

*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

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2026

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

**Научные руководители:**

доктор химических наук, профессор  
кандидат физико-математических наук

**Тимашев Петр Сергеевич**  
**Власова Ирина Ивановна**

**Официальные оппоненты:**

**Чевкина Елена Максимовна** – доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение Министерства здравоохранения Российской Федерации «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина», Научно-исследовательский институт канцерогенеза, лаборатория регуляции клеточных и вирусных онкогенов, заведующий лабораторией

**Шеваль Евгений Валерьевич** – доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, лаборатория ультраструктуры клеточного ядра, заведующий лабораторией

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»

Защита диссертации состоится «27» февраля 2026 года в 12:00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.003.03 при ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (119034, г. Москва, Zubovskiy bulvar, d. 37/1) и на сайте организации: <https://www.sechenov.ru/>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2026 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета ДСУ 208.003.03  
кандидат биологических наук, доцент

**Шпичка Анастасия Иосифовна**

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **Актуальность темы исследования**

Воспаление играет ключевую роль в патогенезе множества заболеваний, включая аутоиммунные, нейродегенеративные, онкологические, сахарный диабет и остеоартрит (ОА) [Yamout, Alroughani, 2018]. Несмотря на прогресс в изучении молекулярных механизмов этих патологий, фармакотерапия часто сопровождается ограниченной эффективностью и серьёзными побочными эффектами [Wilke et al., 2017]. В частности, при ОА – прогрессирующем воспалительно-дегенеративном заболевании суставов – отмечается рост заболеваемости, которое затрагивает до 7% населения [Perruccio et al., 2024].

Основной терапевтический эффект мезенхимных стромальных клеток (МСК) обусловлен их паракринной активностью – секрецией биологически активных факторов, включая внеклеточные везикулы (ВВ) [Marote et al., 2016]. К ним относятся жидкофазные ВВ: экзосомы (30–150 нм), микровезикулы (100–1000 нм), апоптотические тела и матрикс-связанные везикулы (МСВ), недавно описанная субпопуляция (ВВ) [Huleihel et al., 2016; Sheta et al., 2023]. Переноса цитокины, микроРНК и факторы роста, ВВ регулируют в клетках экспрессию генов и белков, вовлечённых в воспаление и регенерацию тканей, что делает их перспективными агентами терапии хронических воспалительных состояний [Chen et al., 2016].

Экзосомы и МСВ потенциально рассматриваются как эффективная альтернатива клеточной терапии при дегенеративных заболеваниях [Piening, Wachs, 2023]. Особый интерес представляют исследования, посвящённые влиянию ВВ на макрофаги – ключевые клетки врождённого иммунитета, обеспечивающие фагоцитоз, регенерацию и ремоделирование тканей [Capella-Monsonís et al., 2025; Arabpour et al., 2021]. ВВ из МСК модулируют внутриклеточные сигнальные каскады, способствуя М2-поляризации макрофагов, снижению воспаления и восстановлению повреждённых структур [Nakao et al., 2021]. Благодаря высокой биологической активности и безопасности, ВВ из МСК рассматриваются как перспективный терапевтический инструмент с низким риском побочных эффектов [Chen et al., 2016].

### **Степень разработанности темы исследования**

Ряд исследований демонстрирует, что ВВ МСК способны индуцировать переход макрофагов из провоспалительного М1-фенотипа в противовоспалительный М2, что способствует регенерации тканей, включая суставной хрящ при ОА. МСВ, обнаруженные в различных тканях, обладают уникальным молекулярным составом, влияют на поляризацию макрофагов и проявляют терапевтический потенциал, снижая нейродегенерацию, ослабляя воспаление и стимулируя регенерацию при ревматоидном артрите. Биологический эффект ВВ реализуется через доставку в клетки-мишени функционально активных молекул – микроРНК, белков и липидов, способных модулировать сигнальные пути. В частности, перенос микроРНК

на макрофаги активирует молекулярные каскады, направленные на перепрограммирование их в M2-фенотип, что сопровождается подавлением воспаления и стимуляцией восстановительных процессов.

Большинство данных о молекулярных механизмах действия ВВ на макрофаги получены в исследованиях на модельных клеточных линиях, таких как RAW 264.7 (мышь) и THP-1 (человек). Однако эти линии существенно отличаются от первичных человеческих макрофагов по транскриптному профилю, фенотипу и функциональной активности, что снижает универсальность результатов. Более того, большинство работ фокусируется на экспрессии маркеров M1/M2 и активации сигнальных путей (например, signal transducer and activator of transcription (STAT)3, PI3K/Akt), при этом недостаточное внимание уделяется функциональным параметрам макрофагов – продукции АФК и фагоцитарной активности.

На сегодняшний день отсутствуют исследования, оценивающие влияние малых ВВ из секрета МСК и МСВ, полученных из МСК, на функциональные свойства макрофагов человека, включая фагоцитоз и генерацию АФК. При этом МСВ преимущественно выделяются из внеклеточного матрикса слизистых оболочек животных, тогда как потенциал везикул, извлечённых из внеклеточного матрикса культур МСК, изучен недостаточно. Также отсутствуют прямые сравнительные исследования терапевтического потенциала жидкофазных ВВ и МСВ при ОА. Сравнительный анализ влияния различных типов ВВ на фагоцитоз, поляризацию и молекулярные механизмы регуляции активности макрофагов представляет собой перспективное направление. Углублённое понимание этих процессов может способствовать созданию новых, более безопасных и эффективных подходов к терапии хронических воспалительных и дегенеративных заболеваний, включая ОА.

### **Цели и задачи исследования**

Цель: установить регуляторный потенциал матрикс-связанных везикул и внеклеточных везикул, выделенных из кондиционированной среды мезенхимных стромальных клеток, в отношении функциональной активности макрофагов, экспрессии генов и белков, связанных с провоспалительной активацией макрофагов, и в модуляции воспалительного процесса на животной модели остеоартрита.

Задачи:

1. Провести сравнительный анализ протеомного профиля внеклеточных везикул, выделенных из внеклеточного матрикса и кондиционированной среды МСК основного вещества пупочного канатика (МСК-ПК) человека;

2. Установить эффекты внеклеточных везикул, выделенных из внеклеточного матрикса и кондиционированной среды МСК, на изменение функциональной активности макрофагов человека;

3. Установить механизмы влияния ВВ МСК-ПК на регуляцию фенотипической пластичности макрофагов;

4. Сравнить терапевтический потенциал внеклеточных везикул, выделенных из внеклеточного матрикса и кондиционированной среды МСК-ПК человека, в управлении воспалительным процессом на животной модели ОА.

### **Научная новизна**

В рамках проведённого исследования была изучена способность МСВ и внеклеточных везикул, выделенных из кондиционированной среды (ВВ/КС) МСК, модулировать функциональную активность макрофагов человека, полученных из моноцитов периферической крови. Проводилась оценка таких параметров, как фагоцитарная активность, продукция АФК и уровень экспрессии НАДФН-оксидазы 2, воспалительных цитокинов, поверхностных рецепторов. В рамках исследования по характеристике состава двух субпопуляций ВВ был впервые проведен протеомный анализ МСВ и ВВ/КС, полученных из МСК основного вещества пупочного канатика (МСК-ПК) продемонстрировал выраженные различия в протеомном профиле между двумя типами ВВ. МСВ содержали повышенное количество белков, регулирующих клеточную миграцию, регенерацию ран, а для ВВ/КС было установлено повышенное содержание белков, регулирующих иммунный ответ и биосинтез внеклеточного матрикса. Впервые было проведено исследование влияния МСВ и ВВ/КС, выделенных из МСК-ПК, на поляризацию макрофагов по M1-фенотипу. Установлено, что МСВ обладают более выраженным иммуносупрессивным эффектом, по сравнению с ВВ/КС, снижая экспрессию ключевых компонентов сигнального каскада Janus kinase (JAK)/STAT1, включая STAT1, STAT2 и interferon regulatory factor (IRF)9. В условиях экспериментальной модели ОА крыс, индуцированного менискэктомией, показано, что однократное внутрисуставное введение МСВ и ВВ/КС оказывает выраженное противовоспалительное действие в тканях коленного сустава спустя 21 день после инъекции.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Полученные в ходе исследования данные расширяют представления о влиянии ВВ/КС и МСВ, полученных из МСК-ПК, на фенотипическую пластичность и функциональную активность макрофагов человека. При изучении иммуномодулирующих свойств ВВ в отношении макрофагов, дифференцированных из моноцитов периферической крови, было выявлено ингибирующее действие как ВВ/КС, так и МСВ на экспрессию генов и белков, ассоциированных с провоспалительной поляризацией макрофагов. Впервые установлены молекулярные различия между двумя типами везикул в контексте регуляции активации макрофагов за счёт модуляции экспрессии компонентов сигнального пути JAK/STAT1.

