

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В. ЛОМОНОСОВА  
ФАКУЛЬТЕТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ МЕДИЦИНСКОГО  
НАУЧНО-ОБРАЗОВАТЕЛЬНОГО ИНСТИТУТА

*На правах рукописи*

**Кулебякина Мария Александровна**

**Механизмы влияния белков, секретируемых мезенхимными  
стволовыми клетками, на дифференцировку фибробластов в  
миофибробласты**

Специальность 1.5.4 Биохимия

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научные руководители:  
доктор медицинских наук  
Ефименко Анастасия Юрьевна,  
доктор биологических наук,  
профессор, академик РАН  
Ткачук Всеволод Арсеньевич

Москва – 2025

## Оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	8
Актуальность и степень разработанности темы исследования.....	8
Цель и задачи исследования .....	9
Научная новизна исследования .....	9
Теоретическая и практическая значимость .....	10
Методология и методы исследования.....	10
Степень достоверности полученных результатов .....	10
Апробация работы.....	11
Личный вклад автора в проведение исследования .....	11
Публикации.....	11
Основные положения, выносимые на защиту.....	13
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	14
Клеточные механизмы репаративной регенерации тканей .....	14
Дифференцировка фибробластов в миофибробласты .....	15
Сигнальные пути, регулирующие дифференцировку фибробластов в миофибробласты .....	17
Канонический сигнальный путь TGF- $\beta$ .....	17
Канонический сигнальный путь WNT.....	20
Сигнальный путь NF- $\kappa$ B.....	23
Канонический сигнальный путь NOTCH .....	26
Роль МСК в регуляции процессов заживления ткани.....	30
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	33
Клеточные культуры.....	33

Сбор кондиционированной среды и получение фракций секретома МСК .....	34
Анализ траекторий наночастиц .....	35
Моделирование дифференцировки фибробластов в миофибробласты .....	35
Иммуноцитохимическое окрашивание.....	36
Денатурирующий электрофорез белков в полиакриламидном геле.....	37
Измерение концентрации белка .....	37
Вестерн-блоттинг и иммунохимическое окрашивание белков, иммобилизованных на мембране .....	38
Приготовление образцов пептидов для протеомного анализа .....	40
Хромато-масс-спектрометрический анализ .....	41
Биоинформатическая обработка данных хромато-масс-спектрометрического анализа.....	41
Выделение тотальной РНК.....	43
ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) .....	44
Электрофорез фрагментов ДНК в агарозном геле.....	46
Выделение ядерной фракции белков из культуры фибробластов .....	49
Статистическая обработка данных.....	50
<b>РЕЗУЛЬТАТЫ</b> .....	<b>52</b>
Разделение на фракции растворимых белков и внеклеточных везикул влияет на способность секретома МСК подавлять дифференцировку фибробластов в миофибробласты <i>in vitro</i> .....	52
Фракция растворимых белковых факторов секретома МСК обогащена белками, способными регулировать канонические сигнальные пути TGF- $\beta$ , Wnt и Notch	56
Экспрессия регуляторов сигнальных путей TGF- $\beta$ , Wnt и Notch, которыми обогащена фракция растворимых белковых факторов секретома МСК,	

повышена в небольшой субпопуляции МСК жировой ткани, сокращающейся в профибротических условиях.....	61
Фракция растворимых белков секрета МСК подавляет канонический сигнальный путь Wnt в фибробластах .....	63
Белок DKK3 в составе фракции растворимых белковых факторов секрета МСК подавляет канонический сигнальный путь Wnt в фибробластах и препятствует дифференцировке фибробластов в миофибробласты .....	67
Тотальная фракция белков секрета МСК обогащена белками, активирующими сигнальный путь NF-κB .....	72
Тотальная фракция белков секрета МСК активирует сигнальный путь NF-κB в фибробластах .....	73
ОБСУЖДЕНИЕ .....	76
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	88
ВЫВОДЫ .....	89
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	91

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ADAM – дезинтегрин и металлопротеиназа (сокр. от a Disintegrin And Metalloproteinase)

AKR1C3 – альдокеторедуктаза 1-го семейства, член C3 (Aldo-Keto Reductase family 1 member C3)

ALIX – белок X, взаимодействующий с [продуктом] гена 2, связанного с апоптозом (Apoptosis-Linked gene 2 Interacting protein X)

CD – кластер дифференцировки (Cluster of Differentiation)

CD74-ICD – внутриклеточный домен CD74 (CD74-IntraCellular Domain)

DAPI – 4',6-диаминидино-2-фенилиндол

DKK3 – связанный с Диккопфом белок-3

dNTP – дезоксинуклеозидтрифосфат

GAPDH – глицеральдегидфосфатдегидрогеназа

HEPES – 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота

HIF-1 $\alpha$  – фактор, индуцируемый гипоксией-1 альфа

HSP70 – белок теплового шока 70 (HSP70)

IL-1 $\alpha$ ( $\beta$ ) – интерлейкин 1 альфа (бета)

ISLR – белок суперсемейства иммуноглобулинов, содержащих богатый лейцином повтор (Immunoglobulin Superfamily containing Leucine-rich Repeat protein)

LAMA2 – субъединица альфа-2 ламинина (LAMinin subunit Alpha-2)

LAP – латентно-ассоциированный пептид

LEF – фактор, связывающий лимфоидный энхансер (lymphoid enhancer-binding factor)

LRP – белок, подобный рецептору липопротеинов низкой плотности (low-density lipoprotein receptor-related protein)

LTBP-1 – белок, связывающий латентный TGF- $\beta$ , -1 (Latent-Transforming growth factor beta-Binding Protein 1)

MAGP – ассоциированный с микрофибриллами гликопротеин (Microfibril-Associated GlycoProtein)

MAML – белок-коактиватор транскрипции, подобный белку Mastermind (MAsterMind-Like protein)

MFAP4 – ассоциированный с микрофибриллами белок 4 (MicroFibril-Associated Protein)

MIF – фактор, ингибирующий миграцию макрофагов (Macrophage migration inhibitory factor)

mTORC2 – комплекс 2 мишени рапамицина у млекопитающих (mammalian target of rapamycin complex 2)

Mw – молекулярная масса (Molecular weight)

NF-κB – транскрипционный ядерный фактор каппа В (Nuclear Factor kappa B)

NOV – продукт сверхэкспрессируемого гена нефробластомы (Nephroblastoma Overexpressed)

NICD – внутриклеточный домен Notch (Notch IntraCellular Domain)

PMSF – фенилметилсульфонилфторид

RBPJ – (Recombination signal Binding Protein for immunoglobulin kappa J region; белок, связывающий сигнал рекомбинации для иммуноглобулина каппа-области)

SDF-1 – фактор стромальных клеток 1 (Stromal cell-Derived Factor 1)

SMAD – Sma и матери против декапентаплегического гомолога 3 (Sma and Mothers Against Decapentaplegic homolog 3)

TCF – Т-клеточный фактор (T-cell factor)

TGF-β – трансформирующий фактор роста бета

TβRI, TβRII – TGF-β-рецептор I и II типа, соответственно

БСА – бычий сывороточный альбумин

ДСН – додецилсульфат натрия

ДТТ – дитиотреитол

МСК – мезенхимные стволовые клетки

ФБС – фетальная бычья сыворотка

ФСБ – фосфатно-солевой буферный раствор

КС-МСК – тотальная фракция белков секрета МСК

ВКМ – внеклеточный матрикс

РФ-МСК – фракция растворимых белковых факторов секрета МСК

ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция в реальном времени с обратной транскрипцией

ПЦР – полимеразная цепная реакция

Трис – трис(гидроксиметил)аминометан

ТСБТ – Трис-буферный раствор с добавлением детергента Твин 20 (Tris-Buffered Saline Tween-20)

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность и степень разработанности темы исследования**

В настоящее время фиброз-ассоциированные заболевания являются причиной почти пятой части всех случаев смертности в мире [1]. В контексте развития таких заболеваний фиброз представляет собой патологический процесс, при котором здоровая ткань замещается рубцовой, что способно приводить к утрате тканями и органами своих функций. Ключевым патогенетическим звеном развития фиброза большинства тканей является избыточное образование миофибробластов – клеток, вносящих основной вклад в формирование рубцовой ткани – преимущественно из резидентных фибробластов [2]. В связи с этим, поиск механизмов регуляции дифференцировки фибробластов в миофибробласты представляет собой важную задачу современной биологии и биомедицины.

Мезенхимные стволовые клетки (МСК), согласно последним данным, играют важнейшую роль в регуляции и координации всех клеточных процессов, происходящих в строме. При этом значительная часть данных эффектов МСК обусловлена продукцией ими биологически активных белковых факторов. Показано, что белки, секретируемые МСК, способны стимулировать ангиогенез и прорастание нейритов, регулировать функционирование иммунных клеток, формировать и ремоделировать внеклеточный матрикс (ВКМ) [3]. Данные литературы свидетельствуют о том, что МСК за счёт паракринных механизмов способны также препятствовать избыточному образованию миофибробластов из фибробластов [4], однако роль растворимых белковых факторов, секретируемых МСК, в этом процессе не установлена. В связи с этим, актуальной задачей является исследование роли растворимых белковых факторов, секретируемых МСК, в регуляции процесса дифференцировки фибробластов в миофибробласты, а также изучение молекулярных механизмов этого влияния.

## **Цель и задачи исследования**

Целью работы является установление роли растворимых белковых факторов, секретируемых МСК, в регуляции процессов дифференцировки фибробластов в миофибробласты.

Для достижения цели были сформулированы следующие задачи:

1. Охарактеризовать фракцию растворимых белковых факторов секрета МСК жировой ткани человека методом протеомного анализа.

2. Установить белки, которыми обогащены фракции секрета МСК жировой ткани, обладающие различной выраженностью антифибротического эффекта в *in vitro* модели дифференцировки фибробластов в миофибробласты.

3. Определить сигнальные пути, с которыми способны взаимодействовать белки, выявленные в составе фракций секрета МСК.

4. Проверить влияние фракций секрета МСК на изменение экспрессии генов-мишеней предсказанных сигнальных путей при дифференцировке фибробластов в миофибробласты.

## **Научная новизна исследования**

В настоящей работе впервые был проведён сравнительный протеомный анализ фракций секрета МСК, различающихся по способности препятствовать дифференцировке фибробластов в миофибробласты *in vitro*, и установлены белки, потенциально вносящие вклад в различие биологических эффектов данных фракций. Обнаружено, что фракция растворимых белковых факторов секрета МСК обогащена регуляторами сигнальных путей Wnt, TGF- $\beta$  и Notch и что данная фракция подавляет канонический сигнальный путь Wnt в фибробластах. Впервые установлено, что белок DKK3 в составе фракции растворимых белковых факторов, секретируемых МСК, необходим для ингибирования данной фракцией канонического сигнального пути Wnt в фибробластах и подавления их

дифференцировки в миофибробласты. Впервые установлено, что тотальная фракция секретома МСК активирует сигнальный путь NF-κB в фибробластах.

### **Теоретическая и практическая значимость**

В ходе выполнения работы был описан механизм антифибротического действия фракции растворимых белковых факторов секретома МСК, связанный с паракриной регуляцией дифференцировки фибробластов в миофибробласты. Полученные в данной работе результаты также указывают на необходимость контроля в составе секретома МСК компонентов, активирующих в клетках-мишенях провоспалительные сигнальные пути, что особенно важно при разработке терапевтических подходов с использованием секретома этих клеток. Результаты исследования могут быть использованы для разработки новых подходов к лечению заболеваний, ключевым звеном патогенеза которых является дифференцировка фибробластов в миофибробласты, таких как фибротические заболевания, а также некоторых заболеваний, связанных с образованием хронических язв.

### **Методология и методы исследования**

Методологические подходы исследования включают в себя анализ существующих данных литературы и степени разработанности темы, формулировку цели исследования, исходя из известных паракриных эффектов МСК в процессах заживления повреждённой ткани, а также постановку задач с учётом обоснованности применения существующих методологических подходов. В диссертационном исследовании использованы методы биохимии и молекулярной биологии, а также клеточной биологии и биоинформатики.

### **Степень достоверности полученных результатов**

Научные результаты диссертационного исследования обладают высокой степенью достоверности, что подтверждается достаточной выборкой, воспроизводимостью результатов измерений, а также согласованностью результатов, полученных с использованием различных методов.

## **Апробация работы**

Апробация работы была проведена на кафедре биохимии и регенеративной биомедицины Факультета фундаментальной медицины Медицинского научно-образовательного института МГУ имени М.В. Ломоносова. Результаты работы были представлены на всероссийских и международных конференциях, включая The 45th FEBS Congress, V и VI Национальные конгрессы по регенеративной медицине, Международную научную конференцию студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов», XXXIV зимнюю молодежную научную школу "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии", 12-ю международную конференцию "Рецепторы и внутриклеточная сигнализация", 3-ю международную конференцию "Системная биология и системная физиология: регуляция сложных биологических систем", Международную научную конференцию молодых ученых в рамках Площадки открытых коммуникаций OpenBio-2024, Всероссийскую научную конференцию с международным участием «Биохимия человека 2024». Доклад по результатам работы получил II место в секции «Биохимические основы фармакологии» на конференции «Биохимия человека 2024»; доклад с основными результатами работы был признан лучшим в секции “Фундаментальная медицина” конференции OpenBio-2024.

## **Личный вклад автора в проведение исследования**

Автору принадлежит основная роль в анализе данных литературы, формулировке целей и постановке задач исследования, планировании и проведении экспериментов, статистической обработке полученных данных, а также в подготовке публикаций по теме исследования.

## **Публикации**

По теме диссертации было опубликовано 5 статей в рецензируемых изданиях, индексируемых Scopus и Web of Science.

Список публикаций по теме диссертации в рецензируемых изданиях, индексируемых Scopus и Web of Science:

1. **Kulebyakina M.**, Basalova N., Butuzova D., Arbatsky M., Chechekhin V., Kalinina N., Tyurin-Kuzmin P., Kulebyakin K., Klychnikov O., Efimenko A. Balance between pro- and antifibrotic proteins in mesenchymal stromal cell secretome fractions revealed by proteome and cell subpopulation analysis // International Journal of Molecular Sciences. – 2024. – V. 25, №1. – P. 290.
2. Eremichev R., **Kulebyakina M.**, Alexandrushkina N., Nimiritsky P., Basalova N., Grigoryeva O., Egiazaryan M., Dyikanov D., Tkachuk V., Makarevich P. Scar-free healing of endometrium: Tissue-specific program of stromal cells and its induction by soluble factors produced after damage // Frontiers in Cell and Developmental Biology. – 2021. – V. 9. – P.616893.
3. Grigorieva O., Basalova N., Dyachkova U., Novoseletskaaya E., Vigovskii M., Arbatskiy M., **Kulebyakina M.**, Efimenko A. Modeling the profibrotic microenvironment in vitro: Model validation // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2024. – V. 733. – P. 150574.
4. Grigorieva O., Vigovskiy M., Dyachkova U., Basalova N., Aleksandrushkina N., **Kulebyakina M.**, Zaitsev I., Popov V., Efimenko A. Mechanisms of endothelial-to-mesenchymal transition induction by extracellular matrix components in pulmonary fibrosis // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2021. V. 171, №4. P. 523–531.
5. Grigorieva O., Basalova N., Vigovskiy M., Arbatskiy M., Dyachkova U., **Kulebyakina M.**, Kulebyakin K., Tyurin-Kuzmin P., Kalinina N., and Efimenko A. Novel potential markers of myofibroblast differentiation revealed by single-cell rna sequencing analysis of mesenchymal stromal cells in profibrotic and adipogenic conditions // Biomedicines. – 2023. – V. 11, № 3. – P. 840.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Фракция секрета МСК человека, обогащенная растворимыми белками, препятствует дифференцировке фибробластов кожи человека в миофибробласты *in vitro* сильнее, чем тотальная фракция секрета.

2. Тотальная фракция секрета МСК обогащена белками, способными активировать транскрипционный фактор NF-κB, и при добавлении к фибробластам в модели миофибробластной дифференцировки *in vitro* активирует NF-κB-зависимый сигнальный путь.

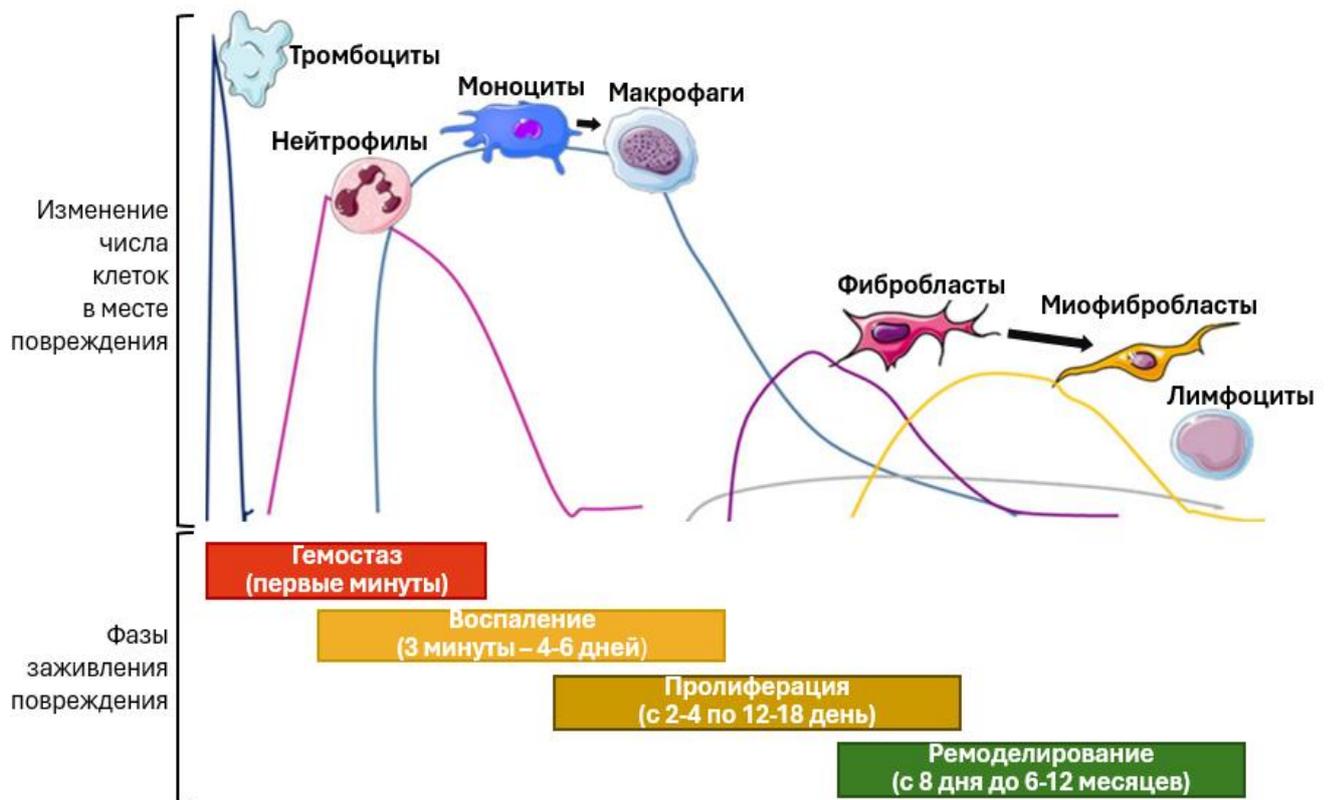
3. Фракция растворимых белков секрета МСК обогащена белками, способными регулировать дифференцировку фибробластов в миофибробласты посредством влияния на канонический сигнальный путь Wnt. Эта фракция снижает базальный уровень активации канонического сигнального пути Wnt в фибробластах кожи человека в модели миофибробластной дифференцировки *in vitro*.

4. Белок DKK3 в составе фракции растворимых белков секрета МСК вносит значимый вклад в подавление дифференцировки фибробластов в миофибробласты *in vitro*.

## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### Клеточные механизмы репаративной регенерации тканей

Заживление большинства тканей после повреждения имеет общие закономерности и представляет собой сложный многоэтапный процесс, регулируемый как местными, так и системными факторами, в котором участвуют резидентные (находящиеся в ткани), а также привлеченные к месту повреждения клетки. В нем принято выделять несколько этапов, или фаз, в зависимости от преобладающих клеточных событий [5–7]. На рис. 1 приведена последовательность данных фаз с указанием их длительности и основных эффекторных клеток.



**Рисунок 1.** Последовательность этапов (фаз) заживления ткани после повреждения (по [6] и [7], с изм.). Пояснения в тексте. Стрелками отмечены процессы дифференцировки клеток.

В первые минуты (фаза гемостаза) происходит активация тромбоцитов, их дегрануляция и образование тромбоцитарного сгустка. Вещества, высвобождаемые при этом тромбоцитами, стимулируют миграцию других типов

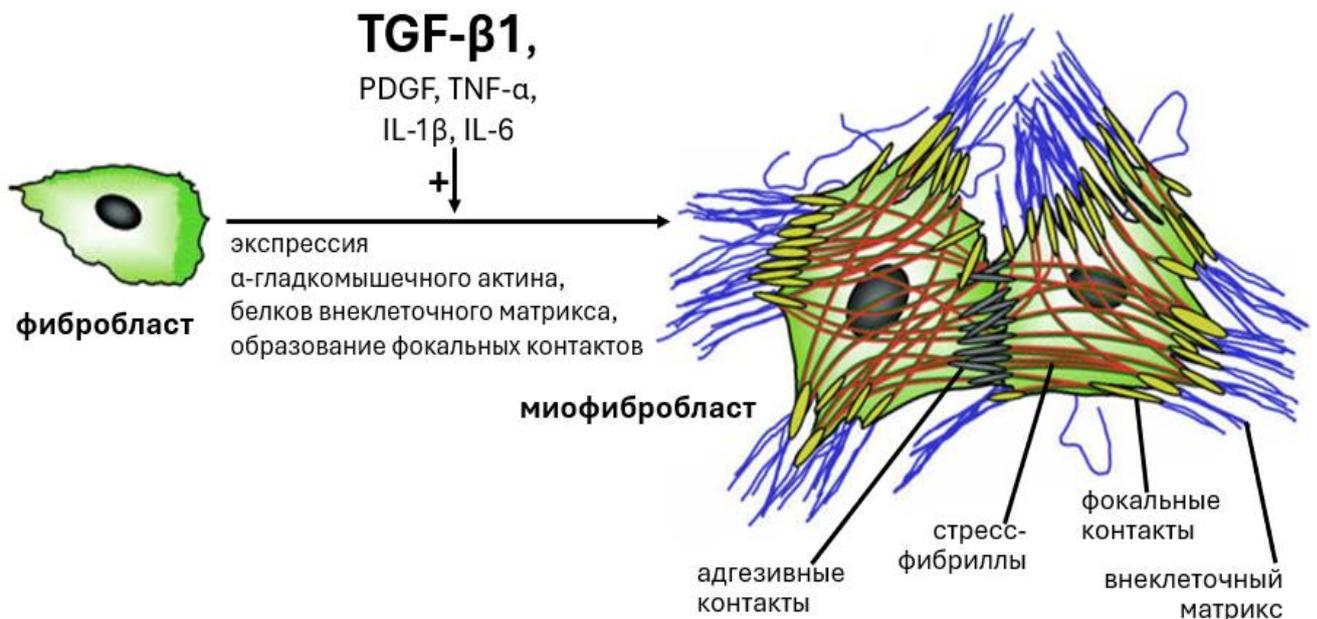
клеток в область повреждения, а также активацию, пролиферацию и дифференцировку этих клеток [6,7]. За фазой гемостаза следует фаза воспаления, начинающаяся при появлении в области повреждения клеток иммунной системы [6–8]. Так, привлеченные нейтрофилы обеспечивают уничтожение патогенов за счёт фагоцитоза, секреции протеаз, продукции активных форм кислорода и других механизмов. Моноциты, мигрировавшие в место повреждения, дифференцируются в макрофаги, которые осуществляют фагоцитоз патогенов и клеточного дэбриса. Все указанные типы иммунных клеток секретируют факторы роста, ферменты и хемокины, вызывающие дополнительное привлечение других клеток к месту повреждения, стимулирующие эпителизацию раны, ангиогенез, пролиферацию стромальных клеток и продукцию ими компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ) [6,8,9].

Следующим этапом заживления ткани является фаза пролиферации, основные эффекторные клетки которой представлены фибробластами. В зоне повреждения фибробласты активируются, пролиферируют и секретируют компоненты ВКМ. Большая часть фибробластов при ранозаживлении дифференцируется в миофибробласты, которые тоже откладывают ВКМ, а также контрактируют (стягивают) его за счёт своей высокой сократительной способности [10,11]. Помимо этого, в пролиферативной фазе также активно происходит ангиогенез и реэпителизация раневой поверхности [7]. Фазу пролиферации постепенно сменяет фаза ремоделирования, в которую происходит реорганизация компонентов новообразованной ткани, изменение укладки отложенного ВКМ и реваскуляризация [7].

### **Дифференцировка фибробластов в миофибробласты**

При заживлении ткани резидентные фибробласты дифференцируются в миофибробласты – клетки, обладающие высокой секреторной активностью выраженными сократительными способностями. Несмотря на то, что миофибробласты могут образовываться из различных типов клеток (клетки эндотелия, перициты, гладкомышечные клетки, клетки эпителия и др.), основным

источником миофибробластов при заживлении большинства тканей является миофибробластная дифференцировка резидентных фибробластов [2,12]. Она запускается различными профибротическими (трансформирующий фактор роста бета 1, тромбоцитарный фактор роста) и провоспалительными (интерлейкин 1 бета, интерлейкин 6) стимулами, а также изменением жёсткости ВКМ (рис. 2) [2,13,14].



**Рисунок 2.** Схема фенотипических изменений, сопровождающих процесс дифференцировки фибробластов в миофибробласты (по [15], с изм.). TGF-β1 – трансформирующий фактор роста бета 1, TNF-α – фактор некроза опухоли альфа, PDGF – тромбоцитарный фактор роста, IL-1β – интерлейкин 1 бета, IL-6 – интерлейкин 6.

Дифференцировка фибробластов в миофибробласты сопровождается рядом фенотипических изменений, схематически отображенных на рис. 2. Так, в фибробластах начинает экспрессироваться альфа-гладкомышечный актин – белок цитоскелета, характерный для многих клеток, обладающих сократительным фенотипом. Альфа-гладкомышечный актин далее встраивается в особый тип фибрилл, называемых стресс-фибриллами. На поверхности клеток интегрин перераспределяются и формируют фокальные контакты, обеспечивающие связь

ВКМ с актиновым цитоскелетом (в первую очередь, со стресс-фибриллами). Помимо этого, в данных клетках возрастает экспрессия генов белков ВКМ (таких как коллаген I и III типа, фибронектин, ламинин). Образованные миофибробласты, таким образом, способны откладывать большое количество ВКМ, прикрепляться к нему и за счёт высокой сократительной способности стягивать ВКМ, уменьшая площадь раневой поверхности и сообщая формирующейся рубцовой ткани механическую прочность [11,15–17].

Нарушение регуляции дифференцировки фибробластов в миофибробласты при заживлении повреждённых тканей приводит к различным патологическим состояниям. Сниженное образование миофибробластов существенно замедляет процесс ранозаживления и способно приводить к образованию хронических язв [18]. Избыточное образование миофибробластов из фибробластов может приводить к развитию фиброза – патологического состояния, при котором здоровая функциональная ткань замещается рубцовой тканью, что постепенно приводит к утрате органами своих функций [2,11,13,14].

### **Сигнальные пути, регулирующие дифференцировку фибробластов в миофибробласты**

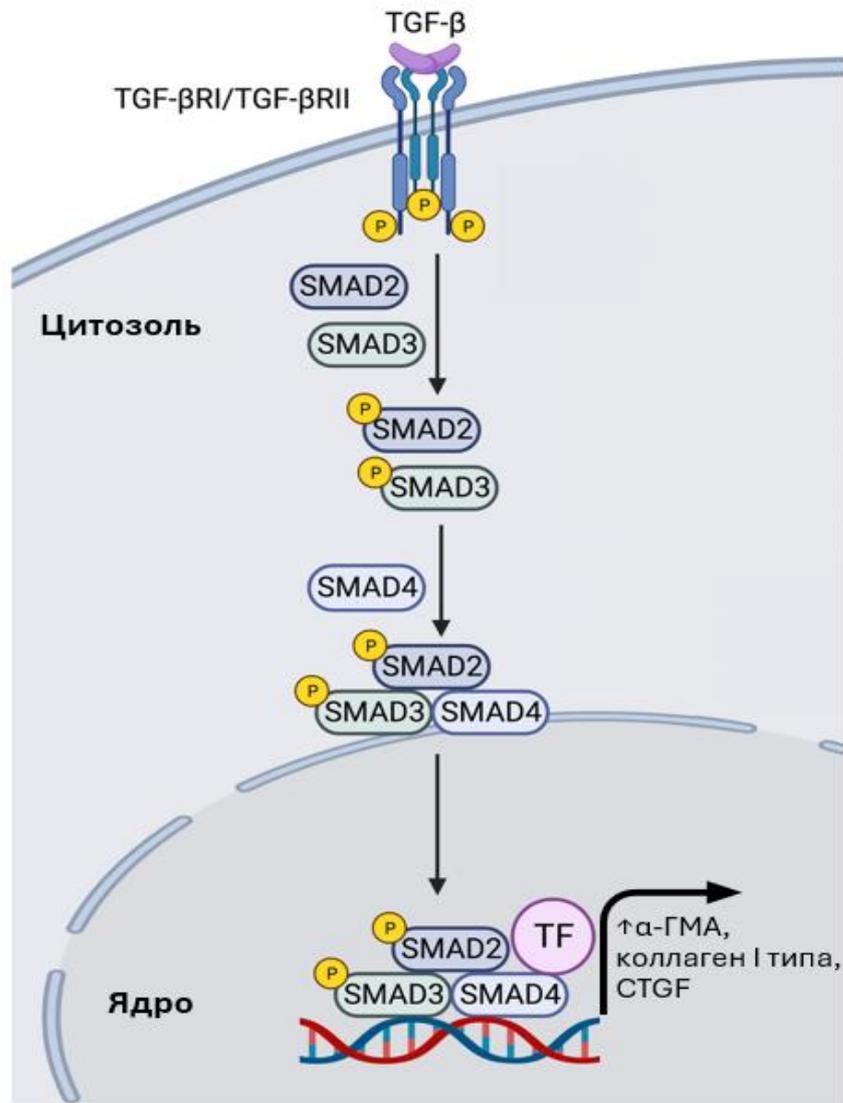
#### **Канонический сигнальный путь TGF- $\beta$**

К трансформирующим факторам роста бета (TGF- $\beta$ ) относятся три белка – TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 и TGF- $\beta$ 3. Данные белки являются высококонсервативными у позвоночных животных, имеют высокое структурное сходство между собой и запускают внутриклеточную сигнализацию через одни и те же рецепторы (T $\beta$ RI и T $\beta$ RII, TGF- $\beta$ -рецептором I и II типа, соответственно). Различия между данными тремя белками заключаются преимущественно в их сродстве к рецепторам, паттерне экспрессии в организме и, следовательно, в регулируемых ими процессах. Так, трансформирующий фактор роста бета-1 (TGF- $\beta$ 1) экспрессируется во многих типах клеток взрослого организма, регулирует обновление тканей, функционирование иммунных клеток и многие процессы, связанные с заживлением ткани после повреждения, включая дифференцировку

фибробластов в миофибробласты. К основным эффектам TGF- $\beta$ 2 можно отнести регуляцию развития сердца и лёгких в эмбриогенезе, а также сдерживание избыточной пролиферации Т-лимфоцитов; TGF- $\beta$ 3 регулирует развитие дыхательной системы и нёба в эмбриогенезе, а также стимулирует миграцию эпителиальных клеток при заживлении кожных ран [19–21].

