

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. Ломоносова

На правах рукописи

Новоселецкая Екатерина Сергеевна

**Выяснение роли мезенхимных стромальных клеток
в регуляции направленной дифференцировки и перепрограммирования
стволовых клеток**

Специальности: 03.01.08 – «Биоинженерия»

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва – 2021

Работа выполнена на кафедре биохимии и молекулярной медицины факультета фундаментальной медицины и в Институте регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного центра Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения
«Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова»

Научный руководитель: *Ефименко Анастасия Юрьевна*, кандидат медицинских наук

Официальные оппоненты: *Григорьева Эльвира Витальевна* - доктор биологических наук, заведующая лабораторией гликобиологии рака Научно-исследовательского института молекулярной биологии и биофизики (НИИМБ) Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

Киреев Игорь Игоревич - доктор биологических наук, заведующий отделом электронной микроскопии Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Маркевич Елена Арнольдовна - доктор химических наук, главный научный сотрудник, руководитель лаборатории биомедицинских материалов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской академии наук

Защита диссертации состоится «15» сентября 2021 года в 15 ч 00 мин на заседании диссертационного совета МГУ.03.04 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 73,
Факультет биоинженерии и биоинформатики, ауд. 221.

E-mail: dissoviet@belozersky.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций Научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский проспект, д. 27) и на сайте ИАС «Истина»: <https://istina.msu.ru/dissertations/373562052>

Автореферат разослан «__» августа 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Шаповалова И.В.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Akt	протеинкиназа В
Akti	ингибитор Akt
DBN	добутамин
ERK	киназа, регулируемая внеклеточными сигналами
FAK	киназа фокальной адгезии
hTERT-МСК	иммортализованные мезенхимные стволовые клетки
MEK	селективный ингибитор МАРК-киназ
pERK	fosфорилированная ERK
pFAK	fosфорилированная FAK
PP2	ингибитор Src-киназ
PPARγ	рецептор, активируемый пероксидоми пролифераторами
pYAP	fosфорилированная Yap
RGD	аргинилглицилспарагиновая кислота
RPLP0	кислый рибосомный белок 60S P0
Runx2	фактор транскрипции 2, содержащий домен Runt
Src	не связанная с клеточным рецептором тирозинкиназа
TAZ	коактиватор транскрипции с PDZ-связывающим мотивом
THP-1	клеточная линия промоноцитов человека
Yap	Yes-ассоциированный белок
ВКМ	внеклеточный матрикс
дВКМ	децеллюлялизованный ВКМ
МСК	мезенхимные стромальные клетки

ВВЕДЕНИЕ

1. Актуальность

Поддержание постоянства и функций стволовых клеток в норме обеспечивается за счет их особого микроокружения, или ниши стволовой клетки. Важнейшими компонентами ниши являются внеклеточный матрикс (ВКМ), регуляторные растворимые факторы, а также поддерживающие клетки, которые формируют специфическое клеточное микроокружение для стволовых клеток. Для большинства ниш стволовых клеток характерно активное участие мезенхимных стромальных клеток (МСК) в качестве поддерживающего компонента. При этом в настоящее время все большее

внимание обращают на регуляторные функции ВКМ, продуцируемого МСК. Показано, что ВКМ играет важную роль в патогенезе различных заболеваний, в процессе старения, а также при нарушении функционирования стволовых клеток. В связи с этим представляется важным изучение механизмов регуляции ВКМ, продуцируемым МСК, процессов дифференцировки стволовых и прогениторных клеток.

2. Степень разработанности темы

Было показано, что наиболее представленными в секретоме МСК человека являются стромальные белки и факторы, участвующие в ремоделировании ВКМ. Распространенной *in vitro* моделью для накопления ВКМ является культивирование клеток в высокой плотности до формирования клеточного пласта, после чего клетки -"продуценты" удаляют с помощью децеллюляризации детергентами или с помощью других подходов. Стоит обратить внимание, что стимуляция дифференцировки клеток в присутствии отдельных компонентов ВКМ, которые часто используют для покрытия культурального пластика, например, фибронектина или коллагена I типа, в сравнении с эффектами, наблюдаемыми при культивировании на децеллюляризованном ВКМ, полученным от МСК, была значительно менее выражена. Таким образом, существуют очевидные предпосылки, что ВКМ, продуцируемый МСК, оказывает специфическое функциональное воздействие на постнатальные стволовые и прогениторные клетки, регулируя их дифференцировку. Изучению особенностей этого влияния и раскрытию его механизмов посвящена диссертационная работа.

3. Цели и задачи

Целью данной работы является выяснение механизмов регуляции дифференцировки стволовых клеток внеклеточным матриксом, продуцируемым мезенхимными стромальными клетками человека. Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Разработать технологию получения внеклеточного матрикса, продуцируемого МСК человека, с сохранением его функциональной

- структуры и ключевых компонентов с помощью децеллюляризации клеточных пластов из МСК (дВКМ).
2. Оценить влияние дВКМ на поведение мультипотентных мезенхимных стволовых клеток, выделенных из жировой ткани человека, *in vitro*.
 3. Проанализировать активность ключевых участников различных внутриклеточных сигнальных путей в МСК при культивировании на дВКМ.
 4. Провести ингибиторный анализ для выяснения механизмов, опосредующих влияние ВКМ, продуцируемого МСК человека, на дифференцировку стволовых клеток.
 5. Исследовать регенераторные свойства дВКМ от МСК на модели монокортикального диафизарного дефекта бедренной кости крысы.

4. Научная новизна

Впервые предложен подход, основанный на применении децеллюляризованного ВКМ, полученного из клеточных пластов МСК человека, для модуляции ответа стволовых и прогениторных клеток на дифференцировочные стимулы. Разработан и оптимизирован протокол получения дВКМ из клеточных пластов МСК человека. Впервые выявлена способность дВКМ от МСК стимулировать пролиферацию и дифференцировку стволовых клеток на ранних сроках индукции дифференцировки. Показано, что эти эффекты происходят за счет обогащения пула прогениторных клеток и их перепрограммирования в активное состояние готовности к индуцирующим сигналам (компетентность). Определены особенности изменения активности ключевых участников различных внутриклеточных сигнальных путей в МСК человека при культивировании на дВКМ. Впервые установлена способность дВКМ, полученного из клеточных пластов МСК, ускорять регенерацию костной ткани после повреждения у крыс. Новизна и практическая значимость диссертационного исследования также подтверждается полученным патентом (Патент РФ # 2718907 от 15 апреля 2020 г.).

5. Теоретическая и практическая значимость

Исследование позволяет установить значимость регенераторного потенциала ВКМ, продуцируемого МСК, и механизмы его реализации при восстановлении специфического микроокружения стволовых клеток и регенерации тканей на примере костной ткани.

На основании полученных результатов предложены оригинальные подходы к получению ВКМ из клеточных пластов МСК человека. Данные, полученные в результате исследования участия ВКМ от МСК в регуляции дифференцировки стволовых клеток, могут быть использованы для моделирования микроокружения различных ниш тканеспецифичных стволовых клеток *in vitro* и разработки новых терапевтических подходов в регенеративной медицине, в частности, для функционализации остеопластических материалов с целью стимуляции заживления костных дефектов.

6. Методология исследования

В исследовании были использованы современные биоинженерные, биохимические, гистологические и молекулярно-биологические методы, а также методы работы с культурами клеток млекопитающих. Все использованные методики были применены в соответствии с общепринятыми мировыми стандартами и с надлежащими контролями. Методы выделения дВКМ, продуцируемого МСК человека, и подходы к пробоподготовке дВКМ для оценки его характеристик были разработаны и апробированы коллективом лаборатории.

7. Положения, выносимые на защиту

1. МСК поддерживают стабильность фенотипа и дифференцировочный потенциал мультипотентных стволовых и прогениторных клеток путем продукции ВКМ с определенными составом и свойствами.
2. ВКМ, продуцируемый МСК, регулирует поведение стволовых клеток с помощью активации фосфорилирования участников основных внутриклеточных сигнальных путей, включая FAK- и ERK-киназных сигнальные пути, модуляцию YAP-сигнального пути, а также

перераспределения активного бета-катенина из ядра в цитоплазму клеток, в модельной системе *in vitro*.

