

ВЛИЯНИЕ ГИПОКСИИ И МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ КРАУДЕРОВ НА ПРОДУКЦИЮ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА МЕЗЕНХИМНЫМИ СТРОМАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ ЭНДОМЕТРИЯ ЧЕЛОВЕКА

© 2023 г. И. Е. Перевозников¹, *, Р. Е. Ушаков¹, Е. Б. Бузова¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

*E-mail: ilyaperevoznikov@gmail.com

Поступила в редакцию 01.10.2022 г.

После доработки 12.10.2022 г.

Принята к публикации 28.10.2022 г.

Последние десятилетия отмечены интенсивным развитием биологии внеклеточного матрикса (ВКМ), контролирующего основные клеточные функции – от пролиферации и дифференцировки до миграции и апоптоза. Биоактивные свойства ВКМ открывают широкие перспективы его использования в биоинженерии и регенеративной медицине. В этом контексте ключевой технологией является получение ВКМ путем децеллюляризации органов, тканей или клеточных культур. Проблема быстрой наработки больших количеств биоактивных ВКМ культивируемых клеток для медицинских целей представляется весьма актуальной; вместе с тем, в отношении эндометриальных мезенхимных стромальных клеток человека (ЭМСК) вопрос остается открытым. С целью оптимизации условий продукции ВКМ культивируемыми ЭМСК мы изучили влияние макромолекулярных соединений (краудеров) – фиколла и полиэтиленгликоля – на эффективность депонирования белков ВКМ в зависимости от времени, концентрации и молекулярного веса краудеров в условиях нормоксии и гипоксии. Как показано методом иммунофлуоресценции, фиколл 400 наиболее эффективен для наработки ключевых компонентов матрикса – фибронектина, коллагена IV типа и в меньшей степени коллагена III типа. При сравнении нормоксических (20% O₂) и гипоксических (3% O₂) условий культивирования выявлено, что клетки продуцируют ВКМ с более развитой структурой при пониженной концентрации кислорода; существенно, что в этих условиях фиколл 400 способствует депонированию ВКМ только при низком содержании сыворотки в ростовой среде. Суммируя, можно заключить, что сочетание гипоксии, фиколла 400 и низкого содержания сыворотки в ростовой среде обеспечивает оптимальный способ продукции ВКМ. Мы впервые продемонстрировали феномен макромолекулярного краудинга в контексте улучшения депонирования и организации структуры ВКМ у ЭМСК.

Ключевые слова: внеклеточный матрикс, эндометриальные мезенхимные стромальные клетки, гипоксия, макромолекулярные краудеры

DOI: 10.31857/S0041377123020074, **EDN:** LYQSER

Использование мезенхимных стромальных клеток (МСК) в тканевой инженерии и регенеративной медицине благодаря их способности к самообновлению, мультипотентности, стабильности кариотипа и секреторному фенотипу открывает широкие возможности для лечения кардиоваскулярных и ревматических болезней, костных заболеваний, повреждений нейронов, воспалительных процессов в легких, диабета и т.д. (Maumus et al., 2013; Konala et al.,

2016; Cunningham et al., 2018; Xu et al., 2019; Rolandsen Enes et al., 2021).

В настоящее время в научной среде доминирует точка зрения, что терапевтический эффект трансплантированных МСК связан с их паракринным действием благодаря секретируемым факторам, которые поддерживают процессы регенерации в поврежденных тканях, индуцируют ангиогенез и модулируют иммунную систему. С другой стороны, как известно, основные клеточные функции контролирует внеклеточный матрикс (ВКМ), являющийся основным компонентом микроокружения клеток и принимающий непосредственное участие в формировании клеточной (тканевой) ниши (Lin et al., 2012; Rao Patabhi et al., 2014; Xing et al., 2020).

ВКМ представляет собой трехмерную молекулярную сеть, занимающую пространство между клетка-

Принятые сокращения: БСА – бычий сывороточный альбумин; ВКМ – внеклеточный матрикс; ММК – макромолекулярные краудеры; МСК – мезенхимные стромальные клетки; ЭМСК – эндометриальные МСК человека; ПРС – полная ростовая среда; ПЭГ – полиэтиленгликоль; СНАПС – (3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate); FVO – занимаемый фракционный объем (fraction volume occupancy).

ми во всех тканях организма, причем его состав и свойства сильно варьируют. Основными компонентами ВКМ являются структурные белки – коллагены, гликопротеины и протеогликаны (Hynes, 2009; Naba et al., 2012; Матвеева, Андреева, 2020); кроме того, ВКМ выполняет функцию депо для ряда морфогенов и факторов роста (Discher et al., 2009). ВКМ вовлечен в регуляцию важнейших клеточных процессов, таких как дифференцировка, пролиферация, миграция клеток, проведение внеклеточных сигналов, апоптоз и морфогенез (Rozario, DeSimone, 2010; Clause, Barker, 2013; Assunção et al., 2020; Xing et al., 2020). Влияние на столь широкий спектр функций происходит благодаря взаимодействию с различными мембранно-связанными клеточными рецепторами, в первую очередь интегринами. Реагируя на сигналы от ВКМ, клетки, в свою очередь, способны ремоделировать матрикс (Ahmed, Ffrench-Constant, 2016). Осуществляется это за счет сериновых и цистеиновых протеаз, а также матриксных металлопротеиназ, которые могут как участвовать в деградации белков ВКМ, так и высвобождать депонированные в нем факторы роста, в частности TGF- β (Schaefer, 2010). Таким образом, взаимодействие клеток и ВКМ является двунаправленным.

Одним из способов получения ВКМ является децеллюляризация тканей, однако при использовании такого матрикса возникает опасность иммунного отторжения в случае неполного удаления клеток (Massaro et al., 2021); кроме того, следует учитывать сложность децеллюляризации некоторых тканей, особенно ниш стволовых клеток (Assunção et al., 2020). В качестве альтернативы используются синтетические двумерные и трехмерные скаффолды, покрытые отдельными белками ВКМ (Yang et al., 2020), либо подложки из смеси белков, входящих в состав ВКМ. В последние годы повышенный интерес научного сообщества вызывает исследование матриксов клеточного происхождения в связи с их существенными преимуществами перед синтетическими аналогами: уникальная биосовместимость, сохранение архитектуры и биохимических свойств ткани (Hoshiba et al., 2010; Nellinger et al., 2022), возможность скрининга популяции исходных клеток-продуцентов и контроля за условиями наработки ВКМ (Li et al., 2020; Antich et al., 2021). Децеллюляризованные ВКМ клеточного происхождения находят применение в качестве модели для изучения взаимодействий матрикс–клетка, а также выступают основой для разработки биосовместимых скаффолдов.

Однако широкое применение ВКМ клеточного происхождения ограничено низкой скоростью и эффективностью его наработки *in vitro*, а также невысокой физико-механической прочностью по сравнению с нативным ВКМ тканей. Решение первой проблемы связано с созданием масштабного производства ВКМ со специальной инфраструктурой, для чего потребуются разработка нового оборудова-

ния и вложение определенных денежных средств. Вторая проблема, в принципе, может быть решена путем введения специальных сшивок в структуру ВКМ (Nyambat et al., 2020). Принимая во внимание возникающие сложности в обоих случаях, на сегодняшний день не теряет актуальности поиск способов увеличения скорости депонирования ВКМ культивируемыми клетками (Assunção et al., 2020).

Среди факторов, которые могут влиять на продукцию ВКМ МСК, рассматривают pH, концентрацию O₂, температуру, механические стимулы и регуляторные молекулы (Матвеева, Андреева, 2020). С целью ускорения и усиления депонирования ВКМ в системах культивируемых клеток используют инертные высокополимерные вещества (краудеры); добавление таких макромолекул в ростовые среды имитирует существующее *in vivo* плотное внеклеточное пространство и позволяет ускорить, например, энзиматическую конверсию водорастворимого проколлагена в нерастворимый коллаген I типа – ключевую стадию образования коллагенового матрикса (Bateman et al., 1986; Lareu et al., 2007). Макромолекулярный краудинг – это биофизический феномен, связанный с объемом, исключаемым макромолекулами, поскольку они подвергаются стерическому отталкиванию и электростатическим взаимодействиям. Эффекты исключенного объема описываются величиной FVO (fraction volume occupancy), т.е. фракцией от общего объема, занимаемой краудером. Исключенный объем зависит от формы, размера, заряда и полидисперсности молекул. В отношении биологических систем это означает увеличение вероятности встречи ферментов с субстратом, что существенно ускоряет протекание биологических процессов (Cigognini et al., 2016), в том числе ферментативных реакций, ответственных за сборку и депонирование матрикса (Chen et al., 2011; Kuznetsova et al., 2014). К макромолекулярным краудерам (ММК) относятся такие различные по природе соединения, как фиколл (ficoll), гиалуриновая кислота (hyaluronic acid), каррагинан (carrageenan), сульфат декстрана (dextran sulphate), поливинилпирролидон (polyvinylpyrrolidone) (Gaspar et al., 2019; Tsiapalis, Zeugolis, 2021).

