обеспечиваемыми физической организацией ВКМ, к которым прикрепляются клетки (Kutys et al., 2013). Согласно классическим представлениям, образование псевдоподиальных форм происходит на анизотропных субстратах с жесткостью, отличной от культурального пластика или стекла (Bershadsky et al., 2003; Discher et al., 2010; Engler et al., 2006; Kular et al., 2014). Различия в организации актинового цитоскелета на препаратах коллагена и дцВКМ также могут определяться показателями их жесткости. На дцВКМ цитоскелет был образован актин-содержащими волокнами внутри края клетки и скоплением глобул в центре клеток и на концах псевдоподий. Тогда как на коллагене большая часть распластанных клеток имели типичную для жестких субстратов структуру F-актина (Riveline et al., 2001) в виде стресс-фибрилл по всей длине клетки, и более коротких пучков под плазмалеммой.

Интересными оказались результаты культивирования МСК на различных ВКМ в течение 72 часов, когда они еще не достигли плотности монослоя. На дцВКМ-Нор МСК имели кубическую форму с несколькими отростками, тогда как на дцВКМ-Гип приобретали веретенообразную форму и выстраивались вдоль волокон. Эти наблюдения показывают, что гипоксический дцВКМ за счет своих выровненных фибрилл контролирует ориентацию клеток при росте. Тогда как на дцВКМ-Нор, клетки образуют несколько псевдоподий, вероятно, нащупывая направление распространения.

Современные методы нанотехнологий позволяют получать субстраты с четко определенной топографией, жесткостью, расстоянием между лигандами и анизотропией. Культивирование клеток на поверхности с различными физическими свойствами демонстрирует их исключительную способность воспринимать адгезивные субстраты и дифференцированно реагировать на них (Geiger et al., 2009). В работе Wang et al., 2018 были описаны, аналогичные нашим результатам, различия в морфологии и поляризации фибробластов при высевании на структурированные и неструктурированные фибронектиновые подложки. Выравнивание волокон ВКМ приводит к снижению количества отростков и приобретению биполярной ориентации клеток. Было установлено, что такие изменения

обуславливались такой организацией фокальных спаек и связанных с ними F-актиновых стресс-фибрилл, которая приводит к образованию и стабилизации клеточных отростков в направлении ориентации ВКМ (Wang et al., 2018).

Способность контролировать ориентацию фибрилл обеспечивает еще один механизм регуляции поведения. Например, выровненный дцВКМ обладает способностью направлять ориентацию нейритов в нейральных эксплантатах (Harris et al., 2017). В работе Bauer et al., 2009 предложена 2D модель, отражающая влияние структуры ВКМ на прорастание сосудов. Плотность ВКМ может изменять скорость прорастания и разветвления сосудов, тогда как выравнивание и жесткость волокон коррелирует с формой эндотелиальных клеток и ориентацией их прорастания. На культивируемых фибробластах было показано, что в независимости от плотности матрикса, выравнивание его волокон способствует увеличению скорости миграции клеток (Wang et al., 2018). В совокупности эти результаты могут указывать, на то что дцВКМ, полученный от МСК при физиологической гипоксии, может повышать эффективность миграции клеток, что может быть востребовано для их применения в репаративных целях.

После достижения монослоя морфология МСК на различных ВКМ не различалась, клетки образовывали плотные слои веретенообразных клеток. Стоит отметить, что на коллагене сохранялся уплощенный фенотип. По состоянию монослоев очевидно, что клеточный прирост на дцВКМ был значительно увеличен по сравнению с коллагеном. При изучении культивируемых МСК установлено, что распластанная морфология клеток коррелирует со снижением дифференцировочной способности и пролиферативной активности в сравнении с веретенообразной формой (Prockop et al., 2001; Neuhuber et al., 2008). Предполагается, что сильнораспластаный тип клеток в популяции представляет более зрелые клетки (Паюшина, Дамарцкая, 2015).

Хотя МСК хорошо адгезируют к пластику, и не требуют фидерных клеток или подложек для культивирования, установлено, что при экспансии на пластике МСК теряют свои «стволовые» функции, поскольку отсутствуют сигналы из микроокружения, поддерживающие и направляющие поведение клеток *in vivo*, в том числе контакты с ВКМ (Lai et al., 2010). Переходя в систему *in vitro* очень важно моделировать тканевое микроокружение клеток, для того чтобы сохранить предполагаемые свойства клеток. Сохранение особенностей топологии и белкового состава в ВКМ, обусловленных физиологической гипоксией, представляется многообещающим для использования дцВКМ в качестве модулятора функциональной активности клеток после рецеллюляризации.

В данной работе показано изменение паракринного профиля МСК, культивируемых на дцВКМ. Являясь хемокинами группы CXCL, GRO- α и IL-8 принимают активное участие в

миграции клеток и ангиогенезе (Ring et al., 2007). Мы отметили снижение уровня плейотропного фактора роста - FGF-2. Это оказалось неожиданным, поскольку FGF-2 - известный стимулятор пролиферации МСК с выраженной проангиогенной активностью (Hagmann et al., 2013), и предполагалось, что он будет действовать однонаправленно с GRO- α и IL-8. Между тем эти результаты могут быть интерпретированы на основании наблюдений Kim и Ma (2013). Они показали, что ВКМ, полученный от МСК в условиях нормоксии и гипоксии, обладают различной способностью связываться с секретируемым клетками и экзогенным FGF-2. ДцВКМ-Гип депонировал в два раза больше FGF-2, чем дцВКМ-Норм, и сильнее связывал FGF-2 из кондиционированной среды МСК. В нашем исследовании протеомный анализ также выявил увеличенное количество FGF-2 в пробах дцВКМ-Гип. Вероятно, механизм снижения содержания FGF-2 в кондиционированной среде может заключаться в снижении уровня растворимого FGF-2 в пользу связанного. По-видимому, модулировать секретом могут белки ВКМ и цитокины, накопленные в дцВКМ. Например, показано, что остеонектин может стимулировать продукцию FGF-2 в МСК (Jose et al., 2014). Секреция VEGF в кММСК стимулировалась за счет продукции IL-8 (Hou et al., 2014).

Хорошо известно, что эффективность дифференцировки МСК *in vitro* в значительной степени зависит от уровня O_2 в микроокружении. Согласно многочисленным наблюдениям, остео- и адиподифференцировка при физиологической гипоксии ослабляются, а хондрогенная - ускоряется (D'Ippolito et al., 2006; Гринаковская и др., 2009; Yang et al., 2011; Bae et al., 2018). Мы сравнили эффективность спонтанного остеоккомитирования и индуцированной остеодифференцировки МСК на дцВКМ-Гип или дцВКМ-Нор.

В нашей работе обнаружен феномен сохранения "гипоксических" компетенций ВКМ, продуцируемого МСК в условиях физиологической гипоксии. Это выражалось в снижении остеопотенциала при культивировании МСК на дцВКМ-Гип. Ранее подобный эффект был описан только в работе (Pei et al., 2012). Авторы использовали дцВКМ, полученную из МСК, предварительно кондиционированных в гипоксии в течение 14 дней. После последующей рецеллюляризации наблюдалось снижение дифференцировки МСК в остео- и адипогенном направлениях. Мы подтвердили замедление спонтанного коммитирования в остеогенном направлении на дцВКМ-Гип на уровне транскрипционной активности *RUNX2*, активности щелочной фосфатазы и продукции белков биомаркеров костной ткани в кондиционированную среду. Такие эффекты, безусловно, могут определяться биофизическими особенностями ВКМ, структурой или жесткостью.

Значительное повышение способности МСК к дифференцировке на дцВКМ по сравнению с культуральным пластиком было подтверждено в нескольких исследованиях (Chen et al., 2007; Ng et al., 2014; Rao Patabhi et al., 2014). В работе Новоселецкой и др. была произведена оценка

активации сигнальных путей, запускаемых в МСК при экспансии на дцВКМ. Установлена активация сигнальных путей, опосредованных адгезией клетка-ВКМ (FAK-ERK- и Src-PI3K-AKT пути) и преимущественная локализация β -катенина в цитоплазме (в сравнении с ядерной фракцией), что может способствовать реализации дифференцировочных компетенций МСК (Novoseletskaya et al., 2020). Сигнальный путь Wnt, основным эффектором которого является β -катенин, рассматривается как ключевой каскад, регулирующий процессы развития и дифференцировки (Moon et al., 2004; Angers, Moon, 2009). Известно, что канонический и неканонический Wnt-пути передачи сигнала играют важную роль в регуляции пролиферации, остеогенной и адипогенной дифференцировки МСК, причем действие этих путей разнонаправлено (Baksch, Tuan, 2007). Детальный анализ активации Wnt-сигналинга в МСК при физиологической гипоксии требует дальнейшего изучения. Необходимо и рассмотрение вовлечения сигнальных каскадов, контролирующих дифференцировку МСК, запускаемых «остео» белками, накопление которых снижается в гипоксическом матриксе.

С точки зрения регуляции остеопотенциала интересно изменение профиля растворимых медиаторов МСК на дцВКМ-Гип. Обнаружено увеличение содержания воспалительных цитокинов GRO-а и эотаксина, которые рассматриваются как потенциальные предикторы потери костной массы, т.е. могут негативно влиять на остеогенез (Mussano et al., 2018). Противовоспалительный препарат дексаметазон является обязательным компонентом остеоиндукционной среды, а в МСК после остеоиндукции *in vitro* было продемонстрировано снижение уровня GRO-а (Kindstedt et al., 2017). Таким образом, остеоиндукторы могут маскировать эффекты дцВКМ-Гип. Что касается IL-8, то этот цитокин, как было показано, способствует хондрогенной дифференцировке (Park et al., 2015). Поскольку хондро- и остеодифференцировка регулируются реципрокно, можно предположить, что повышенный уровень этого интерлейкина может препятствовать остеоконмитированию. FGF-2 считается одним из остеоиндуцирующих цитокинов, рецептор которого, FGFR1, является ключевым регулятором созревания остеобластов в процессе остеогенеза (Jacob et al., 2006). Наблюдаемое снижение уровня FGF-2 можно рассматривать как еще одну причину ослабления остеопотенциала МСК на дцВКМ-Гип.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате многочисленных исследований, выполненных на культивируемых МСК, накоплено значительное количество экспериментальных данных, позволяющих сформулировать основные принципы участия МСК в физиологическом и репаративном ремоделировании. МСК способны продуцировать биологически активные метаболиты, обеспечивая специфическое микроокружение различных клеточных популяций. В свою

очередь, клеточные и неклеточные компоненты тканевых ниш регулируют активность МСК. Исследование механизмов регуляции свойств МСК в результате их взаимодействия с факторами микроокружения имеет важное значение как с точки зрения поддержания тканевого гомеостаза в организме, так и в связи с тем интересом, который они представляют для регенеративной медицины и тканевой инженерии. В настоящей работе показано, как свойства внеклеточного матрикса, продуцируемого МСК, могут зависеть от важнейшего физического фактора локальной тканевой ниши – уровня O_2 .

Полногеномный анализ дифференциальной экспрессии генов МСК, культивируемых при физиологической гипоксии, показал, что около 20% измененных генов кодируют молекулы, относящиеся к матрисому – комплексу структурных и регуляторных белков внеклеточного матрикса. Наиболее значимым при физиологической гипоксии было изменение генов, кодирующих белки гликопротеинов основного матрисома, а также молекулы-регуляторы и секретируемые факторы среди матрисом-ассоциированных генов.

Данные транскрипционного анализа дали основание предположить, что уровень O_2 в микроокружении будет отражаться на структуре и активности ВКМ. МСК, постоянно культивируемые при 20% и 5% O_2 , продуцировали хорошо развитый внеклеточный матрикс, практически не различающийся по общему содержанию коллагеновых и неколлагеновых компонентов. Обнаружены отличия в морфологии ВКМ при различных концентрациях O_2 как под монослоем МСК, так и на децеллюляризированных препаратах. Было сделано предположение, что это может обуславливаться как протеазной/антипротеазной активностью МСК, так и специфичностью белкового профиля продуцируемого ВКМ при различном уровне O_2 . Действительно, транскрипция генов и активность основных матриксных металлопротеиназ – MMP-1 и MMP-2, была снижена в условиях физиологической гипоксии.

В результате протеомного анализа растворимой фракции ВКМ было идентифицировано примерно 80 белков ВКМ, которые были количественно и качественно изменены при физиологической гипоксии. Особый интерес представляют данные о том, что в ВКМ при физиологической гипоксии накапливаются белки, отражающие гипоксические компетенции МСК. Это в первую очередь молекулы, обеспечивающие усиление пролиферации, проангиогенные свойства и направляющие потенциал к дифференцировке МСК в остеогенном и хондрогенном направлениях.

Мы предположили, что ВКМ, продуцируемые МСК при различном уровне O_2 , могут отличаться по способности регулировать функциональную активность рецеллюляризированных клеток. Анализ данных по прикреплению к дцВКМ и распластыванию подтвердил, что МСК чувствительны к свойствам субстрата. ДцВКМ способствовали дифференцировке МСК в остеонаправлении, а также изменению паракринного профиля по сравнению с теми же

клетками на коллагене. При этом активность щелочной фосфатазы и экспрессия *RUNX2* – маркеров остеодифференцировки, спонтанно усиливалась на дцВКМ-Нор по сравнению с дцВКМ-Гип, что аналогично прямым эффектам уровня O_2 на коммитирование МСК.

Таким образом, *in vitro* возможно формирование ВКМ с определенными свойствами за счет использования факторов микроокружения, таких как концентрация O_2 , характерная для их тканевых ниш (Рисунок 38). Дальнейшие исследования в этой области будут направлены на выяснение реализации механизмов вклада физиологической гипоксии в ВКМ-опосредованную функциональную активность как МСК, так и других типов клеток, поскольку от этого может зависеть их вовлечение в физиологические и репаративные процессы *in vivo*, а также применение в протоколах регенеративной медицины и тканевой инженерии.

