

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ ИМ. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН
(ИБР РАН)

УДК 602.6:59; 602.6:612

Рег. № ГЗ 0108-2018-0013

Рег. № НИОКТР АААА-А18-118041690142-5



УТВЕРЖДАЮ
Директор ИБР РАН
д-р биол. наук, чл.-корр. РАН

А.В. Васильев

«10» декабря 2018 г.

ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ ОТБОР КЛЕТОЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ ЭКЗОСОМ С ЦЕЛЬЮ
РАЗРАБОТКИ ЭФФЕКТИВНЫХ ПРЕПАРАТОВ, СТИМУЛИРУЮЩИХ
ВОССТАНОВЛЕНИЕ ТКАНЕЙ

по Программе Президиума РАН № 42
«Фундаментальные исследования для биомедицинских технологий»
(заключительный отчет)

Руководитель НИР,
старший научн. сотр.,
д-р биол. наук

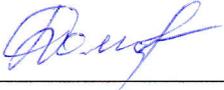
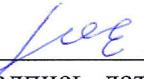
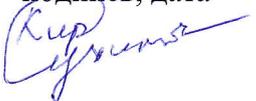
О.В. Паюшина

подпись, дата

06.12.2018

Москва 2018

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель, старший научный сотрудник, доктор биологических наук,	 _____	О.В. Паюшина 06.12.2018
	подпись, дата	
Исполнители: главный научный сотрудник, доктор биологических наук,	 _____	Е.И. Домарацкая 06.12.2018
	подпись, дата	
Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук	 _____	Н.Н. Буторина 06.12.2018
	подпись, дата	
Научный сотрудник, кандидат биологических наук	 _____	О.Н. Шевелева 06.12.2018
	подпись, дата	
Научный сотрудник	 _____	А.М. Куринов 05.12.18
	подпись, дата	
Научный сотрудник, кандидат биологических наук	 _____	К.К. Сухинич 06.12.2018
	подпись, дата	
Старший лаборант	 _____	Т.А. Тортунова 06.12.2018
	подпись, дата	
Нормоконтроль, ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук	 _____	Е.Б. Абрамова 06.12.2018
	подпись, дата	

РЕФЕРАТ

Отчет 24 стр., 10 рис., 2 табл., источников -33, 1 кн., публикаций по теме – 6

ЭКЗОСОМЫ, КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК, МЕЗЕНХИМНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ, КОСТНЫЙ МОЗГ, ЖИРОВАЯ ТКАНЬ, МЫШЦЫ, МИКРОРНК, РЕГЕНЕРАЦИЯ, ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ *IN VITRO*, ФИБРОЗ, МИОГЕНЕЗ

Объектом исследования являются экзосомы, полученные от мезенхимных стромальных клеток (МСК) костного мозга и жировой ткани, а также фибробластов нормальных и поврежденных мышц. Цель работы - поиск оптимальных источников экзосом для стимуляции восстановления мышечной ткани. Экзосомы выделяли из кондиционированных сред методом дифференциального ультрацентрифугирования. Полученные образцы сравнивали по количеству белка, числу и размерам везикул, содержанию ряда микроРНК и влиянию на миогенез и фиброз *in vitro*. В образцах экзосом от МСК костного мозга выявлено наименьшее количество частиц и белка, но наибольшее содержание микроРНК, участвующих в регуляции миогенеза. Показано антифибротическое действие экзосом из всех источников и промиогенное – экзосом от МСК костного мозга и жировой ткани. Полученные результаты дают новую информацию о зависимости количества и качества экзосом от тканевой принадлежности клеток, а также о клеточных механизмах их влияния на регенерацию, и открывают перспективы клинического применения экзосом, прежде всего от МСК костного мозга, для восстановления скелетных мышц.

СОДЕРЖАНИЕ

ОПРЕДЕЛЕНИЯ, СОКРАЩЕНИЯ И ОБОЗНАЧЕНИЯ	5
ОБЩЕЕ ВВЕДЕНИЕ	6
1 ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ЭКЗОСОМ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ	7
1.1 ВВЕДЕНИЕ	7
1.2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ	8
1.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	10
1.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ	14
2. ОЦЕНКА РЕГЕНЕРАТИВНОГО ПОТЕНЦИАЛА ЭКЗОСОМ НА МОДЕЛЯХ <i>IN VITRO</i>	15
2.1 ВВЕДЕНИЕ	15
2.2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ	15
2.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	16
2.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ	19
ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ	20
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	21
ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ГЗ ЗА 2018 ГОД	24

ОПРЕДЕЛЕНИЯ, СОКРАЩЕНИЯ И ОБОЗНАЧЕНИЯ

В настоящем отчете о НИР применяют следующие сокращения и обозначения:

Анализ траекторий наночастиц - метод мультипараметрической характеристики субмикронных частиц в коллоидных растворах, основанный на отслеживании траекторий броуновского движения.

Мезенхимные стромальные клетки – гетерогенная популяция стволовых и родоначальных клеток, обладающих множественными потенциями к дифференцировке в клеточные элементы тканей мезенхимного происхождения.

Микровезикулы – внеклеточные везикулы диаметром 20-1000 нм, образующиеся путем выпячивания и отпочкования участков плазматической мембраны.

микроРНК – малые некодирующие молекулы РНК, участвующие в транскрипционной и посттранскрипционной регуляции экспрессии генов путём РНК-интерференции.

Экзосомы – внеклеточные везикулы диаметром около 40-100 нм, образующиеся внутри мультивезикулярных эндосомальных телец.

В настоящем отчете о НИР применяют следующие сокращения и обозначения:

ЖТ – жировая ткань

ИТС – инсулин-трансферрин-селенит

КМ – костный мозг

М – мышцы

МСК – мезенхимные стромальные клетки

ПМ – поврежденные мышцы

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ЭДТА – этилендиаминтетраацетат

FCS – фетальная телячья сыворотка (fetal calf serum)

miR – микроРНК (microRNA)

NTA – анализ траекторий наночастиц (nanoparticle tracking analysis)

TGF- β 1 – трансформирующий фактор роста β 1 (transforming growth factor β 1)

ОБЩЕЕ ВВЕДЕНИЕ

Фундаментальные исследования по выяснению клеточных и молекулярных механизмов восстановительных процессов в поврежденных тканях создают основу для развития регенеративной медицины, усилия которой направлены на нормализацию структурно-функционального состояния тканей и органов при их патологических изменениях различного генеза. Активная разработка этого направления исследований позволила наметить новые подходы к повышению эффективности восстановительной терапии. В частности, пристальное внимание исследователей привлекает возможность активации регенеративного потенциала тканей с помощью экзосом – внеклеточных везикул, содержащих широкий набор регуляторных молекул и способных передавать их клеткам-мишеням. Передача биологической информации с помощью внеклеточных везикул в настоящее время рассматривается как одно из важнейших средств межклеточной коммуникации, обеспечивающее различные биологические процессы, в том числе связанные с регенерацией. Изучение различных аспектов формирования внеклеточных везикул и их регуляторного влияния на клетки является актуальной общебиологической задачей и открывает большие перспективы для их использования в клинической практике.