Для исследования иммуномодулирующих эффектов ВВ на развитие воспаления при

остеоартрите была использована модель ОА у крыс, созданная методом менискэктомии. Инъекции ВВ/КС и МСВ, полученных из МСК-ПК, оказали выраженное противовоспалительное действие в тканях коленного сустава, подтвердив иммуномодулирующие свойства обоих типов ВВ. Полученные результаты могут послужить основой для разработки новых терапевтических стратегий, использующих ВВ из МСК при лечении ОА и других патологий, ассоциированных с хроническим воспалением. МСВ и ВВ/КС из МСК-ПК рассматриваются как перспективная платформа для управления воспалительными процессами за счёт регуляции фенотипа макрофагов и индукции противовоспалительного иммунного ответа, способствующего ослаблению деструктивных процессов в поврежденных органах и тканях.

### **Методология и методы исследования**

Методическую основу диссертационной работы составили методы динамического светорассеяния, просвечивающей электронной и конфокальной микроскопии, проточной цитометрии, вестерн-блоттинга и высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС). Эти подходы применялись для анализа свойств ВВ и МСК. В ходе работы были охарактеризованы иммунофенотипические маркеры МСК, морфология и размеры ВВ, а также их протеомный профиль. Для оценки влияния ВВ на функциональную активность макрофагов и регуляцию экспрессии генов и белков, ассоциированных с провоспалительной поляризацией, использовались иммуноферментный анализ (ИФА), количественная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (кПЦР-ОТ), проточная цитометрия, вестерн-блоттинг и люминол-зависимая хемилюминесценция. Иммуномодулирующие эффекты ВВ при ОА исследовались на модели ОА у крыс, индуцированной методом менискэктомии. Инъекции ВВ проводились на 21-й день после индукции заболевания, после чего, спустя ещё 21 день, проводилась эвтаназия животных, подготовка тканей для получения гистологических препаратов для иммуногистохимического окрашивания и *in situ* ПЦР. Полученные данные были проанализированы с использованием методов статистической обработки.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. МСВ и ВВ/КС, полученные из МСК пупочного канатика (МСК-ПК) человека, обладают качественными и количественными различиями в белковом составе. МСВ обогащены белками, регулирующими процессы фагоцитоза, эндоцитоза, активации иммунных клеток. ВВ/КС содержат в своем составе белки, стимулирующие синтез внеклеточного матрикса (ВКМ), коллагеновых фибрилл, биосинтез макромолекул.

2. ВВ/КС и МСВ, секретлируемые МСК-ПК человека, оказывают противовоспалительный эффект на М1 макрофаги, изменяя молекулярные медиаторы, которые влияют на окружение клеток: ВВ ослабляют экспрессию мРНК и секрецию воспалительных цитокинов, продукцию

АФК и усиливают экспрессию маркеров M2 поляризации; кроме того ВВ увеличивают способность провоспалительных 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.

#### **Личный вклад автора**

Научные результаты, обобщенные в 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 характеристике внеклеточных везикул, первичных культур мультипотентных мезенхимных стромальных клеток, макрофагов человека, дифференцированных из моноцитов. Автором был проведен анализ влияния внеклеточных везикул на секреторную активность макрофагов и их фенотипическую пластичность с помощью ИФА, кПЦР-ОТ, вестерн-блоттинга, иммуноцитохимического окрашивания, проточной цитометрии, анализ фагоцитоза проведен с помощью проточной цитометрии, анализ радикал-генерирующей активности - с помощью люминол-зависимой хемилюминесценции, иммуногистохимический анализ был использован в работе с тканями животных. Автор самостоятельно планировал и проводил эксперименты, проводил статистическую обработку данных, анализировал и интерпретировал результаты, изучал и обобщал литературные данные по теме диссертации. Автор представлял полученные результаты исследований на конференциях, осуществлял написание научных публикаций по теме данного исследования.

#### **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. 1.5.22 «Клеточная биология» п. 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. Для *in vitro* тестов объем выборки составлял не менее 3 образцов на экспериментальную группу, количество независимых экспериментов для измерения каждого параметра не менее 3. 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 составлял 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».

Материалы исследования были доложены на ряде российских и международных конференций, включая форум «Наука будущего – наука молодых» (Орел, 2023), XXIV съезд Российского Физиологического Общества имени И.П. Павлова (Санкт-Петербург, 2023), VI национальный конгресс по регенеративной медицине (Санкт-Петербург, 2024). Результаты диссертационного исследования были опубликованы в зарубежных научных журналах 1-2 квартилей, входящих в базы данных (Scopus, Web of Science).

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.

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 №NЗАФ-2024-0016.

### **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).

### **Объем и структура 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 использованных сокращений и список литературы (319 источников: 319 иностранных).

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы исследования**

В исследовании по анализу влияния ВВ/КС и МСВ на макрофаги были использованы ВВ из МСК-ПК. МСК-ПК были выделены из основного вещества пупочного канатика и были культивированы в стандартных условиях. Для анализа иммунного фенотипа использовались МСК-ПК 4 пассажа. Анализ иммунного фенотипа МСК-ПК был осуществлен с помощью проточной цитометрии, где была оценена экспрессия положительных маркеров (cluster of differentiation (CD)105, CD73, CD90, CD44, CD29) и отрицательных маркеров (CD19 CD11beta, CD45 и CD34) МСК. Для выделения ВВ/КС и МСВ из МСК-ПК использовались монослойные клеточные культуры после достижения монослоя для лучшего накопления ВКМ. Для выделения ВВ/КС кондиционированную среду отобрали и подвергли серии центрифугирований. Для выделения МСВ клетки 3 раза промыли фосфатно-солевым буфером (PBS) для удаления остатков кондиционированной среды. После чего клетки инкубировали с раствором ферментов коллагеназ I/II и диспазы при 37°C в течение 60 минут для разрушения ВКМ и высвобождения МСВ. Полученную суспензию, содержащую МСВ, подвергли дифференциальному центрифугированию в условиях аналогичных тем, что использовали для получения ВВ/КС, были выбраны следующие параметры: 400g, 2500g, 10000g. После чего супернатант, содержащий МСВ или ВВ/КС, фильтровали через фильтр с диаметром пор 220 нм для удаления частиц более крупного размера и ультрацентрифугировали 2 раза при 120000g в течение 90 минут. ВВ обоих типов растворяли в PBS и хранили при -80°C.

Для дифференцировки ВВ/КС, МСВ был проведен вестерн-блоттинг (ВБ) с целью качественного обнаружения экспрессии в ВВ экзосомальных маркеров, таких как (CD9+, CD63+) Для подтверждения отсутствия контаминантных внутриклеточных белков оба типа ВВ были проанализированы вместе с клеточным лизатом МСК-ПК (клетками-источником данных ВВ) на экспрессию внутриклеточных белков GAPDH-, Calnexin-, негативных маркеров для ВВ. Для визуализации МСВ и ВВ/КС из МСК-ПК везикулы были окрашены с помощью флуоресцентного мембранного красителя PKH26 с последующими ультрацентрифугированием и ультрафильтрацией (с применением Amicon MWCO 10 кДа). После чего образцы, разведенные в PBS, были визуализированы с помощью конфокального микроскопа Olympus FV3000 при увеличении 100x с использованием иммерсии. Морфология МСВ и ВВ/КС анализировалась с

использованием просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) на микроскопе JEM-1011. Средний размер МСВ и ВВ/КС МСК-ПК, определялся методом динамического светорассеяния с использованием прибора Zetasizer Nano ZS.

Протеомный анализ МСВ и ВВ/КС, полученных из МСК-КС, проводился методом ВЭЖХ-МС/МС в технических дубликатах. Образцы ВВ, полученные от трёх доноров и одной смешанной культуры, подвергались стандартной процедуре лизиса, восстановлению дисульфидных связей, алкилированию и осаждению белков, с последующей нормализацией по содержанию белка. Протеолиз проводили трипсином, пептиды очищали и анализировали на масс-спектрометре Q Exactive HF. Сырые данные конвертировали в формат MGF и анализировали с использованием программного обеспечения MASCOT и X! Tandem. Идентификация белков проводилась с применением базы данных UniProt. Контроль достоверности обеспечивался поиском по реверсированной базе данных, с порогом частоты ложный отклонений (FDR) 5%. Обработка и визуализация данных осуществлялась с помощью программного пакета Scaffold 5.

Моноциты, полученные от здоровых доноров, дифференцировали в макрофаги с использованием гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора для получения M0\_ГМ макрофагов и с моноцитарно-макрофагальным-колониестимулирующим для M0\_М макрофагов. На 6 сутки M0\_ГМ макрофаги были поляризованы в M1-фенотип и M0\_М в M2-фенотип с применением липополисахаридов (ЛПС) с интерфероном (ИФН)- $\gamma$  или интерлейкина (Ил)-4 соответственно. Для изучения влияния ВВ на макрофаги клетки инкубировали с ВВ/КС и МСВ из МСК-ПК (100 мкг белка/мл, 48 ч), после чего анализировали секрецию цитокинов и экспрессию генов. Для визуализации фагоцитоза МСВ и ВВ/КС, меченные мембранным красителем PKH26 ВВ вносили в культуру M1-макрофагов (100 мкг белка/мл, 12 ч), фиксировали и анализировали с помощью конфокального микроскопа (Olympus FV3000). Для анализа влияния МСВ и ВВ/КС на экспрессию и секрецию воспалительных цитокинов - фактора некроза опухоли- $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ) и Ил-6 - были проведены ИФА и кПЦР-ОТ (ДТ-Прайм). Контроль за поляризацией макрофагов в различные фенотипы, а также измерение влияния ВВ на экспрессию поверхностных рецепторов осуществлялись с помощью проточной цитометрии, где использовали анти-CD206- PE-Cy7, или антитела против CD86-FITC. Измерения проводили с помощью прибора Sony Biotechnology (версия 1.8) с последующим анализом данных с использованием программы FlowJo (версия 10).