Белок-предшественник TGF- $\beta$ 1 секретируется разными типами клеток, в том числе фибробластами, макрофагами, тромбоцитами, лимфоцитами и клетками эпителия. Секретированный предшественник TGF- $\beta$ 1 связывается с т. н. латентно-ассоциированным пептидом (LAP) и компонентами ВКМ и, таким образом, оказывается задепонированным внутри ВКМ [22]. При повреждении ткани пептид LAP подвергается протеолитическому расщеплению под воздействием матриксных металлопротеиназ, а ВКМ механически растягивается клетками, контактирующими с ним через интегрины, что приводит к высвобождению TGF- $\beta$ 1 и образованию его активной формы, способной запускать внутриклеточную сигнализацию [22,23]. Активная форма TGF- $\beta$ 1 связывается с находящимся на поверхности клеток-мишеней TGF- $\beta$ -рецептором II типа, который впоследствии образует комплекс с TGF- $\beta$ -рецептором I типа и фосфорилирует его по остатку тирозина, инициируя внутриклеточные сигнальные события [2]. Схема канонического сигнального пути, запускаемого TGF- $\beta$  приведена на рис. 3. Фосфорилирование TGF- $\beta$ RI приводит к его активации и способности катализировать фосфорилирование эффекторных белков – SMAD2 и SMAD3 – по остаткам серина и треонина в них. Фосфорилированные SMAD2 и SMAD3 образуют гетеротримерный комплекс с белком SMAD4, после чего транслоцируются в ядро и удерживаются в нём [2,24]. В ядре комплекс белков SMAD связывается с располагающимися в промоторах генов-мишеней последовательностями ДНК, носящими название SBE (Smad Binding Elements) [2,25]. Отметим, что связывание белков SMAD с данными последовательностями, как правило, слабое и требует стабилизации с участием других белков (факторов транскрипции); кроме того, белки SMAD могут также связываться с ДНК не напрямую, а опосредованно через некоторые транскрипционные факторы [25].

После связывания с ДНК комплексы SMAD привлекают к данному участку хроматина различные коактиваторы и корепрессоры, которые, в свою очередь, изменяют структуру хроматина, что приводит к изменению экспрессии генов [2,25].



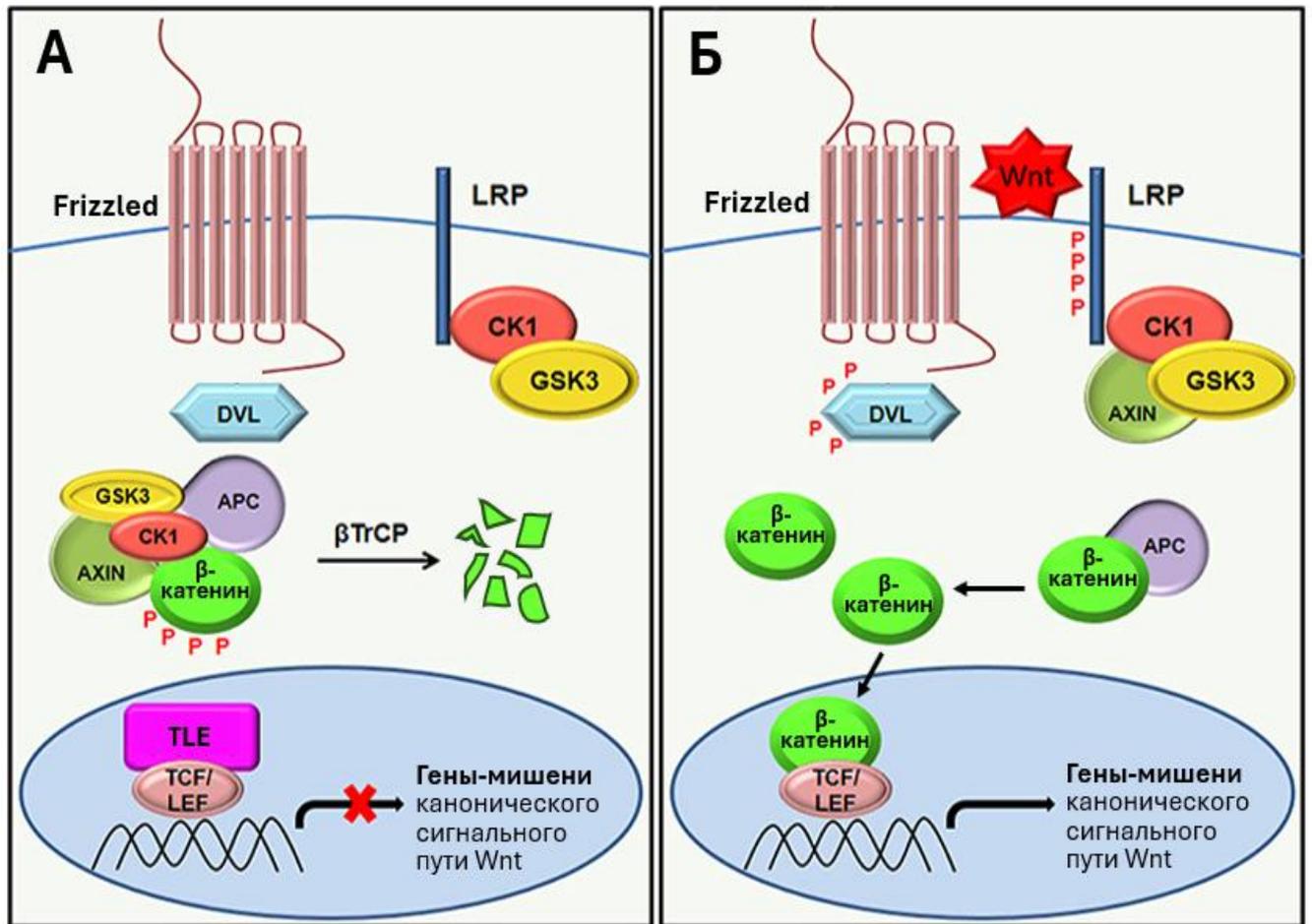
**Рисунок 3.** Канонический сигнальный путь TGF-β1 (по [24], с изм.). Связывание TGF-β1 приводит к образованию комплекса рецепторов TGF-β I типа (TGF-βRI) и II типа (TGF-βRII) и фосфорилированию TGF-βRI, который после этого фосфорилирует и активирует белки SMAD2 и SMAD3. Активированные SMAD2 и SMAD3 связываются с белком SMAD4, перемещаются в ядро и регулируют экспрессию генов-мишеней данного сигнального пути. α-ГМА – альфа-гладкомышечный актин.

Активация канонического сигнального пути TGF- $\beta$  в фибробластах приводит к возрастанию экспрессии генов альфа-гладкомышечного актина, коллагена I типа, тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ и фактора роста соединительной ткани [26,27]. К генам, экспрессию которых канонический сигнальный путь TGF- $\beta$  подавляет в фибробластах, относятся транскрипционный фактор TCF7L2 (Transcription Factor 7 Like 2) и PDGFR $\alpha$  (Platelet-Derived Growth Factor Receptor Alpha), снижение экспрессии которого сопровождается дифференцировку фибробластов в миофибробласты [28].

### **Канонический сигнальный путь WNT**

Канонический сигнальный путь Wnt, или сигнальный путь Wnt/бета-катенина – высококонсервативный сигнальный путь, регулирующий многие процессы дифференцировки клеток как во время эмбрионального развития организма, так и в постнатальный период [29,30]. К основным компонентам данного сигнального пути можно отнести: семейство секретируемых белков Wnt, которые выполняют роль лигандов и активируют данный сигнальный путь; рецепторные белки Frizzled и их корецепторы Lrp; бета-катенин – ключевой внутриклеточный посредник данного сигнального пути. Сигнальные события, происходящие при активации канонического пути Wnt, приведены на рис. 4. В отсутствие активации сигнального пути Wnt новосинтезирующиеся молекулы бета-катенина входят в состав т.н. разрушающего комплекса (destruction complex), состоящего, помимо бета-катенина, из актина, выполняющего в данном комплексе функцию скаффолда, белка аденоматозного полипоза толстой кишки (APC), обеспечивающего привлечение и удержание бета-катенина, а также из киназы гликогенсинтазы-3 бета (GSK-3 $\beta$ ) и казеинкиназы 1 (CK1) [31–33]. Бета-катенин, вошедший в состав этого комплекса, фосфорилируется казеинкиназой-1 и, таким образом, оказывается праймированным для последующего фосфорилирования в нём трёх остатков серина киназой гликогенсинтазы [34], в результате которого у молекулы бета-катенина формируется фосфодегрон – белковый мотив, обеспечивающий связывание бета-катенина с убиквитинлигазой

[33,35]. Следующее за этим убиквитилирование бета-катенина направляет его на деградацию в протеасому (рис. 4А).



**Рисунок 4.** Схема канонического сигнального пути Wnt у человека. (по Patel et al 2019, с изм.) **А.** В отсутствие сигналов от Wnt бета-катенин взаимодействует с разрушающим комплексом, направляющим бета-катенин на путь протеасомной деградации. Транскрипционный фактор семейства TCF/LEF связан с корепрессором TLE, подавляющим экспрессию генов-мишеней данного сигнального пути. **Б.** Активация канонического сигнального каскада Wnt приводит к фосфорилированию белка Dishevelled (DVL) и корецептора LRP, за которым следует высвобождение бета-катенина из разрушающего комплекса, накопление бета-катенина в цитозоле и его транслокация в ядро. В ядре бета-катенин связывается с транскрипционным фактором TCF/LEF и способствует активации транскрипции целевых генов.

Связывание лиганда Wnt с рецептором Frizzled способствует кластеризацию Frizzled с его корецептором Lrp. Далее комплекс Frizzled-LRP привлекает киназу 1 эпсилон, которая затем фосфорилирует белок Dishevelled,

находящийся рядом с Frizzled [30,31,33,36]. Фосфорилирование Dishevelled и вхождение его в комплекс с Frizzled способствует кластеризации молекул LRP на мембране и их последующему фосфорилированию (катализируемому киназой-1 гамма). Это приводит к рекрутированию актина, несущего на себе разрушающий комплекс, к данному рецепторному комплексу [31,33]. После этого белок Dishevelled ингибирует киназу-3 в составе разрушающего комплекса, что подавляет весь процесс направления бета-катенина на путь протеасомной деградации [30]. Бета-катенин высвобождается из разрушающего комплекса без формирования фосфодегрона; таким образом, активация сигнального пути Wnt прекращает деградацию бета-катенина. Это приводит к накоплению бета-катенина в цитоплазме и к его транслокации в ядро.

В ядре бета-катенин связывается с транскрипционными факторами семейства TCF/LEF (Т-клеточный фактор, T-cell factor/ фактор, связывающий лимфоидный энхансер, lymphoid enhancer-binding factor) [37]). В фибробластах преобладающими белками данного семейства являются TCF7L2 и TCF7L1; кроме этого, в отдельных случаях возникает индуцибельная экспрессия белков LEF1 и TCF7 [28]. В отсутствие бета-катенина TCF/LEF связан с транскрипционным корепрессором TLE (Transducin-Like Enhancer of split), гомологом белка Groucho дрозофилы (рис. 4А) [32,38]. Бета-катенин вытесняет TLE из комплекса TLE-TCF/LEF и способствует привлечению к TCF/LEF дополнительных коактиваторов транскрипции (таких как CBP, p300 и Pygopus), в результате чего активируется транскрипция целевых генов, в частности, *c-Myc*, *Ccnd1* и *Axin2*, продукты которых регулируют пролиферацию и дифференцировку клеток [39,40].

Канонический сигнальный каскад Wnt является важнейшим регулятором дифференцировки фибробластов в миофибробласты. Неоднократно показано, что индукция этого сигнального пути в фибробластах посредством добавления рекомбинантных белков Wnt (в частности, Wnt-1 и Wnt-3a) приводит к дифференцировке этих клеток в миофибробласты [41,42]. И, напротив, ингибирование канонического сигнального каскада Wnt подавляет

дифференцировку фибробластов в миофибробласты как *in vitro*, так и в модели фиброза *in vivo* [43].

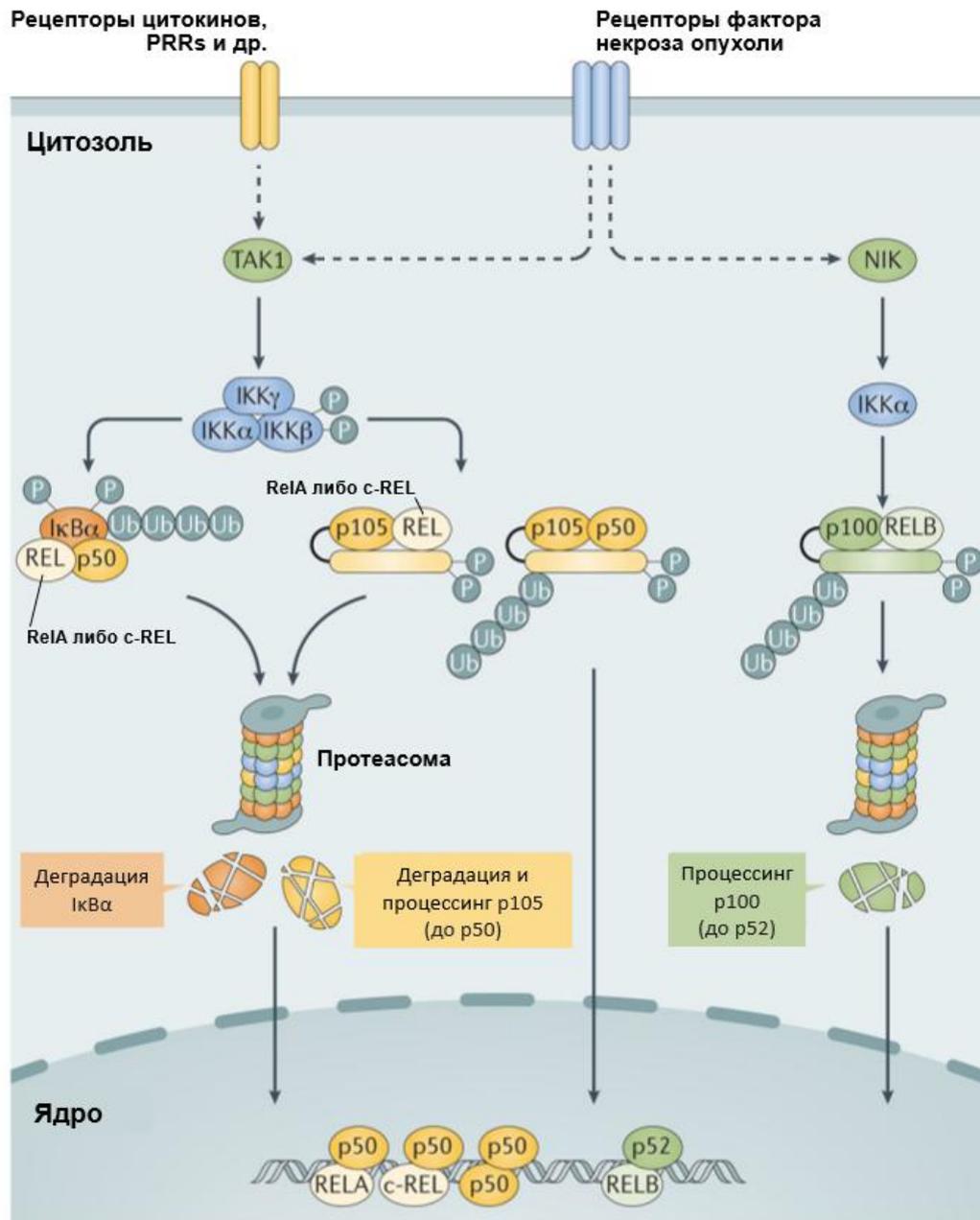
### **Сигнальный путь NF-κB**

Множество провоспалительных сигнальных каскадов приводят к активации транскрипционного фактора NF-κB (энхансер легкой цепи ядерного фактора капса активированных В-клеток), который регулирует ряд важных клеточных процессов, в частности, воспалительные реакции, клеточный рост и апоптоз [44]. К членам семейства NF-κB относятся белки p50, p52, p65 (RelA), RelB и c-Rel [45]. Белки NF-κB высококонсервативны и встречаются от представителей типа Стрекающие до дрозофилы и человека [46]. Согласно данным литературы, в фибробластах экспрессируются все пять вышеперечисленных белков [47,48]. Транскрипционный фактор NF-κB функционирует в виде гомо- или гетеродимерных комплексов, образованных указанными белками [45,49]. В фибробластах преобладает гетеродимер p65/p50, а также гомодимер из двух p65-субъединиц [50]. Хорошо известно, что NF-κB связывает консенсусную последовательность ДНК (5'-GGGPurNNNPurCC-3', где Pur – пурин, Pir – пиримидин, N – пурин либо пиримидин), называемую сайтом κB, располагающуюся в промоторной и/или энхансерной областях генов-мишеней [51]. Связывание конкретного сайта κB, определяющее возможность регуляции того или иного гена транскрипционным фактором NF-κB, зависит, помимо состояния хроматина, от субъединичного состава транскрипционного фактора NF-κB, а также от посттрансляционных модификаций субъединиц в его составе (в первую очередь, от фосфорилирования) [52,53]. Помимо сайта κB, выделяют также полуконсенсусную последовательность связывания NF-κB 5'-GGGPurNNPir NNN-3' (располагающуюся, в частности, в промоторах генов CCND1 и CCR7) [51], а также несколько неконсенсусных сайтов связывания NF-κB, обнаруженных в последние годы [54].

К стимулам, активирующим NF-κB, относятся сигналы от цитокинов (таких как интерлейкин-1 альфа (IL-1α), IL-1β, TNF-α), продукты чужеродной

генетической информации (в первую очередь, бактерий и вирусов), а также ряд внутриклеточных стимулов: гипоксия, активные формы кислорода, сигналы стресса эндоплазматического ретикулума [55]. В отсутствие активирующих сигналов NF-κB находится в цитоплазме клеток в секвестрированной (связанной и ввиду этого неактивной) форме. Секвестрирование NF-κB осуществляют белки семейства IκB (inhibitor of κB) за счёт своих доменов, содержащих анкириновые повторы [56]. Помимо IκB, NF-κB может быть секвестрирован белками p100 и p105 (являющимися предшественниками белков p52 и p50, соответственно), в C-концевом участке молекул которых также расположен домен, содержащий анкириновые повторы [57]. Действие на клетку провоспалительных стимулов приводит к тому, что киназы семейства IκB фосфорилируют белки, секвестрирующие NF-κB, в результате чего эти белки диссоциируют из комплекса с NF-κB и направляются на путь процессинга (в случае белков p100 и p105) либо протеасомной деградации (рис. 5). У освободившегося NF-κB оказывается демаскирован сигнал ядерной локализации, благодаря чему NF-κB транслоцируется в ядро, где регулирует экспрессию генов [57]. Как правило, транслокации освободившегося NF-κB предшествуют посттрансляционные модификации субъединиц в его составе [58].

К факторам, образующимся при заживлении тканей и способным активировать сигнальный путь NF-κB в фибробластах, относятся молекулярные фрагменты, ассоциированные с повреждениями (Damage-associated molecular patterns, DAMPs) и патоген-ассоциированные молекулярные фрагменты (Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), активные формы кислорода (в первую очередь, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), провоспалительные цитокины и факторы роста (IL-1β, TNF-α, TGF-β, эпидермальный фактор роста), а также изменение состава (в частности, увеличение содержания фибронектина и коллагена I типа) и жёсткости ВКМ [59–61].



**Рисунок 5.** Схема активации сигнального пути NF-κB внешними для клетки стимулами (по [57], с изм). Сигналы от рецепторов, опосредуемые киназами TAK1 либо NIK, приводят к высвобождению транскрипционного фактора NF-κB (представленного, как правило, гетеродимерами p50/RelA, p50/c-Rel, p52/RelB либо гомодимером p50/p50) и его транслокации в ядро, где NF-κB регулирует экспрессию генов-мишеней.

При недостаточном уровне активации NF-κB в фибробластах наблюдается уменьшение эффективности их дифференцировки в миофибробласты, а также снижение выживаемости образующихся миофибробластов, необходимых для заживления поврежденной ткани [62,63]. Избыточная активация NF-κB в фибробластах приводит к повышенному образованию миофибробластов из

фибробластов и, как следствие, к чрезмерному отложению ими ВКМ и замещению функциональной ткани на фиброзную (рубцовую) [60,64,65].

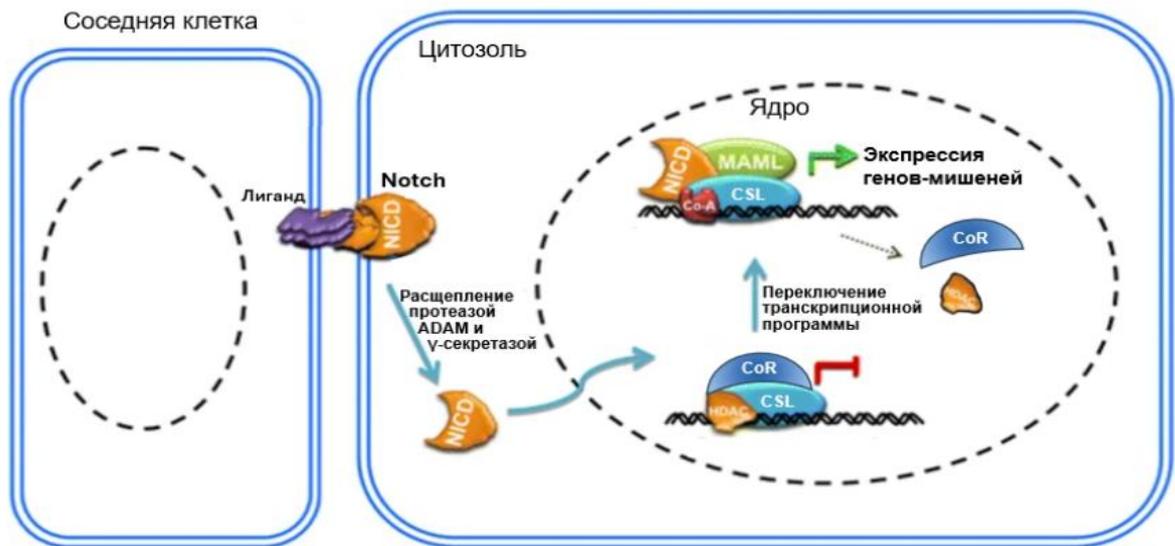
### **Канонический сигнальный путь NOTCH**

Канонический сигнальный путь Notch регулирует пролиферацию, дифференцировку клеток и выбор клеточной судьбы [66,67]. Этот высококонсервативный сигнальный путь примечателен тем, что и рецепторы, и канонические лиганды данного пути представлены мембранными белками, а запуск сигнализации осуществляется в результате контакта двух соседних клеток, при котором лиганд, экспонированный на мембране одной клетки, взаимодействует с рецептором Notch на другой клетке [68].

У млекопитающих семейство Notch состоит из четырех рецепторов Notch (Notch 1–4), экспрессируемых в зависимости от конкретного типа клеток и стадии развития организма [66,68]. На фибробластах показана экспрессия двух рецепторов Notch – Notch1 и Notch3 [69]. Канонические лиганды Notch у млекопитающих представлены пятью белками (мембранно-заякоренные белки Jagged 1 и 2, а также трансмембранные белки DLL- (Delta-подобные белки, Delta-like) 1, 3 и 4), общим свойством которых является наличие DSL-домена (Delta/Serrate/LAG-2 domain), имеющего в своем составе бета-складчатый слой и необходимого для связывания этих лигандов с рецепторами Notch [68,70]. Помимо этого, выделяют также неканонические лиганды Notch, названные так из-за отличного от канонических лигандов строения (в частности, из-за отсутствия DSL-домена). К ним относятся ряд трансмембранных (например, DLK1 (Delta-like non-canonical Notch ligand 1), DNER (Delta/Notch-like EGF-related receptor)), заякоренных в мембране (некоторые белки из семейства контактинов) и секретируемых белков (таких как фактор роста соединительной ткани, продукт сверхэкспрессируемого гена нефробластомы (NOV), гликопротеины-1 и -2, ассоциированные с микрофибриллами (MAGP-1 и MAGP-2), тромбоспондин-2 и др.) [70]. Отметим, что деление лигандов на канонические и неканонические, по всей видимости, никак не отражает их способность активировать канонический

сигнальный путь Notch: так, неканонические лиганды Notch MAGP-1 and MAGP-2, согласно литературе, способны активировать канонический сигнальный путь Notch в клетках-мишенях [71].

Активация Notch обычно требует связывания между рецептором Notch и лигандом Notch, экспонированным на двух соседних клетках. Взаимодействие с лигандом приводит к запуску двух последовательных реакций протеолитического расщепления рецептора Notch: сначала – расщепление внеклеточного участка, катализируемое металлопротеазой семейства ADAM (сокращение от A Disintegrin And Metalloproteinase; в подавляющем большинстве случаев, включая Notch-сигналинг в фибробластах, первую реакцию гидролиза Notch катализирует ADAM10), затем – расщепление внутриклеточного участка, катализируемое гамма-секретазным комплексом (а именно гетеротетрамерным комплексом пресенилина 1 (PS1), энхансера пресенилина 2 (Pen2), Aph-1 гомолога А (Aph1a) и никастрина) с высвобождением внутриклеточного домена Notch (NICD), который, имея в своем составе сигнал ядерной локализации (NLS), перемещается в ядро [72,73]. Там он взаимодействует с транскрипционным фактором CSL, который у позвоночных представлен белком RBPJк (Recombination Signal Binding Protein For Immunoglobulin Kappa J Region; белок, связывающий сигнал рекомбинации для иммуноглобулина каппа-области). В отсутствие сигнала от канонического пути Notch CSL (RBPJк) связан с репрессорным комплексом CoR и деацетилазами гистонов и функционирует как транскрипционный репрессор [67]. Взаимодействие NICD с RBPJк приводит к диссоциации последнего от комплекса CoR и гистоновых деацетилаз и к связыванию с RBPJк коактиваторов транскрипции, таких как белки MAML (коактиватор, подобный белку Mastermind), в результате чего образуется комплекс, активирующий транскрипцию генов. Таким образом, внутриклеточный домен Notch, переместившись в ядро, активирует транскрипцию своих генов-мишеней, тем самым опосредуя множество биологических эффектов [66,68,74]. Схема активации канонического сигнального пути NOTCH приведена на рис. 6.



**Рисунок 6.** Схема активации и протекания канонического сигнального каскада Notch (по [75], с изм.). Связывание рецептора Notch с лигандом приводит к последовательному протеолизу рецептора ферментом ADAM и  $\gamma$ -секретазным комплексом, в результате чего высвобождается внутриклеточный фрагмент Notch (NICD). NICD транслоцируется в ядро, где взаимодействует с репрессорным комплексом CSL, способствует удалению из него комплекса CoR и гистоновых деацетилаз (HDAC), привлечению коактиваторов транскрипции – MAML и других коактиваторов (CoA), что приводит к превращению репрессорного комплекса в активаторный и к активации экспрессии генов-мишеней.

Набор генов, экспрессию которых регулирует канонический сигнальный путь Notch, существенно варьирует в зависимости от типа клеток и биологического процесса. Тем не менее, можно отметить практически “универсальные” гены-мишени данного сигнального пути – гены семейств *Hes* и *Heu*, кодирующие одноимённые транскрипционные репрессоры [66]. Во многих случаях мишенями канонического сигнального пути Notch являются также гены регуляторов дифференцировки *Myc* и *Ccnd1* [76].

Следует отметить также, что канонический сигнальный путь Notch может быть активирован как при взаимодействии клетка-клетка, так и некоторыми растворимыми лигандами (например, белками MAGP-1 and MAGP-2 [71]). Возможно также т.н. *цис*-взаимодействие компонентов сигнального пути Notch, при котором и рецептор Notch, и его лиганд (представленный в данном случае трансмембранным белком) располагаются на плазматической мембране одной и

той же клетки, при этом рецептор и лиганд связываются за счёт латерального взаимодействия рецептора и лиганда на мембране одной и той же клетки [70]. Такое *цис*-взаимодействие приводит к ингибированию канонического сигнального пути Notch [68].

Существует также неканонический сигнальный путь Notch, который наиболее широко можно определить как набор сигнальных механизмов, независимых от CSL (RBPJ $\kappa$ ) [67]. К таким механизмам относятся кросс-взаимодействие NICD с компонентами других сигнальных путей (NF- $\kappa$ B, Akt, Wnt, Hippo, TGF- $\beta$ , mTORC2, HIF-1 $\alpha$ ) [66,77]. В частности, известно, что NICD способен подавлять транскрипционную активность бета-катенина в ядре, блокируя тем самым сигнал от канонического сигнального пути Wnt [78]. Кроме того, показано, что NICD может удерживать в ядре транскрипционный фактор NF- $\kappa$ B, способствуя более продолжительной по времени экспрессии генов-мишеней сигнального пути NF- $\kappa$ B [79]. Также имеются данные о взаимодействии NICD с компонентами канонического сигнального каскада TGF- $\beta$ , в частности, с белком Smad3. При этом NICD способен ингибировать транскрипционную активность белка Smad3, что приводит к подавлению сигнального каскада, запускаемого TGF- $\beta$  [80,81]. Отметим, что во всех описанных случаях у неканонического сигнального пути Notch невозможно выделить какие-либо специфические транскрипционные мишени. Набор генов, на экспрессию которых будет влиять неканонический сигнальный путь Notch, определяется другими сигнальными путями, с которыми он взаимодействует [67].

