

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

ЕФИМЕНКО АНАСТАСИЯ ЮРЬЕВНА

**РОЛЬ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК В
РЕГУЛЯЦИИ НИШ ТКАНЕСПЕЦИФИЧНЫХ СТВОЛОВЫХ
КЛЕТОК**

1.5.5 – Физиология человека и животных

Диссертация в виде научного доклада

на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

Москва – 2023

Работа выполнена в Институте регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного центра Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

НАУЧНЫЙ КОНСУЛЬТАНТ:

Декан факультета фундаментальной медицины, заведующий кафедрой биохимии и регенеративной биомедицины факультета фундаментальной медицины, директор Института регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного центра Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова», доктор биологических наук, профессор, академик РАН **Ткачук Всеволод Арсеньевич**

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ

Ашрафян Левон Андреевич, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заместитель директора ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова», директор Института онкогинекологии и маммологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова»

Литвинова Лариса Сергеевна, доктор медицинских наук, доцент, директор Центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта»

Ельчанинов Андрей Владимирович, доктор медицинских наук, доцент, заведующий лабораторией роста и развития Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ "Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского" Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «__» _____ 2024 г. в ___ на заседании Диссертационного совета 24.1.023.01, созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Институт медико-биологических наук Российской академии наук по адресу: 123007, Москва, Хорошевское шоссе, д. 76 А.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Институт медико-биологических наук Российской академии наук по адресу: 123007, Москва, Хорошевское шоссе, д. 76 А. и на сайте ГНЦ РФ - ИМБП РАН www.imbp.ru

Диссертация в виде научного доклада разослана «__» _____ 20__ г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,

кандидат биологических наук

С.В. Поддубко

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

За обновление тканей взрослого организма и их восстановление после повреждения отвечают постнатальные стволовые клетки. Накопленные к настоящему времени данные показывают, что физиологические функции стволовых клеток регулируются специализированным микроокружением, которое включает в себя различные клеточные и молекулярные компоненты. Впервые важную роль микроокружения в управлении поведением стволовой клетки предположил А.А. Максимов в начале XX века, затем это предположение подтвердил и развил в своих исследованиях А.Я. Фриденштейн. В 1987 году Р. Скофильд ввел понятие «ниши стволовой клетки», концептуализирующее специфические координационные и регуляторные функции микроокружения стволовых клеток в разных тканях. Согласно этой концепции, впоследствии доработанной многими исследователями, компоненты ниши контролируют самообновление и дифференцировку стволовых клеток, регулируя их ответ на локальные или системные сигналы, а нарушение функции ниши может приводить к утрате целостности и дисфункции ткани.

Показано, однако, что ниша стволовой клетки способна к частичному восстановлению своей структуры и функции. Важную роль в этом процессе могут играть мезенхимные стромальные клетки (МСК), которые обнаружены в различных нишах тканеспецифичных стволовых клеток, где они участвуют в поддержании и восстановлении поврежденных ниш, предположительно за счет секреции широкого спектра факторов, вовлеченных в регуляцию репарации и регенерации тканей. Важно отметить, что под действием факторов, связанных с повреждением ткани, способность МСК секретировать различные молекулы адаптивно меняется, и это вносит свой вклад в их взаимодействие с резидентными стволовыми клетками, поддерживающими клетками ниш, а также клетками иммунной системы.

Актуальность настоящей работы определяется недостаточно глубоким пониманием клеточных и молекулярных механизмов участия МСК в поддержании функционирования и восстановления после повреждения ниш тканеспецифичных стволовых клеток и роли различных компонентов секретома МСК в этих процессах. Выяснению этих механизмов и посвящена диссертационная работа.

Степень разработанности темы диссертации

Обновление и регенерация постнатальных тканей могут происходить за счет пролиферации дифференцированных специализированных клеток, но при достаточно сильном повреждении необходимо участие в этих процессах стволовых клеток,

локализованных в тканеспецифичных нишах. В наших исследованиях, как и во многих других работах, показано, что при старении или вследствие перенесенных заболеваний у человека снижается количество стволовых и прогениторных клеток, а также значительно ухудшается их способность участвовать в регенерации, в первую очередь, из-за патологических изменений их микроокружения. Таким образом, для успешной регенерации поврежденной ткани должна быть восстановлена функция микроокружения стволовых клеток, то есть их ниши.

Накопленные на сегодняшний день данные позволили нам сформулировать ключевые требования к клеточным компонентам ниши, способным обеспечить ее восстановление после повреждения. К ним можно отнести способность к активации при повреждении тканей и относительную устойчивость к сигналам клеточной гибели и повреждающим стимулам, умение воспринимать и модулировать локальные и системные сигналы различной природы, способность временно принимать на себя функции утраченных клеток ниши, а также стимулировать восполнение пула функциональных клеток ниши. Всем этим требованиям, по современным представлениям, соответствуют МСК, поэтому именно эти клетки стали основным объектом диссертационной работы.

Последние достижения в области регенеративной биомедицины позволили установить важнейшую роль МСК в поддержании работы многих ниш стволовых клеток в разных тканях. Одной из наиболее изученных ниш в этом контексте является ниша гемопоэтических стволовых клеток (ГСК). В гемопоэтической нише описаны отдельные субпопуляции МСК, которые тесно связаны с ГСК за счет межклеточных контактов, а также продуцируют различные поддерживающие гемопоэз факторы. Удаление популяции МСК, экспрессирующих маркер нестин, приводило к нарушению хоминга ГСК в костный мозг при трансплантации после полной иррадиации костного мозга реципиента. Кроме того, известно, что МСК поддерживают гемопоэз *ex vivo* при выделении ГСК в культуру, а также могут образовывать микроокружение, подобное нише ГСК, при гетеротопической трансплантации *in vivo*.

В нише стволовой клетки тонкого кишечника располагающаяся в глубине кишечной крипты популяция Gli1-позитивных МСК является одним из ключевых участников регуляции ниши за счет продукции лигандов сигнального пути Wnt, в том числе при нарушении функции основных источников этих факторов - клеток Панета. В нише волосяного фолликула МСК участвуют в активации стволовых клеток, секретирова факторы Noggin и Wnt. МСК могут быть вовлечены в регуляцию ниш стволовых клеток и в других тканях, однако таких экспериментальных данных уже значительно меньше, а конкретные механизмы, за счет которых МСК реализуют свою регуляторную функцию в

нише, остаются недостаточно изученными. В данной работе на модели ниши сперматогониальных стволовых клеток были исследованы механизмы участия секрета МСК в регенераторном действии этих клеток на ниши стволовых клеток. Были описаны основные фракции секрета МСК человека и установлен вклад как этих фракций, так и отдельных компонентов в составе секрета МСК в реализацию регенераторных эффектов МСК на стволовые клетки и поддерживающие клетки, участвующие в формировании ниши.

В последние десятилетия регенеративная медицина стала одним из самых перспективных и быстро развивающихся направлений биомедицины. Накопленные знания о роли стволовых клеток в обновлении и регенерации тканей сформировали научную основу для клеточной терапии и тканевой инженерии. Однако подавляющее большинство клинических исследований в этой области не показали ожидаемой эффективности разработанных подходов. Это привело к существенному изменению научной концепции регенеративной медицины - от восстановления или замещения поврежденных тканей и органов путем введения клеток или имплантации тканеинженерных конструкций, созданных вне организма, к стимуляции эндогенной регенерации. Поиск способов направленной регуляции эндогенных процессов обновления и восстановления тканей на основе изучения фундаментальных физиологических механизмов, опосредующих репарацию и регенерацию тканей, является на сегодняшний день одной из важнейших задач регенеративной медицины.

В рамках этой парадигмы была выстроена и данная диссертационная работа. Полученные научные результаты позволили теоретически обосновать и разработать новые терапевтические подходы в области регенеративной медицины на основе использования секрета МСК в качестве субстанции для биологических лекарственных препаратов, направленных на стимуляцию восстановления поврежденных ниш стволовых клеток. С учетом установленных механизмов влияния секрета МСК на нишу сперматогониальных стволовых клеток был создан прототип биологического лекарственного препарата «МедиРег» для лечения тяжелых нарушений сперматогенеза необструктивного генеза, сопровождающихся развитием мужского бесплодия. Полученные результаты доклинического изучения эффективности и безопасности препарата вошли в состав регистрационного досье с целью получения разрешения на проведение клинических исследований.

Цели и задачи исследования

Целью данной работы является установление роли МСК в регуляции ниш тканеспецифичных стволовых клеток. Для достижения цели были сформулированы следующие научно-исследовательские задачи:

1. Проанализировать ключевые известные механизмы участия МСК, реализуемые через паракринную активность, в поддержании функционирования различных ниш постнатальных стволовых клеток в норме и при повреждении, в том числе при старении.
2. Выделить и охарактеризовать основные фракции секретома МСК человека.
3. Исследовать механизмы участия секретома МСК в регенераторном действии этих клеток на ниши стволовых клеток на примере ниши сперматогониальных стволовых клеток.
4. Установить роль различных фракций секретома МСК в регуляции мультипотентных стволовых клеток и поддерживающих клеток, входящих в состав их ниш.
5. Разработать прототип биологического лекарственного препарата на основе секретома МСК человека для стимуляции регенерации тканей за счет восстановления поврежденных ниш стволовых клеток.

Научная новизна

Впервые показана ключевая роль секретома МСК в регуляции различных ниш стволовых клеток и раскрыты механизмы восстановления ниш при введении секретома МСК. На экспериментальной модели повреждения ниши при прямом сравнении доказано, что регенераторные эффекты секретома МСК сравнимы с действием самих клеток. Впервые установлена способность МСК за счет действия секретома или его отдельных фракций восстанавливать функцию ниши сперматогониальных стволовых клеток в виде увеличения фертильности самцов, подавлять развитие фиброза в исходе повреждения и регулировать направленную дифференцировку стволовых клеток. На основании полученных данных впервые предложен подход к направленной регуляции восстановления ниш стволовых клеток после повреждения с помощью экзогенного введения секретома МСК. Разработана и оптимизирована технология получения и стандартизации прототипа первого в своем классе биологического лекарственного препарата на основе секретома МСК человека.

Новизна и практическая значимость работы подтверждаются полученными патентами (патент РФ #2766707 от 15 марта 2022 г., патент РФ #2718907 от 15 апреля 2020 г., патент РФ #2652902 от 3 мая 2018 г., патент РФ #2653779 от 14 мая 2018 г., патент

РФ #2620167 от 23 мая 2017 г., патент РФ #2574017 от 30 сентября 2014 г., патент РФ #2443778 от 27 февраля 2012 г.).

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные в рамках диссертационной работы результаты расширяют понимание физиологической роли МСК в регуляции ниш тканеспецифичных стволовых клеток. МСК входят в состав большинства известных ниш постнатальных стволовых клеток и являются ключевыми клетками, участвующими в поддержании функционирования ниш в норме и при повреждении, благодаря способности воспринимать системные и локальные сигналы, регулировать дифференцировку стволовых и прогениторных клеток, активизировать восстановление компонентов ниши и привлекать в нее функциональные клетки, обеспечивать адекватные регуляторные сигналы в нише и стимулировать ангиогенез и нейрогенез. Полученные результаты доказывают, что указанные механизмы реализуются преимущественно за счет действия компонентов секретома МСК, воздействующих на нишу. В составе секретома МСК человека различными методами выделены и охарактеризованы основные фракции секретируемых белковых факторов, молекул, переносимых в составе внеклеточных везикул, и компонентов внеклеточного матрикса. Показано, что состав секретома изменяется при старении МСК и под действием факторов, связанных с повреждением тканей, что существенно влияет на способность этих клеток участвовать в обновлении и регенерации тканей. Полученные результаты диссертационной работы раскрывают механизмы участия секретома МСК в регенераторном действии этих клеток на нишу стволовых клеток на примере повреждения ниши ССК. Показано, что эффекты МСК и секретома этих клеток в отношении восстановления поврежденной ниши сравнимы, что указывает на важнейшую роль паракринной активности МСК в нише. При этом обнаружено, что секретом МСК действует преимущественно на уровне поддерживающих клеток ниши ССК.

В рамках диссертационного исследования установлено, что все фракции секретома МСК могут участвовать в регуляции функций мультипотентных стволовых клеток и поддерживающих клеток, входящих в состав их ниш. Так, важнейший вклад в способность МСК стимулировать ангиогенез и подавлять развитие фиброза путем ингибирования дифференцировки фибробластов в миофибробласты и стимуляции дедифференцировки миофибробластов вносят секретируемые МСК факторы роста и микроРНК. Установлены механизмы, за счет которых секретируемые МСК компоненты внеклеточного матрикса поддерживают жизнеспособность колоний тканеспецифичных стволовых клеток и потенцируют ответ мультипотентных стволовых клеток при индукции дифференцировки в различных направлениях. Данные диссертационной работы

могут быть использованы для дальнейшего углубленного изучения механизмов участия МСК в регуляции регенерации тканей через воздействие на ниши тканеспецифичных стволовых клеток. Результаты диссертационного исследования легли в основу разработки новых подходов к лечению тяжелых заболеваний в рамках такого направления регенеративной медицины, как “клеточная терапия без клеток” (cell-free cell therapy), которые предполагают применение компонентов клеточного секрета в качестве терапевтических агентов. На основании этих результатов разработан прототип биологического лекарственного препарата «МедиРег» на основе секрета МСК человека для лечения мужского бесплодия необструктивного генеза, предложен механизм действия препарата, разработаны технология получения и подходы к его стандартизации.

Методология и методы исследования

Работа выполнена с использованием широкого спектра современных методов молекулярной и клеточной биологии, физиологии и биохимии. Основным объектом исследования были мезенхимные стромальные клетки, получаемые из жировой ткани человека. Для решения задач исследования были использованы как омиксовые технологии (высокопроизводительное тотальное и таргентное РНК-секвенирование кодирующих и некодирующих РНК, РНК секвенирование одиночных клеток, протеомный анализ секрета МСК), так и методы анализа действия отдельных молекул, в том числе с помощью ингибиторного анализа (модуляция экспрессии генов с использованием подходов редактирования генома или добавления синтетических олигонуклеотидов, ингибирующих или имитирующих работу отдельных микроРНК, применение блокирующих антител и пептидов, синтетических ингибиторов и др.). Работы проводили на различных клеточных и животных экспериментальных моделях (модели двустороннего абдоминального крипторхизма у крыс, токсического доксорубицин-индуцированного повреждения семенников у мышей, блеомицин-индуцированного фиброза легких у мышей). Эксперименты с животными и получение биоматериалов с целью выделения клеток от пациентов проводили согласно международному и национальному законодательству после одобрения соответствующих протоколов локальными этическими комитетами и подписания пациентами добровольного информированного согласия на использование их биоматериалов для научных исследований.

Положения, выносимые на защиту

1. Мезенхимные стромальные клетки (МСК) являются важнейшими участниками поддержания и регуляции большинства известных ниш постнатальных стволовых клеток в норме и при повреждении, в значительной степени благодаря способности секретировать биоактивные факторы, которые оказывают влияние на

дифференцировку стволовых и прогениторных клеток, активируют восстановление компонентов ниши и привлечение в нее функциональных клеток, обеспечивают адекватные регуляторные сигналы в нише и стимулируют ангиогенез и нейрогенез.

2. Секретом МСК человека включает основные фракции секретируемых белковых факторов (факторы роста, цитокины, хемокины), молекул, переносимых в составе внеклеточных везикул (кодирующих и некодирующих РНК), и компонентов внеклеточного матрикса, и его состав может изменяться при старении и под действием факторов, связанных с повреждением тканей, таких как выраженная гипоксия, воздействие фактора роста, полученного из тромбоцитов (PDGF), или трансформирующего фактора роста бета (TGF β), что существенно влияет на способность МСК участвовать в обновлении и регенерации тканей.

3. В нише сперматогониальных стволовых клеток (ССК) МСК локализируются в интерстиции, их количество увеличивается при повреждении ниши, и секретом МСК опосредует регенераторное действие этих клеток на нишу, при этом эффекты экзогенно введенных МСК и секрета этих клеток на поврежденную нишу сопоставимы.

4. Регенераторные эффекты секрета МСК проявляются преимущественно на уровне поддерживающих клеток ниши ССК и реализуются в виде восстановления как структуры, так и функции ниши, что выражается в повышении продукции сперматозоидов и восстановлении фертильности самцов.

6. Секретируемые МСК факторы роста, в том числе такие как фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и фактор роста гепатоцитов (HGF), а также микроРНК, переносимые в составе внеклеточных везикул (микроРНК-21, -29с, -92а, -129), играют критически важную роль в способности МСК стимулировать ангиогенез и подавлять развитие фиброза путем ингибирования дифференцировки фибробластов в миофибробласты и стимуляции дедифференцировки миофибробластов.

7. Секретируемые МСК компоненты внеклеточного матрикса участвуют в поддержании колоний тканеспецифичных стволовых клеток и повышают готовность сигнальных путей в мультипотентных стволовых клетках к ответу на индуцирующие их дифференцировку стимулы (компетентность), при этом значимый вклад в реализацию этих эффектов вносит активация Src- и Akt-зависимых сигнальных путей, а также RGD-связывающих интегринов, в частности, содержащих $\alpha 5$ субъединицу.

8. Секретом МСК и его фракции могут быть использованы для разработки технологической платформы для создания инновационных биологических лекарственных препаратов, направленных на восстановление поврежденных ниш тканеспецифичных стволовых клеток и подавление развития фиброза.

Личный вклад автора

Все представленные данные получены автором или под ее непосредственным руководством. Ефименко А. Ю. лично планировала дизайн экспериментов и осуществляла их выполнение на всех этапах работы, проводила выбор методов, критический анализ результатов, статистическую обработку данных, создание иллюстративного материала для статистических данных, подготовку публикаций, тезисов, монографий и патентных заявок по теме диссертации. Диссертация Ефименко А.Ю. является самостоятельной научно-исследовательской работой, которая свидетельствует о профессиональной компетенции автора.

Степень достоверности и апробация результатов

Основные положения диссертационной работы опубликованы в высокорейтинговых международных журналах (в том числе в *Experimental and Molecular Medicine*, *Cell Communication and Signaling*, *Biomedical Journal*, *Stem cell research & therapy*, *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *Stem Cells Translational Medicine*, *Journal of Translational Medicine*, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *Cells*, *Biomolecules* и других) и представлены на многочисленных российских и международных конференциях.

Материалы диссертации были доложены на российских и международных конференциях, в том числе на III Конгрессе молодых ученых (Сочи, Россия, 2023), «StemCellBio-2023» (Санкт-Петербург, Россия, 2023), Международной конференции "Биобанкирование 2023: от идеи к внедрению" (Москва, Россия, 2023), 2-ой Всероссийской конференции молодых ученых «Генофонд и репродуктивное здоровье человека» (Санкт-Петербург, Россия, 2023), VII Всероссийской научно-практической конференции "3D-технологии в медицине" (Нижний Новгород, Россия, 2023), V Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, Россия, 2022), Международной конференции «Ломоносовские чтения» (Москва, Россия, 2022), VII Молодежной Школе-конференции по молекулярной и клеточной биологии ИНЦ РАН, (Санкт-Петербург, Россия, 2020); VII Троицкой конференции с международным участием "Медицинская физика" (ТКМФ-7) (Троицк, Россия, 2020), IV Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, Россия, 2019), the 27th ESGCT Annual Congress 2019 (Барселона, Испания, 2019), Всероссийской конференции с международным участием "Актуальные проблемы клеточной биологии и клеточных технологий" (Санкт-Петербург, Россия, 2019), конференции «StemCellBio-2018: Фундаментальная наука как основа трансляционной медицины» (Санкт-Петербург, 2018), конгрессе Международного общества исследователей стволовых клеток (ISSCR 2018) (Мельбурн, Австралия, 2018), Международном Форуме «Биотехнология: состояние и перспективы развития. Наука о

жизни» (Москва, 2018), конференции «The second international conference «Cell technologies at the edge: from research to practice» (CTERP) «Translational research in cell therapy» (Москва, 2018), III Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, Россия, 2017) и других, всего более 80 докладов.

Основные научные результаты диссертации представлены в 52 статьях, опубликованных за последние 10 лет (2014-2023 гг.) в рецензируемых изданиях, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий или входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации для опубликования основных результатов диссертаций на соискание ученой степени доктора наук и изданиях, приравненных к ним, что соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям в виде научного доклада в пп. 11-13 "Положения о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 в редакции с актуальными изменениями на 26 октября 2023 г.). Из них 35 статей за последние 10 лет опубликованы в научных изданиях первого и второго квартилей (Q1 и Q2, соответственно), индексируемых в международных базах данных Web of Science и Scopus, а 16 статей - в научных изданиях, индексируемых наукометрической базой данных RSCI. По теме диссертации получено 7 патентов на изобретение РФ.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Ключевые известные механизмы участия МСК в поддержании функционирования различных ниш постнатальных стволовых клеток в норме и при повреждении

По современным представлениям за обновление и регенерацию постнатальных тканей отвечают тканеспецифичные стволовые клетки, которые были обнаружены во всех паренхиматозных органах человека, а также в костном мозге, легких, коже, криптах тонкого кишечника и других органах и тканях. Однако выделенные из тканей тканеспецифичные стволовые клетки или их коммитированные потомки оказались неспособны сформировать полноценно функционирующую ткань или ее эквиваленты вне организма. Это указывает на критическую роль их регуляторного микроокружения, так называемое ниши, которая обеспечивает поддержание потенции стволовых клеток к дифференцировке в специализированные типы клеток. По современным представлениям именно ниша стволовых клеток может считаться функциональной единицей регенерации тканей, обеспечивающей поддержание стволовых клеток в покоем состоянии, рецепцию и передачу им активирующих стимулов и контроль их судьбы [19, 22, 44].

Схематически основные компоненты ниши стволовой клетки представлены на Рис. 1. Во всех известных на сегодняшний день нишах обнаружены МСК, роль которых в поддержании и регуляции ниши активно изучается. Возможные механизмы участия МСК в обновлении и регенерации тканей за счет влияния на ниши тканеспецифичных стволовых клеток, в том числе на нишу мультипотентных стволовых клеток в составе гетерогенной популяции МСК, подробно описаны в нескольких наших обзорах [19, 27, 44]. По современным представлениям МСК играют важнейшую роль в нише, обеспечивая структурную и трофическую поддержку стволовых клеток, прием и модуляцию локальных и системных сигналов различной природы, регуляцию выхода стволовых клеток из ниши. При повреждении ниши именно МСК за счет способности активироваться в ответ на повреждающие сигналы и относительную высокую выживаемость способны временно принимать на себя функции утраченных клеток ниши, обеспечивать нишу регуляторными паракринными сигналами, стимулировать восполнение пула функциональных клеток путем их привлечения из других областей или дифференцировки, подавлять избыточную активацию клеток иммунной системы, а также активизировать наработку тканеспецифичного матрикса, прорастание сосудов и нервных окончаний, что необходимо для полноценного восстановления ниши [19].