Анализ влияния ВВ на продукцию АФК макрофагами человека был осуществлен с помощью люминол-зависимой хемилюминесценции (ХЛ). Для этой цели макрофаги были удалены с поверхности планшетов с помощью фермента Accutase и ресуспендированы в растворе Кребса-Рингера с  $\text{NaHCO}_3$  и  $\text{CaCl}_2$  (pH 7,4) с добавлением люминола и с последующим

внесением растворов пероксидазы хрена и активатора фагоцитов форбола-12-миристат-13-ацетата (ФМА). Измерение было проведено на хемилюминометре Lum-1200. Влияние ВВ на способность макрофагов к фагоцитозу оценивали после инкубации макрофагов с FITC-мечеными *Escherichia coli*, анализ уровня фагоцитоза проводили на клеточном сортере Sony Biotechnology (версия 1.8).

Для подтверждения эффектов и выяснения механизмов влияния МСВ и ВВ/КС из МСК-ПК на экспрессию воспалительных цитокинов и продукцию АФК у М1 макрофагов, дополнительно были проведены кПЦР-ОТ и ВБ, был выполнен анализ субъединиц НАДФН-оксидазы 2 – NOX2, p67phox, p47phox, а также компонентов сигнального пути JAK/STAT1 (STAT1, STAT2, IRF9). После лизиса клеток выделение образцов РНК было осуществлено на колонках RUplus-250. После чего образцы РНК были очищены от остаточной ДНК с помощью наборы ДНКазы E с последующей очисткой суммарной РНК с помощью набора CleanRNA Standard. Обратная транскрипция была проведена с помощью обратной транскриптазы MMLV. кПЦР проводилась в следующем режиме: начальная денатурация при 95°C в течение 3 минут, затем 40 циклов денатурации при 95 °C в течение 15 секунд, отжига при 60°C в течение 15 секунд и элонгации при 70°C в течение 20 секунд. Относительная экспрессия генов анализировалась с помощью метода  $\Delta\Delta C_t$ , нормализованного по глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназе (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). С помощью ВБ была проведена оценка экспрессии GAPDH, p67phox, p47phox, IRF9, STAT1, STAT2 и их фосфорилированных форм. В качестве вторичных антител были использованы антитела с пероксидазой хрена, проявление полос ВБ было осуществлено с помощью набора ECL с применением системы визуализации iBright CL1500. Количественный анализ результатов осуществлялся с помощью программы iBright-Analysis-Software с нормированием на GAPDH.

Для *in vivo* исследования влияния МСВ и ВВ/КС из МСК-ПК на воспалительный процесс при ОА у лабораторных крыс (n=18) был индуцирован ОА посредством менискэктомии, также в эксперименте участвовала группа здорового контроля без индукции ОА (n=6). На 21-й день после операции животные были случайным образом распределены на три экспериментальные подгруппы, получившие внутрисуставные инъекции: МСВ, ВВ/КС или физиологического раствора (по 6 животных в каждой группе, доза – 20 мкл суспензии ВВ, 300 мкг белка/мл). Через 21 день после инъекций все животные были эвтаназированы, ткани коленного сустава собраны и подвергнуты гистологическому и иммуногистохимическому анализу, где была проведена оценка экспрессии аргиназы-1, ФНО- $\alpha$ , индуцируемой синтазы оксида азота (iNOS). Оценку результатов проводили полуколичественно в пяти полях зрения при увеличении 20 $\times$ .

Статистический анализ экспериментальных данных проводился с помощью программного обеспечения GraphPadPrism 9 для Windows. 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 бокс-плота с указанием медианных значений переменной.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### **Характеристика мезенхимных стромальных клеток и внеклеточных везикул, протеомный анализ внеклеточных везикул**

Результаты иммунофенотипирования МСК-ПК 4 пассажа с помощью проточной цитометрии продемонстрировали экспрессию положительных маркеров МСК (CD44, CD29, CD73, CD105), при этом экспрессия негативных маркеров МСК (CD45, CD34, CD11- $\beta$ , CD19) наблюдалась у менее чем 1% клеток (рис. 1А). МСК имели характерную фибробластоподобную морфологию (рис. 1Б).

Для жидкофазных ВВ из секрета МСК-ПК используется термин внеклеточные везикулы, полученные из кондиционированной среды (ВВ/КС), поскольку при выделении ВВ методом дифференциального ультрацентрифугирования в образцах ВВ/КС могут также присутствовать микровезикулы размером частиц до 200 нм. Согласно рекомендациям MISEV 2023 термин экзосомы можно использовать для названия популяции ВВ, для которых протокол выделения ВВ позволяет получить селективно экзосомы без примесей ВВ других типов. С помощью ВВ было продемонстрировано, ВВ/КС экспрессировали характерные экзосомальные маркеры CD9+, CD63+, при пониженной экспрессии относительно их экспрессии в клетках МСК-ПК отрицательных маркеров для ВВ GAPDH-, Calnexin- (рис. 1В). Перечисленные выше маркеры также не были обнаружены для МСВ (рис. 1В). ВВ/КС и МСВ имели схожую морфологию и размеры, анализ динамического светорассеяния наночастиц показал, что ВВ имели размеры от 30-200 нм со средним размером для ВВ/КС –  $(91,3 \pm 21,7)$  нм и для МСВ –  $(78,8 \pm 22,9)$  нм (среднее  $\pm$  стандартное отклонение) (рис. 1Г) Изображения, полученные с помощью просвечивающей электронной микроскопии показали, что МСВ и ВВ/КС имеют характерную чашеобразную округлую морфологию, с размером частиц 50-200 нм (рис. 1Д). МСВ и ВВ/КС были окрашены мембранным цианиновым красителем RKN26, что доказало наличие у обоих типов ВВ липидного бислоя (рис 1Е). МСВ и ВВ/КС, окрашенные RKN26, подвергались активному фагоцитозу со стороны M1 макрофагов, что было продемонстрировано на микрофотографиях, полученных с помощью конфокальной микроскопии (рис 1Ё).