Экзосомы, полученные от различных популяций стволовых клеток, неоднократно показали свою терапевтическую эффективность на экспериментальных моделях повреждения различных тканей, однако их регенеративные свойства в отношении скелетных мышц требуют дальнейшего изучения. Остается открытым и вопрос о зависимости количества и качества экзосом от тканевой принадлежности продуцирующих их клеток, имеющий существенное значение для выбора источника экзосом с целью разработки препаратов, стимулирующих регенерацию.

В связи с вышеизложенным, целью исследования явился поиск оптимальных источников экзосом для стимуляции восстановления мышечной ткани. Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

- 1) Сравнительный анализ экзосом из кондиционированных сред от мезенхимных стромальных клеток (МСК) из костного мозга и жировой ткани, а также фибробластов нормальных и поврежденных скелетных мышц. Определение содержания и состава экзосом в полученных образцах.

- 2) Оценка влияния экзосом из разных источников на миогенез и фиброз на моделях *in vitro*.

1 ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ЭКЗОСОМ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ

1.1 ВВЕДЕНИЕ

Одним из наиболее перспективных источников экзосом для применения в регенеративной медицине являются МСК, которые согласно критериям, разработанным Международным обществом клеточной терапии, определяются как адгезивные к пластику клетки, экспрессирующие поверхностные антигены CD73, CD90 и CD105, лишённые кроветворных маркеров и обладающие потенциями к дифференцировке в остеогенном, адипогенном и хондрогенном направлениях [1]. МСК участвуют в регенеративных процессах главным образом за счёт паракринной секреции широкого спектра биологически активных молекул - цитокинов, хемокинов, ростовых факторов и молекул внеклеточного матрикса, которые участвуют в поддержании тканевого гомеостаза, модулируют иммунные реакции, стимулируют выживание, пролиферацию и дифференцировку клеток, усиливают ангиогенез и предотвращают фиброз [2, 3]. Благотворное влияние трансплантации МСК на структурно-функциональное восстановление показано при повреждениях или заболеваниях многих тканей и органов, включая головной мозг [4], кожу [5, 6], сердце [7], почки [8], печень [9], костную ткань [10], а также скелетные мышцы [6, 11, 12, 13].

Ключевыми компонентами секрета МСК, во многом опосредующими их регенеративные эффекты, являются внеклеточные везикулы, среди которых присутствуют микровезикулы [14] и экзосомы [15]. Они содержат различные белки и нуклеиновые кислоты (мРНК, микроРНК, ДНК) и способны переносить их в клетки-мишени, оказывая на последние регуляторное действие [16]. Как было неоднократно показано в экспериментах на животных, регенеративный эффект введения везикул, полученных от МСК, сопоставим с таковым при трансплантации самих МСК [5, 8], причем экзосомы, по некоторым данным, обладают большей терапевтической эффективностью по сравнению с микровезикулами от тех же клеток [17]. В этой связи введение в поврежденную ткань экзосом, полученных от МСК, представляется хорошей альтернативой трансплантации клеток: их легче хранить и транспортировать, чем клеточные культуры, они не иммуногенны и не вызывают образования опухолей.

МСК широко распространены по организму и могут быть выделены из многих тканей. Перспективными для клинического применения являются такие их источники, как костный мозг и жировая ткань в связи с доступностью материала и сравнительной малоинвазивностью процедуры его получения [18]. Различные популяции стромальных клеток, одни из которых по фенотипическим и функциональным характеристикам близки

к МСК, а другие обладают более узким дифференцировочным потенциалом, присутствуют в скелетных мышцах, оказывая паракринное трофическое влияние на миогенные клетки [13]. При травмах число этих клеток в мышце возрастает, что может указывать на их участие в регенерации [19]. Стромальные клетки из всех вышеперечисленных источников представляют интерес с точки зрения возможности получения от них экзосом для потенциального использования в регенеративной медицине. При этом комплексное сравнение количества и свойств экзосом, продуцируемых этими клетками, ранее не проводилось.

В настоящем исследовании были выделены экзосомы из сред, кондиционированных МСК костного мозга и жировой ткани, а также фибробластами интактных и поврежденных мышц крысы, и проведен сравнительный анализ полученных образцов по концентрации и размерам везикул, общему содержанию в них белка, а также по присутствию ряда микроРНК, участвующих в регуляции миогенеза.

1.2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

1. Клетки для получения экзосом выделяли из костного мозга, жировой ткани и мышц задних конечностей половозрелых крыс Wistar. Для выделения клеток из поврежденных мышц за 4 суток до взятия материала мышцу травмировали путем глубокого разреза с последующим наложением швов. Клетки костного мозга вымывали из диафизов бедренных и большеберцовых костей средой DMEM, а клетки жировой ткани, интактных и поврежденных мышц выделяли обработкой тканевых фрагментов 0,2%-ным раствором коллагеназы (40 мин при 37°C). Выделенные клетки культивировали в среде DMEM с 10% фетальной телячьей сыворотки (FCS) до образования монослоя, после чего снимали раствором трипсина с ЭДТА и пересевали с плотностью $1 \times 10^4 - 1 \times 10^5$ клеток/мл.

2. Кондиционированную среду собирали от клеток 2-го, 3-го и 4-го пассажей следующим образом. По достижении 70-90% конfluence среды заменяли на бессывороточную DMEM, к которой добавляли 2% 50-кратного инсулин-трансферрин-селенита (ИТС). Через 2 суток среду собирали и центрифугировали в течение 30 мин при 2 000 g и 4°C для очистки от клеточного дебриса, супернатант повторно центрифугировали в течение 30 мин при 10 000 g и 4°C для удаления крупных везикул и пропускали через фильтр с размером пор 0,22 мкм.

3. Экзосомы выделяли с помощью ультрацентрифугирования полученной среды в течение 1,5 ч при 110 000g и 4°C. Общее содержание белка в образцах определяли методом Брэдфорда [20]. Распределение частиц по размеру оценивали методом анализа траекторий наночастиц (NTA) с использованием прибора NanoSight LM10 HS-BF (Nanosight Ltd, Великобритания), оснащенного лазерным источником с длиной волны 405

нм мощностью 65 мВт и высокочувствительной камерой типа EMCCD Andor Luca, и программного обеспечения Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) Version 2.3 Build 0033. Результаты измерений подвергали статистической обработке, достоверность различий оценивали по критерию Манна-Уитни.

4. Методом ПЦР в реальном времени оценивали присутствие в экзосомах микроРНК miR27b, miR181 и miR494, участвующих, по имеющимся данным, в регуляции миогенной дифференцировки и регенерации мышц [21-23]. МикроРНК выделяли из образцов набором mirVana™ miRNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, США), обратную транскрипцию микроРНК проводили с помощью набора TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, США). ПЦР проводили в термоциклере ABI Prism 7500 PCR system (Applied Biosystems, США) с использованием праймеров, указанных в таблице 1.1. Программа реакции включала 1 цикл денатурации при 95°C в течение 3 мин, 40 циклов денатурации при 95°C в течение 15 с и совмещенный этап отжига-синтеза при 60°C в течение 1 мин.