Другим подходом является культивирование клеток в условиях гипоксии. Для МСК концентрация O₂ ниже атмосферного уровня является одним из наиболее важных физических факторов тканевого микроокружения (Buravkova et al., 2014). Адаптация МСК к гипоксическим условиям происходит благодаря активации HIF-1 (hypoxia inducible factor-1), который регулирует транскрипционную активность структурных компонентов ВКМ и ферментов его ремоделирования. Было показано, что в условиях гипоксии в матриксе МСК существенно повышается содержание фибронектина, коллагеновых белков и ангиогенных факторов (Cigognini et al., 2016; Du et al., 2017), причем добавление в ростовую среду крауде-

ров (каррагинана и фикола) при культивировании МСК из костного мозга при пониженном содержании кислорода также приводит к увеличению эффективности продукции белков ВКМ (Cigognini et al., 2016). Следовательно, совмещение условий гипоксии и макромолекулярного краудинга может представлять интерес для всестороннего исследования. Наряду с этим отмечали, что культивирование клеток в ростовой среде с низкой концентрацией сыворотки (около 1%) также может увеличивать скорость наработки компонентов ВКМ (Satyam et al., 2014; Kumar et al., 2015a, 2015b).

Представленная работа посвящена оптимизации условий депонирования компонентов внеклеточного матрикса мезенхимными стромальными клетками человека, выделенными из десквамированного эндометрия в менструальной крови (эмСК). Неинвазивный и легкодоступный источник эмСК обеспечивает широкомасштабные исследования *in vitro*. Благодаря высокой пролиферативной активности при длительном культивировании и генетической стабильности (Домнина и др., 2013), эти клетки могут быть перспективным источником ВКМ для изучения функциональной активности и потенциального применения децеллюляризованных ВКМ в регенеративной медицине. Как показывает анализ литературы, информация о применении краудеров различной природы с целью улучшения условий депонирования ВКМ культивируемыми МСК весьма ограничена. Так, в ряде работ было продемонстрировано, что макромолекулярный краудинг ускоряет депонирование и определяет архитектуру ВКМ, продуцированного МСК из костного мозга (Zeiger et al., 2012; Ang et al., 2014; Rashid et al., 2014; Prewitz et al., 2015); при этом использованные краудеры (фиколл, поливинилпирролидон и сульфат декстрана) повышали эффективность наработки коллагенов I–IV типов и фибронектина. В контексте эмСК, подобные работы до настоящего времени не были описаны в литературе.

Мы провели сравнительное исследование влияния макромолекулярных краудеров (фиколл и полиэтиленгликоля) на эффективность депонирования основных белков ВКМ – коллагена III и IV типов и фибронектина – в условиях нормоксии и гипоксии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Характеристика клеток. Во всех экспериментах использовали эмСК человека, выделенные из десквамированного эндометрия в менструальной крови сотрудниками Лаборатории внутриклеточной сигнализации, ИИЦ РАН, на 10–11 пассаже (Земелько и др., 2011). Была подтверждена принадлежность выделенных эмСК к мезенхимным стромальным предшественникам с использованием минимальных критериев, предложенных ISTC (Dominici et al., 2006). Как было установлено (Земелько и др., 2011), используемые эмСК

экспрессируют клеточные маркеры CD73, CD90, CD105, CD13, CD29 и CD44, но не обнаруживают поверхностных антигенов гемопоэтических клеток: CD19, CD34, CD45, CD117, CD130 и HLA-DR (класс II). Мультипотентность эмСК подтверждается их способностью дифференцироваться в различные мезодермальные типы клеток, такие как остециты и адипоциты. Кроме того, выделенные эмСК частично (более 50%) экспрессируют маркер плюрипотентности SSEA-4, но не экспрессируют Oct-4. Иммунофлуоресцентный анализ полученных клеток выявил экспрессию маркеров нейрональных предшественников нестина и бета-III-тубулина, что говорит об их нейрональной предрасположенности. эмСК характеризуются высокой скоростью пролиферации клеток (время удвоения 22–23 ч) и эффективностью колониобразования (около 60%).

Культивирование клеток. Клетки культивировали во флаконах T25 и T75 (Thermo Scientific, США) в полной ростовой среде (ПРС), содержащей среду DMEM/F12 (Gibco, США), 10% эмбриональной сыворотки (FBS) (HyClone, США), 1% PenStrep (Gibco, США) и 1% GlutaMAX (Gibco, США) при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Для проведения экспериментов в гипоксических условиях и в присутствии макромолекулярных краудеров клетки трипсинизировали с помощью 0.05%-ного раствора трипсина и ЭДТА (Invitrogen, США) и рассевали по 200 тыс. клеток на покрытые 0.1%-ным раствором желатина чашки диаметром 35 мм (Thermo Scientific, США).

Нормоксические условия культивирования клеток. Через 3 сут после посева клеток ПРС заменяли на среду, содержащую макромолекулярные краудеры в соответствующей концентрации. Краудеры растворяли в ростовой среде, содержащей 1% FBS и 0.2 мМ аскорбата натрия (Sigma, Германия), которую стерилизовали фильтрацией через мембрану 0.22 мкм непосредственно перед использованием. Аскорбат является необходимой добавкой для стабильной наработки ВКМ (Choi et al., 2008), выступая в роли антиоксиданта, а также кофактора ферментов лизилгидроксилазы и пролилгидроксилазы, участвующих в фибриллогенезе коллагена (Pinnell, 1985). Мы использовали тринатриевую соль 2-фосфо-L-аскорбиновой кислоты как стабильную форму аскорбата натрия с целью снижения частоты замены ростовой среды. В качестве контроля служили клетки, растущие в среде с содержанием FBS (1 или 10%) и 0.2 мМ аскорбата натрия. Клетки культивировали в течение 3 или 7 сут с момента добавления краудеров (или аскорбата натрия в случае контрольных клеток), заменяя среду на свежую каждые 3 сут. По окончании культивирования проводили децеллюляризацию с целью получения бесклеточного ВКМ.

Гипоксические условия культивирования клеток. После посева клетки инкубировали в течение 1 сут в условиях нормоксии, затем чашки переносили в инкубатор с гипоксическими условиями (3% O₂).

Через 1 сут ПРС в чашках заменяли на среду, содержащую 50 мг/мл фикола 400 и 1 или 10% FBS; все среды стерилизовали фильтрацией через мембрану 0.22 мкм непосредственно перед использованием. В качестве контроля служили клетки, растущие в условиях гипоксии в среде с содержанием FBS 1 или 10%. Все ростовые среды содержали 0.2 мМ аскорбата натрия. Клетки культивировали в течение 7 или 14 сут с момента добавления фикола 400 (или аскорбата натрия в случае контрольных клеток), заменяя среду на свежую каждые 3 сут. По окончании инкубации проводили децеллюляризацию ВКМ.

Макромолекулярные краудеры. В качестве макромолекулярных краудеров для исследования мы выбрали фикола 400 кДа (Pharmacia, Швеция), а также полиэтиленгликоль (ПЭГ) с молекулярной массой 2 (Merck, США), 4 и 6 кДа (Ferak Berlin, Германия). При расчете рабочих концентраций взяли за основу ПЭГ 4 кДа в концентрации 50 мг/мл, который способствовал повышению скорости процессинга проколлагена I в коллаген и накоплению последнего (Bateman et al., 1986). Согласно расчету по приведенной ниже формуле, фракционный объем (FVO), занимаемый ПЭГ в концентрации 50 мг/мл, составляет 12.9%. Для вычисления FVO использовали гидродинамический радиус, который занимает 1 молекула ПЭГ 4 кДа в растворе. Значения гидродинамических радиусов были взяты из источников литературы (Kuznetsova et al., 2014; Dong et al., 2018): 1.6 нм (ПЭГ 4 кДа), 2.08 нм (ПЭГ 6 кДа) и 8 нм (фикола 400 кДа). На основе этих данных была рассчитана концентрация для ПЭГ 6 кДа (35 мг/мл), соответствующая FVO = 12.9%. Расчет проводили по формуле, созданной на основе вычислений (см.: Chen et al., 2011):

$$FVO_{\text{ПЭГ4 кДа}} = \frac{4}{3} \pi R_h^3 \frac{M_{1 \text{ мл}}}{Mm_{\text{ПЭГ4 кДа}}} N_A \times 10^6,$$

где FVO_{ПЭГ4 кДа} – фракционный объем, занимаемый ПЭГ 4 кДа (для перевода в % полученный результат умножается на 100); R_h – гидродинамический радиус ПЭГ 4 кДа (м); $M_{1 \text{ мл}}$ – масса ПЭГ 4 кДа, содержащегося в 1 мл раствора (г); $Mm_{\text{ПЭГ4 кДа}}$ – молярная масса ПЭГ 4 кДа (г); N_A – число Авогадро.