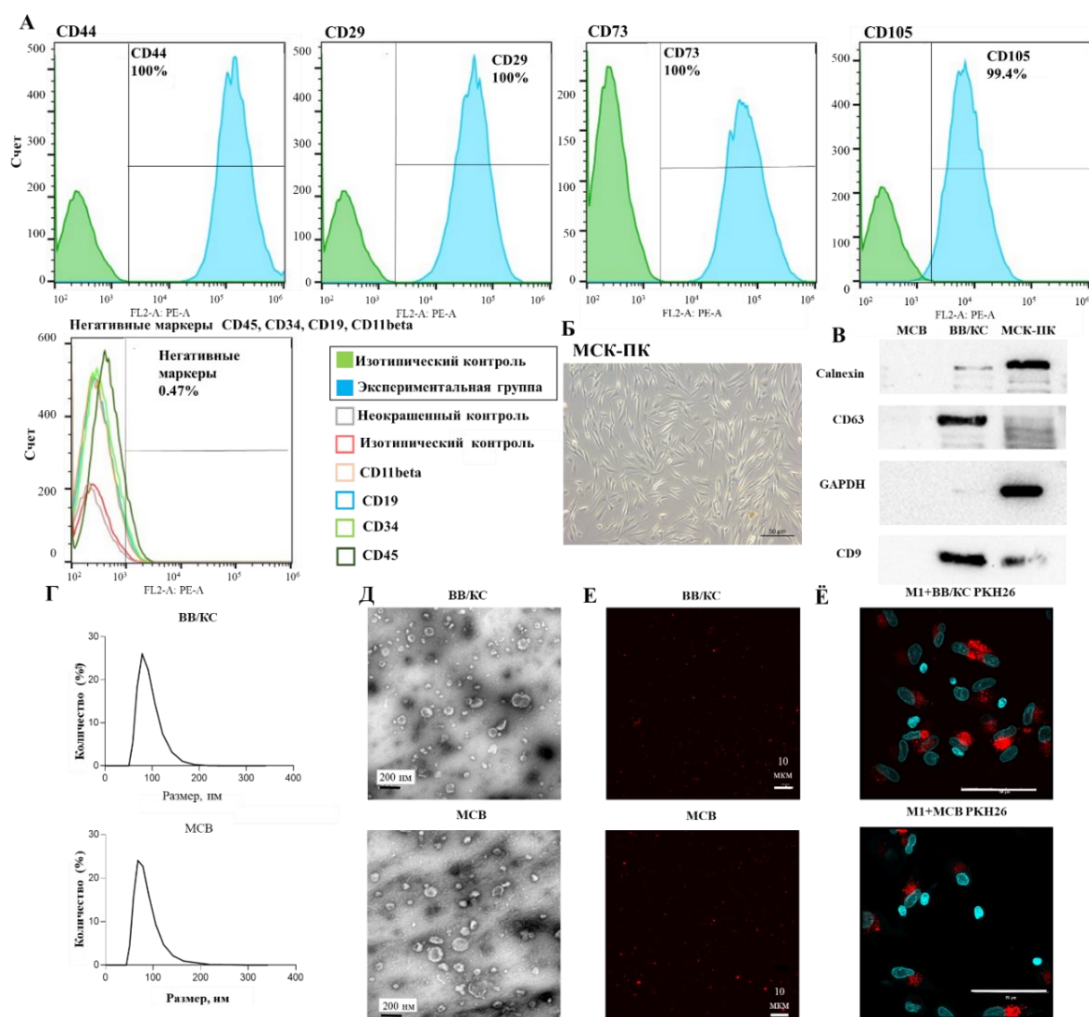


Рисунок 1 – Характеристика МСК-ПК и секретируемых ими ВВ. А – анализ иммунофенотипа МСК-ПК с помощью проточной цитометрии. Б – микрофотография МСК-ПК на 4 пассаже, полученные с помощью фазово-контрастной микроскопии, увеличение 10х. В – ВВ ВВ МСК-ПК (МСВ и ВВ/КС) на наличие экспрессии экзосомальных маркеров (CD9+, CD63+, GAPDH-, Calnexin-). Г – анализ динамического светорассеяния наночастиц для ВВ/КС и МСВ. Д – микрофотографии просвечивающей электронной микроскопии ВВ. Масштабный отрезок 200 нм. Увеличение 60000х. Е – микрофотографии конфокальной микроскопии ВВ, помеченных красителем РКН26. Масштабный отрезок 10 мкм. Увеличение 100х. Ё – Фагоцитоз М1 (ИФН- $\gamma$ +ЛПС) макрофагами ВВ/КС и МСВ МСК-ПК, окрашенных РКН26. Изображения получены с помощью конфокальной микроскопии. Увеличение 100х. Масштабный отрезок 50 мкм

В протеомном анализе были использованы по 2 технических образца ВВ/КС и МСВ, полученных из МСК-ПК, выделенных от 4 здоровых доноров. В ходе биоинформатического анализа было идентифицировано 4080 белков с ненулевым spectral count (SC) в одном образце. В анализ вошли белки, имеющие  $SC \geq 2$  хотя бы в одном образце определённого типа везикул от каждого донора. Фильтрация данных повысила внутригрупповую скоррелированность образцов. Для повышения качества анализа были исключены пары образцов, полученные от одного донора, имеющие слабую корреляцию между друг другом. Таким образом, образцы МСВ от одного донора были исключены из анализа. Исключение образцов и повторная фильтрация данных привели к значительному повышению внутригрупповой скоррелированности между образцами

(рис. 2А). Образцы ВВ/КС и МСВ также хорошо разделяются при помощи метода главных компонент (РСА) после проведения фильтрации данных и удаления низкокачественных образцов МСВ (рис. 2Б).

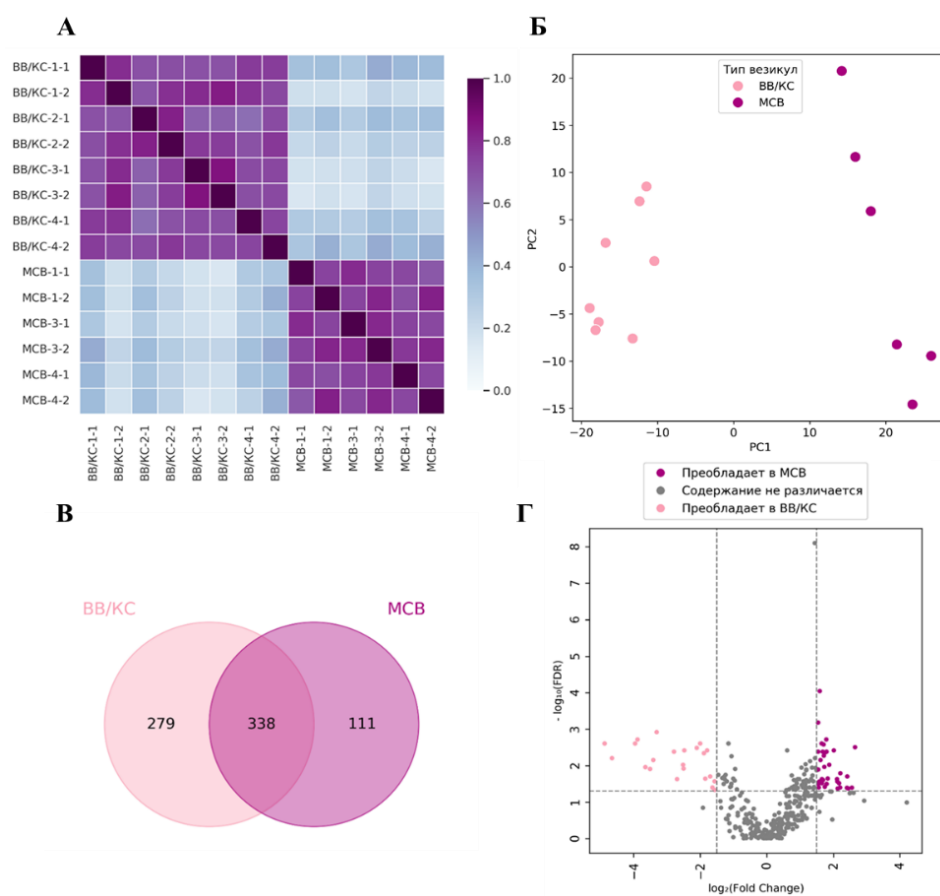


Рисунок 2 – Фильтрация данных протеомного анализа ВВ/КС и МСВ, полученных из МСК-ПК. А – корреляционная матрица образцов ВВ/КС и МСВ, полученная в результате вычисления попарных коэффициентов корреляции Спирмена между образцами. Б – анализ главных компонент для образцов ВВ/КС и МСВ до фильтрации данных. В – диаграмма Венна для белков ВВ/КС и МСВ. Г – volcano диаграмма, отражающая результаты анализа дифференциального содержания белков в ВВ/КС и МСВ

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 (рис. 2В). Также был проведён анализ дифференциального содержания белков, общих для ВВ/КС и МСВ, в двух типах везикул. 1,5-кратное различие в SC белка и  $FDR < 0,05$  свидетельствовали о дифференциальном содержании данного белка в везикулах. 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. В результате анализа дифференциального содержания были обнаружены 57 дифференциально содержащихся белков, из которых 22 преобладали в ВВ/КС и 35 – в МСВ (рис. 2Г).

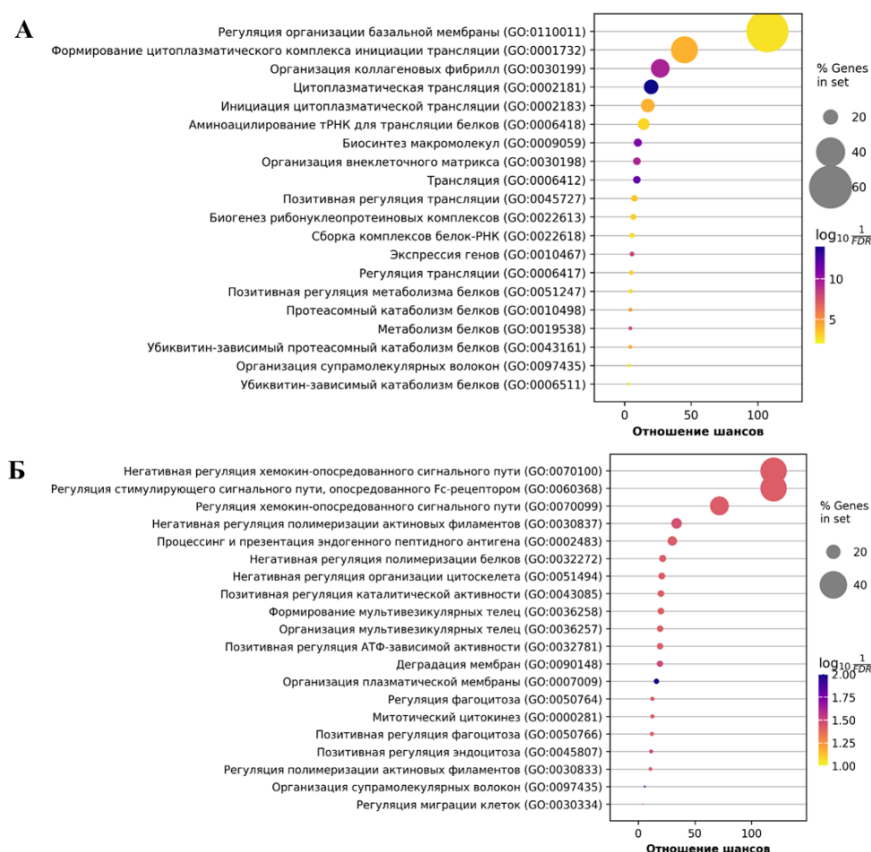


Рисунок 3 – А – анализ обогащения набора генов, соответствующих белкам, содержащимся только в ВВ/КС и не содержащимся в МСВ. Б – анализ обогащения набора генов, соответствующих белкам, содержащимся только в МСВ и не содержащимся в ВВ/КС

ВВ/КС в отличие от МСВ содержат белки, положительно регулирующие организацию ВКМ (COL18A1, POSTN, COL14A1, LUM, COL12A1, LOXL4, PLOD1, NID1), организацию коллагеновых фибрилл (GREM1, COL3A1, BMP1, COL1A2, COL14A1) и организацию супрамолекулярных волокон (RPL5, RPS9, RPL3, RPL21, RPS6, RPL8, GSPT1, DARS1), что может объяснять высокий регенеративный потенциал экзосом в восстановлении хрящевой ткани при ОА (рис. 3А). 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) (рис. 3Б). Различия в протеомном составе ВВ/КС и МСВ, полученных из МСК-ПК, демонстрируют вероятные различия их в биогенезе и биологической активности.