Таблица 1.1 - Последовательности праймеров, использованных для ПЦР в реальном времени

микроРНК	Последовательность праймеров
hno-miR-27b-3p	RT = GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGAC GCAGAAC F = TATCCAGTGCAGGGTCCGA R = TTCACAGTGGCTAAGTTC TaqMan = FAM-TCGCACTGGATACGACGCAGAA-BHQ1
hno-miR-181a-5p	RT = GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGAC ACTCACC F = TATCCAGTGCAGGGTCCGA R = AACATTCAACGCTGTCTG TaqMan = FAM-CGCACTGGATACGACACTCACCG-BHQ1
hno-miR-494-3p	RT = GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGAC AGAGGTT F = TATCCAGTGCAGGGTCCGA R = TGAAACATACACGGGAAAC TaqMan = FAM-TCGCACTGGATACGACAGAGGTTTC-BHQ1

1.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Анализ образцов экзосом, выделенных из сред, кондиционированных клетками из всех использованных источников, показал присутствие в них частиц экзосомального размера. Средний диаметр частиц в различных образцах составлял от 109 до 151 нм. Типичные графики распределения частиц по размеру в образцах, полученных из разных источников, приведены на рисунках 1.1 – 1.4. Характер этого распределения не обнаруживал существенной зависимости от тканевой локализации клеток, использованных для получения экзосом.

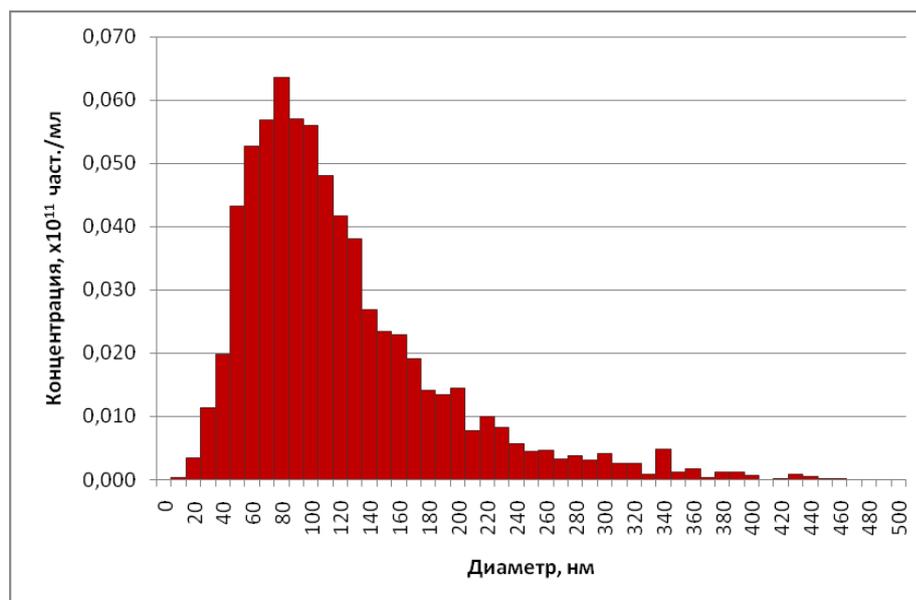


Рисунок 1.1 - NTA-анализ образцов экзосом от МСК костного мозга 2-го пассажа.

Средний размер – 115 ± 5 нм. Концентрация – $0,7 \pm 0,06 \times 10^{11}$ частиц/мл

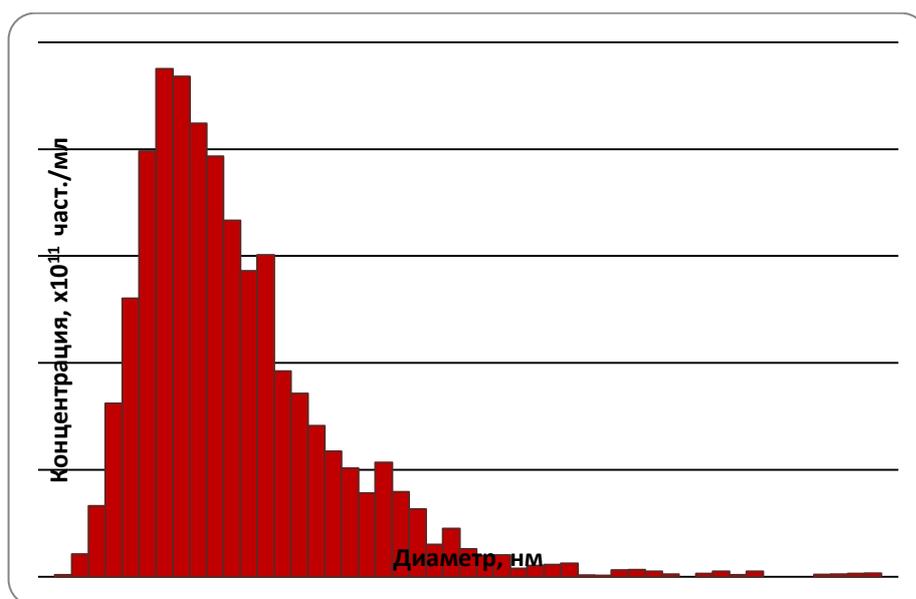


Рисунок 1.2. - NTA-анализ образцов экзосом от МСК жировой ткани 3-го пассажа.

Средний размер – 110 ± 8 нм. Концентрация – $0,25 \pm 0,02 \times 10^{11}$ частиц/мл

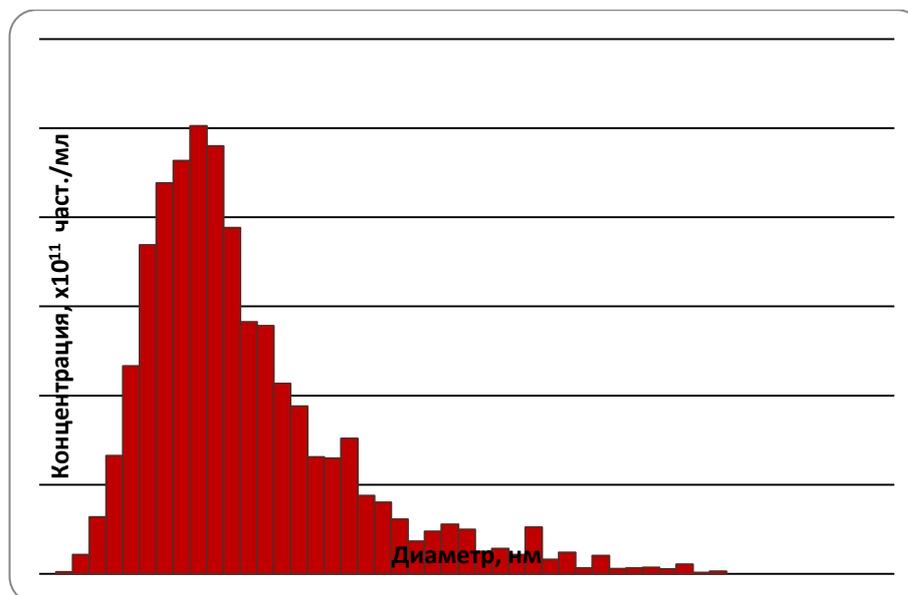


Рисунок 1.3. - NTA-анализ образцов экзосом от фибробластов интактных мышц 2-го пассажа. Средний размер – 113 ± 6 нм. Концентрация – $0,51 \pm 0,04 \times 10^{11}$ частиц/мл

