

МАТВЕЕВА ДИАНА КОНСТАНТИНОВНА

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

1.5.5 – физиология человека и животных

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Государственном научном центре Российской Федерации – Институте медико-биологических проблем Российской академии наук.

Научный руководитель: **Андреева Елена Ромуальдовна**, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории «Клеточная физиология» Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации – Института медико-биологических проблем Российской академии наук.

Официальные оппоненты: **Волова Лариса Теодоровна**, доктор медицинских наук, профессор, директор Научно-исследовательского института биотехнологий «БиоТех» Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Калинина Наталья Игоревна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории генных и клеточных технологий факультета фундаментальной медицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук.

Защита состоится «__» _____ 2024 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 24.1.023.01 в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Государственном научном центре Российской Федерации – Институте медико-биологических проблем Российской академии наук по адресу: 123007 г. Москва, Хорошевское шоссе, 76 А.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации – Института медико-биологических проблем Российской академии наук и на сайте:

<http://www.imbp.ru/WebPages/win1251/ScienceN/DisserSov/Matveeva2024/Matveeva.html>

Автореферат разослан «__» _____ 2024 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Светлана Викторовна Поддубко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

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 секретомы 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 (Shao et al., 2019), 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 матрисомом, 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 (дцВКМ) сохраняет способность передавать инструктивные свойства, обусловленные такими факторами, как тканевый источник и уровень коммитированности (Матвеева, Андреева, 2020). Например, дцВКМ, выделенный 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., 2014) 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, Schumacker, 2006; Ivanovic, 2009; Buravkova et al., 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 (Saed, Diamond, 2002; Milner et al., 2008; Jean et al., 2011; Deschene et al., 2012; 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 тканевый 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 матрикса в мультипотентных мезенхимальных стромальных клетках, постоянно культивируемых при физиологической гипоксии (5 % O_2) по сравнению со стандартным лабораторным уровнем 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 матрикса 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 – для 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 организации 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. Скаффолды из дцВКМ, полученные от МСК при различных уровнях O_2 , могут быть востребованными для разработки тканеинженерных конструкций.

Личный вклад автора заключается в постановке задач, планировании и проведении экспериментов, анализе, оформлении и представлении результатов на научных конференциях и подготовке статей к публикации в научных журналах.

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, 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.

Степень достоверности результатов проведенных исследований

Диссертационная работа выполнена с использованием современных методов клеточной и молекулярной биологии, а также адекватной статистической обработкой данных. Выносимые на защиту положения и выводы основаны на достоверных результатах экспериментов, проиллюстрированных графиками и таблицами.

Апробация работы

Основные результаты и положения диссертации были представлены и обсуждены на: XVIII конференции молодых ученых, специалистов и студентов, посвященной 50-летию высадки человека на Луну (Москва, 2019); IV национальном конгрессе по регенеративной медицине

(Москва, 2019); VII молодежной школе-конференции по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, 2020); IV Сеченовском международном биомедицинском саммите (Москва, 2020); Всероссийской научной конференции с международным участием «Регенеративная биология и медицина» (Москва, 2021); XIX конференция молодых ученых, специалистов и студентов, посвященной 60-летию первого полета человека в космос (Москва, 2021); VIII молодежной школы-конференции по молекулярной биологии (Санкт-Петербург, 2022); V национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2022); Международном конгрессе CRISPR-2023 (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.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 121 странице машинописного текста, состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов и списка литературы, включающего 376 источников, из них 25 на русском и 351 на иностранном языке, содержит 38 рисунков и 8 таблиц.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Культивирование клеток

В экспериментах использовали МСК стромально-васкулярной фракции жировой ткани человека из коллекции лаборатории клеточной физиологии ГНЦ РФ – ИМБП РАН (разрешение Комиссии по биоэтике ГНЦ РФ – ИМБП РАН № 550/MSK от 22.07.2020 г.). Стромальный фенотип МСК характеризовали согласно рекомендациям ISTC (Dominici et al., 2006). Клетки постоянно культивировали в среде α -MEM с добавлением антибиотиков (1 %) и фетальной телячьей сыворотки (10 %) при 20 % O_2 в CO_2 -инкубаторе и в мультигазовом инкубаторе при 5 % O_2 (Sanyo, Япония). Плотность посадки составляла 3–3,5 тыс. клеток/ cm^2 . В экспериментах использовали МСК 3–5 пассажей. Для анализа продукции ВКМ МСК рассеивали с плотностью 5 тыс. клеток/ cm^2 и культивировали в течение 14 суток в присутствии 2-фосфо-L-аскорбата натрия (50 мкг/мл, Fluka, Германия).

Полногеномный анализ транскриптома МСК и ОТ-ПЦР

Полногеномный анализ экспрессии генов в МСК, культивируемых при 20 и 5 % O_2 , был выполнен в компании «Евроген» с применением набора HumanRef-8 (Illumina, США). Анализ полученных данных проводился с использованием программного обеспечения GenomeStudio software (Illumina, США) с использованием статистического модуля для анализа экспрессии генов.

Методом ОТ-ПЦР в реальном времени с применением набора праймеров RT Profiler PCR Array – Human Extracellular matrix & Adhesion Molecules (Qiagen, США) проводили оценку уровня экспрессии генов матрисома. Изменение уровня мРНК оценивали по интенсивности включения флуоресцентного красителя SYBR Green («Синтол», Россия). Для количественного ОТ-ПЦР генов остеомаркеров (*RUNX2*, *ALPL*) использовали соответствующие коммерческие праймеры (Qiagen, США). Для нормализации использовали гены «домашнего хозяйства» – *HPRT* и *RPLP0*.

Характеристика компонентов матрикса с применением гистологических красителей

Для выявления ВКМ использовали красители Sirius Red F3BA и Fast Green FCF (0,1 % в насыщенном водном растворе пикриновой кислоты) (Sigma, США) для коллагеновых и неколлагеновых белков соответственно. Для оценки общего количества белка клетки окрашивали 0,5%-ным Crystal Violet (Sigma, США). После растворения продуктов окрашивания проводили колориметрическую полуколичественную оценку на спектрофотометре (BioRad, США) при 550 и 620 нм.

Иммуноцитохимический анализ

Основные структурные белки ВКМ идентифицировали методом непрямого иммуноцитохимического окрашивания, используя кроличьи антитела к коллагену I типа, фибронектину (Имтек, Россия), витронектину и версикану (Abcam, Великобритания) человека. Для визуализации связавшихся антител использовали набор Novocasta Novolink Polymer Detection Systems (Leica Biosystems, Великобритания) с применением полимера, конъюгированного с пероксидазой, специфически связывающегося с IgG кролика. В качестве субстрата для пероксидазы использовали 3,3'-диамиобензидин.

Активность матричных металлопротеиназ (ММР)

Измерения активности ММР в кондиционированной среде культивируемых МСК проводили с использованием SensoLyte® 520 Generic MMP Assay Kit «Fluorimetric» (AnaSpec, США).

Децеллюляризация внеклеточного матрикса

Удаление МСК для получения дцВКМ проводили с применением 20 mM NH₄OH + 0,5 % Triton X-100 в PBS, при 37 °C в течение 5 мин. Эффективность децеллюляризации контролировали под микроскопом. После инкубации удаляли клеточный дебрис с помощью PBS. Для оценки удаления ДНК-контaminaции использовали краситель DAPI (Thermo Fisher Scientific, США).

Экстракция белков дцВКМ и хромато-масс-спектрометрический анализ

Экстракцию белков из дцВКМ проводили с применением 2 М раствора мочевины в 150 mM растворе NaCl при 4 °C в течение 2 суток, с добавлением ингибиторов протеаз, в том числе металлопротеиназ (Thermo Fisher Scientific, США). Концентрацию экстрагированных белков проводили с использованием набора (Pierce BCA Protein Assay Kit, Termo Fisher Scientific, США). Для анализа белкового состава экстрагированного дцВКМ применяли метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (хроматограф Dionex Ultimate 3000, совмещенный с масс-спектрометром Maxis 4G (Bruker Daltonics, Германия) совместно со с.н.с. лаборатории протеомики ИМБП Д.Н. Кашириной. Анализ проводился с использованием программы MaxQuant, идентификация белков была проведена по базе данных SwissProt.

Рецеллюляризация МСК на дцВКМ

МСК, постоянно культивируемые при 20 % O₂, высевали на препараты дцВКМ или коллаген плотностью 3,5 x 10³/см². Покрытие из коллагена I типа крысы (10 мкг белка/см² (Имтек, Россия)) рассматривали как контроль. Для оценки характера распластывания и актинового цитоскелета через 30 мин неприкрепившиеся клетки удаляли, а прикрепившиеся МСК фиксировали 4%-ным параформальдегидом и окрашивали фаллоидином-Alexa488 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, США).

Для оценки спонтанного остеоккоммитирования и индуцированной остеодифференцировки МСК культивировали на препаратах дцВКМ/коллагене в течение 7 суток с/без добавления остеоиндукторов. Далее оценивали активность щелочной фосфатазы с применением набора Alkaline Phosphatase Kit (Sigma-Aldrich, США) и экспрессию остеогенез-ассоциированных генов.

Мультиплексный анализ

Профиль цитокинов исследовали в кондиционированной среде МСК, культивированных на коллагене и дцВКМ в течение 7 суток, с использованием мультиплексного анализа по технологии xMAP и системы MagPix (Luminex Corporation, США) по инструкции производителя (набор Human Cytokine/Chemokine/Growth Factor Panel A 48 Plex; Merck, Германия).