### **Влияние МСВ и ВВ/КС, полученных из МСК-ПК, на функциональную активность макрофагов человека**

На первом этапе исследования был проведен анализ влияния МСВ и ВВ/КС, полученных из МСК-ПК, на экспрессию и секрецию провоспалительных цитокинов макрофагами, дифференцированных из моноцитов (МДМ) периферической крови человека, с помощью

методов ИФА и кПЦР-ОТ. Для этой цели оба типа ВВ были добавлены в культуральную среду МДМ на 6 день культивирования вместе с индукторами поляризации М1 (ИФН- $\gamma$  + ЛПС). Спустя 48 часов культивирования МДМ с ВВ, была отобрана среда для измерения продукции провоспалительных цитокинов ФНО- $\alpha$  и Ил-6 методом ИФА, а клетки были подвергнуты лизису для характеристики экспрессии мРНК данных цитокинов методом кПЦР-ОТ (Рис. 4).

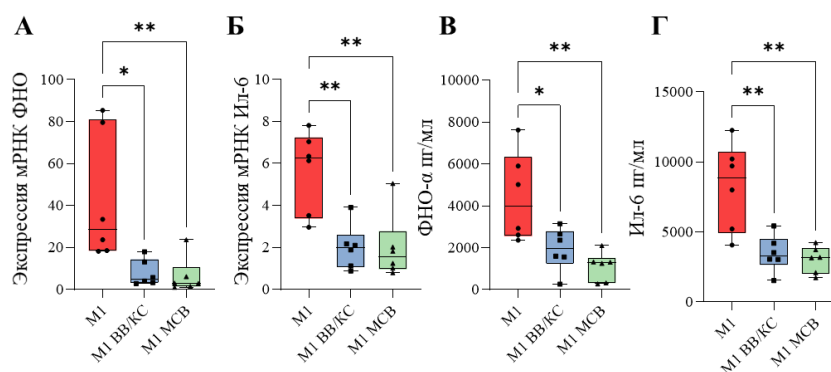


Рисунок 4 – Модуляция секреции провоспалительных цитокинов у МДМ ВВ/КС и МСВ, полученными из МСК-ПК. Результаты кПЦР-ОТ для А – ФНО- $\alpha$ , Б – Ил-6, и ИФА для В – ФНО- $\alpha$ , Г – Ил-6 для М1 фенотипа макрофагов\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; ns ( $p > 0.05$ )

МСВ и ВВ/КС продемонстрировали иммуномодулирующую активность в отношении провоспалительных макрофагов М1, причем оба типа везикул значительно снижали как экспрессию, так и секрецию ФНО- $\alpha$  и Ил-6 (Рис. 4А-Г). Полученные результаты демонстрируют, что оба типа ВВ МСК-ПК имеют схожий противовоспалительный эффект в отношении провоспалительных М1 макрофагов, ослабляя экспрессию и секрецию воспалительных цитокинов: ФНО- $\alpha$  и Ил-6. При этом у МСВ наблюдается более выраженный иммуносупрессивный эффект по сравнению с ВВ/КС.

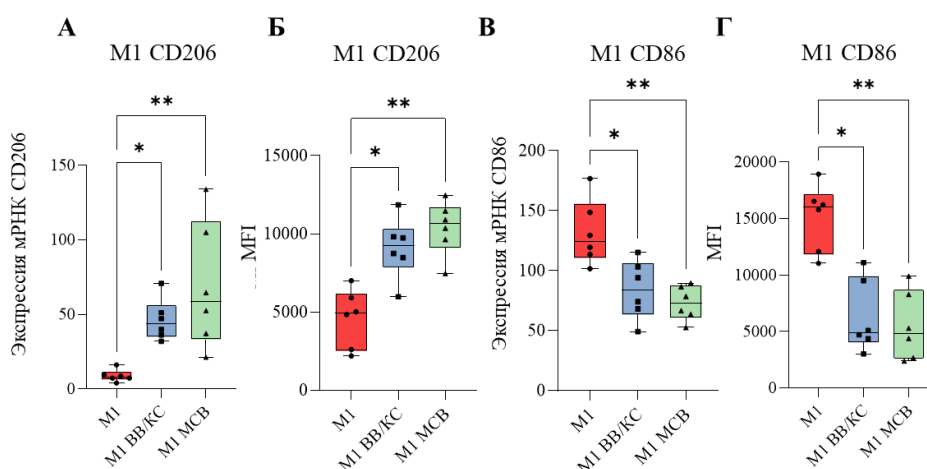


Рисунок 5 – Анализ влияния МСВ и ВВ/КС МСК-ПК на экспрессию поверхностных маркеров макрофагов для М1 макрофагов. А – кПЦР-ОТ для CD206 - M2 маркера поляризации; Б - данные MFI для CD206-Per-Cy; В – кПЦР-ОТ для CD86 – M1 маркера поляризации; Г – данные MFI для CD86-FITC \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; ns ( $p > 0.05$ )

На следующем этапе были проведены эксперименты по анализу влияния МСВ и ВВ/КС МСК-ПК на экспрессию у МДМ М1 фенотипа поверхностных маркеров макрофагов, а именно CD86 – маркера М1 поляризации, CD206 – маркера М2 поляризации. Оценка экспрессии CD206 и CD86 была осуществлена с помощью кПЦР-ОТ и проточной цитометрии (Рис. 5А-Г). Данные проточной цитометрии представлены на графиках в виде медианной интенсивности флуоресценции (MFI) (Рис 5А, В). С помощью двух независимых методов было установлено, что оба типа ВВ усиливали экспрессию CD206 у М1 макрофагов с наиболее выраженным эффектом в группе М1+МСВ (Рис. 5А, Б). В тоже время ВВ способствовали снижению экспрессии мРНК и белка CD86 на поверхности М1 макрофагов, при этом МСВ оказали более выраженный эффект по сравнению с ВВ/КС (Рис. 5В, Г). Полученные результаты показали, что МСВ и ВВ/КС МСК-ПК человека вызывают изменения секреции цитокинов ФНО- $\alpha$  и Ил-6, а также экспрессии поверхностных рецепторов CD86, CD206 у М1 макрофагов, способствуя изменению их фенотипа в сторону М2-подобных макрофагов, имеющих менее выраженную провоспалительную активность, по сравнению с М1 макрофагами, культивируемыми без ВВ.

Способность к фагоцитозу является одним из ключевых видов активности макрофагов в ходе иммунного ответа, а также при поддержании тканевого гомеостаза в ходе нормального физиологического процесса. Интенсивность фагоцитоза *E. Coli* растет у используемых в исследовании МДМ в следующем порядке от М1, М0\_ГМ, М2, М0\_М, исходя из чего более высокая степень фагоцитоза характерна для макрофагов с противовоспалительным фенотипом, таких как М2 и М0\_М (Рис. 6).