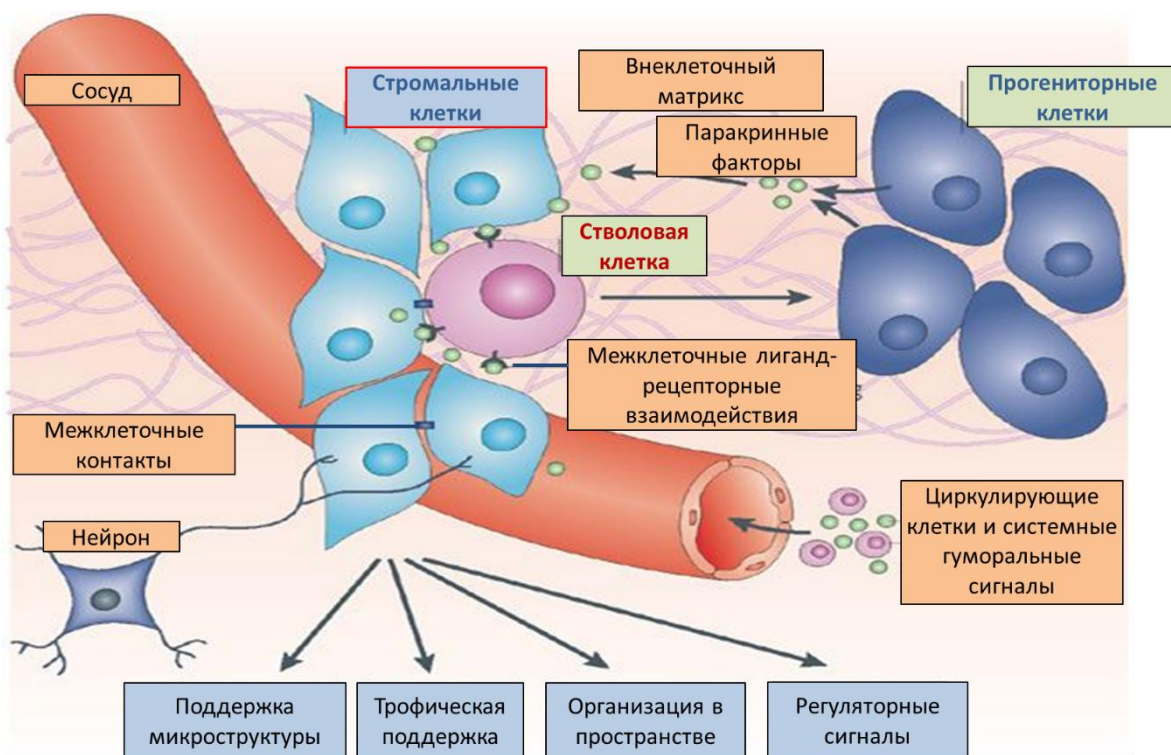


Рис. 1. Ключевые компоненты ниши стволовой клетки. В состав ниши входят поддерживающие клетки, растворимые факторы межклеточной коммуникации, белки внеклеточного матрикса, а также компоненты, обеспечивающие системную интеграцию ниши (сосуды и нервы). Рис. по D.L. Jones & A.J. Wagers (2008), с модификациями.

Накопленные к настоящему моменту экспериментальные данные позволяют предполагать, что значительную часть своих функций в нише МСК выполняют за счет секреции различных биоактивных факторов, среди которых выделяют компоненты внеклеточного матрикса (ВКМ) [2, 25], растворимые факторы преимущественно белковой природы и молекулы в составе внеклеточных везикул (ВВ) [19, 50]. Растворимые факторы роста и цитокины на сегодняшний день рассматриваются как важнейшие регуляторы регенеративных процессов в тканях, действующие через рецепторы с тирозинкиназной активностью, которые являются высокоспецифичными переключателями клеточной программы и определяют судьбу клетки, регулируют клеточную пролиферацию и миграцию, а также могут запускать или модулировать дифференцировку клеток в ходе развития или регенерации [22]. Огромным прорывом в области понимания регуляции регенерации было открытие нового механизма межклеточной коммуникации с помощью секреции ВВ. Было показано, что клетки, как стволовые, так и дифференцированные или опухолевые, могут взаимодействовать не только с помощью формирования прямых физических контактов или путем секреции растворимых факторов, но и за счет молекул, содержащихся в составе ВВ, включающих белки, биоактивные липиды и различные типы нуклеиновых кислот. Все эти молекулы защищены от разрушения двухслойной липидной мембраной ВВ, что позволяет им переносить информацию, в том числе и генетическую, от клетки к клетке на значительные расстояния [13, 21, 50]. Огромный интерес исследователей привлекает класс микроРНК — некодирующих малых регуляторных РНК, способных при переносе в составе ВВ регулировать трансляцию своих мРНК-мишеней за счет инициации деградации таргетной мРНК или подавления ее трансляции в клетках-реципиентах. Перенос микроРНК в таргетные клетки может переключать ее генетическую программу и управлять дифференцировкой и другими клеточными функциями. Подробно роль различных компонентов секретома МСК в регуляции тканеспецифичных стволовых клеток, в том числе через воздействие на нишу, обсуждена в наших обзорах [2, 19, 22, 25].

Таким образом, МСК можно считать ключевым регуляторным компонентом большинства известных ниш постнатальных стволовых клеток, участвующим в поддержании функционирования ниш в норме и при повреждении, благодаря способности воспринимать системные и локальные сигналы, регулировать дифференцировку стволовых и прогениторных клеток, активизировать восстановление компонентов ниши и привлекать в нее функциональные клетки, обеспечивать адекватные регуляторные сигналы в нише и стимулировать ангиогенез и нейрогенез. Значительная часть этих эффектов опосредована действием секретома МСК.

Выделение и характеристика основных фракций секрета МСК человека

Поскольку во многих работах было показано, что регуляторные функции МСК в нише реализуются преимущественно за счет паракринной активности этих клеток, важной экспериментальной задачей исследования стал анализ состава секрета МСК и его отдельных фракций. Для получения секрета МСК клетки выделяли из подкожной жировой ткани молодых и относительно здоровых доноров по отработанной ранее методике, наращивали до 3-5 пассажа, характеризовали, согласно минимальным критериям для МСК, рекомендованным Международным обществом клеточной терапии (ISCT), и кондиционировали клетки в бессывороточной среде роста известного состава, для того чтобы избежать переменчивого влияния фетальной бычьей сыворотки. Кондиционирование проводили в течение 2-3 дней, после чего очищали кондиционированную среду от клеточного дебриса центрифугированием и исследовали состав секрета МСК и его основных фракций, которые получали с помощью разделения кондиционированной среды методом ультрацентрифугирования на фракцию внеклеточных везикул (ВВ-МСК) и внеклеточных растворимых факторов (РФ-МСК).

Анализ белковых факторов в составе секрета МСК проводили методом протеомного анализа в образцах, полученных от десяти доноров [30]. Более 600 секреторируемых белков было определено с помощью биоинформатической обработки результатов масс-спектрометрического анализа секрета МСК, при этом наблюдали высокую переменчивость белкового состава между донорами: только около 100 белков были общими для всех образцов, что указывает, по-видимому, на выраженную гетерогенность первично выделенных МСК.

Тем не менее, можно было сделать вывод, что самым представленным кластером белков во всех образцах секрета были компоненты ВКМ, включая как структурные матричные белки, так и различные факторы, участвующие в ремоделировании ВКМ, например, ферменты (Табл. 1, Рис. 2). Кроме того, в секрете МСК было описано несколько ключевых групп факторов роста, цитокинов и хемокинов, которые могут участвовать в реализации регуляторных функций МСК (Рис. 2). Содержание отдельных ключевых факторов, по данным литературы демонстрирующих значительный вклад в регенераторные эффекты МСК, определяли с помощью иммуноферментного анализа. Так, было подтверждено, что МСК продуцируют фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), фактор роста гепатоцитов (HGF), основной фактор роста фибробластов (FGF2), ангиопоэтин 1 типа (Angpt1), мозговой нейротрофический фактор (BDNF), фактор роста, полученный из глиальных клеток (GDNF), инсулиноподобный фактор роста (IGF-1), фактор роста, полученный из клеток пигментного эпителия (PEDF).

Таблица 1. Наиболее представленные группы белков в секрете МСК человека по данным протеомного анализа [30].

GO term	Count ^a	%	P value**	Proteins (Uniprot acc no.)	Examples
GO:0005578 ~ proteinaceous extracellular matrix	41	41.4	<0.001	P02751, P05997, P01033, P20908, P27797, Q99715, P02461, Q16610, P16035, P09486, P28300, P07942, P11047, P98160, P98095, P12110, P14543, P12111, Q9UBX5, P02452, P23142, P55268, Q16363, P35555, Q15582, P08123, Q95967, P07585, P24821, P51884, P12109, P08254, P08253, Q08629, P21810, Q12805, Q15063, Q08380, Q14767, P13611, P03956	Collagens, collagen-maturation enzymes, collagen interacting proteins, elastin-associated molecules, matricellular proteins, laminins
GO:0005509 ~ calcium ion binding	35	35.4	<0.001	Q02818, P35442, P19022, P27797, P09871, Q92626, P12814, P09486, P11021, Q43707, P07996, P98095, P00736, P14543, Q9UBX5, Q15293, P23142, Q12841, P80303, P15289, P35555, Q95967, Q94985, Q9BRK5, P06396, P13497, P08254, P08253, Q08629, P67936, Q12805, Q43852, Q14767, P13611, P03956	calsyntenin 1; heat shock 70 kDa protein 5; reticulocalbin 1; stromal cell derived factor 4; calumenin; nucleobindin 1.2; calreticulin
GO:0007155 ~ cell adhesion	31	31.3	<0.001	Q16270, P35442, P02751, P20908, P19022, Q99715, P02461, P12814, P07942, P11047, P07996, P98160, P12110, P12111, P14543, Q9UBX5, P05067, P55268, Q16363, Q15582, P35579, Q94985, P24821, Q8IUX7, P13497, P12109, Q08629, Q15063, Q08380, Q14498, P13611	Lectin 3 binding protein; BMP1; AE binding protein 1; N-cadherin; IGFBP-7; TGFBIIP
GO:0006928 ~ cell motion	14	14.1	<0.001	P02751, P20908, P19022, P60709, P05067, P35579, Q13822, P09493, P06753, Q08629, P67936, P11047, P07996, P13611	Extracellular lysophospholipase D; tropomyosins 1, 3, 4
GO:0008233 ~ peptidase activity	13	13.1	<0.001	P30101, Q14773, P16870, P07858, P09871, P05067, Q8IUX7, P13497, P08254, P08253, P05121, P03956, P00736	MMP1, 2; carboxypeptidase E; cathepsin B; tripeptidyl peptidase I
GO:0004866 ~ endopeptidase inhibitor activity	12	12.1	<0.001	P16035, P36955, P01033, P12111, P05155, P05121, P11021, P50454, P05067, P07093,	PEDF; TIMP1,2; PAI-1, 2; cystatin C

Присутствие этих белков в детектируемом количестве было обнаружено и во фракции РФ-МСК секрета (табл. 2).

Таблица 2. Средняя концентрация факторов роста, вовлеченных в реализацию регенераторных эффектов МСК, в составе фракции РФ-МСК.

Фактор роста	VEGF	HGF	FGF2	Angpt-1	GDNF	PEDF
Концентрация, пкг/мл (среднее ± CO)	600 ± 380	417±330	3.0 ± 2.4	222 ± 203	63 ± 17	8800 ± 5400



Рис. 2. Ключевые функциональные группы факторов роста, цитокинов, хемокинов и белков внеклеточного матрикса, обнаруженные в секрете МСК методом протеомного анализа, которые могут участвовать в реализации регуляторных функций этих клеток.

Во фракции ВВ-МСК определяли размер и количество частиц методом анализа траекторий наночастиц (NTA), морфологию, характерную для ВВ, методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ), согласно международным критериям International Society for Extracellular Vesicles (MISEV, 2018). Кроме того, был проведен анализ содержания разных типов РНК в составе ВВ-МСК методом высокопроизводительного РНК секвенирования [18] (рис. 3).

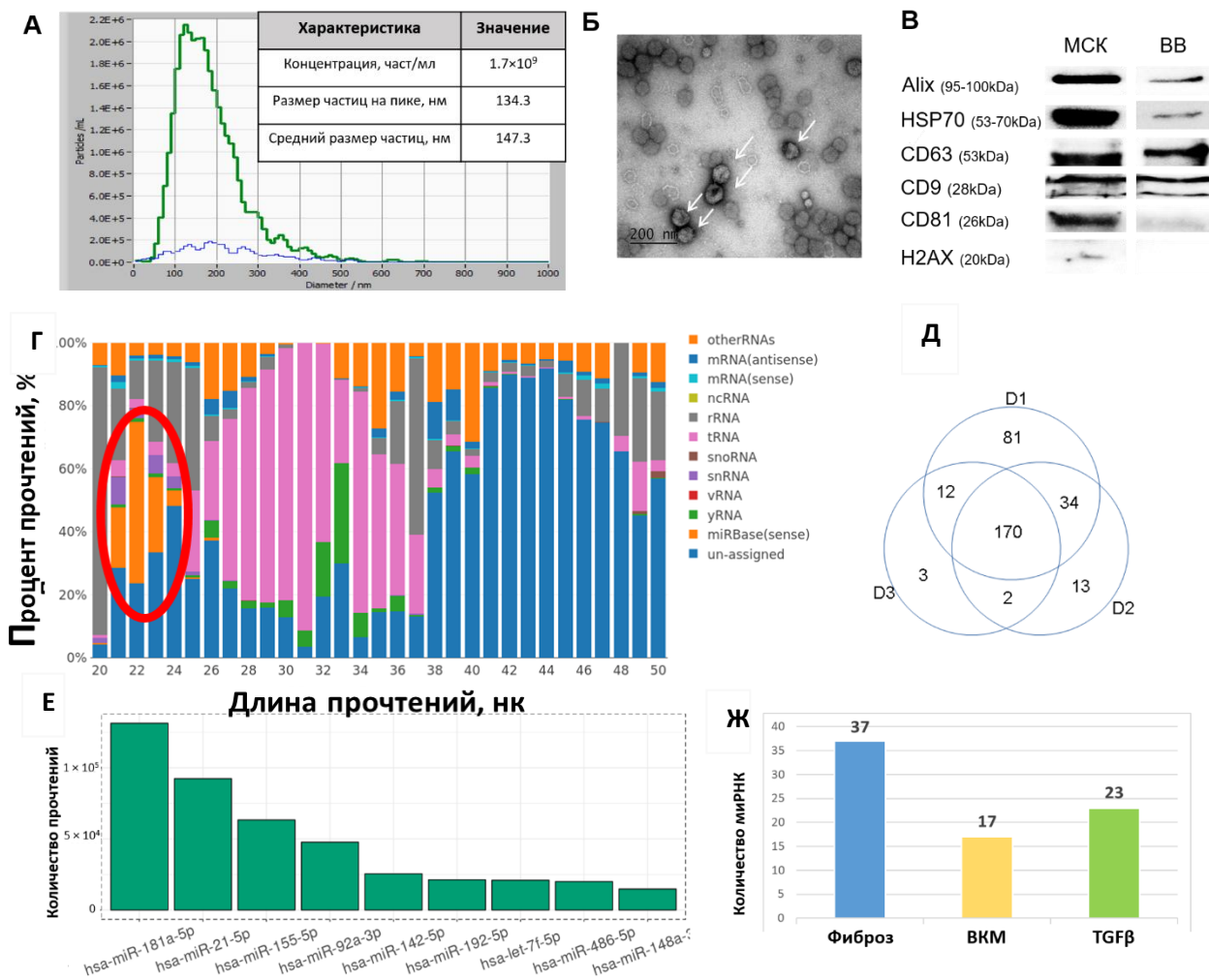


Рис. 3. Характеристики фракции ВВ-МСК человека. А. Оценка количества и распределения частиц по размеру в секрете МСК, собранном через 48 часов кондиционирования (зелёный), и в контрольной среде через 30 мин кондиционирования (синий), проведенная с помощью NTA. Б. Электронные микрофотографии ВВ-МСК (стрелки), ПЭМ. В. Экспрессия везикулярных и вневезикулярных маркёров в лизатах ВВ-МСК и МСК, вестерн-блоттинг. Г. Анализ паттерна различных классов РНК в ВВ-МСК, определенного методом RNA-seq, кластер микроРНК выделен красным овалом. Д. Изменчивость состава микроРНК в ВВ-МСК, полученных из жировой ткани 3 доноров (D1-D3), диаграмма Венна. Е. Десять наиболее представленных микроРНК в ВВ-МСК. Ж. Представленность микроРНК, ассоциированных с репарацией тканей, в ВВ-МСК на основе анализа их предполагаемых мишеней [18].

Важно отметить, что состав секретомы МСК человека может адаптивно изменяться под действием различных факторов, связанных с повреждением. Так, культивирование клеток в условиях выраженной гипоксии (1% O₂) в течение 48 часов не приводило к существенному изменению количества секретируемых белков, но влияло на уровень продукции некоторых из них, например, было обнаружено существенное повышение секреции VEGF и гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF) [30].

Под воздействием фактора роста, полученного из тромбоцитов (PDGF), который является ключевым регулятором стромальных клеток и выделяется в значительных количествах при повреждении тканей, наблюдались значительные изменения в транскриптоме МСК, схожие по паттерну с транскриптомом сенесцентных (стареющих) клеток, однако больше характерные для так называемого раннего клеточного старения (early senescence). Эти изменения приводили к стимуляции пролиферативной и миграторной активности клеток, а также к изменению их секретомы в виде повышения продукции проангиогенных факторов, что можно интерпретировать как активацию регенераторных свойств МСК в ответ на фактор, ассоциированный с повреждением тканей [14] (Рис. 4).

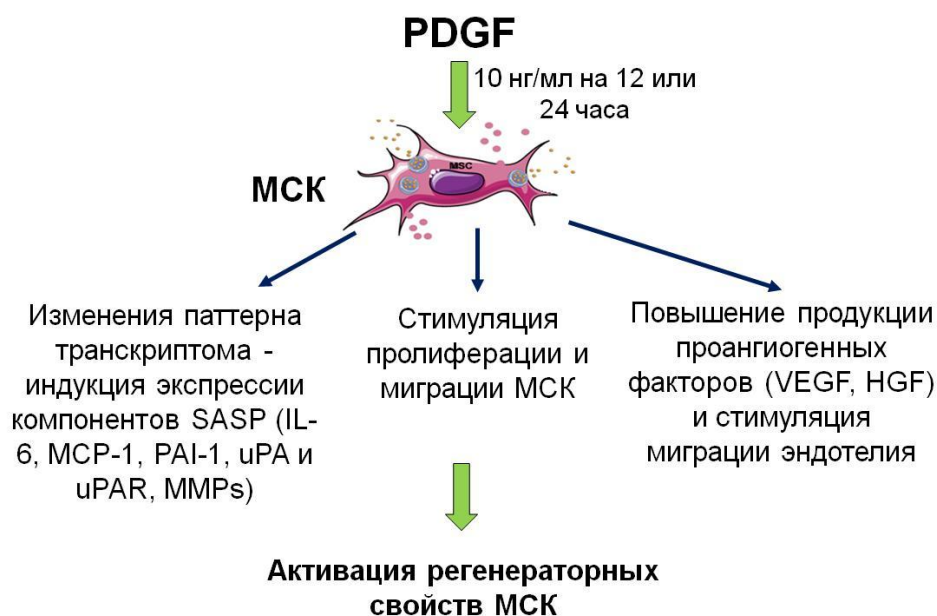


Рис. 4. Изменение транскриптома, состава секретомы и функциональных свойств МСК под действием PDGF (фактор роста, полученный из тромбоцитов). SASP – секреторный фенотип, ассоциированный со старением, IL – интерлейкин, MCP-1 – белок хемоаттрактант моноцитов 1, PAI-1 – ингибитор активатора плазминогена 1, uPA – урокиназа, uPAR – урокиназный рецептор, MMPs – металлопротеиназы.

Однако, при старении человека и накоплении последствий перенесенных заболеваний, таких как ишемическая болезнь сердца, метаболические заболевания и

другие, наблюдаются изменения МСК, которые могут оказывать негативное влияние на их регенераторный потенциал. Было показано, что МСК, выделенные из тканей таких доноров, приобретают фенотипические признаки сенесцентных клеток, включая выраженное замедление пролиферации и повышение экспрессии ингибиторов клеточного цикла, укорочение длины теломер и снижение теломеразной активности, повышение активности бета-галактозидазы, ухудшение репарации ДНК, отражающееся в более высоком уровне накопления γ H2AX в ядрах клеток) и приобретение SASP [6, 32-35, 39] (Рис. 5). При этом обнаруженные изменения секрета МСК приводят к сдвигу баланса между продукцией факторов, участвующих в регуляции регенеративных процессов. Так, наблюдали существенное снижение способности МСК от пожилых доноров секретировать регенераторные факторы роста (VEGF, HGF, Angpt-1, ангиогенин), в то время как продукция провоспалительных факторов и компонентов системы внеклеточного протеолиза (IL-6, MCP-1, uPA, MMP-2,-9, PAI-1) значимо увеличивалась, что было ассоциировано с ухудшением функциональных свойств МСК.

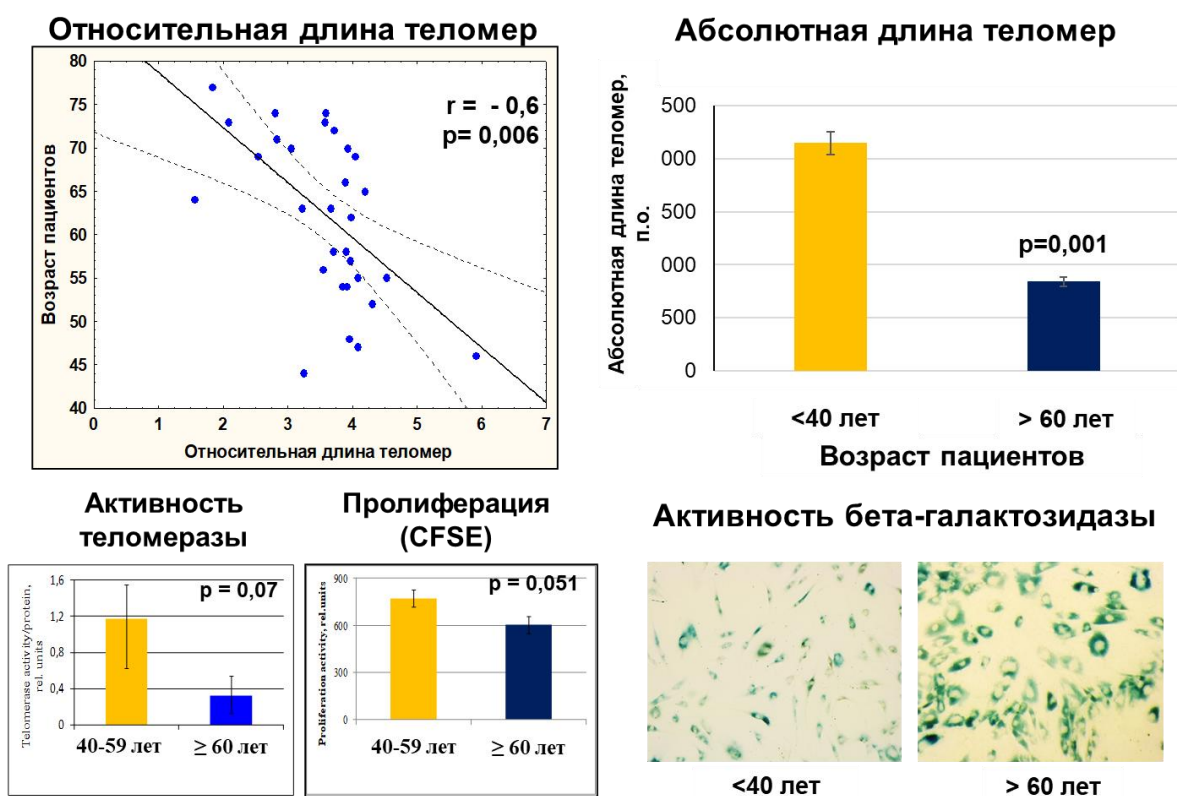


Рис. 5. При старении и развитии хронических заболеваний МСК человека приобретают сенесцентный фенотип.

