



Создание клеточных моделей для оценки специфической активности биологических препаратов для лечения фибротических заболеваний

У. Д. Дьячкова✉, Н. А. Басалова, М. А. Виговский, А. Ю. Ефименко, О. А. Григорьева

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова» (МГУ имени М. В. Ломоносова). 119991, Россия, г. Москва, Ленинские горы, д. 1

✉ Контактное лицо: Дьячкова Ульяна Д. E-mail: dyachkovauliana@gmail.com

ORCID: У. Д. Дьячкова – <https://orcid.org/0000-0002-6119-8976>;
Н. А. Басалова – <https://orcid.org/0000-0002-2597-8879>;
М. А. Виговский – <https://orcid.org/0000-0003-2103-8158>;
А. Ю. Ефименко – <https://orcid.org/0000-0002-0696-1369>;
О. А. Григорьева – <https://orcid.org/0000-0003-2954-2420>.

Статья поступила: 13.05.2025

Статья принята в печать: 21.07.2025

Статья опубликована: 25.07.2025

Резюме

Введение. Везикулярная фракция секрета мезенхимных стволовых/стромальных клеток человека (ВВ МСК) может быть использована как фармацевтическая субстанция для разработки биологического лекарственного препарата для лечения фибротических заболеваний. Для контроля качества такого препарата наряду со стандартными методами требуются релевантные методы оценки специфической активности, основанные на изучении клеточных мишеней и механизмов действия разрабатываемых препаратов.

Цель. Разработка клеточных моделей для оценки специфической активности создаваемого препарата на основе ВВ МСК человека для лечения фибротических заболеваний.

Материалы и методы. Были разработаны две *in-vitro*-модели: первая – модель индуцированной дифференцировки клеточных линий первичных фибробластов кожи человека, вторая – модель поляризации макрофагов в клеточной культуре, полученной из моноцитов периферической крови человека.

Результаты и обсуждение. Обработка трансформирующим фактором роста (TGFβ-1) фибробластов приводила к увеличению уровня основного маркера миофибробластов альфа-гладкомышечного актина (αSMA) спустя 96 часов, а одновременное действие TGFβ-1 и ВВ МСК достоверно снижало уровень αSMA по сравнению с TGFβ-1-стимулированными фибробластами. Поляризация макрофагов в М1-направлении при действии комбинации LPS и IFNγ приводила к увеличению экспрессии генов IL-12p35, TNFα, IL-6 как через 4 часа, так и через 24 часа. Поляризация макрофагов в М2-направлении при действии IL-4 приводила к увеличению экспрессии гена CD200R1 как через 4 часа, так и через 24 часа. Действие ВВ МСК на провоспалительный подтип макрофагов М1, стимулированных LPS и IFNγ, приводило к снижению уровня экспрессии провоспалительных цитокинов IL-6, IL-12p35, TNFα через 24 часа после добавления ВВ.

Заключение. Для оценки специфической активности разрабатываемых препаратов на основе ВВ МСК человека предложены две релевантные клеточные модели. Количественным параметром для оценки специфической активности лекарственного препарата на основе ВВ МСК является снижение уровня αSMA в TGFβ-1-стимулированных фибробластах не менее чем в два с половиной раза по сравнению с положительным контролем. При этом снижение уровня экспрессии генов IL-12p35, IL-6, TNFα в поляризованных М1-макрофагах – не менее чем в два раза по сравнению с М1-макрофагами без воздействия ВВ МСК.

Ключевые слова: биологический препарат, внеклеточные везикулы, мезенхимные стволовые/стромальные клетки (МСК), специфическая активность

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. У. Д. Дьячкова, А. Ю. Ефименко и О. А. Григорьева участвовали в создании концепции работы, составлении дизайна экспериментов. У. Д. Дьячкова, М. А. Виговский и Н. А. Басалова принимали участие в сборе данных и их анализе. Все авторы внесли вклад в обсуждение результатов. У. Д. Дьячкова и О. А. Григорьева участвовали в написании работы, все авторы внесли вклад в рецензирование и редактирование работы.

Финансирование. Исследование было выполнено в рамках государственного задания МГУ имени М. В. Ломоносова (определение количественных параметров для оценки специфической активности антифибротических препаратов) и поддержано грантом РФФ 23-15-00198 <https://rscf.ru/project/23-15-00198/> (клеточные модели взаимодействия макрофагов и стромальных клеток).

Для цитирования: Дьячкова У. Д., Басалова Н. А., Виговский М. А., Ефименко А. Ю., Григорьева О. А. Создание клеточных моделей для оценки специфической активности биологических препаратов для лечения фибротических заболеваний. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2025;14(3):168–176. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-3-2095>

In vitro models for biological activity evaluation of a new antifibrotic drug based on the vesicular fraction of the human mesenchymal stromal cells secretome

Uliana D. Dyachkova✉, Nataliya A. Basalova, Maksim A. Vigovskiy, Anastasia Yu. Efimenko, Olga A. Grigorieva

Lomonosov Moscow State University. 1, Leninskiye Gory, Moscow, 119991, Russia

✉ **Corresponding author:** Uliana D. Dyachkova. **E-mail:** dyachkovauliana@gmail.com

ORCID: Uliana D. Dyachkova – <https://orcid.org/0000-0002-6119-8976>;
Nataliya A. Basalova – <https://orcid.org/0000-0002-2597-8879>;
Maksim A. Vigovskiy – <https://orcid.org/0000-0003-2103-8158>;
Anastasia Yu. Efimenko – <https://orcid.org/0000-0002-0696-1369>;
Olga A. Grigorieva – <https://orcid.org/0000-0003-2954-2420>.