3. В наблюдаемые эффекты дВКМ значительный вклад вносит взаимодействие клеток с белками внеклеточного матрикса через RGD-связывающие интегрины, в том числе содержащие а5-субъединицу.
4. На основе дВКМ, продуцируемого МСК, может быть создан новый класс медицинских изделий с биомиметическими регенераторными свойствами, в частности, для коррекции дефектов костной ткани.

8. Степень достоверности полученных результатов

Статистическая обработка результатов измерений проводилась с использованием программы GraphPad Prism 8.0. Результаты исследования доложены на российских и зарубежных конференциях и опубликованы в рецензируемых журналах.

9. Личный вклад автора

Автору диссертационного исследования принадлежит ключевая роль в постановке целей и формулировке задач, планировании и проведении экспериментов, статистической обработке данных, подготовке публикаций и патента по теме исследования.

10. Публикации

По материалам диссертации опубликовано 20 печатных работ, в том числе, 6 статей, индексируемых Scopus и Web of Science. По результатам исследования опубликован 1 патент Российской Федерации.

11. Апробация результатов

Основные результаты работы были представлены на VII Троицкой конференции с международным участием "Медицинская физика" (ТКМФ-7), Троицк, 2020 г., VII молодежной школе-конференции по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН, Санкт-Петербург, 2020 г., IV Национальном конгрессе по регенеративной медицине, Москва, 2019 г., конгрессе Европейского общества генной и клеточной терапии «The 27th ESGCT Annual Congress 2019», Барселона, Испания, 2019 г., всероссийской конференции с международным участием "Актуальные проблемы клеточной

биологии и клеточных технологий", Санкт-Петербург, 2019 г., всероссийской конференции с международным участием "Russian International Conference on Cryo-Electron Microscopy 2019(RICCEM-2019)", Москва, 2019 г., международной школе-конференции «7th FEBS Advanced lecture course "Matrix Pathobiology, Signaling and Molecular Targets"», Пирохелион, Греция, 2019 г. (на английском языке), 23-й Международной Пущинской школе-конференции молодых учёных «Биология - наука XXI века», Пущино, 2019 г., XXVI Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2019", Москва, 2019 г., конференции «StemCellBio-2018: Фундаментальная наука как основа трансляционной медицины», Санкт-Петербург, 2018 г., Международном Форуме «Биотехнология: состояние и перспективы развития. Науки о жизни», Москва, 2018 г., Конференции «The second international conference «Cell technologies at the edge: from research to practice» (CTERP) «Translational research in cell therapy», Москва, 2018 г. (на английском языке), конгрессе Европейского общества генной и клеточной терапии «The 26th ESGCT Annual Congress 2019», Лозанна, Швейцария, 2018 г., XXV Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2018", Москва, 2018 г.

12. Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения, заключения, выводов, благодарностей, списка литературы. Работа изложена на 145 страницах компьютерного текста, содержит 1 таблицу, 28 рисунков. Список литературы включает 352 источников, из них 5 отечественных и 347 зарубежных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Культивируемые клетки. Для получения дВКМ были использованы мезенхимные стволовые клетки, иммортализованные с помощью человеческой теломеразы (hTERT-МСК). Исследования по влиянию дВКМ от МСК на поведение стволовых клеток были проведены на первично выделенных МСК жировой ткани человека. **Иммуноцитохимия.** Для оценки депонированных компонентов ВКМ в составе клеточного пласта и дВКМ, полученных из МСК, был проведен иммуноцитохимический анализ основных белков ВКМ: фибронектина, ламина и коллагена I типа с помощью кроличьих поликлональных антител, обеспечивающих специфическое связывание к фибронектину (ab2413, Abcam, Великобритания), ламинину (ab11575, Abcam, Великобритания), коллагену I типа (ab34710, Abcam, Великобритания). Данные антитела были также использованы в **вестерн-блоте и дот-блот анализе.** В качестве вторых антител использовали козлиные антитела против кролика (A11034, A11037, Invitrogen, США). Ядра были мечены с помощью DAPI (DAKO, США). Микроскопию и анализ проводил на инвертированном флуоресцентном микроскопе Leica DMi8 (Leica Microsystems GmbH, Germany).

Пролиферация hTERT-МСК на дВКМ. Для оценки цитотоксичности клетки, высаженные на пластик и на дВКМ, помещали в инкубатор с автоматизированным интерактивным микроскопом для инкубатора IncuCyte Zoom HD/2 CLR (Essen Bioscience, США). Кроме того, жизнеспособность клеток оценивали на 1 и 4 день культивирования с помощью МТТ теста (Панэко, Россия). Измерения оптической плотности проводили на длинах волн 595 нм и 630 нм на спектрофотометре EnVision Multilabel Plate Readers (PerkinElmer, США). **Направленная дифференцировка МСК.** Первично выделенные МСК жировой ткани человека дифференцировали с помощью индукционных сред для остеогенной, хондрогенной и адипогенной дифференцировки (Gibco, США), а эффективность оценивали с помощью окрашивания раствором Ализаринового красного, Толуидинового синего и

Суданового красного О. Для количественного анализа красители были экстрагированы с помощью ДМСО (AppliChem, США), а затем была измерена их оптическая плотность при 530 нм (Судановый красный О), при 560 нм (Ализариновый красный) и при 608 нм (Толуидиновый синий) с помощью планшетного спектрофотометра EnVision Multilabel Plate Reader (PerkinElmer, США). Экспрессия генов была оценена с помощью ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией и представлена с использованием относительного количественного метода с нормировкой на ген домашнего хозяйства (RPLP0) (Δ CT). Для осуществления ингибиторного анализа были использованы: 1) селективные ингибиторы внутриклеточных сигнальных путей; 2) RGD-пептиды; 3) блокирующие антитела. Для проверки стимуляции регенерации с использованием дВКМ *in vivo* был использован биосовместимый материал, созданный и изученный ранее научной группой В.И. Путляева (Putlyaev et al., 2017; Дубров и др., 2019) в модели монокортикального диафизарного дефекта бедренной кости крысы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение и характеристика дВКМ, продуцируемого МСК жировой ткани человека. По результатам исследования с помощью оптимизированного протокола был получен дВКМ, продуцируемый МСК человека, и охарактеризованы его структура и состав основных белков ВКМ (Рис. 1). Иммуноцитохимический анализ позволил продемонстрировать сохранение укладки основных белков ВКМ – фибронектина, ламинина и коллагена I типа, в клеточном пласте и после децеллюляризации (Рис. 1А-1Е). Биохимический анализ полученного матрикса показал, что, несмотря на уменьшение количества общего белка по сравнению с клеточным пластом (Рис. 1Ж), дВКМ обогащен основными белками ВКМ (Рис. 1З и 1И). Наиболее представленным компонентом в дВКМ является фибронектин. Количество коллагена I типа в дВКМ также увеличивалось относительно общего количества белка после децеллюляризации.

дВКМ обеспечивает адгезию и пролиферацию МСК. Полученные данные в экспериментах по оценке состояния МСК при культивировании на дВКМ, полученном с помощью различных протоколов, свидетельствуют о способности дВКМ поддерживать адгезию и пролиферацию клеток. МТТ тест использовали для количественной оценки жизнеспособности и пролиферации клеток. Мы обнаружили значимое увеличение пролиферативной активности МСК при культивировании на дВКМ, полученного с использованием CHAPS и ДНКазы I, по сравнению с другими протоколами (Рис. 2). Сокращение времени инкубирования с CHAPS (до 3-х минут вместо 10) с последующей инкубацией с ДНКазой I позволило оптимизировать протокол по выделению дВКМ из клеточного пласта МСК, который использовали на дальнейших этапах исследования.

