

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ ОБЩЕЙ ГЕНЕТИКИ имени Н.И. Вавилова
Российской академии наук

*На правах
рукописи*

СУЗДАЛЬЦЕВА ЮЛИЯ ГЕННАДИЕВНА

**ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ
МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ
КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА
В УСЛОВИЯХ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ**

1.5.22 - клеточная биология

Диссертация
на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научный консультант:
доктор биологических наук,
профессор С.Л. Киселев

Москва 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ.....	2
ВВЕДЕНИЕ.....	6
Актуальность темы исследования	6
Степень разработанности темы исследования	8
Цели и задачи.....	11
Научная новизна темы исследования.....	13
Теоретическая и практическая значимость исследования	15
Методология и методы исследования	17
Положения, выносимые на защиту.....	18
Личный вклад автора	20
Степень достоверности и апробация результатов	20
Публикации по теме диссертации	21
Структура и объем работы	22
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	23
1.1. Динамика заживления поверхностных ран	23
1.1.1. Клеточные и паракринные компоненты в процессе заживления поверхностных ран.....	26
1.1.2. Нарушения заживления поверхностных ран: хроническое воспаление и фиброз	31
1.1.3. Физиологические функции ММСК в регуляции регенерации тканей.....	33
1.2. ММСК: происхождение, идентификация, свойства и функциональная активность	38
1.2.1. Место ММСК в иерархии стволовых клеток	38
1.2.2. Фенотип ММСК	46
1.2.3. Дифференцировка ММСК.....	49
1.2.4. Секреторный профиль ММСК.....	52
1.2.5. Миграция.....	56
1.2.6. Сравнительная характеристика ММСК, выделенных из различных источников	59
1.3. Взаимодействие ММСК с клетками иммунной системы	62
1.3.1. Иммуномодуляторные свойства ММСК <i>in vitro</i>	63
1.3.2. Взаимодействие ММСК с Т-лимфоцитами	64
1.3.3. Взаимодействие ММСК с антиген-представляющими клетками	66
1.3.4. Взаимодействие между ММСК и естественными киллерными клетками	71
1.3.5. Молекулярные механизмы взаимодействия ММСК с иммунными клетками.....	73
1.4. Регенеративный потенциал ММСК при воспалительных заболеваниях <i>in vivo</i>	82
1.4.1. Трансплантация ММСК <i>in vivo</i>	82

1.4.2. ММСК и аллогенное узнавание	83
1.4.3. Исследования регенеративного потенциала ММСК на животных моделях	85
1.4.4. Клинические исследования регенеративного потенциала ММСК.....	87
1.5. Модели для поиска ключевых молекул и терапевтических мишеней, участвующих в регенерации тканей на разных стадиях развития организма	91
1.5.1. Общая характеристика индуцированных плюрипотентных стволовых клеток	95
1.5.2. Дифференцировка ИПСК в мезодермальном направлении.....	98
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	104
2.1. Материалы	104
2.2. Клеточные линии.....	105
2.2.1. Выделение ММСК из жировой ткани и получение первичной культуры	105
2.2.2. Выделение ММСК из пуповины новорожденного и получение первичной культуры	105
2.2.3. Выделение ММСК из костного мозга и получение первичной культуры	106
2.2.4. Культивирование ММСК	106
2.2.5. Выделение и активация МПК	107
2.2.5. Сокультивирование ММСК и актМПК.....	107
2.2.6. Репрограммирование соматических клеток человека с помощью генетических конструкций на основе вируса Сендай	108
2.2.7. Культивирование ИПСК человека	109
2.3. Проточная цитофлуориметрия.....	109
2.4. Характеристика ММСК	110
2.4.1. Анализ иммуноцитотипа ММСК	110
2.4.2. Дифференцировка клеток к остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлении в индуктивных средах роста	112
2.4.3. Гистохимический анализ способности клеток к дифференцировке в мезодермальном направлении	113
2.4.4. Оценка жизнеспособности ММСК.....	114
2.5. Характеристика ИПСК человека	115
2.5.1. Формирование и культивирование эмбрионидных тел.....	115
2.5.2. Спонтанная дифференцировка ИПСК человека	116
2.5.3. Дифференцировка ИПСК в мезодермальном направлении.....	116
2.7. Анализ пролиферации актМПК в сокультуре с ММСК	118
2.8. Выделение и анализ РНК.....	119
2.8.1. Выделение РНК из клеток	119
2.8.2. Электрофорез в агарозном геле	122
2.9. Анализ уровня секреции цитокинов в сокультуре ММСК и МПК.....	123
2.10. Иммуноблоттинг	123
2.11. Контроль зараженности доноров биоматериала и полученных культур ММСК инфекционными агентами	125

2.12. Клиническое исследование безопасности и эффективности ММСК пуповины в терапии длительно незаживающих ран.....	125
2.12.1. Пациенты.....	125
2.12.2. Клиническое обследование	126
2.12.3. Бактериологическое исследование отделяемого язв и ран	127
2.12.4. Процедура введения препарата ММСК пуповины в форме суспензии пациентам.	128
2.12.5. Планиметрия.....	128
2.12.6. Лазерная доплеровская флоуметрия (ЛДФ)	129
2.12.7. Определение уровня транскутанного напряжения кислорода.....	129
2.13. Статистическая обработка результатов исследований	129
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	131
3.1. Сравнительный анализ ММСК, изолированных из различных тканей.....	131
3.1.1. Морфологическая характеристика первичных культур ММСК.....	131
3.1.2. Сравнительный анализ экспрессии цитоплазматических белков в ММСК	133
3.1.3. Сравнительный анализ экспрессии поверхностных белков в ММСК	139
3.1.4. Сравнительный анализ способности к дифференцировке ММСК в ткани мезодермального происхождения.....	149
3.2. Взаимодействие ММСК и иммунокомпетентных клеток <i>in vitro</i>	164
3.2.1. Клеточно-опосредованная цитотоксичность аллогенных МПК по отношению к ММСК	164
3.2.2. Изменение иммуноцитотипического профиля ММСК и МПК при сокультивировании <i>in vitro</i>	167
3.2.3. Способность к дифференцировке ММСК при сокультивировании с МПК <i>in vitro</i> ..	174
3.2.4. Исследование влияния стехиометрических условий сокультивирования с МПК на индукцию функциональной активности ММСК.....	175
3.2.5. ММСК угнетают пролиферацию актМПК при сокультивировании <i>in vitro</i>	177
3.2.6. Снижение уровня маркеров активации на поверхности CD4+ Т-лимфоцитов при сокультивировании с ММСК <i>in vitro</i>	182
3.2.7. Снижение количества активированных CD4+ Т-лимфоцитов при сокультивировании с ММСК не связано с апоптозом	185
3.2.8. ММСК модулируют секрецию цитокинов в сокультурах и актМПК.....	186
3.2.9. Участие растворимых факторов в механизмах подавления пролиферации актМПК при сокультивировании с ММСК.....	193
3.2.10. Активация приводит к возрастанию способности МПК образовывать плотные межклеточные контакты с ММСК.....	197
3.2.11. Анализ потенциальных молекул, участвующих в образовании межклеточных контактов между ММСК и актМПК при сокультивировании.....	200
3.2.12. Сокультивирование ММСК и актМПК усиливает синтез IFN- γ	204
3.2.13. Особенности индукции синтеза IDO в ММСК при сокультивировании с актМПК в присутствии межклеточных контактов.....	205
3.2.14. Блокирование экспонированной на поверхности ММСК молекулы ICAM-1 специфическими антителами не влияет на уровень экспрессии IDO в ММСК.....	206
3.3. Разработка стандартов изготовления препарата ММСК в форме суспензии	208

3.4. Клинические исследования безопасности и эффективности препарата ММСК пуповины в форме суспензии в терапии длительно незаживающих ран.....	210
3.4.1. Оценка безопасности клеточной терапии на здоровых добровольцах	212
3.4.2. ММСК модулируют процессы восстановления тканей в условиях хронического воспаления	213
3.5. Разработка клеточных моделей для изучения молекулярных механизмов регенерации тканей, соответствующих разным стадиям развития организма человека.....	224
3.5.1. Получение клеток с индуцированной плюрипотентностью	225
3.5.2. Дифференцировка клеток с индуцированной плюрипотентностью в клетки параксиальной мезодермы.....	229
3.5.3. Дифференцировка клеток с индуцированной плюрипотентностью в ММСК.....	231
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ.....	234
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	279
ВЫВОДЫ	282
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	285
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	289
ПРИЛОЖЕНИЕ А	335
БЛАГОДАРНОСТИ	336

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Острая воспалительная реакция является нормальным эволюционно-консервативным физиологическим ответом на повреждение ткани, характеризующимся активацией иммунокомпетентных и неиммунных клеток. Воспаление является частью высокоупорядоченного и скоординированного процесса регенерации поврежденных тканей. Однако недавние исследования показали, что определенные факторы, связанные с воздействием окружающей среды, образом жизни, возрастом, генетическими дефектами, могут способствовать развитию хронического воспаления, лежащего в основе заболеваний, которые в совокупности представляют собой ведущие причины инвалидности и смертности во всем мире. В последнее время получены также доказательства того, что воспалительные процессы играют существенную роль не только в проявлении многих болезненных состояний, но и определяют старение организма (Furman D. et al., 2019). Одним из следствий нарушения процессов регенерации, характеризующихся развитием хронического воспалительного процесса, является возникновение длительно незаживающих ран (хронические раны, трофические язвы), существующих продолжительное время без признаков активного заживления. Лечение хронических ран представляет крайне сложную клиническую проблему. В настоящее время для лечения хронических ран эффективных и специфических лекарственных средств не существует. Хронические раны даже при интенсивном лечении длительно не заживают, а после заживления часто рецидивируют. Упорное, длительное течение заболевания часто является причиной утраты трудоспособности. Несмотря на то, что предлагаются все новые методы терапии длительно незаживающих ран, число людей, страдающих такими заболеваниями, остается неизменным многие годы (Zhao R. et al., 2016).

Современные подходы к терапии заболеваний, связанных с нарушениями регенерации включают активацию эндогенных стволовых клеток, трансплантацию клеток (в том числе стволовых), тканевую инженерию. Полноценная регенерация поврежденной ткани невозможна без участия клеток стромального дифферона, поскольку восстановление паренхимы происходит на создаваемом ими молекулярном каркасе. Поэтому мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) в настоящее время рассматриваются как перспективное терапевтическое средство, поскольку могут быть прижизненно выделены из организма и успешно размножены *in vitro* (Pittenger MF et al., 2019, Rodríguez-Fuentes DE et al., 2020). В связи с этим значительные усилия прилагаются к изучению морфофункциональных свойств ММСК в норме и при патологии (Singer NG, Caplan A., 2011). Однако целый ряд вопросов, касающихся особенностей функциональной активности ММСК и их предшественников в условиях провоспалительного микроокружения в эмбриогенезе и во взрослом организме, практически не исследованы. На наш взгляд в настоящее время недостаточно широко изучена роль ММСК в подавлении избыточной активации клеток иммунной системы при остром и хроническом воспалении (Weiss A.R.R., Dahlke M.H., 2019). Несмотря на имеющиеся данные, не установлены конкретные молекулярные механизмы с участием растворимых факторов и межклеточных адгезионных контактов, посредством которых происходит взаимодействие ММСК с иммунными клетками, приводящие к затуханию воспалительной реакции (López-García L., Castro-Manrreza M.E., 2021). Различия этих процессов в раннем развитии и во взрослом организме лишь отрывочно представлены в литературе (Erickson J.R., Echeverri K., 2018, Gnyawali S.C. et al., 2020). Помимо этого подтверждений того, что данные о функциональных и фенотипических характеристиках ММСК, полученные *in vitro*, могут быть экстраполированы на свойства ММСК *in vivo*, все еще очень мало (Rubina K et al., 2009, Oh E.J. et al., 2015, Kramann R. et al., 2015, Schneider R.K. et al., 2017).

Комплексный подход к изучению молекулярных механизмов функциональной активности мезодермальных стромальных клеток различного генеза в условиях провоспалительного микроокружения позволит разработать новые принципы клеточной и лекарственной терапии при заболеваниях, характеризующихся нарушениями процесса заживления ран, что, несомненно, имеет важное значение как для фундаментальной, так и для практической медицины.

Степень разработанности темы исследования

Исследования биологических свойств ММСК, показали, что они представляют собой гетерогенную популяцию клеток. В экспериментах *in vitro* было показано, что культивируемые ММСК, выделенные из различных тканевых источников, обладают сходными свойствами (in 't Anker P.S. H.S. et al., 2003, Wang H.S. et al., 2004, Sakaguchi Y. et al., 2005). Учитывая опыт этих исследований, в 2006 г. на съезде Международного Общества Клеточной и Генной Терапии (International Society for Cell & Gene Therapy, ISCT) были предложены минимальные критерии для определения ММСК человека различного генеза, согласно которым, они должны обладать высокой адгезией к пластиковой поверхности, экспрессировать специфические поверхностные маркеры CD73, CD90, CD105 и проявлять способность к дифференцировке в адипогенном, хондрогенном и остеогенном направлениях (Dominici M. et al., 2006). Вместе с тем, установлено, что культивируемые ММСК обладают индивидуальными различиями в фенотипических и функциональных свойствах, зависящих от тканевого происхождения, а также обусловленных возрастом и состоянием здоровья доноров (Efimenko A et al 2011, Yang H.J. et al., 2014, Wu M et al., 2018). Однако в настоящее время все еще существует дефицит информации о том, какие варианты ММСК обладают наиболее эффективным регенеративным потенциалом для конкретных терапевтических целей.

Терапевтический потенциал ММСК, особенно в случае аллогенных трансплантаций, зависит от ответной реакции организма реципиента. Показано, что аллогенные ММСК после введения могут быть обнаружены в организме реципиента продолжительное время и избегают узнавания аллореактивными клетками (Deuse T. et al., 2011, Meleshko A. et al., 2013, Wang Y., et al., 2019). Однако другие исследователи предполагают, что ММСК быстро исчезают после трансплантации, но вовсе не исключают их функционального эффекта. Например, было продемонстрировано, что фагоцитоз ММСК индуцирует появление противовоспалительных макрофагов M2 (Lu W. et al., 2013, de Witte S.F.H. et al., 2018, Weiss A.R.R., Dahlke M.H., 2019). Тем не менее, практически отсутствуют исследования, посвященные установлению потенциальных механизмов, обеспечивающих иммунологическую толерантность реципиента по отношению к аллогенным ММСК.

С другой стороны установлено, что ММСК обладают выраженными иммуномодулирующими свойствами, выражающимися в их способности изменять активность иммунокомпетентных клеток (Rasmusson I., 2006, Singer N.G., Caplan A.I., 2011, Cruz-Barrera M. et al., 2020). В экспериментах *in vitro* показано, что ММСК способны подавлять пролиферацию активированных аутологичных и аллогенных Т-лимфоцитов, а также опосредовать индукцию регуляторного фенотипа (Treg), препятствовать дифференцировке и созреванию дендритных клеток (ДК) и способствовать их поляризации в сторону противовоспалительного фенотипа M2, способствовать снижению секреции иммуноглобулинов В-лимфоцитами, угнетать цитолитическую активность естественных киллерных клеток (НК) (Le Blanc K., Davies L.C., 2015, Khosravi M et al., 2018, Takizawa N et al., 2017, Papait A. et al., 2020, Hu C.D. et al., 2019, Wang D. et al., 2020). Молекулярные механизмы иммуносупрессивного действия ММСК связывают, в основном, с паракринными эффектами. Среди выделяемых ММСК потенциальных растворимых факторов, определяющих эффект иммуносупрессии, рассматривают такие молекулы, как HGF, TGF- β , PGE2, IDO, IL-10, NO, SDF-1, галектины (Bernardo M.E., Fibbe W.E., 2013, Glenn J.D., Whartenby K.A., 2014,

Davies L.C. et al., 2017, Liu S. et al., 2020). Некоторыми исследователями отмечается важность прямых межклеточных контактов ММСК с иммунными клетками в механизмах иммуномодуляции, которые осуществляются за счет взаимодействия лиганда 1 программируемой гибели клеток (PD-L1), человеческого лейкоцитарного антигена-G5 (HLA-G5), молекулы межклеточной адгезии 1 (CD54/ICAM-1) и молекулы адгезии сосудистых клеток 1 (VCAM-1) с их контррецепторами (López-García L., Castro-Manrreza M.E., 2021). Однако полученные к настоящему времени данные, не позволяют получить на молекулярном уровне полное представление о многоступенчатых событиях, происходящие при взаимодействии ММСК с отдельными субпопуляциями иммунокомпетентных клеток, приводящие к затуханию воспалительной реакции.

Иммуномодулирующая активность ММСК может оказывать положительное влияние на течение хронических воспалительных процессов в организме. Положительные терапевтические эффекты ММСК продемонстрированы на некоторых животных моделях заболеваний человека, следствием которых является развитие хронического воспаления: сахарного диабета, рассеянного склероза, системной красной волчанки, ревматоидного артрита (Shu J. et al., 2018, Wu K.H. et al., 2020, Liu L. et al., 2020, Li G. et al., 2020). Также получены обнадеживающие результаты в клинических исследованиях эффективности ММСК в терапии этих заболеваний (Sharma J. et al., 2017, Lublin F.D. et al., 2014, Hu J. et al., 2016, Carlsson P.O. et al., 2015, Cai J. et al., 2016, Bhansali S. et al., 2017). В результате этих исследований показано, что механизмами терапевтического действия ММСК, помимо иммуномодулирующей активности, могут являться стимуляция неоваскуляризации и регенерации эндогенных тканей, уменьшение фиброза, действующие совместно (Pittenger MF et al., 2019, Rodríguez-Fuentes DE et al., 2020). Согласно доступным данным в настоящее время зарегистрированы также 10 клинических исследований безопасности и эффективности применения ММСК при лечении пациентов с хроническими ранами различной этиологии, однако опубликованные данные о результатах на данный момент отсутствуют.

Даже в случае успешного заживления поврежденных тканей у взрослого человека в большинстве случаев этот процесс завершается образованием фиброза (рубцовой ткани), что связано с возрастным снижением регенеративного потенциала тканей (Yun M.H., 2015). С другой стороны, известно, что в отличие от взрослых, у плода до третьего триместра беременности рубцы вообще не образуются, и заживление повреждений происходит в условиях сниженной воспалительной реакции (Moore A.L. et al., 2018, Yin J.L. et al., 2020, Gnyawali S.C. et al., 2020). В настоящее время физиологические, клеточные и молекулярные механизмы регенерации фетальных тканей остаются практически неизвестными. Можно предположить, что заживление фетальных тканей происходит с участием предшественников ММСК. Однако к настоящему времени практически отсутствуют данные о маркерах, характеризующих мезодермальные предшественники на ранних стадиях эмбриогенеза человека. Метод репрограммирования соматических клеток в плюрипотентные состояние, разработанный японскими исследователями Takahashi и Yamanaka (2006), с последующей дифференцировкой их в мезодермальном направлении позволяет воспроизвести процессы эмбриогенеза и предоставляет возможность получения клеток примитивной мезодермы для исследования молекулярных механизмов регенерации фетальных тканей. Идентификация мезодермального предшественника представляется важной вехой на пути к решению проблем, связанных с преодолением возрастного снижения регенеративного потенциала тканей (Rossant J., Tam P.P.L., 2017, Slukvin I.I., Kumar A., 2018, Eto S. et al., 2018, Nakajima T. et al., 2019).

Цели и задачи

Целью данной работы является идентификация и характеристика молекулярных механизмов индукции функциональной активности ММСК человека различного генеза в условиях провоспалительного микроокружения для поиска перспективных подходов клеточной и лекарственной терапии при

заболеваниях, характеризующихся нарушениями процессов заживления ран.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Получить клеточные культуры ММСК из костного мозга, жировой ткани, кожи и пуповины человека и провести сравнительный анализ их морфофункциональных характеристик *in vitro* с помощью иммуногистохимических методов и проточной цитометрии;
2. Исследовать клеточно-опосредованную цитотоксичность при взаимодействии ММСК, выделенных из различных источников, с аллогенными мононуклеарными клетками периферической крови;
3. Провести анализ механизмов подавления пролиферации активированных мононуклеарных клеток периферической крови в присутствии ММСК;
4. Оценить способность ММСК модулировать секреторную активность активированных мононуклеарных клеток периферической крови при сокультивировании с помощью мультиплексного анализа;
5. Изучить влияние провоспалительного микроокружения, создаваемого активированными мононуклеарными клетками периферической крови на индукцию иммуносупрессивных свойства ММСК;
6. Показать роль межклеточных контактов в проявлении функциональной активности ММСК по отношению к актМПК;
7. Исследовать безопасность и эффективность суспензии ММСК у пациентов с хроническими ранами;
8. На основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток разработать клеточные модели примитивной мезодермы и ММСК из одного источника для сравнительного исследования молекулярных механизмов регенерации тканей эмбрионального и постнатального периодов развития.

Научная новизна темы исследования

Впервые установлено преимущество ММСК пуповины новорожденного по сравнению с ММСК взрослого человека, связанное с пропорционально более высоким содержанием прогениторных клеток, экспрессирующих нестин и рецептор фактора роста стволовых клеток (CD117), определяющих регенеративный потенциал.

Показано, что ММСК различного генеза характеризуются саморегулирующейся экспрессией поверхностных молекул главного комплекса гистосовместимости (ГКГ) I класса и не подвержены клеточно-опосредованной цитотоксичности при взаимодействии с аллогенными мононуклеарными клетками периферической крови *in vitro*.

Подавление пролиферации активированных мононуклеарных клеток периферической крови (актМПК) в присутствии ММСК осуществляется посредством снижения количества CD4⁺ Т-лимфоцитов, экспрессирующих рецепторы к интерлейкину-2 (IL-2R α) и сопровождается изменением цитокинового микроокружения, которое выражается в увеличении концентраций интерлейкинов IL-1, IL-6, интерферона- γ (IFN- γ), гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF) и снижении концентраций IL-10, IL-13 в супернатантах по сравнению с отдельными культурами этих клеток. Обнаружено, что адгезионные контакты между ММСК и актМПК участвуют в регуляции синтеза IL-1, IL-6 и G-CSF.

Активация МПК фитогемагглютинином (ФГА) приводит к увеличению доли CD45⁺CD3⁺ Т-лимфоцитов, образующих плотные адгезионные контакты с ММСК в противоположность клеткам субпопуляции CD45⁺CD3⁻ (не Т-лимфоциты), у которых такая способность снижается. Обнаружено, что среди субпопуляций Т-лимфоцитов способность связываться с ММСК при активации увеличивается у субпопуляции CD4⁺ Т-лимфоцитов. В то же время у CD8⁺ Т-лимфоцитов такая способность не изменяется. Установление межклеточных контактов происходит при взаимодействии рецепторных пар Т-клеточного

функционально-ассоциированного антигена лимфоцитов 1 (LFA1) и молекулы межклеточной адгезии 1 (ICAM-1) на ММСК, и Т-лимфоцитарный антиген 4 (CTLA4)/CD28 на поверхности CD4+Т-лимфоцитов и CD80/CD86 на ММСК.

При взаимодействии с актМПК в ММСК осуществляется перекрестная регуляция экспрессии индол-2,3-диоксигеназы (IDO). Рецепторное взаимодействие молекул человеческого лейкоцитарного антигена DR (HLA-DR) и костимуляторных молекул CD80/CD86 на ММСК с их контррецепторами на Т-лимфоцитах играет основную роль в индукции синтеза и функциональной активности IDO в ММСК. А связывание молекул адгезии ICAM-1 на ММСК с интегрином LFA-1 на поверхности Т-лимфоцитов приводит к увеличению секреции IFN- γ клетками, и играет опосредованную роль в индукции синтеза IDO в ММСК через воздействие IFN- γ . Воздействие растворимого IFN- γ и рецепторное взаимодействие ММСК и CD4+ Т-лимфоцитов образуют регуляторную петлю с положительной обратной связью, которая способствует затуханию воспалительной реакции.

В результате проведенного открытого рандомизированного плацебо-контролируемого ограниченного пилотного исследования установлено, что ММСК способны стимулировать процессы регенерации и смещать хронический воспалительный процесс в следующую фазу регенеративного процесса (фазу грануляции) у пациентов с хроническими ранами различной этиологии. Установлено, что введение суспензии ММСК пуповины новорожденного подкожно по периферии раны и в дно раневого дефекта приводит к выраженному росту и созреванию грануляционной ткани, улучшению показателей микроциркуляции крови в ране, ускорению эпителизации в раневом дефекте, что создает благоприятные условия для естественного заживления или проведения аутодермопластики расщепленным лоскутом.

Предложен оригинальный подход к изучению молекулярных механизмов регенерации фетальных тканей, который ранее не был использован другими исследователями в мировой практике, для реализации которого разработаны методы получения клеток примитивной мезодермы и ММСК из одного

источника с использованием двухстадийной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека в мезодермальном направлении. Впервые установлены морфофункциональные отличия клеток параксиальной мезодермы эмбриона человека от постнатальных ММСК по экспрессии мРНК транскрипционного фактора BRY, генов SNAI1, TBX6, MIXL1 и экспрессии поверхностных маркеров CD73 и CD105.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Новые данные об отсутствии клеточно-опосредованной цитотоксичности при взаимодействии ММСК человека с иммунокомпетентными клетками, полученные в этом исследовании, являются фундаментальным подтверждением возможности терапевтического использования ММСК для аллогенных трансплантаций.

Научные результаты, свидетельствующих о ранее неизвестной фундаментальной роли ряда белков в индукции функциональной активности ММСК по отношению к активированным иммунным клеткам, включая взаимодействие рецепторных пар Т-клеточного LFA1 и ICAM-1 на ММСК, и CTLA4/CD28 на поверхности CD4⁺ Т-лимфоцитов и CD80/CD86 на ММСК, являются приоритетными и служат теоретическим обоснованием использования антагонистов молекулы адгезии ICAM-1 (например, антител) для мобилизации эндогенных ММСК у пациентов с хроническими ранами. Полученные нами данные позволяют также разработать новые подходы к проверке функционального статуса культивируемых ММСК, обеспечивающих предварительную оценку регенеративного потенциала, и предложить адекватные способы оценки иммуносупрессивных свойств ММСК человека путем измерения уровня экспрессии HLA-DR на поверхности мембран и измерения уровня экспрессии молекул IDO и циклооксигеназы 2 (COX-2) (патент № 2526575 С2).

Теоретическая значимость экспериментальных данных об изменении цитокинового микроокружения, сопровождающего эффект подавления

пролиферации актМПК в присутствии ММСК и выражающегося в увеличении концентраций IL-1, IL-6, IFN- γ , G-CSF заключается в обосновании использования этих цитокинов или их комбинаций для прекондиционирования ММСК для усиления иммуномодуляторных свойств перед трансплантацией. Определение IFN- γ как критического фактора, участвующего в инициации и регуляции внутриклеточного сигнального каскада IDO в ММСК, имеет высокую практическую ценность для разработки новых высокоэффективных подходов к терапии заболеваний, характеризующихся нарушением процессов регенерации. Предложен новый способ повышения иммуномодуляторных свойств мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани, заключающийся в прекондиционировании культивирование ММСК в присутствии IFN- γ перед трансплантацией, который позволяет существенно повысить их терапевтический потенциал (патент № 2539750).

В результате проведенного рандомизированного плацебо-контролируемого клинического исследования установлено, что применение препарата ММСК в форме суспензии является безопасным и эффективным методом в лечении пациентов с хроническими ранами различной этиологии. Показано, что локальное введение в область раневого дефекта ММСК пуповины формирует благоприятные условия для естественного заживления или проведения аутодермопластики расщепленным лоскутом за счет стимуляции роста грануляционной ткани и улучшения параметров микроциркуляции крови. Тем самым фундаментально и практически подтверждена гипотеза о том, что ММСК обладают способностью динамично менять экспрессионно-секреторный профиль в зависимости от микроокружения и выполнять регуляторную функцию в очаге повреждения. Полученные данные могут стать основой для дальнейших исследований по использованию ММСК не только в терапии хронических ран, но и других заболеваний, характеризующихся развитием хронического воспаления.

Разработанные в данной работе клеточные модели примитивной мезодермы и ММСК в результате последовательной дифференцировки ИПСК в мезодермальном направлении из одного источника открывают возможности для

дальнейшего исследования особенностей молекулярных механизмов регенерации тканей, присущих разным стадиям развития организма человека, позволяющих преодолеть проблемы, связанные с возрастным снижением регенеративного потенциала тканей, а также обосновывают принципиально новые подходы по терапевтическому использованию клеток и выделяемых ими факторов.

Методология и методы исследования

Методология заключалась в системном подходе к изучению фенотипических и функциональных свойств ММСК человека различного генеза в моделях *in vitro* и клиническом исследовании с участием человека. Проведен критический анализ отечественных и зарубежных научных трудов в области биологии ММСК и регенеративной медицины, которые явились теоретической и методологической базой диссертационного исследования.

В настоящей работе основным объектом исследования служили культуры ММСК постнатальных тканей человека, выделенные из костного мозга, жировой ткани, кожи взрослого человека и пуповины новорожденного. Источником МПК служила периферическая кровь, забранная из локтевой вены. Забор клеточного материала проводился с добровольного информированного согласия доноров.

Для исследования молекулярных механизмов были использованы системы смешанных клеточных культур, в которых ММСК и актМПК сокультивировали в условиях контактного взаимодействия, а также бесконтактного с использованием полупроницаемых мембран. Супернатант от интактных культур ММСК служил в качестве контроля. Для моделирования провоспалительного микроокружения использовали МПК, активированные фитогемаггютином (ФГА).

Репрограммирование ММСК в плюрипотентное состояние проводили с помощью рекомбинантного полисистронного вектора на основе вируса Сендай, несущего в своем геноме транскрипционные факторы Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc.

Исследование локализации белков в ММСК проводили с использованием методов проточной цитометрии, иммуногистохимии и микроскопии. Анализ

содержания белков в клеточных экстрактах осуществляли с помощью иммуноблоттинга. Для мультплексного анализа продукции цитокинов в супернатантах культур и сокультур ММСК и МПК использовали платформу BIOPLEX. Выделение и анализ нуклеиновых кислот проводили методами полимеразной цепной реакции (ПЦР), обратной транскрипции рибонуклеиновых кислот, ПЦР в реальном времени. Оценку жизнеспособности ММСК и анализ клеточно-опосредованной цитотоксичности при взаимодействии ММСК и МПК осуществляли по уровню активности лактатдегидрогеназы калориметрическим методом.

Оценку эффективности ММСК в терапии хронических ран осуществляли с использованием методов планиметрии, лазерной доплеровской флоуметрии, измерения транскутанного напряжения кислорода тканей.

Положения, выносимые на защиту

1. Культивируемые ММСК, выделенные из пуповины новорожденного, кожи, костного мозга и жировой ткани взрослого человека, обладают сходными свойствами по экспрессии поверхностных маркеров экто-5'-нуклеотидазы (CD73), Thy-1 (CD90), эндоглин (CD105) и способности дифференцироваться в адипогенном, хондрогенном и остеогенном направлениях, однако ММСК пуповины отличаются от остальных пропорционально более высоким содержанием прогениторных клеток, экспрессирующих нестин и рецептор фактора роста стволовых клеток (CD117).
2. ММСК характеризуются саморегулирующейся экспрессией поверхностных молекул главного комплекса гистосовместимости (ГКГ) I класса при взаимодействии с аллогенными мононуклеарными клетками периферической крови.
3. ММСК обладают способностью модулировать цитокиновое микроокружение при взаимодействии с активированными

мононуклеарными клетками периферической крови, вызывая усиление продукции интерлейкина-1 (IL-1), IL-6, IL-8, интерферона- γ , гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF), снижение секреции IL-10 и IL-13. Контактные взаимодействия между ММСК и актМПК имеют значение для регуляции синтеза IL -1, IL -6 и G-CSF.

4. Культивируемые ММСК конститутивно экспрессируют высокие уровни циклооксигеназы-2 (COX2), IL-6, IL-8, и моноцитарного хемотаксического протеина-1 (MCP-1), которые свидетельствует об их исходном провоспалительном фенотипе.
5. Подавление пролиферации активированных мононуклеарных клеток периферической крови связано с усилением способности CD4⁺ Т-лимфоцитов образовывать межклеточные контакты с ММСК, которое осуществляется путем взаимодействия рецепторных пар Т-лимфоцитарного антигена 4/CD28 и костимуляторных молекул CD80/CD86 на ММСК, а также Т-клеточного интегрин LFA-1 и молекулы межклеточной адгезии 1-го типа (ICAM-1) на ММСК.
6. При взаимодействии с активированными мононуклеарными клетками периферической крови в ММСК осуществляется перекрестная регуляция экспрессии индол-2,3-диоксигеназы (IDO): контактное связывание рецепторов CD80/CD86 и Т-лимфоцитарного антигена 4/CD28 играет основную роль в индукции синтеза и функциональной активности IDO в ММСК, а связывание рецепторной пары Т-клеточного интегрин LFA-1 и ICAM-1 играет опосредованную роль в индукции синтеза IDO через воздействие интерферона- γ , вместе образуя регуляторную петлю с положительной обратной связью.
7. Применение ММСК пуповины у больных с длительно незаживающими ранами способствует смещению хронического воспалительного процесса в сторону заживления, стимулирует рост и созревание грануляционной ткани, вызывает улучшение параметров микроциркуляции крови, формируя благоприятное микроокружение для естественного заживления ран или

проведения аутодермопластики расщепленным лоскутом.

8. Клетки параксиальной мезодермы и ММСК, полученные из одного источника в результате последовательной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека в мезодермальном направлении, отличаются по морфофункциональным характеристикам, и могут служить моделями для изучения молекулярных механизмов регенерации тканей, присущих разным стадиям развития организма.

Личный вклад автора

Личный вклад автора заключался в планировании, организации и проведении экспериментальных исследований, разработке методических подходов, систематизации и анализе полученных результатов, оформлении результатов в виде публикаций и научных докладов. Клинические исследования были проведены в сотрудничестве с кафедрой госпитальной хирургии № 1 лечебного факультета ФГБОУ ВО РНИМУ имени Н.И. Пирогова Минздрава России. Имена соавторов указаны в научных публикациях.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность экспериментальных данных обеспечена использованием обширного комплекса современных методов исследования и статистического анализа, корректных положительных и отрицательных контролей, критической оценкой полученных результатов при сравнении с данными современной научной литературы. Достоверность полученных результатов подкрепляется показателями цитируемости публикаций в системах РИНЦ - 670, индекс Хирша – 11, в системах Web of Science, и Scopus - 510; индекс Хирша – 9.

Результаты работы были представлены к обсуждению научным

сообществом на российских и международных конференциях и симпозиумах: “Биология стволовых клеток: фундаментальные аспекты” (Москва, 2005), “Стволовые клетки и перспектива их использования в здравоохранении” (Москва, 2006, 2007, 2008), “Биология клетки в культуре” (Санкт-Петербург, 2006), “British-Russian Workshop in association with the European Commission. Stem cell: policy, research, and innovations. European Union – Russian Federation Perspectives” (Москва, 2007), “Аутологичные стволовые и прогениторные клетки: экспериментальные и клинические достижения” (Москва, 2008, 2009), “4 всероссийский съезд трансплантологов памяти ак. В.И. Шумакова” (Москва, 2008), “Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии” (Санкт-Петербург, 2010), “Стволовые клетки и регенеративная медицина” (Москва, 2010, 2011), ISSCR 10th Annual Meeting (Йокогама, Япония, 2012), “Recent Achievements in Stem Cells Research (STERP)” (Санкт-Петербург, 2016), “StemCellBio: фундаментальная наука как основа клеточных технологий” (Санкт-Петербург, 2016), “Аутоиммунные и иммунодефицитные заболевания” (Москва, 2016), “Национальный конгресс по регенеративной медицине” (Москва, 2013, 2015, 2017), FEBS Congress (Прага, Чехия, 2018), “Съезд Физиологов СНГ, Съезд биохимиков” (Сочи-Дагомыс, 2014, 2016, 2019), «Регенеративная биология и медицина» (Москва, 2021).

Публикации по теме диссертации

По материалам диссертации опубликовано 68 печатных работ, которые достаточно полно отражают результаты научного исследования, в том числе 20 научных статей в российских и зарубежных реферируемых научных журналах, 4 главы в книгах и сборниках, тезисы 44 докладов на научно-практических конференциях и конгрессах, получено 2 патента на изобретение. Из них опубликовано статей Web of Science – 17, Scopus – 2, российских журналах, соответствующих перечню ВАК РФ – 1, что подтверждает полноту опубликования результатов диссертационного исследования.

Структура и объем работы

Диссертационная работа включает введение, 4 главы, заключение, выводы, список сокращений, список цитируемой литературы. Работа изложена на 334 страницах, содержит 70 рисунков, 9 таблиц, 583 источника литературы.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Динамика заживления поверхностных ран

Восстановление поврежденной ткани происходит в процессе регенерации. В идеале восстановленная ткань по составу и структуре внеклеточного матрикса (стромы) и клеточных компонентов (паренхимы) соответствует исходной, и, как правило, восстанавливается также ее функциональная активность. Процесс восстановления поврежденной ткани наиболее подробно описан для заживления кожных ран (Singer A.J., Clark R.A., 1999, Shaw T.J., Martin P., 2009). Заживление ран – высокоупорядоченный и скоординированный процесс, который включает в себя воспаление, пролиферацию клеток, формирование внеклеточного матрикса и ремоделирование ткани (Grose R., Werner S., 2004). На рисунке 1.1 приведена классическая схема процесса восстановления ткани при заживлении кожных ран. Эта схема лежит в основе большинства экспериментальных моделей для выяснения клеточных и молекулярных механизмов регенеративных процессов, а также патологий, возникающих при нарушениях этих процессов (Gurtner G.C. et al., 2007, 2008).

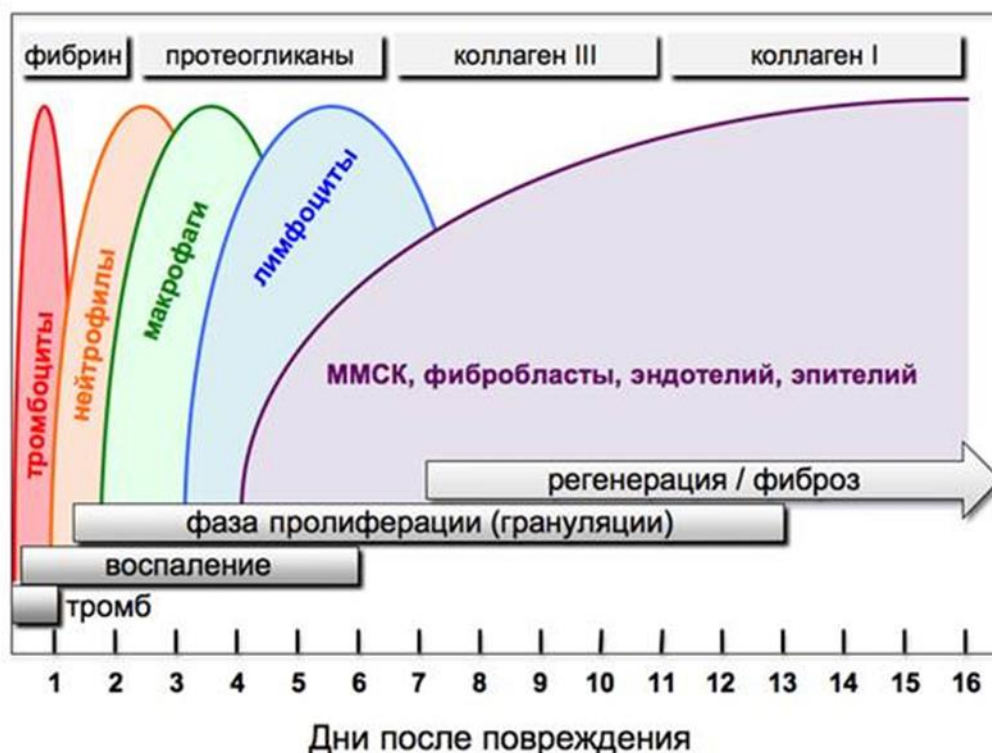


Рисунок 1.1. Динамика появления различных клеток и синтеза основных компонентов внеклеточного матрикса в процессе восстановления ткани на примере заживления кожных повреждений. После повреждения ткани первыми в ране появляются тромбоциты, которые формируют фибриновый тромб и обеспечивают привлечение в рану клеток врожденного и приобретенного иммунитета. Микроокружение, формируемое лейкоцитами в зоне повреждения, способствует привлечению/пролиферации стромальных клеток. В свою очередь, стромальные клетки, секретируя и ремоделируя внеклеточный матрикс, создают условия для восстановления эпителиального слоя.

Процесс заживления ран условно подразделяют на последовательные фазы воспаления, пролиферации (грануляции), и ремоделирования. Каждая последующая фаза восстановления ткани функционально связана с предыдущей так, что нарушение этой взаимосвязи приводит к остановке всего процесса на промежуточной стадии. Завершение третьей фазы означает успешное окончание всего процесса, а остановки на промежуточных стадиях ведут к развитию

хронического воспаления или фиброза (рисунок 1.2) (Воротников А. В. и др., 2012, Suzdaltseva Y. G. et al., 2020).



Рисунок 1.2. Патофизиологические варианты развития событий при восстановлении ткани после ее повреждения. Восстановление происходит либо путем полной регенерации ткани, либо путем фиброза с образованием шрама/рубца. В случае хронического воспаления переход к регенерации не происходит.

Во всех случаях основным действующим элементом регенеративного процесса являются живые клетки. Они привлекаются в очаг повреждения из прилегающих тканей или из отдаленных участков. Направленная миграция клеток является ключевым событием на разных этапах восстановления поврежденной ткани и определяет ее конечный успех. Чем выше противовоспалительный и тканезаместительный потенциал клеток, тем эффективнее и скоординированнее протекает весь процесс.

1.1.1. Клеточные и паракринные компоненты в процессе заживления поверхностных ран

Поскольку повреждение часто связано с нарушением целостности сосудов, первой реакцией является агрегация тромбоцитов и формирование фибринового тромба. Он создает барьер, который останавливает кровотечение и предохраняет рану от инфекции. Помимо этого, фибриновый сгусток выступает как временный матрикс, необходимый для связывания многочисленных провоспалительных факторов (Bianchi M.E., 2007, Rubartelli A., Sitia R., 2009; Crosby L.M., Waters C.M. 2010, Anitua E. et al, 2019).

Кроме того, дегрануляция тромбоцитов приводит к освобождению факторов роста и некоторых цитокинов, которые выступают в роли хемоаттрактантов и способствуют миграции клеток в очаг воспаления. К ним относятся тромбоцитарный (PDGF), эпидермальный (EGF) и трансформирующие факторы роста (TGF- α и TGF- β), факторы роста фибробластов (bFGF) и сосудистого эндотелия (VEGF), цитокины CXCL4 и RANTES, фактор стромальных клеток -1 (SDF-1) (Lau T.T., Wang D.A., 2011, Hu M.S. et al., 2018). Важно также, что тромбоциты секретируют фибронектин и тромбоспондин, которые создают физическую основу для внедрения клеток в очаг повреждения.

Воспаление является физиологическим ответом на повреждение ткани, который обеспечивают клетки врожденного иммунитета (нейтрофилы, макрофаги, базофилы, эозинофилы, естественные киллерные клетки (НК), тучные и дендритные клетки (ДК)). Их первой задачей является выявление и нейтрализация патогенов, накапливающихся в очаге повреждения инородных частиц и сигнальных молекул, запуск и поддержание воспаления. Эти клетки мигрируют в очаг повреждения и устраняют причины воспаления, фагоцитируя токсины, бактерии, зараженные и мертвые клетки. Второй задачей части этих клеток является презентация антигенов иммунным лимфоцитам, обеспечивающим реакции приобретенного иммунитета. Приобретенный

(специфический) иммунитет заключается в продукции антител В-клетками, а также прямом уничтожении чужих и инфицированных клеток НК и цитотоксическими Т-лимфоцитами (ЦТЛ). Изменение клеточного состава и профиля секретируемых ими цитокинов обеспечивает завершение воспаления.

Воспалительная фаза начинается с приходом в очаг повреждения нейтрофилов (рисунок 1.1). Они очищают рану от обломков внеклеточного матрикса и патогенов в ходе респираторного взрыва (Nathan C., 2006, Kovtun A. et al., 2018). Они также секретируют хемоаттрактанты (PDGF, MCP-1) и образуют пероксид водорода. Эти молекулы привлекают и активируют моноциты, вызывая их дифференцировку в макрофаги.

Макрофаги выполняют несколько важных задач. Во-первых, они фагоцитируют погибшие нейтрофилы и берут на себя их функцию, направляя в очаг повреждения другие клетки, включая лейкоциты и фибробласты. Во-вторых, макрофаги секретируют фактор некроза опухолей TNF- α , и IL-1 и IL-6, вызывая миграцию в очаг воспаления и активацию там иммунных лимфоцитов. Лимфоциты не только осуществляют специфический иммунный ответ, но и поддерживают воспалительные условия за счет секреции провоспалительных цитокинов и иммуноглобулинов. В-третьих, макрофаги секретируют факторы роста PDGF, TGF- β , EGF, SDF-1, VEGF, инсулиноподобный фактор роста (IGF-1) и гранулоцит-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF). Это позволяет резко повысить в очаге воспаления концентрации этих молекул, ранее уже образованных тромбоцитами. Эти факторы диффундируют в кровь, в результате чего формируется градиент их концентрации от очага воспаления к окружающим тканям и сосудам. Они действуют как мощные мобилизующие агенты, задают направление и стимулируют хемотаксис не только клеток крови, но и стромальных клеток.

Наличие разных цитокинов, хемокинов и факторов роста в очаге воспаления создает необходимое микроокружение, которое определяет скорость, эффективность и результат заживления (Whitby D.J., Ferguson M.W., 1991, Martin P., 1997). Набор и соотношение этих факторов динамично меняются, регулируя

последовательную миграцию в эту зону клеток крови и стромальных клеток, которые участвуют в первичном восстановлении ткани.

Провоспалительные факторы активируют клеточные механизмы, отвечающие за быстрое развитие воспаления и эффективное устранение его первичной причины. После этого воспалительная реакция должна быть остановлена. Одним из механизмов купирования воспаления является иммуносупрессия, при которой в участке воспаления возрастает уровень противовоспалительных цитокинов (например, TGF- β и IL-10). Они подавляют деление и избыточную активацию иммунных клеток. К числу иммуносупрессорных клеток относятся альтернативно-активированные макрофаги и регуляторные Т-клетки (Трег-клетки). В последнее время показано также, что эффект иммуносупрессии опосредуется и ММСК (Liu J. et al., 2004, Rasmusson I. et al., 2005, Chinnadurai R. et al., 2019, Wang D. et al., 2020).

Только при успешной реализации противовоспалительных механизмов воспаление переходит в фазу грануляции. В противном случае развивается хроническое воспаление (рисунок 1.2).

Фаза грануляции, которая характеризуется созданием грануляционной ткани – временного каркаса для вновь возникающих структур, выполняющего как механическую, так и регуляторную функции, перекрывается во времени с предыдущей стадией воспаления. На этом этапе основную роль играют стромальные клетки. Они выполняют задачу по быстрому закрытию и восстановлению формы участка ткани, который подвергается значительной деструкции в ходе воспаления (Fathke C. et al., 2004, Eckes V. et al., 2010). Стромальные клетки мигрируют в участок повреждения и внутри него по градиентам жесткости матрикса, матриксных белков и растворимых факторов. Обладая высокой синтетической активностью, они секретируют во внешнее пространство компоненты внеклеточного матрикса (фибронектин, коллаген, гликозаминогликаны и протеоглики) и модифицирующие их ферменты (Pfisterer K et al., 2021).

Внеклеточный матрикс включает структурные белки – преимущественно

коллагены и эластины, которые образуют фибриллярные и сетчатые структуры. Адгезивные белки (фибронектин, ламинин, фибулин) соединяют структурные белки матрикса с трансмембранными белками на поверхности клеток. Протеогликаны обеспечивают тургор тканей (Eckes V. et al., 2010). Почти все матриксные белки секретируются в незрелой форме и созревают вне клеток в результате частичного протеолиза, гидроксирования, образования ковалентных сшивок, фибриллярных и сетчатых структур под действием плазмина, матриксных металлопротеиназ (ММП), сериновых протеаз и других внеклеточных ферментов, секретируемых клетками (Vonnans C et al., 2014).

Внеклеточный матрикс выполняет много функций, придавая упругость, эластичность и прочность ткани. С белками матрикса взаимодействуют различные факторы роста и цитокины. Наряду с растворимыми факторами, элементы матрикса и связанные с ними молекулы формируют пространственные градиенты, которые направляют движение клеток по механизму гаптотаксиса. Матрикс создает трехмерный каркас, с которым клетки взаимодействуют всей поверхностью (Even-Ram S., Yamada K.M., 2005, Friedl P., Wolf K., 2010 Pfisterer K et al., 2021). Интегрины, экспрессирующиеся на поверхности клеток, играют важную роль в узнавании компонентов внеклеточного матрикса и проведении в клетку сигналов, запускающих ремоделирование (Geiger B., Yamada K.M., 2011). Кроме того, состав и жесткость матрикса влияют на способность резидентных стромальных клеток дифференцироваться в определенном направлении (Tse J.R., Engler A.J., 2011).

Эффективность регенерации снижается в условиях гипоксии и требует восстановления кровоснабжения поврежденного участка. Это происходит за счет ангио- и васкулогенеза. Ангиогенез – это процесс формирования новых сосудов из уже существующих, тогда как при васкулогенезе сосуды образуются *de novo* с участием прогениторных эндотелиальных клеток. Оба процесса начинаются на поздних этапах фазы воспаления и продолжаются в ходе фазы грануляции.

Васкулогенез происходит с участием эндотелиальных клеток-предшественников, которые рекрутируются в кровотоки из костного мозга под

влиянием ангиогенных факторов роста и цитокинов. Индуцируемый гипоксией транскрипционный фактор-1 (HIF-1) вызывает в клетках экспрессию многих ангиогенных факторов (VEGF, MCP, HGF, ангиопоэтин ANGPT1 и др.), повышенная концентрация которых в очаге воспаления является сигналом для миграции эндотелиальных клеток-предшественников (Semenza G.L., 2004, Boomsma R.A., Geenen D.L., 2012, Xu W. et al, 2019). В дополнение к гипоксии, воспаление и механическое растяжение ткани также активируют HIF-1 и стимулируют ангиогенез (Carmeliet P., Jain R.K., 2011). Периваскулярные стромальные клетки участвуют также в стабилизации и созревании вновь образованных сосудов (Covas D.T. et al., 2008).

Фаза ремоделирования характеризуется реорганизацией и инволюцией грануляционной ткани и восстановлением структуры и функции исходной ткани – двух связанных, но функционально различных этапов единого процесса (рисунок 1.1). Основную роль в ремоделировании временной грануляционной ткани играют ММП, секретируемые клетками, которые регулируют реорганизацию коллагеновых фибрилл (Bonnans C et al., 2014, Pfisterer K et al., 2021). По мере того, как синтетическая активность стромальных клеток снижается, миофибробласты, имеющие развитый сократительный цитоскелет, обеспечивают локальное сокращение и сведение краев раны (Tang W et al., 2018, Lecarpentier Y et al., 2018). Края раны сближаются, а область раны замещается практически бесклеточным рубцом (Tomasek J.J. et al., 2002, Xue M., Jackson C.J., 2015).

Ключевым событием при заживлении поверхностных ран является закрытие поврежденного участка новым клеточным пластом и восстановление барьерной функции эпителия. Этот процесс в основном происходит и завершается на последней стадии регенерации. Его обеспечивают кератиноциты. Они активируются накапливающимися в участке воспаления факторами роста и цитокинами, а также нарушением межклеточных контактов (Singer A.J., Clark R.A., 1999). Кератиноциты, участвующие в ре-эпителизации, образуются за счет деления и миграции клеток из близлежащих неповрежденных участков ткани.

Процессы реэпителизации также регулируются стромальными клетками, которые заполняют пространство грануляционной ткани и секретируют набор факторов, которые стимулируют пролиферацию кератиноцитов. К ним относятся факторы TGF α , TGF β 1, фактор роста кератиноцитов (KGF), EGF, GM-CSF. Уровень экспрессии KGF (FGF7) в фибробластах в очаге повреждения возрастает более чем в 100 раз (Santoro M.M., Gaudino G., 2005). Кератиноциты движутся по грануляционной ткани от периферии к центру раны. Перестройка цитоскелета кератиноцитов, вызываемая контактами поверхностных интегринов с ламининами и коллагеном внеклеточного матрикса, стимулирует их миграцию. Перемещаясь, кератиноциты ремоделируют внеклеточный матрикс, что способствует образованию базальной мембраны и, кроме того, направляет движение следующих за ними клеток. Клетки, располагающиеся в глубине пласта, активно делятся, увеличивая покрываемую пластом площадь (Santoro M.M., Gaudino G., 2005). На завершающих этапах ре-эпителизации клеточные пласты смыкаются, движение и пролиферация замедляются, и клетки возвращаются к своему нормальному эпидермальному фенотипу, прикрепляясь к новообразованной базальной мембране.

1.1.2. Нарушения заживления поверхностных ран: хроническое воспаление и фиброз

При нормальном завершении воспалительной фазы повреждающие факторы нейтрализуются, и запускается процесс образования грануляционной ткани. Однако в некоторых случаях, в том числе связанных с расстройствами кровообращения, облучением, атеросклерозом, диабетом и другими, воспаление не купируется. В таких ситуациях оно продолжается в хроническом виде, и регенерация не наступает (рисунок 1.2). В таких случаях при повреждении кожных покровов развиваются персистирующие длительно незаживающие раны. При таких хронических воспалительных процессах нарушен процесс миграции клеток в очаг повреждения, изменен нормальный уровень и баланс

провоспалительных цитокинов, и временный внеклеточный матрикс не образуется (Velnar T. et al., 2009, Raziyeva K. et al., 2021).

За стадией пролиферации следует стадия ремоделирования, во время которой временная грануляционная ткань замещается постоянной. Именно последний переход определяет, будет ли прежде поврежденный участок заполнен рубцовой тканью (тогда развивается фиброз), или полноценно регенерирует с восстановлением паренхимы и функциональной активности ткани (рисунок 1.2).

У взрослого человека заживление поверхностных ран завершается обычно на стадии ремоделирования. ММСК и фибробласты синтезируют избыточное количество коллагена, что приводит к формированию келоидного рубца или гипертрофического шрама (Хуе М., Jackson С.Ж., 2015). В малоконтролируемых условиях образование рубца (или шрама) является наиболее естественной реакцией, связанной с физическим закрытием участка повреждения и восстановлением его прежней формы. Полное восстановление поврежденного участка кожи у взрослого человека он эффективно происходит только в случае незначительных повреждений.

В случае некоторых патологий (связанных с функционированием жизненно важных органов) быстрое образование рубцовой ткани является необходимым условием для выживания. Так, замедление репаративных процессов при инфаркте миокарда создает большой риск летального исхода. В терапии хронических воспалений достижение фиброза поврежденных участков также считается хорошим результатом (Rieder F. et al., 2007). В остальных случаях, образование шрама или рубца является нежелательным, так как приводит к снижению функциональной активности ткани (Gurtner G.C. et al., 2007, Kumar V. et al., 2009).

Неспособность ткани к регенерации зачастую не связана с генетическими аномалиями клеток, а может быть вызвана эпигенетическими изменениями, затрагивающими экспрессию и активность внутриклеточных и матриксных белков. У человека эти изменения наступают с возрастом или в результате различных патологий. В такой ситуации предотвращение развития хронического воспаления и фиброза, смещение баланса в пользу регенерации требует

принудительного вмешательства, что представляет собой основную задачу регенеративной медицины.

1.1.3. Физиологические функции ММСК в регуляции регенерации тканей

Восстановление поврежденных тканей невозможно без участия стромальных клеток, поскольку восстановление паренхимы происходит на создаваемом ими молекулярном каркасе. В последнее время появляется все больше экспериментальных данных *in vitro*, подтверждаемых исследованиями на животных моделях и клиническими испытаниями, что ключевую роль в регенерации поврежденной ткани играют ММСК, и их присутствие поддерживает здоровое физиологическое функционирование в фазах воспаления, пролиферации и ремоделирования, направленных на успешное заживление. Однако в отличие от культивируемых ММСК, свойства которых активно исследуются в экспериментах *in vitro* и *in vivo* и охарактеризованы в значительной степени, до сих пор мало что известно о роли эндогенных ММСК в нормальных, поврежденных, восстанавливающихся и патологических тканях.

В настоящее время считается, что ММСК попадают в очаг повреждения, пролиферируют там, и непосредственно участвуют в восстановлении ткани. Вероятно, часть из них происходит из исходно присутствующих в ткани резидентных прогениторных клеток. Другая часть рекрутируется в рану из костного мозга и других тканей (Friedl P., Wolf K., 2010).

Классические представления ограничивают участие ММСК в процессе восстановления поврежденной ткани стадиями грануляции и ремоделирования (синтез белков экстрацеллюлярного матрикса, участие в ангиогенезе и реэпителизации). Однако последние исследования позволяют предположить, что практически с момента возникновения воспаления ММСК регулируют и направляют его течение (Waterman R.S., et al., 2010, Motegi S.I., Ishikawa O., 2017).

Во время раннего воспалительного ответа за счет активации разных Toll-подобных рецепторов (TLR) в ММСК повышается секреция провоспалительных

цитокинов IL-1, IL-6 и IL-8. Но под действием специфической стимуляции TLR ММСК могут поляризоваться в разные фенотипы. Так ММСК, стимулированные через TLR4, характеризуются экспрессией TGF- β , IDO, простагландина E2 (PGE2) и секрецией коллагена, вызывающих подавление воспалительной (Waterman R.S. et al., 2010, English K. et al., 2007, Ryan J.M. et al., 2007, Hu M.S. et al., 2018). Активация пути TLR3 в ММСК приводит к повышенной секреции провоспалительных цитокинов TNF- α , IFN- γ , хемокинов CCL2, CCL5 (RANTES), CCL9, CCL10, CXCL10, CXCL11, и фибронектина (Honczarenko M. et al., 2006, Tomchuck S.L. et al., 2008, Waterman RS et al., 2010). Этим можно отчасти объяснить противоречивость ряда экспериментальных данных относительно иммуномодулирующих свойств ММСК, полученных в условиях разного провоспалительного микроокружения.

Накапливающиеся в очаге повреждения провоспалительные цитокины (TNF- α , IFN- γ , IL-1 и др.) вызывают в ММСК секрецию факторов, способствующих подавлению избыточной активации иммунных клеток (English K., et al. 2007, Ryan J.M. et al. 2007). Так в экспериментах *in vitro* было показано, что под действием провоспалительных стимулов ММСК способны ингибировать пролиферацию Т-клеток в реакциях смешанных лимфоцитов, подавлять дифференцировку и созревание ДК и способствуют их поляризации в сторону противовоспалительного фенотипа M2 (Yoo K.H. et al., 2009, Takizawa N. et al., 2017). ММСК могут также опосредовать индукцию регуляторного фенотипа в Т-клетках (Treg) (Melief S.M. et al., 2013, Khosravi M. et al., 2018).

Было показано, что, вызывая функциональные изменения в иммунных клетках, ММСК могут регулировать баланс между провоспалительными и противовоспалительными факторами, производимыми ими, создавая цитокиновую микросреду, необходимую для успешного заживления (Le Blanc K., Davies L.C., 2015, Weiss A.R.R., Dahlke M.H., 2019, Mareschi K. et al., 2016, Guillén M.I. et al., 2018). Однако молекулярные механизмы реципрокного взаимодействия ММСК и иммунных клеток, обеспечивающие переключение экспрессии провоспалительных цитокинов на противовоспалительные практически не

определены. Можно предположить, что иммуномодулирующие свойства ММСК изменяются в условиях *in vivo*, проявляясь и усиливаясь с увеличением доли этих клеток в участке воспаления. Это может происходить при миграции ММСК в очаг воспаления из прилегающих или отдаленных тканей (например, костного мозга) и/или их пролиферации.

Иммуномодулирующая активность ММСК контролирует течение воспаления и его переход в последующую пролиферативную фазу восстановления тканей. Во время фазы пролиферации ММСК мигрируют в область раны, где они инициируют синтез внеклеточного матрикса и ангиогенных факторов (Oh E.J. et al., 2015). В экспериментах *in vitro* было показано, что ММСК синтезируют фибронектин, коллаген, гликозаминогликаны и протеоглики, которые участвуют в создании внеклеточного матрикса, способствуя образованию грануляционной ткани (Baberg F. et al., 2019, Novoseletskaya E. et al., 2020). Было также показано, что в ответ на низкий уровень поступления кислорода, которым характеризуется окружающая среда раны, ММСК секретируют проангиогенные факторы (HIF, VEGF, ангиопоэтин, MCP, HGF и т. д.), которые способствуют миграции и пролиферации эндотелиальных клеток (Rubina K et al., 2009, Bader A.M. et al., 2015, Han K.H. et al., 2017). Считается, что ММСК также поддерживают стабилизацию и созревание новообразованных сосудов (Rubina K et al., 2009, Freiman A. et al., 2016, Yu Y. et al., 2019).

Во время фазы ремоделирования коллагеновые фибриллы претерпевают реорганизацию под действием металлопротеиназ. В экспериментах *in vitro* было показано, что ММСК способны активно участвовать в регуляции протеолитического микроокружения, секретируя ММП, связывая и активируя на своей поверхности эндогенные и экзогенные ММП, ингибируя растворимые ММП за счет продукции TIMP (Lozito T.P., Tuan R.S., 2011, Lozito T.P. et al., 2014, Maffioli E. et al., 2017, Islam A et al., 2019).

В миграционных тестах на зарастание царапины *in vitro* было показано, что ММСК секретируют фактор роста кератиноцитов (KGF) и могут стимулировать миграцию и пролиферацию эпителиальных клеток в ране (Miranda J.P. et al., 2015,

Chen X.X. et al., 2019). Дифференцировка ММСК в миофибробласты способствует сокращению и рубцеванию раны (Kramann R. et al., 2015, Schneider R.K. et al., 2017, Tang W. et al., 2018, Lecarpentier Y. et al., 2018). На заключительной стадии заживления тканей ММСК обеспечивают рост клеточной популяции и витализацию ткани за счет экспрессии факторов роста (Pleumeekers M.M. et al., 2018, Miranda J.P. et al., 2015, Amable P.R. et al., 2014, Pereira T. et al., 2014, Islam A. et al., 2019, Baberg F. et al., 2019).

Способность ММСК к динамическому изменению функциональной активности в процессе восстановления поврежденных тканей обуславливает значительный интерес к их потенциальному терапевтическому использованию при различных заболеваниях.

Однако пространственно-временная динамика изменения функциональной активности ММСК, а также детальные молекулярные механизмы их взаимодействия с различными клетками на разных этапах процесса регенерации исследованы слабо и остаются во многом спорными (рисунок 1.3).

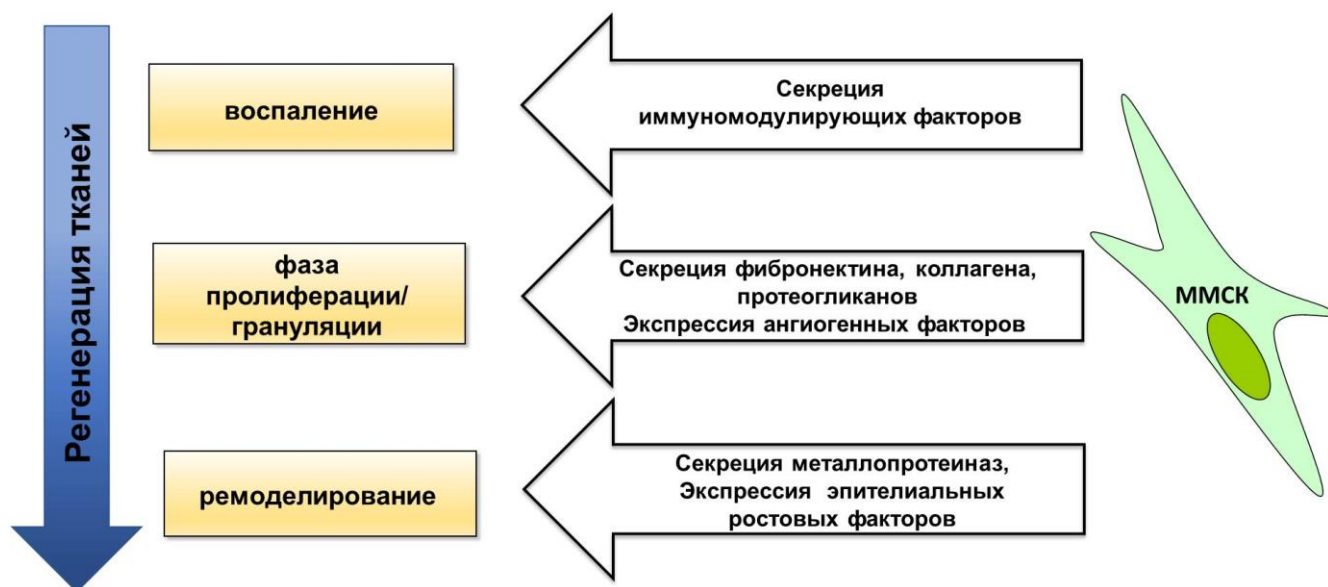


Рисунок 1.3. Роль ММСК в регуляции процессов воспаления и регенерации тканей. На стадии воспаления ММСК оказывают множественные иммуномодулирующие, синтезируя факторы, способствующие подавлению чрезмерной иммунной реакции. В фазе пролиферации ММСК продуцируют белки внеклеточного матрикса и ангиогенные факторы, стимулирующие рост грануляционной ткани. На стадии ремоделирования ММСК регулируют протеолитическое микроокружение и стимулируют реэпителизацию.

Представленный ниже анализ накопленных данных не только указывает на участие ММСК во всех этапах восстановления повреждений тканей, но и обозначает возможные физиологические механизмы такой регуляции.

1.2. ММСК: происхождение, идентификация, свойства и функциональная активность

В 1970-е годы советские ученые А.Я. Фриденштейн впервые обнаружил, описал и экспериментально подтвердил существование в костном мозге стволовых стромальных клеток. В серии работ Фриденштейна и его коллег представлены доказательства клональности и пластичности стромальных клеток из костного мозга, способных к адгезии к пластиковой или стеклянной поверхности в культуре (Friedenstein A., et al., 1974, Chertkov I.L., Gurevich O.A., 1977). В последующем эти клетки получили международное название «мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки».

Впоследствии другие группы исследователей описали негемопоэтические, прикрепляющиеся к пластику прогениторные клетки, получаемые из аспириатов красного костного мозга человека, способные к дифференцировке в клетки мезенхимного ряда (Fedarko N.S. et al., 1990, Haynesworth S.E. et al., 1996, Deans R.J., Moseley A.B., 2000, Bianco P., Gehron Robey P. 2000, Suzdaltseva Y.G. et al., 2007, Juhásová J. et al., 2011, Zhai L.J. et al., 2011, Yang Z. et al., 2011).

В настоящее время установлено, что ММСК могут быть выделены из различных тканевых источников и успешно размножены *in vitro*. Помимо аспириата костного мозга, для получения ММСК предложено использовать ряд других тканей организма: подкожную жировую клетчатку, амниотическую жидкость, плаценту, пуповину, пуповинную кровь, пульпу зуба и др. (Igura K. et al., 2004, Suzdaltseva Y.G. et al., 2007, Vakhrushev I.V. et al., 2010, Mosna F. et al., 2010, Filioli Uranio M. et al., 2011).

1.2.1. Место ММСК в иерархии стволовых клеток.

Согласно определению, стволовыми клетками называются клетки, которые способны к неограниченному самовоспроизведению без изменения кариотипа и фенотипа и способны дифференцироваться в специализированные типы клеток.

В процессе развития млекопитающих стволовые клетки постепенно теряют

потенциал роста и дифференцируются, осуществляя специализированные функции соматических тканей. Например, только зиготы и бластомеры ранней морулы сохраняют способность давать начало эмбриональным, экстраэмбриональным тканям и трофоэктодерме, и считаются тотипотентными. В то время как клетки внутренней массы бластоцисты могут давать начало только эмбриональным тканям и экстраэмбриональным, но не трофоэктодерме и считаются плюрипотентными. Стволовые клетки тканей взрослого организма могут давать начало только линиям клеток в пределах одного зародышевого листка (эктодермы, мезодермы или энтодермы), и считаются мультипотентными или унипотентными в зависимости от числа возможных вариантов дифференцировки. В процессе развития клетки окончательно теряют потенциал развития и превращаются в терминально дифференцированные (рисунок 1.4) (Salem H.K., Thiernermann C., 2010).

В настоящее время интенсивное изучение стволовых клеток человека ведется по нескольким основным направлениям:

- Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), полученные из предимплантационных бластоцист человека,
- Фетальные региональные стволовые клетки,
- ИПСК,
- Постнатальные региональные стволовые клетки человека.

В 1998 году Д. Томпсон изолировали бессмертные линии ЭСК из внутриклеточной массы 4-дневной бластоцисты человеческого эмбриона (Thomson J.A. et al., 1998). ЭСК, формируя эмбриональные сферы суспензионной ЭСК способны бесконечно размножаться в культуре, оставаясь неизменными, а также при определенных условиях дифференцироваться в большинство типов клеток мезодермы, эктодермы и энтодермы (Thomson J.A. et al., 1998, Shambloott M. et al., 1998, Odorico J.S. et al., 2001). Таким образом, ЭСК являются плюрипотентными стволовыми клетками.

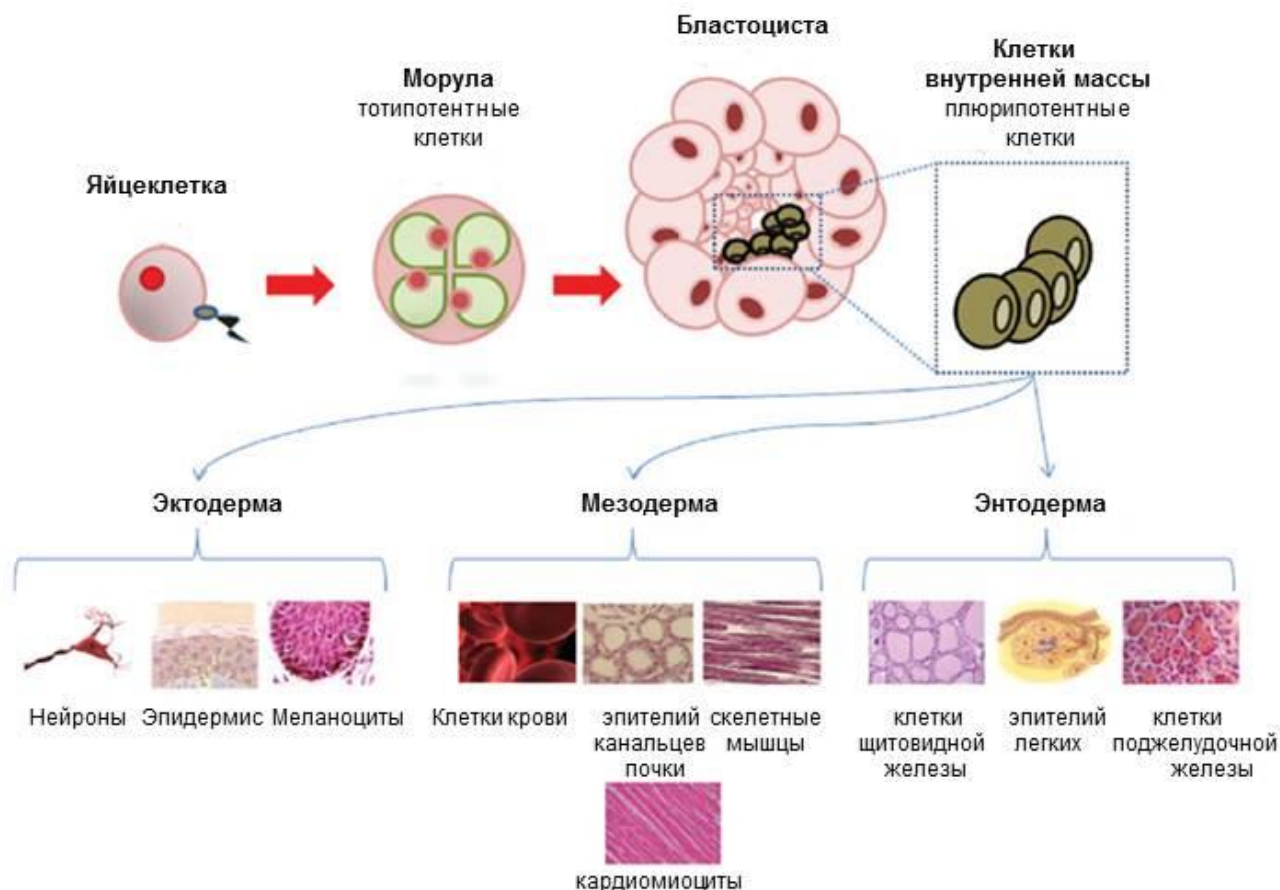


Рисунок 1.4. Иерархия стволовых клеток. Адаптировано из (Salem H.K., Thiernemann C., 2010).

Однако, несмотря на очевидные преимущества ЭСК для изучения механизмов развития, дифференцировки, получения линий специализированных клеток, существуют и серьезные ограничения не только исследовательского, но и этического характера.

Фетальные стволовые клетки получают из предимплантационных бластоцист, начиная с 15 дня после оплодотворения и фетусов. Исследования фетальных стволовых клеток, как и эмбриональных, имеют этические ограничения, т.к. получение таких клеток связано с нарушением целостности эмбриона или фетуса. Однако имеющиеся опубликованные исследования показали, что к концу первого - началу второго триместра развития плода человека региональные стволовые клетки фетальных тканей соответствуют по

фенотипическим признакам и по способности к дифференцировке постнатальными региональными стволовыми клетками (in 't Anker P.S. et al., 2003, Hu Y. et al., 2003, Huang H., Tang X., 2003, Yu M. et al., 2004). Фетальные стволовые клетки первого триместра беременности по фенотипическим признакам и по способности к дифференцировке занимают промежуточное положение между ЭСК и постнатальными региональными стволовыми клетками. Фетальные стволовые клетки в культуре быстрее размножаются и позже стареют по сравнению с их постнатальными аналогами (Campagnoli C. et al., 2001, Guillot P.V. et al., 2007). Способность фетальных стволовых клеток дифференцироваться в клетки тканей различных зародышевых листков остается под сомнением (Guillot P.V. et al., 2008, Kennea N.L. et al., 2009).

Репрограммирование постнатальных клеток млекопитающих в плюрипотентное состояние посредством повышения уровня экспрессии нескольких факторов транскрипции, характерных для ЭСК, открыло новые возможности в области клеточных биотехнологий. Впервые возможность прямого репрограммирования клеток млекопитающих в плюрипотентное состояние, сходное с ЭСК, продемонстрировали Takahashi K. et al. (2006). Было показано, что для успешного репрограммирования клеток достаточно четырех транскрипционных факторов (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc). Вслед за этими исследованиями были получены ИПСК человека с использованием аналогичных подходов (OCT4, SOX2, NANOG, LIN28) в различных комбинациях (Takahashi K. et al., 2007, Yu J. et al., 2007, Park I.H. et al., 2008). В настоящее время актуальными являются исследования молекулярных механизмов репрограммирования, улучшение эффективности репрограммирования, разработка *in vitro* моделей болезней человека (Hochedlinger K., Plath K., 2009, Luciani M. et al., 2020, Watanabe K. et al., 2020, Kouroupi G. et al., 2020). Вследствие того, что в перспективе предполагается использование ИПСК в заместительной терапии, большое внимание в исследованиях уделяется также направленной дифференцировке ИПСК в соматические клетки и клетки-предшественники разных типов (Graf T., Enver T., 2009, Sekine K. et al., 2020, Jiang

L. et al., 2020, Kumar S., et al.,2020).

В настоящее время перспективы, связанные с реализацией технологии ИПСК в медицинской практике, являются самыми многообещающими. В мире зарегистрированы несколько клинических исследований препаратов, полученных с использованием технологии ИПСК, для лечения болезни Паркинсона, макулодистрофии, пигментного ретинита, сердечной недостаточности, повреждений спинного мозга и др. (Yamanaka S., 2020) Тем не менее, существует множество проблем, которые необходимо решить, чтобы сделать технологию ИПСК доступной для гораздо большего числа пациентов.

Важным преимуществом ИПСК является их способность к бесконечному размножению, которая обеспечивает возможность для подготовки миллиардов различных типов человеческих клеток для трансплантации. Однако это свойство имеет и ограничения: если клетки продолжают размножаться даже после трансплантации, они могут привести к появлению опухолей. Рассматривают три канцерогенных сценария. Во-первых, если недифференцированные и/или незрелые клетки сохраняются в конечных клеточных продуктах, которые были дифференцированы от человеческих ИПСК, тератомы или опухоли могут возникнуть из-за неправильного формирования паттерна. Во-вторых, если факторы репрограммирования остаются активными в ИПСК, они могут способствовать онкогенезу. В-третьих, онкогенность может быть вызвана генетическими мутациями, произошедшими при культивировании ИПСК *in vitro* (Yamanaka S., 2020).

Другой проблемой при применении технологии ИПСК является иммунное отторжение. ИПСК, полученные от пациентов, обеспечивают беспрецедентную возможность для проведения ауто трансплантации. Однако в настоящее время подходы с использованием аллотрансплантата предпочтительнее аутологических методов из-за стоимости производства, как в денежном выражении, так и во времени. При тяжелых показаниях, включая сердечную недостаточность и повреждение спинного мозга, длительное время, необходимое для производства продуктов аутологических клеток с использованием технологии ИПСК, не может

быть использовано для успешного лечения этих острых состояний. Однако применение аллогенных производных трансплантатов для лечения повреждений иммунопривелегированных органов (например, глаза) может стать идеальным вариантом с точки зрения предотвращения иммунного ответа (Mandai M. et al., 2017, Yamanaoka S., 2020). Другой подход, который может быть использован для уменьшения иммунного отторжения при трансплантациях - это сопоставление гаплотипов HLA, и создание банков ИПСК (Yamanaoka S., 2020). Такой подход в настоящее время широко используется при трансплантации гематопозитических стволовых клеток. Одним из вариантов преодоления иммунного отторжения является также маскирование белков главного комплекса гистосовместимости (МНС) использованием технологии CRISPR (Lanza R. et al., 2019).

Еще одним ограничением в использовании технологии ИПСК является гетерогенность полученных клонов ИПСК. Некоторые линии ИПСК обладают более низким потенциалом дифференцировки, сопровождающимся аномальным эпигенетическим статусом (Li H.T. et al., 2020).

Тем не менее, продолжающиеся интенсивные исследования в области разработки клеточных технологий на основе ИПСК в контексте применения их в медицинской практике создают обнадеживающие предпосылки для преодоления оставшихся препятствий в недалеком будущем.

Исследования постнатальных региональных стволовых клеток человека ведутся давно и не имеют каких-либо видимых этических препятствий. Однако, многие аспекты проводящихся в этой области исследований остаются неопределенными, включая идентификацию, воспроизводство, дифференцировку и функционирование стволовых клеток *in vivo* и *in vitro*, а также ответственность при манипуляциях стволовыми клетками *ex vivo* и применение их в терапии.

Стволовые клетки взрослого организма, или постнатальные региональные стволовые клетки, представляют собой клетки различного типа, локализованные в специализированных тканях и органах. Постнатальные региональные стволовые клетки обнаружены в мозге, сердце, легких, почках, крови, костном мозге, скелетных мышцах, роговице и сетчатке глаза, пульпе зубов, кровеносных

сосудах, печени, коже, молочной железе, желудочно-кишечном тракте и поджелудочной железе (Таблица 1) (Young H.E. et al., 1995, Warejcka D.J. et al., 1996, Kørbling M, Estrov Z., 2003, Katz A.J. et al., 2005, Fickert S. et al., 2003).

Таблица 1.1. Постнатальные стволовые клетки и их дифференциация.

Тип стволовых клеток	Тканевая локализация	Продуцируемые клетки и ткани
Гемопоэтические стволовые клетки	Костный мозг	клетки крови
Мезенхимальные стромальные клетки	Костный мозг	Кость, хрящ, сухожилие, жировая ткань, строма костного мозга
Нейрональные стволовые клетки	субвентрикулярная зона ЦНС	Нейроны, эпендимные клетки, астроциты, олигодендроциты
Стволовые клетки печени	В терминальных желчных канальцах или рядом с ними	Овальные клетки, которые впоследствии генерируют гепатоциты и клетки канальцев
Стволовые клетки скелетных мышц, сателлитные клетки	Мышечные волокна	Скелетные мышечные волокна
Стволовые клетки кожи	Базальный слой эпидермиса, луковица волосяного фолликула	Эпидермис, кератиноциты
Эпителиальные стволовые клетки легких	Базальные клетки трахей, клетки, секретирующие слизь, секреторные клетки бронхов, альвеолярные пневмоциты II типа	Мукоидные и клетки мерцательного эпителия, пневмоциты I и II типов
Стволовые клетки кишечного эпителия	Эпителиальные клетки, располагающиеся вокруг основания крипт	Клетки Панета, каемчатые энтероциты, бокаловидные клетки, энтероэндокринные клетки ворсинок

Основная функция региональных стволовых клеток - постоянное воспро-

изводство зрелых специализированных клеток. Соответственно, региональные стволовые клетки присутствуют в органах и тканях в качестве пула запасных клеток в течение всей жизни организма. Дифференцировочный потенциал различных типов постнатальных региональных стволовых клеток значительно варьирует от практически унипотентных (стволовые клетки роговицы глаза) до клеток, обладающих широким спектром дифференцировки, таких как мезенхимальные гемопоэтические и стромальные стволовые клетки, нейральные стволовые клетки (Gardner R.L., 2002).

Среди постнатальных региональных стволовых клеток наиболее хорошо изученными являются стволовые клетки костного мозга, включающие гемопоэтические стволовые клетки и субпопуляцию стромальных стволовых клеток, которые обладают мультипотентным потенциалом. ММСК – это уникальная популяция клеток, которые в ответ на соответствующие стимулы способны к делению и воспроизводству, и дифференцировке в несколько типов клеток (Barry F.P. 2003). *In vitro* ММСК обладают значительным пролиферативным потенциалом могут давать начало дифференцированным предшественникам (Schipani E., Kronenberg H.M., 2008-2009, Augello A. et al., 2010, Giovannini S. et al., 2010, Zavan B. et al., 2010, Cakouros D., Gronthos S., 2020).

Начиная с пионерских работ Фриденштейна, большинство исследований было направлено на прямую идентификацию ММСК в костном мозге. ММСК способные дифференцироваться в определенных условиях в различные типы мезенхимных тканей, кроме костного мозга, присутствуют и в других органах и тканях мезодермального происхождения. Они могут быть выделены из жировой ткани, печени, мышечной ткани, легких, амниотической жидкости, плаценты, пуповины и пуповинной крови, пульпы зуба (Igura K. et al., 2004, Suzdal'tseva Y.G. et al., 2007, Vakhrushev I.V. et al., 2010, Mosna F. et al., 2010, Filioli Uranio M. et al., 2011, Yi X. et al., 2020). В периферической крови ММСК в норме практически не обнаруживаются. Принимая во внимание имеющиеся данные, можно предположить, что практически все органы, содержащие соединительную ткань,

также содержат ММСК.

1.2.2. Фенотип ММСК

Многие лаборатории пытаются идентифицировать специфические белковые (или небелковые) маркеры, которые бы могли однозначно определить популяцию ММСК. Однако специфические маркеры ММСК, которые позволят воспроизводимо и достоверно идентифицировать и выделить ММСК, до сих пор не найдены.

Применение метода проточной цитофлуориметрии позволило описать поверхностный антигенный профиль ММСК человека, выделенных из костного мозга и других тканей (Zuk P.A. et al., 2002, Lupatov A.Y. et al., 2006, Reyes M. et al., 2009). Однако, тот факт, что на поверхности ММСК представлен ряд маркеров, характерных также для эндотелиальных, эпителиальных и мышечных клеток, значительно усложняет их иммунофенотипирование. Пока еще не описаны маркеры, которые были бы специфичны и уникальны только для ММСК. Тем не менее, точно известно, что на мембране ММСК отсутствуют характерные для клеток гематопоезического ряда антигены – CD45, CD34, CD11b и CD14, и HLA-DR. В настоящее время существует ряд поверхностных маркеров, которые принято использовать для характеристики ММСК, а также выделения этих клеток из гомогенатов тканей и органов (таблица 2) (Bianco P. et al., 2001, Bühring H.J. et al., 2007).

Ситуация осложняется также тем, что при пассировании в культуре прикрепляющихся клеток костного мозга обнаруживается гетерогенность популяций. Образующиеся колонии клеток отличаются размерами, морфологией, различной скоростью размножения клеток. Однако при том, что пока специфического поверхностного маркера не найдено, известно, что все ММСК, независимо от их морфологических и ростовых характеристик, экспрессируют внутриклеточные белки-маркеры виментин, ламинин- β 1, фибронектин (Bianco P. et al., 2001, Dennis J.E., Charbord P. 2002, Suzdal'tseva Y.G. 2007). Различные

вариации в экспрессии возникают также из-за различий в методах выделения, тканевой и видовой специфичности и условий культивирования.

Таблица 2. Фенотипическая характеристика ММСК.

Позитивная селекция	Негативная селекция
CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD49a, CD49b, CD49c, CD51, CD54, CD58, CD61, CD62L, CD71, CD73, CD90, CD102, CD104, CD105, CD106, CD116, CD119, CD120a, CD120b, CD121, CD123, CD124, CD126, CD127, CD140a, CD166, CD184, CD185, CD191, CD194, CD197, CD331	CD45, CD34, CD14, CD11a, CD19, CD86, CD80/CD40, CD15, CD18, CD25, CD31, CD49d, CD50, CD62E, CD62P, CD117

В исследовании Musina R.A. и др. (2005) сравнили ММСК, выделенные из человеческого костного мозга, жировой ткани, кожи, плаценты и тимуса, на наличие поверхностных маркеров (CD10, CD13, CD31, CD44, CD90, CD105); при этом не было выявлено значительных отличий между клетками, полученными из разных тканей.

Следует подчеркнуть, что пока не будет разрешена проблема идентификации ММСК *in situ*, практически невозможно однозначно ответить на оставшиеся открытыми вопросы о природе, функции и терапевтическом потенциале ММСК. В настоящее время консенсусом ученых принято считать мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками клетки, экспрессирующие на поверхности одновременно три маркера: CD105, CD73, CD90 (Horwitz E.M. et al., 2005, Dominici M. et al., 2006).

Известно также, что ММСК экспрессируют ряд рецепторов для факторов роста FGFR (CD331), PDGFR (CD140a), эндоглину (CD105), c-kit (CD117), определяющих ростовые характеристики и способность к дифференцировке.

(Reyes M. et al., 2009, Wang S. et al., 2018, Kähkönen T.E. et al., 2018).

В настоящее время считается, что неотъемлемым свойством ММСК является высокий уровень экспрессии поверхностных молекул адгезии Н-САМ (CD 44), VCAM-1 (CD106), ICAM-1(CD54), ICAM-2 (CD102), интегринов CD29, CD49b, селектинов CD62 (E, L, P), определяющих способность ММСК к адгезии (Lupatov A.Y. et al., 2006, Reyes M. et al., 2009, Suzdal'tseva Y.G. et al., 2018). Интегрины на поверхности фибробластов и ММСК играют важную роль в узнавании компонентов внеклеточного матрикса и проведении в клетку сигналов, запускающих ремоделирование (Geiger B., Yamada K.M., 2011).

ММСК характеризуются также высоким уровнем экспрессии белков МНС I класса (Lupatov A.Y. et al., 2006, Wang Y. et al., 2019). Наличие молекул на поверхности клеток, защищающих их от лизиса естественными киллерами донора при аллогенной трансплантации, является существенной характеристикой, значительно влияющей на иммуногенность и выживаемость ММСК, и, следовательно, на эффективность клеточной терапии. В настоящее время принято считать, что ММСК экспрессируют исключительно белки МНС I класса. Однако воздействие IFN- γ на ММСК может привести к индукции экспрессии белков МНС II класса. В ряде работ были использованы ММСК, экспрессирующие белки МНС I и II класса (Potian J.A. et al., 2003, Timper K. et al., 2006).

Помимо вышеперечисленных молекул, ММСК экспрессируют рецептор к урокиназе (uPAR), который представляет собой ГФИ-заякоренный белок без трансмембранного домена и цитоплазматической части (Tkachuk V.A. et al., 2009, Chabot V. et al., 2015). С помощью этого крайне мобильного рецептора мигрирующие ММСК локализуют урокиназу, играющую основную роль в ремоделировании матрикса, на лидирующем крае. Таким способом они обеспечивают локальную деградацию матрикса и освобождают себе пространство для движения.

1.2.3. Дифференцировка ММСК

Одной из особенностей, позволяющих расценивать стволовые клетки в качестве перспективного источника для клеточной терапии, является их пластичность. Под «пластичностью» подразумевают способность стволовых клеток при определенных условиях дифференцироваться в клетки других типов тканей, даже если они онтогенетически принадлежат разным зародышевым листкам (Dominguez-Bendala J., Ricordi C. 2005).

Механизмы дифференцировки стволовых клеток в зрелые клетки в большинстве случаев недостаточно изучены. Считается, что стволовые клетки способны претерпевать «ассиметричное» деление, при котором одна из дочерних клеток сохраняет все свойства родительской стволовой клетки, а вторая встает на путь дифференцировки, становясь клеткой-предшественником (Wodarz A, Gonzalez C., 2006, Joly A., Rousset R., 2020, Zion E.H. et al., 2020). Последние уже представляют собой интенсивно пролиферирующую популяцию и при этом имеют меньший дифференцировочный потенциал, являясь коммитированными к образованию определенных типов зрелых клеток.

Получены данные о существовании важных факторов для самоподдержания стволовых клеток. Механизм действия гена *Bmi-1*, вероятно, связан с подавлением экспрессии генов негативных регуляторов клеточного цикла – ингибиторов белков семейства циклин-зависимых киназ *Cdk* (Raaphorst F.M., 2003, Cucco C. et al., 2020, Zhou J. et al., 2020). С другой стороны показана важная роль компонентов сигнальных путей таких регуляторов развития, как *Notch*, *Wnt* и *Hedgehog* (Baron M., 2001, Katoh M., Katoh M., 2006, Roo J.J.D., Staal F.J.T., 2020). Однако в нескольких исследованиях было показано, что члены семейства ростовых факторов фибробластов, особенно *bFGF*, играют важную роль в этом процессе (Fu W. et al., 2020, Dettmer R. et al., 2020).

ММСК являются мультипотентными стволовыми клетками с гораздо более ограниченной способностью к дифференцировке, чем ЭСК (Prindull G., 2005, Caplan A.I., 2009) (Рисунок 1.5).

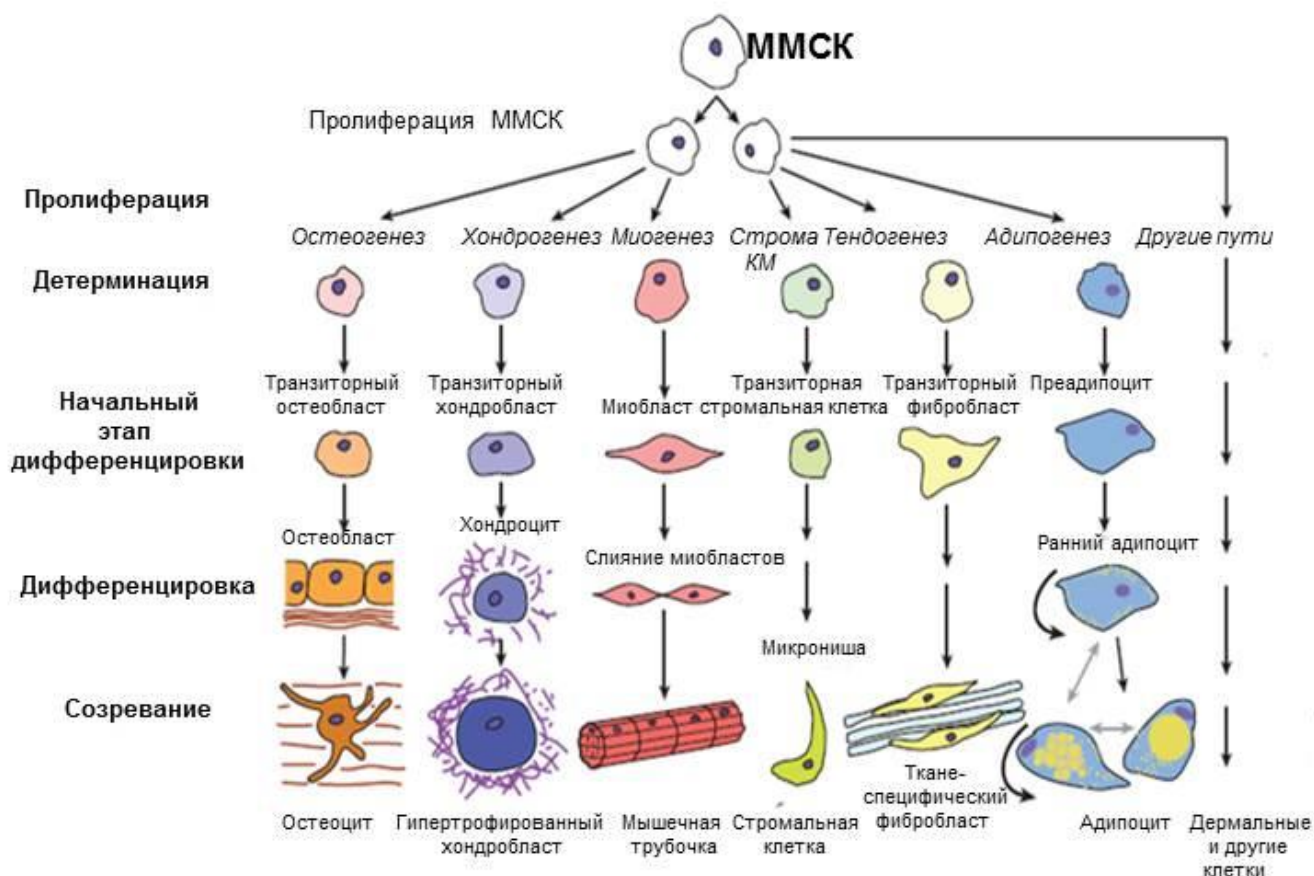


Рисунок 1.5. Дифференцировочный потенциал ММСК. ММСК человека могут развиваться в костную ткань, хрящ, мышцу или жировую ткань. Показана гипотеза процесса дифференцировки, который ММСК проходят как *in vitro*, так и *in vivo*. Адаптировано из (Caplan A.I., 2009).

В исследованиях *in vitro* было показано влияние различных гормонов, витаминов, ростовых факторов и цитокинов на пролиферацию и дифференцировку ММСК, главным образом, в остеоциты (Heino T.J. et al., 2004, Cool S.M., Nurcombe V. 2005), хондроциты (Davidson D. et al., 2005, Solchaga L.A. et al., 2005) или адипоциты (Neubauer M. et al., 2004).

