

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи



Ключерев Тимофей Олегович

**Регуляция экспрессии белков и генов, связанных с провоспалительной
поляризацией макрофагов, под действием внеклеточных везикул
мезенхимных стромальных клеток**

1.5.3. Молекулярная биология

1.5.22. Клеточная биология

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор химических наук, профессор

Тимашев Петр Сергеевич

Научный руководитель:

кандидат физико-математических наук

Власова Ирина Ивановна

Москва – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	19
1.1. Макрофаги: биологическое разнообразие, роль в иммунной регуляции, патологии, регенеративной медицине.....	19
1.1.1. Макрофаги роль в иммунном ответе, происхождение.....	19
1.1.2. Фенотипическая пластичность макрофагов	21
1.1.3. Роль фагоцитов в управлении воспалением на модели повреждения тканей.....	25
1.1.4. Механизмы регуляции фенотипической пластичности макрофагов.....	28
1.1.5. Роль макрофагов в хронических заболеваниях, связанных с воспалением и старением	32
1.2. Внеклеточные везикулы	35
1.2.1. Внеклеточные везикулы: классификация, биогенез.....	35
1.2.2. Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки как источник внеклеточных везикул: безопасность и терапевтическая эффективность	37
1.2.3. Влияние внеклеточных везикул, полученных из мезенхимных стромальных клеток, на функциональную активность макрофагов.....	40
1.2.4. Терапевтические свойства внеклеточных везикул в модуляции воспаления и дегенеративных процессов на примере остеоартрита	43
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	46
2.1. Выделение мезенхимных стромальных клеток	46
2.2. Культивирование монослойных культур мультипотентных мезенхимных стромальных клеток	48
2.3. Культивирование мультипотентных мезенхимных стромальных клеток в виде сфероидов	48
2.4. Анализ экспрессии поверхностных маркеров мультипотентных мезенхимных стромальных клеток с помощью проточной цитометрии	49

2.5. Выделение матрикс связанных везикул и внеклеточных везикул из кондиционированной среды мультипотентных мезенхимных стромальных клеток	50
2.6. Оценка морфологии и размера матрикс связанных везикул и внеклеточных везикул из кондиционированной среды мезенхимных стромальных клеток пупочного канатика человека	51
2.7. Анализ маркеров матрикс связанных везикул и внеклеточных везикул из кондиционированной среды в мезенхимных стромальных клеток пупочного канатика человека методом вестерн-блоттинга	52
2.8. Протеомный анализ матрикс связанных везикул и внеклеточных везикул из кондиционированной среды, полученных из мезенхимных стромальных клеток пупочного канатика человека	53
2.9. Окрашивание внеклеточных везикул из мезенхимных стромальных клеток пупочного канатика человека с помощью флуоресцентного красителя РКН26	57
2.10. Культивирование макрофагов, полученных из ТНР-1	58
2.11. Культивирование макрофагов, дифференцированных из моноцитов периферической крови	59
2.12. Фагоцитоз макрофагами внеклеточных везикул мезенхимных стромальных клеток, меченных мембранным красителем РКН26	59
2.13. Количественная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией	60
2.14. Анализ экспрессии белков в макрофагах, внеклеточных везикулах методом вестерн-блоттинга	63
2.15. Иммуноферментный анализ	64
2.16. Измерение поверхностных маркеров поляризации макрофагов методом проточной цитометрии	64
2.17. Анализ фагоцитоза с помощью проточной цитометрии	65
2.18. Люминол-зависимая хемотроминесценция	66
2.19. Анализ цитотоксичности внеклеточных везикул с помощью измерения количества лактатдегидрогеназы	66

2.20. Иммуноцитохимия	67
2.21. Создание модели остеоартрита у животных посредством менискэктомии коленного сустава и терапия внеклеточными везикулами	68
2.22. Иммуногистохимический анализ	69
2.23. Полимеразная цепная реакция <i>in Situ</i>	70
2.24. Статистический анализ.....	71
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	73
3.1. Характеристика мультипотентных мезенхимных стромальных клеток из разных источников	73
3.1.1. Морфология мезенхимных стромальных клеток и анализ экспрессии поверхностных маркеров с помощью проточной цитометрии	73
3.1.2. Характеристика матрикс связанных везикул и внеклеточных везикул, полученных из кондиционированной среды мезенхимных стромальных клеток.....	75
3.1.3. Протеомный анализ матрикс связанных везикул и внеклеточных везикул из кондиционированной среды, полученной из мезенхимных стромальных клеток пупочного канатика человека	78
3.2. Характеристика клеточных культур макрофагов и анализ влияния матрикс связанных везикул и внеклеточных везикул из кондиционированной среды, полученной из мезенхимных стромальных клеток пупочного канатика человека, на функциональную активность фагоцитов.....	86
3.2.1. Характеристика ТНР-1 макрофагов и макрофагов, полученных из моноцитов периферической крови человека.....	86
3.2.2. Влияние внеклеточных везикул мезенхимных стромальных клеток пупочного канатика на экспрессию поверхностных рецепторов и секреторную активность макрофагов.....	90
3.2.3. Анализ влияния внеклеточных везикул мезенхимных стромальных клеток пупочного канатика человека на способность макрофагов к фагоцитозу и продукции активных форм кислорода.....	101

3.3. Анализ влияния внеклеточных везикул мезенхимных стромальных клеток пупочного канатика на модуляцию компонентов сигнального пути JAK/STAT1 у M1 макрофагов	106
3.4. Влияние внеклеточных везикул мезенхимных стромальных клеток пупочного канатика человека на воспалительный процесс в тканях суставов у крыс с индуцированным остеоартритом.....	109
3.4.1. Результаты иммуноцитохимического анализа.....	109
3.4.2. Результаты полимеразной цепной реакции in Situ	115
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ.....	117
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	131
ВЫВОДЫ	136
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	138
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	139
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	142

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Воспалительный процесс играет ключевую роль в развитии множества заболеваний и может усугублять течение различных патологий, включая аутоиммунные расстройства, нейродегенеративные заболевания, онкологические заболевания, сахарный диабет, остеоартрит (ОА) и другие [1–4]. Несмотря на значительный прогресс в изучении механизмов дегенеративных заболеваний, достигнутый за последние десятилетия, фармакологические методы лечения зачастую обладают ограниченной эффективностью или сопровождаются выраженными побочными эффектами [5,6]. На примере ОА, который представляет собой дегенеративное и воспалительное заболевание суставов, прослеживается тенденция к увеличению распространенности заболевания, в настоящее время ОА страдают ~ 7% населения во всем мире, что приводит к увеличению числа пациентов, у которых прогрессирование ОА приводит к ограничению трудоспособности и инвалидности [7,8]. Расходы на терапию ОА в США составляют 100 миллиардов долларов в год и в связи с тем, что старение является одним из основных факторов риска заболевания, распространенность данного заболевания будет только увеличиваться, создавая тяжелую нагрузку на национальные системы здравоохранения [9].

В последние годы особое внимание уделяется исследованиям, посвящённым терапии воспалительных и дегенеративных патологий с использованием мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (МСК) [10,11]. МСК продемонстрировали выраженные иммуномодулирующие и регенеративные свойства, способствуя снижению воспаления, ослабляя поляризацию макрофагов в провоспалительное М1 состояние и усиливая М2 состояние поляризации, для которого характерного противовоспалительный и иммуномодулирующий фенотип [12]. Также они стимулировали миграцию, клеточную дифференцировку,

ангиогенез, клеточную выживаемость для других типов клеток в условиях *in vitro* [13,14].

Однако клеточная терапия на основе МСК сопряжена с рядом ограничений, включая их недостаточную способность к дифференцировке и выживанию в зоне трансплантации, а также потенциальный риск иммунного отторжения и злокачественной трансформации клеток [15–17]. Одним из ключевых механизмов терапевтического воздействия МСК считается их паракринная активность, обусловленная секрецией разнообразных биологически активных молекул, таких как белковые ростовые факторы, цитокины и внеклеточные везикулы (ВВ) [18,19]. ВВ – это общий термин для покрытых двухслойной липидной мембраной структур, которые можно дифференцировать по признаку связанности везикул с внеклеточным матриксом (ВКМ) или клеточной мембраной и секретируемые в окружающую среду. Например, выделяют несколько классов жидкофазных ВВ, таких как экзосомы (30–150 нм), микровезикулы (100–1000 нм), апоптотические тельца (100–5000 нм), тогда как связанные субпопуляции ВВ представляют собой связанные с ВКМ матрикс-связанные везикулы (МСВ) и мембраносвязанные миграсомы [20,21]. ВВ играют ключевую роль в межклеточной коммуникации, обладая богатым протеомным грузом, а также перенося различные регуляторные молекулы рибонуклеиновых кислот (РНК), такие как микроРНК, кольцевые РНК, длинные некодирующие РНК и другие биологически активные соединения [22]. Благодаря способности влиять на тканевые процессы и регулировать активность иммунных клеток, внеклеточные везикулы представляют значительный интерес для диагностики и терапии воспалительных заболеваний [23,24]. Недавно открытая субпопуляция ВВ – МСВ, связанные с внеклеточным матриксом, отличаются от жидкофазных ВВ, секретируемых теми же клетками, по своему липидному и протеомному составу [25–27]. При этом тип биогенеза МСВ и свободных ВВ в указанных исследованиях не определялся, поэтому отнесение МСВ к отдельному классу ВВ на данный момент представляется дискуссионным вопросом. Они обнаружены в различных тканях организма и участвуют в поддержании гомеостаза, заживлении ран, регенерации, оказывая выраженный

противовоспалительный и регуляторный эффект в отношении M1 макрофагов, способствуя их поляризации в M2 фенотип [28,29]. ВВ различных классов рассматриваются как перспективные терапевтические агенты, способные модулировать воспаление и потенциально заменять клеточные методы, основанные на МСК и других клеточных технологиях, для лечения дегенеративных заболеваний суставов и других патологий [30].

В последние годы наблюдается рост исследований, изучающих влияние ВВ, секретируемых МСК (ВВ-МСК), и другими клетками на модуляцию функциональной активности фагоцитов, в первую очередь макрофагов [23,31]. Макрофаги являются перспективной мишенью для терапии воспалительных и дегенеративных заболеваний, поскольку модуляция их фенотипов может способствовать усилению регенерации и восстановлению физиологических функций поврежденных тканей и органов [32,33]. Изучение влияния ВВ-МСК и из других клеточных источников на макрофаги открывает новые возможности для терапии воспалительных и дегенеративных заболеваний [34]. ВВ-МСК обладают способностью регулировать фенотип макрофагов, модулируя их фенотипическую пластичность посредством активации сигнальных путей, способствующих противовоспалительному профилю активности, повышая долю M2-подобных клеток [35]. Данный процесс приводит к снижению воспаления и активному восстановлению тканей благодаря секреции противовоспалительных цитокинов и факторов роста [36]. Благодаря своим иммуномодулирующим свойствам, ВВ-МСК рассматриваются как перспективное средство для контроля воспаления и стимуляции регенерации за счет модуляции фенотипической и функциональной активности макрофагов, обеспечивая более безопасную альтернативу клеточной терапии с меньшим риском побочных эффектов [22].

Макрофаги – ключевые фагоциты врожденного иммунитета, участвующие в защите организма, поддержании гомеостаза и связи врожденной и адаптивной иммунной системы через антиген-презентацию [37,38]. Они осуществляют защитную функцию, распознавая через систему консервативных рецепторов патогенные микроорганизмы, поврежденные ткани и клетки, подвергают их

фагоцитозу с последующим уничтожением патогенов с помощью внутриклеточных протеаз и активных форм кислорода (АФК) [39]. В зависимости от получаемых сигналов, макрофаги дифференцируются в провоспалительные M1 и противовоспалительные M2 фенотипы [40]. M1 макрофаги формируют первую линию защиты при инфекции и участвуют в противоопухолевом иммунитете [41]. Они характеризуются высокой продукцией провоспалительных цитокинов (фактор некроза опухоли- α (ФНО- α , tumor necrosis factor alpha (TNF- α)), интерлейкины (Ил)-1 β , Ил-6, Ил-12, ФНО- α), экспрессией CD80, CD86, а также активной генерацией АФК за счёт активности никотинамид адениндинуклеотидфосфатоксидазы (НАДФН)-оксидазы 2 [42,43]. Для M2 макрофагов преимущественно с противовоспалительным фенотипом характерны высокая экспрессия CD206 и CD163, а также секреция Ил-10 [44,45]. Преобладание M1 способствует хроническому воспалению и развитию ряда заболеваний (сахарный диабет, инфаркт миокарда, язвенный колит и др.) [42,46], тогда как смещение баланса в сторону M2 создает регенеративное противовоспалительное микроокружение [47]. Изучение влияния ВВ-МСК на поляризацию макрофагов человека является актуальным направлением исследований, открывающим новые возможности для противовоспалительной и регенеративной терапии.

Степень разработанности темы исследования

В качестве терапевтических везикул основное внимание исследователей привлечено к ВВ, которые являются компонентом секрета МСК, таких как экзосомы, микровезикулы, апоптотические тельца [48]. ВВ-МСК, оказывают противовоспалительное, иммунорегуляторное воздействие на различные типы иммунных клеток [48]. Среди иммунных клеток макрофаги являются перспективной терапевтической мишенью, поскольку модуляция их фенотипической пластичности играет важную роль в терапии заболеваний, где хроническое воспаление и нарушение иммунной регуляции занимают важное место в патогенезе [49]. В число таких патологий входят метаболические,

неврологические, аутоиммунные, например, ревматоидный артрит (РА), или дегенеративные заболевания опорно-двигательного аппарата, к которым можно отнести ОА [50–52].

В ряде исследований был продемонстрирован иммуномодулирующий эффект ВВ, полученных из МСК. Жидкофазные ВВ вызвали изменение поляризации макрофагов с М1 на М2 состояние, что оказывает регенеративный эффект при терапии ряда заболеваний, включая, ОА [53,54]. МСВ – ВВ, обнаруженные в ВКМ децеллюляризованных слизистых оболочек мягких тканей и ВКМ клеточных культур, продемонстрировали высокий потенциал при терапии ряда патологий. МСВ предотвращают дегенерацию и гибель аксонов ганглиозных клеток сетчатки, вызванную ишемией, стимулируют регенерацию поврежденных скелетных мышц, ослабляют дегенеративные процессы в тканях суставов при РА [29,55,56]. Терапевтический эффект МСВ основан в первую очередь на иммуномодулирующем воздействии на макрофаги, вызывающем изменение фенотипа от провоспалительного М1 к М2 состоянию, способствующему разрешению воспаления и стимулирующему регенеративные процессы в поврежденных тканях [25].

На сегодняшний день большая часть исследований изучает терапевтический потенциал ВВ на макрофагах, полученных из костного мозга мышей или на клеточных линиях, например, мышинных макрофагах RAW 264.7 или THP-1 – моноцитарной клеточной линии человека, полученной от пациента с острым моноцитарным лейкозом [57,58]. Одним из ограничений в интерпретации результатов упомянутых выше исследований, где анализируется влияние ВВ на макрофаги, является то, что мышинные макрофаги и THP-1 макрофаги отличаются по своему транскриптомному профилю функциональной активности от человеческих макрофагов, полученных из моноцитов периферической крови [59–62]. У макрофагов человека, в отличие от мышинных, индуцируемая синтаза оксида азота (iNOS) не проявляет активность *in vitro*, не смотря на то, что данный фермент играет важную роль в защитной функции организма, вырабатывая активные формы азота [59,60]. Также стоит учесть, что в большинстве исследований влияния ВВ на

макрофаги, основное внимание уделялось секреторной активности клеток, экспрессии генов и белков, связанных с маркерами M1 и M2 фенотипов, а также сигнальными путями, вовлеченными в модуляцию фенотипической пластичности макрофагов [57]. На сегодняшний день не было проведено исследований, изучающих влияние ВВ на функциональную активность макрофагов человека (продукция АФК и фагоцитоз), а также рассматривающих влияние ВВ-МСК, на экспрессию мРНК и белков, связанных с провоспалительной и радикал-генерирующей активностями клеток.

В большей части работ, где анализировался терапевтический потенциал МСВ, данные везикулы были получены из ВКМ децеллюляризованных слизистых оболочек мягких тканей животных. При этом существует ограниченное количество исследований, где использовались МСВ, полученные из ВКМ клеточных культур, а также отсутствуют работы, где изучалась регуляция функциональной активности макрофагов МСВ, полученными из МСК [30,56]. На данный момент не было проведено исследований, где сравнивается терапевтический потенциал разных типов ВВ-МСК в отношении терапии ОА *in vivo*. Сравнение регуляции функциональной активности фагоцитов различными типами ВВ является перспективным направлением исследований с целью поиска потенциальных терапевтических подходов для улучшения состояния пациентов с ограниченно поддающимися лечению заболеваниями, такими как ОА.

Цели и задачи исследования

Целью настоящего исследования было установление влияния внеклеточных везикул, а именно матрикс-связанных везикул и внеклеточных везикул, выделенных из кондиционированной среды мезенхимных стромальных клеток, на функциональную активность макрофагов, экспрессию генов и белков, связанных с провоспалительной активацией макрофагов, а так же на модуляцию воспалительного процесса на животной модели остеоартрита. Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Провести сравнительный анализ протеомного профиля внеклеточных везикул, выделенных из матрикса и кондиционированной среды МСК основного вещества пупочного канатика человека;
2. Установить влияние внеклеточных везикул, выделенных из ВКМ и кондиционированной среды МСК, на функциональную активность макрофагов человека, дифференцированных из моноцитов;
3. Установить механизмы влияния ВВ различного происхождения на модуляцию фенотипической пластичности макрофагов человека;
4. Сравнить терапевтический потенциал внеклеточных везикул, выделенных из матрикса и кондиционированной среды МСК основного вещества пупочного канатика человека, для управления воспалительным процессом на животной модели ОА.

Научная новизна

В работе впервые был проведен анализ влияния МСВ и внеклеточных везикул из кондиционированной среды (ВВ/КС) МСК на изменение функциональной активности макрофагов человека, дифференцированных из моноцитов периферической крови: был проведен анализ влияния ВВ на способность макрофагов к фагоцитозу и генерации АФК, а также была установлена роль ВВ обоих типов в регуляции экспрессии генов и белков, связанных с провоспалительной активацией макрофагов.

Научная новизна заключается в том, что впервые установлено:

- влияние МСВ и ВВ/КС на фагоцитарную активность и продукцию активных форм кислорода (АФК) макрофагами человека;
- вклад указанных субтипов ВВ в регуляцию экспрессии генов и белков, ассоциированных с провоспалительной активацией макрофагов.

В ходе протеомного анализа ВВ обоих типов, полученных из МСК основного вещества пупочного канатика (МСК-ПК) человека было установлено, что ВВ/КС и

МСВ обладают различным протеомным составом. МСВ обогащены белками, стимулирующими процессы фагоцитоза, эндоцитоза, активации иммунных клеток, ВВ/КС богаты белками, стимулирующими синтез ВКМ, коллагеновых фибрилл, синтез макромолекул

Установлено, что МСВ в большей степени чем ВВ/КС модулируют функциональную активность М1 (ИФН- γ +ЛПС) макрофагов с провоспалительным фенотипом, снижая противовоспалительный потенциал данного фенотипа макрофагов.

В ходе анализа механизма влияния МСВ и ВВ/КС на модуляцию М1 фенотипа макрофагов человека, дифференцированных из моноцитов, было установлено, что МСВ оказывают ингибирующее действие на поляризацию макрофагов в М1 состояние, подавляя экспрессию компонентов сигнального пути JAK/STAT1, таких как STAT1, STAT2, IRF9.

Также впервые было продемонстрировано, что однократная внутрисуставная инъекция ВВ/КС и МСВ, полученных из МСК основного вещества пуповины человека, оказывает противовоспалительное действие на ткани коленного сустава животных с индуцированным ОА спустя 21 сутки после введения ВВ. При этом эффект терапии ВВ/КС более выражен по сравнению с МСВ.

Теоретическая и практическая значимость работы

Данные, полученные в результате проведенного исследования, расширяют представление о влиянии ВВ-МСК на фенотипическую пластичность и функциональную активность макрофагов. Результаты, полученные при терапии воспалительного процесса в тканях суставов с помощью ВВ-МСК-ПК животной модели ОА, могут быть использованы для разработки перспективных терапевтических подходов для терапии ОА. Результаты исследования были внедрены в учебный процесс Института регенеративной медицины Научно-технологического парка биомедицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет) в дисциплины «Введение в регенеративную

медицину», «Молекулярно-биологические основы регенеративной медицины», читаемых для студентов по направлениям подготовки 06.04.01 «Биология», 28.04.03 «Нanomатериалы», 22.04.01 «Материаловедение и технологии материалов» (Акт о внедрении результатов диссертации в учебный процесс).

Методология и методы исследования

Методическую базу диссертационной работы составили методы: анализ динамического светорассеяния, просвечивающая электронная микроскопия, конфокальная микроскопия, иммуноферментный анализ, количественная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией, проточная цитометрия, вестерн-блоттинг, жидкостная хроматография с tandemной масс-спектрометрией. Данные методы были использованы для анализа свойств ВВ, клеток-продуцентов внеклеточных везикул. В ходе исследования были охарактеризованы иммунофенотипические свойства МСК, анализ морфологии и размеров ВВ, протеомный состав ВВ, с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с tandemной масс-спектрометрией с последующим биоинформатическим анализом. Для анализа влияния ВВ на функциональную активность макрофагов, регуляцию экспрессии генов и белков, связанных с провоспалительной поляризацией макрофагов, а именно продукцией воспалительных цитокинов, поверхностных рецепторов, компонентов белкового комплекса НАДФН-оксидазы 2, компонентов сигнального пути JAK/STAT1 были использованы цитологические и молекулярные методы исследования. Для исследования иммуномодулирующих свойств ВВ на модуляцию воспаления при ОА, была получена модель ОА крыс посредством менискэктомии. По окончании терапии эффект ВВ-МСК был оценен с помощью иммуногистохимического окрашивания гистологических препаратов коленных суставов. Результаты обрабатывали и анализировали с использованием методов статистического анализа.

Положения, выносимые на защиту

1. МСВ и ВВ/КС, полученные из МСК-ПК человека, обладают качественными и количественными различиями в белковом составе. МСВ обогащены белками, регулирующими процесс фагоцитоза, эндоцитоза, активации иммунных клеток. ВВ/КС содержат в своем составе белки, стимулирующие синтез ВКМ, коллагеновых фибрилл, биосинтез макромолекул.
2. ВВ/КС и МСВ, полученные из МСК-ПК человека, оказывают противовоспалительный эффект на М1 макрофаги, ослабляя экспрессию и секрецию воспалительных цитокинов, продукцию АФК и усиливая экспрессию маркеров М2 поляризации; кроме того ВВ увеличивают способность макрофагов к фагоцитозу.
3. МСВ МСК-ПК человека снижают уровень экспрессии мРНК и белков STAT1/STAT2/IRF9, вовлеченных в JAK/STAT1 сигнальный путь, связанный с провоспалительной поляризацией макрофагов.
4. Внутрисуставная инъекция ВВ/КС и МСВ, секретируемых МСК-ПК человека, ослабляет экспрессию белков, связанных с воспалительными процессами в тканях коленного сустава крыс спустя 21 сутки терапии на животной модели ОА.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 1.5.3. Молекулярная биология: 3. Структура геномов, геномика, эпигеномика и транскриптомика. Биоинформатические методы анализа баз данных последовательностей ДНК, РНК и белков, в том числе при патологии у человека; 8. Биосинтез белка. Посттрансляционные модификации белков. Механизмы транспорта и деградации белков. Протеомика; 10. Внутри- и межклеточные взаимодействия, рецепция и передача сигналов, лиганд-рецепторные

взаимодействия. Диссертация соответствует паспорту научной специальности 1.5.22. Клеточная биология в том числе, следующим направлениям исследований согласно пунктам: 7 (Везикулярный транспорт и механизмы его регуляции. Межклеточный транспорт.), 10 (Изучение закономерностей цито- и гистогенеза, клеточной дифференцировки, физиологической и репаративной регенерации тканей, также, регуляции этих процессов.)

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов определяется репрезентативным объемом биологических образцов, используемых в клеточных и молекулярно-биологических тестах. Объем выборки был предварительно рассчитан при планировании экспериментов. Методы исследования соответствуют поставленным целям и задачам. В *in vivo* исследовании терапии ОА ВВ использовались особи мужского пола возрастом от 3-6 месяцев с целью уменьшения влияния возрастных, гормональных и половых различий между особями. Объем выборки животных был не меньше 6 животных на 1 экспериментальную группу. В исследовании были использованы 24 крысы. Достоверность полученных результатов подтверждается применением современных и сертифицированных реактивов и оборудования. Для статистической обработки данных использовались строгие статистические критерии с использованием специализированного статистического программного обеспечения «GraphPad Prism 9». Результаты диссертационного исследования были опубликованы в зарубежных научных журналах 1-2 квартилей, входящих в международные базы данных (Scopus).

Апробация диссертации состоялась на заседании Института регенеративной медицины Научно-технологического парка биомедицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), протокол № 9 от 21.08.2025 г.

Результаты диссертационного исследования были представлены и обсуждены на VI Сеченовском международном биомедицинском саммите (SIBS-

2022) (Москва, 2022), форуме «Наука будущего – наука молодых» (Орел, 2023), XXIV съезде Российского Физиологического Общества имени И.П. Павлова (Санкт-Петербург, 2023), VII Сеченовском международном биомедицинском саммите (SIBS-2023) (Москва, 2023), Иранский международный конгресс по биологии и технологии стволовых клеток (Royan International Congress on Stem Cell Biology & Technology, Тегеран, 2024), VIII Сеченовском международном биомедицинском саммите (SIBS-2024) (Москва, 2024), VI национальном конгрессе по регенеративной медицине (Санкт-Петербург, 2024).

Выполнение работ по диссертационному исследованию (характеристика мезенхимных стромальных клеток) было поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации по грантовому соглашению № 075-15-2024-640 (Сеченовский университет), (протеомный анализ внеклеточных везикул) выполнено в рамках государственного задания Минздрава России тема №NZAF-2024-0016.

Личный вклад автора

Научные результаты, обобщенные в научной работе Ключерева Т.О. получены им самостоятельно в ходе работы в Институте регенеративной медицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). Автору принадлежит ведущая роль в анализе физико-химических свойств ВВ, фенотипировании первичных культур мультипотентных мезенхимных стромальных клеток, изучении влияния ВВ на функциональную активность и провоспалительные свойства макрофагов человека, полученных из моноцитов. Автором был проведен анализ влияния внеклеточных везикул на секреторную активность макрофагов и их фенотипическую пластичность с помощью иммуноферментного анализа, количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией, вестерн-блоттинга, иммуноцитохимического окрашивания, проточной цитометрии, выполнен анализ фагоцитоза с помощью проточной цитометрии, изучена радикал-генерирующая активность с помощью

люминол-зависимой хемолюминесценции. Для изучения влияния ВВ на экспериментальный ОА у животных был проведен иммуногистохимический анализ. Автор самостоятельно планировал и проводил эксперименты, проводил статистическую обработку данных, анализировал и интерпретировал результаты. Автор представлял полученные результаты исследований на конференциях, осуществлял написание научных публикаций по теме данного исследования.

Публикации по теме диссертации

По результатам исследования автором опубликовано 12 работ, в том числе 3 научные статьи в изданиях, индексируемых в международных базах Scopus, PubMed, 2 иные публикации по результатам исследования, 7 публикаций в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций (из них 1 зарубежная конференция).

Структура и объем диссертации

Диссертация построена по монографическому типу и изложена на 176 страницах, содержит 3 таблицы и 35 рисунков. Диссертация состоит из следующих разделов: введение, четыре стандартные главы (обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований и обсуждение), заключение, выводы, практические рекомендации, список сокращений и условных обозначений и список литературы (319 источников: 319 иностранных).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Макрофаги: биологическое разнообразие, роль в иммунной регуляции, патологии, регенеративной медицине

1.1.1. Макрофаги роль в иммунном ответе, происхождение

Иммунная система является одним из важнейших систем регуляции жизнедеятельности сложных многоклеточных организмов наряду с нервной и эндокринной системами [63]. Среди клеточного компонента врожденной иммунной системы важную роль в защите организма и управления тканевым гомеостазом играют различные тканевые макрофаги и макрофаги, дифференцированные из моноцитов [37]. Данные клетки обладают разнообразными функциями, обеспечивая защиту организма от патогенных микроорганизмов через распознавание (PAMP), а также через собственные антигены, представляющие собой молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением (DAMP) через систему консервативных рецепторов, что обеспечивает фагоцитоз и уничтожение патогенов с помощью действия внутриклеточных протеаз и АФК [39]. Макрофаги обеспечивают связь между врожденной и приобретенной иммунной системами с помощью антиген-презентирующей функции [64]. Также одной из важнейших функций фагоцитов является секреторная активность, макрофаги образуют разнообразные сигнальные молекулы, в первую очередь цитокины, хемокины, лейкотриены, что способствует управлению процессами воспаления, регенерации за счет привлечения и регуляции активности Т и В лимфоцитов естественных киллеров, которые обеспечивают регуляцию с помощью механизмов адаптивного иммунитета [65].

Макрофаги представляют собой широко распространенную группу мононуклеарных фагоцитов, встречающихся почти во всех органах организма человека, и играют важнейшую роль в защите организма от патогенных

микроорганизмов и регуляции тканевого гомеостаза, в регенерации и прогрессировании ряда заболеваний [66–68]. Макрофаги обладают широкой пластичностью фенотипов, характеризующихся различной активностью и функциональными состояниями [67]. Данная пластичность играет важную роль в регуляции процессов регенерации, поскольку избыточные провоспалительные стимулы могут способствовать развитию избыточного воспаления, при этом воздействие противовоспалительных факторов приводит к формированию фенотипов макрофагов с противовоспалительной активностью, стимулирующей регенеративные процессы [69].

Макрофаги были открыты микробиологом Ильей Мечниковым в 1892, данные клетки обладали высокой способностью к фагоцитозу в честь чего были названы макрофагами [70]. Изначальной концепцией происхождения макрофагов была концепция мононуклеарной фагоцитарной системы. Считалось, что макрофаги имеют моноцитарное происхождение, и клетки предшественники моноцитов развиваются в красном костном мозге, после чего через кровь мигрируют в ткани и дифференцируются в макрофаги [71]. Однако со временем были получены ряд доказательств, что тканевые макрофаги имеют отличное эмбриональное происхождение от макрофагов, полученных из моноцитов костного мозга [68]. Тканевые макрофаги помимо образования из костномозговых предшественников происходят из желточного мешка в процессе внутриутробного развития, обладая уникальными транскрипционными и эпигенетическими паттернами по сравнению с моноцитарными макрофагами, что может придавать им уникальные свойства [72–74]. Тканевые макрофаги встречаются в большом количестве органов, например, клетки микроглии в головном мозге, остеокласты распространены в костной ткани, клетки Купфера представляют собой популяцию макрофагов печени [75–77]. Тканевые макрофаги эмбрионального происхождения способны сохраняться в течение всей жизни, однако для восполнения в результате травм или инфекций они пополняются макрофагами из моноцитов крови, имеющие костномозговое происхождение [37]. Макрофаги помимо защитной функции организма играют важную роль в поддержании гомеостаза, обладают трофической

функцией и участвуют в метаболической активности. [78]. Например, мононуклеарные фагоциты участвуют в поддержании сердечного ритма, а клетки Купфера совместно с гепатоцитами участвуют в метаболизме липидов [78,79]. Исходя из способности макрофагов к высокой пластичности и широкому спектру биологических функций, регуляция их фенотипов и функциональной активности может как являться фактором развития ряда заболеваний, так и быть терапевтической мишенью для ослабления воспаления и стимуляции репаративных процессов в поврежденных органах [80].

1.1.2. Фенотипическая пластичность макрофагов

Макрофаги характеризуются выраженной фенотипической пластичностью, позволяющей им адаптироваться к различным сигналам микроокружения. Впервые способность макрофагов изменять своё функциональное состояние под действием цитокинов была обнаружена в 1960-х годах, когда было показано существование двух альтернативных типов активации макрофагов [81]. К концу 20 века было установлено, что M1 макрофаги секретируют ФНО- α , Ил-1, Ил-6, а M2 макрофаги выделяют противовоспалительные цитокины, например Ил-10 и обладают высокой экспрессией аргиназы-1 [82,83]. В 2000 году Миллсом и др. была предложена концепция деления макрофагов на M1 и M2 фенотипы по аналогии с Т-хелперами 1 типа с воспалительной и иммуностимулирующей активностью и Т-хелперами 2 типа с иммунорегуляторной активностью [84]. Для M1 макрофагов, стимулируемых интерфероном (ИФН)- γ + липополисахаридом (ЛПС) было установлено, что они обладают высокой экспрессией iNOS и секретируют повышенное количество оксида азота (NO). M2 макрофаги, активируемые Ил-4, Ил-13, участвуют в метаболизме аргинина в сторону орнитина, благодаря повышенной экспрессии аргиназы-1 [84]. Дихотомия M1/M2 макрофагов является удобной моделью для исследований, однако данные анализа транскриптома, например, с помощью single cell секвенирования и протеома макрофагов

демонстрируют континуумы фенотипов макрофагов, выходящие за рамки парадигмы M1/M2 пластичности макрофагов [85–87].

M1 макрофаги представляют собой популяцию макрофагов, связанную с развитием воспаления и противомикробным иммунным ответом [88]. Основными факторами, способствующими M1 поляризации макрофагов *in vitro*, являются бактериальные продукты, такие как ЛПС, а среди цитокинов преимущественно используется ИФН- γ , также повышенное содержание ФНО- α способствует образованию M1-подобных макрофагов [89–91]. M1 макрофаги принимают участие в развитии воспаления при образовании раны, противоопухолевом иммунитете, а также формируют первую линию защиты в ответ на разнообразные патогены [41]. Данный фенотип участвует в адаптивных иммунных реакциях и стимулирует поляризацию Th1-лимфоцитов CD4⁺ [41]. Для M1 макрофагов характерна повышенная секреция провоспалительных цитокинов Ил-1 β , Ил-6, Ил-12 и Ил-23 и ФНО- α [82]. Данные цитокины способствуют активации других иммунных клеток и стимулируют их миграцию в область воспаления [82]. M1 макрофаги имеют повышенную экспрессию поверхностных белков, вовлеченных в антиген-презентацию, и костимулирующих рецепторов, таких как главного комплекса гистосовместимости (МНС)-II, кластера дифференцировки (CD)80 и CD86, обеспечивая активацию наивных Т-клеток [41]. M1 макрофаги осуществляют бактерицидную активность за счет повышенной продукции АФК посредством экспрессии ферментов НАДФН-оксидазы (в основном NOX2) и активных форм азота за счет экспрессии фермента iNOS [42,43].

Повышенная продукция свободных радикалов M1 макрофагами обеспечивает защитную функцию при формировании в отношении бактериальных патогенов, а также обеспечивает противоопухолевую активность клеток [61]. Радикал-генерирующая активность M1 макрофагов связана с активностью фермента NOX2, который катализирует образование супероксидного анион-радикала (O₂•⁻) [92], который может спонтанно или при участии фермента супероксиддисмутазы (СОД) превращаться в перекись водорода H₂O₂ [93]. В дальнейшем H₂O₂ взаимодействует с ионами железа, входящими в состав

низкомолекулярных комплексов или активных центров ферментов, что приводит к генерации других АФК и развитию окислительного стресса как во внеклеточной среде, так и внутри клеток [93]. М1 макрофаги участвуют в ремоделировании тканей и разрушении ВКМ, секретируя помимо АФК матриксные металлопротеиназы (ММП), которые при нормальном развитии воспаления играют положительную роль в инициировании процесса регенерации [47,94]. При этом избыточная продукция АФК М1 макрофагами является негативным фактором в процессе регенерации тканей, что сопровождается избыточным повреждением окружающих клеток в компонентах ВКМ, препятствуя процессу заживления ран [42,47].

М2 макрофаги характеризуются широкой фенотипической пластичностью, обладая противовоспалительными и иммунорегуляторными свойствами, а также имеют высокий регенеративный потенциал посредством разрешения воспаления, стимуляции процессов ангиогенеза и ремоделирования ВКМ [95,96]. Для М2 макрофагов характерна низкая экспрессия маркеров, связанных с М1 фенотипом: CD86, CD80. Данный фенотип имеет высокий уровень экспрессии рецептора маннозы CD206, представляющий собой фагоцитарный рецептор для патогенов и CD163, рецептор для комплексов гаптоглобин-гемоглобин [97]. Кроме того, данный фенотип характеризуется высокой секрецией Ил-10, трансформирующего фактора роста бета (TGF- β), антагониста рецептора Ил-1 (Ил-1РА) [44,98].

На данный момент исследователи выделяют 4 фенотипа М2 макрофагов, полученные в условиях *in vitro*, с различными промежуточными состояниями активации и различающиеся фенотипической активностью (М2а, М2b, М2с и М2d), которые можно получить при добавлении разнообразных цитокинов и иммуномодулирующих молекул [99–101]. М2а фенотип макрофагов можно индуцировать добавлением Ил-4, Ил-13 или инфекциями, вызванными грибами и гельминтами [40]. Макрофаги М2а обладают высоким регенеративным потенциалом в заживлении ран и экспрессируют высокие уровни CD206, Ил-1РА, аргиназы-1 и CCL17, также данные макрофаги секретируют профиброзные факторы, такие как TGF- β , инсулиноподобный фактор роста и фибронектин,

стимулирующие восстановление тканей [32,102]. Макрофаги M2b представляют собой смешанный фенотип, обладающий свойствами как M1, так M2 фенотипа макрофагов, обладая иммуномодулирующими функциями, например, секретируя провоспалительные цитокины ФНО- α , Ил-6, и при этом имеют противовоспалительную активность за счет секреции Ил-10 и пониженной экспрессии Ил-12 [103,104]. Экспрессия генов в M2b демонстрирует наличие повышенного количества мРНК, которые кодируют цитокины и хемокины, связанные как с провоспалительным, так и противовоспалительным иммунным ответом, что делает данный фенотип макрофагов промежуточным между M1 и M2a [105]. Поляризацию макрофагов в M2c фенотип можно получить с помощью добавки Ил-10, TGF- β [106]. Данный фенотип макрофагов обладает сильной противовоспалительной активностью за счет низкой секреции провоспалительных цитокинов, характерных для M1 макрофагов. M2c макрофаги усиливают активацию регуляторных Т-клеток, способствуя иммуносупрессии [107]. M2c макрофаги имеют высокую секрецию противовоспалительных цитокинов, хемокинов и факторов роста, таких как TGF- β , IL-10, ММП, CCL18, высокую экспрессию CD163 и CD206 [108]. M2c макрофаги играют роль в регуляции процессов фагоцитоза, иммуносупрессии, а также могут способствовать развитию фиброза, моделированию поврежденного ВКМ и образованию новых сосудов [42]. Повышенная способность макрофагов M2c к фагоцитозу и ангиогенезу играет важную роль в регенерации, стимулируя фагоцитоз и ремоделирование поврежденного ВКМ, а также способствуя образованию новых сосудов, за счет стимуляции миграции эндотелиальных клеток и образования трубочек [109,110]. M2d фенотип макрофагов активируется совместной стимуляцией Ил-6 и аденозина через активацию TLR рецепторов [45]. Данный фенотип связан с прогрессированием опухоли и ее ангиогенезом. Для M2d макрофагов характерна повышенная секреция Ил-10 и фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) [111,112].

Важную функцию в дифференциации моноцитов в макрофаги и их ответе на индукторы поляризации в M1 и M2 состоянии осуществляют колониестимулирующие факторы. Наиболее важными являются гранулоцитарно-

макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ) и макрофагальный колониестимулирующий фактор (М-КСФ) [113]. Данные факторы регулируют дифференцировку макрофагов из моноцитов *in vivo*, обеспечивают их выживаемость, дифференцировку [114,115]. Экспрессия М-КСФ относительно стабильна в нормальном состоянии, в то же время ГМ-КСФ имеет в крови относительно низкое содержание, но значительно повышающееся во время иммунных/воспалительных реакций [113]. ГМ-КСФ является фактором, вызывающим воспаление тканей, воздействуя на различные типы миелоидных клеток и способствуя их дифференцировке/поляризации, например, созреванию моноцитов в макрофаги [116]. ГМ-КСФ стимулирует образование более близких к М1 фенотипу макрофагов клеток, как для стимулируемых в М1 ЛПС+ИФН- γ , так и для Ил-4 в М2 фенотип, что сопровождалось относительно слабой экспрессией М2 маркера CD206 у ГМ-КСФ+Ил-4 М2 макрофагов [61]. При этом культивирование М-КСФ не только дифференцирует моноциты, но и поляризует клетки в фенотип, подобный М2, который демонстрировал различные типы активности М2, что при добавлении Ил-4 позволяет получить М2 макрофаги с высокой продукцией Ил-10 и повышенной экспрессией по сравнению с ГМ-КСФ М1 макрофагами CD206 рецептора [61]. Также М-КСФ позволяет получить М2 макрофаги с пониженной радикал-генерирующей активностью, при наличии высокой способности к фагоцитозу [61].

1.1.3. Роль фагоцитов в управлении воспалением на модели повреждения тканей

Макрофаги являются ключевыми регуляторами воспаления, возникающего в ответ на травматическое повреждение тканей, так и в ответ на трансплантацию тканеинженерных конструкций, представляющих собой скаффолды без клеток и в сочетании с клеточными компонентами [117,118]. Одним из ключевых этапов воспалительного процесса при повреждении тканей является фенотипический

переход от M1 к M2 макрофагам [32]. В процессе пролиферации и ремоделирования повреждения M2 макрофаги являются одними из главных клеток, управляющих процессом регенерации посредством стимуляции клеточной миграции, ангиогенеза и образования новых структур ВКМ [119]. Повреждение ткани сопровождается повреждением матрикса и высвобождением внутриклеточных белков, что приводит к возникновению 'сигналов тревоги', которые способствуют началу острой воспалительной реакции [120]. После стадии гемостаза в течение первых 24 часов в область повреждения прибывают нейтрофилы, их основная роль заключается не только в борьбе с инфекцией, но и в изменении повреждённой ткани для обеспечения эффективной регенерации [121]. Нейтрофилы активируются при взаимодействии с поврежденными клетками эндотелия сосудов, связанными на поверхности импланта тромбоцитами и сорбированными на материале белками [121,122] и способствуют развитию острой стадии воспаления, синтезируя протеазы и антимикробные соединения, такие как АФК и гипохлорит-анион, вырабатываемый миелопероксидазой [123]. Действие протеаз (коллагеназ, желатиназ) и АФК, синтезируемых нейтрофилами, разрушает внеклеточный матрикс и подготавливает поврежденную ткань к регенерации путем образования «туннелей» в матриксе, что способствует прохождению крупных макрофагов и дальнейшему ангиогенезу [123]. На следующем этапе развития воспаления белки и цитокины, генерируемые нейтрофилами, а также инициация апоптоза этих клеток, привлекают макрофаги и лимфоциты очаг повреждения [124]. Макрофаги распознают DAMP и PAMP консервативными рецепторами, что приводит к их воспалительной активации, фенотипической перестройке, приводящей к M1 поляризации [124,125]. Распознавание данных молекул запускает быструю фенотипическую трансформацию макрофагов из состояния покоя в активированное провоспалительное состояние, известное как фенотип M1 [126]. Активация макрофагов M1 опосредуется разнообразным набором рецепторов распознавания молекулярных паттернов, включая толл-подобный рецептор (TLR) и нодд-подобных рецепторов (NLR) [127]. Макрофаги на начальном этапе имеют провоспалительный M1 фенотип и синтезируют

цитокины, такие как Ил-1 β , Ил-6, Ил-12, Ил-23 и ФНО- α , а также оксид азота и АФК [32,128,129]. М1 макрофаги принимают активное участие в удалении клеточного детрита и ремоделировании ВКМ с помощью секреции разнообразных протеаз, таких как катепсины, ММП [130,131]. М1 макрофаги способствуют инициации ангиогенеза благодаря секреции ангиогенных факторов VEGF, CCL-5, Ил-8, стимулирующих миграцию эндотелиальных клеток [132].

Через несколько дней с момента начала воспаления происходит стадия пролиферации и регенерации, что заканчивается заживлением и восстановлением структуры ткани благодаря активности регуляторных Т-лимфоцитов и альтернативно активированных М2 макрофагов, секретирующих Ил-10, TGF- β , CCL17, CCL18, CCL22, фактор роста тромбоцитов [133,134]. Изменение баланса макрофагов М1/М2 в сторону М2 альтернативно активированных макрофагов приводит к формированию в области повреждения противовоспалительного микроокружения, что формирует среду благоприятную для восстановления тканей [47]. Ил-10 и TGF- β обладают выраженным иммуносупрессивным действием и ослабляют продукцию у М1 макрофагов воспалительных цитокинов. Кроме того, данные цитокины стимулируют миграцию и активацию регуляторных Т-клеток с противовоспалительным фенотипом [32]. Одним из важных аспектов, регулируемых макрофагами М2 фенотипа, является секреция факторов, способствующих ангиогенезу: VEGF, ангиопоэтины 1, 2, фактор роста плаценты. Данные факторы способствуют миграции эндотелиальных клеток, стимулируют образование новых сосудов и обеспечивают их стабилизацию [135,136]. В фазе ремоделирования М2 макрофаги обладают способностью стимулировать образование нового ВКМ посредством синтеза коллагенов 1, 3 типов, фибронектинов, гиалуроновой кислоты, хондроитинсульфата [95,137]. Также на ранних этапах инфильтрации М2 макрофаги стимулируют ремоделирование ВКМ с помощью ММП-2, ММП-9, что формирует пространство для миграции клеток, при этом М2 макрофаги ингибируют данные ферменты при их повышенной секреции за счет выработки тканевых ингибиторов ММП [138,139]. Модулирование воспаления при повреждении тканей - тонко настроенный процесс,

правильная последовательность и сроки развития различных фаз воспаления являются основополагающими для успешного процесса регенерации [95]. При неблагоприятном исходе, особенно при наличии факторов риска, таких как старение, диабет, может возникнуть хроническое воспаление, которое характеризуется фиброзом, образованием гранулем [95,140]. Таким образом, контроль поведения иммунных клеток, особенно макрофагов, является ключевой задачей для успешного процесса воспаления и дальнейшего функционального восстановления органов и тканей.

1.1.4. Механизмы регуляции фенотипической пластичности макрофагов

В основе фенотипической пластичности макрофагов лежат факторы транскрипции и посттрансляционные регуляторы, например, микроРНК [106]. Под действием разнообразных химических сигналов, макрофаги способны переключать свой фенотип в широком диапазоне между M1 и M2 фенотипами, являющимися условными крайними точками фенотипической вариабельности макрофагов [141]. На поляризацию макрофагов в M1 и M2 состояния отвечают следующие сигнальные пути: JAK/STAT, NF- κ B, PI3K/AKT, Notch, MAPK, Wnt [142]. Сигнальный путь JAK/STAT, включающий в себя янус-киназы (JAK), белки-передатчики сигналов и активаторы транскрипции (STAT) и внутриклеточные рецепторы, является одним из каноничных путей, регулирующих активацию макрофагов в ответ на более 70 цитокинов [143]. Данный сигнальный путь имеет важное значение в регуляции фенотипической пластичности макрофагов, поскольку нарушение в его активации может приводить к аутоиммунным заболеваниям, онкологии и иммунодефицитам [143]. В данный сигнальный путь входят молекулы, связанные с рецепторами JAK1, JAK2, JAK3, и факторы транскрипции STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5, STAT6 [144]. После активации цитокинами открывается фосфорилирующий комплекс, который димеризует молекулы STAT [143]. После чего образованный комплекс STAT

переносится в ядро и связывается с промотором, активируя транскрипцию мРНК гена-мишени [145,146].

JAK/STAT факторы транскрипции STAT1 и STAT2 регулируют передачу сигналов, стимулирующих M1 поляризацию макрофагов [147]. Этот сигнальный каскад запускается под действием интерферонов γ и α/β , а также Ил-12, которые, связываясь с рецепторами семейства JAK, инициируют фосфорилирование STAT-белков и последующую активацию соответствующих генов [147,148]. В регуляцию данного пути вовлечены и факторы регуляции интерферона (IRF9), взаимодействующие с промоторными участками ДНК и усиливающие экспрессию генов, ответственных за иммунную активацию, антигенную презентацию и хемотаксис макрофагов [148]. Помимо повышения активации STAT1, ИФН- γ усиливает канонические воспалительные гены-мишени NF- κ B, приводя к повышению секреции ФНО- α , Ил-6 и Ил-1 β [149,150]. Модуляция активации пути JAK/STAT1/STAT2 потенциально ослабляет поляризацию M1 макрофагов, что может иметь положительный эффект при терапии заболеваний, связанных с избыточной воспалительной активацией фагоцитов данного типа [144,147,151].

Другие факторы транскрипции сигнального JAK/STAT, такие как STAT3, STAT6, играют важную роль в ослаблении избыточной активации иммунной системы и способствуют M2 поляризации макрофагов с противовоспалительным профилем функциональной активности, контролируя воспаление при остром ишемическом повреждении почек, инсульте [152,153]. Ил-4 и Ил-13, стимулирующие M2 поляризацию макрофагов, способствуют усилению экспрессии STAT6 и STAT3 [154]. Ил-4 положительно влияет на клетки микроглии, ослабляя их M1 активацию при кровоизлиянии в мозг и оказывая нейропротекторное действие посредством M2 поляризации данных клеток через усиление передачи сигналов JAK/STAT6 сигнального пути [152]. Krüppel-подобный фактор 4 способствует поляризации M2, взаимодействуя с STAT6 и ингибируя активацию NF- κ B, ослабляет воспалительную активацию макрофагов и усиливает метаболизм через окисление жирных кислот [155]. В ряде исследований демонстрируется, что активация JAK2/STAT3 стимулирует M2 поляризацию

макрофагов, что усиливает иммуносупрессию посредством подавления секреции Ил-1, Ил-6 и ФНО- α [156–158]. Однако в случае онкологических заболеваний активация JAK/STAT3 может иметь негативное последствие, поскольку усиление преобладания M2 макрофагов в опухолевом микроокружении может стимулировать прогрессирование и метастазирование опухолей [158]. При этом стоит учесть, что не во всех случаях активация JAK/STAT3 приводит к усилению M2 поляризации макрофагов, например, на модели острого панкреатита активность JAK2/STAT3 была повышена, при этом ингибирование JAK2 усиливало M2 поляризацию макрофагов, что сопровождалось повышением секреции ИЛ-10 и TGF- β [159]. Пластичность функционирования JAK/STAT3 отражает сложную регуляцию активации макрофагов, обусловленную влиянием разнообразных сигналов микроокружения. В зависимости от состава цитокинового окружения и сочетания внешних стимулов данный путь может приводить как к формированию M1-подобного, так и M2-подобного фенотипов макрофагов [160,161].