В секрете МСК, выделенных из клеток пожилых доноров, наблюдаются также значительные изменения паттерна микроРНК в составе ВВ-МСК, которые были оценены с помощью таргетного ПЦР анализа (Рис. 6). Это приводит к снижению способности

сенесцентных МСК от пожилых пациентов к адипогенной дифференцировке, что может быть связано с развитием инсулинорезистентности в этих клетках за счет влияния микроРНК в составе секретируемых клетками ВВ на компоненты инсулинового сигнального пути (PTEN) и экспрессию белка Ago 1, необходимого для взаимодействия микроРНК с таргетными мРНК и участвующего в ответе клеток на дифференцировочные стимулы [10].

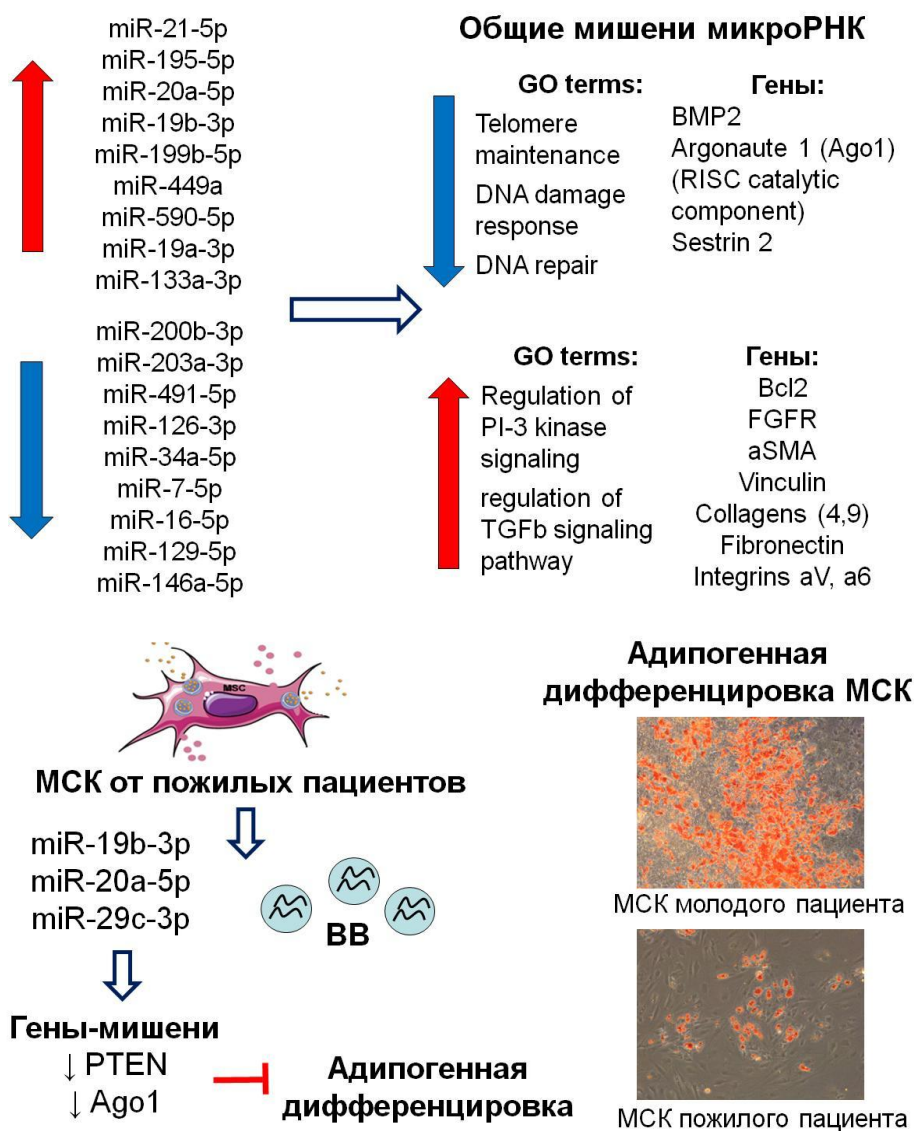


Рис. 6. Изменения паттерна микроРНК в составе ВВ-МСК, полученных от пожилых пациентов, по сравнению с ВВ-МСК от молодых пациентов, оцененные методом таргетного ПЦР анализа. Левая верхняя панель: красная стрелка отмечает микроРНК, экспрессия которых повышена в ВВ-МСК, полученных от пожилых пациентов, синяя стрелка – микроРНК, экспрессия которых снижена в ВВ-МСК, полученных от пожилых пациентов. Правая верхняя панель: биоинформатический анализ позволяет выделить функциональные группы генов-мишеней микроРНК, дифференциально представленных в ВВ-МСК, экспрессия которых предположительно может снижаться (синяя стрелка) или повышаться (красная стрелка) в таргетных клетках под действием секрета МСК. Левая нижняя панель. Предположительный механизм подавления адипогенной

дифференцировки МСК за счет переноса микроРНК, регулирующих ответ клеток на дифференцировочные стимулы. Правая нижняя панель: МСК, полученные от пожилых пациентов, хуже дифференцируются в адипогенном направлении. Клетки после индукции адипогенной дифференцировки (14 дней) с помощью коммерческого набора окрашены Oil Red O для визуализации липидных капель.

Мощное развитие генетических технологий на сегодняшний день открывает широкие возможности направленной модификации клеток, в том числе МСК, с целью модуляции состава их секретома и изучения вклада отдельных его компонентов в паракринные эффекты этих клеток [12]. Так, было показано, что модификация МСК генетической конструкцией, кодирующей VEGF, значимо увеличивает его содержание в секретоме и способность этих клеток стимулировать рост кровеносных сосудов на модели ишемии нижних конечностей мышей *in vivo* [31]. С целью изучения вклада секреторируемых в составе ВВ-МСК микроРНК в изменения свойств этих клеток был отработан подход к управлению экспрессией регуляторных некодирующих РНК в МСК с помощью метода редактирования генома при использовании двух вариантов CRISPR/Cas9, программируемых нуклеаз дикого типа (SpCas9wt) и никазы (SpCas9D10A). Было показано, что использование SpCas9D10A позволяет эффективно снижать экспрессию целевых микроРНК (микроРНК-21 и микроРНК-29с) как в клетках, так и в секреторируемых ВВ-МСК, что было доказано с помощью таргетного секвенирования и ПЦР анализа (Рис. 7). Полученные нами результаты показали, что снижение экспрессии исследуемых микроРНК влияет на способность ВВ-МСК подавлять дифференцировку фибробластов в миофибробласты *in vitro*, что доказывает функциональную значимость внесенных генетических модификаций [4].

Однако, при обсуждении перспектив трансляции таких подходов для модуляции состава секретома МСК следует тщательно анализировать возможные этические и правовые проблемы их применения в медицине [42]. Кроме того, генетическая модификация МСК может непредсказуемым образом изменять их ответ на регуляторные сигналы, так, было обнаружено, что иммортализованные МСК жировой ткани человека (коммерческая линия ASC52Telo, ATCC) значимо хуже отвечают на инсулин и плохо дифференцируются в адипогенном направлении [16].

Таким образом, мы показали, что в составе секретома МСК содержатся основные фракции секреторируемых белковых факторов (факторы роста, цитокины, хемокины), молекул, переносимых в составе ВВ (кодирующих и некодирующих РНК), и компонентов ВКМ. Состав секретома МСК человека может изменяться при старении и под действием

факторов, связанных с повреждением тканей, что может существенно повлиять на способность МСК участвовать в обновлении и регенерации тканей.

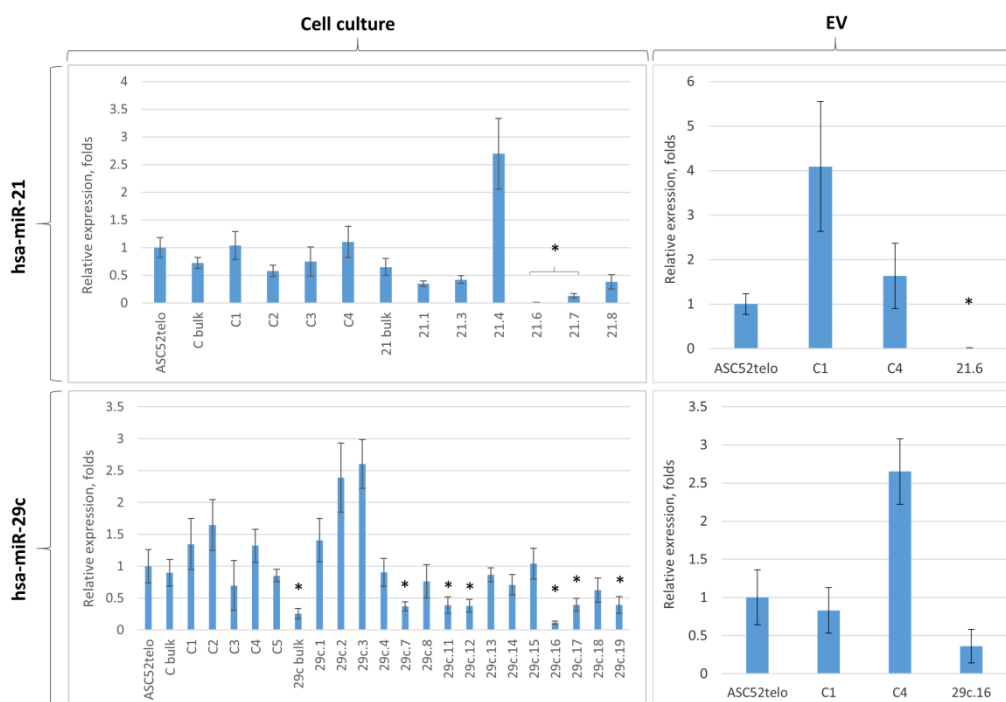


Рис. 7. Относительная экспрессия микроРНК (hsa-miR-21-5p и hsa-miR-29c-3p) в клонах иммортализованных МСК жировой ткани (ASC52telo, ATCC) и продуцируемых ими ВВ-МСК (EV). Клетки были модифицированы с помощью CRISPR/Cas9-никазы с использованием контрольных (scramble) gRNA (клоны C1-5) или специфических gRNA, направленных на выбранные микроРНК. Bulk—модифицированные МСК перед клонированием. * $p < 0.05$ по сравнению с соответствующей группой контроля (C bulk—левая панель, ASC52 telo—правая панель), t-test [4].

Исследование механизмов участия секрета МСК в регенераторном действии этих клеток на ниши стволовых клеток на примере ниши ССК

В качестве релевантной и удобной модели для исследования влияния МСК на нишу стволовых клеток была выбрана ниша сперматогониальной стволовой клетки (ССК). Морфология этой ниши прекрасно изучена, подробно описаны механизмы регуляции стволовых клеток в этой нише за счет эндокринных и паракринных механизмов и влияния матричных компонентов. Кроме того, повреждение ниши ССК можно установить прижизненно с помощью простых методов оценки фертильности и анализа содержания тестостерона в сыворотке крови. Для изучения восстановления ниши была выбрана физиологическая модель повреждения в виде двустороннего абдоминального крипторхизма у крыс, для которых характерна сезонная регуляция сперматогенеза по схожему механизму (втягиванию семенников в брюшную полость с повышенной температурой, что вызывает блок сперматогенеза) [26].

Было впервые установлено, что МСК присутствуют в нише ССК и локализованы в интерстиции, а при повреждении ниши их количество увеличивается. Из семенников были выделены в культуру стромальные клетки, соответствующие критериям МСК по адгезии, иммунофенотипу и способности к дифференцировке в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлениях (Рис. 8)

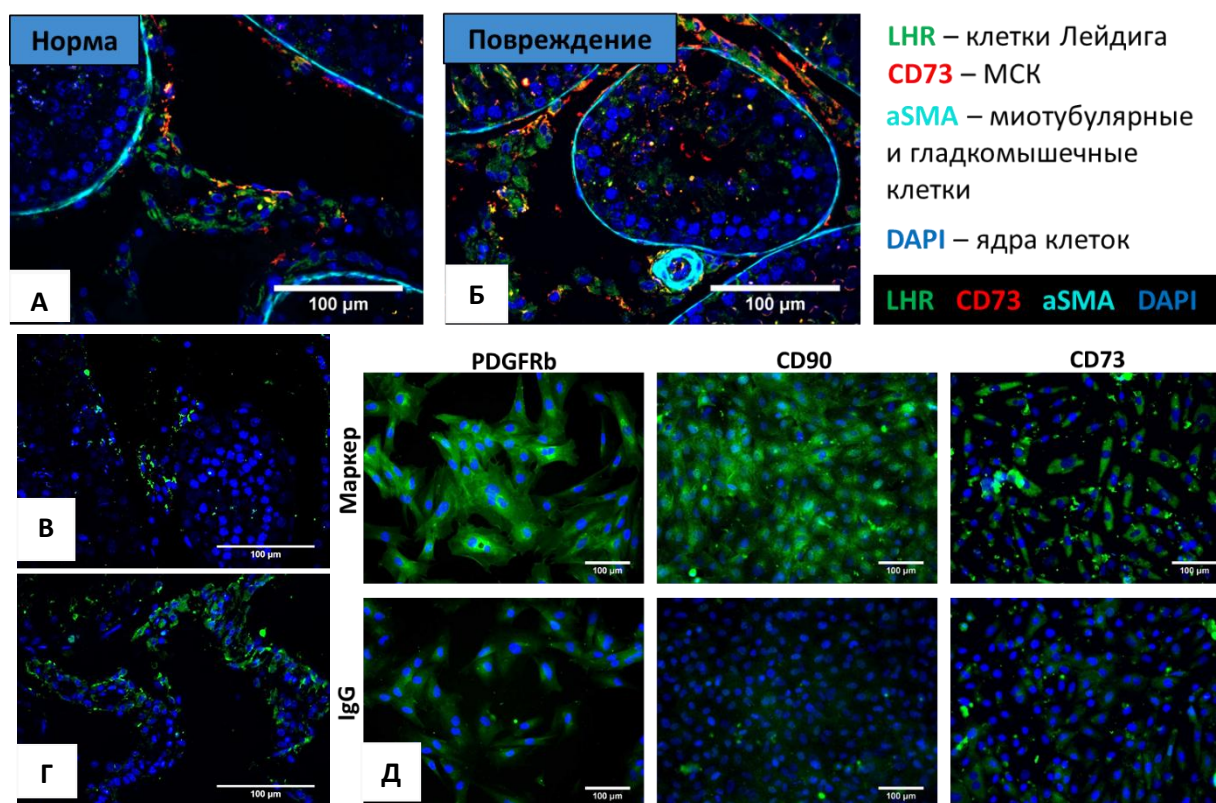


Рис. 8. МСК обнаружены в нише ССК, где локализуются в интерстиции. А-Г. При мультипараметрическом иммуногистохимическом анализе срезов семенников крыс в интерстиции наблюдаются CD73+ клетки (МСК), количество которых увеличивается при повреждении (Б, Г) по сравнению с интактными животными (А, В). Д. Из ткани семенников могут быть выделены клетки с фенотипическими признаками МСК (CD90+CD73+PDGFRb+), отрицательные по маркерам клеток Лейдига и клеток Сертоли.

При моделировании повреждения ниши ССК (поднятие семенников в брюшную полость на две недели) были определены критерии нарушения сперматогенеза. На уровне целого органа моделирование крипторхизма проявляется гипотрофией яичек. При анализе гистологической картины наблюдаются признаки существенного повреждения сперматогенеза, что выражается уменьшением количества клеток сперматогенного эпителия и клеток Сертоли в семенных канальцах, уменьшением количества функциональных семенных канальцев, гиперплазией интерстиция и снижением продукции сперматозоидов [26]. Локальное введение под белочную оболочку секрета МСК способствует восстановлению сперматогенеза, в том числе на уровне целого органа, что было отражено в виде восстановления массы яичек и снижения количества

атрофичных канальцев. Анализ содержания различных типов клеток сперматогенного эпителия в семенных канальцах и сперматозоидов в придатках яичек позволил установить способность секрета МСК стимулировать восстановление ниши ССК, что проявлялось в поддержании пролиферации и дифференцировки сперматогенного эпителия (Рис. 9).

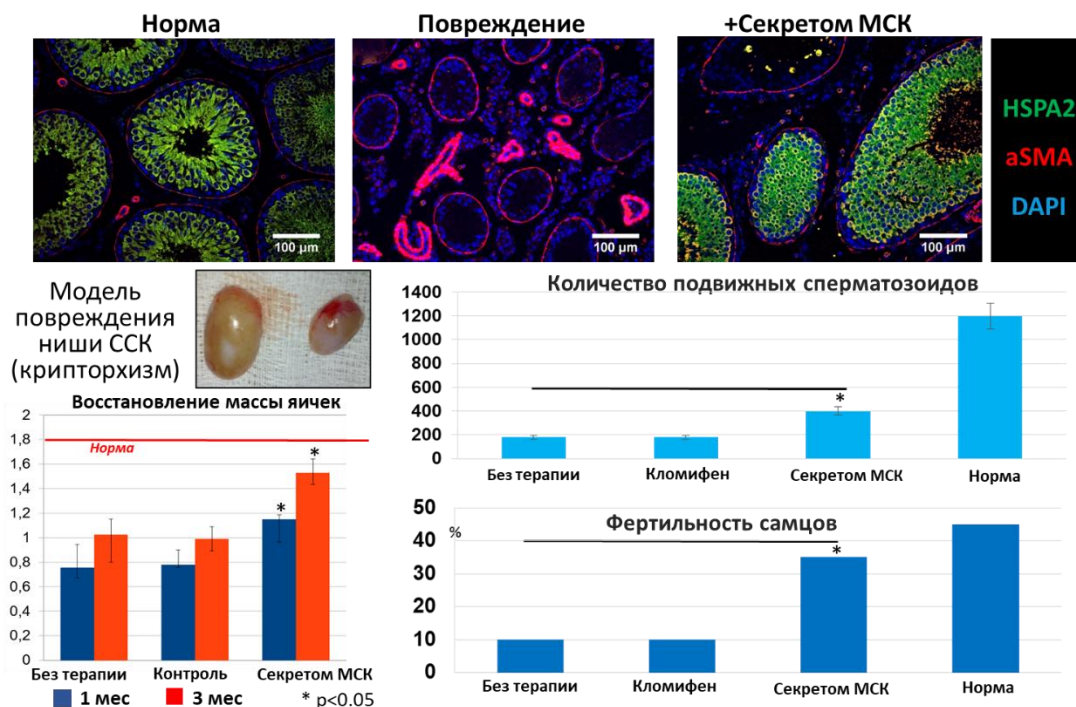


Рис. 9. Локальное введение секрета МСК способствует восстановлению структуры и функции ниши ССК на модели двустороннего абдоминального крипторхизма у крыс. * $p < 0.05$. Кломифен использовали как препарат сравнения.

Даже на относительно коротком сроке наблюдения (один месяц после введения секрета МСК) у крыс наблюдали значительное уменьшение количества атрофичных канальцев по сравнению с контрольной группой (Табл. 3). В этой же временной точке в семенных канальцах обнаруживали сперматоциты и сперматозоиды, что указывало на преодоление блока сперматогенеза (Рис. 10). В то же время анализ общей и подвижной фракции сперматозоидов в придатках показал, что значимое увеличение этих показателей проявляется только через 3 месяца после введения секрета МСК. Это свидетельствовало в пользу предположения о том, что введение секрета МСК запускает восстановление ниши ССК, что на более поздних сроках наблюдения приводит к восстановлению сперматогенеза.

Таблица 3. Количество атрофичных склеротических семенных канальцев на срезах семенников, количество канальцев на поле зрения. Данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение. * $p < 0.05$.

Группы	Через 1 месяц	Через 3 месяца
Без терапии	63,24 \pm 5,16	75,26 \pm 6,17
Контр. ср.	64,26 \pm 3,15	52,12 \pm 2,19
Секр. МСК	3,18\pm0,24*	0,78\pm0,13*
МСК	34,11 \pm 0,15	6,13\pm0,52*

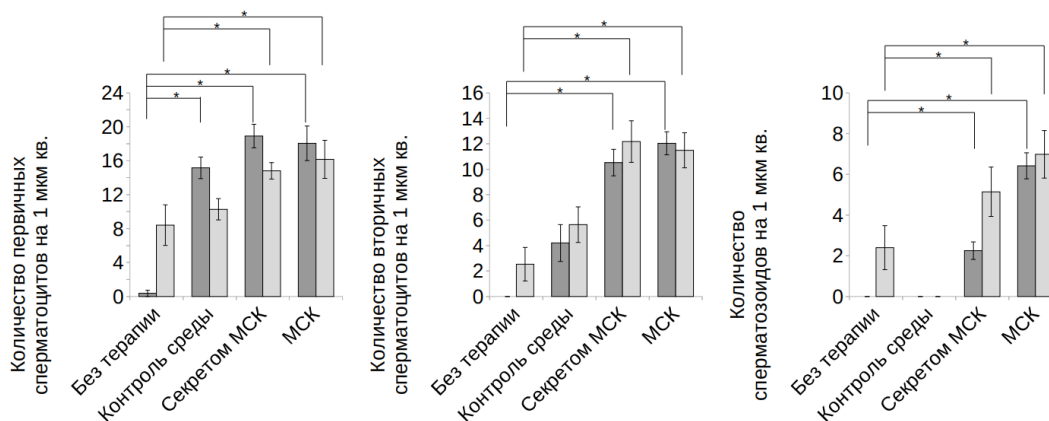


Рис. 10. Анализ клеточного состава в семенных канальцах по представленности клеток сперматогенного эпителия, находящихся на поздних стадиях дифференцировки, на единицу площади семенного канальца, через 1 месяц (темно-серые столбики) и через 3 месяца (светло-серые столбики) после низведения семенников и введения МСК, их секретома или контрольной среды (DMEM с низкой глюкозой). Статистический анализ проведен с помощью теста Стьюдента с применением поправки Бонферрони. * $p < 0.05$ по сравнению со значением в группе «без терапии». Представлены средние и стандартные отклонения групп.