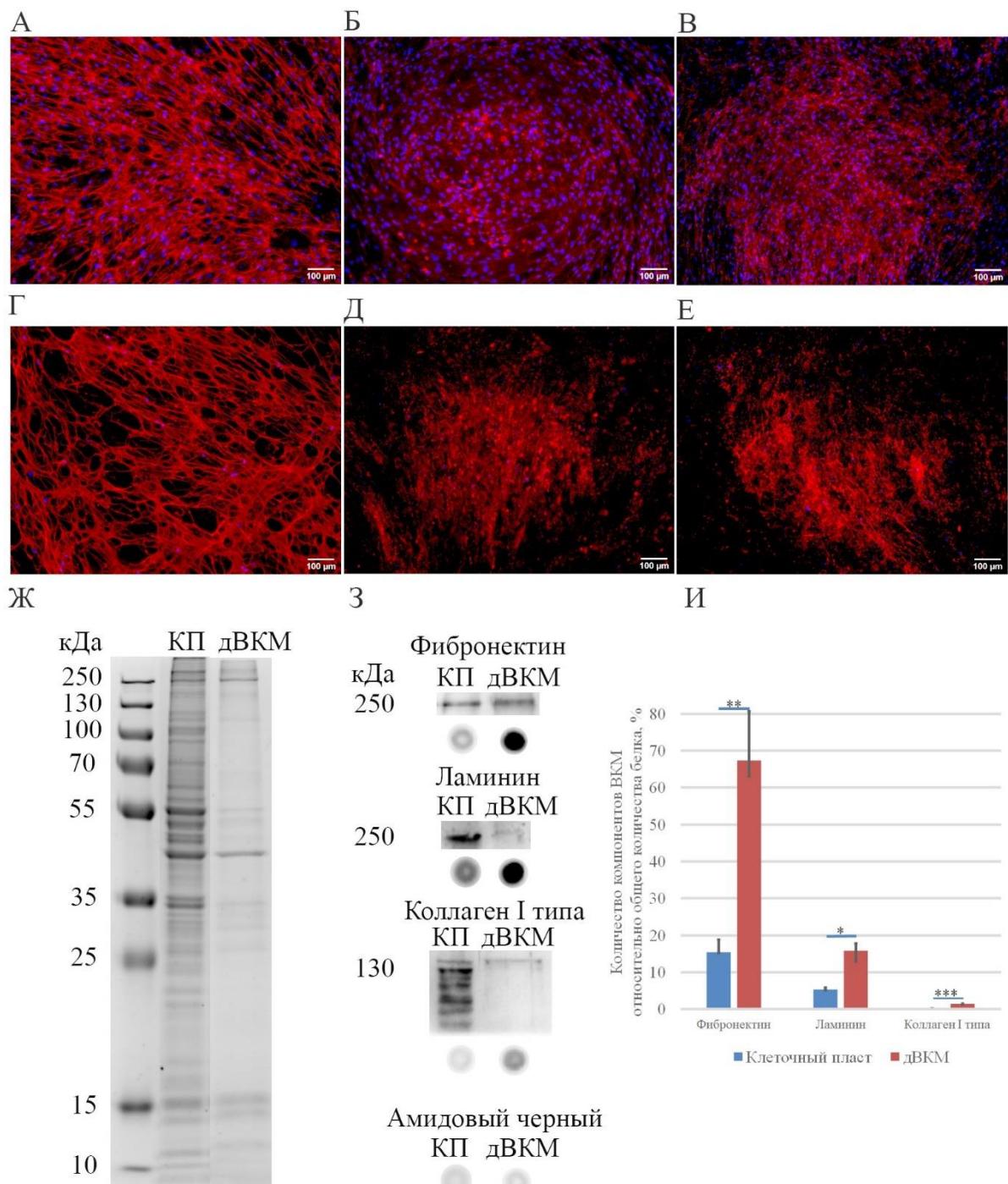


Рис. 1. Содержание белков ВКМ (фибронектина (А, Г), ламина (Б, Д) и коллагена I типа – красный цвет) в составе клеточного пласта (КП) и дВКМ, полученных из МСК, представлено с помощью иммуноцитохимического анализа без пермеабилизации (увеличение объектива – $\times 10$). Ядра окрашены DAPI – синий цвет. Электрофорез КП и дВКМ с последующим окрашиванием (Ж). Результаты вестерн-блота и дот-блота на фибронектин, ламинин и коллаген I типа (З). Диаграмма представляет собой результаты обсчета дот-блота относительно тотального количества белка с нормировкой на эталонные образцы вышеперечисленных белков. Статистическая значимость указана между группами: *($p < 0,05$), **($p < 0,005$), ***($p < 0,0005$).

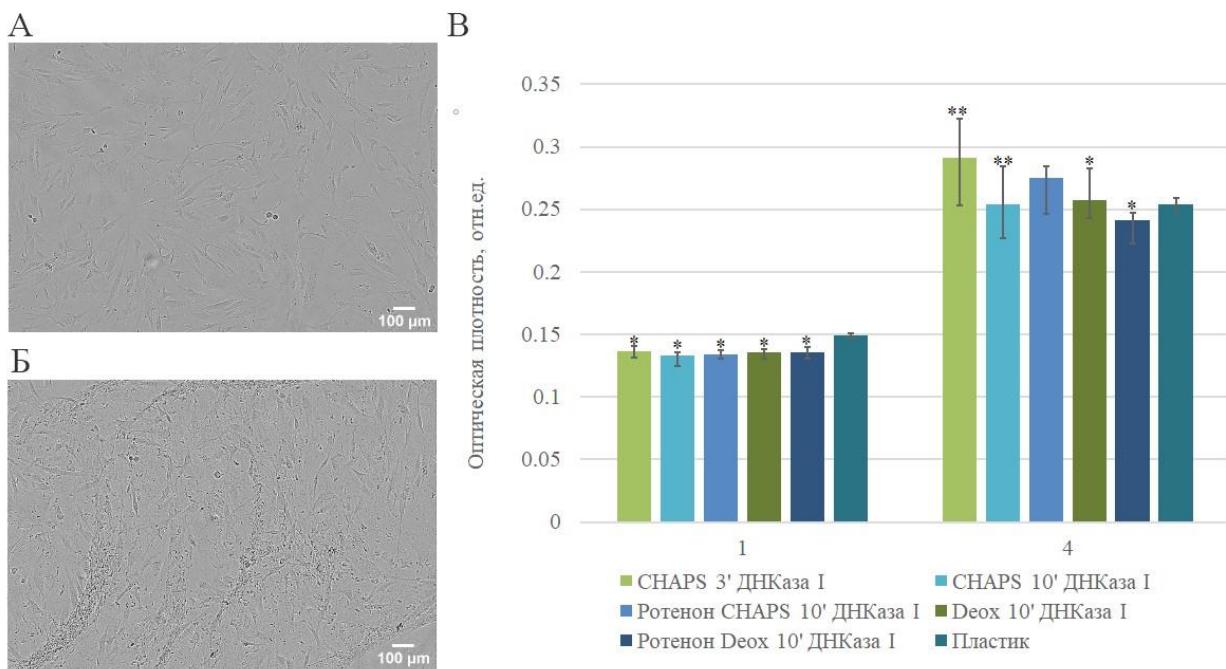


Рис. 2. Пролиферативная активность МСК при культивировании на пластике и на дВКМ. Репрезентативные микрофотографии, полученные с использованием прижизненной съемки, культивирования МСК на пластике (А) и на дВКМ (Б) в течение 4-х дней (фазовый контраст, увеличение объектива – x10), диаграмма результатов МТТ теста по оценке жизнеспособности клеток при культивировании на дВКМ, выделенных с помощью разных протоколов. Данные представлены в виде медианы с перцентилями (25% и 75%). Значимые различия по сравнению с клетками, культивируемыми на пластике, обозначены *(p value < 0,05), **(p value < 0,005).

дВКМ стимулирует индуцированную дифференцировку мультипотентных стволовых клеток. Для изучения способности дВКМ модулировать индуцированную дифференцировку мультипотентных стволовых клеток в популяции первичных МСК клетки культивировали на пластике и на дВКМ в течение 4 и 10 дней (в случае адипогенной дифференцировки) (Рис. 3), а также в течение 4 и 7 (в случае остеогенной дифференцировки) (Рис. 4) с индукционными средами. Было обнаружено, что дВКМ значительно стимулирует индуцированную дифференцировку МСК. При этом ранний эффект мы наблюдали уже на 4 день дифференцировки.