Транскрипционный фактор NF- κ B выступает одним из центральных регуляторов экспрессии воспалительных генов и играет ключевую роль в координации провоспалительных реакций макрофагов и других клеток врожденного иммунитета [142]. Изменение экспрессии данного фактора приводит к широкому спектру заболеваний, связанных с хроническим воспалительным процессом [162]. NF- κ B сигнальный путь активируется через TLR, которые распознают PAMP, например, ЛПС, использующийся для индукции M1 активации макрофагов *in vitro* [163]. Данный сигнальный путь активируется через ЛПС по классическому MyD88-зависимому механизму, а также через регуляторный фактор интерферона 3 [163]. Образующийся в ходе передачи сигнала TLR димер p65/p50 NF- κ B стимулирует M1 поляризацию макрофагов, и усиливает экспрессию генов, кодирующих воспалительные цитокины, таких как Ил-1 β , Ил-6 и ФНО- α [164]. Сигнальный путь NF- κ B тесно связан с JAK/STAT1 сигнальным путем, и их взаимная активация приводит к усилению M1 поляризации макрофагов [165]. Однако TLR4-MyD88-NF- κ B сигнальный путь может опосредованно способствовать усилению M2 поляризации макрофагов, увеличивая экспрессию

ИЛ-10 и CD163 посредством усиления экспрессии STAT3 [166]. Также ингибирование NF-κB приводило к снижению экспрессии STAT3, что сопровождалось усилением M1 активации макрофагов [166]. Разнообразное влияние NF-κB сигнального пути на M1 и M2 поляризацию макрофагов демонстрирует широкое разнообразие и сложность регуляции иммунного ответа у клеток врожденной иммунной системы [167].

В регуляции поляризации макрофагов важную роль играют пути Notch и PI3K/Akt. Они регулируют выживаемость, пролиферацию и миграцию макрофагов [142]. Notch4 положительно влияет на M2 поляризацию, активируя передачу сигналов STAT3 и понижая STAT1, что сопровождается уменьшением экспрессии поверхностных маркеров M1 состояния CD80 и CD86 [168]. PI3K/Akt путь имеет схожее воздействие с Notch на увеличение M2 активации макрофагов, ослабляя передачу сигналов TLR и NF-κB [169]. Делеция Akt1 отрицательно влияет на M2 поляризацию макрофагов, усиливая переход в M1 и повышая экспрессию iNOS, ФНО-α и Ил-6 [169]. В тоже время делеция Akt2 и Akt3 имеет обратный эффект и способствует изменению баланса M1/M2 в сторону M2 фенотипа [170,171]. Важную роль в модуляции фенотипической пластичности макрофагов играют посттрансляционные регуляторы экспрессии генов, такие как микроРНК, длинные некодирующие РНК [106]. На M1 поляризацию макрофагов положительно влияют микроРНК-9, микроРНК-155, микроРНК-125b и let-7b, а M2 поляризация макрофагов опосредована эффектом let-7b, микроРНК-146a, микроРНК-181a, микроРНК-223 [172]. Так, микроРНК-125b усиливает M1 поляризацию макрофагов, подавляя экспрессию IRF4 транскрипционного фактора, регулирующего M2 поляризацию [173]. МикроРНК let-7b является противовоспалительным регулятором поляризации макрофагов, усиливая противовоспалительную активацию M2 макрофагов через ингибирование TLR4 и NF-κB p65 и повышая экспрессию STAT3 при заживлении диабетических ран [166]. МикроРНК-146a снижает экспрессию iNOS посредством ингибирования IRF5, способствующей M1 поляризации макрофагов [174].

Регуляция фенотипической пластичности макрофагов является сложным и тонко настраиваемым процессом, нарушение которого несет риск возникновения аутоиммунных заболеваний или патологий, сопровождающихся хроническим воспалением. Клеточная терапия мезенхимными стромальными клетками и компонентами их секрета, в том числе внеклеточными везикулами, полученными из данного источника, являются перспективными направлениями терапии, обеспечивающим тонкое регулирование воспалительного процесса без оказания системных и выраженных побочных эффектов [166,175].

1.1.5. Роль макрофагов в хронических заболеваниях, связанных с воспалением и старением

Макрофаги являются важным элементом иммунной системы, обеспечивая как защитную функцию против различных патогенов, так и тканевый гомеостаз. Нарушение фенотипической пластичности макрофагов, в первую очередь, в сторону провоспалительного состояния, может являться как причиной, так и фактором развития, аутоиммунных, метаболических, дегенеративных и онкологических заболеваний [176]. Так, макрофаги способствуют негативному течению метаболических заболеваний, например, ожирения и сахарного диабета 2 типа, где нарушение метаболизма глюкозы является одним из основных звеньев патогенеза [177]. Также известна их негативная роль в развитии атеросклероза, который развивается вследствие нарушения обмена липидов [42]. При ожирении гипертрофированные адипоциты могут модулировать фенотип макрофагов в сторону M1 фенотипа, например, с помощью микроРНК-34а, которая подавляет экспрессию Kruppel-подобного фактора 4, способствуя M1 поляризации макрофагов [178]. Также при ожирении нарушаются процессы аутофагии макрофагов, усиливая их активацию, формируя провоспалительное микроокружение, которое может способствовать развитию ожирения, инсулинорезистентности инициации сахарного диабета 2 типа [179]. При данных

заболеваниях наблюдается повышенная активация M1 макрофагов, что сопровождается повышением секреции воспалительных цитокинов Ил-1, Ил-6 и ФНО- α [51,180]. Одним из факторов усиления M1 поляризации макрофагов у пациентов с сахарным диабетом 2 типа является усиление анаэробного гликолиза, сопровождающегося повышенным образованием молочной кислоты и ослаблением окислительного фосфорилирования, характерного для M2 макрофагов [181,182]. Макрофаги играют негативную роль в прогрессировании образования атеросклеротических бляшек посредством усиления M1 поляризации через активацию сигнального пути TLR4 окисленными липопротеинами низкой плотности [183,184]. M1 макрофаги способствуют затвердеванию атеросклеротических бляшек. Одним из подходов, ослабляющим этот процесс, является стимулирование аутофагии через активацию сигнального пути АКТ/mTOR [185].

Макрофаги входят в состав иммунных клеток, связанных с опухолью, и они могут способствовать благоприятному микроокружению опухоли, что усиливает выживаемость, пролиферацию, инвазию опухолевых клеток, а также приводит к усилению ангиогенеза [186]. Ассоциированные с опухолью макрофаги имеют различные фенотипы, например, демонстрируя активность характерную для M1 макрофагов, они способствуют противоопухолевому ответу совместно с другими иммунными клетками [187]. Однако по мере прогрессирования опухоли происходит смещение в сторону M2-фенотипа, сопровождающееся экспрессией характерных для M2 фенотипа поверхностных белков CD163 и CD206 и формированием иммуносупрессивного микроокружения, способствующего росту и метастазированию опухоли [188,189].

При аутоиммунных и дегенеративных патологиях макрофаги могут способствовать деструктивным процессам в органах и тканях при прогрессировании заболеваний [42]. РА и ОА представляют собой гетерогенные по этиологии и механизмам развития заболевания суставов, приводящие к значительному ухудшению качества жизни и являющиеся распространенной причиной инвалидности [8,190]. РА – это хроническое системное аутоиммунное

воспалительное заболевание, которое вызывает повреждение суставов, соединительных тканей, мышц, сухожилий и фиброзной ткани. Распространенность РА во всем мире составляет около 5 случаев на 1000 взрослых [191,192]. ОА – широко распространенное прогрессирующее заболевание суставов, характеризующееся дегенеративными процессами в суставном хряще, субхондральной кости, воспалением синовиальной оболочки. Факторами риска ОА, способствующими разрушению суставов и прогрессированию заболевания, являются пожилой возраст, генетическая предрасположенность, образ жизни, а также травмы суставов [193]. Синовит, развивающийся при ОА и РА, имеет различный состав иммунных клеток, вовлеченных в прогрессирование заболевания. Например, при РА в синовиальной оболочке происходит инфильтрация преимущественно Т-лимфоцитами, а при ОА более выражена активация макрофагов [194,195].

При РА и ОА происходит нарушение соотношения активности остеобластов и остеокластов, что приводит к разрушению и резорбции кости [196]. На усиленный остеокластогенез влияют М1 макрофаги, которые секретируют ФНО- α и Ил-1 β , активирующие синовиальные фибробласты, которые секретируют макрофагальный колониестимулирующий фактор и рецептор лиганда NF- κ B (RANKL). Оба фактора необходимы для выживания и созревания остеокластов [197–199]. ОА традиционно считался невоспалительным артритом, возникающим в результате механического повреждения хряща [200]. Однако несколько исследований показали, что одним из важных факторов патогенеза ОА является воспаление, которое развивается в ответ на гибель хондроцитов и разрушение компонентов внеклеточного матрикса хрящевой ткани [54]. DAMP, высвобождающиеся при повреждении хряща, запускают воспалительную активацию синовиальных фибробластов и макрофагов, что приводит к секреции ФНО- α , Ил-1, Ил-6 и ММП [201–203]. Модуляция фенотипов макрофагов является перспективной стратегией в терапии большого количества заболеваний, связанных с хроническим воспалением и старением. Перспективными выглядят подходы, эффективно модулирующие воспалительный процесс без выраженных побочных

эффектов с помощью терапии, основанной на применении компонентов секретома МСК – внеклеточных везикул.

1.2. Внеклеточные везикулы

1.2.1. Внеклеточные везикулы: классификация, биогенез

ВВ определяются Международным обществом внеклеточных везикул как «частицы, естественно выделяемые различными клетками, ограниченные липидным бислоем и неспособные к репликации из-за отсутствия функционального ядра» [204]. ВВ участвуют во взаимодействиях между клетками, активируя поверхностные рецепторы или транспортируя свой груз, такой как белки, нуклеиновые кислоты и липиды в клетки-мишени. ВВ могут служить биомаркерами различных физиологических состояний и патологий [205,206], а также участвовать в тканевых реакциях на повреждения и регенерацию [207,208]. Жидкофазные ВВ подразделяются на несколько классов, такие как микровезикулы, экзосомы, апоптотические тельца, [20]. Также ряд исследователей выделяют другие субпопуляции ВВ, например, твердофазные ВВ, которые могут быть связаны с ВКМ – матриксные везикулы, матрикс-связанные везикулы (МСВ) и мембраносвязанные везикулы – миграсомы [20]. ВВ привлекают широкое внимание исследователей как перспективные источники терапии ряда заболеваний в качестве наноплатформ доставки собственных эндогенных грузов, а также в качестве систем доставки лекарственных веществ [209,210].

Экзосомы представляют собой наночастицы эндосомального происхождения, со средним размером 30-150 нм [204,211]. Экзосомы образуются внутри клетки в ходе инвагинации мембраны эндосомы с формированием мультивезикулярных телец, содержащих внутрипросветные везикулы.[212]. На следующем этапе биогенеза экзосом мультивезикулярные тельца сливаются с плазматической мембраной в результате чего экзосомы высвобождаются в

межклеточное пространство [212,213]. Экзосомы можно дифференцировать от других типов ВВ с помощью эндосомальных маркеров CD9, CD63, CD81, tumor susceptibility gene (TSG)101 [214,215]. Микровезикулы представляют собой мембраносвязанные везикулы, высвобождающиеся путем отпочковывания мембраны [216]. Микровезикулы могут быть крупнее экзосом со средним размером 100-1000 нм, хотя их размеры могут перекрываться размерами экзосом [217]. Микровезикулы образуются путем наружного отпочковывания и деления плазматических мембран, что регулируется кальций-зависимыми путями, реорганизацией цитоскелета и плавучестью липидных рафтов [217,218]. Они несут поверхностные белки, отражающие их родительские клетки, такие как альфа-4-интегрины и фосфатидилсерин, способствующие почкованию мембраны [216]. Отличие биогенеза экзосом и микровезикул заключается в том, что экзосомы формируются внутри клетки в ходе формирования эндосом и созревания мультивезикулярных телец и выделяются при их слиянии с плазматической мембраной, тогда как микровезикулы образуются путем прямого выпячивания и отщипывания плазматической мембраны. [219]. Экзосомы, как и микровезикулы, могут связываться с ВКМ через поверхностные интегрины [220] и посредством неспецифических взаимодействий [221]. Апоптотические тельца представляют собой довольно крупную фракцию ВВ (средний размер от 1 до 5 мкм), они образуются в ходе апоптотической гибели клеток и состоят из относительно крупных субклеточных фрагментов [222]. Размер ВВ является распространенным критерием классификации из-за популярности методов изоляции, основанных на размерах. Исследователи используют термин «малые ВВ» для обозначения ВВ размером менее 100 или 200 нм и «средние/большие ВВ» для везикул размером более 200 нм [204]. Диапазоны размеров различных типов ВВ составляют 50–1000 нм для микровезикул, 30–150 нм для экзосом и МСВ и 50–5000 нм для апоптотических телец [20]. Из-за перекрытия размеров изолированные по размеру популяции ВВ, вероятно, гетерогенны, что требует осторожного использования терминологии.

ВВ можно классифицировать по фазе происхождения, например, жидкофазные ВВ и ВВ, полученные из твердой фазы ВКМ [55]. Помимо жидкофазных ВВ, которые секретируются преимущественно во внешнюю среду и имеют относительно ограниченное взаимодействие с ВКМ, исследователи также выделяют ВВ, связанные с компонентами ВКМ, например, матриксные везикулы и МСВ [20]. Матриксные везикулы были впервые обнаружены в кальцифицирующих тканях в 1960-1970-х годах с помощью трансмиссионной электронной микроскопии [223]. Недавние исследования выделили новый подтип ВВ – МСВ, ферментативно выделяемых из слизистых оболочек мягких тканей и ВКМ монослойных клеточных культур [53]. Липидомика, анализ белкового и микроРНК-содержимого МСВ показали, что они являются отдельной и уникальной субпопуляцией ВВ, отличающихся по составу от жидкофазных везикул, и обладают тканеспецифическими характеристиками [26,27]. Следовательно, МСВ считаются важной частью тканевого микроокружения, а их терапевтические свойства для регенеративной медицины были доказаны в первую очередь, основываясь на их иммуномодулирующей активности в отношении макрофагов [30,56]. Иногда МСВ и матриксные везикулы рассматриваются как подтипы микровезикул [30]. Данные везикулы выделяются из ткани с помощью ферментов, включающих в себя протеазы, расщепляющие ВКМ [30]. После чего протоколы изолирования ВВ, связанных с ВКМ, аналогичны подходам изолирования жидкофазных ВВ [26].

1.2.2. Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки как источник внеклеточных везикул: безопасность и терапевтическая эффективность

МСК являются одним из наиболее оптимальных и перспективных источников ВВ и привлекает внимание исследователей в качестве перспективного терапевтического средства для модуляции воспаления и стимуляции регенеративных процессов для широкого ряда заболеваний [224,225]. МСК

представляют собой негемопозитические веретенообразные клетки, обладающие адгезией к пластику, способностью к самообновлению, дифференцировке в хондрогенном, остеогенном, адипогенном направлениях [226,227]. Согласно Международной ассоциации клеточной терапии МСК характеризуются экспрессией поверхностных маркеров CD73, CD105 и CD90, при отсутствии экспрессии CD34, CD14, CD45, CD11b [227–230]. Изучение терапевтических свойств МСК для терапии воспалительных и дегенеративных заболеваний показало, что МСК оказывают терапевтическое действие на ткани-мишени, оказывая противовоспалительный эффект, стимулируя регенерацию за счет воздействия на клетки-мишени через паракринный эффект, а также воздействуя на них через межклеточные контакты [231,232]. Иммуносупрессивный эффект МСК может осуществляться через межклеточный контакт с Т-клетками и естественными киллерами (NK)-клетками путем взаимодействия экспрессируемых МСК поверхностного HLA-G – иммуномодулирующей неклассической молекулы МНС-I, которая способна подавлять действие активирующих NK-рецепторов [233,234].

При воспалительных заболеваниях опорно-двигательного аппарата, таких как ОА и РА, наблюдается нарушение баланса между провоспалительными и регуляторными иммунными реакциями. Это выражается в увеличении доли M1-макрофагов и Th1/Th17 Т-клеток при одновременном снижении числа M2-макрофагов и Treg-клеток [235–238]. МСК способствуют восстановлению иммунного гомеостаза за счёт усиления толерогенных свойств Treg и дендритных клеток, реализуя данный эффект через активацию фермента индоамин-2,3-диоксигеназу, катализирующего превращение триптофана в кинуренин, что приводит к подавлению пролиферации Т-клеток и усилению иммунной толерантности [239]. МСК, полученные из костного мозга, могут ослаблять провоспалительную среду в суставах при ОА и РА, индуцируя поляризацию макрофагов в M2-фенотип *in vitro* и *in vivo* [50]. Увеличение доли противовоспалительных M2 макрофагов приводит к снижению секреции цитокинов ФНО- α , ИФН- γ , Ил-1, Ил-6, при этом усиливая образование факторов,

связанных с подавлением иммунного ответа и стимуляцией регенерации Ил-10, TGF- β [50,240].

Терапия МСК относительно безопасна, но остаются вопросы относительно потенциальной иммуногенности этих клеток, рисков тромбоза и опухолевой трансформации при введении *in vivo* [15,241]. В настоящее время считается, что МСК обладают регенеративным потенциалом благодаря паракринной активности, обусловленной различными секретируемыми факторами, к которым относятся ВВ [241]. На данный момент показано, что ВВ обладают слабой способностью индуцировать иммунный ответ, поскольку при переливании крови в организм реципиента попадают ВВ из крови донора, но при этом не наблюдается выраженных побочных эффектов [242]. Также ВВ могут понижать токсичность лекарственных веществ, поскольку они инкапсулированы в бислойную мембрану, а благодаря высокой тропности ВВ к поврежденным тканям они оказывают меньшее количество побочных эффектов, обусловленных специфическим взаимодействием с рецепторами клеток [242]. Систематический обзор применения клеточной терапии на основе МСК показал, что МСК обладают хорошим профилем безопасности [243]. Однако, у ряда пациентов на фоне применения МСК возникает лихорадка, что говорит о потенциальной иммуногенности МСК, обусловленной наличием экспрессии иммуногенных белков, таких как МНС [243,244]. В ходе доклинического исследования было показано, что ВВ, загруженные якорными пептидами и олигопептидами переключения сплайсинга для лечения мышечной дистрофии, не показали побочных эффектов на органах мышцы печени, почках и мышцах после внутривенного введения [245]. В последние годы проводится 11 клинических испытаний, направленных на оценку профиля безопасности и эффективности терапии, основанной на применении внеклеточных везикул, где демонстрируется относительно высокая степень безопасности ВВ [242]. МСВ и их эффекты на данный момент были изучены преимущественно для везикул, полученных из ВКМ децеллюляризованных слизистых оболочек мягких тканей, при этом был продемонстрирован выраженный их терапевтический потенциал при отсутствии выраженного токсического и иммуносупрессивного действия [28,246].

МСК представляют собой перспективный источник МСВ помимо ВВ из кондиционированной среды (ВВ/КС), что было показано в ряде исследований, сравнивающих терапевтический потенциал ВВ/КС МСК, и МСВ из ВКМ МСК [26,53,247]. В этом исследовании была использована преимущественно МСК-ПК человека для получения ВВ/КС и МСВ, поскольку этот источник ВВ имеет ряд преимуществ. Так, данный вид МСК обладает высокой скоростью пролиферации и проявляет выраженный иммуносупрессивный эффект. Кроме того, пуповина – относительно доступный источник [248,249].

1.2.3. Влияние внеклеточных везикул, полученных из мезенхимных стромальных клеток, на функциональную активность макрофагов

Экзосомы и другие типы ВВ, полученные из МСК, являются одним из основных паракринных факторов, обеспечивающих регенеративный эффект секрета МСК посредством модуляции воспалительной активации макрофагов [250]. ВВ, полученные из МСК пуповины человека, усиливают восстановление двигательных функций *in vivo* благодаря увеличению локального количества макрофагов М2 подтипа, что сопровождается уменьшением содержания воспалительных цитокинов: ФНО- α , Ил-6 и ИФН- γ [251]. ВВ-МСК жировой ткани обладали противовоспалительным эффектом, уменьшая воспалительный процесс в печени, индуцированный ЛПС в сочетании D-галактозамином, посредством ослабления активации инфламмосомы NOD-, LRR- и пирин-содержащего белка 3 (NLRP3) через микроРНК-17 в макрофагах печени мыши [252]. ВВ из секрета МСК пуповинной крови человека регулируют переход от М1 к М2 фенотипу макрофагов, подавляя экспрессию фактора, ассоциированного с рецептором фактора некроза опухоли [57]. Помимо регуляции секреции провоспалительных цитокинов ВВ-МСК модулируют метаболические процессы в митохондриях макрофагов [253]. М1-макрофагам при активации в ответ на патогенные микроорганизмы требуется быстрое поступление аденозинтрифосфата

аденозинтрифосфата (АТФ) для интенсивной генерации активных форм кислорода, поэтому у них преобладает анаэробный гликолиз, обеспечивающий высокую скорость синтеза АТФ при относительно низкой энергетической эффективности в виде выхода АТФ [254]. М2-макрофаги, участвующие в поддержании тканевого гомеостаза и ремоделировании ВКМ, нуждаются в стабильном и продолжительном обеспечении энергией; в их митохондриях доминирует окислительное фосфорилирование жирных кислот, обеспечивающее медленный, но более высокий выход АТФ на молекулу субстрата. [255]. К одному из факторов перехода от провоспалительной активации М1 макрофагов к противовоспалительному М2 фенотипу макрофагов является изменение энергетического метаболизма в митохондриях от анаэробного гликолиза к окислительному фосфорилированию, что положительно сказывается на восстановлении функций митохондрий и снижении продукции активных форм азота [256]. На уровне ВВ, полученных из МСК костного мозга, был продемонстрирован положительный эффект на модуляцию метаболизма митохондрий посредством снижения экспрессии индуцируемого гипоксией фактора-1 α (HIF-1 α) и усиления метаболизма, основанного на окислительном фосфорилировании, что сопровождается М2 активацией макрофагов с повышенной фагоцитарной активностью [253,257]. Экзосомы из МСК жировой ткани переносят компоненты митохондрий, восстанавливая функцию поврежденных воздействием ЛПС альвеолярных макрофагов. Они способствуют восстановлению митохондриального мембранного потенциала, активности окислительного фосфорилирования и выработке АТФ, а также устраняют окислительный стресс, индуцированный воспалительным активатором [258]. Способность ВВ, полученных из МСК, модулировать воспаление посредством изменения функциональной активности макрофагов является перспективным подходом для ослабления деструктивных процессов в органах и тканях в результате хронического воспаления, обусловленного активностью М1 макрофагов, а также для стимуляции регенеративных процессов с помощью усиления М2 поляризации макрофагов.

МСВ обладают высоким регенеративным потенциалом, в первую очередь, основанный на их иммуномодулирующей активности в отношении изменения соотношения М1/М2 поляризации макрофагов [30,259]. МСВ являются компонентом ВКМ мягких тканей, монослойных клеточных культур и сфероидов [53,260]. Данные ВВ содержат различные микроРНК, такие как микроРНК 125b-5p, 143-3p и 45-5p, влияющие на сигнальные пути макрофагов М1, способствуя увеличению количества макрофагов М2 [25]. МСВ группа отличаются от других субпопуляций ВВ составом липидной мембраны, поверхностными рецепторами, а также внутренним содержимым, а именно сигнальными молекулами [55]. В отличие от жидкофазных ВВ, МСВ содержат меньше CD63, CD81 и CD9, кроме того, МСВ отличаются и белковым составом [26]. Это позволяет предположить, что МСВ являются отдельной субпопуляцией нановезикул, биологическая активность которых проявляется при разрушении внеклеточного матрикса во время повреждения ткани [27]. МСВ, полученные из слизистой оболочки тонкого кишечника и матрикса мочевого пузыря, оказывали иммуномодулирующий эффект на М1 макрофаги, снижая экспрессию iNOS, ФНО- α , и усиливая экспрессию аргиназы-1, а также способствовали усилению способности М1 макрофагов к фагоцитозу, что демонстрирует переход мышинных М1 макрофагов, полученных из костного мозга М1 макрофагов в М2-подобный фенотип [25]. Богатый протеомный состав МСВ также может объяснять иммуномодулирующую активность этих везикул по отношению к макрофагам. Ил-33, содержащийся в МСВ, способствует формированию репаративного фенотипа макрофагов через сигнальный путь Ил33/ST2 и способствует метаболическому перепрограммированию клеток, включающему усиленное окислительное фосфорилирование и поглощение жирных кислот [261,262]. На сегодняшний день опубликовано исследование, в котором подробно изучается протеомный профиль МСВ и жидкофазных ВВ, полученных из МСК пуповины человека, с помощью масс-спектрометрии [26]. Оба типа везикул содержали множество участвующих в организации внеклеточного матрикса и иммунорегуляторных белков. Однако, в этом исследовании в образцах МСВ, полученных из МСК, не был обнаружен Ил-33 [262]. Таким образом,

иммуномодулирующие эффекты на поляризацию M1 макрофагов МСВ из МСК пуповины человека и МСВ из децеллюляризованных ВКМ могут иметь разную природу, основанную на особенностях тканей и клеток, продуцирующих МСВ [26,261]. Среди перечисленных выше факторов, влияющих на развитие воспаления, бислойные липидные мембраны МСВ являются богатым источником липидных медиаторов, которые принимают участие на разных стадиях воспаления и в последующей регенерации ткани. В ходе липидного исследования было выяснено, что липидные мембраны МСВ содержат большое количество арахидоновой (20:4) и докозагексаеновой кислоты (22:6), а также другие полиненасыщенные молекулярные виды липидов. Кроме того, МСВ, но не малые ВВ из секрета фибробластов NIH-3T3, обогащены оксигенированными фосфолипидами и, следовательно, представляют собой потенциальный резервуар липидных медиаторов, этерифицированных в различные виды фосфолипидов. Эти оксигенированные фосфолипиды могут гидролизоваться фосфолипазами А2 с высвобождением липидных медиаторов, связанных с поляризацией макрофагов в провоспалительное M1 или противовоспалительное M2 фенотипы [27].

1.2.4. Терапевтические свойства внеклеточных везикул в модуляции воспаления и дегенеративных процессов на примере остеоартрита

МСК и компоненты их секрета, в первую очередь ВВ, продемонстрировали большой потенциал для лечения различных дегенеративных заболеваний, при которых хроническое воспаление является ключевым патогенным фактором [263,264]. Остеоартрит – это дегенеративное заболевание суставов, поражающее различные ткани преимущественного коленного и тазобедренного суставов [6]. В прогрессировании остеоартрита важную роль играют нарушения механических свойств мениска, субхондральной кости, а также развитие фиброза в инфрапателлярной жировой подушке и синовиальной мембране [6,265–267]. В формировании воспалительного процесса при ОА важную

роль играют синовиальные фибробласты и тканевые макрофаги синовиальной оболочки и инфрапателлярной жировой подушки, которые в ответ на образование DAMP, высвобождающихся при повреждении хрящевой ткани, активируются и секретируют провоспалительные факторы, такие как ФНО- α , Ил-1 β , Ил-6 и ММП [201–203]. Одним из многообещающих терапевтических подходов терапии ОА является способность ВВ изменять иммунную среду в тканях суставов, способствуя перепрограммированию макрофагов из М1 в М2 – состояние с регенеративными и иммунорегуляторными свойствами, обусловленное секрецией противовоспалительных и трофических факторов [268,269].

Одна из распространённых клеточных моделей ВВ-терапии при ОА включает в себя хондроциты, обработанные ИЛ-1 β , где ВВ из секрета МСК костного мозга и других источников снижают уровень апоптоза и катаболических процессов в хондроцитах и улучшают их миграцию, выживаемость и пролиферацию [270,271]. В исследовании ОА, индуцированного монойодацетатом, ВВ из стволовых клеток амниотической жидкости снижали экспрессию ко-рецептора CD86, связанного с поляризацией макрофагов в М1 состояние. В THP-1 макрофагах М1 фенотипа данные ВВ повышали экспрессию маркеров CD163 и аргиназы-1, связанных с М2 фенотипом [58]. Упомянутые выше ВВ также способствовали уменьшению деструктивных процессов в хрящевой ткани коленных суставов у крыс с индуцированным монойодацетатом ОА, снижая экспрессию связанных с воспалением белков, например, индуцируемой синтазой оксида азота (iNOS) и повышая экспрессию SOX-9, которая связана с анаболическими процессами в хондроцитах гиалинового хряща [58]. Жидкофазные ВВ МСК пуповины демонстрируют выраженный противовоспалительный эффект, снижая секрецию воспалительного цитокина Ил-1 β и NLRP3 [272]. Кроме того, это исследование показало терапевтическую эффективность ВВ, полученных из МСК пуповины человека, на животной модели ОА, вызванного разрушением медиального мениска. Данные везикулы способствовали увеличению количества белков, связанных с восстановлением внеклеточного матрикса, таких как коллаген II типа, альфа-1, агрекан в гиалиновом хряще, а также снижали активность протеаз (ADAMTS-5 и

ММП-13), связанных с разрушением внеклеточного матрикса во время прогрессирования ОА [272]. ВВ продемонстрировали значительный терапевтический эффект при лечении ОА на клеточных и животных моделях, положительно влияя на ослабление катаболического фенотипа хондроцитов и снижая процессы деградации внеклеточного матрикса гиалинового хряща и субхондральной кости, а также оказывая противовоспалительное действие, способствуя поляризации макрофагов от фенотипа M1 к фенотипу M2 [250,273]. ВВ, полученные из МСК жировой ткани и содержащие микроРНК-34, оказали ингибирующее противовоспалительное действие на макрофаги, способствуя поляризации макрофагов M2 за счет подавления передачи сигналов NF-κB, таких как IRAK1 и TRAF6 [274,275]. Ингибирование сигнального пути NF-κB имеет решающее значение в терапии ОА, поскольку повышенная экспрессия этого ядерного фактора индуцирует продукцию воспалительных цитокинов Ил-1β и протеаз, таких как ММП [276]. МСВ также показали многообещающие результаты при РА – воспалительном заболевании суставов аутоиммунной природы [56]. Данный тип везикул продемонстрировал терапевтический эффект, аналогичный эффекту метотрексата, стандартного препарата для лечения РА, увеличивая популяцию M2-подобных макрофагов CD43^{hi}/His48^{lo}/CD206⁺ и снижая секрецию провоспалительных хемокинов CXCL10 и MCP-3, уровни которых были измерены в сыворотке крови крыс с острым и хроническим РА [56].

ВВ, полученные как из секретома, так и из ВКМ МСК, представляют собой перспективные терапевтические технологии для модуляции дегенеративных и воспалительных заболеваний различного генеза. Воздействие ВВ на макрофаги является многообещающей мишенью, исходя из их способности модулировать воспалительный процесс, изменяя направление поляризации с M1 воспалительного фенотипа к M2 фенотипу с противовоспалительным фенотипом. Изучение эффектов МСВ и жидкофазных ВВ на функциональную активность макрофагов человека, экспрессию генов и белков, связанных с провоспалительным фенотипом, а также механизмов, лежащих в основе регуляции фенотипической пластичности, является перспективным направлением исследований.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Выделение мезенхимных стромальных клеток

МСК человека были предоставлены биобанком Института регенеративной медицины Научно-технологического парка биомедицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). МСК выделяли из подкожной жировой ткани, слизистой ротовой полости в области десны и основного вещества пупочного канатика. В соответствии с Хельсинкской декларацией, образец были взяты после того, как донор подписал форму информированного согласия, одобренную местным комитетом по этике Сеченовского университета (№ 16–21, 16 сентября 2021 г., Москва, Россия). Забор биоматериала осуществляли с соблюдением правил асептики и антисептики. Дальнейшую обработку биоматериала проводили в стерильных условиях ламинарного бокса II-го класса биологической защиты в течение 2 часов после сбора.

Подкожная жировая ткань. Биоптаты подкожной жировой ткани брюшной полости тщательно промывали раствором Хэнкса (ПанЭко, Россия), содержащим флуконазол (Pfizer, США), гентамицин (50 мкг/мл, PanEco, Россия) и пенициллин/стрептомицин (100 ЕД/мл и 100 мкг/мл, Sigma, США). После измельчения образцов жировой ткани с помощью ножниц до фрагментов размером около 1 мм³ образцы помещали в конические пробирки и добавляли четырёхкратный объём раствора 0,1 % коллагеназы I типа (Gibco, США) в модифицированной среде Игла (DMEM)D/F12, дополненной 2 mM L-глутамина и 50 мг/мл гентамицина. Ферментативную диссоциацию проводили при 37 °C в течение 20 минут, после чего реакцию ферментативного расщепления останавливали добавлением трёхкратного объёма DMEM/F12 с 10 % фетальной бычьей сыворотки (FBS) (Thermo Fisher, США) и пенициллина/стрептомицина (100 ЕД/мл и 100 мкг/мл, Sigma, США) и 2 mM l-глутамина (BioloT, Россия). Пробирки

центрифугировали при 100 g в течение 10 минут, надосадочную жидкость удаляли, а клетки ресуспендировали в свежей питательной среде DMEM/F12 с добавлением 2 mM L-глутамина, 10% FBS и пенициллин/стрептомицин (100 ЕД/мл/100 мкг/мл) и высевали в чашки Петри.

Десна. Образцы биоптатов ткани десны промывали в растворе α -MEM (Sigma, США), содержащем гентамицин (50 мкг/мл, Sigma, США). в течение 12 ч. Затем ткань десны измельчали на стерильные фрагменты (~3 мм) и подвергали ферментативной обработке в 0,05 % растворе коллагеназы II (Gibco, США) в среде α -MEM с добавлением 10 % FBS и гентамицина (50 мкг/мл). Инкубацию проводили при 37 °C в течение 12 ч. Полученную клеточную суспензию центрифугировали при 200g (10 мин, комнатная температура), осадок ресуспендировали в питательной среде DMEM/F12, дополненной 10 % FBS, 2 mM L-глутамина и пенициллином/стрептомицином (100 ЕД/мл/100 мкг/мл), после чего клетки высевали в чашки Петри.

Пупочный канатик. Для выделения МСК фрагменты пуповины длиной около 2 см промывали от остатков крови PBS, содержащим флуконазол, гентамицин (50 мкг/мл) и пенициллин/стрептомицин 100 ЕД/мл/100 мкг/мл. Затем сделали продольные разрезы, чтобы можно было удалить пупочную вену и пупочные артерии. После удаления сосудов образцы измельчали до фрагментов порядка 1 мм³ и инкубировали в смеси, включающей 0,2 % коллагеназу NB4 (Serva, Германия), 0,005 % гиалуронидазу (Sigma, США) и 10 % Accutase (BD Biosciences, США) в среде DMEM/F12, дополненной 2 mM L-глутамина и 50 мкг/мл гентамицина. Ферментативную реакцию проводили при 37 °C в течение 90 минут при постоянном перемешивании на Mini Rocker-Shaker (Biosan, Латвия). Полученную суспензию фильтровали через 70-мкм сито (Sigma, США) и центрифугировали при 100 g в течение 7 минут. Осадок клеток ресуспендировали в свежей среде DMEM/F12 с добавлением 10 % FBS, 2 mM L-глутамина и антибиотиков, затем высевали в чашки Петри.

2.2. Культивирование монослойных культур мультипотентных мезенхимных стромальных клеток

Клетки культивировали при температуре 37 °С в атмосфере с содержанием CO₂ 5%. Клетки культивировали в полной питательной среде, состоящей из DMEM/F12 (1:1) (Gibco, Норристаун, Пенсильвания, США), дополненной 10% FBS (HyClone, Логан, Юта, США), L-глутамином 2 мМ (Биолот, Новосибирск, Россия), гентамицином 50 мкг/мл (ПанЭко, Москва, Россия), инсулин-трансферрин-селеном 1:100 (Биолот, Россия), bFGF 20 нг/мл (Проспек, Реховот, Израиль). Среду меняли каждые 2–3 дня. Для характеристики иммунофенотипа и выделения ВВ использовали клетки не старше 4-го пассажа. Клетки не подвергались пассированию до 14 дней перед выделением ВВ для лучшего накопления внеклеточного матрикса. За 48 часов до выделения ВВ питательную среду удаляли, а чашки Петри трижды промывали сбалансированным солевым раствором Хэнкса для удаления остатков сыворотки. Затем клетки оставляли в среде DMEM/F12 без сыворотки с добавлением 2 мМ L-глутамин (Biolog, Россия)

2.3. Культивирование мультипотентных мезенхимных стромальных клеток в виде сфероидов

Сфероиды клеток (2000 клеток в каждом сфероиде) сформировали в агарозном неадгезивном микропланшете планшете по 1 планшету на лунку 12-луночного планшета. В данный планшет после стерилизации ультрафиолетом в стерилизаторе микроцид (Микроцид, Россия) была добавлена суспензия клеток в концентрации приблизительно 512 тыс в 140 мкл полной питательной среды, состоящей из DMEM/F12 (1:1) (Gibco, Норристаун, Пенсильвания, США), дополненной 10% FBS (HyClone, Логан, Юта, США), L-глутамином 2 мМ (Биолот, Новосибирская область, Россия), гентамицином 50 мкг/мл (ПанЭко, Москва, Россия), инсулин-трансферрин-селеном 1:100 (Биолот, Россия), bFGF 20 нг/мл (Проспек, Реховот, Израиль). Планшеты были культивированы в течение 5 дней,

после чего была заменена питательная среда на бессывороточную DMEM/F12 (1:1) (Gibco, Норристаун, Пенсильвания, США), после 48 часов культивирования кондиционированная среда и сфероиды использовались для выделения внеклеточных везикул, описанного в следующем разделе.

2.4. Анализ экспрессии поверхностных маркеров мультипотентных мезенхимных стромальных клеток с помощью проточной цитометрии

МСК, полученные из различных источников на 4 пассаже, обрабатывали раствором Версена (Invitrogen, Уолтем, Массачусетс, США) и 0,25%-ным раствором трипсина (Invitrogen, США) для получения суспензий из отдельных клеток. Полученные суспензии клеток, содержащие не менее 1 миллиона клеток в каждой, дополнительно промывали PBS для удаления остатков питательной среды. Полученные суспензии МСК были окрашены антителами к CD105, CD73, CD90, CD44, CD19, CD11beta, CD45 и CD34 (набор для анализа МСК человека, BD Stemflow™, Сан-Диего, Калифорния, США). Окрашивание проводилось в соответствии с протоколом производителя. В качестве контроля использовались клетки, окрашенные с помощью изотипического контроля из набора (BD Stemflow™ набор для анализа МСК человека), и неокрашенные клеточные суспензии. После 15-минутной инкубации образцы промывали PBS с 1% FBS (HyClone, Логан, Юта, США) и исследовали с помощью проточного цитометра Sony SH800 (Sony Biotechnology, Сан-Хосе, США). Для установления базовых уровней флуоресценции использовали клеточные суспензии без окрашивания антителами. Специфичность связывания антител оценивали путем сопоставления сигналов неокрашенных образцов с изотипическими контролями. Интенсивность флуоресценции для каждого маркера сравнивали с соответствующим изотипическим контролем.

2.5. Выделение матрикс связанных везикул и внеклеточных везикул из кондиционированной среды мультипотентных мезенхимных стромальных клеток

За 48 часов до выделения ВВ чашки Петри с монослойными культурами МСК и планшеты со сфероидными МСК трижды промывали сбалансированным солевым раствором Хэнкса для удаления остатков ВВ и белков, содержащихся в FBS и далее культивировали в бессывороточной среде DMEM/F12 с добавлением 2 mM L-глутамин (Biolot, Россия).

При выделении МСВ из монослойных клеточных культур кондиционированную среду из чашек Петри отбирали для последующего выделения ВВ/КС, а поверхность чашек Петри с монослойными МСК трижды промывали раствором стерильного PBS для удаления остатков кондиционированной среды. Протеолиз внеклеточного матрикса для выделения МСВ из монослойной клеточной культуры осуществляли путем добавления в каждую чашку Петри 1 мл следующего раствора ферментов : диспазы (1,5 Ед/мл, Gibco™, 17105041, Гранд-Айленд, Нью-Йорк, США), коллагеназы I (2 мг/мл, Gibco™, 17100017) и коллагеназы II (1 мг/мл, Gibco™, 17101015). Чашки Петри инкубировали с протеазами при температуре 37 °C в течение 60 минут.

Для выделения МСВ из ВКМ сфероидов, кондиционированную среду из лунок 12-луночного планшета отбирали для выделения ВВ/КС, после чего агарозные микропланшеты в каждой лунке промывали 3 раза PBS, для высвобождения из них сфероидов. Суспензия сфероидов была осаждена с помощью центрифугирования (при 400×g в течение 10 минут), после чего надосадочная жидкость была слита и был проведен протеолиз внеклеточного матрикса сфероидов для выделения МСВ путем добавления в каждую пробирку 1 мл раствора ферментов, указанного выше: диспазы (1,5 Ед/мл, Gibco™, 17105041, Гранд-Айленд, Нью-Йорк, США), коллагеназы I (2 мг/мл, Gibco™, 17100017) и коллагеназы II (1 мг/мл, Gibco™, 17101015). Суспензию сфероидов для выделения МСВ из ВКМ инкубировали с раствором протеаз в течение 90 минут при 37 °C.

Последующий протокол выделения МСВ из сфероидов и монослойных клеточных культур осуществляли при параметрах, аналогичных выделению ВВ из кондиционированной среды. После проведения протеолиза ВКМ, использовавшегося для получения МСВ, образцы, содержащие МСВ, а также предварительно отобранную кондиционированную среду МСК, содержащую ВВ/КС, переносили в отдельные центрифужные пробирки. Последовательно выполняли центрифугирование при 400 g в течение 10 минут и при 2500 g в течение 20 минут в охлажденной центрифуге до +4. Далее надосадочные фракции, содержащие ВВ/КС и МСВ, помещали в пробирки для ультрацентрифугирования и подвергали центрифугированию при 10 000 g в течение 30 минут при 4°C. Супернатанты ВВ/КС и МСВ, отобранные из центрифужных пробирок, были пропущены через шприц-фильтр PES с размером пор 0,22 мкм (ALWSCI Technologies, Шаосин, Китай). Ультрацентрифугирование ВВ проводилось дважды при 120 000g в течение 90 минут при 4°C (Optima XPN-100, Beckman Coulter, Индианаполис, Индиана, США). После ультрацентрифугирования надосадочную жидкость слили, а осадок суспендировали в стерильном PBS, пропускали через шприц-фильтр PES с размером пор 0,22 мкм и хранили при –80 °C.

2.6. Оценка морфологии и размера матрикс связанных везикул и внеклеточных везикул из кондиционированной среды мезенхимных стромальных клеток пупочного канатика человека

Для нормирования добавок ВВ-МСК, в образцах выделенных ВВ измеряли концентрацию белка с помощью набора для анализа белка QuantiPro™ BCA (Sigma-Aldrich Co. LLC, Берлингтон, Массачусетс, США), после чего все образцы были разбавлены PBS до конечной концентрации белка примерно 150 мкг/мл. Для анализа морфологии ВВ с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) образцы ВВ помещали на углеродные сетки для ПЭМ (Ted Pella, Реддинг, Калифорния, США). ВВ наносили на сетки на 3 минуты, дважды контрастировали ацетатом уранила (1% водный раствор) и высушивали на воздухе. Морфологию ВВ

изучали с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEM-1011 (Jeol, Токио, Япония). Средний размер МСВ, полученных из ВКМ и ВВ/КС МСК определялся с помощью прибора Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, Малверн, Великобритания) Для проведения анализа пробы вносили в одноразовую кювету DTS0012 (Malvern Panalytical) и выдерживали в приборе при комнатной температуре в течение 120 секунд для стабилизации образца и выравнивания температуры. Измерение интенсивности рассеяния света проводили при угле детекции 173° (режим обратного рассеяния) с использованием гелий-неонового лазера с длиной волны 633 нм. Каждую пробу анализировали трижды, при этом количество повторов в каждом отдельном измерении задавалось автоматически программным обеспечением прибора в зависимости от качества сигнала.

2.7. Анализ маркеров матрикс связанных везикул и внеклеточных везикул из кондиционированной среды в мезенхимных стромальных клеток пупочного канатика человека методом вестерн-блоттинга

Анализ положительной экспрессии экзосомальных маркеров в образцах МСВ и ВВ/КС проводили с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии SDS с последующим вестерн блоттингом. Для подтверждения отсутствия выраженной экспрессии в ВВ внутриклеточных контаминантных белков, содержащихся в МСК-ПК (источнике ВВ обоих типов), МСК-ПК 4 пассажа подвергали лизису с помощью RIPA буфера с ингибитором протеаз-фосфатаз в течение 10 минут на холоде. После лизиса клеток клеточный дебрис осаждали с помощью центрифугирования 10000g 10 минут. После чего образцы лизатов хранили на -80°C . Для нанесения образцов на акриламидный гель лизаты МСК-ПК и образцы МСВ и ВВ/КС предварительно обработали 4-кратным буфером Леммли и подвергли электрофорезу вместе с ВВ/КС и МСВ в 12%-ном полиакриламидном геле с использованием вертикальной камеры (BioRad, Геркулес, Калифорния, США). На каждую дорожку наносили по 15 мкг белка ВВ обоих типов и клеточного лизата МСК-ПК. Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану с размером пор

0,2 мкм (BioRad, США) осуществлялся с помощью системы полусухого блоттинга Power Blotter (Invitrogen, США) и 10-ступенчатого буфера для переноса Power Blotter (Invitrogen, США). Затем мембрану промывали трис-буфером с 0,1% твином (TBST) и инкубировали в блокирующем растворе (5% БСА в TBST) в течение 1 ч. Затем мембрану инкубировали в течение ночи с первичными антителами против положительных экзосомальных маркеров CD9 в разведении 1:1000 (Abcam, ab223052), CD63 в разведении 1:1000 (Abcam, ab68418), Calnexin в разведении 1:1000 (Abcam, ab10286), GAPDH в разведении 1:2000 (CAB932Hu22, Cloud-Clone, КНР). Промывали TBST и инкубировали со вторичными антителами специфичными к иммуноглобулину G кролика, конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP), в разведении 1:10000 (Arigobio, Ханчжоу, Китай). Полосы белков были обнаружены с помощью набора ECL (Thermo Fisher, Уолтем, Массачусетс, США). Обнаружение сигнала проводилось с помощью системы визуализации iBright CL1500 (Invitrogen, США).

2.8. Протеомный анализ матрикс связанных везикул и внеклеточных везикул из кондиционированной среды, полученных из мезенхимных стромальных клеток пупочного канатика человека

Для анализа протеомного состава ВВ/КС и МСВ, полученных из МСК-П, с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) в технических дубликатах были отобраны МСВ и ВВ/КС из секрета МСК-ПК из монослойных культур МСК-ПК. В исследовании было использовано по 8 образцов ВВ обоих типов, которые были получены из МСК от 4 доноров (2 технических повтора на каждый тип ВВ) итоговое число образцов составило 8 на каждый вид ВВ. ВВ подвергались лизису в буфере (4% SDS и 50 мМ TRIS HCl [pH=8] с ингибиторами протеаз [Sigma–Aldrich GE80-6501-23]) в течение 30 минут при 60°C. Затем дисульфидные связи в образцах восстановили с помощью дитиотреитола (ДТТ) 5 мМ в течение 30 минут при 50°C. Далее к образцам добавляли йодоацетамид 10 мМ и инкубировали в

темноте при комнатной температуре 20 минут, ингибирование реакции с йодоацетамидом осуществлялось с помощью ДТТ 5 мМ. После осаждения белков с использованием смеси метанола/хлороформа полученный полусухой белковый осадок растворяли в 50 мкл 8М мочевины, 2М тиомочевины, 10 мМ TRIS-HCl с доведением значения pH до 8. Концентрацию белка в образцах измеряли методом Брэдфорд, образцы ВВ для анализа на ВЭЖХ-МС/МС нормировали по белку и отобрали по 20 мкг на каждый образец. Образцы были разведены до 50 мМ с помощью раствора гидрокарбоната аммония с целью снизить концентрацию мочевины до 2М. Протеолиз образцов осуществили трипсином (Promega, #V511A) в соотношении 1:100 м/м при 37°C в течение 14 часов. На следующем этапе трипсин был ингибирован посредством добавления трифторуксусной кислоты до конечной концентрации 0,5%. Триптические пептиды очищали на мембране SDB-RPS (Sigma–Aldrich, 66886-U), высушивали в вакууме и хранили при -80°C перед ВЭЖХ-МС/МС анализом. Предварительно перед анализом образцы растворили в растворе в 5% ацетонитрила с 0,1% трифторуксусной кислотой и подвергали ультразвуковой обработке. Образцы загружали на 50-см колонки, упакованные C18 3μM Acclaim PepMap 100 (Thermo Fisher Scientific), с использованием системы UltiMate 3000 Nano LC (Thermo Fisher Scientific), соединенной с масс-спектрометром (Q Exactive HF, Thermo Fisher Scientific). Образец пептидов загрузили в колонку, термостатируемую при 40°C, в буфере А (0,2% муравьиная кислота) и элюировали в градиенте 4%-55% буфера В (0,1% муравьиная кислота, 80% ацетонитрил) в буфере А в течение 120 минут при скорости потока 350 нЛ/мин. Данные ВЭЖХ-МС/МС сохранялись при автоматическом переключении между масс-спектрометрическим (МС)1-сканированием и до 15 МС/МС-сканирований (метод topN). Фрагментация прекурсорных ионов осуществлялась высокоэнергетическим расщеплением в С-ловушке с нормализованной энергией столкновения 28 эВ. МС/МС-сканирование проводилось с разрешением 15 000 при 400 m/z и целевым значением 1×10^5 для ионов в диапазоне 200–2000 m/z с максимальным временем инъекции 30 мс.