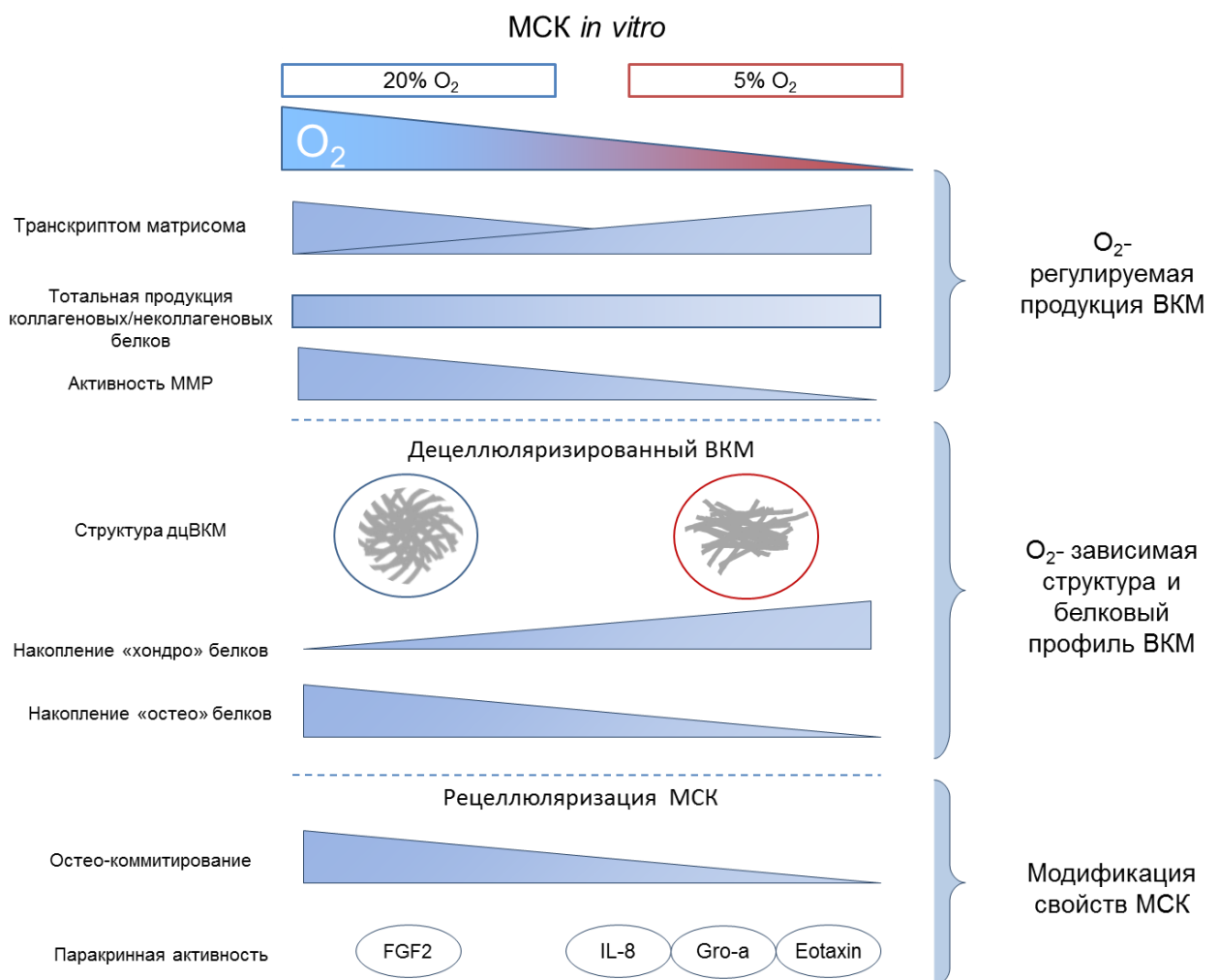


Рисунок 38. Влияние физиологической гипоксии на свойства и активность ВКМ МСК.

ВЫВОДЫ

1. При физиологической гипоксии в мультипотентных мезенхимальных стромальных клетках человека дифференциально экспрессируются гены, кодирующие структурные и регуляторные белки внеклеточного матрикса (матрисома). Достоверно снижается экспрессия генов структурных гликопротеинов (*COMP*, *ELN*) в группе основного матрисома, и увеличивается транскрипция матрисом-ассоциированных белков, с промиграционной (*CXCL12*) и антиоксидантной (*SRPX*, *SERPINF1*) функциями.
2. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, постоянно культивируемые при 20% и 5% O₂, продуцируют внеклеточный матрикс, не различающийся по содержанию коллагеновых и неколлагеновых компонентов. Активность матриксных металлопротеиназ (MMP-1 и MMP-2) в условиях физиологической гипоксии снижается.
3. Культивирование мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток при физиологической гипоксии приводит к формированию более разветвленной сети и увеличению выровненности фибрилл внеклеточного матрикса.
4. Протеомный профиль внеклеточного матрикса при физиологической гипоксии, обогащен специфичными белками хрящевой (HAPLN1, CTGF, CILP, GREM1), а при 20% O₂ – костной (COL3A1, COL5A1, COL6A1, SPARC, CTSK) тканей. При 5% O₂ в матриксе увеличивается содержание белков, вовлеченных в регуляцию клеточной пролиферации и ангиогенеза (FGF2, VEGF, SRPX2, GREM1).
5. Децеллюляризованные матриксы, продуцируемые мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками при 20% и 5% O₂, улучшают адгезию и определяют направленность клеточного роста. После рециеллюляризации на матрикс, полученный при физиологической гипоксии, в мультипотентных мезенхимальных стромальных клетках замедляется спонтанное остеоккомитирование на фоне увеличения продукции IL-8, GRO-α, эотаксина и снижения – FGF-2.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александрова С.А, Пинаев Г.П. Характеристика актинового цитоскелета на начальном этапе трансэндотелиальной миграции мультипотентных мезенхимных стромальных клеток костного мозга // Биофизика. – 2014. – Т. 59. – № 5. – С. 913–918.
2. Андреева Е.Р., Матвеева Д.К. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки и внеклеточный матрикс: особенности регуляции при гипоксии // Физиология Человека. – 2014. – Т. 44. – № 6. – С. 1.
3. Буравкова Л.Б., Гринаковская О.С., Андреева Е.Р., Жамбалова А.П., Козионова М. П. Характеристика мезенхимальных стромальных клеток из липоасpirата человека, культивируемых при пониженном содержании кислорода // Цитология. – 2009. Т. 51. – № 1. – С. 5-11.
4. Буравкова Л.Б., Ездакова М.И., Андрианова И.В., Голикова Е.А., Андреева Е.Р. Транскрипция генов, ответственных за бипотентный дифференцировочный потенциал мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, при различном уровне O₂ // Доклады Академии Наук. – 2020. – Т. 491. – № 1. – С. 122-124.
5. Быков В.Л. Цитология и общая гистология. СПб: Сотис, 2002. – 254 с.
6. Воронкина И.В., Смагина Л.В., Крылова Т.А., Мусорина А.С., Полянская Г.Г., Гин И.И. 2017. Активность ММП и синтез компонентов ВКМ в процессе хондрогенной дифференцировки мезенхимных стволовых клеток в разных условиях // Цитология. – Т. 59. – № 11. – С. 751.
7. Воронкина И.В., Смагина Л.В., Крылова Т.А., Мусорина А.С., Полянская Г.Г., Гин И.И. Активность ММП и синтез компонентов ВКМ в процессе хондрогенной дифференцировки мезенхимных стволовых клеток в разных условиях // Цитология. – 2017. – Т. 59. – № 11. – С. 751.
8. Гринаковская О.С., Андреева Е.Р., Буравкова Л.Б., Рылова Ю.В., Косовский Г.Ю. Пониженное содержание O₂ замедляет коммитирование культивируемых мезенхимальных стромальных клеток-предшественников из жировой ткани в ответ на остеогенные стимулы // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2009. – Т. 147. – № 6. – С. 704-707.
9. Ездакова М.И., Андреева Е.Р., Гурьева Т.С., Дадашева О.А., Орлова В.С., Буравкова Л.Б. Влияние гипоксии и ростовых факторов на ангиогенную активность мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток // Авиакосмическая и экологическая медицина. – 2015. – № 5. – С. 29-36
10. Земелько В.И., Гринчук Т.М., Домнина А.П., Арцыбашева И.В., Зенин В.В, Кирсанов А.А, Бичева Н.К., Корсак В.С., Никольский Н.Н. Мультипотентные мезенхимные стволовые клетки десквамированного эндометрия. Выделение, характеристика и использование в качестве фидерного слоя для культивирования эмбриональных стволовых линий человека // Цитология. – 2011. – Т. 53. – № 1. – С. 919.
11. Костюшев Д.С., Смирский В. Н., Сонг С., Пальцев М. А., Гнатенко Д. А., Сучков С. В. Стволовые клетки и микроокружение: интеграция биохимических и механических факторов // Успехи современной биологии. –2014. – Т. 76. – № 2. – С. 3-18.
12. Крылова Т.А., Мусорина А.С., Кольцова А.М., Зенин В.В., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. Получение и сравнительная характеристика линии мезенхимных стволовых клеток, выделенных из крайней плоти двух доноров одного возраста // Цитология. – 2018. – Т. 60. – № 4. – С. 262.
13. Маркина Е.А. Андреева Е.Р. Культивирование мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга и трабекулярной костной ткани мыши при различном содержании кислорода // Технологии живых систем. – 2016. – Т.13. – №5. – С. 4 - 13.
14. Матвеева Д.К., Андреева Е.Р. Регуляторная активность децеллюляризованного матрикса мультипотентных мезенхимных стромальных клеток // Цитология. – 2020. – Т. 62. – № 10. – С. 699–715.

15. Матвеева Д.К., Андреева Е.Р., Буравкова Л.Б. Выбор оптимального протокола получения децеллюляризированного внеклеточного матрикса мезенхимальных стромальных клеток из жировой ткани человека // Вестник Московского университета, Биология. – 2019. – Т. 74. – № 4. – С. 294–300.
16. Мусина Р.А., Белявский А.В., Тарусова О.В., Соловьева Е.В., Сухих Г.Т. Мезенхимальные стволовые клетки эндометрия, полученные из менструальной крови // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2008. – № 2. – С. 110.
17. Новоселецкая Е.С., Григорьева О.А., Ефименко А.Ю., Калинина Н.И. Внеклеточный матрикс в регуляции дифференцировки стволовых клеток // Биохимия. – 2019. – Т. 84. – № 3. – С. 343-353.
18. Паюшина О.В. Локализация и функции мезенхимных стромальных клеток *in vivo* // Общая Биология. – 2015. – Т. 76. – № 2. – С. 161.
19. Паюшина О.В., Домарацкая Е.И. гетерогенность и возможная структура популяции мезенхимных стромальных клеток // Цитология. – 2015. – Т. 57. – № 1. – С. 31–38.
20. Погодина (Лобанова) М.В., Буравкова Л.Б. Устойчивость к окислительному стрессу мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, культивируемых при разном содержании кислорода. // Авиакосмическая и экологическая медицина. - 2014. - Т. 48. - № 6. - С. 34-38.
21. Рогова Л.Н., Шестернина Н.В., Замечник Т.В., Фастова И.А. Матриксные металлопротеиназы, их роль в физиологических и патологических процессах // Вестник новых медицинских технологий. – 2011. – Т. 18. – № 2. – С. 86.
22. Рукша Т.Г., Аксененко М.Б., Климина Г.М., Новикова Л.В. Внеклеточный матрикс кожи: роль в развитии дерматологических заболеваний // Вестник дерматологии и венерологии. – 2013. – № 6. – С. 32-39.
23. Сахенберг Е.И., Николаенко Н.С., Пинаев Г.П. Исследование распластывания и организации атинового цитоскелета стромальных клеток костного мозга и клеток хряща при раздельном и совместном культивировании на различных белках внеклеточного матрикса // Цитология. – 2014. – Т. 56. – № 10. – С. 708-716.
24. Фриденштейн А.Я., Чайлахян Р.К., Герасимов Ю.В. Пролиферативный и дифференцировочный потенциал скелетных костномозговых колониеформирующих клеток // Цитология. – 1986. – Т. 28. – № 3. – С. 341-349.
25. Якушина В.Д., Васильева О.А., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Савельева О.Е., Прохоренко Т.С., Старикова Е.Г., Зима А.П. Галектин-1: роль в формировании особенностей врожденного и приобретенного иммунитета // Медицинская иммунология. – 2012. – Т. 14. – № 1-2. – С. 21-32.
26. Ahmed M., Ffrench-Constant C. Extracellular matrix regulation of stem cell behavior // Current Stem Cell Report. – 2016. – Vol. 2. – № 3. – P. 197-206.
27. Alexeev V., Arita M., Donahue A., Bonaldo P., Chu M.L., Igoucheva O. Human adipose-derived stem cell transplantation as a potential therapy for collagen VI-related congenital muscular dystrophy // Stem Cell Research & Therapy. – 2014. – Vol. 5. – P. 21.
28. Alto L.T., Terman J.R. Semaphorins and their Signaling Mechanisms // Methods Molecular Biology. – 2017. – Vol. 1493. – P. 1-25.
29. Amano S., Yamagishi S., Inagaki Y., Nakamura K., Takeuchi M., Inoue H., Imaizumi T. Pigment epithelium-derived factor inhibits oxidative stress-induced apoptosis and dysfunction of cultured retinal pericytes // Microvascular Research. – 2005. – Vol. 69. – P. 45–55.
30. Amofa D., Hulin A., Nakada Y., Sadek H.A., Yutzey K.E. Hypoxia promotes primitive glycosaminoglycan-rich extracellular matrix composition in developing heart valves // American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology. – 2017. – Vol. 313. – № 6. – P. 1143-1154.
31. Andreeva E., Matveeva D., Zhidkova O., Zhivodernikov I., Kotov O., Buravkova L. Real and Simulated Microgravity: Focus on Mammalian Extracellular Matrix // Life (Basel). – 2022. Vol. 12. – № 9. P. 1343-1352.

