

ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННЫЙ ВНЕКЛЕТОЧНЫЙ МАТРИКС ЗАМЕДЛЯЕТ ПРЕЖДЕВРЕМЕННОЕ СТАРЕНИЕ ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

© 2023 г. Е. Б. Бурова¹, *, И. Е. Перевозников¹, Р. Е. Ушаков¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

*E-mail: lenbur87@mail.ru

Поступила в редакцию 05.07.2023 г.

После доработки 18.07.2023 г.

Принята к публикации 20.07.2023 г.

Внеклеточный матрикс (ВКМ), основной компонент внеклеточного пространства, опосредует передачу сигналов между клетками и контролирует их ключевые функции – пролиферацию, дифференцировку, миграцию. Актуальность изучения ВКМ обусловлена широким спектром его биологических свойств, которые могут быть использованы в регенеративной медицине и биоинженерии. Особый интерес представляют децеллюляризованные ВКМ (дВКМ) клеточного происхождения для исследования их регуляторной активности в отношении различных клеточных функций. В настоящей работе была проверена гипотеза о модулирующем влиянии дВКМ, депонированного молодыми МСК Вартонова студня пуповины, на фенотип старения эндометриальных МСК (эмСК), который клетки приобретают в ответ на окислительный стресс. Эта сторона функционирования ВКМ в контексте эмСК до сих пор не изучена. Сравнительное исследование H₂O₂-индуцированного старения эмСК, культивируемых на дВКМ и на пластике в течение длительного времени, показало существенное изменение основных маркеров старения в клеточной популяции на дВКМ. В совокупности, полученные результаты дают основание предполагать, что дВКМ способен частично обращать (тормозить) преждевременное старение эмСК в ответ на окислительный стресс, а также расширяют представление о ВКМ как регуляторе функциональной активности клеток.

Ключевые слова: внеклеточный матрикс, децеллюляризация, эндометриальные мезенхимные стромальные клетки, фенотип старения, окислительный стресс, преждевременное старение

DOI: 10.31857/S0041377123060044, EDN: QLQEKJ

В настоящее время продолжается активное исследование возможности применения мультипотентных мезенхимных стромальных клеток человека (МСК) в клеточной терапии, а также различных способов увеличения ее эффективности. Накопленные за последнее десятилетие данные показали, что трансплантированные аллогенные МСК теряют свои положительные эффекты из-за иммунного отторжения, тогда как на функцию аутологических МСК отрицательно влияет возраст пациента, что ограничивает их терапевтический потенциал (Zhou et al., 2020). Одной из актуальных проблем, препятствующих широкому применению МСК, является преждевременное старение, которому они могут подвергаться во время трансплантации в организм пациента, особенно в зоны с протеканием воспали-

тельных процессов. Преждевременное старение МСК в ответ на стресс сопровождается различными фенотипическими изменениями, модуляцией секреторного фенотипа, приводит к остановке пролиферации, что значительно ограничивает их регенеративный потенциал (Liu et al., 2020; Lee et al., 2023).

Одним из перспективных подходов, направленных на преодоление связанных с трансплантацией МСК проблем, является создание на основе внеклеточного матрикса (ВКМ) биосовместимых скаффолдов, имитирующих нативную среду организма и повышающих устойчивость и выживаемость МСК при трансплантации (Assunção et al., 2020; Xing et al., 2020). При этом возможно использование как матриц, состоящих из отдельных белков микроокружения клеток, так и полноценного ВКМ клеточного происхождения (Zhou et al., 2016; Yang et al., 2020). МСК при культивировании синтезируют значительное количество ВКМ с различным составом фибриллярных и растворимых компонентов. Внимание исследователей привлекают децеллюляризованные ВКМ (дВКМ) тканей и культивируемых клеток, в

Принятые сокращения: АФ – автофлуоресценция; АФК – активные формы кислорода; дВКМ – децеллюляризованный внеклеточный матрикс; ПРС – полная ростовая среда; МСК и эмСК – мультипотентные мезенхимные стромальные клетки и эндометриальные МСК человека соответственно; PBS – фосфатно-солевой буферный раствор; SA-β-Gal – β-галактозидаза, ассоциированная с клеточным старением.

том числе МСК, в качестве источника биологических скаффолдов для регенеративной медицины (Matveeva, Andreeva, 2020; Ushakov, 2023). дВКМ — многокомпонентная сеть белков, оказывающих всестороннее влияние на клеточные функции — имитирует естественное клеточное микроокружение и обеспечивает клеткам более физиологичный субстрат по сравнению с культуральным пластиком. Как было продемонстрировано в ряде работ, культивирование на ВКМ клеточных культур стимулирует пролиферацию и миграцию (Lin et al., 2012) и вызывает апрегуляцию соответствующих генов (Ragelle et al., 2017), поддерживает стволовость (Lai et al., 2010) и способствует дифференцировке в различных направлениях (Rao Patabhi et al., 2014; Novoseletskaya et al., 2020; Yang et al., 2020), приводит к омоложению культуры (Choi et al., 2011; Joergensen, Rattan, 2014) и защищает от стресс-индуцированного старения (Liu et al., 2016; Zhou et al., 2018; Yu et al., 2019). Кроме того, культивирование клеток на дВКМ служит хорошей моделью для изучения взаимного влияния в системе матрикс–клетка, результаты которого могут способствовать пониманию процессов, происходящих *in vivo* в тканевых нишах МСК.

Основным объектом исследования в настоящей работе являются мультипотентные МСК, выделенные из десквамированного эндометрия в менструальной крови (эмСК). Выбор обусловлен, в первую очередь, легкой доступностью и неинвазивностью выделения, а также отсутствием этических проблем, связанных с их получением. В продолжении наших предыдущих работ по изучению механизмов стресс-индуцированного старения эмСК и его распространения на клетки микроокружения (Burova et al., 2013; Borodkina et al., 2014; Griukova et al., 2019; Vasilieva et al., 2020), мы поставили задачу выяснить, влияет ли ВКМ на фенотип преждевременного старения эмСК; эта сторона функционирования ВКМ в контексте эмСК до сих пор оставалась неизученной. С этой целью провели исследование динамики H_2O_2 -индуцированного старения эмСК, культивируемых на пластике и на дВКМ, оценивая основные маркеры старения; продуцентом дВКМ были молодые МСК Вартонова студня пуповины человека. В совокупности, полученные результаты указывают на уникальную способность дВКМ частично обращать (или тормозить) преждевременное старение эмСК в ответ на окислительный стресс.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Культивирование клеток. Использовали мультипотентные мезенхимные стромальные клетки: 1) выделенные из десквамированного эндометрия в менструальной крови здоровых доноров (эмСК) и охарактеризованные ранее сотрудниками ИИЦ РАН (Земелько и др., 2011); 2) выделенные из Вартонова студня пупочного канатика человека линии WJ-1 (MSCWJ-1), полученные из Коллекции клеточных

культур позвоночных ИИЦ РАН и охарактеризованные ранее (Кольцова и др., 2017). Характеристики обеих линий клеток соответствовали минимальным критериям, предложенным ISTC (International Society for Cellular Therapy) (Dominici et al., 2006).