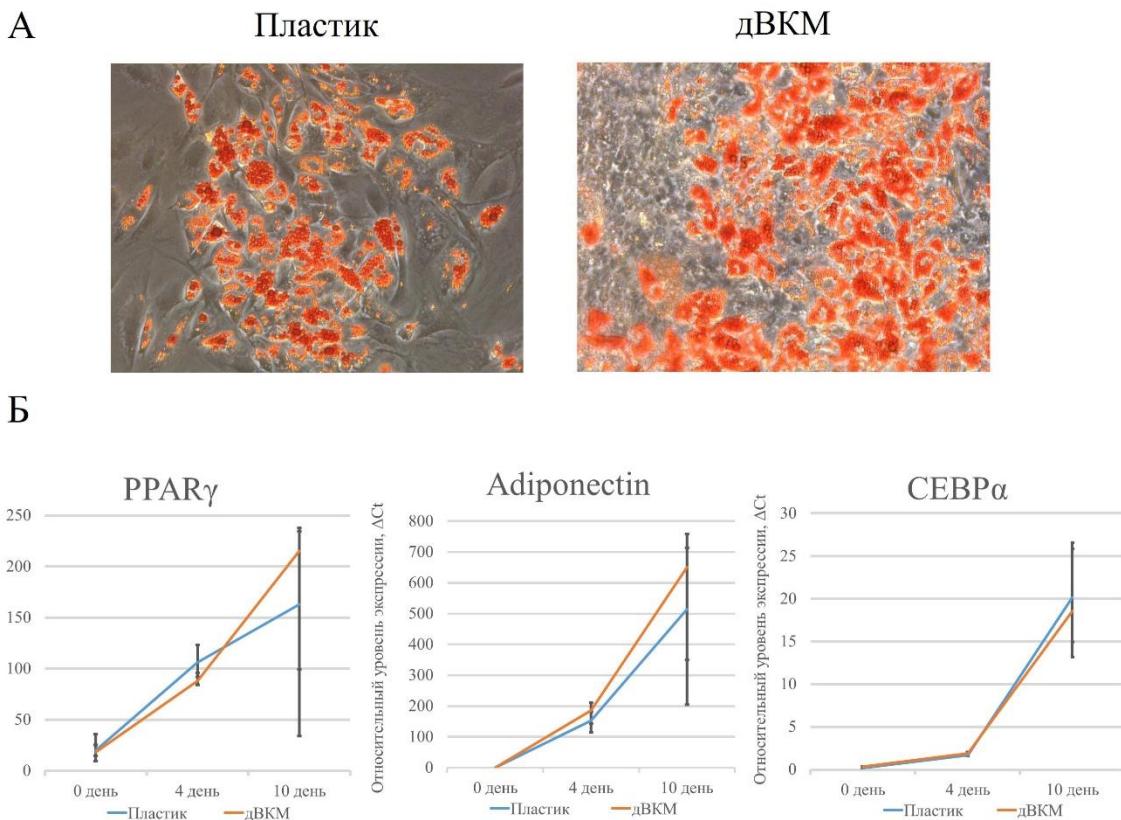


Рис. 3. Индукция адипогенной дифференцировки первично выделенных МСК жировой ткани человека, культивируемых на пластике или на дВКМ, в течение 10-ти дней. Цитохимическая окраска жировых капель с помощью суданового красного (Oil Red)(А). Увеличение объектива, х20. Анализ экспрессии генов (мРНК) маркеров адипогенной дифференцировки (PPAR γ (PPARG), CEBPa(CEBPA), Adiponectin (ADIPOQ) методом ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией(Б). Нормировка на ген домашнего хозяйства (housekeeping gene) - RPLP0. Данные представлены как медиана с квартилями (25%, 75%).

Кроме того, мы провели анализ изменения уровня экспрессии генов-маркеров дифференцировки в динамике с помощью ПЦР в реальном времени. Полученные данные отличались выраженной вариабельностью, по-видимому, из-за гетерогенности культуры МСК, однако, прослеживалась тенденция повышения уровня экспрессии генов-маркеров дифференцировок в клетках, культивированных на дВКМ.

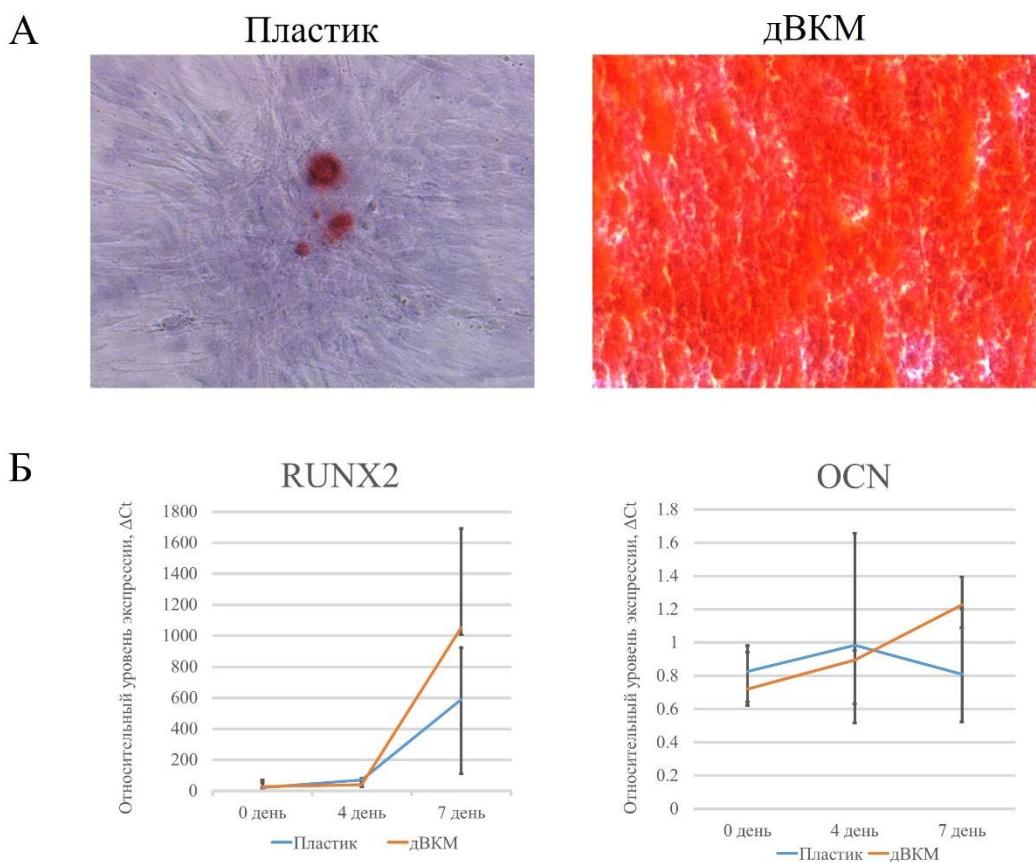


Рис. 4. Индукция остеогенной дифференцировки первично выделенных МСК жировой ткани человека, культивируемых на пластике или на дВКМ, в течение 7-и дней. Цитохимическая окраска отложения кальция с помощью ализаринового красного (А). Увеличение объектива, х20. Анализ экспрессии генов (мРНК) маркеров остеогенной дифференцировки (RUNX2, остеокальцин (OCN) методом ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией(Б). Нормировка на ген домашнего хозяйства (housekeeping gene) - RPLP0. Данные представлены как медиана с квартилями (25%, 75%).

дВКМ поддерживает дифференцировку МСК через Src-PI3K-АКТ-зависимый внутриклеточный сигнальный путь. Было установлено, что Src-PI3K-АКТ сигнальный путь является критически важным для быстрой активации дифференцировки МСК при культивировании на дВКМ (Рис. 5). Присутствие ингибитора Src-киназы значительно снижало способность дВКМ стимулировать индукцию дифференцировки. В то же время добавление ингибитора Akt \downarrow не влияло на морфологию клеток, но значимо ингибировало дВКМ-связанную стимуляцию дифференцировки МСК.

