



УТВЕРЖДАЮ

Директор ГНЦ РФ – ИМБП РАН  
академик РАН

Орлов О.И.

«22» февраля 2024 г.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации – Института медико-биологических проблем Российской академии наук

Диссертация «Влияние физиологической гипоксии *in vitro* на свойства внеклеточного матрикса мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток» выполнена в лаборатории «Клеточная физиология» Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации – Института медико-биологических проблем Российской академии наук (ГНЦ РФ – ИМБП РАН).

В период подготовки диссертации соискатель Матвеева Диана Константиновна работала в ГНЦ РФ – ИМБП РАН в должности младшего научного сотрудника лаборатории «Клеточная физиология» и обучалась в аспирантуре ГНЦ РФ – ИМБП РАН 2019 – 2023 гг.

В 2019 году окончила биологический факультет Московского Государственного Университета имени М.В. Ломоносова по специальности «Биология».

Справка о сдаче кандидатских экзаменов выдана в 2024 году ГНЦ РФ – ИМБП РАН.

Научный руководитель: Андреева Елена Ромуальдовна, доктор биологических наук, ведущий научный работник лаборатории «Клеточной физиологии» ГНЦ РФ – ИМБП РАН.

Результаты диссертационной работы «Влияние физиологической гипоксии *in vitro* на свойства внеклеточного матрикса мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток» были обсуждены на научной секции «Космическая биология и физиология» ГНЦ РФ – ИМБП РАН (протокол № 15 от 18.01.2024 г.).

По итогам обсуждения принято следующее заключение:

Диссертационная работа Матвеевой Д.К. посвящена изучению свойств и регуляторной активности внеклеточного матрикса, продуцируемого мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками в условиях тканевого уровня  $O_2$  (физиологической гипоксии).

Актуальность проблемы

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (МСК) играют важную роль в гомеостазе и регенерации тканей благодаря своей способности к самообновлению, мультилинейной дифференцировке, паракринной активности (Caplan et al., 2011; Cho et al., 2014; Kumar et al., 2019; Asgari Taei et al., 2021). *In vivo* свойства МСК регулируются

различными клеточными, биохимическими и биофизическими факторами их тканевой ниши (Chow et al., 2001; Spencer et al., 2014). При этом МСК высвобождают целый ряд биологически активных продуктов, которые оказывают влияние на локальную клеточную динамику (Kusuma et al., 2017; Chang et al., 2021). Важным продуктом секрета МСК является внеклеточный матрикс (ВКМ) (Sears et al. 2020., Múzes et al., 2022).

ВКМ является неотъемлемым компонентом тканей организма, который обеспечивает их формирование и интеграцию клеточных популяций. За последние десятилетия накоплен значительный массив данных, указывающих на то, что ВКМ выступает как динамичный и многофункциональный регулятор различных клеточных систем, в том числе, ниш стволовых и прогениторных клеток (Gattazzo et al., 2014; Burgstaller et al., 2018; Lee-Thedieck et al., 2022). ВКМ регулирует различные клеточные процессы, такие как пролиферация, миграция, дифференцировка (Frantz et al., 2010; Clause, Barker, 2013; Hoshiba et al., 2018; Zhu 2019; Novoseletskaya et al., 2020). В настоящее время для комплексной характеристики всех связанных с ВКМ белков используется термин матрисом. К нему относятся: коллагены, гликопротеины, протеогликаны (белки основного матрисома) и секретируемые, регуляторные, ВКМ-аффилированные молекулы (матрисом-ассоциированные белки) (база данных MatrisomeBD; Naba et al., 2016; Ragelle et al., 2017).

Взаимодействие клеток с матриксом, безусловно, является двунаправленным: клетки постоянно синтезируют и ремоделируют ВКМ, а его состав, в свою очередь, определяет поведение клеток (Rynes, 2009; Ahmed et al., 2016; Sasikumar et al., 2019; Wang et al., 2020; Matveeva et al., 2023). Соответственно, при изменении состава микроокружения будет происходить модификация биохимических, биомеханических и физических свойств ВКМ и *vice versa*.