Received: 13.05.2025

Accepted: 21.07.2025

Published: 25.07.2025

Abstract

Introduction. The vesicular fraction of human mesenchymal stem/stromal cells (EV MSCs) secretome can be considered as a pharmaceutical substance for the biological drug development to treat fibrotic diseases. Biological drugs quality control requires standard tests using simple validable methods. Additionally, it is necessary to assess specific activity using relevant models based on specific cellular targets and mechanisms of action.

Aim. Development of cell models for specific activity assessment of the biological drug from human EV MSCs for the fibrotic diseases treatment.

Materials and methods. We proposed two *in vitro* models to evaluate specific activity: the first one is primary human dermal fibroblast (HDF) cell lines induced differentiation model and the second one is polarization of macrophages derived from human peripheral blood monocytes.

Results and discussion. Transforming growth factor (TGFβ-1) treatment of HDF increased the level of the main myofibroblasts marker – alpha-smooth muscle actin (αSMA) within 96 hours. The simultaneous action of TGFβ-1 and EV-MSCs significantly decreased αSMA level compared to TGFβ-1-stimulated fibroblasts. Macrophages polarization towards M1-type with LPS/IFNγ combination resulted in increased IL-6, IL-12p35, TNFα genes expression after both 4 and 24 hours. The EV-MSCs addition to M1-type decreased the gene expression of proinflammatory cytokines IL-6, IL-12p35, TNFα in 24 hours.

Conclusion. We developed two *in vitro* models to assess specific activity of antifibrotic drug based on human EV-MSCs. In the first model value of specific activity is at least 2.5-fold decrease of αSMA level in TGFβ-1-stimulated HDF, comparing to non-treated control. In the second model the value is at least two-fold decrease in the level of IL-12p35, IL-6, TNFα expression in M1 macrophages, compared to non-treated M1 macrophages.

Keywords: biological drug, extracellular vesicles, mesenchymal stem/stromal cells (MSCs), specific activity

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Uliana D. Dyachkova, Anastasia Yu. Efimenko and Olga A. Grigorieva participated in developing the hypothesis and designing the experiments. Uliana D. Dyachkova, Maksim A. Vigovskiy and Nataliya A. Basalova participated in collecting and analyzing the data. All authors contributed to the results discussion. Uliana D. Dyachkova and Olga A. Grigorieva participated in writing the paper, all authors contributed to reviewing and editing.

Funding. The study was supported by State Assignment of Lomonosov MSU (quantitative parameters determination for assessing the antifibrotic drugs specific activity) and the RSF grant 23-15-00198, <https://rscf.ru/project/23-15-00198/> (macrophages and stromal cells interactions cell models).

For citation: Dyachkova U. D., Basalova N. A., Vigovskiy M. A., Efimenko A. Yu., Grigorieva O. A. In vitro models for biological activity evaluation of a new antifibrotic drug based on the vesicular fraction of the human mesenchymal stromal cells secretome. *Drug development & registration*. 2025;14(3):168–176. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-3-2095>

ВВЕДЕНИЕ

Стволовые клетки являются многообещающим инструментом нового направления медицины – регенеративной медицины [1–3]. Мезенхимные стволовые/стромальные клетки (МСК) в организме млекопитающих играют ключевую роль в поддержании гомеостаза тканей и их регенерации. Согласно действующей научной парадигме, свой эффект МСК реализуют через секрецию паракринных факторов в составе многокомпонентного секрета, в котором можно выделить везикулярную фракцию (ВВ МСК), состоящую из мембранных частиц разных размеров: экзосом и микровезикул [4, 5]. Ранее в наших работах было показано, что ВВ МСК способны подавлять развитие блеомицин-индуцированного фиброза легких у мышей, преимущественно за счет переноса микроРНК miR-29c и miR-129 [6, 7]. Таким образом, ВВ МСК можно рассматривать как потенциальный препарат для лечения фибротических заболеваний, в том числе фиброза легких. Согласно классификации решения Совета Евразийской экономической комиссии (ЕАК) № 89, препарат на основе ВВ МСК относится к биологическим препаратам, как выделенный из биологического источника¹. Такие препараты отличаются от лекарственных препаратов на основе малых молекул в том числе тем, что их состав не может быть стандартизирован. Контроль качества таких препаратов необходимо проводить не только по стандартным показателям, но также обязательно оценивать специфическую активность, которая является количественной мерой биологической активности препарата.

Универсальных методов определения специфической активности для любого биологического препарата не существует. Поэтому необходимо создание релевантных моделей для каждого конкретного биологического препарата, основанных на понимании клеточных мишеней и механизмов действия. Для разработки моделей оценки специфической активности препарата на основе ВВ МСК нами выбраны модели влияния на дифференцировку основного клеточного эффектора фиброза – миофибробластов и поляризацию макрофагов, играющих ключевую роль в регуляции иммунных процессов при фиброзе.

Целью данной работы явилась разработка клеточных моделей для оценки специфической активности создаваемого препарата на основе ВВ МСК человека для лечения фибротических заболеваний.

¹ Решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза». Доступно по: <https://www.alt.ru/tamdoc/16sr0089/> Ссылка активна на 15.07.2025.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные линии, использованные в работе

В работе использовались клеточные линии и культуры, полученные от добровольцев, согласно разрешению институционального локального этического комитета (этический комитет МНОИ МГУ имени М. В. Ломоносова, IRB00010587) (протокол № 4, дата заседания 04.06.2018), с получением добровольного информированного согласия у всех доноров.