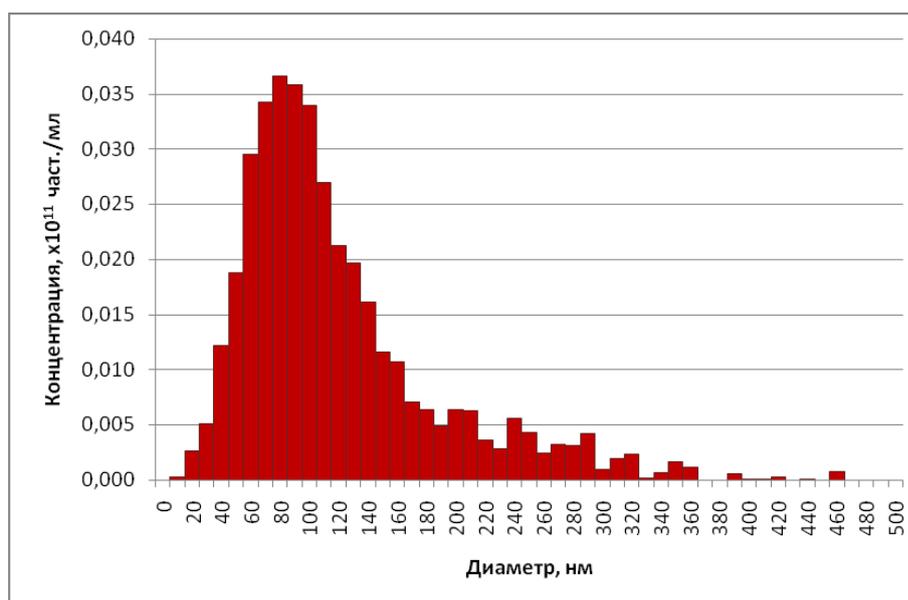


Рисунок 1.4. - NTA-анализ образцов экзосом от фибробластов поврежденных мышц 2-го пассажа. Средний размер – 116 ± 11 нм. Концентрация – $0,39 \pm 0,03 \times 10^{11}$ частиц/мл

На рисунке 1.5 приведены средние значения диаметра частиц, определенные для каждого источника по всем выделенным из него образцам экзосом. Как можно видеть, существенные различия между ними отсутствовали. Таким образом, внеклеточные везикулы с характерными для экзосом размерами были успешно выделены из сред, кондиционированных как МСК костного мозга и жировой ткани, так и фибробластами скелетных мышц, в том числе регенерирующих после повреждения.

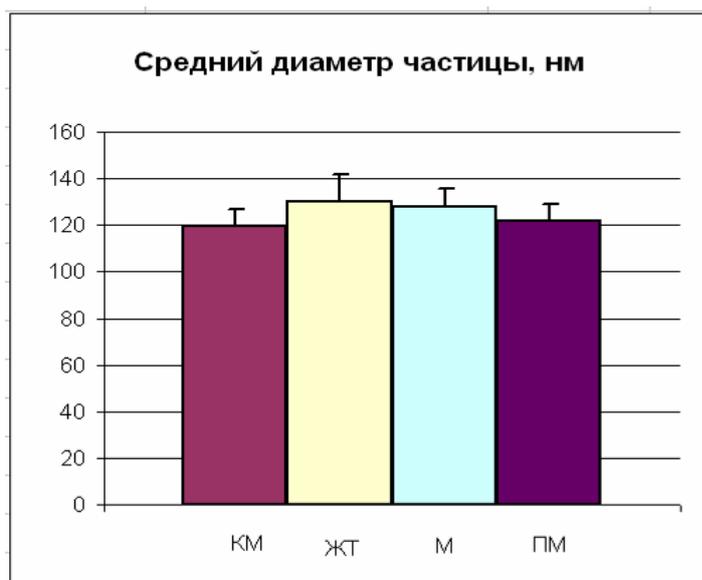


Рисунок 1.5 - Средний диаметр частиц в образцах экзосом, полученных от МСК костного мозга (КМ), МСК жировой ткани (ЖТ), фибробластов интактных мышц (М) и фибробластов поврежденных мышц (ПМ).

2. В таблице 1.2 приведены данные о количестве везикул в образцах, полученные с помощью NTA, а также об общем содержании в них белка, определенном по методу Брэдфорда.

Таблица 1.2 – Количество частиц и общего белка в полученных образцах экзосом

Источник клеток	Содержание везикул, $\times 10^{11}$ частиц/мл	Содержание белка, мкг/мл
Костный мозг	0,49 \pm 0,15	490 \pm 39
Жировая ткань	1,32 \pm 0,99	507 \pm 78
Нормальные мышцы	1,24 \pm 0,50	637 \pm 67
Поврежденные мышцы	0,87 \pm 0,34	650 \pm 64

Количество белка в образцах экзосом, полученных от МСК костного мозга, было достоверно ($p < 0,01$) меньшим, чем в образцах от фибробластов интактных или поврежденных мышц. Оценка содержания везикул в полученных образцах также показала, что МСК из костного мозга являются менее продуктивным источником экзосом, чем клетки из остальных источников. При этом, в отличие от клеток из жировой ткани, нормальных или поврежденных мышц, от которых экзосомы могли быть успешно получены на 2-м, 3-м и 4-м пассажах, в культурах МСК костного мозга уже на 3-м

пассаже содержание везикул в кондиционированной среде значительно снижалось и выделение из нее экзосом становилось нецелесообразным.

3. Анализ экспрессии микроРНК, проведенный методом ПЦР в реальном времени (результаты показаны на рисунке 1.6), выявил в экзосомах от МСК костного мозга значительно более высокое по сравнению с экзосомами от МСК жировой ткани и фибробластов интактных мышц содержание miR494, которая, по имеющимся данным, влияет на дифференцировку миобластов, регулируя биогенез митохондрий [23]. В экзосомах от фибробластов поврежденных мышц уровень этой микроРНК также был значительно повышен по сравнению с таковым в экзосомах из интактных мышц, что может отражать участие стромальных клеток мышечной ткани в ее репаративной регенерации посредством продукции экзосом. Другие проанализированные микроРНК - miR27b, активирующая пролиферацию миобластов [21, 23], и miR181, стимулирующая миогенную дифференцировку [22], регулирующая регенерацию мышц [21] и их адаптацию к физической нагрузке [23] – в значительном количестве содержались только в экзосомах от МСК костного мозга, тогда как в образцах из остальных источников они практически отсутствовали.