Известно, что воздействие стимулов, связанных с повреждением ткани (в том числе TGF- $\beta$ 1), приводит к активации в фибробластах канонического сигнального пути Notch. Показано, что добавление к фибробластам экзогенного TGF- $\beta$ 1 активирует в них канонический сигнальный путь Notch, а также приводит к возрастанию экспрессии компонентов сигнального пути Notch в фибробластах [82,83]. Фибробласты, выделенные из донорского материала больных фиброзом и

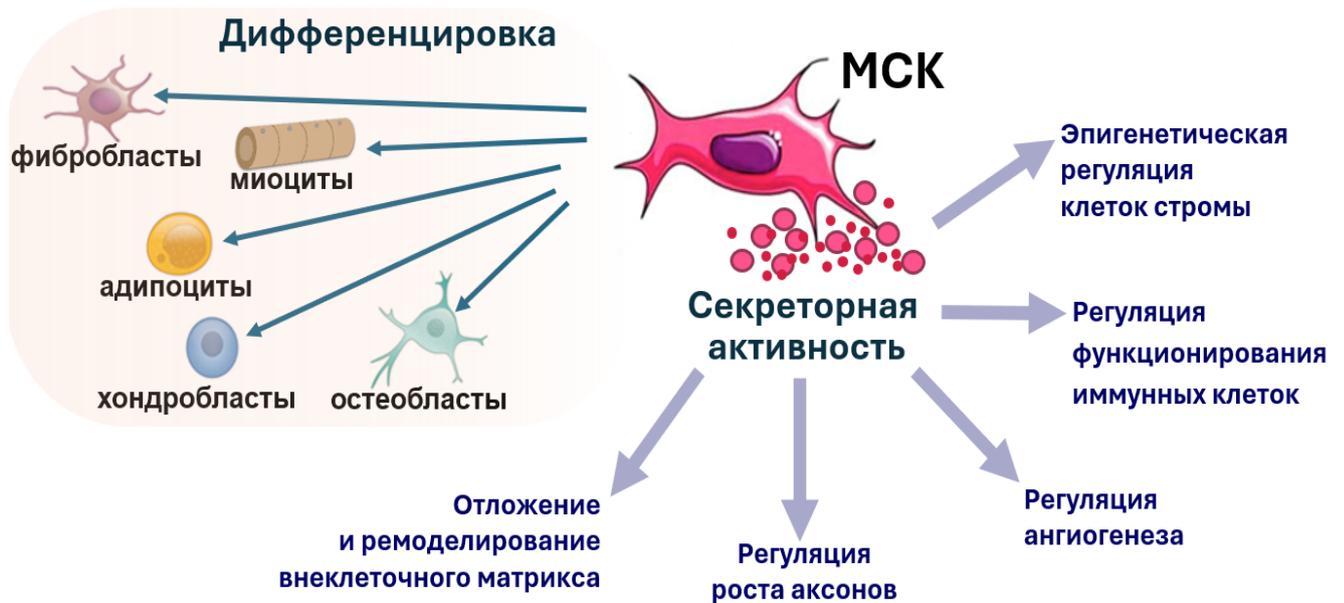
системным склерозом, отличаются стойким повышением активности канонического сигнального пути Notch [84,85].

Накоплено много свидетельств того, что активация сигнального пути Notch является мощным индуктором образования миофибробластов и возникновения рубцовой ткани в моделях фиброза легких, печени, кожи [74,83]. Однако многие из этих работ не позволяют сделать выводы ни о роли сигнального пути Notch в фибробластах в возникновении фиброза *in vivo*, ни о вкладе в эти процессы канонического сигнального пути Notch. Тем не менее, в некоторых исследованиях есть свидетельства важности канонического сигнального пути Notch в дифференцировке фибробластов в миофибробласты. Согласно данным, полученным Деес и соавторами, активация канонического сигнального пути Notch в фибробластах *in vitro* способна приводить к их дифференцировке в миофибробласты в отсутствие каких-либо других внешних профибротических стимулов [84]. Эта же группа исследователей недавно создала трансгенную линию мышей, позволяющую селективно индуцировать экспрессию NICD в фибробластах, и продемонстрировала, что такая избирательная активация сигнального пути Notch в фибробластах приводит к появлению фибротических изменений *in vivo* [86]. Аналогичным образом ранее была создана линия мышей с возможностью фармакологически подавлять экспрессию гена Notch1 в фибробластах. У таких мышей в модели фиброза лёгких наблюдалось сниженное образование миофибробластов по сравнению с животными дикого типа [87]. Все эти данные позволяют предполагать физиологически значимую роль канонического сигнального пути Notch в фибробластах для их дифференцировки в миофибробласты при заживлении повреждённой ткани.

### **Роль МСК в регуляции процессов заживления ткани**

Мезенхимные стволовые клетки (МСК) – популяция клеток мезенхимального происхождения, первично охарактеризованная по своей способности дифференцироваться в адипогенном (адипоциты), остеогенном (остеобласты) и хондрогенном (хондробласты) направлении [12]. Данный вид

постнатальных стволовых клеток обнаружен во множестве тканей взрослого организма, включая жировую, хрящевую и мышечную ткань, костный мозг, пульпу зуба, ткани печени, почек, легких и поджелудочной железы [88]. Помимо участия в обновлении тканей за счёт дифференцировки в различные типы клеток стромы, МСК проявляют секреторную активность, участвуя в обеспечении координации различных клеточных процессов на всех этапах заживления ткани после повреждения (рис. 7) [3,12,89].



**Рисунок 7.** Основные известные механизмы участия МСК в процессах заживления тканей после повреждения.

На данный момент хорошо изучены механизмы ряда эффектов МСК. Так, описано, что МСК способны регулировать эпигенетический статус клеток стромы за счёт переноса микроРНК (например, miR-21, miR-155, miR-92a) и факторов транскрипции (в частности, Foxp3, Runx) в составе внеклеточных везикул [4,90–93]. Среди белков, секретируемых МСК, обнаружены регуляторы ангиогенеза (например, ангиопоэтин-подобные белки-2 и -4, ингибин А, мидкин; тромбоспондин-1, -2; периостин и др.) и прорастания аксонов (такие как дистрогликан, нейропилин-1, нейротрофный фактор астроцитов, Т-кадгерин, семафорин-7А). Показано, что МСК регулируют функционирование клеток иммунной системы за счёт секреции таких белков, как интерлейкин-6,

интерлейкин-8, гранулоцитарный и макрофагальный колониестимулирующие факторы, фактор, ингибирующий миграцию моноцитов, програнулин, галектин-1 и др. Наконец, хорошо известно, что МСК вносят вклад в отложение ВКМ (за счёт продукции его компонентов, в частности, коллагенов, ламинина, люмикана, декорина и др.) и обеспечивают его ремоделирование за счёт секреции матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов, лизилоксидазы и других белков [3,89]. В норме паракринное действие МСК способствует стиханию воспалительной реакции, снижает уровень окислительного стресса, способствует процессам регенерации ткани и препятствует развитию фиброза – избыточного замещения ранее функциональной ткани рубцом [89,94–96].

Несмотря на большое количество накопленных знаний о паракринных эффектах МСК при ранозаживлении, влияние белков, секретлируемых МСК, на процесс дифференцировки фибробластов в миофибробласты, необходимый для успешного заживления повреждённой ткани, на настоящий момент не изучено, что и определило актуальность цели настоящей работы.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ<sup>1</sup>

### Клеточные культуры

В работе использовали линию иммортализованных МСК жировой ткани человека (hTERT ASC52telo, ATCC) и первичные культуры фибробластов кожи человека из коллекции биобанка Центра регенеративной медицины МНОИ МГУ имени М.В. Ломоносова, ID коллекции: MSU\_FB (<https://human.depo.msu.ru>). Коллекции биоматериалов от доноров были созданы и пополняются согласно разрешению институционального локального этического комитета (Этический комитет МНОЦ МГУ имени М.В. Ломоносова, IRB00010587) (протокол #4, дата заседания 04.06.2018), с получением добровольного информированного согласия у всех доноров.

Клетки культивировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°C и 7% CO<sub>2</sub> в чашках Петри диаметром 10 см (~2 × 10<sup>3</sup> клеток/см<sup>2</sup>). В качестве среды культивирования для иммортализованных МСК жировой ткани человека использовали DMEM с пониженным содержанием глюкозы (Gibco, США) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (Gibco, США), 2 mM L-аланил-L-глутамина (Thermo Fischer Scientific, США), 1 mM пирувата (Thermo Fischer Scientific, США), 100ед/мл пенициллина и 100мкг/мл стрептомицина (Penicillin-Streptomycin 100X Solution, HyClone, США). Для культивирования фибробластов кожи человека использовали среду DMEM/F-12 (Gibco, США) с добавлением 7% фетальной бычьей сыворотки (Gibco, США), 2 mM L-аланил-L-глутамина (Thermo Fischer Scientific, США), 1 mM пирувата (Thermo Fischer Scientific, США) и 100 ед/мл

---

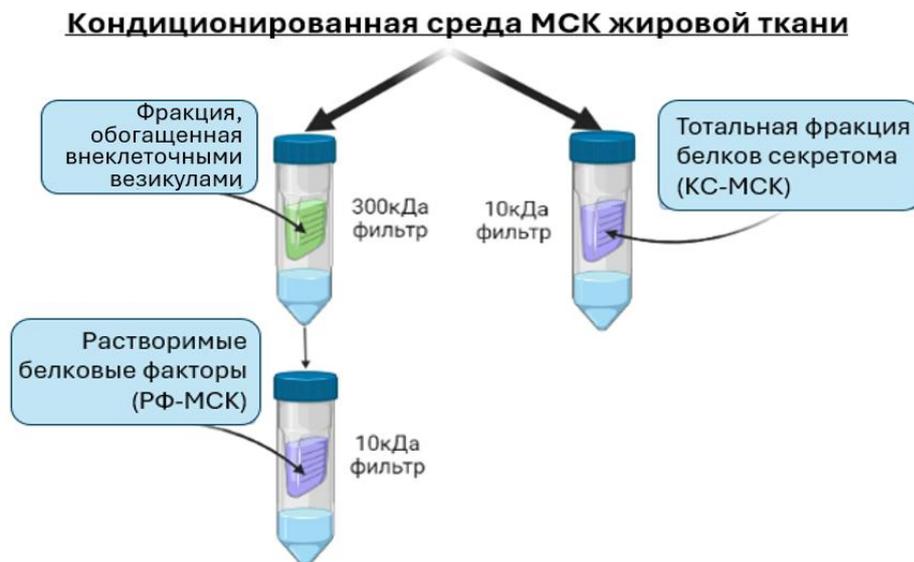
<sup>1</sup> При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

1. **Kulebyakina M.**, Basalova N., Butuzova D., Arbatsky M., Chechekhin V., Kalinina N., Tyurin-Kuzmin P., Kulebyakin K., Klychnikov O., Efimenko A. Balance between pro- and antifibrotic proteins in mesenchymal stromal cell secretome fractions revealed by proteome and cell subpopulation analysis. // International Journal of Molecular Sciences. 2024. Т. 25, №1. — P. 290. Импакт-фактор WoS (JIF) = 4.9, объём публикации – 1,71 печатных листа, личный вклад автора диссертации – 1,36 печатных листа.
2. **Kulebyakina M.**, Butuzova D., Klychnikov O., Strogov Yu., Basalova N., Efimenko A. Study on the mechanisms of antifibrotic action of soluble proteins of human mesenchymal stromal cells secretome (принята к публикации). // Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry. Импакт-фактор WoS (JIF) = 0.6, объём публикации – 2,08 печатных листа, личный вклад автора диссертации – 1,85 печатных листа.

пенициллина/стрептомицина (Gibco, США). Среду культивирования меняли на свежую каждые 2–3 дня. Клетки пересевали по достижении культурой 80% конфлюэнтности монослоя.

### **Сбор кондиционированной среды и получение фракций секрета МСК**

Для депривирования и кондиционирования использовали среду DMEM с пониженным содержанием глюкозы без добавления фенолового красного (Gibco, США) с 2 мМ L-аланил-L-глутамина (Thermo Fischer Scientific, США), 1 мМ пирувата (Thermo Fischer Scientific, США) и 100 ед/мл пенициллина/стрептомицина (Gibco, США). Для получения фракций секрета МСК клетки, достигшие 80-100% конфлюэнтности монослоя, дважды промывали буферным раствором Хэнкса (Панэко, РФ), после чего депривировали в указанной среде в течение 24 часов. После депривирования клетки трижды промывали буферным раствором Хэнкса (Панэко, РФ) и инкубировали в течение 48 ч в указанной среде при 37°C, 7% CO<sub>2</sub>. По истечении времени среду собирали и центрифугировали в течение 10 мин при 300g для удаления клеточного дебриса. Фракции секрета МСК выделяли методом ультрафильтрации полученной кондиционированной среды (рис. 8) с использованием центрифужных фильтров с пределом эксклюзии 10 кДа (JetBiofil, КНР) и 300 кДа (Sartorius, Германия).



**Рисунок 8.** Схема получения фракций секрета МСК методом ультрафильтрации.

Для получения тотальной фракции белков секретома МСК (КС-МСК) белки кондиционированной среды концентрировали на 10 кДа фильтре. Для получения фракции растворимых белковых факторов секретома МСК (РФ-МСК) вначале из кондиционированной среды отделяли внеклеточные везикулы (ВВ-МСК) на 300 кДа фильтре, а полученный фильтрат концентрировали на 10 кДа фильтре (рис. 8). В ходе выделения фракции концентрировали в 200-300 раз. Образцы выделенных фракций секретома хранили при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **Анализ траекторий наночастиц**

Размер частиц во фракциях секретома МСК определяли методом анализа траекторий наночастиц (NTA) на приборе ZetaView (Particle Metrix, Германия). В качестве “фона” использовали образец кондиционированной среды, собранной после кондиционирования МСК в течение 30 минут. Измерение проводили в режиме «боковое светорассеяние» при длине волны 488 нм с использованием протокола, оптимизированного для анализа образцов внеклеточных везикул («EV size, 488»). Все измерения выполняли при  $25^{\circ}\text{C}$ . Для каждого образца измерения проводили в десяти повторах. Результаты обрабатывали с использованием ПО ZetaView Analyzer (Particle Metrix, Германия).

### **Моделирование дифференцировки фибробластов в миофибробласты**

Для *in vitro* индукции дифференцировки в миофибробласты клетки культур фибробластов кожи высевали в культуральные планшеты из расчёта 15 тыс/см<sup>2</sup> и культивировали в течение суток, после чего в течение ночи депривировали в бессывороточной среде DMEM (Gibco, США) в течение 16-18 часов. После этого к клеткам добавляли рекомбинантный TGF- $\beta$ 1 человека (R&D, США) до концентрации 10 нг/мл. Для исследования эффекта фракций секретома МСК на дифференцировку фибробластов в миофибробласты одновременно с внесением рекомбинантного TGF- $\beta$ 1 к клеткам добавляли концентрированную (200-300x) фракцию КС-МСК либо РФ-МСК до пятикратной концентрации. В качестве отрицательного контроля использовали культуру фибробластов, к которой после

депривирования добавляли бессывороточную среду DMEM. После индукции миофибробластной дифференцировки клетки культивировали:

- для оценки содержания бета-катенина и NF-κB в ядре – в течение часа;
- для измерения экспрессии транскрипционных мишеней сигнальных каскадов методом ОТ-ПЦР – в течение 6 часов;
- для оценки эффективности дифференцировки фибробластов в миофибробласты – в течение 96 часов.

### **Иммуноцитохимическое окрашивание**

Клетки промывали теплым раствором Хенкса (Панэко, РФ) фиксировали 4% параформальдегидом на 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 6.8, содержащий 150 mM NaCl (фосфатно-солевой буферный раствор, ФСБ; ПанЭко, Россия) в течение 7-10 минут при комнатной температуре, затем пермеабелизовали 0,1% раствором Triton X-100 в течение 10 минут при комнатной температуре и блокировали сайты неспецифического связывания антител 10% раствором ослиной сыворотки с 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА; ПанЭко, РФ) на ФСБ. После этого клетки инкубировали с кроличьими антителами, специфичными к альфа-гладкомышечному актину (ab32575; Abcam), с фаллоидином, меченным флуоресцентным зондом Alexa 594 (A12381; Molecular probe, США) либо с изотипическими иммуноглобулинами кролика (NSC-2025; Santa Cruz Biotechnology) в течение ночи при 2-8°C. Детекцию антител проводили с использованием антител козы к иммуноглобулинам кролика, конъюгированных с флуоресцентными зондами Alexa 488 (A11034, Invitrogen, США), в течение 1 часа при комнатной температуре в темноте. Для окрашивания ядер использовали DAPI (диаминофенилиндолом; D9542, Sigma) согласно протоколу, предложенному производителем. Изображения получали с использованием инвертированного микроскопа с флуоресцентным модулем DMi8 (Leica, Германия) и камерой DFC 7000 T (Leica, Германия).

## **Денатурирующий электрофорез белков в полиакриламидном геле**

Электрофоретическое разделение белков проводили по методу Лэммли [97]. Использовали концентрирующий гель, содержащий 4% акриламида, и разделяющий гель, содержащий 12% акриламида; соотношение акриламида и метилен-бис-акриламида в гелях составляло 37,5:1. При приготовлении гелей использовали четырехкратные буферные растворы: для концентрирующего геля – 0,5 М Трис-НСl, рН 6.8, содержащий 0,1% додецилсульфата натрия (ДСН); для разделяющего геля – 1,5 М Трис-НСl, рН 8.8, содержащий 0,1% ДСН. Перед внесением в лунки геля к образцам добавляли четырёхкратный буфер для образцов (0,25 М Трис-НСl буферный раствор, рН 6.8, содержащий 40% глицерола, 8% ДСН, 8% β-меркаптоэтанола и 0,05% бромфенолового синего) и инкубировали в течение 5 минут при 95 °С. В качестве маркеров молекулярных масс ( $M_w$ , Molecular weight) белков использовали коммерческие смеси белков PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, США). Электрофорез проводили в электродном буфере (0,025М Трис, 0,192 М глицин, рН 8.3, содержащий 0,1% ДСН), подавая постоянную силу тока из расчета сначала 10 мА на гель (до вхождения бромфенолового синего в разделяющий гель), затем 20 мА на гель. После завершения электрофоретического разделения белки из геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану (см. ниже Вестерн-блоттинг).

### **Измерение концентрации белка**

Измерение концентрации белка в ядерных фракциях проводили методом Бредфорда с использованием коммерческого реактива Bradford Reagent (Bio-Rad, США) согласно протоколу производителя. Оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 595 нм измеряли на приборе Wallac Envision Multilabel 2104 (PerkinElmer, США).

Концентрацию белка во фракциях секрета МСК измеряли денситометрическим методом. Для этого проводили электрофорез в полиакриламидном геле по методу Лэммли в присутствии додецилсульфата

натрия. Для количественного измерения содержания белка в лунки геля вносили образцы, содержащие 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 либо 0,5 мкг БСА (ПанЭко, РФ). После электрофоретического разделения гель фиксировали в 40% растворе метанола с добавлением 10% уксусной кислоты в течение часа, затем окрашивали 0.1% раствором Coomassie G-250 на 10% сульфате аммония, содержащем 20% метанола и 2% ортофосфорной кислоты (Coomassie Blue Silver [98]) в течение ночи при комнатной температуре. Электрофореграмму получали с использованием прибора ChemiDoc™ MP imager (Biorad, США). Результаты измерений обрабатывали в программе Image Lab, (Biorad, США), определяя интегральную оптическую плотность дорожек.

### **Вестерн-блоттинг и иммунохимическое окрашивание белков, иммобилизованных на мембране**

Вестерн-блоттинг проводили по методу Тоубина [99]. Электроперенос белков на нитроцеллюлозную мембрану выполняли в течение 0,5-1,5 часа (в зависимости от молекулярной массы анализируемых белков) при постоянном напряжении 100В в 25 мМ Трис-НСl буфере, рН 8.3, содержащем 192 мМ глицина и 20% этанола (по объему). Перед проведением иммунохимического окрашивания осуществляли блокировку мест неспецифического связывания белков на мембране в 5% растворе БСА (ПанЭко) на Трис-буферном растворе (ТСБТ) (20 мМ Трис-НСl, рН 7.6, содержащий 150 мМ NaCl и 0,1% Tween 20) при комнатной температуре в течение 30 минут, постоянно перемешивая. Затем мембрану инкубировали при +4°C в течение ночи в растворе кроличьих либо мышинных антител, специфичных к исследуемому белку, на 5% БСА в ТСБТ. Используемые в работе первичные антитела приведены в Таблице 1.

**Таблица 1.** Первичные антитела, использованные в работе.

Антиген	Каталожный номер и производитель антител
АИХ	ab88388, Abcam, США

CD63	137001, BioLegend, США
CD9	312102, BioLegend, США
CD81	349502, BioLegend, США
DKK-3	PAD410Hu01, CloudClone, КНР
HSP70	EXOAB-Hsp70A-1-SBI, Biocat, Германия
KDM1 (KDM1A)	ab129195, Abcam, США
NF-κB (p65)	PAB824Hu01, CloudClone, КНР
Бета-катенин	06-734, Sigma, США
Бета-тубулин	ab179513, Abcam, США
Винкулин	V9264, Sigma, США
Глицеральдегидфосфатдегидрогеназа (GAPDH)	2118, Cell Signalling, США
Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа	A9521, Sigma, США
Коллаген I типа	ab34710, Abcam, США
Коллаген IV типа	ab182744, Abcam, США
Ламинин	ab11575, Abcam, США
Фибронектин	ab2413, Abcam, США

Далее мембрану отмывали от несвязавшихся первичных антител раствором ТСБТ и инкубировали в растворе анти-мышинных либо анти-кроличьих поликлональных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена (анти-мышинные антитела – A9044, Sigma-Aldrich, США; анти-кроличьи антитела – A16096, Invitrogen, США) на 5% БСА в ТСБТ в течение часа при комнатной температуре. От несвязавшихся вторичных антител мембраны также отмывали раствором ТБСТ. Для детекции сигнала использовали хемилюминесцентный субстрат Clarity либо Clarity Max (Bio-Rad, США), хемилюминесценцию

мембраны измеряли на приборе Chemidoc Touch (Bio-Rad, США). Обработку результатов вестерн-блоттинга и расчёт интенсивности сигнала белковых полос проводили с использованием ПО ImageLab (Bio-Rad, США). При оценке уровня белков (p65, бета-катенина) в цитоплазматической и ядерной фракциях рассчитывали содержания белка во фракции, нормированное на содержание белка домашнего хозяйства, являющегося контролем белковой нагрузки для данной фракции (GAPDH, или глицеральдегидфосфатдегидрогеназа, – в случае цитоплазматической фракции, KDM1, или лизин-специфическая деметилаза гистонов 1, – в случае ядерной фракции).

### **Приготовление образцов пептидов для протеомного анализа**

Подготовку образцов пептидов для масс-спектрометрического анализа проводили методом трипсинолиза в объеме, аналогичным описанному в работе [100]. На каждую реакцию брали объем образца, содержащий 10 мкг белка. Реакцию проводили в 50мМ буферном растворе гидрокарбоната аммония, pH 8,5, в качестве солибилизирующего агента использовали коммерческий детергент RapiGest (Waters, США) в концентрации 0,05%. Для восстановления дисульфидных связей в белках использовали трис(2-карбок시에тил)фосфин (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 2 мМ, последующее алкилирование остатков цистеина проводили метилметантиосульфатом (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 4мМ. Для получения триптитических пептидов в реакционную смесь добавляли 0,5 мкг модифицированного свиного трипсина (Promega, США) и инкубировали в течение 16 часов при 37°C, после чего добавляли к образцам ещё 0,25 мкг трипсина и инкубировали в течение часа при 50°C. Затем реакцию трипсинолиза останавливали, доводя pH реакционной смеси до 2 добавлением муравьиной кислоты (Sigma-Aldrich, США). Полученные триптитические пептиды хранили на -80°C.

Твердофазную очистку пептидов, полученных в результате трипсинолиза, проводили с использованием колонок ZipTip (C-18; Merck Millipore, США). Колонку промывали 100% метанолом (База №1 химреактивов, РФ), затем 100%

ацетонитрилом (Sigma-Aldrich, США) и уравнивали 0,1% раствором муравьиной кислоты (Sigma-Aldrich, США). После нанесения образца колонку промывали 0,1% раствором муравьиной кислоты. Элюцию проводили 80% раствором ацетонитрила, содержащим 0,1% муравьиной кислоты. Полученный образец высушивали на вакуумном концентраторе Concentrator 5301 (Eppendorf, Германия) при температуре 30°C.

### **Хромато-масс-спектрометрический анализ**

Хромато-масс-спектрометрический анализ пептидов проводили на базе центра коллективного пользования «Сколково» на приборах Ultimate 3000nano UPLC и TIMS-TOF-PRO по следующему протоколу: один микрограмм пептидов загружали в  $\mu$ -предколонку Acclaim (0,5 мм x 3 мм, размер частиц 5 мкм, Thermo Scientific) при скорости потока 10 мкл/мин при изократическом режиме подачи подвижной фазы (2% ацетонитрила, 0,1% муравьиной кислоты). Затем пептиды разделяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии в колонке длиной 15 см. Пептиды элюировали градиентом 80% раствора ацетонитрила, содержащего 0,1% муравьиной кислоты при скорости потока 0,3 мкл/мин. Общее время хроматографического разделения составляло 90 минут. Масс-спектрометрический анализ выполняли с помощью масс-спектрометра Q Exactive HF-X (Q Exactive HF-X Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ масс-спектрометр, Thermo Fisher Scientific) при температуре капилляра 240°C и напряжении на эмиттере 2,1 кВ. Масс-спектры регистрировали с разрешением 120 000 (MS) в диапазоне 300-1500 m/z. Тандемные масс-спектры фрагментов получены с разрешением 15000 (MS/MS) в диапазоне от 100 m/z до значения m/z, определяемого зарядовым состоянием прекурсора, но не более 2000 m/z. Соответствие последовательностей пептидов подтверждали методом MS/MS.

**Биоинформатическая обработка данных хромато-масс-спектрометрического анализа**

Биоинформатическую обработку первичных данных масспектрометрического анализа проводили с использованием ПО MaxQuant

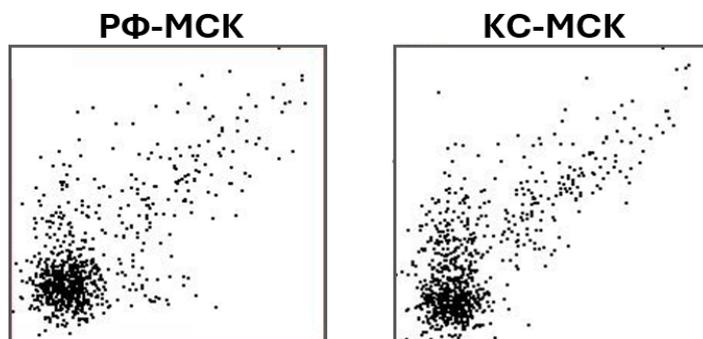
(MaxQuant, Германия), версия v2.0.1.0 [101]. Для идентификации белков в образцах использовали следующие параметры поиска: референсная протеомная база данных протеома человека – MaxQB [102], расщепляющий фермент – трипсин, с допущением не более 1 ошибки гидролиза, обязательная модификация пептидов – карбамидометилирование остатков цистеина, возможные модификации пептидов – окисление, ацетилирование и дезаминирование, минимальное значение отношения LFQ (Label-free quantification, безметочный количественный анализ) – 2, тип нормализации – classic, допустимое отклонение масс при первичном поиске пептидов – 20 ppm, допустимое отклонение масс при основном поиске пептидов – 4,5 ppm, минимальная длина пептидов – 7, максимальная масса пептидов – 4600 Да, минимальная длина пептидов при неспецифическом поиске – 8, максимальная длина пептидов при неспецифическом поиске – 25, количественную оценку рассчитывали на основании группы пептидов “razor+unique peptides”, допускаемая частота встречаемости ложноположительных результатов (FDR) для пептидов и белков менее 1%.

Далее файлы, полученные в результате обработки, анализировали с помощью программного обеспечения Perseus (MaxQuant, Германия) [103]. Для получения конечного массива белков с имеющейся матрицей проводили следующие преобразования:

- 1) Удаляли все белки из колонок ‘Only identified by site’, ‘Reverse’, ‘Potential contaminant’, а также белки, обнаруженные менее чем в двух технических повторах из трех;
- 2) Методом ‘Categorical annotation’ объединяли технические повторы в группы, соответствующие биологическим повторам;
- 3) Выделенные группы сравнивали с помощью метода ‘Two-sample test’.

К полученным данным применяли метод Z-score (стандартизованная оценка). На основе полученной матрицы строили тепловые карты для всех образцов.

Сходимость результатов, полученных для разных биологических повторностей, оценивали с использованием ПО Perseus (MaxQuant, Германия) методом построения графиков рассеяния с расчетом коэффициента Пирсона. Значения коэффициента Пирсона для разных повторов эксперимента превышали 0,7.



**Рисунок 9.** Внешний вид репрезентативных графиков рассеяния, построенных при оценке сходимости результатов протеомного анализа фракций секретома МСК, полученных в различных биологических повторах эксперимента.

Полученные массивы данных анализировали, используя данные баз Gene Ontology [104,105]: Gene Ontology Cellular Component [106] и Gene Ontology Reactome [107], сервис автоматической аннотации g:Profiler (версия e107\_eg54\_p17\_bf42210) [108], а также данные литературы.

### **Выделение тотальной РНК**

Выделение тотальной РНК из фибробластов кожи проводили методом фенол-хлороформной экстракции с использованием реагента Extract RNA (Евроген, РФ) по протоколу, рекомендованному производителем. Концентрацию и чистоту полученных препаратов РНК оценивали с использованием спектрофотометра приборе NanoDrop (Thermo Scientific). Для оценки чистоты оценивали показатели  $A_{260}/A_{280}$  и  $A_{260}/A_{230}$ , отражающие чистоту препарата РНК от белковых и липидных загрязнений соответственно. В дальнейшую работу брали образцы РНК со значениями показателей  $A_{260}/A_{280}$  и  $A_{260}/A_{230}$ , находящимися в пределах от 1,8 до 2.2.

## ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)

Обратную транскрипцию проводили с использованием коммерческого набора MMLV RT Kit (Евроген, РФ) на амплификаторе Mastercycler nexus gradient (Eppendorf, Германия). Анализ экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени проводили с использованием коммерческого реактива qPCRmix-HS SYBR+LowROX (Евроген, РФ) на амплификаторе Bio-Rad Real-Time CFX96 Touch (BioRad, США). В работе использовали пары праймеров, отобранные на основании данных литературы, а также подобранные с использованием сервиса PrimerBlast [109]. Последовательности праймеров, использованные в работе, приведены в Таблице 2.