«Сырые» данные ВЭЖХ-МС/МС с масс-спектрометра Q Exactive HF конвертировались в масс-листы формата MGF с помощью программы MSConvert (ProteoWizard Software Foundation). При конвертации использовались параметры: «–mgf-filter peak Picking true». Для более точной идентификации белков был сгенерирован список пиков, который обрабатывался программами MASCOT (v2.5.1, Matrix Science Ltd., UK) и X! Tandem (ALANINE, 2017.02.01, The Global Proteome Machine Organization) с использованием базы данных UniProt. Статистическая значимость идентификаций устанавливалась путём поиска по реверсированной базе данных белковых последовательностей. Допустимые отклонения от массы иона-предшественника и фрагмента были установлены на уровне 20 ppm и 0,04 Да соответственно. Параметры поиска по базе данных включали допущение одного пропущенного сайта специфического расщепления трипсином, фиксированную модификацию – карбамидометилирование (C), динамическую модификацию – окисление (M). В X! Tandem были заданы переменные модификации: ацетилирование N-концевых остатков белков, потеря молекулы аммиака N-концевым глутамином пептида и потеря молекулы воды N-концевой глутаминовой кислотой пептидов. Валидация и мета-анализ полученных файлов проводился с использованием Scaffold 5 (v5.1.0). Для определения достоверно идентифицированных белков и пептидов пороговая частота ложных отклонений (false discovery rate, FDR) была установлена на уровне 0,05, что обусловлено ограниченным количеством образцов внеклеточных везикул: исследование включало материал, полученный лишь от четырёх доноров МСК, и только два технических повтора для каждого образца. В условиях небольшой выборки чрезмерно строгие критерии фильтрации (например, $FDR < 0,01$) могли бы привести к значительным потерям в числе идентифицированных белков и пептидов, в том числе биологически значимых, что снизило бы чувствительность анализа. Выбранный порог позволил достичь разумного баланса между минимизацией числа ложноположительных результатов и сохранением достаточного объёма данных для интерпретации. Последующий анализ проводился с помощью библиотек numpy, pandas, matplotlib, seaborn, scipy, statsmodels, sklearn,

geneview, bioinfokit и gseapy (язык программирования Python, версия 3.10). Согласованность технических и биологических повторов оценивалась путём вычисления коэффициента корреляции Спирмена между значениями спектральной интенсивности (spectral count (SC)) белков, идентифицированных в образцах. Визуализация результатов корреляционного анализа реализовывалась в виде корреляционной матрицы с помощью библиотеки seaborn. Для оценки внутригруппового сходства и межгрупповых различий между образцами проводилось понижение размерности данных с помощью метода главных компонент (principal component analysis, PCA), поскольку он эффективно выделяет линейные зависимости и максимизирует объяснённую дисперсию. В отличие от многомерного шкалирования (multidimensional scaling, MDS), PCA менее требователен к вычислительным ресурсам и лучше интерпретируется в контексте биологических данных, где ключевыми являются доминантные факторы изменчивости, представляющиеся главными компонентами. Визуализация результатов PCA проводилась путём отображения первых двух главных компонент на двумерном графике. Библиотека geneview использовалась для анализа и визуализации качественного пересечения множеств белков, идентифицированных в МСВ и ВВ/КС с помощью диаграммы Венна. Библиотека bioinfokit применялась для проведения анализа дифференциального содержания белков в МСВ и ВВ/КС. Абсолютное значение двоичного логарифма отношения SC белка в МСВ и ВВ/КС ($|\log_2(\text{Fold Change})|$) не менее 1,5 и $\text{FDR} < 0,05$ свидетельствовали о дифференциальном содержании данного белка в везикулах. Более строгие параметры, такие как $|\log_2(\text{Fold Change})| \geq 2$ и $\text{FDR} < 0,01$, привели бы к значительной потере идентифицированных белков, что в условиях малой выборки могло бы существенно ограничить объём биологически значимых данных. Использованный подход позволил сохранить достаточное количество белков для анализа и обеспечить баланс между чувствительностью и достоверностью результатов. FDR были получены в результате сравнения значений SC каждого белка между двумя группами образцов с помощью t-теста Уэлча и последующей коррекции эффекта множественных сравнений методом Бенджамини-Хохберга.

Библиотека gseapy использовалась для проведения анализа обогащения набора генов [277]. В качестве референса использовалась база данных Gene Ontology Biological Process в версии 2025 года. Обогащение молекулярного пути считалось значимым при $FDR < 0,05$.

2.9. Окрашивание внеклеточных везикул из мезенхимных стромальных клеток пупочного канатика человека с помощью флуоресцентного красителя RKN26

Свежевыделенные МСВ и ВВ/КС из МСК-ПК были окрашены RKN26 в соответствии с инструкциями производителя (Lumiprobe, Москва, Россия). Для этой цели образец ВВ 300 мкг/мл в пересчете на белок, суспендированный в PBS, был разведен до 1 мл с помощью разбавителя С. После чего к данному образцу было добавлено 6 мкл красителя RKN26. Смешанный с красителем образец ресуспендировали в течение 30 секунд, затем оставляли инкубироваться в течение 5 минут. Негативный контроль для оценки содержания в образцах ВВ, меченных RKN26, не связанного с везикулами красителя RKN26 получали с помощью добавления красителя в PBS без ВВ/КС и МСВ, в условиях, аналогичных тем, что использовались для окрашивания ВВ. На следующем этапе образец был повторно суспендирован, и к ВВ было добавлено 2 мл 10%-ного раствора бычьего сывороточного альбумина для гашения флуоресценции не связавшегося красителя. Затем в данный раствор был добавлен стерильный PBS для доведения общего объема образца до 10 мл. Ультрацентрифугирование проводили при 120000g в течение 70 минут при температуре 2–8°C. После завершения ультрацентрифугирования надосадочную жидкость удаляли, а осадок, обогащенный ВВ, переносили в 50-мл центрифужные пробирки, содержащие вставки с фильтрами Amicon MWCO (порог отсека 50 кДа) для последующей очистки образцов ВВ от остаточного красителя, не связанного с везикулами. К образцам добавляли 10 мл PBS, затем образец центрифугировали при 3000g в течение 15 минут до уменьшения объема жидкости на фильтре до 0.25 мл. После

чего данный образец ВВ снова разводили в 10 мл PBS и повторяли цикл очистки до 3 раз. Для визуализации МСВ и ВВ/КС в конфокальном микроскопе 10 мкл окрашенной суспензии везикул наносили на предметное стекло, покрытое поли-L-лизинном, и высушивали на воздухе в течение 30 минут в темноте. Затем образец фиксировали с использованием среды ImmunoHistoMount (Abcam), накрывали покровным стеклом и исследовали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Olympus FV3000 (Япония) с использованием план-апохроматического иммерсионного объектива 100×/1.40 oil и иммерсионного масла IMMOIL-F30CC. Возбуждение флуорофора PKH26 осуществляли с помощью лазера с длиной волны 568 нм.

2.10. Культивирование макрофагов, полученных из ТНР-1

Клетки ТНР-1 (Merck, SCC223) поддерживали в среде RPMI-1640 без глутамина (Gibco, Гранд-Айленд, Нью-Йорк, США), дополненной glutamax (2 mM, GibcoTM, 35050061), 10% FBS и антибиотиками (penicillin 100Ед/мл + streptomycin 100 мкг/мл) в увлажненной атмосфере 5% CO₂ и 95% воздуха при 37°C. По мере увеличения числа клеток их распределяли между культуральными матрасами так, чтобы количество клеток в среде не превышало 1 млн/мл. Для проведения экспериментов с макрофагами ТНР-1 клетки осаждали, ресуспендировали в среде и высевали в 12 луночный планшет по 0,45 млн клеток в 1.5 мл на лунку. Дифференцировка клеток в макрофаги достигалась путем инкубации с активатором фагоцитов форбол-12-миристан-13-ацетатом (ФМА), 50 нг/мл) в течение 48 часов. Поляризацию макрофагов в М1 состояние проводили с помощью обработки клеток ИФН-γ (20 нг/мл) и ЛПС (100 пг/мл), а в М2 состояние - цитокином Ил-4 и Ил-13 (20 нг/мл).

2.11. Культивирование макрофагов, дифференцированных из моноцитов периферической крови

Моноциты были выделены из периферической крови, полученной от здоровых добровольцев в возрасте 18–60 лет с индексом массы тела 18,5–24,9 в количестве 25. Макрофаги, полученные из моноцитов периферической крови (МДМ) культивировали в среде, содержащей 50 нг/мл гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) или 50 нг/мл макрофагального колониестимулирующего фактора (М-КСФ) (SCI-store, Москва, Россия), с заменой среды на 3-й день. На 6-й день среду снова меняли, оставляя часть макрофагов для обоих факторов роста неполяризованной как M0_ГМ и M0_М. Для поляризации макрофагов M1 добавляли ЛПС 10 нг/мл (Thermo Fisher Scientific, Карлсбад, Калифорния, США) и ИФН- γ 50 нг/мл (Thermo Fisher Scientific, США); для поляризации M2 добавляли Ил-4 25 нг/мл (SCI-store, Москва, Россия). Затем к клеткам добавляли МСВ или ВВ/КС из МСК-ПК в концентрации 100 мкг белка везикул на 1 мл среды, в то время как в контрольные образцы ничего не добавляли. Макрофаги культивировали с момента добавления индукторов поляризации и ВВ в течение 48 часов, после чего среду собирали для измерения уровня цитокинов, а клетки лизировали для извлечения РНК.

2.12. Фагоцитоз макрофагами внеклеточных везикул мезенхимных стромальных клеток, меченных мембранным красителем РКН26

ВВ (ВВ/КС и МСВ), меченые РКН26 и очищенные от метки с помощью ультрацентрифугирования с последующей ультрафильтрацией (раздел 2.9), добавляли к провоспалительным макрофагам M1 (ИФН- γ + ЛПС) в концентрации 100 мкг белка везикул на 1 мл среды. Помимо ВВ РКН26 для контроля фона несвязанного красителя и образовавшихся мицелл к M1 макрофагам был добавлен краситель РКН26 без ВВ. Данный образец был получен в условиях, одинаковыми для окрашивания РКН26 ВВ/КС и МСВ и был добавлен в объеме аналогичном

объему проб ВВ РКН26. Также были добавлены ВВ/КС в концентрации 100 мкг белка везикул на 1 мл среды без предварительной окраски красителем РКН26. Помимо данных групп в анализе также были использованы меченые ВВ РКН26, добавленные вместе с cytochalasin D (в концентрации 2 μ M). Данный реактив использовали для оценки ингибирования фагоцитоза ВВ. Затем макрофаги культивировали в течение 12 часов при температуре 37°C. За 30 минут до фиксации клеток ядра клеток окрашивали (0.004 мг/мл Hoechst 33258, Thermo Scientific, США). Затем отбирали среду, промывали конфокальные чашки 3 раза PBS, после чего препарат фиксировали 4%-ным раствором параформальдегида в течение 5 минут, клетки отмывали PBS 3 раза. Образцы анализировали с использованием лазерного сканирующего конфокального микроскопа Olympus FV3000 (Япония) с использованием план-апохроматического иммерсионного объектива 100 $\times$ /1.40 oil и иммерсионного масла IMMOIL F30CC. Для возбуждения флуорофора Hoechst 33258 применяли лазер с длиной волны 405 нм, а для РКН26 – лазер с длиной волны 568 нм. Детекция сигнала проводилась в стандартных спектральных окнах эмиссии: Hoechst 33258 430–480 нм, РКН26 580–620 нм.

2.13. Количественная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

Общая РНК была выделена из клеточных лизатов, полученных из 2,8–3,2 $\times 10^5$ макрофагов на образец, с помощью набора для выделения РНК RUplus-250 (Biolabmix, Россия). Качество выделенной РНК оценивали с помощью спектрофотометра Nanodrop 8000 (Thermo Scientific, США). Для удаления следов ядерной ДНК образцы обрабатывали ДНКазой E, после чего проводили дополнительную очистку общей РНК с применением набора CleanRNA Standard (Eurogen, Россия). Для обратной транскрипции РНК в кДНК использовали 1 мкг РНК на реакцию с обратной транскриптазой MMLV в наборе MMLV RT (Eurogen, Москва, Россия). Затем проводили количественную полимеразную цепную реакцию с использованием готовой 5-кратной смеси qPCRmix-HS SYBR (Eurogen,

Россия) и 50 мкг комплементарной ДНК на реакцию. Последовательности праймеров были получены с помощью Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) Последовательности праймеров, использованные в исследовании представлены в Таблице 1. Условия количественной полимеразной реакции с обратной транскрипцией (кПЦР-ОТ): предварительная денатурация при 95 °С в течение 3 мин, далее 40 циклов, включающих денатурацию при 95 °С в течение 15 с, отжиг при 60 °С в течение 15 с и элонгацию при 70 °С в течение 20 с. Относительная экспрессия генов анализировалась с помощью метода $\Delta\Delta C_t$, нормализованного по GAPDH ($n = 2^{-\Delta C} \times 1000$, где $\Delta C = C_1 - C_{hk}$, где C_1 – целевой ген, а C_{hk} – референтный ген GAPDH).

Таблица 1 – Список праймеров для количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией

CD206_прямой	CCAGACACGATCCGACCCTT
CD206_обратный	AGCTTGCAGTATGTCTCCGCT
CD86_прямой	GAGTGAACAGACCAAGAAAAGAGAA
CD86_обратный	AAAAACACGCTGGGCTTCATC
ФНО_прямой	CTCTTCTGCCTGCTGCACTTTG
ФНО_обратный	ATGGGCTACAGGCTTGTCACCTC
p47phox_прямой	GTACCGCGACAGACATCACC
p47phox_обратный	ACCGCTCTCGCTCTTCTCTA
GAPDH_прямой	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC
GAPDH_обратный	CCACTTGATTTTGGAGGGATCT

Продолжение Таблицы 1

p67phox_прямой	AGCGGACAAGAAGGACTGGA
p67phox_обратный	TCCCTCGTTGGAAGTAAGCC
IL-6_прямой	GGCACTGGCAGAAAACAACC
IL-6_обратный	CACCAGGCAAGTCTCCTCAT
IRF9_прямой	TTGCCCCGATACTTGCTGGAG
IRF9_обратный	AGGTGAGGTGGAAGATGGGT
STAT2_прямой	AAACTCCCCATCGACCCCTC
STAT2_обратный	GTCTCACCAGCAGCCTTGTTT
STAT1_прямой	GGCCAAAGGAAGCACCAAGAGC
STAT1_обратный	TACAGAGCCCACCTATCCGAGACACC
STAT3_прямой	CAAGGGCTTCTCCTTCTGGG
STAT3_reverse	GGTCTTCAGGTATGGGGCAG
STAT5_прямой	GAGGAACTCTTACGCCGACC
STAT5_обратный	CAGAGGTGAAAAGACCGGCA
STAT6_прямой	CCTTGAACCTCGCTGGACAGA
STAT6_обратный	GCTCTCAAGGGTGCTGATGT
IRF5_прямой	ACATGCTGCCTCTGACCGA

Продолжение Таблицы 1

IRF5_обратный	GCTTATGGGGCCGAAGAGTT
NFKB1_прямой	AAATGGGCTACACCGAAGCA
NFKB1_обратный	GCCTGAGAGGTGGTCTTCAC

2.14. Анализ экспрессии белков в макрофагах, внеклеточных везикулах методом вестерн-блоттинга

После 48 часов инкубации макрофагов с ВВ-МСК, которые были добавлены одновременно с индукторами поляризации в M1/M2 фенотипы на 6 сутки с момента выделения моноцитов, клетки промывали 3-раза PBS и подвергали лизису с помощью RIPA буфера с ингибитором протеаз-фосфатаз в течение 10 минут на холоде. После лизиса клеток, клеточный дебрис осаждали с помощью центрифугирования 10000g 10 минут. После чего образцы лизатов хранили на -80°C. Для нанесения образцов на акриламидный гель, лизаты макрофагов предварительно обработали 4-кратным буфером Леммли и подвергли электрофорезу в 10%-ном полиакриламидном геле с использованием вертикальной камеры (BioRad, Геркулес, Калифорния, США). На каждую дорожку наносили по 15 мкг белка. Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану с размером пор 0,2 мкм (BioRad, США) осуществлялся с помощью системы полусухого блоттинга Power Blotter (Invitrogen, США) и 10-кратного буфера для переноса Power Blotter (Invitrogen, США). Затем мембрану промывали Трис-буфером с 0,1% твином (TBST) и инкубировали в блокирующем растворе (5% бычьего сывороточного альбумина в TBST) в течение 1 ч. Затем мембрану инкубировали в течение ночи с первичными антителами против Phospho-STAT1 (Tyr701) в разведении 1:1000 (AF3300, Affinity, КНР), Phospho-STAT2 (Tyr690) в разведении 1:1000 (AF3342, Affinity, КНР), (5% БСА в TBST), Stat-1 в разведении 1:1000 (PAB740Hu01, Cloud-

Clone, KHP), Stat-2 в разведении 1:1000 (PAB796Hu01, Cloud-Clone, KHP), GAPDH в разведении 1:2000 (CAB932Hu22, Cloud-Clone, KHP), IRF-9 в разведении 1:1000 (DF8179, Affinity, KHP), p67phox в разведении 1:1000 (DF6312, Affinity, KHP), p47phox в разведении 1:1000 (AF5220, Affinity, KHP) промыли TBST и инкубировали со вторичными антителами, специфичными к иммуноглобулину G кролика, конъюгированными с пероксидазой хрена, в разведении 1:10000 (Arigobio, Ханчжоу, Китай). Полосы белков были обнаружены с помощью набора ECL (Thermo Fisher, Уолтем, Массачусетс, США). Обнаружение сигнала проводилось с помощью системы визуализации iBright CL1500 (Invitrogen, США). Количественный анализ полученных результатов осуществлялся с помощью программы iBright-Analysis-Software.

2.15. Иммуноферментный анализ

После 48 часов культивирования макрофагов с ВВ-МСК культуральную жидкость собирали и центрифугировали при $400 \times g$ в течение 10 минут, чтобы исключить клеточный мусор. Концентрации цитокинов, характерных для провоспалительных макрофагов, ФНО- α и Ил-6, измеряли с помощью набора для иммуноферментного анализа (Цитокин, Санкт-Петербург, Россия) в соответствии с инструкциями производителя. Оптическую плотность измеряли с помощью микропланшетного фотометра Multiskan™ FC (ThermoFisher, США) при длине волны поглощения 450 нм.

2.16. Измерение поверхностных маркеров поляризации макрофагов методом проточной цитометрии

У макрофагов после 48 часов инкубации с ВВ-МСК отбирали культуральную среду, промывали 3 раза раствором Версена, после чего инкубировали с раствором Accutase (Sigma-Aldrich, США) в течение 5 минут в инкубаторе при 37°C, 5% CO₂ для получения суспензий из отдельных клеток. Клеточную суспензию развели в

среде RPMI1640, для очистки клеток от фермента, и центрифугировали при 300g в течение 7 минут. После центрифугирования клеточные осадки дважды промывали PBS для удаления остатков Accutase. Наконец, клеточные осадки были ресуспендированы в PBS, содержащем 1% FBS, и разделены на аликвоты для последующего окрашивания антителами против CD206, конъюгированными с PE-Cy7, или антителами против CD86, конъюгированными с FITC (Invitrogen, США) в соответствии с протоколом производителя. После инкубации с антителами образцы были промыты PBS и проанализированы на микрофлюидном клеточном сортировщике Sony SH800 (Sony Biotechnology, США). Для каждого образца было зарегистрировано не менее 10000 событий. Визуализация и анализ данных проточной цитометрии проводились с помощью программного обеспечения Sony Biotechnology (версия 1.8) и FlowJo (версия 10).

2.17. Анализ фагоцитоза с помощью проточной цитометрии

Макрофаги культивировали в 12-луночных планшетах для проточной цитометрии. Фагоцитоз изучали с помощью биочастиц *Escherichia coli* (*E. Coli*), конъюгированных с флуоресцентным красителем FITC (Molecular Probes, Юджин, Орегон, США), спустя 48 часов инкубации макрофагов с ВВ-МСК. Суспензию биочастиц тщательно перемешивали с полной средой RPMI и добавляли к макрофагам для достижения необходимого соотношения бактерий и клеток. Затем биочастицы инкубировали с клетками в течение 1–2 часов при 37 °C и 5% CO₂. После инкубации клетки трижды промывали PBS для удаления избытка бактериальных частиц. После чего клетки инкубировали с Accutase в течение 5 минут и отделяли с помощью клеточных шпателей. Полученную клеточную суспензию центрифугировали при 300×g в течение 10 минут. Клеточные осадки заливали ледяным раствором для остановки реакции и инкубировали в течение 5 минут. После центрифугирования клетки ресуспендировали в буфере для фиксации (PBS с 0,5% FBS и 1% параформальдегида). Через 20 минут клетки центрифугировали, ресуспендировали в буфере для проточной цитометрии (PBS +

1% FBS) и анализировали на клеточном сортере Sony SH800 (Sony Biotechnology, США) и обрабатывали данные с помощью программного обеспечения Sony Biotechnology (версия 1.8).

2.18. Люминол-зависимая хемотропная люминесценция

Способность макрофагов генерировать АФК измерялась с помощью люминол-зависимой ХЛ. Макрофаги культивировались в 12-луночных планшетах. Клетки дважды промывали раствором Версена для связывания ионов кальция перед протеолизом внеклеточного матрикса протеазой Accutase (Sigma-Aldrich, США). После чего в каждую лунку был внесен раствор Accutase и после 7 минут инкубации, клетки были собраны с поверхности пластика с помощью стерильных пластиковых скребков. На следующем этапе клетки были дважды центрифугированы в растворе полной питательной среды для ингибирования протеазы Accutase и в PBS для отмывки клеток от питательной среды. После отмывки клетки были посчитаны и разведены с помощью раствора Кребса – Рингера с NaHCO_3 и CaCl_2 (pH 7,4) до 1 млн клеток/мл буфера, добавляли 30 мкг/мл пероксидазы хрена и 200 мкМ люминола для измерения CL, а также 60 мкг/мл пероксидазы хрена. Для активации выработки АФК макрофагами добавляли 100 нг/мл ФМА. Интенсивность испускаемого света, которая пропорциональна количеству образующихся АФК, регистрировалась сразу после добавления активатора макрофагов с помощью хемотропного люминометра Lum-1200 (DISoft, Москва, Россия). Между циклами измерений выполнялось лёгкое встряхивание. Для статистического анализа сравнивали площади под кривыми хемотропной люминесценции.

2.19. Анализ цитотоксичности внеклеточных везикул с помощью измерения количества лактатдегидрогеназы

Для анализа влияния ВВ на выживаемость макрофагов, дифференцированных из моноцитов периферической крови, образцы

кондиционированных сред после 48 часов культивирования с ВВ/КС и МСВ с концентрацией 100 мкг/мл в пересчете на белок были подвергнуты центрифугированию ($300 \times g$ 10 мин). После осаждения клеток в образцах кондиционированных сред был проведен анализ уровня лактатдегидрогеназы (ЛДГ) с помощью набора CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay Kit (C20300, Инвитроген, США). Вкратце, к 50 мкл кондиционированной среды было добавлено 50 мкл рабочего реактива. Инкубация образцов была проведена в 96-луночном планшете в течение 30 минут при комнатной температуре в недоступном для света месте. После чего был добавлен стоп реагент, для остановки реакции. Оптическую плотность измеряли с помощью микропланшетного фотометра Multiskan™ FC (ThermoFisher, США) при длине волны поглощения 490 нм и 680 нм.

2.20. Иммуноцитохимия

Макрофаги, дифференцированные из моноцитов, инкубировали с ВВ-МСК-ПК в течение 48 часов, после чего среда была отобрана, а клетки были промыты 3 раза PBS. Затем к ним был добавлен Hoechst (1 мкг/мл) в RPMI 1640, и клетки инкубировали в течение 30 минут. Клетки были промыты 3 раза PBS. Фиксацию проводили в 4% параформальдегиде при 4°C в течение 20 минут. Пермеабиллизацию клеток осуществляли с помощью 0,1% Triton X-100 в течение 5 минут при комнатной температуре. После этого образцы промывали 3 раза в растворе PBS-Tween 0,05%. Образцы блокировали в 3% BSA в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем добавляли первичные антитела anti-CD206 в разведении 1:500 (ab64693, Abcam), STAT1 в разведении 1:200 (PAB740Hu01, Cloud-Clone, КНР), STAT2 в разведении 1:200 (PAB796Hu01, Cloud-Clone, КНР), и образцы инкубировали в течение ночи при +4°C. После этого образцы промывали 3 раза в растворе PBS-Tween 0,05%. К образцам добавляли вторичное антитело anti-Rabbit IgG superclonal recombinant secondary antibody, Alexa Fluor 488 (Invitrogen, USA) в разведении 1:1000 (для макрофагов, меченных anti-CD206, были использованы вторичные антитела anti-rabbit IgG-FITC (ab6717, Abcam) в

разведении 1:1000). Образцы инкубировали при комнатной температуре в течение 60 минут в темноте. После инкубации со вторичными антителами образцы промывали 3 раза в растворе PBS-Tween 0,05%. Микрофотографии получили с использованием флуоресцентного микроскопа EVOS M5000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

2.21. Создание модели остеоартрита у животных посредством менискэктомии коленного сустава и терапия внеклеточными везикулами

Эксперимент на крысах породы Вистар в возрасте 12–14 недель (самцы, 200–250 г) был одобрен локальным комитетом по этике Сеченовского университета (протокол заседания № 10–24 от 18 апреля 2024 г.). Животные содержались по три особи в клетке в стандартных условиях с естественным световым циклом и свободным доступом к пище и воде. Перед операцией по моделированию ОА у крыс была проведена анестезия путем внутримышечного введения препарата ZOLETIL 100 (VIRBAC, Каррос, Франция) в дозе 6 мг активного вещества на 1 кг массы тела. Из 24 лабораторных животных случайно выбранная группа служила здоровым контролем ($n = 6$), а остальные животные ($n = 18$) подверглись операции по индуцированию ОА посредством менискэктомии. На 21-й день после индукции модели остеоартрита с помощью эксперимента по удалению мениска подопытные животные были случайным образом разделены на 4 подгруппы: первая подгруппа ($n = 6$) получала однократную внутрисуставную инъекцию МСВ (ОА + МСВ); вторая подгруппа ($n = 6$) получала однократную внутрисуставную инъекцию ВВ/КС (ОА + ВВ/КС); третья подгруппа ($n = 6$) получала однократную внутрисуставную инъекцию физраствора (ОА + физраствор, плацебо). Дозировка МСВ и ВВ/КС из МСК-П, использованная в исследовании, составляла 300 мкг/мл в пересчете на белок. Объем внутрисуставной инъекции составлял 20 мкл раствора ВВ или стерильного физиологического раствора. Животные ($n=6$) в каждой экспериментальной подгруппе и ($n=6$) в контрольной группе были усыплены на 21 день после инъекций (в день окончания

эксперимента). Животные были подвергнуты эвтаназии в газовой камере CO₂ для умерщвления грызунов (AwTech, Москва, Россия), где на первом этапе они получали 30% потока воздуха CO₂, а на втором этапе – 70% потока воздуха CO₂. Общее время эвтаназии составило 10 минут.

2.22. Иммуногистохимический анализ

Образцы тканей коленного сустава были собраны и подвергнуты гистологическому анализу. Собранные образцы были зафиксированы в 10%-ном формалине, декальцинированы в 10%-ном растворе этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) в течение 28 дней, обезвожены, залиты парафином и нарезаны на срезы толщиной 4 мкм. Для подготовки образцов к иммуногистохимическому анализу срезы были депарафинированы в растворах ксилола и изопропанола. Высвобождение антигена осуществлялось при температуре 70 °C в течение 30 минут в буфере для высвобождения антигена (буфер для высвобождения антигена 100× Tris-ЭДТА, pH 9) (ab93684, Abcam). Активность эндогенной пероксидазы блокировалась с помощью 3%-ного раствора перекиси водорода, а неспецифическое связывание белков блокировалось 10%-ной козьей сывороткой (Sigma 31872). Инкубацию с первичными антителами осуществляли при комнатной температуре в течение 30 минут, используя следующие разведения: 1:200 – для антител против аргиназы-1 (Арг-1, MAB120Ra21), 1:200 – против ФНО-α (MAA133Ra21) и 1:100 – против iNOS (PAA837Ra02) (Cloud-clone Corp., Ухань, Китай). После промывания препараты инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, в течение 30 минут при комнатной температуре в разведении 1:1000 (козьи антитела против мышинового IgG, применяемые для анти-ФНО и анти-Арг-1; G-21040, Invitrogen, 1:20000 козьи антитела против кроличьего IgG (для анти- iNOS) (205718, Abcam). Образцы окрашивали с помощью смеси субстрата 3,3'-диаминобензидина тетрагидрохлорида, после чего проводили контрастное окрашивание гематоксилином. Результаты иммуногистохимического анализа оценивали

полуколичественно в 5 различных полях зрения (для каждого варианта суставной ткани костно-хрящевой, синовиальной, жировой) при увеличении 400× с помощью системы оценки шкалы полуколичественного балльного анализа данных иммуногистохимического исследования таблица 2. Оценка иммуногистохимического окрашивания производили по сумме баллов значений интенсивности окрашивания реакции ИГХ и распространенности окраски в тканях коленного сустава, сумма баллов могла варьировать от 0 до 6 таблица. 2.

Таблица 2 – Шкала полуколичественного балльного анализа данных иммуногистохимического исследования

Распространенность окраски	Интенсивность окраски
0 – менее 25% клеток	0 – не определяется
1 – 25-49% клеток	1 – единичные положительно окрашенные гранулы (светло-коричневые клетки)
2 – 50-74% клеток	2 – умеренное содержание положительно окрашенных гранул (коричневые клетки)
3 – 75% клеток и более	3 – высокое содержание гранул (темно-коричневые клетки)

2.23. Полимеразная цепная реакция *in Situ*

Образцы тканей подготавливали для полимеразной цепной реакции *in Situ* так же, как и для иммуногистохимического исследования. После извлечения антигена образцы обрабатывали 2 мг/мл пепсина в 10 мМ растворе соляной кислоты. Амплификацию геномной ДНК проводили на амплификаторе для ПЦР *in situ* (Eppendorf, Лейпциг, Германия). Использовались праймеры для NLRP-3: прямой праймер 5'-3': AGCAGCAGGCATCGGAAAAACAAT, обратный праймер 5'-3': ACGTGGCGGGGGTGGTC. Концентрация праймеров составляла 1 мкМ. Смесь для амплификации содержала Biotin-11-dUTP 1/3 (Sileks, Москва, Россия) и

полимеразу Taq в 10-кратном буфере (Evrogen, Россия). Условия амплификации: 30 циклов (денатурация при 95 °C в течение 2 мин, денатурация при 95 °C в течение 15 с, отжиг при 60 °C в течение 15 с, элонгация при 72 °C в течение 30 с). После амплификации эндогенную пероксидазу блокировали 3%-ным раствором перекиси водорода, а неспецифические участки связывания блокировали 10%-ной козьей сывороткой (Sigma 31872). Вторичные антитела против биотина, меченные стрептавидином-пероксидазой, применялись в разведении 1:200 (21132, ThermoScientific, США). Образцы окрашивались с помощью субстратной смеси 3,3'-диаминобензидин-тетрагидрохлорида с последующим контрастным окрашиванием гематоксилином. Образцы были исследованы с помощью световой и фазово-контрастной микроскопии на светодиодном микроскопе Leica DM 4000 B с камерой Leica DFC 7000 T, работающей с LAS V.

2.24. Статистический анализ

Статистическая обработка и визуализация данных протеомного анализа проводились с использованием языка программирования Python (версия 3.10). Для оценки согласованности технических и биологических повторов вычислялся коэффициент корреляции Спирмена по значениям SC с последующей визуализацией в виде корреляционной матрицы. С целью анализа сходства образцов и выявления глобальных закономерностей в данных было применено понижение размерности методом главных компонент. Данный метод был выбран для эффективного выделения линейных зависимостей и максимального сохранения объясненной дисперсии. Результаты визуализированы в проекции на первую и вторую главные компоненты (PC1, PC2). Качественный анализ пересечения множеств идентифицированных белков между экспериментальными группами был выполнен с помощью диаграмм Венна. Выявление дифференциально представленных белков проводилось с использованием t-теста Уэлча с последующей коррекцией полученных p-значений на множественное тестирование методом Бенджамини-Хохберга. Статистически значимо различающимися между

МСВ и ВВ/КС считались белки, удовлетворяющие порогу $FDR < 0,05$ и демонстрирующие $|\log_2(\text{Fold Change})| \geq 1,5$. Биологическая интерпретация полученных списков значимо различающихся белков была выполнена с помощью анализа обогащения набора генов. Обогащение молекулярного пути считалось значимым при $FDR < 0,05$.

Статистический анализ данных в экспериментах *in vitro* и *in vivo* проводился с помощью программного обеспечения GraphPadPrism 10.00 для Windows (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния, США). Нормальность распределения определялась с помощью критерия Шапиро – Уилка. При отсутствии нормального распределения внутри групп, для оценки межгрупповых различий использовался критерий Краскела – Уоллиса с последующим тестом Данна. В случае нормального распределения данных использовался односторонний дисперсионный анализ с последующим тестом Тьюки. Значения $p \leq 0,05$ считались статистически значимыми. Результаты статистического анализа были представлены в виде диаграммы размаха с указанием медианных значений случайной величины.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Характеристика мультипотентных мезенхимных стромальных клеток из разных источников

3.1.1. Морфология мезенхимных стромальных клеток и анализ экспрессии поверхностных маркеров с помощью проточной цитометрии

МСК, полученные из десны, основного вещества пупочного канатика, стромальной васкулярной фракции жировой ткани человека, демонстрировали характерную для МСК морфологию фибробластоподобной формы (рисунок 1А).

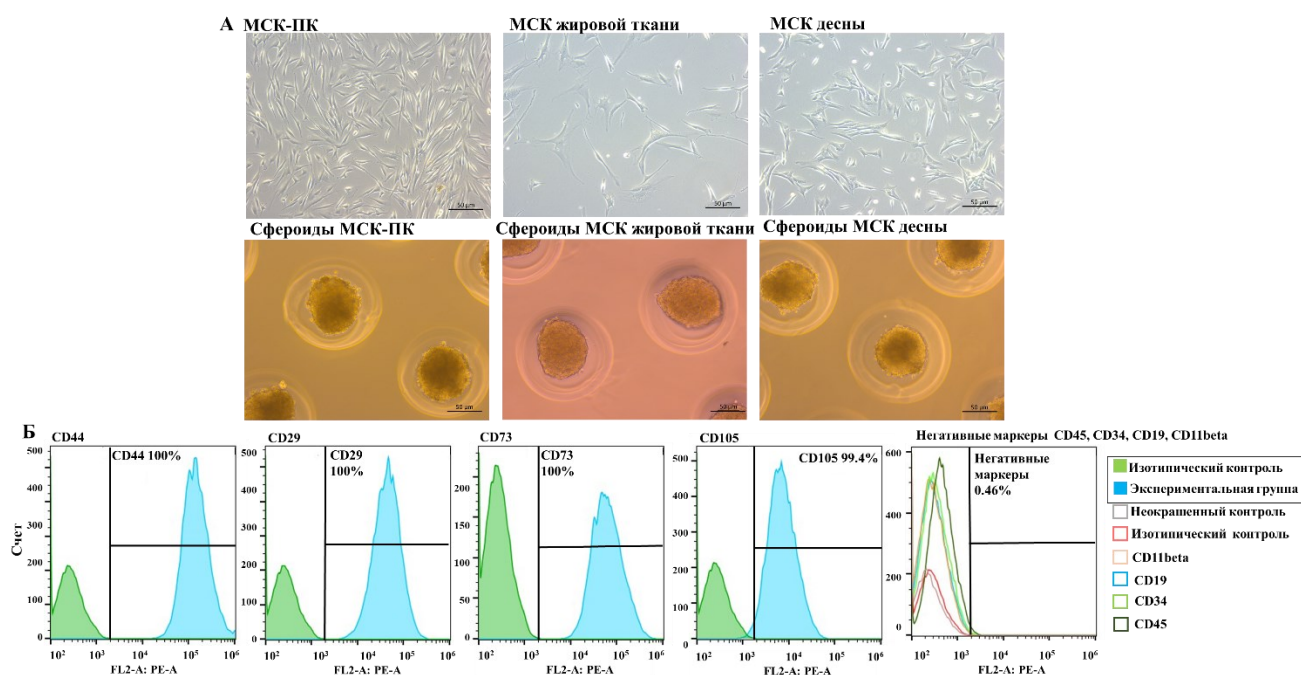


Рисунок 1 – Характеристика МСК А – Микрофотографии монослойных культур и сфероидов МСК из пупочного канатика, жировой ткани и десны человека (4 пассажа), полученные фазово-контрастной микроскопией; увеличение $\times 10$, масштаб 50 мкм. Б – Результаты проточной цитометрии на примере МСК-ПК 4 пассажа показали экспрессию у МСК фенотипических маркеров для МСК (CD105, CD73, CD29, CD44) и отсутствие экспрессии гемопоэтических маркеров (CD19, CD11 β , CD45, CD3)

С помощью проточной цитометрии было продемонстрировано, что МСК-ПК экспрессируют характерные мезенхимальные маркеры (CD105, CD73, CD29, CD44) без существенной экспрессии гемопоэтических маркеров (CD19, CD11beta, CD45, CD34) (рисунок 1Б). Положительные мезенхимальные маркеры включали CD105 (99,4%), CD73 (100%), CD29 (100%) и CD44 (100%) для МСК-ПК, в то время как доля отрицательных маркеров составляла не более 0,46%. Результаты анализа мезенхимальных маркеров для остальных культур МСК, полученных из жира, десны, представлены в (Таблица 3). Результаты демонстрируют, что исследуемые в данной работе МСК различных источников имеют характерный для МСК фенотип.

Таблица 3 – Анализ экспрессии характерных маркеров мезенхимных стромальных клеток для мезенхимных стромальных клеток пупочного канатика, жира, десны 4 пассажа (монослойные клеточные культуры)

		Источник мезенхимных стромальных клеток		
		жировая ткань	десна	пупочный канатик
	Маркер	<i>Доля клеток в популяции, %</i>		
+	CD73	97,97	97,81	98,35
	CD44	99,95	98,84	100,00
	CD90	99,41	96,83	99,95
	CD105	99,21	93,27	99,57
	CD29	98,96	100	100
-	CD45	0,06	0,21	0,46
	CD34	0,57	0,31	0,34
	CD19	0,01	0,09	0,14
	CD11β	0,03	0,07	0,05

Продолжение Таблицы 3

	HLA-DR	0,42	0,21	0,14
--	--------	------	------	------

3.1.2. Характеристика матрикс связанных везикул и внеклеточных везикул, полученных из кондиционированной среды мезенхимных стромальных клеток

Для жидкофазных ВВ из секрета МСК-ПК используется термин внеклеточные везикулы, полученные из кондиционированной среды (ВВ/КС). При выделении ВВ из секрета методом дифференциального ультрацентрифугирования для повышения чистоты образцов на одном из этапов были использованы фильтры 220 нм, соответственно в образцах ВВ помимо экзосом содержатся другие типы ВВ диаметром до 220 нм. Международное общество по изучению внеклеточных везикул (ISEV) 2023 рекомендует использовать термин ВВ вместо экзосом для обозначения малых ВВ, если исследователи использовали селективные методы, которые не позволяют выделять только экзосомы из образцов жидкостей [204]. Исходя из этого, в ходе данного исследования был использован термин ВВ/КС, где указан тип ВВ и источник их выделения, для данных везикул источником является кондиционированная среда МСК. Выделенные ВВ/КС экспрессировали характерные экзосомальные маркеры, CD9+, CD63+ (рисунок 2А), что демонстрирует наличие в ВВ/КС везикул, экспрессирующих такие маркеры. В отличие от этого, у МСК отсутствовала экспрессия экзосомальных маркеров (рисунок 2А). Также был проведен анализ экспрессии положительных и отрицательных маркеров для ВВ в клеточном лизате МСК-ПК (рисунок 2А). Результаты показали, что МСК-ПК имеют менее выраженную экспрессию положительных маркеров для ВВ, таких как CD9+, CD63+, при этом данные клетки имели более выраженную экспрессию GAPDH и Calnexin по сравнению с ВВ обоих типов. Это предполагает отсутствие выраженной контаминации образцов ВВ внутриклеточными белками, такими как

цитозольный белок GAPDH и Calnexin, встречающийся в эндоплазматическом ретикулуме клеток (рисунок 2А). Результаты анализа динамического светорассеяния наночастиц показали, что полученные ВВ/КС и МСВ МСК-ПК имели диапазон размеров 40-150 нм, при этом размер МСВ МСК-ПК составлял $78,8 \pm 22,9$ нм (среднее $\pm$ стандартное отклонение), а ВВ/КС МСК-ПК имели чуть больший размер – $91,3 \pm 21,7$ нм (рисунок 2Б).

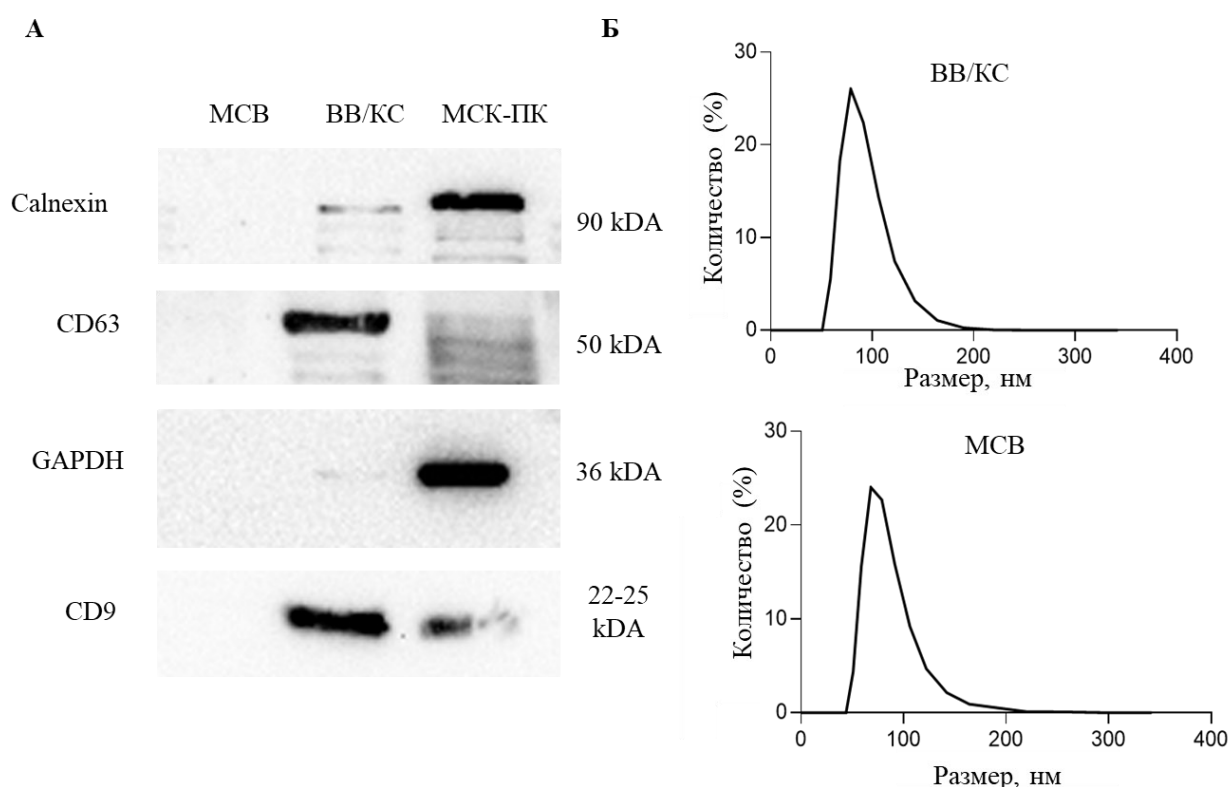


Рисунок 2 – Анализ экзосомальных маркеров и размера ВВ. А – Вестерн-блот анализ ВВ МСК-ПК (МСВ и ВВ/КС), а также клеточного лизата МСК-ПК на наличие положительных экзосомальных маркеров (CD9+, CD63+) и негативных маркеров для ВВ (GAPDH-, Calnexin-). Б – Распределение частиц по размерам, полученное методом динамического рассеяния света наночастиц

Изображения, полученные с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ), показали, что МСВ и ВВ/КС имеют характерную чашеобразную округлую морфологию, а диапазон размеров частиц 50-200 нм (рисунок 3А). С помощью конфокальной микроскопии было показано, что оба типа ВВ, полученные из МСК-ПК, содержат липидные бислои, поскольку они способны

сорбировать цианиновый краситель РКН26, который нековалентно встраивается в липидные мембраны. Известно, что липидные мембраны являются структурной основой мембранных наночастиц, таких как ВВ-МСК (рисунок 3Б).

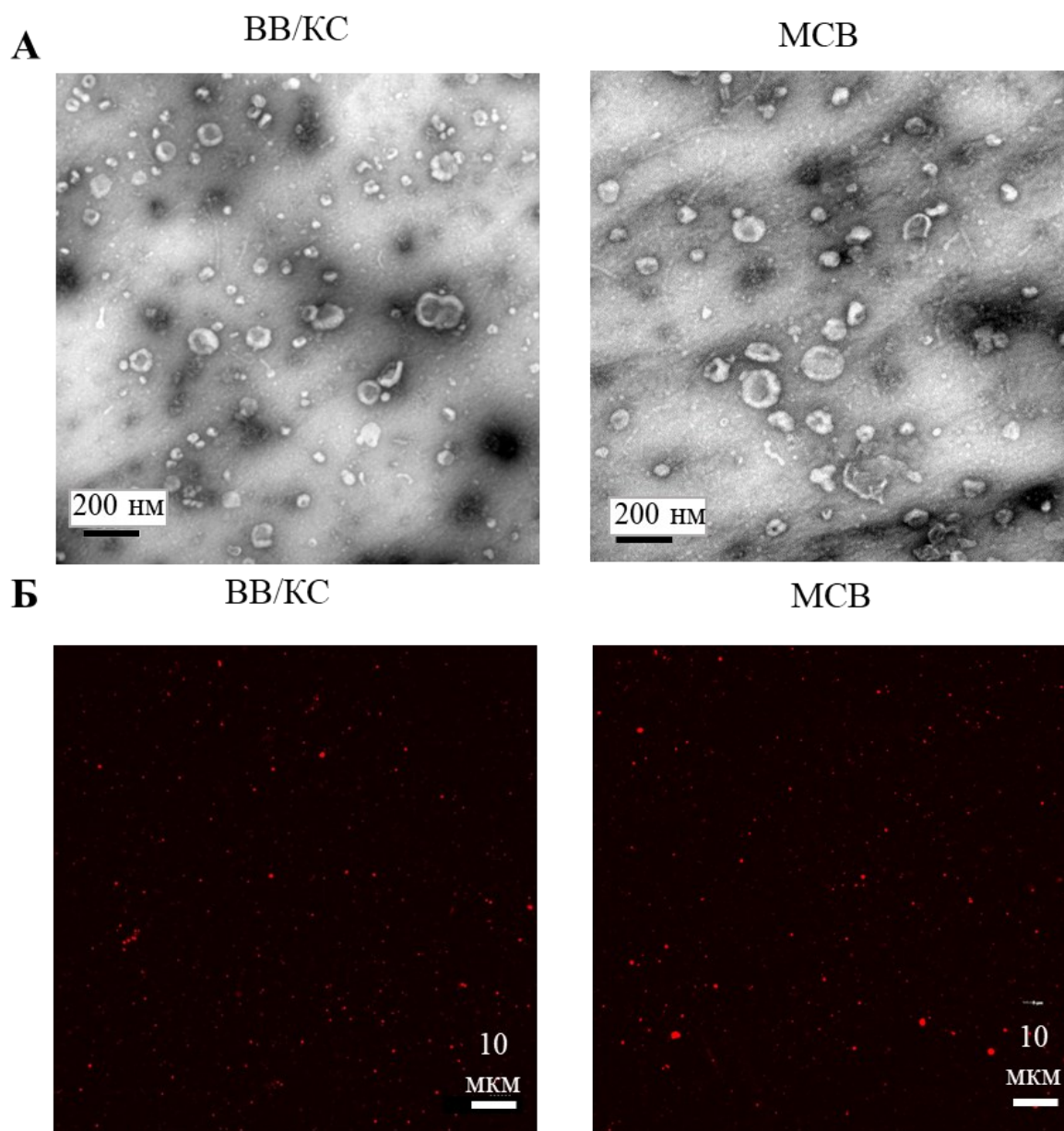


Рисунок 3 – Визуализация морфологии ВВ, полученных из МСК-ПК. А – Визуализация ВВ/КС и МСВ, полученных из МСК-ПК с помощью ПЭМ. На микрофотографиях представлен масштабный отрезок 200 нм. Увеличение 60000х. Б – Микрофотографии конфокальной микроскопии ВВ, полученных из МСК-ПК (ВВ/КС и МСВ), помеченных флуорофорным красителем РКН26. На микрофотографиях представлен масштабный отрезок 10 мкм. Увеличение 100х

3.1.3. Протеомный анализ матрикс связанных везикул и внеклеточных везикул из кондиционированной среды, полученной из мезенхимных стромальных клеток пупочного канатика человека

Для протеомного анализа ВВ, полученных из МСК-ПК, (ВВ/КС и МСВ), были использованы по 2 технических образца, полученных от 4 здоровых доноров. В ходе биоинформатического анализа было идентифицировано 4080 белков с ненулевым SC в одном образце. До исходного проведения фильтрации данных было установлено, что образцы ВВ/КС скоррелированы сильнее, чем образцы МСВ (рисунок 4).