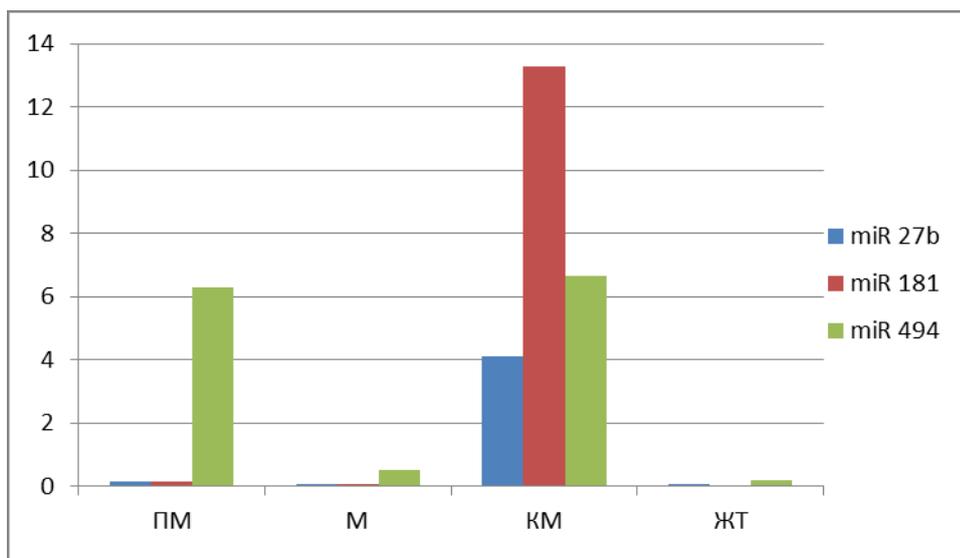


Рисунок 1.6 – Содержание микроРНК (в числе копий на мкг) в образцах экзосом, полученных от фибробластов поврежденных (ПМ) и интактных (М) мышц, МСК костного мозга (КМ) и жировой ткани.

Таким образом, по содержанию микроРНК, регулирующих развитие и регенерацию мышечной ткани, экзосомы от МСК из костного мозга превосходили выделенные из остальных исследованных источников. Это может указывать на их наибольший

регенеративный потенциал в отношении скелетных мышц, хотя данное предположение нуждается в дополнительной экспериментальной проверке.

1.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о том, что экзосомы в том или ином количестве могут быть выделены из секретомов стромальных клеток различной тканевой принадлежности. Сравнительный анализ экзосом, полученных от МСК костного мозга и жировой ткани, а также от фибробластов скелетных мышц, в том числе регенерирующих после повреждения, не выявил существенных различий между этими источниками по среднему размеру везикул. Судя по количеству частиц и общему содержанию в них белка, наименьшим выходом экзосом характеризовались культуры МСК из костного мозга, однако полученные от них экзосомы превосходили остальные по содержанию микроРНК, участвующих в регуляции миогенеза (miR27b, miR181, miR494), что дает основания рассматривать МСК костного мозга в качестве перспективного источника экзосом для регенерации мышц.

2. ОЦЕНКА РЕГЕНЕРАТИВНОГО ПОТЕНЦИАЛА ЭКЗОСОМ НА МОДЕЛЯХ

IN VITRO

2.1 ВВЕДЕНИЕ

Травмы скелетных мышц представляют собой актуальную медицинскую проблему, так как могут приводить к значительному ухудшению сократительной способности вследствие образования рубцов. Перспективным подходом к регенерации поврежденной мышечной ткани является использование клеточных технологий. Подобные технологии восстановления различных тканей и органов с применением стволовых клеток и их секреторных продуктов, в том числе экзосом, в настоящее время активно развиваются и внедряются в медицинскую практику [24, 25]. Результаты экспериментов на животных свидетельствуют о перспективности применения экзосом от МСК для коррекции многих патологических состояний [26-30], в том числе, согласно некоторым сообщениям, и повреждения скелетных мышц [31]. Однако для успешного клинического применения экзосом при повреждении мышц требуются дальнейшие исследования, так как имеющихся данных недостаточно для получения всестороннего представления о характере влияния экзосом на восстановительные процессы в этой ткани.

Хотя окончательное заключение о возможности использования экзосом от МСК для стимуляции восстановления мышечной ткани требует проведения экспериментов *in vivo* на тех или иных моделях ее повреждения у животных, при анализе регенеративного потенциала экзосом целесообразно использовать также и экспериментальные модели *in vitro*. Они удобны для предварительного тестирования образцов экзосом, полученных из различных источников, и позволяют получить информацию об их влиянии на конкретные клеточные популяции, вовлеченные в комплексный процесс восстановления травмированной мышцы (миогенные предшественники, фибробласты и т.д.).

В настоящем исследовании на моделях миогенеза и фиброза *in vitro* был проведен анализ соответственно промиогенного и антифибротического эффектов экзосом, полученных от МСК костного мозга и жировой ткани, а также от фибробластов интактных и поврежденных мышц крысы.

2.2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

1. Влияние экзосом на миогенез оценивали на модели спонтанной дифференцировки первичных миобластов. Клетки выделяли из мышц задних конечностей 9-дневных детенышей крыс Wistar путем обработки 0,2%-ным раствором коллагеназы (30 мин, 37°C), и культивировали на покрытых фибронектином 24-луночных платах в среде DMEM с 10% FCS. Плотность посева составляла 5×10^5 клеток/мл. Через 3 и 6 суток после

посева проводили смену среды с добавлением 50 мкг/мл экзосом; в контрольные лунки экзосомы не добавляли. После 10 суток роста клетки фиксировали 96⁰-ным спиртом, окрашивали азур-эозином и подсчитывали под микроскопом число миотуб на лунку.

2. Антифибротический эффект экзосом оценивали на модели образования фиброзных узелков в культуре фибробластов, индуцированного TGFβ1 [32]. Фибробласты из мышц задних конечностей половозрелых крыс культивировали в среде DMEM с 10% FCS в течение 2 пассажей, после чего пересеивали на покровные стекла. Через сутки после посева среду сменяли на DMEM с 1% FCS, культивировали клетки еще 24 ч, а затем добавляли TGFβ1 в концентрации 10 нг/мл и экзосомы в концентрации 50 мкг/мл либо 200 мкг/мл. К контрольным культурам добавляли только TGFβ1 без экзосом. На следующий день ко всем культурам добавляли еще 10 нг/мл TGFβ1, а еще через сутки их фиксировали 96⁰-ным спиртом и окрашивали по Маллори для визуализации отложений коллагена в фиброзных узелках. Узелки подсчитывали под микроскопом при увеличении x40.

3. Результаты обрабатывали статистически, определяя среднее число миотуб на лунку и среднее число фиброзных узелков на поле зрения. Достоверность различий в числе миотуб оценивали по критерию Манна-Уитни, а в числе узелков ввиду большого объема выборки – по критерию Стьюдента.

2.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. При посеве клеток из мышц детенышей крысы в первичную культуру происходила их спонтанная миогенная дифференцировка с образованием симпластов, содержащих от 2 - 3 до 10 и более ядер. Симпласты имели характерную для скелетно-мышечных миотуб вытянутую, реже – разветвленную форму и располагались поодиночке либо небольшими рыхлыми кластерами. При добавлении экзосом от МСК костного мозга и в меньшей степени – от МСК жировой ткани отмечалась тенденция к увеличению численности образующихся миотуб по сравнению с контрольными культурами, тогда как экзосомы от фибробластов интактных и поврежденных мышц, по предварительным данным, на число миотуб практически не влияли (рисунок 2.1). Кроме того, в присутствии экзосом от МСК костного мозга чаще по сравнению с контролем наблюдалось расположение миотуб кластерами, а сами миотубы выглядели более узкими и длинными, что может свидетельствовать об их большей зрелости (рисунок 2.2).