эмСК и MSCWJ-1 культивировали во флаконах T25 и T75 (Thermo Scientific, США) в полной ростовой среде (ПРС), содержащей DMEM/F12 (Gibco, США), 10% эмбриональной сыворотки (HyClone, США), 1% PenStrep (Gibco, США) и 1% GlutaMAX (Gibco, США), при 37°C в атмосфере 5% CO_2 . После трипсинизации клеток с помощью 0.05%-ного раствора трипсин-ЭДТА (Invitrogen, США) полученную суспензию рассеивали на чашки диаметром 35 мм (Thermo Scientific, США): MSCWJ-1 — по 200, эмСК — по 140 тыс. на чашку.

Депонирование внеклеточного матрикса (ВКМ). MSCWJ-1 на 10-м пассаже, предназначенные для депонирования ВКМ, рассеивали на чашки, покрытые 0.1%-ным раствором желатина. Через 3 сут после посева заменяли ростовую среду на ПРС, содержащую 50 мкМ тринатриевой соли 2-фосфо-L-аскорбиновой кислоты (Sigma, Германия), которую стерилизовали фильтрацией через мембрану 0.22 мкм непосредственно перед использованием. Аскорбат натрия является необходимой добавкой для стабильной наработки ВКМ, выступая в роли антиоксиданта (Choi et al., 2008), а также кофактора ферментов лизилгидроксилазы и пролилгидроксилазы, участвующих в фибрилlogenезе коллагена (Pinnell, 1985). Клетки культивировали в течение 14 сут, заменяя среду на свежую, содержащую аскорбат натрия, каждые 3 сут; затем осуществляли децеллюляризацию с целью получения бесклеточного ВКМ.

Децеллюляризацию ВКМ проводили с помощью 0.5%-ного раствора CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate) (Sigma, США), содержащего 20 мМ гидроксида аммония, в течение 3 мин при комнатной температуре с последующей осторожной промывкой PBS 5 раз по 3 мин; при необходимости хранили препараты бесклеточных ВКМ в PBS при 4°C.

Иммунофлуоресценция. Препараты дВКМ фиксировали 3.7%-ным раствором формалина в течение 15 мин и инкубировали в 0.5%-ном Triton X-100 в течение 15 мин. После каждой процедуры препараты промывали PBS 5 раз по 3 мин. Далее дВКМ обрабатывали 1%-ным бычьим сывороточным альбумином (БСА) в течение 30 мин и инкубировали в течение ночи при 4°C в приготовленных на 1%-ном БСА первичных антителах к фибронектину (Sigma, США) (разведение 1 : 400), коллагену I, III или IV типов (ИМТЕК, Россия) (разведение 1 : 20) с последующей промывкой PBS 5 раз по 2 мин. На следующий день препараты инкубировали с вторичными козьими антителами 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. Для коллагена I типа использовали вторичные козы антитела против иммуноглобулинов мыши и конъюгированные с флуорофором Alexa 568 (GAM-Alexa 568) (разведение 1 : 500) (Invitrogen, США).

Полноту децеллюляризации ВКМ подтверждали отсутствием клеточных компонентов и ядер, окрашивая препараты на α -тубулин, актин и 4',6-диамидино-2-фенилиндол (DAPI). дВКМ инкубировали с первичными антителами на α -тубулин (разведение 1 : 200) (Sigma, США) в течение 10 мин и со вторичными GAM-Alexa 568 (разведение 1 : 500) (Invitrogen, США) в течение 40 мин при комнатной температуре; для окраски на актин использовали фаллоидин, конъюгированный с тетраметилпроламином (разведение 1 : 400) (Invitrogen, США); окраску матриксов с помощью DAPI (разведение 1 : 1000) (Sigma, США) проводили в течение 5 мин при комнатной температуре в темноте. Анализировали препараты окрашенных дВКМ на флуоресцентном микроскопе Fluorescent Cell Imager (Bio-Rad, Сингапур). Анализ показал отсутствие в препаратах дВКМ клеточных компонентов и ядер (результаты не показаны).

Рецеллюляризация дВКМ. эМСК на 11-м пассаже были использованы для рецеллюляризации бесклеточных ВКМ. эМСК рассеивали на чистые чашки диаметром 35 мм и параллельно на чашки с дВКМ в одинаковой плотности (140 тыс. на 1 чашку).

Индукция старения в эМСК при действии H_2O_2 . Программу преждевременного старения клеток инициировали через 2 сут после посева обработкой клеток 200 мкМ H_2O_2 (Sigma-Aldrich, St. Louis, США) в течение 1 ч; после промывки PBS клетки культивировали в ПРС в течение 6 и 16 сут, меняя среду на свежую каждые 3 сут. Условия обработки и культивирования эМСК на дВКМ и на пластике были идентичными.

Анализ внутриклеточного уровня АФК, жизнеспособности, автофлуоресценции (АФ) и размера клеток. Для оценки уровня АФК в эМСК, культивируемых на дВКМ и на пластике, использовали АФК-зависимый зонд диацетат 2,7-дихлор-флуоресцеина ($H_2DCF-DA$) (Molecular Probes, США). Окраску клеток с помощью 1 мМ раствора $H_2DCF-DA$ в DMSO проводили в ростовой среде без сыворотки в CO_2 -инкубаторе в течение 20 мин, промывали 1 раз PBS и собирали клетки трипсинизацией в 0.05%-ном растворе трипсин-ЭДТА с последующим центрифугированием. Суспензию клеток в PBS анализировали на проточном цитометре CytoFLEX S (Beckman Coulter, Бреа, Калифорния, США). Уровень АФК оценивали по изменению интенсивности флуоресценции DCF (усл. ед.). Для определения жизнеспособности к клеточной суспензии добавляли 50 мкг/мл йодистого пропидия (PI) и осторожно перемешивали в течение 30 с; для анализа обычно собирали не менее 3000 событий в качестве основ-

ной клеточной популяции. Репрезентативные точечные диаграммы PI vs. FSC позволяли различать PI-отрицательные (живые) клетки и PI-положительные (мертвые) клетки; одновременно оценивали количество живых клеток, среднее значение АФ, которое отражает присутствие липофусцина, и среднее значение прямого светорассеяния (forward scatter, FS), которое коррелирует с размером клеток. Полученные данные анализировали в программе CytExpert software (версия 2.3) (Beckman Coulter, Бреа, Калифорния, США).