Способность секретома МСК стимулировать регенерацию ниши ССК была подтверждена по восстановлению фертильности самцов и результатам анализа количества полученного потомства [23, 46]. Установлено, что процент самок, оплодотворенных самцами, которым вводили секретом МСК, более чем в 5.5 раз превышает процент самок, оплодотворенных животными без введения (6/17, 35.3% против 1/16, 6.3%). Среднее количество потомства, полученного после оплодотворения самцами крыс, которым вводили секретом, более чем в 4 раза выше по сравнению с группой животных без терапии (Рис. 11).

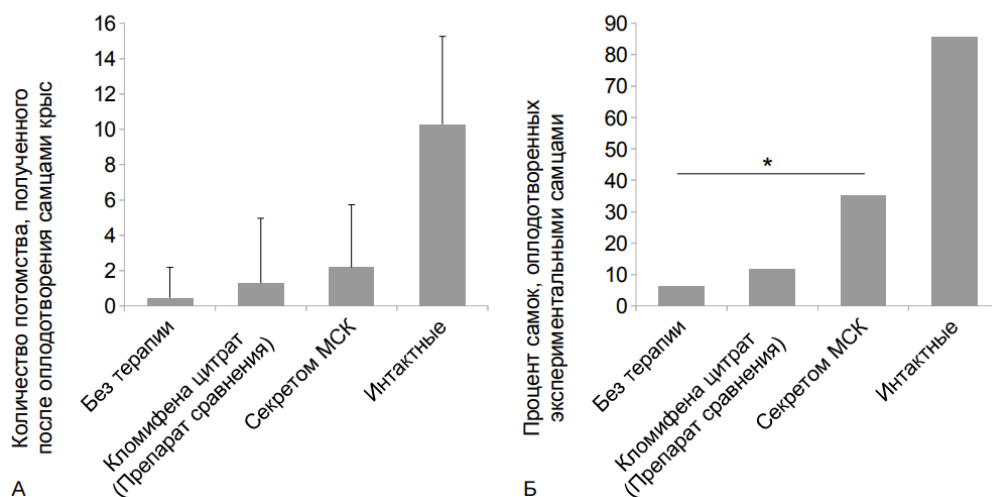
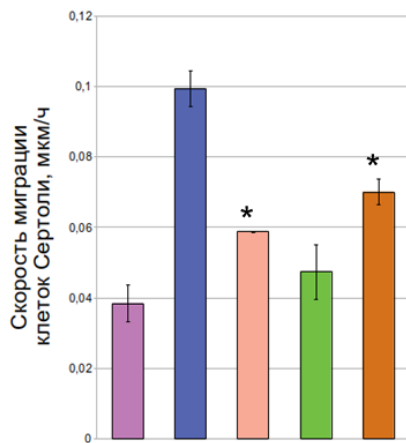
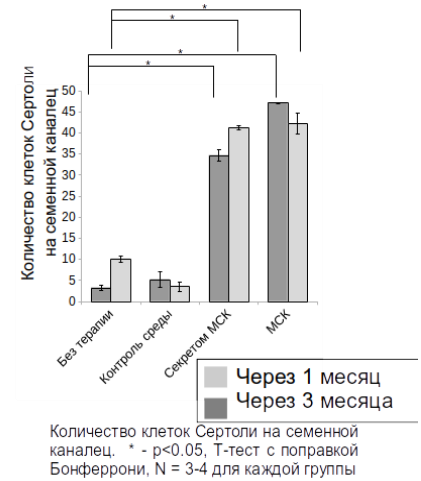
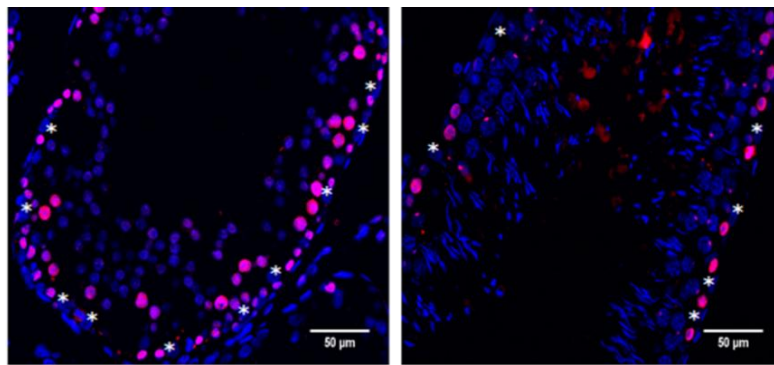


Рис. 11. Оценка восстановления репродуктивной функции самцов крыс после локального введения секретома МСК на модели двустороннего абдоминального крипторхизма. А. Среднее количество потомства, полученного после оплодотворения самцами. Данные представлены в виде среднего и стандартного отклонения. Б. Процент самок, успешно оплодотворенных самцами из разных групп. Для статистического анализа применяли критерий хи-квадрат. * $p < 0.05$.

Для изучения основных механизмов влияния МСК на нишу ССК были проанализированы эффекты этих клеток или их секретома на различные клетки ниши [23, 46]. Известно, что МСК стимулирует ангиогенез, что может быть важным для поддержания сперматогенеза, однако было обнаружено, что как само моделирование крипторхизма, так и введение МСК или их секретома не влияет на количество сосудов, определяемое методом иммуногистохимического анализа на срезах семенников. Как было отмечено выше, можно предполагать, что восстановление ниши ССК предшествует восстановлению непосредственно сперматогенеза, поэтому было проанализировано действие МСК и компонентов их секретома на клетки Сертоли и клетки Лейдига – ключевые поддерживающие клетки ниши ССК. Полученные экспериментальные данные показали, что при введении МСК или секретома МСК восстанавливается популяция клеток Сертоли в сперматогенных канальцах, но не за счет пролиферации, а, возможно, благодаря миграции из переходной зоны (Рис. 12). Наблюдали замедление избыточной пролиферации клеток Лейдига и стимуляцию их секреторной активности (Рис. 13), что было подтверждено с помощью анализа уровня тестостерона как в периферическом кровотоке *in vivo* [23], так и на клеточной модели *in vitro* [11]. Отмечали восстановление гематотестикулярного барьера при введении МСК или их секретома (Рис. 14).



DMEM 0% FBS (отрицательный контроль)
 DMEM 10% FBS (положительный контроль)
 Секретом МСК
 Секретом клеток Лейдига
 Секретом клеток Лейдига, стимулированных секретом МСК

Рис. 12. При введении МСК или секрета МСК восстанавливается популяция клеток Сертоли в сперматогенных канальцах, предположительно, благодаря опосредованной стимуляции миграции из переходной зоны. Верхняя панель. Клетки Сертоли на срезах отмечены звездочками. PCNA (красный) – маркер пролиферирующих клеток. Нижняя панель. Оценка скорости миграции клеток Сертоли in vitro под действием секрета МСК, действующего напрямую или опосредованно через стимуляцию клеток Лейдига. * $p < 0.05$.

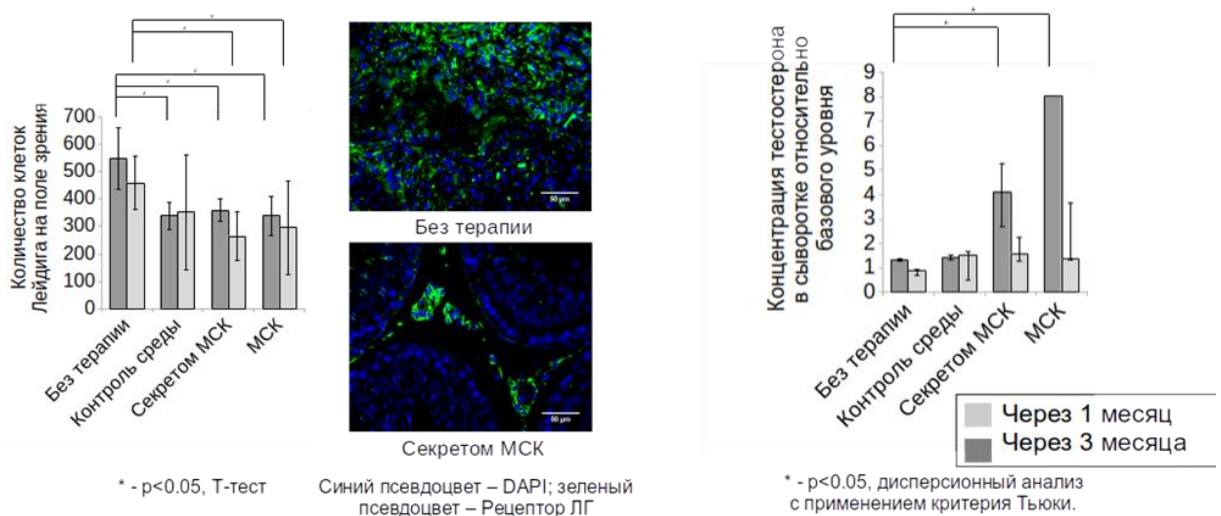


Рис. 13. При введении МСК или их секрета замедляется пролиферация и стимулируется секреторная активность клеток Лейдига. * $p < 0.05$.

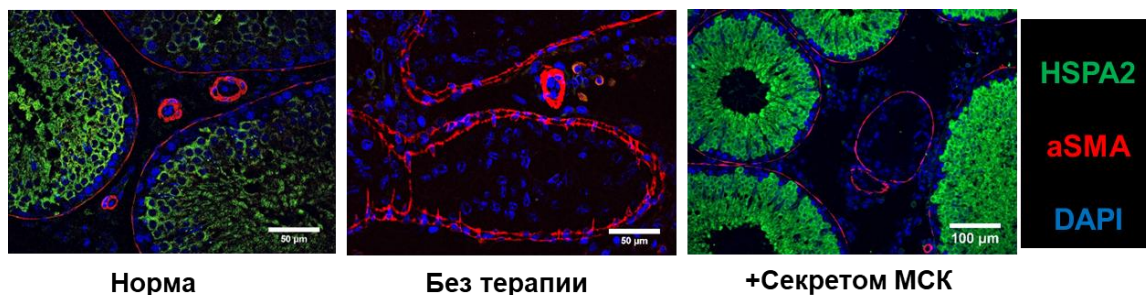


Рис. 14. Восстановление гематотестикулярного барьера при введении секретома МСК в семенники.

Важно отметить, что регенераторные эффекты самих клеток в отношении поврежденной ниши ССК были сравнимы с действием секретома МСК, поэтому паракринную активность МСК можно рассматривать как ключевой механизм для обеспечения их действия в нише [23, 46]. Однако при экзогенном введении МСК количество атрофичных канальцев сохранялось более высоким по сравнению с группой животных, которым вводили секретом МСК (Табл. 3). Предположительно, это может быть связано с реакцией иммунной системы на ксеногенный клеточный материал. Действительно, анализ накопления активированных макрофагов (CD163+) показал, что их количество было значительно больше в семенниках животных, которым вводили МСК по сравнению с группой введения секретома (Рис. 15).

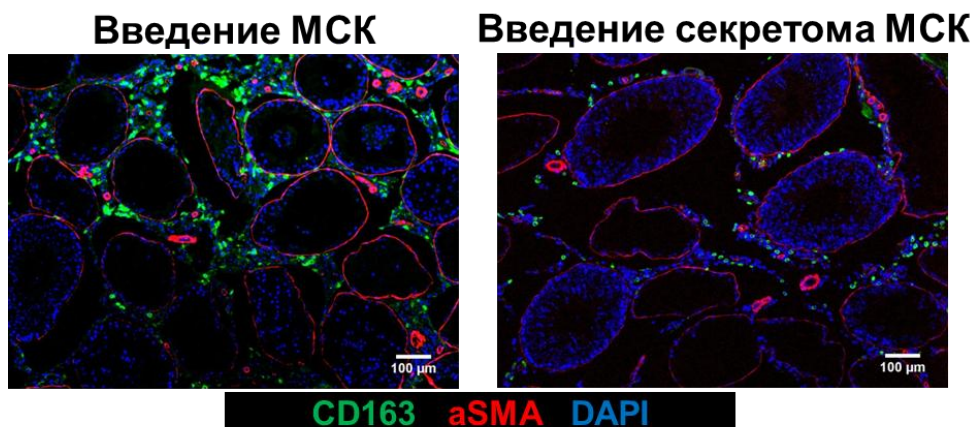


Рис. 15. Введение МСК приводит к привлечению большего количества CD163+ макрофагов при повреждении ниши ССК, чем введение секретома МСК. Иммуногистохимический анализ срезов семенников крыс.

Способность секретома МСК человека стимулировать восстановление сперматогенеза была также подтверждена на модели токсического повреждения семенников у мышей. Для этого было проведено сравнение общетоксического и

сперматотоксического действия различных химических веществ, включая цитостатики [43], и проведена отработка модели доксорубицин-индуцированного повреждения сперматогенеза [40]. На этой модели была также показана возможность секрета МСК при локальном введении в семенники способствовать восстановлению продукции как общего количества, так и количества подвижных форм сперматозоидов [11].

Таким образом, на физиологической модели нарушения сперматогенеза при абдоминальном крипторхизме у крыс установлено, что МСК локализованы в нише ССК, их количество увеличивается при повреждении, и эти клетки могут стимулировать восстановление поврежденной ниши посредством своего секрета. При прямом сравнении в эксперименте показано, что действие МСК и секрета этих клеток в отношении восстановления поврежденной ниши сопоставимы по эффекту, что указывает на важнейшую роль паракринной активности этих клеток в нише. Способность секрета МСК человека стимулировать восстановление сперматогенеза подтверждена на модели токсического доксорубицин-индуцированного повреждения семенников у мышей. При этом регенераторные эффекты секрета МСК реализуются преимущественно на уровне поддерживающих клеток ниши ССК, что приводит к восстановлению как структуры, так и функции ниши.

Роль различных фракций секрета МСК в регуляции мультипотентных стволовых клеток и поддерживающих клеток, входящих в состав их ниш

Успешность восстановления структуры и функции ткани после повреждения зависит от сохранения функционирующих ниш тканеспецифичных стволовых клеток и скорости их регенерации. Однако зачастую при серьезном или повторяющемся повреждении, развитии хронического воспалительного процесса результатом репаративной регенерации у млекопитающих является возникновение фиброза. Хотя этот физиологический репаративный механизм востребован как этап восстановления нормальной ткани, при неблагоприятных условиях он может трансформироваться в прогрессирующий фибропролиферативный процесс в виде избыточного накопления в тканях белков ВКМ, прежде всего, коллагена I типа и специфической формы фибронектина - EDA-фибронектина, что приводит к формированию измененной рубцовой ткани и выраженной дисфункции органа. Это наблюдается в патогенезе таких ассоциированных с фиброзом заболеваний, как идиопатический лёгочный фиброз и другие интерстициальные болезни легких, фиброз и цирроз печени, фиброз почек, склеродермия и других патологий.

К настоящему времени накоплено достаточно много экспериментальных данных, указывающих на то, что важными регуляторами баланса между регенерацией и фиброзом, препятствующими развитию патологического фибропролиферативного сценария, могут служить МСК за счет действия своего секрета на ниши, в первую очередь, на иммунные клетки, участвующие в поддержании хронического воспаления, и стромальные клетки. Основными эффекторными клетками фиброгенеза, ответственными за синтез и ремоделирование ВКМ, считаются миофибробласты. Предшественниками миофибробластов являются различные типы локализованных в строме клеток, в первую очередь, резидентные фибробласты, а также циркулирующие в крови фиброциты, эндотелиальные и эпителиальные клетки, которые могут трансформироваться в миофибробласты в ходе эндотелиально- или эпителиально-мезенхимного перехода, соответственно [1, 18, 37, 51]. Важную роль в прогрессии фиброза играют так называемые активированные фибробласты, экспрессирующие белок активации фибробластов (FAP), что подробно обсуждено в нашем обзоре [51]. Следует отметить, что в популяции МСК есть клетки, способные сами к дифференцировке в миофибробласты и клетки, приобретающие ярко выраженный сократительный фенотип под действием различных стимулов, что было показано с помощью анализа транскриптома единичных клеток (scRNAseq) [7, 8], но описаны и субпопуляции МСК, устойчивые к этим сигналам и обеспечивающие антифибротические эффекты.

В ходе физиологической репарации активность фибробластов находится под контролем иммунной системы, и избыточное количество миофибробластов элиминируется за счет апоптоза. Кроме того, содержание миофибробластов может регулироваться путем ингибирования дифференцировки/транздифференцировки клеток-предшественников или индукции дедифференцировки миофибробластов. В работе было подробно изучен вклад МСК в регуляцию этих процессов.

На клеточной модели фиброза было показано, что дифференцировка фибробластов в миофибробласты, индуцируемая ключевым профибротическим фактором – трансформирующим фактором роста бета (TGF β), ингибируется при добавлении секрета МСК, причем как ВВ-МСК, так и РФ-МСК фракции секрета оказывают подобный эффект (Рис. 16) [18].

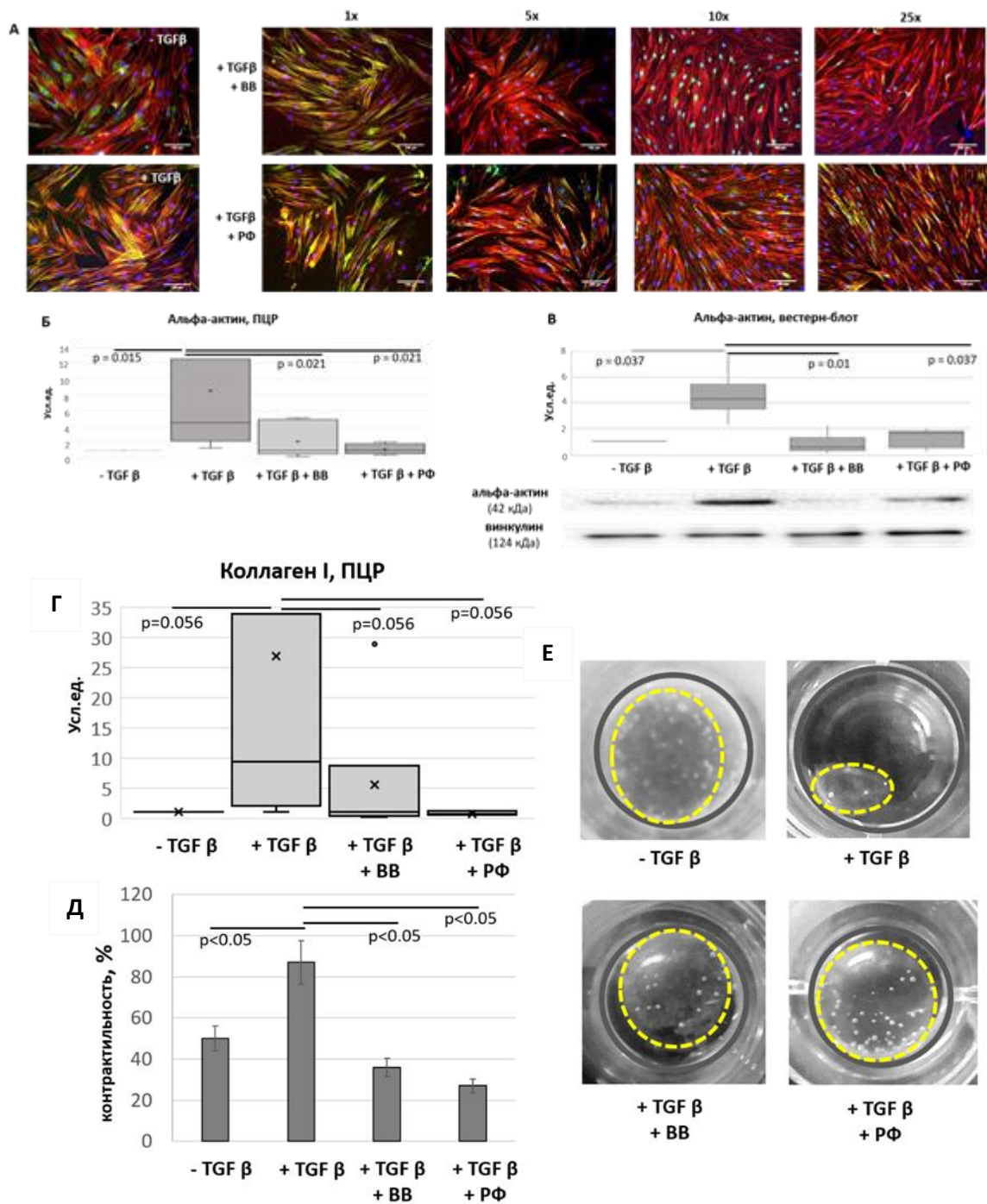


Рис. 16. Фракции секрета МСК предотвращают TGFβ-индуцированную дифференцировку фибробластов в миофибробласты, оцененную по экспрессии альфа-актина (αSMA), формированию стресс-фибрилл, экспрессии коллагена I типа и сократительной способности клеток. А. Иммунофлуоресцентный анализ содержания αSMA в культивируемых контрольных фибробластах (1), в фибробластах после воздействия TGFβ (2), TGFβ + BB-МСК (3), TGFβ + РФ-МСК (4). αSMA (зеленый), фаллоидин (красный), DAPI (синий). Масштабный отрезок – 100 мкм, x – степень концентрирования фракций. Б. ОТ-ПЦР, αSMA. В. Вестерн-блоттинг, αSMA. Г. ОТ-ПЦР, коллаген I типа. Д. График, отражающий сократительную активность клеток на модели контракции коллагенового диска. Е. Репрезентативные фотографии коллагеновых дисков.

Однако, на животной модели блеомицин-индуцированного фиброза легких у мышей было обнаружено, что введение фракций секрета МСК интратрахеально не способно предупредить дифференцировку фибробластов в миофибробласты и развитие фибротических изменений в тканях, но зато фракция ВВ-МСК оказалась очень эффективна в части разрешения уже развившегося фиброза, что сопровождалось значимым уменьшением накопления коллагена и количества активированных фибробластов (FAP+ клеток) и миофибробластов (α SMA+ клеток), а также снижением признаков воспаления в ткани легкого. При этом разницы в уровне апоптоза клеток в легких между группами (тест TUNEL) не обнаружили. Фракция РФ-МСК, не содержащая ВВ, не продемонстрировала такого эффекта (Рис. 17) [1].

С учетом полученных результатов была проанализирована способность ВВ-МСК регулировать дедифференцировку миофибробластов. Было показано, что ВВ-МСК стимулируют дедифференцировку миофибробластов в фибробласты *in vitro*, при этом наблюдаемый эффект зависит от присутствия в их составе РНК (Рис. 18). Для фракции РФ-МСК этот эффект был выражен слабее.