32. Angers S., Moon R.T. Proximal events in Wnt signal transduction // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2009. – Vol. 10. № 7. – P. 468-477.
33. Anitua E., Prado R., Orive G. Safety and efficient ex vivo expansion of stem cells using platelet-rich plasma technology // *Therapeutic Delivery*. – 2013. – Vol. 4. – № 9. – P. 1163–1177.
34. Apte S.S. A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motifs: the ADAMTS family // *International Journal of Biochemical Cell Biol.* – 2004. – Vol. 36. – № 6. – P. 981-985.
35. Aro E., Khatri R., Gerard-O'Riley R., Mangiavini L., Myllyharju J., Schipani E.I. Hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) but not HIF-2 is essential for hypoxic induction of collagen prolyl 4-hydroxylases in primary newborn mouse epiphyseal growth plate chondrocytes // *Journal of Biological Chemistry*. – 2010. – V. 287. – № 44. – P. 37134.
36. Arroyo A.G., Iruela-Arispe M.L. Extracellular matrix, inflammation, and the angiogenic response // *Cardiovascular Research*. – 2010. – Vol. 86 – № 2. – P. 226–235.
37. Asgari Taei A., Nasoohi S., Hassanzadeh G., Kadivar M., Dargahi L., Farahmandfar M. Enhancement of angiogenesis and neurogenesis by intracerebroventricular injection of secretome from human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells in ischemic stroke model // *Biomedical Pharmacotherapy*. – 2021. – Vol. 140. – P. 111709.
38. Aumailley M., Smyth N. The role of laminins in basement membrane function // *Journal of Anatomy*. 1998. – Vol. 193. – № 1. – P. 1–21.
39. Bachmann M., Kukkurainen S., Hytönen V.P., Wehrle-Haller B. Cell Adhesion by Integrins // *Physiology Review*. – 2019. – Vol. 99. – № 4. – P. 1655-1699.
40. Bader A.M., Klose K., Bieback K., Korinth D., Schneider M., Seifert M., Choi Y.H., Kurtz A., Falk V., Stamm C. Hypoxic preconditioning increases survival and pro-angiogenic capacity of human cord blood mesenchymal stromal cells in vitro // *PLoS One*. – 2015. – Vol. 10. – P. e0138477.
41. Bae H.C., Park H.J., Wang S.Y., Yang H.R., Lee M.C., Han H.S. Hypoxic condition enhances chondrogenesis in synovium-derived mesenchymal stem cells // *Biomaterials Research*. – 2018. – Vol. 22. – P. 28-34.
42. Baksh D., Tuan R.S. Canonical and non-canonical Wnts differentially affect the development potential of primary isolate of human bone marrow mesenchymal stem cells // *Journal of Cellular Physiology*. – 2007. – Vol. 212. – № 3. – P. 817-826.
43. Barker H.E., Cox T.R., Erler, J.T. The rationale for targeting the LOX family in cancer // *Nature Review Cancer*. – 2012. – Vol. 12. – P. 540–552.
44. Becerra J., Santos-Ruiz L., Andrades J.A., Mari-Beffa M. The stem cell niche should be a key issue for cell therapy in regenerative medicine // *Stem Cell Reviews and Reports*. – 2011. – Vol. 7. – P. 248–255.
45. Beegle J., Lakatos K., Kalomoiris S., Stewart H., Isseroff R.R., Nolta J.A., Fierro F.A. Hypoxic preconditioning of mesenchymal stromal cells induces metabolic changes, enhances survival, and promotes cell retention in vivo // *Stem Cells*. – 2015. – Vol. 33. – P. 1818–1828.
46. Bellayr I.H., Mu X., Li Y. Biochemical insights into the role of matrix metalloproteinases in regeneration: challenges and recent developments // *Future Medical Chemistry* – 2009. Vol. 1. – № 6. – P. 1095-1111.
47. Benoit Y.D., Lussier C., Ducharme P.A., Sivret S., Schnapp L.M., Basora N. Integrin alpha-8/beta-1 regulates adhesion, migration and proliferation of human intestinal crypt cells via a predominant RhoA/ROCK-dependent mechanism // *Biology of Cell*. – 2009. – Vol. 101. – № 12. – P. 695-708.
48. Berebichez-Fridman R., Montero-Olvera P.R. Sources and Clinical Applications of Mesenchymal Stem Cells // *Sultan Qaboos University Medical Journal*. – 2018. – Vol. 18. – № 3. – P. 264-277.
49. Berg J.T., Breen E.C., Fu Z., Mathieu-Costello O., West J.B. Alveolar hypoxia increases gene expression of extracellular matrix proteins and platelet-derived growth factor-B in lung parenchyma // *American journal of respiratory and critical care medicine*. – 1998. – Vol. 158. – № 6. – P. 1920–1928.

50. Bershadsky A.D., Balaban N.Q., Geiger B. Adhesion-dependent cell mechanosensitivity // *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. – 2003. – Vol. 19. – P.677–695.
51. Beyer C., Schett G., Gay S., Distler O., Distler J.H.W. Hypoxia in the pathogenesis of systemic sclerosis // *Arthritis Research & Therapy*. – 2009. – Vol. 11. – № 2. – P. 220.
52. Bornstein P. Diversity of function is inherent in matricellular proteins: an appraisal of thrombospondin 1 // *Journal of Cell Biology*. – 1995. – Vol. 130. – № 3. – P. 503-506.
53. Boudko S.P., Engel J., Bächinger H.P. The crucial role of trimerization domains in collagen folding // *International Journal of Biochemistry Cell Biology*. – 2012. – Vol. 44. – № 1. – P. 21-32.
54. Bradshaw A.D., Sage E.H. SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury // *Journal of Clinical Investigation*. – 2001. – Vol. 107. – № 9. – P. 1049-1054.
55. Braga C.L., da Silva L.R., Santos R.T., de Carvalho L.R.P, Mandacaru S.C., de Oliveira Trugilho M.R., Rocco P.R.M, Cruz F.F., Silva P.L. Proteomics profile of mesenchymal stromal cells and extracellular vesicles in normoxic and hypoxic conditions // *Cytotherapy*. – 2022. – Vol. 24. – № 12. – P. 1211-1224.
56. Brew K., Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2010. – Vol. 1803. – P. 55–71. doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.01.003.
57. Brinckmann J., Kim S., Wu J., Reinhardt D.P., Batmunkh C., Metzen E. Interleukin 4 and prolonged hypoxia induce a higher gene expression of lysyl hydroxylase 2 and an altered cross-link pattern: important pathogenetic steps in early and late stage of systemic scleroderma? // *Matrix Biology*. – 2005. – Vol. 24. – № 7. – P. 459–468.
58. Brown B.N., Valentin J.E., Stewart-Akers A.M., McCabe G.P., Badylak S.F. Macrophage phenotype and remodeling outcomes in response to biologic scaffolds with and without a cellular component // *Biomaterials*. – 2009. – Vol. 30. – № 8. – P. 1482-1491.
59. Buczek-Thomas J.A., Rich C.B., Nugent M.A. Hypoxia induced heparan sulfate primes the extracellular matrix for endothelial cell recruitment by facilitating VEGF-fibronectin interactions // *International Journal of Molecular Science*. – 2019. – Vol. 20. – № 20. – P. 50-65.
60. Buravkova L.B., Rylova Y.V., Andreeva E.R., Kulikov A.V., Pogodina (Lobanova) M.V., Zhivotovsky B., Gogvadze V. Low ATP level is sufficient to maintain the uncommitted state of multipotent mesenchymal stem cells // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2013. – V. 1830. – № 10. – P. 4418-25. 24
61. Burgstaller G., Sengupta A., Vierkotten S., Preissler G., Lindner M., Behr J., Königshoff M., Eickelberg O. Distinct niches within the extracellular matrix dictate fibroblast function in (cell free) 3D lung tissue cultures // *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. – 2018. – Vol. 314. – № 5. – P. 708-723.
62. Cabral-Pacheco G.A., Garza-Veloz I., Castruita-De la Rosa C., Ramirez-Acuña J.M., Perez-Romero B.A., Guerrero-Rodriguez J.F., Martinez-Avila N., Martinez-Fierro M.L. The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases // *International Journal of Molecular Science*. – 2020. – Vol. 21. – № 24. – P. 9739.
63. Caplan A.I. Mesenchymal stem cells: time to change the name! // *Stem Cells Translational Medicine*. – 2017. – Vol. 6. – № 6. – P. 1445-1451.
64. Caplan A.I., Correa D. The MSC: An Injury Drugstore Cell // *Stem Cell*. – 2011. – Vol. 9. – P. 11–15.
65. Carthy J.M., Abraham T., Meredith A.J., Boroomand S., McManus B.M. Versican localizes to the nucleus in proliferating mesenchymal cells // *Cardiovascular Pathology*. – 2015. – Vol. 24. – № 6. – P. 368-374.
66. Cescon M., Gattazzo F., Chen P., Bonaldo P. Collagen VI at a glance // *Journal of Cell Science*. – 2015. – Vol. 128. – № 19. P. 3525-3531.
67. Cha H.S., Jeon C.H., Choi H.J., Ahn K.S. , Song Y.W., Koh E.M. Regulation of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression by hypoxia in rheumatoid

- and osteoarthritis fibroblast-like synoviocytes // *The Journal of the Korean Rheumatism Association*. – 2003. – Vol. 10. – № 2. – P. 141-150.
68. Chang C., Yan J., Yao Z., Zhang C., Li X., Mao H.Q. Effects of mesenchymal stem cell-derived paracrine signals and their delivery strategies // *Advanced Healthcare Materials*. – 2021. – Vol. 10. – № 7. – P. e2001689.
69. Chen J., Liu Z., Hong M.M., Zhang H., Chen C., Xiao M., Wang J., Yao F., Ba M., Liu J., Guo Z.K., Zhong J. Proangiogenic compositions of microvesicles derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9. – № 12. – P. e115316.
70. Chen X.D., DuseviCh V., Feng J.Q., Manolagas S.C., Jilka R.L. 2007. ExtraCellular matrix made by bone marrow Cells faCilitates expansion of marrow-derived mesenChymal progenitor Cells and prevents their differentiation into osteoblasts // *Journal of Bone and Mineral Research*. – 1943. – Vol. 22. – № 12. – P. 1943.
71. Cho D.I., Kim M.R., Jeong H.Y., Jeong H.C., Jeong M.H., Yoon S.H. Mesenchymal stem cells reciprocally regulate the M1/M2 balance in mouse bone marrow-derived macrophages // *Experimental & Molecular Medicine*. – 2014. – Vol. 46. – P. e70.
72. Choi K.M., Seo Y.K., Yoon H.H., Song K.Y., Kwon S.Y., Lee H.S., Park J.K. Effect of ascorbic acid on bone marrow-derived mesenchymal stem cell proliferation and differentiation // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. – 2008. – Vol. 105. – № 6. – P. 586.
73. Choudhury D., Tun H.W., Wang T., Naing M.W. Organ-derived decellularized extracellular matrix: a game changer for bioink manufacturing? // *Trends in Biotechnology*. – 2018. – Vol. 36. – № 8. – P. 787–803.
74. Chow D.C.; Wenning L.A.; Miller W.M.; Papoutsakis E.T. Modeling pO₂ distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. I. Krogh's model // *Biophysical Journal*. – 2001. – Vol. 81. – P. 675-684.
75. Chung H., Multhaupt H.A.B., Oh E.S., Couchman J.R. Syndecans and their crucial roles during tissue regeneration // *FEBS Letters*. – 2016. – Vol. 590. – № 15. – P. 2408– 2417.
76. Chung M.I., Miao M., Stahl R.J., Chan E., Parkinson J., Keeley F.W. Sequences and domain structures of mammalian, avian, amphibian, and teleost tropoelastins: clues to the evolutionary history of elastin // *Matrix Biology*. – 2006. – Vol. 25. – P.495–504.
77. Cigognini D., Gaspar D., Kumar P., Satyam A., Alagesan S., Sanz-Nogués C., Griffin M., O'Brien T., Pandit A., Zeugolis D.I. Macromolecular crowding meets oxygen tension in human mesenchymal stem cell culture - A step closer to physiologically relevant in vitro organogenesis // *Science Reports*. – 2016. – Vol. 6. – P. 30746.
78. Claesson-Welsh L., Welsh M. VEGFA and tumour angiogenesis // *Journal International Medicine*. – 2013. – Vol. 273. – № 2. – P. 114-127.
79. Clause K.C., Barker T.H. Extracellular matrix signaling in morphogenesis and repair // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2013. – Vol. 24. – P. 830.
80. Cowden-Dahl K.D., Robertson S.E., Weaver V.M., Simon M.C. Hypoxia-inducible factor regulates alphav-beta3 integrin cell surface expression // *Molecular Biology of the Cell*. – 2005. – Vol. 16. – P. 1901.
81. Cox T.R., Bird D., Baker A-M., Barker H.E., Ho M.Y., Lang G., Erler J.T. LOX-mediated collagen crosslinking is responsible for fibrosis-enhanced metastasis // *Cancer Research*. – 2013. – V. 73. – № 6. – P. 1721.
82. Crisp M., Liu Q., Roux K., Rattner J.B., Shanahan C., Burke B. Coupling of the nucleus and cytoplasm: Role of the LINC complex // *Journal of Cell Biology*. – 2006. – Vol. 172. – № 1. – P. 41– 53.
83. da Silva Meirelles L., Chagastelles P.C., Nardi N.B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues // *Journal of Cell Science*. – 2006. – Vol. 119. – № 11. – P. 2204– 2213.
84. Dai J., Losy F., Guinault A.M., Pages C., Anegon I., Desgranges P., Becquemin J.P., Allaire E. Overexpression of transforming growth factor-beta1 stabilizes already-formed aortic aneurysms: a first