Активность β -галактозидазы (SA- β -Gal), ассоциированной с клеточным старением определяли в соответствии с описанным ранее протоколом (Debaqc-Chainiaux et al., 2009). Сначала эМСК обрабатывали с помощью 100 нМ бафиломицина A1 в течение 1 ч для зашелачивания лизосом, затем в клеточную среду добавляли C12FDG (липофильный субстрат бета-галактозидазы), конъюгированный с флуоресцеином, до конечной концентрации 33 мМ, и инкубировали клетки в течение 2-х ч. Обработку клеток проводили при 37°C в атмосфере 5% CO_2 . Окрашенные клетки промывали PBS, собирали трипсинизацией и анализировали в проточном цитометре CytoFlex S (Beckman Coulter, Бреа, Калифорния, США); полученные данные анализировали с помощью программного обеспечения CytExpert (версия 2.0) (Beckman Coulter, Бреа, Калифорния, США).

Электрофорез и иммуноблотинг. Лизаты клеток получали, как описано ранее (Vugova et al., 2013); концентрацию белка определяли по методу Бредфорда на спектрофотометре GeneQuant 1300 (Biochrom, США). Электрофоретическое разделение белков в 9%-ном полиакриламидном геле, перенос на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-C extra (Amersham Pharmacia Biotech, Швеция) и иммуноблотинг проводили по стандартным протоколам производителя (Bio-Rad Laboratories, США). Для визуализации белковых полос мембрану окрашивали красителем Ponceau S (Sigma, США).

Для специфического выявления белков использовали первичные моноклональные кроличьи антитела против ингибитора циклинзависимых киназ p21Waf1/Cip1 и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH, clone 14C10), а также поликлональные кроличьи антитела против фосфорилированной формы Rb (p-Rb) (Ser807/811). В качестве вторичных антител применяли козы антитела, выработанные против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (GAR-HRP). Все антитела были приобретены в фирме Cell Signaling (США). Пероксидазную активность конъюгатов вторичных антител детектировали с помощью метода ECL (Amersham, Швеция); хемилюминесцентное излучение регистрировали экспонированием на рентгеновскую пленку CEA RP NEW (CEA AB, Швеция).

Статистическую обработку данных проводили с помощью компьютерной программы Microsoft Excel

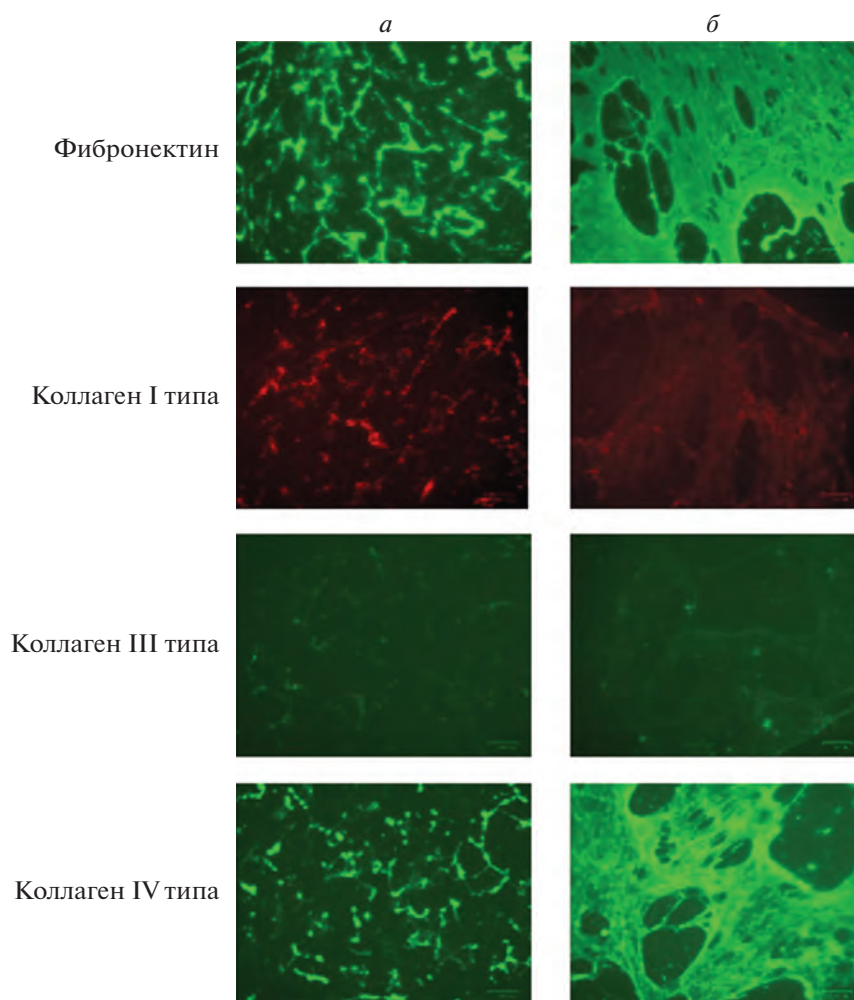


Рис. 1. Децеллюляризованные внеклеточные матриксы (дВКМ), депонированные ЭМСК (*а*) и клетками линии MSCWJ-1 (*б*). Иммунофлуоресцентная окраска основных белковых компонентов дВКМ – фибронектина, коллагенов I, III и IV типов. Препараты окрашенных дВКМ анализировали на флуоресцентном микроскопе Fluorescent Cell Imager (Bio-Rad, Сингапур). Масштабный отрезок: 100 мкм.

(Microsoft Corporation, США), используя пакет программ Microsoft Office 2016. Для оценки достоверности различий данных использовали программу OriginPro 2021 с привлечением дисперсионного анализа (ANOVA) с поправкой Бонферрони. Данные представлены в виде средних значений и их стандартных отклонений ($n = 3$).