**Таблица 2.** Последовательности праймеров, использованных в работе. f – прямой праймер, r – обратный праймер.

Мишень	Последовательность		Длина продукта, п.о.	Источник
36B4	f	CGACCTGGAAGTCCAАСТАС	109	[109]
	r	АТСТГСТГСАТСТГСТТГ		
<b>Транскрипционные мишени NF-κВ</b>				
COX2	f	АТGAGАТТGТGGАААААТТGСТ	299	[110]
	r	GАТСАТСТСТGССТGAGТАТС		
CXCL1	f	AGТСАТAGCCACAСТСАAGААТGG	51	[111]
	r	GАТGCAGGАТТGAGGGCAAGC		
CXCL2	f	AGАТСААТGТGACGGCAGGG	234	[109]
	r	ТСТСТGСТСТААСACAGAGGGGA		
IL1B	f	GCCTGAAGCCСТТGСТGTAGТ	51	[111]
	r	GCGGCАТCCAGСТАСГААТ		
IL6	f	АСТСАСТСТТCAGААСГААТТG	149	[109]

	r	CCATCTTTGGAAGGTTTCAGGTTG		
<b>Транскрипционные мишени канонического сигнального пути TGF-β</b>				
<i>FNI</i>	f	CGGTGGCTGTCAGTCAAAG	130	[112]
	r	AAACCTCGGCTTCCTCCATAA		
<i>ACTA2</i>	f	CAATGAGCTTCGTGTTGCC	198	[4]
	r	TCTCCAGAGTCCAGCACGAT		
<i>COL1</i>	f	CCCAGCCACAAAGAGTCTACA	200	[4]
	r	GTTTCCACACGTCTCGGTCA		
<i>VCAN</i>	f	GTAACCCATGCGCTACATAAAGT	110	[113]
	r	GGCAAAGTAGGCATCGTTGAAA		
<b>Транскрипционные мишени канонического сигнального пути WNT</b>				
<i>AXIN2</i>	f	CCTGCCACCAAGACCTACAT	241	[114]
	r	CTTCATTCAAGGTGGGGAGA		
<i>CCND1</i>	f	CCGAGAAGCTGTGCATCTACAC	94	[115]
	r	AGGTTCCACTTGAGCTTGTTTAC		
<i>FZD8</i>	f	CTCTGCTTCGTGTCCACCTT	60	[116]
	r	GAAGCGCTCCATGTCGAT		
<i>WNT3A</i>	f	GCCCCACTCGGATACTTCTTACT	98	[115]
	r	GAGGAATACTGTGGCCCAACA		
<b>Транскрипционные мишени канонического сигнального пути NOTCH</b>				
<i>JAG1</i>	f	TGCTACAACCGTGCCAGTGACTAT	186	[117]
	r	AGGACCACAGACGTTGGAGGAAAT		
<i>HES1</i>	f	TCAACACGACACCGGATAAA	152	[118]
	r	CCGCGAGCTATCTTTCTTCA		

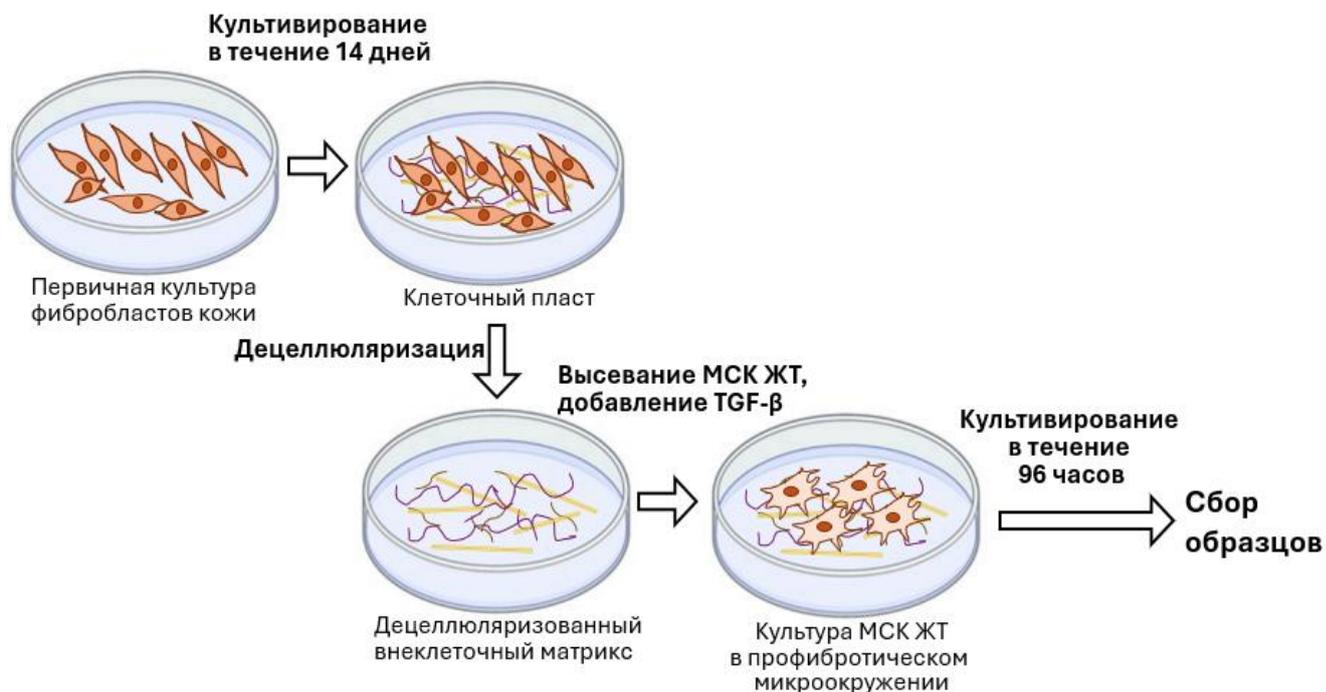
ПЦР проводили при следующих условиях: предварительная денатурация – 95°C, 5 мин; затем 40 циклов последовательной денатурации (95°C, 10 сек), отжига (59-61°C, в зависимости от использованных пар праймеров; 30 сек), элонгации (72°C, 30 сек). По завершении 40 циклов ПЦР проводили дополнительный этап элонгации (72°C, 10 минут) для полного завершения амплификации наработанных фрагментов ДНК. По результатам ПЦР определяли величины Ct (предельного цикла) для генов интереса и нормировочного гена *36B4*. Для сравнения результатов реакции использовали величину  $\Delta Ct$ , рассчитываемую как разницу в величинах Ct для гена интереса и нормировочного гена.

### **Электрофорез фрагментов ДНК в агарозном геле**

Длину продуктов ОТ-ПЦР анализировали методом электрофореза в 3% агарозном геле в Трис-ацетатной буферной системе (10 мМ Трис-ацетатный буфер, pH 8.4, содержащий 1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА)). Для визуализации фрагментов ДНК использовали бромистый этидий в концентрации 0,05 мкг/мл. Для приготовления образцов использовали реагент 6X DNA Loading Dye (Thermo Scientific, США). Для определения длин фрагментов ДНК использовали коммерческие стандарты длин – GeneRuler 50bp DNA Ladder (Thermo Scientific, США). Электрофоретическое разделение проводили при напряженности электрического поля 20В/см длины геля. Результаты визуализировали в ультрафиолетовом свете на приборе ChemiDoc Touch (BioRad, США).

### **Моделирование профибротического микроокружения**

Для культивирования МСК в профибротических условиях использовали отработанную нами ранее модель профибротического микроокружения (схема приведена на рис. 10), при которой на изучаемые клетки одновременно с TGF- $\beta$ 1, растворенным в среде культивирования, действуют сигналы от профибротического ВКМ, отложенного фибробластами [119].



**Рисунок 10.** Схема эксперимента по культивированию МСК в профибротическом микроокружении.

Культуру фибробластов кожи рассеивали в плотности 20000 клеток/см<sup>2</sup> и культивировали в течение 14 дней, после чего из неё получали децеллюляризованный клеточный матрикс по протоколу, описанному нами в работе [120]. На 13 день культивирования, за сутки до процедуры децеллюляризации, к культуре фибробластов, сформировавшей в результате культивирования клеточный пласт, добавляли ротенон (Sigma-Aldrich, США) до концентрации 500 нМ. При децеллюляризации клеточные пласты обрабатывали 0,1% раствором дезоксихолата натрия (Диа-М, РФ) в ФСБ (Панэко, РФ), затем пятикратно промывали тёплым раствором Хэнкса (Панэко, РФ) и инкубировали в 50 Е/мл растворе рекомбинантной ДНКазы I человека (SciStore, РФ) на ФСБ в течение 30 минут при 37°C .

Для моделирования профибротического микроокружения МСК жировой ткани 2-3 пассажа высевали на полученный децеллюляризованный ВКМ, достигая при расеве 60% конфлюэнтности монослоя. В культуральную среду добавляли рекомбинантный человеческий TGF-β1 (R&D, США) до концентрации 5 нг/мл, после чего МСК культивировали в течение 96 часов.

## **Приготовление образцов для анализа транскриптома одиночных клеток**

Для анализа транскриптома одиночных клеток первичную культуру МСК жировой ткани (второго пассажа) культивировали в контрольных либо профибротических условиях в лунках шестилуночного планшета в течение 96 ч, после чего переводили в суспензию и отбирали для дальнейшего процессирования объём суспензии, содержащий 10000 клеток. Далее с использованием прибора Chromium Controller (10x Genomics, США) и наборов реагентов Chromium Next GEM Single Cell 3' GEM, Library & Gel Bead Kit v3.1, Chip D Single Cell DNA Kit и i7 Multiplex Kit (10x Genomics, США) согласно протоколам производителя из каждой клетки готовили библиотеку матричных РНК, меченных баркодом, уникальным для каждой клетки. После этого наборы библиотек матричных РНК секвенировали с использованием системы Illumina HiSeq1500. 2.6.

### **Анализ экспрессии генов на уровне одиночных клеток**

Данные, полученные после секвенирования транскриптома на уровне одиночных клеток, обрабатывали в программе CellRanger 6.1.2 (10x Genomics, США) [121], используя выравнивание против референсного человеческого генома (GRCh38, NCBI). В анализ брали данные клеток, для которых детектированы транскрипты от 2000 до 7000 генов, детектировано от 5000 до 60000 уникальных молекулярных идентификаторов, из которых не более 7% приходилось на митохондриальные матричные РНК. Для регрессии (удаления вклада) митохондриальных генов данные из каждого образца обрабатывали с использованием ПО R-studio 2023.03.1+446 (Posit, Boston, MA, USA) (версии R 4.2.0 и Seurat 4.1.0), после чего с использованием функции IntegrateData проводили интеграцию образцов. Далее проводили анализ главных компонент; 50 главных компонент использовали для кластеризации (алгоритм Лувена с многоуровневым уточнением) и для снижения размерности данных (алгоритм UMAP). Для поиска генов-маркеров кластеров клеток использовали функцию

FindAllMarkers; функциональный анализ генов-маркеров проводили с использованием сервиса gProfiler версии e107\_eg54\_p17\_bf42210 [108]. Для визуализации данных использовали ПО Loupe Browser (10X Genomics, США).

### **Выделение ядерной фракции белков из культуры фибробластов**

Для оценки содержания бета-катенина и NF-κB в ядре из культур фибробластов выделяли ядерную фракцию аналогично описанному ранее [122]. Все манипуляции проводили на льду, используя предварительно охлаждённые растворы. После снятия с планшетов суспензию клеток два раза промывали ФСБ, ресуспендировали в 10 мМ буфере 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислоты (HEPES; Sigma-Aldrich, США), pH 7.9, содержащем 10 мМ KCl, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,5 мМ дитиотреитола (ДТТ; Thermo Scientific, США) и 0,5 мМ фенилметилсульфонилфторида (PMSF; AppliChem, Германия) и инкубировали в течение 10 минут. Для разрушения цитоплазматической мембраны к суспензии клеток добавляли Triton X-100 до концентрации 0,3% и перемешивали пипетированием. Далее ядра осаждали центрифугированием (10000g, 5 минут, +4°C), осадок и супернатант сохраняли.

Осадок, содержащий ядра, растворяли в 20 мМ буфере HEPES, pH 7.9 содержащем 25% глицерина (v/v), 0,42 М NaCl, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,5 мМ ДТТ, 0,2 мМ ЭДТА и 0,5 мМ PMSF и инкубировали на льду в течение 30 минут, после чего снова центрифугировали при тех же условиях. Полученный супернатант, представляющий собой ядерную фракцию, использовали для приготовления образцов для вестерн-блоттинга.

К супернатанту, полученному после осаждения ядер, добавляли 1/9 (по объёму) 0,3М HEPES, pH 7.9, 1,4 М KCl, 30 мМ MgCl<sub>2</sub>, инкубировали на льду в течение 30 минут, после чего снова центрифугировали (14000g, 10 минут, +4°C). Осадок отбрасывали; супернатант, представляющий собой цитоплазматическую фракцию, использовали для приготовления образцов для вестерн-блоттинга.

Эффективность отделения ядерной и цитоплазматической фракций оценивали методом вестерн-блоттинга с использованием антител, специфичных к KDM1 (маркер ядерной фракции) и GAPDH (маркер цитоплазматической фракции; преобладает в цитоплазме).

### **Иммунопреципитация**

Деплецию (удаление) белка DKK из фракции секрета МСК, обогащенной растворимыми белковыми факторами, проводили методом иммунопреципитации. Для этого к 100-200 мкл фракции РФ-МСК, содержащей 50-100 мкг тотального белка, добавляли поликлональные кроличьи антитела, специфичные к человеческому белку DKK3 (CloudClone Corporation, КНР) либо контрольные изотипические антитела кролика (rabbit IgG1, Invitrogen, США) до концентрации 0,1 мкг/мл и инкубировали в течение двух часов при 4°C при постоянном перемешивании на ротаторе Intelli-Mixer RM-2L (ELMI, Латвия). Далее к раствору добавляли 30-50 мкл суспензии магнитных частиц с иммобилизованным на их поверхности белком G (DynaBeads Protein G, Invitrogen, США), предварительно трижды промытых ФСБ с 0,1% БСА, и инкубировали при тех же условиях в течение часа. По завершении инкубирования магнитные частицы отделяли от раствора на магните (Invitrogen, США). Эффективность удаления DKK3 из раствора оценивали методом вестерн-блоттинга.

### **Статистическая обработка данных**

Статистическую обработку данных проводили с использованием ПО Microsoft Excel и GraphPad Prism. Для выборок с  $n \geq 11$  проводили проверку нормальности распределения данных с использованием критерия Шапиро-Уилка. Для характеристик с нормальным распределением рассчитывали арифметическое среднее и стандартное отклонение; для проверки наличия статистически значимых различий между экспериментальными группами применяли однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), далее при сравнении групп использовали t-критерий Стьюдента. Для характеристик с ненормальным распределением рассчитывали медиану и межквартильный размах (Q1-Q3); для

проверки наличия статистически значимых различий между экспериментальными группами применяли критерий Краскела-Уоллиса, при сравнении групп использовали U-критерий Манна-Уитни. Уровнем статистической значимости считали значение  $p < 0,05$ . Для оценки сходимости данных протеомного анализа и результатов, полученных методом вестерн-блоттинга, рассчитывали коэффициент корреляции Пирсона, отражающий степень линейной зависимости между двумя множествами данных.

## РЕЗУЛЬТАТЫ<sup>2</sup>

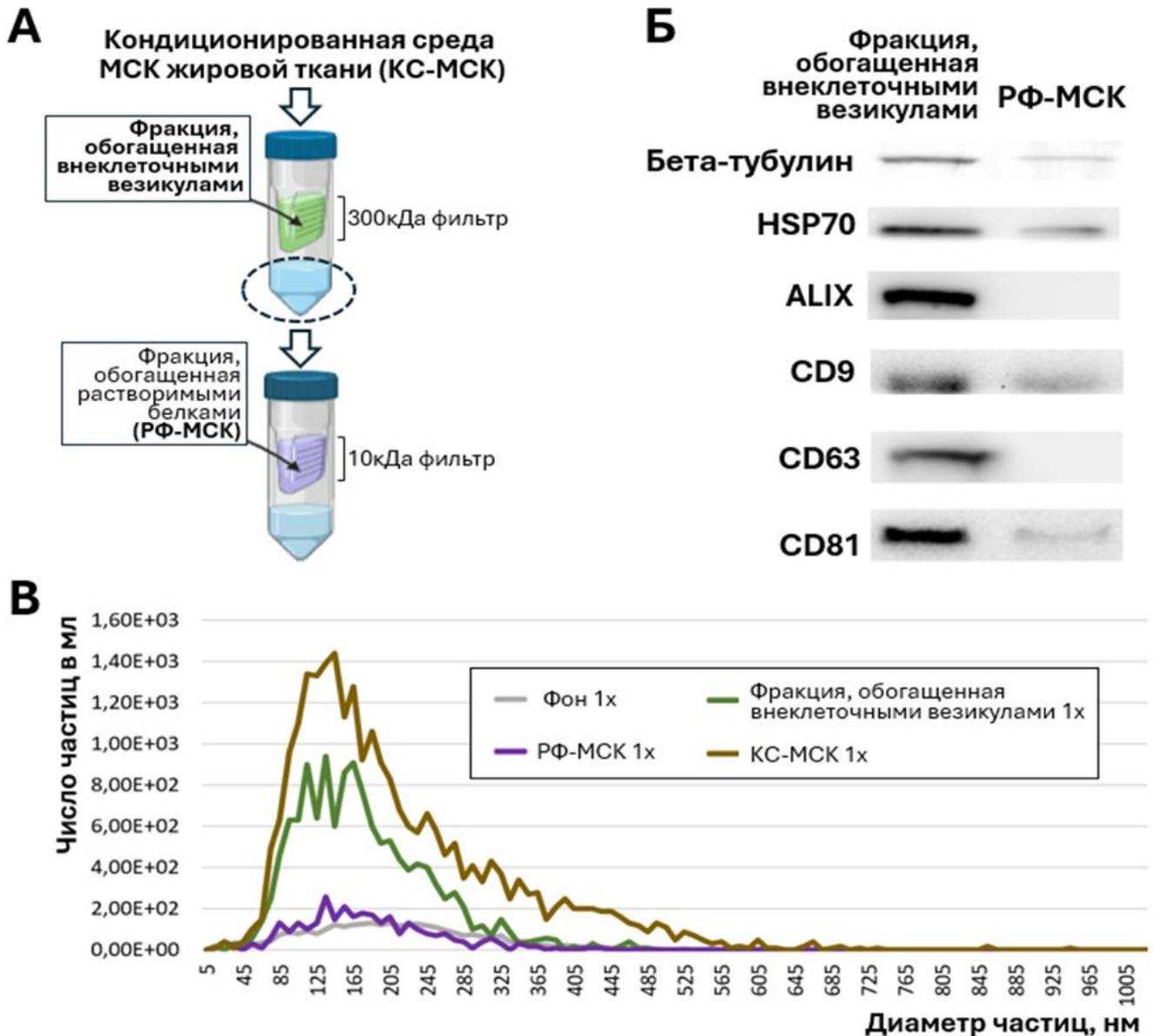
### Разделение на фракции растворимых белков и внеклеточных везикул влияет на способность секретомы МСК подавлять дифференцировку фибробластов в миофибробласты *in vitro*

Для исследования механизмов паракринного действия МСК на процесс дифференцировки фибробластов в миофибробласты мы использовали фракции белков секретомы, полученные от клеток иммортализованной линии МСК жировой ткани человека (ASC52-TELO, ATCC) методом ультрафильтрации. В работе использовали тотальную фракцию белков секретомы (КС-МСК), полученную путем концентрирования белков кондиционированной среды методом ультрафильтрации с использованием фильтра с пределом эксклюзии 10кДа, а также фракцию растворимых белковых факторов секретомы МСК (РФ-МСК), которую получали из фракции КС-МСК с использованием фильтра с пределом эксклюзии 300 кДа. Схема получения фракции РФ-МСК из КС-МСК приведена на рис. 11А.

Методом вестерн-блоттинга мы оценили содержание белков, характерных для внеклеточных везикул, в выделяемой фракции РФ-МСК (проходит через фильтр, фильтрат, рис 11 А), а также в отделяемой при этом фракции внеклеточных везикул (остаются над фильтром, рис. 11 А). При этом мы провели оценку содержания как мембранных белков везикул (белка X, взаимодействующего с продуктом гена 2, связанного с апоптозом (ALIX), CD9, CD63, CD81), так и белков, находящихся внутри везикул (белка теплового шока

<sup>2</sup> При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:  
 1. **Kulebyakina M.**, Basalova N., Butuzova D., Arbatsky M., Chechekhin V., Kalinina N., Tyurin-Kuzmin P., Kulebyakin K., Klychnikov O., Efimenko A. Balance between pro- and antifibrotic proteins in mesenchymal stromal cell secretome fractions revealed by proteome and cell subpopulation analysis. // International Journal of Molecular Sciences. 2024. Т. 25, №1. — P. 290. Импакт-фактор WoS (JIF) = 4.9, объём публикации – 1,71 печатных листа, личный вклад автора диссертации – 1,36 печатных листа.  
 2. **Kulebyakina M.**, Butuzova D., Klychnikov O., Strogov Yu., Basalova N., Efimenko A. Study on the mechanisms of antifibrotic action of soluble proteins of human mesenchymal stromal cells secretome (принята к публикации). // Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry. Импакт-фактор WoS (JIF) = 0.6, объём публикации – 2,08 печатных листа, личный вклад автора диссертации – 1,85 печатных листа.

70 (HSP70) и бета-тубулина) в указанных фракциях секрета МСК. Полученные результаты подтвердили, что используемая нами методика фракционирования позволяет эффективно удалить везикулярные белки при выделении фракции РФ-МСК, обогатив, таким образом, последнюю растворимыми белками секрета.



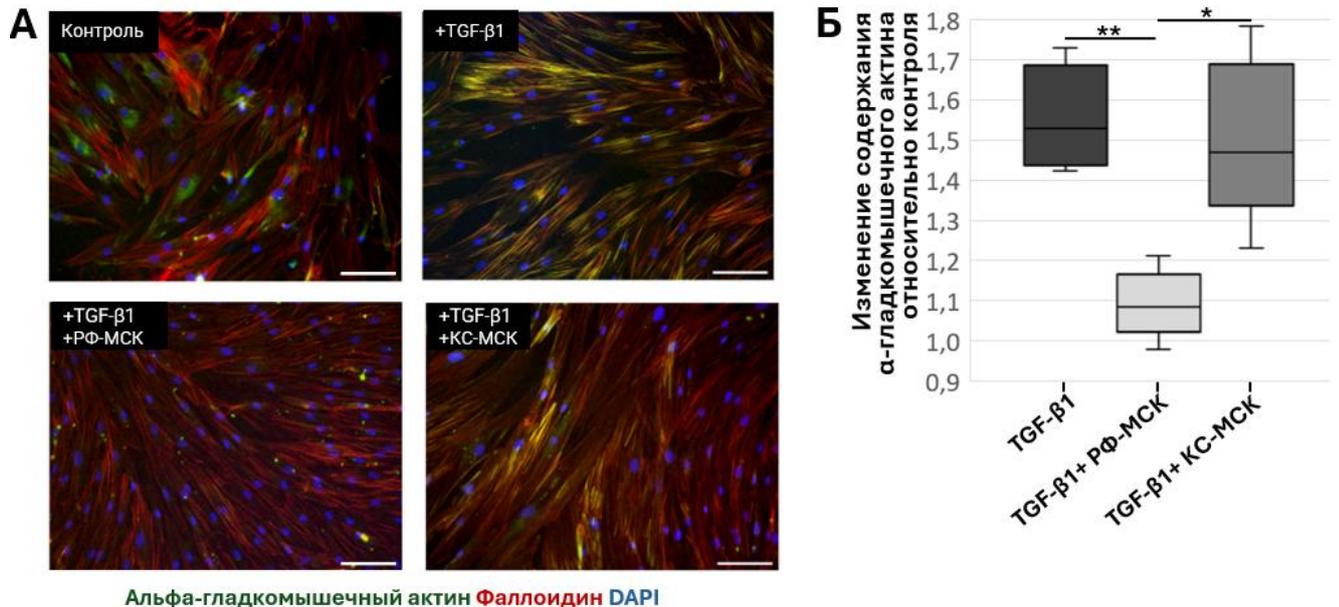
**Рисунок 11.** Оценка эффективности отделения белков внеклеточных везикул при выделении фракции растворимых белков секрета (РФ-МСК) из кондиционированной среды МСК ЖТ, полученной после кондиционирования в течение 48 часов, методом ультрафильтрации. **А.** Схема эксперимента по выделению фракции РФ-МСК методом ультрафильтрации. 300кДа фильтр – фильтрующий элемент с пределом эксклюзии 300кДа, 10кДа фильтр – фильтрующий элемент с пределом эксклюзии 10кДа. **Б.** Вестерн-блоттинг фракций, полученных в результате выделения РФ-МСК из секрета линии МСК

ЖТ, с иммунохимическим окрашиванием на белки внеклеточных везикул. **В.** Распределение частиц по размеру во фракциях, получаемых при выделении РФ-МСК из кондиционированной среды МСК. Результаты анализа траекторий наночастиц (NTA). Фон – кондиционированная среда, собранная после кондиционирования в течение 30 минут.

Помимо этого, методом анализа траекторий наночастиц (NTA) мы показали, что целостность везикул, содержащихся в кондиционированной среде МСК жировой ткани, сохраняется при процедуре отделения фракции везикулярных белков от растворимых белков секрета методом ультрафильтрации (рис.11 В). Везикулы (наночастицы соответствующего размера) детектировали в исходной фракции КС-МСК, а также во фракции, обогащённой внеклеточными везикулами. Во фракции РФ-МСК сигнал от наночастиц наблюдали на уровне фона (кондиционированной среды, собранной после кондиционирования в течение 30 минут). Следовательно, выделяемая фракция РФ-МСК свободна от внеклеточных везикул. Более того, поскольку при выделении фракции РФ-МСК целостность везикул сохраняется, то при выделении РФ-МСК методом ультрафильтрации нам удастся избежать загрязнения этой фракции содержимым везикул. Таким образом, нами отработана методика получения фракции РФ-МСК, изучение состава и биологических эффектов которой позволит судить о механизмах паракринного действия МСК жировой ткани, связанных с продукцией растворимых секретиремых белков, но не с продукцией везикул.

Оценку влияния фракций секрета МСК жировой ткани на дифференцировку фибробластов в миофибробласты мы проводили на *in vitro* модели миофибробластной дифференцировки, запускаемой добавлением TGF- $\beta$ 1, в которой использовали первичные культуры фибробластов кожи человека. Эффективность формирования миофибробластов оценивали спустя 96 часов методом иммуноцитохимического окрашивания на альфа-гладкомышечный актин. Репрезентативные микрофотографии получаемых результатов приведены рис. 12. Накопление альфа-гладкомышечного актина и встраивание его в стресс-фибриллы (на рис. 12 стресс-фибриллы визуализированы как тяжи желтого цвета,

образующегося при наложении красного и зеленого псевдоцветов) является характерным для фенотипа миофибробластов.



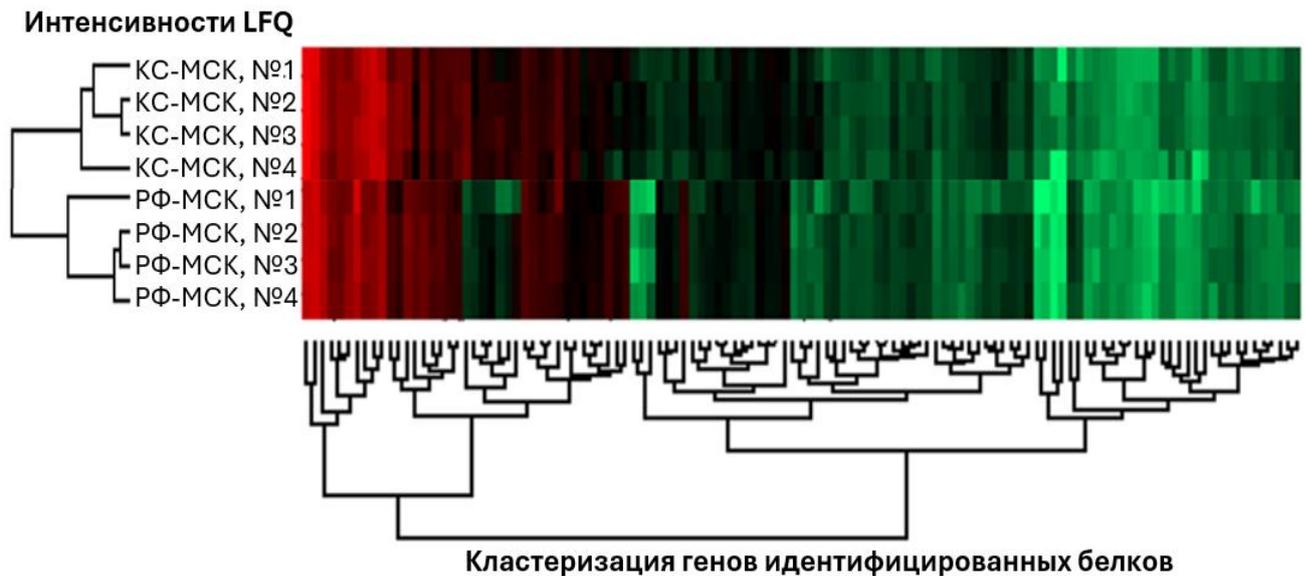
**Рисунок 12.** Влияние фракций РФ-МСК и КС-МСК секрета МСК жировой ткани на *in vitro* дифференцировку фибробластов кожи в миофибробласты, индуцированную добавлением рекомбинантного TGF-β1, спустя 96 часов после добавления TGF-β1 (+TGF-β1), добавления TGF-β1 одновременно с фракциями КС-МСК (+TGF-β1 + КС-МСК) либо РФ-МСК (+TGF-β1 + РФ-МСК). Контроль – фибробласты кожи без добавления TGF-β1. **А.** Иммуноцитохимическое окрашивание на альфа-гладкомышечный актин (зелёный), окрашивание фибриллярного актина фаллоидином (красный) и окрашивание ядер DAPI (синий). Длина масштабного отрезка - 50 мкм. **Б.** Изменение содержания альфа-гладкомышечного актина в фибробластах относительно контроля, рассчитанное по результатам иммуноцитохимического окрашивания. n=9. \*p<0,05, \*\*p<0,01.

Согласно полученным результатам, фракция РФ-МСК эффективно предотвращает дифференцировку фибробластов в миофибробласты, что выражается в предотвращении накопления альфа-гладкомышечного актина и встраивания его в стресс-фибриллы. При этом фракция КС-МСК не обладает настолько выраженным эффектом в данной модели. По всей видимости, выделение фракции РФ-МСК приводит к её обогащению белками, препятствующими дифференцировке фибробластов в миофибробласты, а также, возможно, к обеднению РФ-МСК белками, способствующими миофибробластной

дифференцировке, относительно исходной фракции КС-МСК. Для установления причин различий в степени влияния фракций РФ-МСК и КС-МСК на дифференцировку фибробластов в миофибробласты мы провели сравнительный протеомный анализ данных фракций.