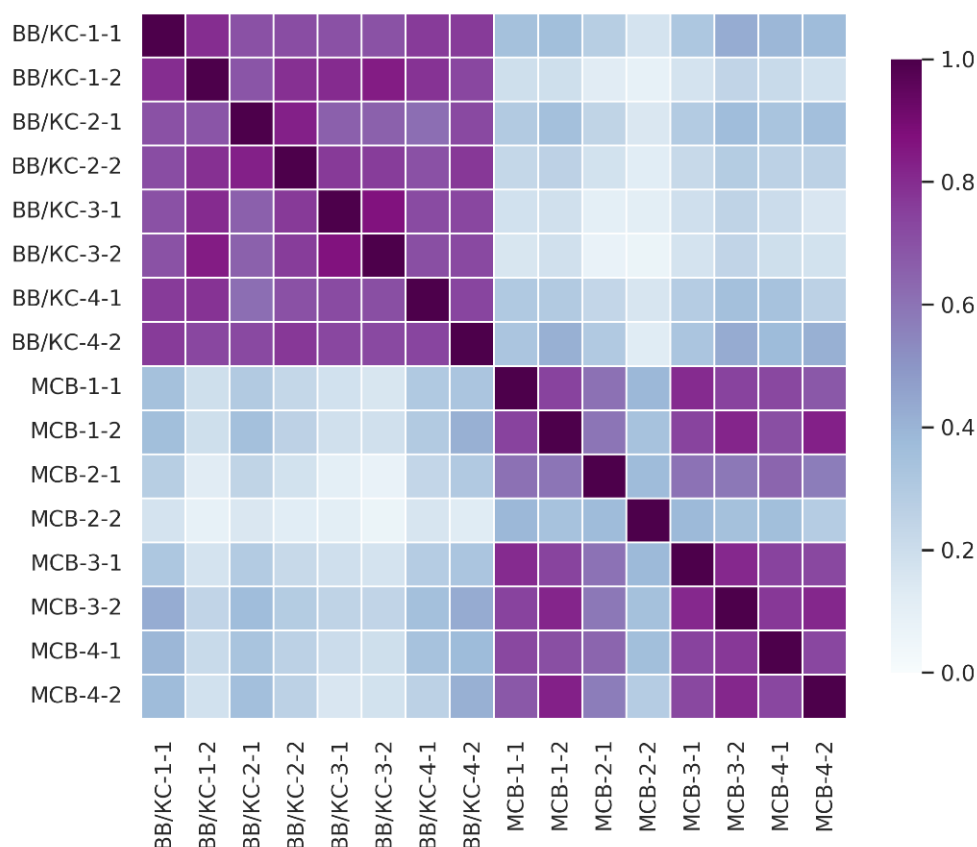


Рисунок 4 – Корреляционная матрица образцов ВВ/КС и МСВ, полученная в результате вычисления попарных коэффициентов корреляции Спирмена между образцами

Метод главных компонент показал чёткое разделение образцов ВВ/КС и МСВ по первой компоненте ещё до проведения фильтрации данных, что говорит о значительных различиях между ВВ/КС и МСВ (рисунок 5).

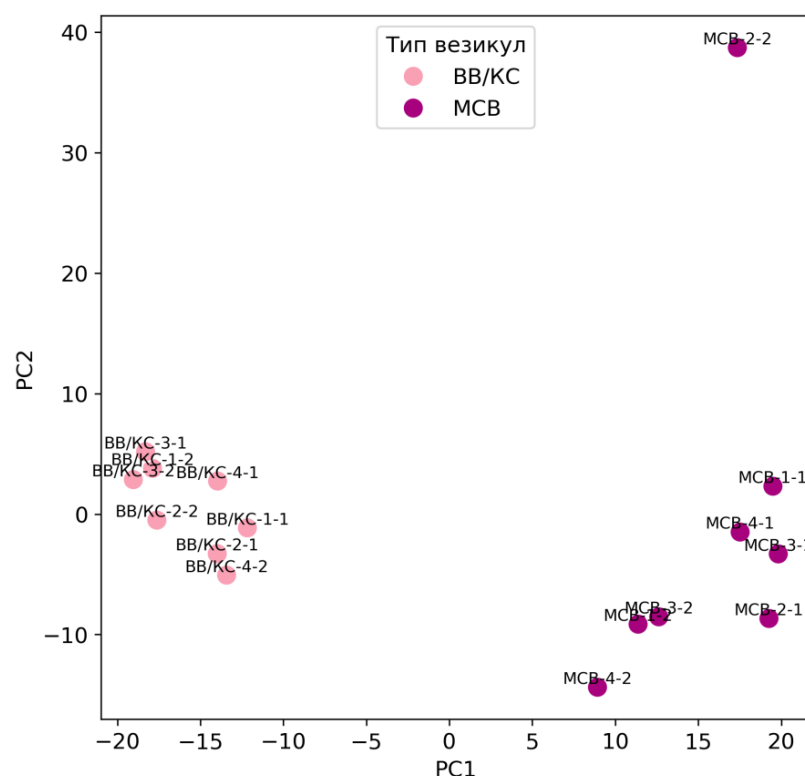


Рисунок 5 – Метод главных компонент для образцов ВВ/КС и МСВ до фильтрации данных

В дальнейший анализ вошли белки, имеющие $SC \geq 2$ хотя бы в одном образце определённого типа везикул от каждого донора. Фильтрация данных повысила внутригрупповую скоррелированность образцов. Тем не менее, образцы МСВ от донора 2 были слабо скоррелированы с другими образцами МСВ. Для повышения качества анализа были исключены пары образцов, полученные от одного донора и слабо скоррелированные между собой ($r_s < 0,5$). Таким образом, образцы МСВ от донора 2 были исключены из анализа. Исключение образцов и повторная фильтрация данных привели к значительному повышению внутригрупповой скоррелированности между образцами (рисунок 6).

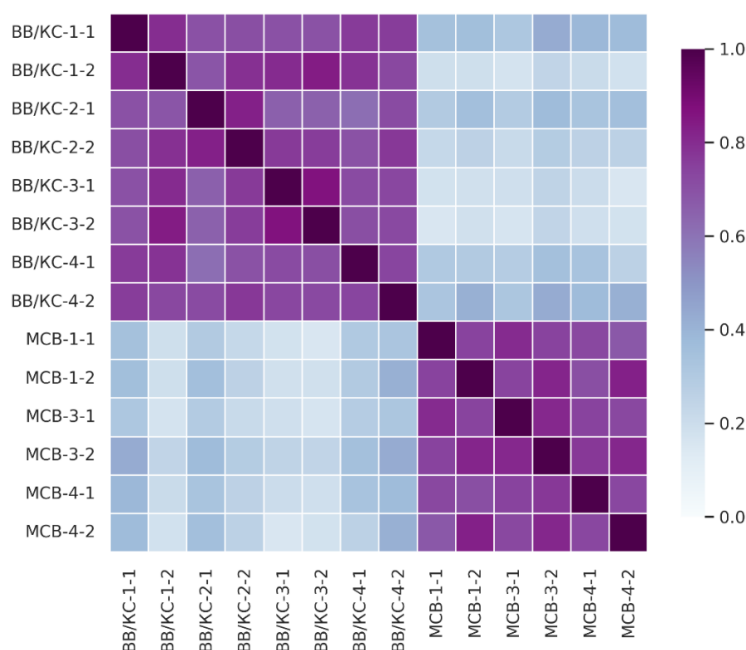


Рисунок 6 – Корреляционная матрица образцов ВВ/КС и МСВ после фильтрации данных и удаления низко скореллированных образцов, полученная в результате вычисления попарных коэффициентов корреляции Спирмена между образцами

Образцы ВВ/КС и МСВ также хорошо разделяются при помощи (РСА после проведения фильтрации данных и удаления низкокачественных образцов МСВ (рисунок 7).

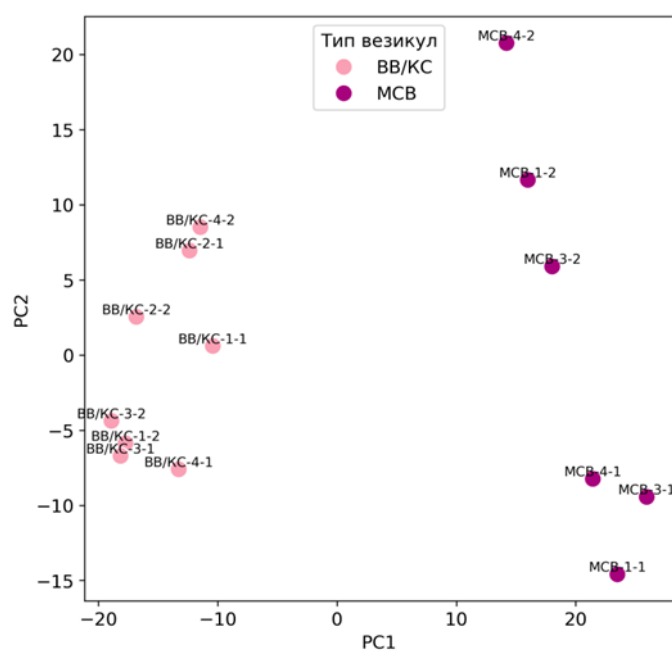


Рисунок 7 – Анализ главных компонент для образцов ВВ/КС и МСВ после фильтрации данных и удаления низко скореллированных образцов

В функциональный анализ вошли 728 белков, из которых 338 были общими для ВВ/КС и МСВ, 279 – обнаружены только в ВВ/КС и не обнаружены в МСВ, и 111 – обнаружены только в МСВ и не обнаружены в ВВ/КС (рисунок 8).

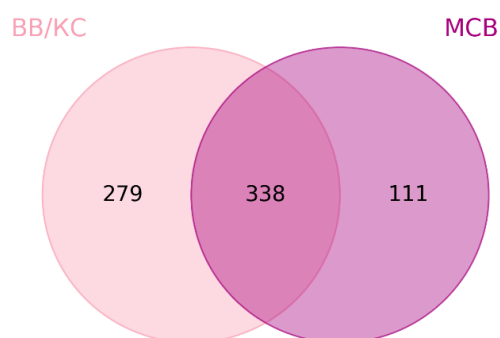


Рисунок 8 – Диаграмма Венна для белков ВВ/КС и МСВ после фильтрации данных и удаления низкокачественных образцов

Белковый состав ВВ/КС и МСВ был функционально аннотирован с помощью базы данных Gene Ontology Biological Process в версии 2025 года (рисунок 9, 10, 12-14).



Рисунок 9 – Анализ обогащения набора генов, соответствующих белкам, содержащимся только в ВВ/КС и не содержащимся в МСВ

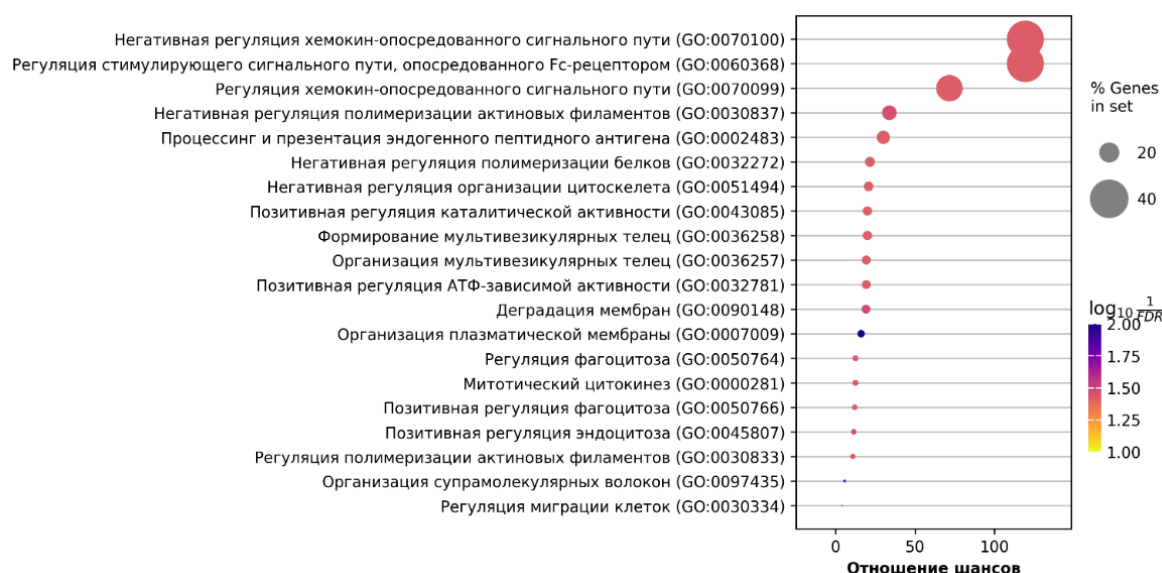


Рисунок 10 – Анализ обогащения набора генов, соответствующих белкам, содержащимся только в МСВ и не содержащимся в ВВ/КС

ВВ/КС в отличие от МСВ содержат белки, положительно регулирующие организацию ВКМ: коллагены (COL1A2, COL3A1, COL12A1, COL14A1, COL18A1); ферменты ремоделирования ВКМ (MMP1, LOXL2, LOXL4, PLOD1, SERPINH1, BMP1, QSOX1, PXDN); гликопротеины и протеогликаны ВКМ (LUM, MATN2, NID1, NID2, POSTN, HAS2); регуляторы сигнальных путей ВКМ (GREM1) и организацию супрамолекулярных волокон (RPL5, RPS9, RPL3, RPL21, RPS6, RPL8, GSPT1, DARS1) (рисунок 9). Данные параметры протеомного профиля ВВ/КС могут иметь важное значение в регуляции биосинтеза компонентов ВКМ хондроцитами при ОА. Также для везикул из секрета МСК-ПК характерно наличие белков, которые регулируют хемотаксис моноцитов (LGALS3, FLT1), ослабление окислительного стресса, индуцированного апоптотическим сигнальным путем (TNFAIP6, LRRC17), а также белки, подавляющие дифференцировку остеокластов (NONO, RACK1). Описанные в предыдущем предложении белки демонстрируют менее выраженное обогащение в образцах ВВ/КС по сравнению с белками, регулирующими биосинтез ВКМ, однако можно предположить, что эти белки могут положительно регулировать дегенеративные процессы при хронических остеоартрикулярных заболеваниях суставов, к которым относится также ОА. У МСВ содержатся компоненты

протеома, которые могут оказывать воздействие на функциональную активность макрофагов, например, в МСВ содержатся белки, положительно регулирующие процесс фагоцитоза (LMAN2;ANO6;PRKCA;CD47), эндоцитоза (LMAN2;PRKCA;CD47;B2M;VPS28), регуляции стимулирующего сигнального пути, опосредованного Fc-рецептором (PLSCR1;CD47), а также негативно регулирующие хемокин-опосредованный сигнальный путь (SLIT2;ROBO1) (рисунок 10). Данные свойства протеомного состава МСВ могут характеризовать их более выраженные эффекты по сравнению с ВВ/КС в отношении регуляции фагоцитоза у макрофагов, дифференцированных из моноцитов. Более детально противовоспалительные иммуномодулирующие свойства ВВ обоих типов будут рассмотрены в следующих разделах. Также был проведён анализ дифференциального содержания белков, общих для ВВ/КС и МСВ, в двух типах везикул, в результате которого были обнаружены 57 дифференциально содержащихся белков, из которых 22 преобладали в ВВ/КС и 35 – в МСВ (рисунок 11).

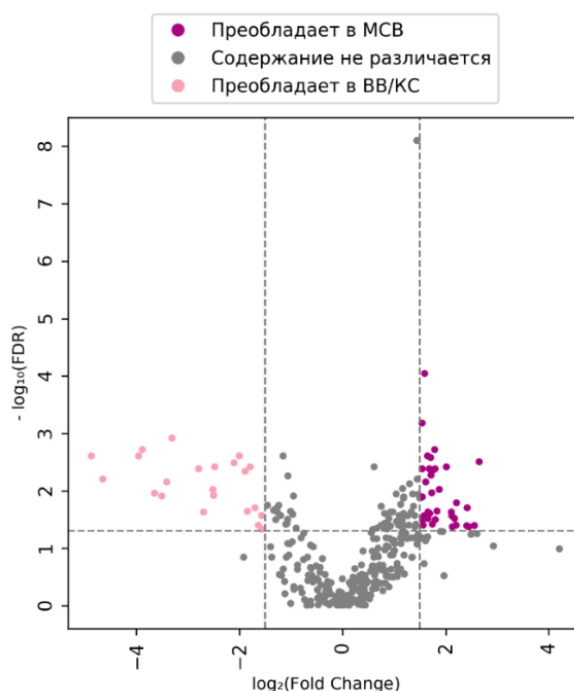


Рисунок 11 – Volcano диаграмма, отражающая результаты анализа дифференциального содержания белков в ВВ/КС и МСВ

Также был проведён функциональный анализ набора генов, соответствующих белкам, недифференциально содержащихся в ВВ/КС и МСВ (рисунок 12), повышено содержащихся в ВВ/КС по сравнению с МСВ (рисунок 13) и повышено содержащихся в МСВ по сравнению с ВВ/КС (рисунок 14).

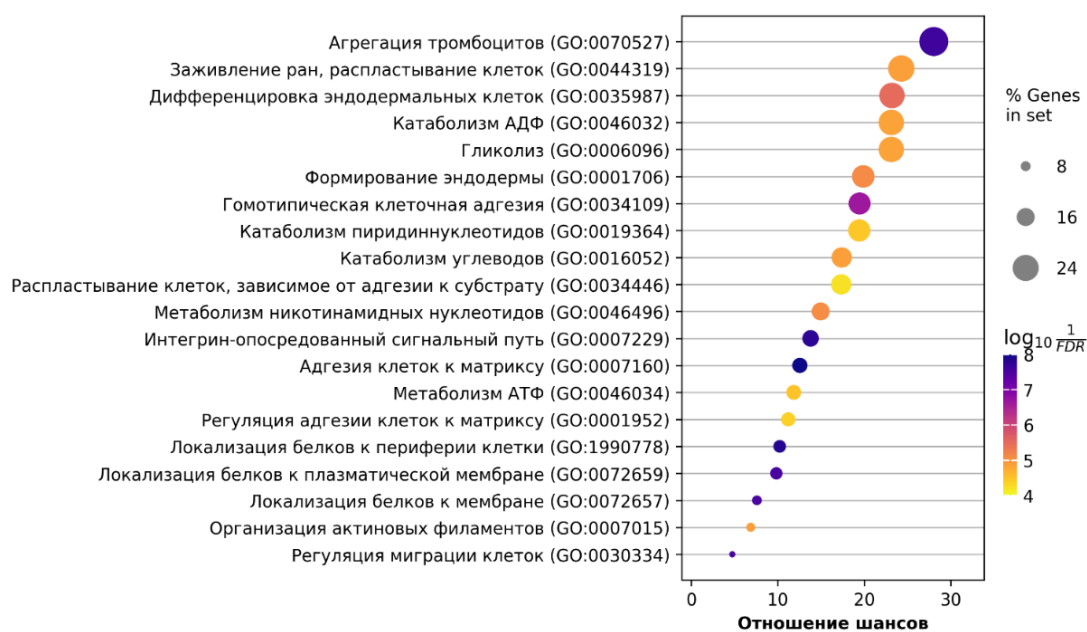


Рисунок 12 – Анализ обогащения набора генов, соответствующих белкам, количественное содержание которых сопоставимо в ВВ/КС и МСВ

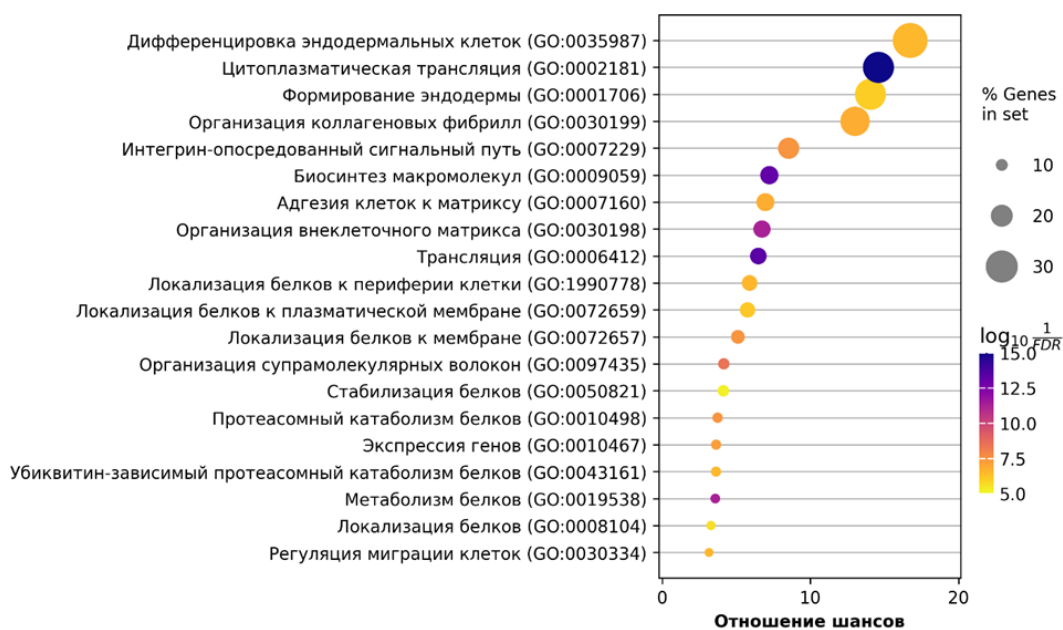


Рисунок 13 – Анализ обогащения набора генов, соответствующих белкам, содержание которых повышено в ВВ/КС по сравнению с МСВ

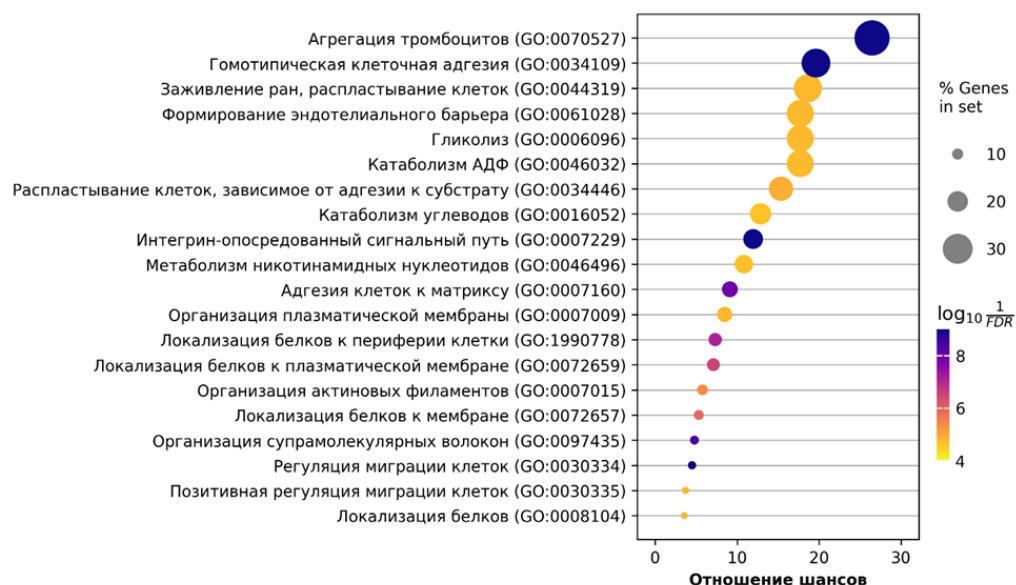


Рисунок 14 – Анализ обогащения набора генов, соответствующих белкам, содержание которых повышено в МСВ по сравнению с ВВ/КС

Для обоих типов ВВ характерно наличие белков, положительно регулирующих регенерацию ран: интегрины (ITGA5, ITGAV, ITGB5); мембранные адаптеры и рецепторы ВКМ (CD151, CD44); цитоскелетные и сигнальные белки (FLNA, RHOA). (рисунок 12) Протеом ВВ/КС более обогащен по сравнению с МСВ белками, связанными с регуляцией процессов организации коллагеновых фибрилл: коллагены (COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL12A1, COL14A1); гликопротеины и протеогликаны ВКМ (LUM); ферменты ремоделирования ВКМ (LOXL2, LOXL4, PLOD1, SERPINH1, BMP1, PXDN); регуляторы сигнальных путей ВКМ (GREM1). (рисунок 13). У МСВ наблюдается более богатый протеомный профиль в отличие от жидкофазных везикул белков, которые способствуют положительной регуляции регенеративных процессов в отношении ран, благодаря повышенному содержанию следующих белков: интегрины (ITGA5, ITGAV, ITGB1, ITGB5); мембранные адаптеры и рецепторы ВКМ (CD151, CD44); цитоскелетные белки и сигнальные модуляторы (FLNA, RHOA) (рисунок 14). Различия в протеомном составе ВВ/КС и МСВ, полученных из МСК-ПК, демонстрируют вероятные различия в их биогенезе и биологической активности. В частности, у ВВ/КС были выявлены белки, положительно регулирующие организацию ВКМ, организацию коллагеновых фибрилл, макромолекул. А у МСВ содержатся белки, регулирующие

процесс фагоцитоза, регенерацию ран. При этом стоит учесть, что протеомный состав ВВ обоих типов не может в полной мере отражать их биологическую активность и их свойства в рамках экспериментов *in vitro* и *in vivo*, сделанные в рамках данного исследования. Крайне важную роль в биологии ВВ играют компоненты транскриптома, которые регулируют экспрессию различных сигнальных путей, вовлеченных в регуляцию функциональной активности макрофагов и других компонентов врожденной иммунной системы.

3.2. Характеристика клеточных культур макрофагов и анализ влияния матрикс связанных везикул и внеклеточных везикул из кондиционированной среды, полученной из мезенхимных стромальных клеток пупочного канатика человека, на функциональную активность фагоцитов

3.2.1. Характеристика ТНР-1 макрофагов и макрофагов, полученных из моноцитов периферической крови человека

Для выбора источника макрофагов для исследования были проанализированы макрофаги, полученные из клеточной линии моноцитарного лейкоза ТНР-1 и макрофаги, дифференцированные из моноцитов (МДМ). ТНР-1 макрофаги являются широко используемой клеточной линией для изучения макрофагов, они обладают способностью к делению в отличие от МДМ. ТНР-1 макрофаги были дифференцированы в 3 фенотипа М0, М1 (ЛПС+ИФН- γ) и М2 (Ил4+Ил13). Данные макрофаги демонстрировали различия в морфологии клеток, где М0 макрофаги имели округлую форму, а у М1 макрофагов была несколько вытянутая форма (рисунок 15). М2 макрофаги имели вытянутую форму у отдельных клеток и по размеру были крупнее М0 макрофагов (рисунок 15).

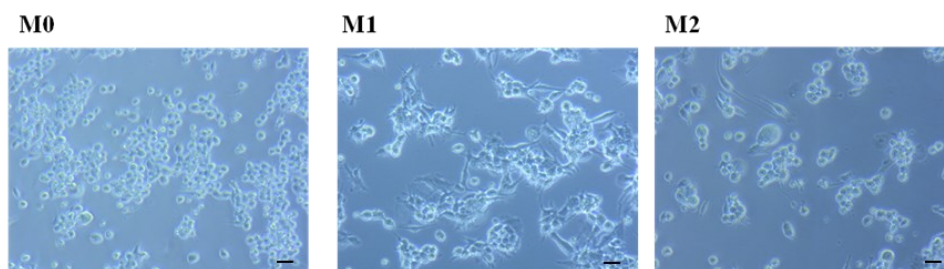


Рисунок 15 – Микрофотографии ТНР-1 макрофагов, дифференцированных в M0, M1, M2 фенотипы, полученные с помощью фазово-контрастной микроскопии, увеличение x20. На микрофотографиях представлен масштабный отрезок 50 мкм

Макрофаги, полученные из моноцитов периферической крови человека, были культивированы с ГМ-КСФ для получения (M0_ГМ) макрофагов и М-КСФ для получения (M0_М) фенотипов в течение 6 суток. На 7 день M0_ГМ были дифференцированы в M1 фенотип с помощью (ИФН- γ +ЛПС), и M0_М макрофаги были дифференцированы в M2 фенотип с помощью цитокина Ил-4. Данные макрофаги демонстрировали различия в морфологии, где M0_ГМ и M1 макрофаги имели округлую, приплюснутую сверху форму, тогда как большинство M0_М и M2 макрофагов имели вытянутую форму (рисунок 16).

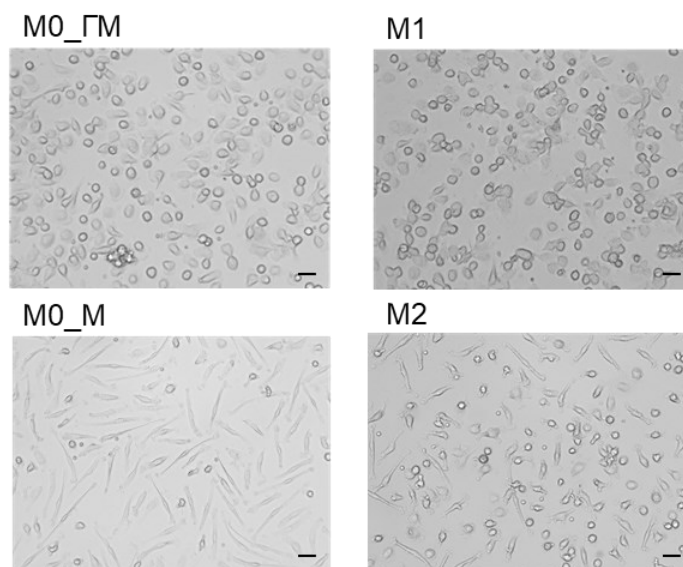


Рисунок 16 – Микрофотографии МДМ макрофагов, дифференцированных в M0_ГМ, M1, M0_М, M2 фенотипы, полученные с помощью фазово-контрастной микроскопии, увеличение x20. На микрофотографиях представлен масштабный отрезок 50 мкм

Для анализа дифференцировки МДМ и ТНР-1 макрофагов в М1 состояние был проведен ИФА провоспалительного цитокина tumor necrosis factor alpha (TNF- α или ФНО- α), представляющего собой основной маркер М1 поляризации макрофагов. Результаты ИФА показали, что МДМ и ТНР-1 макрофаги имели выраженные различия в уровне секреции данного воспалительного цитокина в пользу МДМ макрофагов (рисунок 17).

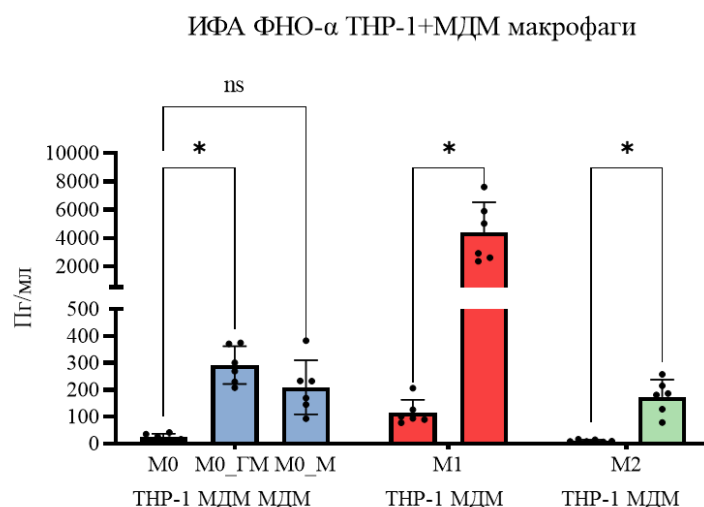


Рисунок 17 – ИФА секреции цитокинов ФНО- α МДМ и ТНР-1 макрофагов. Для статистического анализа использован однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим множественным сравнением по методу Тьюки. * $p < 0.05$; ns ($p > 0.05$)

Помимо способности макрофагов двух типов секретировать различные цитокины, дополнительно был проведен анализ экспрессии поверхностных рецепторов (CD86 и CD206) у МДМ и ТНР-1 макрофагов. CD86 – маркер М1 макрофагов, представляющий собой вспомогательный белок для активации передачи сигнала с антиген-презентирующей клетки Т-лимфоциту, и CD206 – маннозный рецептор, являющийся М2 маркером поляризации макрофагов. Результаты измерения экспрессии указанных белков с помощью проточной цитометрии показали, что у ТНР-1 макрофагов нет различий между фенотипами М1, М0, М2 макрофагов, и экспрессия CD86 и CD206 практически на минимальном

уровне (рисунок 18А). В то же время МДМ клетки показали выраженные фенотипические различия по данным белковым маркерам, где М1 макрофаги больше других фенотипов М2, М0_ГМ, М0_М экспрессировали CD86, а у М2 макрофагов был наибольший уровень экспрессии CD206 по сравнению с другими фенотипами М1, М0_М, М0_ГМ (рисунок 18Б).

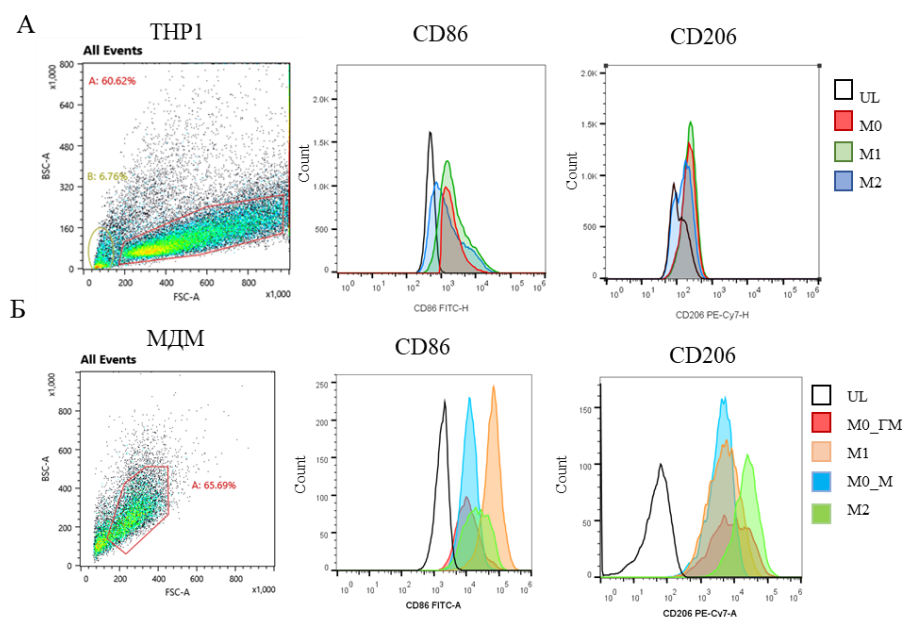


Рисунок 18 – Проточная цитометрия маркеров поляризации ТНР-1 и МДМ макрофагов в М1 и М2 фенотипы. А. Для идентификации клеток ТНР-1 макрофагов и исключения остатков мертвых клеток использовали график зависимости плотности в области прямого рассеяния (FSC-A) от площади бокового рассеяния (BSC-A). Гистограммы отображают интенсивность флуоресценции antiCD86-FITC или antiCD206-PE-Cy7, которыми метили ТНР-1 макрофаги для идентификации М0, М1 и М2 фенотипов. Б. Диаграмма FSC-A и BSC-A для МДМ клеток. Гистограммы отображают интенсивность флуоресценции antiCD86-FITC или antiCD206-PE-Cy7 и позволяют различать М0_ГМ, М1, М0_М и М2 фенотипы МДМ. Черным цветом на гистограммах для ТНР-1 и МДМ макрофагов представлен UL – неокрашенный контроль

Исходя из полученных результатов анализа секреции и экспрессии маркеров поляризации МДМ и ТНР-1, было установлено, что ТНР-1 макрофаги не экспрессируют М2 маркеры поляризации и имеют меньшую экспрессию М1 маркеров по сравнению с МДМ и существенно меньшую секрецию провоспалительного цитокина ФНО- α . Дальнейшую исследовательскую работу по

оценке влияния ВВ на функциональную активность фагоцитов проводили на макрофагах, полученных из моноцитов периферической крови человека.

3.2.2. Влияние внеклеточных везикул мезенхимных стромальных клеток пупочного канатика на экспрессию поверхностных рецепторов и секреторную активность макрофагов

Макрофаги, полученные из моноклеарных клеток периферической крови, были выбраны в качестве модели *in vitro* для оценки иммуномодулирующих свойств ВВ/КС и МСВ МСК-ПК. Способность данных внеклеточных везикул модулировать провоспалительную активность МДМ оценивалась для четырех фенотипов: М0, культивируемых с ГМ-КСФ (М0_ГМ), М0, культивируемых с М-КСФ (М0_М), провоспалительных макрофагов М1 (ИФН γ + ЛПС) и репаративных макрофагов М2 (Ил-4). Все фенотипы макрофагов обладали типичной фагоцитарной активностью, свойственной МДМ. Способность макрофагов фагоцитировать ВВ была показана для ВВ/КС и МСВ, меченных мембранным красителем РКН26 на примере макрофагов М1 (рисунок 19). Для оценки фагоцитоза несвязанного красителя РКН26, который остаточно присутствует в образцах ВВ, М1 макрофаги культивировали с данным красителем, осажденным без ВВ. Результаты показали присутствие слабого фагоцитоза данного красителя. Интенсивность флуоресценции клеток была существенно ниже, чем в образцах М1, инкубированных с ВВ/КС и МСВ РКН26 (рисунок 19). Данные результаты позволяют предположить, что образцы ВВ РКН26 преимущественно очищены от данного красителя, и внутриклеточные фагосомы, окрашенные красным цветом, обусловлены фагоцитозом ВВ РКН26, а не свободного красителя РКН26 или его мицелл. Также для контроля влияния ВВ без окраски к М1 макрофагам были добавлены ВВ/КС, не окрашенные РКН26. На микрофотографии наблюдается отсутствие сигнала от РКН26 (рисунок 19). При добавлении к ВВ РКН26 cytochalasin D, ингибитора фагоцитоза, наблюдали выраженное снижение

содержания захваченных макрофагами ВВ, что позволяет предположить о частичном ингибировании процесса фагоцитоза ВВ РКН26(рисунок 19).

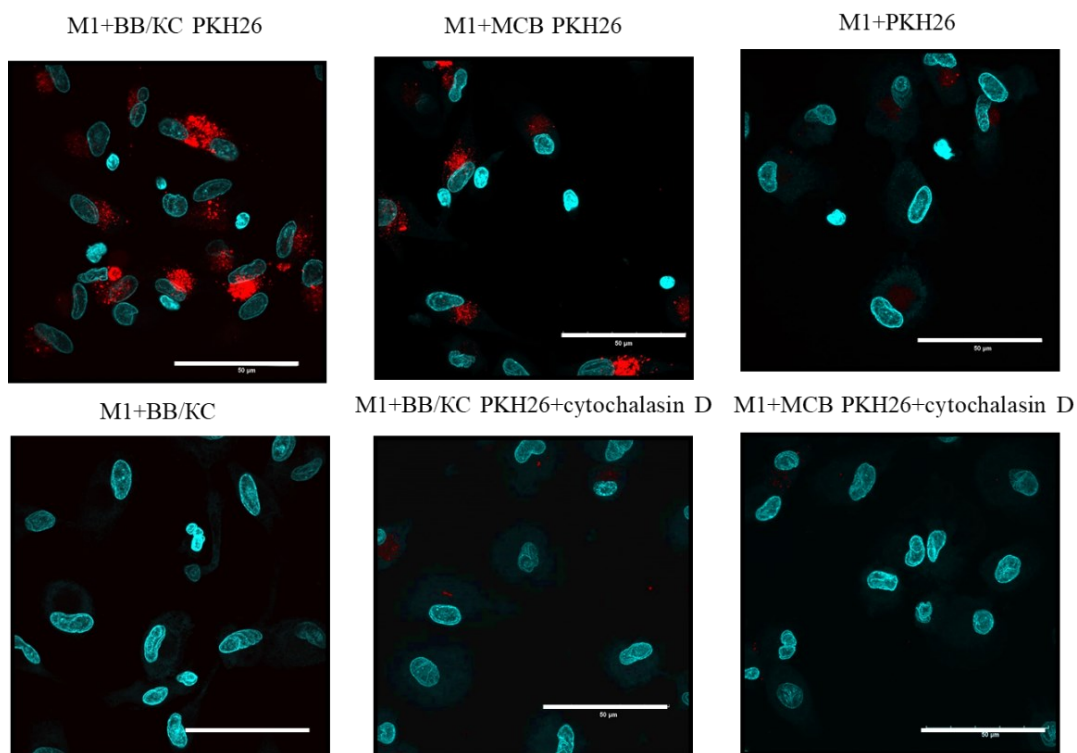


Рисунок 19 – Микрофотографии М1 макрофагов, фагоцитировавших ВВ/КС и МСВ, полученных из МСК-ПК и окрашенных мембранным красителем РКН26. Изображения получены с помощью конфокальной микроскопии. На рисунке представлены М1 макрофаги, культивируемые с ВВ/КС и МСВ, окрашенными РКН26 (верхний ряд снимков); культивируемые с красителем РКН26 (верхний ряд снимков справа), культивируемые в ВВ без красителя РКН26 (нижний ряд слева). Внизу расположены изображения фагоцитоза ВВ РКН26, культивируемых с добавлением ингибитора фагоцитоза cytochalasin D (2 μM). Красным цветом флуоресцирует мембранный краситель РКН26, синим флуоресцирует ядерный краситель Hoechst 33258. Увеличение x100. На микрофотографиях представлен масштабный отрезок 50 мкм

Был проведен сравнительный анализ влияния МСВ и ВВ/КС, полученных из МСК 3 источников, а именно из пупочного канатика, жира и десны, которые культивировались в виде монослойных клеточных культур (2d) и в виде сфероидов (3d), на модуляцию провоспалительной активности М1 макрофагов. Поскольку согласно литературным данным ВВ, выделенные из сфероидов, обладают более выраженными иммуномодулирующими свойствами по сравнению с ВВ из

монослойных клеточных культур в отно [278]. На 6-й день культивирования МДМ проводилась замена среды с добавлением индукторов поляризации для получения макрофагов М1 (ИФН- γ + ЛПС). К макрофагам были добавлены также МСВ или ВВ/КС в концентрации 100 мкг ВВ на 1 мл среды в пересчете на белок, в контрольный образец клеток добавок ВВ не делали. Через 48 часов культивирования была отобрана среда для измерения продукции провоспалительных цитокинов ФНО- α (рисунок 20).

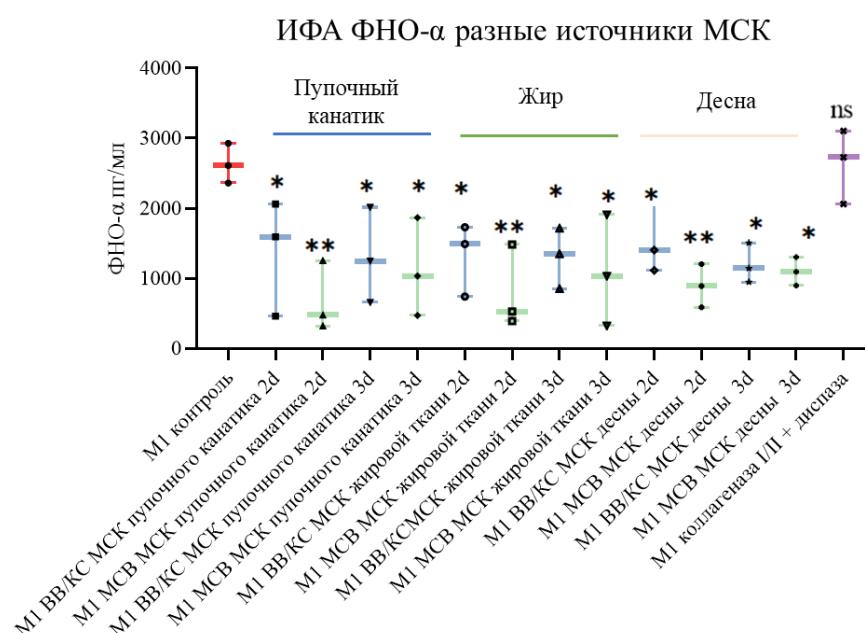


Рисунок 20 – ИФА влияния ВВ/КС и МСВ, полученных из МСК, выделенных из разных источников продукцию цитокина ФНО- α провоспалительными М1 макрофагами. Красным цветом отмечены данные для М1 контроля без ВВ, голубым отмечены М1 макрофаги, инкубируемые с ВВ/КС, зеленым – М1 макрофаги, инкубируемые с МСВ. Фиолетовым цветом отмечены М1 контроль, инкубируемые с протеазами (коллагеназами I/II+ диспаза) для выделения МСВ. Для статистического анализа использован ANOVA с последующим множественным сравнением по методу Тьюки. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; ns ($p > 0.05$)

При измерении влияния ВВ из различных источников МСК наблюдалось значимое снижение секреции ФНО- α М1 макрофагами, при этом не наблюдалось выраженных различий между конкретными типами МСК-донорами ВВ. Также условия культивирования МСК в виде монослойных клеточных культур и в виде

сфероидов не оказало значимого влияния на продукцию ФНО- α макрофагами, наблюдалась лишь тенденция к большему снижению уровня ФНО- α после добавления ВВ/КС, полученных из сфероидов (рисунок 20). Также было проверено влияние протеаз коллагеназ I/II и диспазы на продукцию ФНО- α М1 макрофагами. Данные протеазы используются для выделения МСВ из ВКМ МСК, и они были добавлены в тех же концентрациях, что используются для выделения МСВ. Результаты показали, что данные протеазы не оказывают значимого влияния на продукцию ФНО- α М1 макрофагами. Исходя из полученных результатов дальнейшая работа по изучению влияния ВВ/КС и МСВ, полученных из МСК, была проведена для монослойных МСК-ПК человека в качестве источника ВВ обоих типов. Данная культура МСК демонстрировала стабильно высокую скорость деления клеток по сравнению с другими источниками МСК – десны и жировой ткани, при этом не наблюдалось значимых различий влияния ВВ/КС и МСВ на секреторную активность воспалительных М1 макрофагов человека.

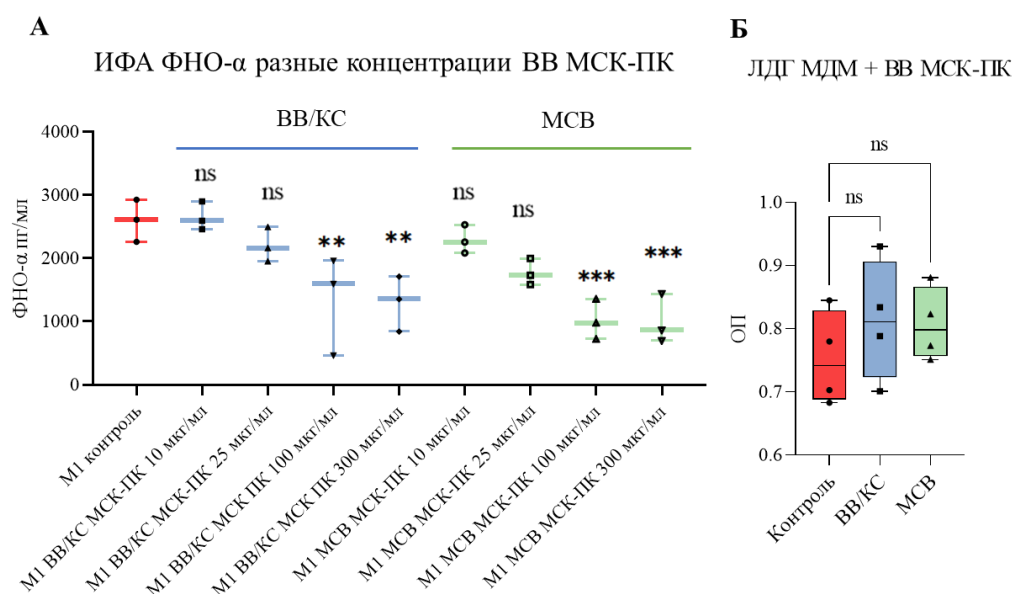


Рисунок 21 –А – Результаты ИФА, демонстрирующие влияние различных концентраций ВВ-МСК-ПК на секрецию ФНО- α М1-макрофагами, Б – Анализ цитотоксичности ВВ-МСК-ПК при концентрации белка в образцах везикул 100 мкг/мл, выполненный с помощью теста на лактатдегидрогеназу. Для статистического анализа использован ANOVA с последующим множественным сравнением по методу Тьюки. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns ($p > 0.05$)

Помимо анализа влияния источника МСК на продукцию воспалительного цитокина ФНО- α у М1 макрофагов была проведена дополнительная оценка влияния концентрации ВВ МСК-ПК человека, которые были нормированы в пересчете на белок (рисунок 21А). В ходе анализа были использованы 4 концентрации ВВ 10 мкг/мл, 25 мкг/мл, 100 мкг/мл и 300 мкг/мл, которые были добавлены одновременно с индукторами поляризации в М1 состояние (ИФН- γ + ЛПС), после 48 часов культивации были отобраны среды для измерения ИФА ФНО- α . Результаты показали, что для обоих типов ВВ при концентрациях везикул 10 мкг/мл, 25 мкг/мл наблюдалось незначительное снижение продукции ФНО- α М1 макрофагами (рисунок 21А). При добавлении ВВ концентраций 100 мкг/мл и 300 мкг/мл соответственно наблюдалось статистически выраженное снижение уровня секреции данного воспалительного цитокина у М1 макрофагов относительно контрольных клеток без ВВ, причем не наблюдалось выраженной разницы эффекта между двумя группами 100 мкг/мл и 300 мкг/мл концентрациями везикул (рисунок 21А). Исходя из чего в дальнейшей работе с МДМ были использованы МСВ и ВВ/КС МСК-ПК в концентрации 100 мкг/мл в пересчете на белок. Стоит указать, что нормирование образцов ВВ на уровень белка менее точное, чем нормирование на количество везикул, которое можно измерить с помощью анализа траекторий наночастиц (Nanoparticle tracking analysis). Тем не менее, поскольку в исследовании ВВ выделялись из кондиционированной среды и ВКМ МСК, то есть из стандартизированной клеточной культуры, а не из сложных биологических жидкостей (кровь, слюна и др.), вариабельность количества ВВ в образцах была относительно низкой, что делает выбранный метод нормирования приемлемым для поставленных задач.

Также был проведен анализ цитотоксичности ВВ-МСК-ПК с помощью определения уровня лактатдегидрогеназы в среде, собранной от макрофагов после 48 часов инкубации с ВВ с основной рабочей концентрацией 100 мкг/мл в пересчете на белок (рисунок 21Б). Результаты измерения лактатдегидрогеназы показали, что ВВ/КС и МСВ незначительно увеличивали уровень секреции макрофагами данного белка в культуральную среду, что говорит об отсутствии

статистически значимого цитотоксического эффекта ВВ-МСК-ПК в концентрации 100 мкг/мл в пересчете на белок.