Мультипотентные мезенхимные стволовые/стромальные клетки

МСК жировой ткани человека, иммортализованные с помощью человеческой теломеразы (ASC52telo, ATCC®), культивировали в полной питательной среде роста DMEM/F-12 (Capricorn Scientific, Германия) с добавлением 7%-й фетальной бычьей сыворотки (ФБС) (HyClone, США) и 100 ед/мл пенициллина/стрептомицина (Gibco, США) при 37 °C и 5%-м CO₂ в газовой фазе.

Фибробласты кожи

Первичные линии фибробластов кожи человека получали из банка клеточных линий Центра регенеративной медицины МНОИ МГУ имени М. В. Ломоносова (номер коллекции MSU_FB²). Клетки культивировали в среде DMEM с низким содержанием глюкозы (Gibco) с добавлением 1%-го пенициллина-стрептомицина (HyClone) и 10%-й ФБС (HyClone) при 37 °C и 5%-м CO₂ в газовой фазе.

Макрофаги

Макрофаги получали из моноцитов, выделенных из периферической крови здоровых доноров обоих полов. Для выделения цельную кровь смешивали в равных объемах с фосфатно-солевым буфером (ФСБ, НПП «ПанЭко», Россия), центрифугировали на градиенте раствора фиколла с плотностью 1,022 г/мл (НПП «ПанЭко», Россия) при 300g в течение 30 минут при +4 °C. Отбирали кольцо мононуклеаров, промывали раствором ФСБ и высаживали на культуральный планшет с адгезивным покрытием CellBind (Corning, США). Через час неприкрепившиеся лимфоциты отмывали с поверхности, к адгезировавшей фракции добавляли полную среду роста RPMI-1640 (GIBCO) с добавлением 1%-го пенициллина и стрептомицина (HyClone), 1%-й GlutaMax, 1%-го пирувата, 1%-й HEPES (GIBCO) и 10%-й инактивированной ФБС (HyClone).

² Национальный банк-депозитарий живых систем. Доступно по: <https://human.depo.msu.ru>. Ссылка активна на 13.05.2025.

Получение и характеристика везикулярной фракции секрета МСК

МСК отмывали трижды раствором Хенкса (НПП «ПанЭко», Россия) и добавляли среду без сыворотки DMEM на двое суток, после чего кондиционированную среду (КС) собирали, центрифугировали при 300g в течение 10 минут для осаждения клеточного дебриса, супернатант подвергали ультрафильтрации с использованием фильтра (300 кДа, Sartorius, Германия) центрифугированием при 1200g. Полученную везикулярную фракцию секрета хранили при –80 °C.

Для подтверждения подлинности ВВ МСК – наличия поверхностных маркеров – был проведен белковый электрофорез и иммуноблотинг с последующим полуколичественным определением Alix (abcam, ab88388), HSP70 (SBI, EXOAB-Hsp70A-1), CD63 (Millepore, CBL553), H2AX (R&D, AF2288).

Количественное определение ВВ МСК было выполнено методом анализа траектории наночастиц (nanoparticle tracking analysis, NTA) с помощью прибора ZetaView (Particle Metrix GmbH, Германия). Измерение проводилось в режиме «бокового светорассеяния» при 25 °C. Для измерения использовали лазер с длиной волны 488 нм, объектив 10x и высокочувствительную камеру с матрицей КМОП-типа. В качестве контроля случайных частиц использовался образец бессывороточной среды после 30 минут инкубации с МСК.

Клеточные модели

TGFβ-1-индуцированная дифференцировка фибробластов

Фибробласты кожи человека высаживали в концентрации 20 000 кл/мл в полной среде роста. Через сутки клетки депривировали от сыворотки 24 часа, затем добавляли 5x ВВ одновременно с 5 нг/мл TGFβ-1 к бессывороточной среде роста и культивировали в течение 4 суток. В качестве контроля использовали клетки, культивированные в бессывороточной среде с/без добавления TGFβ-1 (положительный и отрицательный контроли соответственно).

Дифференцировка и поляризация макрофагов

После прикрепления моноцитов добавляли GM-CSF или M-CSF (SCI-STORE, Россия) в концентрации 50 нг/мл. На 4 сутки проводили смену среды с добавлением тех же факторов. На 6 сутки клеткам меняли среду на полную с добавлением цитокинов для поляризации на 4 или 24 часа. К клеткам с GM-CSF добавляли комбинацию 100 нг/мл LPS и 20 нг/мл IFNγ (Sigma, США) для индукции поляризации M1-типа. К клеткам с M-CSF добавляли 20 нг/мл IL-4 (Sci-Store, Россия) для поляризации M2-типа [8]. Затем на 24 часа добавляли 5x ВВ МСК.

Анализ дифференцировки фибробластов

Иммуноцитохимический анализ

Клетки отмывали с помощью ФСБ от среды роста, фиксировали 4%-м раствором формальдегида (Pan-Reas, Испания) в течение 10 минут. Для выявления внутриклеточных маркеров проводили пермеабиллизацию клеточных мембран с использованием 0,2%-го раствора Triton X-100 (Sigma) в ФСБ. Для блокирования неспецифических сайтов связывания инкубировали препарат с 10%-м раствором нормальной сыворотки (Sigma) животного – донора вторых антител на ФСБ с добавлением 1%-го бычьего сывороточного альбумина (БСА, НПП «ПанЭко») в течение часа при комнатной температуре. Далее инкубировали образец с раствором первичных антител к αSMA (ab5694, 1:300, abcam) или неиммунными IgG (BioLend, США) в качестве контроля при +4 °C в течение ночи. Первичные антитела выявляли с помощью вторичных антител, конъюгированных с Alexa 488 (Invitrogen, США). Ядра дополнительно метили DAPI (Sigma) в разведении 1:10000. Препараты анализировали с помощью инвертированного микроскопа с флуоресцентным модулем и камерой (Leica DMI8, камера Leica DFC 7000 T, Leica, Германия).