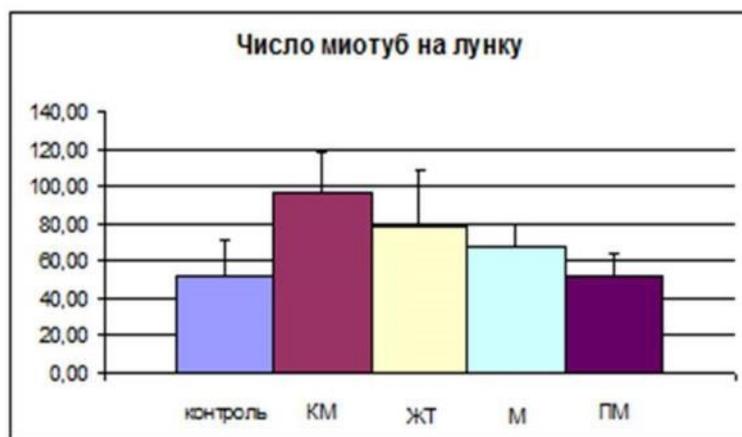


Рисунок 2.1 – Влияние экзосом (50 мкг/мл) на миогенез в первичной культуре миобластов. Источники экзосом: КМ – МСК костного мозга, ЖТ – МСК жировой ткани, М – фибробласты интактных мышц, ПМ – фибробласты поврежденных мышц.

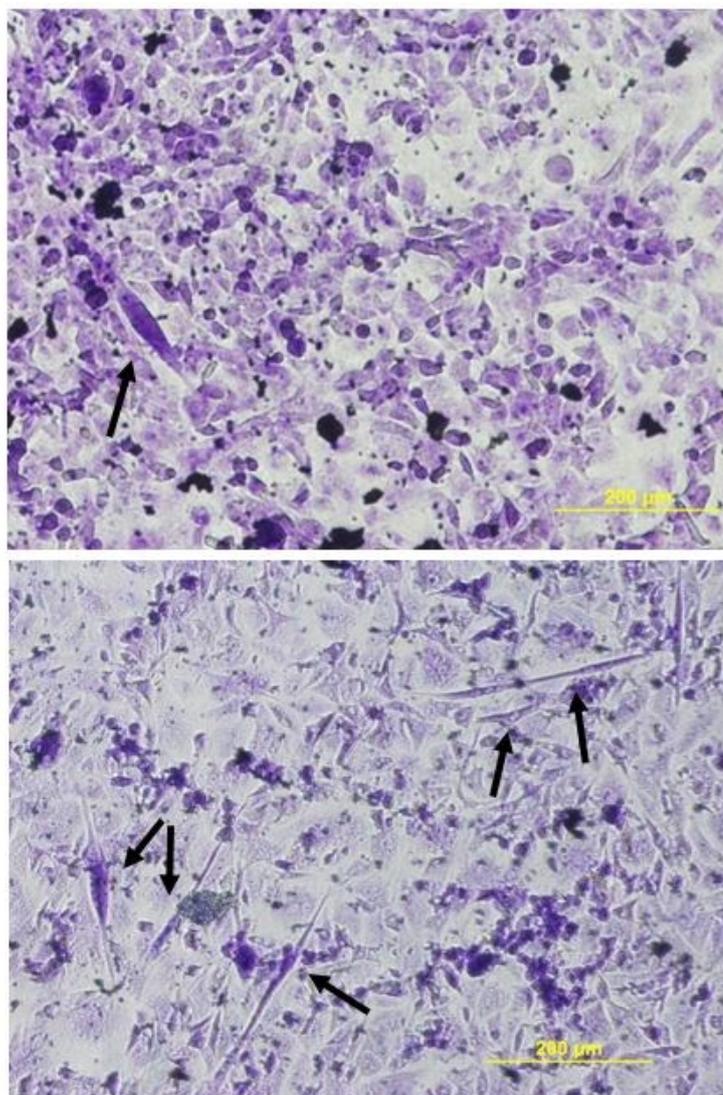


Рисунок 2.2 – Морфология миотуб, образовавшихся в первичной культуре миобластов: а – в отсутствие экзосом; б – в присутствии 50 мкг/мл экзосом от МСК костного мозга. 10 суток культивирования. Окрашивание азур-эозином. Масштабный отрезок 200 мкм.

Миотубы показаны стрелками.

2. Добавление $TGF\beta 1$ к культуре фибробластов, выделенных из мышц половозрелых крыс, приводило к тому, что спустя 2 суток в ней появлялись фиброзные узелки. Они представляли собой плотные скопления из десятков клеток, содержащие внеклеточный матрикс, который окрашивался по Маллори в синий цвет, что характерно для отложений коллагена (рисунок 2.3).

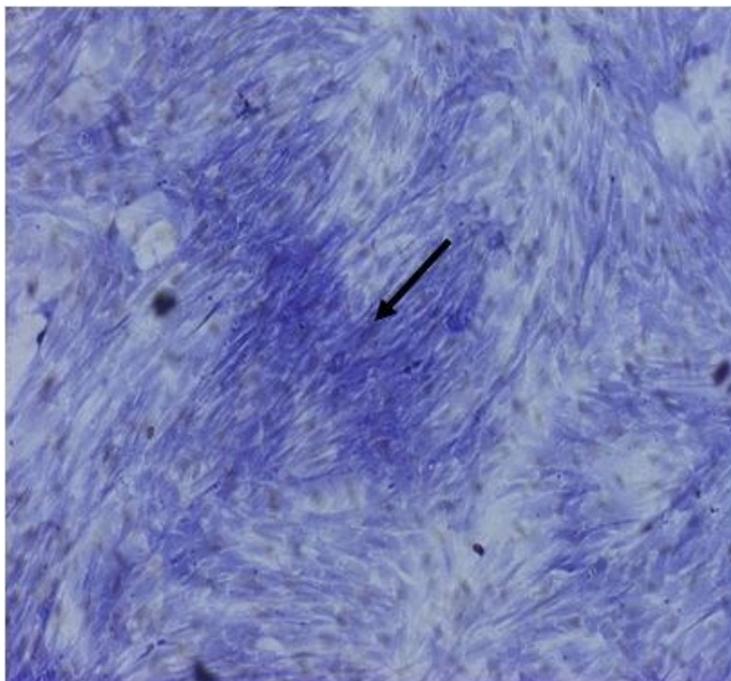


Рисунок 2.3 – Фиброз, индуцированный в культуре фибробластов из скелетных мышц добавлением 10 нг/мл $TGF\beta 1$. 2 суток индукции. Окрашивание по Маллори. Увел.: об. x4, ок. x10. Фиброзный узелок показан стрелкой.

Экзосомы из всех исследованных источников, добавленные в концентрации 50 мкг/мл, достоверно ($p < 0,001$) уменьшали число образующихся узелков по сравнению с контролем. При этом наиболее выраженный антифибротический эффект оказывали экзосомы от МСК костного мозга и фибробластов интактных мышц. В то же время экзосомы от фибробластов из поврежденных мышц предотвращали образование фиброзных узелков менее эффективно, чем полученные от клеток мышц в отсутствие повреждения, причем различия были достоверны при $p < 0,05$ (рисунок 2.4). Полученные данные ставят под сомнение способность резидентных стромальных клеток обеспечивать полноценную, без образования рубца, регенерацию скелетных мышц; вопрос о характере влияния этих клеток и их секреторных продуктов, включая экзосомы, на процесс развития посттравматического фиброза требует дальнейшего исследования.