В работе использовали неорганические соли производства фирмы Sigma (США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для изучения роли ВКМ в процессе преждевременного старения ЭМСК прежде всего необходимо было выбрать МСК, способные продуцировать прочный, стабильно воспроизводимый матрикс; доступность клеточных линий на ранних пассажах в достаточных количествах также имела существенное значение для планируемых широкомасштабных экс-

периментов. Нарработку и децеллюляризацию ВКМ проводили, как описано в разделе “Материал и методика”; полноту децеллюляризации ВКМ подтверждали методом иммунофлуоресценции по отсутствию клеточных компонентов (актинового и тубулинового цитоскелета, ядер) по сравнению с ВКМ с клетками-продуцентами (данные не показаны). Эффективность депонирования основных компонентов дВКМ – фибронектина, коллагенов I, III, IV типов – оценивали по целостности образованной белковой сети. Сравнив структурную сеть компонентов дВКМ, депонированных ЭМСК и MSCWJ-1, для дальнейших исследований выбрали клетки MSCWJ-1 (рис. 1*а, б*).

Для проверки гипотезы о модулирующем действии дВКМ на H_2O_2 -индуцированное клеточное старение мы провели рецеллюляризацию дВКМ популяцией ЭМСК и для сравнения посеяли те же клетки на чистые пластиковые чашки. Клетки под-

вергли сублетальному окислительному стрессу, индуцированному с помощью 200 мкМ H_2O_2 в течение 1 ч. Как было установлено в наших предыдущих работах, в этих условиях эМСК на пластике подвергаются преждевременному старению (Burova et al., 2013; Borodkina et al., 2014). Через 6 и 16 сут после окислительного стресса или через 1 сут после посева (в случае контрольных клеток) сравнивали маркеры старения в эМСК, культивируемых на пластике и на дВКМ. Для мониторинга фенотипа культивируемых в течение длительного времени клеток оценивали уровни АФК и АФ, размер клеток, активность SA- β -Gal и функциональный статус сигнальных белков p21 и Rb.

Измерение внутриклеточного уровня АФК в H_2O_2 -обработанных эМСК, культивируемых на пластике или дВКМ от молодых MSCWJ-1 10 пассажа, проводили с использованием АФК-чувствительного флуоресцентного зонда H_2 -DCF-DA, анализируя изменение интенсивности флуоресценции в клетках. Одновременно оценивали значения АФ (рис. 2б, в), которые при построении гистограмм (рис. 2а) вычитали из значений флуоресценции окрашенных клеток. В анализируемых временных точках (6 и 16 сут) уровень АФК в клетках на дВКМ был значительно ниже, чем на пластике; такая же закономерность была характерна и для контрольных необработанных клеток. Наибольшую разницу между флуоресценцией клеток на дВКМ и пластике наблюдали через 16 сут после обработки H_2O_2 (рис. 2а), причем эти же значения различались между собой, будучи нормированными на соответствующие контроли. Помимо этого, значение АФ в клетках на дВКМ через 16 сут после окислительного стресса было ниже, чем на пластике (рис. 2в).

Результаты анализа изменения размеров клеток в ходе эксперимента представлены на рис. 3а. В отличие от клеток на пластике, клетки на дВКМ имели меньший размер, причем разница в размере была наиболее значительна через 16 сут после обработки H_2O_2 , как и в случае с уровнем АФК и АФ (рис. 2а, в).

Анализ активности SA- β -Gal проводили с помощью проточной цитометрии с использованием C12FDG – липофильного субстрата β -Gal, конъюгированного с флуоресцеином. Интенсивность флуоресценции через 6 сут после обработки H_2O_2 была меньше в клетках, культивируемых на дВКМ, чем в клетках на пластике (рис. 3б), однако эти различия не были статистически значимыми. А уже через 16 сут наблюдали значительное уменьшение значений интенсивности флуоресценции клеток как на дВКМ, так и на пластике по сравнению с 6 сут, но между собой значения не различались.

Как известно, ингибитор циклин-зависимых киназ p21 и белок ретинобластомы Rb являются ключевыми компонентами сигнального каскада АТМ/p53/p21/Rb, ответственного за остановку клеточного цикла и запуск программы клеточного старения в ответ на

окислительный стресс. Как видно на рис. 4, через 6 сут после действия H_2O_2 фосфорилированная форма белка Rb исчезала в клетках, культивируемых как на дВКМ, так и на пластике; в то же время уровень белка p21 был значительно повышен (в большей степени в клетках на пластике), по сравнению с контрольными клетками. Эти факты свидетельствуют о том, что в обоих случаях клетки, обработанные H_2O_2 , находились в состоянии преждевременного старения. Однако через 16 сут культивирования старых (стареющих) эМСК картина существенно изменилась: мы наблюдали появление высокого уровня p-Rb в клетках на дВКМ, по сравнению с весьма незначительным повышением на пластике. Этот интересный феномен восстановления фосфорилирования Rb в старых клетках, культивируемых на дВКМ, может свидетельствовать о важной функциональной роли матрикса, продуцированного молодыми MSCWJ-1.

ОБСУЖДЕНИЕ

В наших предыдущих работах был детально исследован механизм преждевременного старения эМСК в ответ на окислительный стресс, индуцированный действием 200 мкМ H_2O_2 (Burova et al., 2013; Borodkina et al., 2014; Borodkina et al., 2016; Griukova et al., 2019; Vassilieva et al., 2020). Следует подчеркнуть, что все результаты были получены на клетках, культивируемых на пластиковых чашках, традиционно используемых для этой цели. Однако очевидно, что пластик, в отличие от ВКМ, не является релевантным субстратом для культивирования, поскольку в этих условиях клетки лишены тех сигналов, которые может обеспечить ВКМ. Это обстоятельство лишь подчеркивает актуальность изучения регуляторного действия ВКМ на функционирование МСК различной природы. В настоящем исследовании мы проверяли гипотезу о модулирующем влиянии дВКМ, который продуцировали молодые (раннего пассажа) MSCWJ-1, на фенотип старения эМСК.

Дизайн экспериментов предполагал использование дВКМ, депонированного клетками MSCWJ-1, с последующей его рецеллюляризацией молодыми эМСК, которые затем подвергали сублетальному окислительному стрессу, запуская программу клеточного старения. Для сравнения в параллельных экспериментах характеризовали процесс стресс-индуцированного старения эМСК, посеянных на пластиковые чашки.