Белковый электрофорез и иммуноблотинг

Фибробласты кожи человека лизировали на льду в 2x буфере Лемли для образцов. Белки лизата клеток разделяли с помощью денатурирующего фореза в присутствии 20%-го SDS (Sigma). Для определения молекулярных масс белков использовали стандартную коммерческую смесь предварительно окрашенных белков с известной молекулярной массой Page-Ruler™ Plus (Invitrogen). Иммуноблоттинг проводили с использованием немеченых моноклональных антител, специфически связывающихся с GAPDH (Cell Signaling Technology, США, 1:1000, 2118), (αSMA) (Abcam, 1:500, ab7817), белком активированных фибробластов (FAPa) (CellSignalling, 1:1000, 66562) на протяжении ночи при +4 °C и последующей инкубацией со вторыми антителами 1:3000 (антитела козы к IgG кролика или кроличьи антитела к IgG мыши), конъюгированными с пероксидазой хрена (Sigma), в течение 60 минут при комнатной температуре.

Визуализацию белков, связавшихся с антителами, осуществляли с помощью хемилюминесцентного субстрата (ECL Pico or Dura, Pierce, США). Для экспонирования мембран использовали экран ChemiDoc УФ (Bio-Rad, США). Детекцию хемилюминесценции проводили при помощи ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad, США), денситометрический анализ полученных изображений проводили с использованием программы ImageLab.

Анализ поляризации макрофагов

Полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ) с обратной транскрипцией

Для ПЦР-РВ макрофаги лизировали в RLT-буфере (QIAGEN GmbH, Германия). Выделение тотальной РНК из лизатов клеток проводили с использованием набора RNeasy Mini Kit (QIAGEN GmbH, Германия) согласно прилагающейся методике производителя. Концентрацию и чистоту выделенной тотальной РНК определяли с использованием спектрофотометра NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, США) при помощи оригинального программного обеспечения ND-1000 V 3.7.1 (Thermo Scientific, США). Образцы с показателями отношения поглощения на длинах волн 260 и 280 нм (A260/280) от 1,9 до 2,1 были использованы для дальнейшего анализа. Синтез кДНК проводили с использованием набора MMLV RT kit (ЗАО «Евроген», Россия) согласно руководству пользователя. Амплификацию осуществляли с помощью прибора Nexus Mastercycler® gradient (Eppendorf AG, Германия). Количественную ПЦР в реальном времени проводили с помощью набора qPCRmix-HS SYBR + LowROX (ЗАО «Евроген», Россия) в соответствии с протоколами производителя на приборе QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США). Используемые олигонуклеотидные последовательности праймеров указаны в таблице 1.

Статистическая обработка

Экспериментальные данные представлены в виде среднего значения ±10–90 перцентили. Статистическую обработку данных проводили с использованием программы GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, США). Для проверки достоверности различий значений (в численных данных) между опытными и контрольными группами применяли непараметрический критерий Манна – Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$ (обозначения в тексте: * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика ВВ МСК

Согласно рекомендациям MISEV2023 для контроля качества ВВ МСК и подтверждения подлинности ВВ методом иммуноблоттинга нами было показано, что везикулярная фракция содержит специфические маркеры ВВ HSP70, Alix, CD9, CD81 и CD63. При этом в них отсутствует гистоновый белок H2AX, находящийся в ядрах клеток, но не в ВВ [9]. Данные представлены на рисунке 1.

При оценке размера и количества частиц методом NTA (Nanoparticle tracking analysis – анализ траектории наночастиц) было показано, что диаметр частиц варьирует от 10 до 550 нм, при этом большинство частиц имеет размер в среднем от 130 до 170 нм, что соответствует размеру микровезикул, к которым относятся ВВ МСК. При этом количество частиц в 1х растворе ВВ МСК составляло $3-5 \cdot 10^8$ частиц/мл. Данные представлены на рисунке 1.

Оценка специфической активности

Основным типом клеток-эффекторов при развитии фиброза являются миофибробласты, которые синтезируют большое количество компонентов внеклеточного матрикса и контрактируют его благодаря наличию αSMA-содержащих стресс-фибрилл в клетках [10]. Основным источником накопления миофибробластов считается их дифференцировка из резидентных фибробластов ткани, у которых при активации на мембране появляется белок FAPα (fibroblast activation protein alpha).

Важную роль в развитии фиброза играет хроническое воспаление [11]. Основными эффекторами воспаления являются макрофаги, которые в организме представлены широким спектром фенотипов: выделяют М1-провоспалительный и М2-противовоспалительный фенотипы [12].