Микроскопия

Светлопольную и фазово-контрастную микроскопию проводили с использованием микроскопа Nikon Eclipse Ti-U, оснащенного цветной цифровой камерой DS-Ri1 (Япония). Сканирующую электронную микроскопию (СЭМ) выполняли с использованием микроскопа CamScanZ2 (Великобритания). Для лазерно-сканирующей микроскопии использовали LSM-780 (Carl Zeiss, Германия).

Статистическая обработка результатов

Эксперименты проводились как минимум в 3 независимых повторах. Статистическую достоверность различий между 2 группами данных оценивали с помощью непараметрических

критериев Манна – Уитни и t-критерия Уилкоксона для малых групп при выбранном уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Дифференциальная экспрессия генов матрисома МСК при физиологической гипоксии

Полногеномный анализ экспрессии генов был выполнен на МСК, выделенных из 3 образцов жировой ткани человека и постоянно культивируемых при различных уровнях O_2 . Во всех образцах около 20 % среди всех дифференциально измененных генов МСК (при 5% по сравнению с 20 % O_2) 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).

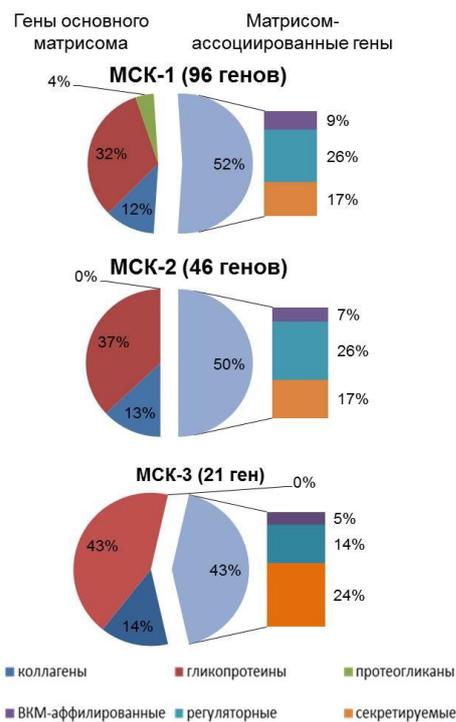


Рис. 1. Распределение дифференциально экспрессированных генов в компартментах матрисома МСК (5 % O_2 vs 20 % O_2).

Для каждого образца МСК была проведена классификация всех дифференциально измененных генов по ключевым группам матрисома (рис. 1). 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, O_2 -зависимыми являются как структурные, так и регуляторные молекулы матрисома МСК.

На рис. 2 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.

Транскрипция 70 % генов матрисома в МСК-1 была снижена. Для группы основного матрисома выявлено снижение экспрессии генов структурных коллагеновых белков (коллагены I, II, III, IV, V, VIII, IX, XI, XII, XVI типов), а также 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 (*FNI*, *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 и ангиогенез (*SLIT2*, *ESM1*, *SPRX2*) молекулы. Анализ направленности изменения экспрессии матрисом-ассоциированных генов МСК-1 показал, что большая часть секретируемых факторов и ВКМ-аффилированных молекул имели сниженную экспрессию, тогда как в группе регуляторов экспрессия 50 % генов, кодирующих ферменты, была увеличена: это матриксные металлопротеиназы (*MMP2*, *MMP3*), катепсины (*CTSK*, *CTSH1*, *CTSL1*), адамализин (*ADAM23*),

МСК-3 имели наименьшее число дифференциально экспрессированных генов матрисома по сравнению с 2 другими образцами. Среди 23 таких генов транскрипция изменялась разнонаправленно. В основном матрисоме увеличивалась экспрессия генов адгезивных белков коллагена VI (*COL6A2-3*) и гликопротеинов, таких, как спондин и фибулин, и снижалась транскрипция генов гликопротеинов, ответственных за организацию неколлагенового ВКМ (*COMP*, *ELN*, *MFAP4*). Среди протеогликанов не было выявлено изменений экспрессии генов. Отмечено значительное увеличение экспрессии генов ингибитора ангиогенеза (*SERPINF1*) и протеазы, расщепляющей IGF-связывающие белки (*PAPPA*) в группе матрисом-ассоциированных генов. Секретируемые факторы изменялись сходно с МСК-2: увеличивалась экспрессия генов цитокинов *CXCL12* и *MDK* и снижалась – *ANGPTL2* и *GDF15*.

Среди всех дифференциально экспрессированных при физиологической гипоксии генов были выявлены группы, которые изменились в 2 или 3 образцах МСК (рис. 3). Во всех 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 сходно измененных генов было идентифицировано в МСК-2 и -3 – 18, из них 13 изменялись сонаправлено: коллагены (*COL6A2*, *COL6A3*), гликопротеины (*COMP*, *ELN*, *FBLN1*, *IGFBP7*, *PCOLCE*, *SPON1*, *SRPX*), секретируемые факторы (*CXCL12*, *GDF15*, *MDK*). Также в 2 из 3 образцов увеличилась экспрессия генов активатора плазминогена урокиназного типа *PLAU* и лизилоксидаза подобного фермента 4 (*LOXL4*). Было отмечено 5 генов матрисома (*COMP*, *ELN*, *SRPX*, *SERPINF1* и *CXCL12*), изменившихся сонаправлено в 3 образцах МСК.

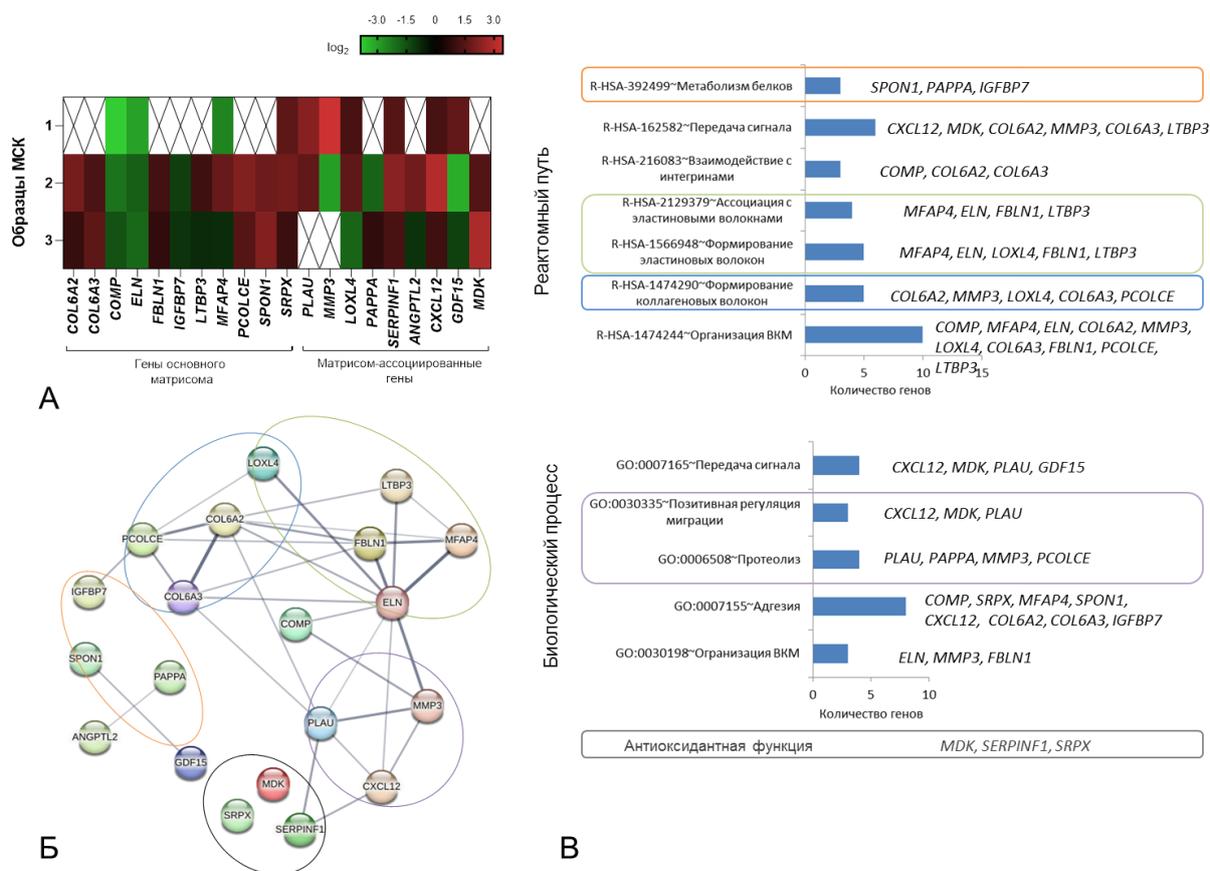


Рис. 3. Дифференциально экспрессированные гены матрисома МСК (5 % vs 20 % O_2). А – тепловая карта, иллюстрирующая уровень экспрессии (\log_2); Б – кластеры генов с наиболее значимыми связями; В – насыщение групп по функциональной принадлежности к реактомым путям и биологическим процессам изменившимися кластерами генов.

С использованием веб-ресурсов DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) и STRING (<https://string-db.org>) установлены наиболее значимые белок-белковые взаимодействия между молекулами, кодируемыми дифференциально измененными генами матрисома (рис. 3, А). Было выделено 5 кластеров генов, аннотированных в общих биологических процессах, согласно базе данных Gene Ontology (рис. 3, В).