Важнейшими компонентами в составе ВВ-МСК, способными регулировать дифференцировку клеток, являются микроРНК. С помощью олигонуклеотидных ингибиторов специфических микроРНК было установлено, что микроРНК-21, -29с и -129 в составе ВВ-МСК вносят значимый вклад в антифибротические эффекты секрета МСК. Было продемонстрировано, что микроРНК-29с и микроРНК-21 вовлечены в подавление дифференцировки фибробластов в миофибробласты *in vitro*, а микроРНК-29с и микроРНК-129 критически важны для реализации способности МСК через продукцию ВВ-МСК стимулировать дедифференцировку миофибробластов *in vitro* (Рис. 19) и оказывать антифибротическую активность *in vivo* (Рис. 20) [1, 18].

Таким образом, МСК способны подавлять развитие фиброза за счет влияния содержащихся в их секрете специфических микроРНК, переносимых в составе ВВ, на дифференцировку и дедифференцировку фибробластов/миофибробластов.

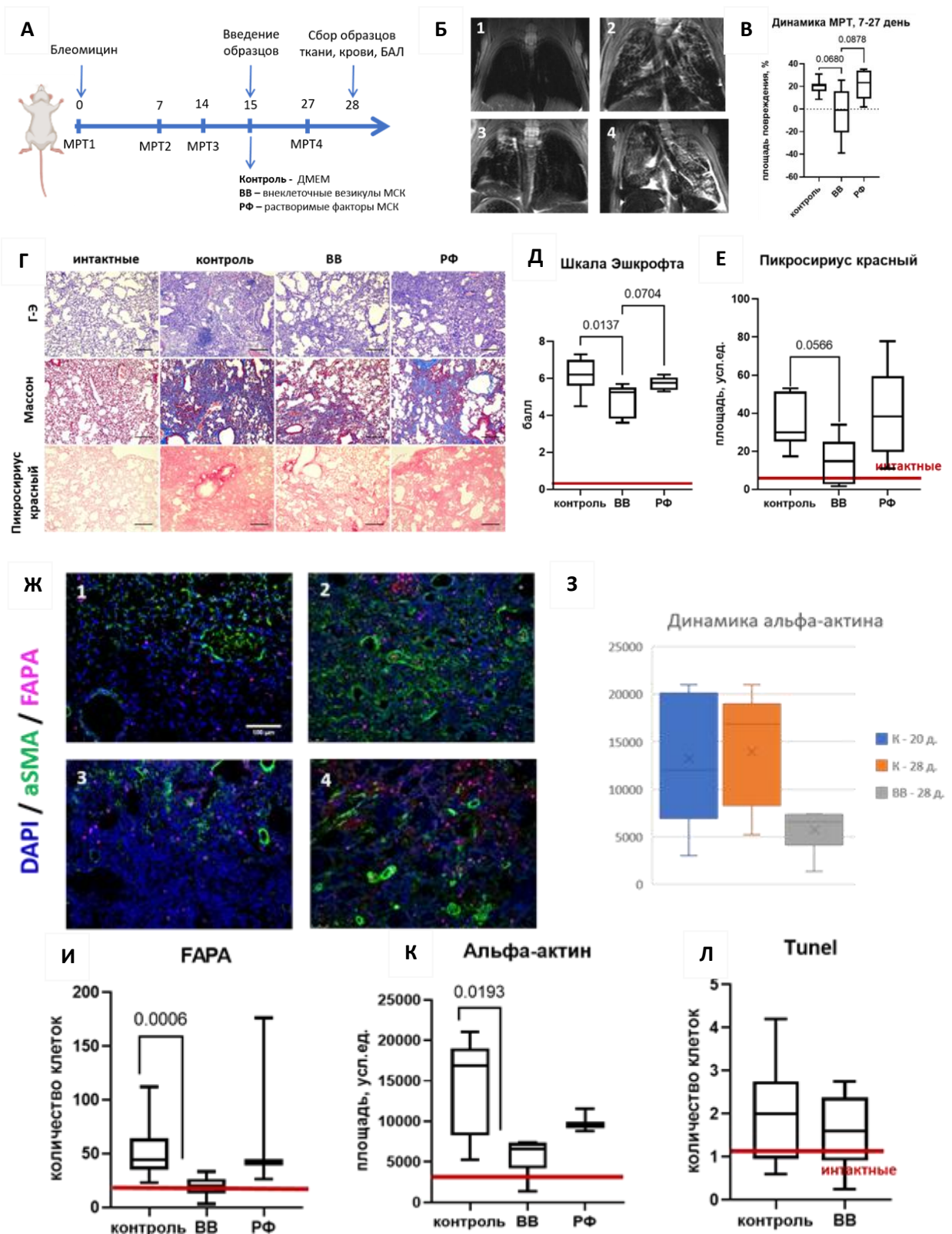


Рис. 17. Компоненты в составе ВВ-МСК способствуют разрешению фиброза лёгких мышей, индуцированного блеомицином. А. Дизайн эксперимента по моделированию лёгочного фиброза у мышей. Б. Репрезентативные томограммы (МРТ) лёгких мышей через 27 дней после введения блеомицина. Группы: интактные животные (1), ДМЕМ (2 - контроль); ВВ-МСК (3 - ВВ) или РФ-МСК (4 - РФ). В. Динамика площади поражения лёгочной ткани по данным МРТ, 7-27 день. Г. Гистологическая оценка изменений в легких мышей через 28 дней после введения блеомицина. Репрезентативные фотографии

(Г-Э – гематоксилин–эозин, трихром по Массону, пикросирус красный). Группы: интактные животные, ДМЕМ (контроль); ВВ-МСК (ВВ) или РФ-МСК (РФ). Масштабный отрезок 200 мкм. Д. Количественная оценка фиброза в баллах по развернутой шкале Эшкрофта. Е. Количество коллагена в ткани лёгких, оцененное по окраске пикросирусом красным. Ж. Иммуногистохимический анализ экспрессии α SMA и FAPa в легких мышей через 28 дней после введения блеомицина. Репрезентативные фотографии, отражающие площадь α SMA-положительных участков в ткани. Группы: интактные животные (1), ДМЕМ (2 - контроль); ВВ-МСК (3 - ВВ) или РФ-МСК (4 - РФ). Масштабный отрезок 100 мкм. З. Изменение площади α SMA-положительных участков в легочной ткани во времени. И. Количество FAPa+ клеток в ткани лёгких. К. Площадь α SMA+ клеток в ткани лёгких. Л. Оценка апоптоза клеток в легких методом TUNEL.

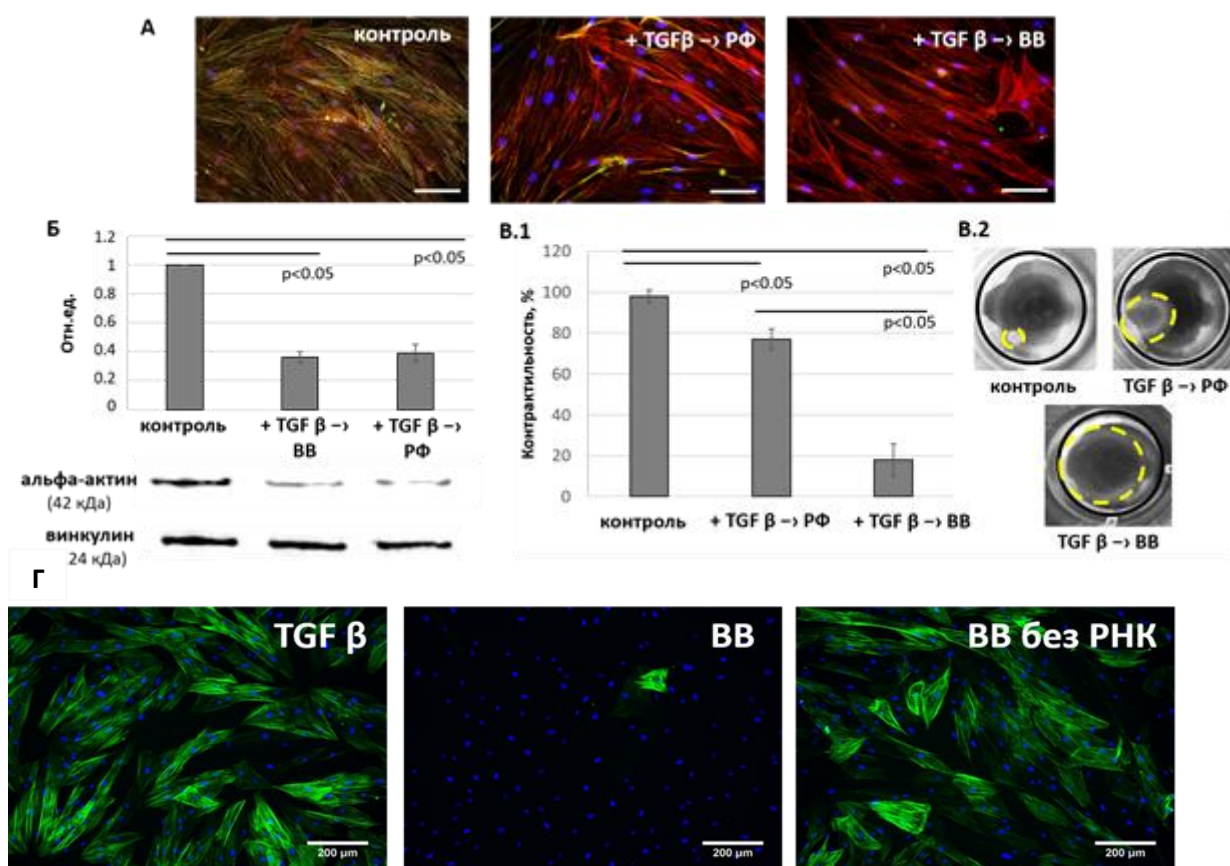


Рис. 18. Фракции секретома МСК стимулируют дедифференцировку миофибробластов. После индукции дифференцировки фибробластов в миофибробласты с помощью TGFb в течение четырех дней среда культивирования была заменена на компоненты фракций секретома МСК (+ TGFβ -> ВВ; + TGFβ -> РФ) или базовую среду ДМЕМ (контроль). А. Иммунофлуоресцентный анализ (α SMA (зеленый), фаллоидин (красный), DAPI (синий)). Масштабный отрезок 100 мкм. Б. Вестерн-блоттинг, α SMA. В. Оценка сократительно активности клеток на модели контракции коллагенового диска. В.1 График сократительной активности миофибробластов. В.2. Репрезентативные макрофотографии. Г. Оценка вклада РНК в реализацию эффектов ВВ-МСК. Иммунофлуоресцентный анализ содержания α SMA в миофибробластах после воздействия TGFβ (TGFβ) и последующей замены ростовой среды ВВ-МСК или ВВ-МСК без РНК (после обработки РНКазой). Масштабный отрезок 200 мкм.

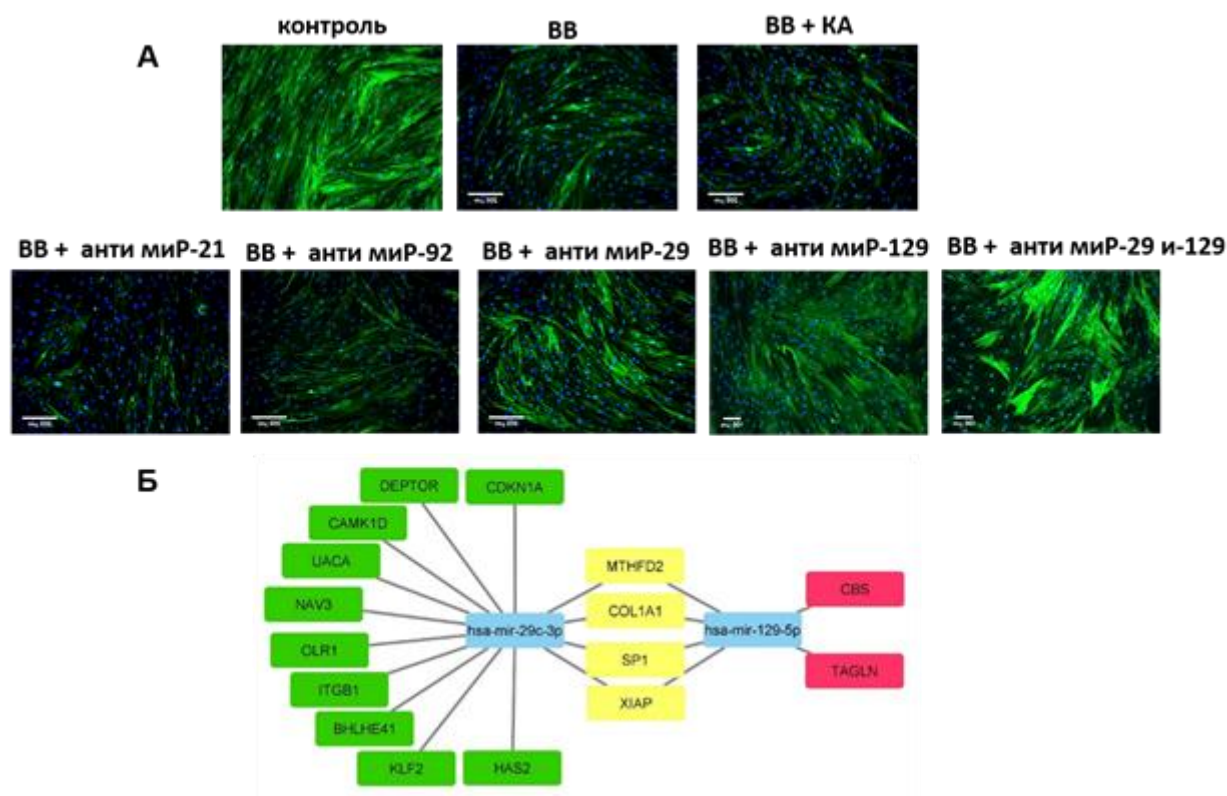


Рис. 19. Оценка вклада отдельных микроРНК (микроРНК-29с и микроРНК-129) в способность МСК стимулировать дедифференцировку миофибробластов за счет секреции микроРНК в составе ВВ методом ингибиторного анализа с помощью трансфекции ВВ-МСК специфическими олигонуклеотидными ингибиторами к выбранным микроРНК. А. Иммунофлуоресцентный анализ aSMA (зеленый) в миофибробластах, DAPI (синий). Контроль – ДМЕМ, ВВ: контрольные нетрансфицированные ВВ-МСК, КА: ВВ-МСК, трансфицированные контрольными для ингибиторов микроРНК олигонуклеотидами, ВВ + анти-миР-21: ВВ-МСК, трансфицированные ингибитором к микроРНК-21, ВВ + анти-миР-92: ВВ-МСК, трансфицированные ингибитором к микроРНК-92а, ВВ + анти-миР-29: ВВ-МСК, трансфицированные ингибитором к микроРНК-29с, ВВ + анти-миР-129: ВВ-МСК, трансфицированные ингибитором к микроРНК-129, ВВ + анти-миР-29 и -129: ВВ-МСК, трансфицированные одновременно ингибиторами к микроРНК-29с и 129. Б. Общие мРНК-мишени микроРНК-29с и микроРНК-129 по данным сервиса miRNet.

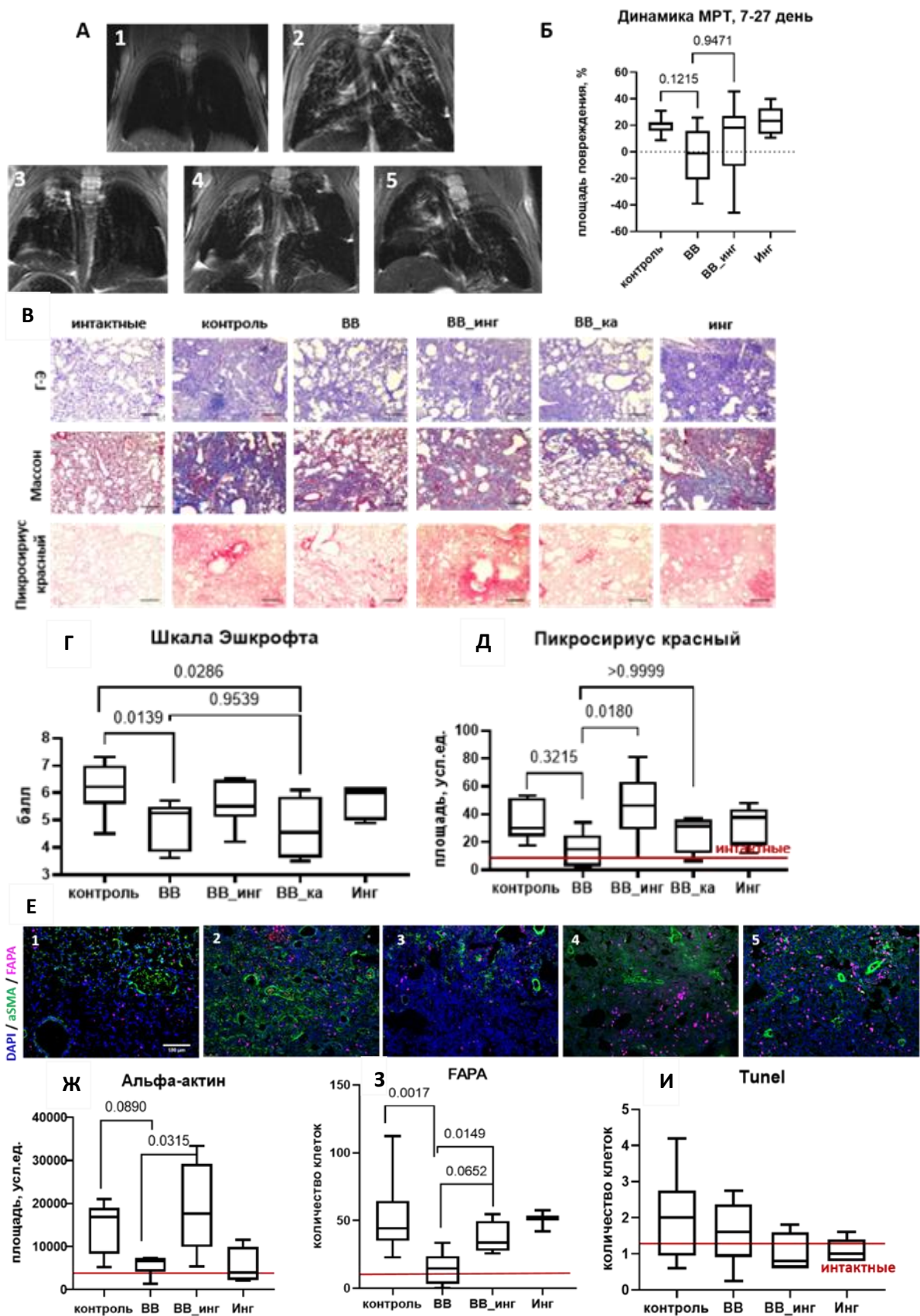


Рис. 20. МикроРНК-29с и -129 в составе ВВ-МСК вносят существенный вклад в антифибротические свойства МСК. А. Репрезентативные томограммы (МРТ) лёгких мышей через 27 дней после введения блеомицина. Группы: интактные животные (1), ДМЕМ (2 - контроль); ВВ-МСК (3 - ВВ); ВВ-МСК, трансфицированные ингибиторами

микроРНК-29с и -129 (4 – ВВ_инг), ингибиторы микроРНК-29с и -129 (5 – Инг). Б. Динамика площади поражения лёгочной ткани по данным МРТ, 7-27 день. В. Гистологическая оценка изменений в легких мышей через 28 дней после введения блеомицина. Репрезентативные фотографии (Г-Э – гематоксилин–эозин, трихром по Массону, пикросирус красный). Группы: интактные животные, ДМЕМ (контроль); ВВ-МСК (3 - ВВ); ВВ-МСК, трансфицированные контролем ингибиторов (4-ВВ_ка) или ингибиторами микроРНК-29с и -129 (5 – ВВ_инг), ингибиторы микроРНК-29с и -129 (6 – Инг). Масштабный отрезок 200 мкм. Г. Количественная оценка выраженности фиброза в баллах по развернутой шкале Эшкрофта. Д. Количество коллагена в ткани лёгких, оцененное по окраске пикросирусом красным. Е. Иммуногистохимический анализ экспрессии аSMA и FAPa в легких мышей через 28 дней после введения блеомицина. Репрезентативные фотографии, отражающие площадь аSMA-положительных участков в ткани. Группы: интактные животные (1), ДМЕМ (2-контроль); ВВ-МСК (3 - ВВ); ВВ-МСК, трансфицированные ингибиторами микроРНК-29с и -129 (4 – ВВ_инг), ингибиторы микроРНК-29с и -129 (5 – Инг). Ж. Изменение площади аSMA-положительных участков в легочной ткани во времени. З. Количество FAPa+ клеток в ткани лёгких. И. Площадь аSMA+ клеток в ткани лёгких. К. Оценка апоптоза клеток в легких методом TUNEL.

Одним из наиболее изученных свойств МСК, реализуемых через паракринную активность этих клеток, долгое время была способность участвовать в стимуляции ангиогенеза и стабилизации новообразованных сосудов. Считалось, что в значительной степени это зависит от продукции клетками проангиогенных факторов роста, таких как VEGF, HGF и другие. В рамках данной работы был изучен вклад различных фракций секретомы МСК в регуляцию этого процесса. На модели образования капилляроподобных структур эндотелиальными клетками на матрикеле *in vitro* (tube assay) было установлено, что удаление ВВ из секретомы МСК практически полностью блокирует его способность стимулировать ангиогенез, хотя содержание проангиогенных факторов роста во вневезикулярной фракции значимо не меняется (Рис. 21) [28]. Схожие эффекты наблюдаются для ВВ, секретруемых опухолевыми клетками, проангиогенная активность которых в значительной степени опосредована действием компонентов в составе ВВ [21].

Было также установлено, что важным регулятором способности секретомы МСК стимулировать ангиогенез является микроРНК-92а, поскольку добавление к клеткам синтетических олигонуклеотидов, имитирующих сверхэкспрессию этой микроРНК (pre-miR-92a), приводило к значимому подавлению проангиогенного действия секретомы, в том числе за счет снижения продукции HGF (Рис. 22), однако его можно было восстановить с помощью добавления рекомбинантного HGF к секретому [28, 29].