Следует отметить, что экзосомы из всех сравниваемых источников, добавленные к культуре обработанных $TGF\beta 1$ фибробластов в концентрации 200 мкг/мл, вызывали гибель значительного числа клеток, что не позволяло провести подсчет фиброзных

узелков. Это наблюдение согласуется с данными других авторов, также сообщавших о цитотоксичности экзосом в высоких концентрациях [33].



Рисунок 2.4 – Влияние экзосом на выраженность индуцированного TGFβ1 фиброза в культуре фибробластов из мышц. Источники экзосом: КМ – МСК костного мозга, ЖТ – МСК жировой ткани, М – фибробласты intactных мышц, ПМ – фибробласты поврежденных мышц.

2.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Тестирование экзосом из различных источников на экспериментальных моделях *in vitro* показало, что все они обладают способностью ингибировать развитие фиброза, а экзосомы от МСК костного мозга и жировой ткани, кроме того, усиливают дифференцировку миогенных клеток. Сравнение выраженности промиогенного и антифибротического эффектов экзосом, полученных от клеток различной тканевой локализации, приводит к предварительному выводу, что оптимальным источником экзосом для комплексного воздействия на регенерирующую мышечную ткань являются МСК костного мозга, тогда как фибробласты из поврежденных мышц, по-видимому, наименее пригодны для этой цели.

ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о возможности использования МСК костного мозга и жировой ткани, а также фибробластов интактных и поврежденных мышц для получения экзосом, обладающих регенеративным потенциалом в отношении скелетной мышечной ткани. Судя по содержанию микроРНК, участвующих в регуляции миогенной дифференцировки и регенерации мышц, а также по выраженности промиогенного и антифибротического эффектов в соответствующих экспериментальных системах *in vitro*, экзосомы от МСК костного мозга наиболее перспективны как ресурс для восстановления мышечной ткани, хотя практическое использование этого источника затруднено низким выходом экзосом.

Поставленные задачи полностью выполнены. На основании полученных данных выбран оптимальный источник экзосом для дальнейшего исследования их регенеративного потенциала *in vivo* – МСК костного мозга. Проведенное исследование находится в русле современных тенденций мировой биомедицинской науки, выполнено на высоком теоретическом и методическом уровне и обладает несомненной актуальностью. Его результаты имеют существенное значение для понимания биологической роли экзосом, проясняют механизмы их влияния на тканевую регенерацию и открывают перспективы для использования экзосом в клинической практике при травмах и заболеваниях мышц.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D., Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement//Cytotherapy. - 2006. - V. 8. - N 4. P. 315 - 317.
2. Caplan A.I. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight//J. Pathol. - 2009. - V. 217. - N 2. - P. 318 - 324.
3. Паюшина О.В. Локализация и функции мезенхимных стромальных клеток *in vivo*//Журн. общ. биологии. – 2015. - Т. 76. - N 2. - С. 161 - 172.
4. Namestnikova D., Gubskiy I.L., Revkova V.A., Sukhinich K.K., Melnikov P.A., Cherkashova E.A., Gabashvili A.N., Vitushev E.Y., Kalsin V.A., Bukharova T.B., Gubsky L.V., Chekhonin V.P., Golshtein D.V., Kisilev S.L., Baklaushev V.P. Yarygin K.N. A comparative study of mesenchymal stem cell, IPS-derived neural progenitor cells and directly reprogrammed neural progenitor cells in treatment of ischemic stroke in rats//Int. J. Stroke. - 2018. - V. 13. - N 2_suppl. – P. 81 - 82.
5. Zhang B., Wang M., Gong A., Zhang X., Wu X., Zhu Y., Shi H., Wu L., Zhu W., Qian H., Xu W. HucMSC-exosome mediated-Wnt4 signaling is required for cutaneous wound healing//Stem Cells. - 2015. - V. 33. P. 2158 - 2168.
6. Новокрещенова А.Н., Буторина Н.Н., Паюшина О.В., Шевелева О.Н., Домарацкая Е.И. Мезенхимные стромальные клетки из жировой ткани как ресурс для регенерации кожи и мышц//В поисках моделей персонализированной медицины. Сборник научных трудов V Международной конференции «ПОСТГЕНОМ’2018» (29.10-02.11.2018 г., Казань). - Казань: Издательство Казан. ун-та, 2018. - С. 121.
7. Yoon Y.S., Wecker A., Heyd L., Park J.S., Tkebuchava T., Kusano K., Hanley A., Scadova H., Qin G., Cha D.H., Johnson K.L., Aikawa R., Asahara T., Losordo D.W. Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction//J. Clin. Invest. - 2005. - V. 115. - P. 326 - 338.
8. Bruno S., Grange C., Collino F., Deregibus M.C., Cantaluppi V., Biancone L., Tetta C., Camussi G. Microvesicles derived from mesenchymal stem cells enhance survival in a lethal model of acute kidney injury//PloS One. - 2012 - V. 7 - P. e33115.
9. Fouraschen S.M., Pan Q., de Ruyter P.E., Farid W.R., Kazemier G., Kwekkeboom J., Ijzermans J.N., Metselaar H.J., Tilanus H.W., de Jonge J., van der Laan L.J. Secreted factors of human liver-derived mesenchymal stem cells promote liver regeneration early after partial hepatectomy//Stem Cells Dev. - 2012. - V. 21. - N 13. - P. 2410 - 2419.

10. Чайлахян Р.К., Герасимов Ю.В. Стволовые стромальные клетки костного мозга: экспериментальные исследования и применение в клинике//Медицинская иммунология. - 2004. - Т. 6. - N 3 - 5. - С. 201 - 205.
11. Andrade B.M., Baldanza M.R., Ribeiro K.C., Porto A., Peçanha R., Fortes F.S.A., Zapata-Sudo G., Campos-de-Carvalho A.C., Goldenberg R.C.S., Werneck-de-Castro J.P. Bone marrow mesenchymal cells improve muscle function in a skeletal muscle re-injury model//PLoS One. - 2015. - V. 10. - N 6. - P. e0127561.
12. Домарацкая Е.И., Буторина Н.Н., Паюшина О.В., Шевелёва О.Н. Мезенхимные стромальные клетки: миогенные потенции и участие в регенерации скелетных мышц//II Международная конференция “StemCellBio-2018: Фундаментальная наука как основа трансляционной медицины” (15-17.11.2018 г., г. Санкт-Петербург). Сборник материалов. – М., 2018. - С. 32.
13. Паюшина О.В., Домарацкая Е.И., Шевелева О.Н. Участие мезенхимных стромальных клеток в регенерации мышечной ткани//Журн. общ. биологии. - 2019 (в печати).
14. Akyurekli C., Le Y., Richardson R.B., Fergusson D., Tay J., Allan D.C.. A systematic review of preclinical studies on the therapeutic potential of mesenchymal stromal cell-derived microvesicles//Stem Cell Rev. - 2015. - V. 11. - P. 150 - 160.
15. Lai R.C., Yeo R.W., Lim S.K. Mesenchymal stem cell exosomes//Semin. Cell. Dev. Biol. – V. 40. – P. 82 - 88.
16. Шевелева О.Н., Домарацкая Е.И., Паюшина О.В. Внеклеточные везикулы и перспективы их использования для регенерации тканей//Биол. мембраны. - 2019 (в печати).
17. Collino F., Pomatto M., Bruno S., Lindoso R. S., Tapparo M., Sicheng W., Quesenberry P., Camussi G. Exosome and microvesicle-enriched fractions isolated from mesenchymal stem cells by gradient separation showed different molecular signatures and functions on renal tubular epithelial cells//Stem Cell Rev. - 2017. - V. 13. - P. 226 - 243.
18. Li C.Y., Wu X.Y., Tong J.B., Yang X.X., Zhao J.L., Zheng Q.F., Zhao G.B., Ma Z.J. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue under xeno-free conditions for cell therapy// Stem Cell Res. Ther. - 2015. - V. 6. - P. 55.
19. Jackson W.M., Lozito T.P., Djouad F., Kuhn N.Z., Nesti L.J., Tuan R.S. Differentiation and regeneration potential of mesenchymal progenitor cells derived from traumatized muscle tissue//J. Cell. Mol. Med. - 2011. - V. 15. - N 11. - P. 2377 - 2388.
20. Kruger N.J. The Bradford method for protein quantitation// Methods Mol. Biol. – 1994. – V. 32. P. 9 - 15.