Таблица 1. Олигонуклеотидные последовательности праймеров для генов человека

Table 1. Human gene primer sequences

Ген Gene	Прямая последовательность Forward sequence	Обратная последовательность Reverse sequence
36b4	5-GCTGCTGCCCCGTGCTGGTG-3	5-TGGTGCCCTGGAGATTTTAGTG-3
IL-12p35	5-GATGGCCCTGTGCCTTAGTA-3	5-TCAAGGGAGGATTTTGTGG-3
CD200R1	5-GGAGGATGAAATGCAGCCCTA-3	5-CTCAGATGCCTTCACCTTGTTT-3
TNFα	5-GAGGCCAAGCCCTGGTATG-3	5-CGGGCCGATTGATCTCAGC-3
IL-6	5-ACTCACCTCTTCAGAACGAATTG-3	5-CCATCTTTGGAAGGTTAGGTTG-3

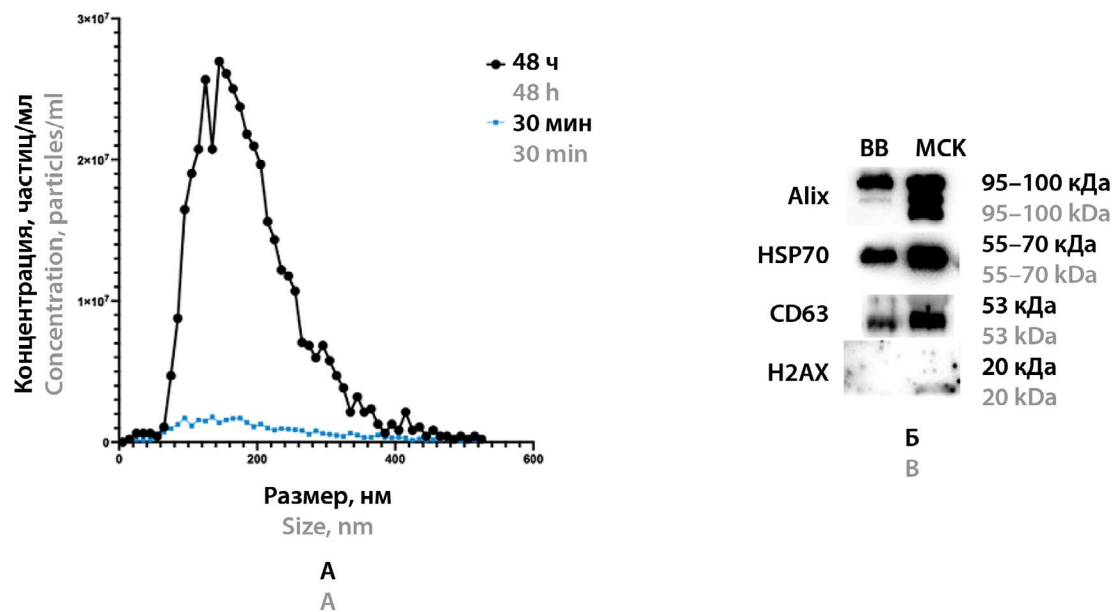


Рисунок 1. Характеристика ВВ МСК.

А – распределение частиц по размеру: в образце среды, кондиционированной МСК, после 48 часов кондиционирования (черный) и в контрольной КС после 30 минут кондиционирования (синий) для образцов, измеренных с помощью метода анализа траекторий наночастиц (NTA); **Б** – репрезентативные данные иммуноблоттинга

Figure 1. EV-MSCs characterization.

A – particle size distribution in the MSC-conditioned medium (CM) after 48 h conditioning (black) and in the control CM after 30 min conditioning (blue) measured using nanoparticle trajectory analysis (NTA); **B** – representative data of immunoblotting

Модель TGFβ-индуцированной дифференцировки фибробластов в миофибробласты

Фибробласты кожи человека обрабатывали трансформирующим фактором роста бета (TGFβ-1) (K+), затем оценивали количество αSMA и FAPα. Через 96 часов уровень αSMA увеличивался в среднем в 4,3 раза (±0,84) по сравнению с необработанными клетками (K-) и происходило его встраивание в стресс-фибриллы, что показано на рисунке 2. Значимого изменения уровня FAPα при действии TGFβ-1 как через 24 часа, так и через 96 часов не происходило, поэтому для определения специфической активности было выбрано определение уровня αSMA через 96 часов.

При одновременном действии TGFβ-1 и ВВ МСК количество αSMA в среднем в 19 (±5) раз меньше, чем при действии TGFβ-1, а также снижается количество стресс-фибрилл до уровня, сопоставимого с отрицательным контролем. Количественным параметром для оценки специфической активности лекарственного препарата на основе ВВ МСК является снижение уровня αSMA в клетках не менее чем в 2,5 раза по сравнению с положительным контролем.

Поляризация макрофагов, полученных из моноцитов периферической крови человека

Методом ПЦР-РВ нами был проанализирован уровень экспрессии генов, меняющихся при поляризации макрофагов (рисунок 3, А). При стимуляции провоспалительной M1-поляризации увеличивалась экспрессия генов IL-12p35 (через 4 часа в $17,9 \pm 4,5$ раза, через 24 часа в $3,5 \pm 1,9$ раза), TNFα (через 4 часа в $54,6 \pm 10,4$ раза, через 24 часа в $4,2 \pm 1,2$ раза), IL-6 (через 4 часа в $233,1 \pm 53,7$ раза, через 24 часа в $25,1 \pm 16,6$ раза). При стимуляции в направлении M2a-поляризации уменьшалась экспрессия гена CD200R1 – маркера профибротических макрофагов (через 4 часа в $12,1 \pm 4,0$ раза, через 24 часа в $6,3 \pm 1,6$ раза).