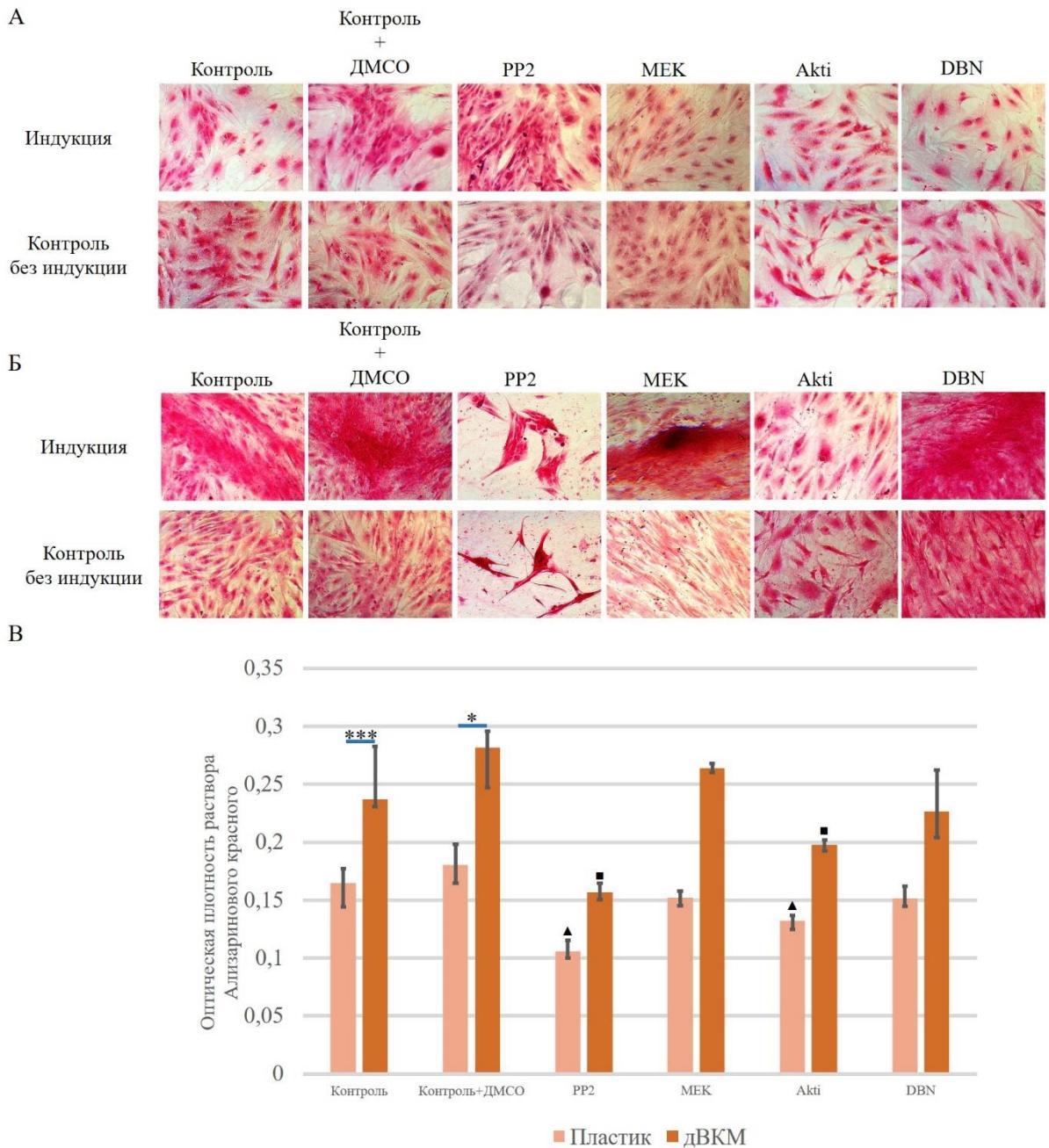


Рис. 5. Ингибиторный анализ механизмов дВКМ-опосредованной индукции дифференцировки МСК на примере остеогенной дифференцировки с помощью добавления ингибиторов сигнальных путей (PP2 - ингибитор Src-киназы, МЕК – ингибитор ERK киназы, AktiVIII (Akti) в качестве ингибитора протеиновой киназы В (Akt) и добутамин (DBN) как ингибитор YAP внутриядерной транслокации) к МСК, культивируемым на пластике (А) или на дВКМ, продуцируемом hTERT-МСК (Б), в течение 4-х дней, с последующим гистохимическим окрашиванием Ализариновым красным. Увеличение объектива, $\times 20$. Экстракция красителя и оценка оптической плотности при длине волны 560 нм (нижняя панель(В)) ($n = 3$). Данные представлены как медиана с квартилями (25%, 75%), а статистические значимые различия обозначены: *(p value < 0,05), ***(p value < 0,0005), треугольниками и квадратами представлены значимые различия относительно соответствующего контроля (p value < 0,05).

Взаимодействие МСК с дВКМ через интегрины вносит существенный вклад в регуляцию дифференцировки клеток. Мы оценили профиль экспрессии генов интегринов в МСК, который включал субъединицы $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, αV , $\alpha 6$, $\alpha 8$, $\beta 1$, $\beta 4$, $\beta 5$, $\beta 7$ (Рис. 6А).

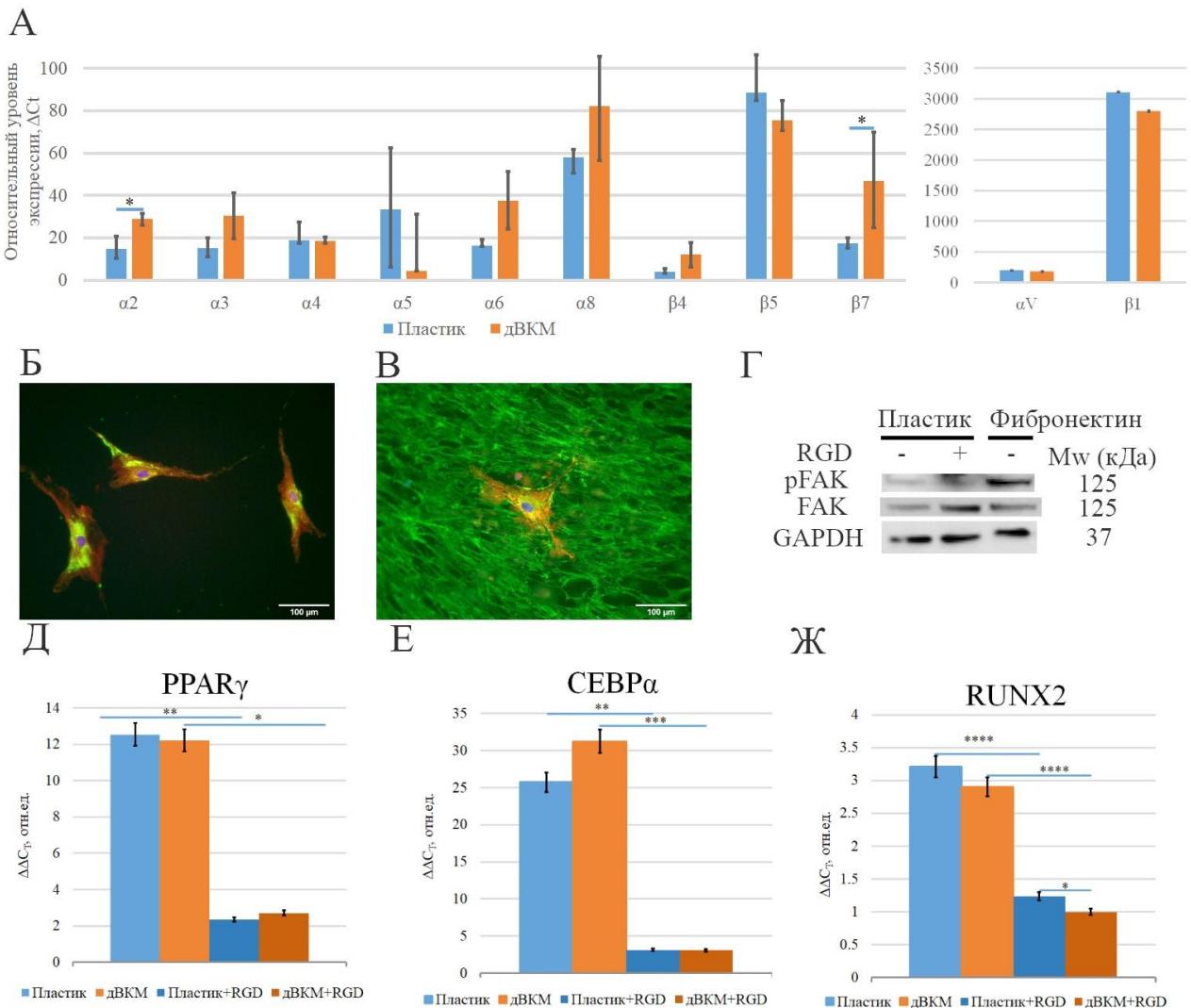


Рис. 6. Влияние взаимодействия МСК с дВКМ через интегрины на стимуляцию ответа клеток на дифференцировочные стимулы. Профиль экспрессии интегринов МСК(А-В), культивируемых на пластике (А, Б) или на дВКМ (А,В), включающий результаты ПЦР в реальном времени по субъединицам(А), а также результаты иммуноцитохимического анализа для субъединицы интегрина $\beta 1$ (Б,В). Оценка активации сигнального пути FAK-киназы для МСК в сусpenзии (Г) при добавлении RGD-TPP-пептида или после 1-го часа прикрепления к фибронектину. Изменение уровня экспрессии мастер-генов дифференцировки в адипогенном (PPAR γ (PPARG)) (Д), CEBP α (CEBPA) (Е)) и остеогенном (RUNX2 (Ж)) направлениях с нормировкой на уровень экспрессии гена домашнего хозяйства (RPLP0) в МСК при культивировании на пластике или дВКМ в присутствии или без блокирующего RGD-TPP-пептида относительно контрольных образцов без индукции. Данные представлены как медиана с квартилями (25%, 75%), а статистические значимые различия обозначены: *(p value < 0,05), **(p value < 0,005), ***(p value < 0,0005), ****(p value < 0,0001).