Преждевременное старение клеток характеризуется рядом общепринятых фенотипических признаков, таких как клеточная гипертрофия, увеличение активности SA- β -Gal вследствие усиления биогенеза лизосом, повышение интенсивности автофлуоресценции, обусловленное накоплением в цитоплазме липофусцина, и усиление генерации внутриклеточных АФК (Campisi, d'Adda di Fagagna, 2007; Blagosklonny, 2011; Bertolo et al., 2019; Weng et al., 2022). В ответ на окислительное

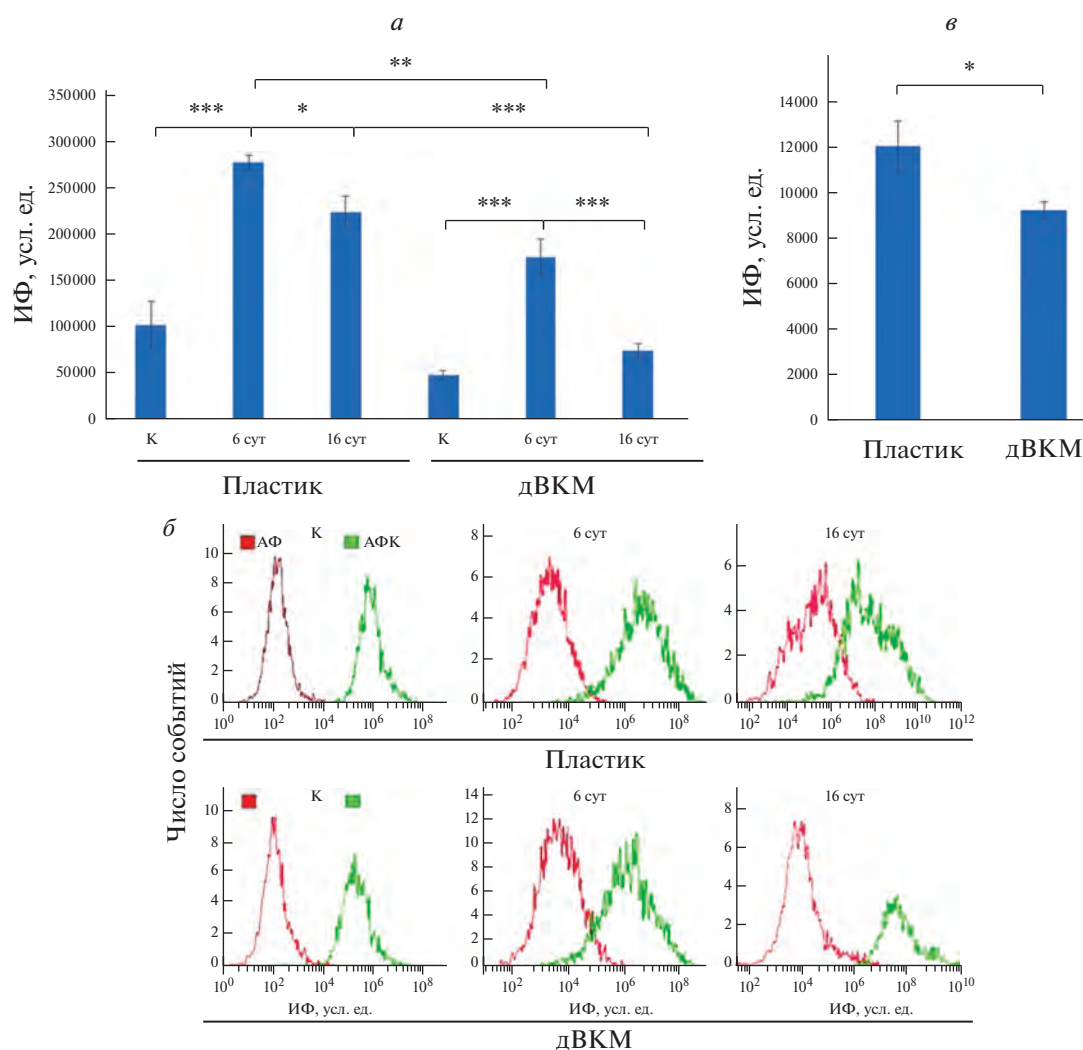


Рис. 2. Зависимость внутриклеточного уровня АФК и АФ от природы субстрата и продолжительности культивирования эМСК, обработанных H_2O_2 . Клетки, посеянные на пластик или дВКМ от MSCWJ-1, подвергали действию H_2O_2 (200 мкМ, 1 ч) и через 6 или 16 сут культивирования оценивали уровень АФК и АФ методом проточной цитометрии. *а* – Интенсивность флуоресценции (ИФ, усл. ед.) DCF (АФК-зависимого зонда H_2 -DCF-DA); К – контрольные интактные клетки; 6 и 16 сут – время культивирования после обработки H_2O_2 . *б* – Интенсивность АФ и зонда (ИФ) окрашенных клеток; по оси абсцисс – ИФ, усл. ед., по оси ординат – число событий. *в* – Интенсивность АФ клеток на пластике или дВКМ, через 16 сут после действия H_2O_2 . Показаны средние значения и их стандартные отклонения (*а*, *в*; вертикальные отрезки) из трех независимых экспериментов; различия достоверны при $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ и $***p < 0.001$.

повреждение ДНК активируется сигнальный путь ATM/p53/p21/Rb, что сопровождается повышением уровня ингибитора циклин-зависимых киназ p21 и падением уровня фосфорилирования белка ретинобластомы Rb с последующим арестом клеточного цикла (Engeland, 2022).

Сравнительная оценка уровня АФК в обработанных H_2O_2 эМСК на разных субстратах – пластике и дВКМ показала, что культивирование клеток на дВКМ приводит к существенному снижению в них уровня АФК. Следует подчеркнуть, что наибольшую разницу между дВКМ и пластиком мы зафиксировали через 16 сут после обработки H_2O_2 , причем различие сохранялось при нормировании уровней АФК

на соответствующие контроли. Эти результаты согласуются с данными из литературы, в соответствии с которыми в старых МСК костного мозга мышей уровень АФК значительно уменьшался в ответ на их культивирование на дВКМ, продуцированном молодыми МСК (Sun et al., 2011). В ряде работ тоже отмечали эффективность дВКМ в повышении устойчивости МСК из различных источников к воздействию АФК (Sart et al., 2020; Xing et al., 2020). Одна из причин наблюдаемых эффектов может быть связана со способностью дВКМ, продуцированного МСК, усиливать активность антиоксидантных ферментов клетки, таких как супероксиддисмутаза и каталаза (Pei et al., 2013; Liu et al., 2016; Zhou et al., 2018).