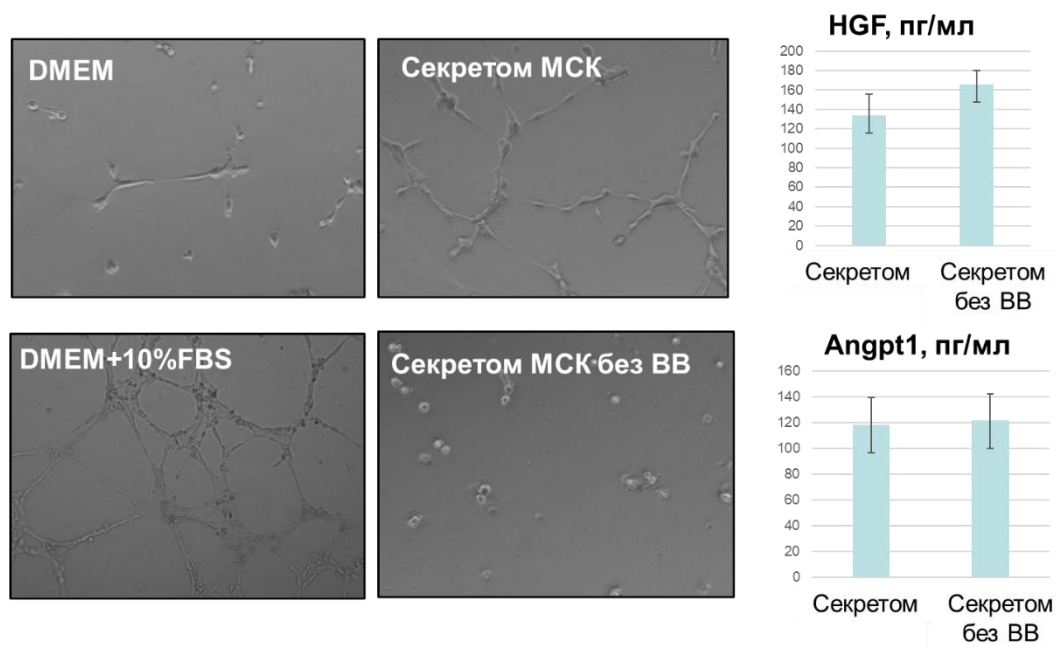


Рис. 21. Продукция внеклеточных везикул (ВВ) критична для реализации проангиогенных свойств МСК через действие их секретома. Левая панель. Удаление ВВ с помощью ультрацентрифугирования приводит к значимому снижению способности секретома МСК стимулировать образование капилляроподобных структур эндотелиальными клетками на Матригеле. Правая панель. Содержание проангиогенных факторов роста HGF и Angpt1, оцененное с помощью иммуноферментного анализа, во вневезикулярной фракции секретома МСК значимо не меняется после удаления ВВ.

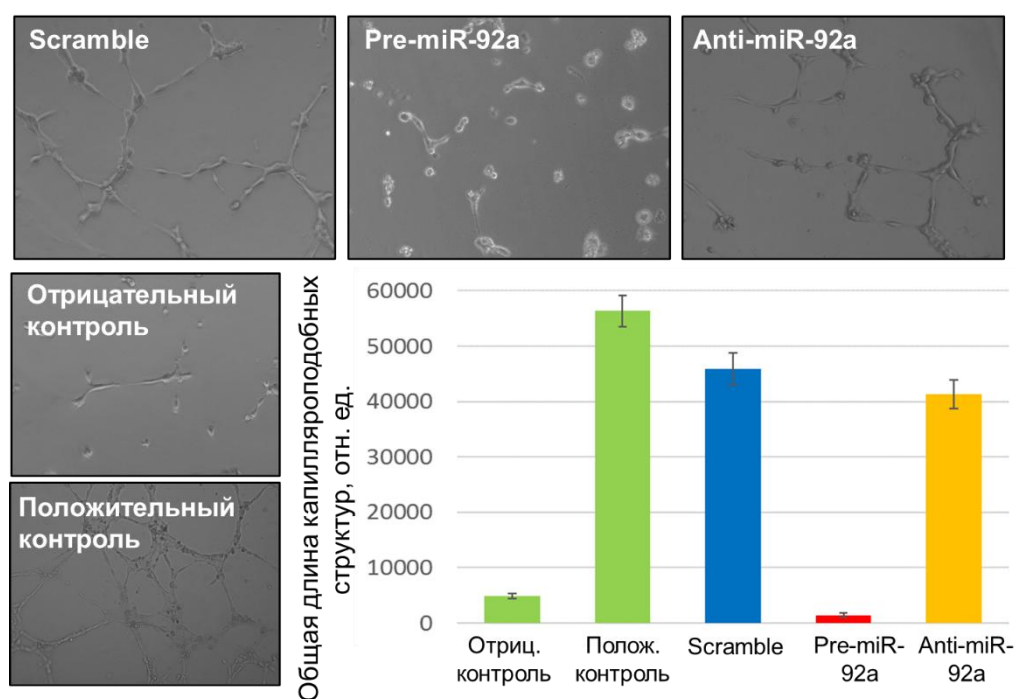


Рис. 22. МикроРНК-92а регулирует ангиогенные свойства МСК, реализуемые через действие их секретома. Сверхэкспрессия микроРНК-92а приводит к значимому снижению способности секретома МСК стимулировать образование капилляроподобных структур эндотелиальными клетками на Матригеле. Отрицательный контроль – ДМЕМ,

положительный контроль – ДМЕМ+10%FBS. $p < 0.05$ при сравнении группы с добавлением мимиков для микроРНК-92a (pre-miR-92a) с контрольной группой (scramble).

Важнейшим компонентом всех ниш тканеспецифичных стволовых клеток является ВКМ. В формировании ниш участвуют многие структурные белки ВКМ, включая коллагены, фибронектин, ламинины, протеогликаны, ферменты и их ингибиторы, вовлеченные в ремоделирование ВКМ, а также паракринные факторы, оказывающие влияние на взаимодействие стволовых клеток с матриксом. Было показано, что ВКМ может обладать тканеспецифичностью в поддержании ниши для стволовых клеток, поскольку в некоторых работах при культивировании стволовых клеток на ВКМ наблюдали усиление их дифференцировки именно в тот тип ткани, из которого был выделен ВКМ. ВКМ является необходимым компонентом для правильной организации и функционирования поддерживающих клеток ниши, что также опосредованно влияет на судьбу стволовых клеток. Взаимодействие ВКМ со стволовыми клетками может быть опосредовано как за счет связывания с рецепторами на их поверхности, так и через депонирование и замедленное высвобождение факторов роста и других биологических активных молекул, в том числе в составе ВВ, что подробно обсуждено в наших обзорах [2, 25].

Поскольку компоненты ВКМ являются наиболее представленными в секрете МСК, была поставлена задача изучить их роль как компонента ниш тканеспецифичных стволовых клеток. Для этого мы использовали отработанную нами *in vitro* модель клеточных пластов, в которой стромальные клетки культивируют в высокой плотности с целью накопления ВКМ и дальнейшим удалением клеточного компонента методом децеллюляризации. Было показано, что культивирование МСК в составе клеточных пластов улучшает их регенераторный потенциал [41], а также способствует самоорганизации и конденсации клеток и отложению ими ВКМ, что активирует в них внутриклеточные сигнальные пути, способствующие дифференцировке в остеогенном и хондрогенном направлении [17]. Однако для установления вклада именно матриксного компонента необходимо было отделить его от клеток в составе пласта. Были подобраны оптимальные условия культивирования МСК жировой ткани человека в виде клеточных пластов и отработан подход к получению децеллюляризованного ВКМ (дВКМ) с помощью обработки пластов детергентами и ферментами [20, 48]. Полученные образцы дВКМ были визуализированы и охарактеризованы по составу методами электронной микроскопии, иммуноцитохимического анализа и дот-блоттинга (Рис. 23) [20].

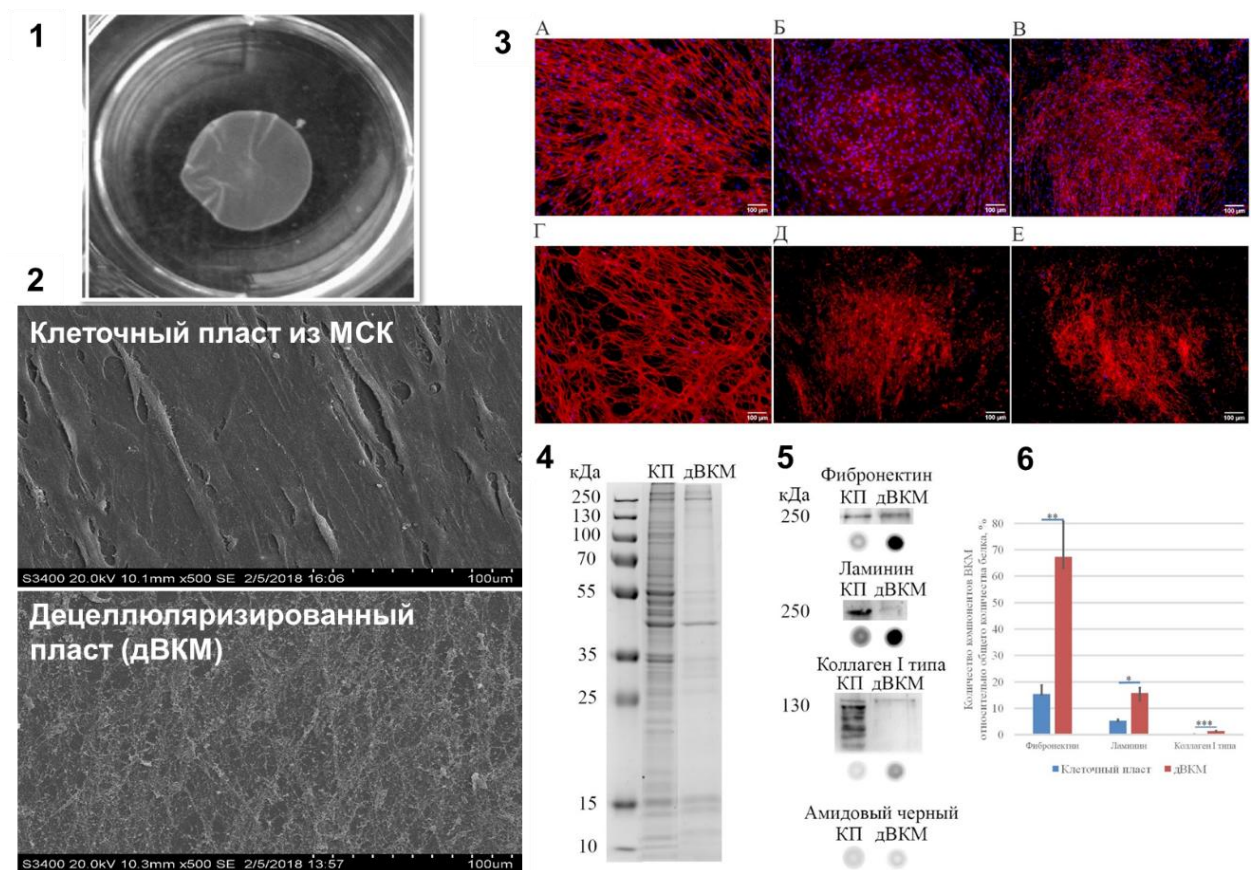


Рис. 23. Получение и характеристика дВКМ, наработанного МСК человека. 1. Культивирование МСК человека в виде клеточного пласта (КС). 2. Визуализация пласта и дВКМ методом сканирующей электронной микроскопии. 3. Содержание белков ВКМ (фибронектина (А, Г), ламинина (Б, Д) и коллагена I типа (В, Е) – красный) в составе КС и дВКМ, полученных из МСК, проанализированное с помощью иммуноцитохимического анализа без пермеабиллизации. Увеличение объектива 10х. Ядра окрашены DAPI (синий). 4. Электрофорез КС и дВКМ с последующей детекцией белков. 5. Результаты вестерн-блота и дот-блота на фибронектин, ламинин и коллаген I типа. 6. Диаграмма представляет собой результаты обсчета дот-блота относительно тотального количества белка с нормировкой на эталонные образцы вышеперечисленных белков. Статистическая значимость указана между группами: * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$.

МСК, выделенные из жировой ткани, представляют собой гетерогенную популяцию клеток, которая включает в том числе мультипотентные стволовые клетки, способные дифференцироваться в адипоциты, остеоциты и хондроциты и некоторые другие типы клеток соединительной ткани. С помощью полученной модели удалось установить, что ВКМ, секретируемый МСК, способен значительно стимулировать индуцированную дифференцировку мультипотентных стволовых клеток во всех трех канонических направлениях, причем эффект стимуляции наблюдается на ранних сроках индукции (уже на 4 день после добавления дифференцировочных сред к клеткам). Важно отметить, что способность дВКМ стимулировать дифференцировку стволовых клеток в

индукционных условиях была выражена как при сравнении с пластиком, так и превышала действие отдельных белков ВКМ или дВКМ, наработанным фибробластами дермы человека, что говорит о тканеспецифичном взаимодействии матрикса с клетками (Рис. 24).

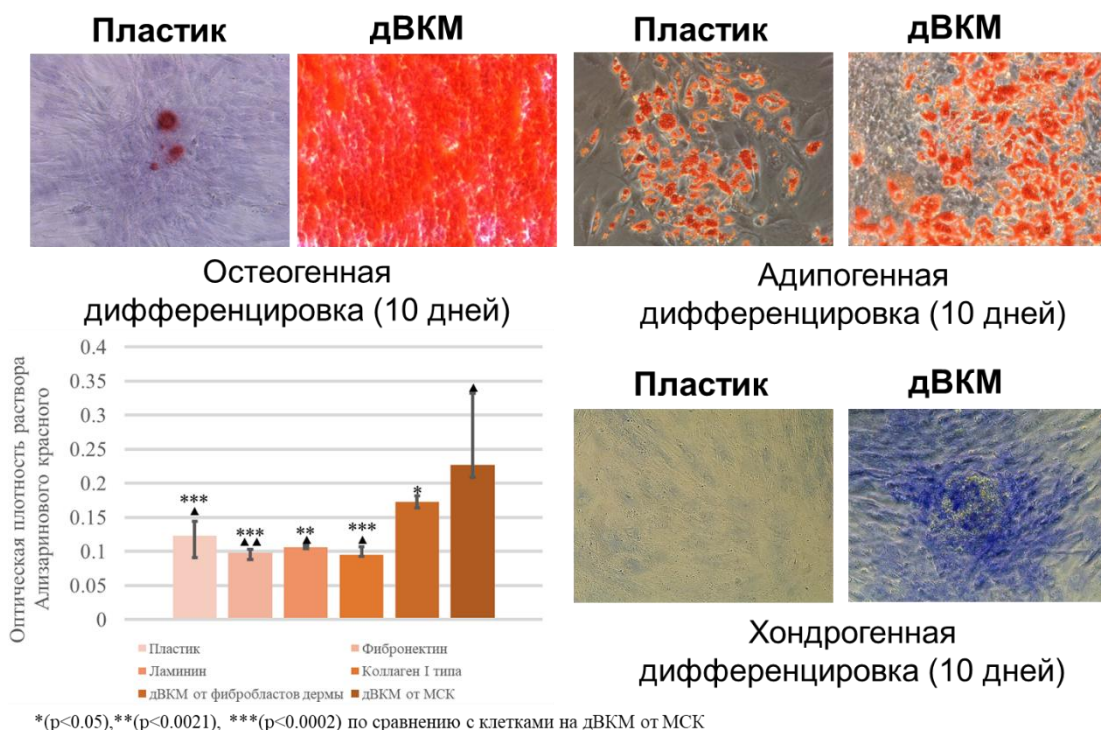


Рис. 24. дВКМ от МСК потенцирует ответ мультипотентных стволовых клеток на дифференцировочные стимулы и ускоряет дифференцировку в остеогенном, адипогенном и хондрогенном направлениях. Эффекты дВКМ значительно превышают влияние отдельных компонентов ВКМ или дВКМ от дермальных фибробластов человека. На рисунке представлены результаты цитохимической окраски клеток при дифференцировке в разных направлениях. Увеличение объектива 20х. Красители были экстрагированы с помощью ДМСО с дальнейшим измерением оптической плотности при длине волны 560 нм (нижняя левая панель). Данные представлены как медиана с интерквартильным разбросом (25%, 75%). * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$ сравнение относительно клеток на дВКМ от МСК, а также ▲ $p < 0,05$ сравнение с клетками на дВКМ, полученного из фибробластов дермы человека. На левой панели представлены данные для остеогенной дифференцировки, аналогичные результаты были получены для адипогенной и хондрогенной дифференцировки [20].

Для раскрытия возможных механизмов воздействия дВКМ на дифференцировку клеток был проведен анализ значимых изменений активности ключевых внутриклеточных сигнальных путей, опосредующих взаимодействие мультипотентных стволовых клеток с дВКМ. Была обнаружена активация FAK- и ERK-сигнальных путей в клетках, а также перераспределение активного бета-катенина из ядра в цитоплазму, что указывает на

повышение готовности сигнальных путей стволовых клеток при связывании с дВКМ к ответу на индуцирующие дифференцировочные стимулы (компетентность) (Рис. 25).

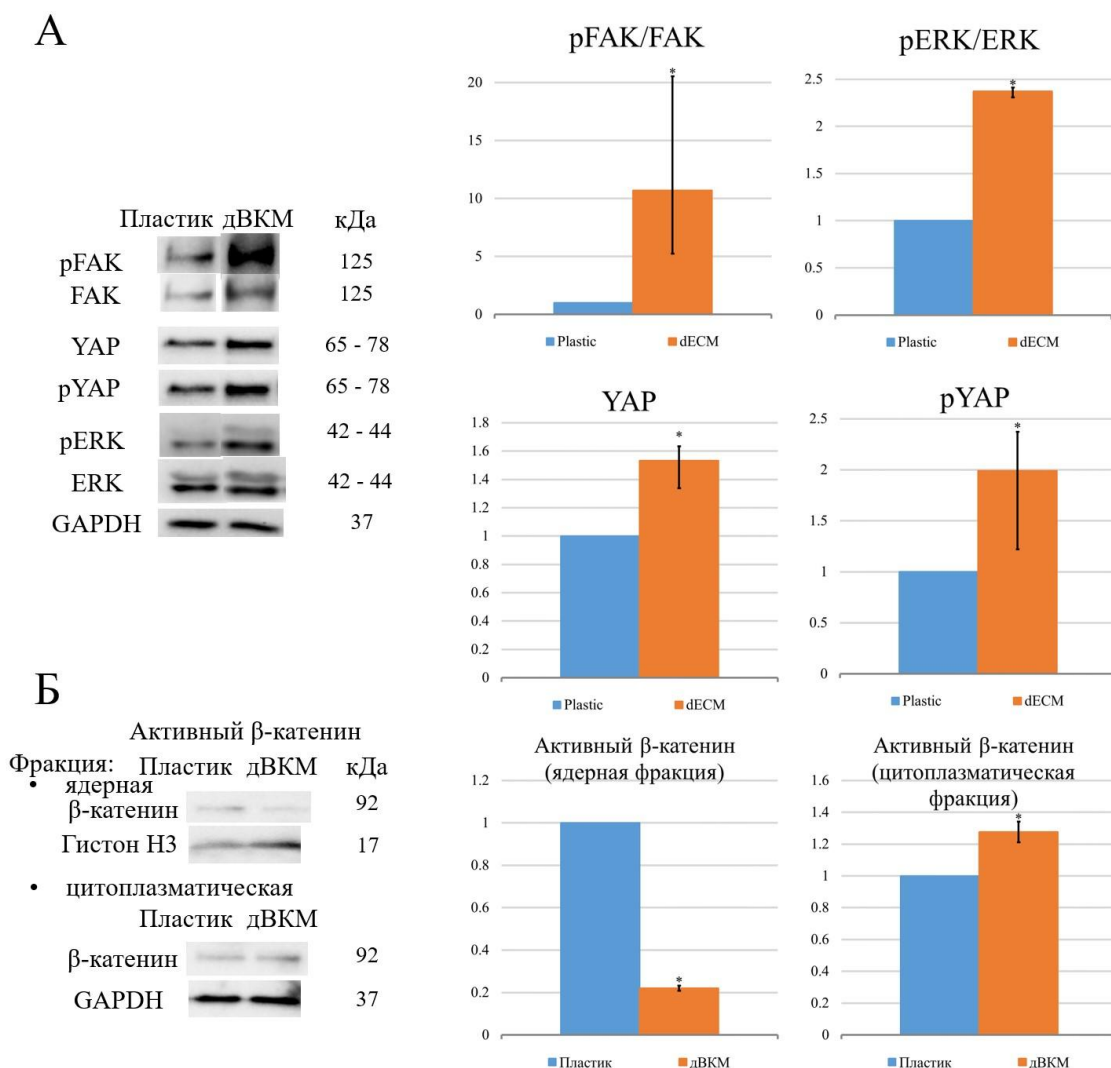


Рис. 25. Анализ активности ключевых внутриклеточных сигнальных путей, опосредующих взаимодействие мультипотентных стволовых клеток с дВКМ. А. Активация FAK-, ERK-, YAP-сигнальных путей в стволовых клетках, культивированных на дВКМ от МСК, по сравнению с контролем (пластик). Б. Распределение активного бета-катенина между ядром и цитоплазмой в стволовых клетках, культивированных на дВКМ от МСК, по сравнению с контролем (пластик). Данные представлены в виде уровня экспрессии белков относительно белка GAPDH (А, Б) или гистона H3 (Б) как медиана с интерквартильным разбросом (25%, 75%). * $p < 0,05$.

С помощью ингибиторного анализа было установлено, что Src-PI3K-AKT сигнальный путь играет важную роль в дВКМ-опосредованной стимуляции дифференцировки клеток. Также было показано, что значимый вклад в наблюдаемые эффекты дВКМ вносит взаимодействие клеток со структурными белками ВКМ через RGD-связывающие интегрины, в частности, содержащие $\alpha 5$ субъединицу [20].

Следует отметить, что согласно полученным данным, стимуляция дифференцировки, по-видимому, зависит от поддержания и пролиферации пула прогениторных клеток при взаимодействии с дВКМ (Рис. 26).