- approach to induction of functional healing by endovascular gene therapy // *Circulation*. – 2005. – Vol. 112. – P. 1008–1015.
85. Daley W.P., Peters S.B., Larsen M. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine // *Journal of Cell Science*. – 2008. – Vol. 121. – № 3. – P. 255.
 86. Danussi C., Del Bel Belluz L., Pivetta E., Modica T.M., Muro A., Wassermann B., Doliana R., Sabatelli P., Colombatti A., Spessotto P. EMILIN1/alpha9/beta1 integrin interaction is crucial in lymphatic valve formation and maintenance // *Molecular and Cellular Biology*. – 2013. – Vol. 33. – P. 4381–4394.
 87. De Rossi G.; Whiteford J.R. Syndecans in Angiogenesis and Endothelial Cell Biology // *Biochemical Society Transactions*. – 2014. – Vol. 42. – № 6. – P. 1643–1646.
 88. Dekker Y., Le Dévédec S.E., Danen E.H.J., Liu Q. Crosstalk between Hypoxia and Extracellular Matrix in the Tumor Microenvironment in Breast Cancer // *Genes*. – 2022. – Vol. 13. – P. 1585.
 89. Deschene K., Céleste C., Boerboom D., Theoret C.L. Hypoxia regulates the expression of extracellular matrix associated proteins in equine dermal fibroblasts via HIF1 // *Journal of Dermatological Science*. – 2012. – Vol. 65. – № 1. – P. 12.
 90. Dillenburg-Pilla P., Patel V., Mikelis C.M., Zárate-Bladés C.R., Doçi C.L., Amornphimoltham P., Wang Z., Martin D., Leelahavanichkul K., Dorsam R.T., Masedunskas A., Weigert R., Molinolo A.A., Gutkind J.S. SDF-1/CXCL12 induces directional cell migration and spontaneous metastasis via a CXCR4/Gai/mTORC1 axis // *FASEB Journal*. – 2015. – Vol. 29. – № 3. – P. 1056–1068.
 91. D'Ippolito G., Howard G.A., Roos B.A., Schiller P.C. Isolation and characterization of marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells // *Experimental Hematology*. – 2006. – Vol. 34. P. 1608–1610.
 92. Discher D.E., Mooney D.J., Zandstra P.W. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells // *Science*. – 2009. – V. 324. – P. 1673.
 93. Dominici M., Le B.K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D., Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement // *Cytherapy*. – 2006. – Vol. 8. – P. 315–317.
 94. Domogatskaya A., Rodin S., Tryggvason K. Functional diversity of laminins // *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. – 2012. – Vol. 28. – P. 523–553.
 95. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function // *Physiological Reviews*. – 2002. – Vol. 82. – № 1. – P. 47–95.
 96. Du H.C., Jiang L., Geng W.-X., Li J., Zhang R., Dang J.G., Li L.W. Evaluation of xenogeneic extracellular matrix fabricated from CoCl₂-conditioned mesenchymal stem cell sheets as a bioactive wound dressing material // *Journal of Biomaterials Applications*. – 2017. – Vol. 32. – № 4. – P. 472.
 97. Eckert R.L., Kaartinen M.T., Nurminskaya M., Belkin A.M., Colak G., Johnson G.V., Mehta K. Transglutaminase regulation of cell function // *Physiology Review*. – 2014. – Vol. 94. – № 2. – P. 383–417.
 98. Eisinger-Mathason T.S., Zhang M., Qiu Q., Skuli N., Nakazawa M.S., Karakasheva T., Mucaj V., Shay J.E., Stangenberg L., Sadri N., Puré E., Yoon S.S., Kirsch D.G., Simon M.C. Hypoxia-dependent modification of collagen networks promotes sarcoma metastasis // *Cancer Discovery*. – 2013. – Vol. 3. – № 10. – P. 1190.
 99. Ejtehadifar M., Shamsasenjan K., Movassaghpour A., Akbarzadehlaleh, P. The Effect of hypoxia on mesenchymal stem cell biology // *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. – 2015. – Vol. 5. – № 2. – P. 141–149.
 100. Eliasson P., Jonsson J.I. The hematopoietic stem cell niche: low in oxygen but a nice place to be // *Journal of Cellular Physiology*. – 2010. – Vol. 222. – № 1. – P. 17.
 101. Embree M.C., Kilts T.M., Ono M., Inkson C.A., Syed-Picard F., Karsdal M.A., Oldberg A., Bi Y., Young M.F. Biglycan and fibromodulin have essential roles in regulating chondrogenesis and extracellular matrix turnover in temporomandibular joint osteoarthritis // *American Journal of Pathology*. – 2010. – Vol. 176. – № 2. – P. 812–826.

102. Emerson R.O., Sage E.H., Ghosh J.G., Clark J.I. Chaperone-like activity revealed in the matricellular protein SPARC // *Journal of Cellular Biochemistry*. – 2006. – Vol. 98. – № 4. – P. 701-705.
103. Enes S.R., Emma Ahrman E., Palani A., Hallgren O., Bjerner L., Malmström A., Scheduling S., Malmström J., Westergren-Thorsson G. 2017. Quantitative proteomic characterization of lung-MSC and bone marrow-MSC using DIA-mass spectrometry // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7. – P. 9316.
104. Engler A.J., Sen S., Sweeney H.L., Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification // *Cell*. – 2006. – Vol. 126. – № 4. – P. 677–689.
105. Fehrer C., Brunauer R., Laschober G., Unterluggauer H., Reitingner S., Kloss F., Gully C., Gassner R., Lepperdinger G. Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan // *Aging of cell*. – 2007. – Vol. 6. – № 6. – P. 745-757.
106. Frantz C., Stewart K.M., Weaver V.M. The extracellular matrix at a glance // *Journal of Cell Science*. – 2010. – Vol. 123. – № 24. – P. 4195–4200.
107. Franzke C.W., Tasanen K., Schacke H., Zhou Z., Tryggvason K., Mauch C., Zigrino P., Sunnarborg S., Lee D.C., Fahrenholz F., Bruckner-Tuderman L. Transmembrane collagen XVII, an epithelial adhesion protein, is shed from the cell surface by ADAMs // *EMBO Journal*. – 2002. – Vol. 21. – P. 5026–5035.
108. Friedenstein A.J., Petrakova K.V., Kurolesova A.I., Frolova G.P. Heterotopic of bone-marrow: Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues // *Transplantation*. – 1968. – Vol. 6. – № 2. – P. 230.
109. Funkelstein L., Toneff T., Mosier C., Hwang S.R., Beuschlein F., Lichtenauer U.D., Reinheckel T., Peters C., Hook V. Major role of cathepsin L for producing the peptide hormones ACTH, beta-endorphin, and alpha-MSH, illustrated by protease gene knockout and expression // *Journal of Biological Chemistry*. – 2008. – Vol. 283. – P. 35652-35659.
110. Gabius H.J., André S., Jiménez-Barbero J., Romero A., Solís D. From lectin structure to functional glycomics: principles of the sugar code // *Trends of Biochemical Science*. – 2011. – Vol. 36. – № 6. P. 298-313.
111. Garg P., Yang S., Liu A., Pallero M.A., Buchsbaum D.J., Mosher D.F., Murphy-Ullrich J.E., Goldblum S.E. Thrombospondin-1 opens the paracellular pathway in pulmonary microvascular endothelia through EGFR/ErbB2 activation // *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. – 2011. – Vol. 301. – P. 79-90.
112. Gattazzo F., Urciuolo A., Bonaldo P. Extracellular matrix : A dynamic microenvironment for stem cell niche // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2014. – Vol. 1840. – № 8. – P. 2506–2519.
113. Ge L., Xun C., Li W., Jin S., Liu Z., Zhuo Y., Duan D., Hu Z., Chen P., Lu M. Extracellular vesicles derived from hypoxia-preconditioned olfactory mucosa mesenchymal stem cells enhance angiogenesis via miR-612 // *Journal of Nanobiotechnology*. – 2021. – Vol. 19. № 1. – P.380.
114. Geiger B., Yamada K.M. Molecular architecture and function of matrix adhesions // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2011. – Vol. 3. – № 5. – P. a005033.
115. Gilkes D.M., Bajpai S., Wirtz D., Gregg L. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) promotes extracellular matrix remodeling under hypoxic conditions by inducing // *Journal of Biological Chemistry*. – 2013. – Vol. 288. – P. 10819-10829.
116. Gilkes D.M., Wirtz D. Hypoxia and the extracellular matrix: drivers of tumour metastasis // *Nature Review Cancer*. – 2014. – Vol. 14. – № 6. – P. 430–439.
117. Gillies R.J., Gatenby R.A. Hypoxia and adaptive landscapes in the evolution of carcinogenesis // *Cancer Metastasis Review*. – 2007. – Vol. 26. – P. 311-317.
118. Gomez D.E., Alonso D.F., Yoshiji H., Thorgeirsson U.P. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions // *European Journal of Cell Biology*. – 1997. – Vol. 74. – P. 111–122.
119. Gonzalez M.W., Kann M.G. Chapter 4: Protein interactions and disease // *PLOS Computational Biology*. – 2012. – Vol 8. – № 12. – P. e1002819.

120. Gornostaeva A.N., Andreeva E.R., Bobyleva P.I., Buravkova L.B. Interaction of allogeneic adipose tissue-derived stromal cells and unstimulated immune cells in vitro: the impact of cell-to-cell contact and hypoxia in the local milieu // *Cytotechnology*. – 2018. – Vol. 70. – № 1. – P. 299-312.
121. Gornostaeva A.N., Bobyleva P.I., Andreeva E.R., Yakubets D.A., Buravkova L.B. Adipose-derived stromal cell immunosuppression of T cells is enhanced under "physiological" hypoxia // *Tissue and Cell*. – 2020. – Vol. 63. – P.101320.
122. Gowen B.B., Borg T.K., Ghaffar A., Mayer E.P. Selective adhesion of macrophages to denatured forms of type I collagen is mediated by scavenger receptors // *Matrix Biology*. – 2000. – Vol. 19. – P. 61.
123. Greenhill N.S., Rüger B.M., Hasan Q., Davis P.F. The alpha1 (VIII) and alpha2 (VIII) collagen chains form two distinct homotrimeric proteins in vivo // *Matrix Biology*. – 2000. – Vol. 19. – 1. – P. 19-28.
124. Guneta V., Zhou Z., Tan N.S., Sugii S., Wong M.T.C., Choong C. Recellularization of decellularized adipose tissue-derived stem cells: role of the cell-secreted extracellular matrix in cellular differentiation // *Biomaterials Science*. – 2017. – Vol. 6. – № 1. – P. 168.
125. Guzy R.D., Schumacker P.T. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia // *Experimental Physiology*. – 2006. – Vol. 91. – № 5. – P. 807-819.
126. Hadden W.J., Young J.L., Holle A.W., McFetridge M.L., Kim D.Y., Wijesinghe P., Taylor-Weiner H., Wen J.H., Lee A.R., Bieback K., Vo B.N., Sampson D.D., Kennedy B.F., Spatz J.P., Engler A.J., Choi Y.S. Stem cell migration and mechanotransduction on linear stiffness gradient hydrogels // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2017. – Vol. 114. – № 22. – P. 5647-5652.
127. Hadjipanayi E., Ananta M., Binkowski M., Streeter I., Lu Z., Cui Z.F., Brown R.A., Mudera V. Mechanisms of structure generation during plastic compression of nanofibrillar collagen hydrogel scaffolds: towards engineering of collagen // *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. – 2011. – Vol. 5. – № 7. – P. 505-519.
128. Hagmann S., Moradi B., Frank S., Dreher T., Kämmerer P.W., Richter W., Gotterbarm T. FGF-2 addition during expansion of human bone marrow-derived stromal cells alters MSC surface marker distribution and chondrogenic differentiation potential // *Cell Proliferation*. – 2013. – Vol 46. – № 4. – P. 396-407.
129. Halper J., Kjaer M. Basic components of connective tissues and extracellular matrix: elastin, fibrillin, fibulins, fibrinogen, fibronectin, laminin, tenascins and thrombospondins // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2013. – Vol. 802.– P. 31-47.
130. Hamada H., Kobune M., Nakamura K., Kawano Y., Kato K., Honmou O., Houkin K., Matsunaga T., Niitsu Y. Mesenchymal stem cells (MSC) as therapeutic cytoreagents for gene therapy. *Cancer Science*. 2005. – Vol. 96. – № 3. – P. 149-156.
131. Handsley M.M., Edwards D.R. Metalloproteinases and their inhibitors in tumor angiogenesis // *International Journal of Cancer*. – 2005. – Vol. 115. – P. 849-860.
132. Haque N., Rahman M.T., Abu Kasim N.H., Alabsi A.M. 2013. Hypoxic culture conditions as a solution for mesenchymal stem cell based regenerative therapy. *Scientific World Journal*. – 2013. – V. 2013. – P. 12.
133. Harris G.M., Madigan N.N., Lancaster K.Z., Enquist L.W., Windebank A.J., Schwartz J. Nerve guidance by a decellularized fibroblast extracellular matrix // *Matrix Biology*. – 2017. – Vol. 6. – P. 176-189.
134. Harris G.M., Raitman I., Schwarzbauer J.E. Cell-derived decellularized extracellular matrices // *Methods of Cell Biology*. – 2018. – Vol. 143. – P. 97-114.
135. Hashimoto Y., Funamoto S., Sasaki S., Honda T., Hattori S., Nam K., Kimura T., Mochizuki M., Fujisato T., Kobayashi H., Kishida A. Preparation and characterization of decellularized cornea using high-hydrostatic pressurization for corneal tissue engineering // *Biomaterials*. – 2010. – Vol. 31. – № 14. – P. 3941e8.

136. Hass R., Kasper C., Böhm S., Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC // *Cell Commun Signal.* – 2011. – Vol. 9. – P.12.
137. Haurigot V., Villacampa P., Ribera A., Bosch A., Ramos D., Ruberte J., Bosch F. Long-term retinal PEDF overexpression prevents neovascularization in a murine adult model of retinopathy // *PLoS ONE.* – 2012. – Vol. 7. – P. e41511.
138. Hawkrigde A.M. Practical Considerations and Current Limitations in Quantitative Mass Spectrometry-based Proteomics / Eyers C., Gaskell S.G. – ebook collection, series: New Developments in Mass Spectrometry. – 2014. – p. 3
139. He X., Cheng R., Benyajati S., Ma J.X. PEDF and its roles in physiological and pathological conditions: implication in diabetic and hypoxia-induced angiogenic diseases // *Clinical Science.* – 2015. – Vol. 128. – № 11. – P.805-23.
140. Heino J. The collagen family members as cell adhesion proteins // *Bioessays.* – 2007. – Vol. 29. – № 10. – P. 1001-1010.
141. Heissig B., Dhahri D., Eiamboonsert S., Salama Y., Shimazu H., Munakata S., Hattori K. Role of mesenchymal stem cell-derived fibrinolytic factor in tissue regeneration and cancer progression // *Cellular and Molecular Life Sciences.* – 2015. – 72. – Vol. 24. – P. 4759-4770.
142. Henry M.D., Campbell K.P. Dystroglycan: an extracellular matrix receptor linked to the cytoskeleton // *Current Opinion of Cell Biology.* – 1996. – Vol. 8. – № 5. – P. 625-631.
143. Hinek A. Biological roles of the non-integrin elastin/laminin receptor // *Journal of Biological Chemistry.* 1996. – Vol. 377. – № 7-8. – P. 471-480.
144. Hofer H.R., Tuan R.S. Secreted trophic factors of mesenchymal stem cells support neurovascular and musculoskeletal therapies // *Stem Cell Research & Therapy.* – 2016. – Vol. 7. – № 1. – P. 131.
145. Honey K., Rudensky A.Y. Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation // *Nature Review Immunology.* – 2003. – Vol. 3. – P. 472-482
146. Horiguchi M., Ota M., Rifkin D.B. Matrix control of transforming growth factor- β function // *Journal of Biochemistry.* – 2012. – Vol. 152. – № 4. – P. 321-329.
147. Hoshiba T., Chen G., Endo C., Maruyama H., Wakui M., Nemoto E., Kawazoe N., Tanaka M. Decellularized Extracellular Matrix as an In Vitro Model to Study the Comprehensive Roles of the ECM in Stem Cell Differentiation // *Stem Cells International.* – 2016. – Vol. 2016. – P. 6397820.
148. Hoshiba T., Lu H. Effects of extracellular matrices derived from different cell sources on chondrocyte functions // *Biotechnology Progress.* – 2011. – Vol. 27. – № 3. – P. 788.
149. Hoshiba T., Lu H., Kawazoe N., Chen G. Decellularized matrices for tissue engineering // *Expert Opinion on Biological Therapy.* – 2010. – Vol. 10. – № 12. – P. 1717.
150. Hou Y., Ryu C.H., Jun J.A., Kim S.M., Jeong C.H., Jeun S.S. IL-8 enhances the angiogenic potential of human bone marrow mesenchymal stem cells by increasing vascular endothelial growth factor // *International of Cell Biology.* – 2014. – Vol. 38. – P.1050–1059.
151. Hu X., Wu R., Shehadeh L. A., Zhou Q., Jiang C., Huang X., Wang J. Severe hypoxia exerts parallel and cell-specific regulation of gene expression and alternative splicing in human mesenchymal stem cells // *BMC Genomics.* – 2014. – Vol. 15. – P. 303.
152. Hung C., Linn G., Chow Y.H., Kobayashi A., Mittelsteadt K., Altemeier W.A., Gharib S.A., Schnapp L.M., Duffield J.S. Role of lung pericytes and resident fibroblasts in the pathogenesis of pulmonary fibrosis // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* – 2013. – Vol. 188. – № 7. P. 820-830.
153. Hussey G.S., Dziki J.L., Badylak S.F. Extracellular matrix-based materials for regenerative medicine // *Nature Review Materials.* – 2018. – Vol. 3. – P. 159–173.
154. Hynes R.O. The extracellular matrix: not just pretty fibrils // *Science.* – 2009. – Vol. 326. – № 5957. – P. 1216–1219.
155. Hynes R.O., Naba A. Overview of the matrisome--an inventory of extracellular matrix constituents and functions // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.* – 2011. – Vol. 4. – № 1. P. a004903–a004903.

156. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines // *Cell*. – 2002. – Vol. 110. № 6. – P.673-87.
157. Iozzo R.V., Schaefer L. Proteoglycan form and function: a comprehensive nomenclature of proteoglycans // *Matrix Biology*. – 2015. – Vol. 42. – P. 11-55.
158. Ivanovic Z. Hypoxia or in situ normoxia: the stem cell paradigm // *Journal of Cell Physiology*. – 2009. – Vol. 219. – P. 271–275.
159. Jabłońska-Trypuć A., Matejczyk M., Rosochacki S. Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs // *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. – 2016. – Vol. 31. P. 177-183.
160. Jacob A.L., Smith C., Partanen J., Ornitz D.M. Fibroblast growth factor receptor 1 signaling in the osteo-chondrogenic cell lineage regulates sequential steps of osteoblast maturation // *Developmental Biology*. – 2006. – Vol. 296. – № 2. – P. 315-328.
161. Jang J.M., Fu Z., Back M.J., Ha H.C., Shin I.C., Kang H.S., Kim H.Y., Ha H.J., Chung Y.K., Choi H.B., Kim D.K. Hyaluronan and proteoglycan link protein1 exhibits chondroregenerative ability in injury-induced osteoarthritic animals through ALK5-SMAD2 signaling in articular chondrocytes // *Osteoarthritis and Cartilage*. – 2021. – Vol. 29. – P. 117-118.
162. Jansen K.A., Atherton P., Ballestrem C. Mechanotransduction at the cell-matrix interface // *Seminars in Cell & Developmental Biology*. – 2017. Vol. 71. – P. 75-83.
163. Jariwala N., Ozols M., Bell M., Bradley E., Gilmore A., DeBelle L., Sherratt M.J. Matrikines as mediators of tissue remodelling // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2022. – Vol. 185. – P. 114240.
164. Jarvelainen H., Sainio A., Koulu M., Wight T.N., Penttinen R. Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy // *Pharmacological Reviews*. – 2009. – Vol. 61. – № 2. – P. 198–223.
165. Jean C., Gravelle P., Fournie J., Laurent G. Influence of stress on extracellular matrix and integrin biology // *Oncogene*. – 2011. – Vol. 30. – P. 2697.
166. Jenkins G. The role of proteases in transforming growth factor-beta activation // *International Journal of Biochemical Cell Biology*. – 2008. – Vol. 40. – № 6-7. – P. 1068-1078.
167. Jensen S.A., Handford P.A. New insights into the structure, assembly and biological roles of 10-12 nm connective tissue microfibrils from fibrillin-1 studies // *Biochemistry Journal*. – 2016. – Vol. 473. – № 7. – P. 827-838.
168. Jin P., Zhao Y., Liu H., Chen J., Ren J., Jin J., Bedognetti D., Liu S., Wang E., Marincola F., Stroncek D. Interferon- γ and tumor necrosis factor- α polarize bone marrow stromal cells uniformly to a th1 phenotype // *Scientific Report*. – 2016. – Vol. 6. – P. 26345.
169. Joddar B., Hoshiba T., Chen G., Ito Y. Cell culture using cell-derived substrates // *Biomaterials Science*. – 2014. – Vol. 2. – № 11. – P. 1595–1603.
170. Jose S., Hughbanks M.L., Binder B.Y., Ingavle G.C., Leach J.K. Enhanced trophic factor secretion by mesenchymal stem/stromal cells with Glycine-Histidine-Lysine (GHK)-modified alginate hydrogels // *Acta Biomaterials*. – 2014. – Vol. 10. – № 5. – P. 1955-1964.
171. Kadler K.E., Baldock C., Bella J., Boot-Handford R.P. Collagens at a glance // *Journal of Cell Science*. – 2007. – Vol. 120. – P. 1955-1958.
172. Kakudo N., Morimoto N., Ogawa T., Taketani S., Kusumoto K. Hypoxia enhances proliferation of human adipose-derived stem cells via hif-1 α activation // *PLoS One*. – 2015. – Vol. 10. – № 10. – P. e0139890.
173. Kalinina N., Klink G., Glukhanyuk E., Lopatina T., Efimenko A., Akopyan Z., Tkachuk V. Mir-92a regulates angiogenic activity of adipose-derived mesenchymal stromal cells // *Experimental Cell Research*. – 2015. – Vol. 339. – № 1. – P. 61-66.
174. Kalluri R. The biology and function of fibroblasts in cancer // *Nature Review Cancer*. – 2016. – Vol. 16. – P. 582.
175. Keane T.J., Swinehart I.T., Badylak S.F. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance // *Methods*. – 2015. – Vol. 84. – P. 25.
176. Keene D.R., Sakai L.Y., Burgeson R.E. Human bone contains type III collagen, type VI collagen, and fibrillin: type III collagen is present on specific fibers that may mediate attachment of

- tendons, ligaments, and periosteum to calcified bone cortex // *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. – 1991. – Vol. 39. – № 1. – P. 59-69.
177. Khan W.S., Adesida A.B., Tew S.R., Lowe E.T., Hardingham T.E. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells express the pericyte marker 3G5 in culture and show enhanced chondrogenesis in hypoxic conditions // *Journal of Orthopaedic Research*. – 2010. – Vol. 28. – N 6. – P. 834-840.
178. Kim B.S., Kim H., Gao G., Jang J., Cho D.-W. Decellularized extracellular matrix: a step towards the next generation source for bioink manufacturing // *Biofabrication*. – 2017. – Vol. 9. – № 3. – P. 034104.
179. Kim J., Ma T. Autocrine Fibroblast Growth Factor 2-Mediated interactions between human mesenchymal stem cells and the extracellular matrix under varying oxygen tension // *Journal of Cell Biochemistry*. – 2013. – Vol. 114. – P. 716–727.
180. Kim J.H., Dooling L.J., Asthagiri A.R. Intercellular mechanotransduction during multicellular morphodynamics // *Journal of The Royal Society Interface*. – 2010. – Vol. 7. – P. S341-350.
181. Kindstedt E., Holm C.K., Sulniute R., Martinez-Carrasco I., Lundmark R., Lundberg P. CCL11, a Novel Mediator of Inflammatory Bone Resorption // *Scientific Report*. – 2017. – Vol 7. – P. 5334.
182. Knight M.N., Hankenson K.D. Mesenchymal stem cells in bone regeneration // *Advances in Wound Care*. – 2013. – Vol 2. – P. 306–316.
183. Koers-Wunrau C., Wehmeyer C., Hillmann A., Pap T., Dankbar B. Cell surface-bound TIMP3 induces apoptosis in mesenchymal Cal78 cells through ligand-independent activation of death receptor signaling and blockade of survival pathways // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8. – № 7. – P.e70709.
184. Kolset S.O., Pejler G. Serglycin: a structural and functional chameleon with wide impact on immune cells // *Journal of Immunology*. – 2011. – Vol. 187. – P. 4927–4933.
185. Konson A., Pradeep S., D'Acunto C.W., Seger R. Pigment epithelium-derived factor and its phosphomimetic mutant induce JNK-dependent apoptosis and p38-mediated migration arrest // *Journal of Biological Chemistry*. – 2011. – Vol. 286. – P. 3540–3551.
186. Korpetinou A., Skandalis S.S., Labropoulou V.T., Smirlaki G., Noulas A., Karamanos N.K. Serglycin: at the crossroad of inflammation and malignancy // *Frontiers in Oncology*. – 2014. – Vol. 3. – P. 327.
187. Kuang P.P., Zhang X.H., Rich C.B., Foster J.A., Subramanian M., Goldstein R.H. Activation of elastin transcription by transforming growth factor-beta in human lung fibroblasts // *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. – 2007. Vol. 292. – P. L944–L952.
188. Kular J.K., Basu S., Sharma R.I. The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering // *Journal of Tissue Engineering*. – 2014. Vol. 5. – P. 2041731414557112.
189. Kulterer B., Friedl G., Jandrositz A., Sanchez-Cabo F., Prokesch A., Paar C., Scheideler M., Windhager R., Preisegger K.H., Trajanoski Z. Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation // *BMC Genomics*. – 2007. – Vol. 8. – P. 70.
190. Kumar L., Kandoi S., Misra R., Verma R. The mesenchymal stem cell secretome: a new paradigm towards cell-free therapeutic mode in regenerative medicine // *Cytokine and Growth Factor Review*. – 2019. – Vol. 46. – P. 1.
191. Kumar P., Satyam A., Cigognini D., Pandit A., Zeugolis D. I. Low oxygen tension and macromolecular crowding accelerate extracellular matrix deposition in human corneal fibroblast culture // *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. – 2018. – Vol. 12. – P. 6–18.
192. Kumar P., Satyam A., Fan X., Rochev Y., Rodriguez B.J., Gorelov A., Joshi L., Raghunath M., Pandit A., Zeugolis D.I. Accelerated development of supramolecular corneal stromal-like assemblies from corneal fibroblasts in the presence of macromolecular crowders // *Tissue Engineering, Part C*. – 2015. – Vol. 21. – № 7. P. 660.

193. Kusuma G.D., Brennecke S.P., Connor A.J., Kalionis B., Heath E. Decellularized extracellular matrices produced from immortal cell lines derived from different parts of the placenta support primary mesenchymal stem cell expansion // *PLoS ONE*. – 2017. – Vol. 12. – № 2. – P. e0171488.
194. Kutys M.L., Doyle A.D., Yamada K.M. Regulation of cell adhesion and migration by cell-derived matrices // *Experimental Cell Research*. – 2013. – Vol. 319. – № 16. – P. 2434-2439.
195. Kwaan H.C. The role of fibrinolytic system in health and disease // *International Journal of Molecular Science*. – 2022. – Vol. 23. – № 9. – P. 5262.
196. Kwon S.G., Kwon Y.W., Lee T.W., Park G.T., Kim J.H. Recent advances in stem cell therapeutics and tissue engineering strategies // *Biomaterials Research*. – 2018. – Vol. 22. – P. 36.
197. Kwon S.H., Lee T.J., Park J., Hwang L.E., Jin M., Jang H.K., Hwang N.S., Kim B.S. Modulation of BMP-2-induced chondrogenic versus osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by cell-specific extracellular matrices // *Tissue Engineering, Part A*. – 2013. – Vol. 19. – № 1-2. – P. 49.
198. Lai Y., Sun Y., Skinner C.M., Son E.L., Lu Z., Tuan R.S., Jilka R.L., Ling J., Chen X.D. Reconstitution of marrow-derived extracellular matrix ex vivo: a robust culture system for expanding large-scale highly functional human mesenchymal stem cells // *Stem Cells Development*. – 2010. – Vol. 19. – № 7. – 1095-1107.
199. Law R.H., Abu-Ssaydeh D., Whisstock J.C. New insights into the structure and function of the plasminogen/plasmin system // *Current Opinion of Structure Biology*. – 2013. – Vol. 23. – № 6. – P. 836-841.
200. Le Blanc K., Tammik C., Rosendahl K., Zetterberg E., Ringdén O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells // *Experimental Hematology*. – 2003. – Vol. 31. – № 10. – P. 890-896.
201. Lee J.H., Kemp D.M. Human adipose-derived stem cells display myogenic potential and perturbed function in hypoxic conditions // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2006. – Vol. 341. – P. 882-888.
202. Lee-Thedieck C., Schertl P., Klein G. The extracellular matrix of hematopoietic stem cell niches // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2022. – Vol. 181. – P. 114069.
203. Leitinger B. Discoidin domain receptor functions in physiological and pathological conditions // *International Review of Cell and Molecular Biology*. – 2014. – Vol. 310. – P. 39– 87.
204. Leto Barone A.A., Khalifian S., Lee W.P., Brandacher G. Immunomodulatory effects of adipose-derived stem cells: fact or fiction? // *BioMed Research International*. – 2013. – Vol. 2013. – P. 383685.
205. Li D.X., Ma Z., Szojka A.R., Lan X., Kunze M., Mulet-Sierra A., Westover L., Adesida A.B. Non-hypertrophic chondrogenesis of mesenchymal stem cells through mechano-hypoxia programming // *Journal of Tissue Engineering*. – 2023. – Vol. 14. – P. 20417314231172574.
206. Liguori T.T.A., Liguori G.R., van Dongen J.A., Moreira L.F.P., Harmsen M.C. Bioactive decellularized cardiac extracellular matrix-based hydrogel as a sustained-release platform for human adipose tissue-derived stromal cell-secreted factors // *Biomedical Materials*. – 2021. – Vol. 16. – № 2. – P.025022.
207. Lin H., Yang G., Tan J., Tuan R.S. Influence of decellularized matrix derived from human mesenchymal stem cells on their proliferation, migration and multi-lineage differentiation potential // *Biomaterials*. – 2012. – Vol. 33. – № 18. – P. 4480.
208. Lin T.M., Tsai J.L., Lin S.D., Lai C.S., Chang C.C. Accelerated growth and prolonged lifespan of adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells in a medium using reduced calcium and antioxidants // *Stem Cell Development*. – 2005. – Vol. 14. – P. 92.
209. Lindner U., Kramer J., Behrends J., Driller B., Wendler N., Boehrsen F., Rohwedel J.U.R., Schlenke P. Improved proliferation and differentiation capacity of human mesenchymal stromal cells cultured with basement-membrane extracellular matrix proteins // *Cytherapy*. – 2010. – Vol. 12. – P. 992.
210. Liu X., Zhou L., Chen X., Liu T., Pan C., Cui W., Li M., Pei M., Yang H., Gong Y., He F. Culturing on decellularized extracellular matrix enhances antioxidant properties of human umbilical