В настоящей работе тестировали эффекты ПЭГ различной мол. массы в следующих концентрациях: ПЭГ 2 кДа – 40 мг/мл; ПЭГ 4 кДа – 25, 50 и 100 мг/мл; ПЭГ 6 кДа – 17.5, 35 и 70 мг/мл. На основе известного радиуса Стокса (1.15 нм) (Zhu et al., 2016) для ПЭГ 2 кДа было рассчитано значение FVO = 7.7%. Как было показано, наиболее эффективной концентрацией фикола для депонирования ВКМ является смесь 37.5 мг/мл фикола 70 кДа и 25 мг/мл фикола 400 кДа (Chen et al., 2011; Tsiapalis, Zeugolis, 2021). Суммарный FVO смеси составляет около 17% по объему, что превосходит значение, вычисленное нами для ПЭГ; поэтому при выборе концентрации фикола 400 кДа мы ориентировались на это значение

и определили, что 50 мг/мл дают величину FVO близкую к этой (около 16%). Таким образом, для исследования эффекта фикола 400 кДа были выбраны следующие концентрации: 25, 50 и 100 мг/мл.

Децеллюляризация ВКМ и иммунофлуоресценция. Децеллюляризацию ВКМ проводили, осторожно обрабатывая клетки 0.5%-ным раствором CNAPS, содержащим 20 мМ гидроксида аммония, в течение 3 мин при комнатной температуре с последующей промывкой PBS. Фиксировали ВКМ 3.7%-ным раствором формалина в течение 15 мин и инкубировали в 0.5%-ном Тритоне-X-100 в течение 15 мин. После каждой стадии препараты промывали PBS 5 раз по 3 мин. Далее ВКМ обрабатывали 1%-ным БСА в течение 30 мин и инкубировали в течение ночи при 4°C в 1%-ном БСА с первичными антителами к фибронектину (Sigma, США) (разведение 1 : 400), коллагену III или IV типов (ИМТЕК, Россия; разведение 1 : 20) с последующей промывкой PBS 5 раз по 2 мин; инкубировали с вторичными козыми антителами, выработанными против иммуноглобулинов кролика и конъюгированными с флуорофором Alexa 488 (GAR-Alexa 488) (Invitrogen, США; разведение 1 : 500), в течение 40 мин при комнатной температуре и промывали PBS 5 раз по 2 мин. Анализ окрашенного ВКМ проводили на флуоресцентном микроскопе Fluorescent Cell Imager (Bio-Rad, Сингапур).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе исследовали влияние различных по химической природе полимерных соединений – фикола 400 и ПЭГ с мол. массой 2, 4 или 6 кДа – на эффективность депонирования ключевых белков ВКМ культивируемыми ЭМСК в условиях нормоксии и гипоксии. Следует подчеркнуть, что в контексте ЭМСК поиск подходов для увеличения скорости и эффективности продукции компонентов ВКМ является новаторским. Как известно, макромолекулярные соединения типа фикола при добавлении в ростовую среду в процессе культивирования клеток рассматриваются как макромолекулярные краудеры, способствующие продукции белков ВКМ (Chen et al., 2011; Kuznetsova et al., 2014; Prewitz et al., 2015; Cigognini et al., 2016; Gaspar et al., 2019; Tsiapalis, Zeugolis, 2021). В частности, фикола 400 в комбинации с фиколом 70 стимулировал депонирование культивируемыми клетками ряда ключевых белковых компонентов ВКМ, таких как фибронектин, коллаген I, II и IV типа (Chen et al., 2011, 2013; Cigognini et al., 2016; Tsiapalis, Zeugolis, 2021), что позволяло надеяться на перспективность использования фикола 400 для улучшения условий наработки матрикса ЭМСК. Кроме того, выбор фикола 400 в качестве объекта исследования был обусловлен крайне скудной информацией о его самостоятельном действии на продукцию ВКМ клетками в культуре; в доступной нам литературе не удалось обнаружить и аналогичных сведений относительно ПЭГ.

Фиколл представляет собой нейтральный полимер, полученный в результате сополимеризации сахарозы и эпихлоргидрина; этот полисахарид не цитотоксичен и не оказывает существенного влияния на вязкость раствора при соответствующих концентрациях. ПЭГ, получаемый каталитической полимеризацией окиси этилена, является гидрофильным веществом с низкой токсичностью; находит широкое применение в различных областях — медицине, биологии, промышленности, в том числе химической и пищевой. Как правило, ПЭГ-полимеры в той или иной степени обладают полидисперсностью (молекулярно-массовым распределением), причем длина полимерных цепей зависит от соотношения реагентов при полимеризации.

С целью оптимизации условий депонирования компонентов ВКМ культивируемыми эМСК было проведено сравнительное изучение эффектов фиколла и ПЭГ разной мол. массы при варьировании концентрации ММК, времени продукции ВКМ, содержания кислорода в атмосфере в процессе культивирования клеток (нормоксия vs гипоксия) и содержания сыворотки в ростовой среде (10 vs 1%). Как сообщалось, культивирование клеток в ростовой среде с низкой концентрацией сыворотки (около 1%) или в бессывороточной среде приводит к увеличению скорости и эффективности депонирования ВКМ, поскольку сыворотка содержит металлопротеазы, разрушающие ВКМ, и снижает скорость его ремоделирования (Satyam et al., 2014; Kumar et al., 2015a, 2015b).

В предварительных экспериментах мы установили, что применение детергента CHAPS для децеллюляризации матрикса эМСК позволяет не только полностью удалить клетки, но и сохранить биоактивные свойства децеллюляризованного ВКМ; с помощью методов иммуноцитохимии и иммуноблотинга было продемонстрировано отсутствие клеточных структур (ядер, актинового и тубулинового цитоскелета), а также наличие основных белков ВКМ — фибро-

нектина, коллагена I, III и IV типов (данные не показаны).

Влияние макромолекулярных краудеров на эффективность депонирования белков ВКМ клетками эМСК. Исследовали зависимость продукции фибронектина и коллагенов III и IV типа от концентрации краудеров ПЭГ и фиколла в стандартных условиях нормоксии в течение 3 и 7 сут. Использованные концентрации: ПЭГ 2 кДа — 40 мг/мл; ПЭГ 4 кДа — 25, 50 или 100 мг/мл; ПЭГ 6 кДа — 17,5, 35 или 70 мг/мл; фиколл 400 — 25, 50 или 100 мг/мл. После децеллюляризации анализ белкового состава полученных ВКМ проводили методом иммунофлуоресценции.

эМСК, инкубированные в средах с добавлением ПЭГ 4 кДа (100 мг/мл) или ПЭГ 6 кДа (35 и 70 мг/мл), в значительной степени погибали в течение первых 3-х сут, поэтому были исключены из эксперимента. Хотя ПЭГ считается по данным FDA (Food and Drug Administration) инертным и безопасным, вероятной причиной клеточной гибели вполне могло быть цитотоксическое действие высоких доз ПЭГ, а также потенциальное наличие в препаратах ПЭГ токсичных примесей — окиси этилена и 1,4-диоксана.

Эффективность депонирования белковых компонентов ВКМ оценивали по интенсивности их флуоресценции и плотности (целостности) образованной сети. Отрицательным контролем служило отсутствие флуоресценции при окраске ВКМ первичными антителами против α -тубулина и вторичными антителами GAR-Alexa 488 (рис. 1). Как показывает сравнение белков ВКМ, депонированных клетками в течение 3 сут в присутствии фиколла 400 (рис. 2), наиболее эффективно действует фиколл 400 в концентрации 50 мг/мл (FVO = 16%) (рис. 2б), при этом пролонгирование культивирования эМСК с фиколлом 400 до 7 сут усиливает депонирование фибронектина и коллагена IV типа (рис. 3б), которые по интенсивности окраски и плотности образуемой сети превосходят наблюдаемые для фиколла 400 в концентрациях 25 мг/мл (FVO = 8%) и тем более 100 мг/мл (FVO = 32%) (рис. 3а, в). Сравнение

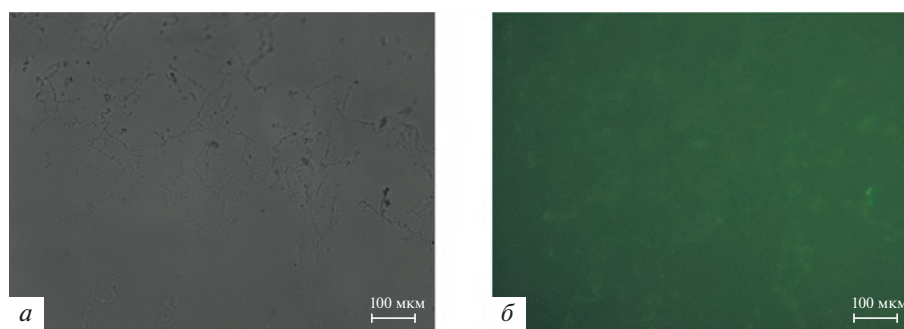


Рис. 1. Окрашивание децеллюляризованного внеклеточного матрикса (ВКМ) эндометриальных мезенхимных стромальных клеток человека (эМСК) первичными антителами против α -тубулина и вторичными антителами GAR-Alexa 488 (отрицательный контроль). *a* — Контраст в проходящем свете, *б* — флуоресценция вторичных антител (отсутствует). Съемку проводили на микроскопе Fluorescent Cell Imager (Bio-Rad, Сингапур), масштабный отрезок — 100 мкм.