Первый кластер объединяет гены коллагена VI типа (*COL6A2*, *COL6A3*) и гены *PCOLCE* и *LOXLA4*, кодирующие белки – модифицирующие коллагеновые белки и участвующие в их образовании. Экспрессия этих генов была увеличена у 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 групп также объединяются общей функциональной группой в качестве адгезионных белков. Среди них отмечены изменения транскрипции в направлении усиления (*COL6A2*, *COL6A3*, *SPON1*, *FBLN1*) и снижения (*COMP*, *MFAP4*, *IGFBP7*).

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 2 типов молекул: 1) гены, продукты которых вовлечены в регуляцию клеточной миграции (*CXCL12*, *PLAU*, *MDK*, *MMP3*); 2) гены, кодирующие молекулы с антиоксидантной функцией (*SRPX*, *SERPINF1*, *MDK*). Стоит отметить, что экспрессия данных генов была увеличена при физиологической гипоксии.

Транскрипция генов важных структурных неколлагеновых белков ВКМ (эластина и олигомерного белка хряща) снижалась. Напротив, экспрессия генов адгезионных молекул, таких, как фибулина 1, коллагена VI типа и спондина 1 увеличивалась. Накопление в ВКМ лигандов, обеспечивающих взаимодействие с клеткой, может способствовать направленной миграции клеток, так называемый гаптотаксис (Wen et al., 2015). Аргументом того, что клетки при физиологической гипоксии могут быть наиболее приспособлены к репаративным функциям, которые заключаются в увеличенной пролиферации и миграции, также является усиление экспрессии *PLAU* и *CXCL12*, поскольку известно, что данные молекулы вовлечены в активацию и индукцию миграции различных типов клеток, в том числе стромальных (Dillenburg-Pilla et al., 2015; Liu et al., 2016).

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 . Например, коллаген VI оказывает широкий спектр цитопротекторных эффектов, которые включают противодействие апоптозу и окислительному повреждению (Cescon et al., 2015; McCulloch et al., 2015). Показано, что *SERPINF1* защищает перициты от апоптоза, вызванного высоким содержанием глюкозы и H_2O_2 , благодаря своей антиоксидантной и противовоспалительной активности (Yamagishi et al., 2002). Повышенные уровни *GDF15* связаны с патологическими состояниями, такими как тканевая гипоксия, воспаление, острая травма и окислительный стресс. У 2 из 3 образцов отмечено уменьшение экспрессии *GDF15*. Мидкин проявляет цитопротекторную активность в раковых клетках за счет усиления экспрессии антиапоптотического фактора *BCL2* и ингибирует каспазозависимое повреждение клеток за счет ингибирования с-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 (Zhao et al., 2014). Биоинформатический анализ показывает, что белок *SRPX* относится к семейству

пероксиредоксинов, которые контролируют уровни перекиси, индуцированные цитокинами, и, таким образом, опосредуют передачу сигнала в клетках млекопитающих (Pawłowski et al., 2010).

Таким образом, нами были выявлены молекулы, которые могут быть маркерами ответа клеток на физиологическую гипоксию. При этом сформировалось понимание, что матрисом МСК оказался значительно модулирован гипоксией на уровне генов, что определило дальнейшее направление исследования на структурном и белковом уровне.

Характеристика структурных компонентов внеклеточного матрикса МСК

На следующем этапе исследования мы оценили накопление коллагеновых и неколлагеновых белков под монослоем МСК при физиологической гипоксии с применением Sirius Red F3BA и Fast Green FCF соответственно (рис. 4, А). Колориметрический анализ выявил достоверное увеличение интенсивности окраски Crystall Violet (использовали для нормирования), что указывает на большее количество клеток в монослое МСК при 5 % O₂. Это подтверждает показанный ранее эффект физиологической гипоксии на пролиферацию МСК (Буравкова и др., 2014). Нами выявлена тенденция к снижению коллагеновых белков в МСК, постоянно культивируемых при 5 % O₂. Различий в накоплении неколлагеновых белков не установлено.

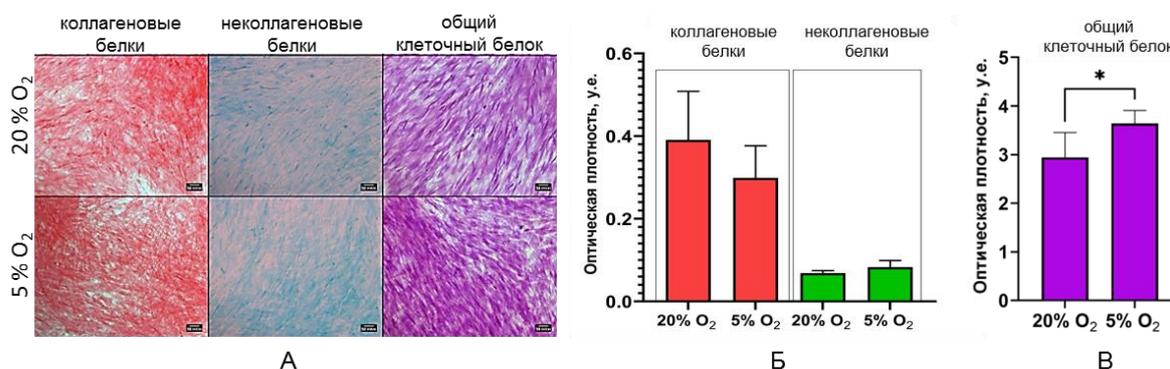


Рис. 4. Выявление коллагеновых (Sirius Red) и неколлагеновых (Fast Green) белков, а также общего белка (Crystall Violet) в МСК, постоянно культивируемых при 20 или 5 % O₂. А – репрезентативные микрофотографии; масштабный отрезок – 50 мкм; Б, В – полуколичественная спектрофотометрическая оценка содержания коллагеновых (550 нм), неколлагеновых (620 нм) белков и общего клеточного белка (550 нм). Значения показателей оптической плотности в элюатах, экстрагированных Sirius Red и Fast Green, нормированы на показатели оптической плотности Crystall Violet. Данные представлены как mean ± SD; n = 6; * – p < 0,05.

Добавление аскорбата натрия значимо стимулировало накопление коллагеновых белков в МСК как при 20 % (в 1,4 раза), так и при 5 % O₂ (в 1,85 раза). В МСК при физиологической гипоксии этот эффект был более выраженным, установлено усиление продукции в 2 раза. В дальнейшем в среду культивирования МСК для стимуляции накопления белков ВКМ добавлялся аскорбат натрия.

Таблица. Влияние аскорбата натрия на продукцию коллагеновых белков МСК, постоянно культивируемыми при 20 или 5 % O₂

Гистологический краситель	Уровень O ₂	Экспериментальная группа	Оптическая плотность (M ± SD)	Достоверность
Sirius Red	20 %	- 2-фосфо-L-аскорбат	0,39 ± 0,08	p = 0,03
		+2-фосфо-L-аскорбат	0,55 ± 0,12	
	5 %	- 2-фосфо-L-аскорбат	0,32 ± 0,01	p = 0,006
		+ 2-фосфо-L-аскорбат	0,6 ± 0,09	
Sirius Red/ Crystall Violet	20 %	- 2-фосфо-L-аскорбат	0,14 ± 0,04	–
		+2-фосфо-L-аскорбат	0,15 ± 0,03	
	5 %	- 2-фосфо-L-аскорбат	0,08 ± 0,02	p = 0,005
		+ 2-фосфо-L-аскорбат	0,16 ± 0,03	

На рис. 4, А представлены результаты иммуноцитохимической идентификации основных структурных белков: коллагена I типа, фибронектина, остеоонектина и версикана. Не было выявлено отличий в локализации и характере упаковки белков в МСК при различных уровнях O_2 (см. рис. 4, А). При этом «гранулярность» остеоонектина внутри МСК, культивируемых при 20 %, была выше, чем при 5 % O_2 , что может указывать на его увеличенную продукцию в первом случае. С помощью ОТ-ПЦР также установлено достоверное снижение экспрессии остеоонектина (*SPARC*) (см. рис. 4, Б). 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 остеоонектина 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 остеоконмитирования МСК (D'Ippolito et al., 2006; Гринаковская и др., 2009; Yang et al., 2011; Vae et al., 2018).

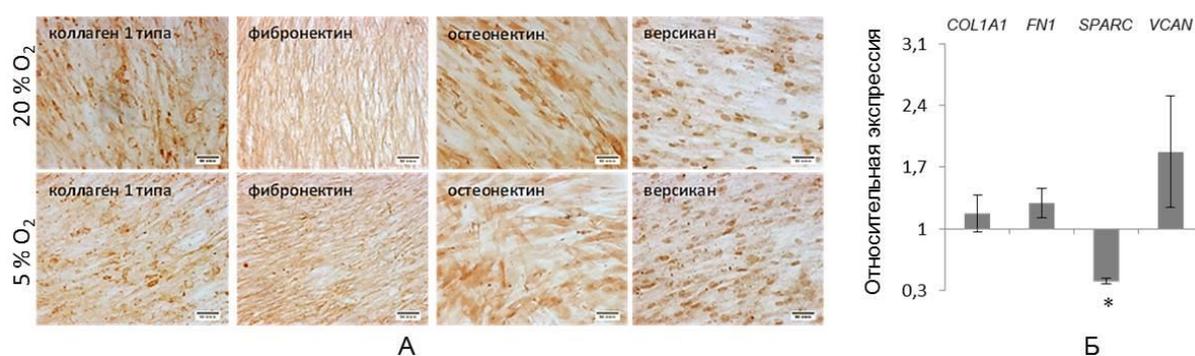


Рис. 5. Характеристика структурных белков ВКМ МСК, постоянно культивируемых при 20 и 5 % O_2 . А – иммуноцитохимическое выявление коллагена I типа, фибронектина, остеоонектина и версикана; репрезентативные микрофотографии; масштаб – 50 мкм; Б – кратность изменений транскрипции генов, кодирующих данные белки ВКМ (*COL1A1*, *FN1*, *SPARC*, *VCAN* соответственно) МСК, постоянно культивируемых при 5 % O_2 по сравнению с 20 % O_2 . Экспрессия генов в МСК при 20 % O_2 принята за 1; * – $p \leq 0,05$; $n = 3$.