- cord-derived mesenchymal stem cells // *Materials Science and Engineering: C*. – 2016. Vol. 61. – P. 437.
211. Lu P., Takai K., Weaver V.M., Werb Z. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease // *Cold Spring Harb Perspect Biology*. – 2011. – Vol. 3. – № 12. – P. a005058.
212. Macri L., Silverstein D., Clark R. growth factor binding to the pericellular matrix and its importance in tissue engineering // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2007. – Vol. 59. – № 13. – P. 1366–1381.
213. Maeda N. Proteoglycans and neuronal migration in the cerebral cortex during development and disease // *Frontiers in Neuroscience*. – 2015. – Vol. 9. – P.98.
214. Mahmoud R.K., El-Ansary A.K., El-Eishi H.H., Kamal H.M., El-Saeed N.H. Matrix metalloproteinases MMP-3 and MMP-1 levels in sera and synovial fluids in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis // *Italian Journal of Biochemistry*. – 2005. – Vol. 54. – P. 248.
215. Makris E.A., Hu J.C., Athanasiou K.A. Hypoxia-induced collagen crosslinking as a mechanism for enhancing mechanical properties of engineered articular cartilage // *Osteoarthritis Cartilage*. – 2013. – Vol. 21. – № 4. – P. 634-641.
216. Mandelin J., Hukkanen M., Li T.F., Korhonen M., Liljeström M., Sillat T., Hanemaaijer R., Salo J., Santavirta S., Kontinen Y.T. Human osteoblasts produce cathepsin K // *Bone*. – 2006. – vol. 38. – № 6. – P. 769-77.
217. Mannino G., Russo C., Maugeri G., Musumeci G., Vicario N., Tibullo D., Giuffrida R., Parenti R., Lo Furno D. Adult stem cell niches for tissue homeostasis // *Journal of Cell Physiology*. – 2022. – Vol. 237. – № 1. – P. 239-257.
218. Maria C., Cristina G., Antonio C., Vincenzo I., Claudio F., Stefano Sa. GDF15 - an emerging key player in human aging // *Aging Research Reviews*. – 2022. – Vol. 75. – P. 101569.
219. Marinkovic M., Blocka T.J., Rakian R., Lic Q., Wangd E., Reilly M.A., Deana D.D., Chen X.D. One size does not fit all: developing a cell-specific niche for in vitro study of cell behavior // *Matrix Biology*. – 2016. – Vol. 52-54. – P. 426.
220. Matsui T., Higashimoto Y., Taira J., Yamagishi S. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) binds to caveolin-1 and inhibits the pro-inflammatory effects of caveolin-1 in endothelial cells // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2013. – Vol. 441. – P. 405–410.
221. Matveeva D., Buravkov S., Andreeva E., Buravkova L. Hypoxic Extracellular Matrix Preserves Its Competence after Expansion of Human MSCs under Physiological Hypoxia In Vitro // *Biomimetics (Basel)*. – 2023. – Vol. 8. – № 6. P. 476.
222. McAllister T.N., Maruszewski M., Garrido S.A., Wystrychowski W., Dusserre N., Marini A., Zagalski K., Fiorillo A., Avila H., Mangano X., Antonelli J., Kocher A., Zembala M., Cierpka L., de la Fuente L.M., L'heureux N. Effectiveness of haemodialysis access with an autologous tissue-engineered vascular graft: a multicentre cohort study // *Lancet*. – 2009. – Vol. 373. – № 9673. – P. 1440-1446.
223. McCulloch L.J., Rawling T.J., Sjöholm K., Franck N., Dankel S.N., Price E.J., Knight B., Liversedge N.H., Mellgren G., Nystrom F. COL6A3 Is regulated by leptin in human adipose tissue and reduced in obesity // *Endocrinology*. – 2015. – Vol. 156. – P. 134-146.
224. McQuitty C.E., Williams R., Chokshi S., Urbani L. Immunomodulatory role of the extracellular matrix within the liver disease microenvironment // *Frontiers of Immunology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 574276.
225. Mecham R.P., Gibson M.A. The microfibril-associated glycoproteins (MAGPs) and the microfibrillar niche // *Matrix Biology*. – 2015. – Vol. 47. – P. 13-33.
226. Merceron C., Vinatier C., Portron S., Masson M., Amiaud J., Guigand L., Chérel Y., Weiss P., Guicheux J. Differential effects of hypoxia on osteochondrogenic potential of human adipose-derived stem cells // *Am J Physiol Cell Physiol*. – 2010. – Vol. 298. – № 2. – P. 355-364.
227. Miceli V., Bulati M., Iannolo G., Zito G., Gallo A., Conaldi P.G. Therapeutic properties of mesenchymal stromal/stem cells: the need of cell priming for cell-free therapies in regenerative medicine // *International Journal of Molecular Science*. – 2021. – Vol. 22. № 2. P. 763.

228. Miljkovic-Licina M., Hammel P., Garrido-Urbani S., Bradfield P.F., Szeptowski P., Imhof B.A. Sushi repeat protein X-linked 2, a novel mediator of angiogenesis // *FASEB Journal*. – 2009. – Vol. 23. – № 12. – P. 4105-4116.
229. Milner R., Hung S., Erokwu B., Dore-Duffy P., LaManna J.C., del Zoppo G.J. Increased expression of fibronectin and the alpha 5 beta 1 integrin in angiogenic cerebral blood vessels of mice subject to hypobaric hypoxia // *Molecular and Cellular Neuroscience*. – 2008. – Vol. 38. – P. 43.
230. Misra S., Hascall V.C., Markwald R.R., Ghatak S. Interactions between Hyaluronan and Its Receptors (CD44, RHAMM) Regulate the Activities of Inflammation and Cancer // *Frontiers in Immunology*. – 2015. – Vol. 6. – P. 201.
231. Mitola S., Ravelli C., Moroni E., Salvi V., Leali D., Ballmer-Hofer K., Zammataro L., Presta M. Gremlin is a novel agonist of the major proangiogenic receptor VEGFR2 // *Blood*. – 2010. – Vol. 116. – P. 3677–3680.
232. Mohamed M.M., Sloane B.F. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer // *Nature Review Cancer*. – 2006. – Vol. 6. – P. 764-775.
233. Monici M. Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications // *Biotechnology Annual Review*. – 2005. – Vol. 11. – P. 227-256.
234. Moon R.T., Kohn A.D., De Ferrari G.V., Kaykas A. WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies // *Nature Reviews Genetics*. – 2004. – Vol. 5. – № 9. – P. 691-701.
235. Mouw J.K., Ou G., Weaver V.M. Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2014. – Vol. 15. – № 12. – P. 771-785.
236. Muncie J.M., Weaver V.M. The Physical and Biochemical Properties of the Extracellular Matrix Regulate Cell Fate // *Current Topics in Developmental Biology*. – 2018. – Vol. 130. P. 1-37.
237. Munoz-Najar U.M., Neurath K.M., Vumbaca, F., Claffey, K.P. Hypoxia stimulates breast carcinoma cell invasion through MT1-MMP and MMP2 activation // *Oncogene*. – 2006. – Vol. 25. – P. 2379–2392.
238. Murphy-Ullrich J.E., E.H. Sage Revisiting the matricellular concept // *Matrix Biology*. – 2014. – Vol. 37. – P. 1-14
239. Murray I.R., Péault B. Mesenchymal stem cells - where do they come from and is it important? // *BMC Biology*. – 2015. – Vol. 13. – P. 99.
240. Mussano F., Genova T., Petrillo S., Roato I., Ferracini R., Munaron L. Osteogenic differentiation modulates the cytokine, chemokine, and growth factor profile of ASCs and SHED // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2018. – Vol. 19. – P. 1454.
241. Mwale F., Ciobanu I., Giannitsios D., Roughley P., Steffen T., Antoniou J. Effect of oxygen levels on proteoglycan synthesis by intervertebral disc cells // *Spine*. – 2011. – Vol. 36. – № 2. – P. 131–138.
242. Myllyharju J., Kivirikko K.I. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms // *Trend in Genetics*. – 2004. – Vol. 20. – P. 33–43.
243. Naba A., Clauser K.R., Ding H., Whittaker C.A., Carr S.A., Hynes R.O. The extracellular matrix: Tools and insights for the "omics" era // *Matrix Biology*. – 2016. – Vol. 49. – P. 10-24.
244. Nagamura-Inoue T., He H. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility // *World Journal of Stem Cells*. – 2014. – Vol. 6. – P. 195.
245. Neuhuber B., Swanger S. A., Howard L., Mackay A., Fischer I. Effects of plating density and culture time on bone marrow stromal cell characteristics // *Experimental Hematology*. – 2008. – Vol. 6. – P. 1176–1185.
246. Ng C.P., Mohamed Sharif, A.R., Heath, D.E., Chow, J.W., Zhang, C.B., Chan-Park, M.B., Griffith, L.G. Enhanced ex vivo expansion of adult mesenchymal stem cells by fetal mesenchymal stem cell ECM // *Biomaterials*. – 2014. – Vol. 35. – № 13. – P. 4046–4057.
247. Noronha N.D.C., Mizukami A., Caliári-Oliveira C., Cominal J.G., Rocha J.L.M., Covas, D.T., Swiech K., Malmegrim K.C.R. Priming approaches to improve the efficacy of mesenchymal stromal cell-based therapies // *Stem Cell Research*. – 2019. – Vol. 10. – P. 131.
248. Noth U., Rackwitz L., Steinert A.F., Tuan R.S. Cell delivery therapeutics for musculoskeletal regeneration // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2010. – Vol. 62. – № 7-8. – P. 765.

249. Novoseletskaia E., Grigorieva O., Nimiritsky P., Basalova N., Eremichev R., Milovskaya I., Kulebyakin K., Kulebyakina M., Rodionov S., Omelyanenko N., Efimenko A. Mesenchymal Stromal Cell-Produced Components of Extracellular Matrix Potentiate Multipotent Stem Cell Response to Differentiation Stimuli // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2020. – Vol. 8. – P.555378.
250. Novoseletskaia E.S., Evdokimov P.V., Efimenko A.Y. Extracellular matrix-induced signaling pathways in mesenchymal stem/stromal cells // *Cell Communication Signal*. – 2023. – Vol. 21. – № 1. – P. 244.
251. Nozaki M., Sakurai E., Raisler B.J., Baffi J.Z., Witta J., Ogura Y., Brekken R.A., Sage E.H., Ambati B.K., Ambati J. Loss of SPARC-mediated VEGFR-1 suppression after injury reveals a novel antiangiogenic activity of EGF-A // *Journal of Clinical Investigation*. – 2006. – Vol. 116. – P. 422.
252. Omelyanenko N., Slutsky L., Mironov S. *Connective Tissue: Histophysiology, Biochemistry, Molecular Biology* / ed. Mironov S. Boca Raton: CRC Press, 2014. 604 p.
253. Ornitz D.M., Itoh N. Fibroblast growth factors // *Genome Biology*. – 2001. – Vol. 2. – № 3. – P. 3005.
254. Orciani M., Di Primio R. Skin-derived mesenchymal stem cells: isolation, culture, and characterization // *Methods of Molecular Biology*. – 2013. – Vol. 989. – P. 275.
255. Owada K., Sanjo N., Kobayashi T., Mizusawa H., Muramatsu H., Muramatsu T., Michikawa M. Midkine inhibits caspase-dependent apoptosis via the activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase in cultured neurons // *Journal of Neurochemistry* – 1999. – Vol. 73. – № 5. – P. 2084-2092.
256. Page-McCaw A., Ewald A.J., Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling // *Nature Review Molecular Cell Biology*. – 2007. – Vol. 8. – № 3. – P. 221-233.
257. Paiva K.B.S., Maas C.S., Dos Santos P.M., Granjeiro J.M., Letra A. Extracellular matrix composition and remodeling: current perspectives on secondary palate formation, cleft lip/palate, and palatal reconstruction // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2019. – Vol. 7. – P. 340.
258. Park H., Kim C.H., Jeong J.H., Park M., Kim K.S. GDF15 contributes to radiation-induced senescence through the ROS-mediated p16 pathway in human endothelial cells // *Oncotarget*. – 2016. – Vol. 7. – № 9. – P. 9634-9644.
259. Park M.S., Kim Y.H., Jung Y., Kim S.H., Park J.C., Yoon D.S., Kim S.-H., Lee J.W. In situ recruitment of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells using chemokines for articular cartilage regeneration // *Cell Transplantation*. – 2015. – Vol. 24. – P. 1067–1083.
260. Pasarica M., Sereda O.R., Redman L.M. Reduced adipose tissue oxygenation in human obesity evidence for rarefaction, macrophage chemotaxis, and inflammation without an angiogenic response // *Diabetes*. – 2009. – Vol. 58. – № 3. – P. 718.
261. Pattappa G., Schewior R., Hofmeister I., Seja J., Zellner J., Johnstone B., Docheva D., Angele P. Physioxia has a beneficial effect on cartilage matrix production in interleukin-1 beta-inhibited mesenchymal stem cell chondrogenesis // *Cells*. – 2019. – Vol. 8. – № 8. – P. 936.
262. Pawłowski K., Muszewska A., Lenart A. et al. A widespread peroxiredoxin-like domain present in tumor suppression- and progression-implicated proteins // *BMC Genomics*. – 2010. – Vol. 11. – P. 590-608.
263. Pei M. Environmental preconditioning rejuvenates adult stem cells proliferation and chondrogenic potential // *Biomaterials*. – 2017. – Vol. 117. – P. 10.
264. Pei M., He F., Kish V.L. Expansion on extracellular matrix deposited by human bone marrow stromal cells facilitates stem cell proliferation and tissue-specific lineage potential // *Tissue Engineering, Part A*. – 2011. – Vol. 17. – № 23. – P. 3067.
265. Pei M., Shoukry M., Li J., Daffner S.D., France J.C., Emery S.E. Modulation of in vitro microenvironment facilitates synovium-derived stem cell-based nucleus pulposus tissue regeneration // *Spine*. – 2012. – Vol. 37. – № 18. – P. 1538.
266. Pelekanos R.A., Sardesai V.S., Futrega K., Lott W.B., Kuhn M., Doran M.R. Isolation and expansion of mesenchymal stem/stromal cells derived from human placenta tissue // *Journal of Visualized Experiments*. – 2016. – Vol. 112. – P. 54204.