*In vitro* установлено, что даже после удаления клеток-продуцентов (децеллюляризации), ВКМ сохраняет способность передавать инструктивные свойства, обусловленные такими факторами как тканевой источник и уровень коммитированности (см. обзор Матвеева, Андреева, 2020). Например, дцВКМ, выделенных из хряща, сухожилий, или полученный от гладкомышечных клеток стимулирует хондрогенную (Xue et al., 2012), тендогенную (Zhang et al., 2011) и миогенную (Rao Pattabhi et al., 201) дифференцировки МСК, соответственно. В связи с этим ВКМ МСК представляет значительный интерес для оптимизации методов культивирования, которые модулируют нативную нишу и обеспечивают масштабную экспансию без риска потери функций клеток.

Низкий уровень  $O_2$  является наиболее важным физическим фактором микроокружения в локальных нишах стволовых и прогениторных клеток (Naque et al., 2013; Ivanovic, 2017). В работах последних двух десятилетий убедительно продемонстрировано, что содержание  $O_2$  может играть решающую роль в реализации функциональной активности МСК (Guzy and Schumacker, 2006; Ivanovic, 2009; Buravkova et al., 2013, 2014; Ivanovic, 2017; Noronha et al., 2019; Pattappa et al., 2019; Yusoff et al., 2022).

Роль снижения уровня  $O_2$  – гипоксии, в продукции и ремоделировании ВКМ рассматривается исследователями в основном в контексте сосудистых заболеваний и опухолевой прогрессии, при которых клетки испытывают гипоксический стресс (Gillies, Gatenby, 2007; Beyer et al., 2009; Winkler et al., 2020; Dekker et al., 2022). Регуляция ВКМ в таких условиях происходит через HIF-1-зависимый механизм. Показано, что

транскрипционными мишенями этого фактора являются гены как структурных молекул ВКМ, так и ферментов, участвующих в его ремоделировании (Gilkes et al., 2013; Petrova et al., 2018; Wicks et al., 2022). Адаптация к гипоксическому стрессу сопровождается увеличением продукции, упорядоченности и жесткости структур ВКМ, что необходимо для обеспечения активации интегринов, усилению экспансии и повышению выживаемости клеток (Jean et al., 2011; Saed, Diamond, 2002; Deschene et al., 2012; Milner et al., 2008; Hu et al., 2014; Kalluri, 2016; Kumar et al., 2018). Однако работ, посвященных модификации матрикса МСК при постоянном уровне  $O_2$ , близком к тканевому - физиологической гипоксии, крайне мало. Некоторую информацию относительно длительных эффектов гипоксии на продукцию ВКМ можно получить из экспериментов по коммитированию МСК. Показано снижение остео-, адипо- и увеличение хондродифференцировки при гипоксии как на уровне транскрипции, так и трансляции соответствующих белков, в том числе компонентов ВКМ (Fehrer et al., 2007; Volkmer 2010; Pei et al., 2012).

Анализ того, как тканевой уровень  $O_2$  в качестве фактора микроокружения может влиять не только на фенотип МСК, но и на секреторную активность, в частности продукцию ВКМ, необходим для более полного понимания механизмов функционирования этих клеток. Мы предполагаем, что дцВКМ от МСК при физиологической гипоксии может сохранить свои компетенции и воспроизводить их при последующей рецеллюляризации, что будет отражаться на свойствах вновь засеваемых клеток. Результаты исследования роли факторов микроокружения в потенциале формируемого ВКМ внесут важный вклад в фундаментальные исследования МСК и будут востребованы для нужд регенеративной медицины.

#### Новизна полученных результатов

Впервые на транскриптомном уровне и на уровне белка проведена комплексная характеристика матрисома МСК при физиологической гипоксии *in vitro*. Установлено, что профиль генов, кодирующих структурные и регуляторные белки матрисома МСК, зависит от уровня  $O_2$  в их микроокружении.

Впервые установлено, что структурные свойства ВКМ изменяются при физиологической гипоксии. Морфометрически продемонстрировано достоверное увеличение выровненности фибрилл и ветвистости сети ВКМ, продуцируемого МСК при 5%  $O_2$ .

Впервые продемонстрировано, что ВКМ, полученный от МСК при 20%  $O_2$  содержит белки, тканеспецифичные для костной, а при 5%  $O_2$  - хрящевой ткани.

Впервые описано замедление остеокоммитирования и соответствующее изменение паракринного профиля МСК, культивируемых на дцВКМ, полученном при физиологической гипоксии.