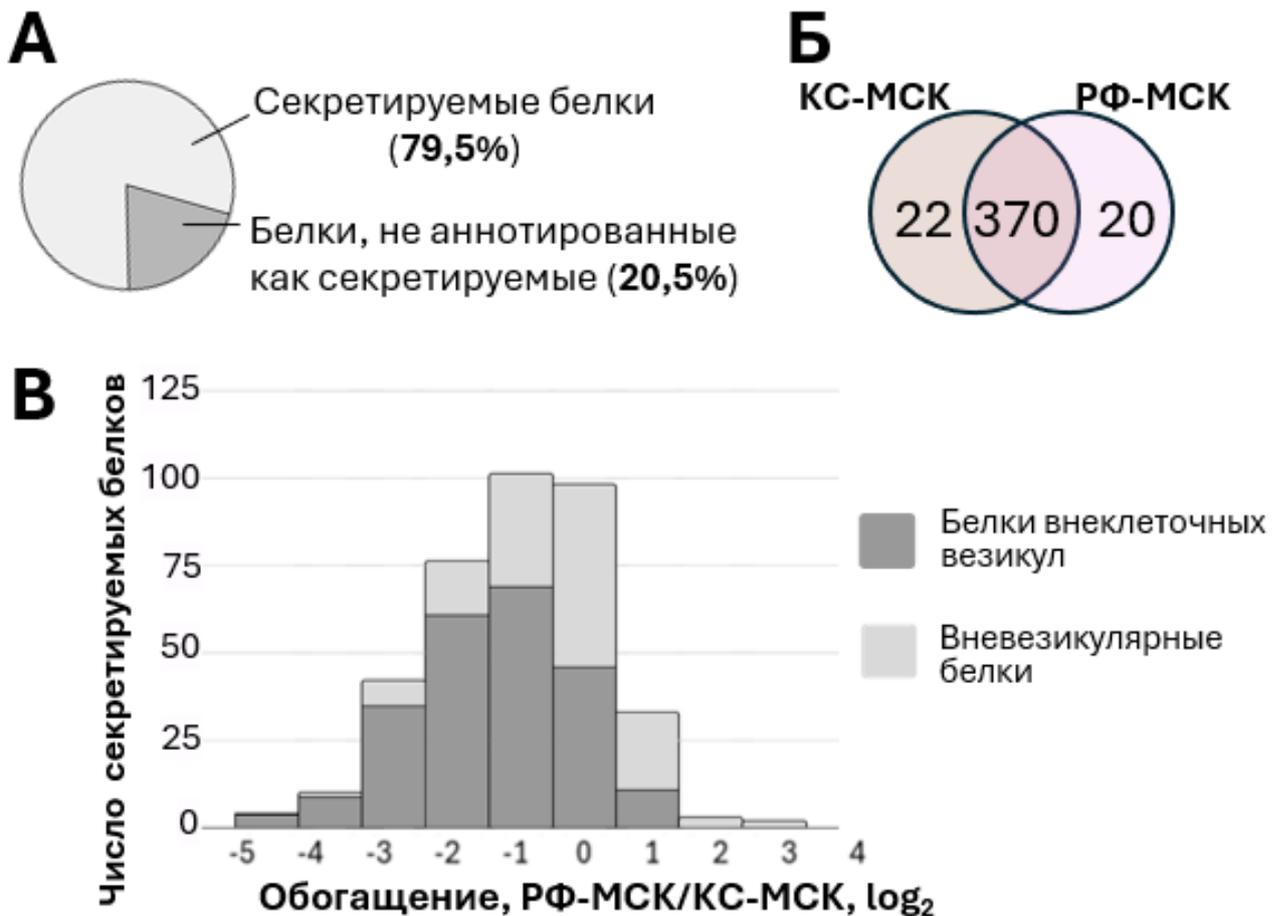
### **Фракция растворимых белковых факторов секрета МСК обогащена белками, способными регулировать канонические сигнальные пути TGF- $\beta$ , Wnt и Notch**

После отработки методики кондиционирования, позволяющей минимизировать загрязнение получаемых фракций секрета внутриклеточными белками (итоговая методика приведена в разделе Материалы и методы, «Сбор кондиционированной среды и получение фракций секрета МСК»), мы провели три независимых эксперимента по полуколичественному протеомному анализу фракций РФ-МСК и КС-МСК. По итогам экспериментов нами достоверно идентифицировано суммарно 518 белков в образцах обеих фракций. Построение иерархической кластеризации данных протеомного анализа показало, что данные, полученные для образцов одной фракции, кластеризуются вместе (древо иерархической организации данных приведено на тепловой карте, рис. 13), что свидетельствует о хорошей сходимости результатов, полученных для разных технических повторностей для каждого образца. Сходимость биологических повторов эксперимента, рассчитанная методом построения графиков рассеяния с расчетом коэффициента Пирсона, превышала 70% для каждой отдельно взятой пары результатов биологических повторов.



**Рисунок 13.** Общий вид тепловой карты, получаемой при иерархической кластеризации результатов масс-спектрометрического анализа белкового состава фракций КС-МСК и РФ-МСК секрета МСК жировой ткани.

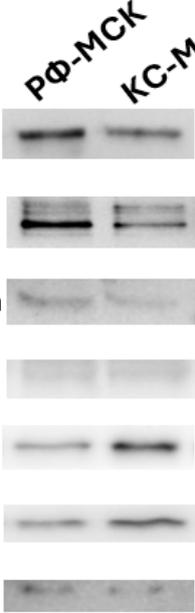
Согласно результатам автоматической аннотации результатов протеомного анализа с использованием программы gProfiler [108], 79,5% всех идентифицированных белков (412 из 518) аннотированы в базе данных Gene Ontology как локализованные во внеклеточном пространстве либо в ВКМ, т. е. являются секретируемыми (рис. 14 А). Это свидетельствует о том, что использованный нами протокол кондиционирования позволил существенно избавиться от клеточного дебриса, обогатив, таким образом, фракции КС-МСК и РФ-МСК секретируемыми белками. Дальнейшую сравнительную характеристику белкового состава фракций секрета мы проводили по представленности в них секретируемых белков. В первую очередь, мы обнаружили, что 89,8% белков (370 из 412 белков), аннотированных как локализованные во внеклеточном пространстве либо в ВКМ, обнаруживаются в обеих фракциях секрета (рис. 14 Б). Каждая фракция содержит сравнительно мало уникальных секретируемых белков: 22 белка (5,7%) фракции КС-МСК не обнаружены во фракции РФ-МСК, и напротив, 20 белков (5,1%) фракции РФ-МСК не обнаружены во фракции КС-МСК.



**Рисунок 14.** Характеристика белкового состава фракций секретома МСК жировой ткани, выполненная методом протеомного анализа. Представлены объединённые результаты трёх независимых экспериментов (по 3-5 технических повторов в каждом). **А.** Содержание секретируемых белков среди белков, обнаруженных во фракциях РФ-МСК и КС-МСК секретома МСК жировой ткани. **Б.** Диаграмма Вена секретируемых белков, идентифицированных во фракциях КС-МСК и РФ-МСК секретома МСК жировой ткани. **В.** Распределение секретируемых белков, идентифицированных методом протеомного анализа во фракциях РФ-МСК и КС-МСК секретома МСК жировой ткани, по обогащению ими фракции РФ-МСК относительно фракции КС-МСК (РФ-МСК/КС-МСК).

Для идентификации большего числа белков, которые потенциально могут опосредовать наблюдаемые эффекты фракций секретома МСК на дифференцировку фибробластов в миофибробласты, мы выполнили также поиск белков, которыми фракции обогащены в два и более раза относительно друг друга. Согласно полученным результатам, фракция КС-МСК обогащена относительно фракции РФ-МСК 133 белками, большая часть которых (110

белков) аннотированы как содержащиеся во внеклеточных везикулах. Фракция РФ-МСК обогащена относительно фракции КС-МСК 38 белками. Распределение белков по обогащению ими фракций секрета МСК отображено на рис. 14 В. Валидацию результатов полуколичественного протеомного анализа мы провели методом вестерн-блоттинга с использованием антител, специфичных к высоко представленным белкам секрета МСК (рис. 15). Коэффициент корреляции данных значений обогащения РФ-МСК относительно КС-МСК отдельными белками, рассчитанных по результатам вестерн-блоттинга и полуколичественного протеомного анализа, составил 0,91. Это свидетельствует о высокой корреляции данных, полученных нами с использованием двух данных методов.

			Обогащение, РФ-МСК/КС-МСК	
			по данным протеомного анализа	по данным вестерн-блоттинга (n=3)
Ламинин			2,3	1,9±0,6
Коллаген I типа			2	2,9±0,2
Коллаген IV типа			1,3	1,8±0,4
Фибронектин			0,8	0,8±0,1
Винкулин			0,48	0,6±0,1
Глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа			0,36	0,5±0,1
Бета-тубулин			0,15	0,4±0,3

**Рисунок 15.** Вестерн-блоттинг фракций РФ-МСК и КС-МСК секрета МСК жировой ткани с иммунохимическим окрашиванием на высоко представленные белки секрета МСК, а также значения обогащений фракций секрета МСК данными белками, рассчитанные на основании результатов вестерн-блоттинга и протеомного анализа.

На следующем этапе работы мы приступили к выяснению потенциальных механизмов действия белков фракции РФ-МСК, которая способна эффективно препятствовать миофибробластной дифференцировке *in vitro*. В качестве потенциальных эффекторов нами рассматривались те белки, которыми фракция

РФ-МСК обогащена относительно фракции КС-МСК. Результаты протеомного анализа позволили обнаружить 59 таких белков: 21 белок, детектированный только во фракции РФ-МСК (рис. 5 Б), а также 38 белков, содержание которых во фракции РФ-МСК превышало их содержание во фракции КС-МСК в два и более раза. Анализ литературы данного набора белков позволил выявить в нём потенциальные регуляторы канонических сигнальных путей TGF- $\beta$ , Wnt и Notch (Таблица 3). Каждый из перечисленных сигнальных путей может быть вовлечен в регуляцию процесса дифференцировки фибробластов в миофибробласты.

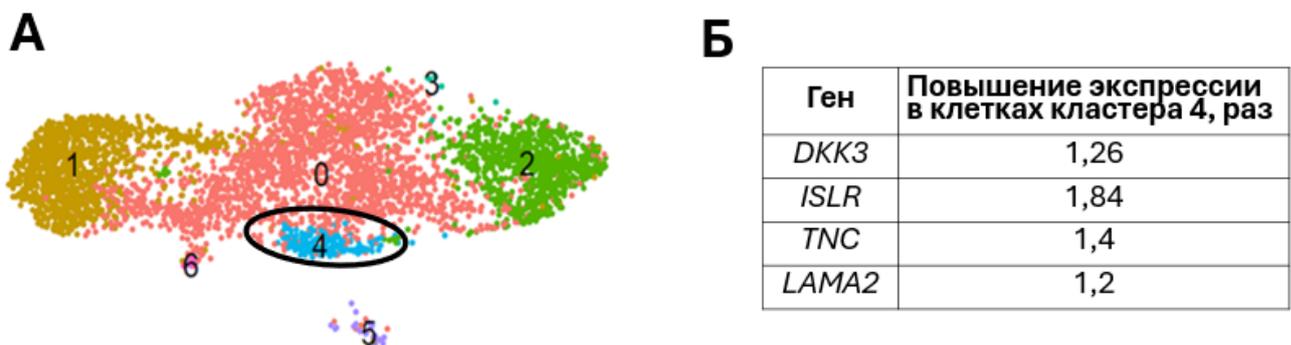
**Таблица 3.** Участие секретируемых белков, которыми фракция РФ-МСК обогащена относительно фракции КС-МСК, во взаимодействии с компонентами канонических сигнальных путей TGF- $\beta$ , Wnt и Notch, по данным литературы. РФ-МСК/КС-МСК – обогащение фракции РФ-МСК относительно фракции КС-МСК.

Название белка	Ген	РФ-МСК/ КС-МСК, раз	Потенциально регулирует сигнальный путь		
			TGF- $\beta$	Wnt	Notch
Белок 3 семейства Диккопф (Dickkopf-related protein 3, DKK3)	<i>DKK3</i>	2,1		✓[123]	
Белок суперсемейства иммуноглобулинов, содержащих богатый лейцинами повтор (immunoglobulin superfamily containing leucine-rich repeat protein, ISLR)	<i>ISLR</i>	-*		✓[124]	
Ламинин, субъединица альфа-2 (laminin subunit alpha-2)	<i>LAMA2</i>	2		✓[125]	
Белок, связывающий латентный TGF- $\beta$ , -1 (latent-transforming growth factor beta-binding protein 1, LTBP-1)	<i>LTBP1</i>	3,7	✓[23]		
Белковый продукт сверхэкспрессируемого гена нефробластомы (nephroblastoma overexpressed, NOV)	<i>NOV</i>	-*			✓[126]
Тенасцин С	<i>TNC</i>	2,2	✓[127]		

\* – указанный белок не обнаружен во фракции КС-МСК

**Экспрессия регуляторов сигнальных путей TGF- $\beta$ , Wnt и Notch, которыми обогащена фракция растворимых белковых факторов секретома МСК, повышена в небольшой субпопуляции МСК жировой ткани, сокращающейся в профибротических условиях**

Методом сравнительного протеомного анализа нами выявлены семь белков, через которые, предположительно, реализуется способность МСК жировой ткани паракринно регулировать миофибробластную дифференцировку по механизмам, связанным с продукцией растворимых факторов. Для поиска субпопуляций МСК жировой ткани, которые могут экспрессировать данные белки, мы провели поиск по созданной нами ранее базе данных транскриптома одиночных клеток первичной культуры МСК жировой ткани человека. На основании различий в экспрессионном профиле все клетки первичной культуры МСК жировой ткани можно разделить на семь основных субпопуляций (рис. 16 А).

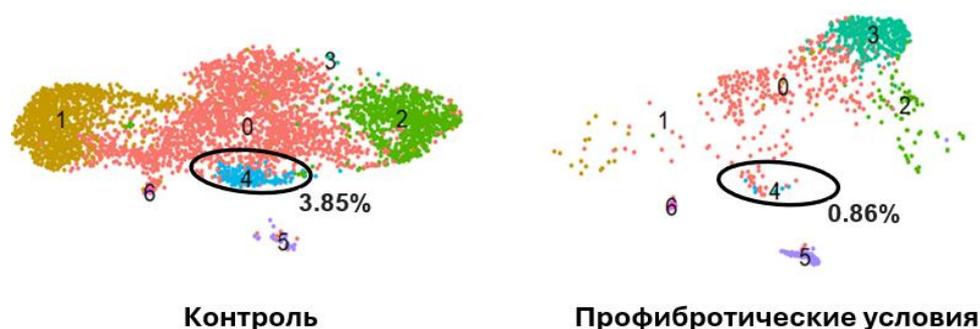


**Рисунок 16. А.** Визуализация данных анализа транскриптома одиночных клеток первичной культуры МСК жировой ткани человека. Субпопуляции (кластеры) клеток, различающиеся по транскрипционному профилю, обозначены цифрами 0-6. Каждый кластер соответствует субпопуляции клеток, характеризующейся повышенной экспрессией определенных групп генов: кластер 0 – генов, связанных с формированием актинового цитоскелета и плотных контактов (*ACTA2*, *CALD1*, *TAGLN*, *TPM2* и др.), кластер 1 – генов, связанных с окислительным фосфорилированием и биосинтетическими процессами (*ATP5F1E*, *HSPB6*, *RPL12*, *SNHG29* и др.); кластер 2 – генов, связанные с регуляцией клеточного цикла (*CENPF*, *MKI67*, *PTTG1*, *TYMS* и др), кластер 3 – генов, связанных с деградацией ВКМ (*MMP2*, *CTSK*, *LUM*, *CLU* и др.), кластер 4 – генов белков ВКМ (*TIMP1*, *POSTN*, *COL5A1*, *FBN1* и др.), кластер 5 – генов, связанных с контракtilностью (*MYH11*, *MYLK*, *CALD1* и др.), кластер 6 – генов, связанных с

регуляцией иммунного ответа (*CD74*, *FCER1G*, *CCL2*, *CXCL8* и др.). Б. Повышение экспрессии генов белков, потенциально препятствующих дифференцировке фибробластов в миофибробласты, в кластере 4 относительно тотальной популяции МСК жировой ткани.

Краткая характеристика данных субпопуляций приведена в описании к рисунку 16. Пять из шести генов белков, выявленных нами как потенциально регулирующие дифференцировку фибробластов в миофибробласты в составе фракции РФ-МСК, обнаружены в результатах анализа транскриптома одиночных клеток МСК жировой ткани (*NOV* не обнаружен). Из этих пяти генов экспрессия четырех (*DKK3*, *ISLR*, *LAMA2*, *TNC*) была повышена в одной и той же небольшой субпопуляции клеток, обозначенной как кластер 4 (рис. 16 Б).

Анализ транскриптома одиночных клеток также позволил проследить судьбу данной малой субпопуляции клеток МСК жировой ткани в профибротических условиях. В данном эксперименте для моделирования профибротических условий первичную культуру МСК жировой ткани культивировали на децеллюляризованном ВКМ фибробластов кожи человека в присутствии рекомбинантного TGF- $\beta$ 1 человека в течение четырёх суток, после чего анализировали транскриптом клеток в данной культуре. Согласно полученным результатам, данная малая субпопуляция первичной культуры МСК жировой ткани значительно сокращается (с 3,85% до 0,86% от общего количества клеток) при культивировании в профибротических условиях (рис. 17).



**Рисунок 17.** Визуализация данных анализа транскриптома одиночных клеток первичной культуры МСК жировой ткани человека, культивированных в контрольных (Контроль) и профибротических условиях (Профибротические условия) в течение 96ч. Субпопуляции (кластеры) клеток, различающиеся по транскрипционному профилю, обозначены цифрами 0-6. Овалом выделена

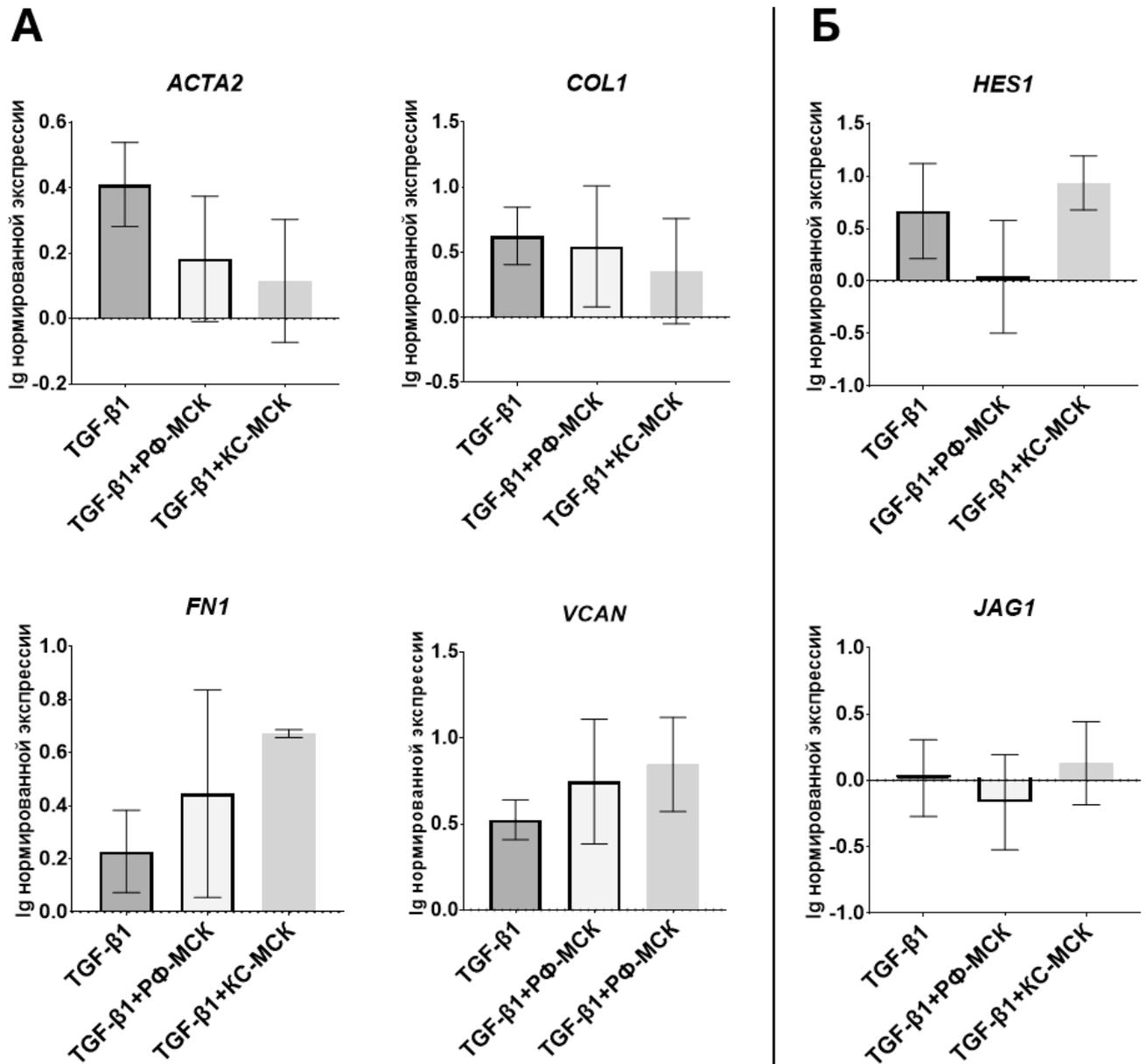
субпопуляция, отличающаяся повышенной экспрессией генов *DKK3*, *ISLR*, *LAMA2*, *TNC*.

Таким образом, методом протеомного анализа в составе фракции РФ-МСК секретома МСК жировой ткани нами обнаружены белки, потенциально регулирующие дифференцировку фибробластов в миофибробласты посредством взаимодействия с компонентами канонических сигнальных путей TGF- $\beta$ , Wnt и Notch. Методом анализа транскриптома одиночных клеток нами обнаружена небольшая субпопуляция в составе МСК жировой ткани, экспрессирующая гены данных белков, а также показано, что культивирование в профибротических условиях приводит к сокращению данной субпопуляции.

### **Фракция растворимых белков секретома МСК подавляет канонический сигнальный путь Wnt в фибробластах**

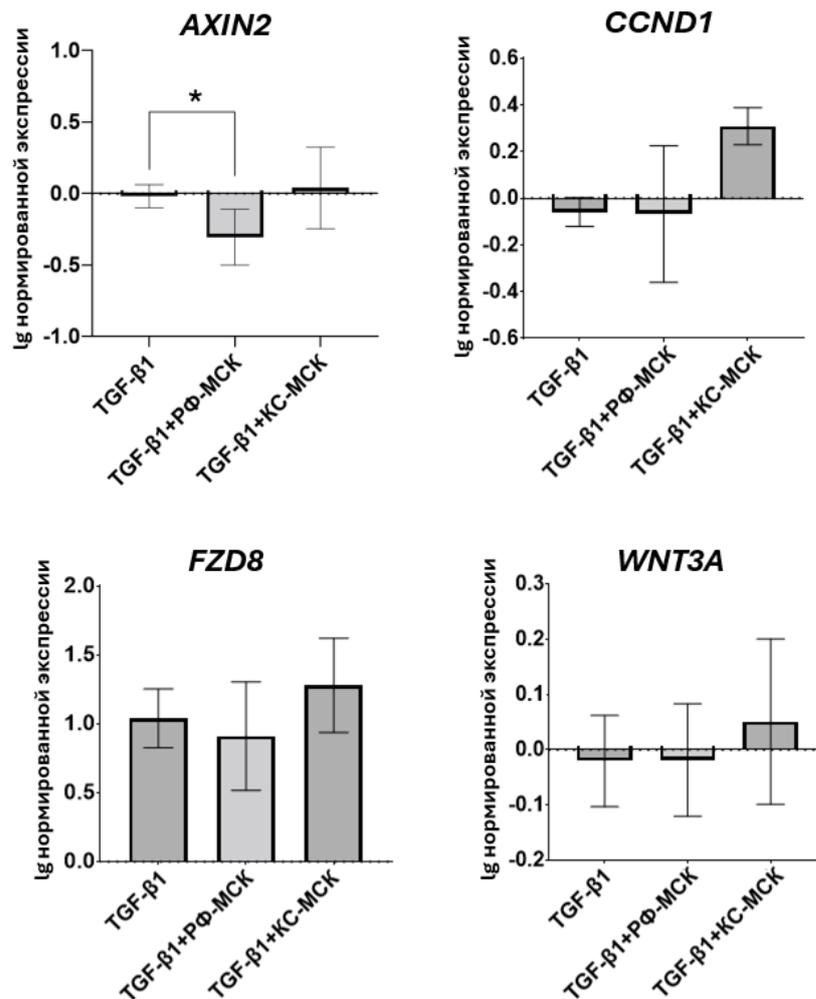
На предыдущих этапах работы мы установили, что фракция РФ-МСК обогащена относительно фракции КС-МСК набором белков, способных влиять на дифференцировку фибробластов в миофибробласты посредством взаимодействия с компонентами канонических сигнальных путей TGF- $\beta$ , Wnt и Notch. Это позволило сформулировать гипотезу о том, что фракция РФ-МСК, предположительно, отличается от фракции КС-МСК по влиянию на указанные сигнальные пути в фибробластах при их дифференцировке в миофибробласты. Для проверки данного предположения мы оценили способность фракций РФ-МСК и КС-МСК регулировать уровень активации канонических сигнальных путей TGF- $\beta$ , Wnt и Notch в используемой нами модели *in vitro* дифференцировки фибробластов в миофибробласты. Об уровне активации указанных сигнальных путей мы судили по изменению экспрессии их транскрипционных мишеней (гены альфа-гладкомышечного актина *ACTA2*, коллагена I типа *COL1*, фибронектина 1 *FNI*, версикана *VCAN* – в случае канонического сигнального пути TGF- $\beta$ ; гены транскрипционного фактора *HES1* и лиганда Notch *JAG1* – в случае канонического сигнального пути Notch; гены каркасного белка *AXIN2*, циклина

D1 *CCND1*, лиганда Wnt *WNT3A* и корцепторного белка Wnt *FZD8* – в случае канонического сигнального пути Wnt), которое оценивали методом ОТ-ПЦР.



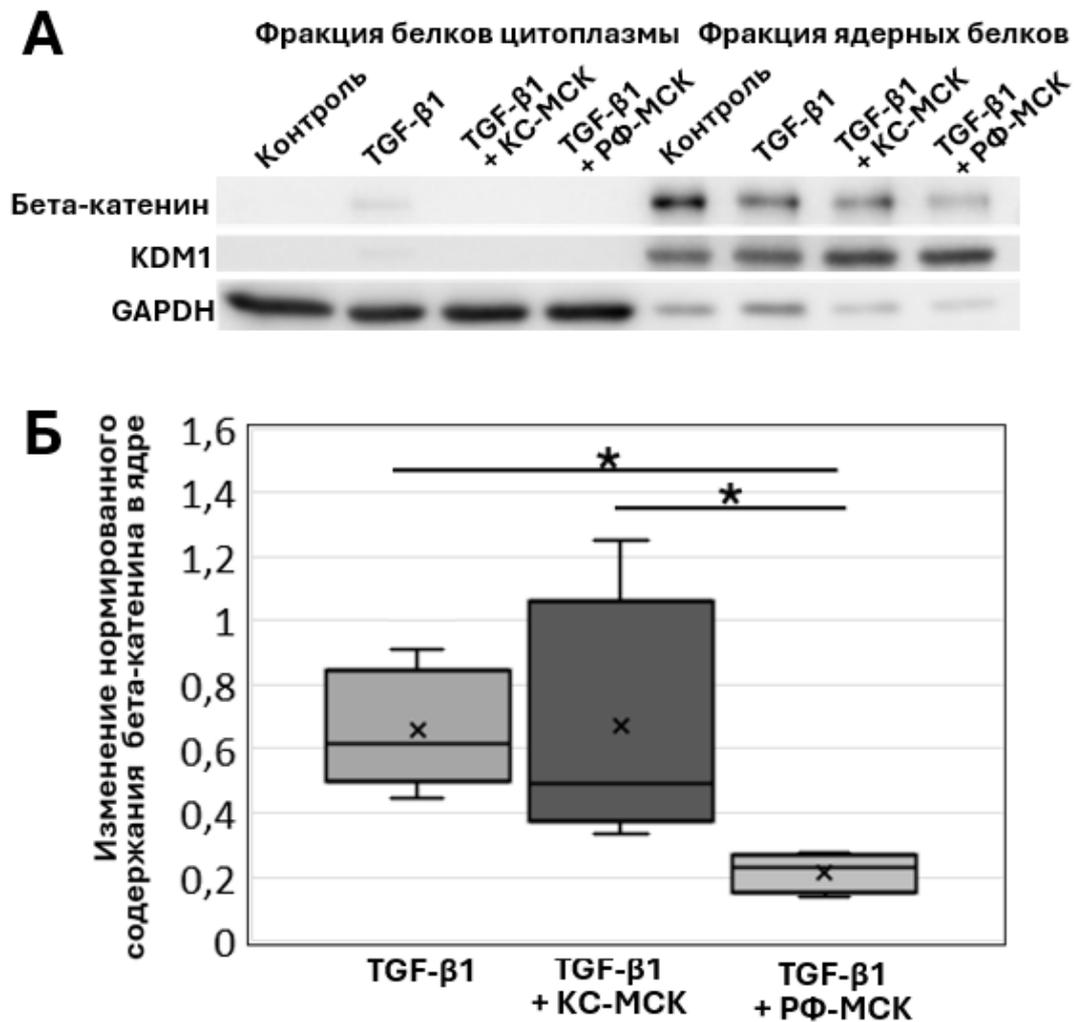
**Рисунок 18.** Влияние фракций РФ-МСК и КС-МСК секрета МСК жировой ткани человека на экспрессию генов в модели *in vitro* дифференцировки фибробластов кожи в миофибробласты, индуцируемой добавлением TGF-β1. Изменение уровня экспрессии генов относительно контроля (культура фибробластов без добавления TGF-β1), измеренное методом ОТ-ПЦР. **А.** Изменение экспрессии транскрипционных мишеней канонического сигнального пути Notch. n=11. **Б.** Изменение экспрессии транскрипционных мишеней канонического сигнального пути TGF-β. n=11.

Согласно полученным результатам, в данной модели добавление фракции РФ-МСК (так же, как и фракция КС-МСК) к фибробластам не приводило к значимому изменению в них экспрессии транскрипционных мишеней канонических сигнальных путей Notch (рис. 18 А) и TGF- $\beta$  (рис. 18 Б) спустя шесть часов. При этом добавление РФ-МСК, но не КС-МСК, приводило к значимому снижению экспрессии одного из генов-мишеней канонического сигнального пути Wnt – гена *AXIN2* (рис. 19), экспрессия которого, согласно данным литературы, прямо отражает уровень активации этого сигнального пути.



**Рисунок 19.** Влияние фракций КС-МСК и РФ-МСК секрета МСК жировой ткани человека на экспрессию генов-мишеней канонического сигнального пути Wnt в модели *in vitro* дифференцировки фибробластов кожи в миофибробласты, индуцируемой добавлением TGF- $\beta$ 1, спустя 6 ч после добавления. Изменение уровня экспрессии генов относительно контроля (культура фибробластов без добавления TGF- $\beta$ 1), измеренное методом ОТ-ПЦР. n=11. \*p<0,05.

Методом вестерн-блоттинга с использованием антител, специфичных к бета-катенину – посреднику канонического сигнального пути Wnt – мы подтвердили, что добавление РФ-МСК, но не КС-МСК, приводило к значимому снижению содержания бета-катенина, посредника канонического сигнального пути Wnt, в ядерной фракции фибробластов в модели миофибробластной дифференцировки (рис. 20 А, Б).