267. Petrova V., Annicchiarico-Petruzzelli M., Melino G., Amelio I. The Hypoxic tumour microenvironment // *Oncogenesis*. – 2018. – Vol. 7. – P. 10.
268. Pittenger M.F., Discher D.E., Péault B.M., Phinney D.G., Hare J.M., Caplan A.I. Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress // *NPJ Regenerative Medicine*. – 2019. – Vol. 4. – P. 22.
269. Pizzute T., Lynch K., Pei M. Impact of tissue-specific stem cells on lineage specific differentiation: a focus on musculoskeletal system // *Stem Cell Reviews and Reports*. – 2015. – Vol. 11. – P. 119.
270. Ponta H., Sherman L., Herrlich P. A. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2003. – Vol. 4. – № 1. – P. 33–45.
271. Potts J.R., Campbell I.D. Fibronectin structure and assembly // *Current Opinion of Cell Biology*. – 1994. – Vol. 6. P. 648–655.
272. Prewitz M.C., Seib F.P., von Bonin M., Friedrichs J., Stißel A., Niehage C., Werner C. Tightly anchored tissue-mimetic matrices as instructive stem cell microenvironments // *Nature Methods*. – 2013. – Vol. 10. – № 8. – P. 788–794.
273. Prockop D. J., Sekiya I., Colter D. C. Isolation and characterization of rapidly self-renewing stem cells from cultures of human marrow stromal cells // *Cytherapy*. – 2001. Vol. 3. – P. 393–396.
274. Qi J.H., Anand-Apte B. Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP3) promotes endothelial apoptosis via a caspase-independent mechanism // *Apoptosis*. – 2015. – Vol. 20. – № 4. – P. 523–34.
275. Quint C., Arief M., Muto A., Dardik A., Niklason L.E. Allogeneic human tissue-engineered blood vessel // *Journal of Vascular Surgery*. – 2012. – Vol. 55. – № 3. – P. 790–798.
276. Quint C., Kondo Y., Manson R.J., Lawson J.H., Dardik A., Niklason L.E. Decellularized tissue-engineered blood vessel as an arterial conduit // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2011. – Vol. 108. – № 22. – P. 9214–9219.
277. Ra H. J., Parks W.C. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity // *Matrix Biology*. – 2007. – Vol. 26. – P. 587–596.
278. Ragelle H., Naba A., Larson B.L., Zhou F., Prijić M., Whittaker C.A., Anderson D.G. Comprehensive proteomic characterization of stem cell-derived extracellular matrices // *Biomaterials*. – 2017. – Vol. 128. – P. 147.
279. Raghunathan R., Sethi M.K., Klein J.A., Zaia J. Proteomics, Glycomics, and Glycoproteomics of Matrisome Molecules // *Molecular Cell Proteomics*. – 2019. – Vol. 18. – № 11. – P. 2138–2148.
280. Rakian R., Block T.J., Johnson S.M., Marinkovic M., Wu J., Dai Q., Dean D.D., Chen X.-D. Native extracellular matrix preserves mesenchymal stem cell “stemness” and differentiation potential under serum-free culture conditions // *Stem Cell Research and Therapy*. – 2015. – Vol. 6. – № 1. – P. 235.
281. Rao Patabhi S., Martinez J.S., Keller T.C. Decellularized ECM effects on human mesenchymal stem cell stemness and differentiation // *Differentiation*. – 2014. – Vol. 88. – № 4-5. – P. 131.
282. Rawlings D., Barrett A.J., Bateman A. MEROPS: the peptidase database // *Nucleic Acids Research*. – 2010. – Vol. 38. – P. 227–233.
283. Rayahin J.E., Buhrman J.S., Zhang Y., Koh T.J., Gemeinhart R.A. High and low molecular weight hyaluronic acid differentially influence macrophage activation // *ACS Biomaterials Science and Engineering*. – 2015. – Vol. 1. – № 7. – P. 481.
284. Reichenberger E., Aigner T., von der Mark K., Stöss H., Bertling W. In situ hybridization studies on the expression of type X collagen in fetal human cartilage // *Development Biology*. – 1991. – Vol. 148. – № 2. – P. 562–572.
285. Reiss K., Saftig P. The "a disintegrin and metalloprotease" (ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions // *Seminars in Cell & Developmental Biology*. – 2009. – Vol. 20. – № 2. – P. 126–137.

286. Riis S., Stensballe A., Emmersen J., Pennisi C. P., Birkelund S., Zachar V. Mass spectrometry analysis of adipose- derived stem cells reveals a significant effect of hypoxia on pathways regulating extracellular matrix // *Stem Cell Research & Therapy*. – 2016. – Vol. 7. – № 1. – P. 1–14.
287. Riveline D., Zamir E., Balaban N.Q., Schwarz U.S., Ishizaki T., Narumiya S., Kam Z., Geiger B. and Bershadsky A.D. Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism // *Journal of Cell Biology*. – 2001. – Vol. 153. – P. 1175–1186.
288. Robey I.F., Lien A.D., Welsh S.J., Baggett B.K., Gillies R.J. Hypoxia-inducible factor-1alpha and the glycolytic phenotype in tumors // *Neoplasia*. – 2005. – Vol. 7. – № 4. – P. 324–330.
289. Rolandsson S.E., Sjöland A.A., Skog I., Hansson L., Larsson H., Le Blanc K., Eriksson L., Bjermer L., Scheding S., Westergren-Thorsson G. MSC from fetal and adult lungs possess lung-specific properties compared to bone marrow-derived MSC // *Scientific Report*. – 2016. – Vol. 6. – P. 29160.
290. Rosset E.M., Bradshaw A.D. SPARC/osteonectin in mineralized tissue // *Matrix Biology*. – 2016. Vol. 52–54. – № 78–87. – P. 1–16.
291. Rozario T., DeSimone D.W. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view // *Development Biology*. – 2010. – Vol. 341. – № 1. – P. 126.
292. Russell K.C., Phinney D.G., Lacey M.R., Barrilleaux B.L., Meyertholen K.E., O'Connor K.C. In vitro high-capacity assay to quantify the clonal heterogeneity in trilineage potential of mesenchymal stem cells reveals a complex hierarchy of lineage commitment // *Stem Cells*. – 2010. – Vol. 28. – № 4 – P. 788–798.
293. Sabatier L., Chen D., Fagotto-Kaufmann C., Hubmacher D., McKee M.D., Annis D.S., Mosher D.F., Reinhardt D.P. Fibrillin assembly requires fibronectin // *Molecular Biology of Cell*. – 2009. – Vol. 20. – P. 846–858.
294. Saed G.M., Diamond D. Hypoxia-induced irreversible up-regulation of type I collagen and transforming growth factor in human peritoneal fibroblasts // *Journal of Biomedical Science*. – 2008. – Vol. 78. – № 1. – P. 144.
295. Sagaradze G.D., Basalova N.A., Efimenko A.Y., Tkachuk V.A. Mesenchymal Stromal Cells as Critical Contributors to Tissue Regeneration // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2020. – Vol. 8. – P. 576176.
296. Salim A., Nacamuli R.P., Morgan E.F., Giaccia A.J., Longaker M.T. Transient changes in oxygen tension inhibit osteogenic differentiation and Runx2 expression in osteoblasts // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. Vol. 279. – № 38. – P. 40007–40016.
297. San Antonio J.D., Des Parkin J., Savige J., Orgel J.P.R.O., Jacenko O. Collagen interactomes: mapping functional domains and mutations on fibrillar and network-forming collagens // *Pathobiology*. – 2012. – P. 575–591.
298. Sarrazin S., Lamanna W.C., Esko J.D. Heparan sulfate proteoglycans // *Cold Spring Harb Perspective Biology*. – 2011. – Vol. 3. – P. 1–33.
299. Sasikumar S., Chameettachal S., Cromer B., Pati F., Kingshott P. Decellularized extracellular matrix hydrogels—cell behavior as a function of matrix stiffness // *Current Opinion in Biomedical Engineering*. – 2019. – Vol. 10. – P. 123–133.
300. Savoca M.P., Tonoli E., Atobatele A.G., Verderio E.A.M. Biocatalysis by transglutaminases: a review of biotechnological applications // *Micromachines (Basel)*. – 2018. – Vol. 9. – № 11. – P.562.
301. Schaller J., Gerber S.S. The plasmin-antiplasmin system: structural and functional aspects // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2011. – Vol. 68. – P. 785–801.
302. Schiemann B.J., Neil J.R., Schiemann W.P. SPARC inhibits epithelial cell proliferation in part through stimulation of the transforming growth factor-beta-signaling system // *Molecular Biology of the Cell*. – 2003. – Vol. 14. – № 10. – P. 3977–3988.
303. Schultz G.S., Wysocki A. Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing // *Wound Repair and Regeneration*. – 2009. – Vol. 17. – № 2. – P. 153– 162.

304. Sears V., Ghosh G. Harnessing mesenchymal stem cell secretome: Effect of extracellular matrices on proangiogenic signaling // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2020. – Vol. 117. № 4. – P. 1159-1171.
305. Semenza G.L. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine // *Cell*. – 2015. – Vol. 148. – № 3. – P. 399.
306. Shabbir A., Cox A., Rodriguez-Menocal L., Salgado M., Van Badiavas E. Mesenchymal stem cell exosomes induce proliferation and migration of normal and chronic wound fibroblasts, and enhance angiogenesis in vitro // *Stem Cells Development*. – 2015. – Vol. 24. – P. 1635-1647.
307. Shang J., Liu H., Li J., Zhou Y. Roles of hypoxia during the chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells // *Current Stem Cells Research and Therapy*. – 2014. – Vol. 9. – № 2. – P. 141-147.
308. Shao X., Taha I.N., Clauser K.R., Gao Y., Naba A. MatrisomeDB: the ECM-protein knowledge database // *Nucleic Acids Research*. – 2019. – Vol. 8. – № 48. – P. D1136-D1144.
309. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor (VEGFR) signaling in angiogenesis: a crucial target for anti- and pro-angiogenic therapies // *Genes and Cancer*. – 2011. – Vol. 2. – № 12. – P. 1097-1105.
310. Shoulders M.D., Raines R.T. Collagen structure and stability // *Annual Review of Biochemistry*. – 2009. – Vol. 78. – P. 929-958.
311. Sivaraman K., Shanthi C. Matrikines for therapeutic and biomedical applications // *Life Science*. – 2018. – Vol. 214. – P. 22-33.
312. Smith L.R., Cho S., Discher D.E. Stem cell differentiation is regulated by extracellular matrix mechanics // *Physiology*. – 2018. – Vol. 33. – № 1. P. 16-23.
313. Snoek-van Beurden P.A., Von den Hoff J.W. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors // *Bio-techniques*. – 2005. – Vol. 38. – № 1. – P. 73-83.
314. Sorokin L. The impact of the extracellular matrix on inflammation // *Nature Review of Immunology*. – 2010. – Vol. 10. – № 10. – P. 712.
315. Spencer J.A., Ferraro F., Roussakis E., Klein A., Wu J., Runnels J.M., Zaher W., Mortensen L.J., Alt C., Turcotte R. Direct Measurement of Local Oxygen Concentration in the Bone Marrow of Live Animals // *Nature*. – 2014. – Vol. 508. – P. 269-273.
316. Spofford C.M., Chilian W.M. The elastin-laminin receptor functions as a mechanotransducer in vascular smooth muscle // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. – 2001. – Vol. 280. – № 3. – P. 1354-1360.
317. Sternlicht M.D., Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior // *Annual Review of Cell Development Biology*. – 2001. – Vol. 17. – P. 463-516.
318. Stoch S.A., Wagner J.A. Cathepsin K inhibitors: a novel target for osteoporosis therapy // *Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*. – 2008. – Vol. 83. – P. 172-176.
319. Streuli C. Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation // *Current Opinion of Cell Biology*. – 1999. – Vol. 11. – № 5. – P. 634.
320. Syedain Z.H., Meier L.A., Lahti M.T., Johnson S.L., Tranquillo R.T. Implantation of completely biological engineered grafts following decellularization into the sheep femoral artery // *Tissue Engineering, Part A*. – 2014. – Vol. 20. – P. 1726-1734. 268.
321. Scadden D.T. The stem-cell niche as an entity of action // *Nature*. – 2006. – Vol. 441. – № 7097. – P. 1075.
322. Taheem D.K., Foyt D.A., Loaiza S., Ferreira S.A., Ilic D., Auner H.W., Grigoriadis A.E., Jell G., Gentleman E. differential regulation of human bone marrow mesenchymal stromal cell chondrogenesis by hypoxia inducible factor-1 α hydroxylase inhibitors // *Stem Cells*. – 2018. – Vol. 36. – № 9. – P. 1380-1392.
323. Takagi J., Strokovich K., Springer T.A., Walz T. Structure of integrin $\alpha 5 \beta 1$ in complex with fibronectin // *EMBO Journal*. – 2003. – Vol. 22. – P. 4607-4615.
324. Takamiya M., Saigusa K., Nakayashiki N., Aoki Y. Studies on mRNA expression of basic fibroblast growth factor in wound healing for wound age determination // *International Journal of Legal Medicine*. – 2003. – Vol. 117. – P. 46-50.