Активность матричных металлопротеиназ МСК при 20 и 5 % O_2

ОТ-ПЦР-анализ верифицировал снижение транскрипции *MMP1*, *MMP2*, *MMP3* более чем в 1,5 раза и увеличение экспрессии их ингибитора *TIMP3* (рис. 6, А). Анализ активности MMP-1 и MMP-2 в кондиционированной среде МСК показал снижение в условиях физиологической гипоксии (в 2,1 и 1,9 раза соответственно) (рис. 6, Б). При этом активность MMP-1 преобладала над MMP-2 по количеству расщепленного субстрата.

Дисбаланс MMP и их ингибиторов (TIMP) приводит к ограничению регенерации тканей (Zhou et al., 2021). В работе Deschene et al. использовали гипоксический миметик и выявили HIF-1-зависимую гиперэкспрессию *COL1A1* и снижение *MMP2*, что может объяснять развитие фиброзной ткани (Deschene et al., 2012). Напротив, при ревматоидных воспалительных процессах в фибробластах синовиальной жидкости нарушался баланс ферментов с увеличением активности MMP (MMP-1 и MMP-3), снижением их ингибитора (TIMP-1), что приводило к избыточной деградации ВКМ хрящевой и костной тканей (Cha et al., 2003). С учетом отсутствия изменений в продукции коллагеновых белков, можно предположить, что физиологическая гипоксия не способствует как профиброзным состояниям, так и избыточной деградации ВКМ.

Снижение активности ММР в условиях физиологической гипоксии может указывать на сохранение «состояния покоя» МСК при постоянном воздействии 5 % O₂, тогда как 20 % O₂ может провоцировать активацию МСК, в том числе запускаящую миграцию и перестройку ВКМ.

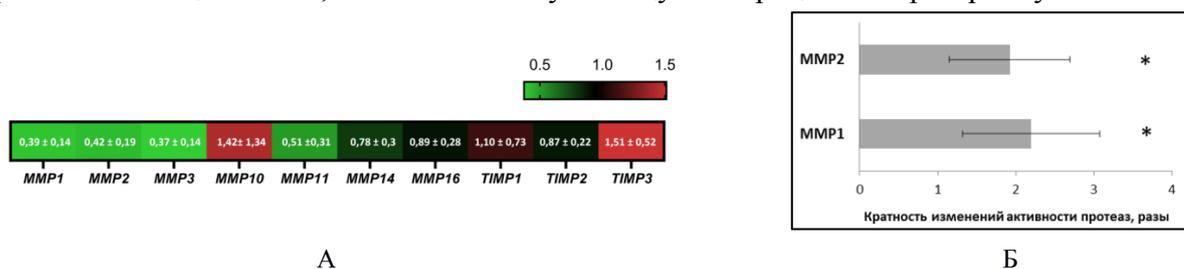


Рис. 6. Характеристика продукции регуляторных молекул матрикса МСК. А – дифференциальная экспрессия генов матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов в МСК, культивируемых при 5 % O₂ по сравнению с 20 % O₂ (за единицу приняты значения экспрессии данных генов у МСК при 20 % O₂). Данные представлены как M ± SD, n = 3; Б – активность матриксных металлопротеиназ (ММР-1, ММР-2), секретируемых МСК при 20 и 5 % O₂ (за единицу приняты значения при 5 % O₂). Данные представлены как M ± SD; * – p < 0,05, n = 3.

Характеристика децеллюляризованного ВКМ

Для характеристики свойств ВКМ, полученного от МСК при 20 или 5 % O₂, были использованы децеллюляризованные препараты ВКМ (дцВКМ-Нор и дцВКМ-Гип соответственно). МСК, как ключевые компоненты соединительной ткани, при культивировании синтезируют достаточное количество ВКМ с различными фибриллярными и растворимыми структурными элементами (Kusuma et al., 2017). Однако отмечено, что ВКМ от стромальных клеток, в том числе фибробластов, не имеет ориентации (Harris et al., 2018). В нашей работе мы продемонстрировали, что после децеллюляризации сохраняется разветвленная сеть ВКМ (Sirius Red, рис. 7, А). При этом отмечены морфологические структурные различия в дцВКМ, полученных при различных уровнях O₂ (рис. 7, Б, В). ДцВКМ-Нор был сформирован мембраноподобными структурами перекрещенных извилистых фибрилл разного размера, тогда как дцВКМ-Гип был представлен равномерно выровненными фибриллами, собранными в решетчатые структуры.

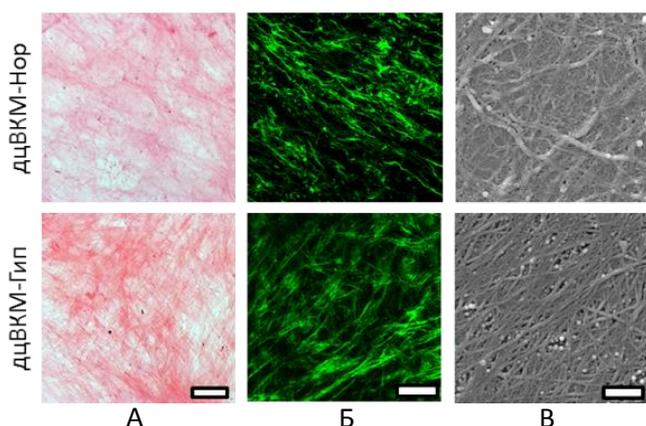


Рис. 7. Структура дцВКМ, полученных от МСК при 20 или 5 % O₂ (дцВКМ-Нор и дцВКМ-Гип соответственно). А – накопление коллагеновых белков (Sirius Red), масштаб – 50мкм; Б – автофлуоресценция при 488 нм, масштаб – 50 мкм; В – сканирующая электронная микроскопия, масштаб – 500 нм.

Такие различия в плотности и выровненности волокон могут определяться свойствами как структурных, так и регуляторных компонентов матрикса. В работе Makris et al. показано, что при культивировании хондроцитов при пониженном уровне O₂ (4 %) в течение 3–4 недель значительно увеличивается экспрессия гена *LOX* с сопутствующим увеличением числа поперечных сшивок между фибриллами коллагена (Makris et al., 2015). Нами установлено увеличение экспрессии гена лизилоксидаза подобного белка (*LOXLA*), что может оказывать влияние на формирование фибриллярной структуры дцВКМ-Гип. Показано, что гипоксия-зависимое усиление

посттрансляционной 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 и при физиологической гипоксии.

Для подробного анализа изменения белков матрисома в дцВКМ, которые могут обуславливать различия в структуре, провели масс-спектрометрический анализ в растворимой в мочеvine фракции белков ВКМ (согласно Lin et al., 2012).

Протеомный профиль растворимой фракции дцВКМ

В образцах экстрактов дцВКМ было идентифицировано 89 молекул матрисома. 80 % белков было представлено как в пробах дцВКМ-Нор, так и в дцВКМ-Гип, при этом выявлены уникальные протеины в каждой из вышеперечисленных групп (8 и 9 соответственно). Соотношение белков, относящихся к основному матрисому и матрисом-ассоциированным компонентам, составило 65 % и 35 % соответственно. Среди детектируемых во всех образцах дцВКМ наибольшее число белков приходилось на гликопротеины (40%) и регуляторные молекулы (16%).

Для дальнейшего анализа белки были разделены на группы: белки, относительное содержание которых не различалось в группах дцВКМ-Нор и дцВКМ-Гип, и белки, относительное содержание которых было более чем 1,5 раза меньше или больше в дцВКМ-Гип по сравнению с дцВКМ-Нор. 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 реактоным путям (на основании базы данных <https://string-db.org/>).

Среди белков, относительное содержание которых не различалось в группах дцВКМ-Нор и дцВКМ-Гип (рис. 8), преобладающее число участвует в организации ВКМ или в метаболизме макромолекул, в частности, коллагеновых (COL1A1, COL12A1, LOX, LOXL2, LUM, SERPINH1) и эластиновых (ELN1, TNXB, LOX) волокон. Стоит отметить участие большинства детектируемых белков в таких процессах, как адгезия и миграция клеток (COL6A1, COL12A1, FN1, SPON1, FBN1, TNXB, TNC, POSTN, VCAN). Выявлены гликопротеины, 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 (COL1A1, COL1A2, ECM, VCAN, TNC, CTHRC1, LOX). Отмечены молекулы, участвующие в передаче сигнала и клеточном ответе на TGF- β (FBN1, MXRA5, POSTN, LTBP2, THBS1, LUM).

Далее была проанализирована группа белков, относительное содержание которых было более чем 1,5 раза меньше в дцВКМ-Гип, а также уникальных для дцВКМ-Нор (рис. 9). С помощью визуализации интерактивной сети белок-белковых взаимоотношений и анализа основных реактивных путей можно выделить 4 кластера белков (рис. 9, А).