Мы обнаружили также, что интенсивность АФ клеток через 16 сут после их обработки H_2O_2 существенно ниже в эМСК, культивируемых на дВКМ; это может свидетельствовать о меньшем накоплении липофусцина в цитоплазме, характерном для более молодых клеток (Bertolo et al., 2019; Shatrova et al., 2021). В пользу “омоложения” клеточной популяции эМСК в наших экспериментах свидетельствует и факт сильного уменьшения размера клеток на дВКМ, которое коррелирует с продолжительностью взаимодействия матрикса и клетки. В то же время, через 16 сут после окислительного стресса снижалась активность SA- β -Gal в клетках на дВКМ и пластике, хотя статистически значимые различия между этими вариантами отсутствовали. В целом, наблюдаемый нами эффект торможения старения эМСК, который оказывает дВКМ, совпадает с описанным ранее защитным эффектом от H_2O_2 -индуцированного старения МСК Вартонова студня (Zhou et al., 2018) и МСК жировой ткани (Yu et al., 2019), который продемонстрировали аутологичные дВКМ.

Анализ функционального статуса ключевых белков p21 и Rb сигнального каскада АТМ/p53/p21/Rb показал, что через 6 сут после стресса клетки как на ВКМ, так и на пластике находятся в состоянии преждевременного старения, о чем свидетельствует увеличение уровня p21 и одновременное падение уровня фосфорилирования Rb. Эти результаты полностью согласуются с описанным ранее механизмом H_2O_2 -индуцированного старения эМСК, культивируемых на пластике (Burova et al., 2013; Borodkina et al., 2014). Принципиально иная ситуация наблюдается при пролонгировании культивирования: в клетках на дВКМ, в отличие от пластика, даже при сохранении уровня p21, фосфорилирование Rb достигает высокого уровня, характерного для пролиферирующих клеток. Принимая во внимание, что сигнальный путь АТМ/p53/p21/Rb активируется в ответ на повреждение ДНК и приводит к аресту клеточного цикла (Engeland, 2022), можно предположить, что антиоксидантные свойства дВКМ способствовали уменьшению повреждения ДНК при окислительном стрессе и торможению развития программы старения.

Нельзя также исключить участие сигнального каскада p38MAPK/p16INK4a в модуляции статуса фосфорилирования Rb при изучении дВКМ-зависимой регуляции старения эМСК. MAP-киназа p38 с большой вероятностью может рассматриваться в качестве кандидата на роль регулятора статуса Rb, учитывая ее вовлеченность в процесс H_2O_2 -индуцированного старения эМСК при культивировании на пластике (Borodkina et al., 2014). С другой стороны, уровень ингибитора циклин-зависимых киназ p16, в отличие от p21, может оказаться существенно пониженным на поздних стадиях старения, что объяснит повышение уровня фосфорилирования белка ретинобластомы.

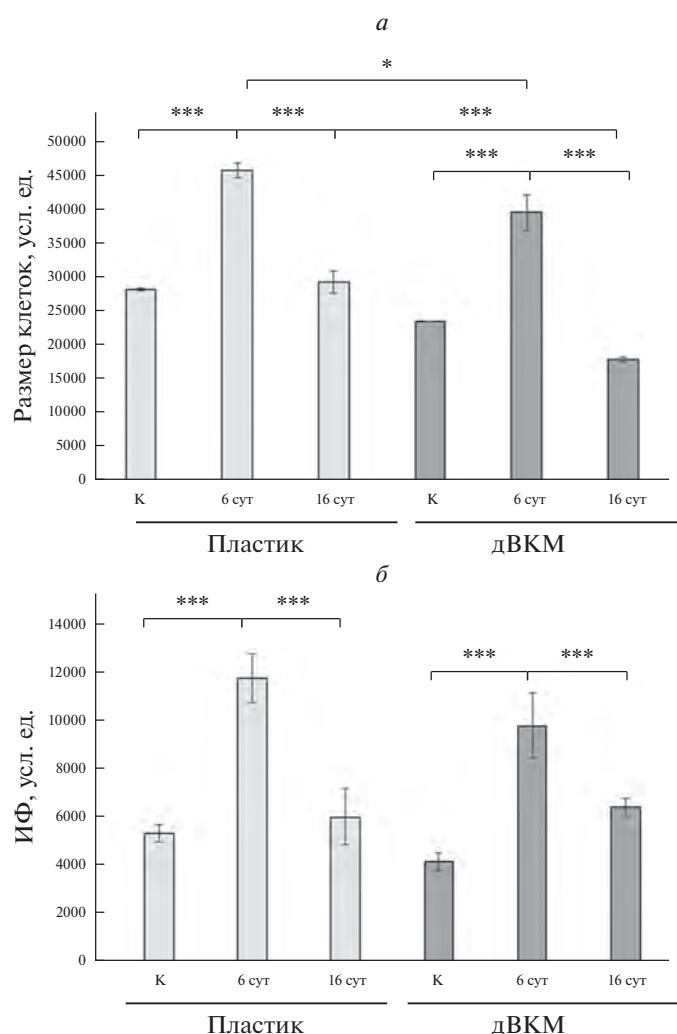


Рис. 3. Изменение размера эМСК (а) и активности в клетках β -галактозидазы (β -Gal), ассоциированной с клеточным старением, (б) через 6 и 16 сут после окислительного стресса. Клетки культивировали на дВКМ и на пластике. Проточная цитометрия. Размер клеток определяли на основе прямого светорассеяния (forward scatter, FS) живых клеток, активность β -Gal – по интенсивности флуоресценции (ИФ) C12FDG, липофильного субстрата β -Gal. Обозначения и другие объяснения те же, что к рис. 2.

Полученные результаты позволяют заключить: дВКМ, депонированный молодыми MSCWJ-1, способен не только модулировать фенотип старения эМСК, но и влиять на сигнальный путь, регулирующий процесс клеточного старения. Как показывает анализ данных из литературы и наших собственных, дВКМ клеточных культур обладает уникальной способностью защищать культивируемые на нем МСК от преждевременного старения в ответ на окислительный стресс. В перспективе это может обеспечить новую стратегию использования депонированного стволовыми клетками матрикса для преодоления проблемы клеточного старения и облегчения

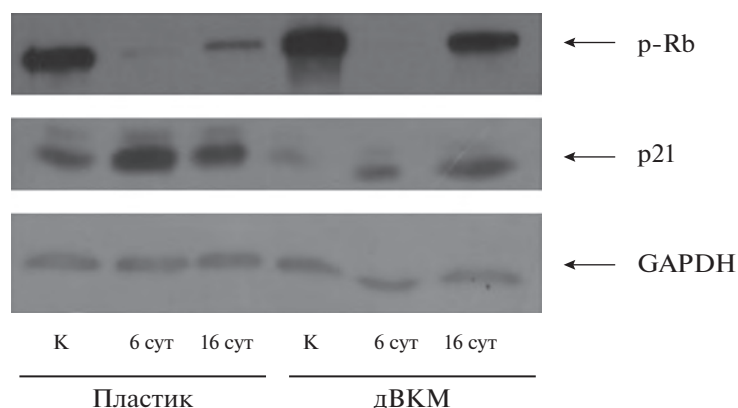


Рис. 4. Долгосрочное (6 и 16 сут) культивирование эМСК, обработанных H_2O_2 , на дВКМ изменяет функциональный статус белка Rb. Вестерн-блот-анализ с использованием специфических антител. К – контрольные интактные клетки. Указаны фосфорилированная форма Rb (p-Rb), а также белки p21 и GAPDH (использован в качестве контроля нагрузки).