При действии ВВ МСК на поляризованные M1-макрофаги снижалась экспрессия генов провоспалительных факторов IL-6 в $8 \pm 2,1$ раза, IL-12p35 в $3,4 \pm 1,2$ раза, TNFα в $4,7 \pm 1,7$ раза, в M2a-макрофагах повышалась экспрессия противовоспалительного фактора IL-10 в $1,75 (\pm 0,3)$ раза, а в M2c-макрофагах практически не изменяется экспрессия генов M2-макрофагов, что показано на рисунке 3, Б. Количественным

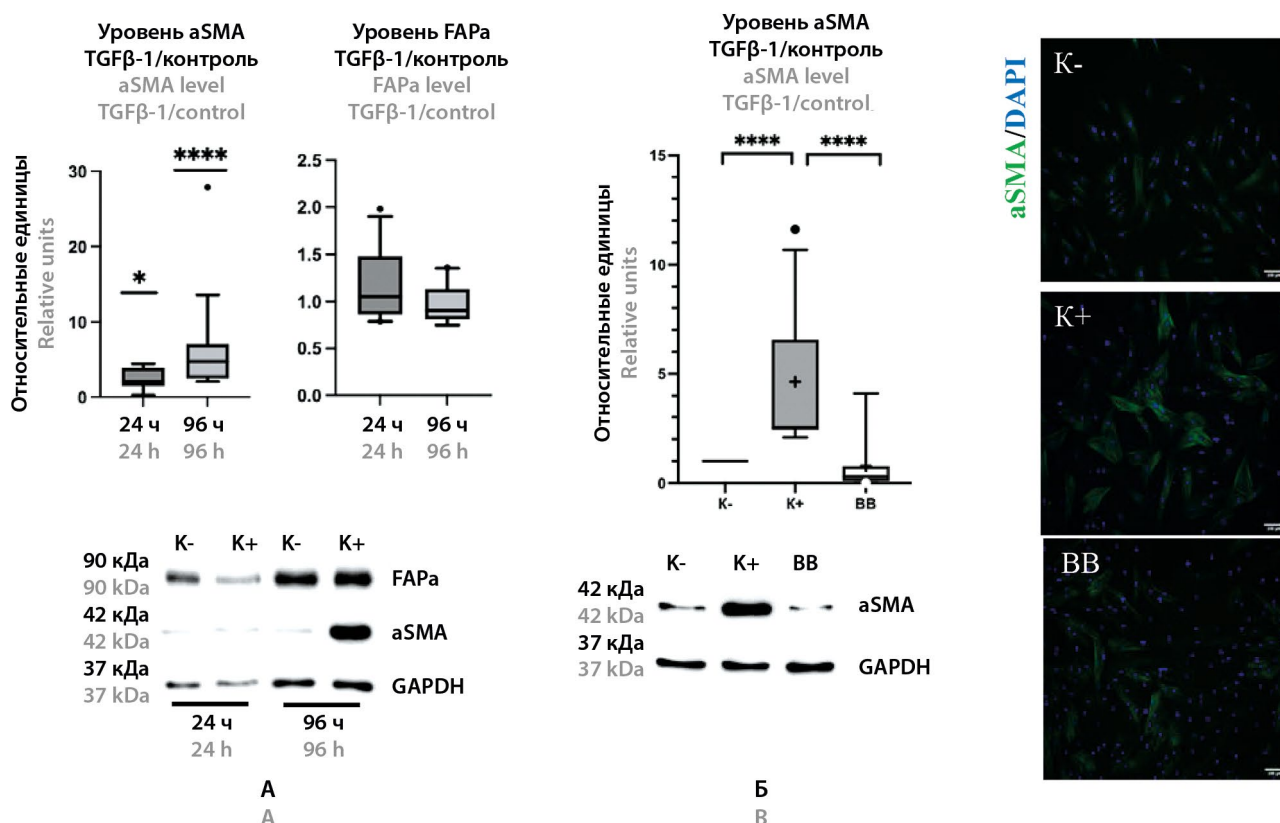


Рисунок 2. TGFβ-индуцированная дифференцировка фибробластов в миофибробласты.

А – уровень aSMA и FAPa по отношению к контролю в фибробластах кожи человека без воздействия (K-), под действием TGFβ-1 (K+) через 24 и 96 часов; Б – уровень aSMA по отношению к контролю в фибробластах кожи человека без воздействия (K-), под действием TGFβ-1 (K+), при одновременном действии TGFβ-1 и BB (BB), измеренный методом иммуноблоттинга. Репрезентативные микрофотографии aSMA (зеленый) фибробластов кожи человека без воздействия (K-), под действием TGFβ-1 (K+), при одновременном действии TGFβ-1 и BB (BB) через 96 часов. Ядра мечены DAPI (синий).

Данные представлены в виде 10–90 перцентилей, линия на уровне среднего значения, разбросы соответствуют диапазону 10–90 перцентилей ($n = 13$, * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$)

Figure 2. TGFβ-induced fibroblasts differentiation into myofibroblasts.

А – aSMA and FAPa levels relative to control in human skin fibroblasts without treatment (K-), with TGFβ-1 treatment (K+) after 24 and 96 hours; Б – aSMA level relative to control in untreated (K-), TGFβ-1-treated (K+), and TGFβ-1- and EVs-MSCs-treated human dermal fibroblasts (EVs) measured by immunoblotting. Representative pictures of aSMA (green) in untreated (K-), TGFβ-1-treated (K+), and TGFβ-1- and EVs-treated human dermal fibroblasts (EVs) after 96 h. Nuclei are labeled with DAPI (blue).