15 белков из этой группы ответственны за организацию ВКМ, в том числе организацию коллагеновых (COL3A1, COL5A1, COL6A1, COL16A1) и эластиновых (MFAP5, FBLN5, FBLN2, VTN, LTBP1, EMILIN1, LOXL4) фибрилл. Повышение в дцВКМ-Нор уровня эластин-ассоциированных белков может объяснять их извилистую структуру по сравнению с выровненной в дцВКМ-Гип. Среди детектируемых протеинов аннотированы группы с участием в клеточной миграции (COL3A1, EMILIN1, SPARC, IGFBP3, SERPINE1, SULF1, SEMA7A) и негативной регуляции ангиогенеза (SPARC, FBLN5, EMILIN1, SULF1, SERPINE1). Выявлен кластер белков, вовлеченных в регуляцию свертывания крови, дегрануляцию тромбоцитов, негативную регуляцию плазминогена и эндопептидаз (VTN, SERPINE1, SERPINE2, SERPINC1, F5, TIMP3).

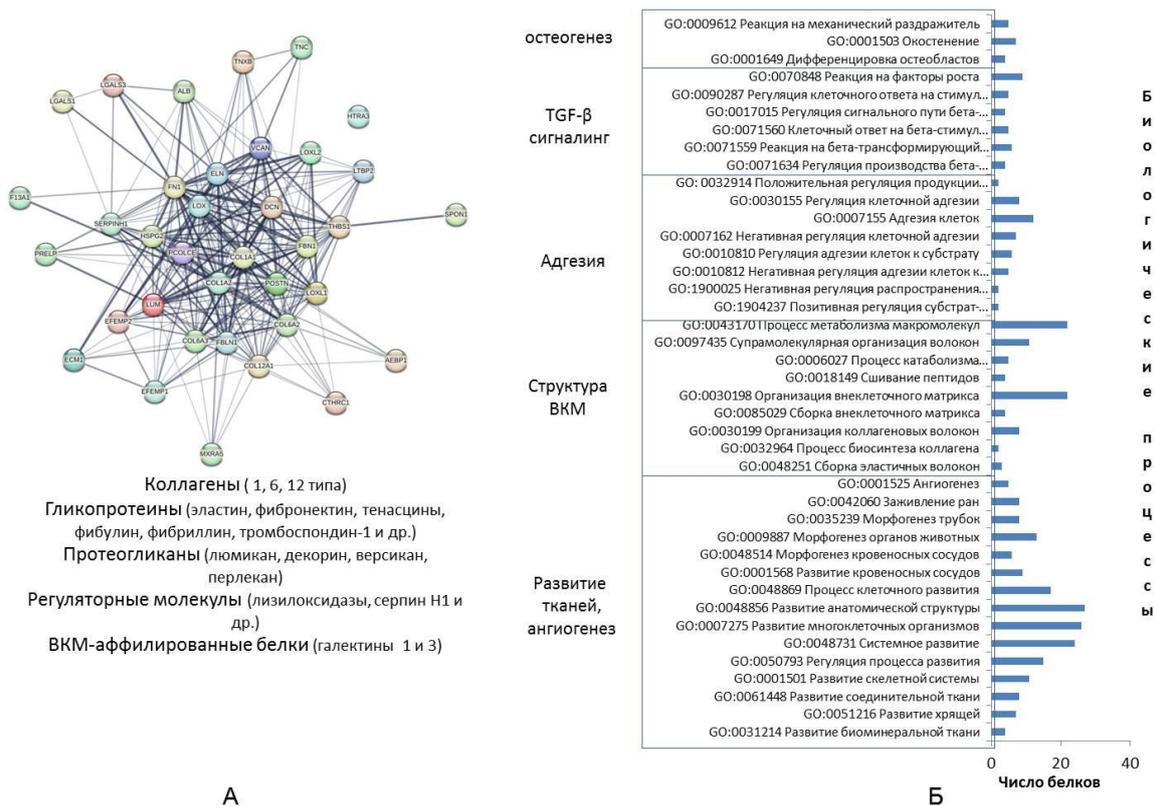


Рис. 8. Характеристика белков, относительное содержание которых не различалось в группах дцВКМ-Нор и дцВКМ-Гип. А – интерактивная сеть белок-белковых взаимосвязей среди молекул, детектируемых масс-спектрометрически (<https://string-db.org/>); Б – насыщение групп по функциональной принадлежности к биологическим процессам согласно <http://geneontology.org/>.

Аннотирование взаимодействий белков, относительное содержание которых было более чем 1,5 раза больше в дцВКМ-Гип, а также уникальных для дцВКМ-Гип, позволил выделить 3 кластера белков с сильными связями, представленными на рис. 10. Большинство детектируемых белков данной группы участвует в клеточной адгезии (COL5A1, COL12A1, COL14A1, COL15A1, THBS4, FBLN5, NPNT, NAPLN1, CTGF, SRPX2). Матрисом МСК при физиологической гипоксии обогащен тканеспецифичными коллагенами, такими как коллаген 12 и 14 типа, и протеогликанами (BGN, FMOD, NAPLN1, CILP), которые участвуют в метаболизме гликозаминогликанов (ГАГ), обеспечивают упругие свойства ВКМ и участвуют в организации коллагеновых волокон.

Для данной группы белков отмечена роль в ангиогенезе и его регуляции, а также развитию кровеносных сосудов (COL5A1, COL15A1, GREM1, FGF2, CTGF, SRPX2). Интересно, что большое количество белков в этой группе участвует в регуляции пролиферации клеточных популяций, в том числе гладкомышечных клеток (GREM1, FGF2, CTGF, IGFBP5, TGM2, THBS4, FBL5).

Мы также использовали иммуноферментный анализ для определения концентрации ключевых факторов роста, таких как VEGF и TGF-β, в экстрактах дцВКМ (данные не представлены). Было установлено, что при физиологической гипоксии происходит усиление депонирования VEGF и снижение - TGF-β. VEGF - ключевой медиатор развития и роста кровеносных сосудов (Shibuya et al., 2011; Claesson-Welsh et al., 2013). 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).

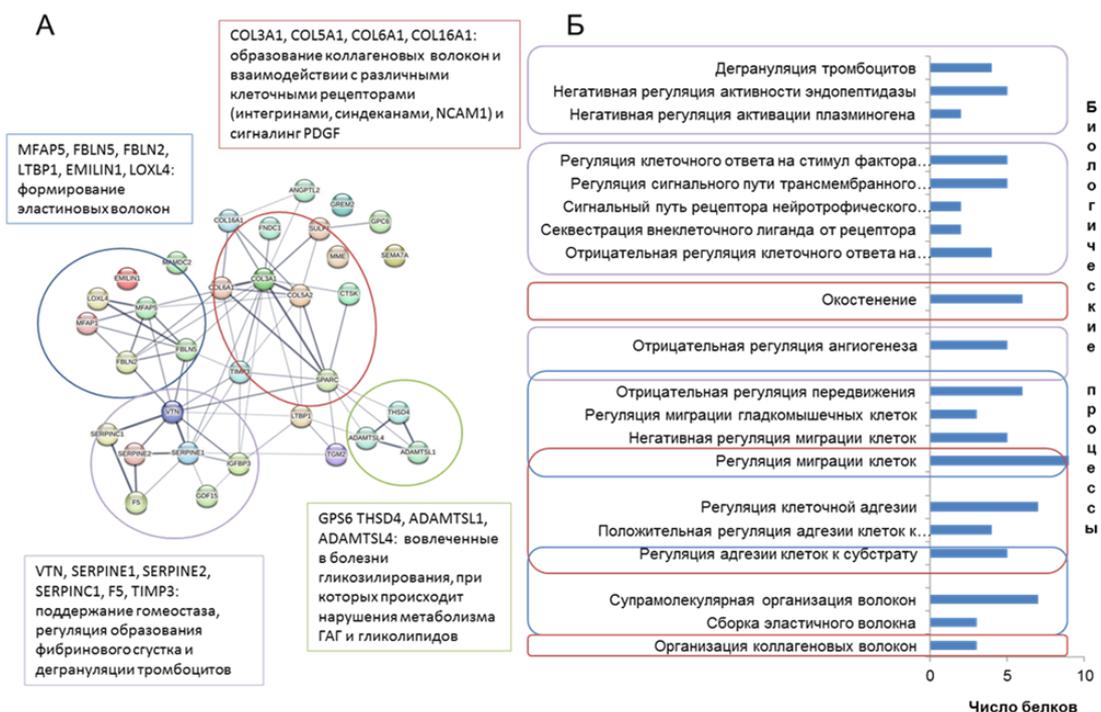


Рис. 9. Характеристика белков, относительное содержание которых было снижено в дцВКМ-Гип по сравнению с дцВКМ-Нор, или уникальных для дцВКМ-Нор. А – интерактивная сеть белок-белковых взаимосвязей среди молекул, детектируемых масс-спектрометрически (<https://string-db.org/>); Б – насыщение групп по функциональной принадлежности к биологическим процессам согласно <http://geneontology.org/>.