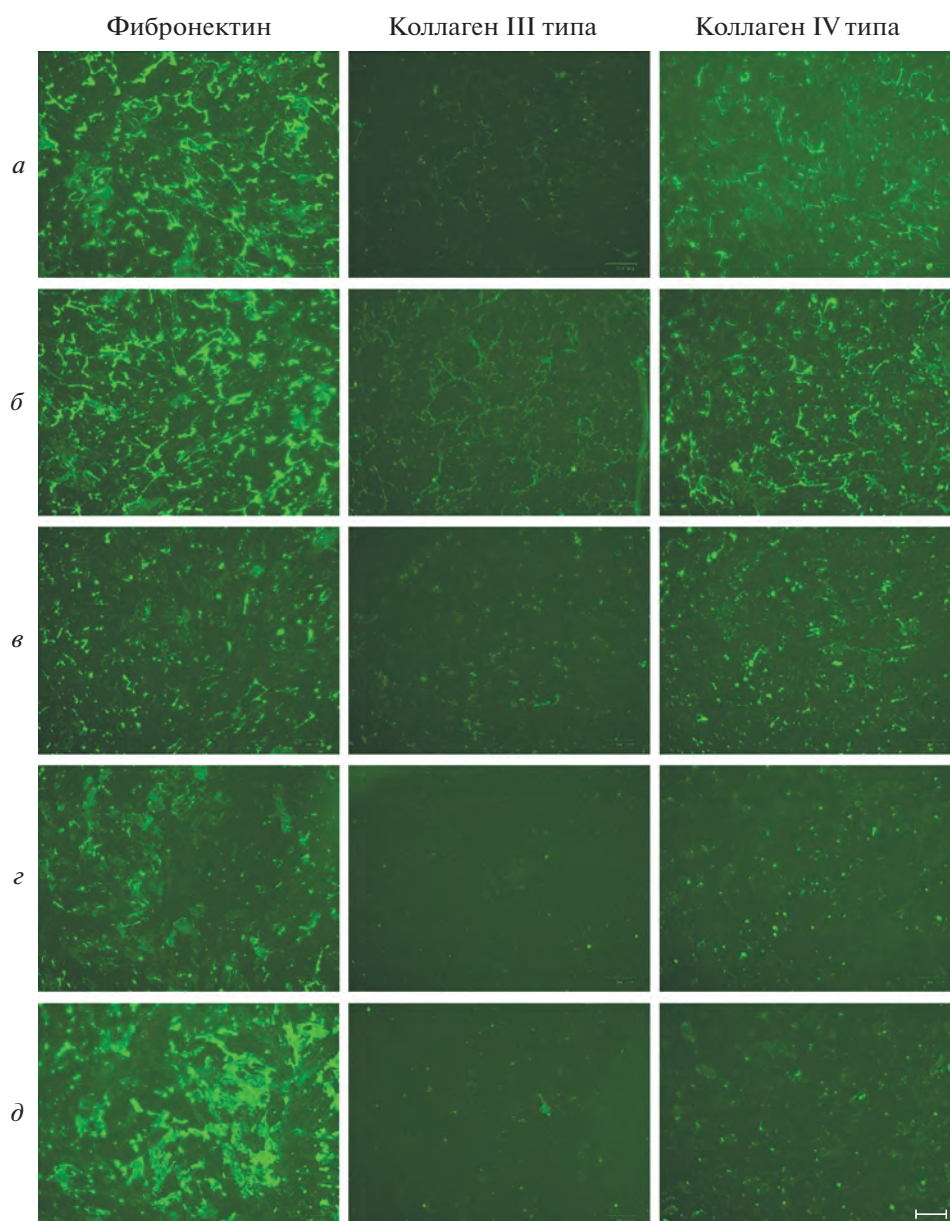


Рис. 2. Влияние фикола 400 в разных концентрациях на эффективность депонирования белков ВКМ эМСК в условиях нормоксии ($20\% O_2$) при культивировании в течение 3 сут. Иммунофлуоресценции на фибронектин, коллаген III и IV типа. Концентрация фикола 400 в ростовой среде, содержащей 1% сыворотки FBS: *a* – 25, *б* – 50, *в* – 100 мг/мл. *г*, *д* – Среда, содержащая 1 и 10% FBS соответственно (окраска контрольных клеток, типичная и для варианта на рис. 4). Представлены наиболее репрезентативные результаты окрашивания белков ВКМ. Условия окраски и съемки идентичны для всех вариантов, представленных на рис. 2–7 (микроскоп Fluorescent Cell Imager; Bio-Rad, Сингапур), масштабный отрезок: 100 мкм.

рис. 2г, д с рис. 3г, д показывает, что наработка всех исследуемых белков ВКМ при культивировании контрольных эМСК в среде с содержанием FBS 1 и 10% значительно усиливается в интервале от 3 до 7 сут.

Тестирование ПЭГ в качестве потенциального краудера, позитивно влияющего на депонирование ВКМ, выявило большую эффективность ПЭГ 4000 в концентрации 25 мг/мл (рис. 4б) по сравнению с остальными препаратами ПЭГ различной мол. массы. При таких условиях через 7 сут усиливается наработка

всех исследуемых белков ВКМ – фибронектина, коллагена III и IV типа (рис. 5б). Однако принимая во внимание результаты окраски контрольных эМСК, которые депонировали ВКМ в ростовой среде с 1% FBS в течение 7 сут (рис. 3г), не совсем корректно говорить о сильном стимулирующем эффекте 25 мг/мл ПЭГ 4000: в целом они сопоставимы. В противоположность ПЭГ 4000 (25 мг/мл), культивирование клеток в присутствии ПЭГ 6000 оказывает выраженное негативное влияние на депонирование белков ВКМ

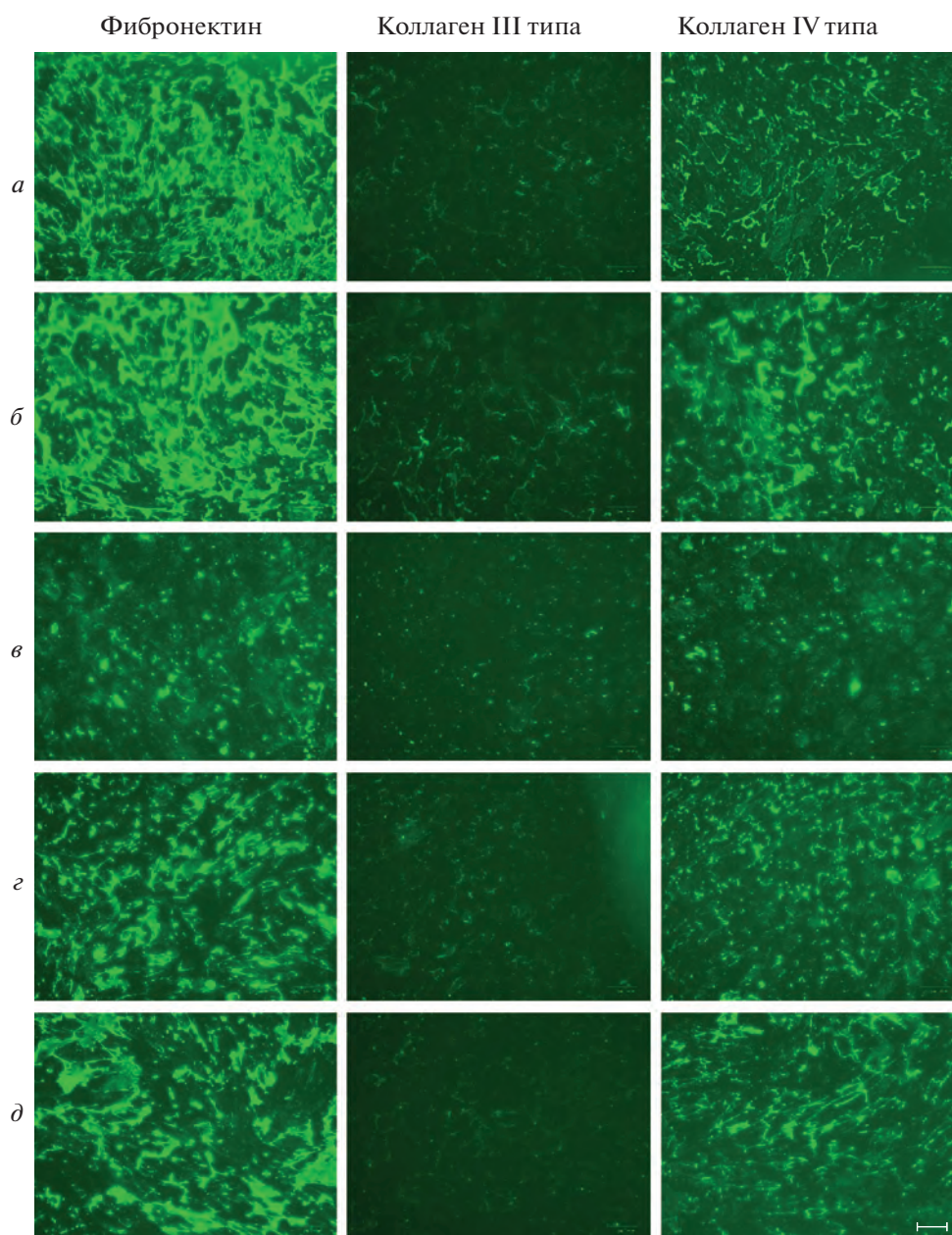


Рис. 3. Влияние фикола 400 на эффективность депонирования белков ВКМ эмСК в условиях нормоксии при культивировании в течение 7 сут. Концентрация фикола 400 в ростовой среде, содержащей 1% сыворотки FBS: *а* – 25, *б* – 50, *в* – 100 мг/мл. *г*, *д* – Среда, содержащая 1 и 10% FBS соответственно (окраска контрольных клеток, типичная и для варианта на рис. 5).