В настоящее время наиболее охарактеризованными являются остеогенная и адипогенная дифференцировки. При культивировании в присутствии дексаметазона и аскорбиновой кислоты, ММСК начинают дифференцироваться в остеоциты, что характеризуется транзиторной индукцией щелочной фосфатазы (примерно после двух недель культивирования), экспрессией мРНК белков костномозгового матрикса и отложением кальция (через три недели). Клональные

ММСК в этих условиях образуют костные локусы, богатые протеогликаном, которые позитивно окрашиваются ализариновым красным и по методике Van Kossa. Для поддержания адипогенной дифференцировки ММСК культивируются в присутствии дексаметазона, метил-изобутилксантина, инсулина и индометацина. После индукции в адипогенной среде морфология клеток изменяется к третьей неделе, что выражается в накоплении вакуолей, богатых липидами, которые могут окрашиваться красителем жировым красным (Oil-Red-O) (Reyes M. et al., 2009, Silva C.G.D. et al., 2020).

Очевидно, что остеобласты и адипоциты происходят из одних и тех же ММСК вследствие активации специфических транскрипционных программ. Ключевыми факторами транскрипции, которые определяют дифференцировку ММСК в остециты и адипоциты, являются Runx2 и PPAR γ соответственно. Активация Runx2 и ингибирование PPAR γ приводит к дифференцировке ММСК в остециты, а обратные транскрипционные события приводят к дифференцировке в адипоциты (Moerman E.J. et al., 2004, Li Y., 2018). Hong и др. (2005) показали, что линейное детерминирование также регулируется другим фактором транскрипции TAZ. Оба из вышеописанных ключевых факторов, Runx2 и PPAR γ , регулируются TAZ, который активирует Runx2-зависимую экспрессию генов остеогенеза и одновременно подавляет PPAR γ -зависимую экспрессию генов адипогенеза. В будущем, возможно, будут найдены еще подобные “молекулярные реостаты”, которые являются важными регуляторами дифференцировки клеток. Идентификация таких молекул в дальнейшем сможет помочь пролить свет на сигнальные пути, которые необходимы для дифференцировки ММСК в те или иные типы клеток.

ММСК могут также дифференцироваться по хондрогенному пути, при культивировании без сыворотки в присутствии трансформирующего ростового фактора TGF- β 3 и дексаметазона. Клетки начинают экспрессировать коллаген II типа, который является характерным для суставного хряща, а также толуидиновым синим на протеогликановый экстрацеллюлярный матрикс (Reyes M. et al., 2009, Sfougataki I et al., 2020).

Также было продемонстрировано, что ММСК из костного мозга присуща способность к дифференцировке в миоциты, не входящие в состав стромы костного мозга (Kurpinski K. et al., 2010, Zhang Y. et al., 2020).

В настоящее время неоспоримым является тот факт, что ММСК способны дифференцироваться в клетки мезенхимного ряда (см. Рисунок 1.5) как *in vitro*, так и *in vivo*. Однако способность ММСК дифференцироваться в различные типы клеток других зародышевых листков остается под вопросом, хотя исследования в этом направлении ведутся весьма интенсивно. В настоящее время отсутствует общий взгляд на пластичность стволовых клеток. Тем не менее, представляется вполне возможным существование наборов внеклеточных стимулов, достаточно сильных для преодоления эпигенетических барьеров.

По данным некоторых исследователей существует потенциальная возможность дифференцировки ММСК *in vitro* в клетки немезодермального происхождения: нейроноподобные клетки (Safford K.M. et al., 2004, Wislet-Gendebien S. et al., 2005, Dilger N. et al., 2020), гепатоциты (Schwartz R.E. et al., 2002, Seo M.J. et al., 2005, Snykers S. et al., 2011, el Baz H. et al., 2020), клетки поджелудочной железы (Timper K. et al., 2006, Uday Chandrika K. et al., 2020) под воздействием некоторых низкомолекулярных соединений (Zhao H.B. et al., 2014, Moon M.Y. et al., 2018), ростовых (Nandy S.B. et al., 2014) и транскрипционных факторов (Feng N. et al., 2014), подтверждающиеся специфическими изменениями морфологии, экспрессии генов, фенотипическими критериями. Такие дифференцированные клетки способны экспрессировать тканеспецифические маркеры, однако их функциональная активность требует дополнительных доказательств. Способность таких клеток проходить хоуминг и проявлять специфическую функциональную активность при трансплантациях в живые организмы в настоящее время остаются под вопросом.

1.2.4. Секреторный профиль ММСК

В тканях ММСК располагаются в специализированных нишах, где они

способствуют формированию и функционированию микроокружения стромы, которая производит индуктивные и регулирующие сигналы не только для мезенхимальных, но и эпителиальных и нервных клеток, а также для поддержания гемопоэтических прогениторных клеток в костном мозге (Minguell J. J. et al., 2001). В настоящий момент существуют доказательства того, что ММСК секретируют ряд цитокинов и факторов роста, участвующих в регуляции внутриклеточных сигнальных каскадов в соседних клетках, стимулирующих ангиогенез, рекрутирование клеток в очаг воспаления, оказывающих трофические иммуномодулирующие эффекты (Hsiao S.T. et al., 2012, Wang Y. et al., 2014, Tofiño-Vian M. et al., 2018).

Это утверждение подкрепляется тем, что ММСК человека обладают обширным профилем продукции ростовых факторов и цитокинов. Они продуцируют ростовые факторы SCF, фактор, ингибирующий лейкемию (LIF), Flt-3-лиганд, GM-CSF, G-CSF, макрофагальный колониестимулирующий фактор (M-CSF), VEGF, фактор роста гепатоцитов (HGF), bFGF, TGF- β , IGF-1 (Majumdar M.K. et al., 2000, Rehman J. et al., 2004, Kyurkchiev D. et al., 2014, Ratushnyy A. et al., 2020), интерлейкины IL-1, IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15, TNF- α , IFN- γ и хемокины CCL2, CXCL9, CXCL10, CXCL11 (Honczarenko M. et al., 2006, Tomchuck S.L. et al., 2008, Singer N.G., Caplan A.I., 2011, Al-Hakami A et al., 2020).

ММСК жировой ткани, так же как и ММСК костного мозга, секретируют такие факторы роста как VEGF, HGF, FGF-2. Секреция этих факторов может повышаться в условиях гипоксии, под воздействием факторов роста, факторов дифференцировки или TNF- α (Rehman J. et al., 2004).

Некоторые цитокины продуцируются постоянно, другие - под действием определенных факторов, например, медиаторов воспаления. В зависимости от микроокружения, в котором находятся или в которое попадают ММСК, их экспрессионный профиль может изменяться (Таблица 3).

Так в очаге воспаления ММСК секретируют факторы, способствующие снижению активации иммунокомпетентных клеток: фермент IDO, катаболизирующий триптофан, индуцируемая NO-синтаза (iNOS), PDE2, COX-2 и

др. (Singer N.G., Caplan A.I., 2011, Rasmusson I., 2006, Ren G. et al., 2010, Espagnolle N. et al., 2017).

Таблица 1.3. Характеристика секреторного профиля ММСК

Экспрессионный продукт	Молекулы
Ростовые факторы	LIF, SCF, Flt-3-лиганд, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, VEGF, HGF, bFGF, TGF- beta, KGF
интерлейкины	IL-1, IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15, TNF- α , IFN- γ
хемокины	CCL2, CXCL9, CXCL10, CXCL11
Матриксные белки	Коллаген I, III, IV, V типа, фибронектин, ламинин, протеогликаны, гликозаногликаны
Протеазы	MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13, MMP-14, MMP-16, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3
Микро РНК	miR-23a-3p, miR-424-5p, miR-144, and miR-130a-3p, miR-23a-3p, miR-424-5p, miR-144-3p, miR-130-3p, miR-145-5p, miR-29b-3p, miR-29a-3p, miR-25-3p, miR-221-5p, miR-21-5p, miR-125b-5p, miR-22-3p, miR-199a-3p, miR-191-5p

В стадии создания грануляционной ткани и восстановления кровоснабжения в очаге повреждения ММСК секретируют ангиогенные факторы: HIF-1, VEGF, HGF (Rehman J. et al., 2004, Ciria M. et al., 2017, Wang H. et al., 2017).

Неотъемлемым свойством ММСК является синтез внеклеточного матрикса, который поддерживает форму и нормальное функционирование здоровых тканей и способствует быстрому закрытию и восстановлению формы поврежденных. ММСК обладают высокой синтетической активностью и секретируют в межклеточное пространство фибронектин, коллаген, ламинин, протеогликаны, гликозаминогликаны (гиалуроновая кислота – наиболее важный компонент) (Eckes B. et al., 2010).

Матриксные белки секретируются преимущественно в незрелой форме и

созревают вне клетки. Созревание включает частичный протеолиз, гидроксирование, образование ковалентных сшивок и формирование фибриллярных или сетчатых структур. Его осуществляют протеазы, пролин-гидроксилазы, лизил-оксидазы и другие внеклеточные ферменты. ММСК экспрессируют внеклеточные протеазы, ММП и модифицирующие компоненты внеклеточного матрикса ферменты, с помощью которых изменяют (ремоделируют) структуру первичного фибринового матрикса с образованием грануляционной ткани, которая создает каркас для вновь возникающих структур (Lozito T.P., Tuan R.S., 2011, Lozito T.P. et al., 2014, Maffioli E. et al., 2017, Islam A et al., 2019). ММП деградируют фибронектин, гиалуроновую кислоту и коллаген III типа, а более плотный и структурированный коллаген I типа, содержащий большее число поперечных сшивок, встраивается на их место.

В стадии реэпителизации поврежденной ткани ММСК секретируют KGF, известный также как FGF-7, который стимулирует миграцию и пролиферацию кератиноцитов (Jiang Z. et al., 2017).

В последнее время выдвинута гипотеза о том, что паракринный эффект ММСК может осуществляться также посредством секреции ими экзосом, которые были обнаружены Lai et al. (2011) с помощью электронной микроскопии. Экзосомы представляют из себя везикулы диаметром 40–150 нм (Vlassov A.V. et al., 2012), покрытые мембраной и содержащие мРНК, микроРНК и некоторые белки (Haraszti R.A. et al., 2016, Zou X.Y. et al., 2018, Ferguson S.W. et al., 2018). Предполагается, что экзосомы являются переносчиками специфических «информационных» молекул, посредством различных механизмов влияющих на клетки-мишени (Phinney D.G., Pittenger M.F., 2017, Deng H. et al., 2018). МикроРНК, содержащиеся в экзосомах, секретлируемых ММСК, вовлечены в регуляцию различных внутриклеточных сигнальных каскадов (WNT, PDGF, TGF-beta, VEGF и др.) через дофаминовые рецепторы, толл-подобные рецепторы (TLR), кадгеринины, интегрины и др. (Zou X.Y. et al., 2018). Так некоторыми исследователями было показано, что экзосомы, секретлируемые ММСК, способствуют реэпителизации кожных ран посредством стимуляции

пролиферации эпителиальных клеток (Zhang B. et al., 2015a), ангиогенеза (Zhang B. et al., 2015b, Shabbir A. et al., 2015), синтеза коллагена и эластина (Zhang J. et al., 2015), а также уменьшение образования рубца за счет сдерживания дифференцировки ММСК в миофибробласты (Fang S. et al., 2016).

1.2.5. Миграция

Главным обстоятельством, послужившим толчком к развитию идеи использования ММСК в терапевтических целях, явилось свойство ММСК мигрировать и приживаться в местах воспаления поврежденных тканей.

Для рекрутинга клеток в очаг воспаления требуется последовательность поэтапных адгезивных и сигнальных событий, включающая в себя селектин опосредованный роллинг, активацию клеток хемокинами и цитокинами, активацию интегринов, интегрин опосредованную устойчивую адгезию на эндотелий, трансэндотелиальную миграцию, и, наконец, миграцию/инвазию в экстрацеллюлярный матрикс с вовлечением интегринзависимых взаимодействий и протеаз, деградирующих матрикс (Imhof V.A., Aurrand-Lions M., 2004, Luster A.D. et al., 2005, Liesveld J.L. et al., 2020). Хорошо известно, что миграция клеток в очаг воспаления обуславливается градиентом плотности хемокинов. Повышение концентрации воспалительных хемокинов, высвобождающихся после повреждения ткани является ключевым сигналом для миграции ММСК в место поражения. Активация ММСК хемокинами, взаимодействующими с их контррецепторами, экспрессируемыми на поверхности, является важным шагом в процессе миграции ММСК в место повреждения (Honczarenko M. et al., 2006, Nitzsche F. et al., 2019, Liesveld J.L. et al., 2020).

Установлено, что SDF-1/CXCL12 (фактор стволовых клеток) является членом семейства хемокинов и постоянно экспрессируется ММСК (Lapidot T. et al., 2005). Было показано, что на ранних пассажах культивирования ММСК экспрессируют специфический для SDF-1 хемокиновый рецептор CXCR4 (Ringe J. et al., 2007). ММСК экспрессируют также несколько молекул адгезии, которые

реагируют на воздействие SDF-1 и некоторые хемокины CX3CL1, CXCL16, CCL3, CCL19 и CCL21 (Majumdar M.K. et al., 2003, Sordi V. et al., 2005). SDF-1 стимулирует миграцию и хоуминг ММСК в очаг воспаления (Lapidot T., 2001). Ингибирование как SDF-1, так и CXCR4 частично блокирует миграцию и хоуминг клеток, экспрессирующих CXCR4, в место повреждения (Abbott J.D. et al., 2004, Bhakta S. et al., 2006).

Недавно было показано, что эндотелиальная NO-синтаза миокарда способствует миграции ММСК в ишемическую зону миокарда после инфаркта посредством повышения экспрессии SDF-1, что приводит к улучшению функции сердца (Li N. et al., 2009). Ponomarev T. et al. (2000) установили, что оверэкспрессия SDF-1 приводит к повышению миграции и хоуминга стволовых клеток в зону ишемии тканей при внутривенном введении.

В миграции ММСК, помимо хорошо охарактеризованного каскада взаимодействий SDF-1/CXCR4, участвуют также несколько других каскадов взаимодействий лиганд-рецептор. Недавно было показано, что ММСК экспрессируют CCR7 – рецептор к лиганду CCL21, который экспрессируется кератиноцитами. ММСК, экспрессирующие CCR7, аккумулируются в ранах и вносят значительный вклад в их репарацию посредством специфического взаимодействия CCL21/CCR7 как *in vitro*, так и *in vivo*. Интрадермальное введение CCL21 участвует также в дифференцировке ММСК в различные типы клеток (Sasaki M. et al., 2008, Inokuma D. et al., 2006, Nitzsche F. et al., 2019).

Интегрины также играют ключевую роль в адгезии, миграции и хемотаксисе клеток. Ip J.E. et al. (2007) продемонстрировали, что интегрин $\beta 1$ участвует в альтернативном CXCR4 пути миграции и приживления ММСК в зоне ишемии миокарда на модели острого инфаркта миокарда. Совсем недавно была также установлена роль подокаликсина (PODXL) и интегрин $\alpha 6$ (CD49f) в миграции и приживлении ММСК в зоны повреждения сердца и почек. Подокаликсин является членом семейства белков – муцинов мембран клеток (CD34). С использованием FACS анализа было показано, что культивированные ММСК, экспрессирующие PODXL/CD49f на высоком уровне, были более

клоногенны и дифференцировались более эффективно по сравнению с ММСК с низким уровнем экспрессии PODXL/CD49f. Подавление экспрессии РНК PODXL приводило к агрегации клеток. Внутривенное введение ММСК, экспрессирующих PODXL/CD49f на высоком уровне, приводило к летальной эмболии легких у мышей в значительно меньшей степени, чем ММСК с низким уровнем экспрессии PODXL/CD49f (Lee R.H. et al., 2009).

Способность ММСК к миграции в значительной степени зависит от вариаций протоколов, используемых рутинно для изоляции и культивирования клеток с целью увеличения количества клеток для использования *in vivo*. Культивирование потенциально может приводить к изменениям в фенотипе клеток, а именно к уменьшению уровня экспрессии молекул адгезии, потере рецепторов к хемокинам, и, в частности, CXCR4, и, следовательно, влиять на их способность к миграции (Kemp K.C. et al., 2005, Son B.R. et al., 2006).

Начальным моментом хоуминга ММСК является селективный опосредованный роллинг, включающий в себя взаимодействие ММСК с Р- и Е-селектинами, которые постоянно экспрессируются эндотелием костного мозга и воспаленных тканей. Физиологические рецепторы селектинов содержат сиалирированные остатки PSGL-1 и CD44, которые, как известно, в большом количестве экспрессируются в ММСК. Вслед за активацией ММСК хемокинами и взаимодействием их с соответствующими хемокиновыми рецепторами на поверхности ММСК происходит активация интегринов, таких как VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$ -интегрин), которые взаимодействуют с экспрессированными на поверхности эндотелия молекулами адгезии VCAM и ICAM. Взаимодействие $\alpha 4\beta 1$ -интегринов с VCAM и ICAM способствует задержке и прочной фиксации ММСК на поверхности эндотелия. Вслед за прочной фиксацией ММСК на поверхности эндотелия происходит трансэндотелиальная миграция с вовлечением молекул адгезии JAM, кадгеринов, тромбоцитарно-эндотелиальных молекул адгезии (PECAM/CD31), опосредующих транслокацию ММСК в экстрацеллюлярный матрикс, где они взаимодействуют с коллагеном и фибронектином через $\alpha 1$ -интегрины, гиалуроновую кислоту и CD44 (Peled A. et al., 2000, Lowe J.B., 2002, Rüster B. et al., 2006, Nitzsche F. et al., 2019,

Liesveld J.L. et al., 2020).

В экспериментах с нокаутами генов матриксных металлопротеиназ (ММП) и тканевого ингибитора металлопротеиназ (TIMP -1/2) было выявлено, что ингибирование ММП и TIMP -1/2 приводило к ослаблению способности ММСК к миграции через базальную мембрану (Nitzsche F. et al., 2019). В тоже время было установлено, что эти белки активируются провоспалительными цитокинами. Steingen et al. (2008) установили роль VCAM-1 и VLA4 в процессе экстравазации. В то же время не исключено, что в этот процесс вовлечены также интегрины $\alpha\beta1$, $\alpha8\beta1$ и $\alpha9\beta1$, которые по отдельности и в комбинации экспрессируются на поверхности ММСК.

Более четкое представление о точных механизмах, посредством которых ММСК осуществляют миграцию в очаги воспаления, позволит в дальнейшем совершенствовать терапевтический потенциал ММСК.

1.2.6. Сравнительная характеристика ММСК, выделенных из различных источников

Прижизненно ММСК могут быть выделены не из всех тканей организма. Сейчас основными источниками получения ММСК человека для исследований *in vitro* и потенциального применения в клинике являются костный мозг, жировая ткань, а также плацента и пупочный канатик новорожденных (Werts E.D. et al., 1980, Reyes M. et al., 2009, Zuk P.A. et al., 2002 Rodriguez A.M. et al., 2005, Fukuchi Y. et al., 2004, Zhang Y. et al., 2004, Suzdaltseva Y.G. et al., 2008, Secco M. et al., 2008, Yi X. et al., 2020). ММСК, выделенные из этих источников, могут быть подвергнуты длительному лабораторному процессингу.

В последнее время появились работы, сравнивающие свойства ММСК из разных источников. Было показано, что ММСК, выделенные из различных тканей человека, обладают сходными свойствами. В частности, показано, что ММСК, выделенные из костного мозга, жировой ткани, пуповины и плаценты не различаются по фибробластоподобной морфологии, фенотипу, клоногенности и

дифференцировке. Было обнаружено, что ММСК способны к адгезии к пластиковой поверхности и экспансии в культуре в стандартных условиях. Популяция ММСК гетерогенна, однако, большинство клеток экспрессируют поверхностные маркеры CD105, CD90 и CD73, и не экспрессируют CD45, CD34, CD14 or CD11b, CD79alpha, CD19 и HLA-DR. ММСК обладают высокой пластичностью, а именно ММСК могут дифференцироваться в адипоциты, хондробласты, остеобласты и миобласты (Zhang Y. et al., 2004, Suzdaltseva Y.G. et al., 2008, Secco M. et al., 2008, Ratushnyu A. et al. 2020,).

Вместе с тем ММСК, выделенные из различных органов, имеют также и специфические особенности. В организме ММСК функционируют в сложной трехмерной соединительно-тканной архитектуре, которая индуцирует конформационную адаптацию. Поверхностная топография и связанная с ней адаптация клеток определяют функциональные и фенотипические особенности клеток, проявляющиеся при исследованиях *in vitro* (Leuning D.G. et al., 2018). Существуют также особенности ММСК, связанные с особенностями доноров: возрастом, полом, индексом массы тела (Yang H.J. et al., 2014).

Для сравнения свойств ММСК человека, присутствующих в различных тканях Sakaguchi и др. (2005) выделил клетки из костного мозга, синовиума, надкостницы, скелетной мышцы и жировой ткани и изучил их способность формировать колонии и дифференцировку. В исследованиях остеогенеза доля ализарин-позитивных колоний была наиболее высокой у клеток, полученных из костного мозга, и далее по убывающей: из синовиума, надкостницы; тогда как, клетки, полученные из синовиума, обладали наибольшей способностью к хондрогенезу. В экспериментах по изучению адипогенеза частота колоний, окрашенных жировым красным, была высокой в клетках, полученных из синовиума и жировой ткани. Эти и некоторые другие результаты говорят о том, что ММСК, выделенные из различных тканевых источников, могут различаться по потенциалу к дифференцировке, даже если культивируются в одинаковых условиях. В пределах отдельной популяции ММСК имеется лишь небольшое количество клеток, способных к дифференцировке во всех трех направлениях,

большинство же клеток популяции являются бипотентными или унипотентными.

В настоящий момент Интернациональным Обществом Клеточной Терапии (The International Society for Cellular Therapy) приняты следующие минимальные критерии для определения ММСК человека:

1) Клетки должны прикрепляться к пластику в стандартных условиях культивирования;

2) Клетки должны экспрессировать поверхностные маркеры CD105, CD73, CD90 и не экспрессировать поверхностные маркеры гемопоэтических стволовых клеток CD34, CD45, CD11a, CD19 и HLA-DR;

3) Под действием специальных условий *in vitro* клетки должны обладать способностью дифференцироваться в остеоциты, адипоциты и хондроциты (Horwitz E.M. et al., 2005, Dominici M. et al., 2006).

1.3. Взаимодействие ММСК с клетками иммунной системы

До недавнего времени основное внимание уделялось изучению способности ММСК к дифференцировке *in vitro* и *in vivo* в различные типы клеток (костные, хрящевые, и жировые), секреции паракринных факторов, к миграции в поврежденные ткани (Reyes M. et al, 2009, Yang Z. et al, 2011, Liang X. et al, 2014, Luo Q. et al, 2016, Liesveld J.L. et al., 2020, Hu C. et al., 2020). Однако целым рядом исследователей установлено, что ММСК обладают выраженными иммуномодулирующими свойствами, выражающимися в способности редуцировать воспалительную реакцию (Rasmusson I., 2006, Singer N.G., Caplan A.I., 2011, Cruz-Barrera M. et al., 2020). Изучение взаимного влияния клеток иммунной системы и ММСК являются важным аспектом при изучении терапевтического потенциала ММСК.

Показано, что ММСК взаимодействуют практически со всеми компонентами иммунной системы, включая факторы врожденного и приобретенного иммунитета. Взаимное влияние включает воздействие клеток иммунной системы и медиаторов иммунного ответа (цитокинов, хемокинов, простагландинов и др.) на ММСК, а также воздействие ММСК на клетки иммунной системы. В литературе описаны многочисленные исследования воздействия клеток иммунной системы и медиаторов воспаления на ММСК *in vitro* и *in vivo*. Показано, что в присутствии провоспалительных цитокинов и при культивировании ММСК в присутствии актМПК наблюдается изменение клеточной подвижности и иммуномодуляторных свойств ММСК.

Все накопленные к настоящему моменту данные позволяют предположить, что взаимодействие ММСК человека с актМПК является многоступенчатым процессом, который должен включать как минимум три стадии: 1) - активация ММСК под действием провоспалительного окружения, 2) - синтез и секреция ММСК регуляторных молекул, 3) - непосредственное взаимодействие регуляторных молекул с актМПК. Далее гипотетически рассматривается стадия передачи сигналов от одних субпопуляций МПК другим. Все эти этапы

взаимодействия клеток в очаге воспаления в данный момент активно изучаются и проверяются.

Первые работы показали, что основным эффектом иммуносупрессивного влияния ММСК заключается в подавлении пролиферации МПК, активированных антителами или аллоантигенами (Bartholomew A. et al., 2002, Di Nicola M. et al., 2002, Le Blanc K. et al., 2003, Aggarwal, Pittenger, 2005). Обнаружив этот эффект, исследователи пришли к выводу, что одна клетка не способна одновременно взаимодействовать со всеми субпопуляциями МПК, и вероятно, существует ряд опосредованных механизмов передачи сигнала от одной субпопуляции МПК к другим. Вопрос о поиске популяции-мишени для ММСК является ключевым в понимании механизмов, и, несмотря на многочисленные исследования и предложенные варианты, единого мнения нет.

1.3.1. Иммуномодуляторные свойства ММСК *in vitro*.

В последнее время большое внимание уделяется исследованию ММСК и иммунокомпетентных клеток *in vitro*. Были проведены многочисленные исследования, посвященные изучению взаимодействия ММСК человека как со смешанными культурами лимфоцитов (мононуклеарными клетками периферической крови - МПК), так и отдельными субпопуляциями лимфоцитов. Получены данные, которые указывают на то, что ММСК подавляют пролиферацию аутологичных и аллогенных МПК в ответ на индукцию аллоантигенами, митогенами (фитогемагглютинином, конкавалином А и др.), неспецифическую активацию рецептора Т клеток с помощью антител (Bartholomew A. et al., 2002, Di Nicola M. et al., 2002, Le Blanc K. et al., 2003, Aggarwal, Pittenger, 2005). Степень подавления пролиферации активированных МПК увеличивается с увеличением пропорции ММСК. Интересно, что незначительные пропорции ММСК или супернатантов культуры ММСК скорее способствуют пролиферации МПК. ММСК подавляют пролиферацию МПК тем эффективнее, чем раньше были добавлены в сокультуру (Le Blanc K. et al., 2003).

Подавление пролиферации активированных МПК осуществляется посредством растворимых факторов, секретируемых ММСК, что было продемонстрировано экспериментами с использованием полупроницаемых мембран, которые позволяют беспрепятственно проникать растворимым молекулам, но препятствуют клеточным контактам. В то же время супернатанты отдельных культур ММСК не подавляют пролиферацию активированных МПК (Le Blanc K. et al., 2004). Добавление IL-1 β к культуре ММСК приводит к тому, что супернатант ММСК также начинает оказывать иммуносупрессивные свойства (Groh M.E. et al., 2005).

Однако ММСК секретируют иммуномодулирующие факторы не постоянно, а только в ответ на воздействие иммунных клеток, требуют динамического реципрокного взаимодействия между ММСК и активированными МПК (Di Nicola M. et al., 2002, Aggarwal S., Pittenger M.F, 2005, Jiang X.X. et al., 2005).

ММСК проявляют иммуносупрессивный эффект при сокультивировании с активированными, аутологичными, аллогенными и ксеногенными МПК (Liu J. et al., 2004, Rasmusson I. et al., 2005, Chinnadurai R. et al., 2019, Wang D. et al., 2020).

1.3.2. Взаимодействие ММСК с Т-лимфоцитами

В настоящее время хорошо известным и подробно описанным феноменом является подавление пролиферации активированных Т-лимфоцитов в смешанной культуре с ММСК *in vitro*. Ингибирование пролиферации Т-лимфоцитов не имеет иммунологических ограничений и наблюдается в смешанной культуре как с аутологичными, так и с аллогенными ММСК (Krampera M. et al., 2003). ММСК одинаково эффективно подавляют пролиферацию различных субпопуляций активированных Т-лимфоцитов: Т-хелперов (CD4 $^{+}$), ЦТЛ (CD8 $^{+}$), Т-клеток памяти (Le Blanc et al., 2004, Krampera et al., 2006, Grégoire C. et al., 2019, Rapait A. et al., 2020). Иммуносупрессивное действие ММСК *in vitro* является дозозависимым. Оно усиливается с повышением доли ММСК при их сокультивировании с активированными лимфоцитами (Le

Blanc K. et al., 2003, Jiang X.X. et al., 2005, Corcione A. et al., 2006).

Установлено, что подавление пролиферации активированных Т-лимфоцитов в присутствии ММСК является следствием снижения экспрессии циклина D в Т-лимфоцитах, следствием чего является остановка их клеточного цикла (Glennie S. et al., 2005).

Подавление пролиферации активированных Т-лимфоцитов в присутствии ММСК сопровождается снижением экспрессии маркеров активации на Т-лимфоцитах. Активация Т-лимфоцитов является результатом сигнального каскада в ответ на связывание антигенного пептида с Т-клеточным рецептором (TcR) на поверхности Т-лимфоцита и HLA-DR на поверхности АПК. Этот сигнал должен быть подтвержден образованием комплекса молекул CTLA4/CD28 на поверхности Т-лимфоцита и костимуляторными молекулами CD80/CD86 на поверхности АПК. Процесс активации Т-лимфоцита сопровождается экспрессией на поверхности мембраны маркеров активации (CD69 и CD25). В работах разных групп исследователей были получены противоречивые данные об уровне экспрессии маркеров активации Т-лимфоцитов в присутствии ММСК. В ряде исследований сокультивирование с ММСК приводило к снижению экспрессии CD25, а также CD38 и CD69 на активированных Т-лимфоцитах (Groh M.E. et al., 2005, Le Blanc K. et al., 2004, Cappellesso-Fleury S. et al., 2010), в других - к стимуляции (Ramasamy R. et al., 2008, Saldanha-Araujo F. et al., 2012).

ММСК могут модулировать иммунный ответ также через индукцию, усиление функциональной активности и увеличением численности Трег-клеток (Burr S.P. et al., 2013, Yang R. et al., 2020). Трег-клетки являются субпопуляцией CD4⁺ Т-лимфоцитов, которые характеризуются экспрессией гена FOXP3 и CD25(α-субъединица рецептора IL-2). Предполагается, что Трег-клетки являются важным звеном в защите организма от реакций, связанных с избыточной активацией Т-лимфоцитов, в частности при аутоиммунных заболеваниях. Было показано, что ММСК стимулируют пролиферацию и повышают выживаемость субпопуляции Трег-клеток (Casiraghi F. et al., 2008, English K. et al., 2009, Frazier T.P. et al., 2014, Azevedo R.I. et al., 2020), которые сохраняют свои свойства и

после удаления ММСК (Gonzalez-Rey E. et al., 2010). Однако ММСК не изменяет пролиферацию активированных CD4⁺ Т-лимфоцитов, если перед активацией было произведено удаление CD25⁺ клеток из популяции CD4⁺ Т-лимфоцитов (Beyth S. et al., 2005). Это может означать, что сокультивирование Т-лимфоцитов с ММСК может вызывать пролиферацию Трег-клеток, но не стимулировать прямое превращение наивных Т-лимфоцитов в клетки, проявляющие регуляторный фенотип.

ММСК оказывают также супрессивный эффект на цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ). При активации из CD8⁺ Т-лимфоцитов образуются ЦТЛ, которые узнают антигенные пептиды, экспонированные на поверхности клеток в виде комплексов с молекулами МНС I класса. Было показано, что способность ММСК ингибировать специфическую аллоантигенную цитотоксическую активность зависит от их количества. Не было выявлено также цитотоксической активности ЦТЛ по отношению к ММСК, т.е. в смешанных культурах ЦТЛ не вызывали лизиса алогенных ММСК. Добавление ММСК в культуру с активированными аллоантигеном МПК приводит к уменьшению количества ЦТЛ, однако добавление IL-2 частично восстанавливает популяцию ЦТЛ. Предполагается, что это может быть связано с подавлением пролиферации ЦТЛ, а не с прямым подавлением цитолитической активности (Rasmusson I. et al., 2003, Parait A. et al., 2020).

1.3.3. Взаимодействие ММСК с антиген-представляющими клетками

К «профессиональным» АПК относятся ДК, макрофаги и В-лимфоциты.

ДК играют ключевую роль в индукции иммунитета и толерантности. ДК - это единственная популяция профессиональных АПК, которые, несмотря на немногочисленность, могут быть найдены практически во всех органах и тканях организма. ДК играют ключевую роль в захвате, транспорте и презентации на поверхности мембраны антигенов и обладают уникальной способностью стимулировать наивные Т-лимфоциты. Только зрелые ДК могут инициировать

иммунный ответ, созревание клеток сопровождается усилением презентации антигенов, при этом повышается экспонирование белков МНС II класса и костимуляторных молекул (CD80, CD86) на поверхности мембраны клеток. Созревание ДК является необходимым требованием для индукции Т-клеточного ответа, в то же время презентация антигена незрелыми ДК нередко приводит к развитию толерантности (Rutella S. et al., 2006).

Способность ДК инициировать иммунный ответ зависит от стадии активации и созревания. Было продемонстрировано, что ММСК подавляют дифференцировку ДК, что приводит к образованию незрелых ДК, обладающих супрессивным или ингибиторным фенотипом (Jiang X.X. et al., 2005, Nauta A.J. et al., 2006, Zhang W. et al., 2004, Papait A. et al., 2020). Добавление ММСК вызывает торможение дифференцировки моноцитов, CD34 + предшественников в CD1a+ ДК, смещая их дифференцировку в клетки с фенотипическими признаками макрофагов (Nauta A.J. et al., 2006). У ДК, полученных в присутствии ММСК, снижается ответ на сигналы созревания, не обнаружена экспрессия CD83, а также повышение экспрессии HLA-DR и костимуляторных молекул. Зрелые ДК являются специфическими АПК, которые вносят критический вклад в активацию Т-лимфоцитов, так как несут на поверхности антиген-презентирующие (МНС II класса) и ко-стимуляторные (CD80/86) молекулы, необходимые для эффективной активации Т-лимфоцитов. ММСК подавляют дифференцировку и созревание ДК, снижая в них уровень экспрессии этих молекул (Beyth S. et al., 2005). В соответствии с этими выводами, у незрелых ДК, дифференцированных в присутствии ММСК, сильно снижена способность активировать Т-лимфоциты. Таким образом, снижение антиген-представляющих функций ДК препятствует активации Т-лимфоцитов и способствуют накоплению в очаге воспаления незрелых АПК, которые обладают супрессорным фенотипом (Jiang X.X., et al., 2005, Nauta A.J. et al., 2006). Следовательно, подавление пролиферации Т-лимфоцитов, активированных различными антигенами, в присутствии ММСК может быть опосредовано ДК.

Недавно предположили, что ДК определяют цитокиновое окружение среды

в местах воспаления. Было обнаружено, что в культуре ММСК/моноцитов изменяется профиль экспрессии цитокинов, т.е. уменьшается продукция провоспалительных цитокинов: TNF- α , IFN- γ и IL-12, и повышается продукция противовоспалительного цитокина IL-10 (Aggarwal S., Pittenger M.F., 2005, Liu W.H. et al., 2013, Azevedo R.I. et al., 2020).

Эксперименты с использованием полупроницаемых мембран показали, что подавляющее действие ММСК на дифференцировку ДК опосредовано растворимыми факторами. Предполагается, что экспрессия ММСК IL-6 и GM-CSF может угнетать дифференцировку и созревание ДК, хотя блокирование этих факторов антителами не приводит к полному восстановлению функций ДК. Альтернативный фактор, ответственный за дифференцировку и созревание ДК - это, по-видимому, PGE2. Снижение синтеза PGE2 восстанавливает уровень секреции TNF- α и IFN- γ ДК, которые предварительно культивировали в присутствии ММСК. Также иммуносупрессивные свойства ММСК усиливают увеличение продукции IL-10 ДК при сокультивировании с ММСК. И действительно, добавление в культуральную среду нейтрализующих антител к IL-10 частично восстанавливает пролиферацию Т-лимфоцитов при сокультивировании ММСК с МПК. Индукция АПК с регуляторным фенотипом в присутствии ММСК возможно является ключевым механизмом, посредством которого ММСК опосредованно (через ДК) супрессируют пролиферацию Т-лимфоцитов наряду с прямым подавлением пролиферации Т-лимфоцитов (Jiang X.X. et al., 2005, Zhang W. et al., 2004).

Макрофаги являются ключевыми клетками, определяющими эффективность воспалительного процесса и переход к последующим фазам регенерации. В фазе воспаления макрофаги фагоцитируют отработавшие нейтрофилы и секретируют провоспалительные медиаторы IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18, TNF- α . Такие провоспалительные макрофаги относятся к функциональному фенотипу M1. В дальнейшем макрофаги приобретают противовоспалительный фенотип M2 и выделяют противовоспалительные цитокины IL-10, CCL-17, CCL-18, CCL22, CCL24, EGF, TGF β , IGF1 (Mantovani A. et al., 2013, Hesketh M. et al., 2017)

(рисунок 1.6).

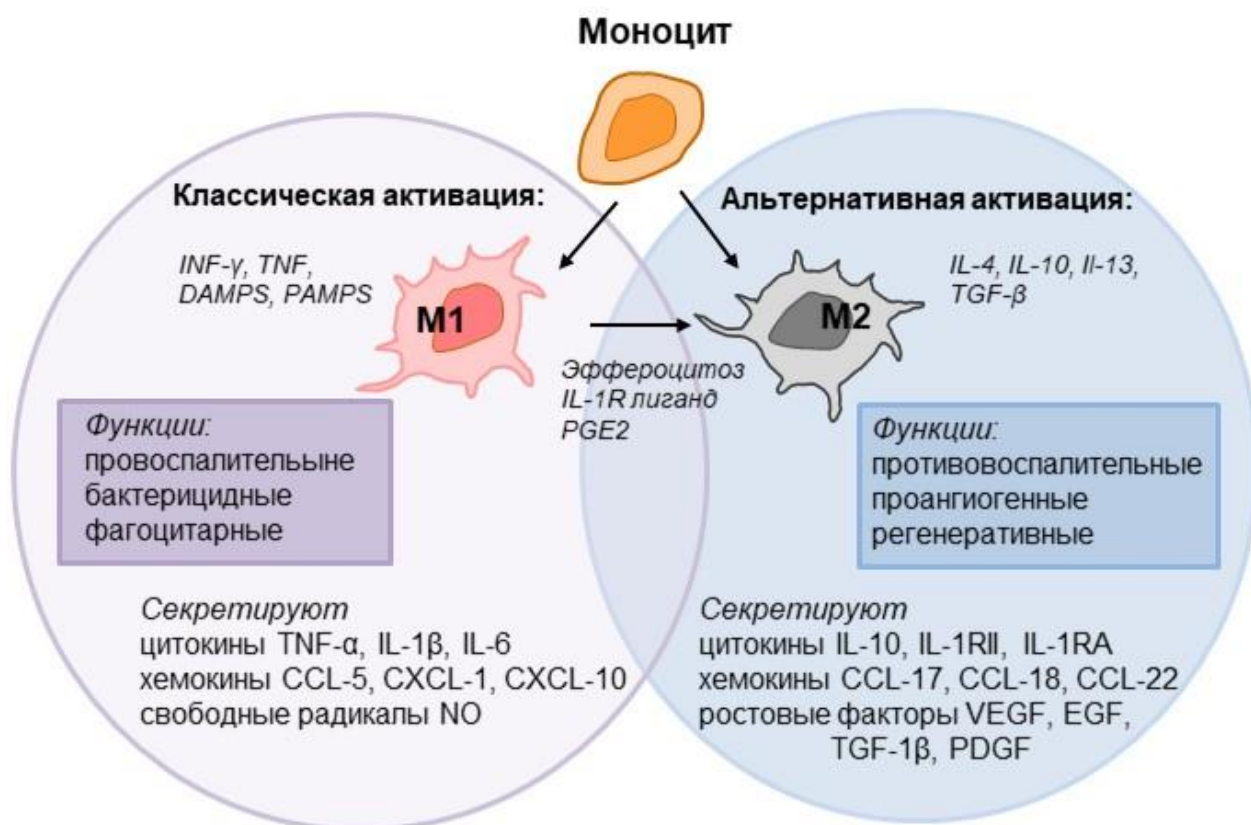


Рисунок 1.6. Поляризация макрофагов M1 и M2. В условиях воспаления моноциты активируются по классическому пути с образованием макрофагов M1 или альтернативному пути с образованием макрофагов M2. Макрофаги M1 могут также дифференцироваться в макрофаги M2 под воздействием локальных сигналов или в результате эффероцитоза. Фенотип M1 провоспалительный (фагоцитарный и антибактериальный). Макрофаги M2 переключают воспаление и регулируют ревазуляризацию и закрытие раны. DAMPs и PAMPs – характерные молекулярные структуры, ассоциированные с повреждениями и патогенами соответственно. Адаптировано из (Hesketh M. et al., 2017).

Недавние исследования показали, что ММСК способны индуцировать появление субпопуляции альтернативно активированных макрофагов нового типа, отличных от классически активированных макрофагов с провоспалительным фенотипом M1 и противовоспалительным фенотипом M2, способных подавлять и врожденный и приобретенный иммунитет. Было показано, что ММСК способны поддерживать жизнеспособность макрофагов,

дифференцированных из моноцитов в присутствии M-CSF, которое осуществляется в основном за счет растворимых факторов (Spaggiari G.M. et al., 2006, Nauta A.J. et al., 2006). Однако взаимодействие рецепторных пар CXCL12/CXCR4 и CXCR7 в поддержании жизнеспособности моноцитов также дискутируется (Sanchez-Martin L. et al., 2011). Было показано также, что ММСК не препятствуют дифференцировке моноцитов в присутствии M-CSF в макрофаги с противовоспалительным фенотипом M2. Такая дифференцировка проходит посредством воздействия PGE₂, экспрессируемого ММСК, а также при участии непосредственных межклеточных контактов, устанавливаемых с ММСК (Chiossone L. et al., 2016). Не исключено также, что в этом процессе могут участвовать и другие факторы. К ним относятся секретлируемые ММСК IDO и IL-6, который вызывает повышение экспрессии IL-4R, которые способствуют поляризации макрофагов в фенотип M2 (Ghannam S. et al., 2010, Francois M. et al., 2012, Melief S.M. et al., 2013a, Fernando M.R. et al., 2014).

Однако при сокультивировании ММСК смещают поляризацию полученных макрофагов к особенному функциональному фенотипу, отличающемуся от классического фенотипа M2. Такие альтернативно активированные макрофаги характеризуются высоким уровнем экспрессии фагоцитарных рецепторов CD206 и CD163 (Melief S.M. et al., 2013b), а также секреции IL-10 и TGF-beta. Такие макрофаги подавляют экспрессию маркеров активации естественных киллерных клеток (НК) NKp44, CD69 и CD25, а также секрецию IFN- γ в отличие от макрофагов с фенотипом M2, которые подавляют только секрецию IFN- γ . Альтернативно активированные макрофаги способны подавлять пролиферацию CD8⁺ Т- лимфоцитов, способствуют индукции CD25^{high}Foxp3⁺ Трег- клеток (Chiossone L. et al., 2016).

В-лимфоциты также относятся к профессиональным АПК. Исследования показали, что ММСК ингибируют пролиферацию В-лимфоцитов, активированных анти-Ig антителами, растворимым CD40 лигандом, антителами к CD40 и IL-4. Было также показано, что ММСК оказывают прямое иммуносупрессивное действие на В-клетки, подавляя секрецию ими иммуноглобулинов IgM и IgG1, а

также дифференцировку В-лимфоцитов в плазматические клетки. Кроме того, ММСК воздействуют на и хемотаксическое поведение В-лимфоцитов (Corcione A. et al., 2006, Asari S. et al., 2009, English K. et al., 2008, Magatti M. et al., 2020, Parait A. et al., 2020).

1.3.4. Взаимодействие между ММСК и естественными киллерными клетками

Естественные киллерные клетки (НК) обладают постоянной цитолитической активностью, которая в основном предназначена для уничтожения клеток, не экспрессирующих молекулы МНС I класса. Лизис клеток, осуществляемый с помощью НК, регулируется набором сигналов, передаваемых посредством активации и/или ингибирования рецепторов (иммуноглобулин-подобные рецепторы натуральных киллеров – KIR), взаимодействующих с молекулами HLA на клетках-мишенях.

ММСК человека подавляют пролиферацию НК (Krampera M. et al., 2006) и снижают их цитолитическую активность (Hu C.D. et al., 2019). Кроме того, установлено, что краткосрочное культивирование с ММСК воздействует только на цитотоксичность НК против опухолевых клеток, положительных по молекулам МНС I класса, но не против клеток, лишенных белков МНС I на поверхности. Эти данные свидетельствуют о том, что ММСК оказывает ингибирующий эффект на цитотоксичность НК в отношении клеток, экспрессирующих молекулы МНС I класса, которые менее подвержены НК-опосредованному лизису, чем клетки, негативные по экспрессии белков МНС I класса (Sotiropoulou P.A. et al., 2006).

Эксперименты, проведенные с использованием полупроницаемых мембран, выявили, что ММСК способны с помощью растворимых факторов подавлять пролиферацию и секрецию цитокинов НК. И наоборот, ингибирование цитотоксичности НК требует межклеточного контакта НК и ММСК, что указывает на существование различных механизмов ММСК-зависимой супрессии НК (Hu C.D. et al., 2019). Было показано, что секреция ММСК PGE2 частично влияет на пролиферацию, экспрессию CD56 и цитотоксичность НК, но не влияет

на продукцию цитокинов или экспрессию рецепторов активации НК. Подавление экспрессии TGF- β частично восстанавливает пролиферацию НК, в то время как блокирование и PGE₂, и TGF- β полностью восстанавливает пролиферативный потенциал НК, свидетельствуя о различных механизмах подавления активности НК (Sotiropoulou P.A. et al., 2006).

До недавнего времени ММСК считались иммунопривелегированными клетками и предыдущие исследования показали, что свежeweделенные НК не лизируют ММСК. Тем не менее, последние данные указывают, что при активации НК приобретают способность эффективно лизировать ММСК (Hu C.D. et al., 2019). Несмотря на то, что ММСК экспрессируют нормальный уровень белков МНС I класса, который должен защитить их от НК-опосредованного лизиса, они также экспрессируют и различные лиганды, которые узнаются активированными рецепторами НК, запускающими аллореактивность НК. Обработка ММСК IFN- γ уменьшает их восприимчивость к НК-опосредованному лизису из-за возрастания количества молекул HLA I класса (Le Blanc K., 2003, Spaggiari G.M. et al., 2006).

Таким образом, приведенные выше данные указывают на то, что ММСК обладают способностью оказывать плеiotропный эффект при взаимодействии с иммунными клетками через клеточные контактно-зависимые или паракринные механизмы. Гипотетическая схема взаимодействия ММСК с клетками иммунной системы в очаге воспаления представлена на рисунке 1.7.

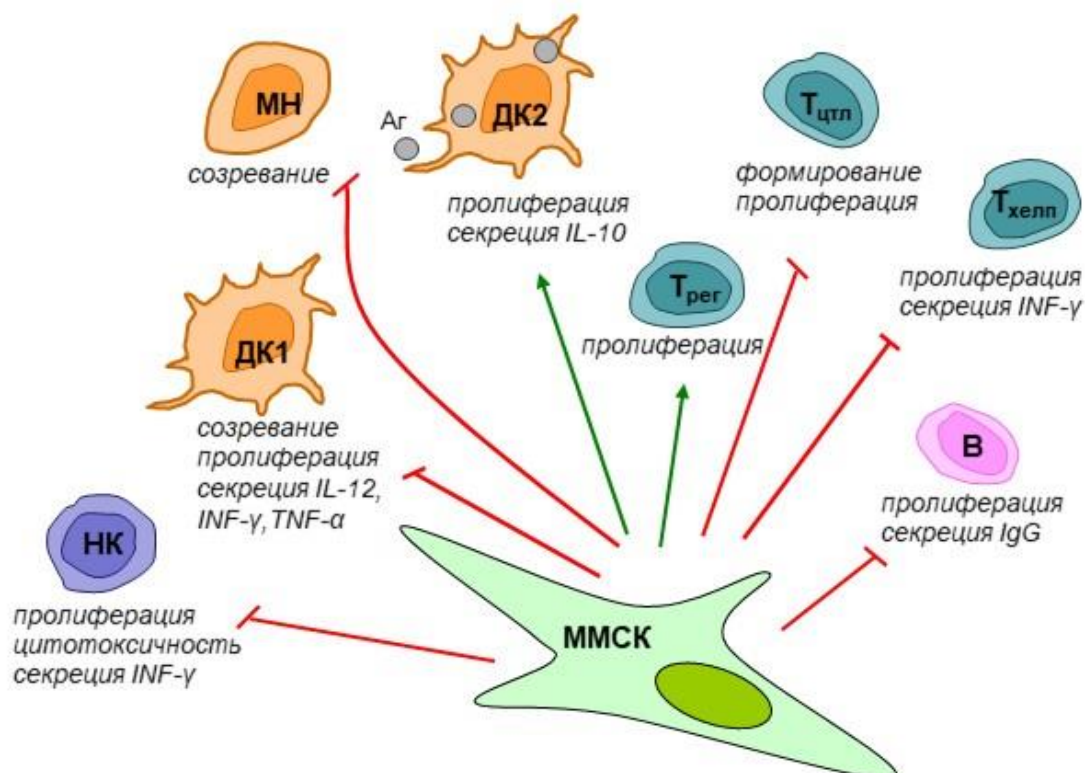


Рисунок 1.7. Иммуномодулирующие свойства ММСК в очаге воспаления. ММСК блокируют пролиферацию естественных киллерных клеток (НК), способствуют снижению пролиферации и секреции иммуноглобулинов В-клетками, супрессируют созревание дендритных клеток (ДК), подавляют формирование цитотоксических Т-лимфоцитов (Тцтл) и пролиферацию активированных Т-хелперов (Тхелп), индуцируют увеличение популяции регуляторных Т-клеток (Трег). МН – моноциты. Зеленые стрелки указывают на стимуляцию процесса, красные стрелки указывают на подавление процесса.

1.3.5. Молекулярные механизмы взаимодействия ММСК с иммунными клетками.

Исследование иммуномодуляторных свойств ММСК *in vitro* позволяют предположить несколько механизмов действия (Qi K. et al., 2018). Эксперименты с использованием полупроницаемых мембран показали, что ингибирование пролиферации активированных CD4⁺ and CD8⁺ Т-лимфоцитов, индукция и увеличение популяции регуляторных Т-клеток (CD4⁺CD25⁺Foxp3), подавление

активации и пролиферации НК, супрессия созревания дендритных клеток, подавление секреции иммуноглобулинов В-клетками осуществляется в основном посредством растворимых факторов, выделяемых ММСК в ответ на провоспалительное микроокружение (Rubtsov Y.P. et al., 2012, Glenn J.D., Whartenby K.A., 2014, Le Burel S. et al., 2017, Contreras-Kallens P. et al., 2017). Однако в последнее время предполагается также участие молекул межклеточного взаимодействия в проявлении этих эффектов (Ren G. et al., 2010, Espagnolle et al., 2017, Rubtsov Y. et al., 2017, Suzdaltseva Y.G. et al., 2018, Liu S. et al., 2020).

Молекулярные механизмы иммуносупрессивного действия ММСК связаны, в основном, с паракринными эффектами, в том числе и за счет внеклеточных везикул, секретируемых ММСК. Среди потенциальных растворимых факторов, выделяемых ММСК в очаге воспаления и определяющих эффект иммуносупрессии, рассматривают HGF, TGF- β , PGE2, IDO, IL-10, NO, SDF-1 или HLA-G (Bernardo M.E., Fibbe W.E., 2013; Glenn J.D., Whartenby K.A., 2014, Davies L.C. et al., 2017, Liu S. et al., 2020).

Предполагается, что одной из потенциальных молекул, секретируемых ММСК в ответ на провоспалительное микроокружение, может служить TGF- β (Liu F. et al., 2019). Было показано, что супрессию по отношению к Т-лимфоцитам в ответ на стимуляцию аллогенными МПК, индуцируемую ММСК, можно устранить путем одновременного блокирования антителами к TGF- β и HGF. Блокирование этих факторов по отдельности не приводит к существенному изменению эффекта подавления ММСК пролиферации активированных Т-лимфоцитов. Однако нейтрализация этих факторов одновременно полностью восстанавливает пролиферацию активированных Т-лимфоцитов. Одновременное добавление рекомбинантных TGF- β и HGF к аллогенным МПК индуцирует такую же степень супрессии, как и присутствие ММСК (Di Nicola M. et al., 2002). Однако блокирование TGF- β и HGF не приводит к изменению пролиферации Т-лимфоцитов при стимуляции их митогенами (Le Blanc K et al., 2004). Было показано также, что нейтрализация TGF- β и HGF частично восстанавливает формирование ЦТЛ, супрессированных в результате взаимодействия с ММСК

(Angoulvant D. et al., 2004). Эти данные подтверждают гипотезу о различных механизмах иммуносупрессивного действия ММСК при различных способах активации лимфоцитов, а также опровергает предположение об индивидуальной роли TGF- β в иммуносупрессии, определяемой ММСК (de Araújo Farias V. et al., 2018, Liu F. et al., 2019) .

Большой интерес исследователей в качестве другого потенциального фактора, определяющего иммуносупрессивное действие ММСК, вызывает PGE2. PGE2 влияет сразу на несколько иммунных процессов, в том числе активацию В-клеток, индукцию Treg-клеток, цитотоксичность НК (Akasaki Y. et al., 2004, Hu C.D. et al., 2019). В синтезе PGE2 участвует COX, экспрессия одной из изоформ которой сильно возрастает при воспалении. Вторая известная изоформа этого белка постоянно синтезируется клетками независимо от наличия или отсутствия воспаления. ММСК даже в норме экспрессируют обе формы COX, и, следовательно, постоянно продуцируют PGE2 (Arikawa T. Et al., 2004). Было показано, что при сокультивировании ММСК и МПК в клетках возрастает уровень экспрессии и COX2, и PGE2 (Сгор M.J. et al., 2010). Однако, роль PGE2 в иммуносупрессии, опосредованной ММСК, остается спорной. Подавление активности COX-2 с помощью индометацина приводит к снижению синтеза PGE2 в сокультуре ММСК и МПК, активированных антителами к CD3/CD28 без восстановления пролиферации (Tse W.T. et al., 2003). Другие исследователи показали, что подавление синтеза PGE2 может восстановить в значительной мере пролиферацию МПК, активированных митогенами, в сокультуре с ММСК. При подавлении синтеза PGE2 восстанавливается также уровень синтеза TNF- α и IFN- γ активированными Т-клетками и ДК (Aggarwal S., Pittenger M.F., 2005). Такое различие может быть объяснено, различной природой стимуляторов, используемых для активации Т-лимфоцитов (Rasmusson I. et al., 2005).

Культивирование ММСК в присутствии провоспалительных цитокинов IFN- γ , TNF- α и IL-6 ведет к индукции экспрессии IDO, которая участвует в метаболизме триптофана. Индукция синтеза и функциональной активности IDO в ММСК приводит к истощению триптофана и накоплению кинуренина. ММСК не

экспрессируют IDO постоянно. Синтез и функциональная активность IDO индуцируется в ММСК в условиях провоспалительного микроокружения и, в частности, после стимуляции IFN- γ (DelaRosa O. et al., 2009, Suzdaltseva Y.G. et al., 2018, Guan Q. et al., 2018). Истощение триптофана, накопление кинуренина и далее в продукты распада кинуренина содействует угнетению пролиферации Т-лимфоцитов. Истощение по триптофану индуцирует также появление Т-клеток с регуляторным фенотипом (Meisel R. et al., 2004, Chen K. et al., 2010). Добавление же триптофана приводит к полному восстановлению пролиферации актМПК. Однако добавление в сокультуру 1-метилтриптофана (ингибитора IDO) не оказывает никакого эффекта на супрессию пролиферации (DelaRosa O. et al., 2009). Было показано, что супрессия Т-лимфоцитов, опосредованная IDO, индуцирует апоптоз Т-лимфоцитов (Li X. et al., 2016). Однако в других работах было показано, что ММСК не влияют на уровень апоптоза в супрессируемых культурах (Frumento G. et al., 2002, Munn D.H. et al., 2004, Meisel R. et al., 2004, Zappia E. et al., 2005).

Описание цитокинового профиля, секретируемого ММСК, до сих пор носит отрывочный и противоречивый характер по причине существенных различий в методологии получения клеточных систем, состоящих из нескольких популяций клеток. Однако было показано, что в культуре нестимулированные ММСК секретируют IL-1, IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15, IL-27, GM-CSF, G-CSF, M-CSF (Haynesworth S.E. et al., 1996, Silva W.A. Jr. et al., 2003, Al-Hakami A. et al., 2020), но не секретируют IL-2, IL-4, IL-10 (Liu J. et al., 2004, Götherström C. et al., 2005). Авторы одной из работ сообщают, что попытки восстановить пролиферацию Т-лимфоцитов с помощью антител, блокирующих IL-6 и IL-11, не привели к успеху. При индивидуальной и совместной нейтрализации эти факторы не влияли на ММСК-опосредованную супрессию Т-лимфоцитов при аллостимуляции (Di Nicola M. et al., 2002). Другими исследователями было показано, что хотя отдельные культуры ММСК не секретировали IL-10, этот фактор был обнаружен в сокультуре ММСК и МПК (Nasef A. et al., 2007, Wang Y. et al., 2020, Yang R. et al., 2020). Подавляющее действие ММСК на продукцию

цитокинов и пролиферацию Т-лимфоцитов может быть частично снижено блокированием сигнального пути IL-10. Добавление антител к рецептору IL-10 (IL-10R) в сокультуру CD4⁺ Т-лимфоцитов, стимулированных стафилококковым энтеротоксином, и ММСК приводило к частичному восстановлению пролиферации Т-лимфоцитов, а также продукции ими TNF- α и IFN- γ . В тоже время нейтрализация самого IL-10 в культуре МПК не приводила к восстановлению пролиферации Т-лимфоцитов (Liu J. et al., 2004). Эти данные служат свидетельством сложности и комплексности участия сигнального пути IL-10 в механизмах подавления пролиферации Т-лимфоцитов.

В качестве потенциальной молекулы, определяющей иммуносупрессивные свойства ММСК, обсуждается также SDF-1, который является хемоаттрактантом при низких концентрациях, однако, при высоких концентрациях SDF-1 может отталкивать Т-лимфоциты (Poznansky M.C. et al., 2000). Этот фактор не экспрессируется на поверхности ММСК даже после инкубации с цитокинами и медиаторами воспаления. Однако небольшое количество растворимого SDF-1 обнаруживается в супернатантах культур ММСК (Nasef A. et al., 2007, Luo Q. et al., 2016, Konala V.B.R., 2020). Тем не менее, добавление антител против SDF-1 не приводит к изменению иммуносупрессивных свойств ММСК в сокультуре с МПК (Poznansky M.C. et al., 2000).

Существуют также данные, в которых антитела к поверхностным белкам, экспрессируемым ММСК, также снижают супрессивное действие ММСК, подтверждая гипотезу о совместном действии сразу нескольких факторов, растворимых и нерастворимых. Например, предполагается, что неклассическая молекула МНС I класса HLA-G также участвует в иммуномодуляторных свойствах ММСК. Было показано, что ММСК секретируют растворимую изоформу HLA-G5, и этот процесс зависит от присутствия IL-10. Более того, межклеточный контакт между ММСК и аллоактивированными Т-клетками необходим для достижения высокого уровня секреции HLA-G5 и, следовательно, осуществления ММСК-опосредованной иммуномодуляции на более высоком уровне. Эксперименты с использованием нейтрализующих антител к HLA-G

показали, что экспрессия ММСК HLA-G5 снижает пролиферацию стимулированных аллогенных Т-лимфоцитов и способствует пролиферации Т-лимфоцитов с регуляторным фенотипом CD4+CD25+FoxP3+ в сокультуре. Помимо этого, было продемонстрировано, что в дополнение к влиянию на адаптивную иммунную систему, ММСК посредством HLA-G5, воздействует на врожденный иммунитет, ингибируя NK-опосредованный цитолиз и секрецию IFN- γ (Selmani Z. et al., 2008, Wobma H.M. et al., 2018).

Среди поверхностных молекул, задействованных в межклеточной коммуникации и опосредующих механизмы иммуномодулирующего действия ММСК, выделяют молекулу адгезии ICAM-1, которая взаимодействует с соответствующим рецептором, представленным на клетках-мишенях (Liu S. et al., 2020). Недавние исследования показали, что ICAM-1 экспрессируется на ММСК и функционально влияет на их иммуносупрессивную способность (Ren G. et al., 2010, Espagnollet et al., 2017, Takizawa N. et al., 2017). Показано, что ММСК через взаимодействие рецепторной пары ICAM-1 / LFA-1 могут индуцировать поляризацию макрофагов в сторону фенотипа M2, подавлять пролиферацию Т-лимфоцитов (Benvenuto F. et al., 2015, Takizawa N. et al., 2017). Прикрепление иммунных клеток к ММСК в области высокой концентрации экспрессируемых молекул ICAM-1 может приводить к апоптозу, нарушению клеточного цикла или изменению фенотипа (Liu S. et al., 2020).

В последние годы все больше и больше исследований показали, что коингибирующие молекулы программируемой смерти (PD-1) и галектины также связаны с иммунорегуляторной способностью ММСК.

Галектины известны как семейство связывающих β -галактозид лектинов, экспрессирующихся на поверхности различных клеток. Галектины опосредуют многие биологические процессы, включая регуляцию роста клеток, апоптоз, сплайсинг пре-мРНК, межклеточную адгезию и адгезию клеточного матрикса, а также полярность клеток, подвижность, дифференцировку, трансформацию и передачу сигналов, а также врожденный / адаптивный иммунитет (Chou F.C. et al., 2018, Ruvolo P.P. 2019).

Было показано, что ММСК постоянно экспрессируют галектин-1 галектин-3 и галектин-9 (Zhang Y. et al., 2017, Lim H. et al., 2020). В присутствии мультивалентных лигандов галектины могут образовывать пентамеры. Благодаря этой способности к олигомеризации галектины могут сшивать лиганды поверхности клеток и воздействовать на межклеточные сигнальные пути, не только благодаря их природным свойствам (структуре, стабильности и т.д.), но, главным образом, способности активации статуса гликозилирования клеток-мишеней (Laderach D.J. et al., 2010). Подавление экспрессии галектина-1, галектина-3, галектина-9 с помощью антител или малых интерферирующих РНК приводит к снижению иммуносупрессивных свойств ММСК в сокультуре с аллогенными Т-клетками (Sioud M., 2011a, Sioud M. et al., 2011b, Zhou K. et al., 2018). Добавление в сокультуру ММСК и МПК экзогенной β -лактозы, конкурентного ингибитора связывания галектинов с поверхностью клеток, приводит к уменьшению иммуносупрессивных свойств ММСК в отношении CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов, но не НК. Было показано также, что галектин-1 может способствовать дифференцировке ДК, в процессе которой они секретируют IL-27 и IL-10 и, таким образом, могут влиять на толерантность Т-лимфоцитов. Ингибирование синтеза галектина-1 и галектина-3 снижает продукцию IL-10 в супернатантах культур МПК (Sioud M., 2011a, Sioud M. et al., 2011b).

Клеточный рецептор PD-1, а также его лиганд PD-L1 также играют жизненно важную роль в гомеостазе Т-лимфоцитов. Было обнаружено, что ММСК обладают высоким уровнем экспрессии PD-L1, который играет важную роль в предотвращении активации Т-лимфоцитов посредством индукции апоптоза. (Kim J.Y. et al., 2018). Показано, что в присутствии PD-L1 в CD4⁺ Т-лимфоцитах происходило снижение фосфорилирования киназой АКТ остатка T308 и возрастание экспрессии FOXP3, которое восстанавливалось при блокировании PD-L. В присутствии ММСК под действием PD-L1 происходило подавление активации в Т-лимфоцитах, индукция их необратимой гипореактивности и апоптоза, снижение секреции IL-2 (Davies L.C. et al., 2017). Исследования взаимодействия PD-1 / PD-L1 между ММСК и Т-лимфоцитами

показали также, что ММСК ингибируют их дифференцировку в клетки Th17, но не влияют на продукцию IL-17 зрелыми клетками Th17 (Luz-Crawford P. et al., 2012). Блокирование передачи сигналов PD-L1 на ММСК значительно снижает иммуносупрессивные способности ММСК (Zhou K. et al., 2018). Кроме того, было обнаружено что ММСК секретируют PD-L1 и PD-L2 в супернатант (Zhou K. et al., 2018). Исследования также показали, что PD-1, экспрессируемый на ММСК, необходим для поддержания свойств стволовых клеток ММСК (Liu Y. et al., 2018).

Толл-подобные рецепторы (TLR) также могут участвовать в механизмах проявления иммуносупрессивных эффектов, опосредованных ММСК. TLR – это семейство консервативных мембранных белков, узнающих патоген-ассоциированные молекулярные структуры и способствующих активации клеток системы врожденного иммунитета. Общей сигнальной особенностью TLR является активация ядерного транскрипционного фактора NF-κB, который участвует в контроле экспрессии воспалительных цитокинов и молекул, необходимых для функционального созревания клеток иммунитета. Было показано, что ММСК экспрессируют молекулы TLR (Rashedi I. Et al., 2017, Abdi J. et al., 2018). Активация ММСК лигандами к TLR стимулирует секрецию IL-6 и транслокацию NF-κB в клеточное ядро. Липополисахариды вызывают активацию NF-κB в ММСК, а также секрецию IL-6, IL-8 и CXCL10 (Jafari M. et al., 2020) . Однако в сокультуре ММСК и Т-лимфоцитов липополисахариды значительно снижают супрессивные функции ММСК. Проведенные исследования выявили, что связывание TLR3 и TLR4 на поверхности ММСК приводит к снижению супрессивного эффекта на пролиферацию Т-лимфоцитов посредством ингибирования экспрессии Jagged-1, который является лигандом белка Notch. Соответственно подавляется проведение сигнала через Notch внутрь Т-клеток, что негативно влияет на их созревание и активацию. Также установлено, что TNF-α является критическим модулятором NF-κB в ММСК за счёт взаимодействия с рецептором TNFR. Полученные результаты подтверждают предположение о том, что активация NF-κB через TLR и TNFR, экспрессирующихся на ММСК, может

подавлять пролиферацию Т-лимфоцитов, созревание ДК, вызывать апоптоз НК (Pevsner-Fischer M. et al., 2007, Tomchuck S.L. et al., 2008, Liotta F. et al., 2008, Crisostomo P.R. et al., 2007, Yagi H. et al., 2010, Petri R.M. et al., 2017).

Предполагаемые молекулярные механизмы этапов многоступенчатого процесса взаимодействия ММСК с актМПК с передачей сигналов от одних клеток к другим представлены на рисунке 1.8.

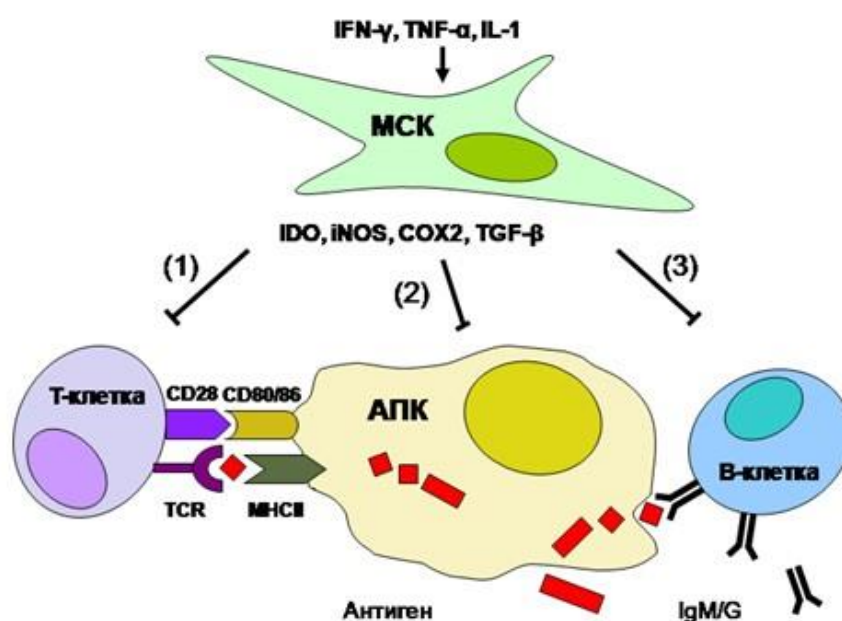


Рисунок 1.8. Молекулярные механизмы многоступенчатого процесса взаимодействия ММСК и иммунокомпетентных клеток. Провоспалительные цитокины активируют в ММСК синтез молекул, которые определяют иммуносупрессивное действие ММСК (предположительно IDO, COX2, iNOS, TGF-β). Обозначены возможные варианты воздействия ММСК на лимфоциты. (1) ММСК подавляют активацию и пролиферацию Т-лимфоцитов. (2) ММСК замедляют дифференцировку и созревание дендритных клеток в антиген-презентирующие клетки (АПК) за счет снижения уровня экспрессии в них коstimуляторных (CD80/86) и антиген-презентирующих (МНС II) молекул. (3) ММСК угнетают пролиферацию В-клеток, дифференцировку их в плазматические клетки, а также секрецию ими иммуноглобулинов IgM/G1. Устранение одного из указанных путей не приводит к исчезновению остальных и общего иммуносупрессивного действия ММСК.

1.4. Регенеративный потенциал ММСК при воспалительных заболеваниях *in vivo*

1.4.1. Трансплантация ММСК *in vivo*

Клеточная терапия с использованием как аутологичных, так и аллогенных ММСК рассматривается сейчас как многообещающий инструмент восстановительной терапии. ММСК представляют собой удобный инструмент для таких воздействий. Это обусловлено относительной безопасностью терапевтического применения ММСК, отсутствием многих ограничений, возникающих при использовании эмбриональных, фетальных и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. Возможность использования ММСК для лечения широкого спектра заболеваний обусловлено также доступностью материала для выделения этих клеток, их высокой пролиферативной активностью в культуре, возможностью использования ММСК для аллогенных трансплантаций. ММСК могут выполнять в очаге воспаления регуляторную функцию по отношению к другим клеткам, экспрессируя и секретируя необходимые факторы. Будучи восприимчивы к внешним сигналам, они могут динамично менять свой экспрессионно-секреторный профиль в зависимости от текущих условий. ММСК обладают выраженными иммуносупрессивными свойствами, значительным дифференцировочным потенциалом, способностью к направленной миграции в очаг повреждения, множественными паракринными эффектами. Наконец, введенные *извне*, эти клетки могут также служить средством адресной доставки биологически активных молекул и/или генетического материала.

Использование этих клеток в регенеративной медицине представляется весьма перспективным, особенно при терапии заболеваний, неподдающихся лечению стандартными методами.

Существующие сейчас данные позволяют предположить, что неспособность поврежденных тканей к полноценной регенерации, приводящая к развитию

хронического воспаления связана отчасти с недостаточной численностью и/или функциональной активностью ММСК в очаге воспаления. Действуя против факторов, вызывающих развитие хронического воспаления в очаге повреждения, ММСК могут вносить критический вклад в полноценность восстановления ткани.

Решение вопросов, связанных с выяснением функциональных особенностей этих клеток, повышением эффективности их попадания в зону воспаления и выполнением в ней своих задач является основной задачей экспериментальной регенеративной медицины.

Однако следует отметить, что, по-видимому, молекулярные механизмы, посредством которых ММСК способствуют восстановлению поврежденных тканей в собственном организме, в значительной мере будут отличаться от воздействий, оказываемых культивированными *ex vivo* и введенными извне ММСК. В особенности при аллогенных и ксеногенных трансплантациях ММСК.

Этот вывод подтверждают результаты многочисленных экспериментов *in vivo* с использованием животных моделей и клинических испытаний с использованием культивированных ММСК.

1.4.2. ММСК и аллогенное узнавание

В настоящее время накоплено достаточное количество данных о том, что трансплантированные аллогенные ММСК могут быть обнаружены в организме реципиента продолжительное время и избегают узнавания аллореактивными клетками (Meleshko A. et al., 2013, Lacitignola L. et al., 2014, Taketani T. et al., 2015, Mao A.S. et al., 2019).

Установлено, что аллогенные ММСК способствуют образованию кости при пересадке мышам, крысам, свиньям. Однако при этом на периферии вновь образованных костей обнаруживаются инфильтраты, содержащие лимфоциты. Однако аллогенные кости не отторгаются, несмотря на привлечение лимфоцитов, что подтверждает предположение о том, что аллогенные ММСК могут уклоняться от иммунного ответа (Djouad F. et al., 2003, Venkataiah V.S. et al., 2019, Longoni A.

et al., 2020).

Кроме того, было показано, что внутривенное введение ММСК костного мозга продлевает сроки отторжения аллогенных трансплантатов кожи. Это свидетельствует об их возможном применении и роли в реакции трансплантат против хозяина. Однократное введение ММСК при пересадке кожи приводило к эффекту, сопоставимому с эффектом применяемых в этих случаях фармакологических иммуносупрессоров, используемых в клинике. Повторное введение ММСК не вызвало увеличение иммуносупрессивного эффекта (Ossevoort M.A. et al., 1999, Roemeling-van Rhijn M. et al., 2013, Ma T. et al., 2018).

Использование ММСК для регенеративной терапии в доклинических моделях аутоиммунных или дегенеративных заболеваний дает возможность изучения миграции экзогенных ММСК. В ряде исследований был продемонстрирован хоуминг ММСК в участки повреждения тканей (Jackson J.S. et al., 2010, Assis A.C. et al., 2010, Eggenhofer E. et al., 2014). Миграция ММСК в такие участки может зависеть от хемотаксических сигналов, посылаемых из них. Исследование с использованием модели острого повреждения почек показало, что миграция ММСК в поврежденную почку зависит от уровня экспрессии CD44 (Herrera M.V. et al., 2007). Экспрессия хемокинового рецептора CXCR4 на MSC усиливает хоуминг ММСК в поврежденные почки (Liu N. et al., 2013).

Миграция ММСК при трансплантациях, вероятно, зависит и от способа введения. В большинстве исследований используют внутривенное введение ММСК, при котором основная часть клеток оказывается в легких (Barbash I.M. et al., 2003, Fischer U.M. et al., 2009, Assis A.C. et al., 2010, Eggenhofer E. et al., 2012). Через 24 ч после введения ММСК перемещаются в другие органы, в частности, в печень и селезенку (Kraitchman D.L. et al. 2005, Assis A.C. et al., 2010). Однако некоторые исследователи предполагают, что ММСК, которые покидают легкие, уже не жизнеспособны (Assis A.C. et al., 2010). Но быстрое исчезновение ММСК после трансплантации вовсе не исключает функционального эффекта клеток. Например, было продемонстрировано, что фагоцитоз мертвых ММСК индуцирует появление макрофагов с регуляторным фенотипом (Lu W. et

al., 2013, de Witte S.F.H. et al., 2018, Weiss A.R.R., Dahlke M.H., 2019). Также не исключено, что некоторая часть клеток ускользает от элиминации и отвечает за терапевтический эффект ММСК.

1.4.3. Исследования регенеративного потенциала ММСК на животных моделях

Многие животные модели хорошо подходят для изучения физиологических механизмов заживления ран. Однако адаптация животных моделей животных для изучения механизмов хронического воспаления и доклинического тестирования различных препаратов привела к многочисленным нестандартизированным вариациям, которые очень затрудняет интерпретацию результатов и сравнительный анализ существующих данных. Это серьезная проблема, поскольку на очень сложный биологический процесс влияют многие переменные, включающие возраст, половые различия, нарушения метаболизма, микробиоту (Elliot S. et al., 2018).

Так Ansell et al. (2018) продемонстрировали, что при стрептозотоцин-индуцированном диабете у мышей половые различия и продолжительность диабета оказывают драматическое влияние на скорость заживления ран.

Однако некоторые животные модели демонстрируют практическую ценность в других случаях нарушений регенеративных процессов, следствием которых также является развитие хронического воспаления.

Способность ММСК проявлять иммуносупрессивные свойства *in vivo* проверена на экспериментальных животных моделях аутоиммунных заболеваний человека: диабета, экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (рассеянный склероз), системной красной волчанки и ревматоидного артрита.

В модели рассеянного склероза (экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита мышей) внутривенное введение ММСК предотвращало развитие выраженных неврологических симптомов (Zappia E. et al., 2005, Constantin G. et al., 2009, Rafei M. et al., 2009, Shu J. et al., 2018). Предложенная

терапевтическая схема была эффективна только при введении ММСК до начала появления признаков заболевания и на пике болезни, но не в период стабилизации. Анализ патологии центральной нервной системы продемонстрировал снижение воспалительной инфильтрации и уменьшение демиелинизации нервных волокон у мышей, подвергшихся трансплантации ММСК. Этот эффект может быть косвенно связан с иммунной супрессией Т-лимфоцитов, снижением продукции IFN- γ , TNF- α , IL-1 β и IL-17A (Zappia E. et al., 2005, Shu J. et al., 2018).

В модели системной красной волчанки (эритроматозе у мышей) введение ММСК приводило к существенным улучшениям, проявляющимся в реконструкции ниш остеобластов, восстановлении иммунного гомеостаза, увеличению сроков возникновения протеинурии (Sun L. et al., 2009, Tanì C. et al., 2017, Wu K.H. et al., 2020).

Использование ММСК человека положительно сказывается при ксеногенной трансплантации мышам с ревматоидным артритом, вызванным введением коллагена. Терапевтический эффект проявился в уменьшении симптомов локального воспаления суставов, в снижении пролиферации антигенспецифических Th1/Th17 эффекторных Т-лимфоцитов, повышении секреции IL-10 и образовании CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg клеток в сочетании с супрессией аутореактивного ответа (Gonzalez M.A. et al., 2009). Недавние данные с использованием сингенных и аллогенных ММСК показали, что ММСК могут локально уменьшать клинические симптомы воспаления в суставах посредством секреции антипролиферативных медиаторов и системно смещать иммунный ответ хозяина к образованию преимущественно Th2 (Ghannam S. et al., 2010, Zhang Q. et al., 2019, Liu L. et al., 2020).

Аутоиммунный диабет является следствием дисфункции иммунитета в части поддержания периферийной и центральной толерантности. ММСК могут оказывать положительный терапевтический эффект при аутоиммунном диабете посредством участия в регуляции баланса Treg-клетки/аутореактивные Т-лимфоциты. Позитивное влияние ММСК при диабете впервые было выявлено в

экспериментах по введению ММСК человека иммунодефицитным NOD/SCID мышам, в которых заболевание было индуцировано стрептозоцином. При введении ММСК человека у экспериментальных мышей было обнаружено увеличение панкреатических островков и количества бета клеток, производящих инсулин, уменьшение инфильтрации макрофагами пораженных панкреатических островков по сравнению с контрольными животными, которым не вводили ММСК. В почках животных-реципиентов было обнаружено также некоторое количество эндотелиальных клеток человеческого происхождения. Роль ММСК, как предполагают, заключается в регенерации эндогенных инсулин-секретирующих клеток и в супрессии иммунных реакций Т-лимфоцитов против вновь сформированных бета-клеток (Lee R.H. et al., 2006, Urban V.S. et al., 2008, Xie Z. et al., 2016, Li G. et al., 2020).

Модулирующая роль ММСК показана также и для такого нарушения регенеративного процесса как образование фиброзной ткани. Введение ММСК в процессе формирования фиброза кожи, вызванного блеомицином, приводило к повышению выработки металлопротеиназ в очаге поражения, ослаблению пролиферации и дифференцировки миофибробластов, а также образованию сходного по структурной организации в нормальной коже коллагена I типа (Wu Y. et al, 2013). Было также показано, что введение ММСК человека облегчает альбуминурию, снижает повреждение клубочков и фиброз почек при диабетической нефропатии у мышей с диабетом, индуцированным стрептозотоцином. В этих экспериментах паракринные факторы, выделяемые ММСК, способствовали снижению отложения фибронектина и коллагена I путем ингибирования трансдифференциации миофибробластов, запускаемого TGF- β 1, и пролиферации клеток, опосредованной сигнальными путями PI3K / Akt и MAPK, а также повышению уровней MMP2 и MMP9 (Li H. et al., 2020)

1.4.4. Клинические исследования регенеративного потенциала ММСК

Терапевтический потенциал ММСК в настоящее время проходит проверку в

I/II и III фазах ряда клинических испытаний, некоторые из которых были недавно завершены или находятся в стадии реализации (Galipeau J., Sensébé L., 2018 Rodríguez-Fuentes D.E. et al., 2020). Согласно доступным данным по клиническим испытаниям в Соединенных Штатах (<http://clinicaltrials.gov>), около 1000 клинических испытаний в настоящее время исследуют безопасность и эффективность применения ММСК для широкого диапазона патологий.

Так внутрикоронарная инъекция ММСК пациентам с острым инфарктом миокарда приводила к улучшению сократительной способности миокарда в зоне инфаркта. Фракция выброса левого желудочка была выше в группе терапии ММСК по сравнению с контролем в продолжение 3 месяцев с начала обследования (Chen S.L. et al., 2004, Gao L.R. et al., 2013, Lee J.W. et al., 2014, Lalu M.M. et al., 2017, Bartolucci J. et al., 2017, Bolli R. et al., 2019).

С учетом многообещающих результатов, полученных на модели эритроматоза мышей, четырем пациентам, невосприимчивым к стандартной терапии системной волчанки, была проведена терапия аллогенными ММСК. У пациентов наблюдали стабильную ремиссию заболевания на срок от 12 до 18 месяцев, улучшение серологических маркеров и функции почек. Полученные данные показали, что инфузия ММСК вызывала восстановление популяции Foxp3⁺ клеток до контрольного (нормального) уровня и у мышей, и у пациентов (Sun L. et al., 2009). В другом исследовании после одной внутривенной инфузии аллогенных ММСК у пациентов с системной красной волчанкой не было выявлено никаких побочных явлений, связанных с трансплантацией. Показатели активности заболевания, уровни аутоантител в сыворотке крови и фрагменты компонентов комплемента значительно снизились. У 32,5% (13/40) пациентов удалось достичь значительного уменьшения значений по шкале, учитывающей динамику активности заболевания (Sharma J. et al., 2017).

В терапии болезни Крона местные перианальные инъекции ММСК не вызывали побочных явлений. Введение ММСК вызывало заживление перианальных свищей у значительного числа пациентов (Molendijk I. et al., 2015, Al-Maawali A.K. et al., 2016). У 14% пациентов была достигнута ремиссия

заболевания (Melmed G.Y. et al., 2015).

Внутривенные инъекции ММСК, выделенных из плаценты, пациентам с ремиттирующим и вторично-прогрессирующим рассеянным склерозом приводили к стабилизации или уменьшению значений по расширенной шкале оценки степени инвалидизации (Lublin F.D. et al., 2014).

У пациентов с диабетом I типа трансплантация ММСК, выделенных из пуповины или костного мозга, через панкреатическую артерию была безопасной и ассоциировалась с умеренным улучшением метаболических показателей. Спустя 1 год после введения ММСК у пациентов наблюдалось повышение концентрации С-пептида в крови, увеличение значений площади под кривой «концентрация – время» для инсулина, снижение концентрации гликозилированного гемоглобина в плазме. Наблюдалось снижение суточной потребности в инсулине (Carlsson P.O. et al., 2015, Cai J. et al., 2016).

У пациентов с диабетом II типа внутривенные инъекции аутологичных и аллогенных ММСК костного мозга и пуповины также приводили к улучшению вышеуказанных метаболических показателей. Отмечалось также значительное увеличение индекса чувствительности к инсулину, сопровождающееся увеличением экспрессии гена субстрата-1 инсулинового рецептора (Skyler J.S. et al., 2015, Hu J. et al., 2016, Bhansali S. et al., 2017).

В дополнение к вышесказанному согласно доступным данным в настоящее время в Соединенных Штатах зарегистрированы 10 клинических исследований безопасности и эффективности применения ММСК в терапии хронических ран различной этиологии. Закончены испытания аутологичных ММСК костного мозга в терапии хронических ран, проведенные на базе медицинского центра Роджера Уильямса в Род Айленде, США (NCT01751282), в терапии пациентов с критической ишемией нижних конечностей, проведенных на базе Сердечного и диабетического центра Нордхайна Вестфалена в Бад-Эйнхаузене, Германия (NCT01065337), а также испытания ММСК пуповины в терапии кожных ран большой площади, проведенные в Китайском госпитале PLA в Пекине, Китай (NCT02669199). Продолжаются испытания аутологичных и аллогенных ММСК

костного мозга и жировой ткани в терапии незаживающих ран, венозных язв, синдрома диабетической стопы, ожогов, проводимые в Германии (NCT02742844, NCT03257098, NCT03267784), Дании (NCT03509870), США (NCT02104713, NCT00815217), Китае (NCT02672280). К сожалению, на данный момент отсутствуют доступные опубликованные данные, полученные в результате этих клинических исследований.

1.5. Модели для поиска ключевых молекул и терапевтических мишеней, участвующих в регенерации тканей на разных стадиях развития организма

Во взрослом организме заживление поврежденных тканей происходит с образованием рубцовой ткани (фиброза). В случае хронического воспаления такое развитие событий является желательным результатом, приводящим к физическому закрытию участка повреждения. При таком развитии событий полной регенерации с восстановлением архитектуры, организации и функциональных свойств ткани не происходит.

Известно, что у человека регенеративный потенциал снижается с возрастом и полноценное восстановление поврежденных тканей не происходит. Это особенно видно на примере поверхностных ран. Если у взрослых людей заживление приводит к образованию рубцовой ткани за счет избыточного накопления хаотично расположенных волокон коллагена, то у младенцев рубец менее выражен и с годами может исчезнуть. Более того, в отличие от взрослых, фетальные ткани способны к полной регенерации. Заживление ран фетальной кожи происходит с полным восстановлением архитектуры, организации и функциональных свойств. До третьего триместра беременности у плода специфические механизмы стимулируют заживление ран в отсутствие воспалительного процесса без образования рубца (Botting R.A., Haniffa M., 2020). Однако к концу беременности способность к полной регенерации исчезает. Этот переход от заживления повреждений без образования рубца к заживлению с образованием рубца происходит примерно на 24 неделе беременности у человека и на 18 день беременности у мышей (Colwell A.S. et al., 2003, 2006, Moore A.L. et al., 2018, Yin J.L. et al., 2020). Внутриутробные компоненты: стерильная амниотическая жидкость, богатая гиалуроновой кислотой, высокая концентрация ростовых факторов, низкая дифференциация клеток в тканях приводят к полной регенерации (Colwell A.S. et al., 2003, Helmo F.R. et al., 2013).

Определение критических факторов (молекул), влияющих на течение воспалительного процесса, участвующих в инициации и регуляции

внутриклеточных сигнальных каскадов и управляющих поведением клеток в процессе восстановления поврежденных фетальных тканей, позволит осуществлять принципиально новые подходы к созданию лекарственных препаратов для стимуляции регенеративных процессов в тканях при многих заболеваниях.

Современные исследования, сосредоточенные на клеточных и молекулярных аспектах заживления ран плода, могут быть разделены на основные категории, включающие факторы роста, цитокины, экстрацеллюлярный матрикс и стволовые клетки (Leung A. et al., 2012, Moore A.L. et al., 2018). Огромный пласт исследований посвящен нарушениям регенерации тканей, ассоциированных с мутациями в генах. Анализ экспрессионных профилей на разных стадиях репаративного процесса (Shaw T.J., Martin P., 2009), а также использование трансгенных моделей (Grose R., Werner S., 2004) показали, что нет одного или нескольких факторов, которые определяют высокую эффективность регенерации. Регенерация достигается в результате комбинации природных факторов, изначально характерных для ткани, и микроокружения.

Феномен регенерации фетальных тканей подтверждает, что воспаление не является критичным и полноценное восстановление может происходить без избыточной мобилизации резервов организма. Это сужает круг искомым биомолекул и направляет их поиск на локальные источники. С высокой вероятностью ими могут быть клетки-предшественники, которыми богаты ткани плода и плаценты матери. Резидентные, или мобилизованные из других ниш, эти клетки, скорее всего, и являются источником тех необходимых факторов, которые под действием локальных сигналов определяют восстановление морфологии и функций живой ткани.

В настоящее время физиологические, клеточные и молекулярные механизмы регенерации фетальных тканей остаются практически неизвестными.

Казалось бы, природа сама дает естественную модель для поиска важнейших факторов и мишеней. Однако подобные исследования сильно ограничиваются моральными аспектами и этическими проблемами в отношении

человека, практически недоступностью материала и объектов для изучения, но вполне возможны с использованием адекватных животных моделей.

Разработка методов получения и культивирования ЭСК (Evans M.J. et al., 1981; Thomson J.A. et al., 1998), а также успешное репрограммирование соматических клеток факторами Oct3/4, Sox2, Klf4, and c-Myc в плюрипотентное состояние, сходное с ЭСК (Takahashi K. et al., 2006) стали началом новой эры исследований. Новые технологии, основанные на использовании ЭСК и ИПСК, позволяют создать модели для изучения молекулярных механизмов регенерации на различных стадиях развития организма, благодаря возможности воспроизведения процессов эмбриогенеза *in vitro*.

Благодаря технологии получения ИПСК от пациентов и возможности их дифференцировки в клетки практически всех типов, могут быть созданы клеточные модели для любых, в том числе редких, заболеваний (Sharma A. et al., 2020). Этот аспект весьма актуален, т.к. в большинстве случаев вызываемые мутацией нарушения начинают проявляться только при дифференциации клеток и никак не проявляются в их предшественниках. С другой стороны технологии ИПСК позволяют моделировать многие болезни старческой возрастной группы, такие как болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона, с помощью искусственного ускорения появления патологических фенотипов в клетках под воздействием внешних факторов, например, оксидативного стресса (Некрасов Е.Д. и др., 2011, Богомазова А.Н. и др., 2015, Chestkov I.V. et al., 2014, Nekrasov E.D. et al. 2016, Panova A.V. et al., 2020, Kouroupi G. et al., 2020, Garcia-Leon J.A. et al., 2020).

Для лучшего понимания процессов дифференцировки плюрипотентных клеток в клетки взрослого организма исследователям необходимо повторить события, происходящие в ходе эмбриогенеза.

На ранних стадиях развития эмбриона в стволовых клетках внутренней массы бластоцисты запускаются сигнальные каскады, приводящие к полному изменению профиля белков клеток. По мере развития эмбриона плюрипотентные клетки внутренней клеточной массы бластоцисты дают начало клеткам

зародышевых лепестков экто-, энто- и мезодермы. И по мере дифференциации стволовых клеток меняется и их фенотип: от примитивного, присущего клеткам внутреннего слоя бластоцисты, до фенотипа клеток в конечных стадиях дифференциации – зрелых клеток. ЭСК начинают экспрессировать эктодермальный маркер нестин, мезодермальный маркер ренин, и энтодермальные маркеры α - фетопротейн и GATA6. При этом ЭСК теряют белки - маркеры стволовости и плюрипотентности и начинают синтезировать белки, присущие прогениторным (клеткам-предшественникам зрелых клеток органов и тканей) и зрелым соматическим клеткам. Дифференцировка прогениторных клеток проходит в несколько стадий, характеризующихся определенными изменениями экспрессионного профиля. Так ЭСК, полученные из внутренней массы клеток бластоцисты человека, экспрессируют уникальные гликофосфолипидантигены SSEA-3, SSEA-4, представляющие комплекс олигосахарида с фосфолипидом, а также гликопротеиды TRA-1-60, TRA-1-8, транскрипционные факторы плюрипотентности Oct-4 и NANOG, и щелочную фосфатазу. Также ЭСК характеризуются высокой активностью теломеразы, высокий уровень активности которой необходим для непрерывного наращивания теломерных повторов ДНК на концах хромосом, благодаря чему клетки приобретают способность бесконечно долго делиться (Sidhu K.S., Tuch B.E. 2006, Vazin T., Freed W.J., 2010).

При формировании примитивных эмбриональных структур плюрипотентные клетки претерпевают существенные изменения. Клетки эпибласта интенсивно делятся и смещаются по направлению к центру и вглубь, образуя первичную полосу и давая начало формированию презумптивных энтодермы и мезодермы. В период гаструляции начальные стадии мезодермальной дифференцировки плюрипотентных клеток регулируются несколькими транскрипционными и ростовыми факторами, участвующими в регуляции первичного эпителиомезенхимного перехода. Эти события сопровождаются потерей клетками молекулы адгезии эпителиальных клеток CD326 и повышением экспрессии молекулы адгезии нервных клеток CD56

(Evseenko D. et al., 2010), индукцией синтеза транскрипционных факторов Zeb1, Zeb2 и Snail (Luzzani C. et al., 2015).

1.5.1. Общая характеристика индуцированных плюрипотентных стволовых клеток

Клетки организма в процессе онтогенеза, начиная с оплодотворенной яйцеклетки, постепенно дифференцируются, теряя дифференцировочный потенциал, превращаясь в различные специализированные типы клеток. В норме это однонаправленный процесс.

Однако в настоящее время разработаны способы возвращения соматических клеток в плюрипотентное состояние, сходное с ЭСК, с помощью трансдукции сочетанием транскрипционных факторов Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc. Репрограммированные таким способом клетки получили название ИПСК (Takahashi K. et al., 2006, 2007) (рисунок 1.9).

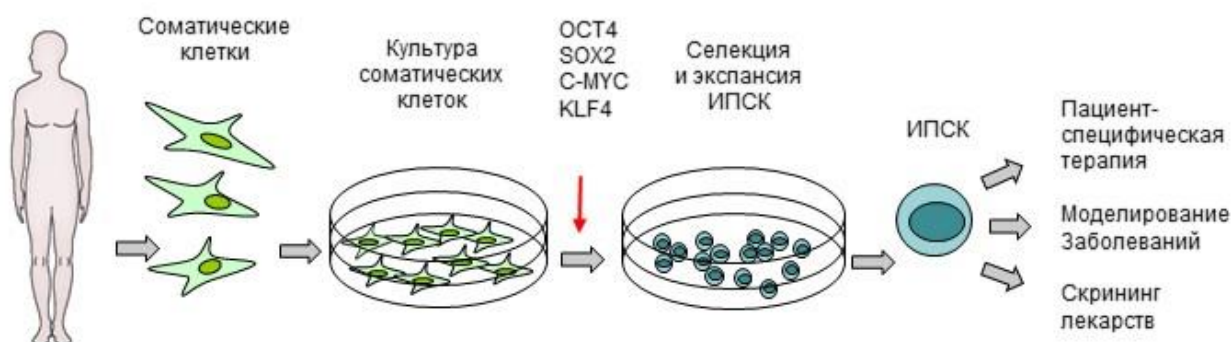


Рисунок 1.9. Репрограммирование соматических клеток в плюрипотентное состояние. Адаптировано из (Yamanaka S., Blau H.M., 2010).