Был обнаружен высокий уровень экспрессии генов ITGAV, ITGA8, ITGB1 и ITGB5, кроме того для субъединицы интегрина $\beta 1$ мы подтвердили экспрессию иммуноцитохимическим анализом (Рис. 6Б, 6В). Возможные комбинации интегринов $\alpha V\beta 1$, $\alpha V\beta 5$, $\alpha 8\beta 1$ могут играть важную роль во взаимодействии гетерогенной популяции МСК с компонентами ВКМ, такими как фибронектин и витронектин, которые в большинстве случаев включают RGD последовательность.

Для оценки вклада такого взаимодействия клетка-ВКМ в стимуляцию дифференцировки при индукции в адипогенном или остеогенном направлении, мы добавляли RGD-пептиды для блокирования связи клетки через вышеупомянутые интегрины. Важно отметить, что присутствие RGD-пептида значительно снижает экспрессию мастер-генов дифференцировки: PPAR γ и CEBP α в случае адипогенной и RUNX2 в случае остеогенной (Рис. 6Д-6Ж), при этом содержание мРНК как BGLAP, так и ADIPOQ не меняется.

Более того, эксперименты по разобщению взаимодействия клеток с дВКМ через интегрины на примере остеогенной дифференцировки продемонстрировали, что в случае применения RGD-TPP пептида при разобщении комплекса субъединиц RGD-связывающих интегринов происходило значимое снижение индукции остеогенной дифференцировки по сравнению с контролем как при культивировании на пластике, так и на дВКМ (Рис. 7А, 7Б).

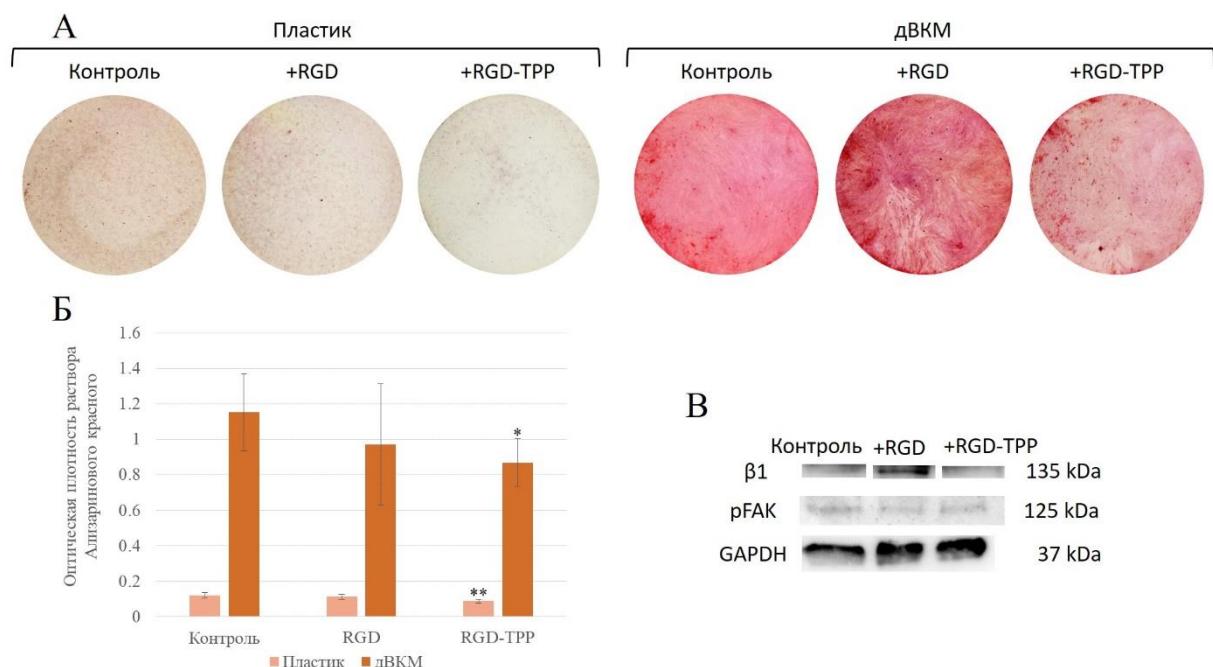


Рис. 7. Оценка вклада взаимодействия клеток с белками ВКМ через RGD-связывающие интегрины в эффекты дВКМ на дифференцировку МСК на примере остеогенной дифференцировки с помощью добавления блокирующих пептидов RGD и RGD-TPP к клеткам, культивируемым на пластике (А-левая панель) или на дВКМ (А-правая панель), в течение 4-х дней, с помощью гистохимического окрашивания Ализариновым красным. Экстракция красителя и оценка оптической плотности при длине волны 560 нм (Б) ($n = 5$). Изучение специфического блокирования пептидов с помощью иммунопреципитации с использованием антител к субъединице интегрина αV и последующего вестерн-блота образцов с использованием антител к субъединице интегрина $\beta 1$. Данные представлены как среднее значение со стандартным отклонением, а статистические значимые различия обозначены: *(p value < 0,05), **(p value < 0,005).

Результаты эксперимента по разобщению контактов клеток с дВКМ путем использования блокирующих антител против отдельных субъединиц интегринов показал, что блокирование взаимодействия через субъединицу $\alpha 5$ приводит к частичному снижению эффекта дВКМ-опосредованной стимуляции остеогенной дифференцировки МСК (Рис. 8Б). В то время как блокирование взаимодействия клеток через субъединицу αV привело к дополнительной стимуляции остеогенной дифференцировки (Рис. 8Б). Стоит отметить, что хотя эффект дополнительной стимуляции индукции дифференцировки от дВКМ при блокировании субъединицы αV был достоверно значимым, он не превышал 5%.