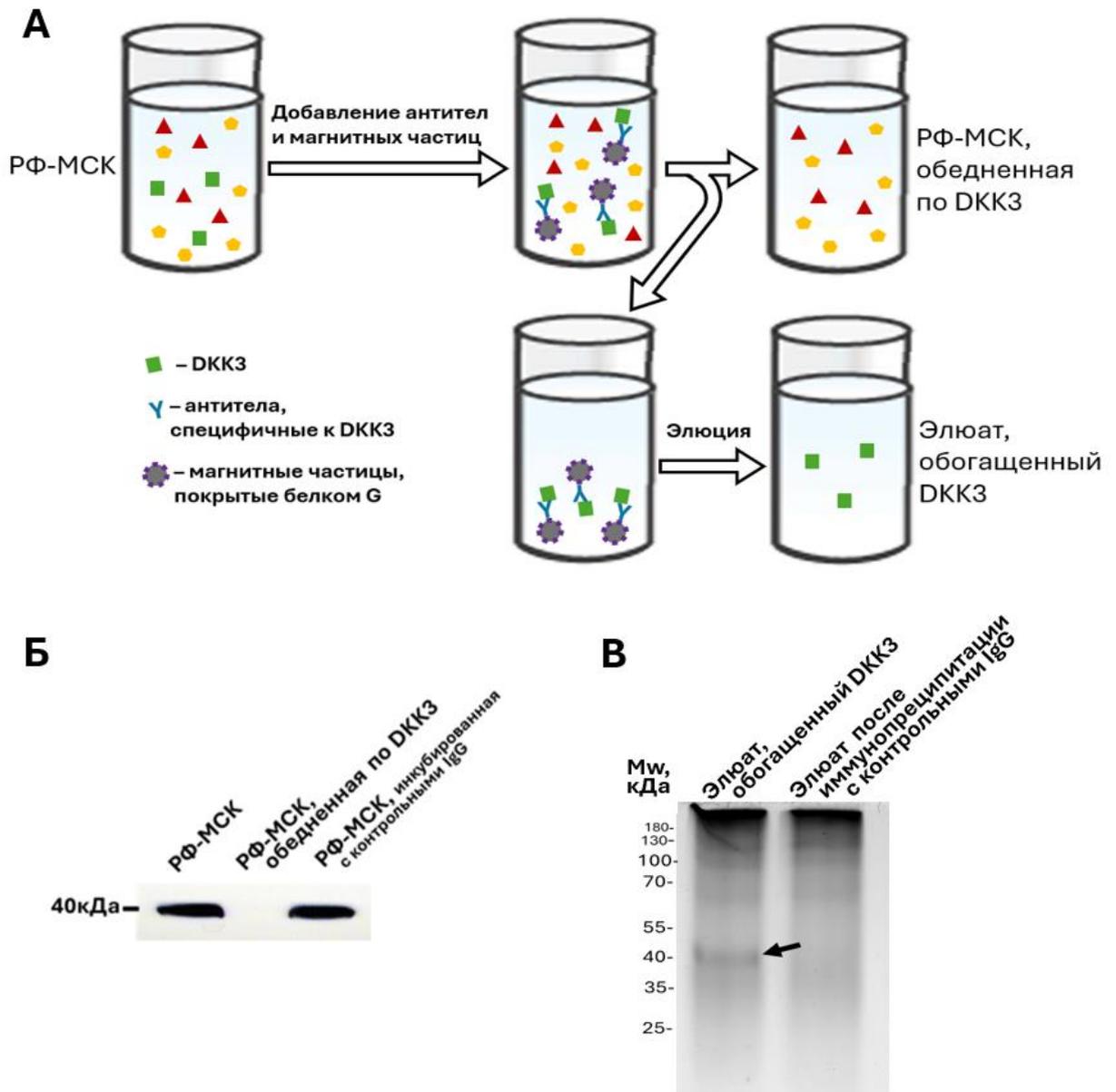
**Рисунок 20.** Влияние фракций КС-МСК и РФ-МСК секрета МСК жировой ткани на содержание бета-катенина в ядерной фракции фибробластов в модели *in vitro* дифференцировки фибробластов в миофибробласты, индуцируемой добавлением TGF-β1. Вестерн-блоттинг. **А.** Содержание бета-катенина во фракции ядерных белков фибробластов спустя 1ч. **Б.** Изменение нормированного на KDM1 содержания бета-катенина в ядре относительно контроля (культура фибробластов без добавления TGF-β1). n=5. \*p<0,05.

Таким образом, мы обнаружили, что компоненты РФ-МСК – фракции секрета МСК, препятствующей дифференцировке фибробластов в миофибробласты – снижают в фибробластах уровень активации канонического сигнального пути Wnt, способствующего, по данным литературы, миофибробластной дифференцировке.

**Белок DKK3 в составе фракции растворимых белковых факторов секрета МСК подавляет канонический сигнальный путь Wnt в фибробластах и препятствует дифференцировке фибробластов в миофибробласты**

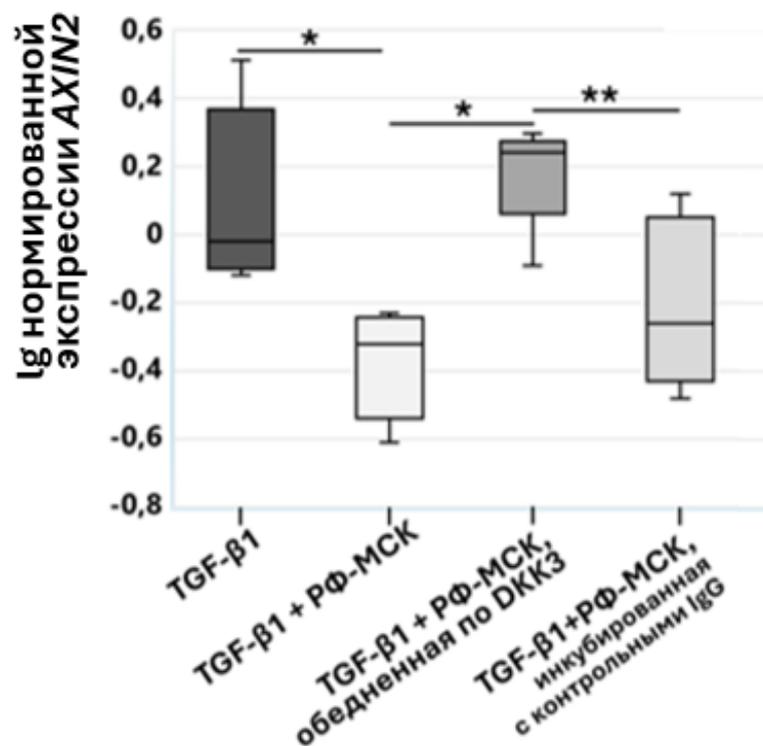
В ходе выполнения данной работы нами установлено, что фракция РФ-МСК, в отличие от фракции КС-МСК: а) эффективно препятствует дифференцировке фибробластов в миофибробласты; б) обогащена белками DKK3, ISLR, и LAMA2, способными регулировать в фибробластах канонический сигнальный путь Wnt, регулирующий дифференцировку фибробластов в миофибробласты и в) подавляет активацию канонического сигнального пути Wnt в фибробластах в модели их дифференцировки в миофибробласты. Для уточнения роли конкретных белков в реализации наблюдаемых нами эффектов фракции РФ-МСК на фибробласты мы изучили данные литературы. Согласно им, белки ISLR и LAMA2 являются активаторами канонического сигнального пути в фибробластах [124,125]. Имеющиеся данные о влиянии белка DKK3 на канонический сигнальный путь Wnt свидетельствуют как в пользу того, что он способен ингибировать данный сигнальный путь, так и в пользу того, что DKK3 может выступать в качестве его (ко)активатора [123,128–131]. Поэтому мы решили исследовать вклад DKK3 в реализацию эффекта фракции РФ-МСК, выражающегося в подавлении канонического сигнального каскада Wnt в фибробластах. Для этого методом иммунопреципитации мы обеднили фракцию РФ-МСК по белку DKK3 (схема эксперимента приведена на рис. 21 А). Эффективность обеднения проверили методом вестерн-блоттинга (рис. 21 Б), а

селективность иммунопреципитации оценили на основании электрофореза белков элюата (рис. 21 В).



**Рисунок 21.** Оценка эффективности удаления (деплеции) DKK3 из фракции РФ-МСК. **А.** Схема эксперимента по деплеции DKK3 из фракции РФ-МСК методом иммунопреципитации. **Б.** Вестерн-блоттинг образцов фракции РФ-МСК, фракции РФ-МСК, обедненной по белку DKK3 и фракции РФ-МСК, инкубированную с носителем, связанным с контрольными изотипическими иммуноглобулинами (РФ-МСК, инкубированная с контрольными IgG). Иммунохимическое окрашивание на DKK3. **В.** Анализ молекулярных масс белков элюата, полученного в результате иммунопреципитации из фракции РФ-МСК, методом денатурирующего электрофореза в ПААГ. Окрашивание раствором Coomassie G-250.

Далее мы оценили изменение эффекта фракции РФ-МСК при её обеднении по белку DKK3 на уровень активации канонического сигнального пути Wnt в фибробластах в *in vitro* модели миофибробластной дифференцировки. Об изменении активации данного сигнального пути, аналогично описанному ранее, мы судили по изменению уровня его транскрипционной мишени - гена *AXIN2*. Согласно полученным результатам (рис. 22), обеднение фракции РФ-МСК по белку DKK3 значительно снижает способность данной фракции подавлять базальный уровень экспрессии гена *AXIN2* в фибробластах в данной модели.



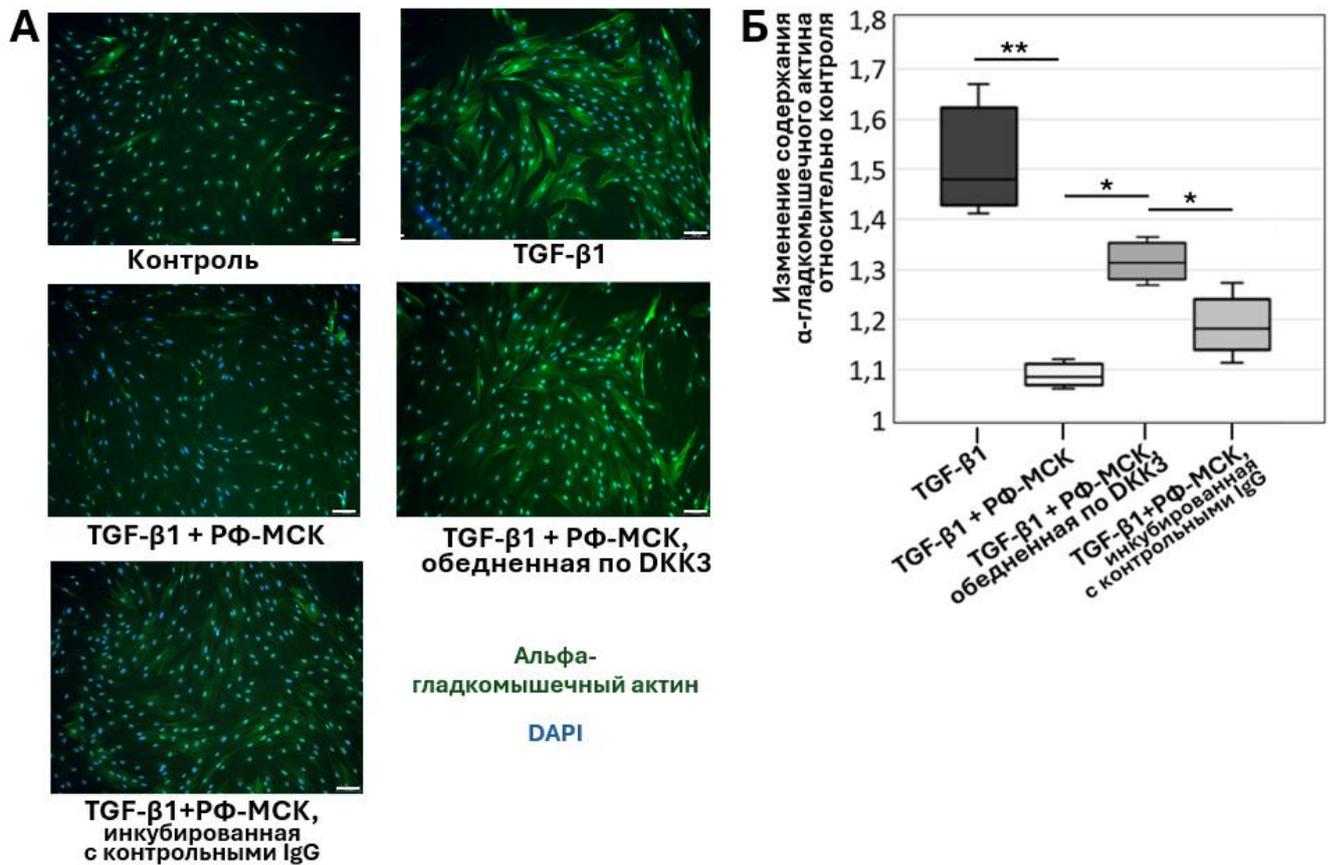
**Рисунок 22.** Влияние фракции РФ секрета МСК, обедненной по белку DKK3, на экспрессию гена *AXIN2* в фибробластах *in vitro* дифференцировку фибробластов в миофибробласты, индуцированную добавлением рекомбинантного TGF-β1. Приведены значения изменения нормированной экспрессии гена *AXIN2* в фибробластах спустя 6 часов после добавления:

- TGF-β1 (“+TGF-β1”),
- TGF-β1 одновременно с фракцией РФ-МСК (“+TGF-β1 + РФ-МСК”),
- TGF-β1 одновременно с фракцией РФ-МСК, обедненной по белку DKK3 методом иммунопреципитации (“+TGF-β1 + РФ-МСК, обеднённая по DKK3”),

- добавления TGF- $\beta$ 1 одновременно с фракцией РФ-МСК, инкубированной с изотипическими IgG (кроличьи IgG1; “+TGF- $\beta$ 1 + РФ-МСК, инкубированная с контрольными IgG”, контроль неспецифики обеднения образца РФ-МСК по белку DKK3 методом иммунопреципитации)

относительно контроля (фибробласты без добавления TGF- $\beta$ 1). n=5. \*p<0,05, \*\*p<0,1.

Аналогичным образом мы оценили вклад DKK3 в реализацию эффекта фракции РФ-МСК на процесс миофибробластной дифференцировки *in vitro*. Для этого к культуре фибробластов одновременно с индукцией дифференцировки к фибробластам добавляли фракцию РФ-МСК, фракцию РФ-МСК, обеднённую по белку DKK3 методом иммунопреципитации, либо соответствующий контроль (фракцию РФ-МСК, инкубированную с аффинным сорбентом на основе контрольных изотипических иммуноглобулинов). Спустя 96 часов проводили иммуноцитохимическое окрашивание полученных культур клеток с использованием антител, специфичных к альфа-гладкомышечному актину. Об эффективности дифференцировки судили по интенсивности сигнала от иммунохимического окрашивания, а также по формированию в клетках “тяжей” – стресс-фибрилл, богатых альфа-гладкомышечным актином, спустя четверо суток после индукции миофибробластной дифференцировки.



**Рисунок 23.** Влияние фракции РФ секрета МСК, обедненной по белку DKK3, на эффективность *in vitro* дифференцировки фибробластов кожи в миофибробласты, индуцированной добавлением рекомбинантного TGF- $\beta$ 1, спустя 96 часов после добавления TGF- $\beta$ 1 (10нг/мл; +TGF- $\beta$ 1), добавления TGF- $\beta$ 1 одновременно с фракциями КС-МСК (+TGF- $\beta$ 1 + КС-МСК) либо РФ-МСК (+TGF- $\beta$ 1 + КС-МСК). Контроль – фибробласты кожи без добавления TGF- $\beta$ 1. **А.** Иммуноцитохимическое окрашивание на альфа-гладкомышечный актин (зелёный) и окрашивание ядер DAPI (синий). **Б.** Изменение содержания  $\alpha$ -гладкомышечного актина в фибробластах относительно контроля, рассчитанное по результатам иммуноцитохимического окрашивания.  $n=5$ . \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,1$ .

Согласно полученным результатам (рис. 23), фракция РФ-МСК, обедненная по белку DKK3, в значительной степени теряет способность препятствовать дифференцировке фибробластов в миофибробласты. Таким образом, можно заключить, что DKK3 в составе фракции РФ-МСК препятствует дифференцировке фибробластов в миофибробласты *in vitro*, причем механизм действия DKK3 в данной модели связан с подавлением канонического сигнального каскада Wnt.

## **Тотальная фракция белков секретома МСК обогащена белками, активирующими сигнальный путь NF-κB**

В рамках нашей работы мы установили, что тотальная фракция белков секретома (КС-МСК) демонстрирует сниженную способность препятствовать дифференцировке фибробластов в миофибробласты *in vitro* по сравнению с выделяемой из неё фракцией растворимых белковых факторов секретома МСК (РФ-МСК). По нашим предположениям, фракция КС-МСК может быть обогащена относительно фракции РФ-МСК некоторыми белками, стимулирующими дифференцировку фибробластов в миофибробласты. Чтобы проверить данное предположение, среди общего набора белков, которыми, по нашим данным, фракция КС-МСК обогащена относительно фракции РФ-МСК, мы провели поиск потенциальных регуляторов миофибробластной дифференцировки. Для этого мы провели анализ литературы на предмет взаимодействия белков, которыми фракция КС-МСК обогащена относительно фракции РФ-МСК, с сигнальными каскадами, регулирующими дифференцировку фибробластов в миофибробласты. По результатам анализа литературы нами обнаружено четыре белка, способные активировать в фибробластах провоспалительный транскрипционный фактор NF-κB и тем самым способствовать их дифференцировке в миофибробласты. Полученные данные приведены в Таблице 4.

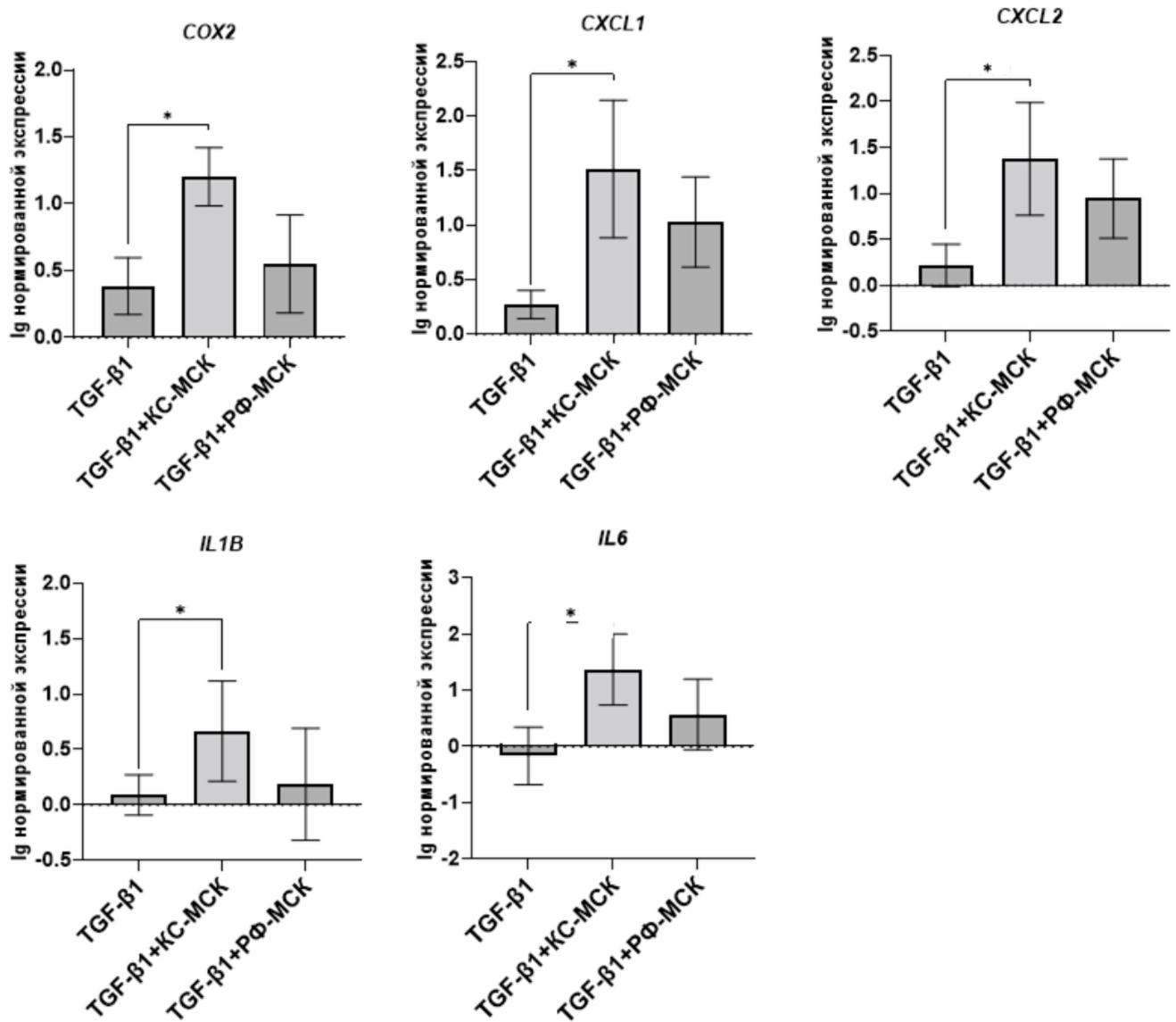
**Таблица 4.** Участие секретиромых белков, которыми фракция КС-МСК обогащена относительно фракции РФ-МСК, в активации транскрипционного фактора NF-κB, по данным литературы. КС-МСК/РФ-МСК – обогащение фракции КС-МСК относительно фракции РФ-МСК.

Название белка	Ген	КС-МСК/ РФ-МСК, раз	Ссылка на источник
Альдокеторедуктаза 1-го семейства, член С3 (aldo-keto reductase family 1 member С3)	<i>AKR1C3</i>	2,8	[132]
Фактор стромальных клеток 1 (stromal cell-derived factor 1, SDF-1)	<i>CXCL12</i>	3,5	[133]

Фактор, ингибирующий миграцию макрофагов (macrophage migration inhibitory factor, MIF)	<i>MIF</i>	16,9	[134,135]
Ассоциированный с микрофибриллами белок-4 (microfibril-associated protein 4, MFAP4)	<i>MFAP4</i>	13,1	[136]

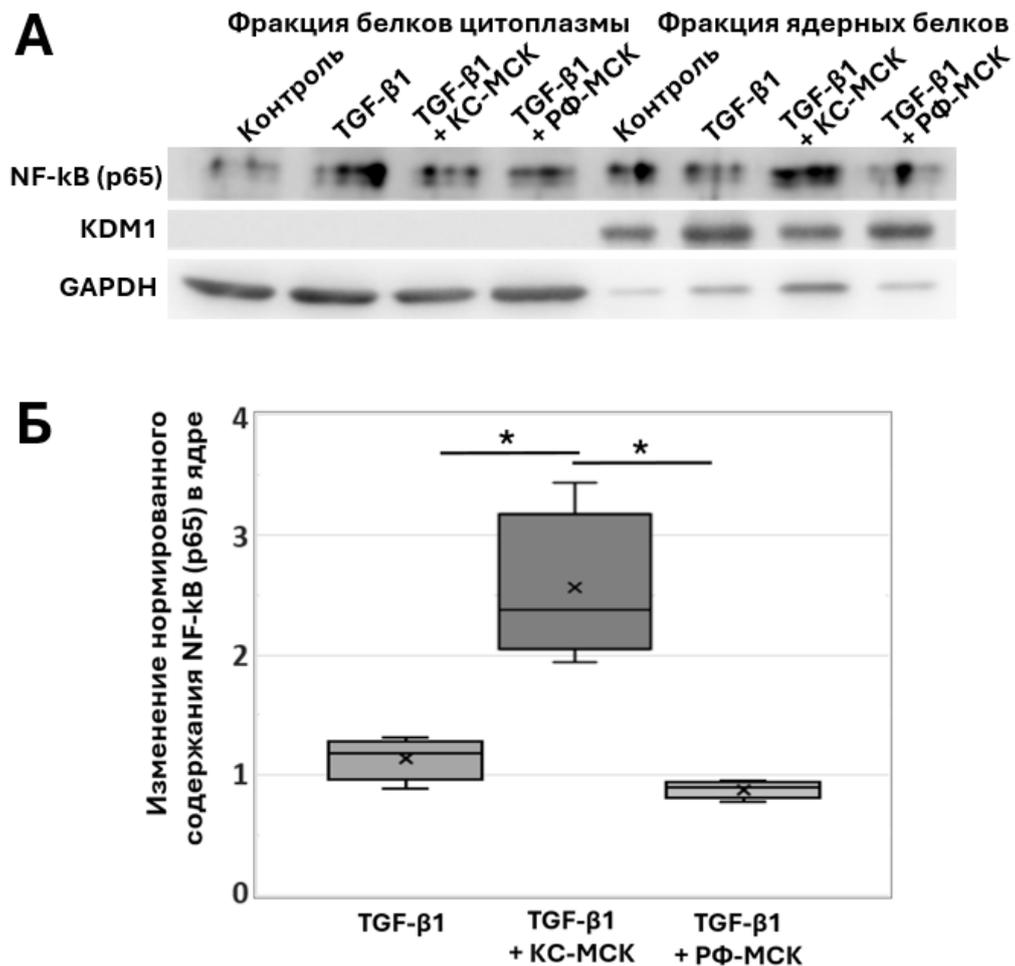
### **Тотальная фракция белков секрета МСК активирует сигнальный путь NF-κB в фибробластах**

Методом ОТ-ПЦР с использованием праймеров на транскрипционные мишени NF-κB – *IL1B*, *IL6*, *CXCL1*, *CXCL2*, *COX2* – мы оценили способность фракций секрета МСК активировать NF-κB в фибробластах кожи человека в модели миофибробластной дифференцировки. В данных экспериментах экспрессию генов измеряли в культуре фибробластов спустя 6 часов после добавления TGF-β1 либо TGF-β1 совместно с фракциями секрета МСК. Согласно полученным результатам, фракция КС-МСК, но не фракция РФ-МСК, активирует экспрессию генов-мишеней NF-κB в культуре фибробластов (рис. 24).



**Рисунок 24.** Влияние фракций КС-МСК и РФ-МСК секрета МСК жировой ткани человека на экспрессию генов-мишеней транскрипционного фактора NF-κB в модели *in vitro* дифференцировки фибробластов кожи в миофибробласты, индуцируемой добавлением TGF-β1, спустя 6 ч после добавления. Изменение уровня экспрессии генов относительно контроля (культура фибробластов без добавления TGF-β1), измеренное методом ОТ-ПЦР. n=13. \*p<0,05.

Методом вестерн-блоттинга мы подтвердили, что добавление фракции КС-МСК, но не фракции РФ-МСК, приводит к возрастанию содержания в ядре фибробластов NF-κB (субъединицы p65), отражающего уровень активации NF-κB, в *in vitro* модели миофибробластной дифференцировки (рис. 25).



**Рисунок 25.** Влияние фракций KC-МСК и РФ-МСК секрета МСК жировой ткани на содержание NF- $\kappa$ B (субъединицы p65) в ядерной фракции фибробластов в модели *in vitro* дифференцировки фибробластов в миофибробласты, индуцируемой добавлением TGF- $\beta$ 1. Вестерн-блоттинг. **А.** Содержание NF- $\kappa$ B (p65) во фракции ядерных белков фибробластов спустя 1ч. **Б.** Нормированное содержание белка NF- $\kappa$ B (p65) в ядре относительно контроля (культура фибробластов без добавления TGF- $\beta$ 1). n=5. \*p<0,05.

Таким образом, нами обнаружено, что фракция KC-МСК, неспособная эффективно препятствовать дифференцировке фибробластов в миофибробласты *in vitro*, обогащена белковыми активаторами транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B. Согласно полученным нами результатам, данная фракция вызывает повышение экспрессии транскрипционных мишеней NF- $\kappa$ B в фибробластах кожи человека, что сопровождается их дифференцировкой в миофибробласты.

### ОБСУЖДЕНИЕ<sup>3</sup>

Дифференцировка резидентных фибробластов в миофибробласты – неотъемлемый этап заживления практически всех тканей организма человека после повреждения. Нарушение регуляции этого процесса способно приводить к замедлению процессов заживления ткани (при недостаточном образовании миофибробластов из фибробластов) либо, напротив, к развитию фибротических изменений и, как следствие, к снижению функции ткани или органа (при избыточном образовании миофибробластов). МСК являются ключевыми регуляторами процессов заживления тканей млекопитающих после повреждения, при этом значительная часть эффектов МСК реализуется за счёт паракринных механизмов [89,137]. Данные механизмы включают в себя как эпигенетическую регуляцию окружающих клеток (посредством доставки в клетки-мишени микроРНК и ферментов ремоделирования хроматина в составе внеклеточных везикул), так и многочисленные механизмы, реализуемые посредством действия растворимых белковых факторов на соответствующие мишени на таргетных клетках. Суммарный эффект паракринного действия МСК в норме можно охарактеризовать как снижающий воспаление и уровень окислительного стресса, препятствующий развитию фибротических изменений и способствующий регенерации ткани [89,94–96]. К настоящему времени подробно описано регулирующее действие растворимых белковых факторов, секретируемых МСК, на функционирование иммунных клеток, ангиогенез и прораствание аксонов, а также непосредственное участие этих белковых факторов в процессах формирования, созревания и ремоделирования ВКМ при заживлении

---

<sup>3</sup> При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

1. **Kulebyakina M.**, Basalova N., Butuzova D., Arbatsky M., Chechekhin V., Kalinina N., Tyurin-Kuzmin P., Kulebyakin K., Klychnikov O., Efimenko A. Balance between pro- and antifibrotic proteins in mesenchymal stromal cell secretome fractions revealed by proteome and cell subpopulation analysis. // *International Journal of Molecular Sciences*. 2024. Т. 25, №1. — P. 290. Импакт-фактор WoS (JIF) = 4.9, объём публикации – 1,71 печатных листа, личный вклад автора диссертации – 1,36 печатных листа.
2. **Kulebyakina M.**, Butuzova D., Klychnikov O., Strogov Yu., Basalova N., Efimenko A. Study on the mechanisms of antifibrotic action of soluble proteins of human mesenchymal stromal cells secretome (принята к публикации). // *Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. Импакт-фактор WoS (JIF) = 0.6, объём публикации – 2,08 печатных листа, личный вклад автора диссертации – 1,85 печатных листа.

поврежденной ткани [3,138–140]. Кроме того, получены данные относительно общего состава тотальной фракции секрета МСК (которая представляет собой сложную смесь везикул и вневезикулярных белков), позволяющие предполагать регулирующее действие МСК на дифференцировку фибробластов [3]. При этом действие растворимых белковых факторов, секретируемых МСК, на процесс дифференцировки тканерезидентных фибробластов в миофибробласты – важнейший этап заживления большинства тканей после повреждения – остается мало исследованным. В настоящей работе предпринята попытка установить эффект растворимых белковых факторов, секретируемых МСК, на дифференцировку фибробластов в миофибробласты, а также выявить конкретные молекулы, потенциально способствующие и препятствующие реализации данного эффекта.