325. Tao H., Han Z., Han Z.C., Li Z. Proangiogenic features of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications // *Stem Cells International*. – 2016. – Vol. 2006. – P. 1314709.
326. Termine J.D., Kleinman H.K., Whitson S.W., Conn K.M., McGarvey M.L., Martin G.R. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen // *Cell*. – 1981. – Vol. 26. – P. 99–105.
327. Thakkar S., Ghebes C.A., Ahmed M., Kelder C., van Blitterswijk C.A., Saris D., Fernandes H.A-M., Moroni L. Mesenchymal stromal cell-derived extracellular matrix influences gene expression of chondrocytes // *Biofabrication*. – 2013. – Vol. 5. – № 2. – P. 025003.
328. Theocharis A.D., Gialeli C., Bouris P., Giannopoulou E., Skandalis S.S., Aletras A.J., Iozzo R.V., Karamanos N.K. Cell-matrix interactions: focus on proteoglycan-proteinase interplay and pharmacological targeting in cancer // *FEBS Journal*. – 2014. – Vol. 281. – P. 5023-5042.
329. Theocharis A.D., Skandalis S.S., Gialeli C., Karamanos N.K. Extracellular matrix structure // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2015. – Vol. 97. – P. 4.
330. Turley E.A., Noble P.W., Bourguignon L.Y. Signaling properties of hyaluronan receptors // *Journal of Biological Chemistry*. – 2002. – Vol. 277. – P. 4589-4592.
331. Upadhyay RK. Role of biological scaffolds, hydrogels and stem cells in tissue regeneration therapy // *Advances in Regenerative Medicine and Tissue Engineering*. – 2017. – Vol. 2. – № 1. – P. 121-135.
332. Valorani M.G., Montelatici E., Germani A., Biddle A., D'Alessandro D., Strollo R., Patrizi M.P., Lazzari L., Nye E., Otto W.R., Pozzilli P., Alison M.R. Pre-culturing human adipose tissue mesenchymal stem cells under hypoxia increases their adipogenic and osteogenic differentiation potentials // *Cell Proliferation*. – 2012. – Vol. 45. – P. 225–238.
333. Van S.Y., Noh Y.K., Kim S.W., Oh Y.M., Kim I.H., Park K. Human umbilical cord blood mesenchymal stem cells expansion via human fibroblast-derived matrix and their potentials toward regenerative application // *Cell and Tissue Research*. – 2019. – Vol. 376. – № 2. – P. 233.
334. Veres S.P., Brennan-Pierce E.P., Lee J.M. Macrophage-like U937 cells recognize collagen fibrils with strain-induced discrete plasticity damage // *Journal of Biomedical Materials Research, Part A*. – 2015. – V. 103. – P. 397.
335. Verrecchia F., Mauviel A. Transforming growth factor-beta signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation // *Journal of Investigative Dermatology*. – 2002. – Vol. 118. – P. 211–215.
336. Vigetti D., Viola M., Karousou E., Deleonibus S., Karamanou K., De Luca G., Passi A. Epigenetics in extracellular matrix remodeling and hyaluronan metabolism // *FEBS Journal*. – 2014. – Vol. 281. – P. 4980–4992.
337. Vishvanath L., MacPherson K. A., Hepler C., Wang Q. A., Shao M., Spurgin S. B. Pdgfr β + mural preadipocytes contribute to adipocyte hyperplasia induced by high-fat-diet feeding and prolonged cold exposure in adult mice // *Cell Metabolism*. – 2016. – Vol. 23. – P. 350–359.
338. Volkmer E., Kallukalam B.C., Maertz J., Otto S., Drosse I., Polzer H., Bocker W., Stengele M., Docheva D., Mutschler W., Schieker M. Hypoxic preconditioning of human mesenchymal stem cells overcomes hypoxia-induced inhibition of osteogenic differentiation // *Tissue Engineering, Part A*. – 2010. – Vol. 16. – № 1. – P. 153-164.
339. Wagenseil J.E., R.P. Mecham. New insights into elastic fiber assembly // *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*. – 2007. – Vol. 81. – P. 229-240.
340. Walton H.L., Corjay M.H., Mohamed S.N., Mousa S.A., Santomenna L.D., Reilly T.M. Hypoxia induces differential expression of the integrin receptors α (v β 3) and α (v β 5) in cultured human endothelial cells // *Journal of Cell Biochemistry*. – 2005. Vol. – 78. – P. 674–680.
341. Wang D.W., Fermor B., Gimble J.M., Awad H.A., Guilak F. Influence of oxygen on the proliferation and metabolism of adipose derived adult stem cells // *Journal Cell Physiology*. – 2005. – Vol. 204. – P. 184–191.
342. Wang T., Nanda S.S., Papaefthymiou G.C., Yi D.K. Mechanophysical cues in extracellular matrix regulation of cell behavior // *Chembiochemistry*. – 2020. – Vol. 21. № 9. – P. 1254-1264.

343. Wang W.Y., Pearson A.T., Kutys M.L., Choi C.K., Wozniak M.A., Baker B.M., Chen C.S. Extracellular matrix alignment dictates the organization of focal adhesions and directs uniaxial cell migration // *APL Bioengineering*. – 2018. Vol. 2. – № 4. – P. 046107.
344. Wang Z., Chesler N.C. Role of collagen content and cross-linking in large pulmonary arterial stiffening after chronic hypoxia // *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*. – 2012. – Vol. 11. № 1–2. – P. 279–289.
345. Wei C., Möller C.C., Altintas M.M., Li J., Schwarz K., Zacchigna S., Xie L., Henger A., Schmid H., Rastaldi M.P., Cowan P., Kretzler M., Parrilla R., Bendayan M., Gupta V., Nikolic B., Kalluri R., Carmeliet P., Mundel P., Reiser J. Modification of kidney barrier function by the urokinase receptor // *Nature Medicine*. – 2008. – Vol. 14. – № 1. – P. 55–63.
346. Wells J.M., Gaggar A., Blalock J.E. MMP generated matrikines // *Matrix Biology*. – 2015. – Vol. 44–46. – P. 122–129.
347. Wen J.H., Choi O., Taylor-Weiner H., Fuhrmann A., Karpiak J.V., Almutairi A., Engler A.J. Haptotaxis is cell type specific and limited by substrate adhesiveness // *Cell Molecular Bioengineering*. – 2015. – Vol. 1. – № 4. – P. 530–542.
348. Wicks E.E., Semenza G.L. Hypoxia-inducible factors: cancer progression and clinical translation // *Journal of Clinical Investigation*. – 2022. – Vol. 132. – № 11. – P. e159839.
349. Winkler J., Abisoye-Ogunniyan A., Metcalf K.J., Werb Z. Concepts of Extracellular Matrix Remodelling in Tumour Progression and Metastasis // *Nature Communications*. – 2020. – Vol. 11. – P. 5120.
350. Wrighton K. The 'ins' and 'outs' of integrin signalling // *Nature Review Molecular Cell Biology*. – 2013. – Vol. 14. – P. 753.
351. Wu M.H., Urban J.P., Cui Z.F., Cui Z., Xu X. Effect of extracellular pH on matrix synthesis by chondrocytes in 3D agarose gel // *Biotechnology*. – 2007. – Vol. 23. – № 2. – P. 430.
352. Wu Y.J., La Pierre D.P., Wu J., Yee A.J., Yang B.B. The interaction of versican with its binding partners // *Cell Research*. – 2005. – Vol. 15. – № 7. – P. 483–494.
353. Wykoff C.C., Sotiropoulos C., Cockman M.E., Ratcliffe P.J., Maxwell P., Liu E., Harris A.L. Gene array of VHL mutation and hypoxia shows novel hypoxia-induced genes and that cyclin D1 is a VHL target gene // *British Journal of Cancer*. – 2004. – Vol. 90. – № 6. – P. 1235–1243.
354. Xie M., Zhang Y., Xiong Z., Hines S., Shang J., Clark K.L., Tan S., Alexander P.G., Lin H. Generation of hyaline-like cartilage tissue from human mesenchymal stromal cells within the self-generated extracellular matrix // *Acta Biomaterials*. – 2022. – Vol. 149. – P. 150–166.
355. Xing Q., Yates K., Tahtinen M., Shearier E., Qian Z., Zhao F. Decellularization of fibroblast cell sheets for natural extracellular matrix scaffold preparation // *Tissue Engineering*. – 2015. – Vol. 21. – № 1. – P. 77.
356. Xiong Y., He J., Zhang W., Zhou G., Cao Y., Liu W. Retention of the stemness of mouse adipose-derived stem cells by their expansion on human bone marrow stromal cell-derived extracellular matrix // *Tissue Engineering, Part A*. – 2015. – Vol. 21. – № 11–12. – P. 1886.
357. Xu J., Rodriguez D., Petitclerc E., Kim J.J., Hangai M., Moon Y.S., Davis G.E., Brooks P.C. Proteolytic exposure of a cryptic site within collagen type IV is required for angiogenesis and tumor growth in vivo // *Journal of Cell Biology*. – 2001. – Vol. 154. – № 5. – P. 1069–1079.
358. Xue J.X., Gong Y.Y., Zhou G.D., Liu W., Cao Y., Zhang W.J. Chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells induced by acellular cartilage sheets // *Biomaterials*. – 2012. – Vol. 33. – P. 5832.
359. Yakovlev S., Medved L. Effect of fibrinogen, fibrin, and fibrin degradation products on transendothelial migration of leukocytes // *Thrombosis Research*. – 2018. – Vol. 162. – P. 93.
360. Yamada Y., Nakamura S., Ito K., Sugito T., Yoshimi R., Nagasaka T., Ueda M. A feasibility of useful cell-based therapy by bone regeneration with deciduous tooth stem cells, dental pulp stem cells, or bonemarrow-derived mesenchymal stem cells for clinical study using tissue engineering technology // *Tissue Engineering, Part A*. – 2010. – Vol. 16. P. 1891.
361. Yamagishi S., Inagaki Y., Amano S., Okamoto T., Takeuchi M., Makita Z. Pigment epithelium-derived factor protects cultured retinal pericytes from advanced glycation end product-

- induced injury through its antioxidative properties // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2002. – Vol. 296. – P. 877–882.
362. Yang D.C., Yang M.H., Tsai C.C., Huang T.F., Chen Y.H., Hung S.C. Hypoxia inhibits osteogenesis in human mesenchymal stem cells through direct regulation of RUNX2 by TWIST // *PLoS One*. – 2011. – Vol. 6. – № 9. P. e23965.
363. Yang M.C., O'Connor A.J., Kalionis B., Heath D.E. Improvement of mesenchymal stromal cell proliferation and differentiation via decellularized extracellular matrix on substrates with a range of surface chemistries // *Frontiers in Medical Technology*. – 2022. – Vol. 4. – P. 834123.
364. Yang Y., Lin H., Shen H., Wang B., Lei G., Tuan R.S. Mesenchymal stem cell-derived extracellular matrix enhances chondrogenic phenotype of and cartilage formation by encapsulated chondrocytes in vitro and in vivo // *Acta Biomaterials*. – 2018. – Vol. 69. – P. 71.
365. Yao X., Tan Z., Gu B., Wu R.R., Liu Y.K., Dai L.C., Zhang M. Promotion of self-renewal of embryonic stem cells by midkine // *Acta Pharmacological Sinica*. – 2010. – Vol. 31. № 5. – P. 629–637.
366. Yusoff F.M., Nakashima A., Kawano K.I., Kajikawa M., Kishimoto S., Maruhashi T., Ishiuchi N., Abdul Wahid S.F.S., Higashi Y. Implantation of Hypoxia-Induced Mesenchymal Stem Cell Advances Therapeutic Angiogenesis // *Stem Cells International*. – 2022. – Vol. 20. – P. 6795274.
367. Zargham R. Tensegrin in context: dual role of alpha 8 integrin in the migration of different cell types // *Cell Adhesion and Migration*. – 2010. – Vol. 4. – № 4. P. 485–490.
368. Zhang H.C., Liu X.B., Huang S., Bi X.Y., Wang H.X. Microvesicles derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells stimulated by hypoxia promote angiogenesis both in vitro and in vivo // *Stem Cells Development*. – 2012. – Vol. 21. – P. 3289–3297.
369. Zhang J., Li B., Wang J.H. The role of engineered tendon matrix in the stemness of tendon stem cells in vitro and the promotion of tendon-like tissue formation in vivo // *Biomaterials*. – 2011. – Vol. 32. – № 29. P. 6972.
370. Zhang S.X., Wang J.J., Gao G., Parke K., Ma J.X. Pigment epithelium-derived factor downregulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and inhibits VEGF-VEGF receptor 2 binding in diabetic retinopathy // *Journal of Molecular Endocrinology*. – 2006. – Vol. 37. – P. 1–12.
371. Zhang W., Yang J., Zhu Y., Sun X., Guo W., Liu X., Jing X., Guo G., Guo Q., Peng J., Zhu X. Extracellular matrix derived by human umbilical cord-deposited mesenchymal stem cells accelerates chondrocyte proliferation and differentiation potential in vitro // *Cell Tissue Bank*. – 2019. – Vol. 20. – № 3. – P. 351.
372. Zhang Z., Luo X., Xu H., Wang L., Jin X., Chen R., Ren X., Lu Y., Fu M., Huang Y., He J., Fan Z. Bone marrow stromal cell-derived extracellular matrix promotes osteogenesis of adipose-derived stem cells // *Cell Biology International*. – 2014. – Vol. 39. – P. 291.
373. Zhao S.L., Zhang Y.J., Li M.H., Zhang X.L., Chen S.L. Mesenchymal stem cells with overexpression of midkine enhance cell survival and attenuate cardiac dysfunction in a rat model of myocardial infarction // *Stem Cell Research Therapy*. – 2014. – Vol. 5. – № 2. – P. 37.
374. Zhou P., Yang C., Zhang S., Ke Z.X., Chen D.X., Li Y.Q., Li Q. The Imbalance of MMP-2/TIMP-2 and MMP-9/TIMP-1 Contributes to Collagen Deposition Disorder in Diabetic Non-Injured Skin // *Frontiers in Endocrinology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 734485.
375. Zhu M., Li W., Dong X., Yuan X., Midgley A.C., Chang H., Wang Y., Wang H., Wang K., Ma P.X., Wang H., Kong D. In vivo engineered extracellular matrix scaffolds with instructive niches for oriented tissue regeneration // *Nature Communications*. – 2019. – Vol. 10. – № 1. – P. 4620.
376. Zollinger A.J., Smith M.L. Fibronectin, the extracellular glue // *Matrix Biology*. – 2017. – Vol. 60–61. – P. 27–37.