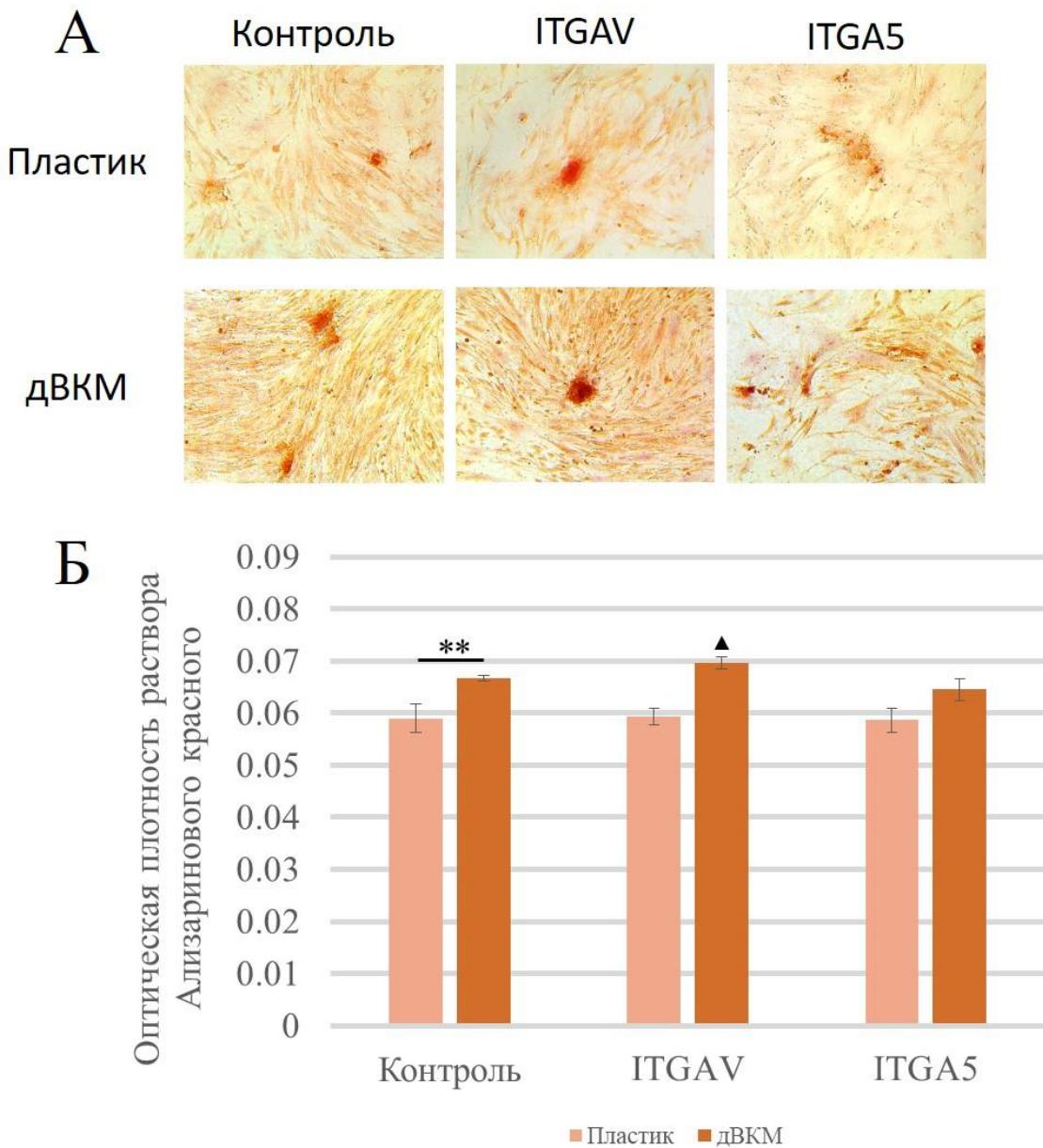


Рис. 8. Оценка вклада взаимодействия клеток с белками ВКМ через интегрины, содержащие субъединицы αV и $\alpha 5$, в эффекты дВКМ на дифференцировку МСК на примере остеогенной дифференцировки с помощью добавления блокирующих антител к субъединицам интегринов αV и $\alpha 5$ к клеткам, культивируемым на пластике (А-верхняя панель) или на дВКМ (А-нижняя панель), в течение 4-х дней, с помощью гистохимического окрашивания Ализариновым красным. Экстракция красителя и оценка оптической плотности при длине волны 560 нм (Б) ($n = 3$). Данные представлены как среднее значение со стандартным отклонением, а статистические значимые различия обозначены: **(p value $< 0,005$), а также ▲(p value $< 0,05$) относительно клеток, культивируемых на дВКМ в контроле.

Подтверждение регенераторных эффектов дВКМ, продуцируемого МСК, в экспериментах *in vivo*. Результаты экспериментов на животных продемонстрировали, что функционализация поверхности

остеопластического материала из керамики дВКМ позволяет снизить количество соединительной ткани вокруг материала, а также усилить компактизацию и отложение коллагеновых волокон в регенерирующей костной ткани (Рис. 9).

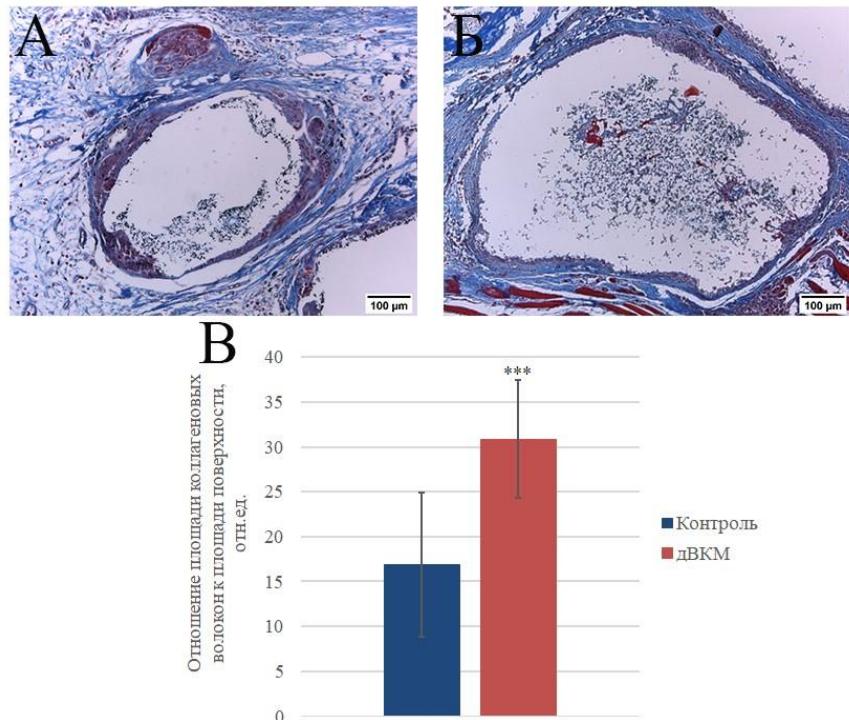


Рис. 9. Анализ срезов бедренной кости крысы с имплантированным контролем (А) или с экспериментальным материалом (функционализация дВКМ) (Б) с помощью окраски трихромным методом по Массону (с анилиновым синим). Увеличение объектива – $\times 10$. На диаграмме представлены результаты анализа отложения коллагеновых волокон относительно площади поверхности имплантированного материала, детектируемого на срезах (В). Данные представлены как среднее значение со стандартным отклонением, а статистически значимое различие по сравнению с контролем обозначено: ***(p value < 0,0005).

Данные наблюдения позволяют сделать предположение о стимуляции аутологичного ремоделирования ВКМ в зоне восстановления за счет дВКМ, продуцируемого МСК. Кроме того, стоит отметить, что применение дВКМ способствовало неоваскуляризации ткани вокруг остеопластического материала, однако механизмы этих эффектов требуют дальнейшего изучения.

ВЫВОДЫ:

1. Разработан протокол получения дВКМ с помощью децеллюляризации клеточного пласта МСК посредством обработки CHAPS и ДНКазой I типа. Данный протокол обеспечивает оптимальную эффективность децеллюляризации по данным анализа содержания остаточной ДНК, а также сохранение и компартментализацию основных компонентов ВКМ, таких как фибронектин, ламинин и коллаген I типа.
2. Компоненты ВКМ, продуцируемого МСК человека, потенцируют ответ мультипотентных стволовых клеток при индукции дифференцировки в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлениях, при этом стимуляция дифференцировки опосредована поддержанием и пролиферацией пула прогениторных клеток, но не дедифференцировкой в стволовые клетки выделенных зрелых клеток.
3. Культивирование МСК на дВКМ приводит к активации FAK- и ERK-киназных сигнальных путей в клетках, а также перераспределению активного бета-катенина из ядра в цитоплазму. Таким образом, при связывании мультипотентных стволовых клеток с дВКМ повышается готовность их сигнальных путей к ответу на индуцирующие стимулы (компетентность).
4. Ингибиование Src- и Akt-зависимых сигнальных путей приводит к снижению стимуляции индукции дифференцировки при культивировании МСК на дВКМ.
5. Существенный вклад в эффекты дВКМ на дифференцировку МСК вносит взаимодействие клеток с белками внеклеточного матрикса через RGD-связывающие интегрины, в частности, содержащие a5 субъединицу.
6. Функционализация поверхности остеопластического материала из трикальций фосфатной керамики с помощью дВКМ, продуцированного МСК человека, приводит к стимуляции ремоделирования новообразованной костной ткани на модели монокортикального диафизарного дефекта бедренной кости крысы *in vivo*.