Транскрипционный фактор Oct4 - ключевой фактор плюрипотентности,

который кодируется геном *Pou5f1* (Takeda J. et al., 1992). Этот фактор необходим для самообновления плюрипотентных клеток, любое изменение в его экспрессии приводит к потере «стволовости» (Zaehres H. et al., 2005). Также фактор *Oct4* осуществляет регуляцию собственного гена в составе комплекса транскрипционных факторов *Sox2/Oct4/Nanog*. *Sox2* - транскрипционный фактор, уровень экспрессии которого очень высок в клетках эмбриона на ранних стадиях развития, он экспрессируется в эмбриональных и экстраэмбриональных тканях зародыша, в клетках-предшественниках нейральных клеток, участвует в поддержании плюрипотентного состояния ЭСК наравне с *Oct4*. Экспрессия транскрипционных факторов и *Sox2* регулируется протоонкогеном *Klf4*, который опосредованно участвует в поддержании плюрипотентности (Jiang J. et al., 2008). Сочетание этих факторов активирует и ген *Nanog* (Sharov A.A. et al., 2008), экспрессия которого характерна для недифференцированных клеток (Hatanou S.Y. et al., 2005). В дальнейшем было показано, что с комплексом *Sox2/Oct4/Nanog* может взаимодействовать четвёртый транскрипционный фактор *c-Myc* (Chickarmane V. et al., 2006; Medeiros R.B. et al., 2009). Транскрипционные факторы *Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*, *Nanog* формируют сеть взаимодействий, необходимых для поддержания самообновления и плюрипотентности ЭСК.

Несмотря на разнообразие интеграционных и неинтеграционных методов репрограммирования и на широкий круг типов клеток, способных к репрограммированию, получаемая в итоге клеточная линия должна соответствовать по своим характеристикам ЭСК.

Используемые в настоящее время критерии (иммунологические маркеры, экспрессия генов плюрипотентности, уровень метилирования ДНК, образование тератомы) делают линии ИПСК неотличимыми от линий ЭСК. Однако некоторые неконтролируемые стохастические события во время репрограммирования несомненно влияют на экспрессию генов и паттерны метилирования ДНК даже в функционально идентичных линиях ИПСК. Было обнаружено, что такими генами являются *Meg3* и *Notch1*, влияющими на процесс перепрограммирования, а также 5 генов из семейства металлотионеинов, расположенных в хромосоме 16, что

указывает на вовлечение этих локусов в процесс репрограммирования (Shutova M.V. et al., 2016).

Недифференцированное состояние плюрипотентных клеток характеризуется различными признаками. ИПСК и ЭСК имеют характерную морфологию. Колонии ИПСК и ЭСК человека плоские и имеют ровный край. Клетки внутри колонии связаны плотными контактами. Для ИПСК и ЭСК характерно высокое ядерно-цитоплазматическое отношение, т.е. крупное ядро и небольшой объем цитоплазмы (Shutova M.V., et al., 2009, Lagarkova M.A. et al., 2010, Chestkov I.V. et al., 2014). ИПСК, также как и ЭСК, обладают способностью к неограниченному самообновлению.

Недифференцированные плюрипотентные стволовые клетки человека характеризуются высокой активностью щелочной фосфатазы (Takahashi K. et al., 2007), теломеразы (Huang J. et al., 2011), экспрессией протеогликанов TRA-1-60 и TRA-1-81 (Lowry W.E. et al., 2008) и гликолипида SSEA-4 (Panova A.V. et al., 2020) и в меньшей степени гликолипида SSEA-3 (Park I.-H. et al., 2008), которые характерны только для плюрипотентных клеток человека и приматов.

Внутриклеточными маркерами недифференцированного состояния являются транскрипционные факторы, необходимые для поддержания плюрипотентности ИПСК и ЭСК, такие как Oct4, Nanog и Sox2 (Maherali N. et al., 2007, Yu J. et al., 2007, Brambrink T. et al., 2008, Lagarkova M.A. et al., 2010, Chestkov I.V. et al., 2014, Panova A.V. et al., 2020). В идеале в ИПСК не должна обнаруживаться экспрессия транскрипционных факторов, но в ИПСК, также как и в ЭСК, должно происходить деметилирование ДНК в промоторах генов плюрипотенции (Maherali N. et al., 2007, Lagarkova M.A. et al., 2010).

ИПСК также обладают способностью дифференцироваться в клетки трех зародышевых листков. После культивирования ИПСК *in vitro* человека в отсутствие факторов, поддерживающих плюрипотентность, в дифференцировавшихся клетках обнаруживается экспрессия маркеров эндодермы, мезодермы и эктодермы (Sun N. et al., 2009, Philonenko E.S. et al., 2017). Функциональным тестом на плюрипотентность ИПСК *in vivo* является

образование тератом при введении их иммунодефицитным (SCID) мышам. В таких тератомах обнаруживаются клетки таких тканей как кишечный эпителий, хрящ, кость, гладкие мышцы, нейроны (Takahashi K. et al, 2007; Brambrink T. et al., 2008).

1.5.2. Дифференцировка ИПСК в мезодермальном направлении

Мезенхимные ткани являются важнейшими компонентами любого органа. Однако мезенхимальные клетки функционально и эволюционно принадлежат к различным популяциям. Недавние достижения в технологиях ИПСК продемонстрировали возможность получения различных типов популяций мезенхимальных клеток, включая гемопоэтические клетки, ММСК, перициты, гладкомышечные клетки, остеобласты, кардиомиоциты и др. (Lagarkova M.A. et al., 2010, Kimura M. et al., 2019, Wang Y. et al., 2020).

Однако к настоящему времени практически отсутствуют данные о маркерах, характеризующих мезенхимальные предшественники на ранних стадиях эмбриогенеза. Более того, из-за фундаментальных различий в развитии мышей и людей критически важно оценить, как мезенхимальные клетки развиваются в онтогенезе человека (Rossant J., Tam P.P.L., 2017). Идентификация общего мезодермального предшественника, мезангиобласта, была бы важной вехой на пути к решению этих проблем (Vodyanik M.A. et al., 2010, Slukvin I.I., Kumar A., 2018).

Дифференцируя ИПСК в мезодермальном направлении Vodyanik et al. выявили новый клональный предшественник эндотелиальных и мезенхимальных клеток, идентифицированный по способности образовывать компактные сфероидные колонии в полутвердой среде с добавлением FGF2 и дифференцироваться в эндотелиальные клетки и ММСК. Такие колонии появлялись очень рано, на 2-й день дифференцировки, резко уменьшались на 3-й день и полностью исчезали на 4-й день дифференцировки. Предполагается, что такие колонии являются самыми ранними клоногенными мезодермальными

предшественниками, которые указывают на возникновение эндотелио- и мезенхимогенеза в культурах ИПСК. Формирование таких колоний зависело исключительно от FGF2, но не от других факторов (VEGF, SCF, IGF1, EGF и HGF), и требовало бессывороточной среды. Добавление PDGF-BB к клоногенной среде с добавлением FGF2 увеличивало частоту и размер колоний. Напротив, TGF-1 или активин А полностью устраняли образование колоний. Анализ транскрипционного профиля клеток показал, что экспрессия рецептора APLNR (рецептор ангиотензина-1) сильно индуцировалась и усиливалась на 2–3 день дифференцировки одновременно с мезодермальной детерминацией и колониеобразующей активностью. В клетках APLNR+ была обнаружена экспрессия генов FOXF1, IRX3, BMP4, WNT5A, HAND1 и HAND2, но отсутствовала экспрессия генов MEOX1, TCF15, PAX3, PAX7, PAX2, PAX8, характерных для мезодермы в эмбрионе (Vodyanik M.A. et al., 2010).

В другом исследовании фенотипический анализ клеток APLNR + на 2-й день дифференцировки показал, что они экспрессируют другие ранние мезодермальные маркеры PDGFR и KDR (VEFR2), но в них отсутствует экспрессия типичных маркеров эндотелиальных, гематopoэтических клеток и ММСК (CD73, VE-кадгерин, CD31, CD43, CD45). Молекулярное профилирование клеток APLNR+ выявило экспрессию генов примитивной мезодермы MIXL1, T, EOMES, FOXF1, HAND1, HAND2, IRX3, BMP4 и WNT5A. Клетки APLNR + были способны дифференцироваться в ММСК, эндотелиальные и гладкомышечные клетки. Интересным является тот факт, эндотелиальные клетки, генерируемые из клеток APLNR+PDGFR+KDR+, имели «провоспалительный» профиль экспрессии генов, о чем свидетельствуют высокие уровни экспрессии генов хемоаттрактантов, VCAM1 и PDL1 (Slukvin I.I., Kumar A., 2018).

В последнее время разработаны разнообразные протоколы дифференцировки ИПСК в ММСК *in vitro*. Эти протоколы учитывают концентрации факторов роста и дифференцировки, плотность посева клеток, подходящие подложки для культивирования клеток, имитирующие механическое

напряжение, происходящее при развитии эмбриона и взаимодействии дифференцирующихся клеток, скорость дифференцировки. Главным образом эти протоколы подразделяются на две группы: спонтанной или специфически направленной дифференцировки ИПСК (Luzzani C.D., Miriuka S.G. 2017, Minakawa T. et al., 2020, Luo L. et al., 2020).

Некоторые протоколы спонтанной дифференцировки включают в себя получение ММСК подобных клеток в результате пассирования исходных ИПСК в условиях депривации среды для поддержания плюрипотентности. Другой способ заключается в механической сепарации ММСК-подобных клеток из эмбрионидных телц, прикрепившихся после 10 дневной дифференцировки. Для прямой дифференцировки ИПСК в ММСК используют также стандартную среду для культивирования ММСК, содержащую фетальную бычью сыворотку, или кондиционированную среду, полученную в результате культивирования ММСК, которые богаты ростовыми факторами, но обеспечивают неспецифическую активацию сигнальных каскадов дифференцирования (Villa-Diaz L.G. et al., 2012, Diederichs S., Tuan R. S., 2014, Sheyn D. et al., 2016, Luo L. et al., 2020).

В тоже время существуют протоколы дифференцировки ИПСК в ММСК, в которых используются комбинации специфических ингибиторов, факторов роста, биологически активных и «маленьких» молекул. Так культивирование ИПСК в среде, содержащей ингибитор сигнального пути TGF- β SB431542, приводило к повышению экспрессии мезодермальных генов MSX2, NCAM, HOXA2 и снижению экспрессии генов плюрипотентности OCT4, LEFTY1/2 (Chen Y.S, et al., 2012). Применение ингибитора Rho-киназы Y-27632 также запускало процессы дифференцирования плюрипотентных клеток (Liu Y. et al., 2012). Использование сочетания костного морфогенетического белка 4 (BMP4), VEGF, bFGF и тромбopoэтина приводило к формированию гемангиобласта (Kimbrel E.A. et al., 2014). Дифференцировка ИПСК в среде без сыворотки с добавлением bFGF и двух «маленьких» молекул SB431542 и CHIR99021 приводила к генерации ММСК с высоким уровнем экспрессии специфических поверхностных маркеров (CD90, CD73, CD105, CD106, CD146 и CD166) и высокой активностью в отношении

остеогенной и хондрогенной дифференцировки (Winston T.S. et al., 2019).

В результате использования вышеперечисленных протоколов дифференцирования ИПСК появляется возможность получения ММСК, аналогичных по морфологическим, фенотипическим и функциональным свойствам ММСК взрослого человека (Diederichs S., Tuan R. S., 2014, Froebel J. et al., 2014, Winston T.S. et al., 2019).

Однако в результате репрограммирования, у вновь полученных ММСК (ИПСК-ММСК), несмотря на предполагаемое влияние «соматической памяти» после ремоделирования хроматина, появляются некоторые эпигенетические особенности. Так ИПСК-ММСК, имеют более длинные теломеры, более короткое время удвоения и более высокий уровень пролиферации по сравнению с ММСК костного мозга, т.е. обладают свойствами, характерными для плюрипотентных клеток (de Reppe G.M., Marolt D., 2013, Billing A.M. et al., 2016). С помощью методов полногеномного и протеомного анализа было показано, что неотъемлемым свойством ММСК взрослого организма является высокий уровень экспрессии белков внеклеточных везикул, определяющих их паракринные эффекты, и белков внеклеточного матрикса. Также для ММСК характерен более высокий уровень экспрессии генов, связанных с развитием сосудистой системы. Отличительным свойством ИПСК-ММСК, является высокий уровень экспрессии генов, связанных с развитием эмбриона и стволовых клеток, транскрипционных факторов *HOXD1*, *NKX2-5*, *LHX2*, *FGF12*, вовлеченных в процессы развития. Также для ИПСК-ММСК характерен более высокий уровень экспрессии генов, связанных с развитием нейронов и аксонов. ММСК взрослого организма и ИПСК-ММСК отличаются также и уровнем экспрессии генов поверхностных маркеров. Так для ММСК отличительным свойством является экспрессия генов *VCAM1*, *CD151*, *LAMP1*, *ANPEP*, *PRNP*, *LAMP2*, а для ИПСК-ММСК - *LIFR*, *PTGFRN*, *PVR*. Среди них экспрессия гена *LIFR*, наиболее точно отображает специфику ИПСК-ММСК, что потенциально может служить параметром для проверки качества в случае создания препарата для клинического применения (Billing A.M. et al., 2016).

В другом исследовании было показано, что ИПСК-ММСК независимо от возраста донора и типа клеток приобретают профиль геной экспрессии, связанный с омоложением, в частности, экспрессию *INHBE*, *DNMT3B*, *POU5F1P1*, *CDKN1C* и *GCNT2*, которые также экспрессируются в плюрипотентных стволовых клетках (ИПСК и ЭСК), но не в родительских ММСК (Spitzhorn L.S. et al., 2019).

Несмотря на то, что экспрессионные профили ММСК и ИПСК-ММСК демонстрируют значительное сходство, экспрессия генов, ассоциированных с активацией Т-лимфоцитов, представлением антигенов, сигнальными каскадами, запускаемыми через *IFN-γ*, и регуляцией иммунного ответа все же выше в ММСК. И, наоборот, ИПСК-ММСК обладают более низкими иммуномодулирующими свойствами, чем первичные ММСК (Froebel J. et al., 2014).

Однако существенным преимуществом использования ИПСК для дифференцировки по мезодермальному пути является получение клеток ранней мезодермы, а также предшественников ММСК (Vodyanik M.A. et al., 2010, Slukvin I.I., Kumar A., 2018). Применение комбинаций экзогенных специфических ингибиторов, факторов роста и биологически активных низкомолекулярных соединений для дифференцировки ИПСК в ММСК позволяет воспроизвести процессы эмбрионального развития и предоставляет потенциальную возможность для получения таких клеток. Фундаментальные исследования молекулярных внутриклеточных и межклеточных механизмов, определяющих взаимодействие таких клеток в условиях воспалительных реакций и в ходе последующей регенерации тканей в норме и при патологии необходимы для выяснения конкретных причин и критических факторов, приводящих к нарушению восстановления тканей. Понимание роли каждого из участников процесса, от молекул до клеток, является необходимым этапом для разработки и создания новых лекарственных препаратов нового поколения.

Таким образом, обзор имеющихся к настоящему времени литературных данных показывает, что ММСК обладают огромным потенциалом для

регенеративной медицины благодаря доступности материала для выделения этих клеток, высокой пролиферативной активностью ММСК в культуре, дифференцировочным потенциалом, выраженными иммуномодулирующими свойствами, множественными паракринными эффектами, способностью к направленной миграции ММСК в места поражения тканей. Однако, многие аспекты проводящихся в области исследований ММСК остаются непроясненными, включая отсутствие критериев идентификации, воспроизводимости, оценки функциональных свойств *in vitro* и *in vivo*. В этой работе были предприняты усилия для преодоления фундаментальных пробелов в знаниях, касающихся молекулярных механизмов проявления иммуномодуляторных свойств ММСК различного генеза в условиях провоспалительного микроокружения.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

Все реактивы, использованные для манипуляций с культурами клеток человека, имели качество Cell Culture Grade. В экспериментах использовали компоненты сред для культивирования фирмы Gibco (Великобритания), NuClone (США), Worthington Biochemical (США), Pharmacia Biotech (США), культуральную пластиковую посуду фирмы Greiner (Германия), Costar (США), NUNC (Дания), реактивы для дифференцировки клеток в остеогенном, адипогенном и хондрогенном направлении. Эксперименты проводились в строго асептических условиях в ламинарном боксе с использованием стерильной посуды и пластика, растворы стерилизовали фильтрацией через мембранный фильтр с размером пор 0,22 мкм.

Все реактивы, использованные для манипуляций с клеточными экстрактами, иммуногистохимического анализа и *in vitro* реакций имели качество Molecular Biology Grade. В экспериментах использовали реактивы для гистохимического анализа фирмы Sigma (Германия), Invitrogen (США), антитела для иммуноцитохимического анализа фирм Chemicon (США), Santa Cruz Biotechnology (США), R&D Systems (США), Cell Signaling Technology (США), антитела для исследования маркеров клеток методом проточной цитофлуориметрии фирмы BD Biosciences (США), реактивы для полимеразной цепной реакции (ПЦР) фирм Евrogen (Россия), Sigma (Германия), Fermentas (Литва), Thermo Fisher Scientific (США).

2.2. Клеточные линии

2.2.1. Выделение ММСК из жировой ткани и получение первичной культуры

ММСК из подкожной жировой ткани человека выделяли с помощью ферментативной обработки по методу Zuc et al., 2002. Измельченную жировую ткань инкубировали с растворами ферментов коллагеназы I типа (200 ед/мл, Worthington Biochemical, США) и диспазы (40 ед/мл, Sigma, Германия) при 37°C в течение 30-45 мин. Затем добавляли равный объем среды DMEM/F12 (HyClone, США), содержащей 100 ед./мл пенициллина, 100 ед./мл стрептомицина, 2 мМ glutамина, 1 мМ пирувата натрия (HyClone, США), 10% фетальной бычьей сыворотки (HyClone, США) (далее стандартная среда культивирования). Полученный образец центрифугировали, осадок ресуспендировали в стандартной среде культивирования. Полученную суспензию высаживали на чашки Петри (Corning Costar, США) в концентрации 5×10^4 фрагментов ткани/см³. Смену стандартной среды культивирования проводили каждые 2-3 дня до достижения 70-80% плотности монослоя.

2.2.2. Выделение ММСК из пуповины новорожденного и получение первичной культуры

Образцы пуповины человека собирали после нормальных родов на 38-40 неделе гестации. Строму пуповины промывали раствором Хенкса (Панэко, Россия), измельчали и инкубировали в 0,1%-ном растворе коллагеназы I типа (200 ед/мл, Worthington Biochemical, США), приготовленном на среде DMEM/F12 (HyClone, США) без сыворотки, при 37°C в течение 60 мин. Полученные клетки осаждали центрифугированием. Осадок ресуспендировали в среде DMEM/F12, содержащей 10% фетальной и бычьей сыворотки, 100 ед./мл пенициллина, 100 ед./мл стрептомицина, 2 мМ glutамина, 1 мМ пирувата натрия, 10 нг/мл bFGF (Sigma, Германия), до концентрации 10^4 фрагментов ткани/мл, переносили в

культуральные чашки и культивировали до формирования монослоя, сменяя среду 2 раза в неделю.

2.2.3. Выделение ММСК из костного мозга и получение первичной культуры

Аспират костного мозга человека забирали в вакутейнеры, содержащие цитрат натрия. Мононуклеарные клетки выделяли в градиенте плотности с использованием Ficoll Paque ($\rho=1,077$ г/см³, Pharmacia Biotech, США) по стандартной методике. Полученные клетки рассеивали в концентрации 10^4 кл/мл в среде DMEM/F12 (HyClone, США), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (HyClone, США), 100 ед./мл пенициллина, 100 ед./мл стрептомицина, 2 мМ глутамина, 1 мМ пирувата натрия, 10 нг/мл EGF (Sigma, Германия), 10 нг/мл PDGF-BB (Sigma, Германия,) переносили в культуральные флаконы и культивировали до формирования монослоя, сменяя среду 2 раза в неделю.

2.2.4. Культивирование ММСК

Выделенные клетки выращивали на стандартном пластике для культивирования клеток (Corning Costar, США) в CO₂ – инкубаторе (5% CO₂; 95% воздуха) при 37°C. ММСК человека культивировали в среде, поддерживающей рост недифференцированных мезенхимальных прогениторных клеток (Advance Stem Cell Basal Medium, HyClone, США), содержащей 10% смеси факторов роста (Advance Stem Cell Growth Supplement, HyClone, США), 100 ед/мл пенициллина и 100 Ед/мл стрептомицина/фунгизона (HyClone, США).

При достижении плотности монослоя 80-90% ММСК рассеивали в соотношении 1:3 с использованием раствора, содержащего 0,025% трипсина и 0,01% ЭДТА. В экспериментах использовали ММСК 2 и 3 пассажей, достигшие 70-80% конфлюентности.

Для получения кондиционированной среды ММСК в течение 1 часа депривировали в стандартной среде, не содержащей сыворотку, затем проводили

смену среды на свежую и культивировали клетки в течение 48 часов. После этого среду собирали, освобождали от неприкрепленных клеток и клеточного дебриса путем центрифугирования при 200g в течение 5 мин. При необходимости рсупернатант азделяли на аликвоты и замораживали в жидком азоте. Образцы кондиционированной среды хранили при -70°C. При каждом расеее проводили подсчет клеток и оценку жизнеспособности клеток с использованием счетчика клеток TC20 (BioRad, США).

2.2.5. Выделение и активация МПК

С согласия здоровых доноров 25-50 мл периферической крови из локтевой вены забирали в стерильные флаконы, содержащие ЭДТА (1,5 мг/мл крови, pH 7,2). МПК выделяли в градиенте плотности Ficoll Paque ($\rho=1,077$ г/см³, Pharmacia Biotech). Затем МПК отмывали в PBS и ресуспендировали в стандартной среде. Активацию МПК проводили ФГА (Sigma) в концентрации 10 мкг/мл. Образец инкубировали при 37°C в течение 2 ч. Затем суспензию центрифугировали, осадок ресуспендировали в стандартной среде культивирования до концентрации 1×10^7 клеток/мл).

2.2.5. Сокультивирование ММСК и актМПК

ММСК культивировали в стандартной среде в 12-луночных планшетах при начальной плотности посева 12 тыс. кл./см² при 37°C в течение 48 ч. Затем среду культивирования заменяли на свежую и добавляли актМПК. ММСК и актМПК сокультивировали в различных соотношениях (1:100, 1:50, 1:25 соответственно) в контактных и бесконтактных условиях в течение 48 ч при 37°C. Контактное сокультивирование осуществляли путем добавления суспензии актМПК непосредственно к монослою ММСК. Бесконтактное сокультивирование клеток осуществляли с использованием полупроницаемых мембран (trans-wells) с

диаметром поры 0,4 мкм (Greiner, Германия).

2.2.6. Репрограммирование соматических клеток человека с помощью генетических конструкций на основе вируса Сендай

ММСК кожи человека выращивали в стандартной среде культивирования до достижения 70% монослоя. Затем клетки отмывали аналогичной средой, не содержащей сыворотки. Затем клетки трансдуцировали рекомбинантным полисистронным вирусом Сендай, несущим в своем геноме транскрипционные факторы Oct4, Sox2, Klf4 и c-Мyc (CytoTune 2.0 -iPS Sendai Reprogramming Kits, Thermo Fisher Scientific, США) (рисунок 2.1.) в количестве 5 вирусных частиц на клетку в течение 24 ч. Затем среду заменяли на стандартную среду культивирования. Спустя трое суток клетки пересевали на заранее высаженные эмбриональные фибробласты мыши, обработанные митомицином С, в среде для поддержания плюрипотентности mTeSR1 (STEMCELL Technologies, США). Смену среды осуществляли каждый день. На 15 день после трандукции отбирали клоны клеток, основываясь на морфологическом критерии схожести с колониями ЭСК человека.

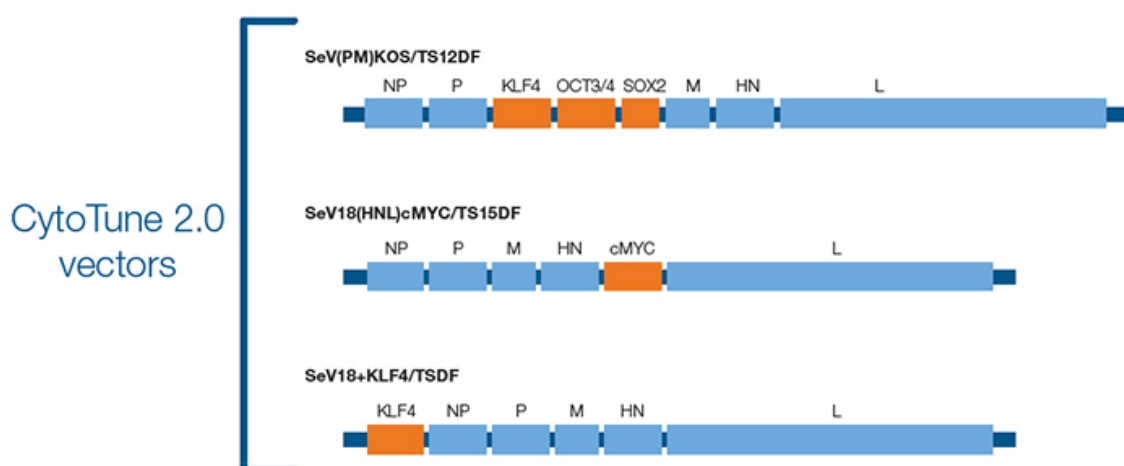


Рисунок 2.1. Конфигурация векторов в CytoTune 2.0 -iPS Sendai Reprogramming Kits.

2.2.7. Культивирование ИПСК человека

Отобранные клоны ИПСК культивировали как самостоятельные линии на чашках Петри, пресорбированных раствором BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix (Becton Dickinson, США) в среде mTeSR1 с ежедневной заменой. Пресорбцию культурального пластика проводили раствором Matrigel, разведенным в 10 раз средой DMEM, в течение 1 ч при комнатной температуре. Клетки пассировали с использованием раствора диспазы в концентрации 1 мг/мл или 0,05% раствора трипсина. При пересеве трипсином в среду для культивирования добавляли ингибитор Rho киназы (ROCK) Y-27632 (STEMCELL Technologies, США) в концентрации 5 мкМ.

2.3. Проточная цитофлуориметрия

2.3.1. Анализ экспрессии поверхностных маркеров ММСК и МПК

Для того чтобы оценить содержание ММСК в популяции культивируемых клеток, выделенных из тканей, клетки 2 пассажа открепляли от поверхности культурального пластика с помощью раствора Версена. МПК выделяли, как описано в п. 2.2.5. Иммуноцитохимическое окрашивание клеток на поверхностные маркеры мезенхимальных стромальных и гемопоэтических клеток проводили с помощью антител к CD105, CD73, CD90, CD34, CD45, CD3, CD4, CD8, CD25, CD69, CD16, CD56, CD19, CD11a, CD80, CD86, HLA-DR, конъюгированных с флуорохромами фикоэритрином (PE), Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 647, аллофикоцианином (APC), пиридинхлорофиллом (Per-CP), изотиоцианатом флуоресцеина (FITC), Per-CP, конъюгированного с циананом 5.5 (Cy5.5), PE-Cy7 (BD Biosciences, США) по инструкции производителя. В качестве отрицательного контроля использовали соответствующие изотипические иммуноглобулины.

Образцы анализировали на проточном цитометре FACS CANTO II (BD

Biosciences, США) и NovoCyte (ACEA Biosciences, США). Данные обрабатывали с помощью пакета программ FLOWJO.

Для анализа гомогенности клеточной популяции использовали данные по прямому (FSC) и угловому (SSC) светорассеянию путем построения двумерных гистограмм распределения клеток по размеру и степени зернистости. На данной стадии для дальнейшего анализа выделяли основную популяцию клеток, исключая клеточные агрегаты и дебрис.

2.3.2. Анализ популяционного состава МПК, способных к образованию межклеточных контактов с ММСК

АктМПК и интактные МПК (интМПК) сокультивировали в контактных условиях с ММСК в течение 48 ч в соотношении 1:100. Неприкрепившиеся клетки отмывали раствором Хенкса. Прикрепившиеся клетки (ММСК и МПК) обрабатывали раствором Qtase (HyClone) 5 мин 37°C, ресуспендировали, добавляли стандартную среду культивирования для инактивации фермента, осаждали центрифугированием. Иммуноцитохимическое окрашивание прикрепившихся клеток проводили с помощью антител, конъюгированных с флуорохромами (BD Multitest™ 6-Color TBNK Reagent, BD Bioscience) по инструкции производителя. Образцы анализировали на проточном цитометре FACS CANTO II (BD Bioscience). Данные обрабатывали с помощью пакета программ FLOWJO.

2.4. Характеристика ММСК

2.4.1. Анализ иммуноцитотипа ММСК

Для иммуноцитохимического исследования клетки выращивали на покровных стеклах. При достижении необходимой плотности клеток стекла промывали фосфатно-солевым буфером (PBS), pH 7.4, и фиксировали метанолом,

охлажденным до -20°C , в течение 2 мин. Последующие операции проводили при комнатной температуре. Фиксированные клетки отмывали PBS и пермеабелизировали с помощью 1% р-ра Triton X100 в PBS в течение 10 мин. После отмывания в PBS (3 раза по 2 мин) материал выдерживали в течение 30 мин в PBS, содержащем 0.5% бычьего сывороточного альбумина (БСА), 2% нормальной козьей сыворотки, 0.05% Tween 20, 0.01% мертиолята) для того, чтобы блокировать неспецифическое связывание антител. Разведения специфических первичных и флуоресцентно меченых антивидовых антител готовили на вышеуказанном буфере. Инкубацию с первичными моноклональными антителами мыши против нестина, виментина, фактора фон Виллебрандта, костного сиалопротеина, остеонектина, коллагена I и II типа человека (Chemicon, США) проводили при комнатной температуре в течение 1,5-2 часов, после чего клетки три раза отмывали PBS. Инкубацию с флуоресцентно мечеными (Rhodamin, FITC) вторичными антивидовыми антителами (Chemicon, США) проводили при комнатной температуре в течение 45-60 мин и затем трижды отмывали PBS. Двойное иммуноцитохимическое окрашивание проводили путем одновременного инкубирования с первичными антителами разных животных-хозяев и соответствующими вторичными антивидовыми антителами, конъюгированными с родамином и FITC. Ядра клеток докрасивали раствором DAPI (Sigma, Германия) в PBS в концентрации 1 мкг/мл. Препарат заключали в специальную среду, препятствующую гашению флуоресценции, и исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа Axio Scope, снабженного камерой AxioCam HRm, и программного обеспечения Axiovision (Carl Zeiss).

Анализ экспрессии поверхностных маркеров ММСК проводили, как описано в п. 2.3.1. Иммуноцитохимическое окрашивание клеток проводили с помощью флуоресцентномеченных антител к CD105, CD73, CD90, CD34, CD45, CD80, CD86, HLA-DR.

2.4.2. Дифференцировка клеток к остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлении в индуктивных средах роста

Для анализа способности ММСК дифференцироваться в адипогенном направлении клетки полученных культур высаживали на 24-луночные планшеты в количестве 1×10^4 клеток на лунку и инкубировали в среде DMEM/F12, содержащей 10% лошадиной сыворотки (Sigma, Германия), 0.5 μM гидрокортизона (Sigma, Германия), 0,5мМ 3-изобутил-1-метилксантина (Sigma, Германия), 60 μM индометацина (Sigma, Германия), 100 ед./мл пенициллина, 100 ед./мл стрептомицина, 2 мМ глутамина, 1 мМ пирувата натрия, в течение 3 недель, заменяя среду 2 раза в неделю. Затем клетки фиксировали в растворе 4% формалина/ФСБ. Адипогенную дифференцировку оценивали визуально по образованию липидных капель во внутриклеточном пространстве, которые окрашивали с помощью специфического красителя масляного красного.

Для анализа способности ММСК к остеогенной дифференцировке клетки полученных культур высаживали на 24-луночные планшеты в количестве 1×10^4 клеток на лунку и инкубировали в стандартной среде без сыворотки, содержащей 0,2 мМ 2-фосфо-L-аскорбиновой кислоты, 10 мМ β -глицерол-2-фосфата кальция, 10^{-7} М дексаметазона (Invitrogen, США), 100 ед./мл пенициллина, 100 ед./мл стрептомицина, 2 мМ глутамина, 1 мМ пирувата натрия в течение 3 недель, заменяя среду 2 раза в неделю. Способность клеток дифференцироваться в остеобласты оценивали по уровню экспрессии белков, специфических для костной ткани – костного сиалопротеина и остеоонектина (методом иммуноцитохимии), активности эндогенной щелочной фосфатазы, накоплению фосфатов Са (методом ван Косса), а также наличие минерализации внеклеточного матрикса с помощью окраски Ализариновым красным.

Дифференцировку клеток полученных культур в хондроциты проводили в культуре микромасс. Для этого 1 млн ММСК центрифунировали 10 мин при 200g, затем осадок культивировали в стандартной среде без сыворотки, содержащей 100 ед./мл пенициллина, 100 ед./мл стрептомицина, 2 мМ глутамина, 1 мМ пирувата

натрия, 100 нг/мл TGF-beta в течение 3 недель. Через 7, 14, 21 день культивирования из полученных микромасс готовили срезы на криотоме. Образование внеклеточного коллагена оценивали с помощью окраски раствором толуидинового голубого.

В качестве отрицательного контроля использовали ММСК того же донора, культивируемые в стандартной среде роста.

2.4.3. Гистохимический анализ способности клеток к дифференцировке в мезодермальном направлении

Для окраски по методу Ван Косса клетки, выращенные на стеклах, фиксировали 2 мин метанолом, охлажденным до -20°C . Затем клетки инкубировали в 2%-ом растворе нитрата серебра (Sigma, Германия) в сосудах Коплина, помещенных прямо перед электрической лампой, в течение 1 ч. Затем стекла промывали дистиллированной водой (dH_2O), фиксировали 2,5% раствором тиосульфата натрия (Sigma, Германия) в течение 5 мин, промывали dH_2O .

Для окраски ализариновым красным клетки, выращенные на стеклах, фиксировали в ледяном 70% этаноле в течение часа. Затем клетки инкубировали в 40 mM растворе (pH 4.1) Alizarin red S (Sigma, Германия) 10 минут. Затем образец промывали PBS. Ядра клеток докрашивали гематоксилином Майера (Sigma, Германия) в течение 1 мин.

Для окраски масляным красным клетки, выращенные на стеклах, фиксировали метанолом, охлажденным до -20°C , в течение 2 мин, затем промывали 50% этанолом. Образцы инкубировали в 0,5% растворе Oil red (Sigma, Германия) в изопропанол в течение 10 минут и промывали 50% этанолом. После обработки стеклов dH_2O ядра клеток докрашивали гематоксилином Майера в течение 1 мин.

Для оценки активности эндогенной щелочной фосфатазы клетки, выращенные на стеклах, фиксировали метанолом, охлажденным до -20°C , в течение 2 мин и промывали буферным раствором, содержащим 100 mM Трис-

HCl, (pH 9.5), 100 mM NaCl и 10 mM MgCl₂ (Invitrogen, Великобритания). Затем образцы инкубировали с субстратом щелочной фосфатазы 5-бром-4-хлор-3-индолил фосфатом и нитросиним тетразолием в течение 10 мин и промывали дН₂O.

Для окраски толуидиновым голубым криосрезы фиксировали метанолом, охлажденным до -20°C , в течение 2 мин и окрашивали в 1% растворе толуидинового голубого (Sigma, Германия) в 50%растворе изопропанола в течение 30 мин. Затем срезы обрабатывали 100% раствором изопропанола и заключали в канадский бальзам.

Образцы исследовали с помощью микроскопа Axio Scope, снабженного камерой AxioCam HRm, и программного обеспечения Axiovision (Carl Zeiss).

2.4.4. Оценка жизнеспособности ММСК.

Жизнеспособность ММСК оценивали при помощи МТТ теста (Invitrogen, США), согласно протоколу, приложенному к набору. Калориметрический метод основан на способности живых клеток превращать растворимый бромид 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия, (МТТ, желтого цвета) в нерастворимые пурпурно-синие кристаллы МТТ-формаза (МТТ-Ф). Мертвые клетки такой способностью не обладают. Интенсивность превращения МТТ в МТТ-Ф отражает общий уровень дегидрогеназной активности в исследуемых клетках и модулируется активностью важнейших сопряженных ферментативных систем, таких как дыхательная цепь, цепь переноса электронов, и др. Насыщенный раствор МТТ готовили на растворе Хенкса и хранили во флаконе из темного стекла при 40°C не более месяца. Клетки выращивали в 96-луночном планшете в 200 мкл ростовой среды. Затем в лунки раствор МТТ в конечной концентрации 1 мкг/мл и инкубировали 4 ч при 37°C в CO₂ инкубаторе, после чего супернатант из лунок удаляли и добавляли в каждую по 100 мкл диметилсульфоксида (DMSO) для растворения внутриклеточных кристаллов МТТ-Ф. Полученный лизат переносился в лунки планшета для

иммуноферментного анализа. Оптический сигнал измеряли прибора с помощью Multiskan™ FC Microplate Photometer (Thermo Scientific, США) при 540 нм (нулевой уровень устанавливали по лунке, содержащей DMSO). Уровень ферментативной активности (жизнеспособность клеток) оценивали путем сравнения оптических плотностей в опыте и контроле. Опытными ММСК служили клетки, выращенные в стандартных условиях и переведенные в суспензию путем ферментативной обработки, дважды промытые, и хранящиеся физиологическом растворе в суспензии при концентрации 1 млн кл/мл в течение 1 ч при температуре +4°C. Контрольными ММСК служили клетки, выращенные в стандартных условиях. Процент сохраненной метаболической активности рассчитывали по формуле:

100% - $[(OD_{\text{contr}} - OD_{\text{exp}}) / OD_{\text{contr}} \times 100\%]$, где OD_{exp} – оптическая плотность р-ра формазана, метаболизированного опытными ММСК, OD_{contr} – оптическая плотность р-ра формазана, метаболизированного контрольными клетками.

2.5. Характеристика ИПСК человека

Полученные ИПСК оценивали по морфологии, экспрессии антигенов SSEA4, TRA-1-60/81 OCT4 методом иммуноцитохимии, как описано в п. 2.4.1, экспрессии транскрипционных факторов OCT4, NANOG, SOX2 методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с обратной транскрипцией, как описано в п. 2.8.2 и способности спонтанно дифференцироваться в клетки трех эмбриональных листков: эктодермы, энтодермы и мезодермы в эмбриоидных телах.

2.5.1. Формирование и культивирование эмбриоидных тел

Колонии ИПСК клеток диссоциировали раствором диспазы с концентрацией 1 мг/мл на фрагменты 400-600 клеток. Переносили в чашки с низкой адгезией Ultra Low Adhesion Plates (Corning, США) со средой mTeSR1,

которую на следующий заменяли на среду для культивирования эмбрионидных тел. Среду меняли раз в 2 дня.

2.5.2. Спонтанная дифференцировка ИПСК человека

Через 10-20 дней культивирования эмбрионидные тела пересаживали на чашки Петри, пресорбированные 0,1% раствором желатина. Через 2-3 недели области прикрепившихся дифференцированных клеток окрашивали антителами против гладкомышечного актина, альфафетопротеина и β -III-тубулина.

2.5.3. Дифференцировка ИПСК в мезодермальном направлении

Для дифференцирования полученных ИПСК в мезодермальном направлении использовали два альтернативных протокола.

Одностадийный протокол спонтанной дифференцировки ИПСК под действием стандартной среды для культивирования ММСК. ИПСК, выращенным на матригеле по методике, описанной в п. 2.2.7, заменяли среду для поддержания плюрипотентности mTeSR1 на стандартную среду культивирования ММСК. Затем клетки инкубировали в течение 7 дней, меняя среду каждые 2 дня. Далее клетки пассировали по методике, описанной для ММСК. Полученные клетки тестировали на соответствие критериям, установленным для ММСК, по экспрессии поверхностных маркеров и по способности дифференцироваться в остеогенном, адипогенном и хондрогенном направлении.

Многостадийный протокол специфически направленной дифференцировки ИПСК. Данный протокол с использованием комбинации экзогенных специфических ингибиторов, факторов роста и биологически активных низкомолекулярных соединений позволяет воспроизвести процессы эмбрионального развития и предоставляет возможность получить клетки параксиальной мезодермы эмбриона человека и зрелые ММСК. ИПСК выращивали на матригеле в среде для поддержания плюрипотентности mTeSR по

методике, описанной в предыдущем разделе. Затем проводили депривацию средой DMEM/F12 (HyClone, США), содержащей 100 ед./мл пенициллина, 100 ед./мл стрептомицина, 2 мМ глутамина, 1% концентрата липидов (Gibco, Великобритания), 40 мкМ тиоглицерола (Sigma, Германия), 100 мкг/мл инсулина 50 мкг/мл трансферрина (Sigma, Германия), 10 нг/мл активина А (R&D Systems, США), 10 нг/мл bFGF (Sigma, Германия) и культивировали клетки 2 суток, заменяя среду каждый день. Для индукции дифференцировки в среду добавляли 10 нг/мл BMP-4, 10 мкМ специфического ингибитора фосфатидилинозитол-3-киназы LY294002 (Sigma, Германия), 3 мкМ ингибитора киназы 3 гликогенсинтазы CHIR99021 (Sigma, Германия) и инкубировали 24 ч. Далее среду заменяли на DMEM/F12, содержащую 10 нг/мл bFGF (Sigma, Германия), 10 нг/мл BMP-4 и культивировали в течение 5 дней, заменяя среду каждый день. Полученные клетки тестировали на отсутствие экспрессии маркеров плюрипотентности OCT4, SOX2, NANOG, оценивали уровень экспрессии маркеров ранней мезодермы brachyury/BRY, SNAIL, MIXL1, TBX6 и поверхностные маркеры CD90, CD73, CD105. Далее клетки пассировали в стандартной среде для культивирования ММСК, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки в течение 2 недель. Полученные клетки тестировали на соответствие критериям, установленным для ММСК, по экспрессии поверхностных маркеров и по способности дифференцироваться в остеогенном, адипогенном и хондрогенном направлении.

2.6. Изучение клеточно-опосредованной цитотоксичности МПК при сокультивировании с ММСК

Изучение клеточно-опосредованной цитотоксичности при взаимодействии ММСК с МПК проводили с использованием набора Cytotox 96 (Promega), предназначенного для оценки функциональной активности НК. Принцип метода заключается в количественном измерении уровня лактатдегидрогеназы (ЛДГ) – цитозольного фермента, выделяющегося во время повреждения мембраны клетки-мишени и ее лизиса. Маркерной реакцией является превращение под действием

лактатдегидрогеназы соли йод-нитро-тетразолия, содержащейся в субстратной смеси, в красный формазан. Клетками-эффекторами служили МПК здоровых доноров, выделенные в градиенте фиколла. Клетками-мишенями служили культивируемые ММСК, а также суспензионная культура В-лимфомы РЗНР1 в качестве положительного контроля. Для проведения эксперимента монослойную культуру ММСК переводили в суспензию смесью растворов Версена и 0,25%-ного раствора трипсина в соотношении 1:1. Определяли оптимальную концентрацию клеток-мишеней по максимальному выделению ЛДГ клетками. Для этого в лунки с последовательными бинарными разведениями клеток-мишеней добавляли 0,1%-ный раствор Tween-20. Затем в 96-луночной планшете готовили последовательные бинарные разведения МПК и добавляли оптимальные концентрации клеток мишеней таким образом, что соотношение клеток-эффекторов с клеткам-мишеням варьировало от 250:1 до 2:1. Смешанную культуру инкубировали в течение 4 ч при 37°C. Затем супернатант отбирали, в лунки добавляли субстратную смесь для ЛДГ, инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Оптическую плотность учитывали при 492 нм. Относительное содержание поврежденных клеток оценивали по отношению оптической плотности раствора в лунках, содержащих смесь клеток-мишеней с клетками-эффекторами, к оптической плотности раствора с максимальным выделением ЛДГ клетками-мишенями.

2.7. Анализ пролиферации актМПК в сокультуре с ММСК

Для исследования способности ММСК угнетать пролиферацию актМПК использовали CyQUANT®NF Cell Proliferation Assay Kit (Invitrogen). Для этого сокультивировали ММСК и актМПК в указанных соотношениях 1-6 суток при 37°C. Затем супернатант, содержащий МПК, центрифугировали, ресуспендировали полученный осадок в однократном растворе Хэнкса, добавляли к клеткам краситель CyQUANT®NF или пермеабиллизующий агент для установки базового фона, инкубировали в темноте 1 ч при 37°C. МПК, культивируемые в

стандартной среде, использовали для построения калибровочной кривой зависимости сигнала флуоресценции от количества клеток. Интенсивность флуоресценции измеряли при 530 нм на приборе ZENYTH 3100 (Biochrom).

2.8. Выделение и анализ РНК

2.8.1. Выделение РНК из клеток

Выделение РНК из культивированных клеток проводили с использованием реагента TRIzol (Sigma, Германия) по методике, описанной в приложенном к набору руководстве пользователя. Для этого непосредственно к моносою клеток, выращенных на культуральном пластике, или к осадку клеток в случае суспензионных культур добавляли реагент TRIzol в расчете 1 мл на 10 см² пластиковой поверхности или на 1 млн клеток в осадке. Лизат тщательно пипетировали. Затем добавляли 0,2 мл хлороформа на 1 мл реагента TRIzol, перемешивали и инкубировали 10 мин при комнатной температуре. После этого лизат клеток центрифугировали при 12000g в течении 15 мин при 4°C. Водную фракцию, содержащую РНК, аккуратно отбирали, переносили в новую пробирку, добавляли 0.5 мл изопропанола, перемешивали и инкубировали при комнатной температуре 10 мин. Затем образцы центрифугировали при тех же условиях. Супернатант удаляли, осадок промывали 1 мл 75% этанола, центрифугировали при 7500g в течении 5 мин при 4°C. Осадок ресуспендировали в 50 мкл свободной от РНКаз воды, которую получали обработкой деионизированной воды диэтилпирокарбонатом.

Определение концентрации РНК проводили по величине оптического поглощения на длине волны 260 нм (A₂₆₀) с учетом коэффициента экстинкции $\epsilon_{260} = 0,025$ (мкг/мл) \cdot 1 см⁻¹ на спектрофотометре NanoDrop 1000 (NanoDrop Technologies Inc, США) или флуориметра Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкциям производителя. Качество РНК оценивали с помощью электрофореза в агарозном геле, образец РНК считали подходящим для ПЦР в

случае четкой визуализации двух полос, соответствующих 28S и 18S субъединицам РНК.

2.8.2. Обратная транскрипция и полуколичественная ПЦР в реальном времени

Синтез кДНК проводили с использованием набора Fermentas Reverse Transcription Reagents (Fermentas, Литва), согласно руководству пользователя, приложенному к набору, используя олиго-dT-праймеры, фермент РНК-зависимую ДНК полимеразу RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas, Литва), ингибитор рибонуклеаз дитиотреитол DTT (Thermo Fisher Scientific, США), дезоксирибонуклеотиды. На одну реакцию брали 1-2 мкг тотальной РНК. Полученную кДНК затем хранили при -20°C.

Для полуколичественной ПЦР использовали реакционную смесь qPCRmix-NS SYBR+HighROX (Евроген, Россия), включающую интеркалирующий краситель SYBR Green I. Реакцию ПЦР с горячим стартом проводили по следующему протоколу: 95°C в течение 5 минут, затем 30 циклов 95°C – 20 секунд, T_m °C – 20 секунд (где T_m – оптимальная температура отжига, определяемая структурой праймеров), 72°C – 60 секунд. Для дополнительного контроля чистоты реактивов и работы проводили контрольную реакцию, в которой присутствовали все компоненты, кроме матрицы. Количественную ПЦР в реальном времени проводили в амплификаторе «BIO-RAD iQ5 Multicolor Real-time PCR detection system» (Bio-rad, США). В качестве праймеров использовали оригинальные специфические комплементарные пары олигодезоксинуклеотидов к анализируемым генам.

Определяли уровень экспрессии генов молекул адгезии N-кадгерина, T-кадгерина, P-кадгерина, E-селектина, P-селектина, L-селектина, ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1, IDO, iNOS, COX2, Oct4, SOX2, Bry, SNAIL, MIXL1, TBX6. (Таблица 2.1).

Таблица 2.1. Последовательности олигонуклеотидных праймеров, специфичных для генов человека.

Ген	Последовательность нуклеотидов 5'-3'	
IDO	F	AGCCCCTGACTTATGAGAACATGGA
	R	CCAGCCAGACAAATATATGCGAAGAA
iNOS	F	ATGGCACACGCTATGGAAAACCTC
	R	CTAGACGTGCAAGGCGCTGTGACT
COX2	F	TTCACGCATCAGTTTTTCAAGACAGA
	R	CATCAGACCAGGCACCAGACCA
Bry	F	CCAATGGGGGTGGCTTCTT
	R	ATGGGTGAGGGGTGTGTAGT
SNAIL	F	CCCAATCGGAAGCCTAACT
	R	GGACAGAGTCCCAGATGAGC
MIXL1	F	CGAGTCCAGGATCCAGCTTTT
	R	CTCCAACCCCGTTTGGTTCG
TBX6	F	TCCATCGTGTCAAGCTCACC
	R	GTGGGTCTGGTAGGCTGTC
Oct4	F	CAAAGCAGAAACCCTCGTGC
	R	TGATCTGCTGCAGTGTGGG
SOX2	F	TTTGTCGGAGACGGAGAAGC
	R	TAAGTGTCCATGCGCTGGTT
NANOG	F	ATCTGCTTATTCAGGACAGCCC
	R	AAAGGCTGGGGTAGGTAGGT
N-кадгерин	F	CATCCAGACCGACCCAAACA
	R	ACAGACACGGTTGCAGTTGA
Т-кадгерин	F	AAGGAGCTGTGGGAGTTATTG
	R	TTGAGGGTTGGTGTGGATTT
Р-кадгерин	F	CGAAGAGGACCAGGACTATGA
	R	CCGCCTTCAGGTTCTCAATTA
Е-селектин	F	CGAGAAGCCAACGTGTAAAG
	R	GGTGAAGTTGCAGGATGATTT
Р-селектин	F	GAGGACTGCGTGGAGATATAC
	R	CCCATAGAATCCAGGGTAACA
L-селектин	F	GACTGCTGGACTTACCATTTATTC
	R	CTCCTATCTTCCGGATTCCTATC
ICAM-1	F	CCAAGTTGTTGGGCATAGAG
	R	CCATCAGGGCAGTTTGAATAG
VCAM1	F	TGAAGGATGCGGGAGTATATG
	R	CACGAGAAGCTCAGGAGAAA

Таблица 2.1 (продолжение). Последовательности олигонуклеотидных праймеров, специфичных для генов человека.

PECAM	F	GATCTGGTCCCATCACCTATAA
	R	GTAATACTCTCCCTCCTGTTCC
β- актин	F	CATCCACGAAACTACCTTCAAC
	R	GTGATCTCCTTCTGCATCCT
винкулин	F	ACATCAGACCTGCTCCTTAC
	R	CATCTTGGCCATCTTAGTCATTC
GAPDH	F	TGGTCACCAGGGCTGCTTTTA
	R	TCCTGGAAGATGGTGATGGGATTT

Для анализа специфичности амплификации по окончании ПЦР в реальном времени проводили плавление продуктов с постоянным анализом флуоресценции для построения кривых плавления, а также проводили электрофорез ампликонов.

При анализе содержания мРНК генов данные для каждого образца нормировали по экспрессии гена домашнего хозяйства (β-актина, винкулина и глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (GAPDH)). Все эксперименты дублировали для каждого образца. Относительную экспрессию генов рассчитывали с использованием метода $\Delta\Delta Ct$.

Все манипуляции осуществляли в условиях ламинарного бокса во избежание контаминации.

2.8.2. Электрофорез в агарозном геле

Электрофорез продуктов амплификации проводили в 2% агарозном геле, который готовили в 1-кратном Трис-боратном буфере (1мМ EDTA, 40 мМ борной кислоты, 40 мМ Трис-HCl, pH 8,3) с последующим добавлением бромистого этидия до конечной концентрации 0,4 мкг/мл. Электрофорез проводили при напряженности электрического поля 3-4 В/см геля. Перед нанесением на гель к образцу нуклеиновой кислоты добавляли 1 мкл буфера для нанесения 6X DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, США). Для анализа размера фрагментов нуклеиновых кислот использовали маркеры молекулярного веса (New England

Biolabs, США). Визуализацию нуклеиновых кислот проводили на УФ-трансиллюминаторе при длине волны 260 нм.

2.9. Анализ уровня секреции цитокинов в сокультуре ММСК и МПК

ММСК культивировали в стандартной среде в 12-луночных планшетах в плотности 12 тыс. кл/см² при 37°C 48ч. Затем среду культивирования заменяли на свежую и добавляли МПК, активированные ФГА (актМПК). ММСК и актМПК сокультивировали в соотношении 1:100 в контактных и бесконтактных условиях с использованием полупроницаемых мембран с диаметром поры 0,4 мкм (Greiner) при 37°C. Супернатанты культур ММСК, МПК, а также сокультур этих клеток собирали через 48 ч от начала культивирования, клетки осаждали центрифугированием. Одновременную детекцию цитокинов и факторов роста в супернатантах, полученных от культур ММСК, актМПК, и сокультур этих клеток, проводили с использованием Bio-Plex Pro Human Cytokine 17-plex Assay на приборе BIOPLEX 200 (BIO-RAD, США) в соответствии с инструкцией производителя. Данные обрабатывали с помощью пакета программ Bio-Plex Manager™ 6.0.

2.10. Иммуноблоттинг

Для приготовления экстрактов ММСК промывали холодным фосфатно-солевым буфером (ФСБ), pH 7,4. Затем добавляли буфер для лизиса, содержащий 50 mM Трис-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 0.5% диоксихолата натрия, 0.1% додецил сульфата натрия (SDS), 1 mM ортованадата натрия, 1 mM NaF, ингибитор протеаз (Roche, Германия), из расчета 1 мл на чашку Петри диаметром 100 мм. Клетки собирали с помощью скрепера и переносили в пробирку для центрифугирования. Полученную суспензию перемешивали на мини-ротаторе в течение 30 мин при 4°C. Затем образцы центрифугировали в течение 20 мин при ускорении 16000g и 4°C. Супернатант аликвотировали по 20

мкл и хранили при -70°C . Определение концентрации белков проводили по методу Брэдфорда (Bradford M.M., 1976).

Образцы (10-30 мкг белка) кипятили в течение 10 мин в буфере для нанесения образцов (0.125 М Трис-НСl, 4% SDS, 20% глицерин, 10% β -меркаптоэтанол, 0,4% бромифеноловый голубой, pH 6,8). Электрофорез белков проводили по методу Лэмли (Laemmli U.K., 1970) в денатурирующих условиях с использованием 10 % полиакриламидного геля (ПААГ) в присутствии SDS на приборе Mini-PROTEAN (Biorad, США). Электрофорез белков проводили при постоянном напряжении 125 В в течение 1,5 ч в буфере, содержащем 25 мМ Трис-НСl, 190 мМ глицина, 0,1% SDS. Затем гель помещали в буфер для переноса, содержащий 25 мМ Трис-НСl, 190 мМ глицина, 0,1% SDS, 20% метанола на 15 мин. Для переноса белков использовали мембрану, изготовленную из нитроцеллюлозы (Hybond-C Extra, GE Healthcare, США). Электроблоттинг проводили в охлажденном буфере для переноса белков при постоянном напряжении 100 В в течение 2 ч с использованием модуля Mini Trans-Blot® Cell system (Bio-Rad, США). Для проверки качества переноса гель окрашивали красителем Ponceau S (0.2% Ponceau S в 5% ледяной уксусной кислоте). Затем мембрану промывали буфером, содержащим 20 мМ Трис-НСl, 150 мМ NaCl, 0.1% Tween 20 (pH 7.5) и блокировали в 3% растворе БСА в течение 1 ч при комнатной температуре. Необходимые разбавления первичных и вторичных антител готовили непосредственно перед использованием в этом буфере, содержащем 5 % обезжиренного молока. После этого мембрану инкубировали с раствором первичных антител против IDO (Santa Cruz Biotechnology, США), iNOS (R&D Systems, США) в течение 3 ч при комнатной температуре. После чего мембрану отмывали три раза в течение 5 мин PBS, содержащим 0,1 % Tween-20. Затем мембрану инкубировали с раствором вторичных антител, меченных пероксидазой хрена (Abcam, США) в течение 1 ч при комнатной температуре. Мембрану отмывали от несвязавшихся антител в вышеописанных условиях. Для визуализации иммобилизованных на мембране белков использовали West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, США). Для контроля количества

нанесенного белка использовали нормализацию к винкулину (Cell Signaling Technology, США) в случае IDO и GAPDH (Cell Signaling Technology, США) в случае iNOS.

2.11. Контроль зараженности доноров биоматериала и полученных культур ММСК инфекционными агентами

У всех доноров пуповины (матерей), костного мозга и жировой ткани исследовали образцы крови и соскоба урогенитального тракта методами иммуноферментного анализа (ИФА) и полимеразной цепной реакции (ПЦР). Методами ИФА выявляли поверхностный антиген вируса гепатита В, антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2, возбудителю сифилиса, IgM и IgG -антитела против вируса гепатита С. Методом ПЦР определяли РНК вируса гепатита С, ДНК вируса гепатита В, ДНК вирусов простого герпеса 1-2 типов, ДНК цитомегаловируса, ДНК вируса Эпштейна-Барр, ДНК токсоплазмы, ДНК уреоплазмы, ДНК хламидий, ДНК микоплазмы в крови и соскобах. Выращенные *in vitro* культуры клеток также исследовали методом ПЦР для выявления перечисленных инфекционных агентов.

2.12. Клиническое исследование безопасности и эффективности ММСК пуповины в терапии длительно незаживающих ран

2.12.1. Пациенты

Клинические исследования были проведены по протоколу открытого пилотного исследования эффективности и безопасности клеточной терапии ММСК, утвержденного в этическом комитете РГМУ им. Пирогова (Регистрационное удостоверение № ФС-2006/341 от 04.12.2006 Росздравнадзора). Исследование проведено в период с 2006 – 2007 гг., на базе кафедры госпитальной хирургии № 1 лечебного факультета ГОУ ВПО РНИМУ им. Н.И.

Пирогова в отделении гнойной хирургии городской клинической больницы №15 им. О.М. Филатова.

В исследовании приняло участие, в рамках GCP, 108 пациентов, имеющих хронические раны различной этиологии, которые были рандомизированы в группу клеточной терапии (59 человек) и группу сравнения (49 человек) согласно критериям включения и исключения (таблица 2.2). Пациенты подписывали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Таблица 2.2. Критерии отбора пациентов.

Критерии включения	Критерии исключения
<ul style="list-style-type: none"> • Наличие хронической раны; • II фаза раневого процесса; • возраст от 18 до 90 лет; • добровольное информированное согласие пациента на участие в исследовании. 	<ul style="list-style-type: none"> • беременность и период лактации; • наличие сопутствующей онкопатологии; • хронические заболевания в стадии декомпенсации; • больные в терминальном состоянии; • алкоголизм или лекарственная зависимость в течение 2 лет до начала исследования; • психические заболевания; • сепсис, септикопиемия.

2.12.2. Клиническое обследование

Клиническое обследование пациентов включало в себя анализ жалоб и анамнеза, физикальное исследование, тщательную клиническую оценку венозного русла нижних конечностей, состояния язвы и степени изменения периульцелярных тканей.

До включения в исследование пациенты обеих группы получали стандартное лечение, одобренное для хронических ран (хирургическая обработка, гидроколлоидные повязки, консервативная фармакотерапия и адекватная

анестезия) в течение четырех недель.

Динамику раневого процесса оценивали по визуальному состоянию хронической раны и окружающим ее кожным покровам при каждом визите, которая включала оценку площади раны, гиперемии, отека, инфильтрации, наличия перифокального дерматита, наложения фибрина, наличия некротических тканей, качества грануляционной ткани, кровоточивости, отделяемого ран и язв в соответствии со шкалой BWAT (Bates-Jensen Wound Assessment Tool), болевого синдрома в соответствии с числовой рейтинговой шкалой для боли (NRS), микроваскулярного кровотока с помощью ультразвуковой доплерографии и измерение транскутанного напряжения кислорода.

Оценку площади раны и микроваскулярного кровотока проводили через 2 и 4 недели после начала терапии. Оценку транскутанного напряжения кислорода проводили только через 2 недели.

2.12.3. Бактериологическое исследование отделяемого язв и ран

Бактериологическое исследование отделяемого язв и ран выполнялось на базе лаборатории клинической микробиологии ГКБ №15 им. О.М.Филатова.

Для количественного определения микроорганизмов в раневом отделяемом использовали стерильные диски фильтровальной бумаги диаметром 5-6 мм, сорбционная емкость которых была 20 мкл. Для этого диск при помощи стерильного пинцета помещали на поверхность язв. После этого его переносили в пробирку с 1 мл стерильного физиологического раствора и встряхивали в течение 1-2 мин. Далее делали серийные десятикратные разведения и из каждого разведения по 0,1 мл производили посевы на чашки Петри с 5 % кровяным агаром и на среду Левина. Чашки инкубировали при 37°C в течение 20-22 часов, подсчитывали количество выросших колоний и определяли количество микроорганизмов в исходном образце (КОЕ/мл). Выросшие культуры идентифицировали с использованием полуавтоматического анализатора «CRYSTAL» (Becton Dickinson, USA). Чувствительность к антибиотикам

определяли на среде Мюллера-Хинтона дискодиффузионным методом.

2.12.4. Процедура введения препарата ММСК пуповины в форме суспензии пациентам

Клеточную терапию проводили в перевязочной или малой операционной с обязательным соблюдением правил асептики и антисептики. При выполнении процедуры пациент находился в горизонтальном положении, учитывая наиболее удобный и свободный доступ к раневому дефекту. Перед проведением клеточной терапии раневой дефект и зону вокруг него обрабатывали раствором антисептика (хлоргексидин, мирамистин, лавасепт), затем смывали его стерильным физиологическим раствором, осушали стерильной салфеткой, обкладывая зону обкалывания. Суспензию клеток в количестве 20 млн, подготовленную в соответствии с процедурами, описанными в п. 2.12.1., забирали в шприц объемом 2 мл из транспортного контейнера. Далее производили инъекции суспензией клеток по периферии раневого дефекта (подкожно и внутримышечно), в дно раны (интрагрануляционно или внутримышечно), через каждые 8-10 мм в объеме 0,1 мл суспензии клеток в жизнеспособные ткани. После проведения клеточной терапии накладывали асептическую повязку, смоченную стерильным физиологическим раствором, или атравматическую повязку с гидрогелем (без цитотоксических добавок, в т.ч. антисептиков) на 2-3 дня. Далее проводили перевязки через 2-3 дня, с атравматической повязкой и/или гидрогелями.

2.12.5. Планиметрия

Площадь раневого дефекта (длина x ширина) определяли методом контактной планиметрии с учетом краевой и очаговой эпителизации по методу Л.Н. Поповой (1942). Основными сравнительными критериями заживления были выбраны изменение площадей ран и скорость эпителизации (ХР). Скорость эпителизации рассчитывалась по формуле: $ХР = (S - S_n) / t$, где S - начальная

площадь язвы до лечения, S_n – площадь при последующем измерении, t – число дней между измерениями.

2.12.6. Лазерная доплеровская флоуметрия (ЛДФ)

Фиксируемый доплеровский сигнал использовали для измерения сегментарного систолического давления и анализа записанной на ленте доплеровской кривой. Измерения проводили с помощью одноканального лазерного флоуметра BLF-21 фирмы «Transonic System Inc» (США) с помощью поверхностного датчика типа «R» в стандартных точках в течение 15-30 секунд после стабилизации показателей перфузионного кровотока.

2.12.7. Определение уровня транскутанного напряжения кислорода

Измерение транскутанного напряжения кислорода тканей ($T_{sp}O_2$) выполняли аппаратом TCM-400 фирмы «RADIOMETR» (Дания). Исследовали базальный уровень микрокровотока, а также проводили ортостатическую пробу, которая заключалась в поднятии нижней конечности в лежащем положении на 30-450 в течение 3 мин. Стандартными точками исследования микрокровотока являлись: тыльная поверхность стопы в I-ом межпальцевом промежутке, подошвенная поверхность стопы в области свода, верхняя треть голени по наружной поверхности.

2.13. Статистическая обработка результатов исследований

Результаты обрабатывали вариационно-статистическими методами. Для проверки нормальности распределения выборок использовали критерий согласия Колмогорова-Смирнова. На основании выводов о нормальности выборки рассчитывали медиану (Me) и интерквартильный размах [25%; 75%] или среднее и среднеквадратичное отклонение ($M \pm \delta$). Достоверность различий между

группами оценивали с помощью U-теста Манна-Уитни, критерия хи-квадрат Пирсона (X^2) или t-критерия Стьюдента. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05. Расчеты выполняли в программе Statistica 6.0.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Сравнительный анализ ММСК, изолированных из различных тканей

3.1.1. Морфологическая характеристика первичных культур ММСК

Биопсию кожи, аспират костного мозга, подкожную жировую клетчатку или липоаспират, пуповину новорожденного получали у пациентов городской клинической больницы №15 им. О.М. Филатова г. Москвы с добровольного информированного согласия.

Были получены адгезивные культуры ММСК, изолированных из кожи (рисунок 3.1, а), пуповины новорожденного (рисунок 3.1, б), костного мозга (рисунок 3.1, в) и жировой ткани (рисунок 3.1, г) человека. В полученных культурах основная масса клеток имела фибробластоподобную морфологию (Yarygin K.N. et al., 2006, Suzdal'tseva Y.G. et al., 2007b)

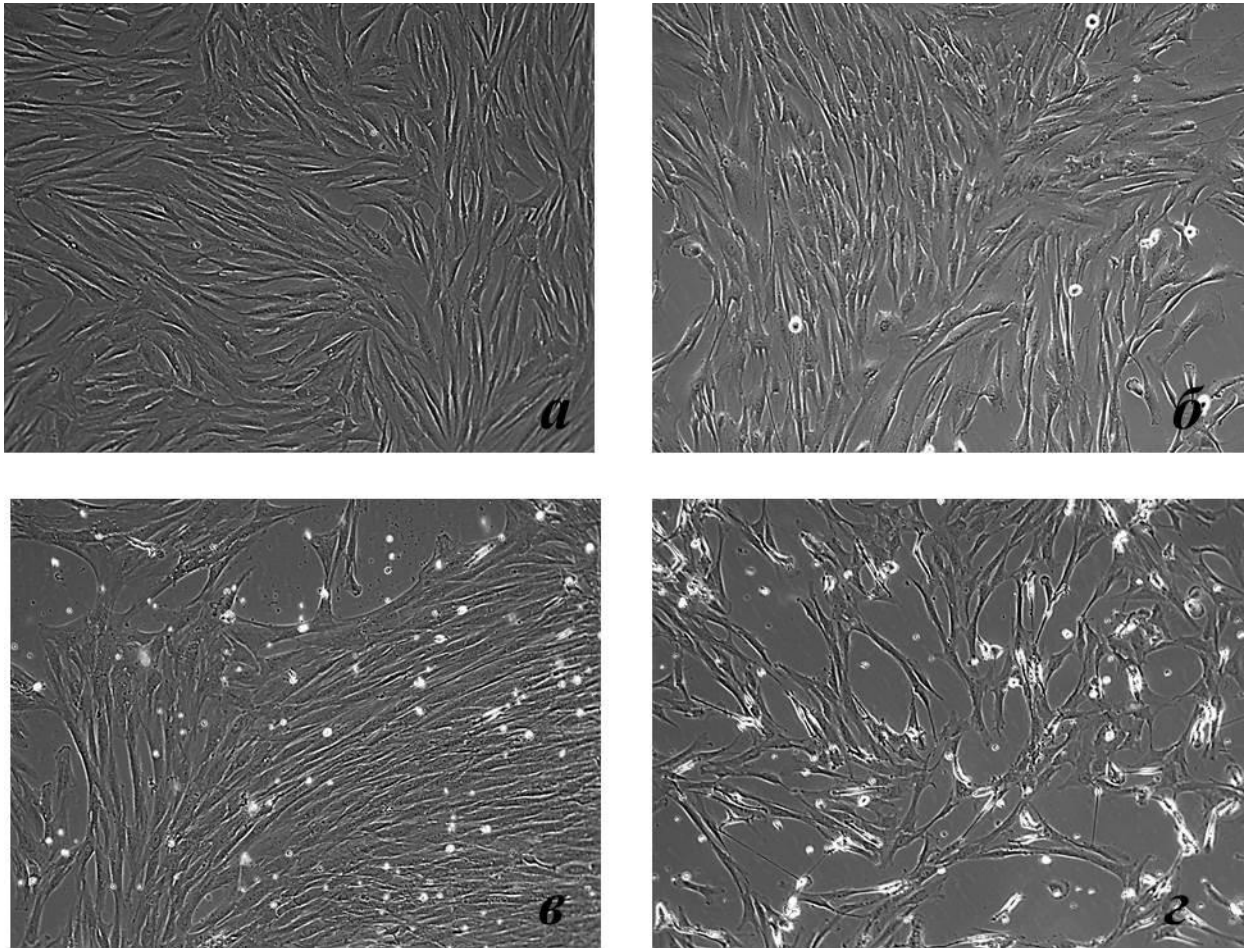


Рисунок 3.1. Морфологическая характеристика ММСК, изолированных из кожи (а), пуповины (б), костного мозга (в), жировой ткани (г). ММСК способны к адгезии к поверхности пластика, имеют фибробластоподобную морфологию, обладают способностью к экспансии в культуре. На фотографии представлены 3 дневные культуры 2 пассажа. Фазовый контраст, увеличение x200.

Однако в культуре ММСК костного мозга обнаруживалась гетерогенность популяций. Образующиеся колонии клеток отличались размерами, морфологией, скоростью размножения клеток. Среди прикрепляющихся клеток помимо фибробластоподобных (рисунок 3.2, а) встречались колонии крупных круглых клеток и колонии мелких клеток каплевидной формы, которые, однако, исчезали в процессе пассирования (рисунок 3.2, б).

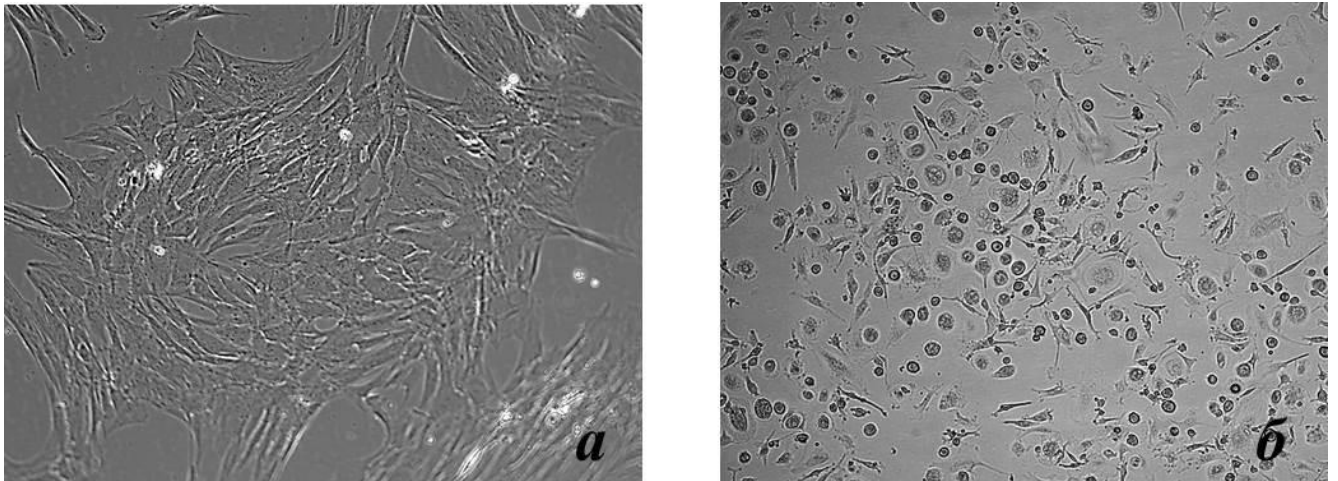


Рисунок 3.2. Гетерогенность клеток костного мозга, способных к адгезии к поверхности пластика. На фотографии представлены 3 дневные культуры 1 пассажа. Фазовый контраст, увеличение x200.

Фибробластоподобные клетки культивировали до 5-го пассажа, при этом на первом, втором и третьем пассажах часть культуры подвергали криоконсервации для создания банка первичных клеточных культур.

3.1.2. Сравнительный анализ экспрессии цитоплазматических белков в ММСК

В настоящее время прилагаются значительные усилия по поиску специфических белковых (или небелковых) маркеров, которые позволят воспроизводимо и достоверно идентифицировать и выделить субпопуляцию ММСК из общего пула клеток биопсии. Однако до сих пор однозначного специфического поверхностного маркера для ММСК не найдено. Различные вариации в экспрессии поверхностных и цитоплазматических белков в ММСК возникают также из-за различий в методах выделения, тканевой и видовой специфичности и условий культивирования. Тем не менее, точно известно, что на

мембране ММСК отсутствуют характерные для клеток гематопоезического ряда антигены – CD45, CD34, CD11b и CD14, CD3, CD19.

Таким образом, возникла задача сравнить цитофенотипический профиль ММСК, выделенных из кожи, костного мозга, жировой ткани, пуповины новорожденного.

Было проведено сравнение полученных ММСК по экспрессии цитоплазматических белков: виментина, нестина, коллагена 1 и 2 типов. Проведенный сравнительный анализ клеток полученных культур показал как сходство, так и существенные различия между ними (Suzdal'tseva Y.G. et al., 2007b).

Все клетки полученных культур экспрессировали виментин - белок цитоплазматического скелета клеток, что является характерным для клеток мезенхимального ряда (рисунок 3.3).

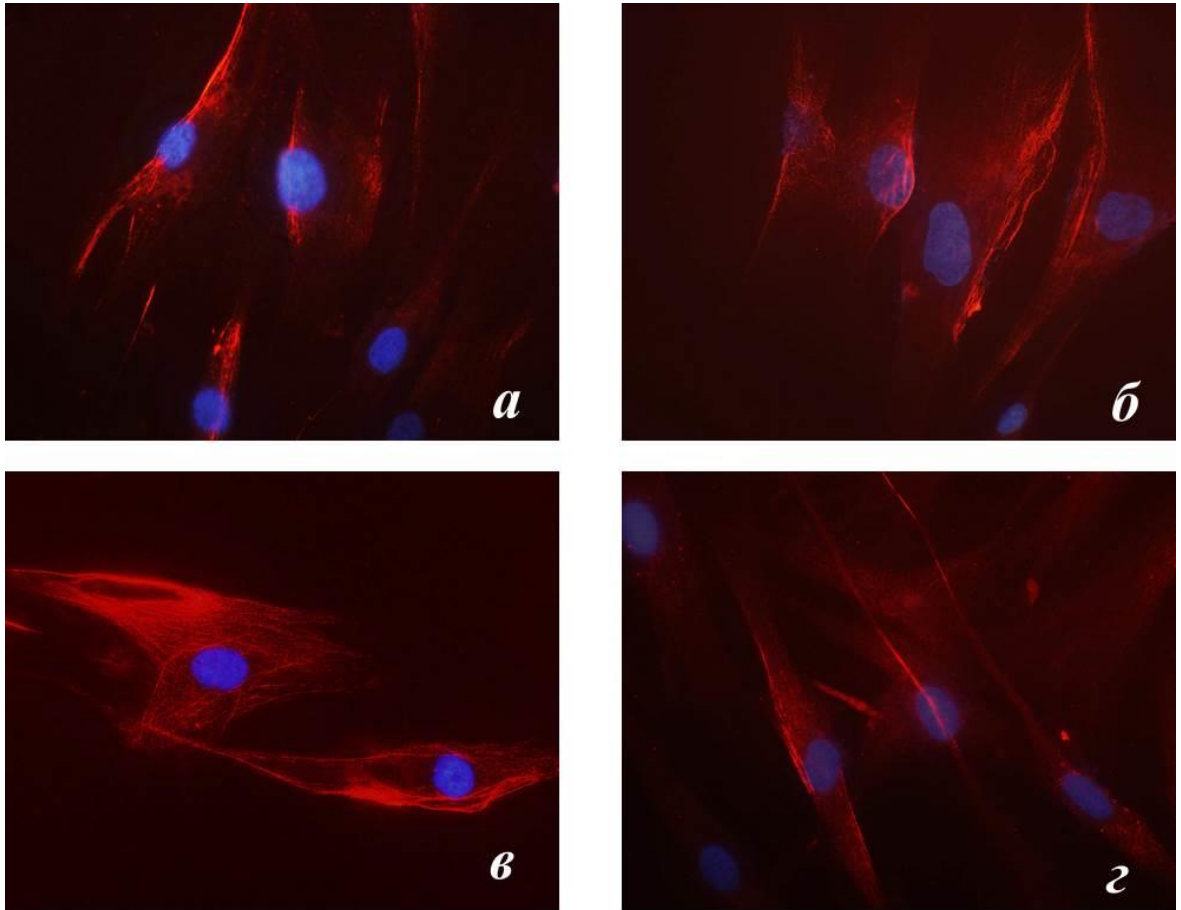


Рисунок 3.3. Экспрессия виментина (Rhodamin) в культурах ММСК, изолированных из кожи (а), пуповины (б), костного мозга (в), жировой ткани (г). Ядра окрашены DAPI. На фотографии представлены 3 дневные культуры 2 пассажа. Увеличение $\times 630$.

Значительная часть популяции ММСК пуповины экспрессировала нестин – маркер незрелых и прогениторных клеток ($68,5 \pm 18,4\%$ при подсчете при подсчете в 4-5 полях зрения в не менее 5 образцах 3 культур неродственных доноров) (рисунок 3.4, а). Количество клеток пуповины, экспрессирующих нестин (в процентном соотношении), и уровень экспрессии этого белка снижались при повышении плотности монослоя (рисунок 3.4, б). ММСК дермального происхождения и ММСК костного мозга и жировой ткани нестин не экспрессировали.

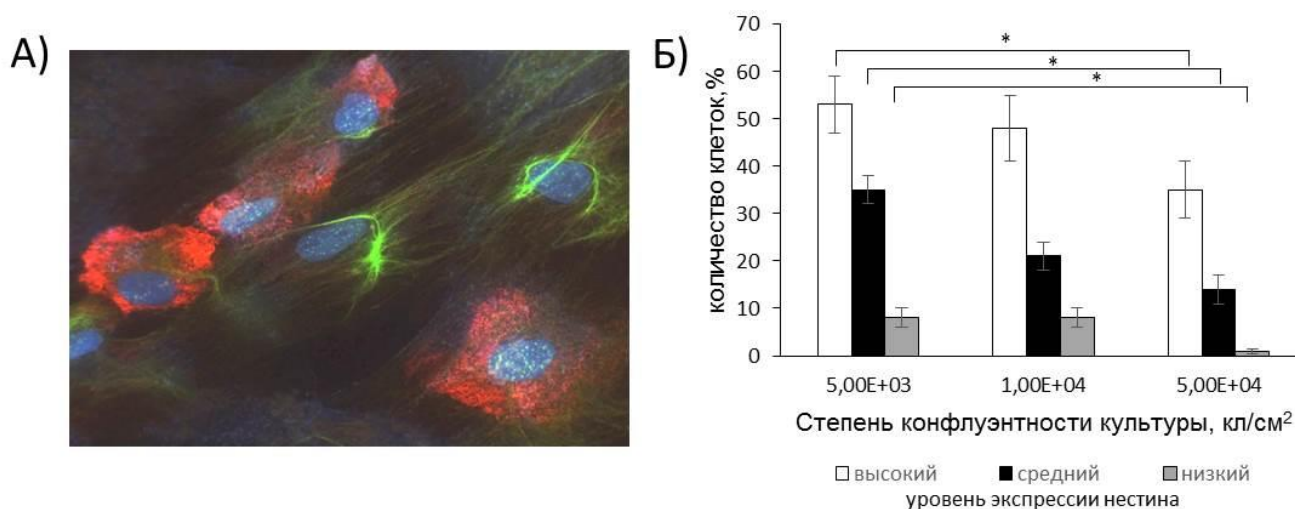


Рисунок 3.4. Экспрессия нестина в культуре ММСК пуповины новорожденного. А) - Коэкспрессия коллагена II типа (Rhod) и нестина (FITC) ММСК пуповины. Ядра окрашены DAPI. Увеличение $\times 630$. Б) – Уровень экспрессии нестина в ММСК пуповины в зависимости от степени конfluэнтности культуры. Измерения проводились в культурах 2-ого пассажа через сутки после посева. Представлены данные 3-х независимых экспериментов (* $P < 0.05$).

Значительная часть популяции ММСК пуповины экспрессировала коллаген I типа ($80,6 \pm 26,2\%$ при подсчете в 4-5 полях зрения в не менее 5 образцах 3 культур неродственных доноров). В культуре ММСК кожи только единичные клетки экспрессировали этот белок ($2,5 \pm 1,4$). Уровень экспрессии коллагена I типа в ММСК костного мозга и жировой ткани сильно варьировал в зависимости от состояния здоровья и возраста доноров ($67,2 \pm 28,6$ и $72,8 \pm 31,4$ соответственно)(рисунок 3.5).

Значительная часть популяции ММСК пуповины экспрессировала коллаген II типа ($57,2 \pm 14,5\%$ при подсчете в 4-5 полях зрения в не менее 5 образцах 3 культур неродственных доноров). Число ММСК пуповины, экспрессирующих коллаген II тип, и уровень экспрессии этого белка увеличивались пропорционально времени культивирования. Плотность монослоя клеток пуповины не влияла на уровень экспрессии коллагена II типа (рисунок 3.6). ММСК, выделенные из кожи, костного мозга и жировой ткани не экспрессировали коллаген II типа в стандартных условиях культивирования.

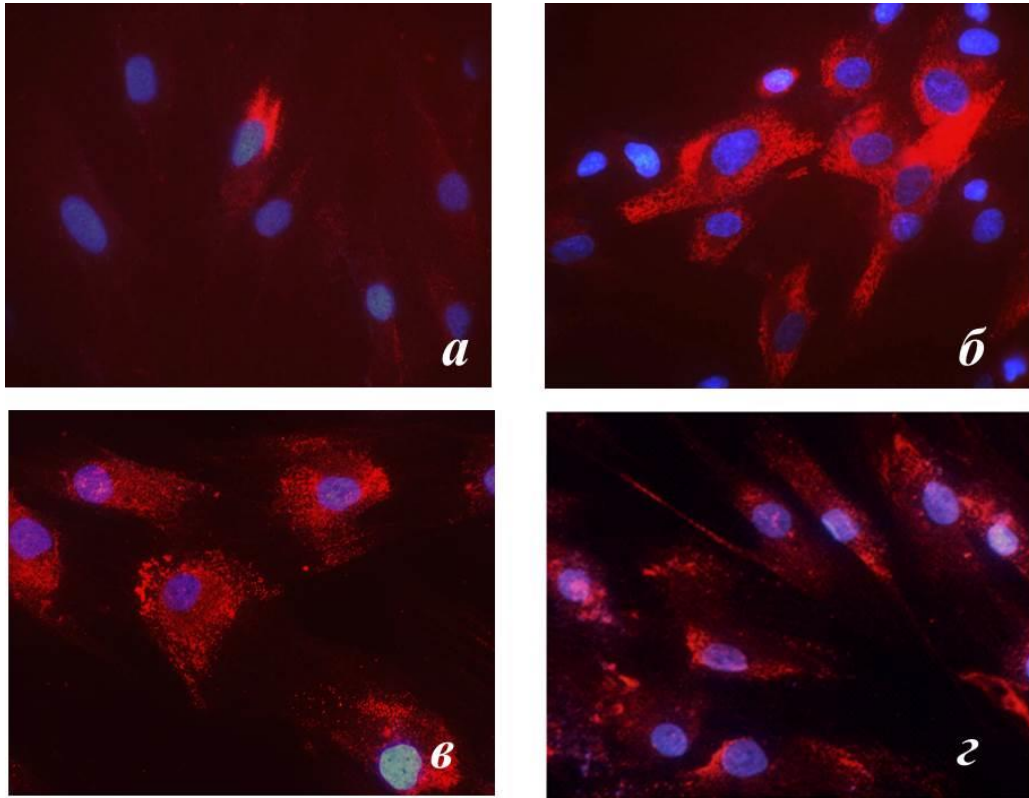


Рисунок 3.5. Экспрессия коллагена I типа (Rhodamin) в культурах ММСК, изолированных из кожи (а), пуповины (б), костного мозга (в), жировой ткани (г). Ядра окрашены DAPI. На фотографии представлены 3 дневные культуры 2 пассажа. Увеличение $\times 630$.

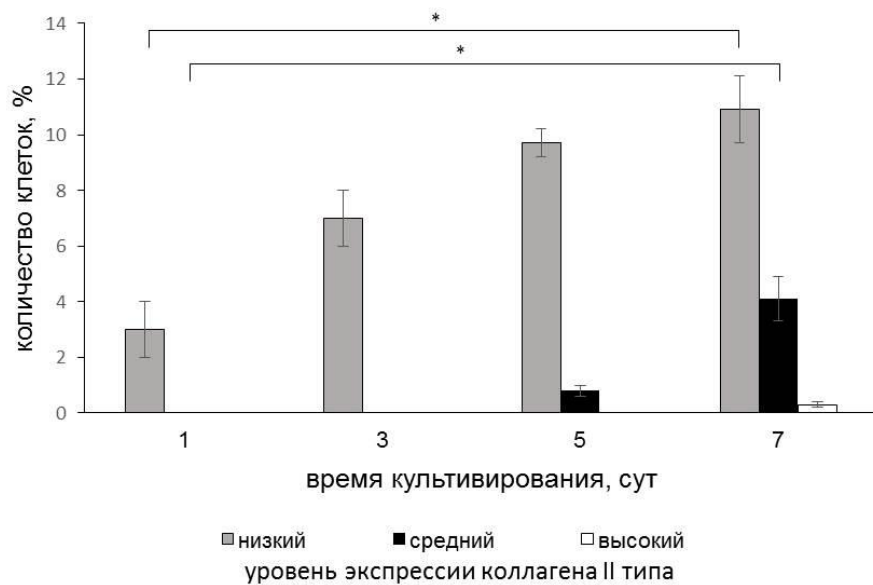


Рисунок 3.6. Уровень экспрессии коллагена II типа в культуре ММСК пуповины новорожденного. Измерения проводились в культурах 2-ого пассажа через сутки после посева. Представлены данные 3-х независимых экспериментов (* $P < 0.05$).

Высокий уровень экспрессии клетками пуповины коллагенов I и II типов объясняется, по-видимому, тем, что функцией этих клеток является образование специальной соединительной ткани, так называемого Вартоньева студня, который окружает сосуды пуповины. Двойное иммуноцитохимическое окрашивание клеток пуповины на коллаген II типа и нестин показало, что в культуре присутствуют клетки, экспрессирующие только коллаген 2 типа, только нестин, а также клетки коэкспрессирующие коллаген 2 типа и нестин (рисунок 3.4, а).

В культуре ММСК пуповины, костного мозга и жировой ткани на первых пассажах незначительное количество клеток экспрессировали маркер эндотелиоцитов - фактор фон Виллебранда (рисунок 3.7). Количество клеток, экспрессирующих фактор фон Виллебранда, в этих культурах ММСК уменьшалось при пассировании и к третьему пассажиру они исчезали из культуры. На фибробластоподобных клетках кожи фактор фон Виллебранда не выявлялся. Экспрессию этого белка ММСК пуповины, костного мозга и жировой ткани в культурах на первых пассажах можно объяснить тем, что из этих тканей, богатых сосудистой сетью, в культуру попадают эндотелиоциты.

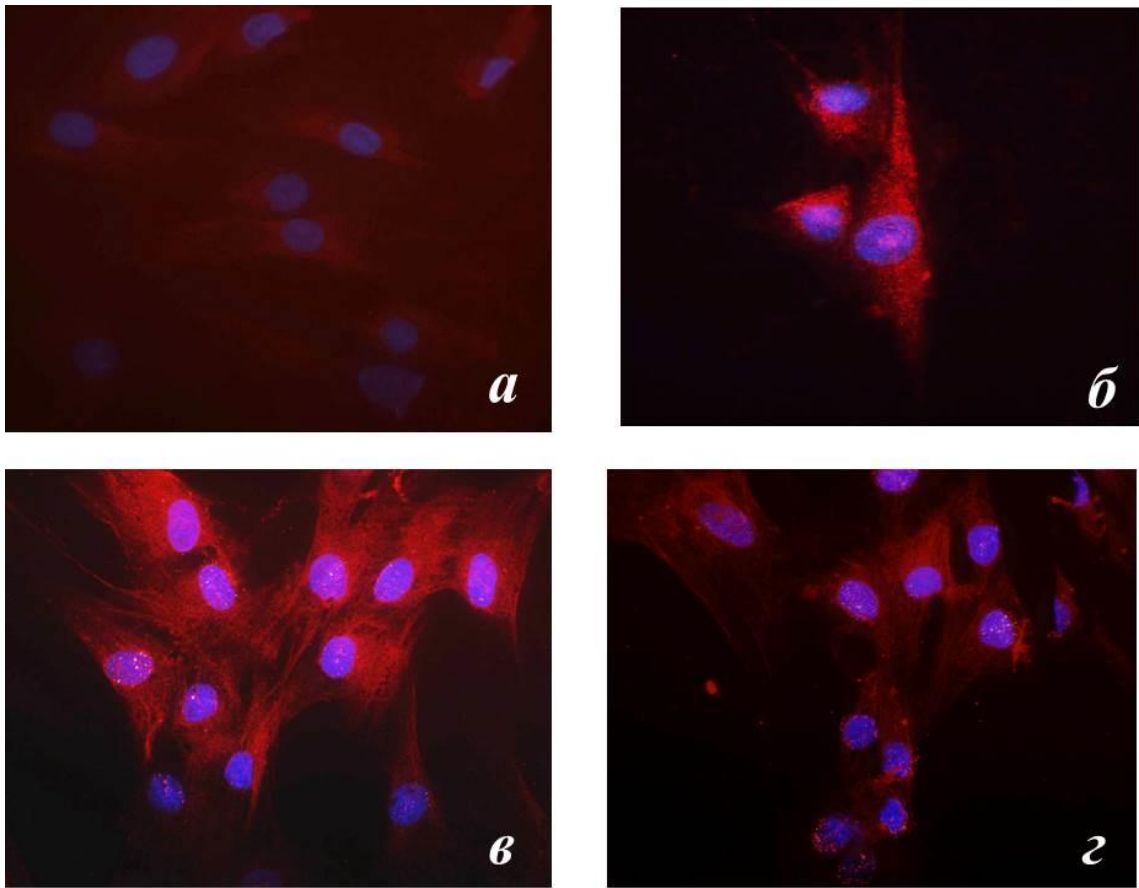


Рисунок 3.7. Экспрессия фактора фон Виллебранда (Rhodamin) в культурах ММСК, изолированных из кожи (а), пуповины (б), костного мозга (в), жировой ткани (г). Ядра окрашены DAPI. На фотографии представлены 3 дневные культуры 2 пассажа. Увеличение x630.

Таким образом, показано, что ММСК, выделенные из кожи, костного мозга, жировой ткани и пуповины не имели отличий по экспрессии виментина и коллагена 1 типа. ММСК пуповины отличались от остальных культур высоким содержанием клеток, экспрессировавших нестин и коллаген 2 типа.

3.1.3. Сравнительный анализ экспрессии поверхностных белков в ММСК

В клетках полученных культур были также исследованы экспрессия и экспонирование на поверхности мембраны маркеров прогениторных и стволовых клеток CD14, CD34, CD44, CD45, CD49b, CD54, CD90, CD105, CD106, CD117 методом проточной цитофлуориметрии (Lupatov A.Y. et al., 2006, Suzdal'tseva Y.G.

et al., 2007b). Были оценены пропорциональное количество клеток, экспрессирующих эти маркеры, а также интенсивность экспрессии. В эксперимент отбирали культуры ММСК трех неродственных доноров для каждого типа клеток. Уровень экспрессии маркеров оценивали по гистограмме интенсивности флуоресценции. Пропорциональное количество клеток, экспрессирующих маркеры, определяли с помощью гейтирования по пороговому значению флуоресценции.

Было установлено, что все клетки полученных культур не экспрессировали маркеров гемопоэтических клеток CD14, CD34 и CD45 (рисунок 3.8).

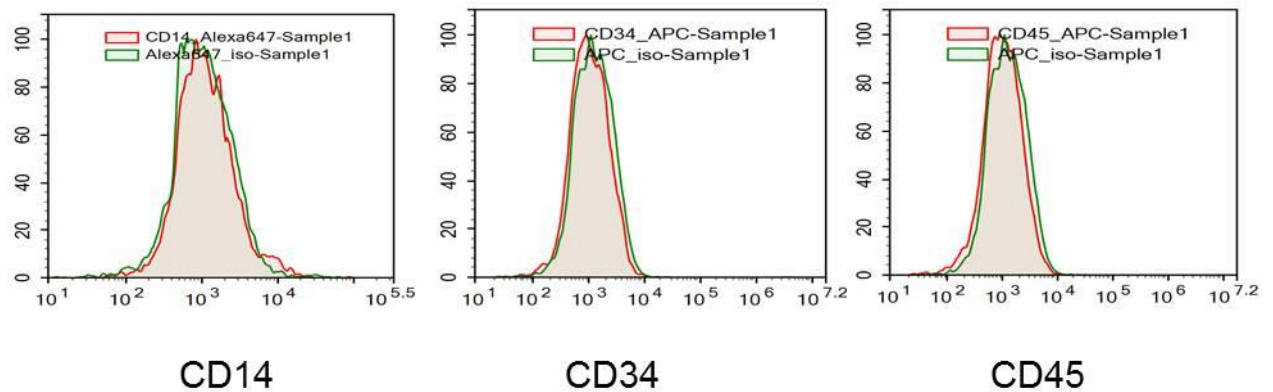


Рисунок 3.8. Репрезентативные данные проточной флуориметрии ММСК костного мозга, окрашенных антителами к поверхностным маркерам CD14, CD34 и CD45, конъюгированных с флуорохромами Alexa647, APC. Красным цветом выделен изотипический контроль; специфические поверхностные маркеры выделены зеленым цветом.

Неотъемлемым свойством ММСК является высокий уровень экспрессии молекул адгезии. Молекулы CD44, CD54, CD49b на поверхности ММСК играют важную роль в узнавании компонентов внеклеточного матрикса и проведении в клетку сигналов, запускающих каскады, участвующие в регуляции процессов миграции и хоуминга клеток, иммуносупрессии и ремоделирования.

Исследование культур ММСК, выделенных из кожи, пуповины, костного мозга и жировой ткани не выявило различий в уровне экспрессии CD44. Для ММСК всех культур был характерен высокий уровень экспрессии белков этого комплекса (рисунок 3.9). Относительный уровень экспонирования CD44 на поверхности ММСК изучаемых культур был $91,25 \pm 28,39$ усл. ед. флуоресценции. Значимых изменений в интенсивности флуоресценции в процессе пассирования клеток не было выявлено. Пропорциональное количество ММСК, экспрессирующих CD44, превышало 80% независимо от источника происхождения.