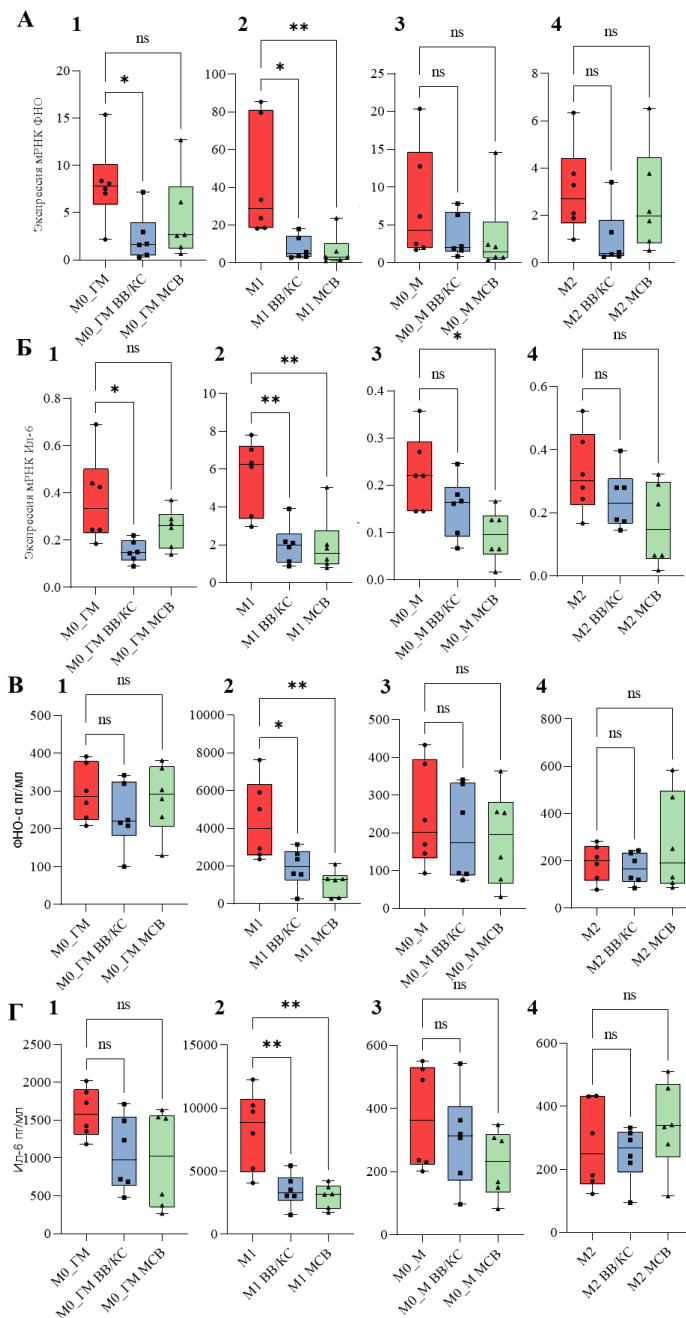


Рисунок 22 – Модуляция уровней провоспалительных цитокинов в макрофагах, дифференцированных из моноцитов, после их инкубации с ВВ/КС и МСВ, полученными из МСК-ПК. Результаты кПЦР-ОТ, демонстрирующие уровень экспрессии мРНК провоспалительных цитокинов, для А – ФНО-α, Б – Ил-6, и ИФА, демонстрирующий уровень секреции воспалительных цитокинов, для В – ФНО-α, Г – Ил-6 для следующих фенотипов макрофагов: M0_ГМ (1), M1 (2), M0_М (3), M2 (4). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; ns ($p > 0.05$)

На следующем этапе был проведен анализ влияния МСВ и ВВ/КС, полученных из МСК-ПК, на секрецию провоспалительных цитокинов у МДМ различных фенотипов. К M0_ГМ, M1 (ИФН- γ + ЛПС), M0_М и M2 (Ил-4) макрофагам были добавлены МСВ и ВВ/КС на 6-ой день культивирования в концентрации 100 мкг ВВ на 1 мл среды в пересчете на белок. Спустя 48 часов была отобрана среда для измерения продукции провоспалительных цитокинов ФНО- α и Ил-6 (методом ИФА), а клетки были лизированы для характеристики экспрессии мРНК цитокинов методом кПЦР-ОТ (рисунок 22). МСК-ПК МСВ и ВВ/КС продемонстрировали значимую иммуномодулирующую активность в отношении провоспалительных макрофагов M1, причем оба типа везикул значительно снижали как экспрессию, так и секрецию ФНО- α и Ил-6 (рисунок 22А2, Б2, В2, Г2). В группе M0_ГМ, которая фенотипически наиболее близка к макрофагам M1 и экспрессирует маркер M1 CD86, значительное снижение экспрессии мРНК ФНО- α и Ил-6 наблюдалось после инкубации с ВВ/КС (рисунок 22А1, Б1), однако секреция цитокинов клетками оставалась неизменной (рисунок 22В1, Г1). МСВ снижали транскрипцию гена Ил-6 в макрофагах M0_М, но концентрация цитокина в среде оставалась практически неизменной (рисунок 22Б3, Г3). В целом, результаты показывают, что оба типа внеклеточных везикул МСК-ПК – ВВ/КС и МСВ обладают выраженной противовоспалительной активностью в отношении макрофагов M1, изменяя их фенотип в сторону сниженной секреции провоспалительных цитокинов. Следовательно, можно заключить, что МСК-ПК МСВ и ВВ/КС оказывают примерно одинаковый иммунодепрессивный эффект *in vitro* в отношении макрофагов M1, снижая продукцию воспалительных цитокинов, характерных для фенотипа макрофагов M1.

Помимо изучения секреторной активностью для анализа влияния ВВ, полученных из МСК-ПК, на фенотипические маркеры макрофагов также были проведены эксперименты по оценке экспрессии поверхностных маркеров: CD86 – маркера M1 поляризации, CD206 – маркера M2 поляризации у МДМ различных фенотипов - M0_ГМ, M1, M0_М, M2. Оценка экспрессии CD206 была проведена на уровне мРНК и белка с помощью количественной кПЦР-ОТ, ИЦХ и проточной

цитометрии (рисунки 23, 24, 25). В случае CD86 были использованы кПЦР-ОТ и проточная цитометрия (рисунки 23, 24, 25).

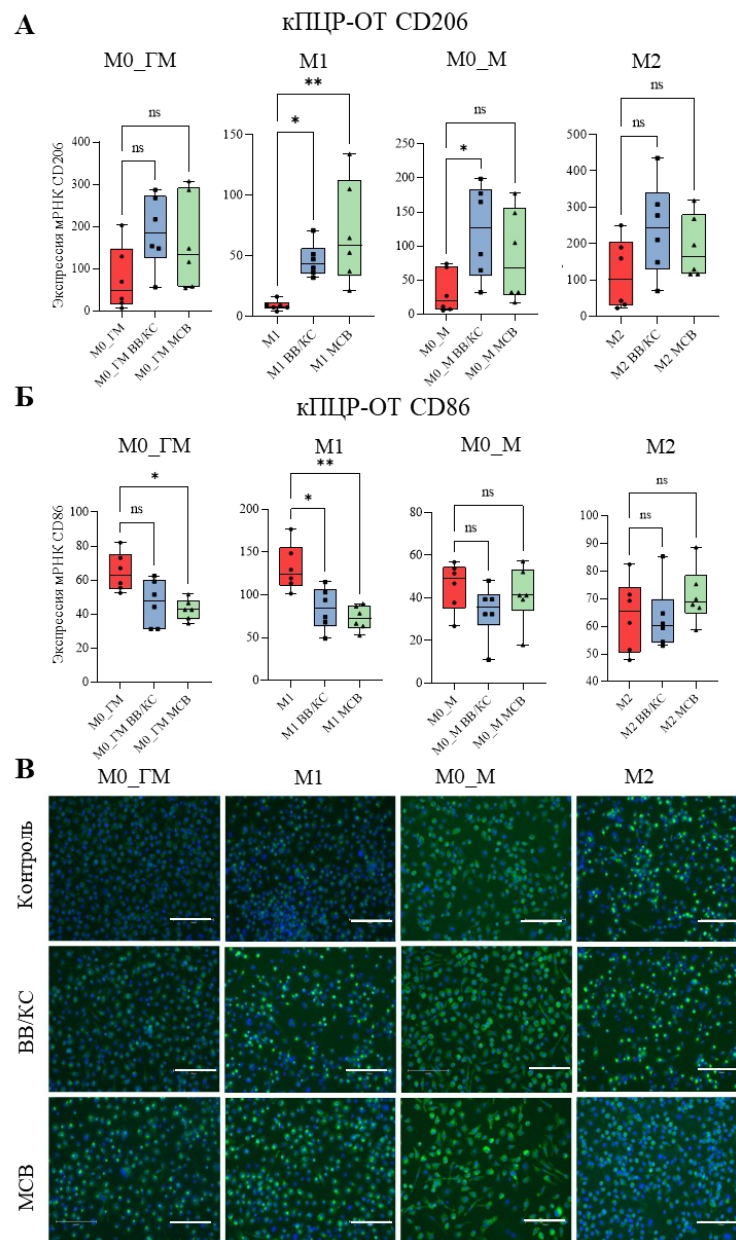


Рисунок 23 – Модуляция экспрессии рецептора CD206 у МДМ, после их инкубации с ВВ-МСК-ПК. А – кПЦР-ОТ для CD206. Б – кПЦР-ОТ для CD86. В – ИЦХ анализ CD206: зеленый сигнал представляет собой флуоресценцию вторичных антител-FITC к anti-CD206, ядра окрашены в синий цвет с помощью Hoechst. Микрофотографии получены с помощью флуоресцентной микроскопии, увеличение x20. Масштабный отрезок 150 мкм. Для статистического анализа использован непараметрический критерий Краскела–Уоллиса с последующим множественным сравнением с поправкой по Данну. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; ns ($p > 0.05$)

С помощью кПЦР-ОТ было установлено, что оба типа ВВ усиливали экспрессию мРНК CD206 у M1 макрофагов, достигая максимума в группе M1+МСВ (рисунок 23А). ВВ/КС значимо усиливали экспрессию мРНК CD206 у M0_M макрофагов (рисунок 23А). После окрашивания макрофагов различных фенотипов – M0_ГМ, M1, M0_M, M2 - anti-CD206-FITC методом ИЦХ выявил тенденцию к усилению флуоресценции клеток после воздействия ВВ/КС и МСВ у M1 и в меньшей степени у M0_ГМ макрофагов (рисунок 23В). В экспериментах, выполненных с помощью метода ИЦХ anti-CD206, у M2 макрофагов наблюдалось незначительное снижение интенсивности флуоресценции в группах M2+МСВ/ВВ/КС, что несколько контрастирует с результатами для кПЦР-ОТ, где наблюдалось статистически незначимое увеличение уровня экспрессии мРНК CD206 (рисунок 23А,Б). Влияние ВВ-МСК-ПК на экспрессию мРНК CD86, показало снижение экспрессии гена данного маркера M1 под действием обеих типов ВВ с более выраженным эффектом в группе M1 МСВ (рисунок 23Б). Помимо M1 макрофагов экспрессия CD86 снижалась у M0_ГМ макрофагов, после инкубации с МСВ (рисунок 23Б). В группе M0_ГМ+ВВ/КС также наблюдалась тенденция к снижению экспрессии мРНК CD86, однако без статистически значимого изменения в отличие от воздействия МСВ (рисунок 23Б).

Для количественного анализа изменений уровня экспрессии белков CD206 и CD86 была проведена проточная цитометрия (рисунки 24, 25). В ходе экспериментов было установлено, что оба типа ВВ, полученных из МСК-ПК, модулировали экспрессию поверхностных белков CD86 и CD206 у M1 макрофагов (рисунок 24В, Г). Для CD86 наблюдалось снижение экспрессии данного белка в первую очередь у M1 макрофагов, при этом МСВ оказали более выраженный эффект по сравнению с ВВ/КС (рисунок 24В). Также ВВ обоих типов усиливали экспрессию CD206 у M1 макрофагов (рисунок 24Г). Для всех фенотипов макрофагов M0_ГМ, M1, M0_M, M2 были количественно обчислены данные интенсивности флуоресценции, данные представлены на графиках в виде медианной интенсивности флуоресценции (MFI) (рисунок 25А, Б).

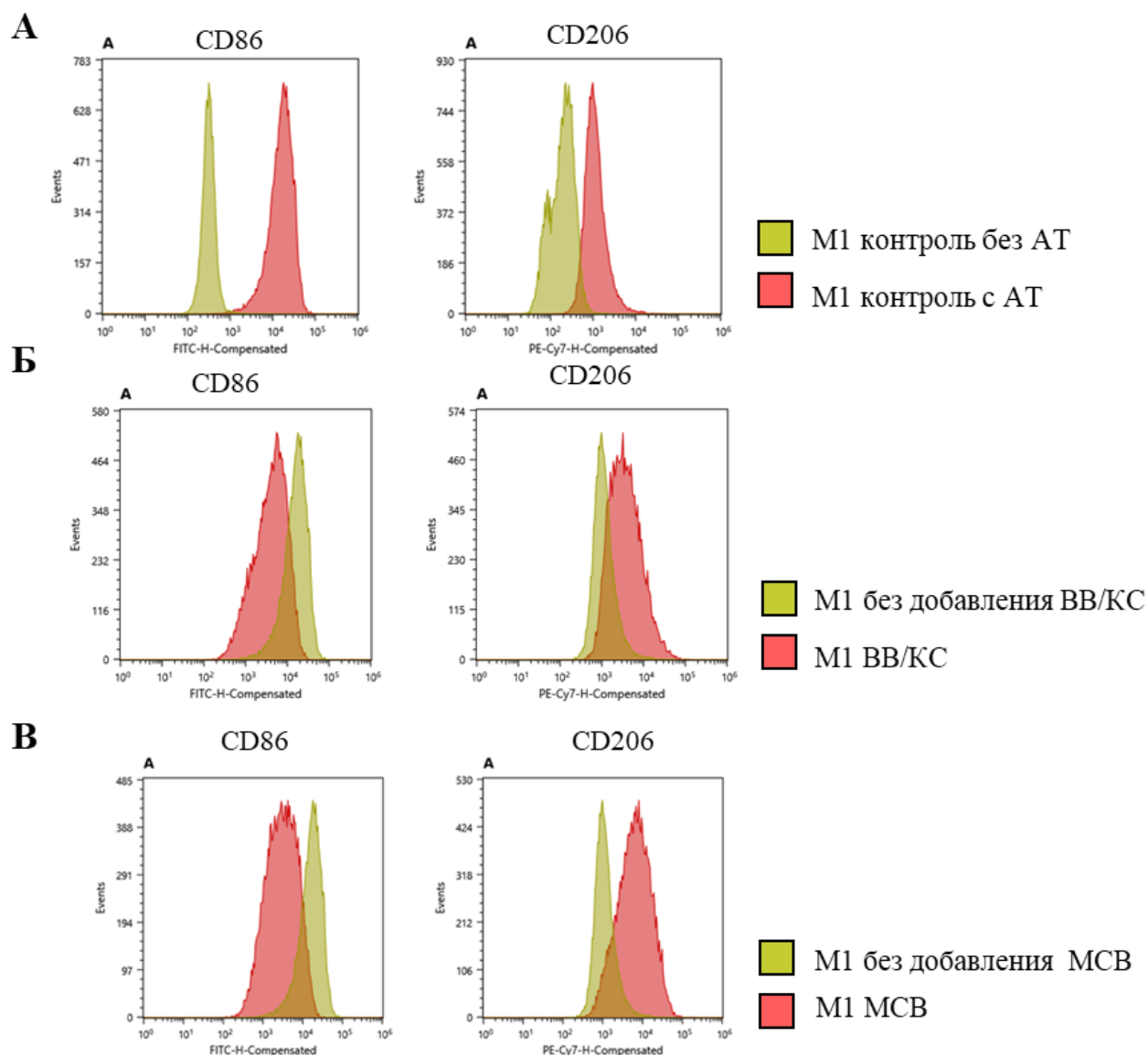


Рисунок 24 – Гистограммы результатов проточной цитометрии по анализу влияния ВВ МСК-ПК на уровень экспрессии маркеров поляризации МДМ. А. – гистограммы отображают интенсивность флуоресценции у положительного М1 контроля без добавления ВВ, окрашенного АТ antiCD86-FITC, antiCD206-PE-Cy7 и отрицательного контроля без АТ. Б – гистограммы отображают интенсивность флуоресценции antiCD86-FITC, antiCD206-PE-Cy7 у М1 без воздействия ВВ/КС и М1 макрофагов после воздействия ВВ/КС с добавлением АТ. В – гистограммы отображают интенсивность флуоресценции antiCD86-FITC, antiCD206-PE-Cy7 у М1 контроля без воздействия МСВ и М1 макрофагов после воздействия МСВ с добавлением АТ

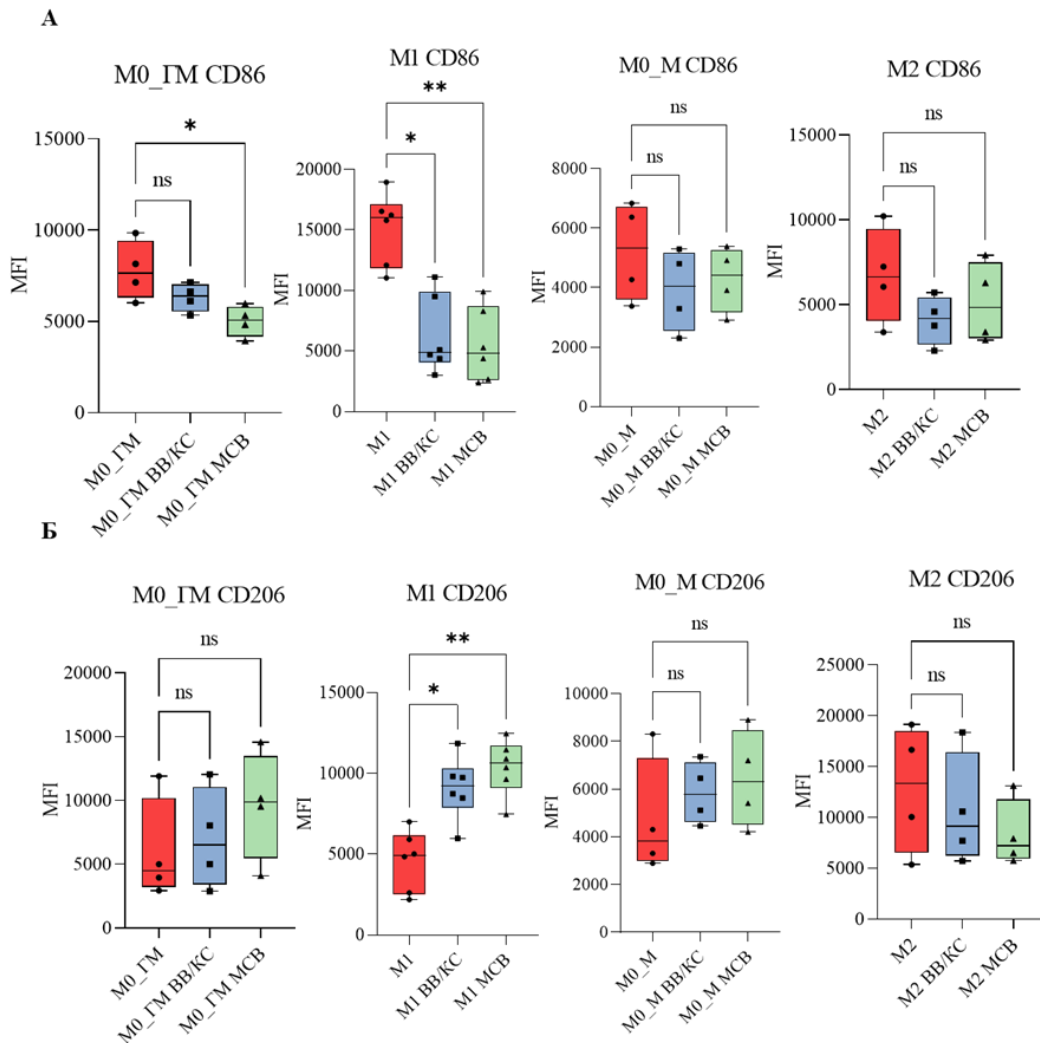


Рисунок 25 – Данные MFI проточной цитометрии для M0_ГМ, M1, M0_M, M2 макрофагов после воздействия ВВ/КС и МСВ, полученных из МСК-ПК человека. MFI для А – CD-86-FITC M1 маркера поляризации, Б – CD-206-Рe-Су M2 маркера поляризации. Для статистического анализа использован непараметрический критерий Краскела–Уоллиса с последующим множественным сравнением с поправкой по Данну. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; ns ($p > 0.05$)

Результаты, полученные с помощью проточной цитометрии демонстрируют снижение экспрессии CD86 у M1 макрофагов после воздействия ВВ/КС и МСВ, полученных из МСК-ПК (рисунок 25А). Также МСВ-МСК-ПК оказали ингибирующий эффект на экспрессию мРНК CD86 у M0_ГМ макрофагов (рисунок 25А). Количественные изменения в экспрессии CD206, полученные с помощью проточной цитометрии (рисунок 25Б), совпадают с результатами кПЦР-ОТ для CD206 у M1 макрофагов (рисунок 23А). Результаты представленные на (рисунках

22-25) позволяют предположить, что МСВ и ВВ/КС МСК-ПК человека вызывают уменьшение секреции цитокинов ФНО- α и Ил-6, а также изменения экспрессии поверхностных рецепторов CD86, CD206 у M1 макрофагов, способствуя изменению их фенотипа в сторону M2-подобных макрофагов, имеющих менее выраженную провоспалительную активность по сравнению с M1 макрофагами, культивируемыми без ВВ. При этом стоит учесть, что МСВ МСК-ПК способствовали незначительному усилению секреции ФНО- α и Ил-6 и незначительному снижению экспрессии рецептора CD206 у M2 макрофагов, вероятно данный тип ВВ стимулирует небольшую провоспалительную активацию у M2 макрофагов. Данные результаты демонстрируют, что МСВ усиливают поляризацию M1 макрофагов в направлении M2, при этом индуцированный фенотип отличается от M2 макрофагов, поляризованных с помощью Ил-4.

3.2.3. Анализ влияния внеклеточных везикул мезенхимных стромальных клеток пупочного канатика человека на способность макрофагов к фагоцитозу и продукции активных форм кислорода

В ходе исследования фагоцитарной активности разных фенотипов макрофагов было установлено, что способность макрофагов к фагоцитозу бактерий E.Coli-FITC усиливается при культивировании с М-КСФ и более связана с M0_M и M2 фенотипом макрофагов. Макрофаги, полученные из моноцитов человека, имели наименьшую способность к фагоцитозу, если они были поляризованы в M1 и M0_ГМ фенотипы, и наибольшую у M2 и M0_M фенотипов соответственно (рисунок 26А, Б). ВВ/КС и МСВ, полученные из МСК-ПК человека, усиливали фагоцитоз у фенотипов макрофагов: M0_ГМ, M1 (рисунок 26Б). Для M0_M и M2 макрофагов наблюдалась тенденция к усилению фагоцитоза E.Coli-FITC бактерий после инкубации клеток с ВВ/КС, однако эффекты не были статистически значимыми, при этом МСВ в отношении M2 макрофагов незначительно ингибировали данную активность (рисунок 26Б). Полученные результаты

позволяют предположить, что МСВ и ВВ/КС МСК-ПК приводят к изменениям M0_ГМ, M1 макрофагов, делая их фагоцитарную активность сопоставимой с противовоспалительным фенотипом, которые культивировали с М-КСФ -M2 и M0_M.

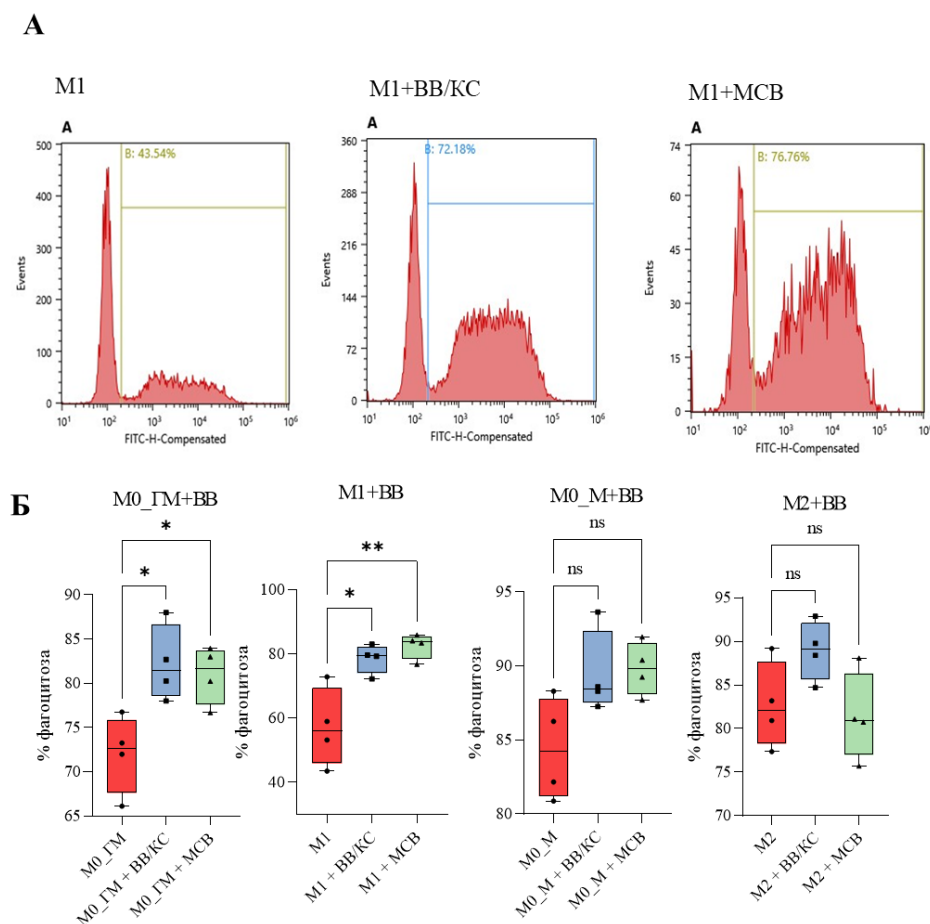


Рисунок 26 – Модуляция фагоцитарной активности M0_ГМ, M1, M0_M, M2 макрофагов, дифференцированных из моноцитов, ВВ/КС и МСВ, полученными из МСК-ПК человека. А – Гистограммы распределения флуоресценции FITC после инкубации макрофагов с *E. coli*-FITC. На гистограммах отображен процент макрофагов от общей популяции, -FITC бактерии. Гистограммы приведены для M1 макрофагов, культивируемых без и с ВВ МСК-ПК. Б – количественный анализ % фагоцитоза M0_ГМ, M1, M0_M, M2 макрофагов после воздействия ВВ МСК-ПК. Для статистического анализа использован непараметрический критерий Краскела–Уоллиса с последующим множественным сравнением с поправкой по Данну. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; ns ($p > 0.05$)

Способность макрофагов генерировать активные формы кислорода является одной из важнейших функций данных фагоцитов, поскольку продуцируемые

свободные радикалы наряду с протеазами участвуют в уничтожении патогенных микроорганизмов. Также АФК играют важную роль в регуляции физиологических процессов в организме, и нарушение баланса между прооксидантной активностью макрофагов и антиоксидантной защитой организма может привести к избыточному образованию АФК и повреждению тканей и органов. В ходе исследования было установлено, что наибольшей радикал-генерирующей активностью, регистрируемой с помощью ХЛ, обладают М1 макрофаги, остальные фенотипы макрофагов показали меньшую ХЛ, активность клеток в сторону убывания выглядит: М0_ГМ, М0_М, М2 (рисунок 27А). ВВ, полученные из МСК-ПК человека, продемонстрировали способность ослаблять люминол-зависимую ХЛ у М1 макрофагов, уменьшая общее количество АФК, которое регистрировали как площадь под кинетической кривой ХЛ (AUC) (рисунок 27Б). В случае МСВ наблюдалась тенденция к снижению продукции АФК у М1 макрофагов, однако статистически значимо ХЛ у М1 макрофагов снижалась только после воздействия на клетки ВВ/КС МСК-ПК (рисунок 27Б). Также небольшое снижение продукции АФК после воздействия ВВ МСК-ПК человека было получено у М0_ГМ макрофагов. На прооксидантную активность М0_М и М2 макрофагов ВВ, полученные из МСК-ПК, не оказали значимого воздействия (рисунок 27Б).

Для выяснения механизмов влияния ВВ, полученных из МСК-ПК человека, на модуляцию продукции М1 макрофагами АФК был проведен анализ экспрессии белка НАДФН-оксидазы 2 и ее субъединиц p47phox и p67phox у М1 макрофагов (рисунок 27В) с помощью вестерн-блоттинга (ВБ), а также экспрессии мРНК НАДФН-оксидазы 2 и ее субъединиц NOX2, p47phox и p67phox у М0_ГМ, М1, М0_М, М2 макрофагов (рисунок 27А-В). Результаты показали, что МСВ и ВВ/КС МСК_ПК человека демонстрировали тенденцию к снижению экспрессии NOX-2, p47phox и p67phox у М0_ГМ и М1 макрофагов (рисунок 28А-В). При этом ВВ/КС привели к статистически значимому снижению мРНК и белка в отличие от МСВ, что совпадает с более выраженным снижением продукцией АФК, детектированной с помощью люминол-зависимой ХЛ, у М1 макрофагов, культивируемых с ВВ/КС МСК-ПК человека (рисунок 27Б).

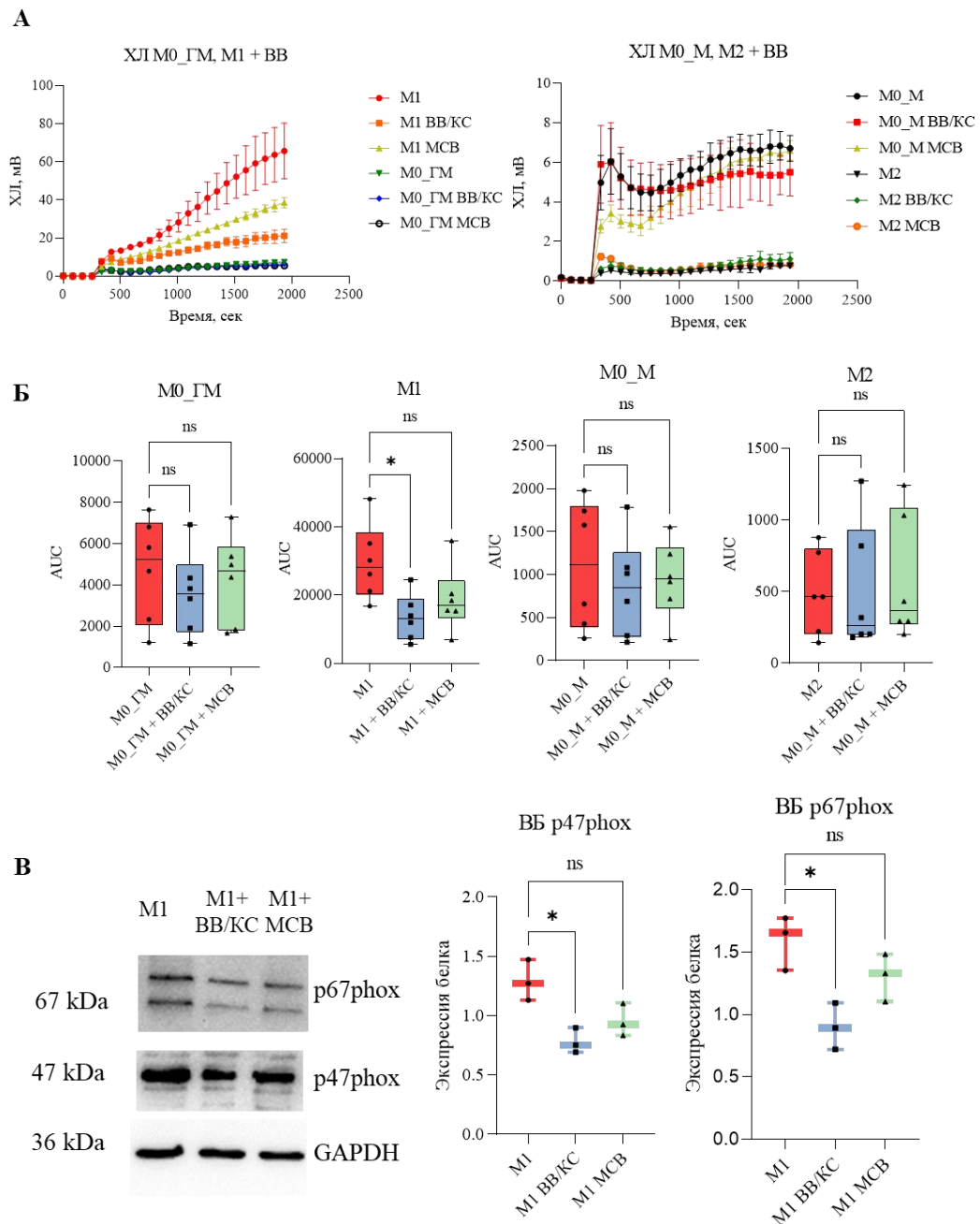


Рисунок 27 – Модуляция продукции АФК МСВ и ВВ/КС, полученными из МСК-ПК человека, у МДМ 4-х фенотипов А – кинетические кривые люминол-зависимой ХЛ для МДМ 4-х фенотипов в контроле и после инкубации с ВВ; Б – количественный анализ результатов люминол-зависимой (box-plot) ХЛ у M0_ГМ, M1 и M0_M и M2, где на оси абсцисс расположены экспериментальные группы, по оси ординат сравнивается площадь под кривой ХЛ (AUC); В – результаты анализа с помощью вестерн-блоттинга влияния МСВ и ВВ/КС МСК-ПК человека на экспрессию субъединиц НАДФН-оксидазы 2 p47phox и p67phox у M1 макрофагов. Для статистического анализа использован ANOVA с последующим множественным сравнением по методу Тьюки. $p < 0.05$; $** p < 0.01$; ns ($p > 0.05$)

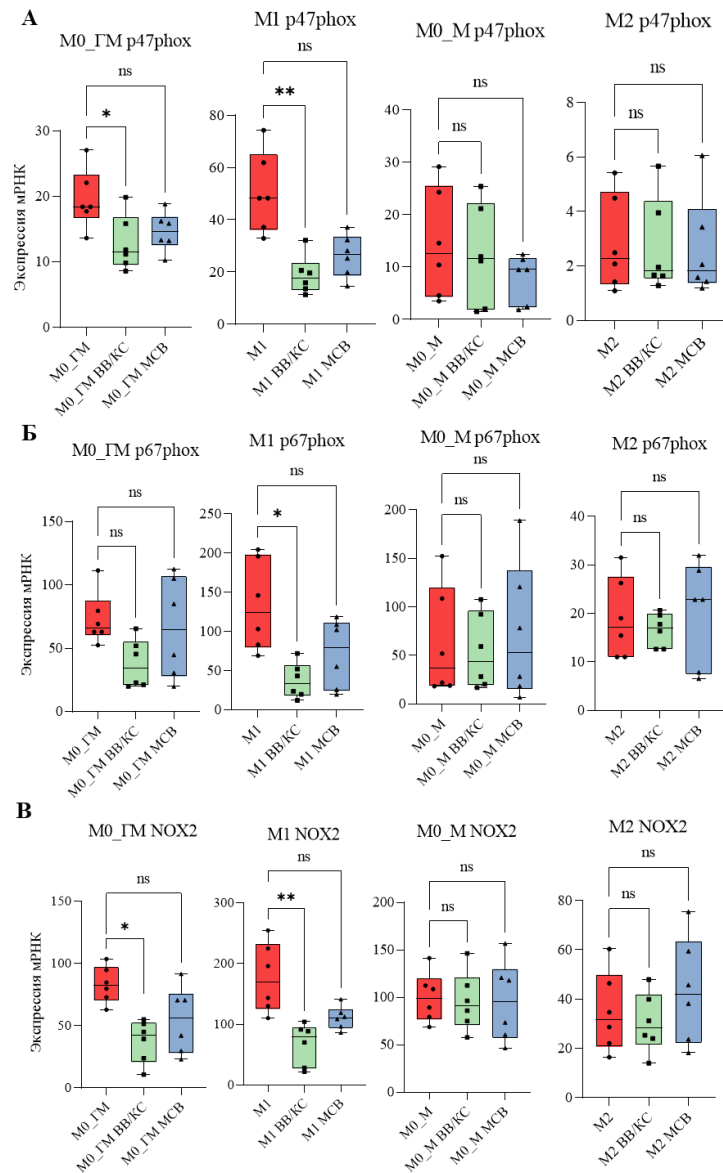


Рисунок 28 – модуляция экспрессии мРНК НАДФН-оксидазы 2 и ее субъединиц NOX-2, p47phox и p67phox МСВ и ВВ/КС, полученными из МСК-ПК человека, у M0_ГМ, M1, M0_М, M2 макрофагов, полученных из моноцитов. Оценка с помощью кПЦР-ОТ экспрессии А – p47phox; Б – p67phox; В – NOX-2. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; ns ($p > 0.05$)

Анализ кПЦР-ОТ демонстрировал, что ВВ/КС в большей степени, чем МСВ МСК-ПК снижали уровень экспрессии NOX-2, p47phox и p67phox у M1 макрофагов, демонстрируя наиболее выраженный эффект в отношении провоспалительного M1 фенотипа макрофагов (рисунок 28А-В) ВВ/КС МСК-ПК человека оказали влияние на экспрессию NOX-2, p47phox у M0_ГМ макрофагов

статистически значимо снизив экспрессию мРНК этих белков (рисунок 28А,В) Снижении экспрессии мРНК р67phox у M0_ГМ макрофагов наблюдалось после культивирования с ВВ/КС, но оно не было статистически достоверным (рисунок 28Б). ВВ/КС и МСВ, полученные из МСК-ПК человека, не оказали значимого влияния на продукцию АФК (рисунок 27Б) и экспрессию мРНК NOX-2, р47phox и р67phox (рисунок 28А) у M0_М и M2 макрофагов. Полученные результаты демонстрируют способность ВВ/КС в большей степени чем МСВ МСК-ПК, моделировать радикал-генерирующую активность у провоспалительных M1 макрофагов, ослабляя продукцию АФК и экспрессию генов, связанных с НАДФН-оксидазой 2, отвечающей за продукцию супероксид аниона.

3.3. Анализ влияния внеклеточных везикул мезенхимных стромальных клеток пупочного канатика на модуляцию компонентов сигнального пути JAK/STAT1 у M1 макрофагов

В ходе изучения влияния ВВ, полученных из МСК-ПК человека, на функциональную активность макрофагов, было установлено, что ВВ обоих типов способствуют противовоспалительной модуляции фенотипа M1 макрофагов, снижая продукцию воспалительных цитокинов, экспрессию поверхностных рецепторов, продукцию АФК и усиливая фагоцитоз. Для изучения предполагаемого механизма, лежащего в основе противовоспалительных свойств МСВ и ВВ/КС МСК-ПК человека был проведен анализ экспрессии сигнальных внутриклеточных молекул, связанных с провоспалительной M1 поляризацией макрофагов, таких как IRF5, STAT1, STAT2, IRF9, и M2 противовоспалительной - STAT3, STAT6, IRF4. В ходе анализа экспрессии описанных выше факторов в M1 макрофагах после культивирования с МСВ и ВВ/КС МСК-ПК человека, было установлено, что STAT3, STAT6, IRF4, IRF5 не изменялись под действием ВВ обоих типов у M1 макрофагов. В то же время было обнаружено, что под действием МСВ в большей степени, чем ВВ/КС, наблюдалось снижение экспрессии мРНК STAT1, STAT2, IRF9 сигнальных молекул у M1 макрофагов, что было

продемонстрировано с помощью количественной ПЦР-ОТ (рисунок 29А). Данные сигнальные молекулы, являются компонентами сигнального пути JAK/STAT1, который вовлечен в провоспалительную активацию M1 макрофагов. Именно этот сигнальный путь активируется посредством индукторов M1 поляризации - ИФН- γ /ИФН- α .

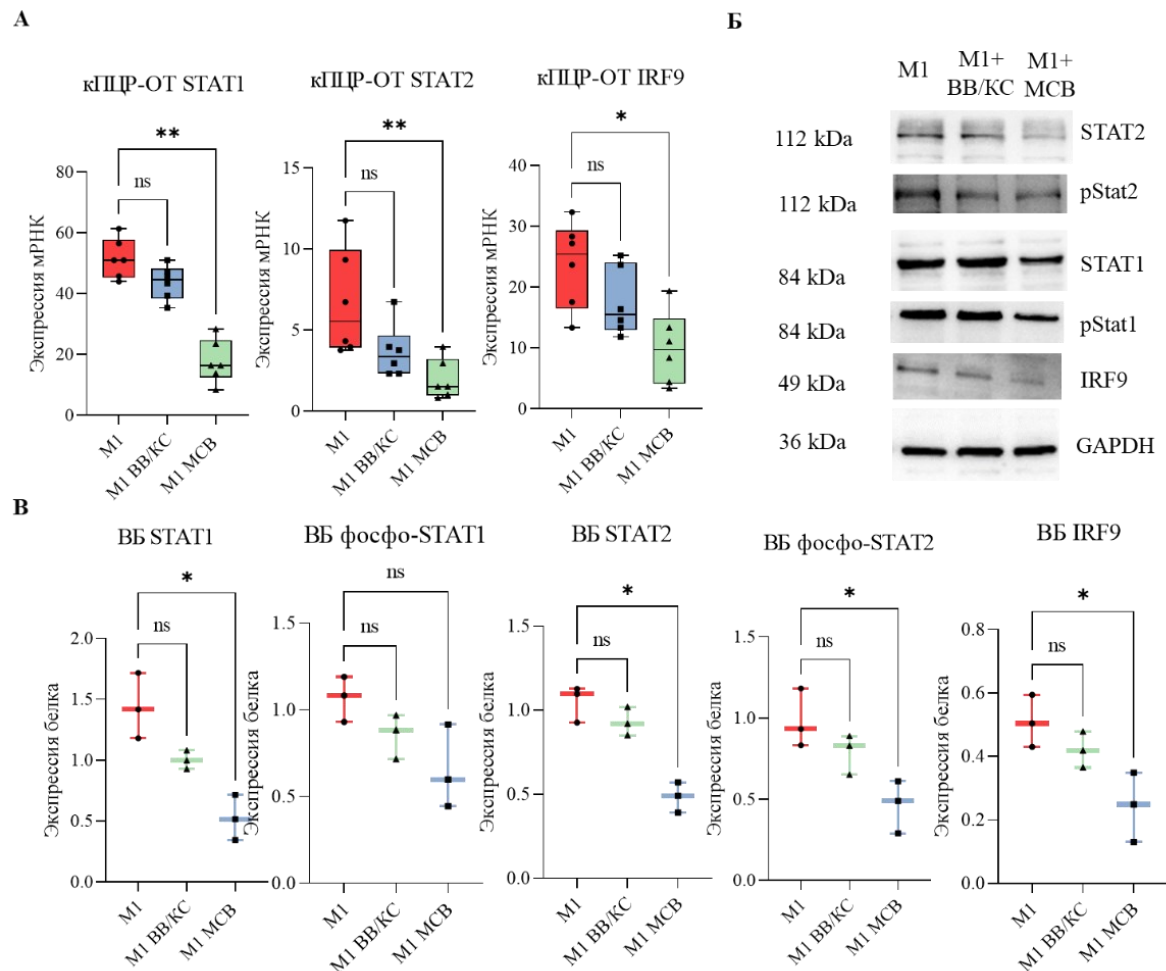


Рисунок 29 – анализ экспрессии мРНК и белков STAT1, STAT2, IRF9 у M1 макрофагов после воздействия MCB и BV/KC, полученных из МСК-ПК человека. А – кПЦР-ОТ для STAT1, STAT2, IRF9 у M1 макрофагов; Б – изображения мембран ВБ для белков pSTAT1, pSTAT2, STAT1, STAT2, IRF9, GAPDH; В – количественный анализ экспрессии данных белков, полученные с помощью вестерн-блоттинга (ВБ), образцы нормированы на белок GAPDH. Для статистического анализа использован однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим множественным сравнением по методу Тьюки. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; ns ($p > 0.05$)

Для подтверждения данного эффекта был проведен дополнительно анализ экспрессии белков STAT1, STAT2, IRF9, а также фосфорилированных форм белков pSTAT1, pSTAT2 с помощью вестерн-блоттинга (рисунок 29Б, В). Изображения мембран ВБ демонстрируют большее снижение интенсивности окрашивания пятен белков pSTAT1, pSTAT2, STAT1, STAT2, IRF9 у M1 макрофагов после воздействия MCB по сравнению с ВВ/КС МСК-ПК (рисунок 29Б). Результаты, полученные в ходе количественного анализа ВБ, продемонстрировали, что MCB в большей степени, чем ВВ/КС снижали экспрессию белков компонентов сигнального пути JAK / STAT1, а именно pSTAT1, pSTAT2, STAT1, STAT2, IRF9 у M1 макрофагов (рисунок 29В).

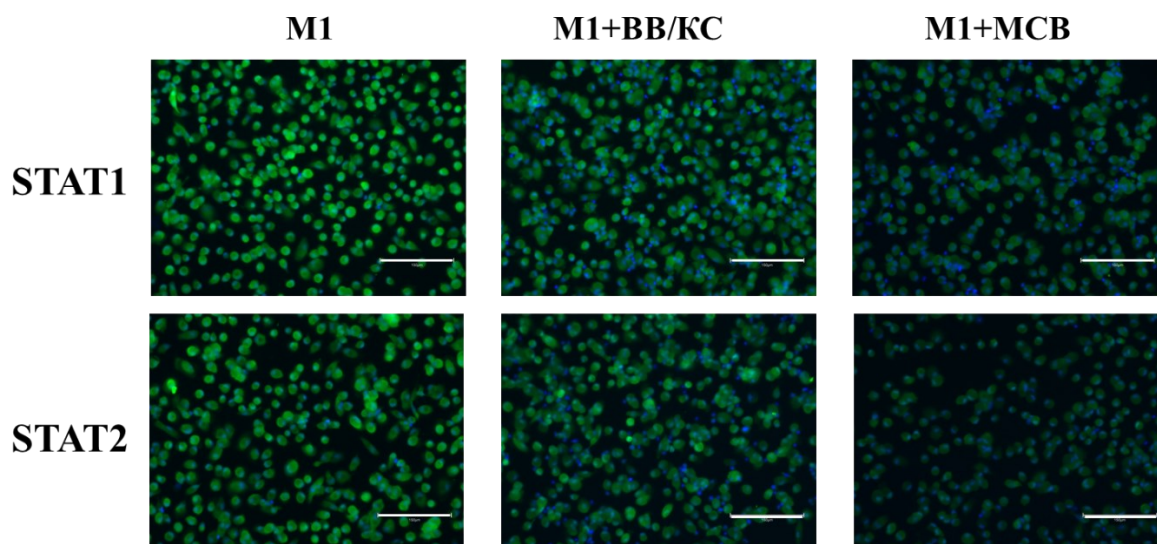


Рисунок 30 – Иммуноцитохимическое окрашивание экспрессии белков STAT1 и STAT2 в M1 макрофагах после инкубации с ВВ-МСК-ПК. AF488 (зелёный) мечет антитела против STAT1 и STAT2 с помощью вторичного anti-rabbit антитела, меченного Alexa Fluor 488; Hoechst (синий) окрашивает ядра. Микрофотографии были получены с помощью флуоресцентной микроскопии, увеличение $\times 20$. Масштабный отрезок 150 мкм

Также было проведено иммуноцитохимическое окрашивание M1 макрофагов после воздействия ВВ-МСК-ПК для оценки уровня экспрессии белков STAT1 и STAT2 (рисунок 30). Результаты иммуноцитохимического окрашивания демонстрируют высокую флуоресценцию в группе M1, что свидетельствует о высоком уровне экспрессии белков STAT1 и STAT2 у данной популяции

макрофагов (рисунок 30). Воздействие ВВ/КС на М1 макрофаги привело к незначительному снижению интенсивности окрашивания, что указывает на слабое влияние данных везикул на экспрессию белков STAT1 и STAT2 (рисунок 30). После воздействия МСВ наблюдалось заметное снижение интенсивности окрашивания, что отражает более выраженный ингибирующий эффект МСВ по сравнению с ВВ/КС на экспрессию белков STAT1 и STAT2 (рисунок 30). Полученные методом иммуноцитохимии результаты согласуются с данными вестерн-блоттинга и подтверждают различия между МСВ и ВВ/КС в регуляции компонентов сигнального пути JAK/STAT1, включая STAT1 и STAT2.

3.4. Влияние внеклеточных везикул мезенхимных стромальных клеток пупочного канатика человека на воспалительный процесс в тканях суставов у крыс с индуцированным остеоартритом

3.4.1. Результаты иммуноцитохимического анализа

Для сравнения терапевтических свойств ВВ/КС и МСВ, полученных из МСК-ПК, в терапии ОА была использована модель заболевания ОА, индуцированная у крыс линии Wistar методом медиальной менискэктомии коленного сустава. Удаление медиального мениска вызывало перераспределение нагрузки и повышение трения в суставе, что приводило к прогрессирующей деградациии суставного хряща, ремоделированию субхондральной кости и развитию локального воспалительного ответа. В исследование включили 24 самца крыс, разделённых на 4 группы по 6 животных. В трёх группах проводили менискэктомию, соблюдая все этические требования по минимизации страданий животных. Через 21 сутки после операции группы распределили следующим образом: ОА (n=6) – внутрисуставная инъекция PBS; ВВ/КС (n=6) – внутрисуставная инъекция ВВ/КС 300 мкг/мл, нормированных по белку; МСВ (n=6) – внутрисуставная инъекция МСВ 300 мкг/мл нормированных по белку. Четвёртая группа (n=6) без моделирования ОА служила здоровым контролем. На

21 сутки после введения препаратов (42 дня после операции) животных выводили из эксперимента, а ткани коленных суставов направляли на ИГХ-анализ.