клинического применения МСК в регенеративной медицине.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе мы продемонстрировали, что долгосрочное культивирование эМСК, в которых запущена программа старения, на дВКМ от молодых MSCWJ-1 приводит к понижению генерации АФК и интенсивности автофлуоресценции, уменьшению размера клеток и активности SA- β -Gal, а также изменению функционального статуса Rb по сравнению с теми же маркерами клеточного старения на пластике. В совокупности, эти результаты дают основание полагать, что данный ВКМ способен частично обращать (тормозить) преждевременное старение эМСК в ответ на окислительный стресс, а также расширяют представление о ВКМ как регуляторе функциональной активности клеток.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Внутреннего гранта Института цитологии РАН 2023 г.

БЛАГОДАРНОСТИ

Клетки линии MSCWJ-1 были получены из ЦКП “Коллекция культур клеток позвоночных”, поддержанного грантом Минобрнауки Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-683).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В экспериментах животные и люди не участвовали.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Кольцова А.М., Крылова Т.А., Мусорина А.С., Зенин В.В., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. 2017. Динамика свойств двух линий мезенхимных стволовых клеток, полученных из Вартонова студня пупочного канатика человека, при длительном культивировании. Цитология. Т. 59. С. 574. (Koltsova A.M., Krylova T.A., Musorina A.S., Zenin V.V., Turilova V.I., Yakovleva T.K., Poljanskaya G.G. 2018. The dynamics of cell properties during long-term cultivation of two lines of mesenchymal stem cells derived from Wharton’s jelly of human umbilical cord. Cell Tiss. Biol. V. 12. P. 7.) <https://doi.org/10.1134/S1990519X1801011X>
- Матвеева Д.К., Андреева Е.Р. 2020. Регуляторная активность децеллюляризованного матрикса мультипотентных мезенхимных стромальных клеток. Цитология. Т. 62. С. 699. (Matveeva D.K., Andreeva E.R. 2020. Regulatory activity of decellularized matrix of multipotent mesenchymal stromal cells. Tsitologia. V. 62. P. 699.) <https://doi.org/10.31857/S004137712010003X>
- 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. 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. P. 1.) <https://doi.org/10.1134/S1990519X12010129>
- 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>
- Bertolo A., Baur M., Guerrero J., Pötzel T., Stoyanov J. 2019. Autofluorescence is a reliable in vitro marker of cellular se-

- nescence in human mesenchymal stromal cells. *Sci. Rep.* V. 9. P. 2074.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-38546-2>
- Blagosklonny M.V.* 2011. Cell cycle arrest is not senescence. *Aging* (Albany NY). V. 3. P. 94.
<https://doi.org/10.18632/aging.100281>
- Borodkina A., Shatrova A., Abushik P., Nikolsky N., Burova E.* 2014. Interaction between ROS dependent DNA damage, mitochondria and p38 MAPK underlies senescence of human adult stem cells. *Aging*. V. 6. P. 481.
<https://doi.org/10.18632/aging.100673>
- Borodkina A.V., Shatrova A.N., Deryabin P.I., Griukova A.A., Abushik P.A., Antonov S.M., Nikolsky N.N., Burova E.B.* 2016. Calcium alterations signal either to senescence or to autophagy induction in stem cells upon oxidative stress. *Aging* (Albany NY). V. 8: 3400.
<https://doi.org/10.18632/aging.101130>
- Burova E., Borodkina A., Shatrova A., Nikolsky N.* 2013. Sublethal oxidative stress induces the premature senescence of human mesenchymal stem cells derived from endometrium. *Oxid. Med. Cell. Longev.* V. 2013: 474931.
<https://doi.org/10.1155/2013/474931>
- Campisi J., d'Adda di Fagagna F.* 2007. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* V. 8. P. 729.
<https://doi.org/10.1038/nrm2233>
- 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>
- Choi H.R., Cho K.A., Kang H.T., Lee J.B., Kaerberlein M., Suh Y., Chung I.K., Park S.C.* 2011. Restoration of senescent human diploid fibroblasts by modulation of the extracellular matrix. *Aging Cell.* V. 10. P. 148.
<https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2010.00654.x>
- Debaq-Chainiaux F., Erusalimsky J.D., Campisi J., Toussaint O.* 2009. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA- β -gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and *in vivo*. *Nat. Protoc.* V. 4. P. 1798.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2009.191>
- 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>
- Engeland K.* Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling. 2022. *Cell Death Differ.* V. 29. P. 946.
<https://doi.org/10.1038/s41418-022-00988-z>
- Griukova A., Deryabin P., Shatrova A., Burova E., Severino V., Farina A., Nikolsky N., Borodkina A.* 2019. Molecular basis of senescence transmitting in the population of human endometrial stromal cells. *Aging*. V. 11: 9912.
<https://doi.org/10.18632/aging.102441>
- Joergensen P., Rattan S.I.S.* 2014. Extracellular matrix modulates morphology, growth, oxidative stress response and functionality of human skin fibroblasts during aging *in vitro*. *J. Aging Sci.* V. 2. P. 122.
<https://doi.org/10.4172/2329-8847.1000122>
- Lai Y., Sun Y., Skinner C.M., Son E.L., Lu Z., Tuan R.S., Jilka R.L., Ling J., Chen X.D.* 2010. Reconstitution of marrow-derived extracellular matrix *ex vivo*: a robust culture system for expanding large-scale highly functional human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* V. 19. P. 1095.
<https://doi.org/10.1089/scd.2009.0217>
- Lee S.S., Vū T.T., Weiss A.S., Yeo G.C.* 2023. Stress-induced senescence in mesenchymal stem cells: Triggers, hallmarks, and current rejuvenation approaches. *Eur. J. Cell Biol.* V. 102. P. 151331.
<https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2023.151331>
- 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>
- Liu X., Zhou L., Chen X., Liu T., Pan G., Cui W., Li M., Luo Z.P., Pei M., Yang H., Gong Y., He F.* 2016. Culturing on decellularized extracellular matrix enhances antioxidant properties of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* V. 61. P. 437.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.12.090>
- Liu J., Ding Y., Liu Z., Liang X.* 2020. Senescence in mesenchymal stem cells: functional alterations, molecular mechanisms, and rejuvenation strategies. *Front. Cell Dev. Biol.* V. 8: 258.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00258>
- Novoseletskaia E., Grigorieva O., Nimiritsky P., Basalova N., Eremichev R., Milovskaya I., Kulebyakin K., Kulebyakina M., Rodionov S., Omelyanenko N., Efimenko A.* 2020. Mesenchymal stromal cell-produced components of extracellular matrix potentiate multipotent stem cell response to differentiation stimuli. *Front. Cell Dev. Biol.* V. 8: 555378.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2020.555378>
- Pei M., Zhang Y., Li J., Chen D.* 2013. Antioxidation of decellularized stem cell matrix promotes human synovium-derived stem cell-based chondrogenesis. *Stem Cells Dev.* V. 22. P. 889.
<https://doi.org/10.1089/scd.2012.0495>
- Ragelle H., Naba A., Larson B.L., Zhou F., Prijic M., Whitaker C.A., Del Rosario A., Langer R., Hynes R.O., Anderson D.G.* 2017. Comprehensive proteomic characterization of stem cell-derived extracellular matrices. *Biomaterials.* V. 128. P. 147.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.03.008>
- Rao Pattabhi S., Martinez J.S., Keller T.C.S.* 3rd. 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>
- Rattan S.I., Keeler K.D., Buchanan J.H., Holliday R.* 1982. Autofluorescence as an index of ageing in human fibroblasts in culture. *Biosci. Rep.* V. 2. P. 561.
<https://doi.org/10.1007/BF01314216>
- Sart S., Jeske R., Chen X., Ma T., Li Y.* 2020. Engineering stem cell-derived extracellular matrices: Decellularization, characterization, and biological function. *Tissue Eng. Part B.* V. 26. P. 402.
<https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2019.0349>
- Shatrova A.N., Burova E.B., Kharchenko M.V., Smirnova I.S., Lyublinskaya O.G., Nikolsky N.N., Borodkina A.V.* 2021. Outcomes of deferoxamine action on H₂O₂-induced growth inhibition and senescence progression of human endometrial Stem Cells. *Int. J. Mol. Sci.* V. 22: 6035.
<https://doi.org/10.3390/ijms22116035>