Наоборот, уровень экспрессии CD54, в состав которого входит молекула межклеточной адгезии (ICAM), которая является лигандом для β_2 -интегринов, значительно различался среди ММСК полученных культур. Интенсивность флуоресценции, а также пропорциональное количество клеток, экспрессирующих CD54, значительно менялся в процессе пассирования клеток, и зависел и от источника происхождения, и от времени культивирования. Так наименьший уровень экспрессии был характерен для ММСК дермального происхождения. Относительный уровень экспонирования CD54 на поверхности ММСК кожи был $8,28 \pm 5,71$ усл. единиц флуоресценции. Среднее количество клеток, экспрессирующих этот маркер, было $15,2 \pm 6,8$ %. Наиболее высокий уровень экспрессии CD54 был выявлен в культуре ММСК пуповины и составлял $184,82 \pm 46,20$ усл. ед. флуоресценции. Среднее количество клеток, экспрессирующих CD54, было $82,1 \pm 12,5$ %. Культуры ММСК костного мозга и жировой ткани характеризовались значительной гетерогенностью в уровне экспрессии CD54. Уровень экспрессии CD54 в ММСК зависел от плотности монослоя и длительности культивирования (рисунок 3.10). Относительный уровень экспонирования CD54 на поверхности ММСК костного мозга и жировой ткани был сопоставимым и составлял $153,31 \pm 41,87$ и $167,82 \pm 46,20$ усл. ед. флуоресценции соответственно. Среднее количество клеток, экспрессирующих CD54, было также сходным и составляло $64,2 \pm 9,6$ % для ММСК костного мозга и $71,6 \pm 10,3$ % для ММСК жировой ткани. Различия в уровне экспрессии CD54

клетками культур, выделенных из различных источников, можно объяснить тем, что синтез этого белка регулируется микроокружением и, в частности, провоспалительными цитокинами.

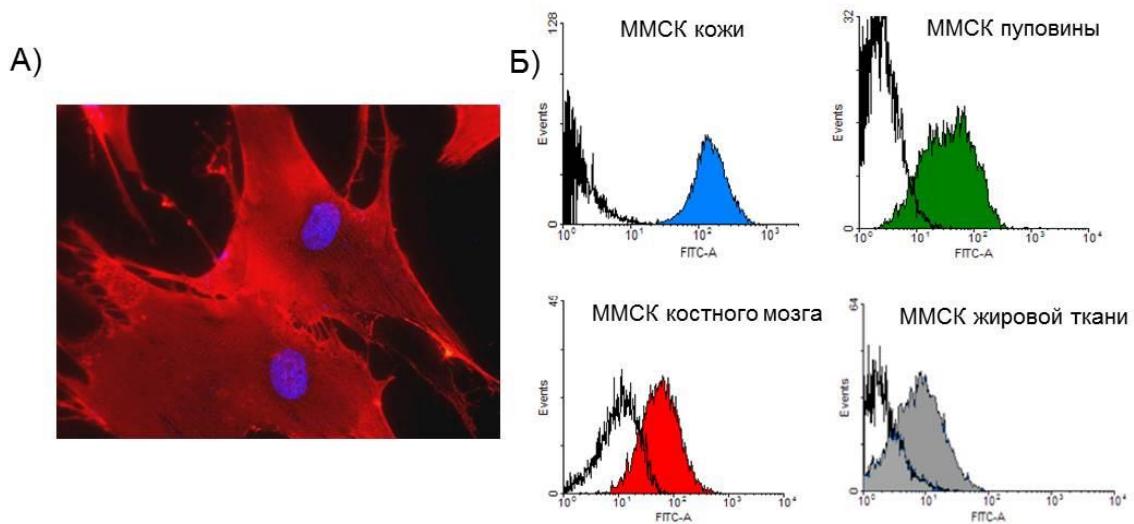


Рисунок 3.9. Экспрессия CD44 в культурах ММСК. А) – репрезентативная фотография ММСК костного мозга, окрашенных CD44 (Rhodamin). Ядра окрашены DAPI. На фотографии представлены 2 дневные культуры 3 пассажа. Увеличение $\times 630$. Б) - проточная флуориметрия ММСК, окрашенных антителами к CD44, конъюгированных с FITC. Черным цветом выделен изотипический контроль.

CD49b является коллагеновым рецептором, взаимодействующий с коллагеном I и III типов. Уровень экспрессии данного маркера был невысок относительно других молекул адгезии для культур ММСК костного мозга и составлял $1,41 \pm 1,99$ усл. ед. флуоресценции. Уровень экспрессии CD49b в культурах ММСК кожи, пуповины и жировой ткани был несколько выше и составлял $7,21 \pm 2,74$, $8,39 \pm 3,22$ и $6,43 \pm 2,81$ усл. ед. флуоресценции соответственно. Однако количество клеток, экспрессирующих CD49b, в этих культурах было довольно высоким и превышало 70% независимо от источника происхождения. В целом низкий уровень экспрессии может свидетельствовать о незначительной роли данной молекулы адгезии при росте клеток в культуре в отсутствии коллагеновой подложки.

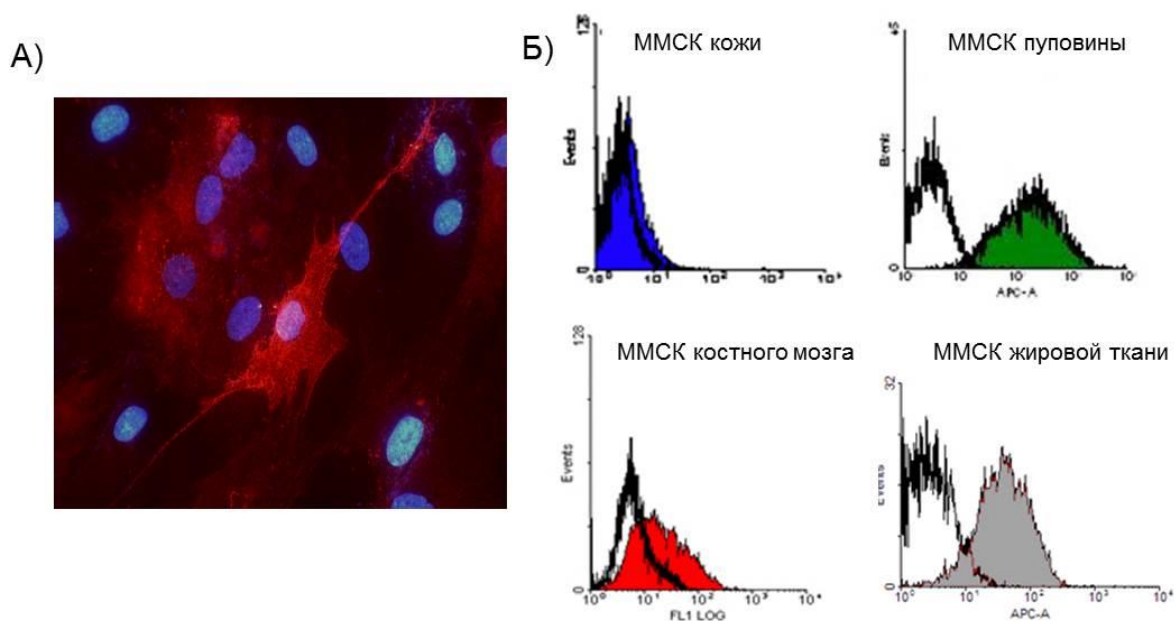


Рисунок 3.10. Экспрессия CD54 в культурах ММСК. А) – репрезентативная фотография ММСК костного мозга, окрашенных CD54 (Rhodamin). Ядра окрашены DAPI. На фотографии представлены 2 дневные культуры 3 пассажа. Увеличение $\times 630$. Б) - проточная флуориметрия ММСК, окрашенных антителами к поверхностным маркерам CD54, конъюгированных с APC. Черным цветом выделен изотипический контроль.

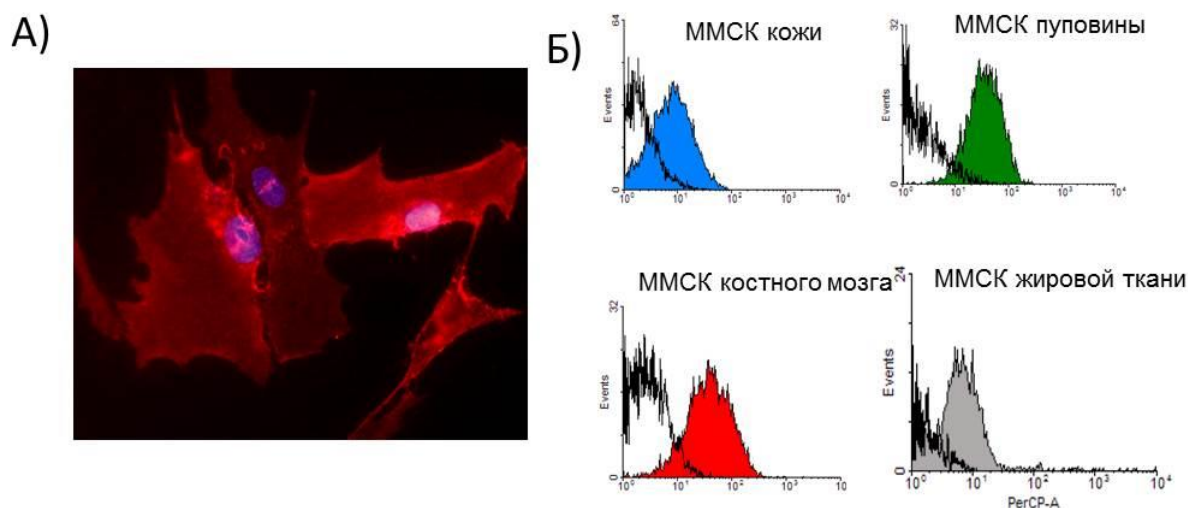


Рисунок 3.11. Экспрессия CD49b в культурах ММСК. А) – репрезентативная фотография ММСК костного мозга, окрашенных CD49b (Rhodamin). Ядра окрашены DAPI. На фотографии представлены 2 дневные культуры 3 пассажа. Увеличение $\times 630$. Б) - проточная флуориметрия ММСК, окрашенных антителами к поверхностным маркерам CD49b, конъюгированных с Per-CP. Черным цветом выделен изотипический контроль.

Наряду с маркером эндотелиоцитов - фактором фон Виллибранда в ММСК всех полученных культур была исследована экспрессия молекулы адгезии эндотелиоцитов – VCAM (CD106). Однако экспрессия этого белка была выявлена только на ММСК костного мозга в пределах первых пассажей и относительный уровень экспонирования CD106 на поверхности ММСК костного мозга составлял $35,50 \pm 9,42$ усл. ед. флуоресценции соответственно. Количество клеток, экспрессирующих CD106, было также довольно высоким и составляло $64,7 \pm 15,8$ % на первом пассаже, однако при дальнейшем культивировании резко снижалось практически к нулю. В культурах ММСК кожи, пуповины и жировой ткани экспрессии CD106 был очень низкий, на уровне фоновых значений и составлял $1,34 \pm 2,36$, $1,83 \pm 1,91$ и $3,64 \pm 1,73$ усл. ед. флуоресценции соответственно (рисунок 3.12). Количество клеток, экспрессирующих CD106, в этих культурах также было очень низким и не превышало 3%. Этот факт может быть объяснен наличием большого количества эндотелиоцитов в культуре прикрепляющихся клеток костного мозга на первых пассажах и активным реципрокным взаимодействием их с фибробластоподобными клетками.

Таким образом, ММСК, изолированные из кожи, пуповины, костного мозга и жировой ткани, характеризовались высоким уровнем экспрессии и экспонировании на поверхности мембраны молекул адгезии CD44, CD54, CD49b.

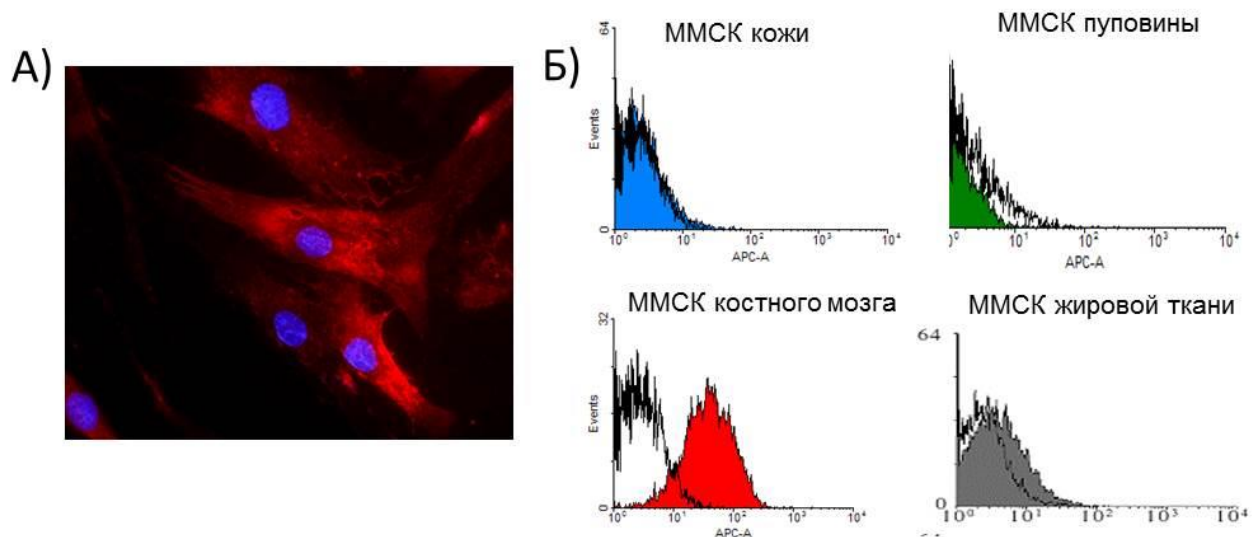


Рисунок 3.12. Экспрессия CD106 в культурах ММСК. А) – репрезентативная фотография ММСК костного мозга, окрашенных CD106 (Rhodamin). Ядра окрашены DAPI. На фотографии представлены 2 дневные культуры 3 пассажа. Увеличение $\times 630$. Б) - проточная флуориметрия ММСК, окрашенных антителами к поверхностным маркерам CD106, конъюгированных с APC. Черным цветом выделен изотипический контроль.

Важной характеристикой присутствия в полученных культурах стволовых и прогениторных клеток является наличие экспрессии в клетках рецепторов к факторам роста и трансформации. Таким образом мы охарактеризовали ММСК полученных культур по экспрессии CD117 и CD105.

Продукт гена *c-kit* (CD117) представляет собой рецептор к фактору стволовых клеток (SCF), который регулирует митотическое деление и запуск антиапоптотических событий в прогениторных клетках. Были выявлены значительные различия в уровне экспрессии CD117 в ММСК полученных культур. ММСК, выделенные из кожи, характеризовались отсутствием экспрессии этого рецептора. ММСК пуповины экспрессировали этот маркер на относительно высоком уровне $44,83 \pm 12,62$ усл. ед. флуоресценции. Количество клеток, экспрессировавших этот маркер, составляло $76,4 \pm 4,8$ %. Относительно высокий уровень экспрессии CD117, наряду с нестином, является

подтверждением наличия большого количества стволовых и прогениторных клеток в культурах в ММСК, выделенных из пуповины. В ММСК костного мозга и жировой ткани незначительное количество клеток экспрессировали CD117. Относительный уровень экспонирования этой молекулы на ММСК этих культур составлял $13,18 \pm 8,42$ и $6,55 \pm 2,76$ усл. ед. флюоресценции соответственно (Рисунок 3.13). Количество клеток, экспрессировавших этот маркер, составляло $11,4 \pm 4,2$ % для ММСК костного мозга и $18,7 \pm 5,9$ % для ММСК жировой ткани.

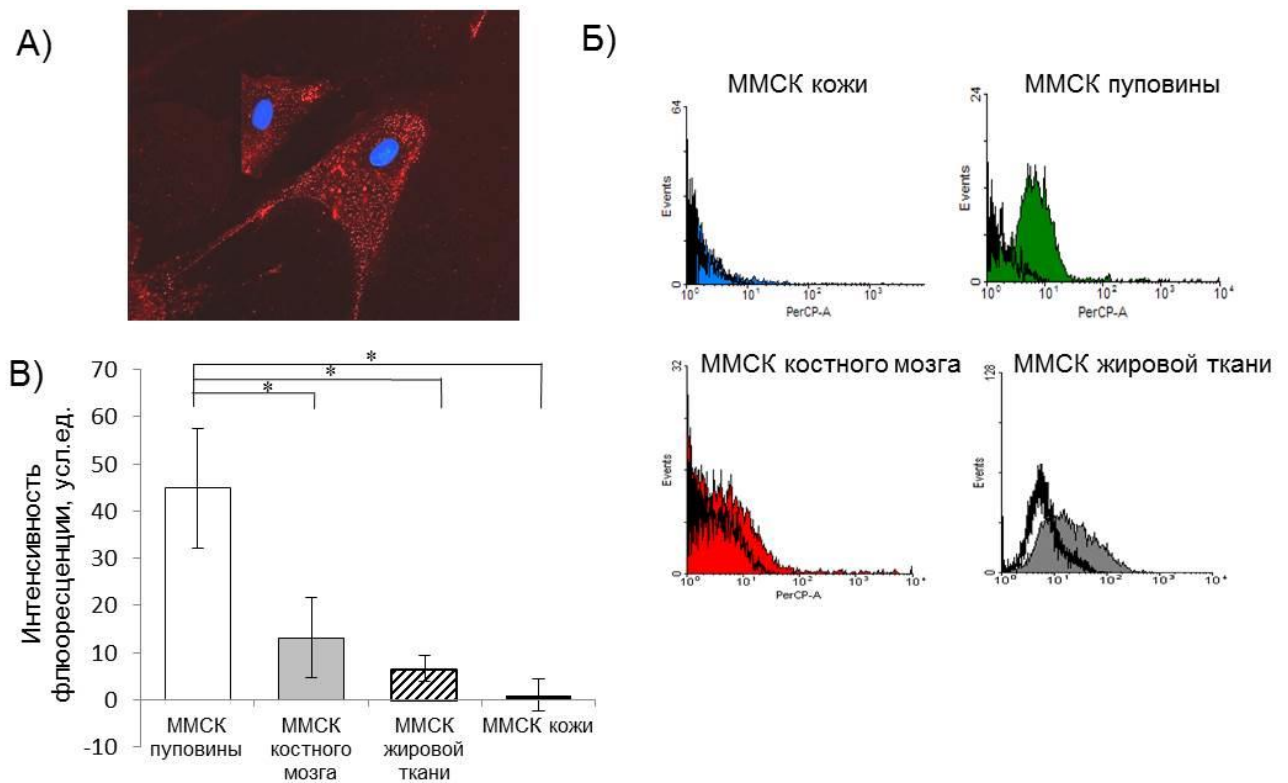


Рисунок 3.13. Экспрессия CD117 в культурах ММСК. А) – репрезентативная фотография ММСК пуповины, окрашенных CD117 (Rhodamin). Ядра окрашены DAPI. На фотографии представлены 2 дневные культуры 3 пассажа. Увеличение $\times 630$. Б) - проточная флуориметрия ММСК, окрашенных антителами к поверхностным маркерам CD117, конъюгированных с Per-CP. Черным цветом выделен изотипический контроль. В) - Уровень экспрессии CD117 в культурах ММСК. Представлены данные 3-х независимых экспериментов (* $P < 0.05$).

Экспрессия клетками рецептора к TGF-beta (CD105, эндоглину), определяет их способность воспринимать сигналы, запускающие каскад реакций, изменяющих морфологию, адгезивные свойства клеток и определяющих их способность к дифференцировке. Проведенные исследования экспрессии CD105 в ММСК не выявили различий между культурами, полученными из кожи, пуповины, костного мозга и жировой ткани. Уровень экспрессии CD105 был высоким во всех культурах (рисунок 3.14) и составлял $19,15 \pm 4,87$, $20,12 \pm 4,1$, $19,73 \pm 4,93$, $18,46 \pm 3,98$ усл. ед. флюоресценции соответственно. Количество клеток, экспрессирующих этот маркер, стабильно превышало 60% во всех культурах, независимо от происхождения и времени культивирования.

Все клетки полученных культур ММСК обладали также высоким уровнем экспрессии CD90, относящегося к семейству иммуноглобулиноподобных рецепторов. Относительный уровень экспонирования CD90 на поверхности ММСК, выделенных из костного мозга и жировой ткани составлял $243,75 \pm 53,63$ и $315,59 \pm 50,49$ усл. ед. флюоресценции соответственно. Для ММСК пуповины значения этого параметра составляло $415,59 \pm 36,85$. Самым высоким уровнем экспрессии CD90 обладали ММСК, выделенные из кожи - $564,36 \pm 73,37$ усл. ед. флюоресценции. Количество клеток, экспрессирующих CD90 на высоком уровне, во всех культурах составляло более 90%, и оставалось неизменным в процессе пассирования. ММСК полученных культур обладали также высоким уровнем экспрессии CD73 (экто-5'-нуклеотидазы). Средний уровень экспрессии этого маркера составлял $263,75 \pm 54,96$ усл. ед. флюоресценции. Количество клеток, стабильно и интенсивно экспрессирующих этот маркер, во всех культурах составляло более 80% независимо от происхождения (рисунок 3.14).

Таким образом, показано, что ММСК, выделенные из кожи, костного мозга, жировой ткани и пуповины не имели отличий по экспрессии маркеров CD44, CD49b, CD54, CD73, CD90, CD105. Культуры ММСК, выделенных их различных источников значительно различались по количеству клеток, экспрессирующих CD117.

Сравнительный анализ экспрессии цитоплазматических и поверхностных белков в культурах ММСК человека, пуповины, костного мозга и жировой ткани человека обнаружил сходный цитофенотипический профиль клеток независимо от источника происхождения. Значительное количество клеток полученных культур экспрессировало белки-маркеры, характерные для клеток мезенхимального происхождения: виментин, молекулы адгезии НСАМ, ИСАМ, $\alpha 2\beta 1$ интегрин. В то же время ММСК полученных культур экспрессировали также белок-маркер эндоглин (CD105), характерный для стволовых и прогениторных клеток. В соответствии с современными представлениями, принятыми консенсусом ученых (Horwitz E.M. et al., 2005, Dominici M. et al., 2006), ММСК полученных культур были охарактеризованы на экспрессию одновременно трех маркеров: CD105, CD73, CD90. Было показано, что ММСК, выделенные из различных источников, обладают высоким уровнем экспрессии этих маркеров и демонстрируют сходные свойства по этому критерию.

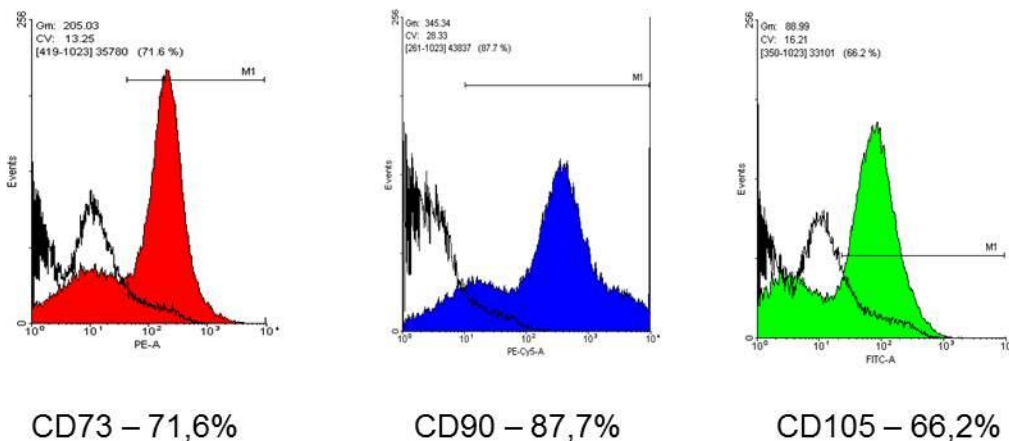


Рисунок 3.14. Репрезентативные данные проточной флуориметрии ММСК костного мозга, окрашенных антителами к поверхностным маркерам CD73, CD90 и CD105, конъюгированных с флуорохромами PE, FITC. Черным цветом выделен изотипический контроль.

В то же время сравнительный анализ экспрессии цитоплазматических и поверхностных белков в культурах ММСК человека, пуповины, костного мозга и

жировой ткани человека выявил некоторые характерные специфические особенности, присущие клеткам, выделенным только из этих тканей. Если принять цитофенотипический профиль ММСК костного мозга, как наиболее изученный, в качестве «золотого стандарта», то наибольшее сходство с ним проявляют ММСК, выделенные из жировой ткани. ММСК, выделенные из пуповины и кожи, обладают некоторыми существенными отличиями.

Так было показано, что значительное количество клеток ММСК пуповины экспрессирует нестин и *c-kit* – маркеры прогениторных клеток. Однако было также выявлено, что неотъемлемым свойством ММСК пуповины является высокий уровень экспрессии коллагенов I и II типов, что означает присутствие в культуре значительного количества коммитированных клеток, принимающих участие в создании хрящеподобной ткани - Вартоньева студня, окружающей сосуда пуповины.

ММСК, выделенные из кожи, наоборот, показали практически полное отсутствие прогениторных клеток, экспрессирующих нестин и *c-kit*. По всей вероятности, это означает, что ММСК, выделенные из кожи, коммитированы на поддержание гомеостаза ткани, из которой были выделены.

3.1.4. Сравнительный анализ способности к дифференцировке ММСК в ткани мезодермального происхождения

Одной из основных характеристик ММСК является их мультипотентность, т.е. способность при определенных условиях дифференцироваться в клетки разных типов тканей, и, в частности в клетки жировой, костной и хрящевой ткани.

Для определения способности ММСК, выделенных из кожи, пуповины, костного мозга и жировой ткани, дифференцироваться в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлении *in vitro* было подобрано специфическое микроокружение, включающее одновременно и растворимые факторы, и множественные контакты между соседними клетками, а также клеткой и внеклеточным матриксом (Suzdal'tseva Y.G. et al, 2007a).

Дифференцировку полученных культур ММСК в жировую ткань проводили в среде, содержащей гидрокортизон, изобутилметилксантин, инсулина, индометацин, 10% лошадиной сыворотки. После индукции в адипогенной среде дифференцировки к 14 дню культивирования практически все ММСК накапливали жировые вакуоли, окрашенные в красный цвет масляным красным (рисунок 3.15).

При культивировании в присутствии дексаметазона, аскорбиновой кислоты и фосфатов Са, ММСК способны дифференцироваться в остеобласты. ММСК в этих условиях образуют костные локусы, характеризующиеся накоплением минерализованного матрикса, которые позитивно окрашиваются ализариновым красным (рисунок 3. 16).

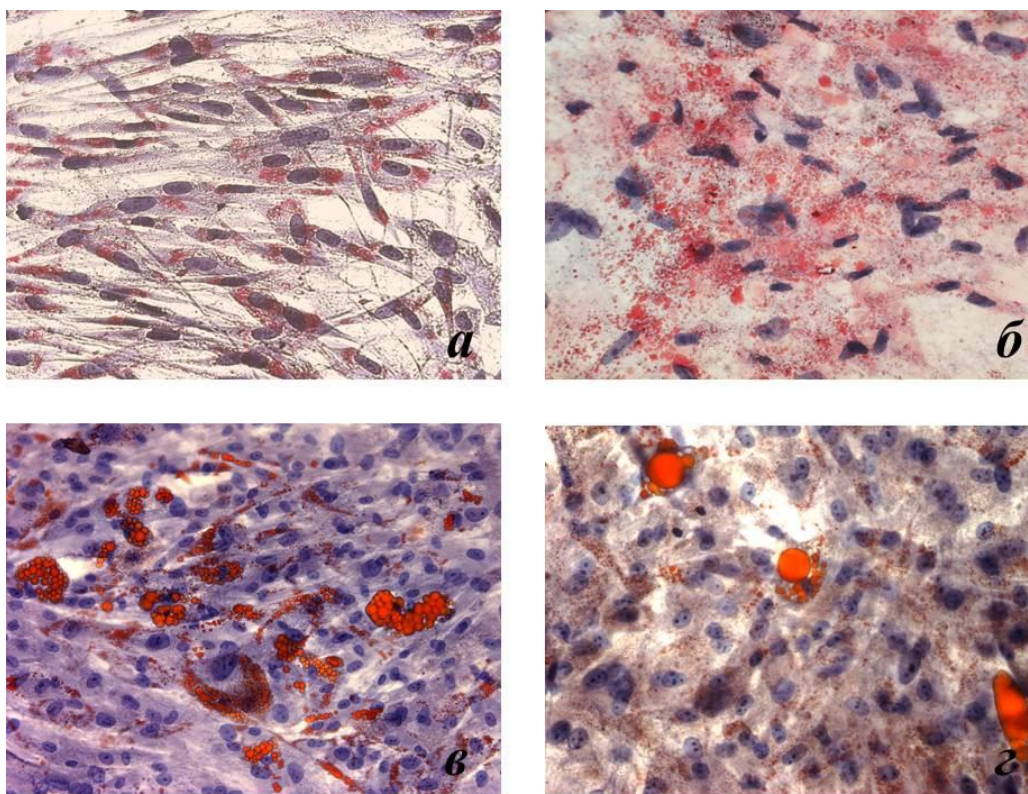


Рисунок 3.15. Накопление жировых вакуолей в ММСК, изолированных из кожи (а), пуповины (б), костного мозга (в), жировой ткани (г) при культивировании в среде дифференцировки в адипоциты в течении 14 дней. Окраска масляным красным/гематоксилином. Увеличение x200.

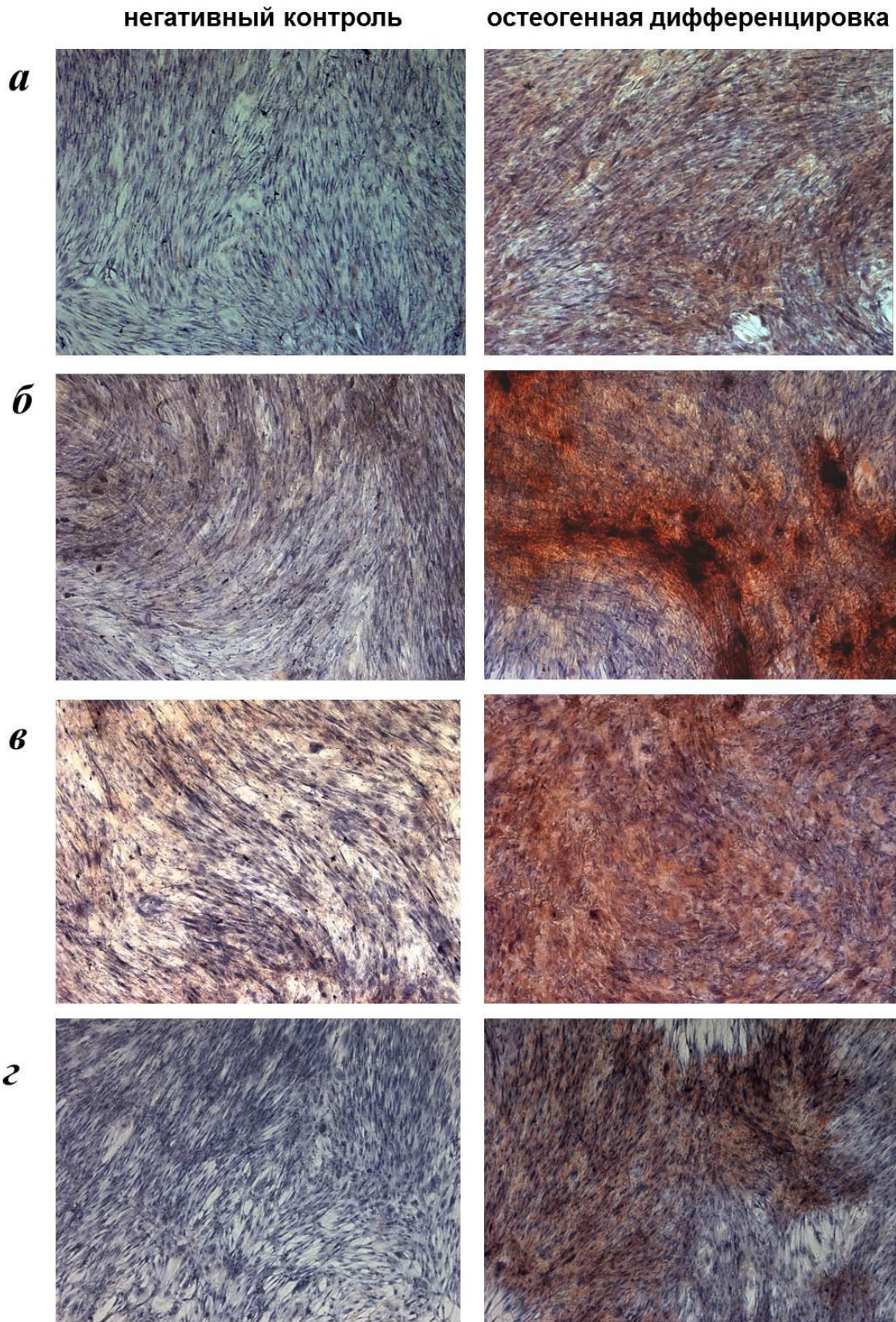


Рисунок 3.16. Накопление минерализованного матрикса в ММСК, изолированных из кожи (а), пуповины (б), костного мозга (в), жировой ткани (г) при культивировании в среде дифференцировки в остеобласты в течении 21 дня. Окраска ализариновым красным. Увеличение x50.

Способность ММСК дифференцироваться в остеобласты оценивали также по динамике изменения уровня экспрессии белков, специфических для костной ткани (костного сиалопротеина и остеонектина), транзиторной индукции активности эндогенной щелочной фосфатазы, а также отложению кальция по методике Van Kossa.

На рисунок 3.17 показано, что ММСК пуповины, костного мозга, жировой ткани имели изначально высокий уровень экспрессии костного сиалопротеина, в отличие от клеток дермального происхождения, которые в обычных условиях не синтезировали этот белок. В течение 3 недель в условиях дифференцировки в костную ткань в клетках всех полученных культур уровень экспрессии костного сиалопротеина повышался. Менее всего в культуре ММСК дермального происхождения, более всего в культуре ММСК костного мозга. На начальном этапе дифференцировки костный сиалопротеин в ММСК пуповины, костного мозга, и жировой ткани главным образом обнаруживался среди белков цитоскелета и в эндоплазматическом ретикулуме в пределах цитоплазмы клеток. На более поздних сроках костный сиалопротеин обнаруживался также в составе экстрацеллюлярного матрикса, так что, если клетка имела возможность передвигаться в течение исследуемого периода времени, то за ней образовывался белковый след.

Результаты иммуноцитохимического окрашивания клеток на остеонектин (рисунок 3.18) показали, что ММСК кожи, пуповины, костного мозга и жировой ткани на начальном этапе дифференцировки в остеобласты не экспрессировали этот белок. В течение 3 недель в условиях дифференцировки в костную ткань в ММСК пуповины, костного мозга и жировой ткани уровень экспрессии остеонектина повышался. В ММСК дермального происхождения остеонектин не обнаруживался. Остеонектин обнаруживался среди белков цитоскелета в пределах цитоплазмы клеток и отсутствовал в экстрацеллюлярном матриксе.

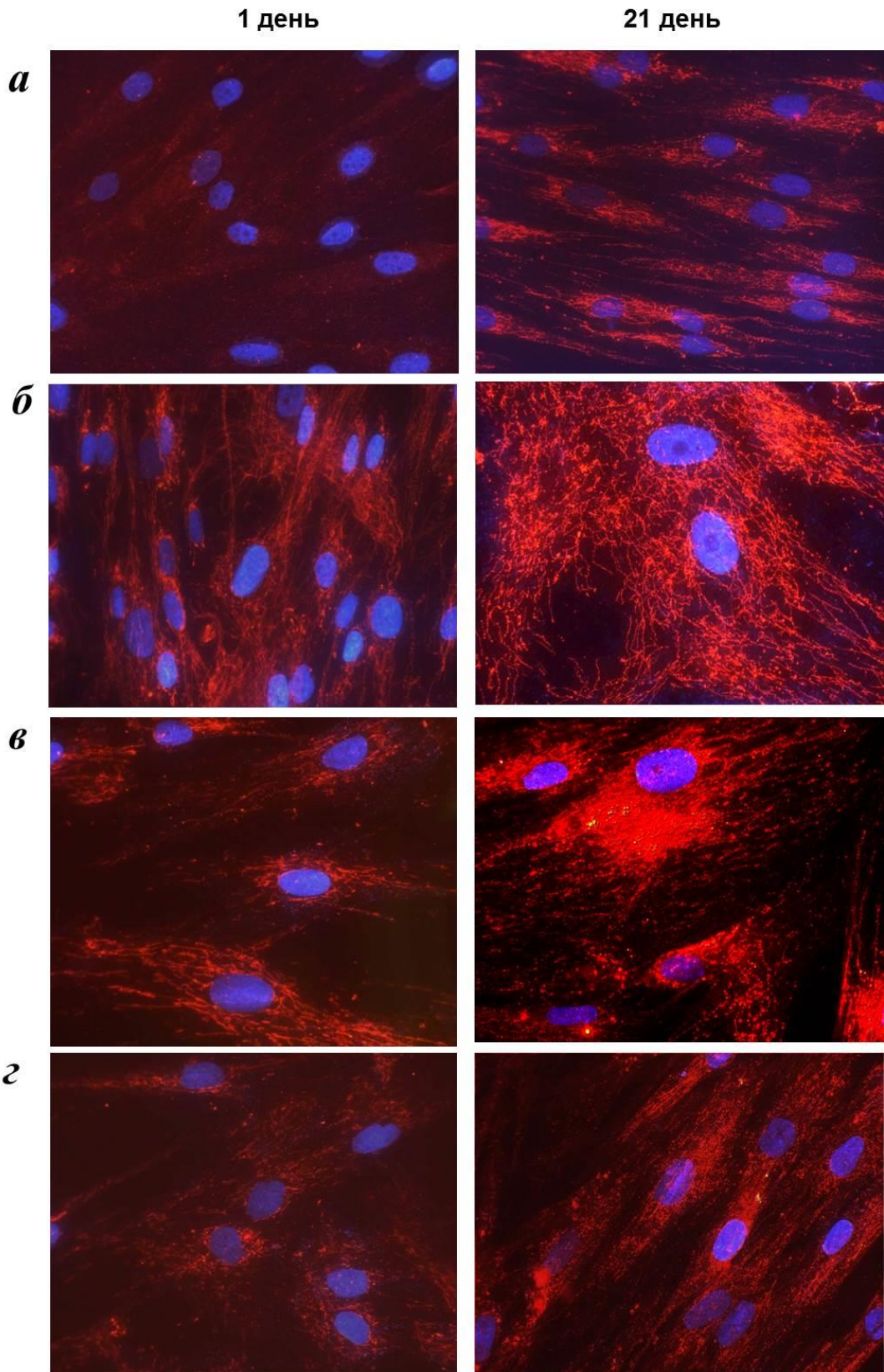


Рисунок 3.17. Динамика экспрессии костного сиалопротеина (Rhodamin) в ММСК, изолированных из кожи (а), пуповины (б), костного мозга (в), жировой ткани (г) при культивировании в среде дифференцировки в остеобласты в течении 21 дня. Ядра окрашены DAPI. Увеличение x630.

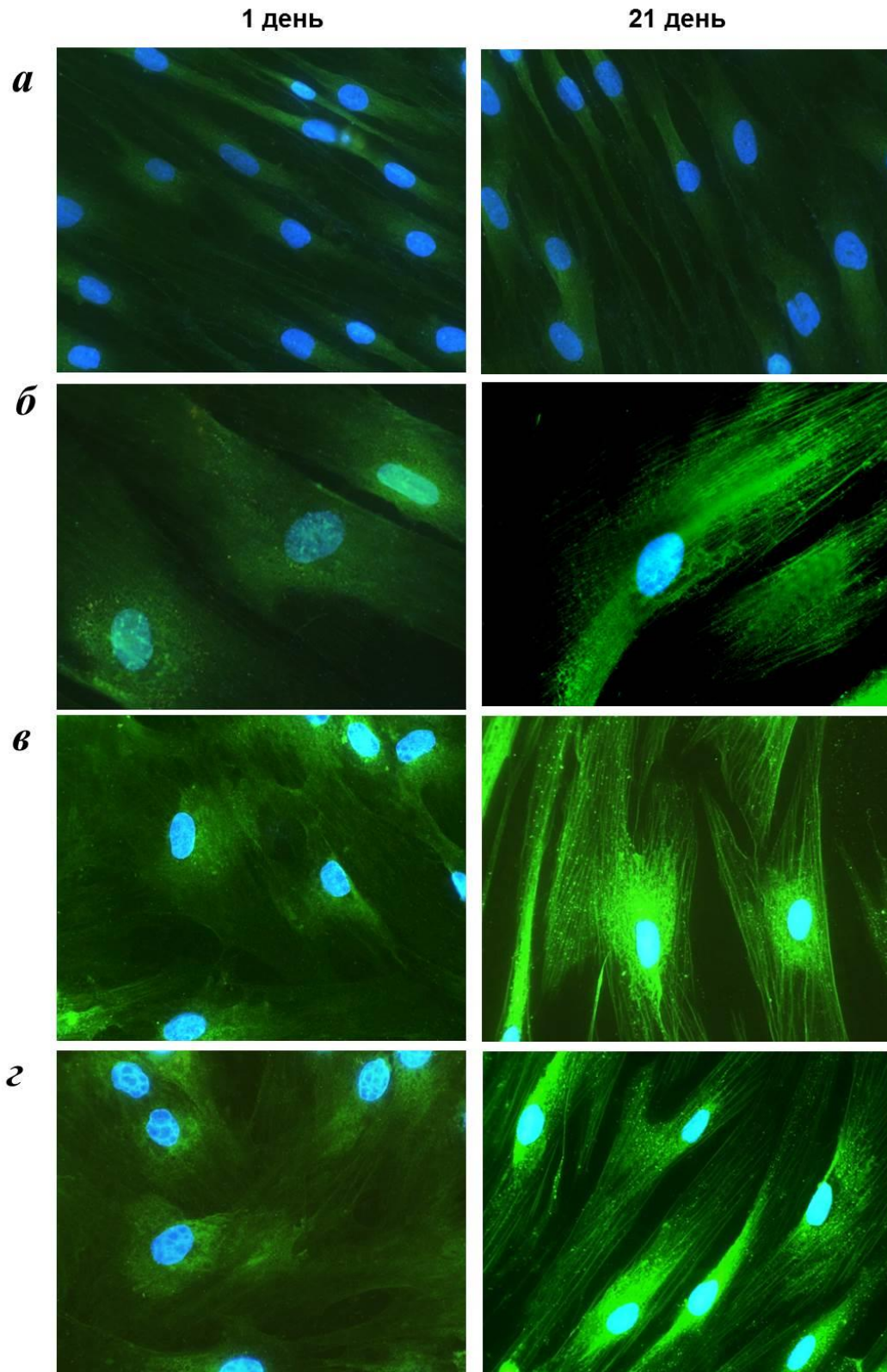


Рисунок 3.18. Динамика экспрессии остеонектина (FITC) в ММСК, изолированных из кожи (а), пуповины (б), костного мозга (в), жировой ткани (г) при культивировании в среде дифференцировки в остеобласты в течении 21 дня. Ядра окрашены DAPI. Увеличение х630.

На рисунке 3.19 представлены результаты исследования уровня активности эндогенной щелочной фосфатазы в клетках полученных культур в условиях дифференцировки в остеобласты. На начальном этапе в культурах ММСК кожи, пуповины, костного мозга и жировой ткани только отдельные клетки имели невысокий уровень активности эндогенной щелочной фосфатазы. При дальнейшем культивировании в условиях дифференцировки в остеобласты уровень активности эндогенной щелочной фосфатазы возрастал. Однако в культуре ММСК, выделенных кожи, только в отдельных клетках обнаруживался этот фермент. В культуре ММСК пуповины и жировой ткани клетки, обладающие повышенным уровнем активности эндогенной щелочной фосфатазы, образовывали отдельные, довольно редкие локусы. Только в культуре ММСК костного мозга уровень активности эндогенной щелочной фосфатазы возрастал критически практически во всех клетках.

Результаты исследования накопления фосфата Са в клетках полученных культур в условиях остеогенной дифференцировки представлены на рисунок 3.20. Гистохимическое окрашивание клеток полученных культур проводили по методу ван Косса. На начальном этапе дифференцировки фосфаты Са в клетках не обнаруживались. При дальнейшем культивировании в условиях остеогенной дифференцировки в культурах ММСК происходило накопление кальция в вакуолях (окрашены черным цветом). В культуре ММСК костного мозга происходило активное накопление фосфата кальция в вакуолях и образование значительного количества локусов окостенения, приводящее к инициации дифференцирования близлежащих клеток в остеобласты. В культуре ММСК, выделенных из пуповины и жировой ткани, через 21 день культивирования в среде дифференцировки можно было обнаружить единичные локусы клеток с включениями фосфатов Са. ММСК, выделенные из кожи, не обладали способностью образовывать локусы, сходные по морфологии с локусами, формируемыми ММСК костного мозга, хотя в культуре отдельные клетки были способны накапливать фосфаты Са.

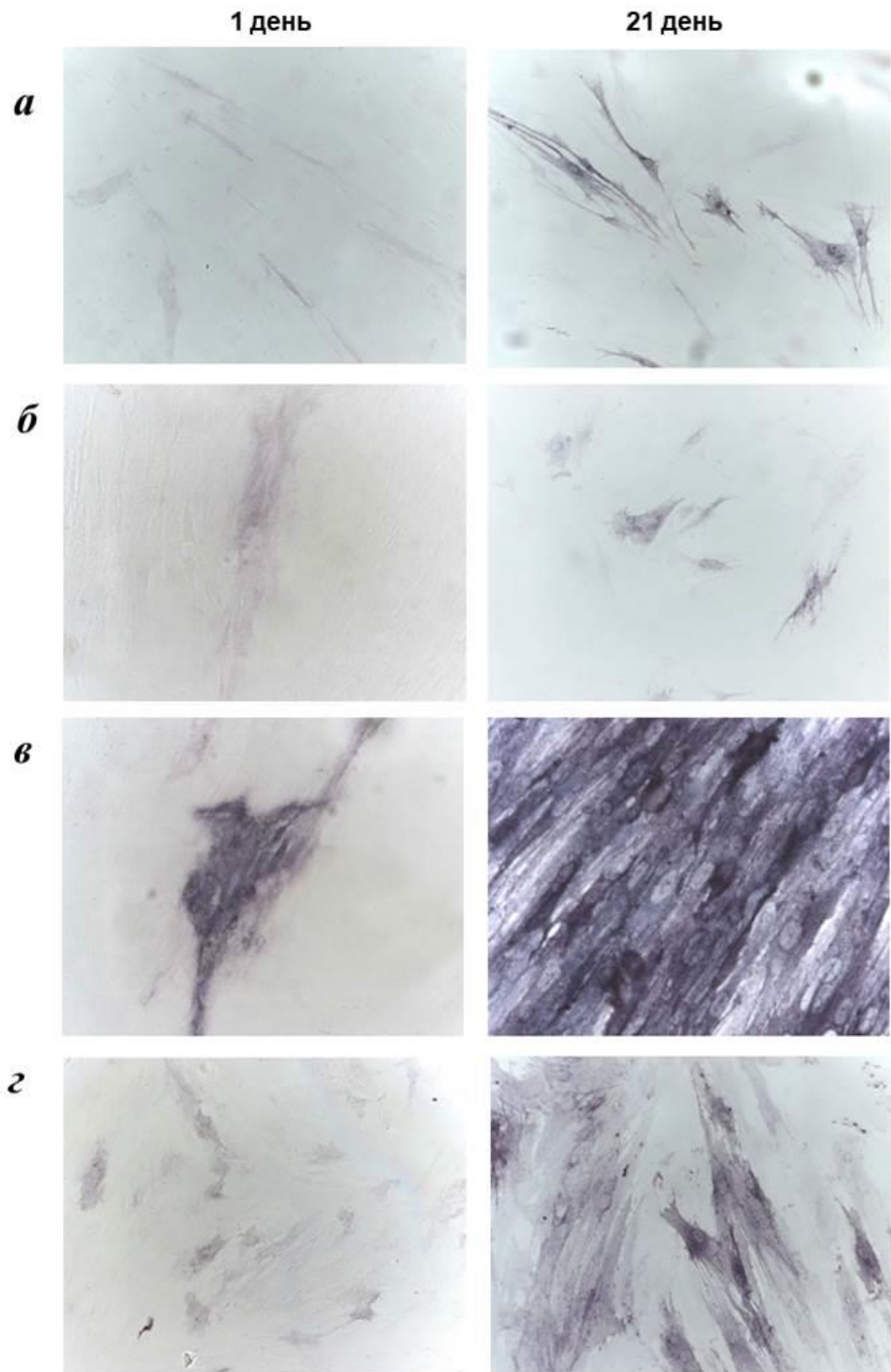


Рисунок 3.19. Динамика изменения активности щелочной фосфатазы в ММСК, изолированных из кожи (а), пуповины (б), костного мозга (в), жировой ткани (г) в условиях остеогенной дифференцировки в течении 21 дня. Увеличение x200.

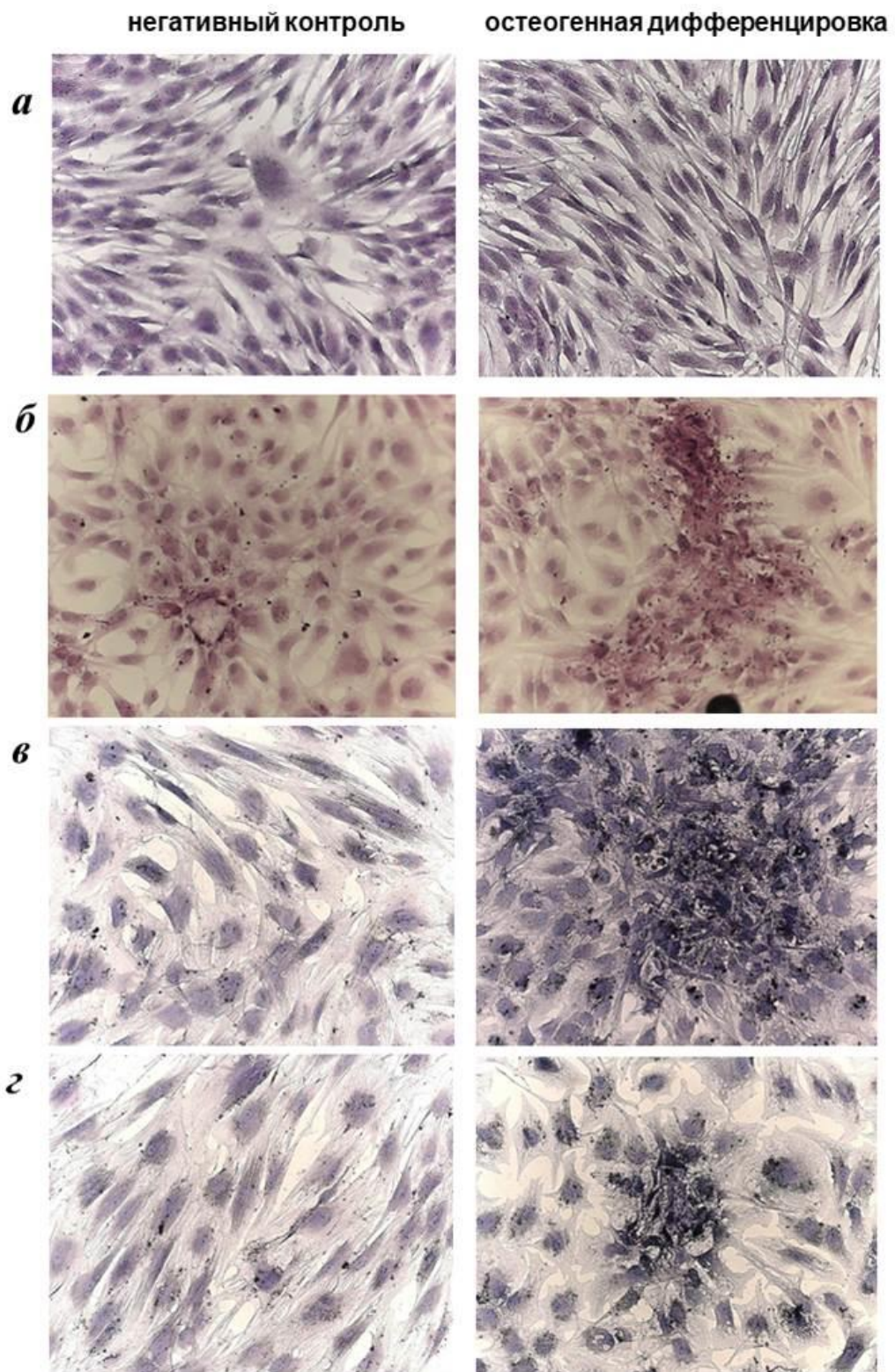


Рисунок 3.20. Динамика накопления фосфатов Са и образование локусов окостенения в культурах ММСК, изолированных из кожи (а), пуповины (б), костного мозга (в), жировой ткани (г) в условиях остеогенной дифференцировки в течении 21 дня. Окраска по методу ван Косса. Увеличение x100.

ММСК способны также к хондрогенной дифференцировке. Дифференцировку полученных культур в хондроциты проводили в культуре микромаасс в присутствии факторов дифференцировки в хондроциты TGF- β в течение 3 недель. Из полученных микромаасс готовили срезы на криотоме. Полученные срезы окрашивали толуидиновым голубым на наличие протеогликанового экстрацеллюлярного матрикса. ММСК пуповины, костного мозга и жировой ткани образовывали оформленные структуры, характеризующиеся наличием значительной массы экстрацеллюлярного матрикса. ММСК, выделенные из кожи, при культивировании в микромаассах образовывали очень рыхлые структуры, легко распадающиеся на мелкие фрагменты (рисунок 3.21).

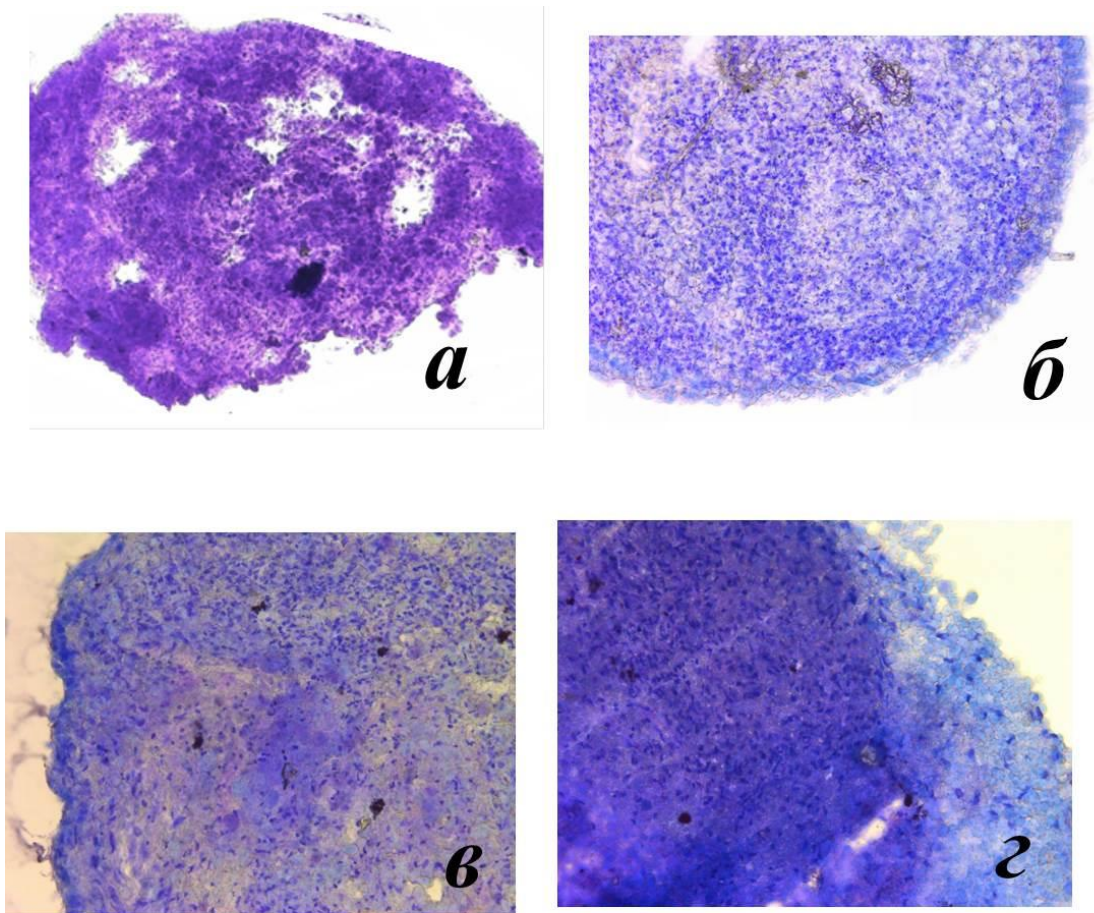


Рисунок 3.21. Образование хрящевых микромаасс ММСК, изолированных из кожи (а), пуповины (б), костного мозга (в), жировой ткани (г) в условиях хондрогенной дифференцировки в течении 21 дня. Криосрезы окрашены толуидиновым голубым. Увеличение $\times 100$.

Анализ экспрессии коллагенов I и II типов и хондроитина в культуре ММСК костного мозга показал, что при длительном культивировании в среде дифференцировки в хондроциты в отсутствие TGF- β клетки синтезируют и накапливают преимущественно коллаген I типа. Экспрессия коллагена II типа и хондроитина остается на фоновом уровне. Такое соотношение коллагенов I и II типов характерно для фиброзного хряща (рисунок 3.22).

Длительное культивирование ММСК в среде дифференцировки в хондроциты, содержащей TGF- β , приводило к уменьшению уровня синтеза коллагена I типа и увеличению уровня синтеза коллагена II типа и хондроитина. Такое соотношение характерно для гиалинового хряща (рисунок 3.22).

Таким образом, присутствие или отсутствие TGF- β в среде культивирования ММСК костного мозга является фактором, определяющим альтернативные пути дифференцировки этих клеток в хрящевую ткань разных типов.

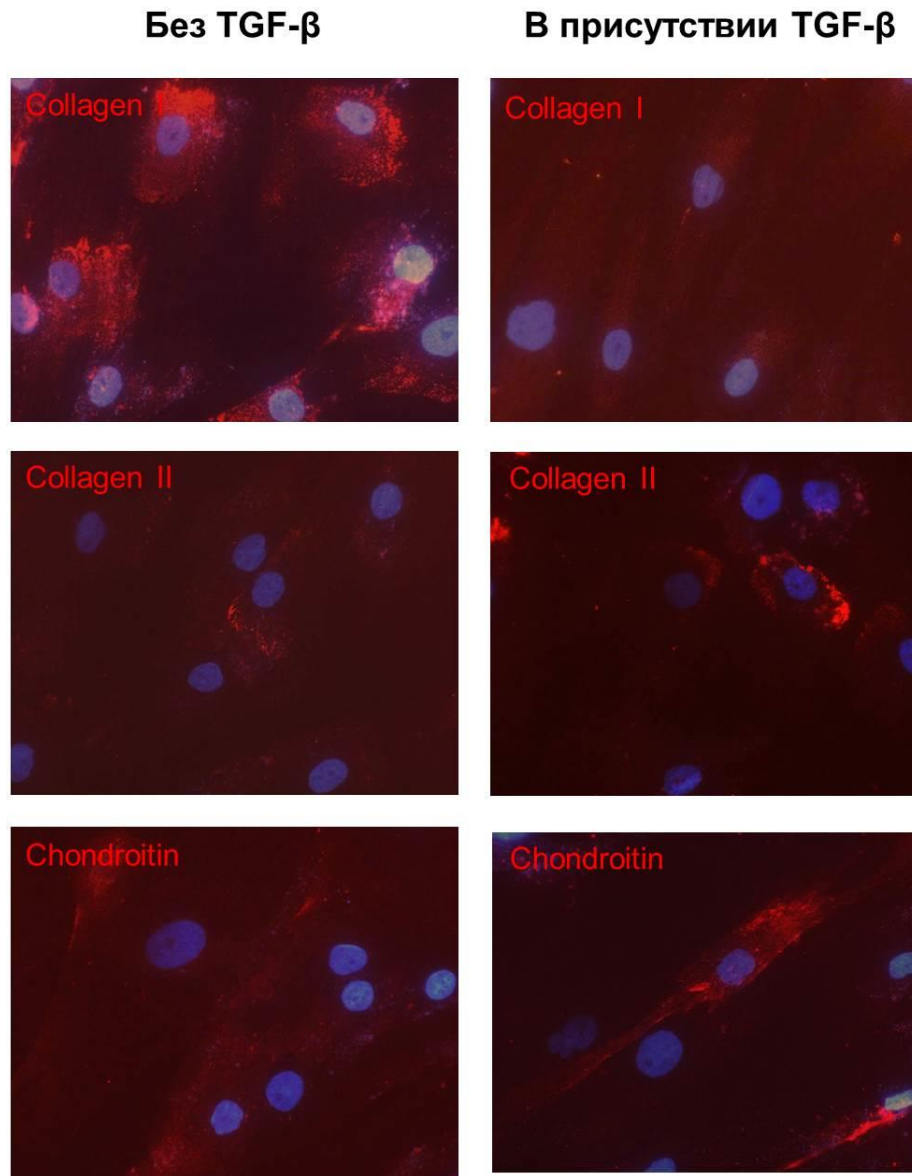


Рисунок 3.22. Экспрессия хондроитина, коллагенов I и II типов (Rhodamin) в условиях хонрогенной дифференцировки ММСК костного мозга в присутствии или отсутствии TGF-beta. Ядра окрашены DAPI. Увеличение x630.

Приведенные результаты показали, что основная масса ММСК, выделенных из кожи, пуповины, костного мозга и жировой ткани обладают сходными свойствами по морфологии, экспрессии поверхностных белков и по способности к дифференцировке. Так основная масса клеток полученных культур имела фибробластоподобную морфологию, обладала способностью к адгезии к пластиковой поверхности и экспансии в культуре.

Фибробластоподобные клетки полученных культур ММСК обладали также сходными паттернами экспрессии поверхностных белков. Культивируемые ММСК, выделенные из кожи, пуповины, костного мозга и жировой ткани, не экспрессировали маркеры гемопоэтических клеток CD14, CD34 и CD45. Значительное количество клеток культур ММСК, выделенных из кожи, пуповины, костного мозга и жировой ткани, коэкспрессировали поверхностные маркеры CD73, CD90 и CD105. ММСК, выделенные из этих тканей, также характеризовались высоким уровнем экспрессии молекул адгезии CD44, CD54 и CD49b.

ММСК полученных культур обладали также сходной способностью дифференцироваться по адипогенному, хондрогенному и остеогенному пути.

Однако более глубокий анализ экспрессии цитоплазматических белков в клетках полученных культур выявил некоторые особенности, присущие только клеткам, выделенным из конкретных тканей. Так было выявлено, что в культурах ММСК выделенных их различных источников присутствуют также специализированные фибробластоподобные клетки, коммитированные на поддержание гомеостаза тканей, из которых были выделены. Так значительное количество фибробластоподобных клеток, выделенных из пуповины, характеризовались высоким уровнем экспрессии коллагенов I и II типов. Вероятно, такие клетки специализируются на создании и поддержании Вартоньева студня пуповины. Клетки, выделенные из тканей, богатых сосудистой сетью (костного мозга и жировой ткани) характеризовались наличием экспрессии фактора вон Виллебранда. Клетки, выделенные из неонатальной ткани (пуповины) характеризовались также экспрессией нестина и *c-kit*.

Некоторые особенности, присущие ММСК, выделенным из конкретных тканей, были выявлены также и по способности к дифференцировке.

Так в исследованиях способности к остеогенной дифференцировке доля локусов, состоящих из клеток с высоким содержанием минерализованного матрикса, была наиболее высокой в культурах ММСК, выделенных из костного мозга и жировой ткани. ММСК, выделенные из кожи, в условиях остеогенной

дифференцировки практически не обладали способностью к образованию таких локусов. ММСК пуповины по способности образовывать такие локусы занимали промежуточное положение между ММСК костного мозга и ММСК кожи.

ММСК, выделенные из кожи, характеризовались также сниженной способностью к хондрогенной дифференцировке по сравнению с ММСК из других источников.

Эти и некоторые другие результаты говорят о том, что ММСК, выделенные из различных тканевых источников, могут различаться по потенциалу к дифференцировке, даже если культивируются в одинаковых условиях. В пределах отдельной популяции ММСК имеется лишь небольшое количество клеток, способных к дифференцировке в трех направлениях: адипогенной, хондрогенной и остеогенной, большинство же клеток популяции являются специализированными, т.е. коммитированными на функциональное поддержание гомеостаза тканей, из которых были выделены, и не являются мультипотентными.

Тем не менее, все ММСК, выделенные из кожи, пуповины, костного мозга и жировой ткани соответствовали критериям Международного Общества Клеточной и Генной Терапии (International Society for Cell & Gene Therapy, ISCT):

1) Клетки обладали способностью прикрепляться к пластику в стандартных условиях культивирования;

2) Клетки экспрессировали поверхностные маркеры CD105, CD73, CD90 и не экспрессировали поверхностные маркеры гемопоэтических стволовых клеток CD34, CD45, CD11a, CD19 и HLA-DR;

3) Под действием специальных условий *in vitro* клетки обладали способностью дифференцироваться в остеоциты, адипоциты и хондроциты.

Полученные данные показали также, что ММСК пуповины по многим параметрам проявляли сходные свойства с ММСК, выделенными из других источников, при этом обладая рядом преимуществ. Процедура получения образцов пуповины неинвазивна и безболезненна, не противоречит общим этическим нормам. ММСК пуповины обладают повышенной пролиферативной способностью и замедленным физиологическим старением в культуре по

сравнению со взрослыми ММСК, а также высоким содержанием прогениторных клеток, экспрессирующих нестин и c-kit. (Yarygin K.N. et al, 2006, Fong C.Y. et al., 2011, Chen M.Y. et al., 2009). Технологические преимущества культивирования ММСК пуповины делают их перспективным терапевтическим средством для лечения широкого спектра заболеваний.

3.2. Взаимодействие ММСК и иммунокомпетентных клеток *in vitro*

3.2.1. Клеточно-опосредованная цитотоксичность аллогенных МПК по отношению к ММСК

Важным аспектом при изучении терапевтического потенциала ММСК является изучение взаимного влияния клеток иммунной системы, факторов врожденного и приобретенного иммунитета и ММСК. Это необходимо при исследовании потенциальных механизмов терапевтического действия ММСК в организме реципиента.

Изучение клеточно-опосредованной цитотоксичности при взаимодействии человеческих ММСК и МПК, содержащих субпопуляцию НК, позволяет составить представление о первых реакциях организма реципиента на введение аллогенных ММСК.

НК обладают постоянной цитолитической активностью, которая в основном предназначена для уничтожения клеток, не экспрессирующих молекулы HLA I класса. Лизис клеток, осуществляемый с помощью НК, регулируется набором сигналов, передаваемых посредством активации или ингибирования рецепторов KIR, взаимодействующих с молекулами HLA на клетках-мишенях.

Изучение клеточно-опосредованной цитотоксичности при взаимодействии ММСК, выделенных из кожи, пуповины, костного мозга и МПК проводили в смешанных культурах *in vitro* с использованием набора Cytotox 96 (Promega, США). Относительное содержание поврежденных клеток определяли по отношению уровня активности лактатдегидрогеназы в лунках, содержащих культуры клеток-мишеней (ММСК), а также культуры В-лимфомы РЗНР1 в качестве положительного контроля, с клетками-эффекторами (МПК) к максимальному уровню активности лактатдегидрогеназы клеток-мишеней. При максимальном соотношении МПК и клеток-мишеней 250:1 относительное содержание поврежденных клеток составило для РЗНР1 – $64 \pm 5,2\%$, ММСК кожи – $5.07 \pm 0,7\%$, ММСК пуповины – $5.8 \pm 2,4\%$, ММСК костного мозга – $1.3 \pm 1.2\%$. В

условиях эксперимента МПК оказывали цитотоксическое действие на клетки В-лимфомы РЗНР1 при соотношении, превышающем 2:1. Цитотоксическое действие МПК на ММСК, выделенных из кожи, пуповины и костного мозга, в условиях эксперимента было незначительное и не зависело от соотношения клеток-эффекторов и клеток-мишеней (рисунок 3.23). Увеличение срока инкубации смешанных культур до 72 ч не влияло на относительное содержание поврежденных ММСК независимо от источника происхождения (данные не представлены).

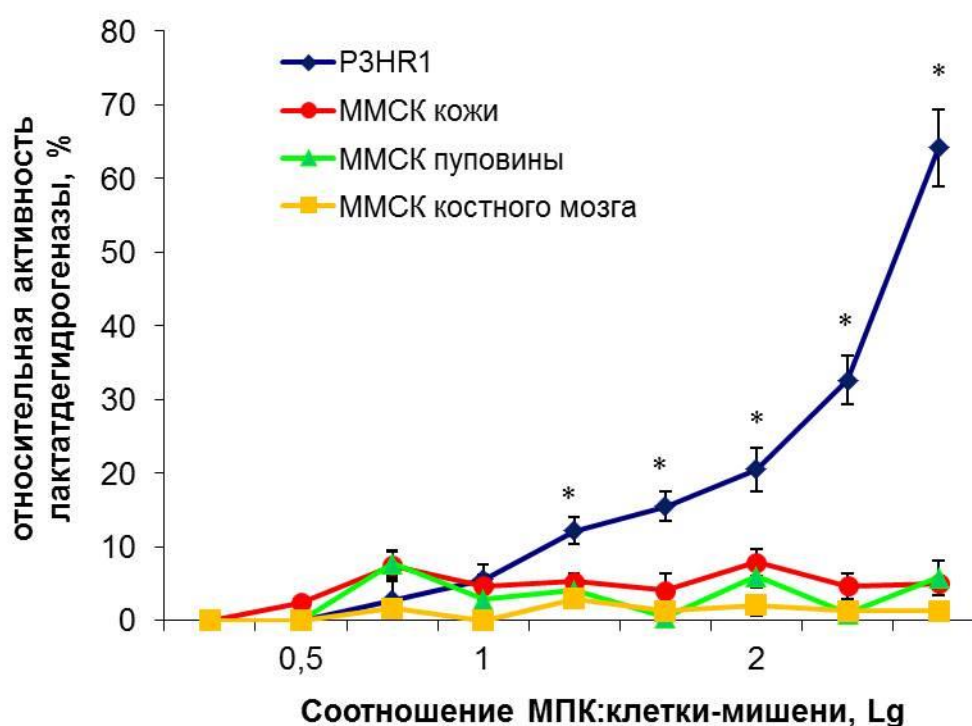


Рисунок 3.23. Цитотоксическое действие МПК на клетки В-лимфомы РЗНР1 и ММСК, выделенные из кожи, пуповины и костного мозга. Содержание поврежденных клеток-мишеней в смешанных культурах с МПК определяли по уровню активности лактатдегидрогеназы. Представлены данные 3-х независимых экспериментов. * показывает достоверность отличий при $P < 0,05$.

Рецепторы KIR играют ключевую роль в регуляции цитолитической активности НК. Лигандами для KIR-рецепторов являются антигены HLA I класса. В связи с этим мы исследовали уровень экспрессии и экспонирования на поверхности мембраны ММСК, выделенных из кожи, пуповины и костного мозга,

поверхностных молекул HLA I класса. В эксперимент отбирали культуры ММСК трех неродственных доноров для каждого типа клеток. Было установлено, что ММСК, выделенные из кожи, пуповины и костного мозга обладают высоким уровнем экспрессии HLA I класса (HLA-ABC) (рисунок 3.24). Относительный уровень экспонирования молекул HLA класса I на поверхности МСК костного мозга и пуповины был $11,81 \pm 5,71$ и $13,17 \pm 5,40$ усл. единиц флуоресценции соответственно. Уровень экспрессии HLA-ABC на фибробластах кожи был достоверно выше $289,53 \pm 34,74$ усл. единиц флуоресценции.

Однако в результате сокультивирования ММСК с МПК в соотношении 1:50 соответственно в течение суток уровень экспрессии поверхностных молекул HLA I класса изменялся. При сокультивировании с МПК в этих условиях в ММСК, выделенных из кожи, уровень экспрессии HLA I класса повышался (рисунок 3.25, а), в ММСК пуповины – снижался (рисунок 3.25, б), а в ММСК костного мозга – не изменялся (рисунок 3.25, в).

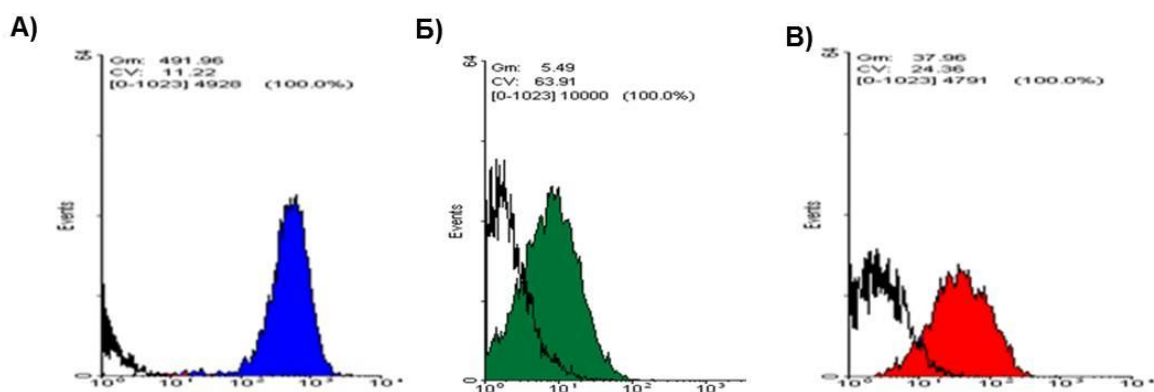


Рисунок 3.24. Репрезентативные данные проточной флуориметрии ММСК, выделенных из кожи (а), пуповины (б) и костного мозга (в), окрашенных антителами к поверхностному маркеру HLA-ABC, конъюгированных с флуорохромом PE. Черным цветом выделен изотипический контроль.

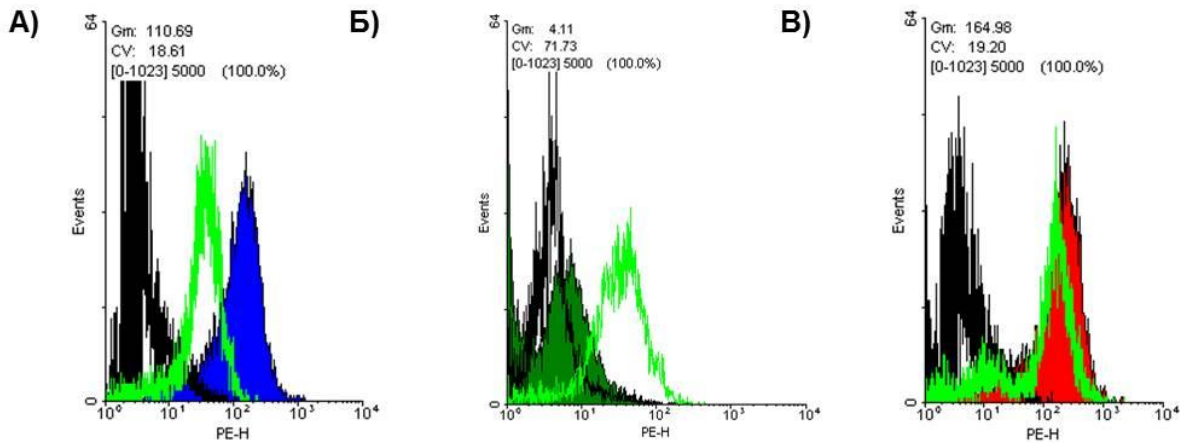


Рисунок 3.25. Изменение уровня экспрессии HLA I класса в ММСК выделенных их кожи (а), пуповины (б) и костного мозга (в) при сокультивировании с МПК. Репрезентативные данные проточной флуориметрии ММСК, окрашенных антителами к поверхностному маркеру HLA-ABC, конъюгированных с флуорохромом PE. Черным цветом выделен изотипический контроль. Зеленым незаштрихованным профилем обозначен уровень экспрессии HLA-ABC в интактных культурах ММСК. Цветным заштрихованным профилем обозначен уровень экспрессии HLA-ABC класса в ММСК после сокультивирования с МПК.

Таким образом, в проведенных экспериментах было показано, что сокультивирование с аллогенными МПК не приводит к цитотоксическому действию на ММСК независимо от происхождения и уровня экспрессии HLA I класса (Suzdaltseva Y. G. et al, 2008). Этот эффект может быть объяснен способностью ММСК к саморегуляции экспрессии поверхностных молекул HLA I класса при взаимодействии с аллогенными МПК.

3.2.2. Изменение иммуноцитотипического профиля ММСК и МПК при сокультивировании *in vitro*

Важным аспектом при изучении терапевтического потенциала культивируемых ММСК является исследование их функциональной активности в организме реципиента после введения. Однако в отношении пациентов

проведение таких экспериментов представляется затруднительным. Для изучения потенциальных механизмов терапевтического действия ММСК мы использовали модельные эксперименты *in vitro*.

В результате взаимодействия с иммунокомпетентными клетками реципиента в ММСК могут активироваться различные сигнальные каскады, приводящие изменению их фенотипа и функциональной активности. Характер таких изменений, вероятно, будет различаться в зависимости от рода таких взаимодействий: аллогенных и аутологичных.

Для изучения иммуномодуляторных свойств ММСК в наших экспериментальных условиях мы использовали ММСК, выделенные из жировой ткани человека. Выбор этого источника ММСК был обусловлен доступностью материала здоровых доноров для выделения клеток, а также полученными предварительно данными о сходных свойствах ММСК, выделенных из различных источников. Дополнительным аргументом являлась также возможность использования ММСК жировой ткани как для аллогенных, так и для аутологичных трансплантаций. В данной работе мы не исследовали взаимодействие ММСК и иммунокомпетентных клеток, выделенных от одного донора. Однако не исключаем этого в будущем. В данной работе в эксперимент отбирали ММСК и МПК неродственных доноров (не менее 3 культур для каждого вида клеток).

Для изучения механизмов взаимодействия ММСК и МПК была разработана система сокультивирования, которая предполагала контактное взаимодействие этих клеток и культивирование в отсутствие контактов с использованием системы полупроницаемых мембран (трансвелл) (рисунок 3.26).

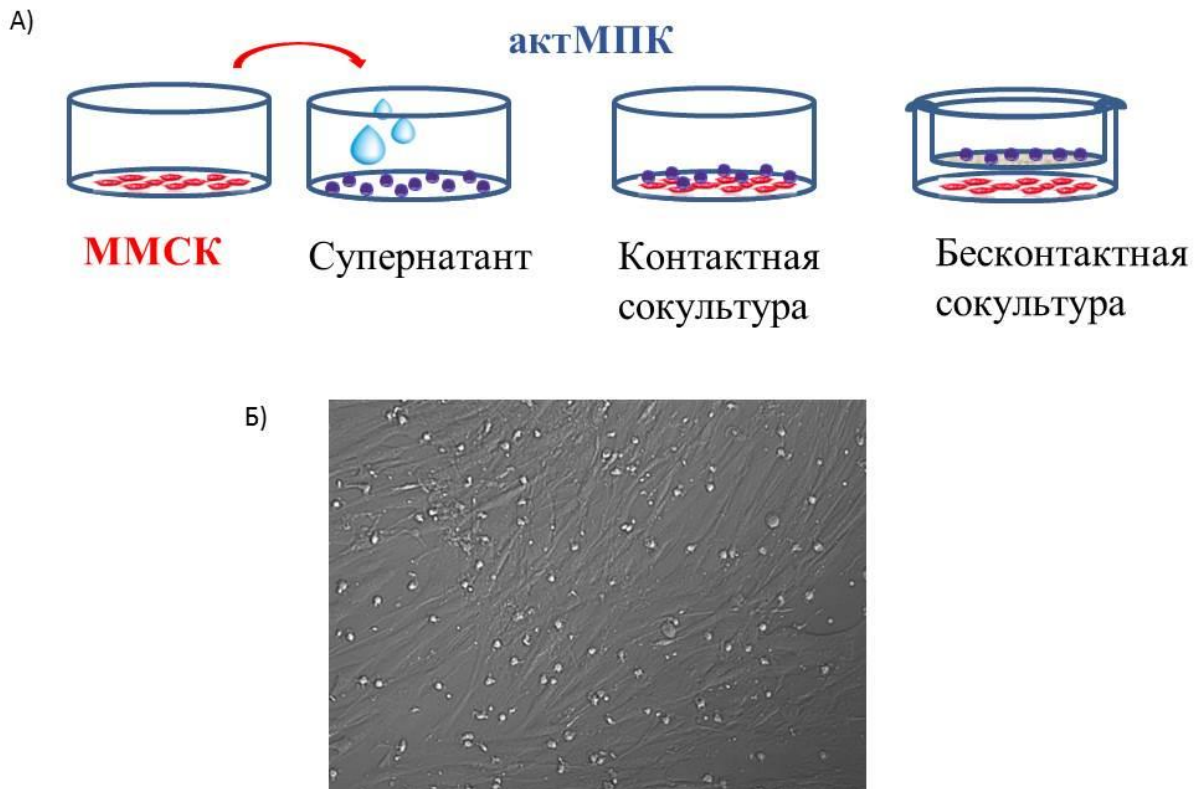


Рисунок 3.26. Сокультивирование ММСК и МПК. А) - в контактной и бесконтактной сокультурах с использованием полупроницаемых мембран (трансвелл). В) - репрезентативная фотография смешанной культуры при сокультивировании ММСК и МПК в присутствии контактных взаимодействий. Фазовый контраст, увеличение $\times 200$.

Для изучения взаимного влияния ММСК и иммунных клеток в условиях провоспалительного микроокружения использовали активированные МПК (актМПК). Для активации МПК человека использовали ФГА - аллоантиген из семейства суперантигенов. ФГА обеспечивает воспроизводимую неспецифическую активацию всех клонов Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов, которые присутствуют в крови. В экспериментах использовали МПК, а не выделенные чистые субпопуляции иммунокомпетентных клеток. Такой подход подкрепляется следующими соображениями. После активации Т-лимфоцитов в МПК в результате известной цепи сигнальных событий происходит активация и моноцитов, и опосредованно В-лимфоцитов. Таким образом, активированные

ФГА Т-лимфоциты, моноциты и В-лимфоциты, секретирующие провоспалительные цитокины, в условиях сокультивирования с ММСК определяли для них цитокиновое микроокружение.

МПК активировали ФГА (10 мкг/мл), окрашивали флуоресцентно-мечеными антителами к маркерам Т-лимфоцитов (CD4, CD8) и В-лимфоцитов (CD19), а также маркерам активации этих клеток (CD25, CD69) и анализировали методом проточной цитометрии.

Было отмечено, что активация МПК приводит к увеличению доли Т- и В-лимфоцитов, несущих на поверхности высокий уровень маркеров активации CD25 (альфа-субъединицы рецептора интерлейкина-2) и CD69 (маркера ранней активации Т-лимфоцитов) (рисунок 3.27).

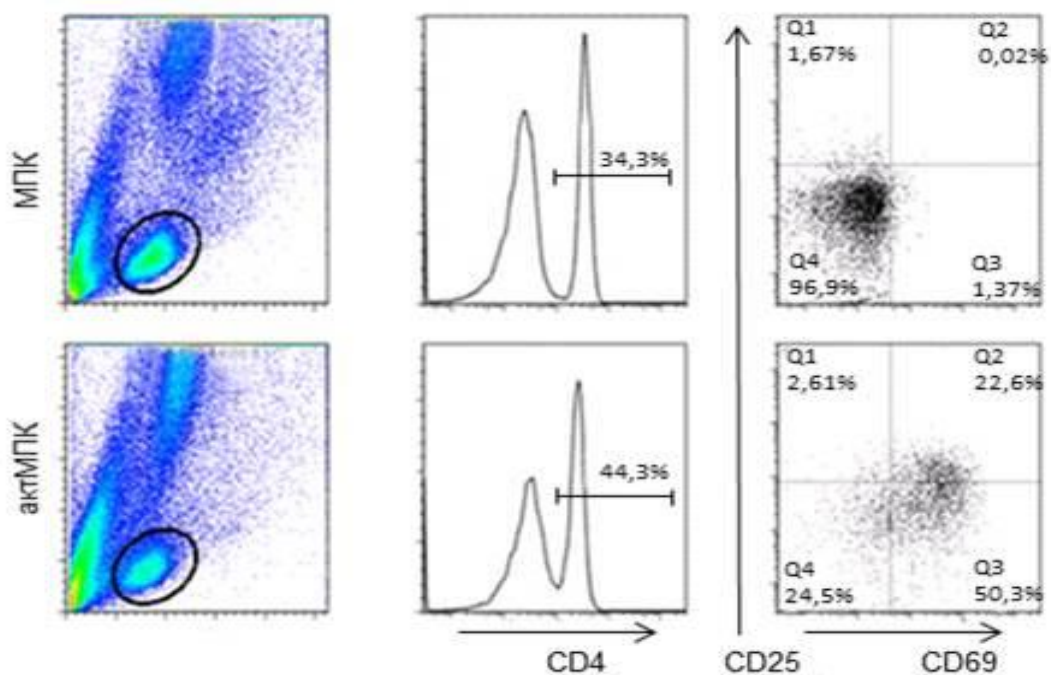


Рисунок 3.27. Активация МПК фитогемагглютинином. Репрезентативные результаты анализа МПК, окрашенных антителами к поверхностным маркерам CD4⁺-Т-лимфоцитов и маркерам активации Т-лимфоцитов CD25 и CD69. Данные проточной цитометрии.

В результате сокультивирования с актМПК могут изменяться свойства и характеристики как ММСК, так и МПК, а также отдельных фракций МПК. Сравнение цитофенотипических, дифференцировочных и секреторных характеристик интактных ММСК (до сокультивирования с МПК) и после сокультивирования с МПК позволит выявить молекулы, являющиеся индикаторными в проявлении иммуномодуляторных свойств ММСК.

Ранее с использованием метода проточной цитофлуориметрии нами было установлено, что ММСК жировой ткани экспрессируют поверхностные маркеры CD105, CD73, CD90 и не экспрессируют поверхностные маркеры гемопоэтических стволовых клеток CD34, CD45, CD11a, CD19. Интактные ММСК не экспрессируют молекулы HLA II класса (HLA-DR) и ко-стимуляторные молекулы CD40, CD80 и CD86.

Для того, чтобы определить изменяется ли цитофенотипический профиль ММСК под влиянием провоспалительного микроокружения, мы проводили сокультивирование ММСК жировой ткани с активированными и интактными МПК. После 48 ч с использованием метода проточной цитофлуориметрии определяли уровень экспрессии маркеров наличие маркеров CD105, CD73, CD90 CD34, CD45, CD11a, CD19, HLA-DR, CD80 и CD86 на поверхности ММСК. Схема эксперимента представлена на рисунок 3.28.

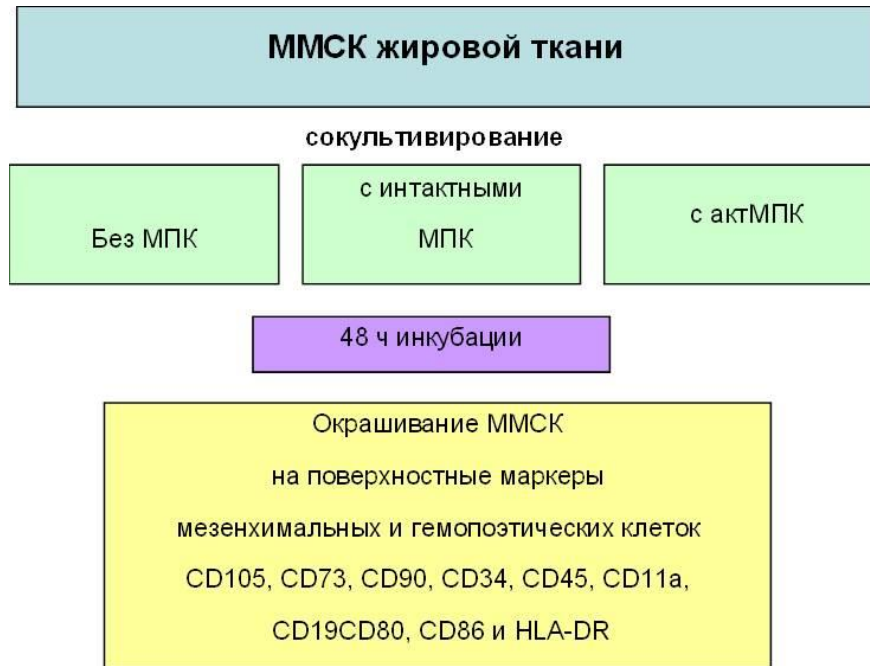


Рисунок 3.28. Схема эксперимента для изучения иммуноцитотипического профиля ММСК жировой ткани в условиях сокультивирования с активированными и интактными МПК.

Мы установили, что при сокультивировании с активированными и интактными МПК у ММСК не изменялась экспрессия поверхностных маркеров CD105, CD73, CD90, характерных для мезенхимальных клеток (рисунок 3.29, а). В отсутствие взаимодействия с МПК и при сокультивировании с неактивированными МПК ММСК не экспрессировали маркеры гемопоэтических клеток CD34, CD45, CD11a, CD19, CD80, CD86 и HLA-DR. Сокультивирование ММСК жировой ткани с актМПК приводило к появлению на мембране ММСК маркеров, характерных для зрелых ДК, HLA-DR и CD86. Однако уровень экспрессии другой костимуляторной молекулы CD80 на поверхности МСК не изменялся (рисунок 3.29, б).

В стандартных условиях культивирования ММСК не экспрессовали, костимуляторных молекул и HLA II класса. Приобретение ММСК способности экспрессировать костимуляторную молекулу CD86 и HLA-DR, характерные для зрелых ДК, может означать, что ММСК активируются в условиях воспаления.

Появление этих молекул на поверхности мембран ММСК может также служить индикатором, выявляющим статус ММСК, в которых начинается синтез белков, определяющих их иммуносупрессивные свойства.

Таким образом, проведенные эксперименты позволили нам выявить молекулы, являющиеся индикаторными в проявлении эффекта активации ММСК под действием провоспалительных цитокинов, выделяемых активированными Т-лимфоцитами (Suzdaltseva Y. G. et al., 2018).

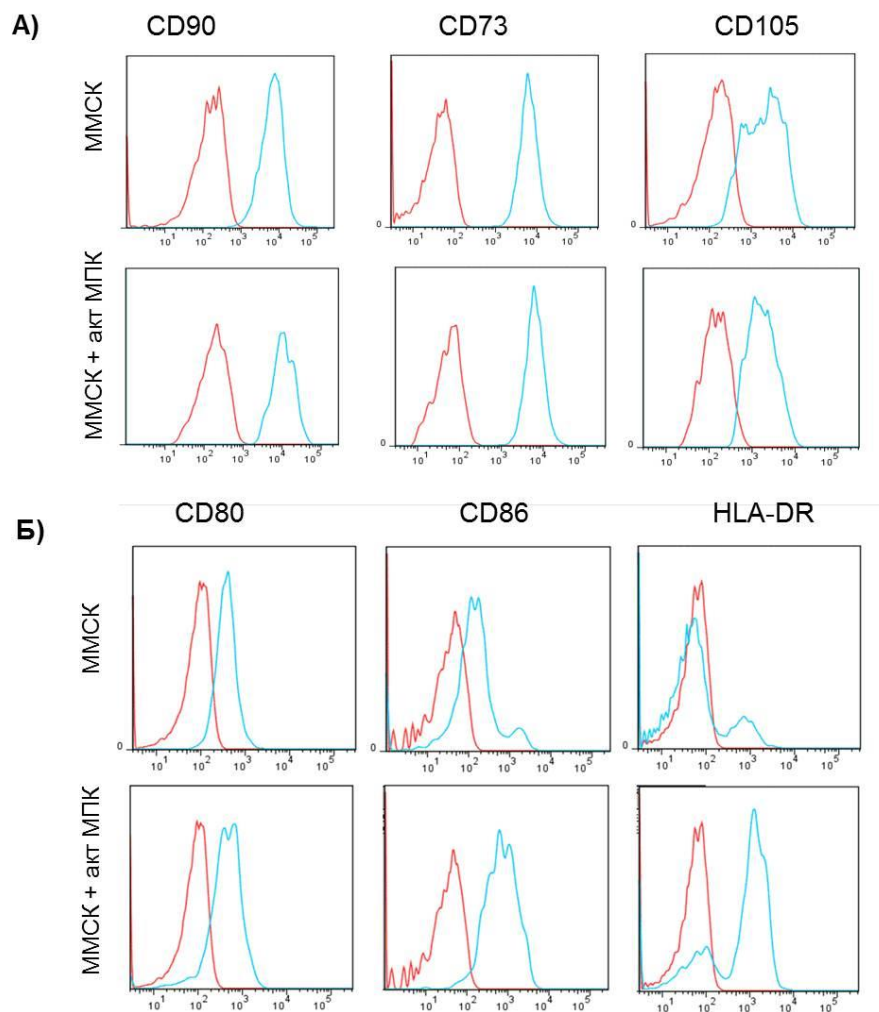


Рисунок 3.29. Изменение экспрессии поверхностных маркеров ММСК жировой ткани в условиях сокультивирования с актМПК. Красным цветом выделен изотипический контроль; специфическое окрашивание на поверхностные маркеры выделены синим цветом.

3.2.3. Способность к дифференцировке ММСК при сокультивировании с МПК *in vitro*.

Для того, чтобы установить изменяется ли способность к дифференцировке ММСК под влиянием провоспалительного микроокружения, мы проводили сокультивирование ММСК жировой ткани с актМПК. После 48 ч сокультивирования актМПК удаляли, а ММСК переводили в среду дифференцировки в адипоциты, остеобласты и хондробласты и культивировали в течение 21 дня, как описано выше.

Сравнение дифференцировочного потенциала ММСК жировой ткани стандартных и в условиях сокультивирования с актМПК показало, что способность ММСК к адипогенной, остеогенной и хондрогенной дифференцировке не изменяется под воздействием провоспалительного микроокружения (рисунок 3.30).

Таким образом, культивирование ММСК жировой ткани в стандартных условиях и при сокультивировании с актМПК в условиях провоспалительного микроокружения не приводило к изменению способности ММСК к адгезии и экспансии в культуре. Сокультивирование ММСК жировой ткани с актМП не приводило к изменению экспрессии поверхностных маркеров CD105, CD73, CD90, характерных для мезенхимальных клеток. Сокультивирование ММСК жировой ткани с актМП не приводило также к изменению их способности к адипогенной, остеогенной и хондрогенной дифференцировке (Suzdaltseva Y. G. et al., 2018).