21. Quattrocelli M., Sampaolesi M. The mesmiRizing complexity of microRNAs for striated muscle tissue engineering//*Adv. Drug Deliv. Rev.* - 2015. - V. 88. - P. 37 - 52.
22. Wand H., Wang B. Extracellular vesicle microRNAs mediate skeletal muscle myogenesis and disease// *Biomed. Rep.* - 2016. - V. 5. - P. 296 -300.
23. Diniz G.P., Wang D.Z. Regulation of skeletal muscle by microRNAs//*Compr. Physiol.* -2016. - V. 6. - N 3. - P. 1279 - 1294.
24. Vasiliev A.V., Tomilin A.N., Malygina T.O. The second international conference “Cell Technologies at The Edge: Research and Practice” (CTERP) “Translational Research in Cell Therapy”, Moscow, April 11-13, 2018//*Онтогенез.* - 2018. - Т. 49. - N 4S. - С. 3 - 54.
25. Borges F.T., Convento M.B., Schor N. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cell: what next?//*Stem Cells Cloning.* - 2018 – V. 11. – P.77 - 83.
26. Lou G., Chen Z., Zheng M., Liu Y. Mesenchymal stem cell-derived exosomes as a new therapeutic strategy for liver diseases//*Exp. Mol. Med.* - 2017. - V. 49. - N 6. - P. e346.
27. Wang B., Jia H., Zhang B., Wang J., Ji C., Zhu X., Yan Y., Yin L., Yu J., Qian H., Xu W. Pre-incubation with hucMSC-exosomes prevents cisplatin-induced nephrotoxicity by activating autophagy//*Stem Cell Res. Ther.* - 2017. - V. 8. - N 1. - P. 75.
28. Suzuki E., Fujita D., Takahashi M., Oba S., Nishimatsu H. Therapeutic effects of mesenchymal stem cell-derived exosomes in cardiovascular disease//*Adv. Exp. Med. Biol.* - 2017. - V. 998. - P. 179 - 185.
29. Xiong Y., Mahmood A., Chopp M. Emerging potential of exosomes for treatment of traumatic brain injury//*Neural Regen. Res.* - 2017. - V. 12. - N 1. - P. 19 - 22.
30. Zhang J., Guan J., Niu X., Hu G., Guo S., Li Q., Xie Z., Zhang C., Wang Y. Exosomes released from human induced pluripotent stem cells-derived MSCs facilitate cutaneous wound healing by promoting collagen synthesis and angiogenesis//*J. Transl. Med.* - 2015. - V. 13. - P. 49.
31. Nakamura Y., Miyaki S., Ishitobi H., Matsuyama S., Nakasa T., Kamei N., Akimoto T., Higashi Y., Ochi M. Mesenchymal-stem-cell-derived exosomes accelerate skeletal muscle regeneration//*FEBS Lett.* - 2015. - V. 589. - N 11. - P. 1257 - 1265.
32. Xu Q., Norman J.T., Shrivastav S., Lucio-Cazana J., Kopp J.B. In vitro models of TGF-induced fibrosis suitable for high-throughput screening of antifibrotic agents//*Am. J. Physiol. Renal Physiol.* - 2007. - V. 293. - P. F631 - F640.
33. Choi J.S., Yoon H.I., Lee K.S., Choi Y.C., Yang S.H., Kim I.S., Cho Y.W. Exosomes from differentiating human skeletal muscle cells trigger myogenesis of stem cells and provide biochemical cues for skeletal muscle regeneration//*J. Control. Release.* - 2016. - V. 222. - P. 107 - 115.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ГЗ ЗА 2018 ГОД

*отчетные публикации

1. *Namestnikova D., Gubskiy I.L., Revkova V.A., Sukhinich K.K., Melnikov P.A., Cherkashova E.A., Gabashvili A.N., Vitushev E.Y., Kalsin V.A., Bukharova T.B., Gubsky L.V., Chekhonin V.P., Golshtein D.V., Kisilev S.L., Baklaushev V.P., Yarygin K.N. A comparative study of mesenchymal stem cell, IPS-derived neural progenitor cells and directly reprogrammed neural progenitor cells in treatment of ischemic stroke in rats//Int. J. Stroke. - 2018. - V. 13. - N 2_suppl. – P. 81 - 82. WOS:000448113301125. (WoS, Scopus).

2. *Vasiliev A.V., Tomilin A.N., Malygina T.O. The second international conference “Cell Technologies at The Edge: Research and Practice” (CTERP) “Translational Research in Cell Therapy”, Moscow, April 11-13, 2018//Онтогенез. - 2018. - Т. 49. - N 4S. - С. 3 - 54. DOI: 10.1134/S0475145018010081. (РИНЦ)

3. Паюшина О.В., Домарацкая Е.И., Шевелева О.Н. Участие мезенхимных стромальных клеток в регенерации мышечной ткани//Журн. общ. биологии. - 2019 (в печати).

4. Шевелева О.Н., Домарацкая Е.И., Паюшина О.В. Внеклеточные везикулы и перспективы их использования для регенерации тканей//Биол. мембраны. - 2019 (в печати).

Тезисы конференций

5. Новокрещенова А.Н., Буторина Н.Н., Паюшина О.В., Шевелева О.Н., Домарацкая Е.И. Мезенхимные стромальные клетки из жировой ткани как ресурс для регенерации кожи и мышц//В поисках моделей персонализированной медицины. Сборник научных трудов V Международной конференции «ПОСТГЕНОМ’2018» (29.10-02.11.2018 г., Казань). - Казань: Издательство Казан. ун-та, 2018. - С. 121.

6. Домарацкая Е.И., Буторина Н.Н., Паюшина О.В., Шевелёва О.Н. Мезенхимные стромальные клетки: миогенные потенции и участие в регенерации скелетных мышц//II Международная конференция “StemCellBio-2018: Фундаментальная наука как основа трансляционной медицины” (15-17.11.2018 г., г. Санкт-Петербург). Сборник материалов. – М., 2018. - С. 32.

Отчет утвержден Ученым советом ИБР РАН, протокол № 11 от 28 ноября 2018 г.