НАУЧНЫЕ СТАТЬИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ,

ОПУБЛИКОВАННЫЕ В ЖУРНАЛАХ SCOPUS, WOS, RSCI:

1. **Novoseletskaya E.S.**, Grigorieva O.A., Nimiritsky P.P., Basalova N.A., Eremichev R.Yu., Milovskaya I.G., Kulebyakin K.Yu., Kulebyakina M.A., Rodionov S.A., Omelyanenko N.P., Efimenko A.Yu. Mesenchymal stromal cell-produced components of extracellular matrix potentiate multipotent stem cell response to differentiation stimuli. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2020. **IF WoS:** 6,68 - (2,89/2,02)¹
2. **Новоселецкая Е.С.**, Григорьева О.А., Ефименко А.Ю., Калинина Н.И. Внеклеточный матрикс в регуляции дифференцировки стволовых клеток. *Биохимия* 84 (2019), 343–353. **IF WoS:** 2,49 - (1,27/0,69)
3. Тихонова С.А., Евдокимов П.В., **Новоселецкая Е.С.**, Ефименко А.Ю., Путляев В.И. Получение кальцийфосфатной биокерамики с контролируемой макропористостью. Деформация и разрушение материалов, (12):2–7, 2020. **IF RSCI:** 0,72 - (0,69/0,12)
4. Бонарцев А. П., Воинова В. В., **Кузнецова Е. С.**², Жаркова И. И., Махина Т. К., Мышкина В. Л., Чеснокова Д. В., Кудряшова К. С., Феофанов А. В., Шайтан К. В., Бонарцева, Г.А. Адсорбция БСА пористыми матриксами на основе БиоПЭГилированного поли-3-оксибутират. *Прикладная биохимия и микробиология*, 54, 4 (2018), 366–374. **IF RSCI:** 1,38 - (1,04/0,46)
5. Bonartsev A.P., Zharkova I.I., Voinova V.V., **Kuznetsova E.S.**, Zhuikov V.A., Makhina T.K., Myshkina V.L., Potashnikova D.M., Chesnokova D.V., Khaydapova D.D., Bonartseva G.A., Shaitan K.V. Poly(3-hydroxybutyrate)/poly(ethylene glycol) scaffolds with different microstructure: the effect on growth of mesenchymal stem cells. *3 Biotech* 8, 328 (2018), 1–10. **IF WoS:** 2,41 - (1,155/0,46)
6. Мураев А.А., Бонарцев А.П., Гажва Ю.В., Рябова В.М., Волков А.В., Жаркова И.И., Стамболиев И.А., **Кузнецова Е.С.**, Жуйков В.А., Мышкина В.Л., Махина Т.К., Бонарцева Г.А., Яковлев С.Г., Кудряшова К.С., Воинова В.В., Шайтан К.В., Иванов С.Ю. Разработка и доклинические исследования ортопедических костных имплантатов на основе гибридной конструкции из поли-3-оксибутират и альгината натрия. *Современные технологии в медицине* 8, 4 (2016), 42–50. **IF RSCI:** 0,8 - (1,04/0,23)

¹В скобках приведен объем публикации в условных печатных листах и вклад автора в условных печатных листах.

²Кузнецова – девичья фамилия диссертанта до 31.08.2018 г.

ДРУГИЕ НАУЧНЫЕ РАБОТЫ, ОПУБЛИКОВАННЫЕ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

- 1) **Новоселецкая Е.С.**, Сагарадзе Г.Д., Басалова Н.А., Григорьева О.А., Ефименко А.Ю. Поддержание фенотипа стволовых клеток при культивировании на внеклеточном матриксе, продуцируемом мезенхимными стромальными клетками. Гены и клетки, 2020,21.
- 2) **Новоселецкая Е.С.**, Григорьева О.А., Миловская И.Г., Кулебякин К.Ю., Кулебякина М.А., Нимирицкий П.П., Макаревич П.И., Ткачук В.А., Ефименко А.Ю. Механизмы регуляции дифференцировки стволовых клеток компонентами внеклеточного матрикса, продуцируемого мезенхимными стромальными клетками. Гены и клетки, 2020,21.
- 3) **Novoseletskaya E.S.**, Sagaradze G. D., Basalova N. A., Grigorieva O. A., Efimenko A.Yu. Extracellular matrix secreted by stromal cells from soft tissues contain extracellular vesicles-like structures. Russian International conference on cryo-electron microscopy (2019), 82.
- 4) **Novoseletskaya E.S.**, Sagaradze G.D., Basalova N.A., Grigorieva O.A., Nimiritsky P.P., Makarevich P.I., Efimenko A.Yu. Extracellular matrix of adipose derived mesenchymal stromal cells in regulation of cell behavior: stemness and differentiation. In 7th FEBS Advanced Lecture Course "Matrix Pathobiology, Signaling and Molecular Targets (2019), p. 71.
- 5) Чистякова С.Ю., Яцевич А.А., Басалова Н.А., **Новоселецкая Е.С.**, Ефименко А.Ю. Децеллюляризованный внеклеточный матрикс стромальных клеток человека как перспективный инструмент для регенеративной медицины. Ломоносов - 2019. Сборник тезисов XXVI Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых (Москва, 2019).
- 6) **Новоселецкая Е.С.**, Сагарадзе Г.Д., Басалова Н.А., Григорьева О.А., Нимирицкий П.П., Макаревич П.И., Ефименко А.Ю. Участие внеклеточного матрикса мезенхимных стромальных клеток в воссоздании ниши стволовых и прогениторных клеток *in vitro*. "Биология - наука XXI века: 23-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых (Пущино, 15-19 апреля 2019 г.). Сборник тезисов. Пущино (2019), vol. 1 of ISBN 978-5-91874-045-3, Пущино, р. 102.
- 7) **Kuznetsova E.S.**, Nimiritsky P.P., Grigorieva O.A., Sagaradze G.D., Rodionov S.A., Omelyanenko N.P., Makarevich P.I., Efimenko A.Yu. Decellularized extracellular matrix of human mesenchymal stromal cells as a novel biomaterial for regenerative medicine. Human Gene Therapy (2018), Mary Ann Liebert, Inc, pp. A75–A76.
- 8) Grigorieva O.A., **Kuznetsova E.S.**, Nimiritsky P.P., Sagaradze G. D., Basalova N.A., Efimenko A.Yu., Tkachuk V.A. Optimization of mesenchymal stromal cells culture in serum-free media using cell-free extracellular matrix biomaterial. Human Gene Therapy 29, 12 (2018), A68.
- 9) **Кузнецова Е.С.**, Сагарадзе Г.Д., Басалова Н.А., Григорьева О.А., Нимирицкий П.П., Макаревич П.И., Ефименко А.Ю. "Клеточная терапия без клеток" как перспективный подход в регенеративной медицине. Материалы международного форума "Биотехнология: состояние и перспективы развития (2018), ООО "РЭД ГРУПП" Москва, pp. 528–530.
- 10) **Кузнецова Е.С.**, Нимирицкий П.П., Григорьева О.А., Сагарадзе Г.Д., Макаревич П.И., Ефименко А.Ю. Децеллюляризованный внеклеточный матрикс

мезенхимных стромальных клеток человека как новый биоматериал для регенеративной медицины. Материалы Международного молодежного научного форума Ломоносов-2018 (2018), Секция Регенеративная медицина, МАКС Пресс Москва.

- 11)Григорьева О.А., **Кузнецова Е.С.**, Александрушкина Н.А., Ефименко А.Ю. Культивирование мезенхимных стромальных клеток на децеллюляризованном внеклеточном матриксе в бессывороточных средах. Сборник материалов Всероссийской конференции с международным участием StemCellBio-2018: фундаментальная наука как основа клеточных технологий" 15-17 ноября 2018 Санкт-Петербург (Москва, 2018), Москва, р. 25.
- 12)**Kuznetsova E.S.**, Zharkova I.I., Yakovlev S.G., Muraev A.A., Shubin V.V., Bonartsev A.P. Cultivation of mesenchymal stem cells on poly(3-hydroxybutyrate) and its copolymer with poly(ethylene glycol) scaffolds. Abstracts for Cell Technologies at The Edge: Research & Practice (2016).
- 13)**Kuznetsova E.S.**, Zharkova I.I., Bonartseva G.A., Myshkina V.L., Mahina T.K., Bonartsev A.P., Shaitan K.V. The two-stage leaching technique for porous 3d-scaffolds manufacture from poly(3-hydroxyalkanoates). The 24th Annual World Forum on Advanced Materials (POLYCHAR) (2016).

ПАТЕНТЫ:

Ткачук В.А., Акопян Ж.А., Ефименко А.Ю., Григорьева О.А., Макаревич П.И., Нимирицкий П.П., **Новоселецкая Е.С.** Биоматериал на основе бесклеточного матрикса, производимого мезенхимными стромальными клетками человека, способ его получения и способ применения для стимуляции регенеративных процессов. // Патент на изобретение RU2718907C1 - 2020 г.