(рис. 4*г* и рис. 5*г*). Важно подчеркнуть, что сравнение результатов действия ПЭГ 4 и 6 кДа в разных концентрациях (за исключением 50 мг/мл ПЭГ 4000) вполне релевантно, поскольку значения их FVO одинаковы (6.5%). Как и в случае с фиколом 400, пролонгирование времени культивирования в присутствии ПЭГ вне зависимости от его мол. массы и использованной концентрации приводит к ускорению депонирования белков ВКМ; однако, как и ожидалось, в разной степени (рис. 4, 5).

Понижение содержания сыворотки в ростовой среде до 1% не оказывает заметного стимулирующего эффекта на скорость депонирования ВКМ по сравнению с нормальной средой, содержащей 10% сыворотки: через 7 сут наблюдали практически идентичную окраску фибронектина, коллагена III и IV типа (рис. 3*г*, *д*).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о потенциале фикола 400 как ММК для оптимизации депонирования компонентов ВКМ

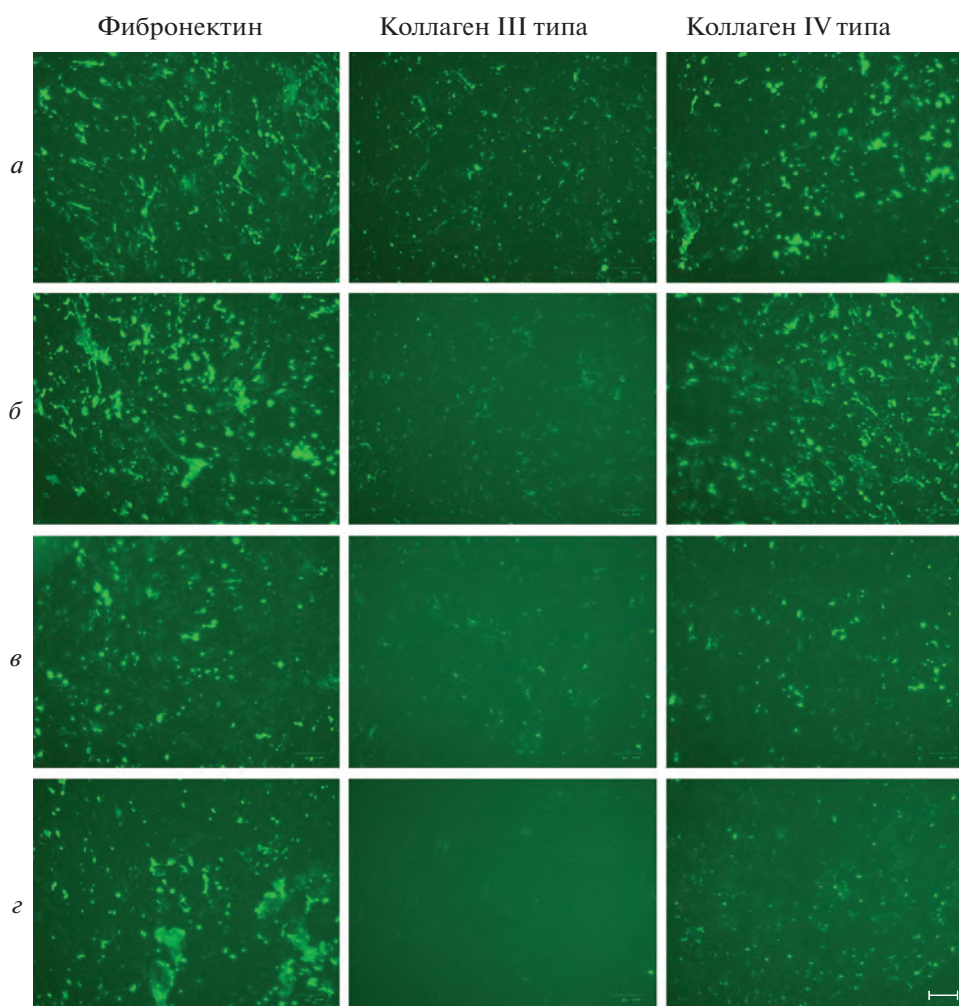


Рис. 4. Нарботка белков ВКМ при культивировании эМСК в течение 3 сут в присутствии полиэтиленгликоля (ПЭГ) разной мол. массы в ростовой среде, содержащей 1% FBS, в условиях нормоксии. *a* – ПЭГ 2 кДа, 40 мг/мл; *б* – ПЭГ 4 кДа, 25 мг/мл, *в* – ПЭГ 4 кДа, 50 мг/мл, *г* – ПЭГ 6 кДа, 17.5 мг/мл.

эМСК; в то же время применение ПЭГ для этой цели представляется бесперспективным.

Влияние фикола 400 на эффективность депонирования белков ВКМ эМСК в условиях гипоксии. Чтобы выяснить потенциальную роль гипоксии в депонировании белков ВКМ по сравнению с нормальными условиями культивирования (нормоксией) в присутствии ММК, использовали фикола 400 в концентрации 50 мг/мл как наиболее перспективный краудинг-агент. При культивировании эМСК в условиях гипоксии обнаружили, что добавление фикола 400 в стандартную ростовую среду (10% FBS) приводило к заметному нарушению целостности 7-суточного матрикса как в отношении фибронектина, так и коллагена IV типа (рис. 6б), причем эта тенденция становилась более выраженной через 14 сут (рис. 7з). Однако культивирование клеток в условиях гипоксии в среде, содержащей 1% FBS и фикола 400, оказало прямо противоположный эффект: ВКМ обладал более развитой и целостной структурой (рис. 7б)

по сравнению с ВКМ, который продуцировали клетки в ростовой среде с 1% FBS (рис. 7а). Таким образом, сочетание трех факторов – гипоксии, низкого содержания сыворотки и краудера – оказало сильное пролонгированное действие на депонирование фибронектина и коллагена IV типа и в меньшей степени – коллагена III типа. Ранее в ряде работ отмечали эффективность совмещения гипоксических условий и макромолекулярного краудинга для оптимального депонирования компонентов ВКМ в культуре МСК (Cigognini et al., 2016) и фибробластов (Satyam et al., 2016; Kumar et al., 2018). Аналогично, использование ростовой среды с пониженным содержанием сыворотки в присутствии краудинг-агентов приводило к ускорению продукции белков ВКМ фибробластами различной природы (Kumar et al., 2015a, 2015b).

При сравнении 7-суточного ВКМ, продуцированного клетками в среде с 10% FBS в условиях нормоксии (рис. 3д) и гипоксии (рис. 6а), становится