Характеризацию белкового состава фракций секрета МСК мы проводили методом протеомного анализа. Данный метод обладает высокой чувствительностью, позволяющей находить в белковых образцах низкопредставленные молекулы, которыми обычно и являются различные регуляторные белки. В качестве источника секрета нами выбрана коммерчески доступная перевиваемая клеточная линия МСК жировой ткани, immortalized путём введения гена теломеразы (hTERT ASC52telo, ATCC). Использование immortalized клеточных линий позволяет минимизировать вариабельность получаемых образцов секрета по сравнению с использованием первичных культур клеток, выделенных из разных доноров. Отметим, что полученные нами результаты анализа образцов секрета immortalized линии согласуются с опубликованными ранее данными о белковом составе секрета первичной культуры МСК жировой ткани, полученными Калининой и соавторами [3]. В частности, такие белки, как фактор, ингибирующий миграцию макрофагов (MIF), субъединица альфа-2 ламинина (LAMA2), белок 3 семейства Диккопф (DKK3), ассоциированный с микрофибриллами белок-4 (MFAP4), белок суперсемейства иммуноглобулинов, содержащих богатый лейцином повтор (ISLR), белок, связывающий латентный TGF- $\beta$ , -1 (Latent-transforming growth

factor beta-binding protein 1, LTBP-1) и тенасцин С, идентифицированные нами методом протеомного анализа во фракциях секрета hTERT ASC52telo, были также обнаружены в секрете первичных МСК жировой ткани. Это усиливает релевантность полученных нами данных и подтверждает корректность применения клеточной линии hTERT ASC52telo для изучения паракринных эффектов МСК, опосредуемых секретируемыми белками.

Интерпретация результатов протеомного анализа секрета культивируемых клеток нередко оказывается затруднена из-за загрязнения выделяемых фракций секрета внутриклеточными белками, диффундирующими в кондиционированную среду из клеточного дебриса. Мы подобрали протокол сбора кондиционированной среды (подробно описан в Материалах и методах), обеспечивающий получение фракций секрета МСК, в значительной степени очищенных от внутриклеточных белков, за счёт сравнительно короткого (48ч) времени кондиционирования и многократных промывок клеток перед сбором секрета. Согласно результатам протеомного анализа, в полученных нами фракциях секрета 79,5% всех идентифицированных белков (412 из 518 белков) являются секретируемыми. Это даёт основания предполагать, что изучаемые нами эффекты данных фракций в значительной степени опосредованы именно секретируемыми белками.

Не менее важным для достижения цели нашей работы было добиться эффективного отделения растворимых белков, секретируемых МСК, от белков, находящихся в секрете МСК в составе внеклеточных везикул. Для решения этой задачи нами выбран типовой и хорошо описанный метод ультрафильтрации, применение которого для исследований механизмов действия секрета обладает рядом преимуществ. Во-первых, отделение везикул данным методом обеспечивает сохранение их целостности, что предотвращает загрязнение выделяемой фракции растворимых белков содержимым внеклеточных везикул. Во-вторых, применение метода ультрафильтрации позволяет минимизировать риск денатурирования выделяемых белков, что особенно важно для дальнейшего

исследования их функционирования и биологических эффектов. Наконец, использование данного метода позволяет многократно (в сотни раз) концентрировать белки и отделять их при этом от низкомолекулярных веществ секретома (пептидов, липидов и т. д.), избавляясь, таким образом, от вклада малых молекул в исследуемые нами эффекты белков секретома.

Мы показали, что фракция растворимых белковых факторов секретома МСК (РФ-МСК), выделяемая из тотальной фракции белков секретома МСК (РФ-МСК), эффективно препятствует дифференцировке фибробластов в миофибробласты *in vitro*, в то время как исходная фракция КС-МСК не обладает таким выраженным эффектом. По нашим предположениям, выделение фракции РФ-МСК обогащает её некоторыми белками, способными подавлять дифференцировку фибробластов в миофибробласты, а также, возможно, обедняет фракцию РФ-МСК белками, способствующими миофибробластной дифференцировке. Сравнительный полуколичественный анализ фракций секретома МСК и последующее изучение данных литературы позволили нам установить, что фракция РФ-МСК обогащена относительно исходной фракции КС-МСК белками, способными регулировать в фибробластах канонические сигнальные пути TGF- $\beta$ , Wnt, а также Notch. Аналогичным образом мы установили, что исходная фракция КС-МСК обогащена относительно фракции РФ-МСК белками, способными регулировать в фибробластах активность транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B. Все перечисленные сигнальные пути, согласно данным литературы, способны регулировать дифференцировку фибробластов в миофибробласты. Поэтому на последующих этапах работы для уточнения механизмов действия фракций секретома МСК на дифференцировку фибробластов в миофибробласты мы проверяли гипотезы относительно влияния фракций секретома МСК на данные сигнальные пути.

В настоящей работе нами обнаружено, что фракция растворимых белковых факторов секретома МСК (РФ-МСК) снижает уровень активации сигнального пути Wnt в фибробластах. Наличие некоего базального уровня активации

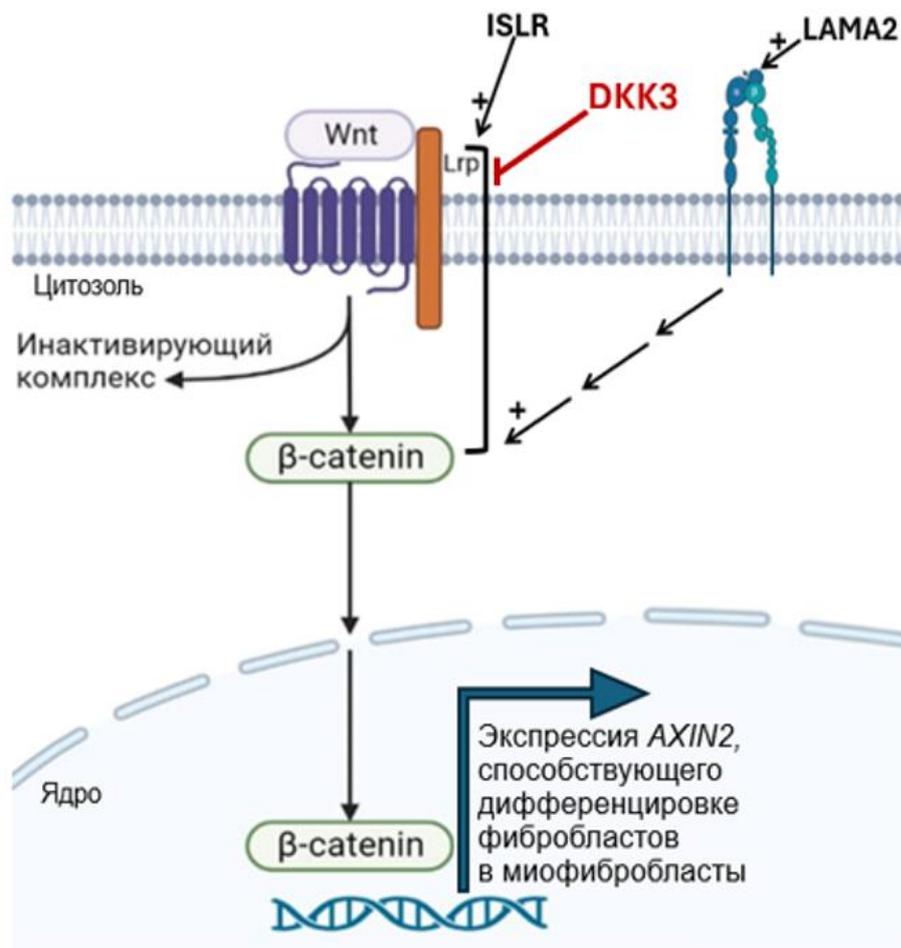
сигнального каскада Wnt, снижение которого мы наблюдали, в изучаемых нами культурах фибробластов объясняется тем, что фибробласты, согласно данным литературы, секретируют лиганды Wnt (в частности, Wnt-1 и Wnt-10b) [41], которые могут действовать на данные клетки аутокринно. Фракция РФ-МСК, согласно полученным нами результатам протеомного анализа, обогащена белками DKK3, ISLR, и LAMA2, которые, по данным литературы, способны взаимодействовать с каноническим сигнальным путем Wnt. Так, секретируемый белок ISLR, согласно данным литературы, способен активировать канонический сигнальный каскад Wnt [124]. Альфа-2-субъединица ламинина (LAMA2) в составе различных изоформ ламинина способна связываться с интегриновым димером  $\alpha\beta 1$  и активировать бета-катенин – посредник канонического сигнального пути Wnt – через интегрин-зависимую киназу [125]. Поскольку на поверхности фибробластов кожи – клеток, использованных нами в *in vitro* модели дифференцировки в миофибробласты, – присутствует интегрин  $\alpha\beta 1$  [141], то можно предположить существование такой интегрин-опосредованной активации сигнального каскада Wnt ламинином и в нашей модели. Таким образом, на основании данных литературы ISLR и LAMA2 не могут рассматриваться как белки, опосредующие наблюдаемое нами снижение активации канонического сигнального пути Wnt.

Данные относительно влияния белка DKK3 на канонический сигнальный путь Wnt в клетках-мишенях неоднозначны. С одной стороны, известно, что данный белок относится к семейству секретируемых белков DKK, большинство представителей которого (например, DKK1, DKK4) являются хорошо охарактеризованными ингибиторами сигнального пути Wnt с описанным механизмом действия (за счёт связывания корецепторов Lrp и белков Kremen, ведущего к интернализации Lrp, что препятствует формированию комплекса Lrp и Frizzled и трансдукции сигнала от лигандов данного рецепторного комплекса) [142,143]. С другой стороны, известно, что DKK3 существенно отличается от DKK1 и DKK4 по способности взаимодействовать с компонентами сигнального пути Wnt. В частности, показано, что DKK3 не связывается с Lrp; однако DKK3

способен связываться с белком Kremen1 [143,144]. Кроме того, для белка DKK3 показано существование внутриклеточной (цитоплазматической) изоформы, образующейся в результате альтернативного сплайсинга и способной подавлять канонический сигнальный каскад Wnt по механизму, связанному с секвестрированием бета-катенина [145].

Неоднократно было показано, что добавление белка DKK3 к клеткам способно ингибировать в них канонический сигнальный путь Wnt [123,128]. Однако в некоторых работах экзогенно добавляемый DKK3 либо не изменял уровень активации канонического сигнального пути Wnt [129,146], либо даже потенцировал активацию данного сигнального пути, запускаемую его лигандом Wnt-3a [131]. Накамурой и коллегами были получены данные о том, что экзогенно добавляемый DKK3 выступает как коактиватор канонического сигнального пути Wnt в клетках Мюллеровой глии, но как ингибитор данного пути – в клетках линии COS7 (фибробластоподобная клеточная линия, полученная из почек африканской зеленой мартышки) [130]. Это позволяет предполагать, что то, какой эффект оказывает DKK3 на активацию канонического сигнального пути Wnt в клетках-мишенях, может определяться типом этих клеток.

Согласно полученным нами данным, DKK3 в составе фракции РФ-МСК подавляет активацию канонического сигнального пути Wnt в фибробластах кожи человека, что выражается в снижении уровня экспрессии гена AXIN2 – транскрипционной мишени данного сигнального пути. Кроме того, мы продемонстрировали, что DKK3 в составе фракции РФ-МСК необходим для эффективного подавления этой фракцией дифференцировки фибробластов в миофибробласты. По всей видимости, влияние DKK3, секретируемого МСК, на дифференцировку фибробластов в миофибробласты опосредовано его влиянием на канонический сигнальный путь Wnt в фибробластах (рис. 26).



**Рисунок 26.** Схема регуляции канонического сигнального пути Wnt белками, которыми обогащена РФ-МСК. Белки LAMA2 и ISLR, по данным литературы, способны активировать данный сигнальный путь. Согласно результатам, полученным в настоящей работе, DKK3 в составе фракции РФ-МСК ингибирует канонический сигнальный путь Wnt.

Мы также наблюдали выраженную тенденцию к подавлению в фибробластах канонического сигнального пути Notch, которое выражалось в снижении экспрессии генов *HES1* и *JAG1* – транскрипционных мишеней данного сигнального пути – под действием фракции РФ-МСК. Согласно полученным нами данным, фракция РФ-МСК обогащена белком NOV (CCN3), который является регулятором канонического сигнального пути Notch [147]. Следует отметить, что первоначально NOV был охарактеризован как активатор сигнального пути Notch [148]. Тем не менее, согласно данным литературы, добавление экзогенного NOV снижает активацию канонического сигнального пути Notch в клетках-мишенях

[126]. Поэтому наблюдаемая нами тенденция к подавлению канонического сигнального пути Notch в фибробластах под действием РФ-МСК может объясняться ингибирующим действием белка NOV, которым обогащена РФ-МСК, на данный сигнальный путь. Поскольку канонический сигнальный путь Notch регулирует процессы самообновления и дифференцировки стромальных клеток [149,150], то предполагаемая нами регуляция данного пути белком NOV, секретлируемым МСК, в фибробластах может играть важную роль при регуляции обновления и поддержания структуры тканей.

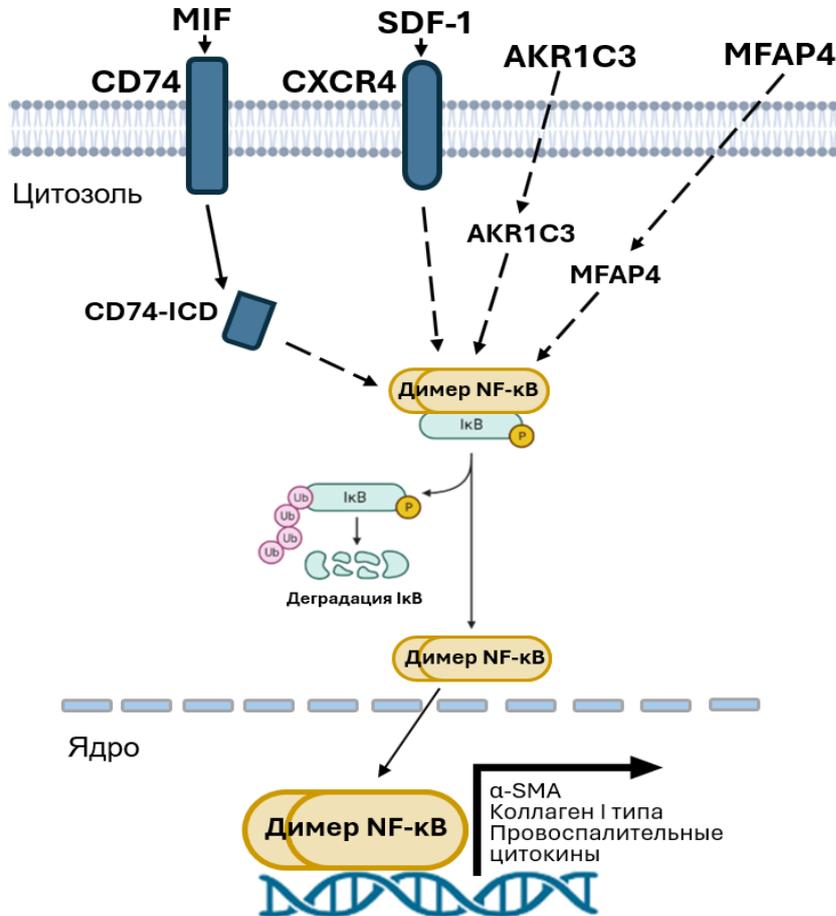
Анализ белкового состава фракций секрета МСК также позволил нам выявить среди белков, которыми обогащена фракция РФ-МСК, два потенциальных регулятора канонического сигнального пути TGF- $\beta$  – белок, связывающий латентный TGF- $\beta$ , -1 (LTBP-1) и с тенасцин С. Данные белки регулируют биологическую активность TGF- $\beta$ , связывая его и депонируя в ВКМ [23,127]. Поскольку фибробласты в культуре в норме также секретлируют некоторое количество TGF- $\beta$ 1 [151], то можно предполагать, что LTBP-1 и тенасцин С взаимодействуют с TGF- $\beta$ 1, продуцированным фибробластами, в использованной нами *in vitro* модели миофибробластной дифференцировки. Отметим, что рекомбинантный TGF- $\beta$ 1, который мы добавляли к культуре фибробластов для индукции их дифференцировки в миофибробласты, лишен пептида, обеспечивающего связывание TGF- $\beta$ 1 с LTBP-1 и с тенасцином. Впрочем, согласно полученным нами результатам, фракция РФ-МСК не влияет на активацию канонического сигнального каскада TGF- $\beta$  в фибробластах на ранних этапах (6ч) миофибробластной дифференцировки.

Фракция КС-МСК, обладающая менее выраженным эффектом на дифференцировку фибробластов в миофибробласты, согласно полученным нами данным, обогащена относительно фракции РФ-МСК белками, способными активировать NF- $\kappa$ B: AKR1C3, MIF, MFAP4 и SDF-1. На рис. 27 приведена схема, отражающая возможные механизмы активации NF- $\kappa$ B указанными компонентами тотальной фракции секрета МСК. Так, фактор стромальных клеток 1 (SDF-1),

связываясь со своим рецептором CXCR4, запускает внутриклеточную сигнализацию, приводящую к высвобождению NF-κB (а именно гетеродимера p65/p50) из комплекса с белками IκB, результатом чего является активация NF-κB [133,152]. Фактор, ингибирующий миграцию макрофагов (MIF), способен активировать сигнальный путь NF-κB по механизму, опосредованному CD74. Помимо хорошо известного участия в созревании и функционировании главного комплекса гистосовместимости класса II [153], CD74, экспрессирующийся в том числе и в фибробластах [154], функционирует как рецептор MIF [135]. Связывание MIF с CD74 приводит к протеолизу последнего под действием внутримембранной протеазы SPPL2a и образованию фрагмента CD74-ICD (внутриклеточного домена CD74) [155]. CD74-ICD затем взаимодействует с NF-κB (а именно с гомодимером p65/p65), что приводит к его активации, транслокации в ядро и изменению экспрессии транскрипционных мишеней фактора NF-κB [134]. При этом CD74-ICD способен также транслоцироваться в ядро и усиливать там транскрипционную активность фактора NF-κB [156]. Данный механизм был детально исследован в В-лимфоцитах [134,135], однако есть основания предполагать существование такого механизма и в фибробластах. В частности, в фибробластах показано существование гомодимерной формы NF-κB p65/p65 и регуляция ей генов провоспалительных цитокинов и коллагена I типа [47,157]. Жанг и соавт. описали CD74-зависимую активацию сигнального пути NF-κB (p65-зависимого) в синовиальных фибробластах [158], а Бенке с коллегами детектировали в фибробластах экспрессию SPPL2a [159]. Эти данные позволяют предположить, что активация NF-κB в фибробластах под воздействием MIF может происходить по механизму, опосредованному CD74.

Ещё два белка, которыми обогащена тотальная фракция секретома МСК – альдокеторедуктаза 1-го семейства, член С3 (AKR1C3) и ассоциированный с микрофибриллами белок-4 (MFAP4) находясь в цитозоле, также способны активировать NF-κB, способствуя его высвобождению из комплекса с IκB [132,136]. Согласно данным литературы и базы Gene Ontology Cellular

Component, как AKR1C3, так и MFAP4 могут находиться в составе внеклеточных везикул [106,158]. Поэтому можно предположить, что внеклеточные везикулы в составе КС-МСК переносят AKR1C3 внутрь клеток-мишеней, где AKR1C3 активирует NF-κB.



**Рисунок 27.** Предполагаемая схема активации NF-κB в фибробластах под действием компонентов тотальной фракции белков секрета МСК. Димер NF-κB (гомодимер p65/p65 либо гетеродимер p65/p50) секвестрирован в цитоплазме белками IκB. Запуск внутриклеточной сигнализации белком MIF, опосредуемый рецептором CD74, приводит к высвобождению NF-κB (гомодимера p65/p65) из комплекса с белками IκB и его транслокации в ядро, где NF-κB регулирует экспрессию генов. Запуск внутриклеточной сигнализации белком SDF-1, опосредуемый рецептором CXCR4, активирует NF-κB (гетеродимер p65/p50) аналогичным образом. Белки AKR1C3 и MFAP4, предположительно, проникают в цитоплазму клеток-мишеней посредством эндоцитоза внеклеточных везикул, содержащих данные белки, и также способствуют активации NF-κB (гетеродимера p65/p50) за счёт высвобождения из комплекса с белками IκB. αSMA – альфа-гладкомышечный актин.

Суммируя вышеперечисленное, можно заключить, что среди белков, которыми обогащена фракция КС-МСК, имеется группа из четырёх белков, обладающих способностью активировать транскрипционный фактор NF-κB – ключевое звено сигнальных путей воспалительного ответа. NF-κB запускает транскрипцию генов провоспалительных и профиброгенных цитокинов, вследствие чего активация NF-κB способствует дифференцировке фибробластов в миофибробласты [161]. Предположительно, именно активация транскрипционного фактора NF-κB в фибробластах компонентами КС-МСК является причиной того, что данная фракция секрета МСК не способна эффективно препятствовать дифференцировке фибробластов в миофибробласты.

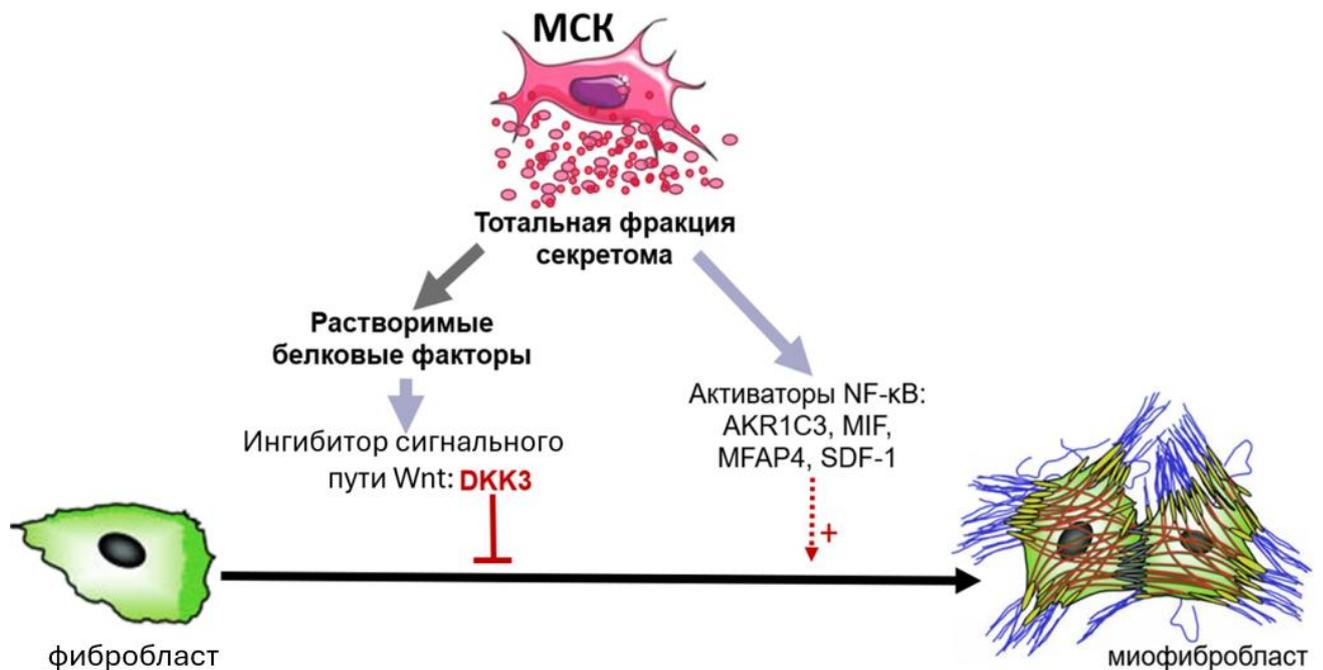
Выполняя роль паракринных регуляторов в процессах обновления и заживления тканей, МСК воспринимают широкий набор стимулов от микроокружения, что способно приводить к изменению состава секрета самих МСК [119, 160]. Данные последних лет позволяют предполагать, что такая адаптивность МСК обеспечивается гетерогенностью популяции МСК (в частности, наличием в составе общей популяции МСК субпопуляций, различающихся по набору рецепторов на плазматической мембране), а также тем, что субпопуляционный состав МСК может меняться в ответ на действие различных стимулов [161, 162].

При ряде патологических состояний (артериальная гипертензия, старение и др.) обратные связи от микроокружения к МСК способны приводить к усугублению патологического состояния [163, 164]. Наиболее распространенной патологией, связанной с предметом настоящего исследования – регуляцией дифференцировки фибробластов в миофибробласты – является фиброз. При фиброзирующих заболеваниях в ткани происходит избыточное образование миофибробластов, которое приводит к замещению ранее функциональной ткани на фиброзную (рубцовую). Используя *in vitro* модель профибротического микроокружения, методом транскриптомного анализа одиночных клеток мы оценили, как профибротические стимулы влияют на субпопуляционный состав

первичной культуры МСК жировой ткани человека. В составе общей популяции МСК нами выявлена небольшая субпопуляция, отличающаяся повышенным уровнем экспрессии генов белков, которыми обогащена фракция РФ-МСК, способная подавлять дифференцировку фибробластов в миофибробласты. Мы обнаружили, что культивирование МСК в условиях профибротического микроокружения приводит к сокращению данной субпопуляции. Данный феномен может отражать запуск положительной обратной связи, возникающий при фиброзирующих заболеваниях, при которой профибротические стимулы действуют, в числе прочего, и на сами МСК, снижая их способность паракринно препятствовать развитию фиброза.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты, полученные нами в ходе изучения действия белков, секретируемых МСК, на дифференцировку фибробластов в миофибробласты, можно представить в виде следующей схемы (рис. 28). Фракция растворимых белковых факторов, выделенная из тотальной фракции секретома МСК, сильнее подавляет дифференцировку фибробластов в миофибробласты, чем исходная тотальная фракция секретома. Мы показали, что фракция растворимых белковых факторов при выделении из тотальной фракция секретома МСК обогащается белками, способными взаимодействовать с компонентами канонического сигнального пути Wnt – в частности, белком DKK3. Нами продемонстрировано, что именно фракция растворимых белковых факторов секретома МСК подавляет канонический сигнальный путь Wnt в фибробластах, и что данный эффект определяется содержанием белка DKK3 в составе данной фракции. Наконец, мы показали, что наличие белка DKK3 в составе фракции растворимых белковых факторов секретома МСК необходимо для того, чтобы эта фракция эффективно препятствовала дифференцировке фибробластов в миофибробласты *in vitro*.



**Рисунок 28.** Схема установленного в настоящей работе влияния белков фракций секретома МСК на дифференцировку фибробластов в миофибробласты.

Мы также исследовали возможные причины того, почему тотальная фракция секрета МСК препятствует дифференцировке фибробластов в миофибробласты *in vitro* слабее, чем выделенная из неё фракция растворимых белковых факторов. Нами показано, что тотальная фракция секрета обогащена относительно фракции растворимых белковых факторов белками, способными активировать транскрипционный фактор NF-κB, и при добавлении к фибробластам активирует NF-κB-зависимый сигнальный путь в *in vitro* модели миофибробластной дифференцировки. Мы предполагаем, что наличие в составе тотальной фракции секрета МСК белков, активирующих NF-κB, препятствует эффективному подавлению данной фракцией дифференцировки фибробластов в миофибробласты.

### **Выводы**

1. Тотальная фракция секрета МСК человека препятствует дифференцировке фибробластов кожи человека в миофибробласты *in vitro* слабее, чем фракция секрета МСК человека, обогащенная растворимыми белками.
2. По данным сравнительного протеомного анализа тотальная фракция секрета МСК обогащена белками, способными активировать транскрипционный фактор NF-κB. Показана способность данной фракции запускать NF-κB-зависимый сигнальный путь в фибробластах кожи в модели миофибробластной дифференцировки *in vitro*.
3. По данным сравнительного протеомного анализа фракция растворимых белков секрета МСК обогащена белками, способными взаимодействовать с компонентами канонических сигнальных путей TGF-β, Wnt, а также Notch.
4. Добавление фракции растворимых белков секрета МСК к фибробластам кожи человека снижает в них базальный уровень активации канонического сигнального пути Wnt в модели миофибробластной дифференцировки *in vitro*.
5. Белок DKK3, взаимодействующий с компонентами канонического сигнального пути Wnt, в составе фракции секрета МСК, обогащенной

растворимыми белками, снижает уровень экспрессии гена *AXIN2* и препятствует дифференцировке фибробластов в миофибробласты *in vitro*.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Mutsaers H.A.M. et al. The impact of fibrotic diseases on global mortality from 1990 to 2019 // *J. Transl. Med.* 2023. Vol. 21, № 1. P. 818.
2. Dees C., Chakraborty D., Distler J.H.W. Cellular and molecular mechanisms in fibrosis // *Exp. Dermatol.* 2021. Vol. 30, № 1. P. 121–131.
3. Kalinina N. et al. Characterization of secretomes provides evidence for adipose-derived mesenchymal stromal cells subtypes // *Stem Cell Res. Ther.* 2015. Vol. 6, № 1. P. 221.
4. Basalova N. et al. Secretome of Mesenchymal Stromal Cells Prevents Myofibroblasts Differentiation by Transferring Fibrosis-Associated microRNAs within Extracellular Vesicles // *Cells.* 2020. Vol. 9, № 5. P. 1272.
5. Шмакова Т.В., Кананыхина Е.Ю., Большакова Г.Б. Клеточные механизмы безрубцового заживления кожи млекопитающих. // Научно-практический рецензируемый журнал Клиническая и экспериментальная морфология. 2019. Vol. 8, № 2. P. 5–11.
6. Ярец Ю.И. Острый и хронический раневой процесс: патогенетические особенности. // *Медико-биологические проблемы жизнедеятельности.* 2016. № 2. P. 21–34.
7. Guillamat-Prats R. The Role of MSC in Wound Healing, Scarring and Regeneration // *Cells.* 2021. Vol. 10, № 7. P. 1729.
8. Soehnlein O. et al. Neutrophils as protagonists and targets in chronic inflammation // *Nat. Rev. Immunol.* 2017. Vol. 17, № 4. P. 248–261.
9. Werner S., Grose R. Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines // *Physiol. Rev.* 2003. Vol. 83, № 3. P. 835–870.
10. Chipev C.C. et al. Myofibroblast phenotype and apoptosis in keloid and palmar fibroblasts in vitro // *Cell Death Differ.* 2000. Vol. 7, № 2. P. 166–176.
11. Caplan A.I. MSCs: The Sentinel and Safe-Guards of Injury: MSCs as injury responders // *J. Cell. Physiol.* 2016. Vol. 231, № 7. P. 1413–1416.