В первую очередь для анализа влияния МСВ и ВВ/КС из МСК-ПК на воспалительные процессы при ОА был проведен иммуногистохимический (ИГХ) анализ маркеров, ассоциированных с воспалением при ОА. Были выбраны маркеры, связанные с воспалительной средой тканей при ОА, включая ФНО- α (рисунок 31) и iNOS (рисунок 32), а также аргиназу-1, маркер, связанный с противовоспалительным ответом (рисунок 33). В интактной контрольной группе экспрессия ФНО- α и iNOS практически не наблюдалась (рисунки 31, 32). В группе ОА без лечения ВВ была выявлена значительная экспрессия этих маркеров в хондроцитах дистрофического и деградирующего суставного хряща, а также в многочисленных макрофагах и фибробластах синовиальной оболочки и инфрапателлярной жировой подушки (рисунки 31, 32). В отличие от ФНО- α , iNOS также был сильно экспрессирован в эндотелиальных клетках синовиальной оболочки. Высокая экспрессия этих белков свидетельствовала о выраженной воспалительной реакции в тканях сустава у образцов ОА на 42-й день после менискэктомии для индукции ОА (рисунки 31, 32). Между тем аргиназа-1 обнаруживалась только в единичных макрофагах синовиальной оболочки и инфрапателлярной жировой подушки, а также в небольшом количестве хондроцитов суставного хряща в интактном контроле, но полностью отсутствовал в тканевых образцах группы ОА (рисунок 33). Через три недели после введения обоих типов ВВ МСК-ПК наблюдалось значительное снижение экспрессии воспалительных маркеров ФНО- α , в меньшей степени iNOS, и заметное увеличение экспрессии аргиназы-1, что свидетельствовало о выраженном противовоспалительном эффекте обоих типов ВВ. Снижение ФНО- α и iNOS в основном наблюдалось в клетках суставного хряща, синовиальной оболочки и инфрапателлярной жировой подушки (рисунок 31, 32). Сильная экспрессия аргиназы-1 преимущественно выявлялась в поверхностной зоне суставного хряща и в макрофагах инфрапателлярной жировой подушки (рисунок 33).

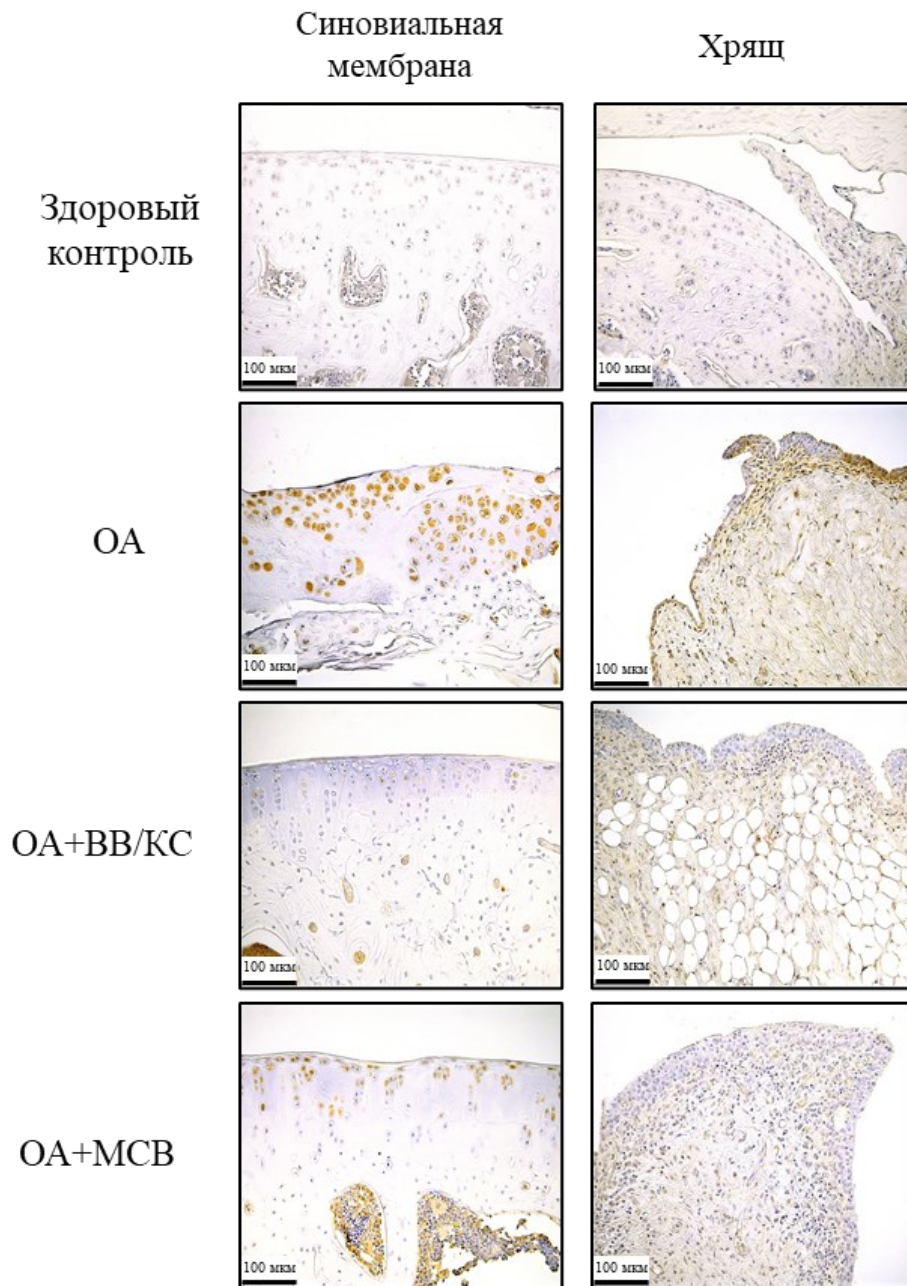


Рисунок 31 – микрофотографии ИГХ образцов суставных тканей контрольных и опытных групп, окрашенные на ФНО- α . Положительно окрашены в коричневый цвет хондроциты суставного хряща, макрофаги и фибробласты синовиальной оболочки. Гистологические изображения тканей были получены через 3 недели после терапии ОА. Контроль – интактный контроль без операции, ОА – группа с хирургически индуцированным ОА, получавшая инъекции PBS, ОА + BV/KC – группа с внутрисуставным введением BV/KC МСК-ПК, ОА + МСВ – группа с внутрисуставным введением МСВ МСК-ПК. Светлопольная микроскопия, увеличение 200х. Масштабный отрезок 100 мкм

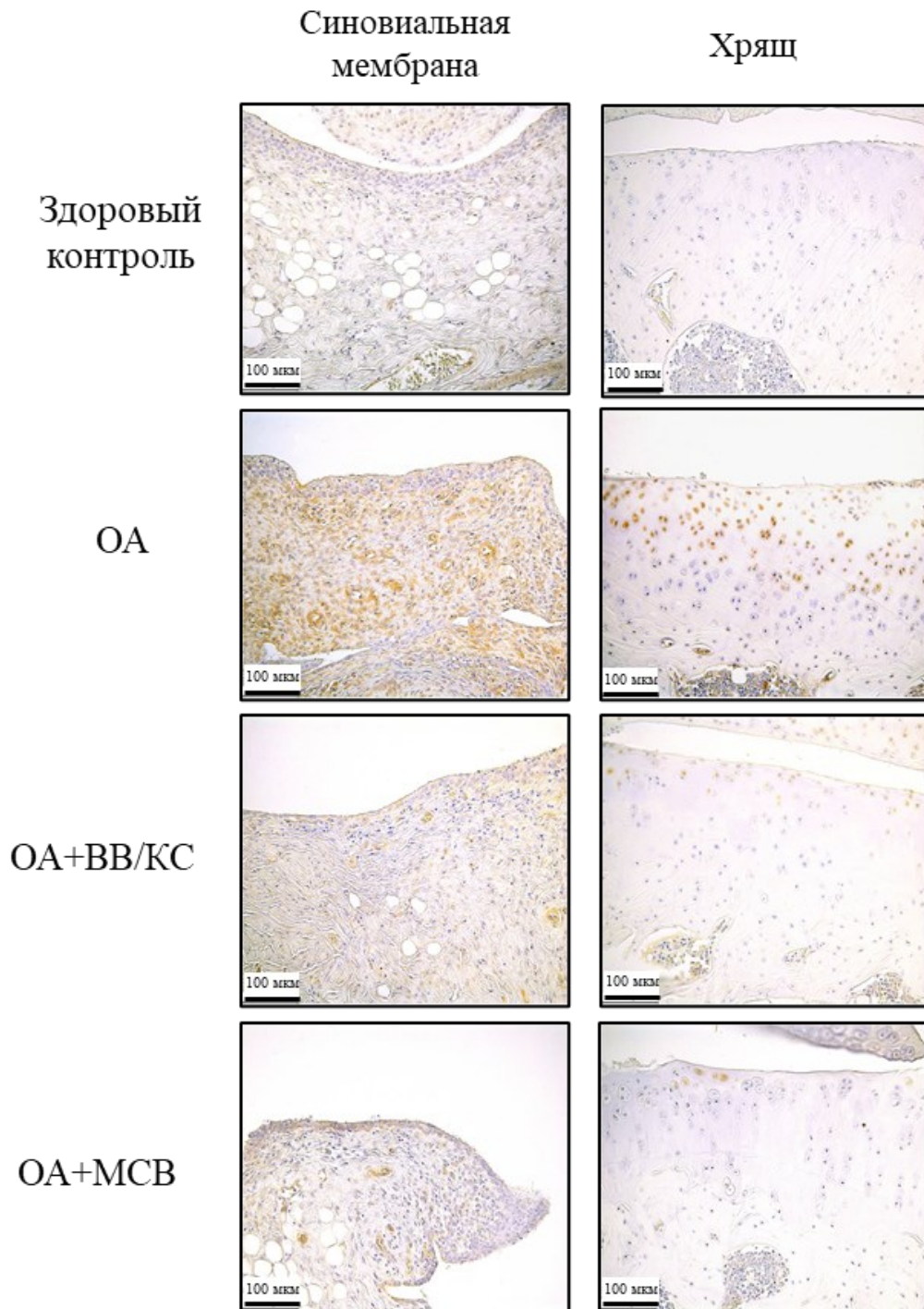


Рисунок 32 – микрофотографии ИГХ образцов суставных тканей контрольных и опытных групп, окрашенные на iNOS. Положительно окрашены в коричневый цвет хондроциты суставного хряща, макрофаги и фибробласты синовиальной оболочки. Гистологические изображения тканей были получены через 3 недели после терапии ОА. Контроль – интактный контроль без операции, ОА – группа с хирургически индуцированным ОА, получавшая инъекции PBS, ОА + BB/КС – группа с внутрисуставным введением BB/КС МСК-ПК, ОА + МСВ – группа с внутрисуставным введением МСВ МСК-ПК. Светлопольная микроскопия, увеличение 200х. Масштабный отрезок 100 мкм

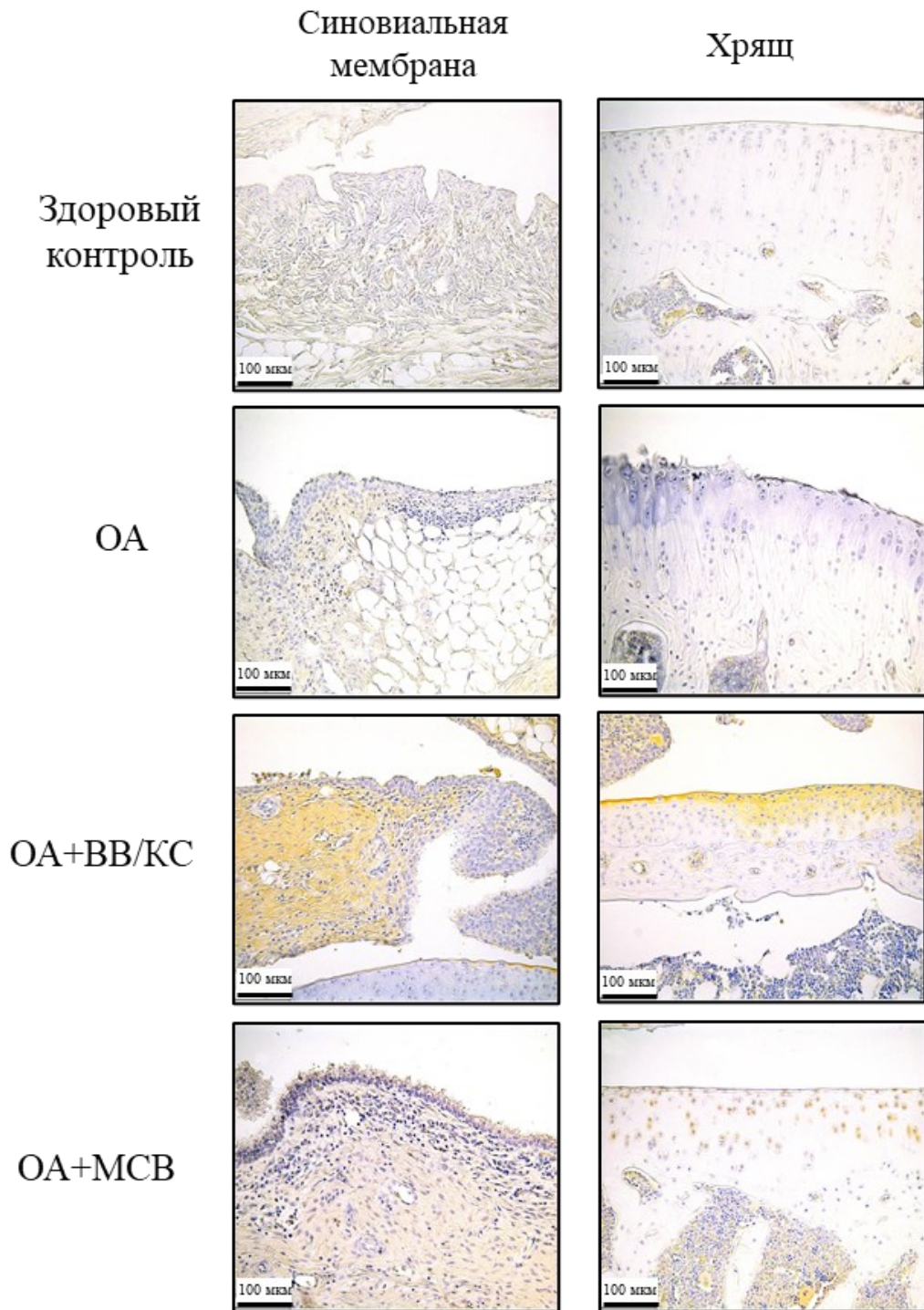


Рисунок 33 – микрофотографии ИГХ образцов суставных тканей контрольных и опытных групп, окрашенные на аргиназу-1. Положительно окрашены в коричневый цвет хондроциты суставного хряща, макрофаги и фибробласты синовиальной оболочки. Гистологические изображения тканей были получены через 3 недели после терапии ОА. Контроль – интактный контроль без операции, ОА – группа с хирургически индуцированным ОА, получавшая инъекции PBS, ОА + ВВ/КС – группа с внутрисуставным введением ВВ/КС МСК-ПК, ОА + МСВ – группа с внутрисуставным введением МСВ МСК-ПК. Светлопольная микроскопия, увеличение 200х. Масштабный отрезок 100 мкм

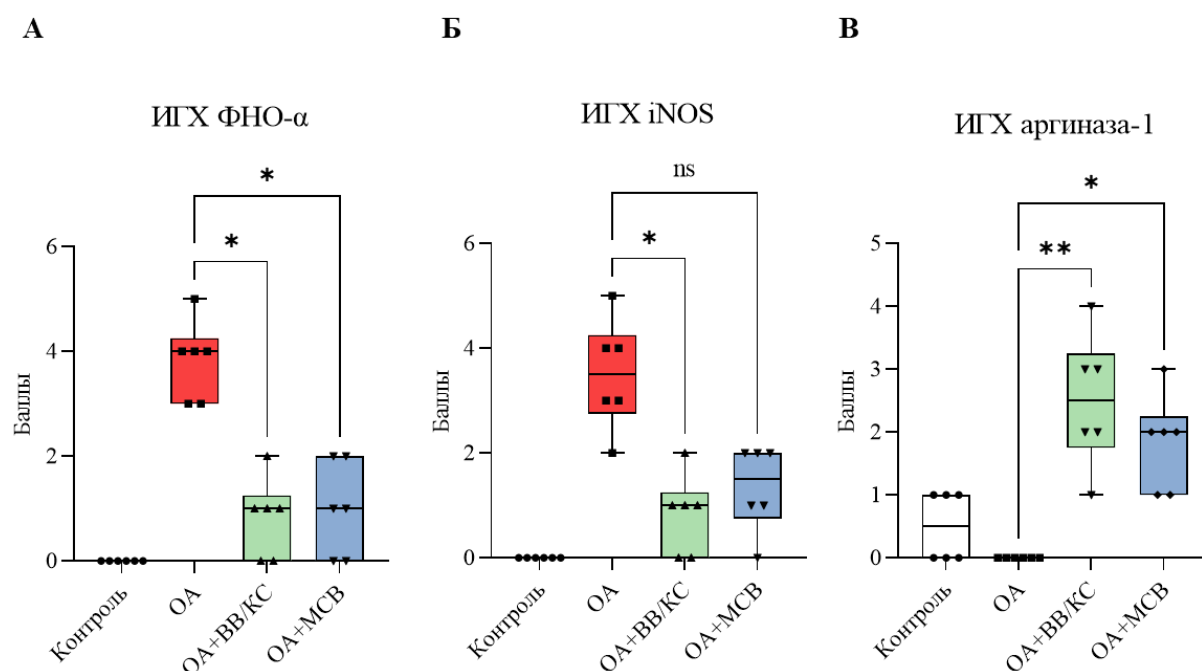


Рисунок 34 – полуколичественный анализ Composite score для ИГХ образцов суставных тканей контрольных и опытных групп для оценки влияния внеклеточных везикул (BV/KC и МСВ), полученных из МСК-ПК, на развитие воспаления в суставных тканях крыс с хирургически индуцированным ОА. А – ФНО-α; Б – iNOS; В – Аргиназа-1. Гистологические изображения тканей были получены через 3 недели после терапии ОА ВВ. Контроль – интактный контроль без операции, ОА – группа с хирургически индуцированным ОА, получавшая инъекции PBS, ОА + BV/KC – группа с внутрисуставным введением BV/KC МСК-ПК, ОА + МСВ – группа с внутрисуставным введением МСВ МСК-ПК.* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; ns ($p > 0.05$)

Полуколичественный анализ экспрессии иммуногистохимических маркеров, представляющий собой усредненную сумму баллов оценки интенсивности и распространенности окрашивания в образцах суставных тканей (синовиальная, костно-хрящевая, жировая), показал статистически значимые ингибирующие эффекты BV/KC на уровень экспрессии iNOS и МСВ на уровень экспрессии ФНО-α (рисунок 34А, Б). В случае iNOS наблюдалась тенденция снижения данного маркера после лечения МСВ без статистически значимого эффекта (рисунок 34А, Б). Влияние МСВ и BV/KC МСК-ПК на уровень аргиназы-1 служило дополнительным индикатором значительного снижения воспаления в тканях синовиальной оболочки и инфрапателлярной жировой подушки за счет

поляризации макрофагов в фенотип с более выраженным противовоспалительным профилем (рисунок 34В). Полученные результаты демонстрируют ослабление воспалительного процесса в тканях коленных суставов крыс с ОА после лечения ВВ МСК-ПК. Под воздействием ВВ формируется более благоприятное микроокружение, способствующее ослаблению деструктивных процессов в хрящевой ткани при ОА.

3.4.2. Результаты полимеразной цепной реакции *in Situ*

Помимо стандартных методов, таких как ИГХ, для оценки влияния ВВ МСК-ПК на прогрессирование ОА *in vivo* дополнительно был изучен уровень рецептора NOD-подобного типа 3 (NLRP3). Этот инфламмасомный комплекс служит маркером прогрессирования ОА. Был проведен качественный анализ оценки экспрессии инфламмасы NLRP3 методом ПЦР *in situ*, который позволяет амплифицировать молекулы ДНК в клетках тканей, позволяя качественно детектировать клетки, где происходит транскрипция данного гена (рисунок 35).

Повышенные уровни NLRP3 наблюдались в хондроцитах поверхностного слоя суставного хряща и макрофагах синовиальной оболочки и инфрапателлярной жировой подушки в группе ОА без лечения (рисунок 35). В интактной контрольной группе экспрессия NLRP3 практически не обнаруживалась в хряще, синовиальной оболочке и инфрапателлярной жировой подушке сустава. В группе, получавшей терапию ВВ/КС МСК-ПК, наблюдалось снижение уровня NLRP3 (рисунок 35). Лечение МСВ также приводило к снижению амплификации NLRP3 в области гиалинового хряща и синовиальной оболочки сустава. Однако экспрессия NLRP3 сохранялась в отдельных фибробластах и макрофагах синовиальной оболочки и инфрапателлярной жировой подушки, хотя частота таких клеток была ниже, чем в группе ОА без лечения (рисунок 35). Эти совокупные результаты демонстрируют, что ВВ/КС МСК-ПК человека обеспечивают более эффективное лечение ОА по

сравнению с МСВ, полученными из МСК-ПК, что делает их перспективным источником ВВ для терапии ОА.

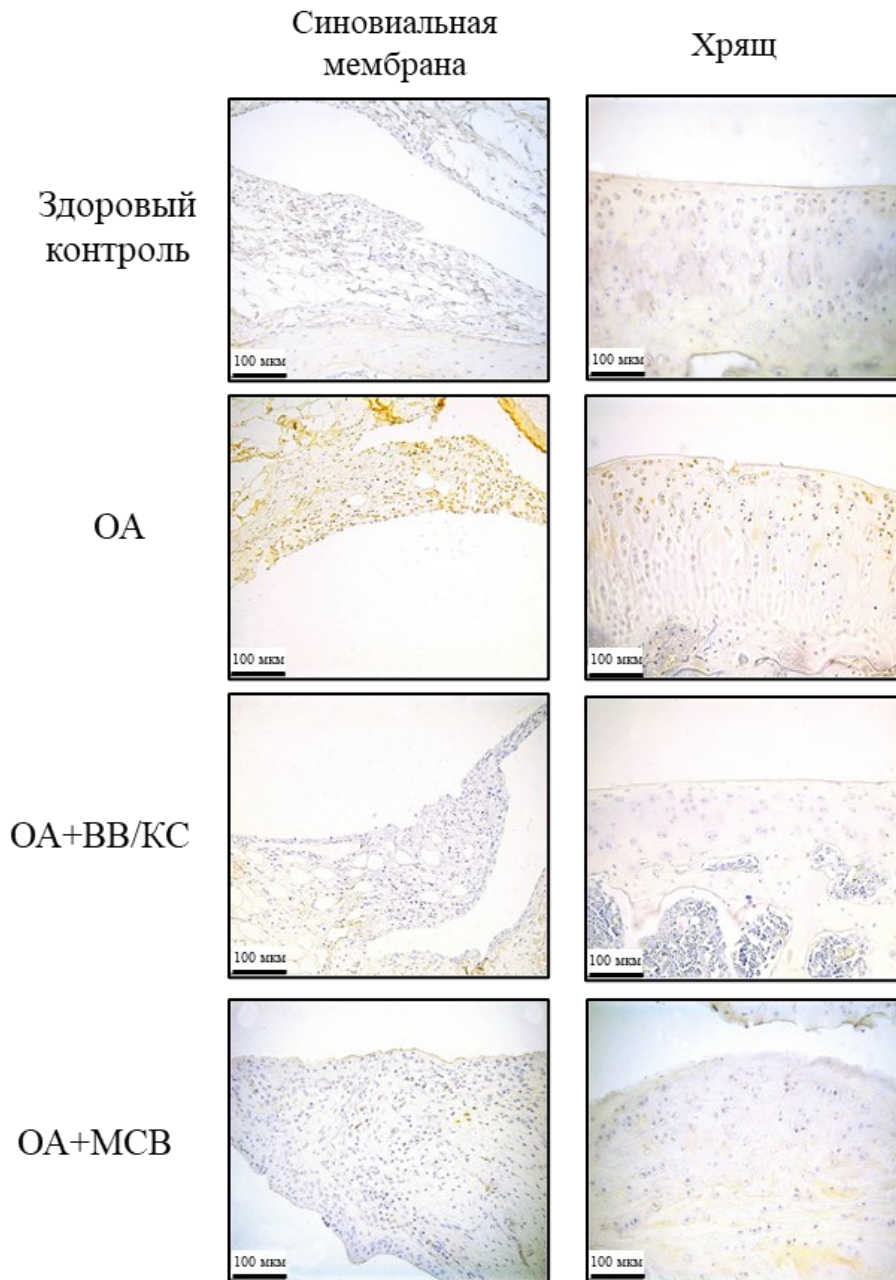


Рисунок 35 – ПЦР *in Situ* микрофотографии образцов суставных тканей контрольных и опытных групп. Положительно окрашены в коричневый цвет хондроциты суставного хряща и макрофаги синовиальной оболочки. Светлопольная микроскопия, ПЦР *in Situ*, увеличение 200х. Масштабный отрезок 100 мкм. Гистологические изображения тканей были получены через 3 недели после терапии ОА ВВ. Контрольная группа – интактный контроль без операции, ОА – группа с хирургически индуцированным ОА, получавшая инъекции PBS, ОА + ВВ/КС – группа с внутрисуставным введением ВВ/КС МСК-ПК, ОА + МСВ – группа с внутрисуставным введением МСВ МСК-ПК

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

На сегодняшний день клеточный компонент врожденной иммунной системы рассматривается не только как один из ключевых участников иммунного ответа организма на внешние патогены, но и как и важный элемент развития множества хронических и острых заболеваний, где воспаление и нарушение иммунной регуляции оказывает важное влияние на патогенез данных патологий [39,279]. Макрофаги представляют собой разнообразную и гетерогенную по происхождению и функциям группу лейкоцитов, имеющую широкое распространение в организме [75]. Макрофаги представлены двумя крупными популяциями, которые можно дифференцировать на основе происхождения. Макрофаги, образованные из циркулирующих в крови моноцитов, имеющих происхождение из костного мозга, долгое время рассматривались в качестве единственной популяции. Однако накопленные на сегодняшний день молекулярно-генетические данные демонстрируют, что огромную роль в иммунной регуляции, развитии и поддержании гомеостаза тканей играют тканевые макрофаги [280,281]. Эта группа макрофагов имеет происхождение из желточного мешка, клеток печени плода, и данные макрофаги присутствуют в головном мозге, печени, сердце, селезенке, синовиальной оболочке суставов [75,77]. Макрофаги привлекают особое внимание исследователей, поскольку данный тип фагоцитов, как часть иммунной системы, влияет на регуляцию множества физиологических процессов: макрофаги участвуют в фагоцитозе, выполняют антигенпрезентирующую функцию, уничтожают патогены за счет секреции АФК и протеаз, а также секретируют ряд сигнальных молекул, в первую очередь цитокины, хемокины, простагландины, которые обеспечивают взаимодействие между врожденной и адаптивной иммунными системами [141]. Неменьший интерес вызывает роль макрофагов в управлении тканевым гомеостазом, посредством фагоцитоза компонентов ВКМ и фрагментов погибших клеток, а также благодаря секреции противовоспалительных и регуляторных сигнальных

молекул, которые стимулируют процессы регенерации [118]. В данном исследовании было проведен анализ влияния ВВ/КС, полученных из секрета МСК, и МСВ из ВКМ МСК различного происхождения на экспрессию в макрофагах генов и белков, связанных с провоспалительным иммунным ответом, а также на модуляцию их активности, включающей в себя радикал генерирующую активность и способность к фагоцитозу, изучен механизм регуляции М1 фенотипа макрофагов,. Также был изучены эффекты ВВ/КС и МСВ из МСК основного вещества пуповины человека на воспалительный процесс в коленных суставах крыс с индуцированным ОА.

Одной из ключевых задач данной работы являлся выбор клеточной модели макрофагов для изучения влияния ВВ на их поведение. Первоначально была выбрана клеточная линия макрофагов, полученная из линии клеток моноцитарной лейкемии человека ТНР-1, благодаря ряду преимуществ: процесс культивирования ТНР-1 относительно прост и экономичен, а клетки характеризуются высокой скоростью пролиферации [282]. В тоже время, макрофаги ТНР-1 при дифференцировке в фенотипы М1 и М2 не демонстрировали значимых различий по специфическим для М2 маркерам, таким как CD206, а также характеризовались слабой экспрессией данного белка во всех фенотипах (М1, М0 и М2). Проточная цитометрия показала, что М1-макрофаги ТНР-1 не экспрессировали CD86 на достаточном уровне, чтобы их можно было четко дифференцировать от М0 и М2-клеток. Кроме того, макрофаги ТНР-1 в М1-фенотипе демонстрировали сравнительно низкую секрецию провоспалительного цитокина ФНО- α по сравнению с М1-МДМ, результаты данного исследования представлены в публикации (Сулейманов и др) [61].

Полученные в данном исследовании результаты согласуются с литературными данными, согласно которым макрофаги ТНР-1 существенно отличаются от основных макрофагов человека, которые дифференцированы из моноцитов крови. В ряде работ отмечалось, что на уровне транскрипции поляризация макрофагов ТНР-1 часто приводила к формированию менее выраженного фенотипа М1 по сравнению с МДМ [282]. Кроме того, клетки

различаются по их радикал-генерирующей активности: у ТНР-1 макрофагов наблюдался значительно меньший уровень продукции АФК по сравнению с МДМ [283]. В целом, макрофаги МПМ и ТНР-1 демонстрировали выраженные различия в уровне поляризации, причем концентрации отдельных маркеров в М1/М2-фенотипах различались до 100 раз [61]. Из-за недостаточной секреции воспалительных цитокинов и отсутствия четких маркеров поляризации в М1- и М2-фенотипы, ТНР-1 макрофаги оказались непригодны для решения поставленных в работе задач. В рамках данного исследования были использованы МДМ. Эти клетки обладают способностью поляризоваться в различные фенотипы, имеющими четкие фенотипические маркеры, демонстрируют высокую радикал-генерирующую активность и выраженные фагоцитарные свойства [284].

Выбор макрофагов, полученных из моноцитов периферической крови человека, обусловлен тем, что большинство исследований функций макрофагов *in vitro* проводится на клетках мышей, однако макрофаги человека и грызунов существенно различаются по размеру, иммунному метаболизму и стадиям дифференцировки [285–287]. Например, редокс-активность макрофагов преимущественно изучалась на мышинных клетках, тогда как макрофаги человека демонстрируют принципиально иные характеристики. Например, мышинные макрофаги М1 отличаются высокой продукцией NO [59]. Напротив, несмотря на экспрессию iNOS, макрофаги человека не продуцируют значительных количеств оксида азота, что свидетельствует о низкой активности данного фермента [60,288]. Кроме того, аргиназа-1, являющаяся основным маркером М2-макрофагов у мышей, в макрофагах человека экспрессируется на низком уровне [289].

В данном исследовании были использованы МДМ, культивируемые в присутствии ГМ-КСФ или М-КСФ, так как эти ростовые факторы способствуют формированию М1- и М2-клеток, отличающихся по функциональной активности, специфическим маркерам [53,61]. Например, Лейси и соавт. (2012) сравнили глобальный профиль экспрессии генов у МДМ, дифференцированных под воздействием ГМ-КСФ или М-КСФ, с аналогичными профилями макрофагов костного мозга мышей, подвергнутых той же стимуляции. Было установлено, что

лишь 17% генов, дифференциально регулируемых этими факторами роста, совпадали у обеих групп, демонстрируя выраженные различия в транскриптом [290]. Воздействие ГМ-КСФ или М-КСФ на моноциты запускает различные программы экспрессии генов, приводя к образованию промежуточных M0-состояний, которые не относятся строго ни к M1, ни к M2, но обладают частичными характеристиками обоих фенотипов [290]. Концентрация ГМ-КСФ в крови находится на низком уровне при нормальном состоянии, однако она возрастает при иммунных и воспалительных реакциях [114]. ГМ-КСФ действует как фактор воспаления, влияя на различные типы миелоидных клеток и способствуя их дифференцировке, в том числе созреванию моноцитов в макрофаги [114,116]. ГМ-КСФ появляется практически одновременно с провоспалительными цитокинами и, возможно, липополисахаридами. Воздействие на клетки M0_ГМ (ЛПС + ИФН- γ) запускает их поляризацию в M1-макрофаги, характеризующиеся наивысшей экспрессией CD86, и повышенной секрецией ФНО- α и Ил-6, что было подтверждено с помощью проточной цитометрии и ИФА [53]. Основной функцией провоспалительных M1-клеток является создание прооксидантной среды. Эти макрофаги способны генерировать высокие уровни АФК в ответ на индукторы и экспрессировать и продуцировать значительные количества провоспалительного цитокина ФНО- α и Ил-6, однако обладают относительно слабой фагоцитарной активностью относительно M0_M и M2 макрофагов [61].

М-КСФ постоянно вырабатывается многими типами клеток, включая фибробласты, эндотелиальные клетки, моноциты, макрофаги, стромальные клетки костного мозга и т. д., его можно обнаружить в плазме в концентрации ~ 10 нг/мл [113]. М-КСФ контролирует выживаемость, пролиферацию, дифференцировку и функции моноцитов и макрофагов [115]. Макрофаги, культивируемые с М-КСФ M0_M обладали самой высокой фагоцитарной активностью среди всех фенотипов. Обработка макрофагов M0_M цитокином Ил-4 привела к формированию противовоспалительного фенотипа макрофагов M2. Они фагоцитировали бактерии в количестве, сопоставимом с M0_M, и экспрессировали CD206, который является маркером фенотипа M2. Более низкая продукция АФК фенотипом M2,

дифференцированными в данный фенотип с помощью Ил-4 коррелировала с их наивысшей стимулирующей способностью по отношению к Т-клеткам по сравнению с другими фенотипами макрофагов [291].

Регуляция соотношения между континуумом M1 и M2 фенотипов макрофагов является важной задачей стремительно развивающейся регенеративной медицины, поскольку регуляция воспаления посредством изменения поляризации макрофагов в сторону M2-подобного фенотипа может способствовать разрешению воспаления, приводя к ослаблению деструктивных процессов в поврежденных тканях или органах, а также к стимуляции процессов регенерации [289]. Для модулирования пластичности фенотипов макрофагов в сторону противовоспалительного M2 фенотипа используются разнообразные подходы, включающие в себя как биоматериалы, так и клеточные продукты, основанные на трансплантации МСК, иммунных клеток, а также компонентов их секрета, включающего в себя различные белковые медиаторы и ВВ наиболее изученными из которых являются экзосомы [292,293]. ВВ-МСК демонстрируют высокий терапевтический потенциал *in vitro* и *in vivo*, где один из эффектов, способствующих ослаблению воспаления, связан с способностью ВВ-МСК усиливать поляризацию макрофагов в M2 состояние [48]. ВВ, полученные из МСК пуповины человека, стимулируют функциональное восстановление у мышей с повреждением спинного мозга *in vivo* благодаря увеличению локального количества макрофагов M2 подтипа, что сопровождается уменьшением содержания воспалительных цитокинов: ФНО- α , Ил-6 и ИФН- γ [251]. ВВ-МСК жировой ткани мыши обладали гепатопротекторным эффектом, ослабляя воспаление в печени, индуцированное токсичным эффектом ЛПС в сочетании D-галактозамином, посредством ослабления активации NLRP3 через miR-17 в макрофагах печени [252]. Существуют различные физические и химические способы усиления терапевтических свойств ВВ, например, культивирование МСК в форме сфероидов, обработка гипоксией, preconditionирование с воспалительными цитокинами что усиливает противовоспалительные и регенеративные свойства ВВ посредством усиления M2 поляризации макрофагов

[274,294–296]. В рамках этого исследования было проведено сравнение свойств ВВ-МСК из различных источников МСК (пупочный канатик, жир, десна), культивируемых в виде монослойной клеточной культуры 2d и сфероидов 3d. В ходе исследования было установлено, что МСВ и ВВ/КС, выделенные из разных тканей, а также культивируемые в виде сфероидов или монослойной клеточной культуры, способствовали снижению секреции воспалительного цитокина ФНО- α у М1 макрофагов (рисунок 20). При этом условия культивирования в виде монослойных клеточных культур и сфероидов, а также ткань-источник МСК не влияли статистически значимо на снижение продукции цитокина ФНО- α М1 макрофагами (рисунок 20). Данные результаты частично могут объясняться результатами других исследований, где ВВ из сфероидов МСК не показали большой иммуномодулирующий эффект, а также не оказали значимого влияния на развитие фиброза у пожилых крыс по сравнению с ВВ, полученными из монослойной клеточной культуры МСК [297]. Однако в данной работе не было проведено комплексного анализа влияния ВВ из сфероидов и монослойных МСК на уровень экспрессии воспалительных цитокинов и других сигнальных молекул, связанных с противовоспалительной активацией макрофагов. Исходя из чего в ходе данного исследования в качестве основного источника ВВ были использованы МСК-ПК, культивируемые в виде монослойной культуры. В данном исследовании было продемонстрировано, что ВВ/КС и МСВ из МСК-ПК обладают выраженным противовоспалительным эффектом, воздействуя преимущественно на М1 макрофаги, способствуя выраженному снижению экспрессии ФНО- α , Ил-6, CD86, а также уменьшению секреции цитокинов ФНО- α , Ил-6, при этом способствуя повышению экспрессии CD206 – М2 маркера макрофагов на уровне мРНК и белка (рисунки 22-25). Данные результаты коррелируют с другими исследованиями, где рассматривался иммуномодулирующий потенциал ВВ, полученных из МСК, на различных клеточных культурах макрофагов [298]

Одна из ключевых функций макрофагов – способность продуцировать АФК, что имеет важное значение как для иммунного ответа на патогены, так и для их нормального физиологического функционирования. В частности, АФК играют

важную роль в процессе дифференцировки моноцитов, а также участвуют в сигнальной передаче, регуляции экспрессии генов и запуске апоптоза. Одним из основных источников АФК в макрофагах является НАДФН-оксидаза, преимущественно представляемая изоформой NOX2 [299]. Всё больше исследований подтверждает, что митохондрии также вносят значительный вклад в генерацию АФК – в первую очередь за счёт утечки электронов из компонентов дыхательной цепи, а также активности определённых ферментов, таких как моноаминоксидазы [300]. При нормальных физиологических условиях продукция АФК играет решающую роль в превращении моноцитов в макрофаги типа M2 [301]. Известно, что уровень АФК и продукция внеклеточного H_2O_2 в макрофагах M2 ниже, чем в M1-клетках. Это свойство M2 макрофагов связано со сниженной экспрессией ферментов окислительно-восстановительного цикла, включая NOX2 и NOX5, а также с усиленной активностью антиоксидантной системы [302]. При нарушении регуляции макрофагального фенотипа избыточная продукция АФК макрофагами M1 (активируемыми ИФН- γ и ЛПС) может оказывать повреждающее воздействие, усугубляя течение различных патологических процессов. Например, при черепно-мозговой травме наблюдается смещение баланса в сторону M1-профиля микроглии, сопровождающееся усиленной экспрессией NOX2 и, как следствие, окислительным повреждением тканей коры головного мозга [303,304]. Снижение активности НАДФН-оксидазы и увеличение доли макрофагов типа M2 может, в свою очередь, способствовать снижению выраженности деструктивных процессов при острых и хронических воспалениях, способствуя сохранению структуры и функций поражённых тканей и органов [304].

Помимо способности ВВ, полученных из МСК, изменять экспрессию мРНК и белков воспалительных цитокинов провоспалительными M1 макрофагами, также ВВ представляют собой перспективное терапевтическое средство для модуляции радикал генерирующей активности макрофагов. В ходе данного исследования было установлено, что МСВ и ВВ/КС из МСК пупочного канатика человека снижают продукцию $O_2^{\bullet-}/H_2O_2$ M1 макрофагами, данные результаты были получены при использовании люминол-зависимой ХЛ. При этом эффект ВВ/КС на

продукцию АФК как у М1 макрофагов, так и у других фенотипов М0_ГМ, М0_М и М2, был более выражен у ВВ/КС по сравнению с МСВ, полученными из МСК пуповины человека (рисунок 27). В связи с влиянием везикул на продукцию АФК, в задачи исследования вошло изучение эффектов ВВ/КС и МСВ на экспрессию генов и белков НАДФН-оксидазы NOX2 с помощью количественной ПЦР с обратной транскрипцией (NOX2, NCF1 (p47phox), NCF2 (p67phox)) и вестерн-блоттинга (p47phox, p67phox). В исследовании Льюиса и др., был проведен анализ радикал генерирующей активности макрофагов человека, полученных из моноцитов периферической крови, а также экспрессии мРНК и белков NOX2, p47phox, p67phox. Авторами не было установлено значимых различий как в продукции АФК М0, М1 и М2 фенотипами макрофагов, так и в экспрессии субъединиц НАДФН оксидазы 2 [283]. В отличие от результатов этой статьи в ходе исследования эффектов ВВ на продукцию макрофагами АФК с помощью люминол-зависимой ХЛ в настоящей работе было установлено, что М1, М0_ГМ, М0_М и М2 имеют выраженные различия в продукции АФК, демонстрируя снижение уровня ХЛ от М1 макрофагов в сторону М2 [61] (рисунок 27). Как МСВ, так и ВВ/КС из пуповины оказали ингибирующий эффект на экспрессию мРНК NOX2, p47phox, p67phox у М1 макрофагов, снижая уровень транскрипции НАДФН-оксидазы 2 и ее субъединиц. При этом ВВ/КС имели более выраженный эффект по сравнению с МСВ на снижение экспрессии белков p47phox, p67phox у М1 макрофагов (рисунки 27, 28).

МСВ представляют собой недавно выделенный подтип ВВ, которые по происхождению и экспрессируемым маркерам отличаются от других жидкофазных ВВ [55]. МСВ получают путем децеллюляризации ВКМ слизистой оболочки мягких тканей, при этом монослойные клеточные культуры также могут являться источником МСВ, например, были получены данные, что МСВ можно выделить из линии мышечных фибробластов NIH-3T3, МСК [27,53]. МСВ богаты микроРНК, в них присутствуют более 200 микроРНК. Механизм действия, с помощью которого МСВ влияют на поведение соседних клеток и активацию макрофагов еще до конца не известны [55]. Было установлено, что три микроРНК: miРНК125b-5p, 143-3p и

145-5p, входящие в состав МСВ, полученных из внеклеточных матриксов мочевого пузыря и тонкого кишечника, способствуют поляризации макрофагов в сторону противовоспалительного M2 состояния [25]. Дальнейшим важным шагом в исследовании МСВ будет идентификация механизма репаративного действия микроРНК, вовлеченных в процесс модуляции поведения макрофагов. Богатый протеомный состав МСВ также может объяснять иммуномодулирующую активность этих везикул по отношению к макрофагам [26]. Недавно было обнаружено, что Ил-33, содержащийся в МСВ, способствует формированию репаративного фенотипа макрофагов через сигнальный путь Ил-33/ST2 и способствует метаболическому перепрограммированию клеток, включающему усиленное окислительное фосфорилирование и поглощение жирных кислот [262]. В ходе протеомного анализа МСВ было установлено, что МСВ из МСК пуповины человека не содержат достаточный уровень Ил-33, что позволяет рассматривать отличный механизм МСВ из МСК от предложенных ранее концепций [26]. МСВ из МСК-ПК человека оказывают выраженные противовоспалительные свойства на M1 макрофаги, дифференцированные из моноцитов человека [53]. МСВ сильнее снижают экспрессию и секрецию воспалительных цитокинов Ил-6 и ФНО- α по сравнению с ВВ/КС из того же клеточного источника [53]. Также МСВ способствуют более выраженному снижению экспрессии CD86 рецептора, характеризующего M1 поляризацию макрофагов, при значимом усилении экспрессии CD206 у M1 макрофагов после воздействия ВВ-МСК-ПК (рисунок 23)

Фагоцитоз является одной из ключевых функций макрофагов и нейтрофилов, наряду с продукцией АФК обеспечивает поглощение и уничтожение патогенных микроорганизмов и фрагментов погибших клеток. При поглощении захваченного патогена образуются фагосомы, которые вместе с протеолитическими ферментами обеспечивают разрушение захваченного материала [305]. Фагоцитарная активность характерна как для макрофагов M1, так и для макрофагов M2, что было показано для RAW 264.7 макрофагов [306], так и для макрофагов человека [61,307]. Однако некоторые исследования продемонстрировали снижение фагоцитарной активности макрофагов после их поляризации в сторону фенотипа M2. В одной из

работ было показано, что поляризация макрофагов, индуцированная Ил-4, в сторону альтернативно активированного фенотипа приводит к значительному снижению фагоцитоза *N. meningitidis*, но в то же время усиливает выработку катепсинов и повышает кислотность и протеолитическую активность фагосом [308]. Напротив, исследования макрофагов человека показывают, что уровень фагоцитоза *E. coli* в макрофагах M2 выше, чем в макрофагах M1 [307]. Фагоцитарная активность макрофагов может зависеть от конкретного патогена, используемого в исследовании, что затрудняет составление общих выводов по результатам [25]. В исследовании, где была оценена фагоцитарная активность макрофагов в отношении MCV, выделенных из матрикса мочевого пузыря и подслизистой оболочки тонкого кишечника, у мышинных M1 (ИФН- γ +ЛПС) макрофагов, полученных из костного мозга, была наибольшая фагоцитарная активность по сравнению с M0 и M2 макрофагами [25]. Воздействие MCV обоих типов на макрофаги привело к усилению фагоцитоза M0 макрофагами *E. coli*, меченных FITC [25]. В данном исследовании фагоцитарная активность макрофагов увеличивалась от M1, M0_ГМ, достигая максимума у M2, M0_М. MCV и ВВ/КС МСК-ПК человека усиливали фагоцитарную активность у M1, M0_ГМ макрофагов, что было подтверждено с помощью проточной цитометрии макрофагов, фагоцитировавших *E. Coli*, меченных FITC (рисунок 26). Инкубация с MCV в большей степени чем с ВВ/КС приближала фагоцитоз M1 фенотипа к уровню фагоцитоза у макрофагов с противовоспалительным фенотипом M0_М и M2.

Функциональная активность макрофагов и контроль их фенотипа осуществляется с помощью факторов транскрипции. Среди основных сигнальных путей, модулирующих изменение фенотипа макрофагов, можно выделить следующие: JAK/STAT, TLR/NF- κ B, PI3K/Akt [146,185,309]. В зависимости от конкретной сигнальной молекулы компоненты описанных выше сигнальных путей могут способствовать как воспалительной M1 так и противовоспалительной M2 поляризации макрофагов [310]. В поляризации макрофагов в M1 состояние положительную роль играют факторы STAT1, STAT2, IRF9, субъединица p65

ядерного фактора- κB NF- κB . В свою очередь повышенная экспрессия и активация STAT6, STAT3, NF- κB p50 усиливает M2 поляризацию макрофагов [311]. С целью выяснить вероятный механизм модуляции фенотипов макрофагов под действием MCB и BB/KC, была оценена экспрессия мРНК внутриклеточных сигнальных молекул STAT1, STAT2, STAT3, STAT6, IRF4, IRF5, IRF9. В ходе скрининга было установлено, что BB/KC и MCB, полученные из MCK-ПК человека, не оказывают значимого влияния на экспрессию факторов STAT3, STAT6, IRF4, IRF5. Среди оставшихся факторов наибольший интерес вызвали сигнальные молекулы, связанные с JAK/STAT1. Полученные результаты показали снижение STAT1, STAT2, IRF9 у M1 макрофагов под действием MCB, полученных из MCK-ПК. BB/KC не оказывали значимого ингибирующего влияния на экспрессию данных сигнальных молекул, демонстрируя лишь тенденцию к снижению их экспрессии (рисунок 29). Активация данного сигнального пути связана с M1 поляризацией макрофагов, что сопровождается повышенной секрецией воспалительных цитокинов ФНО- α и Ил-1 β [312]. Полученные данные позволяют предположить, что более выраженное снижение секреции воспалительных цитокинов ФНО- α и Ил-6 у M1 макрофагов под действием MCB связано со снижением активации JAK/STAT1/STAT2 сигнального пути. Для дополнительного подтверждения данной гипотезы был проведен вестерн-блоттинг с целью оценить экспрессию STAT1, STAT2, IRF9, а также фосфорилированной формы белков STAT1, STAT2. Было установлено, что MCB снижают уровень экспрессии данных белков у M1 макрофагов и полученные результаты коррелируют данным количественной ПЦР с обратной транскрипцией (рисунок 29).

ОА – это заболевание со сложной этиологией и патогенезом. В настоящее время известно, что воспаление является одной из ключевых особенностей остеоартрита, поскольку компоненты инфрапателлярной жировой подушки и синовиальной мембраны, фибробластоподобные синовиоциты и макрофаги являются провоспалительными и активируются в ответ на разрушение компонентов внеклеточного матрикса хряща и секрецию воспалительных факторов Ил-1 β , ФНО- α и моноцитарного хемоаттрактантного белка-1 катаболически

активными хондроцитами [313]. Кроме того, подколенная жировая подушка является богатым источником адипокинов, провоспалительных и катаболических цитокинов, которые могут способствовать хроническому воспалению синовиальной оболочки, разрушению хряща и ремоделированию субхондральной кости при ОА коленного сустава [314]. Активированные провоспалительные М1-подобные макрофаги выделяют провоспалительные цитокины Ил-1 β , ФНО- α и Ил-6, а также ММП, что приводит к усилению деградации внеклеточного матрикса и апоптозу хондроцитов [315]. Одним из многообещающих терапевтических подходов является способность лекарственного препарата изменять иммунную среду в тканях суставов, способствуя перепрограммированию макрофагов из М1 в М2 – состояние с регенеративными и иммунорегуляторными свойствами благодаря секреции противовоспалительных и трофических факторов [247,269].

МСК и компоненты их секрета, в первую очередь ВВ, продемонстрировали большой потенциал для лечения различных дегенеративных заболеваний, при которых ключевым патогенным фактором является хроническое воспаление [263,264]. ВВ продемонстрировали значительный терапевтический эффект при лечении ОА на клеточных и животных моделях, положительно влияя на ослабление катаболического фенотипа хондроцитов и снижая процессы деградации ВКМ гиалинового хряща и субхондральной кости, а также оказывая противовоспалительное действие, способствуя поляризации макрофагов от фенотипа М1 к фенотипу М2 [250,316]. ВВ, полученные из МСК костного мозга, подавляют воспалительные процессы, такие как NF- κ B, p38, ERK1/2, PI3K и TAK1, в различных типах клеток, участвующих в патогенезе ОА, таких как хондроциты и синовиоциты [247,275,317]. ВВ, полученные из МСК жировой ткани и содержащие микроРНК-34, оказывают ингибирующее противовоспалительное действие на макрофаги, способствуя поляризации макрофагов М2 за счет подавления передачи сигналов NF- κ B, таких как IRAK1 и TRAF6 [174,274,275]. Ингибирование сигнального пути NF- κ B имеет решающее значение в терапии ОА, поскольку повышенная экспрессия этого ядерного фактора индуцирует продукцию

воспалительных цитокинов IL-1 β и протеаз, таких как ММП, повышенная активность которых при ОА усиливает деградацию ВКМ [318].