Data are presented as 10–90 percentiles, line at the mean value, scatter corresponds to 10–90 percentiles ($n = 13$, * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$)

параметром для оценки специфической активности лекарственного препарата на основе BB МСК является снижение уровня экспрессии генов IL-12p35, IL-4, TNFα в поляризованных макрофагах не менее чем в два раза по сравнению с M1-макрофагами без воздействия BB МСК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Были разработаны две клеточные модели для оценки специфической активности биологического препарата на основе BB МСК для лечения фиброти-

ческих заболеваний. В качестве показателя специфической активности в модели TGFβ-индуцированной дифференцировки фибробластов в миофибробласты количественным параметром является снижение уровня aSMA в фибробластах не менее чем в 2,5 раза по сравнению с положительным контролем. В модели поляризации макрофагов, полученных из моноцитов периферической крови человека, показателем специфической активности является снижение экспрессии генов IL-12p35, IL-6, TNFα в макрофагах не менее чем в два раза по сравнению с M1-макрофагами без воздействия BB МСК.

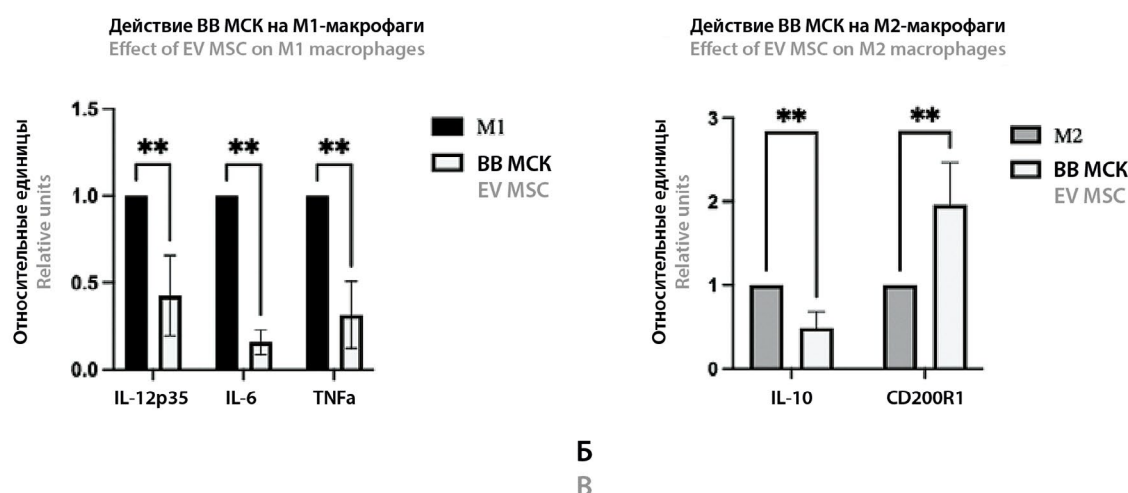
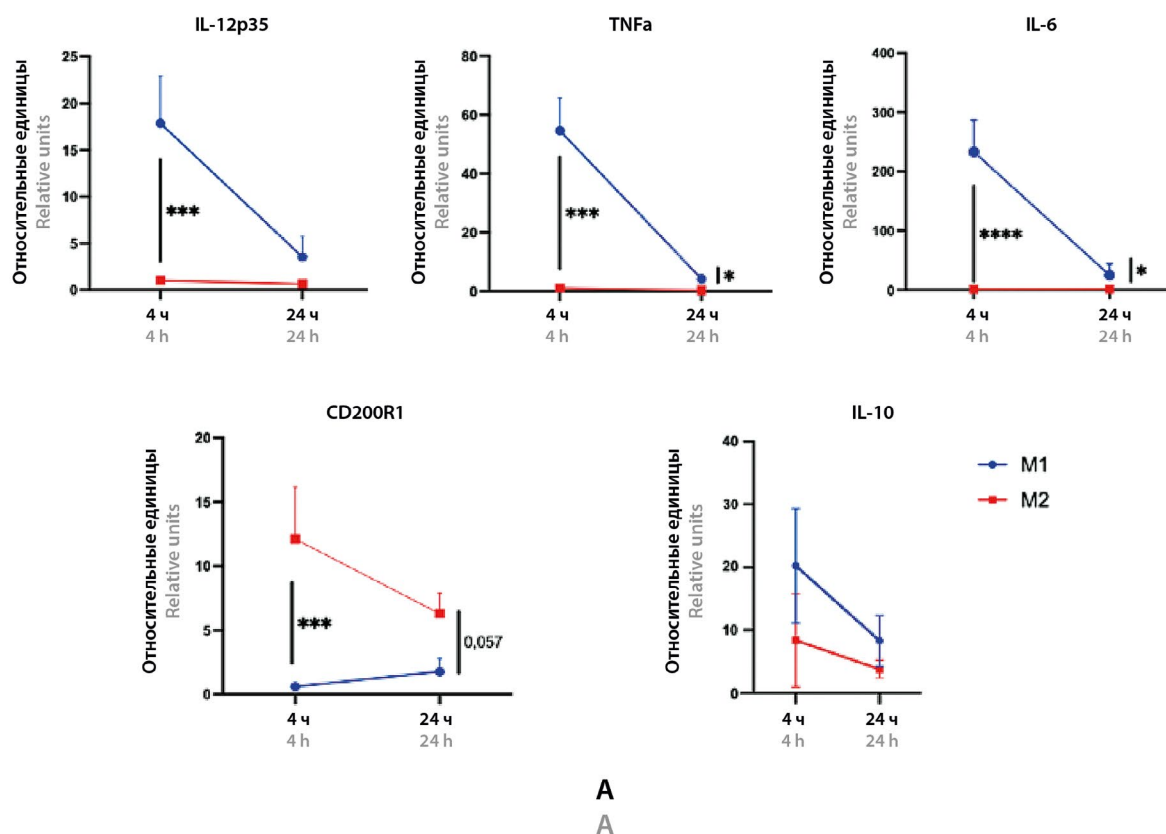


Рисунок 3. Поляризация макрофагов, полученных из моноцитов периферической крови человека.