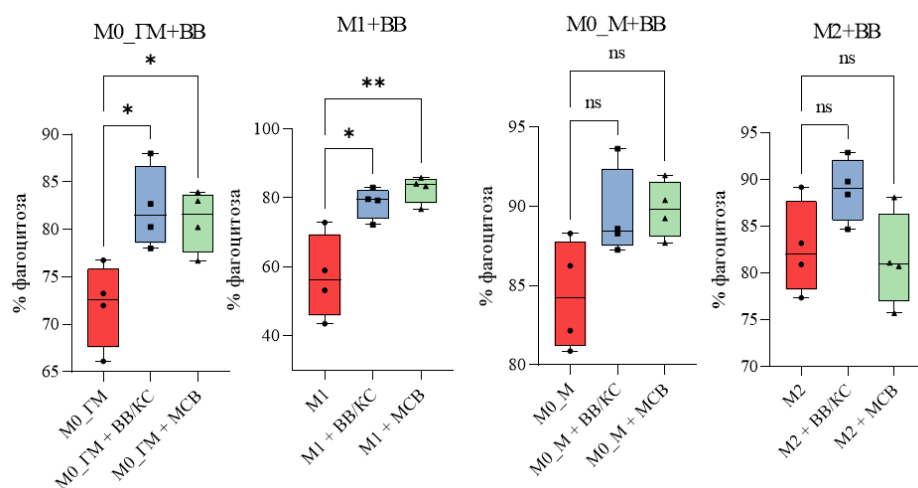


Рисунок 6 – Количественный анализ % фагоцитоза у М0\_ГМ, М1, М0\_М, М2 фенотипов МДМ после воздействия ВВ МСК-ПК, выполненный с помощью проточной цитометрии. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; ns ( $p > 0.05$ )

Инкубация макрофагов с ВВ МСК-ПК приводила к увеличению процента клеток, фагоцитировавших бактерии *E. Coli*-FITC, что было продемонстрировано с помощью проточной цитометрии (Рис. 6). Статистически значимое увеличение способности к фагоцитозу бактерий

ВВ обоих типов вызвали у M0\_ГМ и M1 макрофагов, приближая процент фагоцитировавших клеток к уровню M2 макрофагов (Рис. 6). У MСВ был более выраженный эффект в отношении M1 макрофагов по сравнению с ВВ/КС. В отношении других фенотипов макрофагов влияние двух типов ВВ на фагоцитоз было приблизительно одинаковым.

Способность к генерации АФК макрофагами является одним из основных аспектов их функциональной активности. У макрофагов важную роль в генерации АФК играет НАДФН-оксидаза 2, продуцирующая супероксид-анион. В рамках данного исследования с помощью ХЛ было установлено, что M1 макрофаги имеют наибольшую способность генерировать АФК после добавления ФМА (Рис. 7). Наблюдалось снижение интенсивности ХЛ M1 макрофагов под действием MСВ и ВВ/КС, статистически значимое снижение ХЛ достигалось только для ВВ/КС (Рис. 7Б).

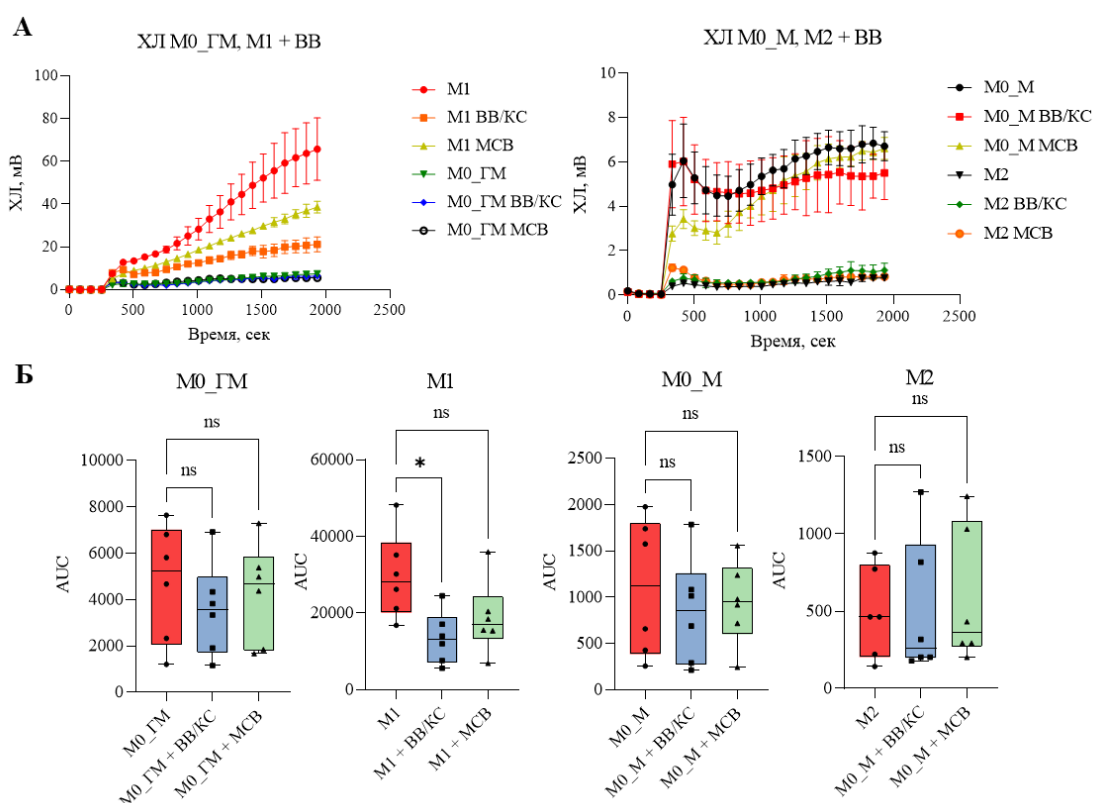


Рисунок 7 – Модуляция продукции АФК у M0\_ГМ, M1, M0\_M, M2 макрофагов после инкубации с MСВ и ВВ/КС MСК-ПК человека. А – кинетические кривые люминол-зависимой ХЛ для МДМ, активированных ФМА; Б – количественный анализ результатов люминол-зависимой ХЛ МДМ, где на оси абсцисс указаны экспериментальные группы, по оси ординат сравнивается площадь под кривой ХЛ (AUC). \*  $p < 0.05$ ; ns ( $p > 0.05$ )

Фермент НАДФН-оксидаза 2 представляет собой сложный многокомпонентный белковый комплекс, который образует высокоорганизованную структуру, обеспечивая регуляцию продукции АФК. Далее был проведен анализ молекулярных механизмов снижения продукции АФК у M1 макрофагов после воздействия MСВ и ВВ/КС MСК-ПК, для этого измеряли уровни экспрессии субъединиц НАДФН-оксидазы 2 p47phox и p67phox, NOX2 у M1

макрофагов методами кПЦР-ОТ и ВБ (Рис 8 А-Г). Результаты кПЦР-ОТ показали, что статистически значимое снижение экспрессии p47phox и p67phox, NOX2 наблюдалось у M1 клеток после воздействия ВВ/КС, для МСВ эффект был менее выраженным (Рис. 8 А-В). В случае ВБ результаты были схожими с кПЦР-ОТ, измерение количества белка субъединиц НАДФН-оксидазы 2 продемонстрировало более выраженный эффект ВВ/КС по сравнению с МСВ в отношении снижения экспрессии p47phox и p67phox. (Рис. 8Г). Полученные результаты демонстрируют связь между влиянием ВВ/КС и МСВ МСК-ПК на снижение продукции АФК и модуляцией экспрессией НАДФН-оксидазы 2 у M1 макрофагов.

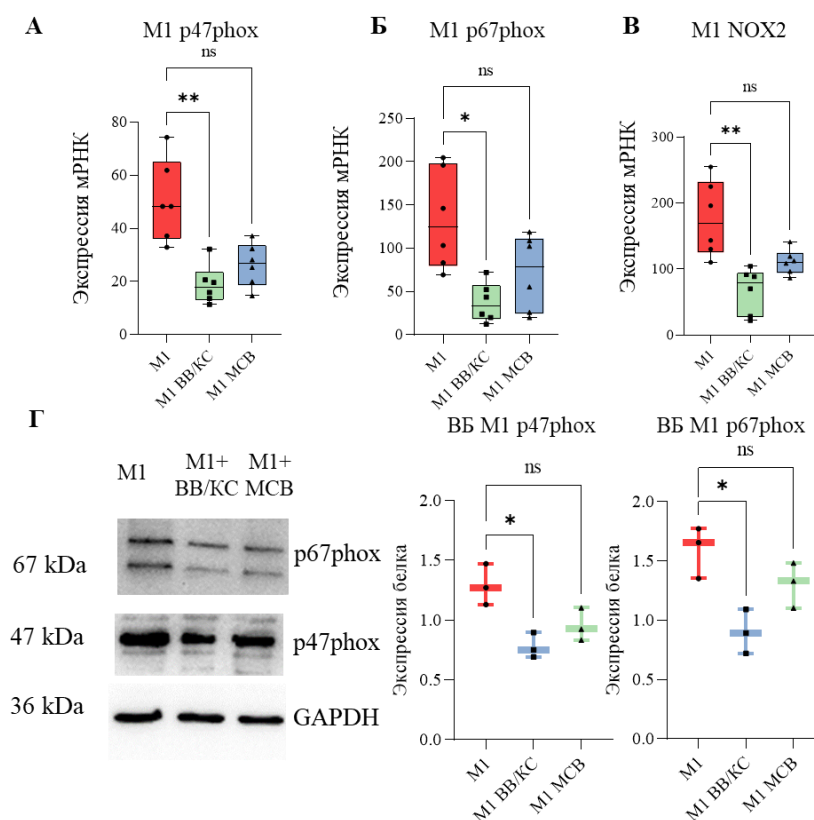


Рисунок 8 – Анализ экспрессии субъединиц НАДФН-оксидазы 2 - p47phox и p67phox, NOX2 - у M1 макрофагов после инкубации с МСВ и ВВ/КС МСК-ПК. А – В - оценка экспрессии мРНК методом кПЦР-ОТ: А – p47phox, Б – p67phox, В – NOX2, Г – ВБ анализ влияния МСВ и ВВ/КС МСК-ПК человека на экспрессию субъединиц НАДФН-оксидазы 2 p47phox и p67phox у M1 макрофагов.  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; ns ( $p > 0.05$ )