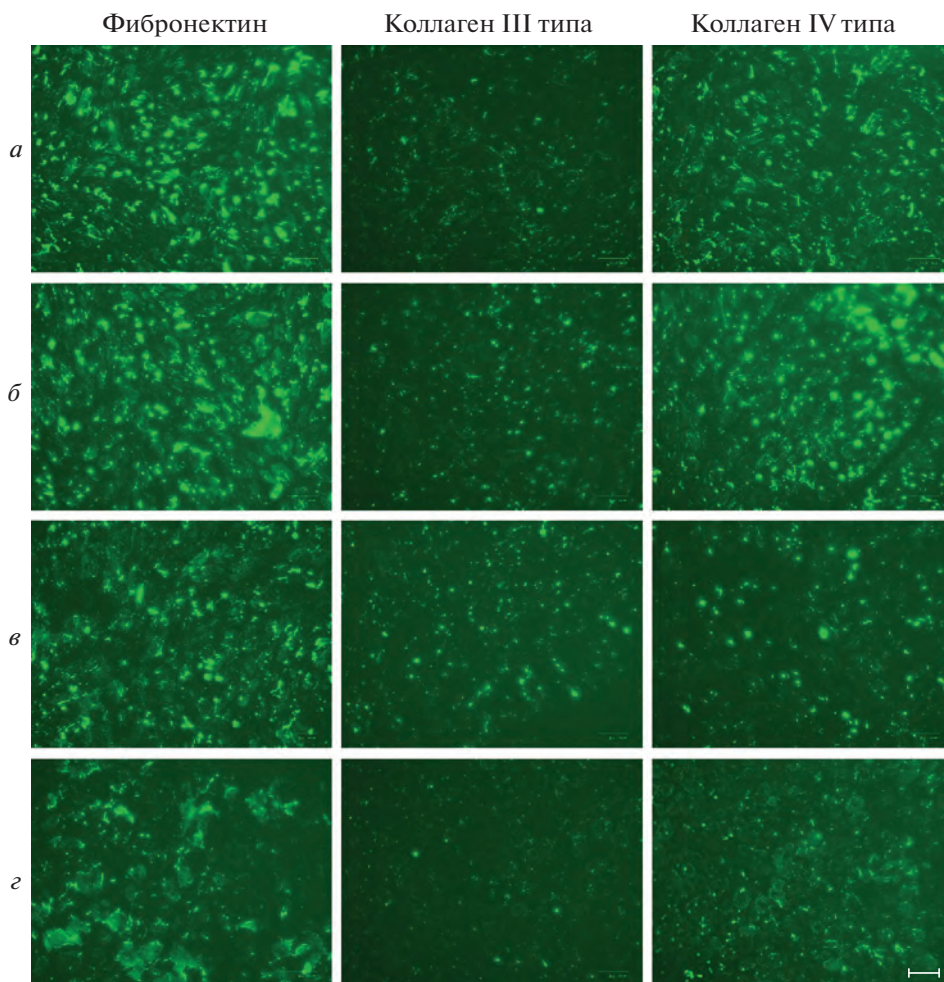


Рис. 5. Нарботка белков ВКМ при культивировании эМСК в течение 7 сут в присутствии ПЭГ в ростовой среде с 1% FBS в условиях нормоксии. *а* – ПЭГ 2 кДа, 40 мг/мл; *б* – ПЭГ 4 кДа, 25 мг/мл, *в* – ПЭГ 4 кДа, 50 мг/мл, *г* – ПЭГ 6 кДа, 17.5 мг/мл.

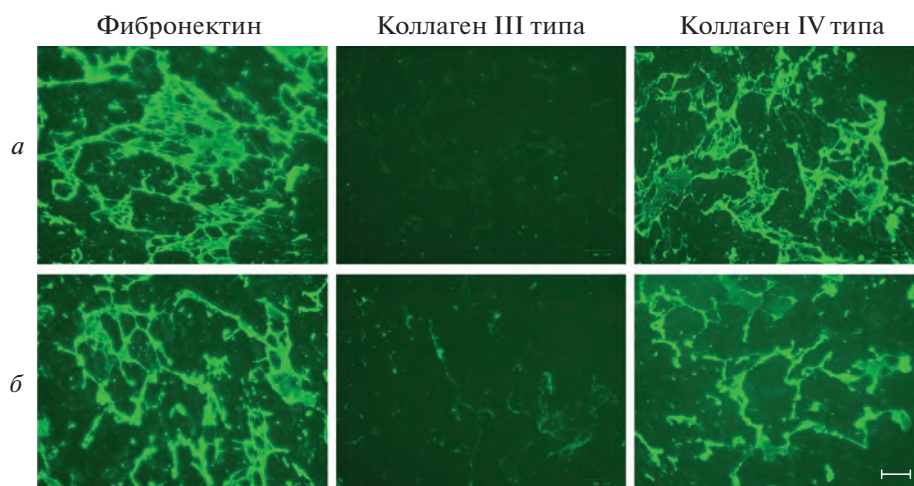


Рис. 6. Влияние фикола 400 в концентрации 50 мг/мл на эффективность депонирования белков ВКМ при культивировании эМСК в течение 7 сут в условиях гипоксии (3% O₂). *а*, *б* – содержание FBS в ростовой среде 1 и 10% соответственно.

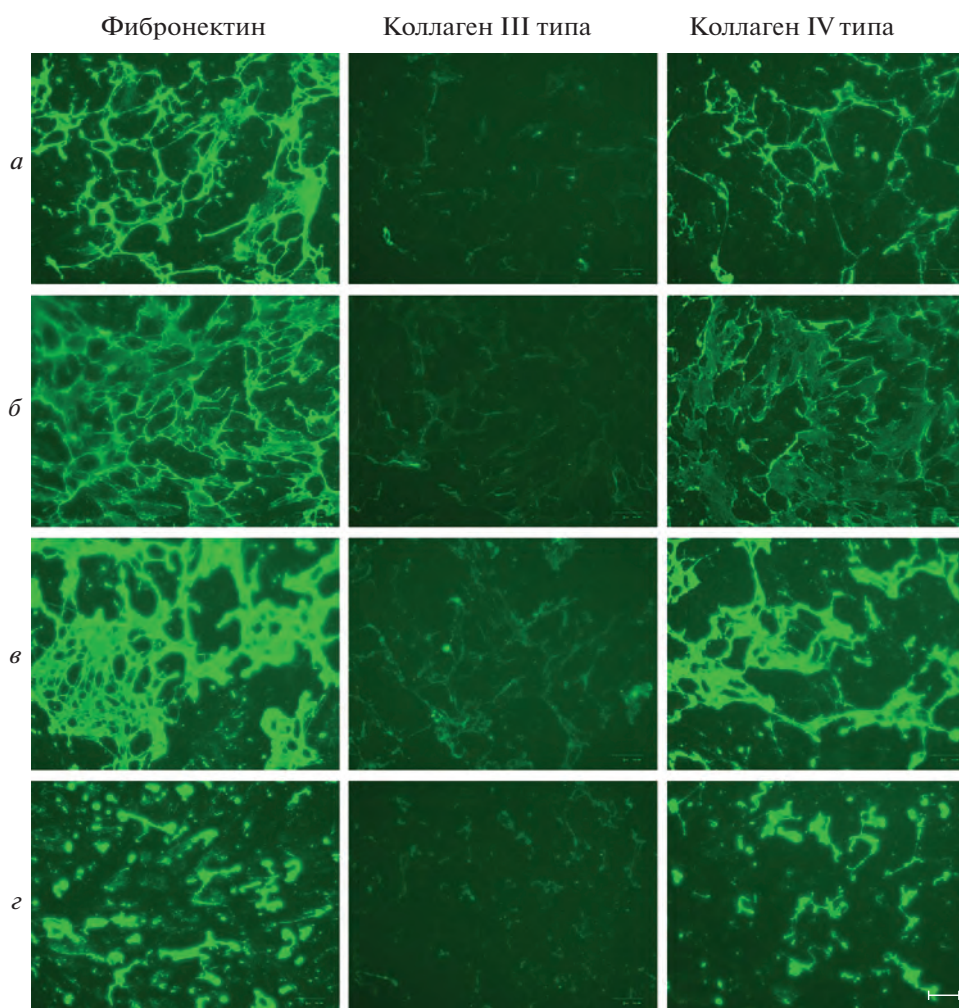


Рис. 7. Влияние фикола 400 в концентрации 50 мг/мл (*б, г*) на эффективность депонирования белков ВКМ при культивировании ЭМСК в течение 14 сут в условиях гипоксии (3% O₂). *а* – 1% FBS в среде без фикола, *б* – 1% FBS, присутствие фикола; *в* – 10% FBS в среде без фикола, *г* – 10% FBS, присутствие фикола.

очевидной стимулирующая роль гипоксии в производстве ВКМ в контексте ускорения депонирования фибронектина и коллагена IV типа, а также образования более разветвленной и целостной сети этих белков. Кроме того, в гипоксических условиях через 14 сут наблюдали более выраженное образование фибриллярной сети коллагена III (рис. 7*в*). В совокупности, наши данные подтверждают, что применение гипоксических условий является перспективным подходом для оптимизации производства ВКМ культивируемыми МСК (Cigognini et al., 2016; Du et al., 2017).

Как было показано, комбинированное действие фикола 400 и фикола 70 вызывает ускорение депонирования ключевых белков ВКМ: коллагена I в случае культивируемых дермальных фибробластов (Gaspar et al., 2019), а также фибронектина, коллагена I и IV типа в случае МСК костного мозга (Zeiger et al., 2012; Rashid et al., 2014; Prewitz et al., 2015). Сведения о самостоятельных эффектах фикола 400 в ка-

честве ММК немногочисленны (Satyam et al., 2014; Gaspar et al., 2019); кроме того, прежде не исследовали способность этого краудера стимулировать работу ВКМ культивируемыми ЭМСК. Мы установили, что в нормальных условиях культивирования ЭМСК пролонгированное действие фикола 400 приводит к ускорению продукции фибронектина и коллагена III и IV типа, тогда как при гипоксии этот эффект значительно усиливается, но только при условии пониженного содержания сыворотки в ростовой среде клеток.