А – изменение экспрессии генов-маркеров макрофагов в динамике: M1-маркеры (IL-12p35, TNFα, IL-6), M2-маркеры (CD200R1, IL-10). Данные представлены в виде среднего значения, разбросы соответствуют стандартной ошибке среднего ($n = 5$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$); **Б** – изменение экспрессии генов-маркеров макрофагов человека, измеренной методом ПЦР-РВ, после действия BB MCK на поляризованные макрофаги. Гены-маркеры M1-макрофагов (IL-12p35, IL-6, TNFα), M2-макрофагов (CD200R1, IL-10). Данные представлены в виде 10–90 перцентилей, линия на уровне медианы, разбросы соответствуют стандартной ошибке ($n = 3$, * $p < 0,05$)

Figure 3. Polarization of macrophages obtained from human peripheral blood monocytes.

A – dynamic changes in human macrophage marker genes' expression: M1-macrophage markers were IL-12p35, IL-6, TNFα. M2-macrophage markers were CD200R1, IL-10. Data are presented as mean values, the ranges correspond to the standard error of the mean ($n = 5$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$); **B** – changes in human macrophage marker genes' expression after the EV-MSCs action on polarized macrophages. M1 macrophages genes-markers (IL-12p35, IL-6, TNFα), M2 macrophages (CD200R1, IL-10). Data are presented as 10–90 percentile, line at the median level, scatter corresponds to the standard error ($n = 3$, * $p < 0.05$)

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Margiana R., Markov A., Zekiy A. O., Hamza M. U., Al-Dabbagh K. A., Al-Zubaidi S. H., Hameed N. M., Ahmad I., Sivaraman R., Kzar H. H., Al-Gazally M. E., Mustafa Y. F., Siahmansouri H. Clinical application of mesenchymal stem cell in regenerative medicine: a narrative review. *Stem Cell Research & Therapy*. 2022;13(1):366. DOI: 10.1186/s13287-022-03054-0.
2. Hade M. D., Suire C. N., Suo Z. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes: Applications in Regenerative Medicine. *Cells*. 2021;10(8):1959. DOI: 10.3390/cells10081959.
3. Tavakoli S., Ghaderi Jafarbeigloo H. R., Shariati A., Jahangiryan A., Jadidi F., Jadidi Kouhbanani M. A., Hassanzadeh A., Zamani M., Javidi K., Naimi A. Mesenchymal stromal cells; a new horizon in regenerative medicine. *Journal of Cellular Physiology*. 2020;235(12):9185–9210. DOI: 10.1002/jcp.29803.
4. Kapur S. K., Katz A. J. Review of the adipose derived stem cell secretome. *Biochimie*. 2013;95(12):2222–2228. DOI: 10.1016/j.biochi.2013.06.001.
5. Naji A., Eitoku M., Favier B., Deschaseaux F., Rouas-Freiss N., Suganuma N. Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2019;76(17):3323–3348. DOI: 10.1007/s00018-019-03125-1.
6. Basalova N., Arbatskiy M., Popov V., Grigorieva O., Vigovskiy M., Zaytsev I., Novoseletskaya E., Sagaradze G., Danilova N., Malkov P., Cherniaev A., Samsonova M., Karagyaour M., Tolstoluzhinskaya A., Dyachkova U., Akopyan Z., Tkachuk V., Kalinina N., Efimenko A., Mesenchymal stromal cells facilitate resolution of pulmonary fibrosis by miR-29c and miR-129 intercellular transfer. *Experimental & Molecular Medicine*. 2023;55:1399–1412. DOI: 10.1038/s12276-023-01017-w.
7. Basalova N., Sagaradze G., Arbatskiy M., Evtushenko E., Kulebyakin K., Grigorieva O., Akopyan Z., Kalinina N., Efimenko A. Secretome of Mesenchymal Stromal Cells Prevents Myofibroblasts Differentiation by Transferring Fibrosis-Associated microRNAs within Extracellular Vesicles. *Cells*. 2020;9(5):1272. DOI: 10.3390/cells9051272.
8. Purcu D. U., Korkmaz A., Gunalp S., Helvacı D. G., Erdal Y., Dogan Y., Suner A., Wingender G., Sag D. Effect of stimulation time on the expression of human macrophage polarization markers. *PLOS ONE*. 2022;17(3):e0265196. DOI: 10.1371/journal.pone.0265196.
9. Théry C., Witwer K., Aikawa E., et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2018;7(1):1535750. DOI: 10.1080/20013078.2018.1535750.
10. Hinz B., Phan S. H., Thannickal V. J., Galli A., Bochaton-Piallat M.-L., Gabbiani G. The Myofibroblast: One Function, Multiple Origins. *The American Journal of Pathology*. 2007;170(6):1807–1816. DOI: 10.2353/ajpath.2007.070112.
11. Wynn T. A., Vannella K. M. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis. *Immunity*. 2016;44(3):450–462. DOI: 10.1016/j.immuni.2016.02.015.
12. Murray P. J. Macrophage Polarization. *Annual Review of Physiology*. 2017;79:541–566. DOI: 10.1146/annurev-physiol-022516-034339.