### Влияние МСВ и ВВ/КС, полученных из МСК-ПК, на модуляцию компонентов сигнального пути JAK/STAT1 у M1 макрофагов

В ходе анализа изменений экспрессии транскрипционных факторов у M1 макрофагов под действием МСВ и ВВ/КС МСК-ПК с помощью кПЦР-ОТ было выявлено, что МСВ оказывали статистически значимый ингибирующий эффект в отношении STAT1, STAT2, IRF9 (Рис 9А). Эти белки являются компонентами сигнального пути JAK/STAT1, который активируется с помощью ИФН- $\gamma$  и способствует провоспалительной M1 поляризации макрофагов. Для подтверждения результатов кПЦР-ОТ был проведен ВБ анализ содержания в макрофагах STAT1, STAT2, фосфо-

STAT1, фосфо-STAT2, IRF9 (Рис. 9Б, В). Результаты ВБ подтвердили данные кПЦР-ОТ - МСВ имели статистически значимый эффект на уровень экспрессии компонентов сигнального пути JAK/STAT1 по сравнению с ВВ/КС, которые продемонстрировали только тенденцию к уменьшению экспрессии указанных выше факторов (Рис. 9Б). Полученные результаты демонстрируют предполагаемую связь между более выраженным снижением экспрессии компонентов сигнального пути JAK/STAT1 и снижением продукции провоспалительных цитокинов ФНО- $\alpha$  и Ил-6 под действием МСВ МСК-ПК у М1 макрофагов.

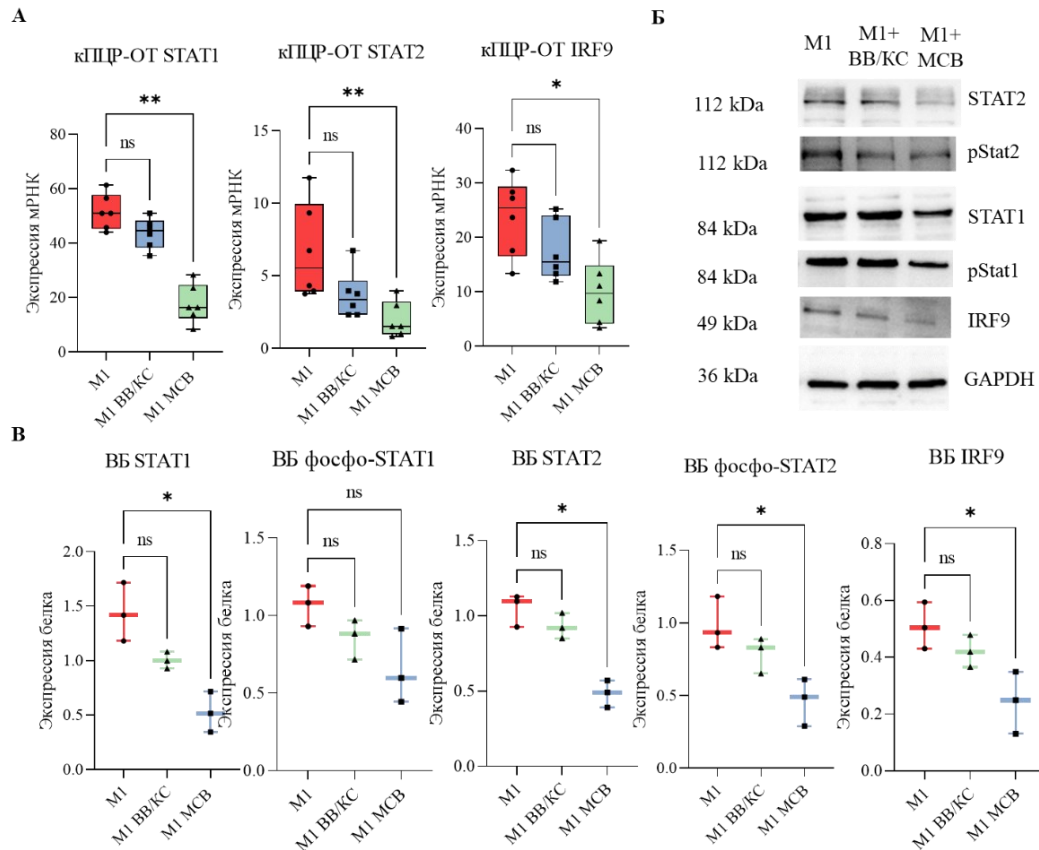


Рисунок 9 – Анализ экспрессии мРНК и содержания белков STAT1, STAT2, IRF9 у М1 макрофагов после воздействия МСВ и ВВ/КС, полученных из МСК-ПК человека. А – кПЦР-ОТ для STAT1, STAT2, IRF9 у М1 макрофагов; Б – изображения мембран ВБ для белков pSTAT1, pSTAT2 (р – фосфо), STAT1, STAT2, IRF9, GAPDH; В – количественный анализ ВБ, образцы нормированы на белок GAPDH. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; ns ( $p > 0.05$ )

### Анализ влияния МСВ и ВВ/КС МСК-ПК на развитие воспалительного процесса в тканях суставов у крыс с индуцированным остеоартритом

В рамках данного исследования было проведен анализ влияния МСВ и ВВ/КС МСК-ПК на модуляцию воспалительного процесса в тканях суставов у крыс с ОА, индуцированным посредством менискэктомии. Спустя три недели после внутрисуставной инъекции МСВ и ВВ/КС (300 мкг белка/мл) в образцах тканей коленных суставов наблюдалось снижение экспрессии воспалительных маркеров ФНО- $\alpha$ , iNOS, и увеличение экспрессии аргиназы-1, что свидетельствовало о противовоспалительном эффекте обоих типов ВВ (Рис. 10 Б-Г). При этом

эффект МСВ был менее выраженным в отношении экспрессии iNOS (Рис. 10 В) Снижение ФНО- $\alpha$  и iNOS в основном наблюдалось в клетках суставного хряща, синовиальной оболочки и интрапателлярной жировой подушки (Рис. 10А). Выраженная экспрессия аргиназы-1 преимущественно выявлялась в поверхностной зоне суставного хряща и в макрофагах интрапателлярной жировой подушки после воздействия МСВ и ВВ/КС (Рис. 10А). Полученные результаты демонстрируют ослабление воспалительного процесса в тканях коленных суставов крыс с ОА - терапия ВВ формирует более благоприятное микроокружение, способствующее ослаблению деструктивных процессов в хрящевой ткани.