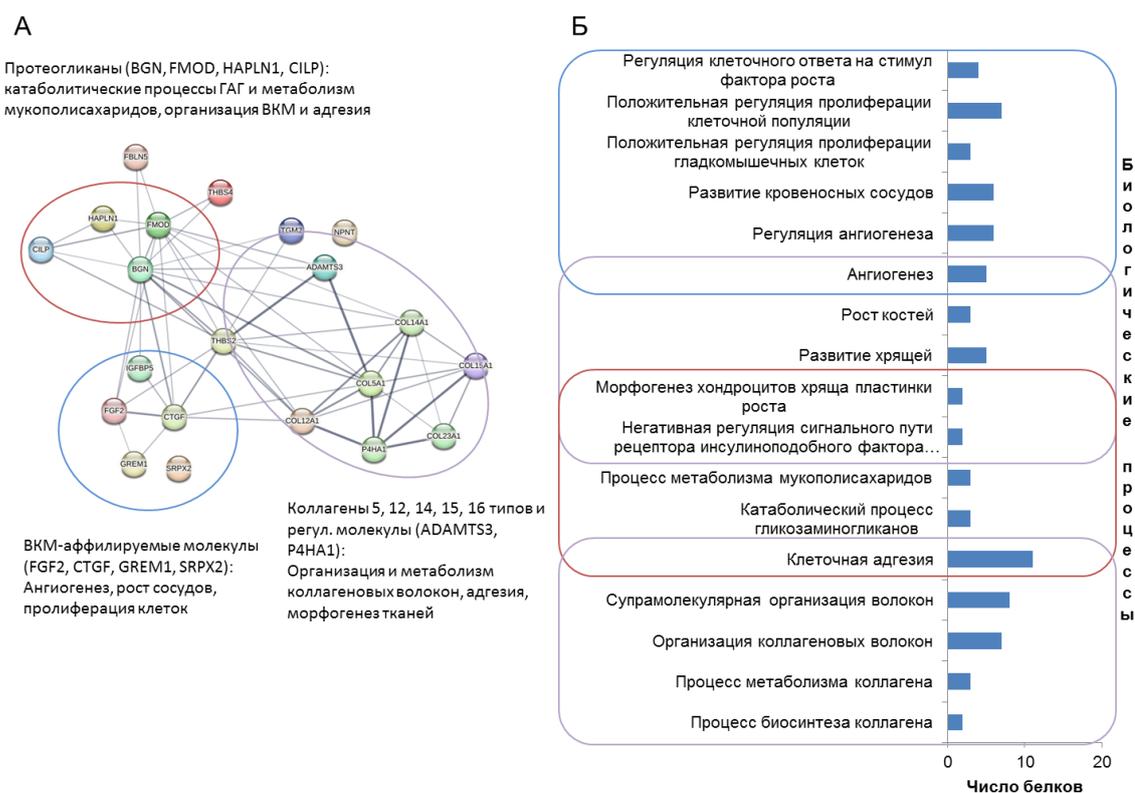


Рис. 10. Характеристика белков, относительное содержание которых было увеличено в дцВКМ-Гип по сравнению с дцВКМ-Нор, или уникальных для дцВКМ-Гип. А – интерактивная сеть белок-белковых взаимосвязей среди молекул, детектируемых масс-спектрометрически (<https://string-db.org/>); Б – насыщение групп по функциональной принадлежности к биологическим процессам согласно <http://geneontology.org/>.

Мы проанализировали 2 группы белков – с повышенным уровнем в пробах дцВКМ-Нор или дцВКМ-Гип – с точки зрения их распространения в тканях (на основании Tissue expression database, рис. 11). Большая часть из них в каждой группе относилась к тканеспецифичным для плаценты, соединительной ткани и скелетной системы. Но при этом интересно, что при 20 % O₂ была выявлена группа белков, которая не детектировалась при 5 % O₂ и относилась к специфичным для кожи, фибробластов и костной ткани. При этом при 5 % O₂ выявлялись специфичные белки для хондроцитов и хрящевой ткани, а также специфические молекулы для плодных оболочек и эмбриональных структур.



Рис. 11. Распределение белков матрисома по представленности в тканях (<https://tissues.jensenlab.org/>). А – группа белков, уровни которых были увеличенными или уникальными в дцВКМ-Нор; Б – группа белков, уровни которых были увеличенными или уникальными в дцВКМ-Гип.

Особый интерес представляют белки, специфичные для костной ткани, увеличенные или уникальные при 20 % O₂ (COL3A1, COL5A1, COL6A1, SPARC, CTSK), и для хрящевой ткани – при 5 % O₂ (HAPLN1, CILP, GREM1, CTGF). Среди уникальных для дцВКМ-Гип обнаружены гликопротеины IGFBP5 и CLIP, для которых установлена связь с негативной регуляцией передачи сигналов через рецептор инсулиноподобного фактора роста, который влияет на пролиферацию хондроцитов.

Полученные данные о различиях в белковом составе оказываются интересными с точки зрения использования дцВКМ для модификации свойств культивируемых на них клеток. Обнаруженные кластеры белков могут предсказывать поведение клеток после рецеллюляризации. Например, то, что в дцВКМ-Гип найдены молекулы, вовлеченные в регуляцию клеточной пролиферации и ангиогенез, указывает на возможность модулировать активность эндотелиальных клеток. Интересно, что регуляция этих процессов является частью гипоксических компетенций МСК и соответственно отражается на составе матрисома. Проведенные исследования, 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).

Аналогично данные, полученные по уникальным тканеспецифичным белкам в дцВКМ при различных кислородных условиях, коррелируют с данными со снижением остео- и увеличению хондродифференцировки МСК при 5 % O₂ (Salim et al., 2004; Volkmer et al., 2010; Yang et al., 2011). Различия в белковом составе матрисома в МСК при различном уровне O₂ могут приводить к дивергенции функциональной активности дцВКМ.

Полученные данные позволили предположить, что различия белкового состава дцВКМ могут определять функциональную активность клеток при последующей рецеллюляризации. Поэтому следующий этап работы мы определили, может ли дцВКМ-Гип передавать «гипоксические» компетенции МСК при повторном заселении.

Экспансия МСК на дцВКМ

Известно, что быстрое прикрепление является одним из основных свойств МСК. Как показано в работе (Lin et al., 2012), для прикрепления МСК и начала их распластывания достаточно 30 мин. Рецеллюляризованные МСК были гетерогенны по размеру и морфологии. В соответствии с работами Shutova (2010), Aleksandrova (2011) мы выделили следующие

морфологические типы (рис. 12, А): 1 – мелкие нераспластанные клетки (до 50 мкм); 2 – средние 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, в то время как на дцВКМ в избытке присутствовали крупные уплощенные МСК. Доля таких МСК была значительно выше среди прикрепленных к дцВКМ-Гип (см. рис. 12, Б).

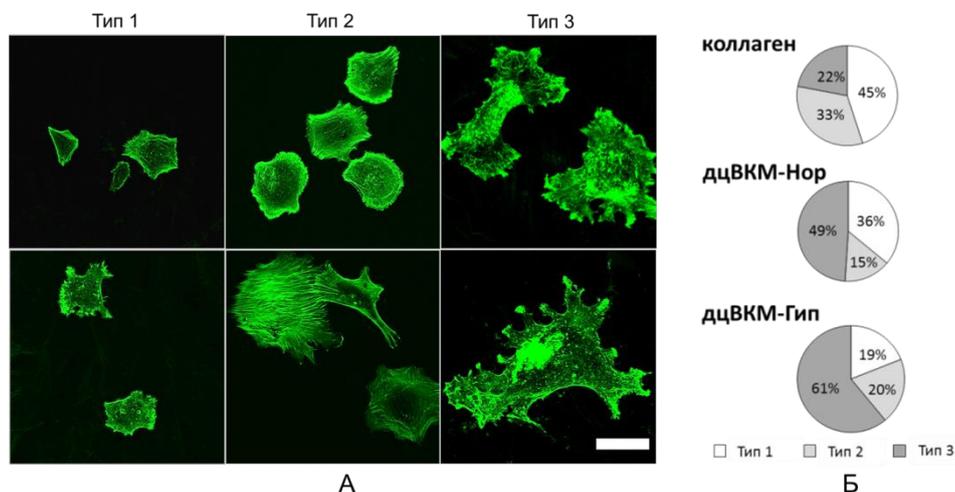


Рис. 12. Прикрепление и распластывание МСК на различных субстратах. А – гетерогенность МСК, окрашенных Alexa488-фаллоидином; репрезентативные изображения; масштабный отрезок – 50 мкм; Б – доля МСК разной формы после 30 мин адгезии на коллагене/дцВКМ-Нор/дцВКМ-Гип.

Приведенные данные о характере распластывания в течение 30 мин подтверждают зависимость специфики формы клеток от свойств субстрата. Ранее было показано, что фибробласты в первые 2–24 ч после прикрепления к пластику претерпевают последовательные этапы изменения формы клеток: дискообразную, поляризованную с активным краем, вытянутую фибробластоподобную (Shutova 2010; Aleksandrova, 2011). Различные формы МСК (тип 1 – 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 МСК в пользу уплощенных, особенно на дцВКМ-Гип. 30-минутный срок экспозиции позволил нам не только охарактеризовать адгезию, но и обнаружить фенотипические различия МСК на различных субстратах, что определяется отличиями, по крайней мере, в жесткости. Адгезия и миграция клеток регулируются 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., 2005; Engler et al., 2006; Kular et al., 2014).

На 3-и сутки морфология МСК на различных субстратах значительно отличались (рис. 13). 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-Норм клетки образуют несколько псевдоподий, вероятно нащупывая направление распространения.

Через 7 суток культивирования МСК на обоих дцВКМ выглядели сходно (рис. 13). Клетки имели специфический фибробластоподобный вид с узким и вытянутым телом. При этом на коллагене монослой МСК был менее неоднородным, присутствовали как распластанные, так и веретенообразные клетки.