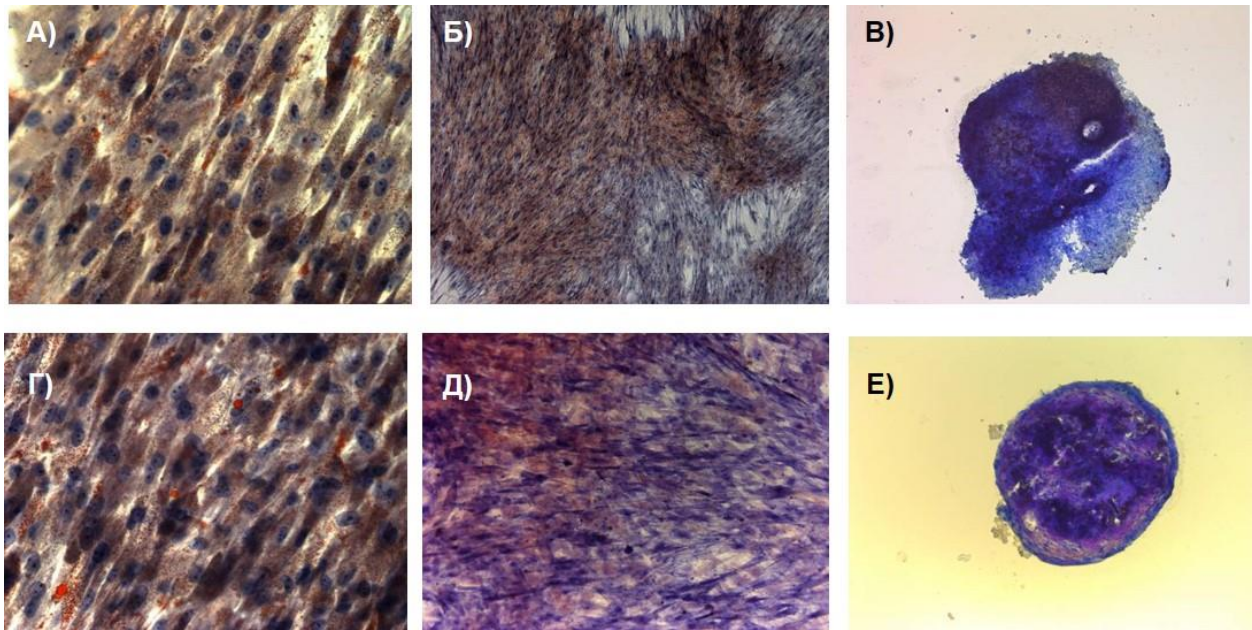


Рисунок 3.30. Дифференцировка ММСК жировой ткани: А и Г) – Адипогенная дифференцировка. Накопление жировых вакуолей в ММСК при культивировании в среде дифференцировки в течении 14 дней. Окраска масляным красным/гемаоксилином. Увеличение $\times 200$. Б и Д) – Osteогенная дифференцировка. Накопление минерализованного матрикса в ММСК при культивировании в среде дифференцировки в течении 21 дня. Окраска ализариновым красным. Увеличение $\times 50$. В и Е) – Хондрогенная дифференцировка. Образование хрящевых микромаст ММСК в среде дифференцировки в течении 21 дня. Криосрезы окрашены толуидиновым голубым. Увеличение $\times 50$. Г, Д, Е – дифференцировка ММСК после сокультивирования с актМПК.

3.2.4. Исследование влияния стехиометрических условий сокультивирования с МПК на индукцию функциональной активности ММСК

Подбор стехиометрических соотношений ММСК и МПК при сокультивировании, при которых достигается максимальный иммуномодуляторный эффект ММСК, является одним из важных аспектов в контексте решения задач настоящей работы. В ходе данной работы нами был проведен анализ условий сокультивирования ММСК и актМПК *in vitro*, который позволил создать систему смешанных культур с переменными стехиометрическими условиями сокультивирования клеток, позволяющую

исследовать иммуномодуляторные эффекты при различных соотношениях клеток в сокультурах, а также оценить влияние растворимых факторов с использованием полупроницаемых мембран, обеспечивающих физическое разделение клеток в сокультуре, и нерастворимых факторов - в ходе контактного сокультивирования, в различные временные отрезки. Такие экспериментальные условия позволили провести комплексное исследование влияния ММСК на пролиферацию актМПК, уровень экспрессии маркеров активации на поверхности МПК, уровень секреции медиаторов воспаления (цитокинов) МПК и выявить критические факторы, влияющие на проявление этих эффектов.

Схема эксперимента для исследования влияния стехиометрических соотношений в сокультурах ММСК и актМПК на проявление иммуномодуляторных свойств ММСК приведена на рисунок 3.31.

В результате проведенных экспериментов было установлено, что при сокультивировании ММСК с актМПК в соотношении превышающем 1:100 (соответственно) возникают неспецифические реакции, возникающими, вероятно, из-за культивирования клеток в высокой концентрации, при котором происходит нарушение гомеостаза клеток из-за быстрого накопления в среде культивирования токсических продуктов жизнедеятельности клеток и метаболитов и недостаточного поступления питательных веществ.

Таким образом, в дальнейших исследованиях, мы ограничивали исследования диапазоном соотношений ММСК к МПК менее, чем 1:100. При этих соотношениях иммуномодуляторные эффекты, оказываемые ММСК, как правило, укладывались в линейную зависимость от соотношений клеток в сокультуре.

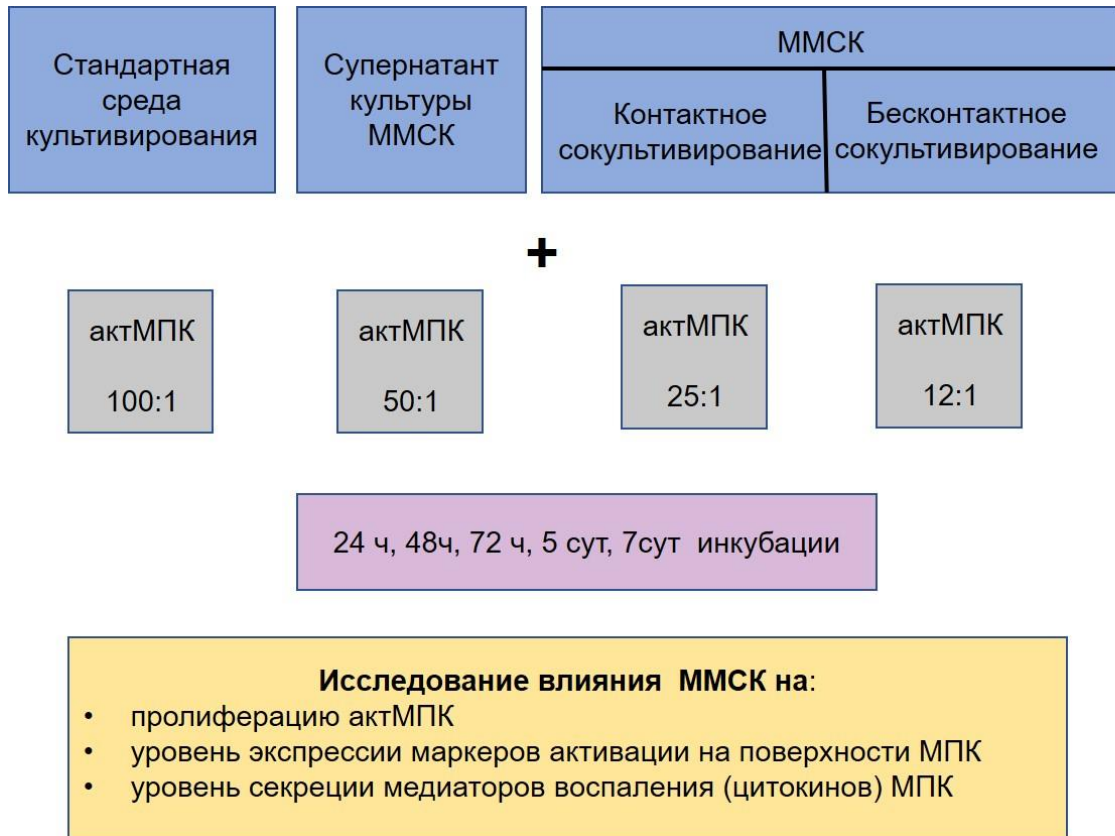


Рисунок 3.31. Схема эксперимента для исследования влияния стехиометрических соотношений в сокультурах ММСК и актМПК на проявление иммуномодуляторных свойств ММСК

3.2.5. ММСК угнетают пролиферацию актМПК при сокультивировании *in vitro*

Одним из основных проявлений иммуномодуляторных эффектов ММСК *in vitro* является подавление пролиферации актМПК, стимулированных аллоантигеном (в нашем случае ФГА).

Мы исследовали способность ММСК жировой ткани угнетать пролиферацию актМПК с помощью системы сокультивирования, которая предполагала контактное взаимодействие ММСК и актМПК и сокультивирование в отсутствие контактов с использованием системы полупроницаемых мембран (трансвелл). Таким образом мы могли определить вклад растворимых и

нерастворимых факторов в эффект подавления пролиферации активированных лимфоцитов. Дополнительно к этому при этих же условиях мы исследовали влияние различных соотношений ММСК и актМПК на этот эффект (Suzdaltseva Y. G. et al., 2018).

Для исследования способности ММСК угнетать пролиферацию актМПК лимфоцитов мы использовали метод CyQUANT®NF. Этот метод основан на связывании флуоресцирующего красителя с молекулой ДНК. Так как количество ДНК в клетке жёстко и чётко регулируется, можно сопоставить/скоррелировать количество ДНК, связавшееся с красителем, с количеством клеток, получая, таким образом, простой инструмент для оценки разницы в пролиферации между клетками контроля и клетками, обработанными определёнными реагентами.

По разработанной нами методике определяли способность ММСК жировой ткани угнетать пролиферацию актМПК. Для этого актМПК в различных концентрациях культивировали в стандартной среде, супернатанте от культуры ММСК и сокультивировали контактным и бесконтактным способом с ММСК в различных стехиометрических соотношениях в течение 1–7 сут. Супернатант сокультур, содержащий культивированные актМПК, собирали, и осаждали клетки центрифугированием при 300g 10 мин. Осадок ресуспендировали в растворе Хэнкса. Определяли концентрации суспензии актМПК с помощью автоматического счетчика клеток (Countess, Invitrogen). Производили приготовление двукратных разведений суспензии лимфоцитов в растворе Хэнкса для построения калибровочной кривой. Далее переносили по 50 мкл разведенных актМПК для построения калибровочной кривой и актМПК экспериментальных образцов в 96-луночный планшет. Готовили двукратное разведение красителя CyQUANT®NF и двукратный раствор пермеабиллизующего агента для контроля автофлуоресценции. Добавляли по 50 мкл либо красителя (в образцы), либо пермеабиллизующего агента (в контроли) в каждую лунку 96-луночного планшета с клетками, тщательно перемешивали и накрывали светонепроницаемой плёнкой. Инкубировали в темноте при 37°C 60 мин. Через 15 мин после инкубации измеряли интенсивность флуоресценции на приборе ZENYTH 3100 в режиме 1

сек на измерение лунки при 530 нм. Данные интенсивности флюоресценции CyQUANT®NF были нормированы к показателям образцов, полученным в условиях использования стандартной среды для культивирования клеток.

В результате проведенных экспериментов было установлено, что эффект подавления пролиферации актМПК в присутствии ММСК зависит от времени сокультивирования и от соотношения этих клеток в сокультуре. Через 24 ч этот эффект был слабо выражен или не обнаруживался. Выраженный эффект подавления пролиферации актМПК наблюдался через 48 ч сокультивирования МСК и актМПК. При более длительном сокультивировании степень подавления пролиферации не изменялась (рисунок 3.32, а). На основании этих данных в дальнейших экспериментах мы сокультивировали ММСК и акт МПК в течение 48 ч.

Эффект подавления пролиферации также зависел от соотношения клеток в сокультуре. При сокультивировании ММСК с актМПК в течение 48 ч в соотношении 1:100 (соответственно) эффекта подавления пролиферации активированных лимфоцитов не наблюдалось. Самый высокий эффект подавления пролиферации активированных лимфоцитов наблюдался при соотношении клеток 1:25 (ММСК:актМПК) и составил 40 % по отношению к уровню пролиферации лимфоцитов, культивировавшихся в супернатанте от культуры ММСК (рисунок 3.32, б).

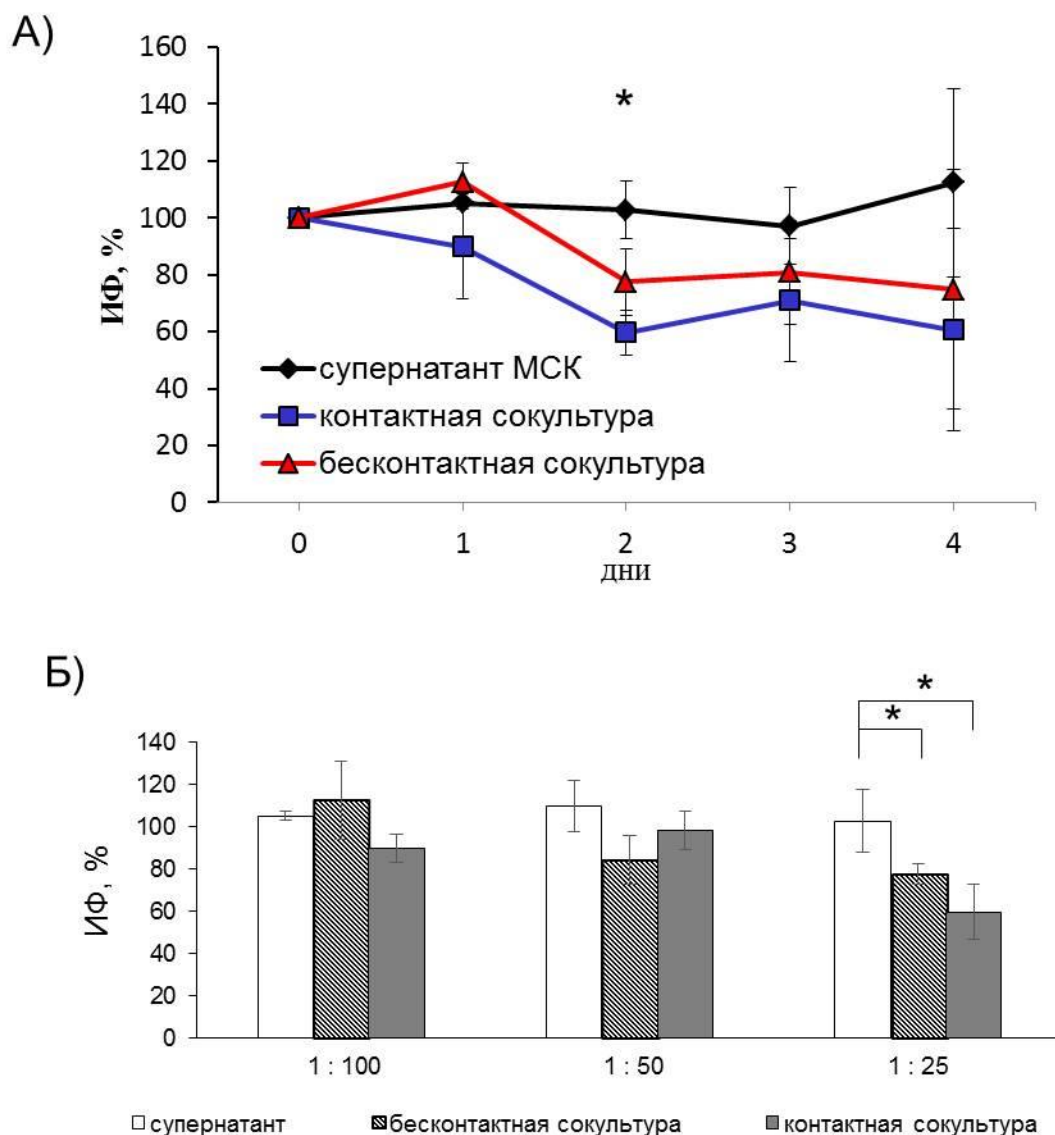


Рисунок 3.32. ММСК жировой ткани подавляют пролиферацию актМПК при сокультивировании. Контролем служили актМПК, культивированные в супернатанте от ММСК. Данные нормированы к уровню пролиферации (100 %) актМПК в стандартной среде культивирования. Показаны средние величины и их ошибки из 5 независимых экспериментов измерений интенсивности флуоресценции CyQUANT®NF (ИФ). Звездочка показывает достоверность отличий при $P < 0.05$. А) – Динамика изменения пролиферации актМПК. Представлены данные при сокультивировании ММСК и актМПК в соотношении 1:25 соответственно. Б) – Изменение пролиферации актМПК в зависимости от соотношения с ММСК через 48 ч сокультивирования в контактных и бесконтактных условиях. Указано соотношение актМПК:ММСК.

В то же время при сокультивировании ММСК с актМПК в соотношении ниже, чем 1:10 возникал обратный эффект, т.е. происходила стимуляция пролиферации актМПК в присутствии ММСК. Однако такой эффект не носил статистически значимого характера (данные не представлены).

Таким образом, в дальнейших исследованиях, мы ограничивали исследования диапазоном соотношений ММСК и акт МПК от 1:100 до 1:25 (соответственно). При этих соотношениях эффект подавления пролиферации актМПК в присутствии ММСК жировой ткани, как правило, укладывался в линейную зависимость от соотношений клеток в сокультуре.

Однако полученные результаты показали, что эффект подавления и стимуляции пролиферации актМПК не зависит от наличия/отсутствия межклеточных контактов. Эффекты подавления и стимуляции пролиферации актМПК были сходными при сокультивировании с ММСК как в присутствии межклеточных контактов, так и при использовании полупроницаемых мембран. Однако при сокультивировании ММСК и актМПК в присутствии межклеточных контактов эффект подавления пролиферации актМПК был несколько выше, чем в их отсутствие. Полученные данные позволяют предположить, что в описываемых эффектах основную роль играют растворимые факторы, однако межклеточные контакты усиливают их роль.

В экспериментах мы также исследовали влияние супернатанта от культуры ММСК на пролиферацию актМПК. Полученные данные показали, что растворимые факторы, выделяемые ММСК в условиях отсутствия моделирования провоспалительных условий, не оказывают влияния на пролиферацию актМПК. Этот результат указывает на тот факт, что ММСК не секретируют иммуносупрессивные факторы в стандартных условиях. Иммуносупрессивные свойства ММСК жировой ткани проявляются только в ответ на стимулы, поступающие от актМПК.

3.2.6. Снижение уровня маркеров активации на поверхности CD4+ Т-лимфоцитов при сокультивировании с ММСК *in vitro*

Активация Т- и В- лимфоцитов фитогемагглютинином сопровождается их активным делением. При этом на поверхности этих клеток происходит увеличение уровня количества белков - маркеров активации CD25, CD38 и CD69. Мы предположили, что подавление пролиферации актМПК в присутствии ММСК связано с подавлением пролиферации Т- и В- лимфоцитов.

Пролиферация Т-лимфоцитов напрямую связана с чувствительностью к IL-2, рецептором для которого является субъединица IL-2Ra (CD25) на поверхности мембраны. Высокое сродство IL-2 с его рецептором обеспечивает сигнал, необходимый для поддержания пролиферации Т-лимфоцитов.

Для исследования способности ММСК снижать уровень экспрессии маркеров активации на поверхности активированных Т- и В-лимфоцитов мы использовали метод проточной цитометрии.

Для этого сокультивировали ММСК жировой ткани и актМПК в течение 48 ч в различных соотношениях. Супернатант сокультуры, содержащий актМПК, собирали, и осаждали клетки центрифугированием. Полученные клетки окрашивали антителами к CD4, CD8, CD19, меченных FITC, и CD25, меченных APC.

В результате проведенных экспериментов было установлено, что сокультивирование с ММСК приводит к снижению уровня экспрессии маркера активации CD25 на поверхности активированных CD4+ Т-лимфоцитов. Уровень экспрессии этого маркера в субпопуляциях активированных CD8+ Т-лимфоцитов и CD19+ В-лимфоцитов в присутствии ММСК не изменялся. Эффект снижения уровня экспрессии маркера активации CD25 на поверхности активированных CD4+Т-лимфоцитов в присутствии ММСК зависел от соотношения этих клеток в сокультуре. Наименьшее количество активированных CD4+CD25+ Т-лимфоцитов наблюдалось при сокультивировании с ММСК с актМПК в соотношении 1:25. Этот эффект обнаруживался как при контактном, так и бесконтактном

сокультивировании с ММСК. Однако количество CD4+CD25+ Т-лимфоцитов было все же ниже при сокультивировании с ММСК в контактных условиях (рисунок 3.33) (Rubtsov Y. et al., 2017). Сокультивирование ММСК и актМПК в соотношении 1:100 и 1:50 (соответственно), а также культивирование актМПК в стандартной среде не приводило к изменению количества активированных CD4+CD25+ Т-лимфоцитов. Супернатант от культуры ММСК также не оказывал влияния на количество активированных Т- и В-лимфоцитов.

При культивировании актМПК в присутствии ММСК в соотношении ниже, чем 1:10 мы наблюдали обратный эффект: повышение количества активированных CD4+CD25+ Т-лимфоцитов. Этот эффект был еще более выражен в случае сокультивирования ММСК с интактными МПК (данные не представлены). Этот факт наряду со стимуляцией пролиферации актМПК в присутствии ММСК при тех же соотношениях клеток может свидетельствовать о том, что в отсутствие воспалительной реакции ММСК могут создавать и поддерживать определенный провоспалительный баланс в тканях.

Таким образом полученные результаты показали, что эффект снижения уровня экспрессии маркера CD25 на поверхности активированных CD4+Т-лимфоцитов в присутствии ММСК зависит от соотношения этих клеток в сокультуре. Растворимые факторы, выделяемые ММСК в отсутствие активированных лимфоцитов, не оказывают влияния на уровень экспрессии маркера активации CD25 на поверхности активированных Т-лимфоцитов.

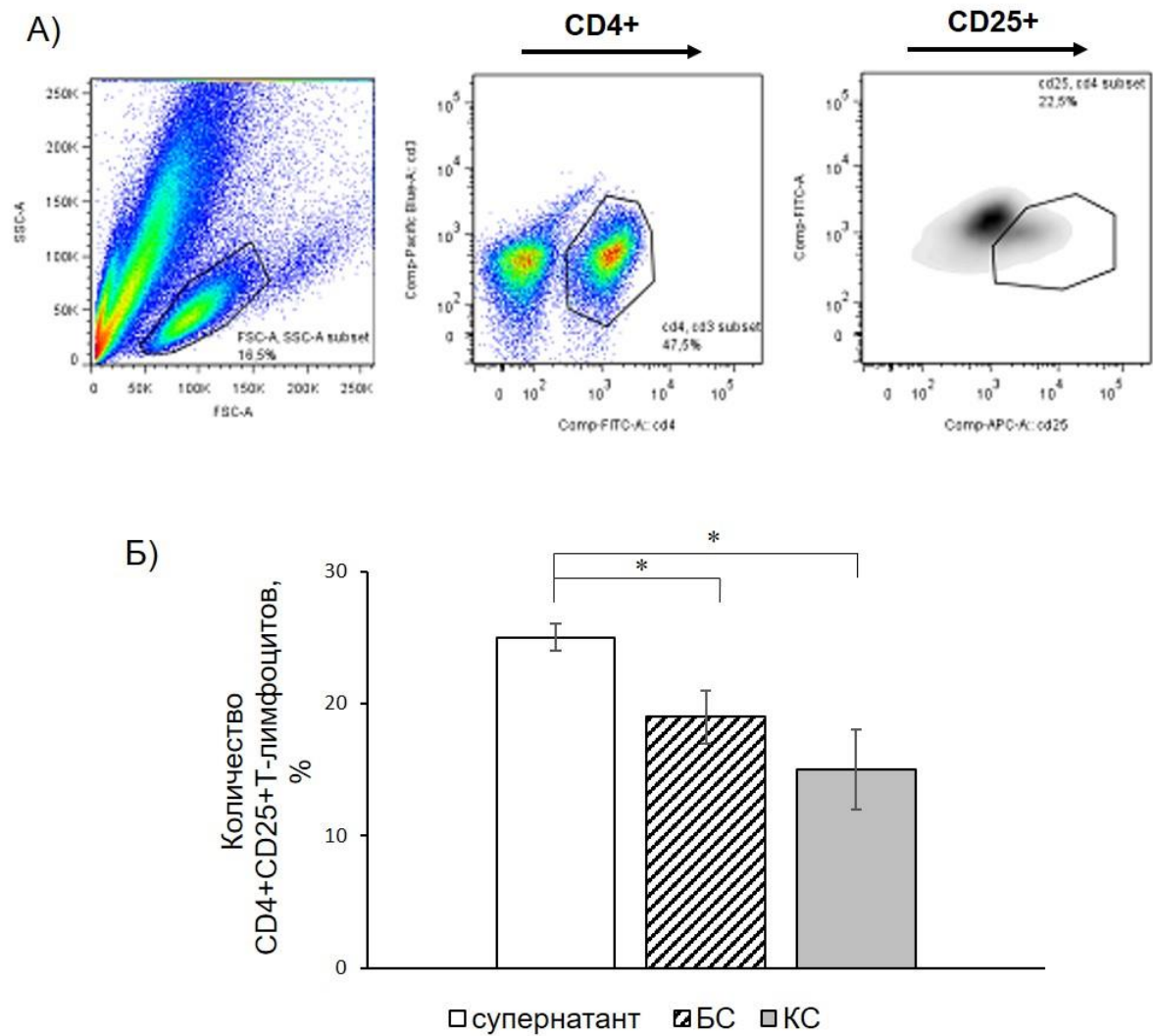


Рисунок 3.33. Относительное количество активированных CD4+Т-лимфоцитов при культивировании в присутствии ММСК. А) - Репрезентативные результаты анализа актМПК, окрашенных антителами к поверхностным маркерам Т-лимфоцитов CD4+ (FITC) и CD25 (APC). Данные проточной цитометрии. Б) - Относительное количество CD25+Т-лимфоцитов в % от общего количества CD4+Т-лимфоцитов в бесконтактной и контактной сокультуре (БС и КС) с ММСК. ММСК сокультивировали с актМПК в течение 48 ч в соотношении 1:25. Контролем служили актМПК, культивированные в супернатанте от культуры ММСК. Показаны средние величины и их ошибки из 3 независимых экспериментов. Звездочка показывает достоверность отличий при $P < 0.05$.

3.2.7. Снижение количества активированных CD4+ Т-лимфоцитов при сокультивировании с ММСК не связано с апоптозом

Снижение количества активированных CD4+ Т-лимфоцитов в присутствии ММСК может быть также связано с их гибелью в результате апоптоза. Для оценки способности ММСК вызывать апоптоз активированных CD4+ Т-лимфоцитов мы использовали метод проточной цитометрии.

Для этого сокультивировали ММСК жировой ткани и актМПК в течение 48 ч в различных соотношениях. Супернатант сокультуры, содержащий актМПК, собирали, и осаждали клетки центрифугированием. Полученные клетки окрашивали антителами к аннексину V, меченными Alexa 488. Такое окрашивание обеспечивает выявление фосфатидилсерина, экспонирующегося на поверхности мембраны клеток при ранних стадиях апоптоза, и позволяет дифференцировать живые и апоптотические клетки. Репрезентативные результаты анализа актМПК, окрашенных антителами к аннексину V, представлены на рисунок 3.34.

Проведенные эксперименты не выявили статистически значимых различий в количестве апоптотических клеток среди активированных CD4+CD25+ Т-лимфоцитов и неактивированных CD4+CD25- Т-лимфоцитов в образцах, сокультивированных с ММСК, супернатантом от культуры ММСК и в контроле (данные не представлены).

Таким образом, присутствие ММСК или выделяемых ими растворимых факторов в сокультуре с актМПК не влияет на уровень апоптоза среди Т-лимфоцитов.

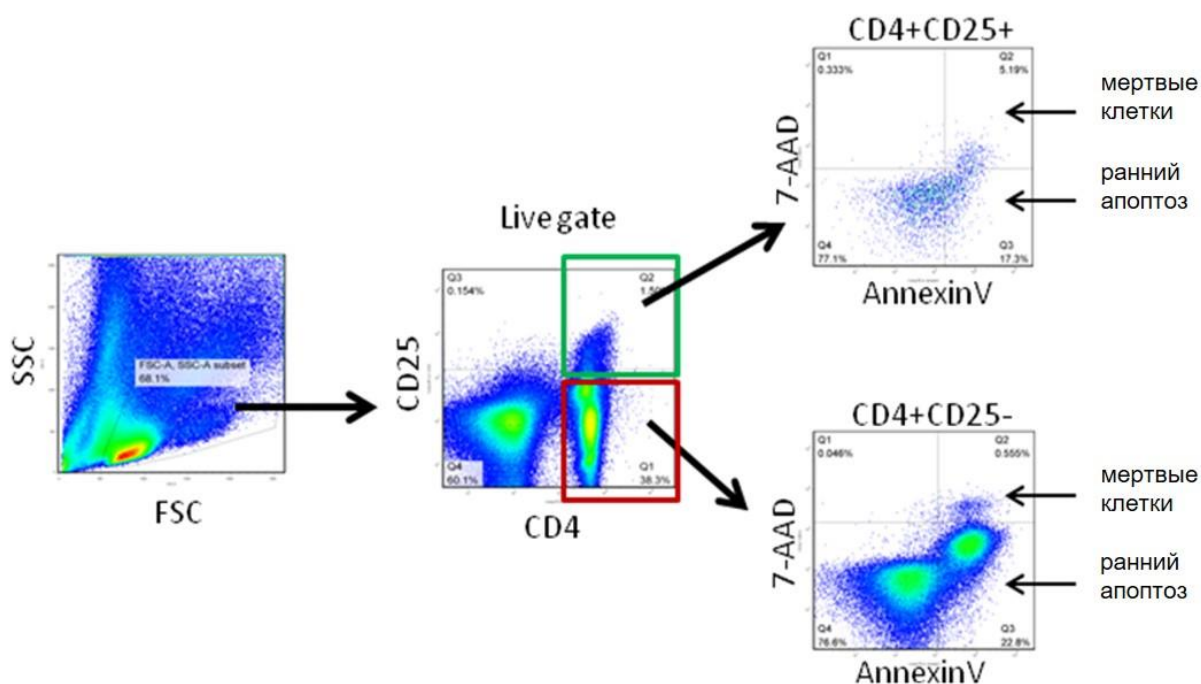


Рисунок 3.34. Репрезентативные результаты анализа МПК, окрашенных антителами к поверхностным маркерам Т-лимфоцитов CD4⁺ (FITC), маркерам активации Т-лимфоцитов CD25 (APC), маркеру раннего апоптоза аннексину V (Alexa 488), а также витальным красителем 7-AAD. Данные проточной цитометрии.

3.2.8. ММСК модулируют секрецию цитокинов в сокультурах и актМПК

При сокультивировании ММСК и актМПК мы наблюдали эффект подавления пролиферации актМПК, в котором основную роль играли растворимые факторы, синтезируемые ММСК.

В связи с этим, для исследования роли выделяемых ММСК растворимых факторов в проявлении их иммуномодулирующих свойств, мы провели анализ секретируемого цитокинового профиля в сокультуре ММСК и актМПК с помощью технологии Bioplex, основанной на интеграции иммуноферментного метода и метода проточной цитофлуориметрии, позволяющей производить

количественный анализ значительного числа цитокинов, хемокинов, факторов роста в одном образце одновременно. В нашей работе мы использовали набор Bio-Plex Human 17-plex assay для определения наиболее значимых в условиях воспалительной реакции цитокинов, хемокинов и факторов роста: (IL-1b, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IL-17), G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , TNF- α , а также моноцитарный хемотаксический протеин-1 (MCP-1 или CCL2), макрофагальный воспалительный протеин-1b (MIP-1b или CCL4). Способность ММСК к модулированию цитокинового микроокружения была оценена с помощью одновременного измерения содержания вышеперечисленных цитокинов в супернатантах культур ММСК и актМПК, а также их бесконтактных и контактных сокультур.

Для этого производили культивирование ММСК жировой ткани, актМПК, а также сокультивирование ММСК и актМПК в различных стехиометрических условиях, предполагающих контактное и бесконтактное взаимодействие этих клеток в различных соотношениях в течение 48 ч. Затем собирали супернатант от отдельных культур ММСК и актМПК и их сокультур. Осаждали актМПК центрифугированием. Супернатанты образцов, свободные от ММСК и актМПК, анализировали с использованием Bio-Plex Pro Human Cytokine 17-plex Assay на приборе BIORPLEX 200 (BIO-RAD, США).

В результате проведенных экспериментов было обнаружено, что актМПК, культивируемые в стандартных условиях, секретируют все вышеуказанные цитокины.

Культивируемые интактные ММСК жировой ткани секретировали преимущественно IL-6, IL-8 и MCP-1. Базальный уровень секреции IL-6 в культуре ММСК был существенно выше по сравнению с актМПК. Цитокины IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, GM-CSF, G-CSF, IFN- γ , MCP-1, MIP-1b, TNF- α ММСК секретировали на существенно более низком уровне. Концентрации циткинов IL-2, IL-5, IL-7, IL-13 в супернатантах культуры ММСК были ниже пределов детекции (рисунок 3.35, а).

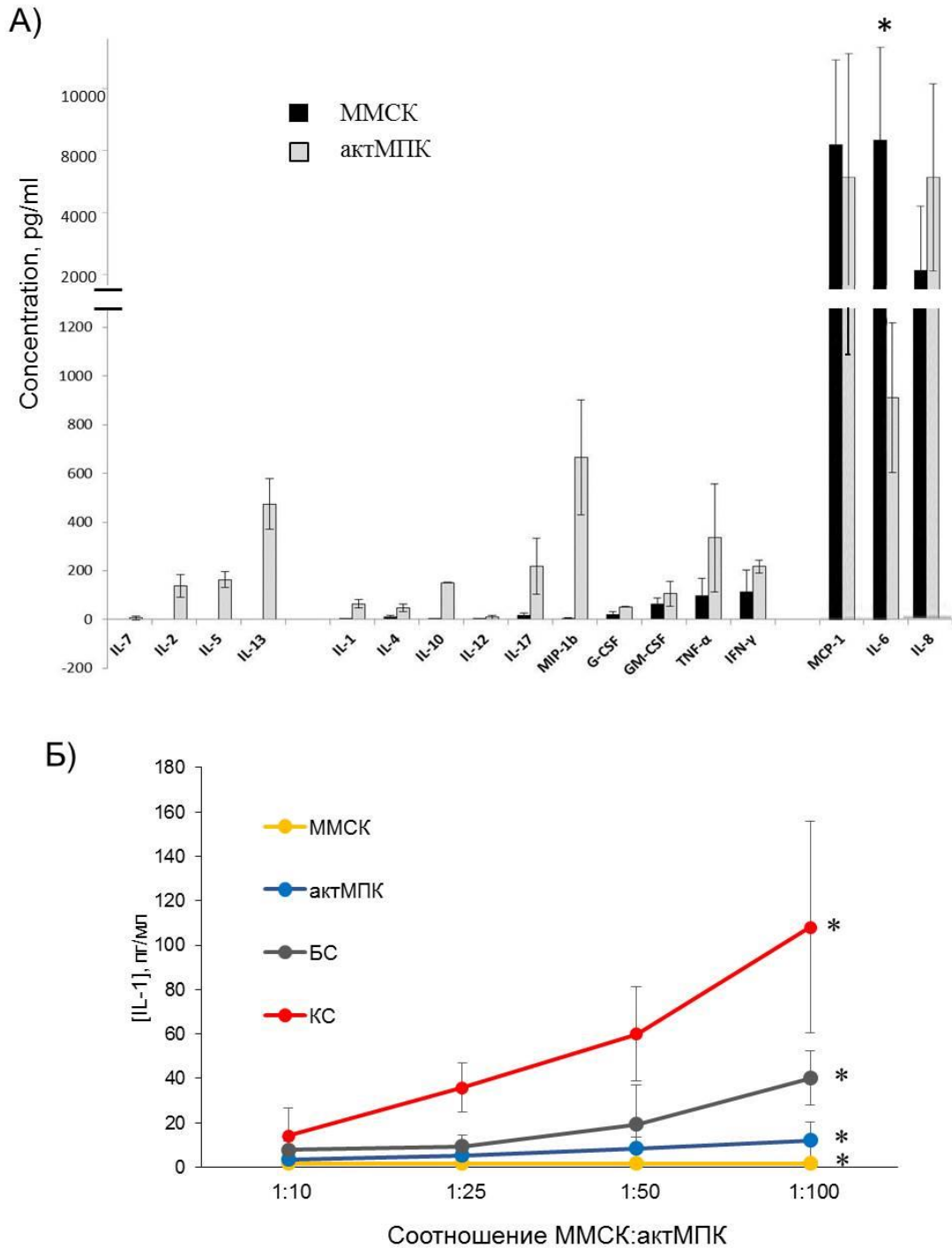


Рисунок 3.35. Концентрация цитокинов в супернатантах отдельных и совместных культур ММСК и актМПК. Данные представлены как среднее \pm стандартное; $n = 5$, t -критерий, * достоверность различий при $p < 0,05$. А) – Концентрация цитокинов в супернатантах интактных культур ММСК и актМПК. Б) – Изменение концентрации IL-1 в супернатантах в зависимости от количества клеток в культурах при отдельном и совместном культивировании ММСК жировой ткани и актМПК в различных соотношениях. БС – бесконтактное сокультивирование, КС – контактное сокультивирование. Показаны средние величины и их ошибки из 3 независимых экспериментов. * показывает достоверность отличий при $P < 0,05$.

Было показано, что концентрации измеряемых цитокинов повышались прямо пропорционально изменению количества клеток в отдельных культурах ММСК и актМПК и соотношений ММСК и актМПК в сокультурах. График зависимости концентрации IL-1 в супернатантах отдельных культур ММСК и актМПК, а также их контактных и бесконтактных сокультур от количества клеток в образцах представлен на рисунке 3.35, б. Дальнейшие измерения проводили при начальной плотности посева ММСК 2×10^4 кл/см² и актМПК 2×10^6 кл/см². Таким образом в контактных и бесконтактных сокультурах соотношение клеток составило 1:100.

Полученные данные показали, что условия совместного культивирования ММСК и актМПК оказывают значительное влияние на соотношение некоторых секретируемых цитокинов в измеряемых образцах.

Так сокультивирование ММСК и актМПК как в контактных, так и бесконтактных условиях приводило к увеличению концентраций IL-1, IFN- γ , G-CSF в супернатантах по сравнению с отдельными культурами этих клеток (рисунок 3.36).

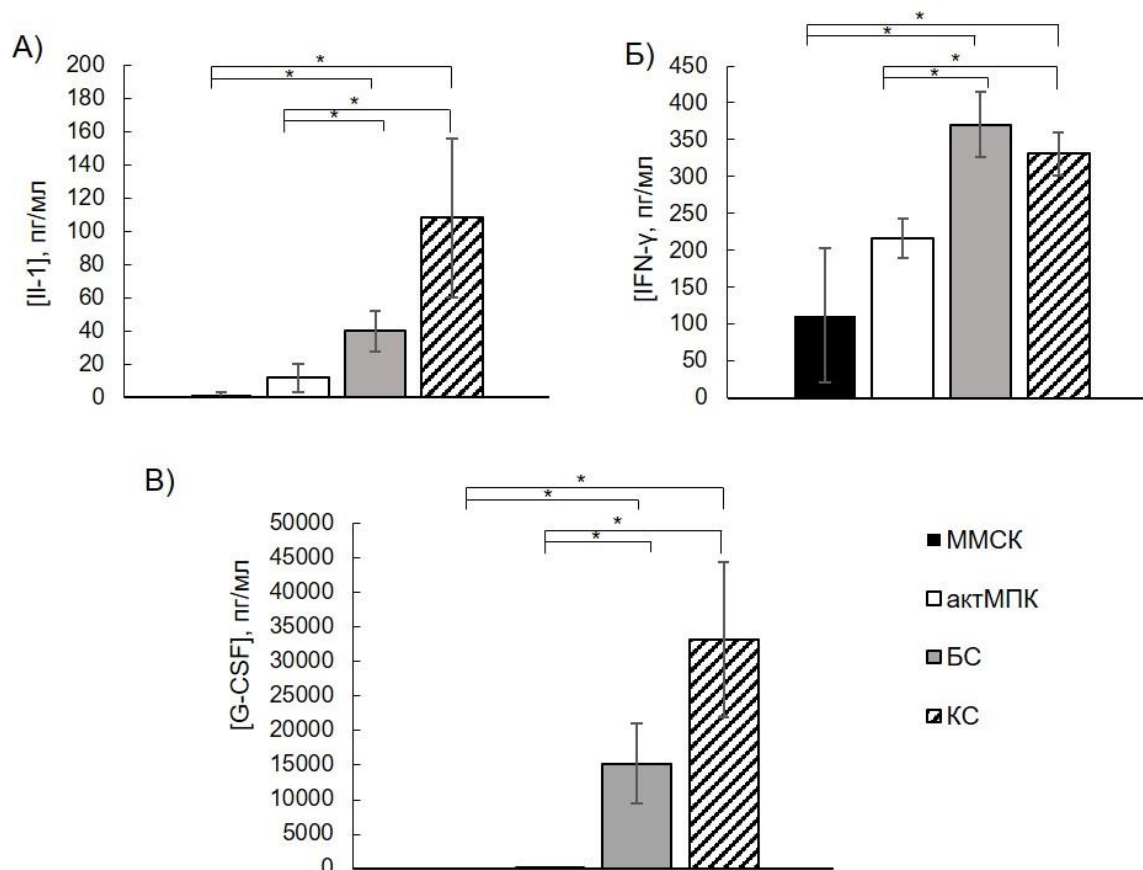


Рисунок 3.36. Концентрации цитокинов в супернатантах ММСК жировой ткани и актМПК при раздельном и совместном культивировании. А) – концентрация IL-1, Б) – концентрация IFN- γ , В) - концентрация G-CSF. BC - бесконтактное сокультивирование, KC – контактное сокультивирование.

Показаны средние величины и их ошибки из 3 независимых экспериментов. Звездочка показывает достоверность отличий при $P < 0.05$.

Сокультивирование ММСК и актМПК как в контактных, так и бесконтактных условиях приводило к увеличению концентраций IL-10, IL-13, относительно супернатантов раздельных культур ММСК. Однако относительно супернатантов раздельных культур актМПК концентрации этих цитокинов уменьшались (рисунок 3.37).

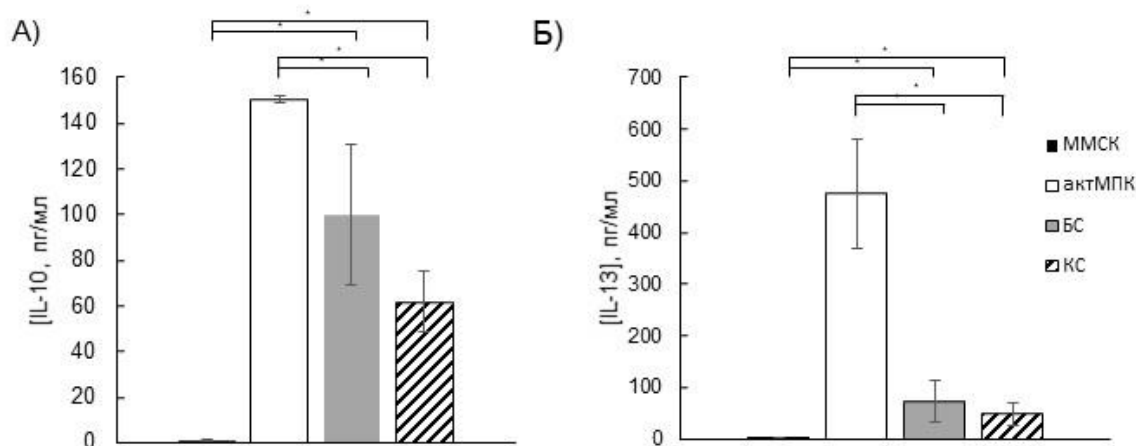


Рисунок 3.37. Концентрации цитокинов в супернатантах ММСК жировой ткани и актМПК при раздельном и совместном культивировании. А) – концентрация IL-10, Б) – концентрация IL-13, В). BC – бесконтактное сокультивирование, KC – контактное сокультивирование. Показаны средние величины и их ошибки из 3 независимых экспериментов. Звездочка показывает достоверность отличий при $P < 0.05$.

Культивирование актМПК в присутствии ММСК и приводило также к значительному увеличению концентраций IL-6 в супернатантах. Особенно ярко этот эффект проявлялся при сравнении значений концентраций IL-6 в супернатантах сокультур этих клеток относительно отдельных культур актМПК. При этом необходимо отметить, что базовый уровень секреции IL-6 при культивировании ММСК в стандартных условиях был относительно высоким по сравнению с такими же культурами актМПК (рисунок 3.38). Этот факт подтверждает гипотезу о том, что ММСК в отсутствие воспалительной реакции способны поддерживать некоторый провоспалительный гомеостаз в тканях.

Необходимо обратить внимание на тот факт, что секреция IL-1, IL-6 и G-CSF существенно не только значительно возрастала при культивировании актМПК в присутствии ММСК, но при этом концентрации IL-1, IL-6 и G-CSF супернатантах при контактном сокультивировании ММСК и актМПК были существенно выше, чем при бесконтактном (рисунок 3.36, 3.38). Таким образом можно предположить, что контактные взаимодействия между ММСК и акт МПК

могут активировать сигнальные каскады, участвующие в регуляции синтеза этих цитокинов.

Сокультивирование ММСК и актМПК как в контактных, так и бесконтактных условиях не приводило к значимым изменениям концентраций TNF-alpha, IL-2, IL-12, IL-17, GM-CSF, хемокина MIP-1b в супернатантах относительно отдельных культур этих клеток (данные не представлены). Произвести оценку изменений концентраций IL-5, IL-7, IL-8 и MCP-1 в супернатантах в наших экспериментальных условиях не представлялось возможным из-за ограничений используемого метода BIOPLEX (получаемые значения концентраций указанных цитокинов выходили за пределы прямолинейного участка соответствующих калибровочных кривых).

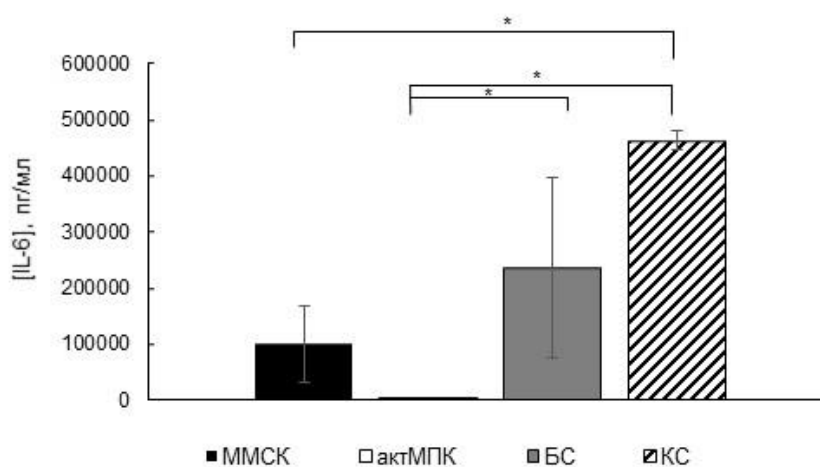


Рисунок 3.38. Концентрация IL-6 в супернатантах ММСК жировой ткани и актМПК при отдельном и совместном культивировании. БС – бесконтактное сокультивирование, КС – контактное сокультивирование. Показаны средние величины и их ошибки из 3 независимых экспериментов. Звездочка показывает достоверность отличий при $P < 0.05$.

Таким образом, проведенные эксперименты показали, что отдельные культуры ММСК и актМПК секретируют определенный спектр интерлейкинов,

ростовых факторов и хемокинов. Однако при сокультивировании этих клеток спектр, соотношение и уровень секреции этих цитокинов может значительно изменяться в зависимости от наличия или отсутствия межклеточных контактов между ММСК и актМПК. Этот факт свидетельствует о способности ММСК осуществлять динамическое модулирование цитокинового микроокружения в зависимости от поступающих извне сигналов и участвовать в регуляции синтеза этих молекул активированными лимфоцитами в очаге воспаления.

3.2.9. Участие растворимых факторов в механизмах подавления пролиферации актМПК при сокультивировании с ММСК

Среди других потенциальных растворимых факторов, выделяемых ММСК в очаге воспаления и участвующих в механизмах иммуносупрессии, могут быть также такие медиаторы воспаления, как PGE2, COX-2, IDO, iNOS.

Предыдущий раздел был посвящен исследованию способности ММСК модулировать цитокиновое микроокружение, под действием которого в ММСК могут активироваться различные сигнальные каскады, изменяющие экспрессию ряда генов, которые могут быть вовлечены в механизмы иммуносупрессии. В рамках исследования механизмов подавления пролиферации актМПК при сокультивировании с ММСК был произведен анализ потенциальных растворимых факторов, индуцируемых в ММСК под действием провоспалительных цитокинов.

Для этого производили сокультивирование ММСК жировой ткани с актМПК контактных и бесконтактных условиях в течение 48 ч. Контролем служили ММСК, культивируемые в стандартных условиях. Супернатант удаляли, монослой ММСК дважды промывали раствором PBS. Дополнительно к этой процедуре ММСК из контактных сокультур отделяли от актМПК, образовавших с ними адгезионные контакты, с помощью магнитного метода разделения путем негативной селекции. Затем из образцов ММСК выделяли мРНК и осуществляли обратную транскрипцию. Оценку уровня экспрессии генов IDO, iNOS, COX-2 проводили с помощью ПЦР в реальном времени. Данные измерений пороговых

циклов амплификации генов IDO, iNOS, COX-2 нормировали к данным измерений пороговых циклов амплификации β -актина или винкулина, которые были выбраны нами в качестве генов домашнего хозяйства.

Известно, что под действием провоспалительных цитокинов происходит индукция синтеза фермента IDO в ММСК, который участвует в метаболизме триптофана (Meisel R. et al., 2004, DelaRosa O. et al., 2009). Считается, что секретируемая форма IDO снижает концентрацию свободного триптофана, большие количества которого потребляют быстро делящиеся и метаболизирующие активированные Т-лимфоциты, и таким образом является негативным регулятором их функций. Более того, катаболит триптофана – кинуренин, который вырабатывается в ходе работы IDO, тоже подавляет активацию Т-клеток (Munn D.H. et al., 1999).

Исследование экспрессии гена IDO в ММСК в наших экспериментальных условиях показало, что ММСК не экспрессируют этот ген конститутивно. В ММСК, культивированных в стандартных условиях, экспрессия IDO не выявлялась. Сокультивирование ММСК с актМПК приводило к индукции экспрессии гена IDO в ММСК, однако уровень экспрессии этого фермента значительно различался в зависимости от стехиометрических соотношений клеток в сокультуре. Индукция синтеза IDO в ММСК наблюдалась как при контактном, так и бесконтактном сокультивировании с актМПК. Уровень экспрессии IDO в ММСК при бесконтактном сокультивировании с актМПК прямопропорционально зависел от соотношения клеток в сокультуре. При контактном сокультивировании такой зависимости выявлено не было. Уровень экспрессии IDO в ММСК был более высоким при контактном сокультивировании с актМПК. (рисунок 3.39).

Альтернативный путь активации ММСК заключается в увеличении экспрессии гена iNOS – фермента, который отвечает за продукцию клетками NO и в норме не транскрибируется. Известно, что в целом ряде клеток иммунной системы уровень iNOS значительно возрастает под действием цитокинов и других стрессовых воздействий (Ren G. et al., 2008). Увеличение уровня экспрессии гена

iNOS в ММСК при активации свидетельствует об увеличении продукции NO этими клетками. Действие NO на стимулированные Т-клетки, согласно существующим данным, заключается в подавлении их деления, секреции цитокинов, а также, по-видимому, увеличении уровня гибели клеток.

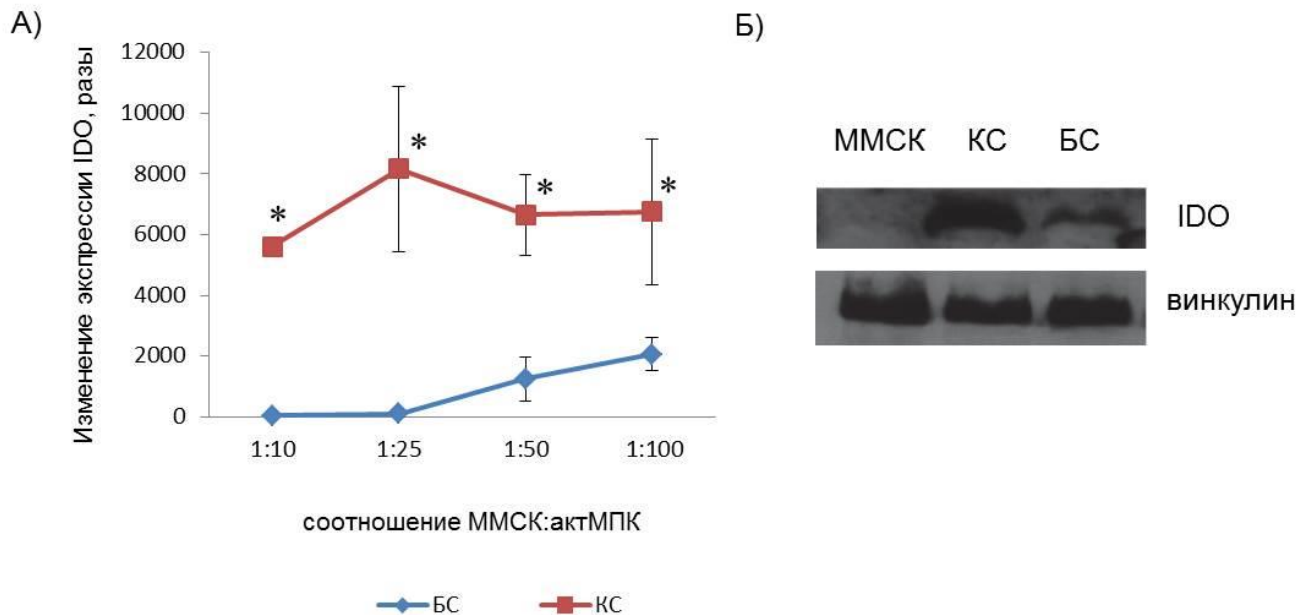


Рисунок 3.39. Индукция синтеза фермента IDO в ММСК жировой ткани при бесконтактном (БС) и контактном (КС) сокультивировании с актМПК. А) - относительное изменение экспрессии гена IDO. ПЦР в реальном времени. Представлены средние величины и их ошибки из 3 независимых экспериментов. Б) – Уровень протеина IDO в ММСК при сокультивировании с актМПК в соотношении 1:25. Иммуноблоттинг. * показывает достоверность отличий при $P < 0,05$.

В наших экспериментальных условиях ММСК, культивируемые в стандартных условиях, не экспрессировали iNOS. Сокультивирование ММСК с актМПК приводило к индукции экспрессии гена iNOS в ММСК, однако изменение уровня экспрессии мРНК этого гена было весьма незначительным и детектировалось на уровне пороговых значений. Протеина iNOS в ММСК не было обнаружено (данные не представлены).

Другим потенциальным фактором, определяющим иммуносупрессивное действие ММСК, является PGE₂, в синтезе которого участвует COX. PGE₂ влияет на процессы активации В-клеток и индукции Treg-клеток (Akasaki Y. et al., 2004). Известны 2 изоформы COX, одна из которых постоянно синтезируется клетками, экспрессия другой сильно возрастает при воспалении.

Исследование уровня экспрессии гена COX-2 в ММСК показало, что при культивировании в стандартных условиях ММСК экспрессируют низкие уровни COX-2. При сокультивировании с актМПК в ММСК уровень экспрессии COX-2 возрастает прямопропорционально количеству актМПК в образце и не зависит от наличия или отсутствия контактов между клетками в сокультуре (рисунок 3.40).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что сокультивирование ММСК с актМПК приводит к индукции или стимуляции экспрессии таких генов, как IDO и COX-2, являющимися растворимыми факторами. Экспрессия этих генов проявляется в определенных условиях и соотносится с эффектом подавления/стимуляции пролиферации актМПК в присутствии ММСК.

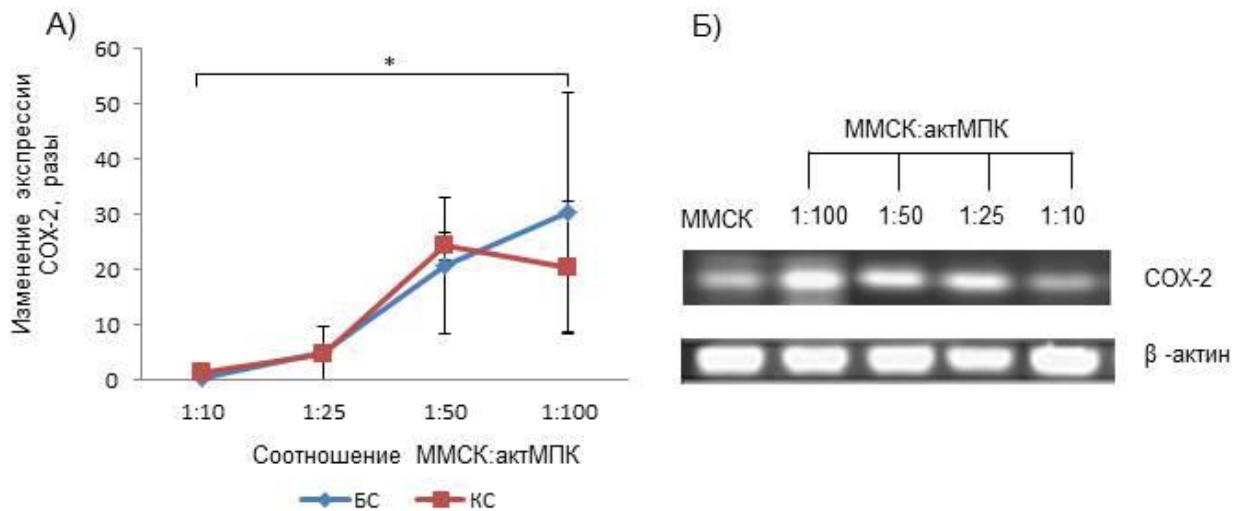


Рисунок 3.40. Индукция COX-2 в ММСК жировой ткани при бесконтактном (БС) и контактном (КС) сокультивировании с актМПК. А) - относительное изменение экспрессии гена COX-2. ПЦР в реальном времени. Представлены средние величины и их ошибки из 3 независимых экспериментов. Б) –репрезентативная электрофореграмма продуктов ПЦР. * показывает достоверность отличий при $P < 0,05$.

3.2.10. Активация приводит к возрастанию способности МПК образовывать плотные межклеточные контакты с ММСК

Как было отмечено ранее подавление пролиферации актМПК (рисунок 3.32) осуществляется в основном посредством растворимых факторов, выделяемых ММСК в ответ на провоспалительное микроокружение. Степень подавления пролиферации актМПК в присутствии ММСК зависела от соотношения этих клеток в культуре. Наиболее значительное подавление пролиферации актМПК наблюдали при соотношении клеток 1: 25. Степень подавления пролиферации актМПК не имела статистически значимых отличий в зависимости от наличия или отсутствия межклеточных контактов между ММСК и МПК в сокультуре. Однако при наличии межклеточных контактов подавление пролиферации актМПК было

всё же больше, чем без них. Полученные результаты позволяют предположить, что в описываемых эффектах основную роль играют растворимые факторы, однако межклеточные контакты также вносят определенный вклад.

Для установления роли межклеточных контактов в проявлении эффекта подавления пролиферации актМПК мы проанализировали субпопуляции актМПК, способные к образованию плотных межклеточных контактов с ММСК, в условиях контактного сокультивирования. Для этого сокультивировали ММСК жировой ткани с интактными МПК и актМПК в контактных условиях в течение 48 ч. Затем неприкрепившиеся МПК отмывали. Прикрепившиеся клетки (ММСК и МПК) с помощью ферментной обработки ресуспендировали. Связавшиеся с ММСК интактные МПК и актМПК анализировали с помощью метода проточной цитометрии, инкубируя их с реагентом BD Multitest™ 6-Color TBNK (BD Bioscience, США), содержащего флуоресцентно меченные антитела на общий лейкоцитарный антиген (CD45), маркёры Т-лимфоцитов (CD3, CD4 и CD8), а также на маркёры натуральных киллеров (CD16, CD56) и В-лимфоцитов (CD19) и позволяющего одновременно определить относительное содержание основных субпопуляций МПК в одном образце.

Проведенные эксперименты показали, что активация МПК приводит к увеличению их способности образовывать межклеточные контакты с ММСК (рисунок 3.41, а). Иммуноцитотипирование показало, что этот эффект обеспечивается определенными субпопуляциями МПК, большинство же других не участвует в этом процессе. В условиях эксперимента активация МПК приводила к увеличению доли Т-лимфоцитов (CD45+CD3+), связавшихся с ММСК (рисунок 3.41, б). В тоже время среди клеток субпопуляции CD45+CD3- (не Т-лимфоцитов) способность образовывать межклеточные контакты с ММСК жировой ткани при активации ФГА снижалась (рисунок 3.41, в). Дальнейший анализ субпопуляций Т-лимфоцитов, связавшихся с ММСК, показал, что при активации способность к установлению межклеточных контактов с ММСК значительно повышается у CD4+ Т-лимфоцитов, а у CD8+Т-лимфоцитов не изменяется (рисунок 3.41, г).

Таким образом, мы предполагаем, что контактные взаимодействия между активированными CD4+Т-лимфоцитами и ММСК, возможно, могут являться одним из важных факторов, участвующих в стимуляции иммуносупрессивных свойств ММСК (Suzdaltseva Y. G. et al., 2018).

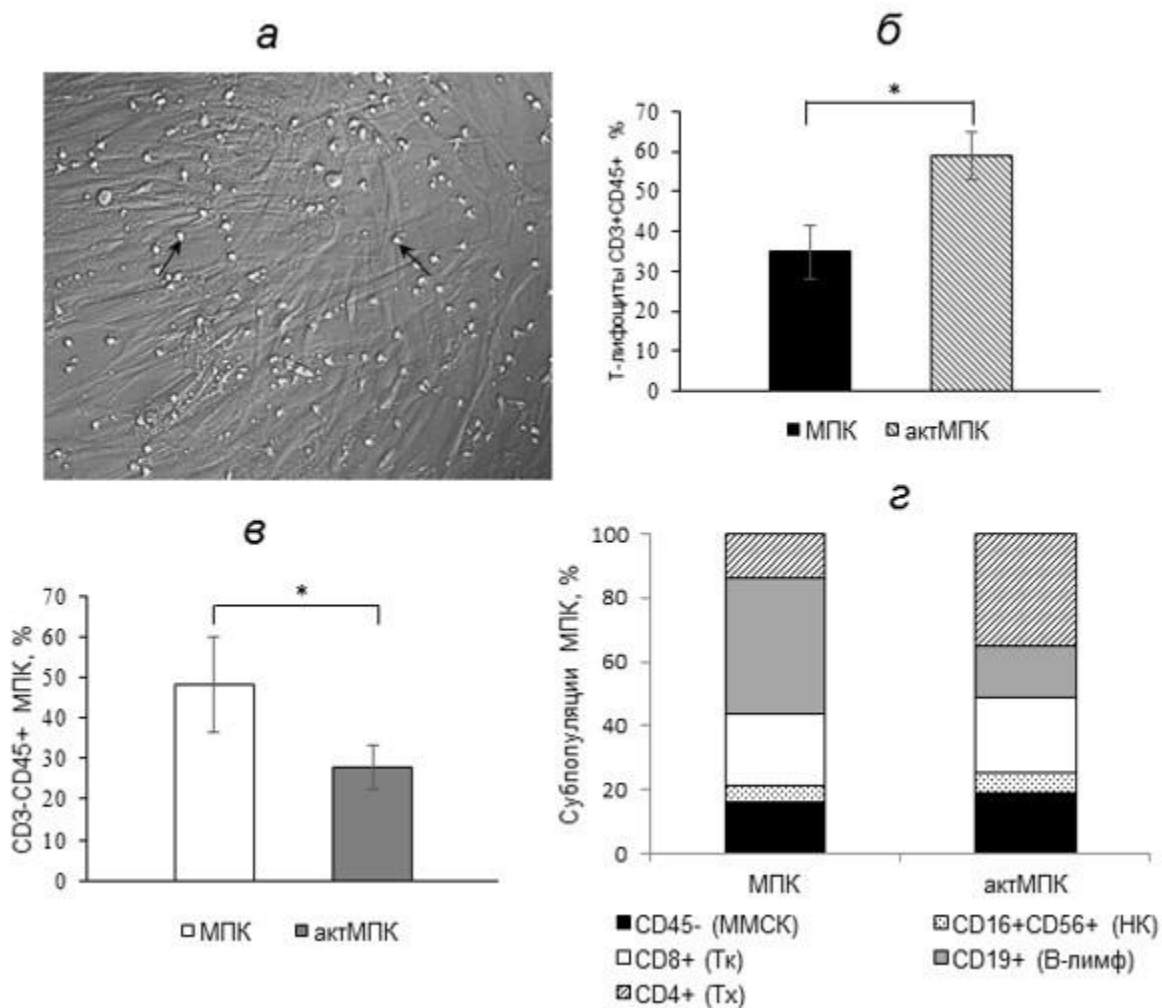


Рисунок 3.41. Активация МПК добавлением 10 мкг/мл ФГА способствует усилению их способности образовывать контакты с ММСК. а -- фотография культуры ММСК после сокультивирования с актМПК; стрелками указаны МПК, образовавшие плотные контакты с ММСК; б – доля CD3+ Т-лимфоцитов, связавшихся с ММСК в % от общего количества CD45+ МПК; в -- доля CD3–МПК, связавшихся с ММСК в % от общего количества CD45+ МПК; г -- распределение субпопуляций МПК, связавшихся с ММСК при сокультивировании: Тх (Т-хелперы), Тк (Т-киллерные клетки), НК (натуральные киллерные клетки). На гистограммах представлены средние величины (б, в, г) и их ошибки (б, в) из 9 независимых экспериментов (*p < 0,05).

3.2.11. Анализ потенциальных молекул, участвующих в образовании межклеточных контактов между ММСК и актМПК при сокультивировании

Основными белками, участвующими в образовании межклеточных контактов, являются молекулы адгезии. Для того чтобы установить, какие молекулы адгезии могут участвовать в образовании межклеточных контактов между ММСК и актМПК при сокультивировании в контактных условиях исследовали уровень экспрессии генов ICAM-1, VCAM, PECAM, N-кадгерина, T-кадгерина, P-кадгерина, E-селектина, P-селектина, L-селектина в каждом из указанных типов клеток отдельно. Для этого ММСК сокультивировали с актМПК в контактных и бесконтактных условиях в течение 48 ч. Затем супернатант, содержащий актМПК, отбирали и осаждали центрифугированием. Отдельно из ММСК и МПК выделяли мРНК, проводили обратную транскрипцию и ПЦР в реальном времени.

Основной функцией кадгеринов является обеспечение гомотипического соединения клеток в плотных тканях организма. В условиях контактного и бесконтактного сокультивирования с ММСК в актМПК не обнаружили экспрессии генов E-, T-, P- и N- кадгеринов. В отличие от МПК в ММСК эти кадгерины экспрессировались, но уровень экспрессии снижался при сокультивировании с актМПК в контактных условиях (данные не приведены).

Из всех генов селектинов (E-, P- и L-селектина) в наших условиях сокультивирования в актМПК была обнаружена экспрессия только гена L-селектина. Последний конститутивно экспрессируется на лейкоцитах. В условиях контактного сокультивирования с ММСК в актМПК уровень экспрессии L-селектина возрастал, что указывает на возможность участия этого гена в установлении адгезивных контактов между клетками. Однако статистически достоверных различий между повышением уровня экспрессии гена L-селектина в актМПК в контактных и бесконтактных условиях сокультивирования с ММСК не обнаружено.

PECAM-1 конститутивно экспрессируется в основном в клетках эндотелия, однако обнаруживается также и в ММСК. При сокультивировании ММСК и актМПК мы не обнаружили экспрессии этого гена ни в ММСК, ни в актМПК. Таким образом, участие PECAM-1 в установлении контактов между клетками не обнаружено.

В отличие от постоянно экспрессирующейся в эндотелии молекулы PECAM-1 экспрессия гена VCAM-1 индуцируется в них провоспалительным микроокружением. Ранее нами было показано, что при культивировании в стандартных условиях в ММСК обнаруживается незначительное количество клеток, экспрессирующих VCAM-1 (рисунок 3.12). В настоящей работе мы не обнаружили закономерности в изменении экспрессии гена VCAM-1 в ММСК при сокультивировании с актМПК в повторных экспериментах (данные не представлены). Экспрессия гена VCAM-1 в актМПК не обнаружена.

Итак, полученные результаты указывают на то, что кадгерины, E- и P-селектин, PECAM-1 и VCAM-1 при взаимодействии актМПК с ММСК в наших экспериментальных условиях не участвуют.

Другой молекулой адгезии, синтез которой индуцируется провоспалительным микроокружением и, в частности, такими медиаторами воспаления как IL-1, TNF α и IFN γ , является ICAM-1. Проведенный нами анализ мРНК показал, что при сокультивировании уровень экспрессии гена ICAM-1 значительно возрастал и в ММСК, и в актМПК (рисунок 3.42, а). С помощью проточной цитометрии было показано также, что и экспонирование ICAM-1 на поверхности ММСК также драматически увеличивалось. Количество ММСК с высоким уровнем экспонирования ICAM-1 на поверхности было значительно выше при сокультивировании их с актМПК в контактных условиях по сравнению с бесконтактными (рисунок 3.42, б). Однако данные проточной цитометрии показали, что уровень экспрессии ICAM-1 в субпопуляции CD4⁺Т-лимфоцитов оставался стабильным. Уровень экспрессии ICAM-1 возрастал в основном в клетках субпопуляции CD4⁻ (рисунок 3.42, в). Этот факт указывает на то, что в установлении межклеточных контактов между CD4⁺ Т-лимфоцитами и ММСК

участвуют именно ICAM-1, экспрессирующийся на поверхности ММСК. Рецептором для ICAM-1 служит молекула LFA-1, которая экспрессирована на поверхности Т-лимфоцитов.

Таким образом, полученные данные позволяют предположить, что рецепторная пара LFA-1 и ICAM-1 может являться потенциальной участницей установления плотных межклеточных контактов между ММСК и CD4⁺ Т-лимфоцитами (Suzdaltseva Y. G. et al., 2018).

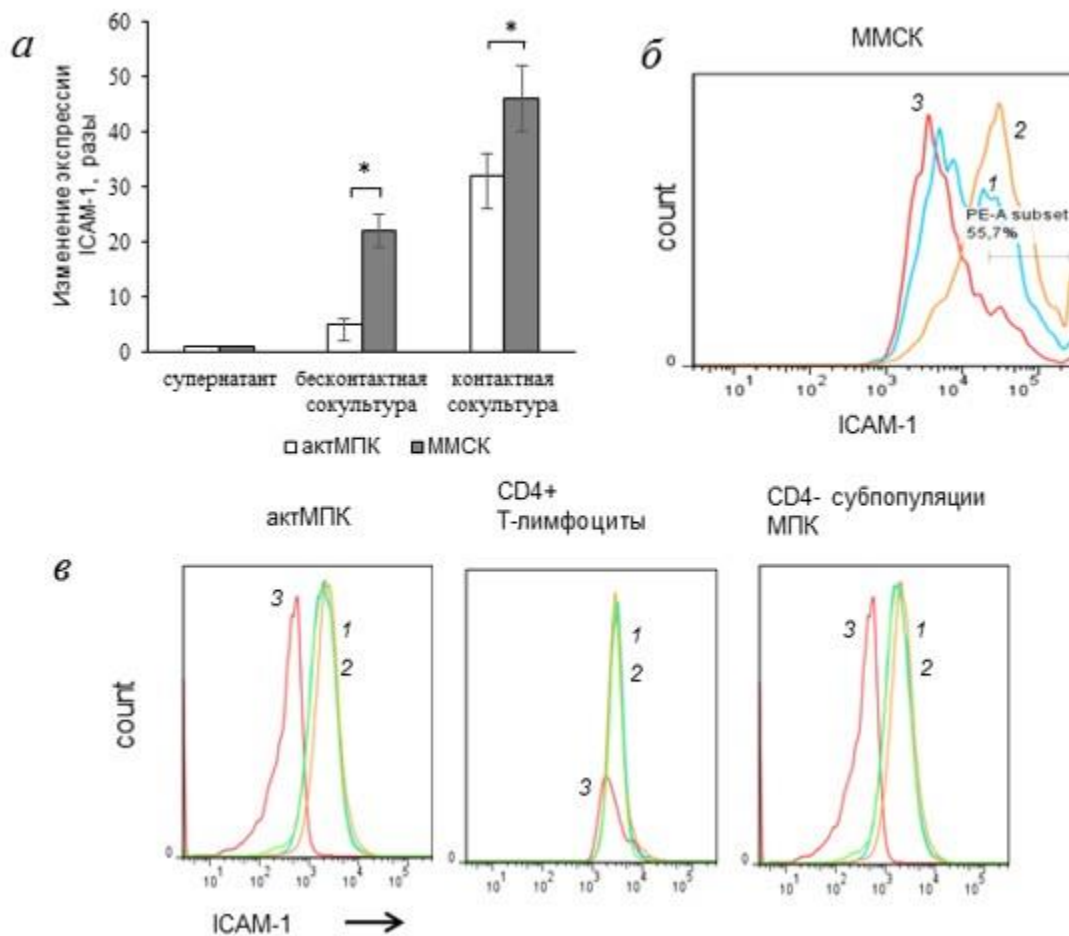


Рисунок 3.42. Изменение уровня экспрессии ICAM-1 в ММСК и актМПК при их совместном культивировании. *а* – относительные изменения уровня экспрессии гена ICAM-1 в ММСК и актМПК; представлены средние величины и их ошибки из 3 независимых экспериментов (* $P < 0.05$). *б* -- поверхностный маркер ICAM-1 на ММСК при их бесконтактном (кривая 1) и контактном (кривая 2) сокультивировании с актМПК; кривая 3 -- изотипический контроль. *в* -- поверхностный маркер ICAM-1, экспрессируемый актМПК и МПК-субпопуляциями CD4⁺ и CD4⁻: обозначения кривых те же, что на рисунке, *б*.

Другие молекулы, экспрессирующиеся на поверхности $CD4^+$ Т-лимфоцитов, также могут участвовать в процессе установления межклеточных контактов с ММСК. Мы показали, что при сокультивировании с актМПК в ММСК индуцируется синтез костимуляторных молекул CD80/CD86 и молекулы HLA-DR, характерных для дендритных клеток (рисунок 3.43). Следовательно, среди потенциальных молекул, участвующих в образовании межклеточных контактов, могут быть костимуляторные молекулы HLA-DR, CD80/CD86 с одной стороны, и Т-клеточные рецепторы (TCR), CTLA4/CD28 – с другой.

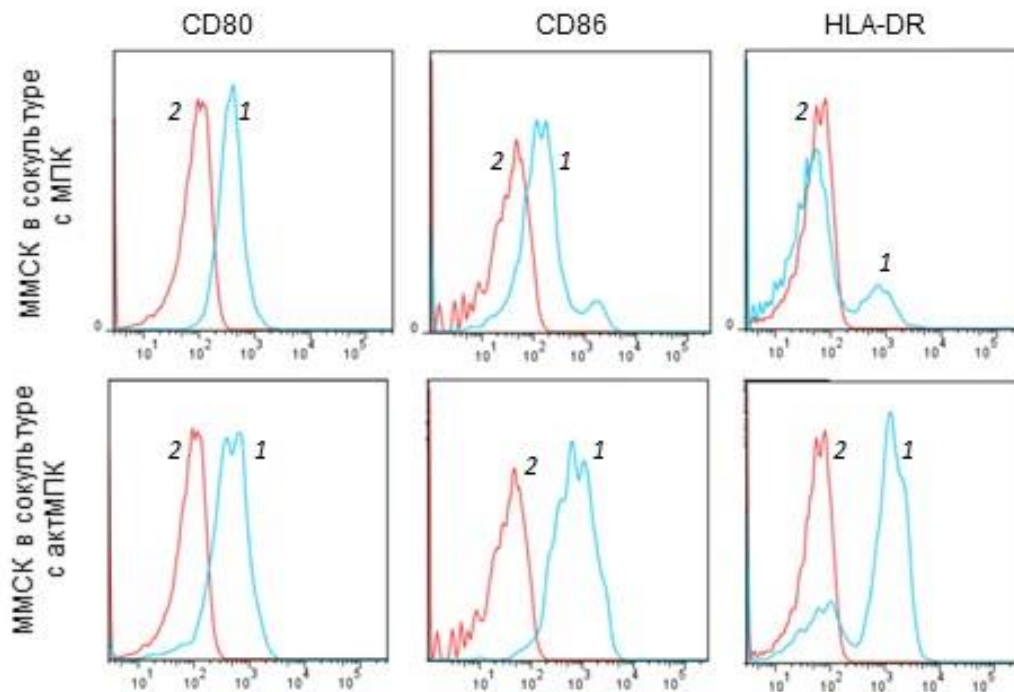


Рисунок 3.43. Экспрессии поверхностных костимуляторных молекул CD80/CD86 и HLA-DR в ММСК жировой (кривые 1) ткани при сокультивировании с интактными МПК и актМПК в течение 48 ч. Проточная цитометрия. 2 -- изотипический контроль.

Таким образом, было показано, что межклеточные контакты между ММСК и $CD4^+$ Т-лимфоцитами могут устанавливаться через взаимодействие двух рецепторных пар: CD80/CD86 и ICAM-1 на поверхности ММСК с их контррецепторами CTLA4/CD28 и LFA1 на поверхности $CD4^+$ Т-лимфоцитов.

3.2.12. Сокультивирование ММСК и актМПК усиливает синтез IFN- γ

Для того чтобы установить вероятную роль межклеточных контактов в индукции синтеза IFN- γ , проводили анализ содержания IFN- γ в супернатанте культур и сокультур ММСК и актМПК после 48 ч сокультивирования в соотношении 1:25. Проведенные эксперименты показали, что в стандартных условиях отдельные культуры ММСК и актМПК продуцировали незначительное количество IFN- γ (рисунок 3.44). Сокультивирование ММСК и актМПК в контактных условиях приводило к значительному увеличению концентрации IFN- γ в супернатанте. Изменение концентрации IFN- γ в супернатанте бесконтактных сокультур не было статистически достоверным (Suzdaltseva Y. G. et al., 2018).

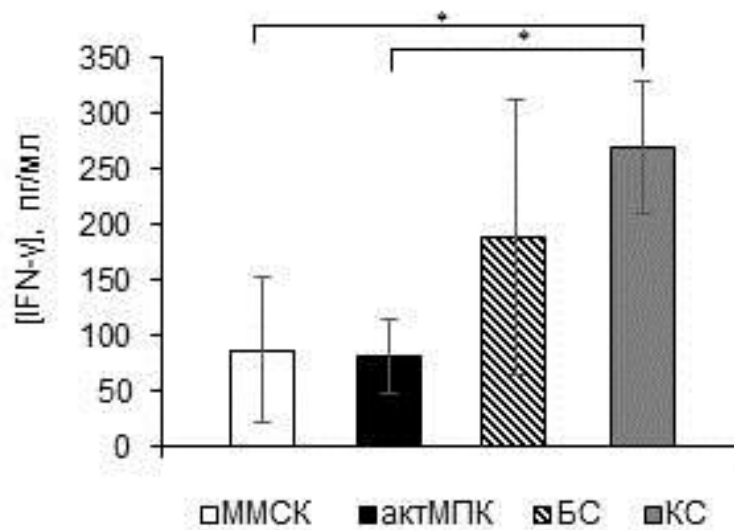


Рисунок 3.44. Концентрации IFN- γ в супернатантах актМПК и ММСК при отдельном и бесконтактном (БК) и контактном (КС) сокультивировании. Представлены средние величины и их ошибки из 6 независимых экспериментов (* $P < 0.05$).

Таким образом, было показано, что присутствие ММСК в сокультуре приводит к усилению синтеза IFN- γ актМПК.

3.2.13. Особенности индукции синтеза IDO в ММСК при сокультивировании с актМПК в присутствии межклеточных контактов

Для установления вероятной роли межклеточных контактов в индукции синтеза IDO анализировали содержание мРНК этого фермента в ММСК при контактном и бесконтактном сокультивировании с актМПК. Было установлено, что ММСК не экспрессирует IDO конститутивно. Сокультивирование ММСК с актМПК приводит к индукции синтеза IDO в ММСК. Уровень мРНК IDO в ММСК был значительно повышен при контактном сокультивировании с актМПК при соотношении 1:25. При этом соотношении подавление пролиферации актМПК в присутствии ММСК было максимальным. Существенно более низкий уровень экспрессии IDO обнаружен в ММСК, сокультивированных с актМПК в бесконтактных условиях (рисунок 3.45).

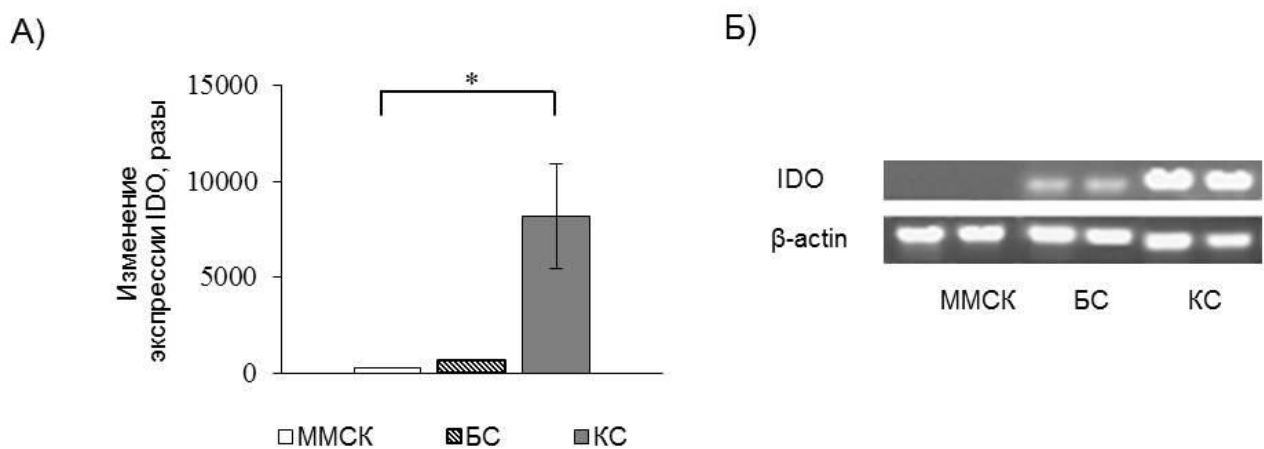


Рисунок 3.45. Изменение экспрессии гена фермента IDO в ММСК жировой ткани при бесконтактном (BC) и контактном (KC) сокультивировании с актМПК. ПЦР в реальном времени. А) – относительные изменения экспрессии, представлены средние величины и их ошибки из 3 независимых экспериментов (* $P < 0.05$); Б) - репрезентативная электрофореграмма продуктов ПЦР.

Тот факт, что уровень синтеза IDO в ММСК при сокультивировании с актМПК существенно выше в контактных условиях, чем в бесконтактных, указывает на то, что межклеточные взаимодействия играют существенную роль в индукции этого фермента в ММСК (Suzdaltseva Y. G. et al., 2018).

3.2.14. Блокирование экспонированной на поверхности ММСК молекулы ICAM-1 специфическими антителами не влияет на уровень экспрессии IDO в ММСК

Для того, чтобы проверить, участвует ли ICAM-1 в индукции экспрессии IDO в ММСК и косвенно в регуляции подавления пролиферации актМПК, мы заблокировали ICAM-1, экспрессированный на поверхности ММСК и актМПК с помощью специфических антител. Однако, было обнаружено, что антителопосредованное блокирование ICAM-1 не влияет на уровень IDO в ММСК при сокультивировании с актМПК как на транскрипционном, так и на белковом уровнях (рисунок 3.46).

Следовательно, установление контактов между ММСК и Т-лимфоцитами CD4⁺ через ICAM-1 играет опосредованную роль в индукции синтеза и функциональной активности IDO в ММСК. Соответственно, решающее значение в проявлении этого эффекта имеет образование межклеточных контактов между костимуляторными молекулами CD80/CD86 и HLA-DR на поверхности ММСК и Т-клеточными рецепторами (TCR), CTLA4/CD28 (Rubtsov Y. et al., 2017).

Таким образом, в экспериментах *in vitro* была показана способность ММСК модулировать цитокиновое микроокружение, а также оказывать иммуносупрессивное действие на активированные иммунокомпетентные клетки, проявляющееся в подавлении их пролиферации при контактном и бесконтактном взаимодействии. Одним из основных механизмов иммуносупрессии, проявляемой ММСК при взаимодействии с актМПК, является индукция синтеза IDO в ММСК, вызываемая воздействием IFN- γ , а также взаимодействием молекул CD80/CD86 и

HLA-DR на поверхности ММСК и Т-клеточными рецепторами CTLA4/CD28, которые действуют синергично и образуют положительную регуляторную петлю.

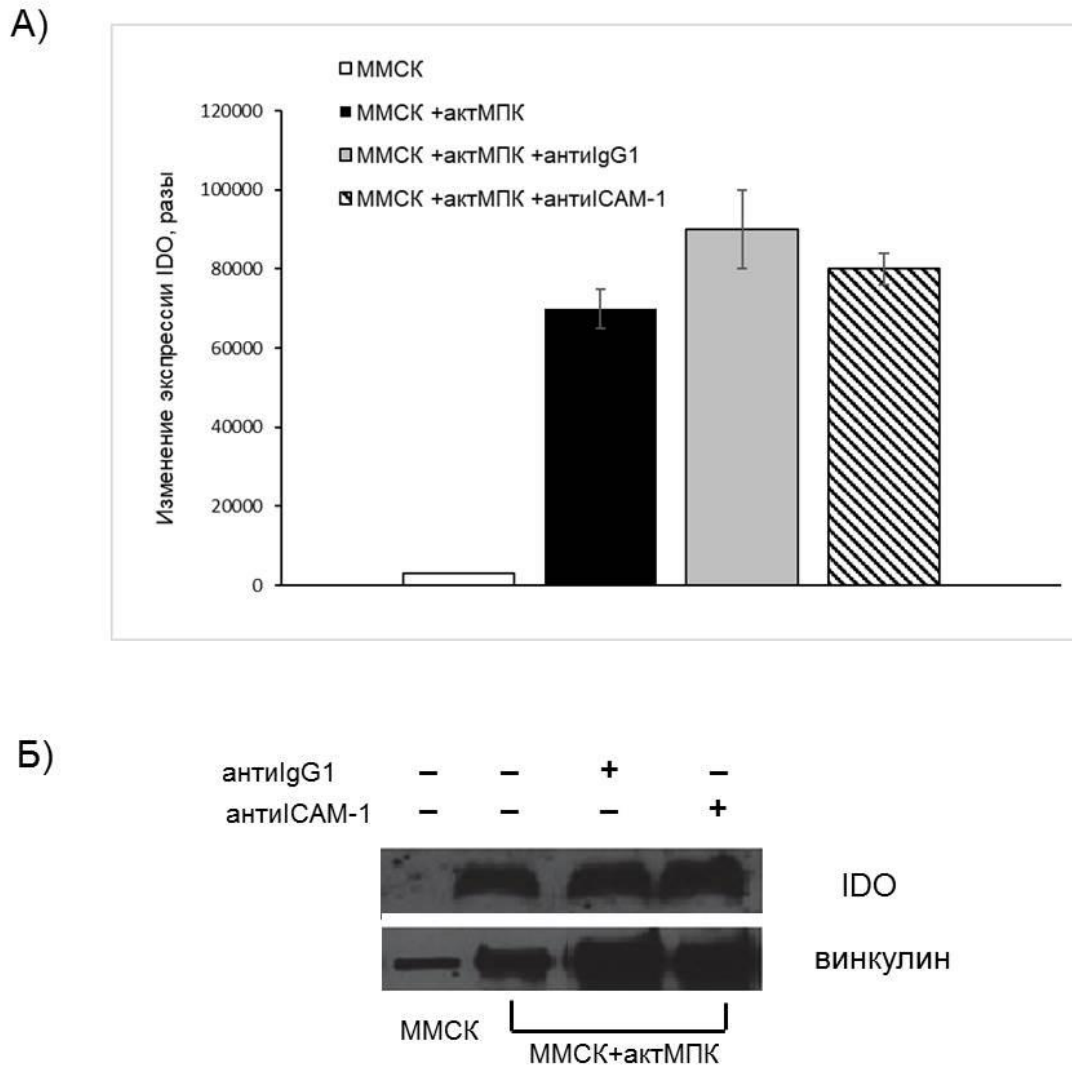


Рисунок 3.46. Блокирование ICAM-1 антителами не приводит к изменению экспрессии фермента IDO в ММСК жировой ткани при совместном контактном культивировании с актМПК. А) – относительные изменения экспрессии. ПЦР в реальном времени. Представлены средние величины и их ошибки из 3 независимых экспериментов; Б) – Уровень протеина IDO в ММСК при сокультивировании с актМПК в соотношении 1:25. Иммуноблоттинг.

3.3. Разработка стандартов изготовления препарата ММСК в форме суспензии

Способность ММСК оказывать терапевтический эффект в очаге воспаления была проверена в доклинических исследованиях на моделях поверхностных ран крыс и в клинических исследованиях на пациентах с хроническими ранами. Для этого был разработан препарат ММСК в форме суспензии.

Мы предложили использовать для этих целей ММСК пуповины новорожденного, которые обладают рядом преимуществ перед ММСК, выделенными из других источников. Эти преимущества обуславливаются доступностью материала для выделения ММСК, неинвазивностью процедуры забора, возможностью стандартизации процедур, усиленной пролиферацией и замедленным старением ММСК пуповины в культуре, а также более высоким содержанием прогениторных клеток, экспрессирующих нестин и c-kit.

Изготовление препаратов на основе ММСК включает в себя ряд процедур: выделение клеток из биопсии, культивирование *in vitro*, контроль жизнеспособности, исследование параметров на соответствие критериям ISCT, долговременная криоконсервация, наращивание необходимого количества клеток. Эти процедуры описаны в предыдущих разделах.

Перед проведением доклинических и клинических испытаний проводили подготовку препарата ММСК для введения животным и пациентам.

Для подготовки препарата монослой ММСК пуповины (после 3-5 пассажей *in vitro*) переводили в суспензию путем ферментативной обработки, которую затем трижды промывали стерильным физиологическим раствором. Клетки осаждали центрифугированием. Осадок ресуспендировали в стерильном физиологическом растворе до концентрации 1 - 5 млн кл/мл, получая суспензию клеток. С помощью окраски 1% р-ром трипанового и подсчета клеток в счетчике TC20 (Bio-Rad, США) определяли процент жизнеспособных ММСК в препарате. Проводили также тест на метаболическую активность полученных препаратов ММСК с МТТ-формазаном.

Было установлено, что процент ММСК, сохраняющих жизнеспособность, при хранении в суспензии физиологическом растворе при концентрации 1 млн кл/мл в течение 1 ч при температуре +4°C составляет 95-97%.

Одним из обязательных элементов стандартизации препаратов ММСК при подготовке к клиническим испытаниям является оценка медицинской безопасности. В рамках исследования медицинской безопасности методом ПЦР был проведен скрининг ММСК на наличие инфекционных агентов: РНК вируса гепатита С, ДНК вируса гепатита В, ДНК вирусов простого герпеса 1-2 типов, ДНК цитомегаловируса, ДНК вируса Эпштейна-Барр, ДНК токсоплазмы, ДНК уреоплазмы, ДНК хламидий, ДНК микоплазмы. С помощью микробиологических тестов была проведена проверка препаратов ММСК на стерильность в отношении бактерий и грибов. Также были проведены цитогенетические тесты на отсутствие клеток с хромосомными аномалиями.

Таким образом, были предложены и разработаны технологические процедуры получения и контроля качества препаратов ММСК пуповины в форме суспензии (Burunova V.V. et al., 2008).

3.4. Клинические исследования безопасности и эффективности препарата ММСК пуповины в форме суспензии в терапии длительно незаживающих ран

Были проведены клинические исследования безопасности и эффективности препарата ММСК пуповины новорожденного в форме суспензии, предложенного в качестве средства для стимуляции регенеративных процессов в хронических ранах (см. раздел 3.3).

Перед проведением клинических исследований с участием человека были проведены необходимые доклинические исследования безопасности и эффективности препарата ММСК пуповины в форме суспензии на животных на базе аккредитованных центров доклинических исследований РНИМУ им. Н.И. Пирогова и ФГБОУ ВО Курского государственного медицинского университета Минздрава России в соответствии с международными и российскими нормами.

Программа токсикологического исследования включала изучение токсичности и переносимости препарата при однократном введении лабораторным животным, изучение потенциальных мутагенных, эмбриотоксических, тератогенных и иммунотоксических свойств препарата, а также исследовано влияние на репродуктивную функцию. Во всех проведенных экспериментах отмечалось, что введение препарата ММСК в форме суспензии не вызывало у подопытных животных интоксикацию и гибель, не оказывало мутагенного, иммунотоксического, эмбриотоксического и тератогенного действия, и не влияло на репродуктивные функции. В доклинических экспериментах по оценке влияния препарата ММСК на заживление полнослойных кожных ран у крыс пострепродуктивного периода было установлено его положительное влияние на динамику изменения площадей ран, подтверждаемых данными гистологического исследования срезов ран, в которых было установлено увеличение длины и количества слоев новообразованного эпидермиса (от краев раны к центру) в опытной группе по сравнению с

контрольной (Silina E.V. et al., 2021, Silina E. et al., 2021). Было установлено также отсутствие аберрантных процессов при заживлении ран после введения ММСК.

На основании результатов проведенных доклинических исследований было сделано заключение о безопасности и эффективности препарата ММСК в форме суспензии при введении в организм животных и возможности использования его в клинических исследованиях с участием человека.

На следующем этапе были проведены клинические исследования безопасности и эффективности препарата ММСК пуповины у пациентов с длительно незаживающими ранами.

Длительно незаживающие раны (хронические раны, трофические язвы) – раны с нарушенным процессом репарации, существующие более четырех недель без признаков активного заживления. Причинами образования длительно незаживающих ран, как правило, являются повторяющаяся травма, нейропатия, хроническая венозная и артериальная недостаточность нижних конечностей, системные заболевания соединительной ткани, наличие хронической персистирующей местной инфекции и др. К хроническим ранам относятся трофические язвы различной этиологии, пролежни, поражения стоп при сахарном диабете - синдром диабетической стопы (СДС) и т.п. Лечение хронических ран представляет крайне сложную клиническую проблему и требует устранения повреждающих факторов, улучшения регионарного венозного и артериального кровообращения. В настоящий момент наибольшие перспективы в лечении хронических язв связаны с использованием препаратов, содержащих живые ММСК человека.