#### Теоретическая и практическая значимость работы

Изучение механизмов поддержания тканевого гомеостаза и ремоделирования за счет взаимодействия клеточных и неклеточных составляющих тканевых ниш является необходимым элементом в системе формирования знаний о роли малодифференцированных предшественников в организме. Полученные данные указывают о важном значении уровня  $O_2$  в формировании матрикса, как компонента микроокружения МСК. Результаты исследования дополняют фундаментальные представления о регуляции судьбы МСК посредством сигналов из микроокружения и могут быть использованы для дальнейшего изучения механизмов взаимодействия ВКМ-

клетка. Полученные данные об O<sub>2</sub>-зависимых изменениях свойств ВКМ дополняют и могут быть востребованы для разработки новых протоколов *ex vivo* экспансии МСК с сохранением или приобретением свойств, необходимых для регенеративной медицины. Применение скаффолдов из дцВКМ, полученных от МСК при различном уровне O<sub>2</sub>, может рассматриваться для разработки тканеинженерных конструкций.

#### Степень достоверности результатов проведенных исследований

Диссертационная работа выполнена с использованием современных методов клеточной и молекулярной биологии, а также адекватной статистической обработки данных. Выносимые на защиту положения и выводы основаны на достоверных результатах экспериментов, проиллюстрированных графиками и таблицами. Статистическая обработка результатов проводилась с использованием общепринятых методов анализа данных.

#### Оценка выполненной соискателем работы

По актуальности поставленных задач, методическому и научному уровню исследований, их новизне и практической значимости, диссертационная работа Матвеевой Дианы Константиновны является законченной научно-квалификационной работой, которая отвечает п. 9-14 «Положения о порядке присуждения учёных степеней» (Постановление Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842), предъявляемых к диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук.

Личный вклад диссертанта состоит в проведении экспериментов, интерпретации и анализе полученных результатов, написании статей и подготовке докладов. При выполнении диссертационной работы автор выявил профиль генов, кодирующих белки матрисома, при физиологической гипоксии с помощью полногеномного анализа, охарактеризовал продукцию внеклеточного матрикса количественно с помощью гистологических красителей и качественно с помощью масс-спектрометрического анализа, установил различия в характере упаковки матрикса при различном уровне O<sub>2</sub> с помощью конфокальной и сканирующей электронной микроскопии, оценил экспрессию генов и активность матриксных металлопротеиназ в кондиционированной среде с помощью ПЦР и флуориметрического метода основанного на FRET-переносе, соответственно, провел оценку osteo-коммитирования по активности щелочной фосфатазы и паракринного профиля методом иммунофлуоресцентного мультиплексного анализа у МСК после рецеллюляризации на препараты матрикса.

По теме диссертации опубликовано 15 печатных работ, в том числе 5 статьи в журналах из перечня ВАК РФ и баз данных RSCI/Scopus/Web of Science и 10 тезисов докладов.

Диссертационная работа Матвеевой Дианы Константиновны «Влияние физиологической гипоксии *in vitro* на свойства внеклеточного матрикса мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток» по специальности 1.5.5 – физиология человека и животных является научно-квалификационной работой, отвечающей на поставленные цели и задачи. Положения, выносимые на защиту, сформулированы корректно и научно обоснованы.

Диссертация соответствует требованиям п. 9-14 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ №842 от 24.09.2013 г., и не содержит заимствованного материала без ссылки на авторов.

Диссертационная работа «Влияние физиологической гипоксии *in vitro* на свойства внеклеточного матрикса мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток»

Матвеевой Дианы Константиновны рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.5 – физиология человека и животных.

Заключение принято на заседании научной секции «Космическая биология и физиология» ГНЦ РФ – ИМБП РАН. На заседании присутствовало 20 человек. Результаты голосования: «за» - 20 чел., «против» - нет, «воздержалось» - нет, протокол № 15 от 18.01.24 г.

Председатель секции  
«Космическая биология и физиология»  
ГНЦ РФ – ИМБП РАН, д.б.н.



Сычев В.Н.

Ученый секретарь секции  
«Космическая биология и физиология»  
ГНЦ РФ – ИМБП РАН, д.б.н.



Пастушкова Л.Х.