- Sun E., Li Y., Lu W., Chen Z., Ling Z., Ran J., Jilka O.L. 2011. Rescuing replication and osteogenesis of aged mesenchymal stem cells by exposure to a young extracellular matrix. *FASEB J.* V. 25. P. 1474. <https://doi.org/10.1096/fj.10-161497>
- Vassilieva I., Kosheverova V., Vitte M., Kamentseva R., Shatrova A., Tsupkina N., Skvortsova E., Borodkina A., Tolkunova E., Nikolsky N., Burova E. 2020. Paracrine senescence of human endometrial mesenchymal stem cells: a role for the insulin-like growth factor binding protein 3. *Aging.* V. 12: 1987. <https://doi.org/10.18632/aging.102737>
- Weng Z., Wang Y., Ouchi T., Liu H., Qiao X., Wu C., Zhao Z., Li L., Li B. 2022. Mesenchymal stem/stromal cell senescence: hallmarks, mechanisms, and combating strategies. *Stem Cells Transl. Med.* V. 11. P. 356. <https://doi.org/10.1093/stcltm/szac004>
- Xing H., Lee H., Luo L., Kyriakides T.R. 2020. Extracellular matrix-derived biomaterials in engineering cell function. *Biotechnol. Adv.* V. 42. P. 107421. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107421>
- 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/acsami.0c05012>
- Yu X., He Y., Chen Z., Qian Y., Wang J., Ji Z., Tan X., Li L., Lin M. 2019. Autologous decellularized extracellular matrix protects against H₂O₂-induced senescence and aging in adipose-derived stem cells and stimulates proliferation *in vitro*. *Biosci. Rep.* V. 39: BSR20182137. <https://doi.org/10.1042/BSR20182137>
- Zhou Y., Zimmer M., Yuan H., Naughton G.K., Fernan R., Li W.-J. 2016. Effects of human fibroblast-derived extracellular matrix on mesenchymal stem cells. *Stem Cell Rev. Rep.* V. 12. P. 560. <https://doi.org/10.1007/s12015-016-9671-7>
- Zhou L., Chen X., Liu T., Zhu C., Si M., Jargstorf J., Li M., Pan G., Gong Y., Luo Z.-P., Yang H., Pei M., He F. 2018. SIRT1-dependent anti-senescence effects of cell-deposited matrix on human umbilical cord mesenchymal stem cells. *J. Tiss. Eng. Regen. Med.* V. 12: e1008. <https://doi.org/10.1002/term.2422>
- Zhou X., Hong Y., Zhang H., Li X. 2020. Mesenchymal stem cell senescence and rejuvenation: current status and challenges. *Front. Cell Dev. Biol.* V. 8. P. 364. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00364>

Decellularized Extracellular Matrix Retards Premature Senescence of Human Endometrial Mesenchymal Stromal Cells

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

^a*Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064 Russia*

**e-mail: lenbur87@mail.ru*

The extracellular matrix (ECM), the main component of the extracellular space, mediates signaling between cells and controls the key cell functions—proliferation, differentiation, and migration. The relevance of studying ECM is due to a wide range of its biological properties that can be applied in regenerative medicine and bioengineering. Cell-derived decellularized ECM (dECM) is used to study ECM as a regulator of the cell functional activity, as well as to mimic their tissue-specific microenvironment. Here, we hypothesized that dECM deposited by Wharton's jelly-derived MSCs modulates the senescence phenotype of endometrial MSCs (eMSCs) acquired in response to oxidative stress. This aspect of ECM functioning in the context of eMSCs has so far remained unexplored. A comparative study of prolonged H₂O₂-induced senescence of eMSCs exposed to both dECM and cultured plastic showed that dECM may effectively downregulate the main senescence markers. Our findings suggest that ECM is able to partially reverse (retard) the eMSCs premature senescence.

Keywords: extracellular matrix, decellularization, human endometrial mesenchymal stromal cells, senescence phenotype, oxidative stress, premature senescence