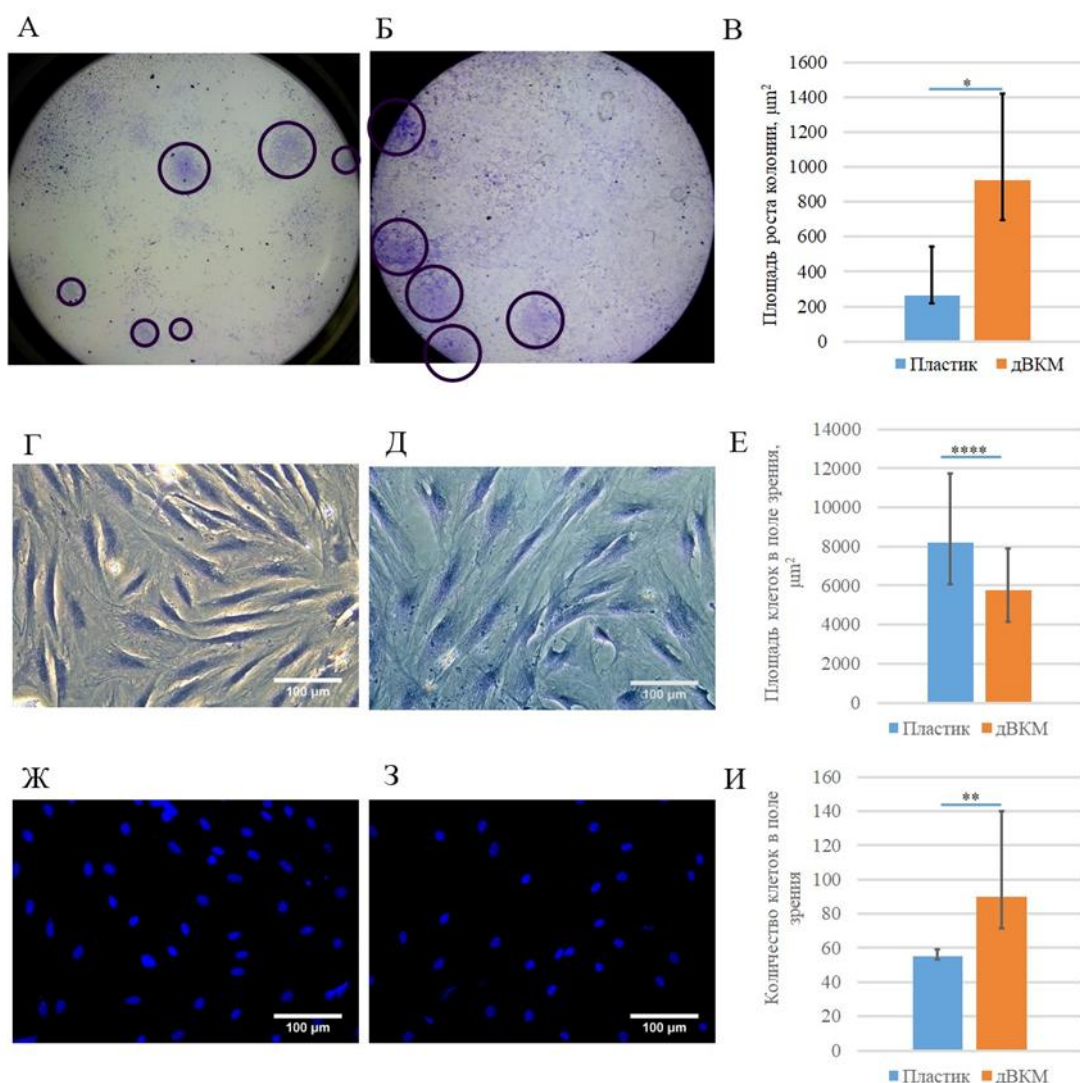


Рис. 26. Оценка клоногенности (CFU-тест) мультипотентных стволовых клеток, культивируемых на пластике (А, Г, Ж) и на дВКМ (Б, Д, З). Представлен количественный обсчет площади роста колонии (В), площади клеток в поле зрения (Е), количества клеток в поле зрения (И). Данные представлено в виде медианы медиана с интерквартильным разбросом (25%,75%). * $p<0,05$, ** $p<0,005$, **** $p<0,0001$.

Полученные результаты позволили предложить способ функционализации остеопластического материала на основе трикальций фосфатной керамики с помощью дВКМ, продуцированного МСК человека, с целью стимуляции остеогенной дифференцировки клеток, заселяющих тканеинженерную конструкцию из такого материала. Была показана биосовместимость фосфатной керамики с МСК [36], а пилотное исследование на модели монокортикального диафизарного дефекта бедренной кости

крысы *in vivo* продемонстрировало перспективность такого использования дВКМ для стимуляции ремоделирования новообразованной костной ткани.

Интересно подчеркнуть, что установленные нами регуляторные эффекты дВКМ проявляет не только в отношении мультипотентных стволовых клеток соединительной ткани, но других типов тканеспецифичных стволовых клеток. Так, например, было показано, что дВКМ от МСК поддерживает пролиферацию и жизнеспособность ССК (Рис. 27). Это подтверждает возможность рассматривать компоненты ВКМ в секрете МСК как часть формируемой ими ниши.

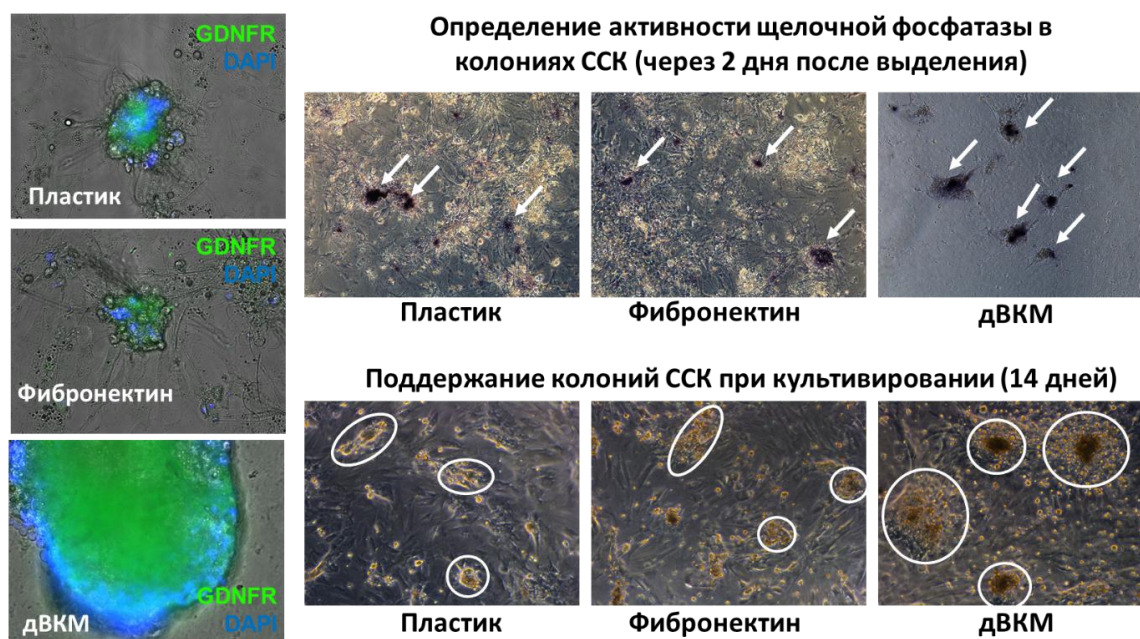


Рис. 27. дВКМ от МСК поддерживает пролиферацию и жизнеспособность ССК, выделенных из семенников крыс, в культуре. Левая панель. Иммуноцитохимическое окрашивание колоний ССК, маркируемых антителами против рецептора GDNF (зеленый), ядра помечены DAPI (синий). Объектив 40х. Правая панель. Микрофотографии колоний ССК, культивируемых на пластике, пластике, покрытом фибронектином, или на дВКМ от МСК, отражающие способность дВКМ поддерживать стволовые клетки. Объектив 10х.

Разработка прототипа биологического лекарственного препарата на основе секрета МСК человека для восстановления поврежденных ниш стволовых клеток

Полученные нами данные, доказывающие важнейшую роль секретируемых МСК компонентов в поддержании ниши, сравнимую по степени выраженности регенераторного эффекта с действием самих клеток, позволяют обосновать возможность восстановления поврежденной ниши ССК с помощью локального введения секрета МСК [9, 19, 24, 49]. Опираясь на полученные результаты, мы начали разработку нового лекарственного средства, относящегося к классу биологических лекарственных препаратов, на основе секрета МСК жировой ткани человека («МедиРегTM») для лечения тяжелых нарушений

сперматогенеза необструктивного генеза, сопровождающихся развитием мужского бесплодия. Важно отметить, что выбранная нами клиническая проблема относится к так называемым неудовлетворенным медицинским потребностям (unmet medical need). По степени тяжести неблагоприятных социальных последствий ВОЗ поставила проблему мужского бесплодия сразу вслед за проблемами онкологических и сердечно-сосудистых заболеваний. В Российской Федерации около 17,5% пар имеют проблемы с фертильностью. По официальной статистике ВОЗ вклад мужского бесплодия в нарушение фертильности пар растет в течение последних десятилетий и уже достиг 50%. В настоящее время в клинической практике отсутствуют лекарственные средства, способные эффективно восстанавливать мужскую фертильность в значительном проценте случаев мужского бесплодия. Показано, что на нарушения, связанные с гонадотропным гипогонадизмом, и обструктивные нарушения сперматогенеза, для которых терапевтические и/или хирургические подходы описаны в международных рекомендациях, приходится в сумме около 3% случаев. Среди оставшихся этиологических причин мужского бесплодия существуют такие (например, варикоцеле), для лечения которых предпринимают малоэффективные или недоказательные подходы, а также около 40% случаев являются идиопатическими, то есть возникают по неустановленным причинам. Таким образом, в подавляющем большинстве случаев нарушенного сперматогенеза, проявляющегося в виде азооспермии/олигоспермии, а также астенозооспермии (отсутствие подвижности сперматозоидов) и/или тератозооспермии (изменение формы сперматозоидов), способы восстановления фертильности подбираются эмпирически, являются малоэффективными и часто связаны с рядом тяжелых побочных эффектов, что определяет актуальность поиска новых подходов к лечению таких патологий.

В рамках создания препарата «МедиРег» была разработана технология получения секрета МСК с помощью кондиционирования в бессывороточной среде роста известного состава, не содержащей ксеногенных компонентов. Анализ жизнеспособности клеток и динамики накопления в кондиционированной факторов роста, ассоциированных с регенеративными процессами, позволил установить оптимальный срок кондиционирования. В сравнительных экспериментальных исследованиях была также подобрана определенная базовая среда для кондиционирования МСК. На основании проведенных экспериментов предложен протокол получения кондиционированной среды, содержащей компоненты секрета МСК, а также определены диапазоны концентраций факторов роста, в которых секретом МСК проявляет специфическую активность на хорошо известных *in vitro* моделях миграции фибробластов кожи человека и

эндотелиальных клеток человека [24], а также разработанной нами модели стимуляции секреции тестостерона клетками Лейдига, отражающей один из доказанных механизмов действия секрета МСК на нишу ССК [11].

Статистический анализ значений концентраций ключевых факторов роста для образцов секрета МСК жировой ткани, полученных от разных доноров, позволил установить минимальные пороговые значения для каждого фактора, рассчитанные как 5% процентиля по общей выборке (n доноров = 30), и использовать их для стандартизации состава [24, 49]. Учитывая комплексный состав предлагаемого биологического лекарственного средства на основе секрета МСК и плеiotропность его эффектов, важным результатом работы является разработка подходов к стандартизации состава препарата путем установления ключевых компонентов секрета, содержание которых, по данным литературы или нашим собственным результатам, коррелирует со специфической активностью препарата в моделях нарушения функционирования сперматогенной ниши *in vitro* и *in vivo*. Был предложен ряд решений в области стандартизации подобных препаратов [11, 24, 49] и выбора релевантных моделей для оценки биологической активности с целью контроля качества (*potency assay*) [3, 11]. Так, было теоретически и экспериментально обосновано использование VEGF как ключевого фармакодинамического маркера препарата «МедиРег» для восстановления сперматогенеза при тяжелых повреждениях ниши ССК [11].

Важно отметить, что разработанный в рамках диссертации подход может быть использован в качестве основы для технологической платформы по созданию биологических лекарственных средств или функционализированных тканеинженерных конструкций с использованием секрета МСК человека для лечения и других тяжелых заболеваний, связанных с выраженным повреждением тканей [5, 15, 24, 47, 50]. Так, на основании полученных экспериментальных данных везикулярная фракция секрета МСК представляется перспективным кандидатом в качестве фармацевтической субстанции для разработки новых лекарственных препаратов для лечения фиброза легких или фибротических осложнений, вызванных, например, коронавирусной инфекцией [38].

Помимо описания механизма действия препарата, разработки технологии его получения и подходов к стандартизации, были также решены некоторые биоэтические вопросы, связанные с трансляцией разработки в медицину, в частности, сформулированы критерии для подготовки формы добровольного информированного согласия на получение и использование клеточного материала человека [45].

В настоящее время полученные нами результаты доклинического изучения эффективности [23, 26, 46] и безопасности [52] препарата «МедиРег» на основе секрета

МСК человека вошли в состав регистрационного досье с целью получения разрешения на проведение клинических исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения настоящего исследования было показано, что одним из физиологических механизмов действия МСК является регуляция поддержания ниш тканеспецифичных стволовых клеток за счет действия компонентов, входящих в состав их секретома (факторов роста, белков внеклеточного матрикса, микроРНК в составе внеклеточных везикул и др.), благодаря которым они способны управлять дифференцировкой стволовых и прогениторных клеток, восстанавливать структуру и функции поврежденной ниши, стимулировать рост кровеносных сосудов и подавлять развитие фиброза. При этом состав секретома МСК модулируется как под действием физиологических стимулов, так и может быть направленно изменен с помощью современных биомедицинских технологий. Полученные в ходе диссертационного исследования научные результаты позволили обосновать возможность использования секретома МСК в качестве субстанции для биологических лекарственных препаратов, направленных на стимуляцию восстановления поврежденных ниш стволовых клеток. Благодаря этому был разработан прототип препарата «МедиРег» для лечения тяжелых нарушений сперматогенеза необструктивного генеза, сопровождающихся развитием мужского бесплодия.

ВЫВОДЫ

1. Воздействие мезенхимных стромальных клеток (МСК) на ниши постнатальных стволовых клеток реализуется преимущественно за счет секреции биологически активных факторов. В составе секретома МСК человека методом протеомного анализа и РНК-секвенирования выделены и охарактеризованы основные фракции секретируемых белковых факторов, молекул, переносимых в составе внеклеточных везикул, включая некодирующие РНК, и компонентов внеклеточного матрикса. Состав секретома изменяется при старении МСК и под действием факторов, связанных с повреждением тканей, таких как выраженная гипоксия, воздействие фактора роста, полученного из тромбоцитов (PDGF), или трансформирующего фактора роста бета (TGFb), что существенно влияет на способность этих клеток участвовать в обновлении и регенерации тканей.

2. В нише сперматогониальных стволовых клеток (ССК) обнаружены МСК, локализующиеся в интерстиции, количество которых увеличивается при повреждении. Показано, что эффекты секретома МСК в отношении восстановления поврежденной ниши

сравнимы с действием самих клеток, что указывает на важнейшую роль паракринной активности МСК в нише.

3. Обнаружено, что регенераторные эффекты секретома МСК реализуются преимущественно на уровне поддерживающих клеток ниши ССК. Локальное введение секретома МСК в семенники вызывает восстановление нормальной структуры семенных канальцев, стимулирует миграцию клеток Сертоли в зону повреждения, приводит к восстановлению секреции тестостерона клетками Лейдига и нормализации уровня тестостерона в плазме крови, увеличивает количество клеток дифферона сперматогониальных стволовых клеток: сперматоцитов и сперматозоидов, что способствует повышению как общего количества, так и количества подвижных форм сперматозоидов и восстановлению фертильности самцов.

4. Секретируемые МСК факторы роста, в том числе такие как фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и фактор роста гепатоцитов (HGF), а также микроРНК, переносимые в составе внеклеточных везикул (микроРНК-21, -29с, -92а, -129), играют критически важную роль в способности МСК стимулировать ангиогенез и подавлять развитие фиброза путем ингибирования дифференцировки фибробластов в миофибробласты и стимуляции дедифференцировки миофибробластов, что было показано на моделях *in vitro* и *in vivo*.

5. Секретируемые МСК компоненты внеклеточного матрикса поддерживают жизнеспособность колоний тканеспецифичных стволовых клеток и потенцируют ответ мультипотентных стволовых клеток на сигналы, запускающие адипогенную, остеогенную и хондрогенную дифференцировку, при этом стимуляция дифференцировки опосредована поддержанием и пролиферацией прогениторных клеток. Установлен вклад Src- и Akt-зависимых сигнальных путей, а также RGD-связывающих интегринов, в частности, содержащих $\alpha 5$ субъединицу, в реализацию этих эффектов секретома МСК.

6. Впервые экспериментально обоснована возможность восстановления поврежденной ниши ССК с помощью экзогенного локального введения секретома МСК и доказаны преимущества этого подхода по сравнению с локальным введением самих клеток. На основании полученных результатов разработан прототип биологического лекарственного препарата «МедиРег» на основе секретома МСК человека для лечения мужского бесплодия необструктивного генеза. Предложен механизм действия препарата, разработаны технология получения и подходы к его стандартизации.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. (Q1) Basalova Nataliya, Arbatskiy Michail, Popov Vladimir, Grigorieva Olga, Vigovsky Maxim, Zaytsev Ivan, Novoseletskaia Ekaterina, Sagaradze Georgy, Danilova Natalia, Malkov Pavel, Cherniaev Andrey, Samsonova Maria, Karagyaur Maxim, Tolstoluzhinskaya Anastasiya, Dyachkova Uliana, Akopyan Zhanna, Tkachuk Vsevolod, Kalinina Natalia, **Efimenko Anastasiya**. Mesenchymal stromal cells facilitate resolution of pulmonary fibrosis by miR-29c and miR-129 intercellular transfer. *Experimental and Molecular Medicine*. 2023; 55: 1399–1412. <https://doi.org/10.1038/s12276-023-01017-w>. IF = 12.8.
2. (Q1) Novoseletskaia, E.S., Evdokimov, P.V. & **Efimenko, A.Y.** Extracellular matrix-induced signaling pathways in mesenchymal stem/stromal cells. *Cell Communication and Signaling*. 2023; 21: 244. <https://doi.org/10.1186/s12964-023-01252-8>. IF = 8.4.
3. (Q1) Sagaradze G, Monakova A, **Efimenko A.** Potency Assays for Mesenchymal Stromal Cell Secretome-Based Products for Tissue Regeneration. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24(11):9379. <https://doi.org/10.3390/ijms24119379>. IF = 5.5.
4. (Q1) Basalova N, Illarionova M, Skryabina M, Vigovskiy M, Tolstoluzhinskaya A, Primak A, Chechekhina E, Chechekhin V, Karagyaur M, **Efimenko A.** Advances and Obstacles in Using CRISPR/Cas9 Technology for Non-Coding RNA Gene Knockout in Human Mesenchymal Stromal Cells. *Non-Coding RNA*. 2023; 9(5):49. <https://doi.org/10.3390/ncrna9050049>. IF = 4.3.
5. (Q1) Dzhauari S, Basalova N, Primak A, Balabanyan V, **Efimenko A**, Skryabina M, Popov V, Velichko A, Bozov K, Akopyan Z, et al. The Secretome of Mesenchymal Stromal Cells in Treating Intracerebral Hemorrhage: The First Step to Bedside. *Pharmaceutics*. 2023; 15(6):1608. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15061608>. IF = 5.4.
6. (Q2) Sorokina Anna Grigorevna, Orlova Iana Arturovna, Grigorieva Olga Aleksandrovna, Novoseletskaia Ekaterina Sergeevna, Basalova Nataliya Andreevna, Alexandrushkina Natalya Andreevna, Vigovskiy Maksim Aleksandrovich, Kirillova Karina Igorevna, Balatsky Alexander Vladimirovich, Samokhodskaya Larisa Mihailovna, Danilova Natalya Vladimirovna, Dyachkova Uliana Denisovna, Kakotkin Victor Victorovich, Asratyan David Albertovich, Akopyan Zhanna Alekseevna, **Efimenko Anastasia Yurievna**. Correlations between biomarkers of senescent cell accumulation at the systemic, tissue and cellular levels in elderly patients. *Experimental Gerontology*. 2023; 177: 112176. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2023.112176>. IF = 4.253.
7. (Q1) Grigorieva Olga, Basalova Nataliya, Vigovskiy Maksim, Arbatskiy Mikhail, Dyachkova Uliana, Kulebyakina Maria, Kulebyakin Konstantin, Tyurin-Kuzmin Pyotr, Kalinina Natalia, **Efimenko Anastasia**. Novel Potential Markers of Myofibroblast Differentiation Revealed by Single-Cell RNA Sequencing Analysis of Mesenchymal Stromal Cells in Profibrotic and Adipogenic Conditions. *Biomedicines*. 2023; 11(3): 840. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11030840>. IF = 4.757.
8. (Q1) Chechekhin V, Ivanova A, Kulebyakin K, Sysoeva V, Naida D, Arbatskiy M, Basalova N, Karagyaur M, Skryabina M, **Efimenko A**, Grigorieva O, Kalinina N, Tkachuk V, Tyurin-Kuzmin P. Alpha1A- and Beta3-Adrenoceptors Interplay in Adipose Multipotent Mesenchymal Stromal Cells: A Novel Mechanism of Obesity-Driven Hypertension. *Cells*. 2023; 12(4):585. <https://doi.org/10.3390/cells12040585>. IF = 7.666.
9. (Q1) Sagaradze GD, Monakova AO, Basalova NA, Popov VS, Balabanyan VY, **Efimenko AY**. Regenerative medicine for male infertility: a focus on stem cell niche injury models. *Biomedical Journal*. 2022; 45(4): 607-614. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2022.01.015>. IF = 7.892.

10. (Q1) Voynova E, Kulebyakin K, Grigorieva O, Novoseletskaya E, Basalova N, Alexandrushkina N, Arbatskiy M, Vigovskiy M, Sorokina A, Zinoveva A, Bakhchinyan E, Kalinina N, Akopyan Z, Tkachuk V, Tyurin-Kuzmin P and **Efimenko A**. Declined adipogenic potential of senescent MSCs due to shift in insulin signaling and altered exosome cargo. *Front. Cell Dev. Biol.* 2022; 10:1050489. doi: 10.3389/fcell.2022.1050489. IF = 6.684.
11. (Q1) Monakova, A., Sagaradze, G., Basalova, N., Balabanyan, V., **Efimenko, A.** Novel Potency Assay for MSC Secretome-Based Treatment of Idiopathic Male Infertility Employed Leydig Cells and Revealed Vascular Endothelial Growth Factor as a Promising Potency Marker. *International Journal of Molecular Science.* 2022, 23(16), 9414. <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/16/9414>. IF = 6.208.
12. (Q1) Karagyaur M., Primak A., **Efimenko A.**, Skryabina M., Tkachuk V. The Power of Gene Technologies: 1001 Ways to Create a Cell Model. *Cells* 2022, 11, 3235. <https://doi.org/10.3390/cells11203235>. IF = 7.666.
13. (Q1) Lopatina Tatiana, Widera Darius, **Efimenko Anastasia**. Editorial: Extracellular RNAs as Outside Regulators of Gene Expression in Homeostasis and Pathology. *Frontiers in Cell and Developmental Biology.* 2022; 9. DOI:10.3389/fcell.2021.818430. IF = 6.684.
14. (Q1) Grigorieva O., M. Arbatskiy, E. Novoseletskaya, U. Dyachkova, A. Ishkin, N. Kalinina, and **A. Efimenko**. Platelet-derived growth factor induces SASP-associated gene expression in human multipotent mesenchymal stromal cells but does not promote cell senescence. *Biomedicines.* 2021; 9(10):1290–1290. DOI:10.3390/biomedicines9101290. IF = 6,081.
15. (Q1) Karagyaur M, Dzhauari S, Basalova N, Aleksandrushkina N, Sagaradze G, Danilova N, Malkov P, Popov V, Skryabina M, **Efimenko A**, Tkachuk V. MSC Secretome as a Promising Tool for Neuroprotection and Neuroregeneration in a Model of Intracerebral Hemorrhage. *Pharmaceutics.* 2021; 13(12): 2031. doi: 10.3390/pharmaceutics13122031. IF = 6.321.
16. (Q1) Kulebyakin K., P. Tyurin-Kuzmin, A. **Efimenko, A.** Voloshin, A. Kartoshkin, M. Karagyaur, O. Grigorieva, E. Novoseletskaya, V. Sysoeva, P. Makarevich, and V. Tkachuk. Decreased insulin sensitivity in telomerase-immortalized mesenchymal stem cells affects efficacy and outcome of adipogenic differentiation in vitro. *Frontiers in Cell and Developmental Biology.* 2021; 9:662078. DOI: 10.3389/fcell.2021.662078. IF = 6.684.
17. (Q1) Nimiritsky, P., Novoseletskaya, E., Eremichev, R., Alexandrushkina, N., Karagyaur, M., Vetrovoy, O., Basalova, N., **Efimenko, A.**, Tkachuk, V., Makarevich, P. Self-Organization Provides Cell Fate Commitment in MSC Sheet Condensed Areas via ROCK-Dependent Mechanism. *Biomedicines.* 2021; 9(9): 1192. doi: 10.3390/biomedicines9091192. IF = 6,081.
18. (Q1) Basalova Nataliya, Sagaradze Georgy, Arbatskiy Mikhail, Evtushenko Evgeniy, Kulebyakin Konstantin, Grigorieva Olga, Akopyan Zhanna, Kalinina Natalia, **Efimenko Anastasia**. Secretome of Mesenchymal Stromal Cells Prevents Myofibroblasts Differentiation by Transferring Fibrosis-Associated microRNAs within Extracellular Vesicles. *Cells* 2020; 9(5): 1272. doi: 10.3390/cells9051272. IF = 7.666.
19. (Q1) Sagaradze G., Basalova N., **Efimenko A.**, Tkachuk V. Mesenchymal stromal cells as critical contributors to tissue regeneration. *Frontiers in Cell and Developmental Biology.* 2020; 8: 1-13doi: 10.3389/fcell.2020.576176. . IF = 6.684.
20. (Q1) Novoseletskaya Ekaterina, Grigorieva Olga A., Nimiritsky Peter, Basalova Natalia, Eremichev Roman, Milovskaya Irina, Kulebyakin Konstantin, Kulebyakina Maria, Rodionov Sergei, Omelyanenko Nikolai, **Efimenko Anastasia**. Mesenchymal stromal cell-produced components of extracellular matrix potentiate multipotent stem cell response to differentiation

stimuli. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2020; 8: 555378. DOI: 10.3389/fcell.2020.555378. IF = 6.684.