В рамках данного исследования было проведено сравнение терапевтических эффектов ВВ из секрета МСК-ПК человека и МСВ того же источника. МСВ являются компонентом внеклеточного матрикса мягких тканей и продемонстрировали значительный терапевтический потенциал благодаря своей способности стимулировать поляризацию воспалительных макрофагов М1 в сторону макрофагов М2 с иммуносупрессивными и регуляторными свойствами в условиях *in vitro* [25,262]. Кроме того, авторы отметили важную роль Ил-33, обнаруженного в МСВ, полученном из внеклеточного матрикса слизистой оболочки, в регулировании иммунного фенотипа макрофагов, обеспечивающего регенеративный эффект при различных заболеваниях, таких как восстановление скелетных мышц за счёт модуляции противовоспалительной активации макрофагов [259,261]. МСВ также показали многообещающие результаты при РА – воспалительном заболевании аутоиммунной природы, в отличие от ОА [56]. МСВ продемонстрировали терапевтический эффект, аналогичный эффекту метотрексата, стандартного препарата для лечения ревматоидного артрита, увеличивая популяцию М2-подобных макрофагов CD43^{hi}/His48^{lo}/CD206⁺ и снижая секрецию провоспалительных хемокинов CXCL10 и MCP-3, уровни которых были измерены в сыворотке крови крыс с острым и хроническим ревматоидным артритом [56]. В большинстве исследований использовались МСВ, полученные в основном из слизистой оболочки мочевого пузыря и тонкого кишечника свиней, в то время как МСВ, полученные из монослойных клеточных культур уделялось мало внимания в контексте терапии ОА [25,27]. Экзосомы и другие типы ВВ, полученные из МСК пупочного канатика, редко изучались для терапии ОА по сравнению с МСК жировой ткани и костного мозга [263,319]. При терапии ОА у крыс, индуцированного менискэктомией оба типа ВВ, полученных из МСК-ПК человека, способствовали ослаблению воспаления в синовиальной оболочке и инфрапателлярной жировой подушке коленных суставов [53]. Однако терапия ВВ/КС МСК в большей степени чем МСВ привела к значительному

улучшению состояния суставных тканей, что было подтверждено иммуногистохимическим анализом (рисунки 31-34). МСВ и ВВ/КС по-разному влияли на уровень экспрессии воспалительных цитокинов и белков. Терапия ВВ/КС МСК пупочного канатика человека привела к чуть более выраженному снижению экспрессии воспалительных факторов ФНО- α , iNOS, NLRP3 и повышению экспрессии Арг-1 в макрофагах и синовиальных фибробластах по сравнению с МСВ. Различия в терапевтической эффективности МСВ и ВВ/КС, полученных из МСК пуповины, частично согласуются с результатами анализа протеома этих везикул. Протеомный профиль ВВ/КС показал более высокую насыщенность белками, связанными с организацией внеклеточного матрикса, по сравнению с МСВ, что является важным фактором при терапии ОА (рисунок 9). Например, в исследовании Ключерева и др. было продемонстрировано, что данный тип ВВ сильнее стимулирует восстановление хрящевой ткани по сравнению с МСВ при ОА [53]. Также в ВВ/КС были детектированы белки, подавляющие дифференцировку остеокластов, а также отвечающих за ослабление окислительного стресса, вызванного активацией апоптотических сигнальных путей. Данные свойства могут объяснять вероятные различия в терапевтической эффективности МСВ и ВВ/КС МСК-ПК в отношении ОА. В рамках данного исследования было установлено, что в протеомном составе МСВ МСК-ПК были обнаружены белки, модулирующие процессы фагоцитоза и регуляции сигнальных путей иммунных клеток. Однако стоит учесть, что состав протеома ВВ не может отражать в полной мере их терапевтические свойства, что обусловлено сложностью состава их содержимого, где важную роль в модуляции активации макрофагов и других клеток играют микроРНК, циркулирующие РНК, длинные некодирующие РНК, модулирующие экспрессию генов и активацию клеток. В рамках будущих исследований необходимо установить различия в составе транскриптома обоих типов ВВ, поскольку определённые микроРНК могут играть ключевую роль в регулировании путей, связанных с регенерацией и модуляцией воспаления как макрофагов, так и других клеток, участвующих в развитии ОА.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Воспаление рассматривается как один из основных факторов развития ряда патологий, где воспалительный процесс может стать как инициирующим фактором развития заболевания, так и фактором, способствующим его негативному развитию. Ряд исследователей считает, что воспаление, иммунная регуляция и подходы к управлению воспалением является одним из центральных метанарративов медицины XXI века. Существует потребность в терапевтических подходах, нацеленных на управление процессом воспаления, которые позволят получить необходимые терапевтические результаты, замедляя развитие дегенеративных процессов в органах, подверженных воспалению, а также повышая эффективность воздействий, нацеленных на стимуляцию регенерации. На сегодняшний день накапливается все больше данных, что макрофаги играют важную роль не только в защитной функции иммунной системы, но и в поддержании гомеостаза органов, обеспечивая развитие и регенеративные процессы в нормальных физиологических условиях. Нарушение иммунной регуляции со стороны макрофагов может привести к развитию ряда заболеваний - метаболических, сердечно-сосудистых, нейродегенеративных. Существует потребность в терапевтических подходах, способных управлять процессом воспаления, функциональной активностью макрофагов и других иммунных клеток без выраженных побочных эффектов и иммуносупрессии.

МСК и продукты их секретомы - различные цитокины и ВВ - являются перспективными подходами, стимулирующими регенерацию и ослабляющими воспаление посредством модуляции экспрессии сигнальных путей, регулирующих изменения фенотипов макрофагов. Терапия МСК показала ряд ограничений, обусловленных отсутствием их дифференциации и плохой выживаемостью при трансплантации в организм, также есть риски опухолевой трансформации и избыточного иммунного ответа на пересаженные клетки. Исследования показали, что МСК оказывают свой эффект посредством паракринной активности и секреции

сигнальных факторов и ВВ. Исходя из этого ВВ, полученные из МСК, как наиболее изученный компонент секрета являются перспективным терапевтическим средством для управления регенерацией посредством иммуномодулирующей активности.

Не менее перспективным подходом выглядит использование биоматериалов, особенно биологического происхождения, полученных посредством децеллюляризации органов и тканей животных. Относительно недавно были получены доказательства, что одним из возможных объяснений стимуляции регенерации и ослабления воспаления при трансплантации биоматериалов, богатых ВКМ, полученных посредством децеллюляризации слизистых оболочек мягких тканей, является наличие в их составе ВВ, которым дали наименование МСВ. МСВ, полученные таким путем, обладают терапевтическим потенциалом, стимулируя ослабление воспаления посредством усиления поляризации макрофагов в М2 фенотип. Также накапливаются данные, что МСВ могут содержаться в ВКМ клеточных культур, фибробластов мыши NIH-3T3, МСК как монослойных, так и культивируемых в виде сфероидов. Однако на сегодняшний день нет достаточного количества исследований, где рассматриваются МСВ, полученные из МСК, в модуляции функциональной активности макрофагов человека. Также не было проведено сравнения терапевтического потенциала МСВ, полученных из ВКМ МСК, с ВВ, полученными из кондиционированной среды тех же клеток, на макрофагах человека, а также в терапии воспалительных заболеваний, например, ОА. Целью данного исследования являлось установить эффекты МСВ и ВВ/КС, полученных из МСК пуповины человека, на модуляцию иммунного фенотипа макрофагов человека, полученных из моноцитов, а также выяснить эффекты обоих типов ВВ на экспрессию генов и белков, связанных с провоспалительным ответом макрофагов, а также на функциональную активность макрофагов, а именно на продукцию АФК и фагоцитоз.

Одной из задач данного исследования был поиск оптимальной клеточной модели макрофагов человека. Изначально казалось предпочтительным использование клеточной линии THP-1, поскольку они значительно менее

требовательнее к условиям культивирования и способны к эффективной пролиферации. Однако в ходе исследования было установлено, что макрофаги, дифференцированные из ТНР-1 клеток, отличаются недостаточной экспрессией поверхностных маркеров М1 и М2 фенотипов, а также низкой секрецией цитокинов, по сравнению с макрофагами, полученными из моноцитов человека. В соответствии с другими исследованиями ТНР-1 макрофаги демонстрировали значительно менее выраженную радикал-генерирующую активность по сравнению с другими подтипами макрофагов.

В ходе исследования ВВ обоих типов были тщательно проанализированы на предмет их морфологии, размеров, поверхностных маркеров. Было установлено, что МСВ, как и ВВ/КС, являются липидными частицами, активно фагоцитируемыми макрофагами. В данной работе был проведен протеомный анализ МСВ и ВВ из секрета МСК пуповины человека. МСК-ПК человека были выбраны на основании их выраженной пролиферативной и секреторной активности по сравнению с другими источниками МСК (жира, десны). Протеомный состав ВВ обоих типов составлял приблизительно 50% общих белков. У МСВ и ВВ/КС наблюдалось обогащение в образцах белками, положительно регулирующими регенерацию ран, адгезию клеток к ВКМ, распластывание клеток. ВВ/КС содержали в своем составе большее количество уникальных для данного класса ВВ белков по сравнению с МСВ. ВВ/КС более обогащены по сравнению с МСВ белковыми кластерами, регулирующими организацию ВКМ, синтез макромолекул. Также в ВВ/КС наблюдались белки, которые ингибируют дифференцировку остеокластов, а также ослабляют окислительный стресс, вызванный активацией апоптотического сигнального пути. Среди белков уникальных для МСВ можно выделить белки, регулирующие поведение иммунных клеток, например, фагоцитоз, эндоцитоз, хемокин-опосредованный сигнальный путь. Различия в протеомном составе ВВ/КС и МСВ, полученных из МСК-ПК, демонстрируют вероятные различия в их биогенезе и биологической активности.

Исследование влияния МСВ и ВВ/КС, полученных из МСК, на функциональную активность фагоцитов показало, что оба типа ВВ обладают

противовоспалительным и иммуномодулирующим потенциалом, стимулируя переход М1 макрофагов в промежуточный фенотип, имеющий свойства М2 макрофагов. В данной работе было установлено, что МСВ в большей степени чем ВВ/КС из МСК-ПК человека снижали секрецию воспалительных цитокинов Ил-6 и ФНО- α у М1 макрофагов. Также оба типа изменяли характер экспрессии поверхностных рецепторов у М1 макрофагов, уменьшая М1 маркер CD86 и увеличивая CD206 – маркер М2 фенотипа. Также эффект ВВ/КС и МСВ МСК был показан на уровне транскриптома, где экспрессия мРНК Ил-6, ФНО- α , CD206 коррелировала с результатами ИФА и проточной цитометрии. МСВ имели более выраженный эффект по сравнению с ВВ/КС на фагоцитарную активность М1 и М0_{GM} макрофагов. Однако при изучении радикал генерирующей активности макрофагов с помощью люминол-зависимой ХЛ было установлено, что ВВ/КС имели более выраженный ингибирующий эффект на продукцию АФК у М1 макрофагов и других фенотипов, используемых в данном исследовании. Для того, чтобы выяснить молекулярные механизмы, лежащие в основе данных результатов, был проведен анализ экспрессии мРНК НАДФН-оксидазы 2 и ее субъединиц NOX2, p47phox, p67phox с помощью количественной ПЦР с обратной транскрипцией. В ходе исследования было установлено, что ВВ/КС в большей степени чем МСВ снижают экспрессию NOX2, p47phox, p67phox у М1 макрофагов с провоспалительным фенотипом. Полученный результат был подтвержден с помощью вестерн-блоттинга. Различное влияние на экспрессию субъединиц НАДФН оксидазы-2 может объяснить более выраженные эффекты ВВ/КС на снижение продукции АФК, зарегистрированные с помощью люминол-зависимой ХЛ.

При изучении вероятного механизма, ответственного за различие в терапевтическом воздействии на макрофаги ВВ/КС и МСВ МСК пуповины человека, опираясь на литературные данные, проводили анализ экспрессии мРНК STAT1, STAT2, STAT3, STAT5, STAT6, IRF4, IRF5, IRF9, NF- κ B p50 с помощью количественной ПЦР с обратной транскрипцией. Было установлено, что ВВ/КС и МСВ не оказывают значимого влияния на экспрессию факторов STAT3, STAT5,

STAT6, IRF4, IRF5. В тоже время МСВ в большей степени, чем ВВ/КС МСК-ПК человека снижали экспрессию STAT1, STAT2 и IRF9 у М1 макрофагов. Данный эффект МСВ был подтвержден дополнительно с помощью вестерн-блоттинга, который показал, что воздействие МСВ на М1 макрофаги ингибирует экспрессию компонентов сигнального пути JAK/STAT1, ответственного за М1 поляризацию макрофагов с помощью ИФН- γ/α .

В данном исследовании впервые было проведено сравнение влияния МСВ и ВВ/КС, полученных из МСК основного вещества пуповины человека, на модификацию воспалительного микроокружения в коленных суставах крыс с индуцированным посредством менискэктомии ОА. Оба типа ВВ спустя 3 недели после внутрисуставной инъекции демонстрировали противовоспалительный эффект, снижая экспрессию белков, маркеров, связанных с воспалительным iNOS, ФНО- α и стимулируя экспрессию Арг-1, что было подтверждено с помощью ИГХ. При этом терапия ВВ/КС привела к статистически значимым изменениям содержания данных белков в образцах суставных тканей. МСВ показали более слабый эффект по сравнению с ВВ/КС в модулировании воспалительного процесса у крыс с индуцированным ОА.

ВЫВОДЫ

1. МСВ и ВВ/КС, полученные из МСК-ПК, характеризуются выраженными качественными и количественными различиями в протеомном составе. Протеом ВВ/КС обогащён белками, участвующими в положительной регуляции биосинтеза компонентов ВКМ, формирования коллагеновых фибрилл и синтеза макромолекул. В свою очередь, МСВ преимущественно содержат белки, регулирующие процессы фагоцитоза, эндоцитоза и модуляцию активности иммунных клеток.

2. МСВ и ВВ/КС, полученные из мультипотентных МСК-ПК человека, обладают выраженной противовоспалительной активностью в отношении М1 макрофагов человека после 48 часов инкубации с клетками, способствуя уменьшению секреции ФНО- α , ИЛ-6 и изменяя уровень экспрессии поверхностных рецепторов CD86, CD206, что позволяет получить популяцию макрофагов, соответствующих М2 макрофагам по секреторной активности и экспрессии белков. МСВ обладают более выраженным противовоспалительным эффектом, по сравнению с ВВ/КС

3. ВВ/КС и МСВ модифицировали функциональную активность макрофагов, усиливая фагоцитоз у М0-ГМ и М1 фенотипов и уменьшая продукцию АФК у макрофагов. ВВ/КС имели более выраженный ингибирующий эффект в отношении прооксидантной активности М1 макрофагов по сравнению с МСВ. Инкубация с ВВ/КС привела к снижению экспрессии мРНК и белков НАДФН-оксидазы 2 и ее субъединиц p47phox, p67phox у М1 макрофагов, что коррелирует со значимым ингибирующим влиянием ВВ/КС на продукцию АФК М1 фенотипом.

4. МСВ оказывают противовоспалительный эффект в отношении М1 макрофагов посредством снижения экспрессии мРНК и белков STAT1, STAT2 и IRF9, являющихся компонентами сигнального пути JAK/STAT1.

5. ВВ/КС и МСВ, полученные из МСК основного вещества пуповины человека, через 21 день после внутрисуставной инъекции ВВ крысам с

индуцированным посредством менискэктомии ОА, демонстрировали противовоспалительный эффект в тканях коленного сустава, снижая экспрессию iNOS, ФНО- α , и увеличивая уровень аргиназы-1.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Минимальная эффективная доза ВВ, полученных из секрета и внеклеточного матрикса мультипотентных МСК-ПК человека, необходимая для модуляции активности культивируемых макрофагов человека, полученных из моноцитов, составляет не менее 100 мкг белка/мл.

2. Для исследования иммуномодулирующих свойств ВВ мультипотентных МСК-ПК в отношении макрофагов наиболее оптимальным является М1 фенотип макрофагов, культивируемых с индукторами поляризации, ИФН- γ в сочетании с ЛПС, и с внеклеточными везикулами в течение 48 часов.

3. При исследовании терапевтического потенциала ВВ, полученных из секрета и внеклеточного матрикса мультипотентных МСК-ПК человека, для терапии воспалительного процесса остеоартрита крыс, индуцированного менискэктомией медиального мениска, рекомендуется использовать однократную внутрисуставную инъекцию внеклеточных везикул объемом 20 мкл с концентрацией белка 300 мкг/мл.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АФК – активная форма кислорода

АТФ – аденозинтрифосфат

ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с tandemной масс-спектрометрией

ГАГ – гликозаминогликан

ДТТ – дитиотреитол

ИГХ – иммуногистохимический

ИЛ – интерлейкин

ИЛ-1РА – интерлейкин-1 рецепторный антагонист

ИФН- γ – интерферон-гамма

ЛПС – липополисахарид

МДМ – макрофаг, дифференцированный из моноцитов

М-КСФ – макрофагальный колониестимулирующий фактор

ММП – матриксная металлопротеиназа

МС – масс-спектрометр

МСВ – матрикс-связанные везикулы

МСК – мезенхимные стромальные клетки

ОА – остеоартрит

ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия

кПЦР-ОТ – количественная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

СОД – супероксиддисмутаза

ФМА – форбол-12-миристан-13-ацетат

ФНО- α – фактор некроза опухоли- α

ВВ – внеклеточные везикулы

ВВ/КС – внеклеточные везикулы, полученные из кондиционированной среды

BKM – внеклеточный матрикс

ЦОГ-2 – циклооксигеназа-2

B2M – beta-2-microglobulin, бета-2-микроглобулин

BMP – bone morphogenetic protein, костный морфогенетический белок

CD – cluster of differentiation, кластер дифференцировки

DAMP – damage-associated molecular pattern, молекулярный паттерн, ассоциированный с повреждением

FBS – fetal bovine serum, фетальная бычья сыворотка

G-CSF – granulocyte colony-stimulating factor, колониестимулирующий фактор гранулоцитов

GOBP – Gene Ontology Biological Process

HIF-1 α – hypoxia-inducible factor-1 alpha, индуцируемый гипоксией фактор-1 α

iNOS – inducible nitric oxide synthase, индуцируемая синтаза оксида азота

IRF – interferon regulatory factor, фактор регуляции интерферона

JAK – Janus kinase, янус-киназа

L-AA – L-ascorbic acid, L-аскорбиновая кислота

MHC – major histocompatibility complex, главный комплекс гистосовместимости

NK – natural killer, естественный киллер

NLR – NOD-like receptor, нодд-подобный рецептор

NLRP3 – NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3, инфламасома белка 3

NO – оксид азота

O₂•⁻ – superoxide anion radical, супероксид анионный радикал

PAMP – pathogen-associated molecular pattern, патоген-ассоциированный молекулярный паттерн

PCA – principal component analysis, метод главной компоненты

PBS – phosphate-buffered saline, фосфатно-солевой буфер

RANKL – receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand, рецептор лиганда NF- κ B

SC – spectral count, спектральная интенсивность

STAT – signal transducer and activator of transcription, белок-передатчик сигналов и

активатор транскрипции

TLR – toll-like receptor, толл-подобный рецептор

TSG101 – tumor susceptibility gene 101, ген предрасположенности к опухолям 101

VEGF – vascular endothelial growth factor, фактор роста эндотелия сосудов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yamout, B.I. Multiple Sclerosis / B.I. Yamout, R. Alroughani // *Semin. Neurol.* – 2018. – Vol. 38. – № 2. – P. 212–225.2.
2. Diabetes Mellitus and Inflammation / E. Lontchi-Yimagou, E. Sobngwi, T.E. Matsha, [et al.] // *Curr. Diab. Rep.* – 2013. – Vol. 13. – № 3. – P. 435–444.
3. Scanzello, C.R. The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis / C.R. Scanzello, S.R. Goldring // *Bone.* – 2012. – Vol. 51. – № 2. – P. 249–257.
4. The effects of microglia-associated neuroinflammation on Alzheimer's disease / C. Wang, S. Chen, H. Guo, [et al.] // *Front. Immunol. Frontiers.* – 2023. – Vol. 14. – P. e 1117172.
5. Drug survival of second biological DMARD therapy in patients with rheumatoid arthritis: a retrospective non-interventional cohort analysis / T. Wilke, S. Mueller, J. Jeske, [et al.] // *BMC Musculoskelet. Disord.* – 2017. – Vol. 18. – № 1. – P. 332.
6. Abramoff, B. Osteoarthritis: Pathology, Diagnosis, and Treatment Options / B. Abramoff, F.E. Caldera // *Med. Clin. North Am.* – 2020. – Vol. 104. – № 2. – P. 293–311.
7. Osteoarthritis year in review 2023: Epidemiology & therapy / A.V. Perruccio, J.D. Power, R. Gandhi, [et al.] // *Osteoarthritis Cartilage. Elsevier.* – 2024. – Vol. 32. – № 2. – P. 159–165.
8. Hunter, D.J. Osteoarthritis in 2020 and beyond: a Lancet Commission / D.J. Hunter, L. March, M. Chew // *Lancet. Elsevier.* – 2020. – Vol. 396. – № 10264. – P. 1711–1712.
9. Katz, J.N. Diagnosis and Treatment of Hip and Knee Osteoarthritis: A Review / J.N. Katz, K.R. Arant, R.F. Loeser // *JAMA.* – 2021. – Vol. 325. – № 6. – P. 568–578.
10. Exosomes as drug carriers for clinical application / C. Di, Q. Zhang, Y. Wang, [et al.] // *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* – 2018. – Vol. 46. – № Suppl. 3. – P. 564–570.

11. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from fetal-bone marrow, adipose tissue, and Wharton's jelly as sources of cell immunomodulatory therapy / Q. Wang, Y. Ma, L. et al. // *Hum. Vaccines Immunother.* – 2016. – Vol. 12. – № 1. – P. 85–96.
12. Mesenchymal stem cells influence monocyte/macrophage phenotype: Regulatory mode and potential clinical applications / D. Lu, X. Jiao, W. Jiang, et al. // *Biomed. Pharmacother.* – 2023. – Vol. 165. – P. 115042.
13. Hopes and Limits of Adipose-Derived Stem Cells (ADSCs) and Mesenchymal Stem Cells (MSCs) in Wound Healing / L. Mazini, et al. // *Int. J. Mol. Sci. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.* – 2020. – Vol. 21. – № 4. – P. 1306.
14. Mesenchymal Stem Cells in the Pathogenesis and Therapy of Autoimmune and Autoinflammatory Diseases / L.N. Zaripova, A. Midgley, S.E. Christmas // *Int. J. Mol. Sci. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.* – 2023. – Vol. 24. – № 22. – P. 16040.
15. Ethical and safety issues of stem cell-based therapy / V. Volarevic, B. Ljubic, N. Stojkovic, [et al.] // *Int. J. Med. Sci.* – 2018. – Vol. 15. – № 1. – P. 36–45.
16. Human mesenchymal stem cells creating an immunosuppressive environment and promote breast cancer in mice / B. Ljubic, V. Milovanovic, I. Volarevic, [et al.] // *Sci. Rep. Nature Publishing Group.* – 2013. – Vol. 3. – № 1. – P. 2298.
17. Integration of stem cell-derived exosomes with in situ hydrogel glue as a promising tissue patch for articular cartilage regeneration / X. Liu, Y. Yang, Z. Li, [et al.] // *Nanoscale. The Royal Society of Chemistry.* – 2017. – Vol. 9. – № 13. – P. 4430–4438.
18. MSCs-derived exosomes: Cell-secreted nanovesicles with regenerative potential / A. Marote, C. Teixeira, R. Mendes-Pinheiro, [et al.] // *Front. Pharmacol. Frontiers.* – 2016. – Vol. 7. – P. 231.
19. Mesenchymal stem cells secretome: A new paradigm for central nervous system regeneration? / F.G. Teixeira, M.M. Carvalho, N. Sousa, [et al.] // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2013. – Vol. 70. – № 20. – P. 3871–3882.
20. Direct and cell-mediated EV-ECM interplay / O. Smirnova, Y. Efremov, T. Klyucherev, [et al.] // *Acta Biomater.* – 2024. – Vol. 186. – P. 63–84.

21. Extracellular vesicles: New classification and tumor immunosuppression / M. Sheta, E.A. Taha, Y. Lu, [et al.] // *Biology*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. – 2023. – Vol. 12. – № 1. – P. 110.
22. Immunomodulatory effects of mesenchymal stromal cells-derived exosome / W. Chen, Y. Huang, J. Han, [et al.] // *Immunol. Res.* – 2016. – Vol. 64. – № 4. – P. 831–840.
23. Arabpour, M. Anti-inflammatory and M2 macrophage polarization-promoting effect of mesenchymal stem cell-derived exosomes / M. Arabpour, A. Saghazadeh, N. Rezaei // *Int. Immunopharmacol.* – 2021. – Vol. 97. – P. 107823.
24. *Lactobacillus plantarum*-derived extracellular vesicles modulate macrophage polarization and gut homeostasis for alleviating ulcerative colitis / Q. Chen, Z. Wang, Z. Yang, [et al.] // *J. Agric. Food Chem.* American Chemical Society. – 2024. – Vol. 72. – № 26. – P. 14713–14726.
25. Matrix-bound nanovesicles recapitulate extracellular matrix effects on macrophage phenotype / L. Huleihel, J.G. Bartolacci, J.L. Dziki, [et al.] // *Tissue Eng. Part A*. Mary Ann Liebert, Inc., publishers. – 2017. – Vol. 23. – № 21–22. – P. 1283–1294.
26. Four sides to the story: A proteomic comparison of liquid-phase and matrix-bound extracellular vesicles in 2D and 3D cell cultures / M. Peshkova, A. Korneev, D. Revokatova [et al.] // *Tissue Eng. Part A*. – 2024. – Vol. 24. – № 18. – P. e2300375.
27. Lipidomics and RNA sequencing reveal a novel subpopulation of nanovesicle within extracellular matrix biomaterials / G.S. Hussey, C.P. Molina, M.C. Cramer, [et al.] // *Sci. Adv.* American Association for the Advancement of Science. – 2020. – Vol. 6. – № 12. – P. eaay4361.
28. Matrix-bound nanovesicles promote prohealing immunomodulation without immunosuppression / H. Capella-Monsonís, Raphael J Crum, William D'Angelo, [et al.] // *Tissue Eng. Part A*. Mary Ann Liebert, Inc., publishers. – 2025.
29. Matrix-bound nanovesicles prevent ischemia-induced retinal ganglion cell axon degeneration and death and preserve visual function / Y. van der Merwe, A.E. Faust, E.T. Sakalli [et al.] // *Sci. Rep.* Nature Publishing Group. – 2019. – Vol. 9. – № 1. – P. 3482.

30. Piening, L.M. Matrix-bound nanovesicles: What are they and what do they do? / L.M. Piening, R.A. Wachs // *Cells Tissues Organs*. – 2023. – Vol. 212. – № 1. – P. 111–123.
31. Exosomes from TNF- α -treated human gingiva-derived MSCs enhance M2 macrophage polarization and inhibit periodontal bone loss / Y. Nakao, T. Fukuda, Q. Zhang, [et al.] // *Acta Biomater*. – 2021. – Vol. 122. – P. 306–324.
32. Wynn, T.A. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis / T.A. Wynn, K.M. Vannella // *Immunity*. Elsevier. – 2016. – Vol. 44. – № 3. – P. 450–462.
33. Macrophage phenotypic switch orchestrates the inflammation and repair/regeneration following acute pancreatitis injury / J. Wu, L. Zhang 1, J. Shi, [et al.] // *eBioMedicine*. – 2020. – Vol. 58. – P. 102902.
34. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of the extracellular vesicles derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells on osteoarthritis via M2 macrophages / K. Li, G. Yan, H. Huang, [et al.] // *J. Nanobiotechnology*. – 2022. – Vol. 20. – № 1. – P. 38.
35. A novel extracellular vesicles production system harnessing matrix homeostasis and macrophage reprogramming mitigates osteoarthritis / T. Wang, H. Zhao, Y. Zhang, [et al.] // *J. Nanobiotechnology*. – 2024. – Vol. 22. – № 1. – P. 79.
36. Mesenchymal stem/stromal cell-derived exosomes for immunomodulatory therapeutics and skin regeneration / D.H. Ha, H.-K. Kim, J. Lee, [et al.] // *Cells*. – 2020. – Vol. 9. – № 5. – P. 1157.
37. Gordon, S. Mononuclear phagocytes, cellular immunity, and Nobel prizes: A historic perspective / S. Gordon, A. Roberti, S.H.E. Kaufmann // *Cells*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. – 2024. – Vol. 13. – № 16. – P. 1378.
38. Mesenchymal stromal cell exosomes mediate M2-like macrophage polarization through CD73/ecto-5'-nucleotidase activity / K.Y.W. Teo, S. Zhang, J.T. Loh [et al.] // *Pharmaceutics*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. – 2023. – Vol. 15. – № 5. – P. 1489.
39. Pollard, J.W. Trophic macrophages in development and disease / J.W. Pollard // *Nat. Rev. Immunol*. Nature Publishing Group. – 2009. – Vol. 9. – № 4. – P. 259–270.

40. Macrophage M1/M2 polarization / C. Yunna, H. Mengru, W. Lei, [et al.] // *Eur. J. Pharmacol.* – 2020. – Vol. 877. – P. 173090.
41. Muraille, E. Th1/Th2 Paradigm Extended: Macrophage Polarization as an Unappreciated Pathogen-Driven Escape Mechanism? / E. Muraille, O. Leo, M. Moser // *Frontiers in Immunology. Frontiers.* – 2014. – Vol. 5. – P. 603.
42. Macrophage polarization: an important role in inflammatory diseases / M. Luo, F. Zhao, H. Cheng, [et al.] // *Frontiers in Immunology.* – 2024. – Vol. 15. – P. 1398239.
43. Reactive oxygen species (ROS) in macrophage activation and function in diabetes / E. Rendra, V. Riabov, D.M. Mossel, [et al.] // *Immunobiology.* – 2019. – Vol. 224. – № 2. – P. 242–253.
44. De Paoli, F. Macrophage Phenotypes and Their Modulation in Atherosclerosis / F. De Paoli, B. Staels, G. Chinetti-Gbaguidi // *Circulation Journal.* – 2014. – Vol. 78. – № 8. – P. 1775–1781.
45. M2b macrophage polarization and its roles in diseases / L. Wang, Z. Zhang, K. Wang, S. Zhang, H. Wu [et al.] // *Journal of Leukocyte Biology.* – 2019. – Vol. 106. – № 2. – P. 345–358.
46. Immunomodulatory and regenerative effects of mesenchymal stem cells and extracellular vesicles: therapeutic outlook for inflammatory and degenerative diseases / S. Dabrowska, A. Andrzejewska, M. Janowski, [et al.] // *Frontiers in Immunology.* – 2021. – Vol. 11. – P. 591065.
47. Macrophage polarization and diabetic wound healing / A.E. Louiselle, S.M. Niemiec, C. Zgheib, [et al.] // *Translational Research. Elsevier.* – 2021. – Vol. 236. – P. 109–116.
48. Hade, M.D. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes: Applications in Regenerative Medicine / M.D. Hade, C.N. Suire, Z. Suo // *Cells. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.* – 2021. – Vol. 10. – № 8. – P. 1959.
49. Macrophage Polarization and Its Role in Liver Disease / C. Wang, C. Ma, L. Gong, [et al.] // *Frontiers in Immunology. Frontiers.* – 2021. – Vol. 12. – P. 803044.

50. Mesenchymal stem cells reciprocally regulate the M1/M2 balance in mouse bone marrow-derived macrophages / D.-I. Cho, M.R. Kim, H.-Y. Jeong, [et al.] // *Exp. Mol. Med.* Nature Publishing Group. – 2014. – Vol. 46. – № 1. – P. e70.
51. Macrophages as a therapeutic target to promote diabetic wound healing / M. Sharifiaghdam, E. Shaabani, R. Faridi-Majidi, [et al.] // *Mol. Ther.* Elsevier. – 2022. – Vol. 30. – № 9. – P. 2891–2908.
52. Modulators of microglia activation and polarization in ischemic stroke (Review) / C.-T. Jiang, W.-F. Wu, Y.-H. Deng, // *Mol. Med. Rep.* – 2020. – Vol. 21. – № 5. – P. 2006–2018.
53. The Therapeutic Potential of Exosomes vs. Matrix-Bound Nanovesicles from Human Umbilical Cord Mesenchymal Stromal Cells in Osteoarthritis Treatment / T.O. Klyucherev, M.A. Peshkova, D.P. Revokatova, [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* Multidisciplinary Digital Publishing Institute. – 2024. – Vol. 25. – № 21. – P. 11564.
54. Targeting Inflammation and Regeneration: Scaffolds, Extracellular Vesicles, and Nanotechnologies as Cell-Free Dual-Target Therapeutic Strategies / M. Peshkova, N. Kosheleva, A. Shpichka, [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* Multidisciplinary Digital Publishing Institute. – 2022. – Vol. 23. – № 22. – P. 13796.
55. Matrix-bound nanovesicles within ECM bioscaffolds / L. Huleihel, G.S. Hussey, J.D. Naranjo, [et al.] // *Sci. Adv.* American Association for the Advancement of Science. – 2016. – Vol. 2. – № 6. – P. e1600502.
56. Immunomodulatory matrix-bound nanovesicles mitigate acute and chronic pristane-induced rheumatoid arthritis / R.J. Crum, K. Hall, C.P. Molina, [et al.] // *Npj Regen. Med.* Nature Publishing Group. – 2022. – Vol. 7. – № 1. – P. 13.
57. Exosomes from human umbilical cord mesenchymal stem cells attenuate the inflammation of severe steroid-resistant asthma by reshaping macrophage polarization / B. Dong, C. Wang, J. Zhang, [et al.] // *Stem Cell Res. Ther.* – 2021. – Vol. 12. – № 1. – P. 204.

58. Comparison of the therapeutic effect of amniotic fluid stem cells and their exosomes on monoiodoacetate-induced animal model of osteoarthritis / M. Zavatti, F. Beretti, F. Casciaro, [et al.] // *BioFactors Oxf. Engl.* – 2020. – Vol. 46. – № 1. – P. 106–117.
59. Regulation and control of nitric oxide (NO) in macrophages: Protecting the “professional killer cell” from its own cytotoxic arsenal via MRP1 and GSTP1 / Z. Kovacevic, S. Sahni, H. Lok, [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta BBA. - General Subjects.* – 2017. – Vol. 1861. – № 5, Part A. – P. 995–999.
60. Schneemann, M. Macrophage biology and immunology: man is not a mouse / M. Schneemann, G. Schoeden // *J. Leukoc. Biol.* – 2007. – Vol. 81. – № 3. – P. 579.
61. Radical-Generating Activity, Phagocytosis, and Mechanical Properties of Four Phenotypes of Human Macrophages / S.K. Suleimanov, Y.M. Efremov, T.O. Klyucherev, [et al.] // *Int. J. Mol. Sci. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.* – 2024. – Vol. 25. – № 3. – P. 1860.
62. Gene expression profiling of human macrophages after graphene oxide and graphene nanoplatelets treatment reveals particle-specific regulation of pathways / D. Korejwo, S. Chortarea, C. Louka, [et al.] // *NanoImpact.* – 2023. – Vol. 29. – P. 100452.
63. Parkin, J. An overview of the immune system / J. Parkin, B. Cohen // *The Lancet. Elsevier.* – 2001. – Vol. 357. – № 9270. – P. 1777–1789.
64. Muntjewerff, E.M. Antigen Cross-Presentation by Macrophages / E.M. Muntjewerff, L.D. Meesters, G. van den Bogaart // *Front. Immunol. Frontiers.* – 2020. – Vol. 11. – P. 1276.
65. Long, A. Immune dysregulation / A. Long, A. Kleiner, R.J. Looney // *J. Allergy Clin. Immunol. Elsevier.* – 2023. – Vol. 151. – № 1. – P. 70–80.
66. Macrophage Polarization, Metabolic Reprogramming, and Inflammatory Effects in Ischemic Heart Disease / X. Sun, Y. Li, Q. Deng, [et al.] // *Front. Immunol. Frontiers.* – 2022. – Vol. 13. – P. 934040.
67. Immunology of Acute and Chronic Wound Healing / K. Raziyeva, Y. Kim, Z. Zharkinbekov, [et al.] // *Biomolecules. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.* – 2021. – Vol. 11. – № 5. – P. 700.

68. Ginhoux, F. Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis / F. Ginhoux, M. Williams // *Immunity*. Elsevier. – 2016. – Vol. 44. – № 3. – P. 439–449.
69. Macrophage-Mediated Inflammation in Skin Wound Healing / A. Hassanshahi, M. Moradzad, S. Ghalamkari, [et al.] // *Cells*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. – 2022. – Vol. 11. – № 19. – P. 2953.
70. Yona, S. From the Reticuloendothelial to Mononuclear Phagocyte System – The Unaccounted Years / S. Yona, S. Gordon // *Front. Immunol. Frontiers*. – 2015. – Vol. 6. – P. 328.
71. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells / R. van Furth, Z.A. Cohn, J.G. Hirsch, [et al.] // *Bull. World Health Organ.* – 1972. – Vol. 46. – № 6. – P. 845.
72. Epelman, S. Origin and Functions of Tissue Macrophages / S. Epelman, K.J. Lavine, G.J. Randolph // *Immunity*. Elsevier. – 2014. – Vol. 41. – № 1. – P. 21–35.
73. Analysis of Genetically Diverse Macrophages Reveals Local and Domain-wide Mechanisms that Control Transcription Factor Binding and Function / V.M. Link, S.H. Duttke, H.B. Chun, [et al.] // *Cell*. Elsevier. – 2018. – Vol. 173. – № 7. – P. 1796–1809.e17.
74. Distinct pathogenic roles for resident and monocyte-derived macrophages in lupus nephritis / N. Richoz, Z.K. Tuong, K.W. Loudon, [et al.] // *JCI Insight*. American Society for Clinical Investigation. – 2023. – Vol. 7. – № 21. – P. e159751.
75. Li, Q. Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease / Q. Li, B.A. Barres // *Nat. Rev. Immunol.* Nature Publishing Group. – 2018. – Vol. 18. – № 4. – P. 225–242.
76. Liver X receptors in lipid metabolism: opportunities for drug discovery / C. Hong, P. Tontonoz // *Nat. Rev. Drug Discov.* Nature Publishing Group. – 2014. – Vol. 13. – № 6. – P. 433–444.
77. The human heart contains distinct macrophage subsets with divergent origins and functions / G. Bajpai, C. Schneider, N. Wong, [et al.] // *Nat. Med.* Nature Publishing Group. – 2018. – Vol. 24. – № 8. – P. 1234–1245.

78. Frodermann, V. Macrophages and Cardiovascular Health / V. Frodermann, M. Nahrendorf // *Physiol. Rev. American Physiological Society*. – 2018. – Vol. 98. – № 4. – P. 2523–2569.
79. Orchestration of Metabolism by Macrophages / S.K. Biswas, A. Mantovani // *Cell Metab. Elsevier*. – 2012. – Vol. 15. – № 4. – P. 432–437.
80. Udalova, I.A. Macrophage heterogeneity in the context of rheumatoid arthritis / I.A. Udalova, A. Mantovani, M. Feldmann // *Nat. Rev. Rheumatol. Nature Publishing Group*. – 2016. – Vol. 12. – № 8. – P. 472–485.
81. Van Epps, H.L. Macrophage activation unveiled / H.L. Van Epps // *J. Exp. Med.* – 2005. – Vol. 202. – № 7. – P. 884.
82. Mills, C.D. M1 and M2 Macrophages: The Chicken and the Egg of Immunity / C.D. Mills, K. Ley // *J. Innate Immun. S. Karger AG*. – 2014. – Vol. 6. – № 6. – P. 716–726.
83. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation / M. Stein, S. Keshav, N. Harris, [et al.] // *J. Exp. Med.* – 1992. – Vol. 176. – № 1. – P. 287–292.
84. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm / C.D. Mills, K. Kincaid, J.M. Alt, [et al.] // *J. Immunol.* – 2000. – Vol. 164. – № 12. – P. 6166–6173.
85. Mass cytometry deep phenotyping of human mononuclear phagocytes and myeloid-derived suppressor cells from human blood and bone marrow / M. Roussel, P.B. Ferrell Jr, A.R. Greenplate, [et al.] // *J. Leukoc. Biol.* – 2017. – Vol. 102. – № 2. – P. 437–447.
86. Integrating RNA-seq and scRNA-seq to explore the mechanism of macrophage ferroptosis associated with COPD / P. Fan, Y. Zhang, S. Ding, [et al.] // *Front. Pharmacol. Frontiers*. – 2023. – Vol. 14. – P. 1139137.
87. Microglia Heterogeneity in the Single-Cell Era / T. Masuda, R. Sankowski, O. Staszewski, [et al.] // *Cell Rep. Elsevier*. – 2020. – Vol. 30. – № 5. – P. 1271–1281.

88. Sialidase facilitates *Porphyromonas gingivalis* immune evasion by reducing M1 polarization, antigen presentation, and phagocytosis of infected macrophages / X. Fan, S. Zheng, C. Chen, [et al.] // *Front. Cell. Infect. Microbiol. Frontiers*. – 2023. – Vol. 13. – P. 1173899.
89. Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS–) vs. Alternatively Activated Macrophages / M. Orecchioni, Y. Ghosheh, A.B. Pramod, [et al.] // *Front. Immunol. Frontiers*. – 2019. – Vol. 10. – P. 1084.
90. Italiani, P. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation / P. Italiani, D. Boraschi // *Front. Immunol. Frontiers*. – 2014. – Vol. 5. – P. 514.
91. CD4⁺ T cells indirectly kill tumor cells via induction of cytotoxic macrophages in mouse models / B. Bogen, M. Fauskanger, O.A. Haabeth, [et al.] // *Cancer Immunol. Immunother. Springer*. – 2019. – Vol. 68. – № 11. – P. 1865–1873.
92. Nauseef, W.M. The phagocyte NOX2 NADPH oxidase in microbial killing and cell signaling / W.M. Nauseef // *Curr. Opin. Immunol. Elsevier*. – 2019. – Vol. 60. – P. 130–140.
93. Arnhold, J. Host-Derived Cytotoxic Agents in Chronic Inflammation and Disease Progression / J. Arnhold // *Int. J. Mol. Sci. Multidisciplinary Digital Publishing Institute*. – 2023. – Vol. 24. – № 3. – P. 3016.
94. Zhang, H. Macrophages regulate the progression of osteoarthritis / H. Zhang, D. Cai, X. Bai // *Osteoarthritis Cartilage. Elsevier*. – 2020. – Vol. 28. – № 5. – P. 555–561.
95. M2 Macrophage-Derived Concentrated Conditioned Media Significantly Improves Skin Wound Healing / C. Savitri, J.W. Kwon, V. Drobyshava, [et al.] // *Tissue Eng. Regen. Med. Springer*. – 2022. – Vol. 19. – № 3. – P. 617–628.
96. Puerarin improves diabetic wound healing via regulation of macrophage M2 polarization phenotype / S. Li, P. Yang, X. Ding, [et al.] // *Burns Trauma*. – 2022. – Vol. 10. – P. tkac046.
97. Ubiquitin E3 Ligase Pellino-1 Inhibits IL-10-mediated M2c Polarization of Macrophages, Thereby Suppressing Tumor Growth / D. Kim, J. Koh, J.S. Ko, [et al.] // *Immune Netw*. – 2019. – Vol. 19. – № 5. – P. e32.

98. Fever-Range Hyperthermia Promotes Macrophage Polarization towards Regulatory Phenotype M2b: 24 / H.M. Kozłowski, J. Sobocińska, T. Jędrzejewski, [et al.] // *Int. J. Mol. Sci. Multidisciplinary Digital Publishing Institute*. – 2023. – Vol. 24. – № 24. – P. 17574.
99. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization / A. Mantovani, A. Sica, S. Sozzani, [et al.] // *Trends Immunol. Elsevier*. – 2004. – Vol. 25. – № 12. – P. 677–686.
100. Preconditioning of bone marrow-derived mesenchymal stem cells highly strengthens their potential to promote IL-6-dependent M2b polarization / D. Philipp, L. Suhr, T. Wahlers, [et al.] // *Stem Cell Res. Ther. BioMed Central*. – 2018. – Vol. 9. – № 1. – P. 286.
101. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes / A. Mantovani, S. Sozzani, M. Locati, [et al.] // *Trends Immunol. Elsevier*. – 2002. – Vol. 23. – № 11. – P. 549–555.
102. The role of macrophages in the formation of hypertrophic scars and keloids / X. Xu, S. Gu, X. Huang, [et al.] // *Burns Trauma*. – 2020. – Vol. 8. – P. tkaa006.
103. HCV inhibits M2a, M2b and M2c macrophage polarization via HCV core protein engagement with Toll-like receptor 2 / S. Zhao, M. Si, X. Den, [et al.] // *Exp. Ther. Med. Spandidos Publications*. – 2022. – Vol. 24. – № 2. – P. 1–10.
104. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations / J.P. Edwards, X. Zhang, K.A. Frauwirth, [et al.] // *J. Leukoc. Biol. Oxford Academic*. – 2006. – Vol. 80. – № 6. – P. 1298–1307.
105. Temporal phenotypic features distinguish polarized macrophages in vitro / D.W. Melton, L.M. McManus, J.A.L. Gelfond, [et al.] // *Autoimmunity. Taylor & Francis*. – 2015. – Vol. 48. – № 3. – P. 161–176.
106. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles alter disease outcomes via endorsement of macrophage polarization / J. Wang, J. Xia, R. Huang, [et al.] // *Stem Cell Res. Ther. BioMed Central*. – 2020. – Vol. 11. – № 1. – P. 424.

107. Precisely Regulating M2 Subtype Macrophages for Renal Fibrosis Resolution / L. Luo, S. Wang, Y. Hu, [et al.] // ACS Nano. American Chemical Society. – 2023. – Vol. 17. – № 22. – P. 22508–22526.
108. Regulatory T cells engineered with a novel insulin-specific chimeric antigen receptor as a candidate immunotherapy for type 1 diabetes / M. Tenspolde, K. Zimmermann, L.C. Weber, [et al.] // J. Autoimmun. Elsevier. – 2019. – Vol. 103. – P. 102289.
109. Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo / N. Jetten, S. Verbruggen, M.J. Gijbels, [et al.] // Angiogenesis. Springer. – 2014. – Vol. 17. – № 1. – P. 109–118.
110. Transcriptome analysis of IL-10-stimulated (M2c) macrophages by next-generation sequencing / E.B. Lurier, D. Dalton, W. Dampier, [et al.] // Immunobiology. Elsevier. – 2017. – Vol. 222. – № 7. – P. 847–856.
111. Gao, J. Shaping Polarization Of Tumor-Associated Macrophages In Cancer Immunotherapy / J. Gao, Y. Liang, L. Wang // Front. Immunol. Frontiers. – 2022. – Vol. 13.
112. Kerneur, C. Major pathways involved in macrophage polarization in cancer / C. Kerneur, C.E. Cano, D. Olive // Front. Immunol. Frontiers. – 2022. – Vol. 13.
113. Ushach, I. Biological role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on cells of the myeloid lineage / I. Ushach, A. Zlotnik // J. Leukoc. Biol. John Wiley & Sons. – 2016. – Vol. 100. – № 3. – P. 481–489.
114. Hamilton, J.A. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity / J.A. Hamilton // Nat. Rev. Immunol. Nature Publishing Group. – 2008. – Vol. 8. – № 7. – P. 533–544.
115. Pro- and anti-inflammatory control of M-CSF-mediated macrophage differentiation / A. Popova, J. Kzhyshkowska, D. Nurgazieva, [et al.] // Immunobiology. Elsevier. – 2011. – Vol. 216. – № 1. – P. 164–172.
116. Hamilton, J.A. GM-CSF in inflammation / J.A. Hamilton // J. Exp. Med. Rockefeller Univ. Press. – 2019. – Vol. 217. – № 1. – P. e20190945.

117. Macrophage Participation in the Degradation and Remodeling of Extracellular Matrix Scaffolds / J.E. Valentin, A.M. Stewart-Akers, T.W. Gilbert, [et al.] // *Tissue Eng. Part A*. Mary Ann Liebert, Inc. – 2009. – Vol. 15. – № 7. – P. 1687–1694.
118. Macrophage Related Chronic Inflammation in Non-Healing Wounds / M. Li, Q. Hou, L. Zhong, [et al.] // *Front. Immunol. Frontiers*. – 2021. – Vol. 12.
119. Oishi, Y. Macrophages in inflammation, repair and regeneration / Y. Oishi, I. Manabe // *Int. Immunol.* – 2018. – Vol. 30. – № 11. – P. 511–528.
120. Monaco, J.L. Acute wound healing: An overview / J.L. Monaco, W.T. Lawrence // *Clin. Plast. Surg. Elsevier*. – 2003. – Vol. 30. – № 1. – P. 1–12.
121. Biomaterials: Foreign Bodies or Tuners for the Immune Response? / E. Mariani, G. Lisignoli, R.M. Borzì, [et al.] // *Int. J. Mol. Sci. Multidisciplinary Digital Publishing Institute*. – 2019. – Vol. 20. – № 3. – P. 636.
122. An in vitro model mimics the contact of biomaterials to blood components and the reaction of surrounding soft tissue / M. Jannasch, S. Gaetzner, F. Groeber, [et al.] // *Acta Biomater. Elsevier*. – 2019. – Vol. 89. – P. 227–241.
123. Hart, J. Inflammation 2: its role in the healing of chronic wounds / J. Hart // *J. Wound Care*. Mark Allen Group. – 2002. – Vol. 11. – № 7. – P. 245–249.
124. DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases / T. Gong, L. Liu, W. Jiang, [et al.] // *Nat. Rev. Immunol. Nature Publishing Group*. – 2020. – Vol. 20. – № 2. – P. 95–112.
125. Zindel, J. DAMPs, PAMPs, and LAMPs in Immunity and Sterile Inflammation / J. Zindel, P. Kubes // *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis. Annual Reviews*. – 2020. – Vol. 15. – P. 493–518.
126. Preissner, K.T. Extracellular RNA as a Versatile DAMP and Alarm Signal That Influences Leukocyte Recruitment in Inflammation and Infection / K.T. Preissner, S. Fischer, E. Deindl // *Front. Cell Dev. Biol. Frontiers*. – 2020. – Vol. 8.
127. Li, D. Pattern recognition receptors in health and diseases / D. Li, M. Wu // *Signal Transduct. Target. Ther. Nature Publishing Group*. – 2021. – Vol. 6. – № 1. – P. 291.