В соответствии с действующими на тот период времени законодательством (законом «Об охране здоровья населения Российской Федерации», законом «О трансплантации органов и тканей человека», приказом МЗ РФ от 29.08.2001 № 345 "О создании Экспертного Совета по рассмотрению научных исследований в области развития клеточных технологий и внедрению их в практическое здравоохранение", «Временной инструкцией о порядке исследований в области клеточных технологий и их использования в учреждениях здравоохранения» от

18.04.2002 (существовала до 2008 г.), приказом № 325 МЗ РФ «О развитии клеточных технологий в Российской Федерации» от 25.07.2003, Государственным реестром новых медицинских технологий, отраслевой программой РАМН от 29 мая 2002 года "Новые клеточные технологии - медицине", методическими указаниями по работе с медицинскими препаратами МУК 4.1/4.2.588-96 «Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям» от 31.10.1996) в 2006 г. этическим комитетом ГОУ ВПО Российского национального исследовательского медицинского университета им. Пирогова было выдано разрешение на проведение ограниченных клинических исследований безопасности и эффективности применения суспензии ММСК пуповины для лечения длительно незаживающих ран, которые были выполнены на базе кафедры госпитальной хирургии № 1 лечебного факультета РНИМУ в отделении гнойной хирургии городской клинической больницы №15 им. О.М. Филатова.кафедре госпитальной хирургии.

3.4.1. Оценка безопасности клеточной терапии на здоровых добровольцах

В первой фазе клинических исследований оценивали безопасность использования суспензии ММСК пуповины у 30 здоровых (по критериям ВОЗ) добровольцев 30-60 лет. Добровольцам однократно интрадермально вводили 5,0 мл суспензии МСК пуповины в стерильном физиологическом растворе в концентрации 4 млн кл/мл. Оценивали безопасность процедуры и возникновение осложнений в день первого введения и далее через 2 недели, 1 и 3 месяца. На всех сроках наблюдения ни у одного пациента не было отмечено появления нежелательных реакций как местного, так и системного характера (Suzdaltseva Y. et al., 2020).

3.4.2. ММСК модулируют процессы восстановления тканей в условиях хронического воспаления

Способность ММСК инициировать процессы восстановления тканей в условиях хронического воспаления была исследована на примере больных с длительно незаживающими ранами (Suzdaltseva Y. et al., 2020). Клинические исследования были проведены по протоколу открытого пилотного исследования эффективности и безопасности клеточной терапии ММСК, утвержденного в этическом комитете РГМУ им. Пирогова. Исследование проведено в период с 2006 – 2007 гг., на базе кафедры госпитальной хирургии № 1 лечебного факультета РНИМУ им. Н.И. Пирогова в отделении гнойной хирургии городской клинической больницы №15 им. О.М. Филатова.

В условиях нашего исследования всем пациентам оказывался весь спектр процедур, предусмотренных стандартами медицинской помощи. В исследование включались пациенты, у которых стандартная терапия в течение 4-х недель не приводила к положительной динамике заживления ран в соответствии со шкалой BWAT ((Bates-Jensen Wound Assessment Tool). Если в течение 4 недель у пациентов не отмечалась положительная динамика в соответствии со шкалой, их включали в исследования. Препарат ММСК назначался в дополнение к стандартной терапии.

В клинических исследованиях приняло участие 108 пациентов в соответствии с GCP (Good Clinical Practice), которые подписывали добровольное информированное согласие, из них 59 составили группу клеточной терапии и 49 группу плацебо согласно критериям включения и исключения (см. раздел Материалы и методы). Средний возраст составил около 60 лет (таблица 3.1).

Распределение больных по полу и возрасту в группе клеточной терапии и группе сравнения было сопоставимо и отражало структуру заболеваний, которые приводят к образованию длительно незаживающих язв и ран.

Таблица 3.1. Распределение больных по полу и возрасту.

		Группа плацебо	Группа клеточной терапии	Всего
Возраст (t-тест, p=0.211)	M±δ Me 25%/75% q	61.85±11.84 64 54/72	58.5±12.33 60 49/68	59.99±12.26 62 52/70
Пол (t-тест, p=0.701)	мужчины; n (%) женщины; n(%)	24 (49%) 25 (51%)	28 (47.5%) 31 (52.5%)	52(48.1%) 56 (51.9%)

M±δ – среднее и стандартное отклонение, Me – медиана, 25%/75% q – интерквартильный размах [25%; 75%]

Характер патологии включал 5 нозологических форм основного заболевания, явившегося причиной возникновения раны: хроническую венозную недостаточность (ХВН), хроническую артериальную недостаточность (ХАН), синдром диабетической стопы (СДС), пролежни и смешанную патологию (таблица 3.2). И в группе клеточной терапии, и в группе плацебо около половины больных страдали сахарным диабетом, преимущественно II типа, средней степени тяжести в стадии субкомпенсации.

Таблица 3.2. Распределение больных по основному заболеванию.

Характер основного заболевания	Группы больных			
	Группа плацебо		Группа клеточной терапии	
	абс.	%	абс.	%
ХВН	8	16,3	10	16,9
Хроническая ишемия нижних конечностей	4	8,2	5	8,5
СДС	15	30,6	18	30,5
Пролежни	1	2,1	3	5,1
Смешанная патология	21	42,9	23	39,0
Всего	49	100	59	100

В группе клеточной терапии и группе плацебо отмечалось равномерное распределение пациентов с вялогранулирующими ранами, трофическими язвами и СДС во 2 фазе раневого процесса (таблица 3.3). Раневые дефекты как в группе клеточной терапии, так и в группе сравнения, располагались на голени до 70 %, на стопе 15 %, на бедре 5 %, на крестце 5 %.

Таблица 3.3. Распределение больных по характеру раневых дефектов.

Характер основного заболевания	Группы больных			
	Группа плацебо		Группа клеточной терапии	
	абс.	%	абс.	%
Трофическая язва	18	36,7	21	35,6
СДС	15	30,6	18	30,5
Пролежни	1	2,1	3	5,1
Вялогранулирующи е раны	15	30,6	17	28,8
Всего	49	100	59	100

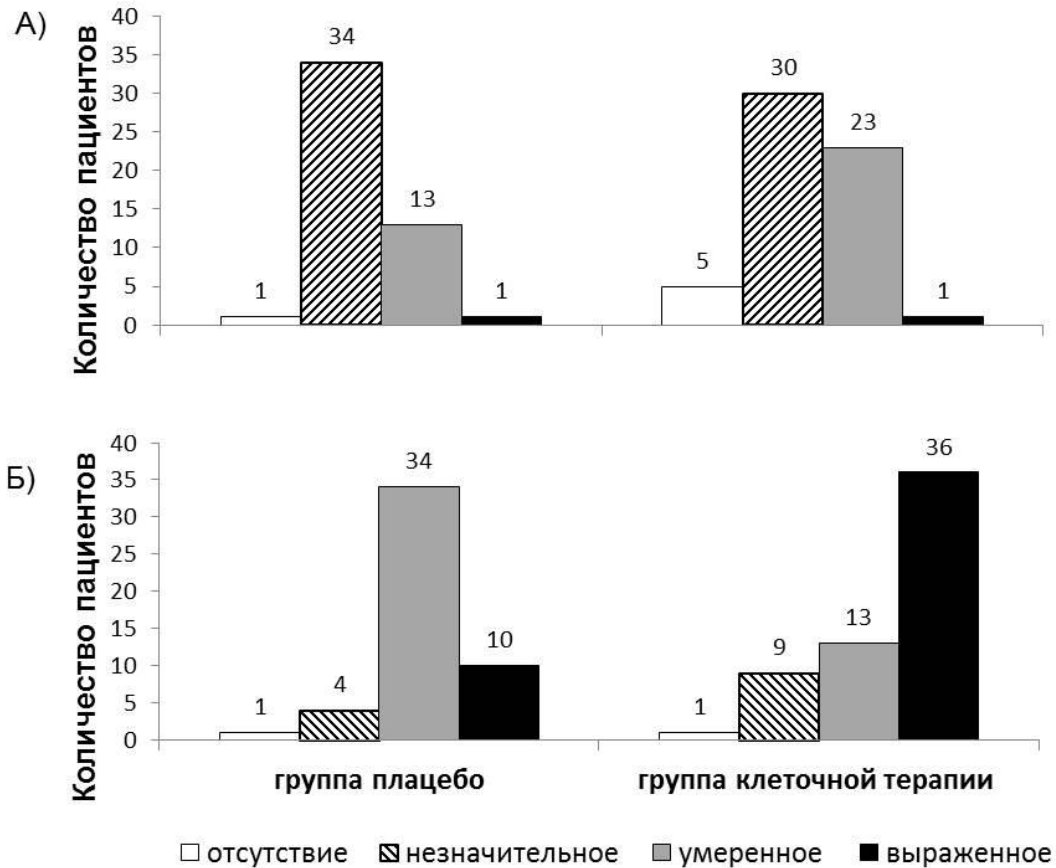
На момент включения в исследование пациентам из группы клеточной терапии и группы плацебо в течение 4-х недель проводилось стандартное лечение, включающее лекарственные (антиоксиданты, ангиопротекторы, адекватное обезболивание), оперативные и инструментальные методы. Пациентам из группы клеточной терапии дополнительно к стандартному лечению осуществляли введение суспензии ММСК пуповины в количестве 20 млн однократно интрадермально на глубину 3-5 мм по периферии раневой поверхности и в дно раневого дефекта, через каждые 10 мм вводили по 0,1 мл суспензии клеток.

Для оценки состояния больных и эффективности терапии ММСК использовали прямые показатели динамики раневого процесса, включающие планиметрическое обследование, измерение транскутанного напряжения кислорода и объемной скорости кровотока, качественную характеристику грануляционной ткани. Измерения проводили через 15 дней от начала проведения инъекций. Кроме того, были проведены: общее физикальное и лабораторное микробиологическое исследование раневого отделяемого и мягких тканей.

При бактериологическом исследовании на момент включения больных в исследование в ранах в основном преобладала грамположительная микрофлора: *Staph.aureus*, в том числе MRSA, в КОЕ 106-104, а также встречалась *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter sp.*, *Alcaligenes faecalis*, чаще в качестве микстинфекции. За время наблюдения в группе клеточной терапии и в группе плацебо значимого изменения спектра микрофлоры и увеличения микробной обсемененности выявлено не было.

Грануляционная ткань до начала лечения в группе плацебо и в группе клеточной терапии была незначительно или умеренно выражена. Цвет грануляций в обеих группах был бледно-розовым или розовым. Различия между группами по критерию Х2 не достоверны. После введения суспензии ММСК в группе клеточной терапии отмечали активный рост и созревание грануляционной ткани. Через 15 дней после начала лечения в группе клеточной терапии преобладали пациенты с

выраженными грануляциями, а в группе плацебо - умеренными. Статистические различия по критерию χ^2 между группами достоверны, $p = 0,00013$ (Рисунок 3.47).



В)



Г)



Рисунок 3.47. Качественная характеристика грануляционной ткани в группе сравнения и группе клеточной терапии. А) – в начале наблюдения, Б) – через 15 дней. В) – репрезентативный пример динамики роста и созревания грануляционной ткани у пациента из группы клеточной терапии. Г) – аутодермопластика раны расщепленным кожным лоскутом у этого же пациента. Звездочка показывает достоверность отличий, критерий χ^2 , д – дни после инъекции суспензии ММСК.

До начала лечения средняя площадь ран группы плацебо и группы клеточной терапии была сопоставима и составила $Me = 31,15 [19,29-41,95] \text{ см}^2$ и $Me = 28,5 [17,5-39,7] \text{ см}^2$ соответственно. Различия между группами были статистически недостоверны (U-тест, $p=0,911640$). После проведенного лечения на 15 сутки изменения площадей раневой поверхности в абсолютном выражении, по сравнению с начальным наблюдением, в группе плацебо составило $Me=0,73 [-5,9-2,1] \text{ см}^2$, а в группе клеточной терапии - $Me=5,00 [6,07-11,8] \text{ см}^2$ (U-тест, $p < 0,05$). Через четыре недели после лечения площадь ран в группе клеточной терапии составила $Me = 15,75 [5,33 - 26,19] \text{ см}^2$, а в группе плацебо - $Me = 27,60 [17,6 - 35,84] \text{ см}^2$. Различия между группами были статистически значимыми (U-тест, $p < 0,01$) (рисунок 3.48, а). Скорость заживления ран в двух группах также значительно отличались. В группе клеточной терапии в течении первых 14 дней скорость заживления ран составила $2,19 \pm 1,58\%$ в день и $0,73 \pm 1,2\%$ в день в группе плацебо (U-тест, $p < 0,01$). Уменьшение площади ран происходило как в результате краевой эпителизации (рисунок 3.48, б), так и за счет контракции (рисунок 3.48, в). Пациентам с обширными ранами проводили аутодермопластику расщепленным лоскутом.

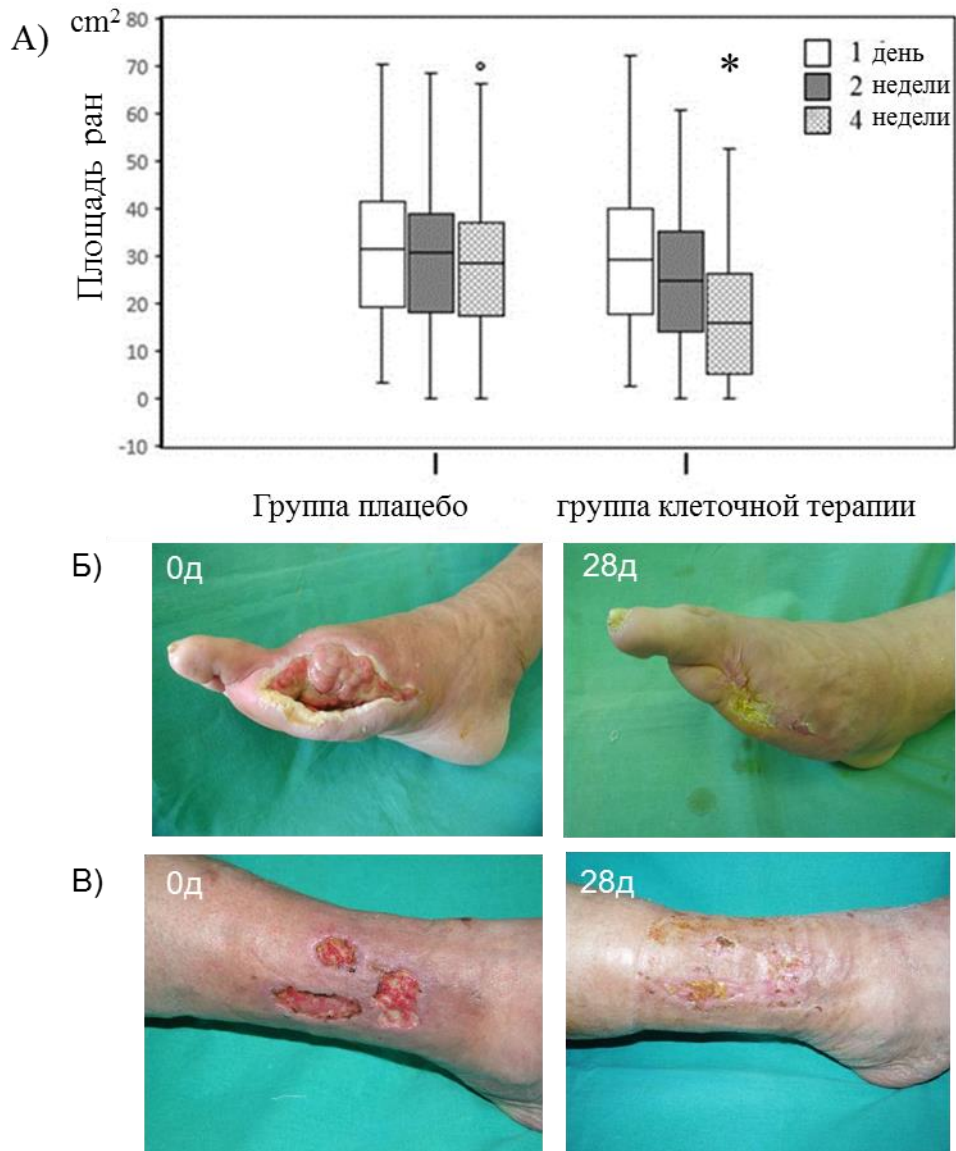


Рисунок 3.48. Динамика изменения площади ран у пациентов. А)- площади ран группы плацебо и группы клеточной терапии. Данные представлены как медиана, верхний и нижний квартили, максимальное и минимальное значение. Звездочка показывает достоверность отличий, U-тест, $p < 0,05$). Символ «o» обозначает выброс из выборки данных. Б) – Динамика изменения площади ран у пациента группы клеточной терапии с СДС. В) - Динамика изменения площади ран у пациента группы клеточной терапии с многоуровневым поражением артерий мелкого калибра. д – дни после инъекции суспензии ММСК.

Оценка уровня микроциркуляции крови в области хронических ран с помощью транскутанного измерения кислорода тканей (рисунок 3.49) показала, что в группе плацебо уровень парциального давления кислорода в перифокальной

зоне и зоне раневого дефекта изменялся незначительно. В группе клеточной терапии отмечали улучшение кровоснабжения, выражающегося в повышении базального уровня $TcPO_2$ по сравнению с начальными наблюдениями на 30 % (различия по критерию t достоверны, $p < 0,05$).

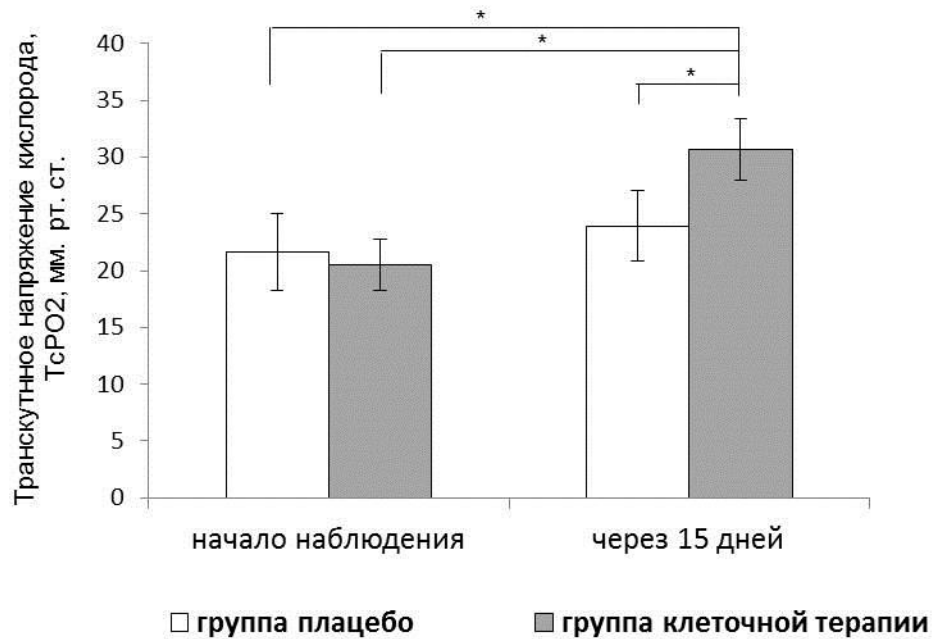


Рисунок 3.49. Динамика изменения уровня микроциркуляции крови в области хронических ран у пациентов группы плацебо и группы клеточной терапии. Показаны средние величины и их ошибки измерений базального уровня $TcPO_2$. Звездочка показывает достоверность отличий при $p < 0.05$, t -тест.

После проведенной терапии показатели базального уровня артериального систолического давления большеберцовой артерии, измеряемого с помощью ЛДФ, изменялись незначительно в контрольной группе сравнения. В группе клеточной терапии объемная скорость кровотока увеличивалась в 1,84 раза по сравнению с начальными наблюдениями (рисунок 3.50).

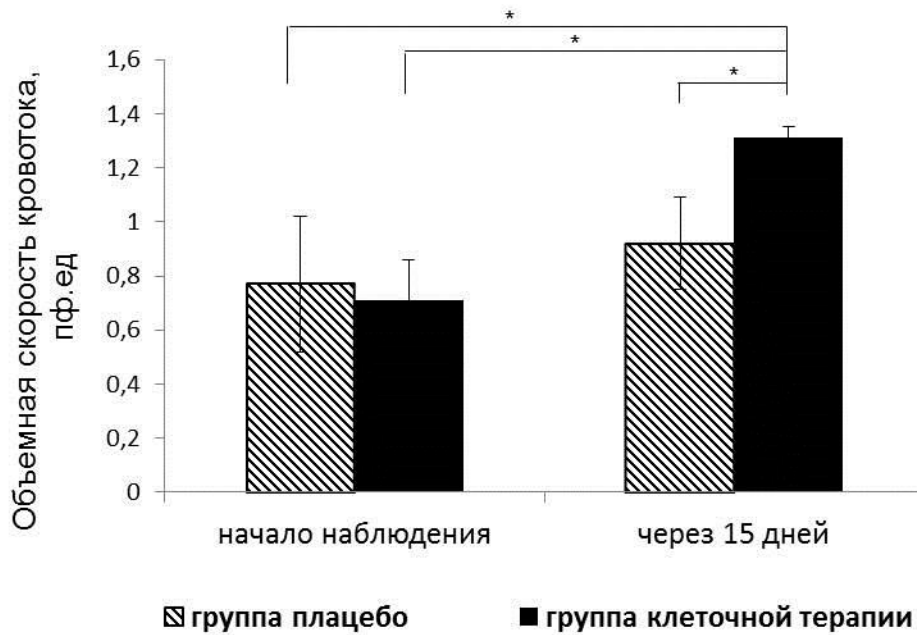


Рисунок 3.50. Динамика изменения показателей базального уровня артериального систолического давления большеберцовой артерии у пациентов группы плацебо и группы клеточной терапии. Показаны средние величины и их ошибки измерений объемной скорости кровотока. Звездочка показывает достоверность отличий при $UMW < 0.05$.

Через четыре недели после лечения значительное улучшение (полное закрытие раны или уменьшение размера раны более 90% от начального значения) достигнуто в 17 случаев (15,7% от общего числа пациентов, включенных в исследование), в том числе 13 случаев (22%) в группе клеточной терапии и 4 случая (8,2%) в группе плацебо. Умеренное улучшение (уменьшение размера раны менее 90%, но более 25% от исходного значения) обнаружено в 70 случаях (64,8% от общего числа пациентов), в том числе 41 случай (69,5%) в группе клеточной терапии и 29 случаев (59,2%) в группе плацебо. Отрицательные исходы (увеличение размера раны по сравнению с исходным значением) или незначительное улучшение (уменьшение размера раны менее 25% от начального значения) наблюдалось в 21 случае (19,4% от общего числа включенных пациентов), в том числе 5 (8,5%) случаев в группе клеточной терапии и 16 случаев (32,6%) в группе плацебо (таблица 3.4).

Таблица 3.4. Состояние ран у пациентов через 4 недели после лечения (χ^2 -тест, $p < 0,05$).

Состояние раны		Группа плацебо	Группа клеточной терапии	Всего
Полное закрытие раны или значительное улучшение	Пациентов в группе % в группе % в подкатегории	4 8,2% 23,5%	13 22% 76,5%	17 15,7% 100%
Умеренное улучшение	Пациентов в группе % в группе % в подкатегории	29 59,2% 41,4%	41 69,5% 56,6%	70 64,8% 100%
Отрицательные результаты или незначительное улучшение	Пациентов в группе % в группе % в подкатегории	16 32,6% 76,2%	5 8,5% 23,8%	21 19,5% 100%

Отдаленные результаты у больных группы клеточной терапии были прослежены в сроки от 1 до 2 лет. В отдаленном периоде до 2 лет после проведения клеточной терапии у пациентов новых, клинически значимых, заболеваний, в том числе новообразований, выявлено не было. При анализе результатов в группе клеточной терапии было выявлено, что у 38 пациентов (в 65% случаев) раны полностью зажили, и рецидивов у этих пациентов не было, у 15 пациентов (в 25% случаев) раны значительно уменьшились в размерах, у 2 пациентов (в 3% случаев) размер раневого дефекта остался без изменений.

Результаты проведенных исследований продемонстрировали, что введение ММСК пуповины пациентам с длительно незаживающими ранами дополнительно к стандартному лечению приводило к активизации регенеративных процессов в хроническом раневом дефекте и, следовательно, к ускорению заживления ран. Введение ММСК вызывало активный рост и созревание грануляционной ткани, которая создает благоприятное микроокружение для реэпителизации раны или проведения аутодермопластики расщепленным лоскутом. Введение ММСК вызывало улучшение кровоснабжения в раневом дефекте, выражающемся в улучшении микроциркуляции крови и повышении парциального давления

кислорода. Естественное заживление хронических ран происходило как за счет контракции, так и за счет эпителизации раневых поверхностей.

Анализ отдаленных результатов у больных, прошедших курс клеточной терапии, показал, что у пациентов новых, клинически значимых заболеваний, в том числе новообразований, выявлено не было. В большинстве случаев применение клеточной терапии привело к значительному уменьшению площади ран или полному заживлению ран без рецидивов.

Таким образом, в I фазе клинических испытаний безопасности клеточной терапии с участием здоровых добровольцев было установлено, что подкожные инъекции суспензии ММСК пуповины не приводили к появлению нежелательных реакций местного и системного характера. Следовательно, суспензия ММСК пуповины является безопасным материалом для терапии длительно незаживающих ран.

Во II фазе клинических испытаний суспензия ММСК пуповины была использована для дополнительной терапии к стандартному лечению длительно незаживающих ран. Локальное введение ММСК пуповины приводило к активизации регенеративных процессов в раневом дефекте: выраженному росту грануляционной ткани, улучшению микроциркуляции крови в ране, ускорению контракции и эпителизации ран в группе клеточной терапии по сравнению с группой плацебо. В случае обширных ран образовавшаяся грануляционная ткань позволяла выполнить дермопластику расщепленным лоскутом.

Проведенные ограниченные клинические исследования показали, что применение суспензии ММСК пуповины для терапии длительно незаживающих ран является эффективным и безопасным методом и служит обоснованием получения новых клеточных препаратов для практического здравоохранения.

По результатам испытаний препарата ММСК пуповины было выдано регистрационное удостоверение № ФС-2006/341 Росздравнадзора от 04.12.2006 на медицинскую технологию: клеточный материал из пуповины человека получение, культивирование, хранение и транспортировка (приложение А).

3.5. Разработка клеточных моделей для изучения молекулярных механизмов регенерации тканей, соответствующих разным стадиям развития организма человека

В доклинических и клинических исследованиях было показано, что ММСК способствуют стимуляции регенеративных процессов в раневом дефекте и ускорению заживления ран.

У пациентов с длительно незаживающими ранами было показано также, что ММСК обеспечивают смещение хронического воспалительного процесса в сторону успешного заживления. В редких случаях восстановление незаживающих раневых дефектов приводило к реэрителизации, однако в большинстве случаев заживление хронических ран приводило к контракции и формированию рубцовой ткани (фиброзу).

ММСК способны стимулировать процессы регенерации, однако не способствуют полноценному восстановлению исходной структуры тканей и органов, измененных в результате повреждения. В то же время, известно, что до третьего триместра беременности заживление поврежденных фетальных тканей происходит в условиях сниженного воспалительного процесса с полным восстановлением архитектуры, организации и функциональных свойств. Однако в настоящий момент практически остается неизвестным определяется ли полноценная регенерация фетальных тканей свойствами клеток мезодермального происхождения.

Развитие клеточных технологий позволяет осуществлять принципиально новые подходы к преодолению проблем, связанных с возрастным снижением способности ткани к регенерации. Разработка методов репрограммирования дифференцированных соматических клеток человека факторами Oct3/4, Sox2, Klf4, and c-Myc в плюрипотентное состояние, сходное с ЭСК предоставляет возможность создания моделей для изучения молекулярных механизмов регенерации на ранних стадиях развития организма.

В рамках данного исследования мы предприняли ряд пилотных экспериментов для выяснения возможности получения в результате дифференциации из ИПСК клеток параксиальной мезодермы эмбриона человека, и зрелых ММСК из одного источника.

3.5.1. Получение клеток с индуцированной плюрипотентностью

Для получения ИПСК культивируемые ММСК из биоптата кожи человека были репрограммированы факторами Oct3/4, Sox2, Klf4, and c-Myc с использованием эквивалентного количества рекомбинантных вирусов Сендая в плюрипотентное состояние, сходное с эмбриональными клетками. Затем воздействием комбинаций ингибитора Rhoкиназы, активина А, факторов роста bFGF и BMP-4, биологически активных низкомолекулярных соединений LY294002 и SHIR99021 в полученных ИПСК была индуцирована дифференцировка в клетки параксиальной мезодермы. Далее, посредством культивирования в стандартной среде, содержащей эмбриональную сыворотку телят, клетки параксиальной мезодермы были дифференцированы в ММСК. Морфологические изменения клеток при репрограммировании ММСК в ИПСК и дифференцировке ИПСК в мезодермальном направлении представлены на рисунок 3.51.

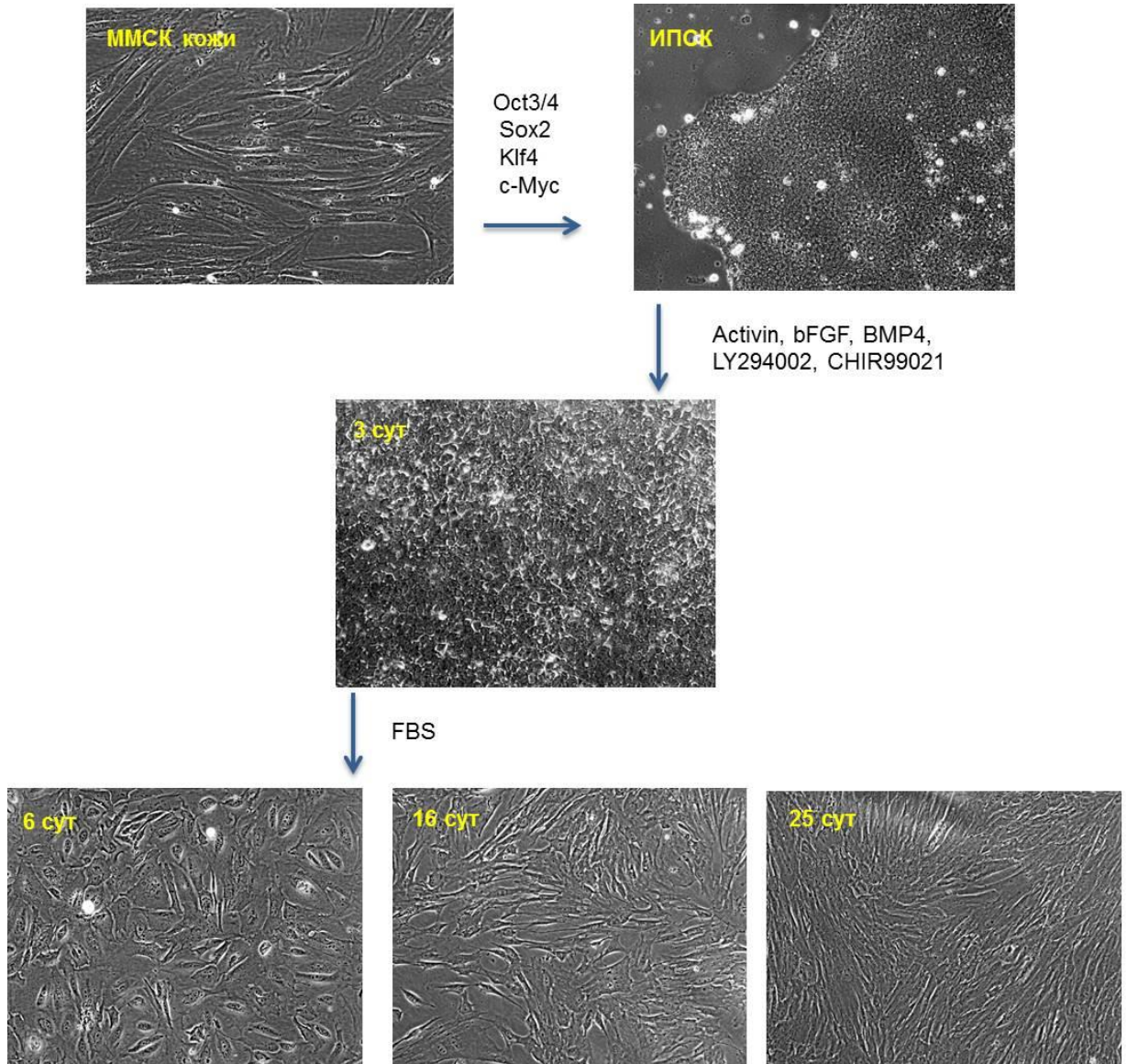


Рисунок 3.51. Морфологические изменения клеток при репрограммировании ММСК в ИПСК и дифференцировке ИПСК в мезодермальном направлении.

Полученные ИПСК были охарактеризованы по морфологии, поверхностным антигенам (SSEA4, TRA-1-60/81), экспрессии транскрипционных факторов (OCT4, NANOG, SOX2) и способности в процессе дифференцировки in

vitro экспрессировать маркеры эктодермы (PAX6, SOX1), энтодермы (CXCR4 и SOX17) и мезодермы (RUNX1, BRY) (рисунок 3.52).

Полученные колонии ИПСК были плоские, имели ровный край. Клетки внутри колонии были связаны плотными контактами. Для полученных ИПСК было характерно высокое ядерно-цитоплазматическое отношение, т.е. крупное ядро и небольшой объем цитоплазмы (рисунок 3.52, а). Полученные ИПСК характеризовались высоким уровнем экспрессии протеогликана TRA-1-60 и гликолипида SSEA-4 (рис 3.52, в), а также транскрипционных факторов, необходимых для поддержания плюрипотентности Oct4, Nanog и Sox2 (рисунок 3.52, б, в).

Для подтверждения плюрипотентности клеток полученных клонов ИПСК был использован тест на формирование клетками эмбрионных тел с их последующей дифференцировкой в клетки трех зародышевых листков. В результате спонтанной дифференцировки образовывались клетки различной морфологии. В культуре спонтанно дифференцировавшихся ИПСК присутствовали клетки, положительно окрашивающиеся на маркеры эктодермы (β -III-тубулин), мезодермы (α -sma, гладкомышечный актин) и энтодермы (α -фетопроtein, AFP) (рисунок 3.52, г).

Таким образом, полученные в результате репрограммирования ММСК плюрипотентные клетки соответствовали критериям, принятым для ИПСК (Takahashi K. et al., 2007).

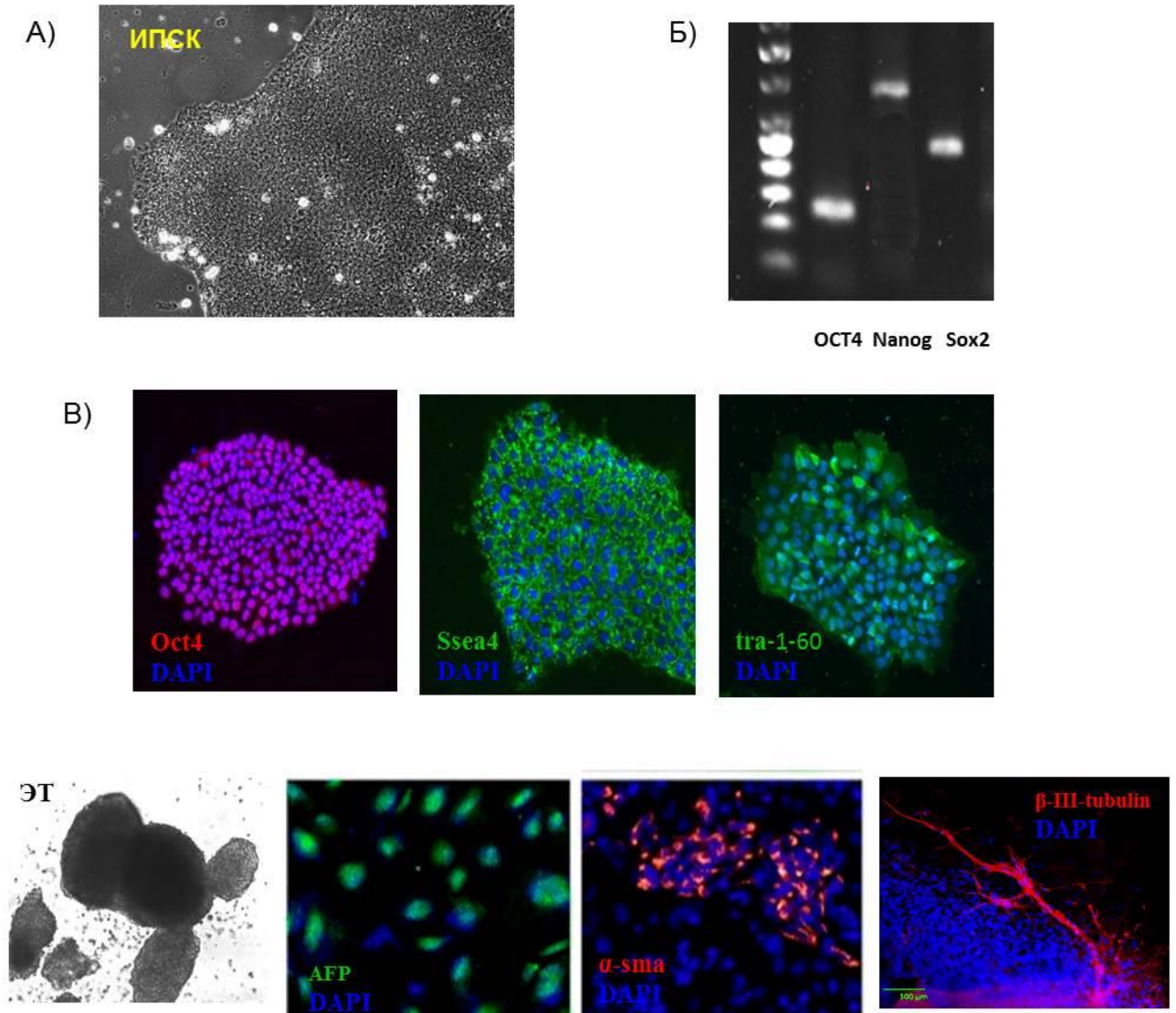


Рисунок 3.52. Характеристика ИПСК. А) - Морфология колоний ИПСК человека. Б) - Экспрессия маркеров плюрипотентности Oct4, Nanog, Sox2 в линиях ИПСК. Репрезентативная электрофореграмма продуктов ПЦР. В) - Экспрессия транскрипционного фактора Oct4 (PE), гликолипида SSEA-4 (FITC) и протеогликана TRA-1-60 (FITC) в ИПСК. Ядра окрашены DAPI. Увеличение x200. Г) – Характерная морфология эмбрионидных тел, сформированных ИПСК, через неделю суспензионного культивирования. Иммуноцитохимическое окрашивание дифференцированных ИПСК антителами к маркерам энтодермы AFP (FITC), мезодермы α -sma (PE), эктодермы β -III-tubulin (FITC). Ядра окрашены DAPI. Увеличение x400.

3.5.2. Дифференцировка клеток с индуцированной плюрипотентностью в клетки параксиальной мезодермы

Затем полученные ИПСК под воздействием комбинаций ингибитора Rho киназы, активина А, факторов роста bFGF и BMP-4, биологически активных низкомолекулярных соединений LY294002 и CHIR99021 были дифференцированы в клетки параксиальной мезодермы (рисунок 3.53, а). После индукции дифференцировки ИПСК в течение недели наблюдали снижение уровня экспрессии мРНК маркеров плюрипотентности Oct4, Nanog, Sox2, и повышение уровня экспрессии мРНК маркеров BRY, Snail, TBX6 и индукцию синтеза мРНК MIXL1, характерных для клеток параксиальной мезодермы (рисунок 3.53, б, в). Клетки параксиальной мезодермы, дифференцированные из ИПСК, характеризовались экспрессией поверхностного антигена CD90, но не экспрессировали поверхностные антигены CD105 и CD73, характерные для зрелых ММСК. Эти клетки также не экспрессировали маркеров гемопоэтических клеток HLA-DR, CD34, CD45 (рисунок 3.53, г).

Таким образом, было выявлено, что полученные в результате дифференцировки ИПСК клетки параксиальной мезодермы обладают существенными отличиями в эпигенетическом статусе по сравнению с исходными клетками и ММСК взрослого организма.

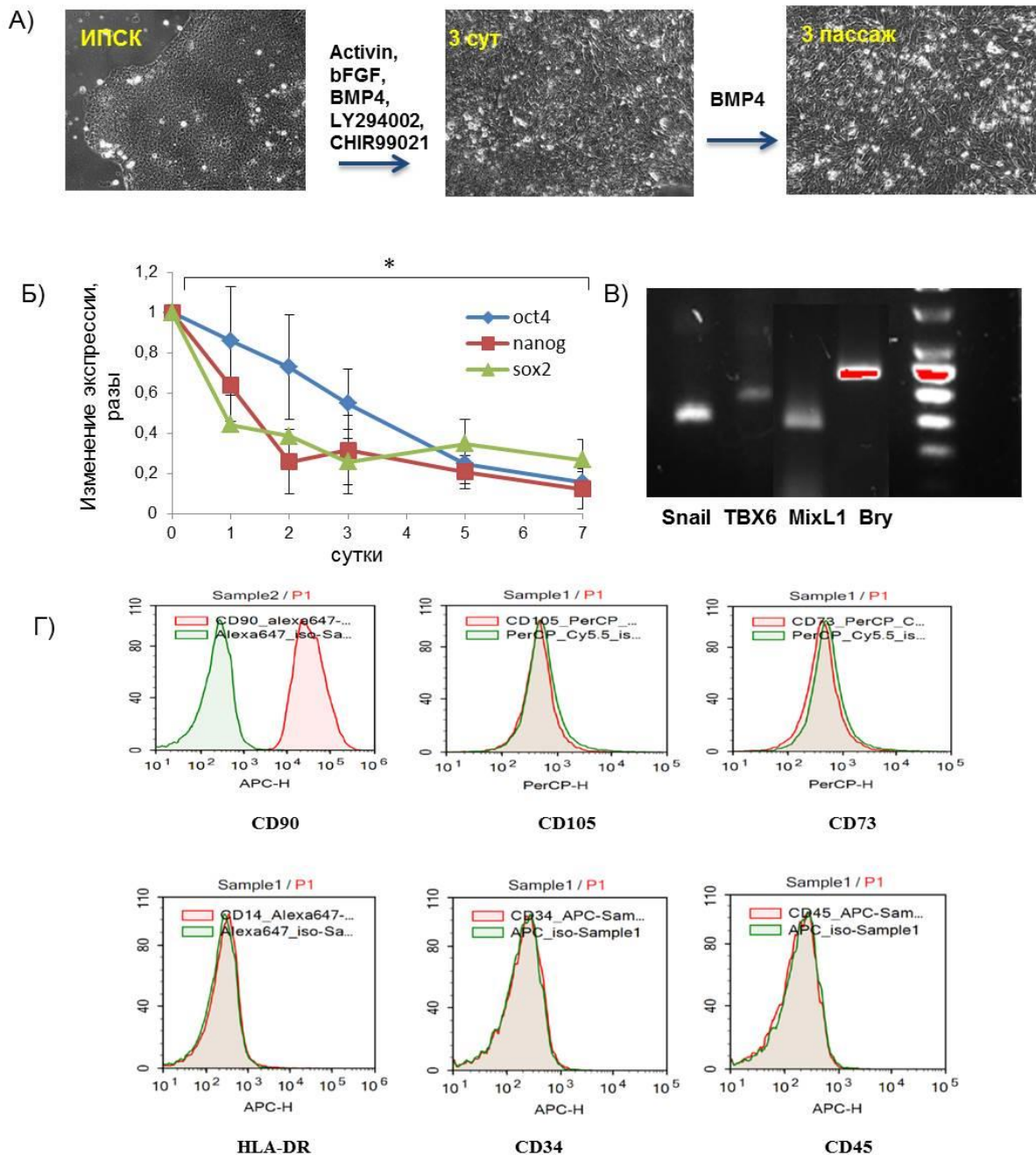


Рисунок 3.53. Дифференцировка ИПСК в клетки параксиальной мезодермы. А) - Морфологические изменения ИПСК в процессе дифференцировки в клетки параксиальной мезодермы. Б) – Изменение экспрессии маркеров плюрипотентности Oct4, Nanog, Sox2 в ИПСК в процессе дифференцировки в клетки параксиальной мезодермы. * показывает достоверность отличий при $P < 0,05$. В) - Экспрессия маркеров клеток ранней мезодермы BRY, Snail, TBX6, MIXL1 при дифференцировке ИПСК. Репрезентативная электрофореграмма продуктов ПЦР. Г) – Экспрессия поверхностных маркеров ММСК в клетках параксиальной мезодермы, дифференцированных из ИПСК. Данные проточной цитометрии. Зеленым цветом выделен изотипический контроль; специфическое окрашивание на поверхностные маркеры выделены красным цветом.

3.5.3. Дифференцировка клеток с индуцированной плюрипотентностью в ММСК

Далее посредством культивирования в стандартной среде клетки параксиальной мезодермы были дифференцированы в ММСК (ИПСК-ММСК). Через три недели культивирования клеток ранней мезодеры были получены клетки, морфологически соответствующие ММСК, способные к адгезии к пластиковой поверхности, экспрессирующие поверхностные маркеры CD105, CD90 и CD73 и не экспрессирующие CD45, CD34 и HLA-DR, способные дифференцироваться в клетки жировой, костной и хрящевой ткани (рисунок 3.54).

Зрелыми ММСК считали исходные культивируемые ММСК, выделенные из биоптата кожи.

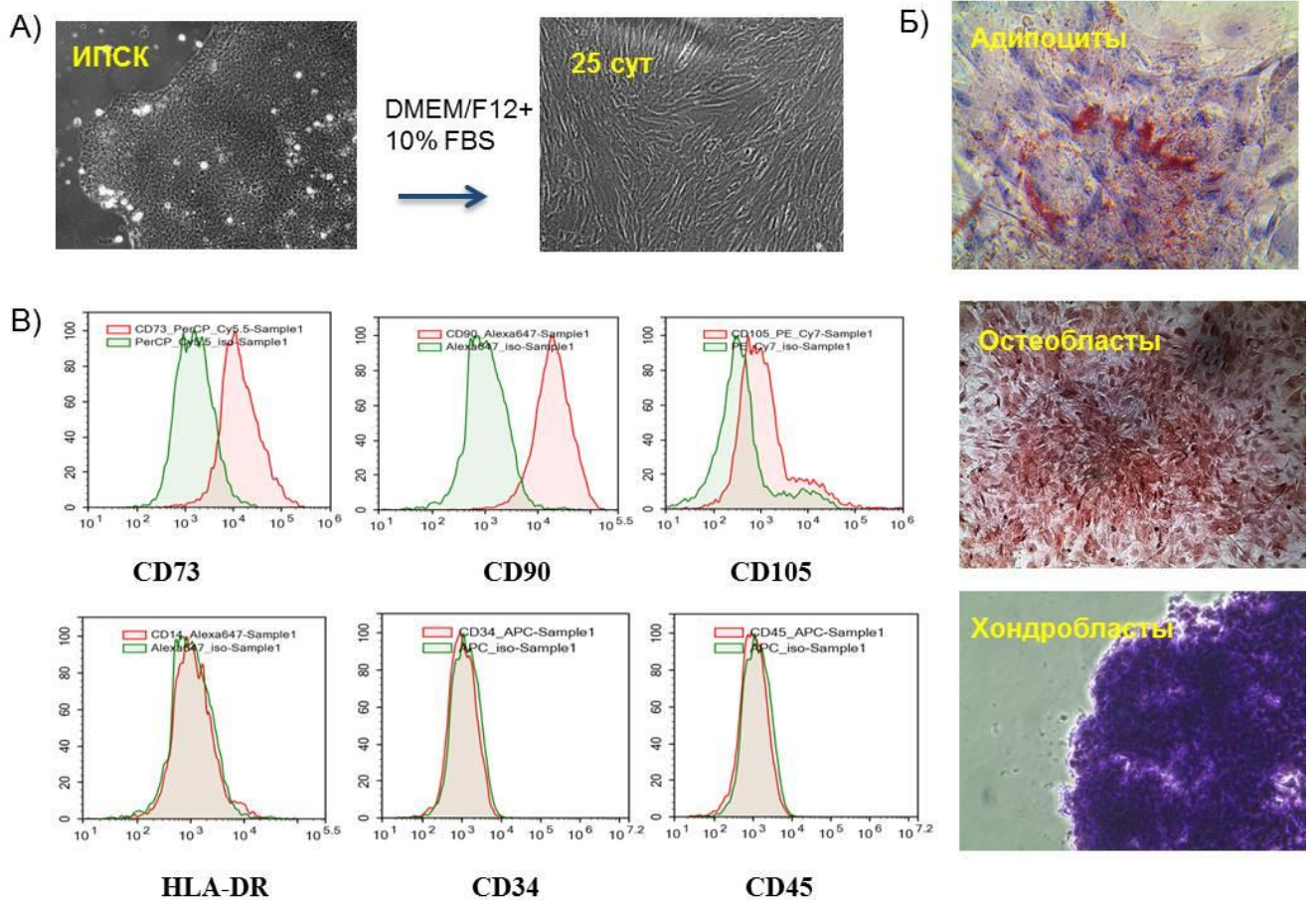


Рисунок 3.54. Дифференцировка ИПСК в ММСК. А) - Морфологические изменения ИПСК в процессе дифференцировки в ММСК. Б) Дифференцировка ИПСК-ММСК, в адипоциты, остеобласты и хондробласты. Накопление жировых вакуолей (окраска масляным красным и гематоксилином), накопление минерализованного матрикса (окраска ализариновым красным и гематоксилином), образование хрящевых микроасс (криосрезы окрашены толуидиновым голубым). В) - проточная флуориметрия ИПСК-ММСК, окрашенных антителами к поверхностным маркерам CD90, CD73, CD105, HLA-DR, CD34, CD45, конъюгированных с флуорохромами PerCP, Alexa Fluor 647, PE и APC. Зеленым цветом показан изотипический контроль, красным – специфические поверхностные маркеры.

Таким образом, из одного источника ММСК были созданы клеточные модели клеток параксиальной мезодермы и зрелых ММСК, позволяющие изучать молекулярные механизмы регенерации тканей на различных стадиях развития организма.

Изучение особенностей функциональной активности клеток параксиальной мезодермы в сравнении с ММСК, дифференцированными из ИПСК, позволит идентифицировать ключевые молекулы и терапевтические мишени, способствующие минимизации образования рубцов, стимуляции регенеративных процессов в очагах хронического воспаления, и содействующих полноценному восстановлению поврежденных тканей, что является необходимым этапом для разработки и создания новых лекарственных препаратов и перспективных подходов в лечении дегенеративных заболеваний, для которых на современном этапе не существует адекватных специфических методов терапии.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

Стволовые клетки опосредуют физиологическое обновление и регенерацию тканей организма в течение всей жизни. Возможно, что снижение способности организма к регенерации с возрастом или в результате развития патологий обусловлено снижением количества, а также функциональной активности стволовых и прогениторных клеток. Полноценная регенерация тканей невозможна без участия мезенхимальных стромальных клеток. Таким образом, ММСК привлекают большое внимание исследователей и клиницистов как перспективное терапевтическое средство для лечения многих заболеваний, связанных с нарушением регенерации тканей. В последнее время в мире прилагаются огромные усилия для изучения молекулярных механизмов индукции функциональной активности ММСК с целью идентификации ключевых молекул, участвующих в регуляции регенерации тканей, а также разработке технологических регламентов получения стандартизированных препаратов с использованием ММСК и их секретомов. В нашей стране это направление также интенсивно развивается. Данная работа является результатом многолетних лабораторных и клинических исследований функциональной активности ММСК различного генеза при воспалении и заживлении поверхностных ран.

ММСК легко могут быть выделены из различных тканевых источников и и успешно размножены *in vitro*. Наиболее часто используемые взрослые исходные ткани для ММСК человека - это костный мозг и жировая ткань. Другими отличными источниками ММСК являются пуповина и плацента, от которых обычно отказываются при рождении.

В настоящее время многочисленные исследования продемонстрировали значительное сходство морфофункциональных свойств культивируемых ММСК, выделенных из различных источников (Kozłowska U. et al., 2019, Das M. et al., 2021, Zha K. et al., 2021, Shin S et al., 2021). В результате проведенной нами работы также были охарактеризованы культуры ММСК, выделенных из кожи, костного мозга, жировой ткани, пуповины новорожденного. Выделенные из

тканей клетки, прикрепившиеся к поверхности культурального пластика, имели фибробластоподобную морфологию, обладали способностью к экспансии. Под действием специальных условий эти клетки обладали способностью дифференцироваться в адипогенном, хондрогенном и остеогенном направлении. Анализ фенотипа клеток полученной культуры методом проточной цитофлюориметрии показал, что они экспрессируют поверхностные маркеры ММСК CD105, CD73, CD90 и не экспрессируют поверхностные маркеры гемопоэтических клеток CD34, CD45, HLA-DR (Suzdaltseva Y.G. et al., 2006, 2007a, 2007b, Yarygin K.N. et al., 2006, Lupatov A.Y. et al., 2007). Таким образом, наши данные о сходных свойствах ММСК, выделенных из различных источников, согласуются с результатами, полученным другими исследователями (in 't Anker P.S. et al., 2003, Wang H.S. et al., 2004, Sakaguchi Y. et al., 2005, Bieback K. et al., 2008, Reyes M. et al., 2009, Lv F.J. et al., 2014, Kozłowska U. et al., 2019, Shin S. et al., 2021). Проведенный морфологический, иммуноцитотипический и функциональный анализ позволяет также утверждать, что клетки полученных нами культур ММСК соответствуют минимальным критериям, предложенным ISCT для определения ММСК человека (Dominici M. et al., 2006).

Однако более глубокий анализ экспрессии цитоплазматических и поверхностных белков в клетках полученных культур выявил некоторые особенности, присущие только клеткам определенных тканей. Нами впервые было показано, что значительная часть (~ 70%) культивируемых ММСК, выделенных из пуповины человека, экспрессируют нестин – маркер прогениторных клеток (Yarygin K.N. et al., 2006). В ММСК, выделенных из кожи, костного мозга и жировой ткани клеток, экспрессирующих этот белок выявлено не было (Suzdaltseva Y.G. et al., 2007b). Помимо этого, нами было показано, что количество клеток, экспрессирующих рецептор к SCF (CD117, *c-kit*), в культуре ММСК пуповины также было существенно выше, чем в ММСК, выделенных из кожи, костного мозга или жировой ткани (Lupatov A. Y. et al., 2006). Таким образом, мы показали, что ММСК пуповины выгодно отличается от ММСК, выделенных из других источников, по количеству прогениторных клеток в

культуре. Впоследствии другими исследователями этот факт также был подтвержден (Kadam S.S., Bhonde R.R., 2010, Montanucci P. et al., 2011, Liu Y et al., 2020).

Несмотря на сходство фенотипических и мультипотентных характеристик, ММСК, полученные от разных доноров, сильно различаются по способности к экспансии в культуре. Скорость пролиферации и физиологическое старение ММСК в культуре значительно варьируются от образца к образцу, даже, если клетки были выделены из одного типа ткани. Различия в способности к экспансии ММСК от разных доноров, зависят не только от возраста, но и от генетических и эпигенетических особенностей организма (Efimenko A. et al 2011, Wegmeyer H. et al, 2013, Wu M. et al., 2018, Ratushnyy A. et al., 2020). В процессе наших исследований мы отметили, что ММСК пуповины новорожденного помимо присутствия значительного количества прогениторных клеток выгодно отличаются от клеток, выделенных из кожи, жировой ткани и костного мозга взрослого человека, повышенной пролиферацией и замедленным старением в культуре. Другим преимуществом ММСК, выделенных из пуповины, может также считаться неинвазивная, безболезненная и не противоречащая этическим нормам процедура сбора образцов (Yarygin K.N. et al, 2006). Этот факт также отмечается многими другими исследователями (Wang H.S. et al., 2004, Fong C.Y. et al., 2011, Chen M.Y. et al., 2009, Islam A. et al., 2019). Совокупность этих факторов позволила нам впоследствии внедрить технологические стандарты культивирования *ex vivo*, получения и контроля качества препаратов ММСК пуповины.

Возможность использования ММСК в качестве терапевтического средства подразумевает обсуждение такого аспекта, как взаимодействие ММСК с иммунными клетками в организме реципиента. Это особенно актуально, при аллогенных трансплантациях ММСК. Но и при аутологичных трансплантациях ММСК этот момент является немаловажным, т.к. клетки при культивировании *ex vivo* могут изменять свои свойства, особенно, если такие изменения вносятся искусственно (например, при геномодификации).

В настоящее время общепринято, что ММСК пуповины наилучшим образом подходят для аллогенных трансплантаций. В то же время для ММСК, выделенных из костного мозга, жировой ткани и кожи взрослого человека, подразумевается как аллогенное, так и аутологичное применение (Pittenger M.F. et al., 2019, Rodríguez-Fuentes D.E. et al., 2020).

В настоящее время все еще недостаточно данных о том, избегают ли ММСК узнавания аллореактивными клетками, или, что это узнавание неэффективно в силу гипоиммуногенного характера (Le Blanc K. et al., 2003, Potian J.A. et al., 2003, de Witte S.F.H. et al., 2018). Механизмы уклонения от иммунного ответа могут иметь огромное значение для терапевтического применения аллогенных ММСК, которые более уязвимы при встрече с иммунной системой реципиента в отличие от аутологичных. Однако доказано, что аллогенные ММСК обладают и гораздо более мощным иммуномодулирующим потенциалом по сравнению с аутологичными (Maccario R. et al., 2005, Klyushnenkova E. et al., 2005, Islam A. et al., 2019, Suzdaltseva Y.G. et al., 2020). В любом случае изучению механизмов взаимодействия ММСК с иммунными клетками *in vitro* и *in vivo* уделяется огромное внимание во всем мире.

Первым вопросом, возникающим при изучении возможности использования ММСК в качестве терапевтического средства, является цитотоксичность НК реципиента по отношению к трансплантированным аллогенным ММСК. Именно этот фактор определяет временной отрезок, в течение которого ММСК смогут оказывать терапевтический эффект. Этот аспект достаточно подробно описан в литературе (de Witte S.F.H. et al., 2018, Weiss A.R.R., Dahlke M.H., 2019). МНС I класса играет ключевую роль в модулировании иммуногенности ММСК. Первые исследования, посвященные изучению экспрессии МНС I и II класса в ММСК костного мозга были сделаны еще в 2003 г. (Le Blanc K. et al., 2003). Было показано, что аллогенные ММСК крысы могут оказывать терапевтический ангиогенный эффект, однако по данным гистологического анализа количество трансплантированных ММСК уменьшается в течение 3-4 недель после инъекции (Ishikane S. et al., 2008, Arutyunyan I. et al., 2015). Аутопсия пациентов,

получавших инфузии аллогенных ММСК в течение года, показала, что после трансплантации введенные клетки имеют тенденцию к гибели, положительно коррелирующую со временем от начала инъекций (von Bahr L. et al., 2012). Кроме того, полученные другими исследователями данные показывают, что ММСК подавляют цитотоксичность НК и избегают НК-опосредованного лизиса. (Sotiropoulou P.A. et al., 2006, Spaggiari G.M. et al., 2006, Hu C.D. et al., 2019). Таким образом, эти данные свидетельствуют о том, что ММСК обладают иммунной привилегией и могут быть трансплантированы между HLA-несовместимыми людьми. Наши исследования также продемонстрировали, что аллогенные ММСК не лизируются в присутствии иммунокомпетентных клеток реципиента при сокультивировании *in vitro* (рисунок 3.23). Нами также показано, что присутствие ММСК не влияет на относительное содержание Т- и В-лимфоцитов, НК и моноцитов в сокультурах (Suzdaltseva Y. G. et al., 2008). В наших исследованиях был проведен сравнительный анализ экспрессии поверхностных молекул HLA I класса в культурах ММСК, выделенных из кожи, костного мозга и пуповины человека. Было установлено, что ММСК, выделенные из кожи, пуповины и костного мозга обладают высоким уровнем экспрессии HLA I класса (рисунок 3.24). Однако уровень экспрессии HLA I класса на ММСК, выделенных из кожи, был выше более чем в 10 раз по сравнению с ММСК костного мозга и пуповины. Впервые было показано, что при сокультивировании с аллогенными иммунокомпетентными клетками уровень экспрессии HLA I класса в ММСК может изменяться. В наших условиях при взаимодействии с аллогенными МПК в ММСК кожи уровень экспрессии HLA I класса повышался, в ММСК пуповины – снижался, а в ММСК костного мозга – не изменялся (рисунок 3.25) (Suzdaltseva Y. G. et al., 2008). Впоследствии подобные данные были получены другими исследователями, которые предположили, что снижение уровня экспрессии HLA I класса в ММСК может происходить в результате клатрин-независимого эндоцитоза, а повышение – в результате воздействия провоспалительного микрооружия. Считается, что клетки, обладающие саморегулирующейся экспрессией поверхностного HLA I класса, вызывают более

слабый иммунный ответ (Deuse T. et al., 2011, Wang Y., et al., 2019). Такая способность ММСК изменять уровень экспрессии поверхностных молекул HLA I класса может являться одним из механизмов уклонения от иммунного ответа при трансплантациях.

Влияние иммунных клеток на способность ММСК экспрессировать специфические поверхностные маркеры и дифференцироваться в клетки мезенхимного ряда является одним из аспектов при изучении иммуномодуляторных свойств ММСК. Согласно литературным данным, сокультивирование ММСК с актМПК или индивидуальными субпопуляциями иммунных клеток не оказывает влияния на уровень экспрессии мезенхимальных маркеров CD105, CD73, CD90 и способность к дифференцировке (Singer N.G., Caplan A.I., 2011, Pourgholaminejad A. et al., 2016). Нами было также установлено, что сокультивирование ММСК с актМПК в течение 48 ч не приводило к изменению экспрессии этих поверхностных маркеров. Сокультивирование полученных культур ММСК с актМПК не приводило также к изменению их способности в дифференцировке в адипоциты, хондробласты, остеобласты (см. рисунок 3.29, а, 3.30).

Для того, чтобы охарактеризовать иммуномодуляторные свойства ММСК нами была разработана новая комплексная методика, позволяющая в течение одного эксперимента в одной контрольной точке произвести одновременную оценку степени подавления пролиферации актМПК, уровня экспрессии поверхностных маркеров ММСК и актМПК, уровня экспрессии мРНК некоторых генов в ММСК и актМПК, уровня секреции цитокинов.

Для изучения иммуномодуляторных свойств ММСК в наших экспериментальных условиях мы использовали ММСК, выделенные из жировой ткани человека, использование которых предоставляет возможность исследования их иммуномодуляторных свойств ММСК при сокультивировании как с аллогенными, так и с аутологичными иммунокомпетентными клетками. В данной работе мы не исследовали взаимодействие ММСК и иммунных клеток, выделенных от одного донора. Такая работа планируется в будущем.

Проблема поиска оптимальных стехиометрических соотношений ММСК и МПК, которые необходимы для проявления ММСК иммуномодуляторных свойств, рассматривается уже достаточно давно и весьма скрупулёзно. Впервые анализ влияния соотношения ММСК и иммунных клеток (в частности Т-лимфоцитов) был проведен на примере ММСК костного мозга. В данных экспериментах в качестве исходной нулевой точки или контрольного образца использовали активированные с помощью различных агентов клетки иммунной системы (в случае человеческих клеток это были периферические лейкоциты крови, прединкубированные с митогенами или суперантигенами (конкавалином А или фитогемагглютинином) (Di Nicola M. et al., 2002, Le Blanc K. et al., 2003), либо специфическими антителами, которые вызывают лигирование Т-клеточных рецепторов на поверхности Т-клеток, приводя к их специфической активации (Potian J.A. et al., 2003). В других случаях Т-клетки активировали с помощью антиген-презентирующих (как правило, дендритных) клеток в присутствии специфического белкового или пептидного антигена. Один из вариантов такой активации – это смешанная реакция лейкоцитов, которую также использовали для оценки иммуномодулирующей активности ММСК (Groh M.E. et al., 2005). В экспериментальных образцах равное число предварительно активированных иммунных клеток инкубировали в присутствии различных количеств ММСК. Таким образом, удалось получить зависимости иммуномодулирующих свойств ММСК от соотношения числа ММСК и иммунных клеток. При этом было показано, что соотношение ММСК и иммунных клеток является критическим фактором, поскольку при различных соотношениях можно добиться как иммуносупрессивного, так и иммуностимулирующего действия ММСК на клетки иммунной системы. Так, было показано, что активированные с помощью митогенов или суперантигенов клетки иммунной системы в присутствии ММСК пролиферируют медленнее и имеют менее выраженный активированный фенотип (экспрессию поверхностных маркеров активации, секрецию провоспалительных цитокинов и т.д.) пропорционально увеличению числа ММСК в сокультурах (Le

Blanc K. et al., 2004, DelaRosa O. et al., 2009, Petrenko Y et al., 2020, Herzig M.C. et al., 2021).

Наши эксперименты также подтвердили способность ММСК жировой ткани подавлять пролиферацию МПК, активированных ФГА. Степень подавления пролиферации актМПК в присутствии ММСК оценивали через 24 ч, 48 ч, 72 ч, 5 сут и 7 сут от начала сокультивирования. При этом мы использовали различные соотношения этих клеток: 1:10, 1:25, 1:50 и 1:100 (ММСК : актМПК). Сокультивирование производили как в контактных, так и в бесконтактных условиях (с использованием полупроницаемых мембран). Мы установили, что ММСК в наибольшей степени подавляют пролиферацию актМПК через 48 ч сокультивирования. При больших временах инкубации данный эффект был менее выражен. Поэтому дальнейшие измерения проводили именно через 48 ч сокультивирования. Степень подавления пролиферации актМПК в присутствии ММСК зависела от соотношения этих клеток в культуре. Наиболее значительное подавление пролиферации актМПК наблюдали при соотношении клеток 1:25 (ММСК : актМПК) (Rubtsov Y. et al., 2017, Suzdaltseva Y.G., 2018).

Степень подавления пролиферации актМПК не зависела от наличия межклеточных контактов с ММСК в сокультуре (см. рисунок 3.32). Таким образом, полученные нами результаты показали, что подавление пролиферации активированных МПК осуществляется посредством растворимых факторов, секретируемых ММСК. Нами также было выявлено, что растворимые факторы, содержащиеся в супернатантах интактных культур ММСК, не влияют на пролиферацию актМПК. Этот результат указывает на то, что ММСК жировой ткани не секретируют иммуносупрессивные факторы конститутивно, только в ответ на стимулы, поступающие от актМПК (Rubtsov Y. et al., 2017, Suzdaltseva Y.G., 2018). Наши результаты вполне согласуются с экспериментальными данными, полученными (Le Blanc K. et al., 2004, DelaRosa O. et al., 2009, Zhou Y et al., 2019, Negi N., Griffin M.D., 2020).

Мы предположили, что одним из механизмов подавления пролиферации Т-лимфоцитов в присутствии ММСК является снижение уровня экспрессии маркера

активации CD25 на поверхности мембраны активированных Т- и В- лимфоцитов. На эту мысль нас натолкнули результаты, полученные Park M.J. et al. (2011) и Yoo H.S. et al. (2017) в экспериментах по сокультивированию активированных Т-лимфоцитов и ММСК мыши. Также эффект снижения количества активированных CD3+CD25+Т-лимфоцитов в сокультуре с ММСК костного мозга человека, облученных радиацией, был обнаружен Le Blanc K. et al. (2004). Для того, чтобы проверить эту гипотезу мы произвели оценку относительного содержания активированных CD4+CD25+ и CD8+CD25+ Т-лимфоцитов и CD19+CD25+ В-лимфоцитов в сокультуре с ММСК жировой ткани человека в системе культивирования, которая предполагала контактное и бесконтактное взаимодействие этих клеток в различных соотношениях, в отличие от Le Blanc K. et al. (2004), которые исследовали этот эффект без оценки участия субпопуляций CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов, при одном соотношении с ММСК и без разделения контактов между ними. В результате проведенных экспериментов нами впервые было установлено, что в присутствии ММСК жировой ткани снижается относительное содержание субпопуляции активированных CD4+CD25+ Т-лимфоцитов. В остальных субпопуляциях число CD25+ клеток не изменялось. Увеличение пропорции ММСК по отношению к актМПК в сокультуре приводило к снижению доли активированных CD25+ Т-лимфоцитов. Несмотря на то, что присутствие или отсутствие адгезивных взаимодействий между ММСК и актМПК не оказывали значительного влияния на характер полученных зависимостей, доля активированных CD4+CD25+ Т-лимфоцитов в бесконтактных сокультурах ММСК и актМПК была выше по сравнению с соответствующими образцами контактных сокультур (см. рисунок 3.33, б). Супернатант интактной культуры ММСК не оказывал влияния на относительное содержание активированных CD4+CD25+ Т-лимфоцитов в общей популяции МПК независимо от концентрации клеток. Таким образом, растворимые факторы, выделяемые интактной культурой ММСК, в наших экспериментальных условиях не оказывали влияния на активацию Т-лимфоцитов. Изменение соотношений клеток в сокультуре, и, следовательно, концентраций растворимых факторов, выделяемых

ими при взаимодействии, приводило к дозозависимой модуляции активации Т-лимфоцитов. Этот результат также подтверждает тезис о том то, что иммуномодуляторные свойства ММСК проявляются только в ответ на сигналы, поступающие от микроокружения, создаваемого актМПК. Эффект снижения относительного содержания активированных CD4+CD25+ Т-лимфоцитов в контактной сокультуре с ММСК ткани по сравнению с бесконтактной указывает на то, что адгезивные взаимодействия между этими клетками могут быть задействованы в механизмах подавления активации Т-лимфоцитов (Rubtsov Y. et al., 2017).

Однако при определенных условиях сокультивирования актМПК и ММСК мы наблюдали обратный эффект: повышение относительного количества активированных CD4+CD25+ Т-лимфоцитов. Такой эффект наблюдался при сокультивировании ММСК с интактными МПК или сопоставимом количестве ММСК и актМПК в сокультуре ($\approx 1:1$). Подобные результаты были описаны в работах Le Blanc K. et al. (2003) и Mareschi K. et al. (2016). Этот факт может свидетельствовать о том, что в отсутствие воспалительной реакции ММСК могут создавать и поддерживать определенный провоспалительный баланс в тканях.

Одним из вероятных событий, происходящих при осуществлении эффекта подавления пролиферации актМПК в присутствии ММСК, может являться апоптоз активированных Т-лимфоцитов. Данные, подтверждающие эту гипотезу, были получены Li X. et al., 2016. Мы также проанализировали количество апоптотических клеток среди активированных Т-лимфоцитов при сокультивировании с ММСК. Для этого использовали метод проточной цитометрии с окраской клеток на маркеры аннексин V и 7-AAD. Проведенные эксперименты показали, что сокультивирование с ММСК не вызывает статистически значимых изменений в индукции апоптоза как среди клеток субпопуляций CD4+ и CD4- лимфоцитов, так и среди субпопуляции активированных CD4+CD25+Т-лимфоцитов. Эффект был сходен и в контактных и в бесконтактных условиях и не зависел от соотношения клеток. Полученные данные свидетельствуют о том, что апоптоз активированных CD4+CD25+ Т-

лимфоцитов в присутствии ММСК в наших экспериментальных условиях не участвует в возможных механизмах подавления пролиферации актМПК.

Проведенные ранее исследования (Aggarwal S., Pittenger M.F., 2005, DelaRosa O. et al., 2009, Liu W.H. et al., 2013, Cuerquis et al., 2014, Islam A. et al., 2019) показали, что ММСК, культивируемые *ex vivo*, секретируют определенный спектр интерлейкинов, ростовых факторов, хемокинов, белков внеклеточного матрикса, металлопротеиназ. Некоторые из вышеперечисленных факторов продуцируются ММСК постоянно. Белки внеклеточного матрикса - самая большая и самая многочисленная группа белков, секретируемых МСК, состоящая из изоформ коллагена, ламининов, фибронектина, эластина, протеогликанов (Amable P.R. et al., 2014, Baberg F. et al., 2019, Yuan O. et al., 2019). МСК также секретируют металлопротеиназы MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-13, которые регулируют отложение коллагена, деградацию и перестройку внеклеточного матрикса, способствуют миграции клеток и ангиогенезу (Amable P.R. et al. al., 2014, Almalki S.G., Agrawal D.K., 2016, Maffioli E. et al., 2017, Islam A. et al., 2019). Внутри секретома MSC были идентифицированы несколько факторов роста, таких как VEGF, TGF- β 1, TGF- β 2, PDGF, HGF, bFGF, IGF2, PDGF, FGF7, GM-CSF, G-CSF, которые, как известно, участвуют в межклеточной коммуникации и передаче сигнала (Amable P.R. et al., 2014, Pereira T. et al., 2014, Islam A. et al., 2019, Baberg F. et al., 2019). Также было показано, что МСК продуцируют хемокины MCP-1, MIP-1 α , RANTES и IP-10, а также цитокины IFN- γ , IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15 и IL-17, комбинированная реакция которых лежит в основе иммуномодулирующих эффектов МСК (Yoo K.H. et al., 2009, Amable P.R. et al., 2014, Pereira T. et al., 2014, Islam. A et al., 2019, Ratushnyy A. et al., 2020).

Однако недавние публикации продемонстрировали, что предварительное кондиционирование МСК *in vitro* различными стимулами, включая гипоксические состояния, провоспалительное праймирование, трехмерное культивирование, может изменять их паракринную активность и стимулировать или индуцировать секрецию белков, участвующих в воспалении и ангиогенезе (Riis S. et al., 2016,

Maffioli E. et al., 2017, F.J. et al., 2017, Ferreira J.R. et al., 2018., Islam A et al., 2019). Полученные этими исследователями данные, хотя и носят отрывочный и противоречивый характер, позволяют выдвинуть предположение о способности ММСК изменять свой экспрессионно-секреторный профиль и осуществлять динамическое модулирование цитокинового микроокружения в зависимости от поступающих извне сигналов *in vivo*

В нашей работе мы выдвинули гипотезу о том, что стимуляция ММСК провоспалительным микроокружением или сокультивирование этих клеток с иммунокомпетентными клетками в смешанных культурах может приводить к индукции синтеза или значительному изменению спектра, соотношения и уровня секреции этих факторов.

В этой работе мы провели комплексный анализ содержания 17 цитокинов и факторов роста, продуцируемых ММСК и актМПК в отдельных культурах и при сокультивировании. Проведенные эксперименты показали, что ММСК жировой ткани, культивируемые в стандартных условиях, постоянно секретируют некоторое количество IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, GM-CSF, IFN- γ , MCP-1, MIP-1b, TNF- α и не секретируют IL-2, IL-5, IL-7, IL-17, G-CSF. АктМПК, культивируемые в тех же условиях, секретируют все вышеуказанные цитокины. Наши результаты согласуются с данными, полученными другими исследователями (Yoo K.H. et al., 2009, Amable P.R. et al., 2014, Pereira T. et al., 2014, Islam. A et al., 2019, Ratushnyu A. et al., 2020).

В нашей работе мы впервые показали, что сокультивирование ММСК жировой ткани и аллогенных актМПК приводит к значительному изменению уровня секреции некоторых цитокинов по сравнению с отдельными культурами этих клеток.

Так нами было показано, что концентрации измеряемых цитокинов повышались прямо пропорционально изменению количества клеток в отдельных культурах ММСК и актМПК и соотношений ММСК и актМПК в сокультурах (рисунок 3.35). Сокультивирование ММСК и актМПК не приводило к значимым изменениям концентраций TNF- α , IL-2, IL-12, IL-17, GM-CSF, хемокина MIP-

1b в супернатантах относительно отдельных культур этих клеток. Однако мы показали, что условия совместного культивирования ММСК и актМПК оказывают значительное влияние на уровень секреции и соотношение IL-1, IL-6, IL-10, IL-13, IFN- γ , G-CSF в измеряемых образцах, и уровень экспрессии этих цитокинов зависит от соотношения этих клеток и от наличия межклеточных контактов между ММСК и актМПК. Однако динамика изменения концентраций этих цитокинов значительно различалась. Так сокультивирование ММСК и актМПК приводило к увеличению концентраций IL-1, IFN- γ , G-CSF, IL-6 в супернатантах по сравнению с отдельными культурами этих клеток (рисунок 3.36, 3.38). Анализ данных, полученных в наших экспериментальных условиях, не позволяет установить в каких конкретно клетках (ММСК и/или актМПК) уровень секреции этих цитокинов увеличивался. Увеличение уровня секреции IFN- γ , не зависело от отсутствия или наличия межклеточных контактов между ММСК и актМПК в сокультурах. В то же время концентрации IL-1, IL-6 и G-CSF при контактном сокультивировании актМПК и ММСК были статистически значимо выше, чем при бесконтактном (рисунок 3.36, 3.38). Таким образом, можно предположить, что контактные взаимодействия между ММСК и акт МПК могут активировать сигнальные каскады, участвующие в регуляции синтеза этих цитокинов в клетках.

Интересным также является тот факт, что базовый уровень секреции IL-6 в ММСК (при культивировании в стандартных условиях) был существенно выше по отношению к таким же культурам актМПК (см. рисунок 3.38). Этот факт подтверждает гипотезу о том, что в отсутствие провоспалительного микроокружения, создаваемого актМПК, ММСК сами могут его создавать и поддерживать.

Сокультивирование ММСК и актМПК приводило также к увеличению концентраций IL-10, IL-13. Однако этот эффект проявлялся только по отношению к супернатантам отдельных культур ММСК. Относительно супернатантов отдельных культур актМПК концентрации этих цитокинов уменьшались (см. рисунок 3.37). Эти данные свидетельствуют о том, что микроокружение,

создаваемое актМПК, вызывает в ММСК индукцию сигнальных каскадов, приводящих к синтезу факторов, подавляющих секрецию этих цитокинов именно в актМПК.

В свою очередь воздействие сигналов, поступающих от актМПК, вызывает в ММСК изменения, приводящие к индукции или усилению секреции факторов, оказывающих влияние на функциональную активность иммунокомпетентных клеток (Rubtsov Y.P. et al., 2012, Glenn J.D., Whartenby K.A., 2014, Le Burel S. et al., 2017, Contreras-Kallens P. et al., 2017).

В нашей работе мы провели анализ потенциальных растворимых факторов - основных медиаторов воспаления, которые могут выделять ММСК под воздействием провоспалительного микроокружения, и которые могут участвовать в механизмах подавления пролиферации актМПК.

Ранее было показано, что под действием провоспалительного микроокружения в ММСК происходит изменение экспрессии целого ряда генов, которые могут отвечать за механизмы подавления пролиферации актМПК: TGF- β , PGE2, COX-2, IDO, iNOS, PD-L1, галектинов, SDF-1. (Bernardo M.E., Fibbe W.E., 2013; Glenn J.D., Whartenby K.A., 2014). В частности, было установлено, что под действием IFN- γ в ММСК происходит индукция синтеза IDO (DelaRosa O., et al., 2009, Boyt D.T. et al., 2020, Lim J.Y. et al., 2021). Известно, что IDO катализирует превращение незаменимой аминокислоты триптофана в кинуренин. Истощение среды культивирования по триптофану препятствует синтезу белков в клетках, нарушает метаболизм клеток, и, следовательно, отрицательно влияет на активацию и пролиферацию лимфоцитов. Показано также, что катаболит триптофана – кинуренин также подавляет активацию Т-лимфоцитов (DelaRosa O., et al., 2009). Схема предполагаемого механизма подавления пролиферации активированных Т-лимфоцитов под действием IDO, экспрессируемого ММСК представлена на рисунок 4.1.

В нашей работе мы также показали, что в условиях сокультивирования с актМПК в ММСК жировой ткани происходила индукция синтеза IDO. В стандартных условиях культивирования экспрессии гена IDO в ММСК не было

выявлено. Таким образом, было показано, что ММСК не экспрессируют этот ген постоянно, а индукция экспрессии его происходит под действием микроокружения. Индукция экспрессии IDO в ММСК происходила в условиях как контактного, так и бесконтактного сокультивирования с актМПК. Следовательно, этот эффект был опосредован растворимыми факторами, выделяемыми актМПК. Это утверждение подтверждается тем, что уровень экспрессии IDO в ММСК прямопропорционально зависел от количества актМПК в сокультуре, и, следовательно, концентрации секретируемых ими цитокинов (в том числе IFN- γ). Полученные нами результаты вполне согласуются с данными, полученными другими исследователями (DelaRosa O., et al., 2009, Torres Crigna A., et al., 2020). Уровень экспрессии IDO в ММСК был существенно более высоким при контактном сокультивировании с актМПК по сравнению с бесконтактным. Однако при контактном сокультивировании уровень экспрессии IDO в ММСК не зависел от количества актМПК в сокультуре. Этот факт дает основания предполагать, что контактные взаимодействия между ММСК жировой ткани и актМПК могут иметь важное значение в индукции IDO. Отсутствие зависимости в уровне экспрессии IDO в ММСК от концентрации актМПК в сокультуре означает, что только ограниченное количество клеток способно образовывать плотные адгезивные контакты, содержащие трансмембранные рецепторы, активирующие сигнальный каскад IDO.

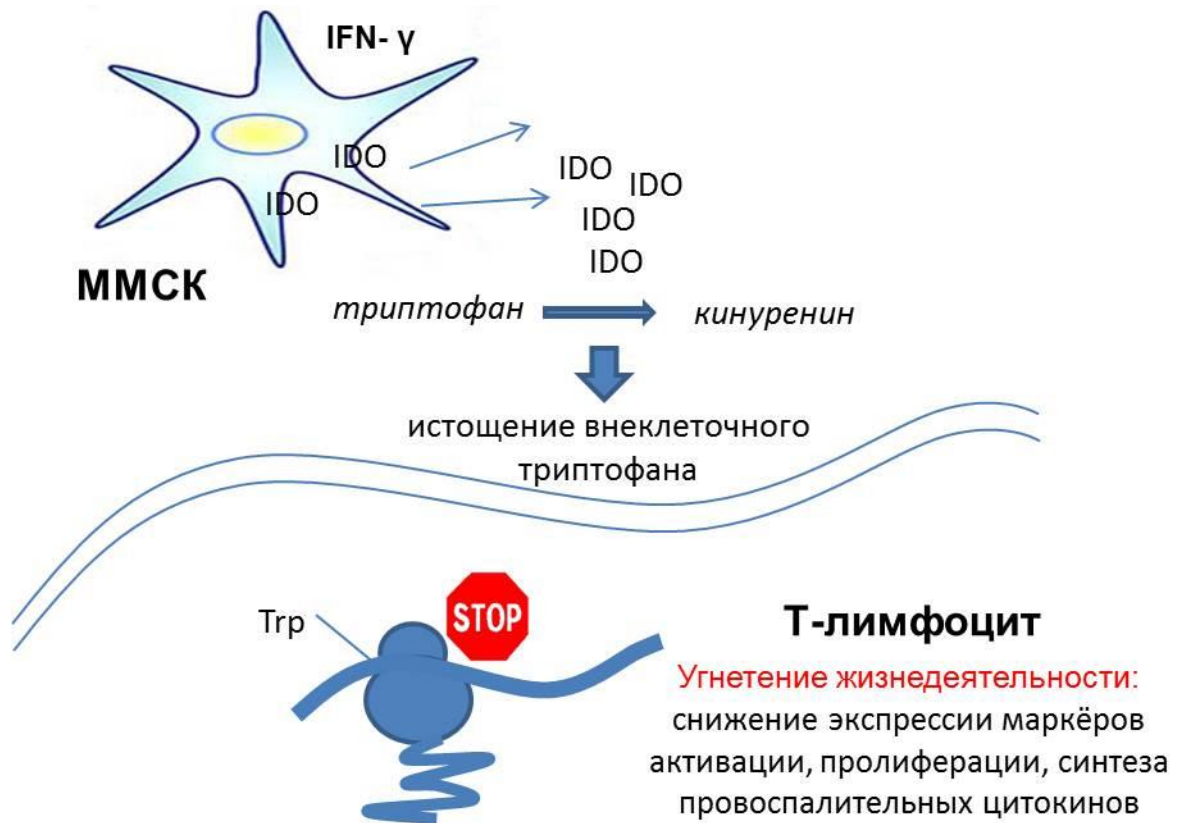


Рисунок 4.1. Предполагаемый механизм подавления пролиферации активированных Т-лимфоцитов под действием IDO, экспрессируемого MMCK.

Еще один ген, экспрессия которого индуцируется провоспалительным микроокружением, является iNOS. Фермент iNOS катализирует реакцию с образованием молекулы NO, которая реагирует со многими ферментами, ионными каналами и рецепторами. Было показано, что NO, синтезируемая MMCK, ингибирует фосфорилирование STAT5 и подавляет пролиферацию Т-лимфоцитов (Sato K. et al., 2007). Ранее было показано, что под действием провоспалительных цитокинов в MMCK костного мозга мышей происходит индукция синтеза iNOS (Ren G. et al., 2008). Значительное увеличение экспрессии гена iNOS в MMCK под действием IFN-gamma, TNF-alpha и IL-1b возможно является альтернативным механизмом подавления пролиферации актМПК (рисунок 4.2).

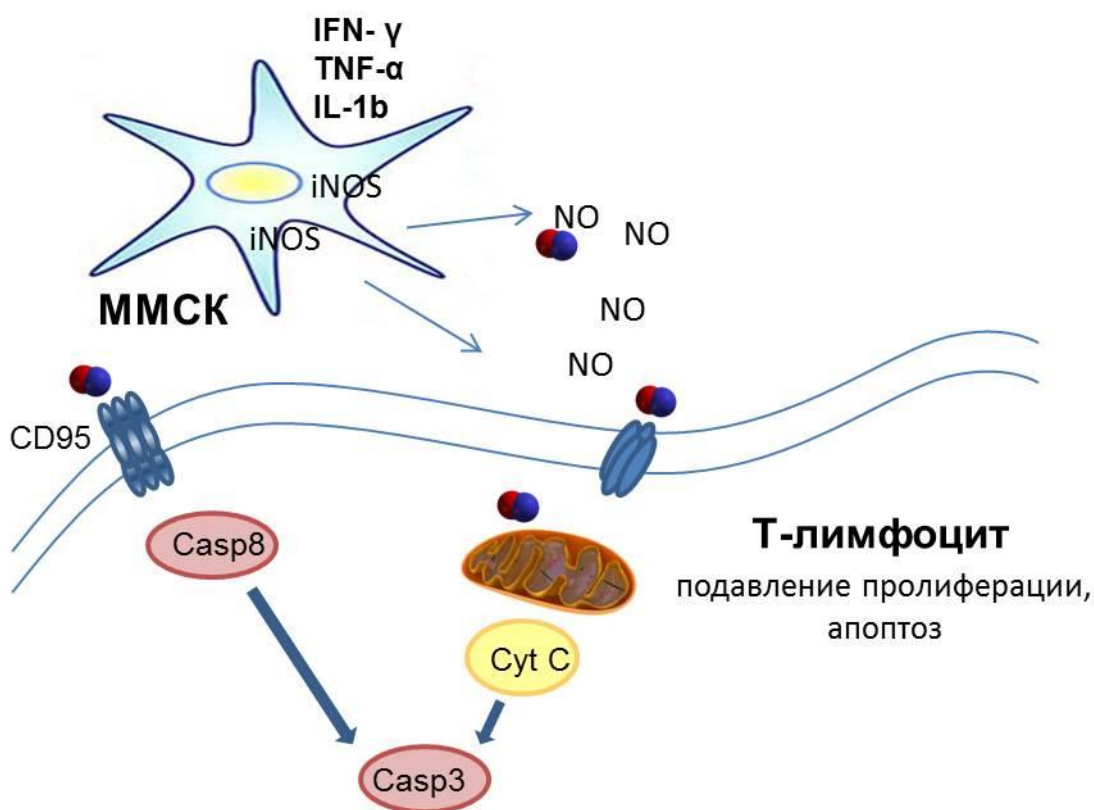


Рисунок 4.2. Предполагаемый механизм подавления пролиферации активированных Т-лимфоцитов под действием NO, продуцируемого ферментом iNOS MMCK.

В MMCK iNOS в норме не транскрибируется. Увеличение уровня iNOS в MMCK в условиях провоспалительного микроокружения свидетельствует об увеличении продукции NO этими клетками. Образование значительного количества NO, катализируемого iNOS, может являться причиной гибели клеток в результате повреждения ДНК или клеточных структур, и одним из механизмов подавления пролиферации Т-лимфоцитов.

Интересным является тот факт, что индукция синтеза iNOS в MMCK под действием провоспалительных цитокинов происходит не у всех видов млекопитающих. Данные, полученные Su J. et al., 2014, свидетельствуют о том, что MMCK млекопитающих по способности к индукции синтеза IDO и iNOS под действием провоспалительных цитокинов делятся на две отдельные группы. MMCK обезьяны, свиньи и человека в условиях воспаления синтезируют IDO для

подавления иммунных ответов, тогда как ММСК мыши, крысы, кролика и хомяка синтезируют iNOS.

Нами также было показано, что ММСК жировой ткани при культивировании в стандартных условиях не экспрессировали iNOS. В условиях сокультивирования с актМПК в ММСК происходила индукция экспрессии мРНК гена iNOS, однако белкового продукта этого гена в клетках обнаружить не удалось. Полученные данные свидетельствуют о том, что в наших экспериментальных условиях механизм подавления пролиферации актМПК с участием iNOS не активируется. Полученные нами данные подтверждаются другими исследованиями (Su J. et al., 2014).

В нашей работе также было показано, что ММСК жировой ткани экспрессируют COX-2 конститутивно при культивировании в стандартных условиях. Однако сокультивирование с актМПК приводило к возрастанию уровня экспрессии COX-2 в ММСК, что согласуется с данными, полученными другими исследователями (Chen K. et al., 2010, Kim O.H. et al., 2019, Zhang Z. et al., 2019). В условиях смешанных культур уровень экспрессии COX-2 в ММСК возрастал прямопропорционально количеству актМПК в образце и не зависел от наличия или отсутствия контактов между клетками в сокультуре. Известно, что knock-down COX-2 в ММСК малыми интерферирующими РНК, а также присутствие ингибиторов PGE2 приводит к восстановлению пролиферации актМПК (Zhang Z. et al., 2019). Таким образом, показано, что COX-2 принимает участие в подавлении пролиферации актМПК, однако молекулярные механизмы такого действия остаются непроясненными.

Известно, что транскрипция IDO, iNOS и COX-2 регулируется такими транскрипционными факторами как ядерный фактор «каппа-би» (NF κ B), регуляторный фактор интерферона 1 (IRF-1), преобразователь сигналов и активатор транскрипции STAT-1 α . Связывание IFN- γ со своим рецептором индуцирует фосфорилирование STAT-1 α через активацию тирозин-киназ JAK1 и JAK2. Фосфорилированные STAT-1 α образуют гомодимеры, которые после этого транлоцируются в ядро и связываются со специфической последовательностью

ДНК GAS в промоторе гена IRF-1, индуцируя его синтез. Транскрипционный фактор IRF-1 индуцирует синтез IDO, а также вместе с NFκβ участвует в кооперативной регуляции транскрипции iNOS (De Stefano D. et al., 2006) (рисунок 4.3).

Связывание TNF-α со своим рецептором приводит к активации сигнального пути NFκβ, которое включает связывание ряда адаптерных белков с лиганд-связанным рецепторным комплексом. Иницирующим событием является взаимодействие адаптерного DD-содержащего белка TRADD (TNFR1 - associated death domain protein) с белком TRAF (фактор, ассоциированный с рецептором фактора некроза опухолей), т.к. в TNFR1 отсутствует домен взаимодействия с TRAF. TRADD образует как проапоптотический сигнальный комплекс через рекрутирование FADD (FAS рецептор-ассоциированный домен смерти), так и провоспалительный/комплекс выживания через TRAF. TRAF рекрутирует киназный комплекс ИКК путем прямого связывания. ИКК фосфорилирует Iκβ (ингибитор κβ), который расщепляется протеасомой и освобождает NFκβ, позволяя его димерам переместиться в ядро клетки (Hayden M.S., Ghosh S., 2014). NFκβ участвует в регуляции транскрипции iNOS и COX-2 (рисунок 4.3).

Однако кинетика накопления мРНК транскрипционных факторов NFκβ, IRF-1 и STAT-1α в условиях провоспалительного микрооружения сильно различается. Так воздействие медиаторов воспаления приводит к индукции транскрипции мРНК NF-κB через 1 ч в количестве, постепенно увеличивающемся до 24 ч. Напротив, в этих же условиях уровни мРНК IRF-1 и STAT-1α наиболее высокие через 1 ч, а затем снижаются в зависимости от времени (De Stefano D. et al., 2006).

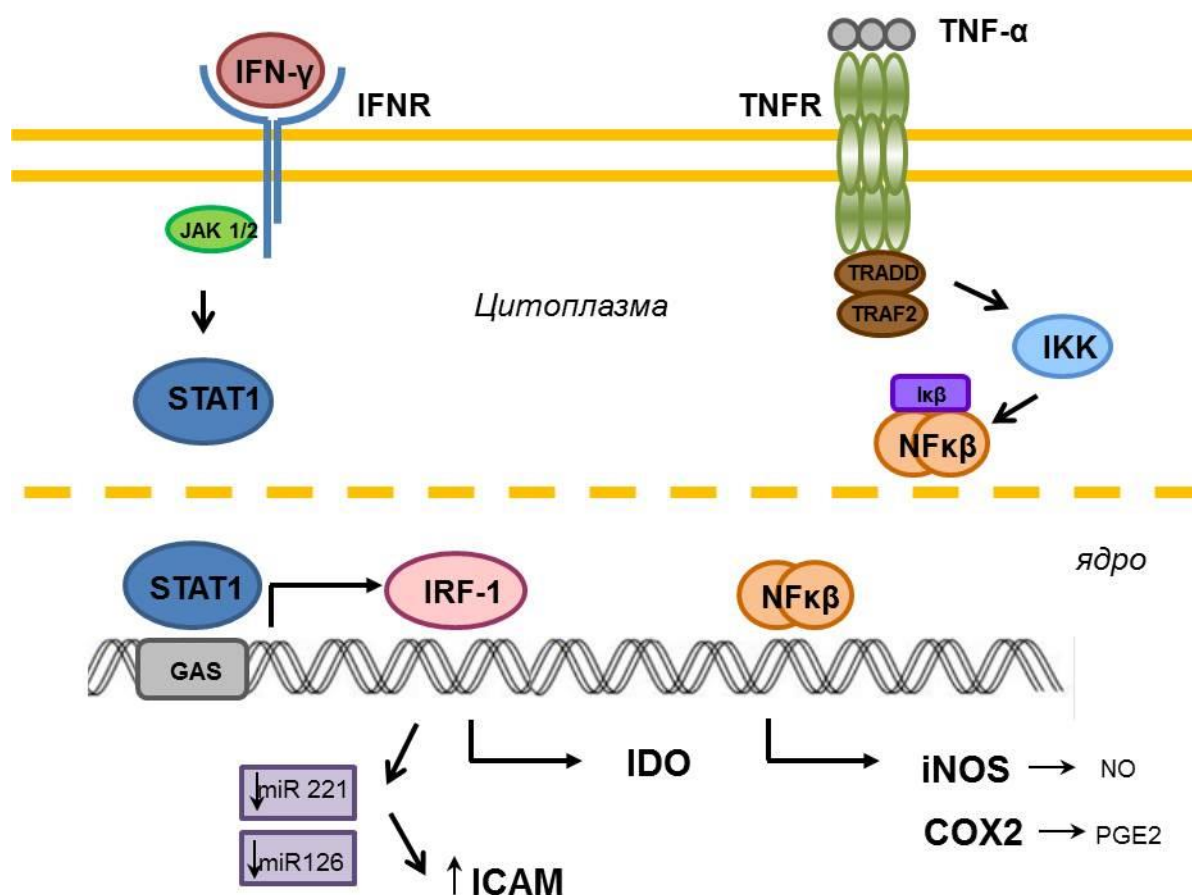


Рисунок 4.3. Молекулярные механизмы и транскрипционные факторы, вовлеченные в индукцию синтеза IDO, iNOS и COX2 в ММСК. Связывание IFN- γ со своим рецептором через активацию тирозин-киназ JAK1 и JAK2 индуцирует фосфорилирование STAT-1 α , который после этого транлоцируется в ядро и связывается с последовательностью ДНК GAS в промоторе гена IRF-1, индуцируя его синтез. Связывание TNF- α со своим рецептором приводит к активации сигнального пути NF κ B через связывание адаптерных белков TRADD и TRAF с киназным комплексом IKK, который фосфорилирует I κ B, который расщепляясь освобождает NF κ B, позволяя его димерам переместиться в ядро клетки и индуцировать синтез мРНК iNOS и COX-2.