21. (Q1) Konoshenko Maria, Sagaradze Georgy, Orlova Evgeniya, Shtam Tatiana, Proskura Ksenia, Kamyshinsky Roman, Yunusova Natalia, Alexandrova Antonina, **Efimenko Anastasia**, Tamkovich Svetlana. Total Blood Exosomes in Breast Cancer: Potential Role in Crucial Steps of Tumorigenesis. *International Journal of Molecular Science* 2020; 21(19): 7341-7341. doi: 10.3390/ijms21197341. IF = 6.208.

22. (Q2) Makarevich P.I., **Efimenko A.Yu**, Tkachuk V.A. Biochemical Regulation of Regenerative Processes by Growth Factors and Cytokines: Basic Mechanisms and Relevance for Regenerative Medicine. *Biochemistry (Moscow)* 2020; 85(11): 11-26. <https://doi.org/10.1134/S0006297920010022>. IF = 2.824.

23. (Q1) Sagaradze G., Basalova N., Kirpatovsky V., Ohobotov D., Nimiritsky P., Grigorieva O., **Efimenko A.** A magic kick for regeneration: role of mesenchymal stromal cell secretome in spermatogonial stem cell niche recovery. *Stem cell research & therapy*. 2019; 10(1): 1-10. doi: 10.1186/s13287-019-1479-3. IF = 8,088.

24. (Q1) Sagaradze G., Grigorieva O., Nimiritsky P., Basalova N., Kalinina N., Akopyan Z., **Efimenko A.** Conditioned medium from human mesenchymal stromal cells: towards the clinical translation. *International journal of molecular sciences*. 2019; 20(7): 1-16. doi: 10.3390/ijms20071656. IF = 6.208.

25. (Q2) Novoseletskaia E. S., O. A. Grigorieva, **A. Yu Efimenko**, and N. I. Kalinina. Extracellular matrix in the regulation of stem cell differentiation. *Biochemistry (Moscow)*, 84(3):232–240, 2019. DOI: 10.1134/S0006297919030052. IF = 2,824.

26. (Q1) Sagaradze G. D., N. A. Basalova, V. I. Kirpatovsky, D. A. Ohobotov, O. A. Grigorieva, V. Y. Balabanyan, A. A. Kamalov, and **A. Y. Efimenko**. Application of rat cryptorchidism model for the evaluation of mesenchymal stromal cell secretome regenerative potential. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 109:1428–1436, 2019. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.10.174. IF = 6,529.

27. (Q1) Nimiritsky P.P., Eremichev R.Y., Alexandrushkina N.A., **Efimenko A.Y.**, Tkachuk V.A, Makarevich P.I. Unveiling Mesenchymal Stromal Cells' Organizing Function in Regeneration. *Int J Mol Sci*. 2019;20(4):823. doi: 10.3390/ijms20040823. IF = 6.208.

28. (Q2) **Efimenko Anastassia**, Sagaradze Georgiy, Akopyan Zhanna, Lopatina Tatiana, and Kalinina Natalia. Data supporting that mir-92a suppresses angiogenic activity of adipose-derived mesenchymal stromal cells by down-regulating hepatocyte growth factor. *Data in Brief*. 2016; 6: 295-310. doi: 10.1016/j.dib.2015.12.021. IF = 0,131.

29. (Q2) Kalinina Natalia, Klink Galina, Glukhanyuk Eugeniy, Lopatina Tatiana, **Efimenko Anastassia**, Akopyan Zhanna, and Tkachuk Vsevolod. mir-92a regulates angiogenic activity of adipose-derived mesenchymal stromal cells. *Experimental Cell Research*, 2015; 339 (1): 61-66. doi: 10.1016/j.yexcr.2015.10.007. IF = 4,145.

30. (Q1) Kalinina Natalia, Kharlampieva Daria, Loguinova Marina, **Efimenko Anastasia**, Ischenko Dmitry, Alekseev Dmitry, Grigorieva Olga, Sysoeva Veronika, Rubina Ksenia, Lazarev Vassiliy, Govorun Vadim, Ageeva Liudmila, Sharonov George, Pobeguts Olga, and Butenko Ivan. Characterization of secretomes provides evidence for adipose-derived mesenchymal stromal cells subtypes. *Stem Cell Res Ther*. 2015; 6: 221. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0209-8>. IF = 8,088.

31. (Q1) Makarevich PI, Boldyreva MA, Gluhanyuk EV, **Efimenko AY**, Dergilev KV, Shevchenko EK, Sharonov GV, Gallinger JO, Rodina PA, Sarkisyan SS, Hu YC, Parfyonova YV. Enhanced angiogenesis in ischemic skeletal muscle after transplantation of cell sheets from baculovirus-transduced adipose-derived stromal cells expressing VEGF165. *Stem Cell Res Ther*. 2015; 6: 204. doi: 10.1186/s13287-015-0199-6. IF = 8,088.

32. (Q2) **Efimenko Anastasia Yu.**, Kochegura Tatiana N., Akopyan Zhanna A., and Parfyonova Yelena V. Autologous Stem Cell Therapy: How Aging and Chronic Diseases Affect Stem and Progenitor Cells. *BioResearch Open Access*. 2015; 4(1): 26-38. doi: 10.1089/biores.2014.0042. IF = 0,373.
33. (Q1) Dzhoyashvili N.A., **Efimenko A.Yu.**, Kochegura T.N., Kalinina N.I., Koptelova N.V., Sukhareva O.Yu., Shestakova M.V., Akchurin R.S., Tkachuk V.A., Parfyonova Ye.V. Disturbed angiogenic activity of adipose-derived stromal cells obtained from patients with coronary artery disease and diabetes mellitus type 2. *Journal of Translational Medicine*. 2014; 12: 337. <https://doi.org/10.1186/s12967-014-0337-4>. IF = 8,448.
34. (Q1) **Efimenko A.Yu.**, Dzhoyashvili N.A., Kalinina N.I., Kochegura T.N., Akchurin R.S., Tkachuk V.A., Parfyonova Ye.V. Adipose-derived stromal cells (ADSC) from aged patients with coronary artery disease keep MSC properties but exhibit age markers and have an impaired angiogenic potential. *Stem Cells Translational Medicine*. 2014; 3(1): 32-41. doi: 10.5966/sctm.2013-0014. IF = 7,655.
35. Sorokina, A. G., **Efimenko, A. Y.**, Grigorieva, O. A., Novoseletskaia, E. S., Basalova, N. A., Aleksandrushkina, N. A., Vigovskiy, M. A., Kirillova, K. I., Strazhesko, I. D., Orlov, A. V., Balatskiy, A. V., Samokhodskaya, L. M., Danilova, N. V., Dychkova, U. D., Akopyan, A. A., Kakotkin, V. V., Asratyan, D. A., Akopyan, Z. A., and Orlova, Y. A. Correlations between vessel stiffness and biomarkers of senescent cell in elderly patients. *Kardiologiya*. 2022; 62(6): 15–22. DOI: 10.18087/cardio.2022.6.n2033. IF (РИНЦ) = 0,777.
36. Евдокимов П. В., Киселева А. К., Ларионов Д. С., Новоселецкая Е. С., **Ефименко А. Ю.**, Щербаков И. М., Шипунов Г. А., Дубров В. Э., Путляев В. И. Влияние пористости материалов на основе трикальциевого фосфата на поведение мезенхимных стволовых клеток. *Перспективные материалы*. 2023; 6: 24–33. <https://doi.org/10.30791/1028-978X-2023-6-24-32>.
37. Grigorieva, O.A., Vigovskiy, M.A., Dyachkova, U.D., Basalova N. A., Aleksandrushkina N. A., Kulebyakina M. A., Zaitsev I. L., Popov V. S. & **Efimenko A. Yu.** Mechanisms of Endothelial-to-Mesenchymal Transition Induction by Extracellular Matrix Components in Pulmonary Fibrosis. *Bull Exp Biol Med*. 2021; 171: 523–531. <https://doi.org/10.1007/s10517-021-05264-7>. IF = 0,7.
38. **Ефименко А.Ю.**, Калинина Н.И., Рубина К.А., Сёмина Е.В., Сысоева В.Ю., Акоюян Ж.А., Ткачук В.А. Секретом мультипотентных мезенхимных стромальных клеток как перспективное средство лечения и реабилитации пациентов с новой коронавирусной инфекцией. *Вестник Российской академии наук*. 2021; 91(4): 343-349. <https://doi.org/10.1134/S101933162102012X>.
39. Сорокина А.Г., Орлова Я.А., Григорьева О.А., Новоселецкая Е.С., Басалова Н.А., Александрюшкина Н.А., Виговский М.А., Кириллова К.И., Балацкий А.В., Самоходская Л.М., Данилова Н.В., Дьячкова У.Д., Федотов Д.А., Акоюян А.А., Какоткин В.В., Асратян Д.А., Акоюян Ж.А., **Ефименко А.Ю.** Создание коллекции биологических образцов разного типа, полученных от пожилых пациентов, для изучения взаимосвязей клинических, системных, тканевых и клеточных биомаркеров накопления сенесцентных клеток при старении. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2021; 20(8): 3051. <https://doi.org/10.15829/1728-8800-2021-3051>.
40. Охоботов Д.А., Сагарадзе Г.Д., Монакова А.О., Басалова Н.А., Балабаньян В.Ю., Попов В.С., Кирпатовский В.И., Нестерова О.Ю., **Ефименко А.Ю.**, Камалов А.А. Моделирование нарушений сперматогенеза химиотерапевтическими средствами – цисплатином и доксорубицином. *Экспериментальная и клиническая урология*. 2021; 14(4): 95-101. <https://doi.org/10.29188/2222-8543-2021-14-4-95-101>.

41. Aleksandrushkina, N.A., Danilova, N.V., Grigorieva, O.A., Malkov P. G., Popov V. S., **Efimenko A. Yu.** & Makarevich P. I. Cell Sheets of Mesenchymal Stromal Cells Effectively Stimulate Healing of Deep Soft Tissue Defects. Bull Exp Biol Med. 2019; 167: 159–163. <https://doi.org/10.1007/s10517-019-04482-4>. IF = 0,7.

42. Karagyaur M.N., **Efimenko A.Yu.**, Makarevich P.I., Vasiluev P.A., Akopyan Zh.A., Bryzgalina E.V., Tkachuk V.A. Ethical and Legal Aspects of Using Genome Editing Technologies in Medicine (Review). Sovremennye tehnologii v medicine. 2019; 11(3): 117. <https://doi.org/10.17691/stm2019.11.3.16>. IF (РИНЦ) = 0,88.

43. Камалов А.А., Охоботов Д.А., **Ефименко А.Ю.**, Сагарадзе Г.Д., Чалый М.Е., Низов А.Н., Дзитиев В.К., Афанасьевская Е.В., Стригунов А.А., Нестерова О.Ю. Выбор химического соединения, обладающего комбинированным сперматотоксическим эффектом, для создания модели управляемого токсического повреждения сперматогенеза. Технологии живых систем. 2019; 16(3): 5-20. DOI: 10.18127/j20700997-201903-01.

44. Нибирицкий П.П., Сагарадзе Г.Д., **Ефименко А.Ю.**, Макаревич П.И., Ткачук В.А. Ниша стволовой клетки. Цитология. 2018; 60(8): 575-586. <http://dx.doi.org/10.31116/tsitol.2018.08.01>.

45. Стамбольский Д.В., Брызгалина Е.В., **Ефименко А.Ю.**, Аласания К.Ю., Шкомова Е.М., Гавриленко С.М., Вархотов Т.А., Мацкеплишвили С.Т. Информированное согласие на получение и использование клеточного материала человека: нормативно-правовое и этическое регулирование. Российский кардиологический журнал. 2018;(12):84-90. <https://doi.org/10.15829/1560-4071-2018-12-84-91>.

46. Камалов А.А., Кирпатовский В.И., Охоботов Д.А., **Ефименко А.Ю.**, Макаревич П.И., Сагарадзе Г.Д., Макаревич О.А., Нибирицкий П.П., Басалова Н.А., Камалов Д.М., Осидак Е.О., Домогатский С.П., Акоюн Ж.А., Ткачук В.А. Использование нового биоматериала на основе продуктов секреции мезенхимных стволовых клеток человека и коллагена для восстановления сперматогенеза на модели экспериментального крипторхизма. Технологии живых систем. 2017; 14(1): 4-17.

47. Кирпатовский В.И., Камалов Д.М., **Ефименко А.Ю.**, Макаревич П.И., Сагарадзе Г.Д., Макаревич О.А., Нибирицкий П.П., Осидак Е.О., Домогатский С.П., Карпов В.К., Акоюн Ж.А., Ткачук В.А., Камалов А.А. Заместительная пластика мочевого пузыря с использованием комбинированной мембраны на основе продуктов секреции мезенхимных стволовых клеток человека и коллагена I типа. Урология. 2016; 6: 34-42. <https://urologyjournal.ru/ru/archive/article/34103>.

48. Нибирицкий П.П., Дусь Т.А., Григорьева О.А., Сагарадзе Г.Д., **Ефименко А.Ю.**, Макаревич П.И. Клеточные пласты из мезенхимных стромальных клеток жировой ткани человека и получение препаратов внеклеточного матрикса методом децеллюляризации. Технологии живых систем. 2016; 13(6): 4-13.

49. Сагарадзе Г.Д., Григорьева О.А., **Ефименко А.Ю.**, Чапленко А.А., Суслина С.Н., Сысоева В.Ю., Калинина Н.И., Акоюн Ж.А., Ткачук В.А. Терапевтический потенциал секреторных компонентов мезенхимных стромальных клеток человека: проблема стандартизации. Биомедицинская химия. 2015; 61(6):750-759. DOI: 10.18097/PBMC20156106750.

50. Басалова Н. А., Джауари С. С., Юршев Ю. А., Примак А. Л., Ефименко А. Ю., Ткачук В. А., Карагяур М. Н. State-of-the-art: применение внеклеточных везикул и препаратов на их основе для нейропротекции и стимуляции регенерации ткани головного мозга. Нейрохимия. 2023; 40(4): 367–380. DOI: 10.31857/S1027813323040076.

51. (Q1) Basalova N., Alexandrushkina N., Grigorieva O., Kulebyakina M., **Efimenko A.**

Fibroblast Activation Protein Alpha (FAP α) in Fibrosis: Beyond a Perspective Marker for Activated Stromal Cells? *Biomolecules*. 2023; 13(12): 1718. <https://doi.org/10.3390/biom13121718>. IF = 6.064.

52. Монакова А.О., Сагарадзе Г.Д., Балабаньян В.Ю., Басалова Н.А., Матичина А.А., Матичин А.А., Крышень К.Л., Попов В.С., Акопян Ж.А., Ефименко А.Ю. Изучение безопасности оригинального препарата на основе секрета мезенхимных стромальных клеток при локальном введении в яички и при внутримышечном введении крысам. Безопасность и риск фармакотерапии. 2023. IF (РИНЦ) = 2,149. <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-364>.

СПИСОК ПАТЕНТОВ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Патент РФ #2766707, 15 марта 2022 г. Средство для лечения фиброза тканей на основе компонентов секрета мезенхимных стромальных клеток, способ получения и применения средства
2. Патент РФ #2718907, 15 апреля 2020 г. Биоматериал на основе бесклеточного матрикса, производимого мезенхимными стромальными клетками человека, способ его получения и способ применения для стимуляции регенеративных процессов
3. Патент РФ #2653779, 14 мая 2018 г. Способ стимуляции сперматогенеза
4. Патент РФ #2652902, 3 мая 2018 г. Способ стимуляции сперматогенеза
5. Патент РФ #2620167, 23 мая 2017 г. Способ получения средства для стимуляции регенерации на основе продуктов секреции мультипотентных мезенхимных стромальных клеток человека
6. Патент РФ #2574017, 30 сентября 2014 г. Средство для лечения ожогов и ран на основе цитокинов и факторов роста, секретируемых мезенхимными клетками человека, способ получения средства и способ лечения ожогов и ран
7. Патент РФ #2443778, 27 февраля 2012 г. Способ повышения ангиогенного потенциала мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани

БЛАГОДАРНОСТИ

Хочу выразить глубокую благодарность и искреннюю признательность всем сотрудникам Института регенеративной медицины МНОЦ и кафедры биохимии и регенеративной биомедицины ФФМ МГУ имени М.В. Ломоносова. Совместная работа с моими коллегами всегда была огромным удовольствием и вдохновляла меня.

Отдельная моя благодарность предназначается моему научному консультанту д.б.н., профессору, академику Всеволоду Арсеньевичу Ткачуку, благодаря которому я сформировалась как ученый и всегда ощущала неизменную поддержку и веру в меня.

За организацию работы в Медицинском научно-образовательном центре, совместные исследования и поддержку хочу поблагодарить директора МНОЦ МГУ, д.м.н., академика Камалова Армаиса Альбертовича. Большинство исследований, результаты которых представлены в работе, состоялись в значительной степени благодаря неустанным усилиям и постоянной помощи зам.директора МНОЦ и зам.декана ФФМ МГУ, к.м.н. Жанны Алексеевны Акопян, за что я ей очень признательна.

Выражаю искреннюю благодарность моим научным наставницам и руководительницам моей кандидатской диссертации к.б.н. Наталье Игоревне Калининой и д.м.н., профессору Елене Викторовне Парфеновой за совместную работу, возможность всегда обратиться за помощью и советом.

Отдельно хочу поблагодарить дорогого коллегу и напарника, без поддержки и искреннего соучастия которого трудно было бы достигнуть успехов в моей работе, зав.лабораторией Института регенеративной медицины МНОЦ МГУ, к.м.н. Павла Игоревича Макаревича.

Выражаю свою глубокую благодарность сотрудникам моей лаборатории, аспирантам и студентам, которые всегда вдохновляли и радовали меня своими талантами, трудолюбием, пылкостью и ответственностью. Отдельная признательность за годы плодотворной совместной работы к.б.н. Ольге Александровне Григорьевой, к.б.н. Наталие Андреевне Басаловой, к.б.н. Екатерине Сергеевне Новоселецкой, к.б.н. Георгию Дмитриевичу Сагарадзе, Анне Олеговне Монаковой, Максиму Александровичу Виговскому, Анастасии Евгеньевне Толстолужинской, Ульяне Денисовне Дьячковой.

Хочу поблагодарить многих моих замечательных коллег из Института регенеративной медицины МНОЦ и кафедры биохимии и регенеративной медицины ФФМ за совместную плодотворную работу: Попова Владимира Сергеевича, Кулебякину Марию Александровну, Александрюшк

ину Наталью Андреевну, Еремичева Романа Юрьевича, Нимирицкого Петра Петровича, Балабаньяна Вадима Юрьевича, Карягура Максима Николаевича, Тюрина-Кузьмина Петра Алексеевича, Кулебякина Константина Юрьевича, Арбатского Михаила Спартаковича, Сысоеву Веронику Юрьевну, Семину Екатерину Владимировну, Рубину Ксению Андреевну, Климович Полину Сергеевну, Чехехина Вадима Игоревича, Чехехину Елизавету Сергеевну, а также Лопатину Татьяну Владимировну. Отдельное спасибо моей коллеге и подруге к.э.н. Елене Владимировне Тарасовой.

Выражаю благодарность коллегам из Медицинского научно-образовательного центра МГУ за совместную работу и интересные и полезные обсуждения, особенно д.м.н., профессору Яне Артуровне Орловой, д.м.н. Дмитрию Александровичу Охоботову, Анне Григорьевне Клементьевой, д.м.н. Наталье Владимировне Даниловой, д.м.н. Павлу Георгиевичу Малькову, к.м.н. Ларисе Михайловне Самоходской, д.м.н. Владимиру Игоревичу Кирпатовскому, к.б.н. Стамбольскому Дмитрию Викторовичу, д.м.н., профессору Вадиму Эриковичу Дуброву, д.м.н. Владиславу Владимировичу Филиппову.

Выражаю свою огромную благодарность за совместные исследования, ценные советы и всестороннюю помощь сотрудникам Факультета фундаментальной медицины, НИИ ФХБ им. Белозерского, биологического, химического и философского факультетов МГУ имени М.В. Ломоносова: Путляеву Валерию Ивановичу, Евдокимову Павлу Владимировичу, Клычникову Олегу Игоревичу, Животовскому Борису Давыдовичу, Копеиной Гелине Сергеевне, Попову Даниилу Викторовичу, Высоких Михаилу Юрьевичу, Брызгалиной Елене Владимировне.

Отдельную благодарность хочу выразить всем сотрудникам Медицинского научно-образовательного центра и Факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова за постоянную помощь и внимание, оказанные за годы моей работы в Московском университете.

Выражаю огромную благодарность всем моим школьным учителям и университетским преподавателям.

Моя отдельная особенная благодарность - моим родителям, семье и друзьям за неизменную поддержку, сопереживание и веру в меня, без которых мне было бы трудно справиться с этой работой.