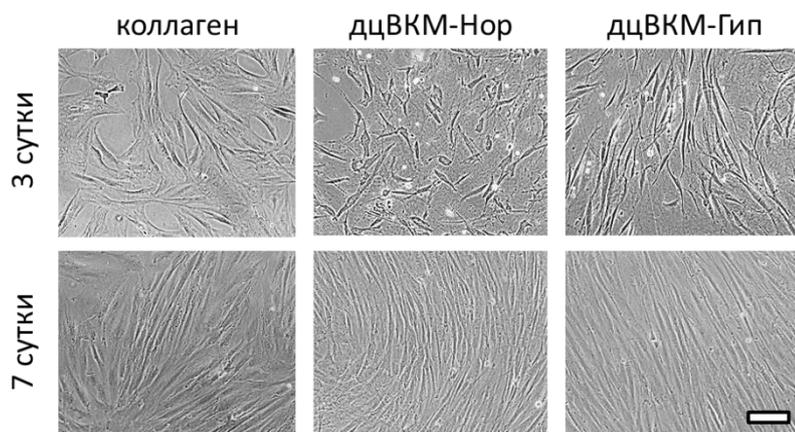


Рис. 13. Культура МСК на 3-и и 7-е сутки после рецеллюляризации на коллаген/дцВКМ-Норм/дцВКМ-Гип. Репрезентативные изображения, фазовый контраст, масштабный отрезок – 100 мкм.

Способность контролировать ориентацию фибрилл обеспечивает еще один механизм регуляции поведения клеток. 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 разветвление 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.

Паракринный профиль МСК после рецеллюляризации на дцВКМ

С помощью иммунофлуоресцентного мультиплексного анализа было определено 48 цитокинов и факторов роста в кондиционированной среде МСК, рецеллюляризованных на коллаген, дцВКМ-Норм и дцВКМ-Гип после 7 суток культивирования. Некоторые из них не определялись или были представлены на пороге чувствительности метода. Из достоверно детектируемых уровни IL-6, MCP-1, IP-10 и RANTES не зависели от типа субстрата. В кондиционированной среде МСК, рецеллюляризованных на дцВКМ-Гип, было обнаружено снижение уровня FGF-2 и повышение уровней IL-8, GRO- α и эотаксина по сравнению с дцВКМ-Норм (рис. 14). 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 плеiotропного фактора роста – FGF-2. Это оказалось неожиданным, поскольку FGF-2 – известный стимулятор пролиферации МСК с выраженной ангиогенной 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, обладает различной способностью связываться с секретируемым клетками и экзогенным FGF-2. ДцВКМ-Гип

депонировал в 2 раза больше FGF-2, чем дцВКМ-Нор, и сильнее связывал FGF-2 из кондиционированной среды МСК. Вероятно, подобный механизм мог иметь место и в нашем случае, снижая уровень растворимого FGF-2 в пользу связанного.

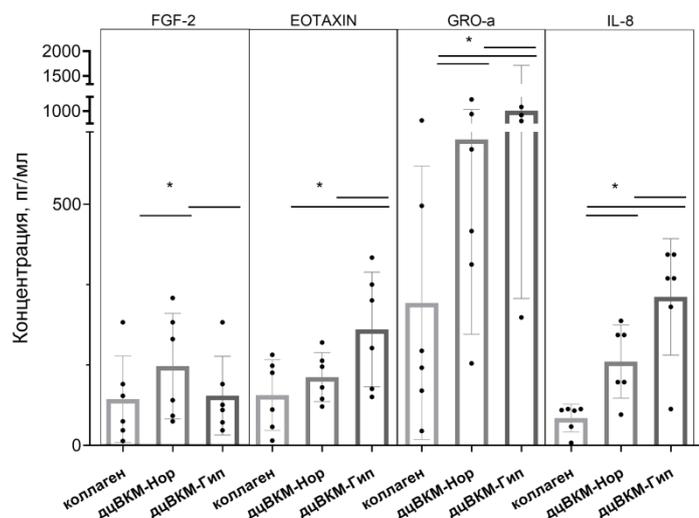


Рис. 14. Содержание медиаторов в кондиционированной среде МСК после рецеллюляризации на коллаген/дцВКМ-Нор/дцВКМ-Гип, определенное с помощью мультиплексного анализа. Данные представлены как $M \pm SD$, $*p < 0,05$ ($n=6$).

Дифференцировочный потенциал МСК, культивируемых на дцВКМ

Потенциал дифференцировки в остеогенном, адипогенном и хондрогенном направлении считается наиболее важной способностью МСК (Фриденштейн и др., 1986; Caplan, 2007). Хорошо известно, что эффективность дифференцировки *in vitro* в значительной степени зависит от уровня O_2 в микроокружении (Ejtehadifar et al., 2015). Для проверки нашей гипотезы о том, что дцВКМ-Гип способен сохранять «гипоксическую» компетентность, мы сравнили эффективность спонтанного остеокomitирования и индуцированной остеодифференцировки МСК на дцВКМ-Гип или дцВКМ-Нор. После рецеллюляризации на коллаген и препараты дцВКМ МСК культивировали в стандартном CO_2 -инкубаторе (20% O_2). Оценивали признаки спонтанной комитированности и ответ на остеоиндукцию по активности щелочной фосфатазы (ЩФ) – раннего маркера остеодифференцировки и экспрессии генов связанных с остеогенезом.

Полуколичественный колориметрический анализ показал, что в спонтанно остеокomitированных МСК интенсивность ЩФ-окрашивания была значительно выше на дцВКМ, чем на коллагене, при этом на дцВКМ-Нор окраска была в 1,5 раза интенсивнее, чем на дцВКМ-Гип. Этот эффект отменялся после остеоиндукции (рис. 15, А).

Далее мы исследовали экспрессию гена транскрипционного фактора *RUNX2* и *ALPL* – гена, кодирующего ЩФ (рис. 15, Б). В отсутствие остеоиндукторов экспрессия *RUNX2* была повышена в МСК на дцВКМ-Нор 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-Нор. 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 нашей работе обнаружен феномен снижения остеопотенциала при культивировании МСК на дцВКМ-Гип. Ранее подобный эффект был описан только в работе Pei et al. (2012). Авторы использовали дцВКМ, полученный из МСК, предварительно кондиционированных в гипоксии в течение 14 суток. После последующей рецеллюляризации наблюдалось снижение дифференцировки МСК в osteo- и адипогенном направлениях.

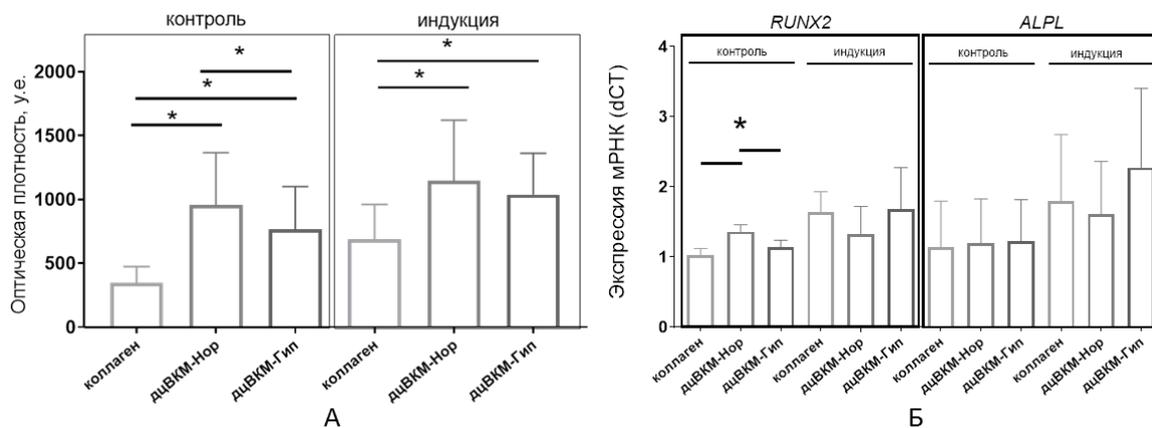


Рис. 15. Спонтанная (контроль) и индуцированная (индукция) дифференцировка МСК в остеогенном направлении, культивируемых на коллагене/дцВКМ-Нор/дцВКМ-Гип, в течение 7-ми суток. А – спектрофотометрическое определение активности щелочной фосфатазы, 550 нм. Данные представлены как $M \pm SD$, $n = 6$; * – $p \leq 0,05$; Б – экспрессия генов *RUNX2*, *ALPL*, выявленная методом ОТ-ПЦР. Данные представлены как $M \pm SD$, $n = 3$; * – $p < 0,05$.

С точки зрения остеопотенциала МСК интересно изменение профиля растворимых медиаторов МСК на дцВКМ-Гип. Обнаружено увеличение содержания воспалительных цитокинов GRO- α и зотаксина, которые рассматриваются как потенциальные предикторы потери костной массы, т.е. могут негативно влиять на остеогенез. Противовоспалительный препарат дексаметазон является обязательным компонентом остеоиндукционной среды, а в МСК после остеоиндукции *in vitro* было продемонстрировано снижение уровня GRO- α (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 остеоидифференцировки регулируются реципрокно, можно предположить, что повышенный уровень этого воспалительного цитокина может препятствовать остеокоммитированию. FGF-2 считается одним из остеоиндуцирующих цитокинов, рецептор которого, FGFR1, является ключевым регулятором созревания остеобластов в процессе остеогенеза. 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 матрикса, 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 децеллюляризованных 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.