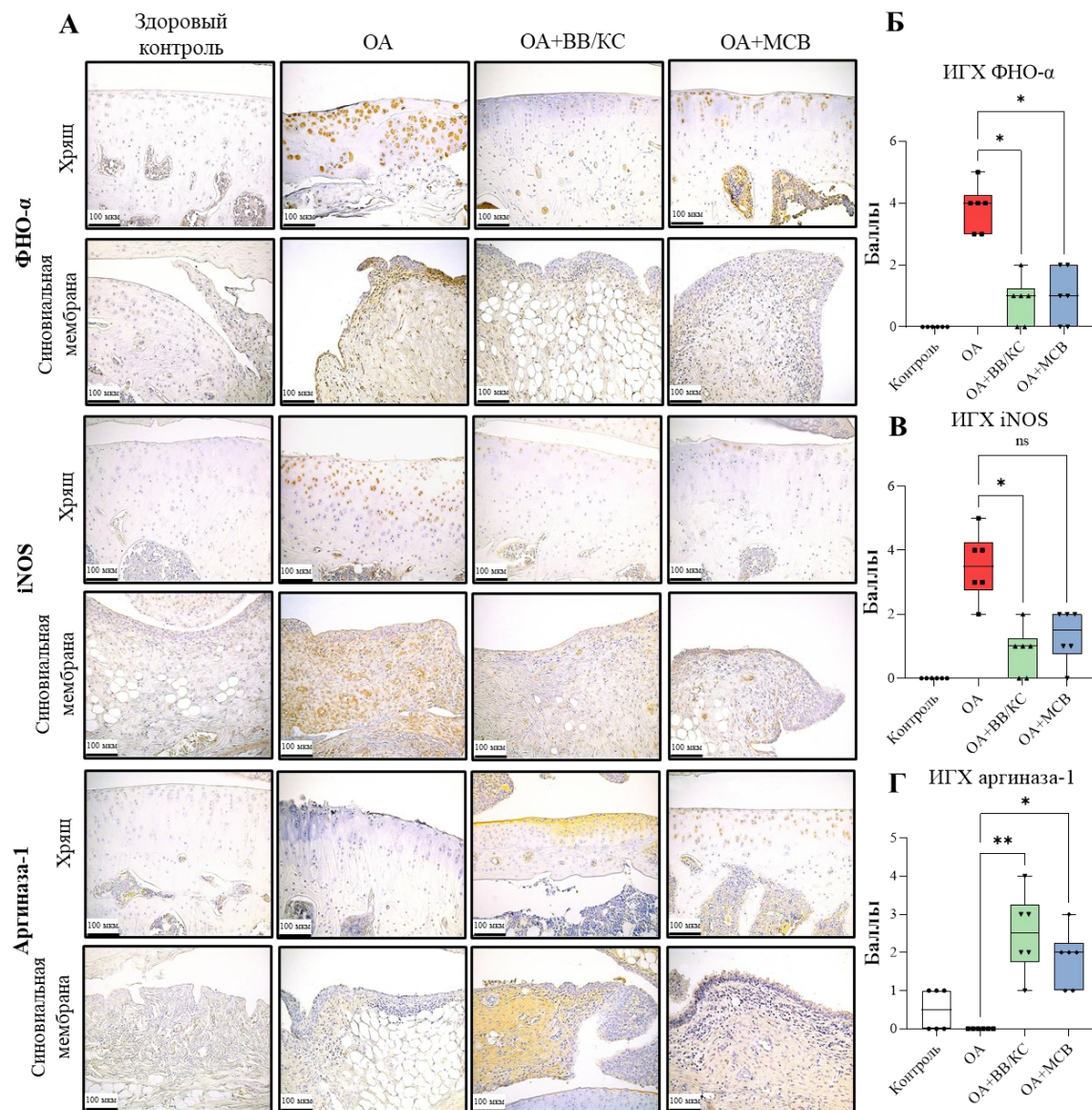


Рисунок 10 – Иммуногистохимический анализ с последующей полуколичественной оценкой влияния МСВ и ВВ/КС МСК-ПК на воспалительный процесс в тканях коленного сустава при ОА. А – микрофотографии синовиальной мембраны и хрящевой ткани демонстрируют влияние ВВ на развитие воспаления в тканях суставов крыс с хирургически вызванным ОА. ВВ изменяют уровни маркеров воспаления: Б – ФНО- $\alpha$ ; В – iNOS; Г – Аргиназа-1. Контроль – интактный контроль без операции, ОА – группа с хирургически индуцированным ОА, получавшая инъекции PBS, ОА + ВВ/КС – группа с внутрисуставным введением ВВ/КС, ОА + МСВ – группа с внутрисуставным введением МСВ.\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; ns ( $p > 0.05$ )

## 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- $\alpha$ , 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 М1 макрофагов. ВВ/КС имели более выраженный значимый ингибирующий эффект в отношении прооксидантной активности М1 макрофагов по сравнению с МСВ. Инкубация с ВВ/КС привела к снижению экспрессии мРНК и белков субъединиц НАДФН-оксидазы 2 - p47phox, p67phox, - у М1 макрофагов, что коррелирует со значимым ингибирующим влиянием ВВ/КС на продукцию активных форм кислорода (АФК) М1 фенотипом.

4. МСВ оказывают противовоспалительный эффект в отношении М1 макрофагов посредством снижения экспрессии мРНК и белков STAT1, STAT2 и IRF9, являющиеся 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- $\alpha$ , 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 в отношении макрофагов наиболее оптимальным является M1 фенотип макрофагов, культивируемых с индукторами поляризации, ИФН- $\gamma$  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 с концентрацией 300 мкг белка/мл объемом 20 мкл.

### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. 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, N.B. Serejnikova, N.M. Fayzullina, A.L. Fayzullin, B.P. Ershov, Y.I. Khristidis, I.I. Vlasova, N.V. Kosheleva, A.A. Svistunov, P.S. Timashev // **International Journal of Molecular Sciences**. – 2024. – Vol. 25. – №21. – P. 11564. doi: 10.3390/ijms252111564. PMID: 39519121; PMCID: PMC11545893. [**Scopus**]

2. Radical-Generating Activity, Phagocytosis, and Mechanical Properties of Four Phenotypes of Human Macrophages / S.K. Suleimanov, Y.M. Efremov, **T.O. Klyucherev**, M.A. Peshkova, D.P. Revokatova, A.I. Shpichka, P.S. Timashev // **International Journal of Molecular Sciences**. – 2024. – Vol. 25. – №3. – P. 1860. doi: 10.3390/ijms25031860. PMID: 38339139; PMCID: PMC10855323. [**Scopus**]

3. Four sides to the story: A proteomic comparison of liquid-phase and matrix-bound extracellular vesicles in 2D and 3D cell cultures / M.A. Peshkova, A.A. Korneev, D.P. Revokatova, A.V. Smirnova, **T.O. Klyucherev**, V.O. Shender, G.P. Arapidi, N.V. Kosheleva, P.S. Timashev // **Proteomics**. – 2024. – Vol. 24. – №18. – Article e2300375. doi: 10.1002/pmic.202300375. PMID: 38197488. [**Scopus**]

4. Direct and cell-mediated EV-ECM interplay / A.V. Smirnova, Y.M. Efremov, **T.O. Klyucherev**, M.A. Peshkova, A.M. Senkovenko, A.A. Svistunov, P.S. Timashev // **Acta Biomaterialia**. – 2024. – Vol. 186. – P. 63–84. doi: 10.1016/j.actbio.2024.07.029. PMID: 39043290.

5. 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, N.V. Kosheleva, A.A. Svistunov, X.J. Liang, P.S. Timashev // **International Journal of Molecular Sciences**. – 2025. – Vol. 26. – Article 5766. doi: 10.3390/ijms26125766.

6. **Klyucherev T.O.**, Suleimanov S.K., Koteneva P.I., Kosheleva N.V., Vlasova I.I., Timashev P.S., Extracellular vesicles reduce M1 macrophage polarization // Abstract book VI Sechenov International Biomedical Summit 2022 (SIBS-2022). – 2022. - p. 8.

7. **Ключерев Т.О.**, Регуляция воспалительной и радикал-продуцирующей активности фагоцитов внеклеточными везикулами // Сборник тезисов докладов участников V Международной научной конференции «Наука будущего» и VIII Всероссийского молодежного научного форума «Наука будущего – наука молодых» – 2023. - с. 105.

8. **Ключерев Т.О.**, Сулейманов Ш.К., Юрканова М.Д., Теплова А.А., Власова И.И., Тимашев П.С., Иммуномодуляция про-воспалительной активности нейтрофилов и макрофагов внеклеточными везикулами // Сборник тезисов XXIV съезда физиологического общества им. И.П. Павлова – 2023 - с. 94.

9. Корнеев А.А., Пешкова М.А., **Ключерев Т.О.**, Кошелева Н.В., Тимашев П.С., Функциональная характеристика внеклеточных везикул методами сравнительной протеомики // Сборник тезисов VII Сеченовского международного биомедицинского саммита: Мегатренды в биомедицине (SIBS-2023). – 2023. - с. 34.

10. **Ключерев Т.О.**, Юрканова М.Д., Кошелева Н.В., Власова И.И., Тимашев П.С., Модулирование иммунного ответа макрофагов внеклеточными везикулами, полученными из мезенхимальных стромальных клеток пуповины человека // Сборник тезисов VIII Международного биомедицинского саммита (SIBS-2024). – 2024. - с. 14.

11. **Klyucherev T.**, Yurkanova M., Peshkova M., Kosheleva N., Vlasova I., Timashev P., Modulation of The Inflammatory Response of Macrophages by Mesenchymal Stromal Cells-Derived Exosomes and Matrix-Bound Nanovesicles // Сборник материалов Royan International Hybrid Twin Congress – 2024. - p. 154.

12. **Ключерев Т.О.**, Юрканова М.Д., Пешкова М.А., Кошелева Н.В., Власова И.И., Тимашев П.С., Модуляция воспалительного ответа макрофагов экзосомами и матрикс-связанными нановезикулами, полученными из мезенхимальных стромальных клеток пуповины человека // Сборник материалов VI Национального конгресса по регенеративной медицине. – 2024. - с. 441.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АФК – активные формы кислорода

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

ИЛ – интерлейкин

ИФН- $\gamma$  – интерферон-гамма

ЛПС – липополисахарид

МДМ – макрофаги, дифференцированные из моноцитов

МСВ – матрикс-связанные везикулы

МСК – мезенхимные стромальные клетки

ОА – остеоартрит

кПЦР-ОТ – количественная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

ФМА – форбол-12-миристан-13-ацетат

ФНО- $\alpha$  – фактор некроза опухоли- $\alpha$

ВВ – внеклеточные везикулы

ВВ/КС – внеклеточные везикулы, полученные из кондиционированной среды

ВКМ – внеклеточный матрикс

CD – cluster of differentiation, кластер дифференцировки

iNOS – inducible nitric oxide synthase, индуцируемая синтаза оксида азота

IRF – interferon regulatory factor, фактор регуляции интерферона

ЯК – Janus kinase, янус-киназа

РСА – principal component analysis, метод главной компоненты

PBS – phosphate-buffered saline, фосфатно-солевой буфер

SC – spectral count, спектральная интенсивность

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