Таким образом, полученные результаты позволяют выдвинуть предположение о том, что в условиях воспаления характер взаимодействия иммунных клеток с ММСК может влиять на индукцию альтернативных сигнальных путей, определяющих иммуномодуляторные свойства ММСК. Так контактные взаимодействия актМПК с ММСК в присутствии IFN- γ могут

запускать механизм подавления пролиферации актМПК с участием IDO. TNF- α может инициировать сигнальный каскад, приводящий к синтезу iNOS и COX-2 в ММСК. Тот факт, что в наших экспериментальных условиях сокультивирование актМПК с ММСК приводило к существенному возрастанию концентрации IFN- γ в супернатантах сокультур подтверждает возможность активации сигнального каскада, индуцирующего синтез IDO в ММСК. В тоже время сокультивирование актМПК с ММСК не приводило к существенному изменению концентрации TNF- α в супернатантах сокультур. Таким образом, вероятно в наших экспериментальных условиях в ММСК активации сигнального пути NF κ B, индуцирующего синтез iNOS, не происходило.

Проведенный нами комплексный анализ экспрессии мРНК генов, кодирующих IDO, iNOS и COX2, в ММСК и секреции ими цитокинов, позволил также установить, что интактные культивируемые ММСК конститутивно экспрессируют высокие уровни COX2, IL-8, IL-6 и MCP-1, что свидетельствует об их исходном провоспалительном фенотипе. Эти данные также подтверждают гипотезу о том, что в отсутствие воспалительной реакции ММСК могут создавать и поддерживать определенный провоспалительный баланс в тканях.

Эффект подавления пролиферации актМПК в наших экспериментальных условиях реализовывался в основном за счет растворимых факторов, синтезируемых ММСК в ответ на воздействие провоспалительного микроокружения. Однако межклеточные взаимодействия также оказывали влияние на этот эффект. Для установления роли межклеточных контактов в проявлении эффекта подавления пролиферации актМПК мы проанализировали субпопуляции актМПК, способные к образованию плотных межклеточных контактов с ММСК, в условиях контактного сокультивирования.

В нашей работе впервые было показано, что при контактном сокультивировании актМПК способны образовывать плотные адгезионные контакты с ММСК. Субпопуляционный анализ клеток, связавшихся с ММСК в условиях контактного сокультивирования показал, что в этот эффект осуществляется CD4+Т-лимфоцитами. Субпопуляции CD8+Т-лимфоцитов, В-

лимфоцитов, моноцитов, НК не участвует в этом процессе. Этот факт позволяет предположить участие контактов между CD4⁺ Т-лимфоцитами и ММСК в механизмах иммуносупрессии (Suzdaltseva Yu. G. et al., 2018).

В образовании стабильных, но при этом динамических контактов между клетками могут участвовать такие молекулы адгезии как кадгерины, селектины, PECAM-1, ICAM-1 и VCAM-1.

Полученные нами результаты показали, что экспрессия генов кадгеринов в ММСК снижается при сокультивировании с актМПК, что свидетельствует об уменьшении гомотипического взаимодействия между этими клетками и вызывает отделение их друг от друга. Этот факт может иметь отношение к предполагаемому механизму привлечения ММСК в очаг воспаления. Однако отсутствие экспрессии генов кадгеринов в актМПК указывает на то, что эти молекулы не участвуют в образовании контактов между ММСК и CD4⁺Т-лимфоцитами в наших экспериментальных условиях. Селектины, PECAM-1, ICAM-1 и VCAM-1 вовлечены в механизмы адгезии в процессах хоуминга Т-лимфоцитов и их избирательного перемещения (роллинга) в ткани. Различают несколько основных механизмов взаимодействия рецептора с лигандом, участвующих в процессе взаимодействия Т-лимфоцитов с клетками других типов: Т-клеточный LFA1 (интегрин α L β 2, CD11a/CD18) связывается с ICAM-1, Т-клеточный VLA-4 (интегрин α 4 β 1, CD49d/CD29) связывается с VCAM-1 и сиалирированные карбогидраты Т-клеток связываются с Е-селектином (Shimizu Y. et al., 1991).

Мы показали, что при контактном сокультивировании с актМПК уровень экспрессии ICAM-1 в ММСК существенно возрастал, но оставался стабильным в субпопуляции CD4⁺ Т-лимфоцитов (рисунок 3.42, в). В наших условиях сокультивирования ни актМПК, ни ММСК не синтезировали Е-селектин. А изменение уровня экспрессии VCAM-1 в ММСК при сокультивировании в контактных и бексконтактных условиях с актМПК не было статистически значимым. Известно, что провоспалительные медиаторы индуцируют синтез ICAM-1 во многих клетках (рисунок 4.3) и значительно повышают адгезию к ним

Т-лимфоцитов через LFA1 (Springer T.A., 1990; Ren G. et al., 2010). Однако повышенная способность к адгезии является следствием не увеличения уровня экспрессии этого гена, а качественными изменениями образующегося комплекса с ICAM-1 (Shimizu Y. et al., 1991). Таким образом, можно предположить, что в наших экспериментальных условиях именно взаимодействие рецепторной пары Т-клеточный LFA1 и ICAM-1, экспрессирующейся на ММСК, обеспечивало плотные контакты между клетками. Следовательно, полученные нами результаты показали, что только один из вышеперечисленных механизмов участвует в образовании плотных межклеточных контактов между активированными CD4+ Т-лимфоцитами и ММСК (Suzdaltseva Yu. G. et al., 2018).

Однако существует другой механизм, вовлеченный в образование контактных взаимодействий между активированными CD4+ Т-лимфоцитами и ММСК. Показано, что провоспалительное микроокружение, в частности, IFN- γ , вызывает в ММСК индукцию синтеза HLA-DR и костимуляторных молекул CD80/CD86, экспрессия которых характерна для дендритных клеток (Bleijds D.A. et al., 1999; Le Blanc K. et al., 2003). В наших условиях сокультивирование с актМПК тоже приводило к индукции синтеза HLA-DR и CD80/CD86 в ММСК. Взаимодействие между HLA-DR и CD80/CD86, экспрессирующимися на ММСК, и TCR и CTLA4/CD28, экспрессирующимися на поверхности CD4+ Т-лимфоцитов, может участвовать в установлении контактов между этими клетками и в наших условиях.

Таким образом, в нашей работе впервые было показано, что образование адгезионных межклеточных контактов между CD4+ Т-лимфоцитами и с ММСК происходит в результате взаимодействия рецепторных пар CTLA4/CD28 на поверхности CD4+Т-лимфоцитов и CD80/CD86 на ММСК и Т-клеточного LFA1 и ICAM-1 на ММСК.

Известно, что IFN- γ и дополнительный сигнал в виде лигирования рецепторных пар CD80/CD86 и CTLA4/CD28 необходимы для индукции функциональной активности IDO в дендритных клетках (Munn D.H. et al., 2004). Активность фермента IDO, катализирующего превращение незаменимой

аминокислоты триптофана в кинуренин, является одним из механизмов подавления пролиферации активированных лимфоцитов и обеспечивает супрессию нежелательного Т-клеточного ответа (Munn D.H. et al., 1999). Показано, что IFN- γ индуцирует синтез IDO и в ММСК жировой ткани (DelaRosa O. et al., 2009, Torres Crigna A., et al., 2020).

Проведенные нами эксперименты показали, что установление контактов между ММСК и активированными CD4⁺ Т-лимфоцитами может приводить к активации механизма подавления пролиферации активированных лимфоцитов, сходного с дендритными клетками. В нем могут участвовать контакты, образованные взаимодействием как рецепторной пары Т-клеточный LFA1 и ICAM-1 на ММСК, так и CTLA4/CD28 на поверхности CD4⁺ Т-лимфоцитов и CD80/CD86 на ММСК (Suzdaltseva Yu. G. et al., 2018).

Мы показали, что сокультивирование актМПК с ММСК в контактных условиях приводило к значительному повышению концентраций IFN- γ в супернатанте (рисунок 3.44) и одновременно происходило повышение уровня экспрессии гена ICAM-1 в ММСК (рисунок 3.42, а, б). Известно, что взаимодействие рецепторной пары Т-клеточный LFA1 и ICAM1 играет важную роль в усилении синтеза IFN- γ в МПК (Bleijis D.A. et al., 1999; Yoshida A. et al., 2002). Полученные нами результаты согласуются с данными из литературы (Cuerquis J. et al., 2014) о том, что подавлению пролиферации актМПК при сокультивировании с ММСК предшествует значительное повышение концентрации IFN- γ в супернатанте в ранний период, которая при дальнейшем сокультивировании снижается. В аналогичных условиях нами обнаружена индукция синтеза IDO в ММСК (рисунок 3.45) и максимальное подавление пролиферации актМПК (рисунок 3.32). Однако нами показано, что блокирование экспонированной на поверхности ММСК молекулы ICAM-1 специфическими антителами не влияет на уровень экспрессии IDO в ММСК (рисунок 3.46) (Suzdaltseva Yu. G. et al., 2018).

Следовательно, установление контактов между ММСК и CD4⁺ Т-лимфоцитами через CD80/CD86 и CTLA4/CD28 играет основную роль в

индукции синтеза и функциональной активности IDO в ММСК, а связывание рецепторной пары Т-клеточный LFA1 и ICAM-1 может играть как прямую, так и опосредованную роль в индукции синтеза IDO через воздействие IFN- γ . Таким образом, мы впервые показали, что в ММСК осуществляется перекрестная регуляция экспрессии IDO при взаимодействии с активированными CD4⁺ Т-лимфоцитами с участием их контактных взаимодействий с ММСК и растворимых факторов (рисунок 4.4).

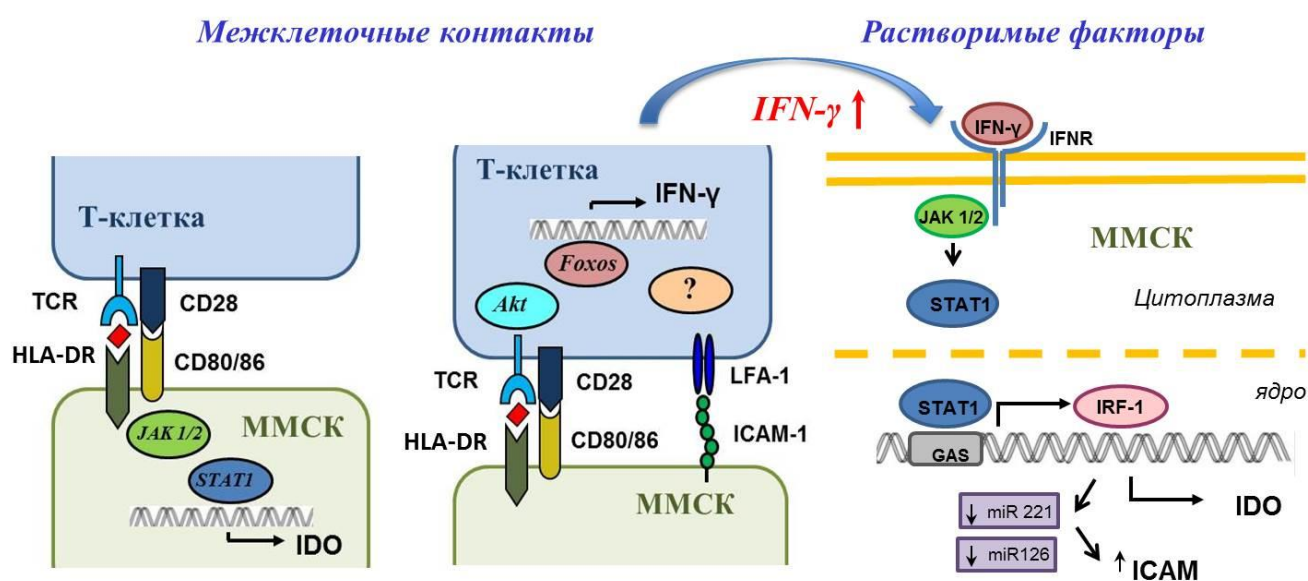


Рисунок 4.4. Перекрестная регуляция экспрессии IDO при взаимодействии с активированными CD4⁺ Т-лимфоцитами. Взаимодействие рецепторных пар HLA-DR и костимуляторных молекул CD80/CD86 на ММСК и Т-клеточных рецепторов (TCR) и CTLA4/CD28 на Т-лимфоцитах вызывают индукцию синтеза и функциональной активности IDO в МСК. Связывание рецепторной пары ICAM-1 на ММСК с молекулой LFA-1 на поверхности Т-лимфоцитов, приводит к увеличению продукции IFN- γ клетками. Связывание IFN- γ со своим рецептором через фосфорилирование STAT-1 α индуцирует синтез транскрипционного фактора IRF-1, регулирующего индукцию синтеза IDO в ММСК.

Воздействие растворимого IFN- γ и взаимодействие рецепторов на поверхности ММСК и CD4⁺ Т-лимфоцитах образуют регуляторную петлю с положительной обратной связью, способствующую снижению активации и пролиферации активированных иммунных клеток и затуханию воспалительной реакции (рис. 4.5).

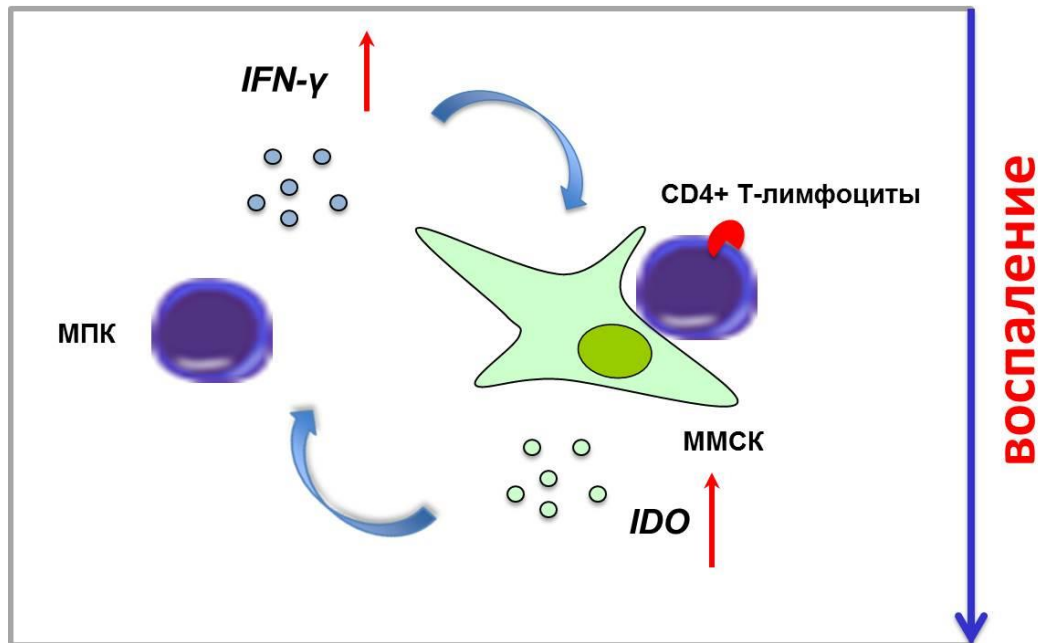


Рисунок 4.5. Регуляторная петля с положительной обратной связью, образуемая растворимым фактором $IFN-\gamma$ и адгезивным взаимодействием между ММСК и $CD4+$ Т-лимфоцитами, способствующая затуханию воспалительной реакции.

Таким образом, проведенные эксперименты показали, что ММСК, выделенные из различных источников и прошедшие лабораторный процессинг, обладают высокой пролиферативной активностью в культуре, значительным дифференцировочным потенциалом, множественными паракринными эффектами, выраженными иммуномодулирующими свойствами. Также были исследованы потенциальные молекулярные механизмы, посредством которых ММСК осуществляют регуляцию гомеостаза и воспаления ткани. Такие свойства ММСК обосновывают их применение при заболеваниях, связанных с нарушением течения воспалительных процессов (например, при длительно незаживающих ранах) и делают их весьма перспективными объектами для создания лекарственных препаратов, которые могут быть использованы для коррекции заболеваний, неподдающихся лечению стандартными методами, и для успешного применения в регенеративной медицине (Usovetskii I. A. et al., 2009, Ефименко А.Ю. др., 2011, Акопян Ж.А. и др., 2011, Manturova N.E. et al., 2018, Jung K.W., 2009, Galipeau J., Sensébé L., 2018).

Предложенные нами подходы и отработанные методики позволили получить стандартизованные клеточные препараты ММСК, отвечающие международным стандартам, с использованием определенных технологических процедур получения и контроля качества, включающих выделение клеток из биопсии, культивирование *in vitro*, контроль жизнеспособности и инфекционной безопасности, исследование на соответствие параметров и критериев ISCT, наращивание необходимого количества клеток.

В качестве источника получения ММСК для создания прототипа клеточного препарата была предложена пуповина (Вартонов студень) человека после нормальных родов на 38-40 неделе гестации как альтернатива использованию традиционных источников (таких, как костный мозг, жировая ткань, кожа, и т.д.). Использование пуповины в качестве источника получения клеток не имеет морально-этических препятствий, т. к. пуповина забирается после нормальных родов. В этом случае возникают наименьшие препятствия с поиском здоровых доноров, дающих добровольное информированное согласие. Культуры ММСК пуповины являются более технологичными по сравнению с культурами ММСК из костного мозга, жира, кожи, легко поддаются стандартизации. ММСК пуповины новорожденного также выгодно отличаются от ММСК взрослого человека относительно высоким содержанием прогениторных клеток, экспрессирующих нестин и *c-kit*. В наших условиях полученные ММСК пуповины обладали более высокой пролиферативной активностью в культуре, которая позволяла быстро нарастить необходимое количество клеток. Полученные ММСК пуповины были охарактеризованы по цитофенотипическим признакам и по способности к дифференцировке в жировую, хрящевую и костную ткань, проверены на инфекционную безопасность.

Были проведены доклинические токсикологические испытания суспензии ММСК пуповины на животных при подкожном введении. Во всех проведенных экспериментах отмечалось, что введение препарата ММСК в форме суспензии не вызывало у подопытных животных интоксикацию и гибель, не оказывало

мутагенного, эмбриотоксического и тератогенного действия, и не влияло на репродуктивные функции (Суздальцева Ю.Г. и др., 2011).

Однако при выборе животных моделей для оценки эффективности ММСК пуповины в случае длительно незаживающих ран возникли определенные проблемы. До настоящего времени не существует адекватных стандартизированных животных моделей для изучения механизмов хронического воспаления и доклинического тестирования различных препаратов. Многочисленные нестандартизированные их вариации существенно затрудняют интерпретацию результатов и сравнительный анализ существующих данных, т.к. на очень сложный биологический процесс влияют возраст, половые различия, нарушения метаболизма, стадии развития диабета и т.д. (Ansell D.M. et al., 2018, Elliot S. et al., 2018).

Животные модели заживления ран (на грызунах, овцах и свиньях) широко используются для изучения и тестирования новых терапевтических субстанций (Samia D.G. et al., 2019, Rodriguez-Menocal L. et al., 2015, Pelizzo G. et al., 2015, Kato Y. et al., 2017, Martinello T. et al., 2018).

Кожа грызунов существенно отличается от кожи человека и характеризуется тонким эпидермисом, густым волосяным покровом, отсутствием потовых желез, а также наличием подкожной мышцы *ranniculus carnosus*, которая способствует быстрому сокращению раны. Однако низкая стоимость, доступность и небольшой размер грызунов делают их подходящими для крупномасштабных исследований, снижающих статистические ошибки.

Свиньи также являются хорошими моделями для изучения заживления ран, а также других заболеваний, из-за физиологического и анатомического сходства с людьми. Кожа свиньи обладает толстыми слоями эпидермиса и дермы, редкой шерстью, потовыми железами, и заживление ран происходит за счет реэпителизации. Однако, в отличие от человека, у свиней дерма хуже васкуляризирована. Несмотря на сходство, свиньи не часто используются для доклинических исследований из-за их высокой стоимости и необходимости в больших экспериментальных площадях.

На грызунах разработаны различные модели заживления постоперационных острых и хронических (диабетических) ран. Так же существуют несколько моделей кожных язв, вызываемых радиационным облучением, ишемией (с использованием магнитов, силиконовых колец и подложек, металлических камер). Помимо этого, грызуны используются для изучения заживления ожоговых ран (Samia D.G. et al., 2019, Henriksen J.L. et al., 2020).

Постоперационные раны являются наиболее распространенной моделью, используемой в изучении заживления ран. Для преодоления проблемы контракции ран у грызунов вследствие сокращения мышцы *ranniculus carnosus*, некоторые исследователи используют силиконовые кольца. Однако такая модель подходит для оценки заживления острых ран, поскольку сосуды остаются неповрежденными, и эпителизация проходит в нормальные сроки (Nascimento-Filho S.H.V. et al., 2020). Для имитации процесса заживления хронических ран используются постоперационные раны животных, больных диабетом (Kato Y. et al., 2017). Однако такая модель не подходит для изучения заживления хронических ран, вызванных ишемией, или травм, вызванных повторяющимся напряжением.

Дополнительно к вышеуказанным ограничениям, осложняющим анализ результатов доклинических исследований эффективности ММСК человека с использованием грызунов в качестве моделей, появились новые данные о видовых различиях в молекулярных механизмах иммуномодулирующего действия ММСК у млекопитающих. Так, в ответ на провоспалительные стимулы для подавления иммунных ответов ММСК грызунов синтезируют iNOS. В то же время основным механизмом иммуносупрессивного действия ММСК обезьяны, свиньи и человека является индукция синтеза IDO (Su J. et al., 2014).

В нашей работе в доклинических экспериментах мы проводили оценку влияния ММСК пуповины человека на скорость и характер заживления на модели полнослойных кожных ран у крыс пострепродуктивного периода (Silina E.V. et al., 2021). Выбор крыс такого возрастного периода был обусловлен теми соображениями, что проблемы заживления ран у млекопитающих усугубляются

при старении. Мы также учитывали опыт предыдущих подобных доклинических исследований с использованием ММСК человека (Rodriguez-Menocal L. et al., 2015, Millán-Rivero J.E. et al., 2019, Bi H et al., 2019, Park J et al., 2018, Ramos-Gonzalez G. et al., 2020), а также экономическую целесообразность.

Предварительные исследования на животных показали, что введение ММСК из костного мозга и жировой ткани способствует заживлению полнослойных кожных ран у мышей (Wu Y. et al, 2007, Lee S.H. et al., 2011, Rodriguez-Menocal L. et al., 2015), крыс (Kato Y. et al., 2017), кроликов (Pelizzo G. et al., 2015), овец (Martinello T. et al., 2018). В мышинной модели диабета также было показано улучшение заживления ран после подкожного введения ММСК пуповины человека. При этом в данных экспериментах введение кондиционированной среды от культуры ММСК пуповины оказывало еще более лучший и быстрый эффект после по сравнению с трансплантацией клеток (Shrestha C. et al., 2013).

Проведенные нами доклинические исследования показали, что введение ММСК пуповины человека оказывает положительное влияние на скорость заживления полнослойных кожных ран у крыс. Подобные данные в животных моделях получали также другие исследователи (Lee Y.S. et al., 2016, Su W.H. et al., 2019, Yang Y. et al., 2020). В проведенных экспериментах ММСК стимулировали более быстрый переход от фазы экссудации к фазе пролиферации. Гистологически в группе ММСК была выявлена более быстрая эпителизация раневой поверхности по длине и количеству слоев многослойного плоского эпителия по сравнению с контролем. Было показано, что в группе ММСК скорость заживления ран была выше, чем в контроле. Эти факты свидетельствуют о том, что введение ММСК оказывает позитивный эффект на заживление ран у крыс. Поскольку гистологическое исследование не выявило значимых различий в пропорции лейкоцитов и фибробластов в области ран между группами на этих сроках, можно предположить, что такой эффект может быть обусловлен системным общестимулирующим действием ММСК на организм крыс, приводящим к ускорению заживления ран (Silina E.V. et al., 2021). Это

предположение было подтверждено последующими нашими экспериментами на крысах, в которых раны наносились по обе стороны спины, но инъекцию ММСК в область ран проводили только с одной стороны. Рана на противоположной стороне того же животного служила для оценки отдаленного (общего, системного) эффекта от введения ММСК (Silina E. et al., 2021). В этих экспериментах было показано, что местное введение ММСК в область раны с одной стороны спины оказывало сопоставимый положительный эффект на динамику заживления ран с противоположной стороны спины, а также по сравнению с контрольной группой животных.

Таким образом, результаты проведенных доклинических токсикологических исследований препарата ММСК в форме суспензии показали его безопасность и возможность использования в клинических исследованиях с участием человека. В результате проведенных доклинических исследований эффективности препарата ММСК на модели заживления полнослойных кожных ран у крыс впервые было показано, что введение ММСК может оказывать как местное противовоспалительное, так и отдаленное общестимулирующее действие на организм, приводящее к стимуляции регенеративных процессов в тканях.

У людей длительно незаживающие или хронические раны, вызванные невропатией, ишемией, травмой или смешанной патологией часто трудно поддаются лечению. Основная цель лечения такого рода ран заключается в закрытии раны в максимально быстрые сроки. Однако, несмотря на использование различных современных методов терапии, хронические раны часто заживают долго. Предыдущие исследования показали, что ММСК из костного мозга и жировой ткани способны способствовать заживлению кожных ран у животных (Lee S.H. et al., 2011, Rodriguez-Menocal L. et al., 2015, Pelizzo G. et al., 2015) и пациентов с хроническими ранами (Akita S. et al., 2012, Otero G. et al., 2019).

Наше клиническое исследование было посвящено оценке безопасности и эффективности локального введения ММСК пуповины у пациентов с длительно незаживающими ранами.

Недавно опубликованный мета-анализ, подводящий итог безопасности трансплантации ММСК в 36 проспективных клинических исследованиях, показал отсутствие связи между лечением ММСК и развитием острой инфузионной токсичности, осложнений со стороны системы органов, инфекции, смерти или злокачественного новообразования (Lalu M.M. et al., 2012). Наше исследование также не обнаружило никаких неблагоприятных последствий, связанных с однократной подкожной инфузией ММСК пуповины у здоровых пациентов. В I фазе клинических исследований с участием здоровых добровольцев было установлено, что подкожные инъекции суспензии ММСК пуповины не приводили к появлению нежелательных реакций местного и системного характера. Следовательно, местное введение суспензии ММСК пуповины может быть квалифицировано как безопасная процедура лечения.

Предыдущие клинические исследования, изучающие эффективность терапии ММСК у пациентов с различными острыми и хроническими повреждениями кожи, такими как диабетические язвы кожи, радиация и термические ожоги, показали улучшение заживления ран в течение нескольких дней после введения ММСК, характеризующееся уменьшением площади раны, увеличением кровотока в сосудистой сети дермы и увеличением толщины кожи в раневом ложе (Akita S. et al., 2012, Otero G. et al., 2019, Vojtassák J. et al., 2006, Lu D. et al., 2011). В этих исследованиях тип ММСК, используемых для лечения хронических ран широко варьировался: культивируемые ММСК костного мозга и жировой ткани, моноклеарные клетки костного мозга и стромальная сосудистая фракция, полученная из жировой ткани. Количество введенных клеток, пути введения, оценка заживления раны время наблюдения также существенно различался по всем исследованиям. В настоящее время нет опубликованных результатов клинических исследований с использованием ММСК пуповины для терапии хронических ран. Мы впервые провели открытое рандомизированное плацебо-контролируемое клиническое исследование, в котором суспензия ММСК пуповины была впервые использована для лечения длительно незаживающих ран. В исследовании приняло участие 108 пациентов, имевших хронические раны

различной этиологии, которые были рандомизированы в группу клеточной терапии (59 человек) и группу плацебо (49 человек) согласно критериям включения и исключения. Наше исследование продемонстрировало, что местное введение ММСК пуповины у пациентов с длительно незаживающими ранами индуцирует активный рост грануляционной ткани и увеличивает кровообращение и насыщение кислородом окolorаневых тканей, тем самым способствуя реэпителизации и ускорению заживления ран по сравнению с группой плацебо. Было показано, что местное введение ММСК пуповины оказывает наилучший эффект у пациентов с поражением микроциркуляторного русла (с синдромом диабетической стопы и язвами, вызванными многоуровневыми окклюзиями артерий малого калибра, которые не могли быть удалены хирургическим путем). У таких пациентов раны заживали самостоятельно. У пациентов с язвами, вызванными поражением крупных сосудов, эффект от местного введения ММСК был меньшим или отсутствовал. У пациентов с обширными ранами образование грануляционной ткани позволяло осуществить успешную аутодермопластику расщепленным лоскутом. Анализ отдаленных результатов (в течение года) у пациентов, проходивших терапию ММСК пуповины, показал, что в большинстве случаев такое лечение приводило к полному заживлению ран или значительному уменьшению площадей ран без каких-либо рецидивов. Успех лечения ММСК пуповины также значительно зависел от начального размера раны / язвы, стадии, степени нарушения гемодинамики в артериях нижних конечностей и уровня бактериальной инфекции. Таким образом, было установлено, что введение ММСК приводит к активизации регенеративных процессов в хронических раневых дефектах и приводит к значимому, статистически достоверному ускорению заживления ран в группе клеточной терапии по сравнению с контрольной группой в отмеченный период времени.

Для объяснения благоприятного эффекта терапии ММСК пуповины в случае длительно незаживающих ран и язв, предлагается множество механизмов, включая трофические эффекты, дифференцировку клеток, неоваскуляризацию и иммуномодулирующее действие.

Трофические эффекты реализуются путем секреции ММСК пуповины факторов роста, включая PDGF, TGF- β и bFGF [Rehman J. et al., 2004, Dabrowska S. et al., 2018, Wang S. et al., 2018). Секретируемые ММСК пуповины матриксные белки (в частности такие, как фибронектин и коллаген) создают благоприятное микроокружение для роста эпителия (Eckes B. et al., 2010, Jiang Z., 2017).

Способность ММСК пуповины дифференцироваться в остеобласты, хондроциты, миоциты и адипоциты хорошо описана *in vitro* (Suzdal'tseva Y. G. et al., 2007, Wu M. et al., 2018, Guan Y.T. et al., 2019). Однако их мультипотентность в случае трансплантации *in vivo* до сих пор еще не была четко продемонстрирована. Кроме того, физиологическая способность их дифференцировки в дополнительные линии, включая кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, гепатоциты, нервные клетки, кератиноциты, фиброциты, эндотелиальные клетки и перициты еще предстоит определить. Однако очевидно, что этот механизм ускорения процесса заживления раны не может быть проигнорирован.

Неоваскуляризация необходима для роста и поддержания грануляционной ткани, формирование которой является одним из важнейших процессов заживления ран. Предыдущие исследования показали, что ММСК пуповины могут усиливать ангиогенез, способствуя образованию капилляроподобных структур *in vitro* или путем увеличения капиллярной плотности *in vivo* через секрецию KGF, PDGF и хемокины (Shrestha C. et al., 2013, Arutyunyan I. et al., 2016, Bartolucci J. et al., 2017). Интересным является тот факт, что ММСК пуповины секретируют проангиогенные факторы (в частности VEGF) на очень низком уровне (Arutyunyan I. et al., 2016). Их проангиогенный потенциал реализуется с помощью паракринного механизма, но без участия VEGF. Этот факт свидетельствует в пользу иммуномодулирующего действия ММСК пуповины при введении в область хронического воспаления.

Эксперименты *in vitro* показали, что ММСК пуповины, костного мозга и жировой ткани обладают способностью снижать экспрессию провоспалительных цитокинов иммунными клетками (Yoo K.H. et al., 2009, Jiang X.X. et al., 2005,

Nauta A.J. et al., 2006), а также подавлять пролиферацию активированных Т-лимфоцитов (Rasmusson I., 2006, Manochantr S. et al., 2013, He H. et al., 2015). Они также способны подавлять дифференцировку и созревание ДК (Beyth S. et al., 2005, English K. et al., 2008) и опосредовать индукцию регуляторного фенотипа в активированных Т-лимфоцитах (Treg) (Maccario R. et al., 2005, English K. et al., 2009). Возможно, иммуномодулирующие функции ММСК могут меняться в естественных условиях, когда ММСК пациента мигрируют в место воспаления из соседних или отдаленных тканей и/или размножаются там. Иммуномодулирующие функции ММСК пациента могут также меняться и в том случае, когда культивированные *ex vivo* аллогенные ММСК вводят в область воспаления. Более того, потенциал аутологичных ММСК может быть ослаблен у пациентов с хроническими системными болезнями и введение экзогенных аллогенных ММСК может улучшить функции эндотелия и сосудистую реактивность путем стимуляции мобилизации эндогенных эндотелиальных клеток-предшественников (Bartolucci J. et al., 2017, Kuo Y.R. et al., 2016), а также путем индукции появления альтернативно активированных противовоспалительных макрофагов.

Последнее предположение подтверждается следующими соображениями. Известно, что клеточный состав и цитокиновое микроокружение при остром и хроническом воспалении принципиально отличаются. Основными клетками острого воспаления являются нейтрофилы, которые очищают рану от обломков внеклеточного матрикса и патогенов. Они секретируют хемоаттрактанты и образуют пероксид водорода, которые привлекают в очаг воспаления моноциты, активируют их, вызывая дифференцировку в макрофаги. Макрофаги являются ключевыми клетками, определяющими эффективность воспалительного процесса и переход к последующей фазе пролиферации. В фазе воспаления макрофаги с функциональным фенотипом М1 фагоцитируют отработавшие нейтрофилы и секретируют провоспалительные медиаторы IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18, IL-23, TNF- α . В дальнейшем макрофаги приобретают противовоспалительный фенотип М2 и выделяют противовоспалительные цитокины IL-10, CCL-17, CCL-18, CCL22,

CCL24, EGF, TGF β , IGF1 (Mantovani A. et al., 2013) (рисунок 4.6, а). Так было показано, что реципрокная перекрестная активация сигнальных путей NF- κ B и STAT3 в макрофагах может модулировать баланс M1/M2 и координировать реакции на различное микроокружение; активация NF- κ B может индуцировать воспалительный фенотип M1, а активация STAT3 важна для противовоспалительной конверсии M2 (Gao S. et al., 2014, Motwani M.P., Gilroy D.W., 2015, Ti D. et al., 2015)(рисунок 4.6, б). В случае, когда под воздействием каких-либо факторов блокируется переход макрофагов в противовоспалительное состояние, фаза острого воспаления затягивается, формируется клеточный инфильтрат, состоящий из активированных макрофагов с провоспалительным фенотипом M1, развивается хроническое воспаление (Hesketh M. et al., 2017). В такой ситуации смещение провоспалительного цитокинового профиля в сторону противовоспалительного, который и способствует заживлению ран, требует принудительного вмешательства (Alvarez M.M. et al., 2016) (рисунок 4.6, в).

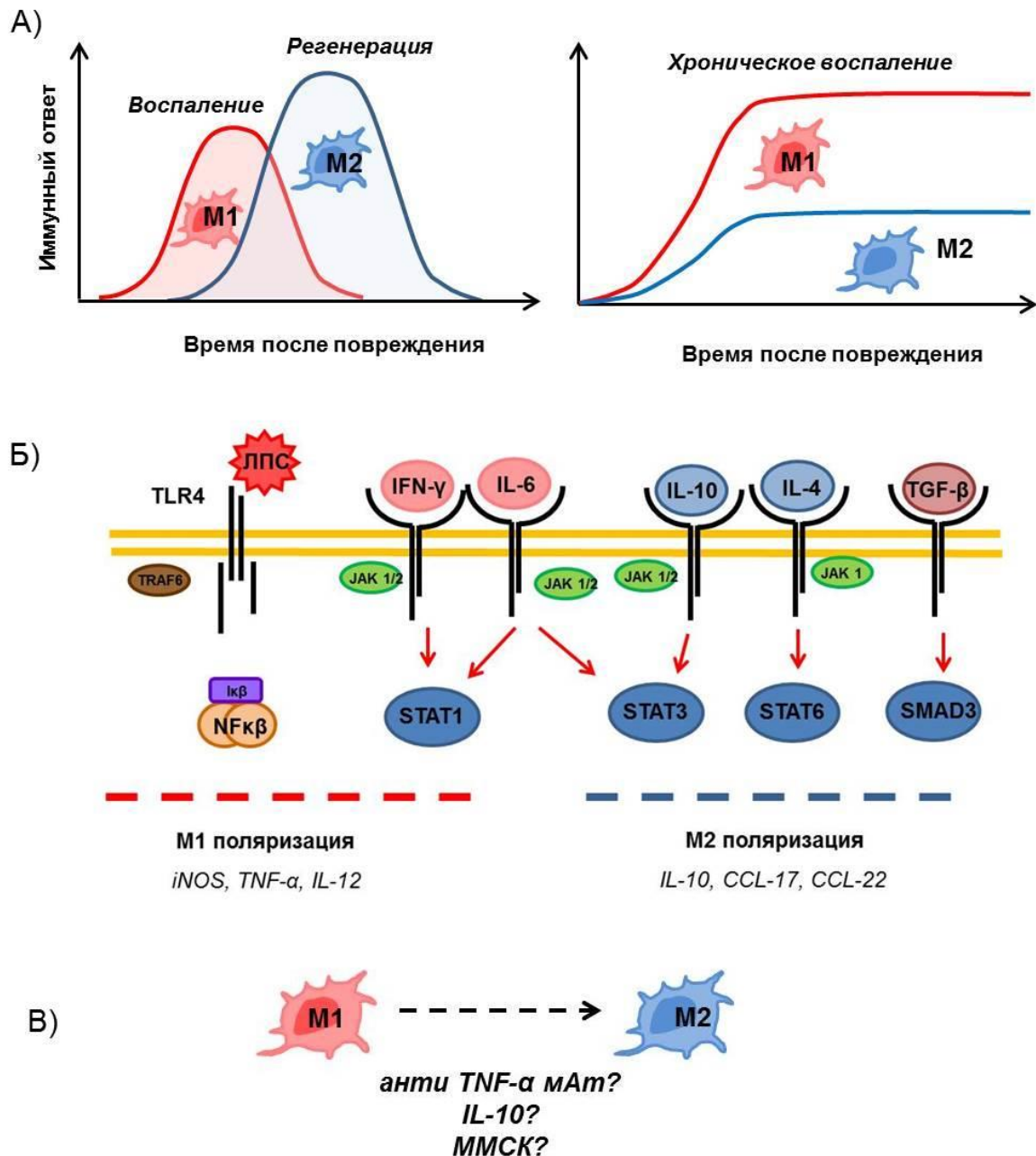


Рисунок 4.6. Баланс макрофагов M1/M2 в условиях воспаления. А)- динамика накопления макрофагов M1 и M2 в очагах острого и хронического воспаления. Б)- реципрокная перекрестная активация сигнальных путей NF- κ B и STAT3 в макрофагах модулирует баланс M1/M2. В) - Стратегия контроля воспалительного процесса - смещение баланса макрофагов в пользу M2. ЛПС – липополисахарид; mAb – моноклональные антитела.

Ранее было показано, что MMCK синтезируют IL-6, который участвует в регуляции дифференцировки моноцитов в сторону клеток, экспрессирующих IL-10. Нейтрализация IL-6 приводит к блокированию иммуносупрессивного эффекта, опосредованного MMCK. MMCK не продуцируют IL-10. Под воздействием IL-6 в

моноцитах индуцируется синтез IL-10, что приводит к усилению иммуносупрессивного эффекта ММСК (Melief S.M. et al., 2013a, Deng Y. et al., 2016). Было также показано, что сокультивирование моноцитов с ММСК приводит к снижению продукции IL-12 и TNF- α (Kim J., Hematti P., 2009). Эксперименты с бесконтактным сокультивированием ММСК и моноцитов показали, что индукция дифференцировки моноцитов осуществляется за счет растворимых факторов, синтезируемых ММСК. Межклеточные контакты не принимают участия в этом процессе (Melief S.M. et al., 2013). Растворимые факторы, синтезируемые ММСК, вызывают изменения в экспрессии поверхностных маркеров моноцитами и, следовательно, их иммунную функцию. Так показано, что ММСК вызывают селективный апоптоз провоспалительных CD14+CD16+ моноцитов, синтезирующих TNF- α and IL-12, и участвующих в развитии острого и хронического воспаления и увеличивают количество моноцитов, синтезирующих CD90+ и PD-L1+ (Gonçalves F.D.C. et al., 2017). Было также установлено, что сокультивирование с ММСК приводит к увеличению субпопуляции альтернативно активированных противовоспалительных CD206+CD163+ моноцитов, принимающих важное участие в образовании CD4+CD25+FoxP3+ Трег лимфоцитов. Так было показано, что при сокультивировании ММСК смещают поляризацию полученных макрофагов к особому функциональному фенотипу, отличающемуся от классического фенотипа M2. Такие альтернативно активированные макрофаги характеризуются высоким уровнем экспрессии фагоцитарных рецепторов CD206 и CD163 (Melief S.M. et al., 2013b), а также секреции IL-10 и TGF- β . Такие макрофаги подавляют экспрессию маркеров активации естественных киллерных клеток (НК) NKp44, CD69 и CD25, подавляют пролиферацию CD8+ Т- лимфоцитов, способствуют индукции CD25^{high}Foxp3⁺ Трег- лимфоцитов, а также подавляют секрецию IFN- γ (Chiossone L. et al., 2016).

Нами также было показано, что при сокультивировании с актМПК ММСК *in vitro* вызывают повышение экспрессии IL-6. В тоже время экспрессия TNF- α and IL-12 не изменяется. Эти факты косвенно свидетельствуют о том, что при

введении ММСК в очаг хронического воспаления могут вызывать активацию альтернативного фенотипа тканевых макрофагов, предотвращая развитие хронического воспаления и смещая баланс в пользу регенерации. Такое предположение подтверждается экспериментальными данными, полученными Arutyunyan I. et al. (2015), на модели ишемии задней конечности крыс, которые показали, что аллогенная внутримышечная трансплантация ММСК пуповины стимулирует образование и активацию прорегенераторных M2 макрофагов в ткани.

Положительный эффект терапии ММСК в лечении длительно незаживающих ран, выражающийся в активизации репаративных процессов в хроническом раневом дефекте, может быть также объяснен паракринным действием ММСК, которые экспрессируют ростовые факторы, приводящие к улучшению трофики в тканях, а также матриксные белки (такие как фибронектин, коллаген), создающие благоприятное для роста эпителия микроокружение (Amable P.R. et al., 2014, Pereira T. et al., 2014, Baberg F. et al., 2019, Yuan O. et al., 2019, Islam A. et al., 2019).

Можно предположить, что иммуномодулирующие свойства ММСК изменяются в условиях *in vivo*, проявляясь и усиливаясь с увеличением доли этих клеток в участке воспаления. Это может происходить при миграции ММСК в очаг воспаления из прилегающих или отдаленных тканей (например, костного мозга) и/или их пролиферации или при введении в организм пациента ММСК, культивированных *ex vivo*. Существующие сейчас данные о регенеративном потенциале ММСК позволяют предположить, что неспособность тканей к полноценному завершению воспаления с переходом в стадию грануляции и развитие хронического воспаления связаны отчасти с недостаточной численностью и/или функциональной активностью ММСК в очаге воспаления. Предотвращая развитие хронического воспаления в очаге повреждения, ММСК могут вносить критический вклад в полноценность восстановления ткани.

Тем не менее, взятые вместе данные доклинических и клинических испытаний продемонстрировали, что ММСК являются эффективным и

безопасным средством для лечения длительно незаживающих ран. ММСК, введенные в область хронического воспаления, могут способствовать заживлению. Таким образом, ММСК предоставляют новые возможности для регенеративной медицины.

С другой стороны известно, что у человека регенеративный потенциал снижается с возрастом. У взрослого человека обычно заживление поврежденной ткани сопровождается образованием рубца. Современные лекарственные средства способны стимулировать процессы регенерации, однако не способствуют полноценному восстановлению исходной структуры тканей и органов, измененных в результате повреждения. В отличие от взрослых, фетальные ткани способны к полной регенерации. Известно, что у плодов человека до третьего семестра гестации регенерация тканей после повреждения происходит в условиях сниженной воспалительной реакции с полным восстановлением первоначальной архитектуры и функциональной активности (Colwell A.S. et al., 2003, Helmo F.R. et al., 2013). Учитывая ключевую роль ММСК в процессах регуляции регенерации поврежденных тканей во взрослом организме, естественный интерес вызывает изучение особенностей функционирования предшественников ММСК (например, клеток параксиальной мезодермы эмбриона человека) в условиях моделирования воспалительного микроокружения. Такой подход позволил бы идентифицировать ключевые молекулы и факторы, играющие критическую роль в регуляции процессов регенерации, соответствующих ранним стадиям развития организма. Однако в настоящее время молекулярные механизмы регенерации тканей на ранних стадиях развития человека остаются практически неизвестными. Подобные исследования сдерживаются ограничениями морально-этического плана в отношении материала и объектов для изучения.

Революционные технологии репрограммирования соматических клеток человека факторами Oct3/4, Sox2, Klf4, and c-Myc в плюрипотентное состояние, сходное с эмбриональными стволовыми клетками (Takahashi K. et al., 2007), предоставляют потенциальную возможность для получения клеток, соответствующих различным стадиям развития организма. Применение

комбинаций экзогенных специфических ингибиторов, факторов роста и биологически активных низкомолекулярных соединений для дифференцировки клеток с индуцированной плюрипотентностью позволяет воспроизвести процессы эмбрионального развития и создать клеточные модели для изучения молекулярных механизмов регенерации на различных стадиях развития организма, в частности клеток параксиальной мезодермы и зрелых ММСК из одного источника.

В настоящее время описаны методы прямого дифференцирования ИПСК в зрелые ММСК (Zhang J. et al., 2015, Sheyn D. et al., 2016, Villa-Diaz L.G. et al., 2012). Недавно были предприняты попытки дифференцировать ИПСК в клетки мезодермы с помощью двухстадийного протокола, в результате которого сначала получали клетки с фенотипом PDGDR α + / VEGFR2-, которые являются предшественниками ММСК. Затем отсортированные клетки PDGDR α + / VEGFR2- подвергали дифференцировке в зрелые ММСК (Eto S. et al., 2018).

В этой работе мы предприняли попытку репрограммирования ММСК факторами Oct3/4, Sox2, Klf4, and c-Myc в плюрипотентное состояние (ИПСК). Полученные ИПСК были охарактеризованы по морфологии, поверхностным антигенам (SSEA4, TRA-1-60/81), экспрессии транскрипционных факторов (OCT4, NANOG, SOX2) и способности в процессе дифференцировки *in vitro* экспрессировать маркеры эктодермы (PAX6, SOX1), энтодермы (CXCR4 и SOX17) и мезодермы (RUNX1, BRY). Затем полученные ИПСК были дифференцированы в клетки параксиальной мезодермы под воздействием комбинаций ингибитора Rho киназы, активина А, факторов роста bFGF и BMP-4, биологически активных низкомолекулярных соединений LY294002 и CHIR99021, которые были охарактеризованы по экспрессии маркеров BRY, Snail, TBX6, MIXL1. Клетки параксиальной мезодермы затем были дифференцированы в зрелые ММСК посредством культивирования в среде, содержащей эмбриональную сыворотку телят, которые были охарактеризованы по экспрессии поверхностных маркеров CD73, CD90, CD105, отсутствию экспрессии маркеров CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79alpha, CD19 и HLA-DR, и по

способности к дифференцировке в адипогенном, хондрогенном и остеогенном направлении. Примененный нами подход позволил воспроизвести процессы эмбрионального развития и предоставил возможность получения линий клеток параксиальной мезодермы и зрелых ММСК из одного источника. Такие клеточные модели ММСК на основе ИПСК человека позволят изучать особенности механизмов регенерации тканей на разных стадиях развития организма. Несмотря на то, что особенности функциональной активности предшественников ММСК в ранней мезодерме по сравнению с ММСК взрослого организма еще предстоит изучить, используя подходы, описанные выше, наши предварительные данные, согласующиеся с полученными ранее, позволяют испытывать оптимизм в отношении успеха подобных исследований. Так, в работе Frobel J. et al., 2014 было установлено, что ММСК и ММСК, дифференцированные из ИПСК (ИПСК-ММСК) демонстрируют значительное сходство по экспрессии генов, ассоциированных с активацией Т-лимфоцитов, представлением антигенов, сигнальными каскадами, запускаемыми через IFN- γ , и регуляцией иммунного ответа. Однако эти авторы предполагают, что ИПСК-ММСК обладают более низкими иммуномодулирующими свойствами, чем первичные ММСК. Эти гипотезы все еще ждут своего подтверждения. Учитывая то, что одним из основных механизмов проявления иммуносупрессивных свойств ММСК во взрослом организме является индукция синтеза IDO под действием провоспалительного микроокружения, в таком случае IDO является адекватной мишенью для изучения молекулярных механизмов регенерации поврежденных фетальных тканей. В то время как научным сообществом активно обсуждаются несколько потенциальных рецептор-зависимых взаимодействий, отвечающих за индукцию синтеза и функциональной активности IDO в ММСК при взаимодействии с иммунными клетками во взрослом организме (Shimizu et al., 1991, Munn et al., 2004, DelaRosa et al., 2009, Tomchuck S.L. et al., 2008, Suzdaltseva Y., 2018), на текущий момент доступно мизерное количество данных, посвященных этой проблеме в отношении фетальных тканей.

С другой стороны современные исследования, сосредоточенные на клеточных и молекулярных аспектах заживления ран плода показали, что нет одного или нескольких факторов, которые определяют высокую эффективность регенерации (Leung A. et al., 2012, Shaw T.J., Martin P., 2009, Grose R., Werner S., 2004). Регенерация достигается в результате комбинации природных факторов, изначально характерных для ткани, и микроокружения. Феномен регенерации фетальных тканей подтверждает, что воспаление не является критичным и полноценное восстановление может происходить без избыточной мобилизации резервов организма.

Тем не менее, изучение особенностей индукции синтеза и функциональной активности IDO в клетках параксиальной мезодермы по сравнению со «взрослыми» ММСК в условиях моделирования воспалительного микроокружения позволит идентифицировать ключевые молекулы и факторы, играющие критическую роль в регуляции процессов регенерации, соответствующих ранним стадиям развития организма.

Помимо исследовательского интереса и перспектив получения инновационных субстанций лекарственных средств, создание охарактеризованных клеточных моделей ММСК на основе ИПСК человека позволит сформировать основу для разработки аллогенного клеточного биомедицинского продукта из стандартизованных линий клеток человека для терапии патологических процессов, связанных с нарушениями регенерации тканей (например, хронического воспаления), для которых на современном этапе не существует адекватных специфических методов лечения.

Развитие клеточных технологий позволит также осуществлять принципиально новые подходы к интеграционному и не интеграционному репрограммированию клеток, направленной доставке новых соединений в клетки в ткани для стимуляции регенеративных процессов. Современные синтетические полимеры и наноматериалы, состоящие из гидрофильных или амфифильных, полиэлектролитных полимерных цепей, спонтанно взаимодействующие с биологически активными молекулами путем образования солевых связей,

водородных связей или гидрофобных взаимодействий способны радикально изменить специфические генетически контролируемые ответы клеток на поступающие сигналы и проявлять селективные фенотипические эффекты в клетках и механизмах передачи сигналов в организме, участвующих в воспалении, дифференцировке, пролиферации и апоптозе. Эти утверждения подтверждаются долгосрочными систематическими исследованиями биологической активности различных блоксополимеров и полиэлектролитных комплексов, проводимыми нами с помощью различных моделей *in vitro* и *in vivo* (Vinogradov S.V. et al., 1994, Kabanov A.V. et al., 1995, Vinogradov S.V. et al., 1996, Melik-Nubarov NS et al., 1999, Lemieux P. et al., 2000, Kabanov A.V., 2006). Так, недавно нами были получены результаты, демонстрирующие более высокую эффективность комплекса ММСК пуповины с нанополимерами на модели заживления полнослойных кожных ран у крыс пострепродуктивного периода по сравнению с ММСК (Silina E.V. et al., 2021).

В таком случае клеточная терапия с использованием ММСК рассматривается сейчас как многообещающий инструмент восстановительной терапии. Многочисленные экспериментальные данные, полученные *in vitro* и *in vivo*, указывают на значительную роль ММСК в регуляции регенеративного процесса и их способность смещать его течение в ту или иную сторону. На стадии воспаления ММСК пластично реагируют на воздействие конкретного микроокружения, секретирова различные цитокины, хемокины и экстрацеллюлярные матриксные белки, дифференцируясь в клетки необходимой направленности, и взаимодействуя с клетками иммунной системы. На стадии регенерации ММСК синтезируют и ремоделируют внеклеточный матрикс, стимулируют ангиогенез и реэпителизацию. На заключительной стадии регенерации ММСК обеспечивают рост клеточной популяции и витализацию ткани.

Разработка комплексных подходов с использованием клеточной и генной терапии представляется весьма перспективным направлением в клинической

практике, особенно при терапии заболеваний, не поддающихся лечению методами классической медицины и фармакологии.

Результаты данной работы создают научно-технический задел для разработки новых протоколов специфической и индивидуальной терапии заболеваний человека, не применявшихся ранее в медицинской практике. Создание препаратов на основе ММСК будет содействовать увеличению эффективности лечения заболеваний с нарушениями регенерации тканей и, следовательно, снижению затрат государства на реабилитацию больных с потерей трудоспособности и инвалидов. Применение препарата на основе ММСК могло бы повысить качество жизни больных такими заболеваниями, снизить риск развития осложнений, увеличить продолжительность жизни.

Разработка и вывод на рынок отечественного инновационного препарата на основе ММСК будет способствовать обеспечению населения современным, высокоэффективным лекарственным препаратом, позволит обеспечить лекарственную безопасность Российской Федерации. Предложенные подходы и разработанные методы получения ММСК позволят разработать препарат, который будет носить экспортоспособный характер и может быть коммерциализирован на международном рынке.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Отсутствие адекватных специфических методов лечения заболеваний, при которых наблюдается развитие хронических воспалительных процессов и нарушение регенерации тканей, предлагаемых классической фармакологией, подвигло научное сообщество к поиску альтернативных путей решения проблемы. Внедрение в экспериментальную практику методов выделения и длительного культивирования *ex vivo* стволовых клеток и клеток-предшественников, выделенных из различных тканей человека, стало революционным шагом в этом направлении. В последнее время было показано, что ММСК обладают иммуномодуляторными свойствами и могут препятствовать развитию хронических воспалительных процессов. Многочисленными исследованиями *in vivo* и *in vitro* было установлено, что в ответ на воздействие провоспалительного микроокружения и, в частности, активированных иммунных клеток ММСК могут обеспечивать супрессию нежелательного иммунного ответа. Однако фундаментальные пробелы в знаниях о молекулярных механизмах взаимодействия ММСК с другими клетками в очаге воспаления препятствуют разработке перспективных лекарственных препаратов нового поколения.

Именно поэтому высокозначимыми достижениями настоящего исследования стали: получение и характеристика морфофункциональных особенностей линий мезодермальных стромальных клеток, соответствующих разным стадиям развития человека, от эмбрионального до взрослого; установление молекулярных механизмов подавления пролиферации активированных CD4⁺T-лимфоцитов под действием ММСК, посредством установления межклеточных контактов между ними через взаимодействие рецепторных пар CTLA4/CD28 и LFA1 на поверхности T-лимфоцитов и CD80/CD86 и ICAM-1 на поверхности ММСК (соответственно), играющих основную роль в индукции синтеза и функциональной активности IDO в ММСК; а также установление безопасности и эффективности применения препаратов

ММСК в лечении длительно незаживающих ран в доклинических и клинических исследованиях.

В результате проведенной работы было установлено, что провоспалительное микроокружение, создаваемое активированными иммунными клетками в очаге воспаления, индуцирует в ММСК определенное функциональное состояние, характеризующееся изменением экспрессии целого ряда генов, таких как ICAM-1, CD80/CD86, HLA-DR и IDO. Экспонирование молекул ICAM-1, CD80/CD86 и HLA-DR на поверхности ММСК приводит к повышению их способности образовывать плотные межклеточные контакты с активированными CD4⁺ Т-лимфоцитами. Такое взаимодействие между ММСК и CD4⁺Т-лимфоцитами приводит к индукции синтеза и функциональной активности фермента IDO в ММСК, который катализируя превращение незаменимой аминокислоты триптофана в кинуренин, запускает механизм подавления пролиферации активированных CD4⁺Т-лимфоцитов. Таким образом, детально установлены паракринные факторы, рецепторные пары и клетки-мишени, участвующие в многоступенчатом процессе взаимодействия ММСК с иммунными клетками в очаге воспаления.

Другим фундаментальным свойством ММСК в условиях воспаления, обнаруженным в ходе систематических исследований, является способность ММСК модулировать цитокиновое микроокружение. Увеличение секреции IL-1, IL-6, IFN- γ , G-CSF при контакте ММСК с иммунными клетками в очаге воспаления способно смещать баланс в пользу регенерации, предотвращая развитие хронического воспаления.

Детальное изучение фундаментальных свойств ММСК, обеспечивающих регуляцию регенерации поврежденных тканей, позволило обосновать использование препарата ММСК в терапии длительно незаживающих ран. Были проведены доклинические и клинические исследования безопасности и эффективности препарата ММСК из стромы пуповины новорожденного в терапии длительно незаживающих ран. Было показано, что применение суспензии ММСК активизирует регенеративные процессы в хронических раневых дефектах,

приводит к выраженному росту и созреванию грануляционной ткани, улучшению микроциркуляции крови и ускорению эпителизации в раневом дефекте, значительному уменьшению площади или полному заживлению ран.

Методы специфической дифференцировки ИПСК в мезодермальном направлении позволили создать клеточные модели ММСК, соответствующие различным стадиям развития организма (линий клеток параксиальной мезодермы эмбриона человека и зрелых ММСК из одного источника). В перспективе, изучение особенностей функциональной активности клеток параксиальной мезодермы в сравнении со зрелыми ММСК, дифференцированными из ИПСК, позволит идентифицировать ключевые молекулы и терапевтические мишени, способствующие минимизации образования рубцов, стимуляции регенеративных процессов в очагах хронического воспаления, и содействующих полноценному восстановлению поврежденных тканей, что является необходимым этапом для разработки и создания новых лекарственных препаратов и перспективных подходов в лечении дегенеративных заболеваний, для которых на современном этапе не существует адекватных специфических методов терапии.

Такие принципиально новые подходы позволят в дальнейшем преодолеть дорогостоящие технологии создания биомедицинских клеточных продуктов и получить менее затратные инновационные субстанции лекарственных средств на основе биологически активных молекул и современных синтетических полимеров и наноматериалов, способных радикально изменить специфические генетически контролируемые ответы клеток на поступающие сигналы и осуществить селективные фенотипические эффекты в механизмах передачи сигналов в организме для стимуляции регенеративных процессов в тканях при многих заболеваниях.

ВЫВОДЫ

1. Адгезивные культуры ММСК, выделенных из кожи, костного мозга, жировой ткани и пуповины новорожденного обладают сходными свойствами по экспрессии поверхностных маркеров экто-5'-нуклеотидазы (CD73), Thy-1 (CD90), эндоглин (CD105), по способности дифференцироваться в остеогенном, адипогенном и хондрогенном направлении, что соответствует критериям для ММСК Международного общества клеточной и генной терапии. ММСК пуповины новорожденного, обладают пропорционально более высоким содержанием прогениторных клеток, экспрессирующих нестин и рецептор фактора роста стволовых клеток (CD117), по сравнению с ММСК взрослого человека, выделенными из костного мозга, жировой ткани и кожи.
2. Сокультивирование МСК с аллогенными мононуклеарными клетками периферической крови не оказывает цитотоксического действия на ММСК независимо от источника происхождения и уровня экспрессии поверхностных молекул главного комплекса гистосовместимости (ГКГ) I класса, не вызывает изменения характерного для них иммуноцитотипического профиля и способности к дифференцировке. ММСК характеризуются саморегулирующейся экспрессией поверхностных белков ГКГ I класса при взаимодействии с аллогенными мононуклеарными клетками периферической крови.
3. В условиях провоспалительного микроокружения при сокультивировании с аллогенными мононуклеарными клетками периферической крови ММСК приобретают способность подавлять их пролиферацию и активацию, что подтверждается снижением экспрессии субъединицы α рецептора интерлейкина 2 (IL-2R α) на поверхности активированных CD4⁺T-лимфоцитов.
4. ММСК способны осуществлять динамическое модулирование цитокинового микроокружения при взаимодействии с актМПК, приводящее к увеличению концентраций интерлейкина-1 (IL-1), IL-6, интерферона- γ , гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF), и снижению концентраций, и снижению концентраций IL-10, IL-13, в супернатантах по

сравнению с отдельными культурами этих клеток. Регуляция синтеза IL-1, IL-6 и G-CSF осуществляется с вовлечением контактных взаимодействий между ММСК и активированными мононуклеарными клетками периферической крови.

5. Культивируемые ММСК изначально обладают провоспалительным фенотипом, выражающимся в конститутивной экспрессии циклооксигеназы-2 (COX-2), высоким уровнем секреции IL-6, IL-8, моноцитарного хемотаксического протеина-1 (MCP-1). Взаимодействие с активированными мононуклеарными клетками периферической крови приводит к активации противовоспалительного каскада в ММСК, проявляющегося в индукции синтеза и функциональной активности IDO. ММСК не экспрессируют индуцируемой NO-синтазы (iNOS) при отдельном или совместном культивировании с активированными мононуклеарными клетками периферической крови.
6. Активация мононуклеарных клеток периферической крови фитогемагглютинином приводит к возрастанию способности CD4+Т-лимфоцитов образовывать плотные межклеточные контакты с ММСК. Адгезионные контакты, образуемые за счет связывания молекулы межклеточной адгезии 1 типа на ММСК с Т-лимфоцитарным интегрином LFA-1 вызывают повышение секреции интерферона- γ . Интерферон- γ и рецепторное взаимодействие молекул человеческого лейкоцитарного антигена DR и костимуляторных молекул CD80/CD86 на ММСК с их контррецепторами Т-лимфоцитарным антигеном 4/CD28, индуцируя синтез индол-2,3-диоксигеназы в ММСК, образуют регуляторную петлю с положительной обратной связью, способствующую снижению активации и пролиферации активированных иммунных клеток и затуханию воспалительной реакции.
7. Подкожные инъекции суспензии ММСК пуповины человека не приводят к появлению нежелательных реакций местного и системного характера у здоровых добровольцев. Местное введение суспензии ММСК пуповины у пациентов с длительно незаживающими ранами стимулирует рост и созревание грануляционной ткани, вызывает улучшение микроциркуляции крови, создавая благоприятные условия для заживления ран или проведения аутодермопластики

расщепленным лоскутом. Применение препарата ММСК в форме суспензии является безопасным и эффективным методом в лечении длительно незаживающих ран.

8. Линии клеток параксиальной мезодермы и ММСК, полученных из одного источника в результате последовательной дифференцировки ИПСК, отличаются по экспрессии маркеров BRY Snail, TBX6, MIXL1 и экспонированию на поверхности мембраны маркеров CD73 и CD105 и могут быть использованы для изучения особенностей молекулярных механизмов заживления повреждений в разных стадиях развития организма.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- актМПК – активированные моноклеарные клетки периферической крови
- АПК – антиген-представляющие клетки
- БСА – бычий сывороточный альбумин
- ГКГ – главный комплекс гистосовместимости
- ГФИ – гликозилфосфатидилинозитол
- дН₂О – дистиллированная вода
- ДК – дендритные клетки
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- Ед. – единица
- ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки
- ЛДГ – лактатдегидрогеназа
- ЛДФ – лазерная доплеровская флоуметрия
- ЛПС – липополисахарид
- мАт – моноклональные антитела
- ММР – металлопротеиназа
- ММСК – мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки
- МПК – моноклеарные клетки периферической крови
- МТТ – [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,50-дифенил-тетразол-бромид]
- НК – естественные киллерные клетки
- ПААГ – полиакриламидный гель
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- РТПХ – реакция «трансплантат против хозяина»
- СДС – синдром диабетической стопы
- Усл. – условный
- ФГА – фитогемагглютинин
- ХВН – хроническая венозная недостаточность
- ХИНК – хроническая ишемия нижних конечностей

ЦНС – центральная нервная система
ЦТЛ – цитотоксические Т-лимфоциты
ЭСК – эмбриональные стволовые клетки
АРС – аллофикоцианин
BMP4 – костный морфогенетический белок4
BWAT – Bates-Jensen Wound Assessment Tool
CD – кластер дифференцировки
СОХ – циклооксигеназа
CTLA4 – Т-лимфоцитарный антиген 4
CXС, СС, CXCL, CCL, MCP-1, RANTES – хемокины
CXCR, CCR – рецепторы к хемокинам
DAPI – диамино-4",6--2-фенилиндол
DMSO – диметилсульфоксид
EGF – эпидермальный фактор роста
EGFR, FGFR, G-CSFR, LIFR, PDGFR, TGF β IR, TGF β IIR – рецепторы к факторам роста
FACS – проточная цитофлуориметрия
FITC – флуоресцеин-5-изотиоцианат
GCP – Good Clinical Practice
ICAM – молекула межклеточной адгезии
IDO – индоламин-2,3-диоксигеназа
IFN- γ – интерферон-гамма
IGF-1 – инсулиноподобный фактор роста-1
IL – интерлейкин
IL-R – рецептор к интерлейкину
iNOS – индуцируемая NO-синтаза
ISCT – Интернациональное Общество Клеточной Терапии
FDA – Food and Drug Administration
FGF – фактор роста фибробластов
GAPDH – глицеральальдегид 3-фосфат дегидрогеназа

- G-CSF – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор
- GM-CSF – гранулоцит-макрофагальный колониестимулирующий фактор
- H-CAM – молекула клеточной адгезии, трансмембранный гликопротеин
- HIF-1 – индуцируемый гипоксией транскрипционный фактор-1
- HGF – фактор роста гепатоцитов
- HLA – человеческий лейкоцитарный антиген
- JAM – соединительные молекулы адгезии
- KGF – фактор роста кератиноцитов
- KIR – иммуноглобулин-подобные рецепторы натуральных киллеров
- LFA1 – функционально-ассоциированный антиген лимфоцитов 1, интегрин $\alpha L\beta 2$
- LIF – фактор, ингибирующий лейкемию
- M-CSF – макрофагальный колониестимулирующий фактор
- MCP-1 – моноцитарный хемотаксический протеин-1
- MHC – главный комплекс гистосовместимости
- MIP-1b – макрофагальный воспалительный протеин-1b
- MTT – 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид
- PBS – фосфатно-солевой буфер
- PDGF – тромбоцитарный фактор роста
- PD-L – лиганд программируемой смерти
- PE – фикоэритрин
- PECAM – тромбоцитарно-эндотелиальная молекула клеточной адгезии
- Per-CP – пиридинхлорофиллом
- PGE2 – простагландин E2
- PODXL – подокаликсин
- PPAR γ – рецептор, активирующий пролиферацию пероксисом, гамма
- PSGL-1 – гликопротеиновый лиганд P-селектина
- ROCK – Rho киназа
- SCF – фактор стволовых клеток
- SDF-1 – фактор стромальных клеток -1

SDS – додецил сульфат натрия

TcR –T-клеточный рецептор

TGF- трансформирующий фактор роста

TIMP – тканевой ингибитор металлопротеиназ

TNF- α – фактор некроза опухолей альфа

V-CAM – васкулярная молекула клеточной адгезии

VEGF– фактор роста сосулистого эндотелия

VLA-4 – интегрин $\alpha 4\beta 1$ (Very Late Antigen-4)

TLR –толл-подобный рецептор

IFN γ R рецептор к интерферону-гамма

TNFR– рецептор к фактору некроза опухолей альфа

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Акопян Ж.А., Ефименко А.Ю., Рубина К.А., Калинина Н.И., Суздальцева Ю.Г., Кочегура Т.Н., Бредихин А.М. Системная трансплантация аутологичных мезенхимальных клеток костного мозга больным ишемической болезнью сердца, сочетающейся с сахарным диабетом: долгосрочное наблюдение и результаты повторного введения. Стволовые клетки и регенеративная медицина: сборник статей, под ред. В.А. Ткачука. – М.: МАКС Пресс, 2011.- 320с., стр. 235-263. ISBN 978-5-317-03583-9.
2. Богомазова А.Н., Васина Е.М., Киселев С.Л., Лагарькова М.А., Лебедева О.С., Некрасов Е.Д., Панова А.В., Филоненко Е.С., Хомякова Е.А., Цховребова Л.В., Честков И.В., Шутова М.В. Генетическое репрограммирование клеток: новая технология для фундаментальных исследований и практического использования. Генетика. 2015. Т. 51. № 4. С. 466.
3. Воротников А. В., Суздальцева Ю. Г., Рубцов Ю. П., Аниол Н. В., Горюнов К. В., Кудряшова Т. В., Тюрин-Кузьмин П. А., Ткачук В. А. Направленная миграция и мезенхимальные прогениторные клетки: участие в воспалении, репарации и регенерации ткани. Стволовые клетки и регенеративная медицина: сборник статей под ред. Ткачука В. А. – М.: МАКС Пресс, 2012, стр. 62-97. ISBN 978-5-317-04008-6.
4. Ефименко А.Ю., Акопян Ж.А., Рубина К.А., Калинина Н.И., Суздальцева Ю.Г., Кочегура Т.Н., Бредихин А.М. Системная трансплантация аутологичных мезенхимальных клеток костного мозга больным ишемической болезнью сердца: долгосрочное наблюдение и результаты повторного введения. Стволовые клетки и регенеративная медицина: сборник статей, под ред. В.А. Ткачука. – М.: МАКС Пресс, 2011.- 320с., стр. 206-234. ISBN 978-5-317-03583-9.
5. Некрасов Е.Д., Лагарькова М.А., Киселев С.Л. Индуцированные плюрипотентные клетки как модель для изучения болезней человека. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2011. Т. 6. № 2. С. 32-37.
6. Суздальцева Ю.Г., Жидких С.Ю., Пар В.И., Бурунова В.В., Горюнов С.В., Смирнова Г.О., Жидких Н.В., Воронов А.В., Ярыгин К.Н., Ступин В.А. Мезенхимальные стволовые клетки пуповины новорожденного в терапии длительно незаживающих ран. Стволовые клетки и регенеративная медицина: сборник статей, под ред. В.А. Ткачука. – М.: МАКС Пресс, 2011.- 320с., стр. 181-205. ISBN 978-5-317-03583-9
7. Abbott J.D., Huang Y., Liu D., Hickey R., Krause D.S., Giordano F.J. Stromal cell-derived factor-1alpha plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury. *Circulation*. 2004 Nov 23;110(21):3300-5. Epub 2004 Nov 8.
8. Abdi J., Rashedi I., Keating A. Concise Review: TLR Pathway-miRNA Interplay in Mesenchymal Stromal Cells: Regulatory Roles and Therapeutic Directions. *Stem Cells*. 2018 Nov;36(11):1655-1662.
9. Aggarwal S., Pittenger M.F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005 Feb 15;105(4):1815-22.

10. Akasaki Y., Liu G., Chung N.H., Ehtesham M., Black K.L., Yu J.S. Induction of a CD4+ T regulatory type 1 response by cyclooxygenase-2-overexpressing glioma. *J Immunol.* 2004 Oct 1;173(7):4352-9.
11. Akita S., Yoshimoto H., Akino K., Ohtsuru A., Hayashida K., Hirano A., Suzuki K., Yamashita S. Early experiences with stem cells in treating chronic wounds. *Clin Plast Surg.* 2012 Jul;39(3):281-92.
12. Al-Hakami A., Alqhatani S.Q., Shaik S., Jalfan S.M., Dhammam M.S.A., Asiri W., Alkahtani A.M., Devaraj A., Chandramoorthy H.C. Cytokine physiognomies of MSCs from varied sources confirm the regenerative commitment post-coculture with activated neutrophils. *J Cell Physiol.* 2020 Nov;235(11):8691-8701.
13. Al-Maawali A.K., Nguyen P., Phang P.T. Modern Treatments and Stem Cell Therapies for Perianal Crohn's Fistulas. *Can J Gastroenterol Hepatol.* 2016; 2016:1651570.
14. Almalki S.G., Agrawal D.K. Effects of matrix metalloproteinases on the fate of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2016 Sep 9;7(1):129.
15. Alvarez M.M., Liu J.C., Trujillo-de Santiago G., Cha B.H., Vishwakarma A., Ghaemmaghami A.M., Khademhosseini A. Delivery strategies to control inflammatory response: Modulating M1-M2 polarization in tissue engineering applications. *J Control Release.* 2016 Oct 28;240:349-363.
16. Amable P.R., Teixeira M.V., Carias R.B., Granjeiro J.M., Borojevic R. Protein synthesis and secretion in human mesenchymal cells derived from bone marrow, adipose tissue and Wharton's jelly. *Stem Cell Res Ther.* 2014 Apr 16;5(2):53. doi: 10.1186/scrt442.
17. Angoulvant D., Clerc A., Benchalal S., Galambrun C., Farre A., Bertrand Y., Eljaafari A. Human mesenchymal stem cells suppress induction of cytotoxic response to alloantigens. *Biorheology.* 2004;41(3-4):469-76.
18. Anitua E., Nurden P., Prado R., Nurden A.T., Padilla S. Autologous fibrin scaffolds: When platelet- and plasma-derived biomolecules meet fibrin. *Biomaterials.* 2019 Feb;192:440-460.
19. in 't Anker P.S., Noort W.A., Scherjon S.A., Kleijburg-van der Keur C., Kruisselbrink A.B., van Bezooijen R.L., Beekhuizen W., Willemze R., Kanhai H.H., Fibbe W.E. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematologica.* 2003 Aug;88(8):845-52.
20. Ansell D.M., Marsh C., Walker L., Hardman M.J., Holden K. Evaluating STZ-Induced Impaired Wound Healing in Rats. *J Invest Dermatol.* 2018 Apr;138(4):994-997.
21. de Araújo Farias V., Carrillo-Gálvez A.B., Martín F., Anderson P. TGF- β and mesenchymal stromal cells in regenerative medicine, autoimmunity and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2018 Oct;43:25-37.
22. Arikawa T., Omura K., Morita I. Regulation of bone morphogenetic protein-2 expression by endogenous prostaglandin E2 in human mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol.* 2004 Sep;200(3):400-6.

23. Arutyunyan I., Elchaninov A., Fatkhudinov T., Makarov A., Kananykhina E., Usman N., Bolshakova G., Glinkina V., Goldshtein D., Sukhikh G. Elimination of allogeneic multipotent stromal cells by host macrophages in different models of regeneration. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015 May 1;8(5):4469-80. eCollection 2015.
24. Arutyunyan I, Fatkhudinov T, Kananykhina E, Usman N, Elchaninov A, Makarov A, Bolshakova G, Goldshtein D, Sukhikh G. Role of VEGF-A in angiogenesis promoted by umbilical cord-derived mesenchymal stromal/stem cells: in vitro study. *Stem Cell Res Ther.* 2016 Mar 22;7:46.
25. Asari S., Itakura S., Ferreri K., Liu C.P., Kuroda Y., Kandeel F., Mullen Y. Mesenchymal stem cells suppress B-cell terminal differentiation. *Exp. Hematol.* 2009; 37: 604-615.
26. Assis A.C., Carvalho J.L., Jacoby B.A., Ferreira R.L., Castanheira P., Diniz S.O., Cardoso V.N., Goes A.M., Ferreira A.J. Time-dependent migration of systemically delivered bone marrow mesenchymal stem cells to the infarcted heart. *Cell Transplant.* 2010;19(2):219-30.
27. Augello A., Kurth T.B., De Bari C. Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches. *Eur Cell Mater.* 2010 Sep 1;20: 121-33.
28. Azevedo R.I., Minskaia E., Fernandes-Platzgummer A., Vieira A.I.S., da Silva C.L., Cabral J.M.S., Lacerda J.F. Mesenchymal stromal cells induce regulatory T cells via epigenetic conversion of human conventional CD4 T cells in vitro. *Stem Cells.* 2020 Aug;38(8):1007-1019.
29. Baberg F., Geyh S., Waldera-Lupa D., Stefanski A., Zilkens C., Haas R., Schroeder T., Stühler K. Secretome analysis of human bone marrow derived mesenchymal stromal cells. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom.* 2019 Apr;1867(4):434-441. doi: 10.1016/j.bbapap.2019.01.013.
30. Bader A.M., Klose K., Bieback K., Korinth D., Schneider M., Seifert M., Choi Y.H., Kurtz A., Falk V., Stamm C. Hypoxic Preconditioning Increases Survival and Pro-Angiogenic Capacity of Human Cord Blood Mesenchymal Stromal Cells In Vitro. *PLoS One.* 2015 Sep 18;10(9):e0138477.
31. von Bahr L., Batsis I., Moll G., Hägg M., Szakos A., Sundberg B., Uzunel M., Ringden O., Le Blanc K. Analysis of tissues following mesenchymal stromal cell therapy in humans indicates limited long-term engraftment and no ectopic tissue formation. *Stem Cells.* 2012 Jul;30(7):1575-8.
32. Barbash I.M., Chouraqui P., Baron J., Feinberg M.S., Etzion S., Tessone A., Miller L., Guetta E., Zipori D., Kedes L.H., Kloner R.A., Leor J. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation.* 2003 Aug 19;108(7):863-8.
33. Baron M. Induction of embryonic hematopoietic and endothelial stem/progenitor cells by hedgehog-mediated signals. *Differentiation.* 2001 68(4): pp. 175-185.
34. Barry F.P. Biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Birth Defects Res. C. Embryo Today,* 2003, V. 69, N. 3, p. 250-256.

35. Bartholomew A., Sturgeon C., Siatskas M., Ferrer K., McIntosh K., Patil S., Hardy W., Devine S., Ucker D., Deans R., Moseley A., Hoffman R. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol.* 2002 Jan;30(1):42-8.
36. Bartolucci J., Verdugo F.J., González P.L., Larrea R.E., Abarzua E., Goset C., Rojo P., Palma I., Lamich R., Pedreros P.A., Valdivia G., Lopez V.M., Nazzari C., Alcayaga-Miranda F., Cuenca J., Brobeck M.J., Patel A.N., Figueroa F.E., Khoury M. Safety and Efficacy of the Intravenous Infusion of Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in Patients With Heart Failure: A Phase 1/2 Randomized Controlled Trial (RIMECARD Trial [Randomized Clinical Trial of Intravenous Infusion Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells on Cardiopathy]). *Circ Res.* 2017 Oct 27;121(10):1192-1204.
37. Benvenuto F., Voci A., Carminati E., Gualandi F., Mancardi G., Uccelli A., Vergani L. Human mesenchymal stem cells target adhesion molecules and receptors involved in T cell extravasation. *Stem Cell Res Ther.* 2015 Dec 10;6:245.
38. Bernardo M.E., Fibbe W.E. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell.* 2013; 13: 392-402.
39. Beyth S., Borovsky Z., Mevorach D., Liebergall M., Gazit Z., Aslan H., Galun E., Rachmilewitz J. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood.* 2005; 105: 2214-2219.
40. Bhakta S., Hong P., Koc O. The surface adhesion molecule CXCR4 stimulates mesenchymal stem cell migration to stromal cell-derived factor-1 in vitro but does not decrease apoptosis under serum deprivation. *Cardiovasc Revasc Med.* 2006 Jan-Mar;7(1):19-24.
41. Bhansali S., Dutta P., Kumar V., Yadav M.K., Jain A., Mudaliar S., Bhansali S., Sharma R.R., Jha V., Marwaha N., Khandelwal N., Srinivasan A., Sachdeva N., Hawkins M. Bhansali A. Efficacy of Autologous Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell and Mononuclear Cell Transplantation in Type 2 Diabetes Mellitus: A Randomized, Placebo-Controlled Comparative Study. *Stem Cells Dev.* 2017 Apr 1;26(7):471-481.
42. Bi H., Li H., Zhang C., Mao Y., Nie F., Xing Y., Sha W., Wang X., Irwin D.M., Tan H. Stromal vascular fraction promotes migration of fibroblasts and angiogenesis through regulation of extracellular matrix in the skin wound healing process. *Stem Cell Res Ther.* 2019 Oct 17;10(1):302. doi: 10.1186/s13287-019-1415-6.
43. Bianchi M.E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J. Leukoc. Biol.* 2007; 81: 1-5.
44. Bianco P., Gehron Robey P. Marrow stromal stem cells. *J Clin Invest.* 2000 Jun;105(12):1663-8.
45. Bianco P., Riminucci M., Gronthos S., Robey P. G. Bone Marrow Stromal Stem Cells: Nature, Biology, and Potential Applications. *Stem Cells*, May 1, 2001; 19(3): 180 - 192.
46. Bieback K., Kern S., Kocaomer A., Ferlik K., Bugert P: Comparing mesenchymal stromal cells from different human tissues: bone marrow, adipose tissue and umbilical cord blood. *Biomed Mater Eng* 2008, 18:S71-76.

47. Billing A.M., Ben Hamidane H., Dib S.S., Cotton R.J., Bhagwat A.M., Kumar P., Hayat S., Yousri N.A., Goswami N., Suhre K., Rafii A., Graumann J. Comprehensive transcriptomic and proteomic characterization of human mesenchymal stem cells reveals source specific cellular markers. *Sci Rep.* 2016 Feb 9;6:21507.
48. Bleijs D.A., de Waal-Malefyt R., Figdor C.G., van Kooyk Y. Co-stimulation of T cells results in distinct IL-10 and TNF-alpha cytokine profiles dependent on binding to ICAM-1, ICAM-2 or ICAM-3. *Eur. J. Immunol.* 1999 Jul;29(7):2248-58.
49. Bolli R., Hare J.M., March K.L., Pepine C.J., Willerson J.T., Perin E.C., Yang P.C., Henry T.D., Traverse J.H., Mitrani R.D., Khan A., Hernandez-Schulman I., Taylor D.A., DiFede D.L., Lima J.A.C., Chugh A., Loughran J., Vojvodic R.W., Sayre S.L., Bettencourt J., Cohen M., Moyé L., Ebert R.F., Simari R.D.; Cardiovascular Cell Therapy Research Network (CCTR). Rationale and Design of the CONCERT-HF Trial (Combination of Mesenchymal and c-kit+ Cardiac Stem Cells As Regenerative Therapy for Heart Failure). *Circ Res.* 2018 Jun 8;122(12):1703-1715.
50. Bonnans C, Chou J, Werb Z Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014 Dec; 15(12):786-801.
51. Boomsma R.A., Geenen D.L. Mesenchymal stem cells secrete multiple cytokines that promote angiogenesis and have contrasting effects on chemotaxis and apoptosis. *PLoS One.* 2012; 7(4): e35685.
52. Botting R.A., Haniffa M. The developing immune network in human prenatal skin. *Immunology.* 2020 Jun;160(2):149-156.
53. Boyt D.T., Boland L.K., Burand A.J. Jr., Brown A.J., Ankrum J.A. Dose and duration of interferon gamma pre-licensing interact with donor characteristics to influence the expression and function of indoleamine-2,3-dioxygenase in mesenchymal stromal cells. *J R Soc Interface.* 2020 Jun;17(167):20190815.
54. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54.
55. Brambrink T., Foreman R., Welstead G.G., Lengner C.J., Wernig M., Suh H., Jaenisch R. Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell.* 2008 Feb 7;2(2):151-9.
56. Bühring H.J., Battula V.L., Trembl S., Schewe B., Kanz L., Vogel W. Novel markers for the prospective isolation of human MSC. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Jun;1106:262-71.
57. Burr S.P., Dazzi F., Garden O.A. Mesenchymal stromal cells and regulatory T cells: the Yin and Yang of peripheral tolerance? *Immunol Cell Biol.* 2013 Jan;91(1):12-8.
58. Burunova V.V., Suzdaltseva Y.G., Voronov A.V., Cheglakov I.B., Vakhrushev I.V., Yarygin K.N., Yarygin V.N. Development and introduction of production standards for cell products of mesenchymal origin. *Bull Exp Biol Med.* 2008 Apr;145(4):526-30.
59. Cai J., Wu Z., Xu X., Liao L., Chen J., Huang L., Wu W., Luo F., Wu C., Pugliese A., Pileggi A., Ricordi C., Tan J. Umbilical Cord Mesenchymal Stromal Cell

With Autologous Bone Marrow Cell Transplantation in Established Type 1 Diabetes: A Pilot Randomized Controlled Open-Label Clinical Study to Assess Safety and Impact on Insulin Secretion. *Diabetes Care*. 2016 Jan;39(1):149-57.

60. Cakouros D., Gronthos S. Epigenetic Regulators of Mesenchymal Stem/Stromal Cell Lineage Determination. *Curr Osteoporos Rep*. 2020 Oct;18(5):597-605.

61. Campagnoli C., Roberts I.A., Kumar S., Bennett P.R., Bellantuono I., Fisk N.M. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*. 2001 Oct 15;98(8):2396-402.

62. Caplan A.I. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol*. 2009 Jan;217(2):318-24.

63. Cappellesso-Fleury S., Puissant-Lubrano B., Apoil P.A., Titeux M., Winterton P., Casteilla L., Bourin P., Blancher A. Human fibroblasts share immunosuppressive properties with bone marrow mesenchymal stem cells. *J Clin Immunol*. 2010 Jul;30(4):607-19.

64. Carlsson P.O., Schwarcz E., Korsgren O., Le Blanc K. Preserved β -cell function in type 1 diabetes by mesenchymal stromal cells. *Diabetes*. 2015 Feb;64(2):587-92.

65. Carmeliet P., Jain R.K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. 2011; 473: 298-307.

66. Casiraghi F., Azzollini N., Cassis P., Imberti B., Morigi M., Cugini D., Cavinato R.A., Todeschini M., Solini S., Sonzogni A., Perico N., Remuzzi G., Noris M. Pretransplant infusion of mesenchymal stem cells prolongs the survival of a semiallogeneic heart transplant through the generation of regulatory T cells. *J Immunol*. 2008 Sep 15;181(6):3933-46

67. Chabot V., Dromard C., Rico A., Langonné A., Gaillard J., Guilloton F., Casteilla L., Sensebé L. Urokinase-type plasminogen activator receptor interaction with $\beta 1$ integrin is required for platelet-derived growth factor-AB-induced human mesenchymal stem/stromal cell migration. *Stem Cell Res Ther*. 2015 Sep 29;6:188.

68. Chen K., Wang D., Du W.T., Han Z.B., Ren H., Chi Y., Yang S.G., Zhu D., Bayard F., Han Z.C. Human umbilical cord mesenchymal stem cells hUC-MSCs exert immunosuppressive activities through a PGE2-dependent mechanism. *Clin. Immunol*. 2010; 135: 448-458.

69. Chen M.Y., Lie P.C., Li Z.L., Wei X. Endothelial differentiation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*. 2009 May;37(5):629-40.

70. Chen S.L., Fang W.W., Qian J., Ye F., Liu Y.H., Shan S.J., Zhang J.J., Lin S., Liao L.M., Zhao R.C. Improvement of cardiac function after transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in patients with acute myocardial infarction. *Chin Med J (Engl)*. 2004 Oct;117(10):1443-8.

71. Chen X.X., Tang L., Han Z.H., Wang W.J., Meng J.G. Coculture with bone marrow-derived mesenchymal stem cells attenuates inflammation and apoptosis in lipopolysaccharide-stimulated alveolar epithelial cells via enhanced secretion of

keratinocyte growth factor and angiopoietin-1 modulating the Toll-like receptor-4 signal pathway. *Mol Med Rep.* 2019 Mar;19(3):1891-1902.

72. Chen Y.S., Pelekanos R.A., Ellis R.L., Horne R., Wolvetang E.J., Fisk N.M. Small molecule mesengenic induction of human induced pluripotent stem cells to generate mesenchymal stem/stromal cells. *Stem Cells Transl Med.* 2012 Feb;1(2):83-95.

73. Chertkov I.L., Gurevich O.A. 2 populations of bone marrow cells transferring the hematopoietic environment. *Biull Eksp Biol Med.* 1977 Feb;83(2):206-8.

74. Chestkov I.V., Vasilieva E.A., Illarioshkin S.N., Lagarkova M.A., Kiselev S.L. Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells for SOD1-Associated Amyotrophic Lateral Sclerosis Pathogenesis Studies. *Acta Naturae.* 2014 Jan;6(1):54-60.

75. Chickarmane V., Troein C., Nuber U.A., Sauro H.M., Peterson C. Transcriptional dynamics of the embryonic stem cell switch. *PLoS Comput Biol.* 2006 Sep 15;2(9):e123.

76. Chinnadurai R., Rajakumar A., Schneider A.J., Bushman W.A., Hematti P., Galipeau J. Potency Analysis of Mesenchymal Stromal Cells Using a Phospho-STAT Matrix Loop Analytical Approach. *Stem Cells.* 2019 Aug;37(8):1119-1125.

77. Chiossone L., Conte R., Spaggiari G.M., Serra M., Romei C., Bellora F., Becchetti F., Andaloro A., Moretta L., Bottino C. Mesenchymal Stromal Cells Induce Peculiar Alternatively Activated Macrophages Capable of Dampening Both Innate and Adaptive Immune Responses. *Stem Cells.* 2016 Jul;34(7):1909-21.

78. Chou F.C., Chen H.Y., Kuo C.C., Sytwu H.K. Role of Galectins in Tumors and in Clinical Immunotherapy. *Int J Mol Sci.* 2018 Feb 1;19(2):430.

79. Ciria M., García N.A., Ontoria-Oviedo I., González-King H., Carrero R., De La Pompa J.L., Montero J.A., Sepúlveda P. Mesenchymal Stem Cell Migration and Proliferation Are Mediated by Hypoxia-Inducible Factor-1 α Upstream of Notch and SUMO Pathways. *Stem Cells Dev.* 2017 Jul 1;26(13):973-985.

80. Colwell A.S., Krummel T.M., Longaker M.T., Lorenz H.P. An in vivo mouse excisional wound model of scarless healing. *Plast Reconstr Surg.* 2006 Jun;117(7):2292-6.

81. Colwell A.S., Longaker M.T., Lorenz H.P. Fetal wound healing. *Front. Biosci.* 2003; 8: s1240-1248.

82. Constantin G., Marconi S., Rossi B., Angiari S., Calderan L., Anghileri E., Gini B., Bach S.D., Martinello M., Bifari F., Galiè M., Turano E., Budui S., Sbarbati A., Krampera M., Bonetti B. Adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Stem Cells.* 2009; 27: 2624-2635.

83. Contreras-Kallens P., Terraza C., Oyarce K., Gajardo T., Campos-Mora M., Barroilhet M.T., Álvarez C., Fuentes R., Figueroa F., Khoury M., Pino-Lagos K. Mesenchymal stem cells and their immunosuppressive role in transplantation tolerance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2017; 10.1111/nyas.13364

84. Cool S.M., Nurcombe V. The osteoblast-heparan sulfate axis: control of the bone cell lineage. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2005, V. 37, N. 9, p. 1739-1745.

85. Corcione A., Benvenuto F., Ferretti E., Giunti D., Cappiello V., Cazzanti F., Risso M., Gualandi F., Mancardi G.L., Pistoia V., Uccelli A. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*. 2006; 107: 367-372.
86. Covas D.T., Panepucci R.A., Fontes A.M., Silva W.A. Jr., Orellana M.D., Freitas M.C., Neder L., Santos A.R., Peres L.C., Jamur M.C., Zago M.A. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. *Exp. Hematol*. 2008; 36(5):642-54.
87. Crisostomo P.R., Wang M., Herring C.M., Markel T.A., Meldrum K.K., Lillemoe K.D., Meldrum D.R. Gender differences in injury induced mesenchymal stem cell apoptosis and VEGF, TNF, IL-6 expression: role of the 55 kDa TNF receptor (TNFR1) *J Mol Cell Cardiol*. 2007;42(1):142–149.
88. Crop M.J., Baan C.C., Korevaar S.S., Ijzermans J.N., Pescatori M., Stubbs A.P., van Ijcken W.F., Dahlke M.H., Eggenhofer E., Weimar W., Hoogduijn M.J. Inflammatory conditions affect gene expression and function of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol*. 2010;162(3): 474-86.
89. Crosby L.M., Waters C.M. Epithelial repair mechanisms in the lung. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol*. 2010; 298: L715-731.
90. Cruz-Barrera M., Flórez-Zapata N., Lemus-Diaz N., Medina C., Galindo C.C., González-Acero L.X., Correa L., Camacho B., Gruber J., Salguero G. Integrated Analysis of Transcriptome and Secretome From Umbilical Cord Mesenchymal Stromal Cells Reveal New Mechanisms for the Modulation of Inflammation and Immune Activation. *Front Immunol*. 2020 Sep 30;11:575488.
91. Cucco C., Zhang Z., Botero T.M., Chiego D.J., Castilho R.M., Nör J.E. SCF/C-Kit Signaling Induces Self-Renewal of Dental Pulp Stem Cells. *J Endod*. 2020 Sep;46(9S):S56-S62.
92. Cuerquis J., Romieu-Mourez R., François M., Routy J.P., Young Y.K., Zhao J., Eliopoulos N. Human mesenchymal stromal cells transiently increase cytokine production by activated T cells before suppressing T-cell proliferation: effect of interferon- γ and tumor necrosis factor- α stimulation. *Cytotherapy*. 2014 Feb;16(2):191-202.
93. Dabrowska S., Sypecka J., Jablonska A., Strojek L., Wielgos M., Domanska-Janik K., Sarnowska A. Neuroprotective Potential and Paracrine Activity of Stromal Vs. Culture-Expanded hMSC Derived from Wharton Jelly under Co-Cultured with Hippocampal Organotypic Slices. *Mol Neurobiol*. 2018 Jul;55(7):6021-6036.
94. Das M., Das A., Barui A., Paul R.R. Comparative evaluation of proliferative potential and replicative senescence associated changes in mesenchymal stem cells derived from dental pulp and umbilical cord. *Cell Tissue Bank*. 2021 Apr 26.
95. Davidson D., Blanc A., Filion D., Wang H., Plut P., Pfeffer G., Buschmann M.D., Henderson J.E. Fibroblast growth factor (FGF) 18 signals through FGF receptor 3 to promote chondrogenesis. *J. Biol. Chem.*, 2005, V. 280, N. 21, p. 20509-20515.
96. Davies L.C., Heldring N., Kadri N., Le Blanc K. Mesenchymal Stromal Cell Secretion of Programmed Death-1 Ligands Regulates T Cell Mediated Immunosuppression. *Stem Cells*. 2017 Mar;35(3):766-776.