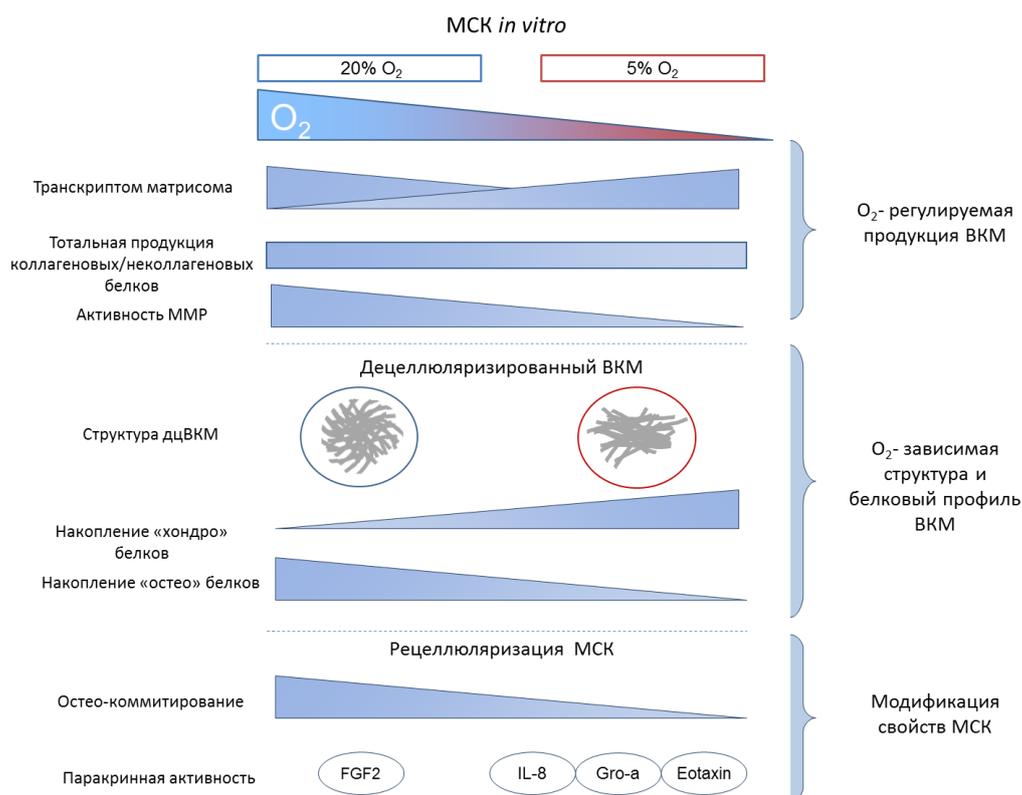


Рис. 16. Влияние физиологической гипоксии на свойства и активность ВКМ МСК.

Мы предположили, что ВКМ, продуцируемые МСК при различном уровне O_2 , могут отличаться по способности регулировать функциональную активность рецеллюляризованных клеток. Анализ данных по прикреплению к дцВКМ и расплыванию 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 ЩФ 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 (рис. 16). 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.

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 промигранционной (*CXCL12*) и антиоксидантной (*SRPX*, *SERPINF1*) функциями.
2. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, постоянно культивируемые при 20 и 5 % O_2 , 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 % O_2 – костной (*COL3A1*, *COL5A1*, *COL6A1*, *SPARC*, *CTSK*) тканей. При 5 % O_2 в матриксе увеличивается содержание белков, вовлеченных в регуляцию клеточной пролиферации и ангиогенеза (*FGF2*, *VEGF*, *SRPX2*, *GREM1*).
5. Децеллюляризированные матриксы, продуцируемые мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками при 20 и 5 % O_2 , улучшают адгезию и определяют направленность клеточного роста. После рецеллюляризации на матрикс, полученный при физиологической гипоксии, в мультипотентных мезенхимальных стромальных клетках замедляется спонтанное остеокмитирование на фоне увеличения продукции IL-8, GRO- α , эотаксина и снижения FGF-2.

Список работ, опубликованных по материалам диссертации

Статьи:

1. Андреева Е.Р., Матвеева Д.К. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки и внеклеточный матрикс: регуляция в условиях гипоксии // Физиология человека. – 2018. – Т. 44. – № 6. – С. 696–705.
2. 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. Серия 16. Биология. – 2019. – Т. 74. – № 4. – С. 294–300.

3. **Матвеева Д.К.**, Андреева Е.Р. Регуляторная активность децеллюляризованного матрикса мультипотентных мезенхимных стромальных клеток // Цитология. – 2020. – Т. 62. – № 10. – С. 699–715.
4. **Матвеева Д.К.**, Андреева Е.Р., Новиков Н.Н., Пустовой В.И., Буравкова Л.Б. Структурная организация и состав внеклеточного матрикса мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток при различном уровне содержания кислорода *in vitro* // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2020. – Т. 9. – № 1. – С. 57–63.
5. **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. 476–492.

Тезисы докладов научных конференций:

1. **Матвеева Д.К.**, Живодерников И.В. Внеклеточный матрикс мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток *in vitro*: особенности при различном уровне O₂ в микроокружении // Сборник XVIII конференции молодых учёных, специалистов и студентов, посвящённой 50-летию высадки человека на Луну. Москва. 16 апреля. – 2019. – С. 35-36.
2. **Матвеева Д.К.**, Живодерников И.В. Особенности продукции внеклеточного матрикса мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток *in vitro* при различном содержании O₂ // Материалы международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2019». Москва. 8-12 апреля. – 2019. – С. 1-2.
3. **Матвеева Д.К.**, Андреева Е.Р. Оптимизация протокола получения децеллюляризованного внеклеточного матрикса мезенхимальных стромальных клеток из жировой ткани человека // IV национальный конгресс по регенеративной медицине. Москва. 20-23 ноября. Гены и Клетки. – 2019. – Т. 14. – С. 147.
4. **Матвеева Д.К.**, Андреева Е.Р. Рецеллюляризация внеклеточных матриксов от МСК, культивируемых при различном уровне O₂ // VII молодёжная школа-конференция по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН. Санкт-Петербург. 12–15 октября. Гены и Клетки. – 2020. – Т. 15. – № 3. – С. 19-20.
5. **Matveeva D.**, Buravkov S., Andreeva E. Decellularised extracellular matrix from mesenchymal stromal cells permanently cultured under different O₂ levels: morphology and functional activity // TERMIS EU. Манчестер. 26-29 мая. ECM Periodical, Collection 1. – 2020. – P. 229.
6. **Матвеева Д.К.**, Андреева Е.Р., Рудимова Ю.В., Буравкова Л.Б. Особенности дифференциальной экспрессии матрисомных генов в МСК, постоянно культивируемых при 5% и 20% O₂ // Сборник тезисов IV Сеченовского международного биомедицинского саммита. Москва. 17-18 ноября. – 2020. – С. 17.
7. **Матвеева Д.К.**, Якубец Д.А. Дифференциальная экспрессия генов матрикс-ассоциированных протеаз и их активность в МСК при «физиологической» гипоксии *in vitro*. // Сборник научных трудов всероссийской научной конференции с международным участием «Регенеративная биология и медицина». Москва. 15-16 апреля. – 2021. – С. 142-143.
8. **Матвеева Д.К.**, Жидкова О.В. Влияние «физиологической» гипоксии на профиль экспрессии генов белков матрикса мезенхимальных стромальных клеток *in vitro*. // Сборник XIX Конференции молодых учёных, специалистов и студентов», посвящённой 60-летию первого полета человека в космос. Москва. 26 ноября. – 2021. – С. 51-52.
9. **Матвеева Д.К.**, Каширина Д.Н. Протеом внеклеточного матрикса мезенхимальных стромальных клеток, культивируемых при различном уровне O₂ // VIII Молодежная школа-

конференция по молекулярной биологии. Санкт-Петербург. 11-14 октября. Цитология. – 2022. – Т. 64. – № 7. – С. 741-742.

10. **Матвеева Д.К.**, Андреева Е.Р., Буравкова Л.Б. Тканевой уровень O_2 *in vitro* как модулятор индуктивных свойств внеклеточного матрикса мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток // Международный конгресс CRISPR-2023. Новосибирск. 11-13 сентября. Гены и Клетки. – 2023. – Т. 18. – С. 76.

Список использованных сокращений:

МСК – мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки
 ВКМ – внеклеточный матрикс
 дцВКМ – децеллюляризированный ВКМ
 дцВКМ-Нор – дцВКМ, полученный от МСК, культивируемых при 20% O_2
 дцВКМ-Гип – дцВКМ, полученный от МСК, культивируемых при 5% O_2
 ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
 СЭМ – сканирующая электронная микроскопия
 ЛСМ — лазерно-сканирующая микроскопия
 NH_4OH – гидроксид аммония
 PBS – фосфатно-солевой буфер
 DAPI – 4,6-диамидино-2-фенилиндола
 MMP – матриксная металлопротеиназа
 TIMP – тканевой ингибитор MMP
 ГАГ – гликозаминогликан
 COL – коллаген
 SPARC – остеоонектин
 TGF- β – трансформирующий фактор роста β
 VEGF – фактор роста эндотелия сосудов
 FGF – фактор роста фибробластов
 CTGF – фактор роста соединительной ткани
 IL – интерлейкин
 HAPLN1 – гиалуронан и протеогликан связывающий белок 1
 CILP – белок, промежуточного слоя хряща
 GREM1 – гремлин-1
 SRPX2 – белок 2 с повторами sushi