В представленной работе мы продемонстрировали влияние макромолекулярных краудеров фикола 400 и ПЭГ различной мол. массы на депонирование ВКМ ЭМСК в условиях нормоксии и гипоксии. На основе полученных данных можно заключить, что фикола 400 эффективен как краудер для ускорения продукции ключевых компонентов матрикса ЭМСК – фибронектина и коллагена IV типа, в меньшей степени коллагена III типа. При сравнении нормокси-

ческих (20% O₂) и гипоксических (3% O₂) условий культивирования показано, что клетки продуцируют ВКМ с более развитой структурой при пониженной концентрации кислорода. Отметим, что в условиях гипоксии фиколл 400 способствует депонированию ВКМ только при низком содержании сыворотки в ростовой среде. В контексте ЭМСК полученные результаты обладают новизной и расширяют представление о способах оптимизации депонирования ВКМ.

БЛАГОДАРНОСТИ

В работе использовали оборудование ЦКП “Коллекция культур клеток позвоночных”, поддержанного грантом Минобрнауки РФ (Соглашение № 075-15-2021-683).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В экспериментах животные и люди не участвовали.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Домнина А.П., Фридянская И.И., Земелько В.И., Пуговкина Н.А., Ковалева З.В., Зенин В.В., Гринчук Т.М., Никольский Н.Н. 2013. Мезенхимные стволовые клетки эндометрия человека при длительном культивировании не подвергаются спонтанной трансформации. Цитология. Т. 55. № 1. С. 69. (Domnina A.P., Fridliandskaia I.I., Zemelko V.I., Pugovkina N.A., Kovaleva Z.V., Zenin V.V., Grinchuk T.M., Nikolsky N.N. 2013. Mesenchymal stem cells from human endometrium do not undergo spontaneous transformation during long-term cultivation. Cell Tiss. Biol. V. 7. P. 221.)
- Земелько В.И., Гринчук Т.М., Домнина А.П., Арцыбашева И.В., Зенин В.В., Кирсанов А.А., Бичева Н.К., Корсак В.С., Никольский Н.Н. 2011. Мультипотентные мезенхимные стволовые клетки десквамированного эндометрия. Выделение, характеристика и использование в качестве фидерного слоя для культивирования эмбриональных стволовых линий человека. Цитология. Т. 53. № 12. С. 919. (Zemelko V.I., Grinchuk T.M., Domnina A.P., Artzibasheva I.V., Zenin V.V., Kirsanov A.A., Bichevaia N.K., Korsak V.S., Nikolsky N.N. 2012. Multipotent mesenchymal stem cells of desquamated endometrium: isolation, characterization, and application as a feeder layer for maintenance of human embryonic stem cells. Cell Tiss. Biol. V. 6. № 1. P. 1.)
- Матвеева Д.К., Андреева Е.Р. 2020. Регуляторная активность децеллюляризованного матрикса мультипотентных мезенхимных стромальных клеток. Цитология. Т. 62. № 10. С. 699. (Matveeva D.K., Andreeva E.R. 2020. Regulatory activity of decellularized matrix of multipotent mesenchymal stromal cells. Tsitologiya. V. 62. № 10. P. 699.) <https://doi.org/10.31857/S004137712010003X>
- Ahmed M., Ffrench-Constant C. 2016. Extracellular matrix regulation of stem cell behavior. Curr. Stem Cell Rep. V. 2. P. 197. <https://doi.org/10.1007/s40778-016-0056-2>
- Ang X.M., Lee M.H.C., Blocki A., Chen C., Ong L.L.S., Asada H.H., Sheppard A., Raghunath M. 2014. Macromolecular crowding amplifies adipogenesis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by enhancing the pro-adipogenic microenvironment. Tiss. Eng. Part A. V. 20. P. 966. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2013.0337>
- Antich C., Jiménez G., de Vicente J., López-Ruiz E., Chocarro-Wrona C., Griñán-Lisón C., Carrillo E., Montañez E., Marchal J.A. 2021. Development of a biomimetic hydrogel based on predifferentiated mesenchymal stem-cell-derived ECM for cartilage tissue engineering. Adv. Healthc Mater. V. 10 (8): e2001847. <https://doi.org/10.1002/adhm.202001847>
- Assunção M., Dehghan-Baniani D., Yiu C.H.K., Später T., Beyer S., Blocki A. 2020. Cell-derived extracellular matrix for tissue engineering and regenerative medicine. Front. Bioeng. Biotechnol. V. 8: 602009. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.602009>
- Bateman J.F., Cole W.G., Pillow J.J., Ramshaw J.A.M. 1986. Induction of procollagen processing in fibroblast cultures by neutral polymers. J. Biol. Chem. V. 261. P. 4198. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)35645-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)35645-4)
- Buravkova L.B., Andreeva E.R., Gogvadze V., Zhivotovsky B. 2014. Mesenchymal stem cells and hypoxia: where are we? Mitochondrion. V. 19. P. 105. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2014.07.005>
- Chen B., Wang B., Zhang W.J., Zhou G., Cao Y., Liu W. 2013. Macromolecular crowding effect on cartilaginous matrix production: a comparison of two-dimensional and three-dimensional models. Tiss. Engineering. V. 19. P. 586. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2012.0408>
- Chen C., Loe F., Blocki A., Peng Y., Raghunath M. 2011. Applying macromolecular crowding to enhance extracellular matrix deposition and its remodeling *in vitro* for tissue engineering and cell-based therapies. Adv. Drug Delivery Rev. V. 63. P. 277. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.03.003>
- Choi K.M., Seo Y.K., Yoon H.H., Song K.Y., Kwon S.Y., Lee H.S., Park J.K. 2008. Effect of ascorbic acid on bone marrow-derived mesenchymal stem cell proliferation and differentiation. J. Biosci. Bioeng. V. 105. P. 586. <https://doi.org/10.1263/jbb.105.586>
- Cigognini D., Gaspar D., Kumar P., Satyam A., Alagesan S., Sanz-Nogués C., Griffin M., O'brien T., Pandit A., Zeugolis D.I. 2016. Macromolecular crowding meets oxygen tension in human mesenchymal stem cell culture – a step closer to physiologically relevant *in vitro* organogenesis. Sci. Rep. V. 6. P. 30746. <https://doi.org/10.1038/srep30746>
- Clause K.C., Barker T.H. 2013. Extracellular matrix signaling in morphogenesis and repair. Curr. Opin. Biotechnol. V. 24. P. 830. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.04.011>
- Cunningham C.J., Redondo-Castro E., Allan S.M. 2018. The therapeutic potential of the mesenchymal stem cell secretome in ischaemic stroke. J. Cerebral Blood Flow Metab. V. 38. P. 1276. <https://doi.org/10.1177/0271678X18776802>
- Discher D.E., Mooney D.J., Zandstra P.W. 2009. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. Science. V. 324. P. 1673. <https://doi.org/10.1126/science.1171643>

- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D.S., Deans R.J., Keating A., Prockop D.J., Horwitz E.M.* 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. V. 8. P. 315. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Dong X., Al-Jumaily A., Escobar I.C.* 2018. Investigation of the use of a bio-derived solvent for non-solvent-induced phase separation (NIPS) fabrication of polysulfone. *Membranes*. V. 8. P. 23. <https://doi.org/10.3390/membranes8020023>
- Du H.-C., Jiang L., Geng W.-X., Li J., Zhang R., Dang J.-G., Shu M.-G., Li L.-W.* 2017. Growth factor-reinforced ECM fabricated from chemically hypoxic MSC sheet with improved *in vivo* wound repair activity. *BioMed Res. Int.* V. 2017. 2017: 2578017. <https://doi.org/10.1155/2017/2578017>
- Gaspar D., Fuller K.P., Zeugolis D.I.* 2019. Polydispersity and negative charge are key modulators of extracellular matrix deposition under macromolecular crowding conditions. *Acta Biomaterialia*. V. 88. P. 197. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.02.050>
- Hoshiba T., Lu H., Kawazoe N., Chen G.* 2010. Decellularized matrices for tissue engineering. *Expert Opinion Biol. Ther.* V. 10. P. 1717. <https://doi.org/10.1517/14712598.2010.534079>
- Hynes R.O.* 2009. Extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science*. V. 326. P. 1216. <https://doi.org/10.1126/science.1176009>
- Konala V.B., Mamidi M.K., Bhone R., Das A.K., Pochampally R., Pal R.* 2016. The current landscape of the mesenchymal stromal cell secretome: A new paradigm for cell-free regeneration. *Cytotherapy*. V. 18. P. 13. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2015.10.008>
- Kumar P., Satyam A., Fan X., Collin E., Rochev Y., Rodriguez B.J., Gorelov A., Dillon S., Joshi L., Raghunath M., Pandit A., Zeugolis D.I.* 2015a. Macromolecularly crowded *in vitro* micro-environments accelerate the production of extracellular matrix-rich supramolecular assemblies. *Sci. Rep.* V. 5. P. 8729. <https://doi.org/10.1038/srep08729>
- Kumar P., Satyam A., Fan X., Rochev Y., Rodriguez B., Gorelov A., Joshi L., Raghunath M., Pandit A., Zeugolis D.I.* 2015b. Accelerated development of supramolecular corneal stromal-like assemblies from corneal fibroblasts in the presence of macromolecular crowders. *Tiss. Eng. C Methods*. V. 21. P. 660. <https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2014.0387>
- Kumar P., Satyam A., Cigognini D., Pandit A., Zeugolis D.I.* 2018. Low oxygen tension and macromolecular crowding accelerate extracellular matrix deposition in human corneal fibroblast culture. *J. Tiss. Eng. Regen. Med.* V. 12. P. 6. <https://doi.org/10.1002/term.2283>
- Kuznetsova I.M., Turoverov K.K., Uversky V.N.* 2014. What macromolecular crowding can do to a protein. *Int. J. Mol. Sci.* V. 15. P. 23090. <https://doi.org/10.3390/ijms151223090>
- Lareu R.R., Subramhanya K.H., Peng Y., Benny P., Chen C., Wang Z., Rajagopalan R., Raghunath M.* 2007. Collagen matrix deposition is dramatically enhanced *in vitro* when crowded with charged macromolecules: the biological relevance of the excluded volume effect. *FEBS Letters*. V. 581. P. 2709. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.05.020>
- Li M., Zhang A., Li J., Zhou J., Zheng Y., Zhang C., Xia D., Mao H., Zhao J.* 2020. Osteoblast/fibroblast coculture derived bioactive ECM with unique matrisome profile facilitates bone regeneration. *Bioact. Mater.* V. 5. P. 938. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.06.017>
- Lin H., Yang G., Tan J., Tuan R.S.* 2012. Influence of decellularized matrix derived from human mesenchymal stem cells on their proliferation, migration and multi-lineage differentiation potential. *Biomaterials*. V. 33. P. 4480. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.03.012>
- Massaro M.S., Palek R., Rosendorf J., Cervenkova L., Liska V., Moulisova V.* 2021. Decellularized xenogeneic scaffolds in transplantation and tissue engineering: Immunogenicity versus positive cell stimulation. *Mater. Sci. Eng. C*. V. 127. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112203>
- Maumus M., Jorgensen C., Noël D.* 2013. Mesenchymal stem cells in regenerative medicine applied to rheumatic diseases: role of secretome and exosomes. *Biochimie*. V. 95. P. 2229. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.04.017>
- Naba A., Clauser K.R., Hoersch S., Liu H., Carr S.A., Hynes R.O.* 2012. The matrisome: *in silico* definition and *in vivo* characterization by proteomics of normal and tumor extracellular matrices. *Mol. and Cell. Proteomics*. V. 11: M111.014647. <https://doi.org/10.1074/MCP.M111.014647>
- Nellinger S., Mrcic I., Keller S., Heine S., Southan A., Bach M., Volz A.C., Chassé T., Kluger P.J.* 2022. Cell-derived and enzyme-based decellularized extracellular matrix exhibit compositional and structural differences that are relevant for its use as a biomaterial. *Biotechnol. Bioeng.* V. 119. P. 1142. <https://doi.org/10.1002/bit.28047>
- Nyambat B., Manga Y.B., Chen C.H., Gankhuyag U., Pratomo Wp A., Kumar S.M., Chuang E.Y.* 2020. New insight into natural extracellular matrix: genipin cross-linked adipose-derived stem cell extracellular matrix gel for tissue engineering. *Int. J. Mol. Sci.* V. 21. P. 4864. <https://doi.org/10.3390/ijms21144864>
- Pinnell S.R.* 1985. Regulation of collagen biosynthesis by ascorbic acid: a review. *Yale J. Boil. Med.* V. 58. P. 553.
- Prewitz M.C., Stissel A., Friedrichs J., Traber N., Vogler S., Bornhauser M., Werner C.* 2015. Extracellular matrix deposition of bone marrow stroma hanced by macromolecular crowding. *Biomaterials*. V. 73. P. 60. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.09.014>
- Rao Pattabhi S., Martinez J.S., Keller Iii T.C.S.* 2014. Decellularized ECM effects on human mesenchymal stem cell stemness and differentiation. *Differentiation*. V. 88. P. 131. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2014.12.005>
- Rolandsson Enes S., Krasnodembskaya A.D., English K., dos Santos C.C., Weiss D.J.* 2021. Research progress on strategies that can enhance the therapeutic benefits of mesenchymal stromal cells in respiratory diseases with a specific focus on acute respiratory distress syndrome and other inflammatory lung diseases. *Front. Pharmacol.* V. 12: 647652. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.647652>
- Rashid R., Lim N., Chee S., Png S., Wohland T., Raghunath M.* 2014. Novel use for polyvinylpyrrolidone as a macromolecular crowder for enhanced extracellular matrix deposition and cell proliferation. *Tissue Eng. C Methods*. V. 20.

- P. 994.
<https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2013.0733>
- Rozario T., DeSimone D.W. 2010. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Devel. Biol.* V. 341. P. 126.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.10.026>
- Satyam A., Kumar P., Cigognini D., Pandit A., Zeugolis D.I. 2016. Low, but not too low, oxygen tension and macromolecular crowding accelerate extracellular matrix deposition in human dermal fibroblast culture. *Acta Biomaterialia.* V. 44. P. 221.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.08.008>
- Satyam A., Kumar P., Fan X., Gorelov A., Rochev Y., Joshi L., Peinado H., Lyden D., Thomas B., Rodriguez B., Raghunath M., Pandit A., Zeugolis D. 2014. Macromolecular crowding meets tissue engineering by self-assembly: a paradigm shift in regenerative medicine. *Advanced Materials.* V. 26. P. 3024.
<https://doi.org/10.1002/adma.201304428>
- Schaefer L. 2010. Extracellular matrix molecules: endogenous danger signals as new drug targets in kidney diseases. *Curr. Opin. Pharmacol.* V. 10. P. 185.
<https://doi.org/10.1016/j.coph.2009.11.007>
- Tsiapalis D., Zeugolis D.I. 2021. It is time to crowd your cell culture media – Physicochemical considerations with biological consequences. *Biomaterials.* V. 275: 120943.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.120943>
- Xing H., Lee H., Luo L., Kyriakides T.R. 2020. Extracellular matrix-derived biomaterials in engineering cell function. *Biotechnol. Adv.* V. 42: 107421.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107421>
- Xu S., Liu C., Ji H.L. 2019. Concise review: therapeutic potential of the mesenchymal stem cell derived secretome and extracellular vesicles for radiation-induced lung injury: progress and hypotheses. *Stem Cells Transl. Med.* V. 8. P. 344.
<https://doi.org/10.1002/sctm.18-0038>
- Yang L., Ge L., van Rijn P. 2020. Synergistic effect of cell-derived extracellular matrices and topography on osteogenesis of mesenchymal stem cells. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* V. 12. P. 25591.
<https://doi.org/10.1021/acscami.0c05012>
- Zeiger A.S., Loe F.C., Li R., Raghunath M., Van Vliet K.J. 2012. Macromolecular crowding directs extracellular matrix organization and mesenchymal stem cell behavior. *PLoS One.* V. 7 P. e37904.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037904>
- Zhu J., Zheng J., Liu C., Zhang S. 2016. Ionic complexing induced fabrication of highly permeable and selective polyacrylic acid complexed poly (arylene ether sulfone) nanofiltration membranes for water purification. *J. Membr. Sci.* V. 520. P. 130.
<https://doi.org/10.1016/j.memsci.2016.07.059>

An Impact of Hypoxia and Macromolecular Crowders on Extracellular Matrix Deposition by Human Endometrial Mesenchymal Stromal Cells

I. E. Perevoznikov^{a, *}, R. E. Ushakov^a, and E. B. Burova^a

^a*Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064 Russia*

**e-mail: ilyaperevoznikov@gmail.com*

The last decades are characterized by intensive development of extracellular matrix (ECM) biology. ECM binds cells in an integral tissue and controls the cell functions – from proliferation and differentiation to migration and apoptosis. Bioactive properties of ECM provide the wide perspectives of using in bioengineering and regenerative medicine. In this context, the ECM production by decellularization of organs, tissues or cell cultures is a key technology. To date, a problem of a rapid and large-scale production of bioactive ECM by cultured cells remains very relevant. Optimization of the ECM deposition conditions by human endometrial mesenchymal stromal cells (MESC)s had not been studied yet. Here, we investigated an impact of macromolecular compounds (crowders) – ficoll and PEG on efficiency of crucial ECM proteins deposition depending on both concentration and molecular weight of crowders under normoxia and hypoxia. According to immunofluorescence analysis, among all studied crowders, ficoll 400 had a potent effect on the production of ECM core proteins – fibronectin, type IV collagen and, in a lower rate, type III collagen. The MESC)s incubation under hypoxia promoted the formation of a properly organized ECM structure as well as increase in efficiency of ECM protein deposition. Of note, in these conditions ficoll 400 accelerated the ECM production only in a low serum medium. Together, combination of ficoll 400, low serum medium and hypoxia provides the optimal conditions for ECM synthesis. The present work demonstrates for the first time the phenomenon of macromolecular crowding in the context of improving the conditions for deposition and organization of ECM by MESC)s.

Keywords: extracellular matrix, human endometrial mesenchymal stromal cells, hypoxia, macromolecular crowders