128. Targeting macrophage autophagy for inflammation resolution and tissue repair in inflammatory bowel disease / E. Wang, M.Y. Wu, Z.Y. Ren, [et al.] // *Burns Trauma*. – 2023. – Vol. 11. – P. tkad004.
129. Biswas, S.K. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm / S.K. Biswas, A. Mantovani // *Nat. Immunol.* Nature Publishing Group. – 2010. – Vol. 11. – № 10. – P. 889–896.
130. Cathepsins in Bacteria-Macrophage Interaction: Defenders or Victims of Circumstance? / L. Szulc-Dąbrowska, M. Bossowska-Nowicka, J. Struzik, [et al.] // *Front. Cell. Infect. Microbiol. Frontiers*. – 2020. – Vol. 10.
131. Chang, M. Strategy for Treatment of Infected Diabetic Foot Ulcers / M. Chang, T.T. Nguyen // *Acc. Chem. Res. American Chemical Society*. – 2021. – Vol. 54. – № 5. – P. 1080–1093.
132. The role of macrophage phenotype in vascularization of tissue engineering scaffolds / K.L. Spiller, R.R. Anfang, K.J. Spiller, [et al.] // *Biomaterials. Elsevier*. – 2014. – Vol. 35. – № 15. – P. 4477–4488.
133. Robson, M.C. Wound healing: Biologic features and approaches to maximize healing trajectories / M.C. Robson, D.L. Steed, M.G. Franz // *Curr. Probl. Surg. Elsevier*. – 2001. – Vol. 38. – № 2. – P. A1, 72-140.
134. Ferrante, C.J. Regulation of Macrophage Polarization and Wound Healing / C.J. Ferrante, S.J. Leibovich // *Adv. Wound Care. Mary Ann Liebert, Inc., publishers*. – 2012. – Vol. 1. – № 1. – P. 10–16.
135. PlGF Reduction Compromises Angiogenesis in Diabetic Foot Disease Through Macrophages / L. Zhu, J. Qian, Y. Jiang, [et al.] // *Front. Immunol. Frontiers*. – 2021. – Vol. 12.
136. Endothelial Lactate Controls Muscle Regeneration from Ischemia by Inducing M2-like Macrophage Polarization / J. Zhang, J. Muri, G. Fitzgerald, [et al.] // *Cell Metab. Elsevier*. – 2020. – Vol. 31. – № 6. – P. 1136–1153.e7.
137. Macrophages directly contribute collagen to scar formation during zebrafish heart regeneration and mouse heart repair / F.C. Simões, T.J. Cahill, A. Kenyon, [et al.] // *Nat. Commun. Nature Publishing Group*. – 2020. – Vol. 11. – № 1. – P. 600.

138. Ursolic Acid Ameliorated Neuronal Damage by Restoring Microglia-Activated MMP/TIMP Imbalance in vitro / L. Qiu, Y. Wang, Y. Wang, [et al.] // *Drug Des. Devel. Ther.* Dove Press. – 2023. – Vol. 17. – P. 2481–2493.
139. Macrophage morphological plasticity and migration is Rac signalling and MMP9 dependant / J. Travnickova, S. Nhim, N. Abdellaoui, [et al.] // *Sci. Rep.* Nature Publishing Group. – 2021. – Vol. 11. – № 1. – P. 10123.
140. Eming, S.A. Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation / S.A. Eming, P. Martin, M. Tomic-Canic // *Sci. Transl. Med.* American Association for the Advancement of Science. – 2014. – Vol. 6. – № 265. – P. 265sr6.
141. Atri, C. Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases / C. Atri, F.Z. Guerfali, D. Laouini // *Int. J. Mol. Sci.* Multidisciplinary Digital Publishing Institute. – 2018. – Vol. 19. – № 6. – P. 1801.
142. Advances in the role of STAT3 in macrophage polarization / T. Xia, M. Zhang, W. Lei, [et al.] // *Front. Immunol.* Frontiers. – 2023. – Vol. 14.
143. The JAK-STAT Pathway: Impact on Human Disease and Therapeutic Intervention / J.J. O'Shea, D.M Schwartz, A.V. Villarino, [et al.] // *Annu. Rev. Med.* Annual Reviews. – 2015. – Vol. 66. – P. 311–328.
144. Liu, C. Advances in the Regulation of Macrophage Polarization by Mesenchymal Stem Cells and Implications for ALI/ARDS Treatment / C. Liu, K. Xiao, L. Xie // *Front. Immunol.* Frontiers. – 2022. – Vol. 13.
145. Role of the JAK/STAT signaling pathway in regulation of innate immunity in neuroinflammatory diseases / Z. Yan, S.A. Gibson, J.A. Buckley, [et al.] // *Clin. Immunol.* Elsevier. – 2018. – Vol. 189. – P. 4–13.
146. JAK–STAT Signaling as a Target for Inflammatory and Autoimmune Diseases: Current and Future Prospects / S. Banerjee, A. Biehl, M. Gadina, [et al.] // *Drugs.* Springer. – 2017. – Vol. 77. – № 5. – P. 521–546.
147. The N6-methyladenosine (m6A)-forming enzyme METTL3 facilitates M1 macrophage polarization through the methylation of STAT1 mRNA / Y. Liu, Z. Liu, H. Tang, [et al.] // *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* American Physiological Society. – 2019. – Vol. 317. – № 4. – P. C762–C775.

148. Lee, M.-S. Macrophages from Nonobese Diabetic Mouse Have a Selective Defect in IFN- γ but Not IFN- α/β Receptor Pathway / M.-S. Lee, H.-J. Kwon, H.S. Kim // J. Clin. Immunol. Springer. – 2012. – Vol. 32. – № 4. – P. 753–761.
149. Latent Enhancers Activated by Stimulation in Differentiated Cells / R. Ostuni, V. Piccolo, I. Barozzi, [et al.] // Cell. Elsevier. – 2013. – Vol. 152. – № 1. – P. 157–171.
150. Synergistic Activation of Inflammatory Cytokine Genes by Interferon- γ -Induced Chromatin Remodeling and Toll-like Receptor Signaling / Y. Qiao, E.G. Giannopoulou, C.H. Chan, [et al.] // Immunity. Elsevier. – 2013. – Vol. 39. – № 3. – P. 454–469.
151. Atorvastatin-pretreated mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles promote cardiac repair after myocardial infarction via shifting macrophage polarization by targeting microRNA-139-3p/Stat1 pathway / Y. Ning, P. Huang, G. Chen, [et al.] // BMC Medicine. BioMed Central. – 2023. – Vol. 21. – № 1. – P. 96.
152. IL-4 Switches Microglia/macrophage M1/M2 Polarization and Alleviates Neurological Damage by Modulating the JAK1/STAT6 Pathway Following ICH / Y. He, Y. Gao, Q. Zhang, [et al.] // Neuroscience. Elsevier Ltd. – 2020. – Vol. 437. – P. 161–171.
153. STAT3 blockade ameliorates LPS-induced kidney injury through macrophage-driven inflammation / S.-H. Lee, K.H. Kim, S.M. Lee, [et al.] // Cell Commun. Signal. BioMed Central. – 2024. – Vol. 22. – № 1. – P. 476.
154. Serum- and Glucocorticoid-Inducible Kinase 1 Promotes Alternative Macrophage Polarization and Restrains Inflammation through FoxO1 and STAT3 Signaling / J. Ren, X. Han, H. Lohner, [et al.] // The J. Immunol. The American Association of Immunologists, Inc. – 2021. – Vol. 207. – № 1. – P. 268–280.
155. Krüppel-like factor 4 regulates macrophage polarization / X. Liao, N. Sharma, F. Kapadia, [et al.] // J. Clin. Invest. American Society for Clinical Investigation – 2011. – Vol. 121. – № 7. – P. 2736–2749.
156. Viola yedoensis Makino formula alleviates DNCB-induced atopic dermatitis by activating JAK2/STAT3 signaling pathway and promoting M2 macrophages polarization / H. Zeng, B. Zhao, D. Zhang, [et al.] // Phytomedicine. Elsevier B.V. – 2022. – Vol. 103. – P. 154228.

157. Simiao Wan attenuates monosodium urate crystal-induced arthritis in rats through contributing to macrophage M2 polarization / J. Yang, G. Chen, T.-W. Guo, [et al.] // *J. Ethnopharmacol. Elsevier B.V.* – 2021. – Vol. 275. – P. 114123.
158. Tumor-derived exosomes deliver the tumor suppressor miR-3591-3p to induce M2 macrophage polarization and promote glioma progression / M. Li, H. Xu, Y. Qi, [et al.] // *Oncogene. Nature Publishing Group.* – 2022. – Vol. 41. – № 41. – P. 4618–4632
159. Blockade of JAK2 signaling produces immunomodulatory effect to preserve pancreatic homeostasis in severe acute pancreatitis / Z. Qiu, F. Xu, Z. Wang, [et al.] // *Biochem. Biophys. Rep. Elsevier B.V.* – 2021. – Vol. 28. – P. 101133.
160. Xuanfei Baidu Decoction protects against macrophages induced inflammation and pulmonary fibrosis via inhibiting IL-6/STAT3 signaling pathway / Y. Wang, X. Sang, R. Shao, [et al.] // *J. Ethnopharmacol. Elsevier B.V.* – 2022. – Vol. 283. – P. 114701.
161. Macrophage M1 polarization mediated via the IL-6/STAT3 pathway contributes to apical periodontitis induced by *Porphyromonas gingivalis* / X. Chen, J. Dou, Z. Fu, [et al.] // *J. Appl. Oral Sci. Faculdade De Odontologia De Bauru - USP.* – 2022. – Vol. 30. – P. e20220316.
162. Sun, S.-C. The non-canonical NF- κ B pathway in immunity and inflammation / S.-C. Sun // *Nat. Rev. Immunol. Nature Publishing Group.* – 2017. – Vol. 17. – № 9. – P. 545–558.
163. Paralemmin-3 contributes to lipopolysaccharide-induced inflammatory response and is involved in lipopolysaccharide-Toll-like receptor-4 signaling in alveolar macrophages / X.-X. Chen, L. Tang, Y.-M. Fu, [et al.] // *Int. J. Mol. Med. Spandidos Publications.* – 2017. – Vol. 40. – № 6. – P. 1921–1931.
164. Nrf2 inhibits M1 macrophage polarization to ameliorate renal ischemia–reperfusion injury through antagonizing NF- κ B signaling / H. Han, Y. Gao, B. Chen, [et al.] // *Int. Immunopharmacol.* – 2024. – Vol. 143. – P. 113310.
165. Valproic acid attenuates traumatic spinal cord injury-induced inflammation via STAT1 and NF- κ B pathway dependent of HDAC3 / S. Chen, J. Ye, X. Chen, [et al.] // *J. Neuroinflammation.* – 2018. – Vol. 15. – № 1. – P. 150.

166. LPS-preconditioned mesenchymal stromal cells modify macrophage polarization for resolution of chronic inflammation via exosome-shuttled let-7b / D. Ti, H. Hao, C. Tong, [et al.] // J. Transl. Med. – 2015. – Vol. 13. – № 1. – P. 308.
167. Guo, H. Lipocalin 2 is a regulator of macrophage polarization and NF- κ B/STAT3 pathway activation / H. Guo, D. Jin, X. Chen // Mol. Endocrinol. – 2014. – Vol. 28. – № 10. – P. 1616–1628.
168. NOTCH4 Exhibits Anti-Inflammatory Activity in Activated Macrophages by Interfering With Interferon- γ and TLR4 Signaling / S. López-López, M.J. Romero de Ávila 1, N.C. Hernández de León, [et al.] // Front. Immunol. Frontiers. – 2021. – Vol. 12.
169. Advances in the study of macrophage polarization in inflammatory immune skin diseases / T. Xia, S. Fu, R. Yang, [et al.] // J. Inflamm. – 2023. – Vol. 20. – № 1. – P. 33.
170. Akt1 and Akt2 protein kinases differentially contribute to macrophage polarization / A. Arranz, C. Doxaki, E. Vergadi, [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2012. – Vol. 109. – № 24. – P. 9517–9522.
171. AKT3 deficiency in M2 macrophages impairs cutaneous wound healing by disrupting tissue remodeling / S. Gu, H. Dai, X. Zhao, [et al.] // Aging. – 2020. – Vol. 12. – № 8. – P. 6928–6946.
172. Expression profiles of miRNAs in polarized macrophages / Y. Zhang, M. Zhang, M. Zhong, [et al.] // Int. J. Mol. Med. Spandidos Publications. – 2013. – Vol. 31. – № 4. – P. 797–802.
173. MicroRNA-125b potentiates macrophage activation / A.A. Chaudhuri, A.Y.-L. So, N. Sinha, [et al.] // J. Immunol. – 2011. – Vol. 187. – № 10. – P. 5062–5068.
174. Akt2 deficiency protects from acute lung injury via alternative macrophage activation and miR-146a induction in mice / E. Vergadi, K. Vaporidi, E.E. Theodorakis, [et al.] // J. Immunol. – 2014. – Vol. 192. – № 1. – P. 394–406.
175. C-C chemokine receptor type 2-overexpressing exosomes alleviated experimental post-stroke cognitive impairment by enhancing microglia/macrophage M2 polarization / H.-C. Yang, M. Zhang, R. Wu, [et al.] // World J. Stem Cells. Baishideng Publishing Group Inc. – 2020. – Vol. 12. – № 2. – P. 152–167.

176. Kadomoto, S. Macrophage polarity and disease control / S. Kadomoto, K. Izumi, A. Mizokami // *Int. J. Mol. Sci. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.* – 2022. – Vol. 23. – № 1. – P. 144.
177. Thomas, D. Macrophage functions in lean and obese adipose tissue / D. Thomas, C. Apovian // *Metab. - Clin. Exp. Elsevier.* – 2017. – Vol. 72. – P. 120–143.
178. Adipocyte-secreted exosomal microRNA-34a inhibits M2 macrophage polarization to promote obesity-induced adipose inflammation / Y. Pan, X. Hui, R.L.C. Hoo, [et al.] // *J. Clin. Invest. American Society for Clinical Investigation.* – 2019. – Vol. 129. – № 2. – P. 834–849.
179. Impaired macrophage autophagy induces systemic insulin resistance in obesity / Y.-H. Kang, M.-H. Cho, J.-Y. Kim, [et al.] // *Oncotarget. Impact Journals.* – 2016. – Vol. 7. – № 24. – P. 35577–35591.
180. TNF α -induced NLRP3 inflammasome mediates adipocyte dysfunction and activates macrophages through adipocyte-derived lipocalin 2 / H.M.A. Javaid, E. Ko, E.J. Joo, [et al.] // *Metab. - Clin. Exp. Elsevier.* – 2023. – Vol. 142.
181. Meta-inflammation and metabolic reprogramming of macrophages in diabetes and obesity: the importance of metabolites / S. Russo, M. Kwiatkowski, N. Govorukhina, [et al.] // *Front. Immunol. Frontiers.* – 2021. – Vol. 12.
182. Glutamine metabolism in macrophages: a novel target for obesity/type 2 diabetes / W. Ren, Y. Xia, S. Chen, [et al.] // *Adv. Nutr.* – 2019. – Vol. 10. – № 2. – P. 321–330.
183. Macrophage death as a pharmacological target in atherosclerosis / W. Martinet, I. Coornaert, P. Puylaert, [et al.] // *Front. Pharmacol. Frontiers.* – 2019. – Vol. 10.
184. A role for the apoptosis inhibitory factor AIM/Sp α /Api6 in atherosclerosis development / S. Arai, J.M. Shelton, M. Chen, [et al.] // *Cell Metab. Elsevier.* – 2005. – Vol. 1. – № 3. – P. 201–213.
185. Linton, M.F. Akt signaling in macrophage polarization, survival, and atherosclerosis / M.F. Linton, J.J. Moslehi, V.R. Babaev // *Int. J. Mol. Sci. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.* – 2019. – Vol. 20. – № 11. – P. 2703.
186. Arneth, B. Tumor microenvironment / B. Arneth // *Medicina (Mex.). Multidisciplinary Digital Publishing Institute.* – 2020. – Vol. 56. – № 1. – P. 15.

187. Macrophages and metabolism in the tumor microenvironment / I. Vitale, G. Manic, L.M. Coussens, [et al.] // *Cell Metab. Elsevier*. – 2019. – Vol. 30. – № 1. – P. 36–50.
188. Hedgehog signaling promotes tumor-associated macrophage polarization to suppress intratumoral CD8⁺ T cell recruitment / A.J. Petty, A. Li, X. Wang, [et al.] // *J. Clin. Invest. American Society for Clinical Investigation*. – 2019. – Vol. 129. – № 12. – P. 5151–5162.
189. Tumor-associated macrophages in tumor immunity / Y. Pan, Y. Yu, X. Wang, [et al.] // *Front. Immunol. Frontiers*. – 2020. – Vol. 11.
190. Lin, Y.-J. Update on the pathomechanism, diagnosis, and treatment options for rheumatoid arthritis / Y.-J. Lin, M. Anzaghe, S. Schülke // *Cells. Multidisciplinary Digital Publishing Institute*. – 2020. – Vol. 9. – № 4. – P. 880.
191. Aletaha, D. Diagnosis and management of rheumatoid arthritis: a review / D. Aletaha, J.S. Smolen // *JAMA*. – 2018. – Vol. 320. – № 13. – P. 1360–1372.
192. Is the epidemiology of rheumatoid arthritis changing? Results from a population-based incidence study, 1985–2014 / E. Myasoedova, J. Davis, E.L. Matteson [et al.] // *Ann. Rheum. Dis. Elsevier*. – 2020. – Vol. 79. – № 4. – P. 440–444.
193. Clinical, humanistic, and economic burden of osteoarthritis among noninstitutionalized adults in the United States / X. Zhao, D. Shah, K. Gandhi, [et al.] // *Osteoarthritis Cartilage. Elsevier*. – 2019. – Vol. 27. – № 11. – P. 1618–1626.
194. Defining inflammatory cell states in rheumatoid arthritis joint synovial tissues by integrating single-cell transcriptomics and mass cytometry / F. Zhang, K. Wei, K. Slowikowski, [et al.] // *Nat. Immunol. Nature Publishing Group*. – 2019. – Vol. 20. – № 7. – P. 928–942.
195. Macrophage proliferation distinguishes 2 subgroups of knee osteoarthritis patients / M.J. Wood, A. Leckenby, G. Reynolds, [et al.] // *JCI Insight. American Society for Clinical Investigation*. – 2019. – Vol. 4. – № 2.
196. Steffen, U. How autoantibodies regulate osteoclast induced bone loss in rheumatoid arthritis / U. Steffen, G. Schett, A. Bozec // *Front. Immunol. Frontiers*. – 2019. – Vol. 10.

197. Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse / W. Wiktor-Jedrzejczak, A Bartocci, A.W. Ferrante Jr, [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1990. – Vol. 87. – № 12. – P. 4828–4832.
198. Commitment and differentiation of osteoclast precursor cells by the sequential expression of C-Fms and receptor activator of nuclear factor kb (RANK) receptors / F. Arai, T. Miyamoto, O. Ohneda, [et al.] // *J. Exp. Med.* – 1999. – Vol. 190. – № 12. – P. 1741–1754.
199. Xing, L. Osteoclast fusion and regulation by RANKL-dependent and independent factors / L. Xing, Y. Xiu, B.F. Boyce // *World J. Orthop. Baishideng Publishing Group Inc.* – 2012. – Vol. 3. – № 12. – P. 212–222.
200. Association between knee inflammation and knee pain in patients with knee osteoarthritis: a systematic review / P. Dainese, K.V. Wyngaert, S.D. Mits, [et al.] // *Osteoarthritis Cartilage. Elsevier*. – 2022. – Vol. 30. – № 4. – P. 516–534.
201. The damage-associated molecular patterns (DAMPs) as potential targets to treat osteoarthritis: perspectives from a review of the literature / C. Lambert, J. Zappia, C. Sanchez, [et al.] // *Front. Med. Frontiers*. – 2021. – Vol. 7.
202. Redefining chronic inflammation in aging and age-related diseases: proposal of the senoinflammation concept / H.Y. Chung, D.H. Kim, E.K. Lee, [et al.] // *Aging Dis.* – 2019. – Vol. 10. – № 2. – P. 367–382.
203. Miller, R.E. Osteoarthritis joint pain: the cytokine connection / R.E. Miller, R.J. Miller, A.-M. Malfait // *Cytokine*. – 2014. – Vol. 70. – № 2. – P. 185–193.
204. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): from basic to advanced approaches / J.A. Welsh, D.C.I. Goberdhan, L. O'Driscoll, [et al.]. *J. Extracell. Vesicles*. – 2024. – Vol. 13. – № 2. – P. e12404.
205. Ciferri, M.C. Extracellular vesicles as biomarkers and therapeutic tools: from pre-clinical to clinical applications / M.C. Ciferri, R. Quarto, R. Tasso // *Biology. Multidisciplinary Digital Publishing Institute*. – 2021. – Vol. 10. – № 5. – P. 359.

206. Extracellular vesicles as potential biomarkers and therapeutic approaches in autoimmune diseases / K. Xu, Q. Liu, K. Wu, [et al.] // J. Transl. Med. – 2020. – Vol. 18. – № 1. – P. 432.
207. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in skin wound healing: roles, opportunities and challenges / J.-Y. Ding, M.-J. Chen, L.-F. Wu [et al.] // Mil. Med. Res. – 2023. – Vol. 10. – № 1. – P. 36.
208. Mesenchymal stem cell-derived exosomes and other extracellular vesicles as new remedies in the therapy of inflammatory diseases / C.R. Harrell, N. Jovicic, V. Djonov, [et al.] // Cells. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. – 2019. – Vol. 8. – № 12. – P. 1605.
209. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles as therapeutics and as a drug delivery platform / G. Baek, H. Choi, Y. Kim, [et al.] // Stem Cells Transl. Med. – 2019. – Vol. 8. – № 9. – P. 880–886.
210. Bioengineered extracellular vesicle-loaded bioscaffolds for therapeutic applications in regenerative medicine / S. Lazar, S. Mor, J. Chen, [et al.] // Extracell. Vesicles Circ. Nucleic Acids. OAE Publishing Inc. – 2021. – Vol. 2. – № 2. – P. 175–178.
211. Kalluri, R. The biology and function of exosomes in cancer / R. Kalluri // J. Clin. Invest. American Society for Clinical Investigation. – 2016. – Vol. 126. – № 4. – P. 1208–1215.
212. Extracellular vesicle heterogeneity: subpopulations, isolation techniques, and diverse functions in cancer progression / E. Willms, C. Cabañas, I. Mäger, [et al.] // Front. Immunol. Frontiers. – 2018. – Vol. 9.
213. Hessvik, N.P. Current knowledge on exosome biogenesis and release / N.P. Hessvik, A. Llorente // Cell. Mol. Life Sci. – 2018. – Vol. 75. – № 2. – P. 193–208.
214. Ohno, S. Roles of exosomes and microvesicles in disease pathogenesis / S. Ohno, A. Ishikawa, M. Kuroda // Adv. Drug Deliv. Rev. – 2013. – Vol. 65. – № 3. – P. 398–401.

215. The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis / G. van Niel, S. Charrin, S. Simoes, [et al.] // *Dev. Cell. Elsevier*. – 2011. – Vol. 21. – № 4. – P. 708–721.
216. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies / J.C. Akers, D. Gonda, R. Kim, [et al.] // *J. Neurooncol.* – 2013. – Vol. 113. – № 1. – P. 1–11.
217. How do mesenchymal stem cells influence or are influenced by microenvironment through extracellular vesicles communication? / G. Dostert, B. Mesure, P. Menu, [et al.] // *Front. Cell Dev. Biol.* – 2017. – Vol. 5. – P. 6.
218. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles / E. van der Pol, A.N. Böing, P. Harrison, [et al.] // *Pharmacol. Rev. Elsevier*. – 2012. – Vol. 64. – № 3. – P. 676–705.
219. Pegtel, D.M. Exosomes / D.M. Pegtel, S.J. Gould // *Annu. Rev. Biochem. Annual Reviews*. – 2019. – Vol. 88. – P. 487–514.
220. 3D encapsulation and tethering of functionally engineered extracellular vesicles to hydrogels / C.-C. Huang, M. Kang, S. Shirazi, [et al.] // *Acta Biomater.* – 2021. – Vol. 126. – P. 199–210.
221. Engineering bioactive self-healing antibacterial exosomes hydrogel for promoting chronic diabetic wound healing and complete skin regeneration / C. Wang, M. Wang, T. Xu, [et al.] // *Theranostics. Ivyspring International Publisher*. – 2019. – Vol. 9. – № 1. – P. 65–76.
222. Caruso, S. Apoptotic cell-derived extracellular vesicles: more than just debris / S. Caruso, I.K.H. Poon // *Front. Immunol. Frontiers*. – 2018. – Vol. 9.
223. Anderson, H.C. Electron microscopic studies of induced cartilage development and calcification / H.C. Anderson // *J. Cell Biol. The Rockefeller University Press*. – 1967. – Vol. 35. – № 1. – P. 81–101.
224. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells and mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in rheumatoid arthritis / H. Liu, R. Li, T. Liu, [et al.] // *Front. Immunol. Frontiers*. – 2020. – Vol. 11.

225. Bernardo, M.E. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation / M.E. Bernardo, W.E. Fibbe // *Cell Stem Cell*. Elsevier. – 2013. – Vol. 13. – № 4. – P. 392–402.
226. Mesenchymal stem cells: identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro-engineering of their niche / J. Kobolak, A. Dinnyes, A. Memic, [et al.] // *Methods*. – 2016. – Vol. 99. – P. 62–68.
227. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement / M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller, [et al.] // *Cytotherapy*. Elsevier. – 2006. – Vol. 8. – № 4. – P. 315–317.
228. Adipose-derived mesenchymal stem cells and conditioned medium attenuate the memory retrieval impairment during sepsis in rats / F. Akhondzadeh, M. Kadkhodaei, B. Seifi, [et al.] // *Mol. Neurobiol.* – 2020. – Vol. 57. – № 9. – P. 3633–3645.
229. Comprehensive proteomic analysis of exosomes derived from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord mesenchymal stem cells / Z. Wang, Z.-Y. He, S. Liang, [et al.] // *Stem Cell Res. Ther.* – 2020. – Vol. 11. – № 1. – P. 511.
230. The human arthritic hip joint is a source of mesenchymal stromal cells (MSCs) with extensive multipotent differentiation potential / M. Wagenbrenner, T. Heinz, K. Horas, [et al.] // *BMC Musculoskelet. Disord.* – 2020. – Vol. 21. – № 1. – P. 297.
231. Soluble factors on stage to direct mesenchymal stem cells fate / C. Sobacchi, E. Palagano, A. Villa, [et al.] // *Front. Bioeng. Biotechnol. Frontiers*. – 2017. – Vol. 5.
232. A significant decrease of BAFF, APRIL, and BAFF receptors following mesenchymal stem cell transplantation in patients with refractory rheumatoid arthritis / A. Gowhari Shabgah, Z. Shariati-Sarabi, J. Tavakkol-Afshari, [et al.] // *Gene*. – 2020. – Vol. 732. – P. 144336.
233. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells / Z. Selmani, A. Naji, I. Zidi, [et al.] // *Stem Cells*. Oxford Academic. – 2008. – Vol. 26. – № 1. – P. 212–222.

234. Surface expression of HLA-G is involved in mediating immunomodulatory effects of placenta-derived multipotent cells (PDMCs) towards natural killer lymphocytes / K.-J. Liu, C.-J. Wang, C.-J. Chang, [et al.] // *Cell Transplant.* – 2011. – Vol. 20. – № 11–12. – P. 1721–1730.
235. Obesity-associated metabolic syndrome spontaneously induces infiltration of pro-inflammatory macrophage in synovium and promotes osteoarthritis / A.R. Sun, S.K. Panchal, T. Friis, [et al.] // *PLOS ONE. Public Library of Science.* – 2017. – Vol. 12. – № 8. – P. e0183693.
236. Weyand, C.M. The immunology of rheumatoid arthritis / C.M. Weyand, J.J. Goronzy // *Nat. Immunol.* Nature Publishing Group. – 2021. – Vol. 22. – № 1. – P. 10–18.
237. Apoptotic mesenchymal stromal cells induce prostaglandin E2 in monocytes: implications for the monitoring of mesenchymal stromal cell activity / T.S. Cheung, A. Galleu, M. von Bonin, [et al.] // *Haematologica.* – 2019. – Vol. 104. – № 10. – P. e438–e441.
238. Imbalance of M1/M2 macrophages is linked to severity level of knee osteoarthritis / B. Liu, M. Zhang, J. Zhao, [et al.] // *Exp. Ther. Med.* Spandidos Publications. – 2018. – Vol. 16. – № 6. – P. 5009–5014.
239. Indoleamine 2,3-dioxygenase mediates inhibition of virus-specific CD8⁺ T cell proliferation by human mesenchymal stromal cells / J. Hong, A. Hueckelhoven, L. Wang, [et al.] // *Cytotherapy.* Elsevier. – 2016. – Vol. 18. – № 5. – P. 621–629.
240. Treatment efficacy of adipose-derived stem cells in experimental osteoarthritis is driven by high synovial activation and reflected by S100A8/A9 serum levels / R.F. Schelbergen, S. van Dalen, M. ter Huurne, [et al.] // *Osteoarthritis Cartilage.* Elsevier. – 2014. – Vol. 22. – № 8. – P. 1158–1166.
241. Mesenchymal stem cells: a friend or foe in immune-mediated diseases / M. Gazdic, V. Volarevic, N. Arsenijevic, [et al.] // *Stem Cell Rev. Rep.* – 2015. – Vol. 11. – № 2. – P. 280–287.

242. Extracellular vesicles as drug delivery systems: why and how? / O.M. Elsharkasy, J.Z. Nordin, D.W. Hagey, [et al.] // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2020. – Vol. 159. – P. 332–343.
243. Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (SafeCell): a systematic review and meta-analysis of clinical trials / M.M. Lalu, L. McIntyre, C. Pugliese, [et al.] // *PLOS ONE. Public Library of Science.* – 2012. – Vol. 7. – № 10. – P. e47559.
244. Yu, B. Exosomes derived from mesenchymal stem cells / B. Yu, X. Zhang, X. Li // *Int. J. Mol. Sci. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.* – 2014. – Vol. 15. – № 3. – P. 4142–4157.
245. Anchor peptide captures, targets, and loads exosomes of diverse origins for diagnostics and therapy / X. Gao, N. Ran, X. Dong, [et al.] // *Sci. Transl. Med. American Association for the Advancement of Science.* – 2018. – Vol. 10. – № 444. – P. eaat0195.
246. Biocompatibility and biodistribution of matrix-bound nanovesicles in vitro and in vivo / R.J. Crum, H. Capella-Monsonís, J. Chang, [et al.] // *Acta Biomater.* – 2023. – Vol. 155. – P. 113–122.
247. Advances in regenerative therapies for inflammatory arthritis: exploring the potential of mesenchymal stem cells and extracellular vesicles / T.O. Klyucherev, M.A. Peshkova, M.D. Yurkanova, [et al.] // *Int. J. Mol. Sci. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.* – 2025. – Vol. 26. – № 12. – P. 5766.
248. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood as sources of cell therapy / H.J. Jin, Y.K. Bae, M. Kim, [et al.] // *Int. J. Mol. Sci. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.* – 2013. – Vol. 14. – № 9. – P. 17986–18001.
249. Minimally manipulated whole human umbilical cord is a rich source of clinical-grade human mesenchymal stromal cells expanded in human platelet lysate / C. Capelli, E. Gotti, M. Morigi, [et al.] // *Cytotherapy. Elsevier.* – 2011. – Vol. 13. – № 7. – P. 786–801.

250. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles as mediators of anti-inflammatory effects: endorsement of macrophage polarization / C. Lo Sicco, D. Reverberi, C. Balbi, [et al.] // *Stem Cells Transl. Med.* – 2017. – Vol. 6. – № 3. – P. 1018–1028.
251. hucMSC derived exosomes promote functional recovery in spinal cord injury mice via attenuating inflammation / G. Sun, G. Li, D. Li, [et al.] // *Mater. Sci. Eng. C.* – 2018. – Vol. 89. – P. 194–204.
252. AMSC-derived exosomes alleviate lipopolysaccharide/d-galactosamine-induced acute liver failure by miR-17-mediated reduction of TXNIP/NLRP3 inflammasome activation in macrophages / Y. Liu, G. Lou, A. Li, [et al.] // *eBioMedicine. Elsevier.* – 2018. – Vol. 36. – P. 140–150.
253. Mitochondrial transfer via tunneling nanotubes is an important mechanism by which mesenchymal stem cells enhance macrophage phagocytosis in the in vitro and in vivo models of ARDS / M.V. Jackson, T.J. Morrison, D.F. Doherty, [et al.] // *Stem Cells.* – 2016. – Vol. 34. – № 8. – P. 2210–2223.
254. Cellular metabolism and macrophage functional polarization / L. Zhu, Q. Zhao, T. Yang, [et al.] // *Int. Rev. Immunol. Taylor & Francis.* – 2015. – Vol. 34. – № 1. – P. 82–100.
255. Planat-Benard, V. MSCs and inflammatory cells crosstalk in regenerative medicine: concerted actions for optimized resolution driven by energy metabolism / V. Planat-Benard, A. Varin, L. Casteilla // *Front. Immunol. Frontiers.* – 2021. – Vol. 12.
256. Mitochondrial dysfunction prevents repolarization of inflammatory macrophages / J. Van den Bossche, J. Baardman, N.A. Otto, [et al.] // *Cell Rep. Elsevier.* – 2016. – Vol. 17. – № 3. – P. 684–696.
257. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes attenuate LPS-induced ARDS by modulating macrophage polarization through inhibiting glycolysis in macrophages / H. Deng, L. Wu, M. Liu, [et al.] // *Shock.* – 2020. – Vol. 54. – № 6. – P. 828.

258. AdMSC-derived exosomes alleviate acute lung injury via transferring mitochondrial component to improve homeostasis of alveolar macrophages / L. Xia, C. Zhang, N. Lv, [et al.] // *Theranostics*. Ivyspring International Publisher. – 2022. – Vol. 12. – № 6. – P. 2928–2947.
259. Matrix-bound nanovesicle-associated IL-33 supports functional recovery after skeletal muscle injury by initiating a pro-regenerative macrophage phenotypic transition / J.G. Bartolacci, M.N. Behun, J.P. Warunek, [et al.] // *Npj Regen. Med.* Nature Publishing Group. – 2024. – Vol. 9. – № 1. – P. 7.
260. Matrix-bound nanovesicles: the effects of isolation method upon yield, purity, and function / L.M. Quijano, J.D. Naranjo, S.O. El-Mossier, [et al.] // *Tissue Eng. Part C Methods*. Mary Ann Liebert, Inc., publishers. – 2020. – Vol. 26. – № 10. – P. 528–540.
261. Transcriptomic regulation of macrophages by matrix-bound nanovesicle-associated interleukin-33 / M. Cramer, C. Pineda Molina, G. Hussey, [et al.] // *Tissue Eng. Part A*. Mary Ann Liebert, Inc., publishers. – 2022. – Vol. 28. – № 19–20. – P. 867–878.
262. Matrix bound nanovesicle-associated IL-33 activates a pro-remodeling macrophage phenotype via a non-canonical, ST2-independent pathway / G.S. Hussey, J.L. Dziki, Y.C. Lee, [et al.] // *J. Immunol. Regen. Med.* – 2019. – Vol. 3. – P. 26–35.
263. Dual-engineered cartilage-targeting extracellular vesicles derived from mesenchymal stem cells enhance osteoarthritis treatment via miR-223/NLRP3/pyroptosis axis: toward a precision therapy / W. Liu, A. Liu, X. Li, [et al.] // *Bioact. Mater.* – 2023. – Vol. 30. – P. 169–183.
264. Chen, Y. Stem cell senescence: the obstacle of the treatment of degenerative disk disease / Y. Chen, L. Tang // *Curr. Stem Cell Res. Ther.* – Vol. 14. – № 8. – P. 654–668.
265. Mechanical behavior of infrapatellar fat pad of patients affected by osteoarthritis / C.G. Fontanella, E. Belluzzi, A. Pozzuoli, [et al.] // *J. Biomech.* – 2022. – Vol. 131. – P. 110931.

266. Biomechanics of chondrocytes and chondrons in healthy conditions and osteoarthritis: a review of the mechanical characterisations at the microscale / S. Pettenuzzo, A. Arduino, E. Belluzzi, [et al.] // *Biomedicines. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.* – 2023. – Vol. 11. – № 7. – P. 1942.
267. Jiang, Y. Osteoarthritis year in review 2021: biology / Y. Jiang // *Osteoarthritis Cartilage. Elsevier.* – 2022. – Vol. 30. – № 2. – P. 207–215.
268. Mills, C.D. Anatomy of a discovery: M1 and M2 macrophages / C.D. Mills // *Front. Immunol. Frontiers.* – 2015. – Vol. 6.
269. Stem cell-derived extracellular vesicles and immune-modulation / J. Burrello, S. Monticone, C. Gai, [et al.] // *Front. Cell Dev. Biol. Frontiers.* – 2016. – Vol. 4.
270. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes protect cartilage damage and relieve knee osteoarthritis pain in a rat model of osteoarthritis / L. He, T. He, J. Xing, [et al.] // *Stem Cell Res. Ther.* – 2020. – Vol. 11. – № 1. – P. 276.
271. Mesenchymal stem cells derived exosomes and microparticles protect cartilage and bone from degradation in osteoarthritis / S. Cosenza, T. He, J. Xing, [et al.] // *Sci. Rep. Nature Publishing Group.* – 2017. – Vol. 7. – № 1. – P. 16214.
272. Extracellular vesicles derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate osteoarthritis of the knee in mice model by interacting with METTL3 to reduce m6A of NLRP3 in macrophage / H. Zhou, X. Shen, C. Yan, [et al.] // *Stem Cell Res. Ther.* – 2022. – Vol. 13. – № 1. – P. 322.
273. Amniotic membrane-mesenchymal stromal cells secreted factors and extracellular vesicle-miRNAs: anti-inflammatory and regenerative features for musculoskeletal tissues / E. Ragni, A. Papait, C.P. Orfei, [et al.] // *Stem Cells Transl. Med.* – 2021. – Vol. 10. – № 7. – P. 1044–1062.
274. Pro inflammatory stimuli enhance the immunosuppressive functions of adipose mesenchymal stem cells-derived exosomes / R. Domenis, A. Cifù, S. Quaglia, [et al.] // *Sci. Rep. Nature Publishing Group.* – 2018. – Vol. 8. – № 1. – P. 13325.

275. Small extracellular vesicles from adipose derived stromal cells significantly attenuate in vitro the NF- κ B dependent inflammatory/catabolic environment of osteoarthritis / C. Cavallo, G. Merli, N. Zini, [et al.] // *Sci. Rep.* Nature Publishing Group. – 2021. – Vol. 11. – № 1. – P. 1053.
276. Inhibition of interleukin-1-stimulated MAP kinases, activating protein-1 (AP-1) and nuclear factor kappa B (NF- κ B) transcription factors down-regulates matrix metalloproteinase gene expression in articular chondrocytes / A. Liacini, J. Sylvester, W.Q. Li, [et al.] // *Matrix Biol.* – 2002. – Vol. 21. – № 3. – P. 251–262.
277. Fang, Z. GSEAPy: a comprehensive package for performing gene set enrichment analysis in Python / Z. Fang, X. Liu, G. Peltz // *Bioinformatics.* – 2023. – Vol. 39. – № 1. – P. btac757.
278. Extracellular vesicles derived from three-dimensional-cultured human umbilical cord blood mesenchymal stem cells prevent inflammation and dedifferentiation in pancreatic islets / E. Lee, S. Ha, G. Kim, [et al.] // *Stem Cells Int.* John Wiley & Sons, Ltd. – 2023. – P. 5475212.
279. A guiding map for inflammation / M.G. Netea, F. Balkwill, M. Chonchol, [et al.] // *Nat. Immunol.* Nature Publishing Group. – 2017. – Vol. 18. – № 8. – P. 826–831.
280. Macrophage plasticity in reproduction and environmental influences on their function / M. Chambers, A. Rees, J.G. Cronin, [et al.] // *Front. Immunol.* Frontiers. – 2021. – Vol. 11.
281. Origin, fate and dynamics of macrophages at central nervous system interfaces / T. Goldmann, P. Wieghofer, M.J. Jordão, [et al.] // *Nat. Immunol.* Nature Publishing Group. – 2016. – Vol. 17. – № 7. – P. 797–805.
282. Chanput, W. THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach / W. Chanput, J.J. Mes, H.J. Wichers // *Int. Immunopharmacol.* – 2014. – Vol. 23. – № 1. – P. 37–45.
283. Distinct redox signalling following macrophage activation influences profibrotic activity / C.V. Lewis, A. Vinh, H. Diep, [et al.] // *J. Immunol. Res.* John Wiley & Sons, Ltd. – 2019. – P. 1278301.

284. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages / M. Daigneault, J.A. Preston, H.M. Marriott, [et al.] // PLOS ONE. Public Library of Science. – 2010. – Vol. 5. – № 1. – P. e8668.
285. Human serous cavity macrophages and dendritic cells possess counterparts in the mouse with a distinct distribution between species / J. Han, A. Gallerand, E.C. Erlich, [et al.] // Nat. Immunol. Nature Publishing Group. – 2024. – Vol. 25. – № 1. – P. 155–165.
286. Cell size of alveolar macrophages: an interspecies comparison / F. Krombach, S. Münzing, A.M. Allmeling, [et al.] // Environ. Health Perspect. Environmental Health Perspectives. – 1997. – Vol. 105. – № Suppl 5. – P. 1261–1263.
287. Human and murine macrophages exhibit differential metabolic responses to lipopolysaccharide – a divergent role for glycolysis / V. Vijayan, P. Pradhan, L. Braud, [et al.] // Redox Biol. – 2019. – Vol. 22. – P. 101147.
288. Nitric oxide synthase is not a constituent of the antimicrobial armature of human mononuclear phagocytes / M. Schneemann, G. Schoedon, S. Hofer, [et al.] // J. Infect. Dis. – 1993. – Vol. 167. – № 6. – P. 1358–1363.
289. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines / P.J. Murray, J.E. Allen, S.K. Biswas, [et al.] // Immunity. Elsevier. – 2014. – Vol. 41. – № 1. – P. 14–20.
290. Defining GM-CSF- and macrophage-CSF-dependent macrophage responses by in vitro models / D.C. Lacey, A. Achuthan, A.J. Fleetwood, [et al.] // J. Immunol. – 2012. – Vol. 188. – № 11. – P. 5752–5765.
291. Subsets of human type 2 macrophages show differential capacity to produce reactive oxygen species / M.D. Kraaij, K.M. Koekkoek, S.W. van der Kooij, [et al.] // Cell. Immunol. – 2013. – Vol. 284. – № 1. – P. 1–8.
292. Keshtkar, S. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: novel frontiers in regenerative medicine / S. Keshtkar, N. Azarpira, M.H. Ghahremani // Stem Cell Res. Ther. – 2018. – Vol. 9. – № 1. – P. 63.

293. Che, Z. Extracellular vesicles in the mesenchymal stem cell/macrophage axis: potential targets for inflammatory treatment / Z. Che, W. Yan, Q. Zhao // *Int. J. Mol. Sci. Multidisciplinary Digital Publishing Institute*. – 2025. – Vol. 26. – № 6. – P. 2827.
294. Exosome-shuttled miR-216a-5p from hypoxic preconditioned mesenchymal stem cells repair traumatic spinal cord injury by shifting microglial M1/M2 polarization / W. Liu, Y. Rong, J. Wang, [et al.] // *J. Neuroinflammation*. – 2020. – Vol. 17. – № 1. – P. 47.
295. Yan, L. Exosomes produced from 3D cultures of umbilical cord mesenchymal stem cells in a hollow-fiber bioreactor show improved osteochondral regeneration activity / L. Yan, X. Wu // *Cell Biol. Toxicol.* – 2020. – Vol. 36. – № 2. – P. 165–178.
296. Comprehensive molecular profiles of functionally effective MSC-derived extracellular vesicles in immunomodulation / H. Kim, M.J. Lee, E.-H. Bae, [et al.] // *Mol. Ther. Elsevier*. – 2020. – Vol. 28. – № 7. – P. 1628–1644.
297. Effect of 2D and 3D culture microenvironments on mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles potencies / G.D. Kusuma, A. Li, D. Zhu, [et al.] // *Front. Cell Dev. Biol. Frontiers*. – 2022. – Vol. 10.
298. Mesenchymal stromal cell-derived exosomes attenuate myocardial ischaemia-reperfusion injury through miR-182-regulated macrophage polarization / J. Zhao, X. Li, J. Hu, [et al.] // *Cardiovasc. Res.* – 2019. – Vol. 115. – № 7. – P. 1205–1216.
299. Herb, M. Functions of ROS in macrophages and antimicrobial immunity / M. Herb, M. Schramm // *Antioxidants. Multidisciplinary Digital Publishing Institute*. – 2021. – Vol. 10. – № 2. – P. 313.
300. Reactive oxygen species in macrophages: sources and targets / M. Canton, R. Sánchez-Rodríguez, I. Spera, [et al.] // *Front. Immunol. Frontiers*. – 2021. – Vol. 12.
301. ROS play a critical role in the differentiation of alternatively activated macrophages and the occurrence of tumor-associated macrophages / Y. Zhang, S. Choksi, K. Chen, [et al.] // *Cell Res. Nature Publishing Group*. – 2013. – Vol. 23. – № 7. – P. 898–914.

302. Scavenging reactive oxygen species selectively inhibits M2 macrophage polarization and their pro-tumorigenic function in part, via Stat3 suppression / B. Griess, S. Mir, K. Datta, [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2020. – Vol. 147. – P. 48–60.
303. Rapid neuroinflammatory response localized to injured neurons after diffuse traumatic brain injury in swine / K.L. Wofford, J.P. Harris, K.D. Browne, [et al.] // *Exp. Neurol.* – 2017. – Vol. 290. – P. 85–94.
304. Microglial/macrophage polarization dynamics following traumatic brain injury / A. Kumar, D.-M. Alvarez-Croda, B.A. Stoica, [et al.] // *J. Neurotrauma*. Mary Ann Liebert, Inc., publishers. – 2016. – Vol. 33. – № 19. – P. 1732–1750.
305. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases are everywhere in brain disease, but not in Huntington's disease? / L. Villegas, A. Nørremølle, K. Freude, [et al.] // *Front. Aging Neurosci. Frontiers*. – 2021. – Vol. 13.
306. Unprimed, M1 and M2 macrophages differentially interact with *Porphyromonas gingivalis* / R.S. Lam, N.M. O'Brien-Simpson, J.A. Holden, [et al.] // *PLOS ONE*. Public Library of Science. – 2016. – Vol. 11. – № 7. – P. e0158629.
307. In-depth characterization of monocyte-derived macrophages using a mass cytometry-based phagocytosis assay / D. Schulz, Y. Severin, V.R.T. Zanutelli, [et al.] // *Sci. Rep.* Nature Publishing Group. – 2019. – Vol. 9. – № 1. – P. 1925.
308. Alternative activation of macrophages by IL-4 impairs phagocytosis of pathogens but potentiates microbial-induced signalling and cytokine secretion / A. Varin, S. Mukhopadhyay, G. Herbein, [et al.] // *Blood*. – 2010. – Vol. 115. – № 2. – P. 353–362.
309. Impact of neonatal malnutrition on expression TLR-9, NF-kB and cytokines of macrophages infected in vitro with methicillin resistant *Staphylococcus aureus* / N.G. de Moraes, T.B. da Costa, L.F.F. de Lima, [et al.] // *Microb. Pathog.* – 2019. – Vol. 132. – P. 254–260.
310. The myeloid transcription factor KLF2 regulates the host response to polymicrobial infection and endotoxic shock / G.H. Mahabeleshwar, D. Kawanami, N. Sharma, [et al.] // *Immunity*. Elsevier. – 2011. – Vol. 34. – № 5. – P. 715–728.

311. Scalable ultra-high-throughput single-cell chromatin and RNA sequencing reveals gene regulatory dynamics linking macrophage polarization to autoimmune disease / S. Lobato-Moreno, U. Yildiz, A. Claringbould, [et al.] // bioRxiv. – 2023. – P. 2023.12.26.573253.
312. The role and mechanisms of mesenchymal stem cells regulating macrophage plasticity in spinal cord injury / S.-P. Fu, X.-C. Wu, R.-L. Yan, [et al.] // Biomed. Pharmacother. – 2023. – Vol. 168. – P. 115632.
313. Basal and IL-1 β enhanced chondrocyte chemotactic activity on monocytes are co-dependent on both IKK α and IKK β NF- κ B activating kinases / E. Olivotto, M. Minguzzi, S. D'Adamo, [et al.] // Sci. Rep. Nature Publishing Group. – 2021. – Vol. 11. – № 1. – P. 21697.
314. The corpus adiposum infrapatellare (Hoffa's fat pad) – the role of the infrapatellar fat pad in osteoarthritis pathogenesis / S. Braun, F. Zaucke, M. Brenneis, [et al.] // Biomedicines. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. – 2022. – Vol. 10. – № 5. – P. 1071.
315. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles for osteoarthritis treatment: extracellular matrix protection, chondrocyte and osteocyte physiology, pain and inflammation management / T.H. Nguyen, C.M. Duong, X.-H. Nguyen, [et al.] // Cells. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. – 2021. – Vol. 10. – № 11. – P. 2887.
316. Exosome-encapsulated microRNA-127-3p released from bone marrow-derived mesenchymal stem cells alleviates osteoarthritis through regulating CDH11-mediated Wnt/ β -catenin pathway / J. Dong, L. Li, X. Fang, [et al.] // J. Pain Res. – 2021. – Vol. 14. – P. 297–310.
317. hBMSC-derived extracellular vesicles attenuate IL-1 β -induced catabolic effects on OA-chondrocytes by regulating pro-inflammatory signaling pathways / S. Li, S. Stöckl, C. Lukas, [et al.] // Front. Bioeng. Biotechnol. – 2020. – Vol. 8. – P. 603598.
318. Exercise induced meteorin-like protects chondrocytes against inflammation and pyroptosis in osteoarthritis by inhibiting PI3K/Akt/NF- κ B and NLRP3/caspase-1/GSDMD signaling / J. Liu, S. Jia, Y. Yang, [et al.] // Biomed. Pharmacother. – 2023. – Vol. 158. – P. 114118.

319. Wang, R. TGF- β 1-modified MSC-derived exosomal miR-135b attenuates cartilage injury via promoting M2 synovial macrophage polarization by targeting MAPK6 / R. Wang, B. Xu // Cell Tissue Res. – 2021. – Vol. 384. – № 1. – P. 113–127.