12. Kalinina N.I. et al. Mesenchymal stem cells in tissue growth and repair // *Acta Naturae*. 2011. Vol. 3, № 4. P. 30–37.
13. Kis K., Liu X., Hagood J.S. Myofibroblast differentiation and survival in fibrotic disease // *Expert Rev. Mol. Med.* 2011. Vol. 13. P. e27.
14. Györfi A.H., Matei A.-E., Distler J.H.W. Targeting TGF- $\beta$  signaling for the treatment of fibrosis // *Matrix Biol.* 2018. Vol. 68–69. P. 8–27.
15. Hinz B. et al. Recent Developments in Myofibroblast Biology // *Am. J. Pathol.* 2012. Vol. 180, № 4. P. 1340–1355.
16. Gabbiani G., Ryan G.B., Majno G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction // *Experientia*. 1971. Vol. 27, № 5. P. 549–550.
17. Tai Y. et al. Myofibroblasts: Function, Formation, and Scope of Molecular Therapies for Skin Fibrosis // *Biomolecules*. 2021. Vol. 11, № 8. P. 1095.
18. Cialdai F., Risaliti C., Monici M. Role of fibroblasts in wound healing and tissue remodeling on Earth and in space // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2022. Vol. 10. P. 958381.
19. Roberts A.B., Sporn M.B. Differential expression of the TGF- $\beta$  isoforms in embryogenesis suggests specific roles in developing and adult tissues // *Mol. Reprod. Dev.* 1992. Vol. 32, № 2. P. 91–98.
20. Kubiczikova L. et al. TGF- $\beta$  – an excellent servant but a bad master // *J. Transl. Med.* 2012. Vol. 10, № 1. P. 183.
21. Flanders K.C. et al. Quantitation of TGF- $\beta$  proteins in mouse tissues shows reciprocal changes in TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 3 in normal vs neoplastic mammary epithelium // *Oncotarget*. 2016. Vol. 7, № 25. P. 38164–38179.
22. Horiguchi M., Ota M., Rifkin D.B. Matrix control of transforming growth factor-function // *J. Biochem. (Tokyo)*. 2012. Vol. 152, № 4. P. 321–329.
23. Robertson I.B. et al. Latent TGF- $\beta$ -binding proteins // *Matrix Biol.* 2015. Vol. 47. P. 44–53.

24. Tie Y. et al. TGF-beta signal transduction: biology, function and therapy for diseases // *Mol. Biomed.* 2022. Vol. 3, № 1. P. 45.
25. Hill C.S. Transcriptional Control by the SMADs // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2016. Vol. 8, № 10. P. a022079.
26. Meng X., Nikolic-Paterson D.J., Lan H.Y. TGF- $\beta$ : the master regulator of fibrosis // *Nat. Rev. Nephrol.* 2016. Vol. 12, № 6. P. 325–338.
27. Shi X. et al. Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling in Fibrotic Diseases and Cancer-Associated Fibroblasts // *Biomolecules.* 2020. Vol. 10, № 12. P. 1666.
28. Contreras O. et al. TGF- $\beta$ -driven downregulation of the transcription factor TCF7L2 affects Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in PDGFR $\alpha$ + fibroblasts // *J. Cell Sci.* 2020. Vol. 133, № 12. P. jcs242297.
29. Burgy O., Königshoff M. The WNT signaling pathways in wound healing and fibrosis // *Matrix Biol.* 2018. Vol. 68–69. P. 67–80.
30. Griffin M.F. et al. The role of Wnt signaling in skin fibrosis // *Med. Res. Rev.* 2022. Vol. 42, № 1. P. 615–628.
31. Barker N. The Canonical Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalling Pathway // *Wnt Signaling* / ed. Vincan E. Totowa, NJ: Humana Press, 2008. Vol. 468. P. 5–15.
32. Liu J. et al. Wnt/ $\beta$ -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities // *Signal Transduct. Target. Ther.* 2022. Vol. 7, № 1. P. 3.
33. Albrecht L.V., Tejeda-Muñoz N., De Robertis E.M. Cell Biology of Canonical Wnt Signaling // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2021. Vol. 37, № 1. P. 369–389.
34. McCubrey J.A. et al. Multifaceted roles of GSK-3 and Wnt/ $\beta$ -catenin in hematopoiesis and leukemogenesis: opportunities for therapeutic intervention // *Leukemia.* 2014. Vol. 28, № 1. P. 15–33.
35. Holt L.J. Regulatory modules: Coupling protein stability to phosphoregulation during cell division // *FEBS Lett.* 2012. Vol. 586, № 17. P. 2773–2777.
36. Hanáková K. et al. Comparative phosphorylation map of Dishevelled 3 links phospho-signatures to biological outputs // *Cell Commun. Signal.* 2019. Vol. 17, № 1. P. 170.

37. Hrckulak D. et al. TCF/LEF Transcription Factors: An Update from the Internet Resources // *Cancers*. 2016. Vol. 8, № 7. P. 70.
38. Jennings B.H., Ish-Horowicz D. The Groucho/TLE/Grg family of transcriptional co-repressors // *Genome Biol.* 2008. Vol. 9, № 1. P. 205.
39. Städeli R., Hoffmans R., Basler K. Transcription under the Control of Nuclear Arm/ $\beta$ -Catenin // *Curr. Biol.* 2006. Vol. 16, № 10. P. R378–R385.
40. Ramakrishnan A.-B., Cadigan K.M. Wnt target genes and where to find them // *F1000Research*. 2017. Vol. 6. P. 746.
41. Akhmetshina A. et al. Activation of canonical Wnt signalling is required for TGF- $\beta$ -mediated fibrosis // *Nat. Commun.* 2012. Vol. 3, № 1. P. 735.
42. Wei J. et al. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling is hyperactivated in systemic sclerosis and induces Smad-dependent fibrotic responses in mesenchymal cells // *Arthritis Rheum.* 2012. Vol. 64, № 8. P. 2734–2745.
43. Huang S. et al. DKK1 Ameliorates Myofibroblast Differentiation in Urethral Fibrosis in Vivo and in Vitro by Regulating the Canonical Wnt Pathway // *Int. J. Med. Sci.* 2023. Vol. 20, № 12. P. 1631–1643.
44. Герштейн Е.С. et al. Ключевые компоненты NF- $\kappa$ B-сигнального пути в опухолях больных раком молочной железы. // *Вестник российских университетов*. 2013. Vol. 18, № 6. P. 3292–3297.
45. Liu T. et al. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation // *Signal Transduct. Target. Ther.* 2017. Vol. 2, № 1. P. 17023.
46. Gilmore T.D. Introduction to NF- $\kappa$ B: players, pathways, perspectives // *Oncogene*. 2006. Vol. 25, № 51. P. 6680–6684.
47. Beauchef G. et al. The p65 Subunit of NF- $\kappa$ B Inhibits COL1A1 Gene Transcription in Human Dermal and Scleroderma Fibroblasts through Its Recruitment on Promoter by Protein Interaction with Transcriptional Activators (c-Krox, Sp1, and Sp3) // *J. Biol. Chem.* 2012. Vol. 287, № 5. P. 3462–3478.

48. Fullard N. et al. The c-Rel Subunit of NF- $\kappa$ B Regulates Epidermal Homeostasis and Promotes Skin Fibrosis in Mice // *Am. J. Pathol.* 2013. Vol. 182, № 6. P. 2109–2120.
49. Sun S.-C., Chang J.-H., Jin J. Regulation of nuclear factor- $\kappa$ B in autoimmunity // *Trends Immunol.* 2013. Vol. 34, № 6. P. 282–289.
50. Martin E.W. et al. Assaying Homodimers of NF- $\kappa$ B in Live Single Cells // *Front. Immunol.* 2019. Vol. 10. P. 2609.
51. Mulero M.C. et al. Genome reading by the NF- $\kappa$ B transcription factors // *Nucleic Acids Res.* 2019. Vol. 47, № 19. P. 9967–9989.
52. Hochrainer K., Racchumi G., Anrather J. Site-specific Phosphorylation of the p65 Protein Subunit Mediates Selective Gene Expression by Differential NF- $\kappa$ B and RNA Polymerase II Promoter Recruitment // *J. Biol. Chem.* 2013. Vol. 288, № 1. P. 285–293.
53. Brignall R. et al. Considering Abundance, Affinity, and Binding Site Availability in the NF- $\kappa$ B Target Selection Puzzle // *Front. Immunol.* 2019. Vol. 10. P. 609.
54. Bacher S. et al. Regulation of Transcription Factor NF- $\kappa$ B in Its Natural Habitat: The Nucleus // *Cells.* 2021. Vol. 10, № 4. P. 753.
55. May M.J., Ghosh S. Rel/NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B proteins: an overview // *Semin. Cancer Biol.* 1997. Vol. 8, № 2. P. 63–73.
56. Oeckinghaus A., Ghosh S. The NF- $\kappa$ B Family of Transcription Factors and Its Regulation // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2009. Vol. 1, № 4. P. a000034–a000034.
57. Sun S.-C. The non-canonical NF- $\kappa$ B pathway in immunity and inflammation // *Nat. Rev. Immunol.* 2017. Vol. 17, № 9. P. 545–558.
58. Hayden M.S., Ghosh S. Shared Principles in NF- $\kappa$ B Signaling // *Cell.* 2008. Vol. 132, № 3. P. 344–362.
59. Morgan M.J., Liu Z. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- $\kappa$ B signaling // *Cell Res.* 2011. Vol. 21, № 1. P. 103–115.
60. Talbott H.E. et al. Wound healing, fibroblast heterogeneity, and fibrosis // *Cell Stem Cell.* 2022. Vol. 29, № 8. P. 1161–1180.

61. Guo Q. et al. NF- $\kappa$ B in biology and targeted therapy: new insights and translational implications // *Signal Transduct. Target. Ther.* 2024. Vol. 9, № 1. P. 53.
62. Best K.T. et al. NF- $\kappa$ B activation persists into the remodeling phase of tendon healing and promotes myofibroblast survival // *Sci. Signal.* 2020. Vol. 13, № 658. P. eabb7209.
63. Rai V., K. Agrawal D. Role of Transcription Factors and MicroRNAs in Regulating Fibroblast Reprogramming in Wound Healing // *J. Bioinforma. Syst. Biol.* 2023. Vol. 06, № 02.
64. Kendall R.T., Feghali-Bostwick C.A. Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators // *Front. Pharmacol.* 2014. Vol. 5.
65. Antar S.A. et al. Fibrosis: Types, Effects, Markers, Mechanisms for Disease Progression, and Its Relation with Oxidative Stress, Immunity, and Inflammation // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. Vol. 24, № 4. P. 4004.
66. Sachan N. et al. Notch signalling: multifaceted role in development and disease // *FEBS J.* 2024. Vol. 291, № 14. P. 3030–3059.
67. Andersen P. et al. Non-canonical Notch signaling: emerging role and mechanism // *Trends Cell Biol.* 2012. Vol. 22, № 5. P. 257–265.
68. Дергилев К.В. et al. Сигнальный путь Notch-терапевтическая мишень для регуляции репаративных процессов в сердце. // *Терапевтический архив.* 2018. Vol. 90, № 12. P. 112-121.
69. Wei K., Nguyen H.N., Brenner M.B. Fibroblast pathology in inflammatory diseases // *J. Clin. Invest.* 2021. Vol. 131, № 20. P. e149538.
70. D'Souza B., Meloty-Kapella L., Weinmaster G. Canonical and Non-Canonical Notch Ligands // *Current Topics in Developmental Biology.* Elsevier, 2010. Vol. 92. P. 73–129.
71. Miyamoto A. et al. Microfibrillar Proteins MAGP-1 and MAGP-2 Induce Notch1 Extracellular Domain Dissociation and Receptor Activation // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 281, № 15. P. 10089–10097.

72. Kovall R.A. et al. The Canonical Notch Signaling Pathway: Structural and Biochemical Insights into Shape, Sugar, and Force // *Dev. Cell*. 2017. Vol. 41, № 3. P. 228–241.
73. Zhao G. et al.  $\gamma$ -Secretase Composed of PS1/Pen2/Aph1a Can Cleave Notch and Amyloid Precursor Protein in the Absence of Nicastrin // *J. Neurosci*. 2010. Vol. 30, № 5. P. 1648–1656.
74. Condorelli A.G. et al. Notch-ing up knowledge on molecular mechanisms of skin fibrosis: focus on the multifaceted Notch signalling pathway // *J. Biomed. Sci*. 2021. Vol. 28, № 1. P. 36.
75. Sanalkumar R., Dhanesh S.B., James J. Non-canonical activation of Notch signaling/target genes in vertebrates // *Cell. Mol. Life Sci*. 2010. Vol. 67, № 17. P. 2957–2968.
76. Borggreffe T., Oswald F. The Notch signaling pathway: Transcriptional regulation at Notch target genes // *Cell. Mol. Life Sci*. 2009. Vol. 66, № 10. P. 1631–1646.
77. Zhou B. et al. Notch signaling pathway: architecture, disease, and therapeutics // *Signal Transduct. Target. Ther*. 2022. Vol. 7, № 1. P. 95.
78. Acar A. et al. Inhibition of Wnt signalling by Notch via two distinct mechanisms // *Sci. Rep*. 2021. Vol. 11, № 1. P. 9096.
79. Shin H.M. et al. Notch1 augments NF- $\kappa$ B activity by facilitating its nuclear retention // *EMBO J*. 2006. Vol. 25, № 1. P. 129–138.
80. Masuda S. et al. Notch1 oncoprotein antagonizes TGF- $\beta$ /Smad-mediated cell growth suppression via sequestration of coactivator p300 // *Cancer Sci*. 2005. Vol. 96, № 5. P. 274–282.
81. Luo K. Signaling Cross Talk between TGF- $\beta$ /Smad and Other Signaling Pathways // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*. 2017. Vol. 9, № 1. P. a022137.
82. Hong W. et al. Epithelial and interstitial Notch1 activity contributes to the myofibroblastic phenotype and fibrosis // *Cell Commun. Signal*. 2019. Vol. 17, № 1. P. 145.

83. Zmorzyński S. et al. The Significance of NOTCH Pathway in the Development of Fibrosis in Systemic Sclerosis // *Ann. Dermatol.* 2019. Vol. 31, № 4. P. 365.
84. Dees C. et al. Notch signalling regulates fibroblast activation and collagen release in systemic sclerosis // *Ann. Rheum. Dis.* 2011. Vol. 70, № 7. P. 1304–1310.
85. Huang S. et al. Effects of a gamma-secretase inhibitor of notch signalling on transforming growth factor  $\beta$ 1-induced urethral fibrosis // *J. Cell. Mol. Med.* 2021. Vol. 25, № 18. P. 8796–8808.
86. Dees C. et al. Activation of notch1 signaling in fibroblasts is sufficient to induce fibrosis and activates a network of profibrotic signaling cascades // *Scientific Abstracts. BMJ Publishing Group Ltd and European League Against Rheumatism*, 2024. P. 287.1-287.
87. Hu B. et al. Mesenchymal Deficiency of Notch1 Attenuates Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis // *Am. J. Pathol.* 2015. Vol. 185, № 11. P. 3066–3075.
88. Orbay H., Tobita M., Mizuno H. Mesenchymal Stem Cells Isolated from Adipose and Other Tissues: Basic Biological Properties and Clinical Applications // *Stem Cells Int.* 2012. Vol. 2012. P. 1–9.
89. Sagaradze G.D. et al. Mesenchymal Stromal Cells as Critical Contributors to Tissue Regeneration // *Front. Cell Dev. Biol.* 2020. Vol. 8. P. 576176.
90. Lara-Barba E. et al. Role of microRNA Shuttled in Small Extracellular Vesicles Derived From Mesenchymal Stem/Stromal Cells for Osteoarticular Disease Treatment // *Front. Immunol.* 2021. Vol. 12. P. 768771.
91. Rajool Dezfuly A., Safaee A., Salehi H. Therapeutic effects of mesenchymal stem cells-derived extracellular vesicles' miRNAs on retinal regeneration: a review // *Stem Cell Res. Ther.* 2021. Vol. 12, № 1. P. 530.
92. Tang J. et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: a regulator and carrier for targeting bone-related diseases // *Cell Death Discov.* 2024. Vol. 10, № 1. P. 212.

93. Zhang X. et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles: Roles in Tumor Growth, Progression, and Drug Resistance // *Stem Cells Int.* 2017. Vol. 2017. P. 1–12.
94. Qiu G. et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles affect disease outcomes via transfer of microRNAs // *Stem Cell Res. Ther.* 2018. Vol. 9, № 1. P. 320.
95. Sisa C. et al. Mesenchymal Stromal Cell Derived Extracellular Vesicles Reduce Hypoxia-Ischaemia Induced Perinatal Brain Injury // *Front. Physiol.* 2019. Vol. 10. P. 282.
96. Casado-Díaz A., Quesada-Gómez J.M., Dorado G. Extracellular Vesicles Derived From Mesenchymal Stem Cells (MSC) in Regenerative Medicine: Applications in Skin Wound Healing // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2020. Vol. 8. P. 146.
97. Laemmli U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 // *Nature.* 1970. Vol. 227, № 5259. P. 680–685.
98. Candiano G. et al. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis // *ELECTROPHORESIS.* 2004. Vol. 25, № 9. P. 1327–1333.
99. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1979. Vol. 76, № 9. P. 4350–4354.
100. Nowacki F.C. et al. Protein and small non-coding RNA-enriched extracellular vesicles are released by the pathogenic blood fluke *Schistosoma mansoni* // *J. Extracell. Vesicles.* 2015. Vol. 4, № 1. P. 28665.
101. Tyanova S., Temu T., Cox J. The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics // *Nat. Protoc.* 2016. Vol. 11, № 12. P. 2301–2319.
102. Schaab C. et al. Analysis of High Accuracy, Quantitative Proteomics Data in the MaxQB Database // *Mol. Cell. Proteomics.* 2012. Vol. 11, № 3. P. M111.014068.
103. Tyanova S. et al. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data // *Nat. Methods.* 2016. Vol. 13, № 9. P. 731–740.

104. Ashburner M. et al. Gene Ontology: tool for the unification of biology // *Nat. Genet.* 2000. Vol. 25, № 1. P. 25–29.
105. The Gene Ontology Consortium et al. The Gene Ontology knowledgebase in 2023 // *GENETICS* / ed. Baryshnikova A. 2023. Vol. 224, № 1. P. iyad031.
106. Roncaglia P. et al. The Gene Ontology (GO) Cellular Component Ontology: integration with SAO (Subcellular Anatomy Ontology) and other recent developments // *J. Biomed. Semant.* 2013. Vol. 4, № 1. P. 20.
107. Jassal B. et al. The reactome pathway knowledgebase // *Nucleic Acids Res.* 2019. P. gkz1031.
108. Raudvere U. et al. g:Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update) // *Nucleic Acids Res.* 2019. Vol. 47, № W1. P. W191–W198.
109. Ye J. et al. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction // *BMC Bioinformatics.* 2012. Vol. 13, № 1. P. 134.
110. Nakao S. et al. Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )-induced prostaglandin E2 release is mediated by the activation of cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription via NF $\kappa$ B in human gingival fibroblasts // *Mol. Cell. Biochem.* 2002. Vol. 238, № 1/2. P. 11–18.
111. Kogan-Sakin I. et al. Prostate stromal cells produce CXCL-1, CXCL-2, CXCL-3 and IL-8 in response to epithelia-secreted IL-1 // *Carcinogenesis.* 2009. Vol. 30, № 4. P. 698–705.
112. Tian B. et al. Analysis of the TGF $\beta$ -induced program in primary airway epithelial cells shows essential role of NF- $\kappa$ B/RelA signaling network in type II epithelial mesenchymal transition // *BMC Genomics.* 2015. Vol. 16, № 1. P. 529.
113. Bukong T.N. et al. Versican: a novel modulator of hepatic fibrosis // *Lab. Invest.* 2016. Vol. 96, № 3. P. 361–374.
114. Baarsma H.A. et al. Activation of WNT /  $\beta$ -Catenin Signaling in Pulmonary Fibroblasts by TGF- $\beta$ 1 Is Increased in Chronic Obstructive Pulmonary Disease // *PLoS ONE* / ed. Eickelberg O. 2011. Vol. 6, № 9. P. e25450.

115. Königshoff M. et al. Functional Wnt Signaling Is Increased in Idiopathic Pulmonary Fibrosis // PLoS ONE / ed. Schmidt H.H.H.W. 2008. Vol. 3, № 5. P. e2142.
116. Sobel K. et al. Wnt-3a-activated human fibroblasts promote human keratinocyte proliferation and matrix destruction // Int. J. Cancer. 2015. Vol. 136, № 12. P. 2786–2798.
117. Syed F., Bayat A. Notch signaling pathway in keloid disease: Enhanced fibroblast activity in a Jagged-1 peptide-dependent manner in lesional vs. extralesional fibroblasts // Wound Repair Regen. 2012. Vol. 20, № 5. P. 688–706.
118. Pupo M. et al. GPER activates Notch signaling in breast cancer cells and cancer-associated fibroblasts (CAFs) // Int. J. Biochem. Cell Biol. 2014. Vol. 46. P. 56–67.
119. Grigorieva O. et al. Modeling the profibrotic microenvironment in vitro: Model validation // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2024. Vol. 733. P. 150574.
120. Novoseletskaia E. et al. Mesenchymal Stromal Cell-Produced Components of Extracellular Matrix Potentiate Multipotent Stem Cell Response to Differentiation Stimuli // Front. Cell Dev. Biol. 2020. Vol. 8. P. 555378.
121. Zheng G.X.Y. et al. Massively parallel digital transcriptional profiling of single cells // Nat. Commun. 2017. Vol. 8, № 1. P. 14049.
122. Longobardi E., Blasi F. Overexpression of PREP-1 in F9 Teratocarcinoma Cells Leads to a Functionally Relevant Increase of PBX-2 by Preventing Its Degradation // J. Biol. Chem. 2003. Vol. 278, № 40. P. 39235–39241.
123. Snelling S. et al. Dickkopf-3 is upregulated in osteoarthritis and has a chondroprotective role // Osteoarthritis Cartilage. 2016. Vol. 24, № 5. P. 883–891.
124. Zhang K. et al. Islr regulates canonical Wnt signaling-mediated skeletal muscle regeneration by stabilizing Dishevelled-2 and preventing autophagy // Nat. Commun. 2018. Vol. 9, № 1. P. 5129.
125. Yuzuriha A. et al. Extracellular laminin regulates hematopoietic potential of pluripotent stem cells through integrin  $\beta$ 1-ILK- $\beta$ -catenin-JUN axis // Stem Cell Res. 2021. Vol. 53. P. 102287.

126. Suresh S. et al. The matricellular protein CCN3 regulates NOTCH1 signalling in chronic myeloid leukaemia: NOTCH1-CCN3 signalling in CML // *J. Pathol.* 2013. Vol. 231, № 3. P. 378–387.
127. Aubert A. et al. Latent TGF- $\beta$  Activation Is a Hallmark of the Tenascin Family // *Front. Immunol.* 2021. Vol. 12. P. 613438.
128. Xu J. et al. Exogenous DKK-3/REIC inhibits Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and cell proliferation in human kidney cancer KPK1 // *Oncol. Lett.* 2017.
129. Yu B. et al. A Cytokine-Like Protein Dickkopf-Related Protein 3 Is Atheroprotective // *Circulation.* 2017. Vol. 136, № 11. P. 1022–1036.
130. Nakamura R.E. et al. Identification of two novel activities of the Wnt signaling regulator Dickkopf 3 and characterization of its expression in the mouse retina // *BMC Cell Biol.* 2007. Vol. 8, № 1. P. 52.
131. Nakamura R.E.I., Hackam A.S. Analysis of Dickkopf3 interactions with Wnt signaling receptors // *Growth Factors.* 2010. Vol. 28, № 4. P. 232–242.
132. Zhou Q. et al. A Positive Feedback Loop of AKR1C3-Mediated Activation of NF- $\kappa$ B and STAT3 Facilitates Proliferation and Metastasis in Hepatocellular Carcinoma // *Cancer Res.* 2021. Vol. 81, № 5. P. 1361–1374.
133. Kucia M. et al. CXCR4–SDF-1 Signalling, Locomotion, Chemotaxis and Adhesion // *J. Mol. Histol.* 2003. Vol. 35, № 3. P. 233–245.
134. Lantner F. et al. CD74 induces TAp63 expression leading to B-cell survival // *Blood.* 2007. Vol. 110, № 13. P. 4303–4311.
135. Li Q.-L. et al. The role of CD74 in cardiovascular disease // *Front. Cardiovasc. Med.* 2023. Vol. 9. P. 1049143.
136. Pan Z. et al. MFAP4 deficiency alleviates renal fibrosis through inhibition of NF- $\kappa$ B and TGF- $\beta$ /Smad signaling pathways // *FASEB J.* 2020. Vol. 34, № 11. P. 14250–14263.
137. Gneccchi M. et al. Paracrine Mechanisms of Mesenchymal Stem Cells in Tissue Repair // *Mesenchymal Stem Cells* / ed. Gneccchi M. New York, NY: Springer New York, 2016. Vol. 1416. P. 123–146.

138. Maacha S. et al. Paracrine Mechanisms of Mesenchymal Stromal Cells in Angiogenesis // *Stem Cells Int.* 2020. Vol. 2020. P. 1–12.
139. Alvites R. et al. Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Their Paracrine Activity—Immunomodulation Mechanisms and How to Influence the Therapeutic Potential // *Pharmaceutics.* 2022. Vol. 14, № 2. P. 381.
140. Li M., Chen H., Zhu M. Mesenchymal stem cells for regenerative medicine in central nervous system // *Front. Neurosci.* 2022. Vol. 16. P. 1068114.
141. Chen N., Chen C.-C., Lau L.F. Adhesion of Human Skin Fibroblasts to Cyr61 Is Mediated through Integrin  $\alpha 6\beta 1$  and Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275, № 32. P. 24953–24961.
142. Kawano Y., Kypta R. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway // *J. Cell Sci.* 2003. Vol. 116, № 13. P. 2627–2634.
143. Ferrari N. et al. Dickkopf-3 links HSF1 and YAP/TAZ signalling to control aggressive behaviours in cancer-associated fibroblasts // *Nat. Commun.* 2019. Vol. 10, № 1. P. 130.
144. Mao B., Niehrs C. Kremen2 modulates Dickkopf2 activity during Wnt/IRP6 signaling // *Gene.* 2003. Vol. 302, № 1–2. P. 179–183.
145. Mourtada J. et al. The Multifaceted Role of Human Dickkopf-3 (DKK-3) in Development, Immune Modulation and Cancer // *Cells.* 2023. Vol. 13, № 1. P. 75.
146. Krupnik V.E. et al. Functional and structural diversity of the human Dickkopf gene family // *Gene.* 1999. Vol. 238, № 2. P. 301–313.
147. Wang M.M. Notch signaling and Notch signaling modifiers // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2011. Vol. 43, № 11. P. 1550–1562.
148. Sakamoto K. et al. The Nephroblastoma Overexpressed Gene (NOV/ccn3) Protein Associates with Notch1 Extracellular Domain and Inhibits Myoblast Differentiation via Notch Signaling Pathway // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277, № 33. P. 29399–29405.

149. Liu J. et al. Notch Signaling in the Regulation of Stem Cell Self-Renewal and Differentiation // *Current Topics in Developmental Biology*. Elsevier, 2010. Vol. 92. P. 367–409.
150. Hori K., Sen A., Artavanis-Tsakonas S. Notch signaling at a glance // *J. Cell Sci.* 2013. P. jcs.127308.
151. Wells R.G., Kruglov E., Dranoff J.A. Autocrine release of TGF- $\beta$  by portal fibroblasts regulates cell growth // *FEBS Lett.* 2004. Vol. 559, № 1–3. P. 107–110.
152. Teicher B.A., Fricker S.P. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 Pathway in Cancer // *Clin. Cancer Res.* 2010. Vol. 16, № 11. P. 2927–2931.
153. Cloutier M., Fortin J.-S., Thibodeau J. The transmembrane domain and luminal C-terminal region independently support invariant chain trimerization and assembly with MHCII into nonamers // *BMC Immunol.* 2021. Vol. 22, № 1. P. 56.
154. Martin-Ventura J.L. et al. Increased CD74 expression in human atherosclerotic plaques: contribution to inflammatory responses in vascular cells // *Cardiovasc. Res.* 2009. Vol. 83, № 3. P. 586–594.
155. Luo Y. et al. Macrophage migration inhibitory factor in the pathogenesis of leukemia (Review) // *Int. J. Oncol.* 2021. Vol. 59, № 2. P. 62.
156. Gil-Yarom N. et al. CD74 is a novel transcription regulator // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2017. Vol. 114, № 3. P. 562–567.
157. Mizuno M. et al. Canonical NF- $\kappa$ B p65, but Not p105, Contributes to IL-1 $\beta$ -Induced IL-8 Expression in Cardiac Fibroblasts // *Front. Immunol.* 2022. Vol. 13. P. 863309.
158. Zhang Y. et al. Macrophage migration inhibitory factor activates the inflammatory response in joint capsule fibroblasts following post-traumatic joint contracture // *Aging.* 2021. Vol. 13, № 4. P. 5804–5823.
159. Behnke J. et al. Signal-peptide-peptidase-like 2a (SPPL2a) is targeted to lysosomes/late endosomes by a tyrosine motif in its C-terminal tail // *FEBS Lett.* 2011. Vol. 585, № 19. P. 2951–2957.

160. Zhu S. et al. Plasma Exosomal AKR1C3 mRNA Expression Is a Predictive and Prognostic Biomarker in Patients with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer // *The Oncologist*. 2022. Vol. 27, № 11. P. e870–e877.
161. Hou J. et al. TNF- $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activation promotes myofibroblast differentiation of LR-MSCs and exacerbates bleomycin-induced pulmonary fibrosis // *J. Cell. Physiol.* 2018. Vol. 233, № 3. P. 2409–2419.
162. Wangler S. et al. Uncovering the secretome of mesenchymal stromal cells exposed to healthy, traumatic, and degenerative intervertebral discs: a proteomic analysis // *Stem Cell Res. Ther.* 2021. Vol. 12, № 1. P. 11.
163. Tyurin-Kuzmin P.A., Hayashi Y., Kulebyakin K. Editorial: Functional heterogeneity of stem cells // *Front. Cell Dev. Biol.* 2023. Vol. 11. P. 1179911.
164. Chechekhin V. et al. Alpha1A- and Beta3-Adrenoceptors Interplay in Adipose Multipotent Mesenchymal Stromal Cells: A Novel Mechanism of Obesity-Driven Hypertension // *Cells*. 2023. Vol. 12, № 4. P. 585.
165. Chechekhin V.I. et al. Noradrenaline and serotonin-dependent sensitization of MSCs to noradrenaline // *MethodsX*. 2024. Vol. 12. P. 102587.
166. Arellano M.Y.G. et al. Role of Mesenchymal Stem/Stromal Cells (MSCs) and MSC-Derived Extracellular Vesicles (EVs) in Prevention of Telomere Length Shortening, Cellular Senescence, and Accelerated Biological Aging // *Bioengineering*. 2024. Vol. 11, № 6. P. 524.