97. Deans R.J., Moseley A.B. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol.* 2000 Aug;28(8):875-84.
98. DelaRosa O., Lombardo E., Beraza A., Mancheño-Corvo P., Ramirez C., Menta R., Rico L., Camarillo E., García L., Abad J.L., Trigueros C., Delgado M., Büscher D. Requirement of IFN-gamma-mediated indoleamine 2,3-dioxygenase expression in the modulation of lymphocyte proliferation by human adipose-derived stem cells. *Tissue Eng. Part A.* 2009; 15:27952-806.
99. Deng H., Sun C., Sun Y., Li H., Yang L., Wu D., Gao Q., Jiang X. Lipid, Protein, and MicroRNA Composition Within Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes. *Cell Reprogram.* 2018 May 21. doi: 10.1089/cell.2017.0047.
100. Deng Y., Zhang Y., Ye L., Zhang T., Cheng J., Chen G., Zhang Q., Yang Y. Umbilical Cord-derived Mesenchymal Stem Cells Instruct Monocytes Towards an IL10-producing Phenotype by Secreting IL6 and HGF. *Sci Rep.* 2016 Dec 5;6:37566.
101. Dennis J. E., Charbord P. Origin and Differentiation of Human and Murine Stroma. *Stem Cells* 2002;20:205-214
102. De Stefano D., Maiuri M.C., Iovine B., Ialenti A., Bevilacqua M.A., Carnuccio R. The role of NF-kappaB, IRF-1, and STAT-1alpha transcription factors in the iNOS gene induction by gliadin and IFN-gamma in RAW 264.7 macrophages. *J Mol Med (Berl).* 2006 Jan;84(1):65-74.
103. Dettmer R., Cirksena K., Münchhoff J., Kresse J., Diekmann U., Niwolik I., Buettner F.F.R., Naujok O. FGF2 Inhibits Early Pancreatic Lineage Specification during Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. *Cells.* 2020 Aug 20;9(9):1927.
104. Deuse T., Seifert M., Phillips N., Fire A., Tyan D., Kay M., Tsao P.S., Hua X., Velden J., Eiermann T., Volk H.D., Reichenspurner H., Robbins R.C., Schrepfer S. Human leukocyte antigen I knockdown human embryonic stem cells induce host ignorance and achieve prolonged xenogeneic survival. *Circulation.* 2011 Sep 13;124(11 Suppl):S3-9.
105. Diederichs S., Tuan R.S. Functional comparison of human-induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal cells and bone marrow-derived mesenchymal stromal cells from the same donor. *Stem Cells Dev.* 2014 Jul 15;23(14):1594-610.
106. Dilger N., Neehus A.L., Grieger K., Hoffmann A., Menssen M., Ngezahayo A. Gap Junction Dependent Cell Communication Is Modulated During Transdifferentiation of Mesenchymal Stem/Stromal Cells Towards Neuron-Like Cells. *Front Cell Dev Biol.* 2020 Aug 31;8:869.
107. Di Nicola M., Carlo-Stella C., Magni M., Milanesi M., Longoni P.D., Matteucci P., Grisanti S., Gianni A.M. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood.* 2002; 99: 3838-3843.
108. Djouad F., Plence P., Bony C., Tropel P., Apparailly F., Sany J., Noël D., Jorgensen C. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood.* 2003 Nov 15;102(10):3837-44.
109. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop Dj., Horwitz E. Minimal criteria for defining

- multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
110. Dominguez-Bendala J., Ricordi C. Stem cell plasticity and tissue replacement. *Cell Transplant*. 2005; 14(7): pp. 423-425.
111. Eckes B., Nischt R., Krieg T. Cell-matrix interactions in dermal repair and scarring. *Fibrogenesis. Tissue. Repair*. 2010; 3: 4.
112. Eggenhofer E., Benseler V., Kroemer A., Popp F.C., Geissler E.K., Schlitt H.J., Baan C.C., Dahlke M.H., Hoogduijn M.J. Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion. *Front Immunol*. 2012 Sep 26;3:297.
113. Eggenhofer E., Luk F., Dahlke M.H., Hoogduijn M.J. The life and fate of mesenchymal stem cells. *Front Immunol*. 2014 May 19;5:148.
114. El Baz H., Demerdash Z., Kamel M., Hammam O., Abdelhady D.S., Mahmoud S., Hassan S., Mahmoud F., Atta S., Riad N.M., Gaafar T. Induction of Hepatic Regeneration in an Experimental Model Using Hepatocyte-Differentiated Mesenchymal Stem Cells. *Cell Reprogram*. 2020 Jun;22(3):134-146.
115. Elliot S., Wikramanayake T.C., Jozic I., Tomic-Canic M. A Modeling Conundrum: Murine Models for Cutaneous Wound Healing. *J Invest Dermatol*. 2018 Apr;138(4):736-740.
116. English K., Barry F.P., Field-Corbett C.P., Mahon B.P. IFN-gamma and TNF-alpha differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells. *Immunol. Lett*. 2007; 110: 91-100.
117. English K., Barry F.P., Mahon B.P. Murine mesenchymal stem cells suppress dendritic cell migration, maturation and antigen presentation. *Immunol. Lett*. 2008; 115: 50-58.
118. English K., Ryan J.M., Tobin L., Murphy M.J., Barry F.P., Mahon B.P. Cell contact, prostaglandin E(2) and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4+CD25(High) forkhead box P3+ regulatory T cells. *Clin. Exp. Immunol*. 2009; 156: 149-160.
119. Erickson J.R., Echeverri K. Learning from regeneration research organisms: The circuitous road to scar free wound healing. *Dev Biol*. 2018 Jan 15;433(2):144-154.
120. Espagnolle N., Balguerie A., Arnaud E., Sensebé L., Varin A. CD54-Mediated Interaction with Pro-inflammatory Macrophages Increases the Immunosuppressive Function of Human Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cell Reports*. 2017; 8(4):961-976.
121. Eto S., Goto M., Soga M., Kaneko Y., Uehara Y., Mizuta H., Era T. Mesenchymal stem cells derived from human iPS cells via mesoderm and neuroepithelium have different features and therapeutic potentials. *PLoS One*. 2018 Jul 25;13(7):e0200790.
122. Evans M.J., Kaufman M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981 Jul 9;292(5819):154-6.
123. Even-Ram S., Yamada K.M. Cell migration in 3D matrix. *Curr. Opin. Cell. Biol*. 2005; 17: 524-532.

124. Evseenko D., Zhu Y., Schenke-Layland K., Kuo J., Latour B., Ge S., Scholes J., Dravid G., Li X., MacLellan W.R., Crooks G.M. Mapping the first stages of mesoderm commitment during differentiation of human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Aug 3;107(31):13742-7.
125. Fang S., Xu C., Zhang Y., Xue C., Yang C., Bi H., Qian X., Wu M., Ji K., Zhao Y., Wang Y., Liu H., Xing X. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cell-derived exosomal microRNAs suppress myofibroblast differentiation by inhibiting the transforming growth factor- β /SMAD2 pathway during wound healing. *Stem Cells Transl Med*. 2016 Oct;5(10):1425-1439.
126. Fathke C., Wilson L., Hutter J., Kapoor V., Smith A., Hocking A., Isik F. Contribution of bone marrow-derived cells to skin: collagen deposition and wound repair. *Stem Cells*. 2004; 22: 812-822.
127. Fedarko N.S., Bianco P., Vetter U., Robey P.G. Human bone cell enzyme expression and cellular heterogeneity: correlation of alkaline phosphatase enzyme activity with cell cycle. *J Cell Physiol*. 1990 Jul;144(1):115-21.
128. Feng D., Zhao W.L., Ye Y.Y., Bai X.C., Liu R.Q., Chang L.F., Zhou Q., Sui S.F. Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *Traffic* 2010, 11, 675–687.
129. Feng N., Han Q., Li J., Wang S., Li H., Yao X., Zhao R.C. Generation of highly purified neural stem cells from human adipose-derived mesenchymal stem cells by Sox1 activation. *Stem Cells Dev*. 2014 Mar 1;23(5):515-29.
130. Ferreira J.R., Teixeira G.Q., Santos S.G., Barbosa M.A., Almeida-Porada G., Gonçalves R.M. Mesenchymal Stromal Cell Secretome: Influencing Therapeutic Potential by Cellular Pre-conditioning. *Front Immunol*. 2018 Dec 4;9:2837. doi: 10.3389/fimmu.2018.02837. eCollection 2018.
131. Fernando M.R., Reyes J.L., Iannuzzi J., Leung G., McKay D.M. The pro-inflammatory cytokine, interleukin-6, enhances the polarization of alternatively activated macrophages. *PLoS One*. 2014 Apr 15;9(4):e94188.
132. Ferguson S.W., Wang J., Lee C.J., Liu M., Neelamegham S., Canty J.M., Nguyen J. The microRNA regulatory landscape of MSC-derived exosomes: a systems view. *Sci Rep*. 2018 Jan 23;8(1):1419.
133. Fickert S., Fiedler J., Brenner R.E. Identification, quantification and isolation of mesenchymal progenitor cells from osteoarthritic synovium by fluorescence automated cell sorting. *Osteoarthritis Cartilage*, 2003, V. 11, N. 11, p. 790-800.
134. Filioli Uranio M., Valentini L., Lange-Consiglio A., Caira M., Guaricci A.C., L'abbate A., Catacchio C.R., Ventura M., Cremonesi F., Dell'aquila M.E. Isolation, proliferation, cytogenetic, and molecular characterization and in vitro differentiation potency of canine stem cells from foetal adnexa: A comparative study of amniotic fluid, amnion, and umbilical cord matrix. *Mol Reprod Dev*. 2011 May;78(5):361-73.
135. Fischer U.M., Harting M.T., Jimenez F., Monzon-Posadas W.O., Xue H., Savitz S.I., Laine G.A., Cox C.S. Jr. Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect. *Stem Cells Dev*. 2009 Jun;18(5):683-92.

136. Fong C.Y., Chak L.L., Biswas A., Tan J.H., Gauthaman K., Chan W.K., Bongso A. Human Wharton's jelly stem cells have unique transcriptome profiles compared to human embryonic stem cells and other mesenchymal stem cells. *Stem Cell Rev Rep.* 2011 Mar;7(1):1-16.
137. Francois M., Romieu-Mourez R., Li M., Galipeau J. Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2,3- dioxygenase and bystander M2 macrophage differentiation. *Mol Ther* 2012;20:187–195.
138. Frazier T.P., McLachlan J.B., Gimble J.M., Tucker H.A., Rowan B.G. Human Adipose-Derived Stromal/Stem Cells Induce Functional CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ CD127⁻ Regulatory T Cells Under Low Oxygen Culture Conditions. *Stem Cells Dev.* 2014 May 1;23(9):968-77.
139. Freiman A., Shandalov Y., Rozenfeld D., Shor E., Segal S., Ben-David D., Meretzki S., Egozi D., Levenberg S. Adipose-derived endothelial and mesenchymal stem cells enhance vascular network formation on three-dimensional constructs in vitro. *Stem Cell Res Ther.* 2016 Jan 11;7:5.
140. Friedenstein A.J. Stromal mechanisms of bone marrow: cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Haematol. Blood Transfus.*, 1980, V. 25, p. 19-29.
141. Friedenstein A.J., Chailakhyan R.K., Gerasimov U.V. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet.*, 1987, V. 20, N. 3, p. 263-272.
142. Friedenstein A.J., Deriglasova U.F., Kulagina N.N., Panasuk A.F., Rudakowa S.F., Luriá E.A., Ruadkow I.A. Precursors for fibroblasts in different populations of hemopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exper Hematol.* 1974; 2:83-92.
143. Friedl P., Wolf K. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J. Cell. Biol.* 2010; 188: 11-19.
144. Frobel J., Hemedá H., Lenz M., Abagnale G., Jousen S., Denecke B., Sarić T., Zenke M., Wagner W. Epigenetic rejuvenation of mesenchymal stromal cells derived from induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports.* 2014 Sep 9;3(3):414-22.
145. Frumento G., Rotondo R., Tonetti M., Damonte G., Benatti U., Ferrara G.B. Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Exp Med.* 2002 Aug 19;196(4):459-468.
146. Fu W., Yue Y., Miao K., Xi G., Zhang C., Wang W., An L., Tian J. Repression of FGF signaling is responsible for Dnmt3b inhibition and impaired de novo DNA methylation during early development of in vitro fertilized embryos. *Int J Biol Sci.* 2020 Oct 3;16(15):3085-3099.
147. Fukuchi Y., Nakajima H., Sugiyama D., Hirose I., Kitamura T., Tsuji K. Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. *Stem Cells.* 2004;22(5):649-58.
148. Fukuda K. Application of mesenchymal stem cells for the regeneration of cardiomyocyte and its use for cell transplantation therapy. *Hum Cell.* 2003 16(3): pp. 83-94.

149. Furman D., Campisi J., Verdin E., Carrera-Bastos P., Targ S., Franceschi C., Ferrucci L., Gilroy D.W., Fasano A., Miller G.W., Miller A.H., Mantovani A., Weyand C.M., Barzilai N., Goronzy J.J., Rando T.A., Effros R.B., Lucia A., Kleinstreuer N., Slavich G.M. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nat Med.* 2019 Dec;25(12):1822-1832.
150. Gabrielyan A., Quade M., Gelinsky M., Rösen-Wolff A. IL-11 and soluble VCAM-1 are important components of Hypoxia Conditioned Media and crucial for Mesenchymal Stromal Cells attraction. *Stem Cell Res.* 2020 May;45:101814.
151. Gao L.R., Pei X.T., Ding Q.A., Chen Y., Zhang N.K., Chen H.Y., Wang Z.G., Wang Y.F., Zhu Z.M., Li T.C., Liu H.L., Tong Z.C., Yang Y., Nan X., Guo F., Shen J.L., Shen Y.H., Zhang J.J., Fei Y.X., Xu H.T., Wang L.H., Tian H.T., Liu D.Q., Yang Y. A critical challenge: dosage-related efficacy and acute complication intracoronary injection of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in acutemyocardial infarction. *Int J Cardiol.* 2013 Oct 9;168(4):3191-3199.
152. Gao S., Mao F., Zhang B., Zhang L., Zhang X., Wang M., Yan Y., Yang T., Zhang J., Zhu W., Qian H., Xu W. Mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce macrophage M2 polarization through the nuclear factor- κ B and signal transducer and activator of transcription 3 pathways. *Exp Biol Med (Maywood).* 2014 Mar;239(3):366-375.
153. Galipeau J., Sensébé L. Mesenchymal Stromal Cells: Clinical Challenges and Therapeutic Opportunities. *Cell Stem Cell.* 2018 Jun 1;22(6):824-833.
154. Garcia-Leon J.A., Caceres-Palomo L., Sanchez-Mejias E., Mejias-Ortega M., Nuñez-Diaz C., Fernandez-Valenzuela J.J., Sanchez-Varo R., Davila J.C., Vitorica J., Gutierrez A. Human Pluripotent Stem Cell-Derived Neural Cells as a Relevant Platform for Drug Screening in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci.* 2020 Sep 18;21(18):6867.
155. Gardner R.L. Stem cells: potency, plasticity and public perception. *J Anat.* 2002, 200(Pt 3): pp. 277-282.
156. Gearhart J. New potential for human embryonic stem cells. *Science.* 1998 Nov 6;282(5391):1061-1062.
157. Geiger B., Yamada K.M. Molecular architecture and function of matrix adhesions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2011; 3.
158. Ghajar C.M., Kachgal S., Kniazeva E., Mori H., Costes S.V., George S.C., Putnam A.J. Mesenchymal cells stimulate capillary morphogenesis via distinct proteolytic mechanisms. *Exp. Cell. Res.* 2010; 316(5):813-25.
159. Ghannam S., Bouffi C., Djouad F., Jorgensen C., Noël D. Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. *Stem Cell Res Ther.* 2010 Mar 15;1(1):2.
160. Giovannini S., Diaz-Romero J., Aigner T., Heini P., Mainil-Varlet P., Nestic D. Micromass co-culture of human articular chondrocytes and human bone marrow mesenchymal stem cells to investigate stable neocartilage tissue formation in vitro. *Eur Cell Mater.* 2010 Oct 5;20: 245-59.
161. Glenn J.D., Whartenby K.A. Mesenchymal stem cells: Emerging mechanisms of immunomodulation and therapy. *World J. Stem Cells.* 2014; 6:526-539.

162. Glennie S., Soeiro I., Dyson P.J., Lam E.W., Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood*. 2005 Apr 1;105(7):2821-7.
163. Gonçalves F.D.C., Luk F., Korevaar S.S., Bouzid R., Paz A.H., López-Iglesias C., Baan C., Merino A., Hoogduijn M.J. Membrane particles generated from mesenchymal stromal cells modulate immune responses by selective targeting of pro-inflammatory monocytes. *Sci Rep*. 2017 Sep 21;7(1):12100.
164. Ramos-Gonzalez G., Wittig O., Diaz-Solano D., Salazar L., Ayala-Grosso C., Cardier J.E. Evaluation of epithelial progenitor cells and growth factors in a preclinical model of wound healing induced by mesenchymal stromal cells. *Biosci Rep*. 2020 Jul 31;40(7):BSR20200461.
165. Gonzalez M.A., Gonzalez-Rey E., Rico L., Büscher D., Delgado M. Treatment of experimental arthritis by inducing immune tolerance with human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Arthritis. Rheum*. 2009; 60: 1006-1019.
166. Gonzalez-Rey E., Gonzalez M.A., Varela N., O'Valle F., Hernandez-Cortes P., Rico L., Buscher D., Delgado M. Human adipose-derived mesenchymal stem cells reduce inflammatory and T cell responses and induce regulatory T cells in vitro in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2010 Jan;69(1):241-8.
167. Götherström C., West A., Liden J., Uzunel M., Lahesmaa R., Le Blanc K. Difference in gene expression between human fetal liver and adult bone marrow mesenchymal stem cells. *Haematologica*. 2005 Aug;90(8):1017-26.
168. Graf T., Enver T. Forcing cells to change lineages. *Nature*. 2009;462(7273):587-94.
169. Grégoire C., Ritacco C., Hannon M., Seidel L., Delens L., Belle L., Dubois S., Vériter S., Lechanteur C., Briquet A., Servais S., Ehx G., Beguin Y., Baron F. Comparison of Mesenchymal Stromal Cells From Different Origins for the Treatment of Graft-vs.-Host-Disease in a Humanized Mouse Model. *Front Immunol*. 2019 Apr 2;10:619.
170. Groh M.E., Maitra B., Szekely E., Koç O.N. Human mesenchymal stem cells require monocyte-mediated activation to suppress alloreactive T cells. *Exp Hematol*. 2005 Aug;33(8):928-34.
171. Grose R., Werner S. Wound-healing studies in transgenic and knockout mice. *Mol Biotechnol*. 2004 Oct;28(2):147-66
172. Guan Q., Li Y., Shpiruk T., Bhagwat S., Wall D.A. Inducible indoleamine 2,3-dioxygenase 1 and programmed death ligand 1 expression as the potency marker for mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. 2018 May;20(5):639-649.
173. Guan Y.T., Xie Y., Li D.S., Zhu Y.Y., Zhang X.L., Feng Y.L., Chen Y.P., Xu L.J., Liao P.F., Wang G. Comparison of biological characteristics of mesenchymal stem cells derived from the human umbilical cord and decidua parietalis. *Mol Med Rep*. 2019 Jul;20(1):633-639.
174. Guillén M.I., Platas J., Pérez Del Caz M.D., Mirabet V., Alcaraz M.J. Paracrine Anti-inflammatory Effects of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells in Human Monocytes. *Front Physiol*. 2018 May 31;9:661. doi: 10.3389/fphys.2018.00661. eCollection 2018.

175. Guillot P.V., De Bari C., Dell'Accio F., Kurata H., Polak J., Fisk N.M. Comparative osteogenic transcription profiling of various fetal and adult mesenchymal stem cell sources. *Differentiation*. 2008 Nov;76(9):946-57.
176. Guillot P.V., Gotherstrom C., Chan J., Kurata H., Fisk N.M. Human first-trimester fetal MSC express pluripotency markers and grow faster and have longer telomeres than adult MSC. *Stem Cells*. 2007 Mar;25(3):646-54.
177. Gurtner G.C., Callaghan M.J., Longaker M.T. Progress and potential for regenerative medicine. *Annu. Rev. Med.* 2007; 58: 299-312.
178. Gurtner G.C., Werner S., Barrandon Y., Longaker M.T. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008; 453: 314-321.
179. Han K.H., Kim A.K., Kim M.H., Kim D.H., Go H.N., Kang D., Chang J.W., Choi S.W., Kang K.S., Kim D.I. Protein profiling and angiogenic effect of hypoxia-cultured human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in hindlimb ischemia. *Tissue Cell*. 2017 Dec;49(6):680-690.
180. Haraszti R.A., Didiot M.C., Sapp E., Leszyk J., Shaffer S.A., Rockwell H.E., Gao F., Narain N.R., DiFiglia M., Kiebish M.A, Aronin N., Khvorova A.. High-resolution proteomic and lipidomic analysis of exosomes and microvesicles from different cell sources. *J Extracell Vesicles*. 2016 Nov 17;5:32570.
181. Hatano S.Y., Tada M., Kimura H., Yamaguchi S., Kono T., Nakano T., Suemori H., Nakatsuji N., Tada T. Pluripotential competence of cells associated with Nanog activity. *Mech Dev*. 2005 Jan;122(1):67-79.
182. Hayden M.S., Ghosh S.. Regulation of NF- κ B by TNF family cytokines. *Semin Immunol*. 2014 Jun;26(3):253-66.
183. Haynesworth S.E., Baber M.A., Caplan A.I. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. *J Cell Physiol*. 1996 Mar;166(3):585-92.
184. He H., Nagamura-Inoue T., Takahashi A., Mori Y., Yamamoto Y., Shimazu T., Tsunoda H., Tojo A. Immunosuppressive properties of Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells in vitro. *Int J Hematol*. 2015 Sep;102(3):368-78.
185. Heino T.J., Hentunen T.A., Vaananen H.K. Conditioned medium from osteocytes stimulates the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells and their differentiation into osteoblasts. *Exp. Cell Res.*, 2004, V. 294, N. 2, p. 458-468.
186. Helmo F.R., Machado J.R., Guimarães C.S., Teixeira V.de P., dos Reis M.A., Corrêa R.R. Fetal wound healing biomarkers. *Dis Markers*. 2013;35(6):939-44.
187. Henriksen J.L., Sørensen N.B., Fink T., Zachar V., Porsborg S.R. Systematic Review of Stem-Cell-Based Therapy of Burn Wounds: Lessons Learned from Animal and Clinical Studies. *Cells*. 2020 Nov 26;9(12):2545.
188. Herzig M.C., Christy B.A., Montgomery R.K., Delavan C.P., Jensen K.J., Lovelace S.E., Cantu C., Salgado C.L., Cap A.P., Bynum J.A. Interactions of human mesenchymal stromal cells with peripheral blood mononuclear cells in a Mitogenic proliferation assay. *J Immunol Methods*. 2021 May;492:113000.
189. Herrera M.B., Bussolati B., Bruno S., Morando L., Mauriello-Romanazzi G., Sanavio F., Stamenkovic I., Biancone L., Camussi G. Exogenous mesenchymal

- stem cells localize to the kidney by means of CD44 following acute tubular injury. *Kidney Int.* 2007 Aug;72(4):430-41.
190. Hesketh M., Sahin K.B., West Z.E., Murray R.Z. Macrophage Phenotypes Regulate Scar Formation and Chronic Wound Healing. *Int J Mol Sci.* 2017 Jul 17;18(7). pii: E1545
191. Hochedlinger K., Plath K. Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. *Development.* 2009;136(4):509-23
192. Honczarenko M., Le Y., Swierkowski M., Ghiran I., Glodek A.M., Silberstein L.E. Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. *Stem Cells.* 2006; 24: 1030-1041.
193. Hong J.H., Hwang E.S., McManus M.T., Amsterdam A., Tian Y., Kalmukova R., Mueller E., Benjamin T., Spiegelman B.M., Sharp P.A., Hopkins N., Yaffe M.B. TAZ, a transcriptional modulator of mesenchymal stem cell differentiation. *Science*, 2005, V. 309, N. 5737, p. 1074-1078.
194. Horwitz E.M., Le Blanc K., Dominici M., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F.C., Deans R.J., Krause D.S., Keating A.; International Society for Cellular Therapy. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2005;7(5):393-5.
195. Hsiao S.T., Asgari A., Lokmic Z., Sinclair R., Disting G.J., Lim S.Y., Dilley R.J. Comparative analysis of paracrine factor expression in human adult mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose, and dermal tissue. *Stem Cells Dev.* 2012 Aug 10;21(12):2189-203.
196. Hu C., Zhao L., Zhang L., Bao Q., Li L. Mesenchymal stem cell-based cell-free strategies: safe and effective treatments for liver injury. *Stem Cell Res Ther.* 2020 Sep 3;11(1):377.
197. Hu C.D., Kosaka Y., Marcus P., Rashedi I., Keating A. Differential Immunomodulatory Effects of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells on Natural Killer Cells. *Stem Cells Dev.* 2019 Jul 15;28(14):933-943.
198. Hu J., Wang Y., Gong H., Yu C., Guo C., Wang F., Yan S., Xu H. Long term effect and safety of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells on type 2 diabetes. *Exp Ther Med.* 2016 Sep;12(3):1857-1866.
199. Hu M.S., Borrelli M.R., Lorenz H.P., Longaker M.T., Wan D.C. Mesenchymal Stromal Cells and Cutaneous Wound Healing: A Comprehensive Review of the Background, Role, and Therapeutic Potential. *Stem Cells Int.* 2018 May 20;2018:6901983.
200. Hu Y., Liao L., Wang Q., Ma L., Ma G., Jiang X., Zhao R.C. Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human fetal pancreas. *J Lab Clin Med.* 2003 May;141(5):342-9.
201. Huang H., Tang X. Phenotypic Determination and Characterization of Nestin-Positive Precursors Derived from Human Fetal Pancreas. *Laboratory Investigation.* 2003;83:539-547.
202. Huang J., Wang F., Okuka M., Liu N., Ji G., Ye X., Zuo B., Li M., Liang P., Ge W.W., Tsibris J.C., Keefe D.L., Liu L. Association of telomere length with authentic pluripotency of ES/iPS cells. *Cell Res.* 2011 May;21(5):779-92.

203. Igura K., Zhang X., Takahashi K., Mitsuru A., Yamaguchi S., Takashi T.A. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytherapy*, 2004, V. 6, N. 6, p. 543-553.
204. Imhof B.A., Aurrand-Lions M. Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nat Rev Immunol*. 2004 Jun;4(6):432-44.
205. Inokuma D., Abe R., Fujita Y., Sasaki M., Shibaki A., Nakamura H., McMillan J.R., Shimizu T., Shimizu H. CTACK/CCL27 accelerates skin regeneration via accumulation of bone marrow-derived keratinocytes. *Stem Cells*. 2006 Dec;24(12):2810-6.
206. Ip J.E., Wu Y., Huang J., Zhang L., Pratt R.E., Dzau V.J. Mesenchymal stem cells use integrin beta1 not CXC chemokine receptor 4 for myocardial migration and engraftment. *Mol Biol Cell*. 2007 Aug;18(8):2873-82.
207. Ishikane S., Ohnishi S., Yamahara K., Sada M., Harada K., Mishima K., Iwasaki K., Fujiwara M., Kitamura S., Nagaya N., Ikeda T. Allogeneic injection of fetal membrane-derived mesenchymal stem cells induces therapeutic angiogenesis in a rat model of hind limb ischemia. *Stem Cells*. 2008 Oct;26(10):2625-33. doi: 10.1634/stemcells.2008-0236. Epub 2008 Jul 31.
208. Islam A., Urbarova I., Bruun J.A., Martinez-Zubiaurre I. Large-scale secretome analyses unveil the superior immunosuppressive phenotype of umbilical cord stromal cells as compared to other adult mesenchymal stromal cells. *Eur Cell Mater*. 2019 Feb 20;37:153-174. doi: 10.22203/eCM.v037a10.
209. Jackson J.S., Golding J.P., Chapon C., Jones W.A., Bhakoo K.K. Homing of stem cells to sites of inflammatory brain injury after intracerebral and intravenous administration: a longitudinal imaging study. *Stem Cell Res Ther*. 2010 Jun 15;1(2):17.
210. Jafari M., Asghari A., Delbandi A.A., Jalessi M., Jazayeri M.H., Samareh R., Tajik N. Priming TLR3 and TLR4 in human adipose- and olfactory mucosa-derived mesenchymal stromal cells and comparison of their cytokine secretions. *Cytotechnology*. 2020 Feb;72(1):57-68.
211. Jiang J., Chan Y.S., Loh Y.H., Cai J., Tong G.Q., Lim C.A., Robson P., Zhong S., Ng H.H. A core Klf circuitry regulates self-renewal of embryonic stem cells. *Nat Cell Biol*. 2008 Mar;10(3):353-60.
212. Jiang L., Liang J., Huang W., Wu Z., Paul C., Wang Y. Strategies and Challenges to Improve Cellular Programming-Based Approaches for Heart Regeneration Therapy. *Int J Mol Sci*. 2020 Oct 16;21(20):E7662
213. Jiang X.X., Zhang Y., Liu B., Zhang S.X., Wu Y., Yu X.D., Mao N. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 2005; 105:4120–4126.
214. Jiang X.X., Zhang Y., Liu B., Zhang S.X., Wu Y., Yu X.D., Mao N. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*. 2005; 105: 4120-4126.
215. Jiang Z., Liu G., Meng F., Wang W., Hao P., Xiang Y., Wang Y., Han R., Li F., Wang L, Li X. Paracrine effects of mesenchymal stem cells on the activation of keratocytes. *Br J Ophthalmol*. 2017 Nov;101(11):1583-1590.

216. Joly A., Rousset R. Tissue Adaptation to Environmental Cues by Symmetric and Asymmetric Division Modes of Intestinal Stem Cells. *Int J Mol Sci.* 2020 Sep 2;21(17):6362.
217. Juhásová J., Juhás S., Klíma J., Strnádel J., Holubová M., Motlík Jr. J. Osteogenic differentiation of miniature pig mesenchymal stem cells in 2D and 3D environment. *Physiol Res.* 2011 Mar 14.
218. Jung K.W. Perspectives on human stem cell research. *J Cell Physiol.* 2009 Sep;220(3):535-7.
219. Kabanov A.V. Polymer genomics: an insight into pharmacology and toxicology of nanomedicines. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006 Dec 30;58(15):1597-621.
220. Kabanov A.V., Vinogradov S.V., Suzdaltseva Y.G., Alakhov V.Yu. Water-soluble block polycations as carriers for oligonucleotide delivery. *Bioconjug Chem.* 1995 Nov-Dec;6(6):639-43.
221. Kadam S.S., Bhonde R.R. Islet neogenesis from the constitutively nestin expressing human umbilical cord matrix derived mesenchymal stem cells. *Islets.* 2010 Mar-Apr;2(2):112-20. doi: 10.4161/isl.2.2.11280.
222. Kähkönen T.E., Ivaska K.K., Jiang M., Büki K.G., Väänänen H.K., Härkönen P.L. Role of fibroblast growth factor receptors (FGFR) and FGFR like-1 (FGFRL1) in mesenchymal stromal cell differentiation to osteoblasts and adipocytes. *Mol Cell Endocrinol.* 2018 Feb 5;461:194-204.
223. Kato Y., Iwata T., Washio K., Yoshida T., Kuroda H., Morikawa S., Hamada M., Ikura K., Kaibuchi N., Yamato M., Okano T., Uchigata Y. Creation and Transplantation of an Adipose-derived Stem Cell (ASC) Sheet in a Diabetic Wound-healing Model. *J Vis Exp.* 2017 Aug 4;(126).
224. Katoh M., Katoh M. Notch ligand, JAG1, is evolutionarily conserved target of canonical WNT signaling pathway in progenitor cells. *Int J Mol Med.* 2006. 17(4): pp. 681-685.
225. Katz A.J., Tholpady A., Tholpady S.S., Shang H., Ogle R.C. Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells. *Stem Cells*, 2005, V. 23, N. 3, p. 412-423.
226. Kemp K.C., Hows J., Donaldson C. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Leuk Lymphoma.* 2005 Nov;46(11):1531-44.
227. Kennea N.L., Waddington S.N., Chan J., O'Donoghue K., Yeung D., Taylor D.L., Al-Allaf F.A., Pirianov G., Themis M., Edwards A.D., Fisk N.M., Mehmet H. Differentiation of human fetal mesenchymal stem cells into cells with an oligodendrocyte phenotype. *Cell Cycle.* 2009 Apr 1;8(7):1069-79.
228. Kim B.J., Seo J.H., Bubien J.K., Oh Y.S. Differentiation of adult bone marrow stem cells into neuroprogenitor cells in vitro. *Neuroreport.* 2002 13(9): pp. 1185-1188.
229. Kim J., Hematti P. Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages. *Exp Hematol.* 2009 Dec;37(12):1445-53.
230. Kim J.Y., Park M., Kim Y.H., Ryu K.H., Lee K.H., Cho K.A., Woo S.Y. Tonsil-derived mesenchymal stem cells (T-MSCs) prevent Th17-mediated autoimmune

- response via regulation of the programmed death-1/programmed death ligand-1 (PD-1/PD-L1) pathway. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018 Feb;12(2):e1022-e1033.
231. Kim O.H., Yoon O.J., Lee H.J. Silk fibroin scaffolds potentiate immunomodulatory function of human mesenchymal stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019 Nov 5;519(2):323-329.
232. Kimbrel E.A., Kouris N.A., Yavanian G.J., Chu J., Qin Y., Chan A., Singh R.P., McCurdy D., Gordon L., Levinson R.D., Lanza R. Mesenchymal stem cell population derived from human pluripotent stem cells displays potent immunomodulatory and therapeutic properties. *Stem Cells Dev.* 2014 Jul 15;23(14):1611-24.
233. Kimura M., Furukawa H., Shoji M., Shinozawa T. Increased mesodermal and mesendodermal populations by BMP4 treatment facilitates human iPSC line differentiation into a cardiac lineage. *J Stem Cells Regen Med.* 2019 Dec 24;15(2):45-51.
234. Klyushnenkova E., Mosca J.D., Zernetkina V., Majumdar M.K., Beggs K.J., Simonetti D.W., Deans R.J., McIntosh K.R. T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. *J Biomed Sci.* 2005;12(1):47-57.
235. Konala V.B.R., Bhonde R., Pal R. Secretome studies of mesenchymal stromal cells (MSCs) isolated from three tissue sources reveal subtle differences in potency. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2020 Oct 2.
236. Kørbling M., Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? *N Engl J Med.* 2003 Aug 7;349(6):570-82.
237. Kozłowska U., Krawczenko A., Futoma K., Jurek T., Rorat M., Patrzalek D., Klimczak A. Similarities and differences between mesenchymal stem/progenitor cells derived from various human tissues. *World J Stem Cells.* 2019 Jun 26;11(6):347-374.
238. Kouroupi G., Antoniou N., Prodromidou K., Taoufik E., Matsas R. Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cell-Based Models in Parkinson's Disease for Drug Identification. *Int J Mol Sci.* 2020 Sep 26;21(19):E7113.
239. Kovtun A., Messerer D.A.C., Scharffetter-Kochanek K., Huber-Lang M., Ignatius A. Neutrophils in Tissue Trauma of the Skin, Bone, and Lung: Two Sides of the Same Coin. *J Immunol Res.* 2018 Apr 23;2018:8173983.
240. Kraitchman D.L., Tatsumi M., Gilson W.D., Ishimori T., Kedziorek D., Walczak P., Segars W.P., Chen H.H., Fritzges D., Izbudak I., Young R.G., Marcelino M., Pittenger M.F., Solaiyappan M., Boston R.C., Tsui B.M., Wahl R.L., Bulte J.W. Dynamic imaging of allogeneic mesenchymal stem cells trafficking to myocardial infarction. *Circulation.* 2005 Sep 6;112(10):1451-61.
241. Kramann R., Schneider R.K., DiRocco D.P., Machado F., Fleig S., Bondzie P.A., Henderson J.M., Ebert B.L., Humphreys B.D. Perivascular Gli1+ progenitors are key contributors to injury-induced organ fibrosis. *Cell Stem Cell.* 2015 Jan 8;16(1):51-66.
242. Krampera M., Cosmi L., Angeli R., Pasini A., Liotta F., Andreini A., Santarlaschi V., Mazzinghi B., Pizzolo G., Vinante F., Romagnani P., Maggi

- E., Romagnani S., Annunziato F. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006; 24:386–398.
243. Krampera M., Glennie S., Dyson J., Scott D., Laylor R., Simpson E., Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood*. 2003 May 1;101(9):3722-9.
244. Khosravi M., Bidmeshkipour A., Moravej A., Hojjat-Assari S., Naserian S., Karimi M.H. Induction of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells by mesenchymal stem cells is associated with RUNX complex factors. *Immunol Res*. 2018 Feb;66(1):207-218. doi: 10.1007/s12026-017-8973-4.
245. Kumar S., Curran J.E, DeLeon E., Leandro A.C., Howard T.E., Lehman D.M., Williams-Blangero S., Glahn D.C., Blangero J. Role of miRNA-mRNA Interaction in Neural Stem Cell Differentiation of Induced Pluripotent Stem Cells. *Int J Mol Sci*. 2020 Sep 23;21(19):E6980.
246. Kumar V., Abbas A.K., Fausto N., Aster J.C. Tissue Renewal, Regeneration, and Repair. *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease*, Saunders Elsevier; 2009. p. 79-110.
247. Kuo Y.R., Wang C.T., Cheng J.T., Kao G.S., Chiang Y.C., Wang C.J. Adipose-Derived Stem Cells Accelerate Diabetic Wound Healing Through the Induction of Autocrine and Paracrine Effects. *Cell Transplant*. 2016;25(1):71-81.
248. Kurpinski K., Lam H., Chu J., Wang A., Kim A., Tsay E., Agrawal S., Schaffer D.V., Li S. Transforming growth factor-beta and notch signaling mediate stem cell differentiation into smooth muscle cells. *Stem Cells*. 2010 Apr;28(4):734-42.
249. Kyurkchiev D., Bochev I., Ivanova-Todorova E., Mourdjeva M., Oreshkova T., Belemezova K., Kyurkchiev S. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells*. 2014 Nov 26;6(5):552-70.
250. Lacitignola L., Staffieri F., Rossi G., Francioso E., Crovace A. Survival of bone marrow mesenchymal stem cells labelled with red fluorescent protein in an ovine model of collagenase-induced tendinitis. *Vet Comp Orthop Traumatol*. 2014;27(3):204-9.
251. Laderach D.J., Compagno D., Toscano M.A., Croci D.O., Dergan-Dylon S., Salatino M., Rabinovich G.A. Dissecting the signal transduction pathways triggered by galectin-glycan interactions in physiological and pathological settings. *IUBMB Life*. 2010 Jan;62(1):1-13.
252. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
253. Lagarkova M.A., Shutova M.V., Bogomazova A.N., Vassina E.M., Glazov E.A., Zhang P., Rizvanov A.A., Chestkov I.V., Kiselev S.L. Induction of pluripotency in human endothelial cells resets epigenetic profile on genome scale. *Cell Cycle*. 2010 Mar 1;9(5):937-46.
254. Lalu M.M., Mazzarello S., Zlepzig J., Dong Y.Y.R., Montroy J., McIntyre L., Devereaux P.J., Stewart D.J., David Mazer C., Barron C.C., McIsaac D.I., Fergusson D.A. Safety and Efficacy of Adult Stem Cell Therapy for Acute Myocardial Infarction and Ischemic Heart Failure (SafeCell Heart): A Systematic Review and Meta-Analysis. *Stem Cells Transl Med*. 2018 Dec;7(12):857-866.

255. Lalu M.M., McIntyre L., Pugliese C., Fergusson D., Winston B.W., Marshall J.C., Granton J., Stewart D.J.; Canadian Critical Care Trials Group. Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (SafeCell): a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *PLoS One*. 2012;7(10):e47559.
256. Lai R.C., Chen T.S., Lim, S.K. Mesenchymal stem cell exosome: A novel stem cell-based therapy for cardiovascular disease. *Regen. Med*. 2011. 6, 481–492.
257. Lanza R., Russell D.W., Nagy A.. Engineering universal cells that evade immune detection. *Nat Rev Immunol*. 2019 Dec;19(12):723-733.
258. Lapidot T. Mechanism of human stem cell migration and repopulation of NOD/SCID and B2mnull NOD/SCID mice. The role of SDF-1/CXCR4 interactions. *Ann N Y Acad Sci*. 2001 Jun;938:83-95.
259. Lapidot T., Dar A., Kollet O. How do stem cells find their way home? *Blood*. 2005 Sep 15;106(6):1901-10.
260. Lau T.T., Wang D.A. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) homing factor for engineered regenerative medicine. *Expert. Opin. Biol. Ther*. 2011; 11: 189-197.
261. Le Blanc K. Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. *Cytotherapy* 2003; 5:485–489.
262. Le Blanc K., Rasmusson I., Götherström C., Seidel C., Sundberg B., Sundin M., Rosendahl K., Tammik C., Ringdén O. Mesenchymal stem cells inhibit the expression of CD25 (interleukin-2 receptor) and CD38 on phytohaemagglutinin-activated lymphocytes. *Scand J Immunol*. 2004 Sep;60(3):307-15.
263. Le Blanc K., Tammik C., Rosendahl K., Zetterberg E., Ringdén O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*. 2003 Oct;31(10):890-6.
264. Le Blanc K., Tammik L., Sundberg B., Haynesworth S.E., Ringdén O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand. J. Immunol*. 2003; 57: 11-20.
265. Le Burel S., Thepenier C., Boutin L., Lataillade J.J., Peltzer J. Effect of Mesenchymal Stromal Cells on T Cells in a Septic Context: Immunosuppression or Immunostimulation? *Stem Cells Dev*. 2017; 26:1477-1489.
266. Lecarpentier Y, Schussler O, Sakic A, Rincon-Garriz JM, Soulie P, Bochaton-Piallat ML, Kindler V. Human Bone Marrow Contains Mesenchymal Stromal Stem Cells That Differentiate In Vitro into Contractile Myofibroblasts Controlling T Lymphocyte Proliferation. *Stem Cells Int*. 2018 Apr 29;2018:6134787.
267. Lee J.W., Lee S.H., Youn Y.J., Ahn M.S., Kim J.Y., Yoo B.S., Yoon J., Kwon W., Hong I.S., Lee K., Kwan J., Park K.S., Choi D., Jang Y.S., Hong M.K. A randomized, open-label, multicenter trial for the safety and efficacy of adult mesenchymal stem cells after acute myocardial infarction. *J Korean Med Sci*. 2014 Jan;29(1):23-31.
268. Lee R.H., Seo M.J., Pulin A.A., Gregory C.A., Ylostalo J., Prockop D.J. The CD34-like protein PODXL and alpha6-integrin (CD49f) identify early progenitor MSCs with increased clonogenicity and migration to infarcted heart in mice. *Blood*. 2009 Jan 22;113(4):816-26.

269. Lee R.H., Seo M.J., Reger R.L., Spees J.L., Pulin A.A., Olson S.D., Prockop DJ. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2006; 103: 17438-17443.
270. Lee S.H., Lee J.H., Cho KH. Effects of Human Adipose-derived Stem Cells on Cutaneous Wound Healing in Nude Mice. *Ann Dermatol.* 2011 May;23(2):150-5.
271. Lee Y.S., Sah S.K., Lee J.H., Seo K.W., Kang K.S., Kim T.Y. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells ameliorate psoriasis-like skin inflammation in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016 Oct 8;9:281-288. doi: 10.1016/j.bbrep.2016.10.002. eCollection 2017 Mar.
272. Lemieux P., Vinogradov S.V., Gebhart C.L., Guérin N., Paradis G., Nguyen H.K., Ochietti B., Suzdaltseva Y.G., Bartakova E.V., Bronich T.K., St-Pierre Y., Alakhov V.Y., Kabanov A.V. Block and graft copolymers and NanoGel copolymer networks for DNA delivery into cell. *J Drug Target.* 2000;8(2):91-105.
273. Leung A., Crombleholme T.M., Keswani S.G. Fetal wound healing: implications for minimal scar formation. *Curr Opin Pediatr.* 2012 Jun;24(3):371-8.
274. Leuning D.G., Beijer N.R.M., du Fossé N.A., Vermeulen S., Liewers E., van Kooten C., Rabelink T.J., Boer J. The cytokine secretion profile of mesenchymal stromal cells is determined by surface structure of the microenvironment. *Sci Rep.* 2018 May 16;8(1):7716.
275. Li G., Peng H., Qian S., Zou X., Du Y., Wang Z., Zou L., Feng Z., Zhang J., Zhu Y., Liang H., Li B. Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Restored High-Fat-Fed Induced Hyperinsulinemia in Rats at Early Stage of Type 2 Diabetes Mellitus. *Cell Transplant.* 2020 Jan-Dec;29:963689720904628.
276. Li H., Rong P., Ma X., Nie W., Chen Y., Zhang J., Dong Q., Yang M., Wang W. Mouse Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Paracrine Alleviates Renal Fibrosis in Diabetic Nephropathy by Reducing Myofibroblast Transdifferentiation and Cell Proliferation and Upregulating MMPs in Mesangial Cells. *J Diabetes Res.* 2020 May 2;2020:3847171.
277. Li H.T., Liu Y., Liu H., Sun X. Effect for Human Genomic Variation During the BMP4-Induced Conversion From Pluripotent Stem Cells to Trophoblast. *Front Genet.* 2020 Apr 7;11:230.
278. Li N., Lu X., Zhao X., Xiang F.L., Xenocostas A., Karmazyn M., Feng Q. Endothelial nitric oxide synthase promotes bone marrow stromal cell migration to the ischemic myocardium via upregulation of stromal cell-derived factor-1alpha. *Stem Cells.* 2009 Apr;27(4):961-70.
279. Li X., Xu Z., Bai J., Yang S., Zhao S., Zhang Y., Chen X., Wang Y. Umbilical Cord Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Induce T Lymphocyte Apoptosis and Cell Cycle Arrest by Expression of Indoleamine 2, 3-Dioxygenase. *Stem Cells Int.* 2016;2016:7495135.
280. Li Y., Jin D., Xie W., Wen L., Chen W., Xu J., Ding J., Ren D. PPAR- γ and Wnt Regulate the Differentiation of MSCs into Adipocytes and Osteoblasts Respectively. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2018 Feb 23;13(3):185-192.

281. Lim J.Y., Kim B.S., Ryu D.B., Kim T.W., Park G., Min C.K. The therapeutic efficacy of mesenchymal stromal cells on experimental colitis was improved by the IFN-gamma and poly(I:C) priming through promoting the expression of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Stem Cell Res Ther.* 2021 Jan 7;12(1):37. doi: 10.1186/s13287-020-02087-7.
282. Liu L., Farhoodi H.P., Han M., Liu G., Yu J., Nguyen L., Nguyen B., Nguyen A., Liao W., Zhao W. Preclinical Evaluation of a Single Intravenous Infusion of hUC-MSC (BX-U001) in Rheumatoid Arthritis. *Cell Transplant.* Jan-Dec 2020;29:963689720965896.
283. Liu Y., Jing H., Kou X., Chen C., Liu D., Jin Y., Lu L., Shi S. PD-1 is required to maintain stem cell properties in human dental pulp stem cells. *Cell Death Differ.* 2018 Jul;25(7):1350-1360.
284. Liang X., Ding Y., Zhang Y., Tse H.F., Lian Q. Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cell-based therapy: current status and perspectives. *Cell Transplant.* 2014;23(9):1045-59.
285. Liesveld J.L., Sharma N., Aljitiawi O.S. Stem cell homing: From physiology to therapeutics. *Stem Cells.* 2020 Oct 1;38(10):1241-1253.
286. Lim H., Lee D., Choi W.K., Choi S.J., Oh W., Kim DH. Galectin-3 Secreted by Human Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells Reduces Aberrant Tau Phosphorylation in an Alzheimer Disease Model. *Stem Cells Int.* 2020 Jul 18;2020:8878412.
287. Liotta F., Angeli R., Cosmi L., Fili L., Manuelli C., Frosali F., Mazzinghi B., Maggi L., Pasini A., Lisi V., Santarlasci V., Consoloni L., Angelotti M.L., Romagnani P., Parronchi P., Krampera M., Maggi E., Romagnani S., Annunziato F. Toll-like receptors 3 and 4 are expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and can inhibit their T-cell modulatory activity by impairing Notch signaling. *Stem Cells.* 2008;26(1):279–289.
288. Liu F., Qiu H., Xue M., Zhang S., Zhang X., Xu J., Chen J., Yang Y, Xie J. MSC-secreted TGF- β regulates lipopolysaccharide-stimulated macrophage M2-like polarization via the Akt/FoxO1 pathway. *Stem Cell Res Ther.* 2019 Nov 26;10(1):345.
289. Liu J., Lu X.F., Wan L., Li Y.P., Li S.F., Zeng L.Y., Zeng Y.Z., Cheng L.H., Lu Y.R., Cheng J.Q. Suppression of human peripheral blood lymphocyte proliferation by immortalized mesenchymal stem cells derived from bone marrow of Banna Minipig inbred-line. *Transplant Proc.* 2004 Dec;36(10):3272-5.
290. Liu N., Patzak A., Zhang J. CXCR4-overexpressing bone marrow-derived mesenchymal stem cells improverepair of acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2013 Oct 1;305(7):F1064-73.
291. Liu S., Liu F., Zhou Y., Jin B., Sun Q., Guo S. Immunosuppressive Property of MSCs Mediated by Cell Surface Receptors. *Front Immunol.* 2020 Jul 28;11:1076.
292. Liu W.H., Liu J.J., Wu J., Zhang L.L., Liu F., Yin L., Zhang M.M., Yu B. Novel mechanism of inhibition of dendritic cells maturation by mesenchymal stem cells via interleukin-10 and the JAK1/STAT3 signaling pathway. *PLoS One.* 2013;8(1):e55487.

293. Liu Y., Goldberg A.J., Dennis J.E., Gronowicz G.A., Kuhn L.T. One-step derivation of mesenchymal stem cell (MSC)-like cells from human pluripotent stem cells on a fibrillar collagen coating. *PLoS One*. 2012;7(3):e33225. 21.
294. Liu Y., Xiao F., Hu X., Tang Z., Fu Z., Liang X., Zeng G., Zeng W., Liao Y., Ren Y., Liu Z., Peng H., Mei Q., Liu M. Recovery and maintenance of NESTIN expression in umbilical cord-MSC using a novel culture medium. *AMB Express*. 2020 Jul 28;10(1):132. doi: 10.1186/s13568-020-01067-7.
295. Longoni A., Pennings I., Cuenca Lopera M., van Rijen M.H.P., Peperzak V., Rosenberg A.J.W.P., Levato R., Gawlitta D. Endochondral Bone Regeneration by Non-autologous Mesenchymal Stem Cells. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020 Jul 9;8:651.
296. López-García L, Castro-Manreza ME. TNF- α and IFN- γ Participate in Improving the Immunoregulatory Capacity of Mesenchymal Stem/Stromal Cells: Importance of Cell-Cell Contact and Extracellular Vesicles. *Int J Mol Sci*. 2021 Sep 2;22(17):9531.
297. Lowe J.B. Glycosyltransferases and glycan structures contributing to the adhesive activities of L-, E- and P-selectin counter-receptors. *Biochem Soc Symp*. 2002;(69):33-45.
298. Lowry W.E., Richter L., Yachechko R., Pyle A.D., Tchieu J., Sridharan R., Clark A.T., Plath K. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Feb 26;105(8):2883-8.
299. Lozito T.P., Tuan R.S. Mesenchymal stem cells inhibit both endogenous and exogenous MMPs via secreted TIMPs. *J. Cell. Physiol*. 2011; 226(2):385-96.
300. Lozito T.P., Jackson W.M., Nesti L.J., Tuan R.S. Human mesenchymal stem cells generate a distinct pericellular zone of MMP activities via binding of MMPs and secretion of high levels of TIMPs. *Matrix Biol*. 2014 Feb;34:132-43.
301. Lu D., Chen B., Liang Z., Deng W., Jiang Y., Li S., Xu J., Wu Q., Zhang Z., Xie B., Chen S. Comparison of bone marrow mesenchymal stem cells with bone marrow-derived mononuclear cells for treatment of diabetic critical limb ischemia and foot ulcer: a double-blind, randomized, controlled trial. *Diabetes Res Clin Pract*. 2011 Apr;92(1):26-36.
302. Lu W., Fu C., Song L., Yao Y., Zhang X., Chen Z., Li Y., Ma G., Shen C. Exposure to supernatants of macrophages that phagocytized dead mesenchymal stem cells improves hypoxic cardiomyocytes survival. *Int J Cardiol*. 2013 May 10;165(2):333-40.
303. Lublin F.D., Bowen J.D., Huddleston J., Kremenutzky M., Carpenter A., Corboy J.R., Freedman M.S., Krupp L., Paulo C., Hariri R.J., Fischkoff S.A. Human placenta-derived cells (PDA-001) for the treatment of adults with multiple sclerosis: a randomized, placebo-controlled, multiple-dose study. *Mult Scler Relat Disord*. 2014 Nov;3(6):696-704.
304. Luciani M., Gritti A., Meneghini V. Human iPSC-Based Models for the Development of Therapeutics Targeting Neurodegenerative Lysosomal Storage Diseases. *Front Mol Biosci*. 2020 Sep 18;7:224.
305. Luo L., Zhou Y., Zhang C., Huang J., Du J., Liao J., Bergholt N.L., Bünger C., Xu F., Lin L., Tong G., Zhou G., Luo Y. Feeder-free generation and transcriptome

- characterization of functional mesenchymal stromal cells from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Res.* 2020 Oct;48:101990.
306. Luo Q., Zhang B., Kuang D., Song G. Role of Stromal-Derived Factor-1 in Mesenchymal Stem Cell Paracrine-Mediated Tissue Repair. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2016;11(7):585-92.
307. Lupatov A.Y., Karalkin P.A., Suzdal'tseva Y.G., Burunova V.V., Yarygin V.N., Yarygin K.N. Cytofluorometric analysis of phenotypes of human bone marrow and umbilical fibroblast-like cells. *Bull Exp Biol Med.* 2006 Oct;142(4):521-6. English, Russian.
308. Luster A.D., Alon R., von Andrian U.H. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol.* 2005 Dec;6(12):1182-90.
309. Luz-Crawford P., Noël D., Fernandez X., Khoury M., Figueroa F., Carrión F., Jorgensen C., Djouad F. Mesenchymal stem cells repress Th17 molecular program through the PD-1 pathway. *PLoS One.* 2012;7(9):e45272.
310. Luzzani C.D., Miriuka S.G. Pluripotent Stem Cells as a Robust Source of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cell Rev.* 2017 Feb;13(1):68-78.
311. Luzzani C., Neiman G., Garate X., Questa M., Solari C., Fernandez Espinosa D., García M., Errecalde A.L., Guberman A., Scassa M.E., Sevlever G.E., Romorini L., Miriuka S.G.. A therapy-grade protocol for differentiation of pluripotent stem cells into mesenchymal stem cells using platelet lysate as supplement. *Stem Cell Res Ther.* 2015 Jan 12;6:6.
312. Lv F.J., Tuan R.S., Cheung K.M., Leung V.Y. Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2014 Jun;32(6):1408-19.
313. Ma T., Wang X., Jiao Y., Wang H., Qi Y., Gong H., Zhang L., Jiang D. Interleukin 17 (IL-17)-Induced Mesenchymal Stem Cells Prolong the Survival of Allogeneic Skin Grafts. *Ann Transplant.* 2018 Aug 31;23:615-621.
314. Maccario R., Podesta M., Moretta A., Cometa A., Comoli P., Montagna D., Daudt L., Ibatici A., Piaggio G., Pozzi S., Frassoni F., Locatelli F. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica.* 2005; 90: 516-525.
315. Maffioli E., Nonnis S., Angioni R., Santagata F., Cali B., Zanotti L., Negri A., Viola A., Tedeschi G. Proteomic analysis of the secretome of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells primed by pro-inflammatory cytokines. *J Proteomics.* 2017 Aug 23;166:115-126. doi: 10.1016/j.jprot.2017.07.012. Epub 2017 Jul 21.
316. Magatti M., Masserdotti A., Bonassi Signoroni P., Vertua E., Stefani F.R., Silini A.R., Parolini O. B Lymphocytes as Targets of the Immunomodulatory Properties of Human Amniotic Mesenchymal Stromal Cells. *Front Immunol.* 2020 Jun 9;11:1156.
317. Magne B., Dedier M., Nivet M., Coulomb B., Banzet S., Lataillade J.J., Trouillas M. IL-1 β -Primed Mesenchymal Stromal Cells Improve Epidermal Substitute Engraftment and Wound Healing via Matrix Metalloproteinases and Transforming Growth Factor- β 1. *J Invest Dermatol.* 2020 Mar;140(3):688-698.e21.

318. Maherali N., Hochedlinger K. Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2008 Dec 4;3(6):595-605.
319. Maherali N., Sridharan R., Xie W., Utikal J., Eminli S., Arnold K., Stadtfeld M., Yachechko R., Tchieu J., Jaenisch R., Plath K., Hochedlinger K. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell*. 2007 Jun 7;1(1):55-70.
320. Majumdar M.K., Keane-Moore M., Buyaner D., Hardy W.B., Moorman M.A., McIntosh K.R., Mosca J.D. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci*. 2003 Mar-Apr;10(2):228-41.
321. Majumdar M.K., Thiede M.A., Haynesworth S.E., Bruder S.P., Gerson S.L. Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages. *J Hematother Stem Cell Res*. 2000 Dec;9(6):841-8.
322. Mandai M., Kurimoto Y., Takahashi M. Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *N Engl J Med*. 2017 Aug 24;377(8):792-793.
323. Manochantr S., U-pratya Y., Kheolamai P., Rojphisan S., Chayosumrit M., Tantrawatpan C., Supokawej A., Issaragrisil S. Immunosuppressive properties of mesenchymal stromal cells derived from amnion, placenta, Wharton's jelly and umbilical cord. *Intern Med J*. 2013 Apr;43(4):430-9.
324. Mantovani A., Biswas S.K., Galdiero M.R., Sica A., Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol*. 2013 Jan;229(2):176-85.
325. Manturova N.E., Smirnova G.O., Silina E.V., Suzdaltseva Y.G., Stupin V.A. The effectiveness of mesotherapy with progenitor cells of involutinal changes in facial skin in patients of different ages. *Ann Trop Med Public Health*, 2018, V. 9, special issue, p. S614-18.
326. Mao A.S., Özkale B., Shah N.J., Vining K.H., Descombes T., Zhang L., Tringides C.M., Wong S.W., Shin J.W., Scadden D.T., Weitz D.A., Mooney D.J. Programmable microencapsulation for enhanced mesenchymal stem cell persistence and immunomodulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019 Jul 30;116(31):15392-15397.
327. Mareschi K., Castiglia S., Sanavio F., Rustichelli D., Muraro M., Defedele D., Bergallo M., Fagioli F. Immunoregulatory effects on T lymphocytes by human mesenchymal stromal cells isolated from bone marrow, amniotic fluid, and placenta. *Exp Hematol*. 2016 Feb;44(2):138-150.e1.
328. Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science*. 1997; 276: 75-81.
329. Martinello T., Gomiero C., Perazzi A., Iacopetti I., Gemignani F., DeBenedictis G.M., Ferro S., Zuin M., Martines E., Brun P., Maccatrozzo L., Chiers K., Spaas J.H., Patruno M. Allogeneic mesenchymal stem cells improve the wound healing process of sheep skin. *BMC Vet Res*. 2018 Jun 25;14(1):202.
330. Medeiros R.B., Papenfuss K.J., Hoium B., Coley K., Jadrach J., Goh S.K., Elayaperumal A., Herrera J.E., Resnik E., Ni H.T. Novel sequential ChIP and simplified

- basic ChIP protocols for promoter co-occupancy and target gene identification in human embryonic stem cells. *BMC Biotechnol.* 2009 Jun 29;9:59.
331. Meisel R., Zibert A., Laryea M., Göbel U., Däubener W., Dilloo D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood.* 2004; 103: 4619-4621.
332. Meleshko A., Prakharenia I., Kletski S., Isaikina Y. Chimerism of allogeneic mesenchymal cells in bone marrow, liver, and spleen after mesenchymal stem cells infusion. *Pediatr Transplant.* 2013 Dec;17(8):E189-94.
333. Melief S.M., Geutskens S.B., Fibbe W.E., Roelofs H. Multipotent stromal cells skew monocytes towards an anti-inflammatory interleukin-10-producing phenotype by production of interleukin-6. *Haematologica.* 2013a Jun;98(6):888-95.
334. Melief S.M., Schrama E., Brugman M.H., Tiemessen M.M., Hoogduijn M.J., Fibbe W.E., Roelofs H. Multipotent stromal cells induce human regulatory T cells through a novel pathway involving skewing of monocytes toward anti-inflammatory macrophages. *Stem Cells.* 2013b Sep;31(9):1980-91.
335. Melik-Nubarov NS, Dorodnykh TYu, Kozlov MYu, Suzdal'tseva YuG, Arzhakov SA, Alakhov VYu, Batrakova EV, Kabanov AV. Synthesis and biological activity of the functional block copolymers based on pluronic p85-doxorubicin conjugates. *Polymer Science. Series A.* 1999. T. 41. № 5. C. 494-499.
336. Melmed G.Y., Pandak W.M., Casey K., Abraham B., Valentine J., Schwartz D., Awais D., Bassan I., Lichtiger S., Sands B., Hanauer S., Richards R., Oikonomou I., Parekh N., Targan S., Johnson K., Hariri R., Fischkoff S. Human Placenta-derived Cells (PDA-001) for the Treatment of Moderate-to-severe Crohn's Disease: A Phase 1b/2a Study. *Inflamm Bowel Dis.* 2015 Aug;21(8):1809-16.
337. Millán-Rivero J.E., Martínez C.M., Romecín P.A., Aznar-Cervantes S.D., Carpes-Ruiz M., Cenis J.L., Moraleda J.M., Atucha N.M., García-Bernal D. Silk fibroin scaffolds seeded with Wharton's jelly mesenchymal stem cells enhance re-epithelialization and reduce formation of scar tissue after cutaneous wound healing. *Stem Cell Res Ther.* 2019 Apr 27;10(1):126.
338. Minakawa T., Kanki Y., Nakamura K., Yamashita J.K. Protein kinase A accelerates the rate of early stage differentiation of pluripotent stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020 Mar 26;524(1):57-63. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.12.098. Epub 2020
339. Minguell J. J., Erice A., Conget P. Mesenchymal Stem Cells. *Experimental Biology and Medicine.* 2001, 226:507-520.
340. Miranda J.P., Filipe E., Fernandes A.S., Almeida J.M., Martins J.P., De la Fuente A., Abal M., Barcia R.N., Cruz P., Cruz H., Castro M., Santos J.M. The Human Umbilical Cord Tissue-Derived MSC Population UCX() Promotes Early Motogenic Effects on Keratinocytes and Fibroblasts and G-CSF-Mediated Mobilization of BM-MSCs When Transplanted In Vivo. *Cell Transplant.* 2015;24(5):865-77.
341. Moerman E.J., Teng K., Lipschitz D.A., Lecka-Czernik B. Aging activates adipogenic and suppresses osteogenic programs in mesenchymal marrow stroma/stem cells: the role of PPAR-gamma2 transcription factor and TGF-beta/BMP signaling pathways. *Aging Cell.* 2004, V. 3, N. 6, p. 379-389.

342. Molendijk I., Bonsing B. A., Roelofs H., Peeters K.C., Wasser M.N., Dijkstra G., van der Woude C.J., Duijvestein M., Veenendaal R.A., Zwaginga J.J., Verspaget H.W., Fibbe W.E., van der Meulen-de Jong A.E., Hommes D.W. Allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stromal cells promote healing of refractory perianal fistulas in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2015;149(4):918–927.
343. Montanucci P., Basta G., Pescara T., Pennoni I., Di Giovanni F., Calafiore R.. New simple and rapid method for purification of mesenchymal stem cells from the human umbilical cord Wharton jelly. *Tissue Eng Part A*. 2011 Nov;17(21-22):2651-61. doi: 10.1089/ten.TEA.2010.0587. Epub 2011 Sep 6.
344. Moon M.Y., Kim H.J., Choi B.Y., Sohn M., Chung T.N., Suh S.W.. Zinc Promotes Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell Proliferation and Differentiation towards a Neuronal Fate. *Stem Cells Int*. 2018 Apr 18;2018:5736535.
345. Moore A.L., Marshall C.D., Barnes L.A., Murphy M.P., Ransom R.C., Longaker MT. Scarless wound healing: Transitioning from fetal research to regenerative healing. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2018 Mar;7(2):10.1002/wdev.309.
346. Mosna F., Sensebé L., Krampera M. Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells: a user's guide. *Stem Cells Dev*. 2010 Oct;19(10):1449-70.
347. Motegi S.I., Ishikawa O. Mesenchymal stem cells: The roles and functions in cutaneous wound healing and tumor growth. *J Dermatol Sci*. 2017 May;86(2):83-89.
348. Motwani M.P., Gilroy D.W. Macrophage development and polarization in chronic inflammation. *Semin Immunol*. 2015 Aug;27(4):257-66.
349. Munn D.H., Shafizadeh E., Attwood J.T., Bondarev I., Pashine A., Mellor A.L. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J Exp Med*. 1999 May 3;189(9):1363-72.
350. Munn D.H., Sharma M.D., Hou D., Baban B., Lee J.R., Antonia S.J., Messina J.L., Chandler P., Koni P.A., Mellor A.L. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. *J Clin Invest*. 2004 Jul;114(2):280-90.
351. Musina R.A., Bekchanova E.S., Sukhikh G.T. Comparison of mesenchymal stem cells obtained from different human tissues. *Bull Exp. Biol. Med.*, 2005, V. 139, N. 4, p. 504-509.
352. Nandy S.B., Mohanty S., Singh M., Behari M., Airan B. Fibroblast Growth Factor-2 alone as an efficient inducer for differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells into dopaminergic neurons. *J Biomed Sci*. 2014 Sep 24;21:83.
353. Narsinh K.H., Sun N., Sanchez-Freire V., Lee A.S., Almeida P., Hu S., Jan T., Wilson K.D., Leong D., Rosenberg J., Yao M., Robbins R.C., Wu J.C. Single cell transcriptional profiling reveals heterogeneity of human induced pluripotent stem cells. *J Clin Invest*. 2011 Mar 1;121(3):1217-21.
354. Nasef A., Chapel A., Mazurier C., Bouchet S., Lopez M., Mathieu N., Sensebé L., Zhang Y., Gorin N.C., Thierry D., Fouillard L. Identification of IL-10 and

- TGF-beta transcripts involved in the inhibition of T-lymphocyte proliferation during cell contact with human mesenchymal stem cells. *Gene Expr.* 2007;13(4-5):217-26.
355. Nascimento-Filho C.H.V., Silveira E.J.D., Goloni-Bertollo E.M., de Souza L.B., Squarize C.H., Castilho R.M. Skin wound healing triggers epigenetic modifications of histone H4. *J Transl Med.* 2020 Mar 26;18(1):138.
356. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* 2006; 6: 173-182.
357. Nauta A.J., Kruisselbrink A.B., Lurvink E., Willemze R., Fibbe W.E. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.* 2006; 177: 2080-2087.
358. Negi N., Griffin M.D. Effects of mesenchymal stromal cells on regulatory T cells: Current understanding and clinical relevance. *Stem Cells.* 2020 May;38(5):596-605.
359. Neubauer M., Fischbach C., Bauer-Kreisel P., Lieb E., Hacker M., Tessmar J., Schulz MB, Goepferich A, Blunk T. Basic fibroblast growth factor enhances PPARgamma ligand-induced adipogenesis of mesenchymal stem cells. *FEBS Lett.*, 2004, V. 577, N. 2, p. 277-283.
360. Nekrasov E.D., Vigont V.A., Klyushnikov S.A., Lebedeva O.S., Vassina E.M., Bogomazova A.N., Chestkov I.V., Semashko T.A., Kiseleva E., Suldina L.A., Bobrovsky P.A., Zimina O.A., Ryazantseva M.A., Skopin A.Y., Illarioshin S.N., Kaznacheeva E.V., Lagarkova M.A., Kiselev S.L. Manifestation of Huntington's disease pathology in human induced pluripotent stem cell-derived neurons. *Mol Neurodegener.* 2016 Apr 14;11:27.
361. Nitzsche F., Muller C., Lukomska B., Jolkkonen J., Deten A., Boltze J. Concise review: MSC adhesion cascade-insights into homing and transendothelial migration. *Stem Cells.* 2017;35:1446–1460.
362. Novoseletskaia E, Grigorieva O, Nimiritsky P, Basalova N, Eremichev R, Milovskaya I, Kulebyakin K, Kulebyakina M, Rodionov S, Omelyanenko N, Efimenko A. Mesenchymal Stromal Cell-Produced Components of Extracellular Matrix Potentiate Multipotent Stem Cell Response to Differentiation Stimuli. *Front Cell Dev Biol.* 2020 Sep 22;8:555378.
363. Odorico J.S., Kaufman D.S., Thomson J.A. Multilineage Differentiation from Human Embryonic Stem Cell Lines. *Stem Cells*, 2001, Vol. 19, No. 3, 193-204 AlphaMed Press
364. Oh E.J., Lee H.W., Kalimuthu S., Kim T.J., Kim H.M., Baek S.H., Zhu L., Oh J.M., Son S.H., Chung H.Y., Ahn B.C. In vivo migration of mesenchymal stem cells to burn injury sites and their therapeutic effects in a living mouse model. *J Control Release.* 2018 Jun 10;279:79-88.
365. Ossevoort M.A., Lorré K., Boon L., van den Hout Y., de Boer M., De Waele P., Jonker M., VandeVoorde A. Prolonged skin graft survival by administration of anti-CD80 monoclonal antibody with cyclosporin A. *J Immunother.* 1999 Sep;22(5):381-9.
366. Otero G., Agorio C., Sujanov A., Echarte L., Tchekmedyan A., Montelongo M., Menyau A., Rodriguez A., Diaz L., Rodriguez I., Touriño C.

- Autologous bone marrow-derived cells for venous leg ulcers treatment: a pilot study. *Cytotherapy*. 2019 Feb;21(2):189-199.
367. Panova A.V., Klementieva N.V., Sycheva A.V., Goliusova D.V., Khokhlov N.V., Zubkova N.A., Tiulpakov A.N, Kiselev S.L. Generation of an induced pluripotent stem cell line MNDINSi001-A from a patient with neonatal diabetes caused by a heterozygous INS mutation. *Stem Cell Res*. 2020 Jul 25;47:101929.
368. Papait A., Vertua E., Magatti M., Ceccariglia S., De Munari S., Silini A.R., Sheleg M., Ofir R., Parolini O. Mesenchymal Stromal Cells from Fetal and Maternal Placenta Possess Key Similarities and Differences: Potential Implications for Their Applications in Regenerative Medicine. *Cells*. 2020 Jan 6;9(1):127.
369. Park I.H., Zhao R., West J.A., Yabuuchi A., Huo H., Ince T.A., Lerou P.H., Lensch M.W., Daley G.Q. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*. 2008;451(7175):141-6.
370. Park J., Lee J.H., Yoon B.S., Jun E.K., Lee G., Kim I.Y., You S. Additive effect of bFGF and selenium on expansion and paracrine action of human amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2018 Nov 8;9(1):293.
371. Park M.J., Shin J.S., Kim Y.H., Hong S.H., Yang S.H., Shin J.Y., Kim S.Y., Kim B., Kim J.S., Park C.G. Murine mesenchymal stem cells suppress T lymphocyte activation through IL-2 receptor alpha (CD25) cleavage by producing matrix metalloproteinases. *Stem Cell Rev Rep*. 2011 Jun;7(2):381-93.
372. Peled A., Kollet O., Ponomaryov T., Petit I., Franitza S., Grabovsky V., Slav M.M., Nagler A., Lider O., Alon R., Zipori D., Lapidot T. The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. *Blood*. 2000 Jun 1;95(11):3289-96.
373. Pelizzo G., Avanzini M.A., Icaro Cornaglia A., Osti M., Romano P., Avolio L., Maccario R., Dominici M., De Silvestri A., Andreatta E., Costanzo F., Mantelli M., Ingo D., Piccinno S., Calcaterra V. Mesenchymal stromal cells for cutaneous wound healing in a rabbit model: pre-clinical study applicable in the pediatric surgical setting. *J Transl Med*. 2015 Jul 8;13:219.
374. de Peppo G.M., Marolt D. Modulating the biochemical and biophysical culture environment to enhance osteogenic differentiation and maturation of human pluripotent stem cell-derived mesenchymal progenitors. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4(5):106.
375. Pereira T., Ivanova G., Caseiro A.R., Barbosa P., Bártolo P.J., Santos J.D., Luís A.L., Maurício A.C. MSCs conditioned media and umbilical cord blood plasma metabolomics and composition. *PLoS One*. 2014 Nov 25;9(11):e113769. doi: 10.1371/journal.pone.0113769. eCollection 2014.
376. Petrenko Y., Vackova I., Kekulova K., Chudickova M., Koci Z., Turnovcova K., Kupcova Skalnikova H., Vodicka P., Kubinova S. A Comparative Analysis of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells derived from Different Sources, with a Focus on Neuroregenerative Potential. *Sci Rep*. 2020 Mar 9;10(1):4290.
377. Petri R.M., Hackel A., Hahnel K., Dumitru C.A., Bruderek K., Flohe S.B., Paschen A., Lang S., Brandau S. Activated Tissue-Resident Mesenchymal Stromal

- Cells Regulate Natural Killer Cell Immune and Tissue-Regenerative Function. *Stem Cell Reports*. 2017 Sep 12;9(3):985-998.
378. Pevsner-Fischer M., Morad V., Cohen-Sfady M., Rousso-Noori L., Zanin-Zhorov A., Cohen S., Cohen I.R., Zipori D. Toll-like receptors and their ligands control mesenchymal stem cell functions. *Blood*. 2007;109(4):1422–1432.
379. Pfisterer K., Shaw L.E., Symmank D., Weninger W. The Extracellular Matrix in Skin Inflammation and Infection. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Jul 6;9:682414.
380. Philonenko E.S., Shutova M.V., Khomyakova E.A., Vassina E.M., Lebedeva O.S., Kiselev S.L., Lagarkova M.A. Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells into Mesodermal and Ectodermal Derivatives Is Independent of the Type of Isogenic Reprogrammed Somatic Cells. *Acta Naturae*. 2017 Jan-Mar;9(1):68-74.
381. Phinney D.G., Pittenger M.F. Concise Review: MSC-Derived Exosomes for Cell-Free Therapy. *Stem Cells*. 2017 Apr;35(4):851-858. doi: 10.1002/stem.2575. Epub 2017 Mar 10. Review. Erratum in: *Stem Cells*. 2017 Sep;35(9):2103.
382. Pittenger M.F., Discher D.E., Péault B.M., Phinney D.G., Hare J.M., Caplan A.I. Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. *NPJ Regen Med*. 2019 Dec 2;4:22. eCollection 2019.
383. Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., Moorman M.A., Simonetti D.W., Craig S., Marshak D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999 Apr 2;284(5411):143-7.
384. Pleumeekers M.M., Nimeskern L., Koevoet J.L.M., Karperien M., Stok K.S., van Osch G.J.V.M. Trophic effects of adipose-tissue-derived and bone-marrow-derived mesenchymal stem cells enhance cartilage generation by chondrocytes in co-culture. *PLoS One*. 2018 Feb 28;13(2):e0190744.
385. Ponomaryov T., Peled A., Petit I., Taichman R.S., Habler L., Sandbank J., Arenzana-Seisdedos F., Magerus A., Caruz A., Fujii N., Nagler A., Lahav M., Szyper-Kravitz M., Zipori D., Lapidot T. Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function. *J Clin Invest*. 2000 Dec;106(11):1331-9.
386. Potian J.A., Aviv H., Ponzio N.M., Harrison J.S., Rameshwar P. Veto-like activity of mesenchymal stem cells: functional discrimination between cellular responses to alloantigens and recall antigens. *J Immunol*. 2003 Oct 1;171(7):3426-34.
387. Pourgholaminejad A., Aghdami N., Baharvand H., Moazzeni S.M. The effect of pro-inflammatory cytokines on immunophenotype, differentiation capacity and immunomodulatory functions of human mesenchymal stem cells. *Cytokine*. 2016 Sep;85:51-60.
388. Poznansky M.C., Olszak I.T., Foxall R., Evans R.H., Luster A.D., Scadden D.T. Active movement of T cells away from a chemokine. *Nat Med*. 2000 May;6(5):543-8.
389. Prindull G. Hypothesis: cell plasticity, linking embryonal stem cells to adult stem cell reservoirs and metastatic cancer cells? *Exp. Hematol.*, 2005, V. 33, N. 7, p. 738-746.

390. Qi K., Li N., Zhang Z., Melino G. Tissue regeneration: The crosstalk between mesenchymal stem cells and immune response. *Cell Immunol.* 2018 Apr;326:86-93.
391. Rafei M., Birman E., Forner K., Galipeau J. Allogeneic mesenchymal stem cells for treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Mol. Ther.* 2009; 17: 1799-1803.
392. Raaphorst F.M. Self-renewal of hematopoietic and leukemic stem cells: a central role for the Polycomb-group gene Bmi-1. *Trends Immunol.* 2003. 24(10): pp. 522-524.
393. Ramasamy R., Tong C.K., Seow H.F., Vidyadaran S., Dazzi F. The immunosuppressive effects of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells target T cell proliferation but not its effector function. *Cell Immunol.* 2008 Feb;251(2):131-6.
394. Rashedi I., Gómez-Aristizábal A., Wang X.H., Viswanathan S., Keating A. TLR3 or TLR4 Activation Enhances Mesenchymal Stromal Cell-Mediated Treg Induction via Notch Signaling. *Stem Cells.* 2017 Jan;35(1):265-275.
395. Rasmusson I. Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Exp. Cell. Res.* 2006; 312: 2169-2179.
396. Rasmusson I., Ringdén O., Sundberg B., Le Blanc K. Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms. *Exp Cell Res.* 2005 Apr 15;305(1):33-41.
397. Ratushnyy A., Ezzakova M., Buravkova L. Secretome of Senescent Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Negatively Regulates Angiogenesis. *Int J Mol Sci.* 2020 Mar 5;21(5):1802.
398. Raziyeva K, Kim Y, Zharkinbekov Z, Kassymbek K, Jimi S, Saparov A. Immunology of Acute and Chronic Wound Healing. *Biomolecules.* 2021 May 8;11(5):700.
399. Rehman J., Traktuev D., Li J., Merfeld-Clauss S., Temm-Grove C.J., Bovenkerk J.E., Pell C.L., Johnstone B.H., Considine R.V., March K.L. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation.* 2004 Mar 16;109(10):1292-8.
400. Ren G., Zhang L., Zhao X., Xu G., Zhang Y., Roberts A.I., Zhao R.C., Shi Y. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell. Stem Cell.* 2008; 2: 141-150.
401. Ren G., Zhao X., Zhang L., Zhang J., L'Huillier A., Ling W., Roberts A.I., Le A.D., Shi S., Shao C., Shi Y. Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. *J. Immunol.* 2010;184(5):2321-8.
402. Reyes M., Lund T., Lenvik T., Aguiar D., Koodie L., Verfaillie C.M. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood.* 2009 Mar 5;113(10):2370.
403. Rieder F., Brenmoehl J., Leeb S., Schölmerich J., Rogler G. Wound healing and fibrosis in intestinal disease. *Gut.* 2007; 56: 130-139.

404. Riis S., Stensballe A., Emmersen J., Pennisi C.P., Birkelund S., Zachar V., Fink T. Mass spectrometry analysis of adipose-derived stem cells reveals a significant effect of hypoxia on pathways regulating extracellular matrix. *Stem Cell Res Ther.* 2016 Apr 14;7(1):52.
405. Ringe J., Strassburg S., Neumann K., Endres M., Notter M., Burmester G.R., Kaps C., Sittinger M. Towards in situ tissue repair: human mesenchymal stem cells express chemokine receptors CXCR1, CXCR2 and CCR2, and migrate upon stimulation with CXCL8 but not CCL2. *J Cell Biochem.* 2007 May 1;101(1):135-46.
406. Rodriguez A.M., Elabd C., Amri E.Z., Ailhaud G., Dani C. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie.* 2005 Jan;87(1):125-8.
407. Rodríguez-Fuentes D.E., Fernández-Garza L.E., Samia-Meza J.A., Barrera-Barrera S.A., Caplan A.I., Barrera-Saldaña H.A. Mesenchymal Stem Cells Current Clinical Applications: A Systematic Review. *Arch Med Res.* 2020 Sep 22:S0188-4409(20)30638-X.
408. Rodriguez-Menocal L., Shareef S., Salgado M., Shabbir A., Van Badiavas E. Role of whole bone marrow, whole bone marrow cultured cells, and mesenchymal stem cells in chronic wound healing. *Stem Cell Res Ther.* 2015 Mar 13;6:24.
409. Roemeling-van Rhijn M., Khairoun M., Korevaar S.S., Liewers E., Leuning D.G., Ijzermans J.N., Betjes M.G., Genever P.G., van Kooten C., de Fijter H.J., Rabelink T.J., Baan C.C., Weimar W., Roelofs H., Hoogduijn M.J., Reinders ME. Human Bone Marrow- and Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stromal Cells are Immunosuppressive In vitro and in a Humanized Allograft Rejection Model. *J Stem Cell Res Ther.* 2013 Nov 25;Suppl 6(1):20780.
410. Roo J.J.D., Staal F.J.T. Cell Signaling Pathway Reporters in Adult Hematopoietic Stem Cells. *Cells.* 2020 Oct 9;9(10):E2264.
411. Rossant J., Tam P.P.L. New Insights into Early Human Development: Lessons for Stem Cell Derivation and Differentiation. *Cell Stem Cell.* 2017 Jan 5;20(1):18-28.
412. Rubartelli A., Sitia R. Stress as an intercellular signal: the emergence of stress-associated molecular patterns (SAMP). *Antioxid. Redox. Signal.* 2009; 11: 2621-2629.
413. Rubina K., Kalinina N., Efimenko A., Lopatina T., Melikhova V., Tsokolaeva Z., Sysoeva V., Tkachuk V., Parfyonova Y. Adipose stromal cells stimulate angiogenesis via promoting progenitor cell differentiation, secretion of angiogenic factors, and enhancing vessel maturation. *Tissue Eng Part A.* 2009 Aug;15(8):2039-50.
414. Rubtsov Y., Goryunov K., Romanov A., Suzdaltseva Y., Sharonov G., Tkachuk V. Molecular Mechanisms of Immunomodulation Properties of Mesenchymal Stromal Cells: A New Insight into the Role of ICAM-1. *Stem Cells Int.* 2017; 2017:6516854
415. Rubtsov Y.P., Suzdaltseva Y.G., Goryunov K.V., Kalinina N.I., Sysoeva V.Y., Tkachuk VA.. Regulation of Immunity via Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. *Acta Naturae.* 2012; 4:23-31.

416. Rüster B., Göttig S., Ludwig R.J., Bistrrian R., Müller S., Seifried E., Gille J., Henschler R. Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood*. 2006 Dec 1;108(12):3938-44.
417. Rutella S., Danese S., Leone G. Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age. *Blood* 2006; 108:1435–1440.
418. Ruvolo P.P. Galectins as regulators of cell survival in the leukemia niche. *Adv Biol Regul*. 2019 Jan;71:41-54.
419. Ryan J.M., Barry F., Murphy J.M., Mahon B.P. Interferon-gamma does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clin. Exp. Immunol*. 2007; 149: 353-363.
420. Safford K.M., Safford S.D., Gimble J.M., Shetty A.K., Rice H.E. Characterization of neuronal/glia differentiation of murine adipose-derived adult stromal cells. *Exp Neurol*. 2004 Jun;187(2):319-28.
421. Saldanha-Araujo F., Haddad R., Farias K.C., Souza Ade P., Palma P.V., Araujo A.G., Orellana M.D., Voltarelli J.C., Covas D.T., Zago M.A., Panepucci RA. Mesenchymal stem cells promote the sustained expression of CD69 on activated T lymphocytes: roles of canonical and non-canonical NF- κ B signaling. *J Cell Mol Med*. 2012 Jun;16(6):1232-44.
422. Samia D.G., Heibaa H.H., Abdellatif A. Wound healing models: A systematic review of animal and non-animal models. *Wound Medicine*. 2019 March 24:8-17
423. Sanchez-Martin L., Estechea A., Samaniego R. Sánchez-Ramón S., Vega M.Á., Sánchez-Mateos P. The chemokine CXCL12 regulates monocyte-macrophage differentiation and RUNX3 expression. *Blood* 2011;117:88–97
424. Sasaki M., Abe R., Fujita Y., Ando S., Inokuma D., Shimizu H. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J Immunol*. 2008 Feb 15;180(4):2581-7.
425. Sakaguchi Y., Sekiya I., Yagishita K., Muneta T. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum.*, 2005, V. 52, N. 8, p. 2521-2529.
426. Salem H.K., Thiemermann C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells*. 2010; 28: 585-596.
427. Santoro M.M., Gaudino G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. *Exp. Cell. Res*. 2005; 304: 274-286.
428. Sato K., Ozaki K., Oh I., Meguro A., Hatanaka K., Nagai T., Muroi K., Ozawa K. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood*. 2007 Jan 1;109(1):228-34.
429. Schipani E., Kronenberg H.M. Adult mesenchymal stem cells. *StemBook* [Internet]. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute; 2008-2009 Jan 31.
430. Schwartz R.E., Reyes M., Koodie L., Jiang Y., Blackstad M., Lund T., Lenvik T., Johnson S., Hu W.S., Verfaillie C.M. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest*. 2002 May;109(10):1291-302.

431. Secco M., Zucconi E., Vieira N.M., Fogaça L.L., Cerqueira A., Carvalho M.D., Jazedje T., Okamoto O.K., Muotri A.R., Zatz M. Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood! *Stem Cells*. 2008 Jan;26(1):146-50.
432. Sekine K., Ogawa S., Tsuzuki S., Kobayashi T., Ikeda K., Nakanishi N., Takeuchi K., Kanai E., Otake Y., Okamoto S., Kobayashi T., Takebe T., Taniguchi H. Generation of human induced pluripotent stem cell-derived liver buds with chemically defined and animal origin-free media. *Sci Rep*. 2020 Oct 21;10(1):17937.
433. Selmani Z., Naji A., Zidi I., Favier B., Gaiffe E., Obert L., Borg C., Saas P., Tiberghien P., Rouas-Freiss N., Carosella E.D., Deschaseaux F. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. *Stem Cells*. 2008 Jan;26(1):212-22.
434. Semenza G.L. Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology (Bethesda)*. 2004; 19: 176-182.
435. Seo M.J., Suh S.Y., Bae Y.C., Jung J.S. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Mar 4;328(1):258-64.
436. Sfougataki I., Varela I., Stefanaki K., Karagiannidou A., Roubelakis M.G., Kalodimou V., Papatheanasiou I., Traeger-Synodinos J., Kitsiou-Tzeli S., Kanavakis E., Kitra V., Tsezou A., Tzetis M., Goussetis E. Proliferative and chondrogenic potential of mesenchymal stromal cells from pluripotent and bone marrow cells. *Histol Histopathol*. 2020 Sep 22:18259.
437. Shabbir A., Cox A., Rodriguez-Menocal L., Salgado M., Van Badiavas E. Mesenchymal stem cell exosomes induce proliferation and migration of normal and chronic wound fibroblasts and enhance angiogenesis in vitro. *Stem Cells Dev*. 2015 Jul 15;24(14):1635-47.
438. Shamblott M., Axelman J., Wang S., Bugg E.M., Littlefield J.W., Donovan P.J., Blumenthal P.D., Huggins G.R., Gearhart J.D. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:13726-13731
439. Sharma A., Sances S., Workman M.J., Svendsen C.N. Multi-lineage Human iPSC-Derived Platforms for Disease Modeling and Drug Discovery. *Cell Stem Cell*. 2020 Mar 5;26(3):309-329.
440. Sharma J., Hampton J.M., Valiente G.R., Wada T., Steigelman H., Young M.C., Spurbeck R.R., Blazek A.D., Bösh S., Jarjour W.N., Young N.A. Therapeutic Development of Mesenchymal Stem Cells or Their Extracellular Vesicles to Inhibit Autoimmune-Mediated Inflammatory Processes in Systemic Lupus Erythematosus. *Front Immunol*. 2017 May 10;8:526.
441. Sharov A.A., Masui S., Sharova L.V., Piao Y., Aiba K., Matoba R., Xin L., Niwa H., Ko M.S. Identification of Pou5f1, Sox2, and Nanog downstream target genes with statistical confidence by applying a novel algorithm to time course microarray and genome-wide chromatin immunoprecipitation data. *BMC Genomics*. 2008 Jun 3;9:269.
442. Shaw T.J., Martin P. Wound repair at a glance. *J. Cell. Sci*. 2009; 122: 3209-3213.

443. Shin S., Lee J., Kwon Y., Park K.S., Jeong J.H., Choi S.J., Bang S.I., Chang J.W., Lee C. Comparative Proteomic Analysis of the Mesenchymal Stem Cells Secretome from Adipose, Bone Marrow, Placenta and Wharton's Jelly. *Int J Mol Sci*. 2021 Jan 15;22(2):845. doi: 10.3390/ijms22020845.
444. Sheyn D., Ben-David S., Shapiro G., De Mel S., Bez M., Ornelas L., Sahabian A., Sareen D., Da X., Pelled G., Tawackoli W., Liu Z., Gazit D., Gazit Z. Human Induced Pluripotent Stem Cells Differentiate Into Functional Mesenchymal Stem Cells and Repair Bone Defects. *Stem Cells Transl Med*. 2016 Nov;5(11):1447-1460.
445. Shrestha C., Zhao L., Chen K., He H., Mo Z. Enhanced healing of diabetic wounds by subcutaneous administration of human umbilical cord derived stem cells and their conditioned media. *Int J Endocrinol*. 2013;2013:592454.
446. Shimizu Y., Newman W., Gopal T.V., Horgan K.J., Graber N., Beall L.D., van Seventer G.A., Shaw S. Four molecular pathways of T cell adhesion to endothelial cells: roles of LFA-1, VCAM-1, and ELAM-1 and changes in pathway hierarchy under different activation conditions. *J. Cell Biol*. 1991 Jun;113(5):1203-12.
447. Shu J., He X., Li H., Liu X., Qiu X., Zhou T., Wang P., Huang X. The Beneficial Effect of Human Amnion Mesenchymal Cells in Inhibition of Inflammation and Induction of Neuronal Repair in EAE Mice. *Immunol Res*. 2018 Jun 24;2018:5083797.
448. Shutova M.V., Bogomazova A.N., Lagarkova M.A., Kiselev S.L. Generation and characterization of human induced pluripotent stem cells. *Acta Naturae*. 2009 Jul;1(2):91-2.
449. Shutova M.V., Surdina A.V., Ischenko D.S., Naumov V.A., Bogomazova A.N., Vassina E.M., Alekseev D.G., Lagarkova M.A., Kiselev S.L. An integrative analysis of reprogramming in human isogenic system identified a clone selection criterion. *Cell Cycle*. 2016;15(7):986-97.
450. Sidhu K.S., Tuch B.E. Derivation of Three Clones from Human Embryonic Stem Cell Lines by FACS Sorting and Their Characterization. *Stem Cells and Development*. February 2006, 15(1): 61-69.
451. Silina E., Stupin V., Koreyba K., Bolevich S., Suzdaltseva Y., Manturova N. Local and Remote Effects of Mesenchymal Stem Cell Administration on Skin Wound Regeneration. *Pathophysiology*. 2021; 28(3):355-373.
452. Silina E.V., Stupin V.A., Suzdaltseva Y.G., Aliev S.R., Abramov I.S., Khokhlov N.V. Application of Polymer Drugs with Cerium Dioxide Nanomolecules and Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Skin Wounds in Aged Rats. *Polymers (Basel)*. 2021 May; 13(9): 1467. doi: 10.3390/polym13091467
453. Silva C.G.D., Barretto L.S.S., Lo Turco E.G., Santos A.L., Lessio C., Martins Júnior H.A., Almeida F.G. Lipidomics of mesenchymal stem cell differentiation. *Chem Phys Lipids*. 2020 Oct;232:104964.
454. Silva W.A. Jr., Covas D.T., Panepucci R.A., Proto-Siqueira R., Siufi J.L., Zanette D.L., Santos A.R., Zago M.A. The profile of gene expression of human marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2003;21(6):661-9.

455. Singer N.G., Caplan A.I. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. *Annu. Rev. Pathol.* 2011; 6: 457-478.
456. Singer A.J., Clark R.A. Cutaneous wound healing. *N. Engl. J. Med.* 1999; 341: 738-746.
457. Sioud M. New insights into mesenchymal stromal cell-mediated T-cell suppression through galectins. *Scand J Immunol.* 2011a Feb;73(2):79-84.
458. Sioud M., Mobergslien A., Boudabous A., Fløisand Y. Mesenchymal stem cell-mediated T cell suppression occurs through secreted galectins. *Int J Oncol.* 2011b Feb;38(2):385-90.
459. Skyler J.S., Fonseca V.A., Segal K.R., Rosenstock J., MSB-DM003 Investigators. Allogeneic Mesenchymal Precursor Cells in Type 2 Diabetes: A Randomized, Placebo-Controlled, Dose-Escalation Safety and Tolerability Pilot Study. *Diabetes Care.* 2015 Sep;38(9):1742-9.
460. Slukvin I.I., Kumar A. The mesenchymoangioblast, mesodermal precursor for mesenchymal and endothelial cells. *Cell Mol Life Sci.* 2018 Oct;75(19):3507-3520.
461. Snykers S., De Kock J., Tamara V., Rogiers V. Hepatic differentiation of mesenchymal stem cells: in vitro strategies. *Methods Mol Biol.* 2011;698:305-14.
462. Solchaga L.A., Penick K., Porter J.D., Goldberg V.M., Caplan A.I., Welter J.F. FGF-2 enhances the mitotic and chondrogenic potentials of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J. Cell Physiol.*, 2005, V. 203, N. 2, p. 398-409.
463. Son B.R., Marquez-Curtis L.A., Kucia M., Wysoczynski M., Turner A.R., Ratajczak J., Ratajczak M.Z., Janowska-Wieczorek A. Migration of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells in vitro is regulated by stromal-derived factor-1-CXCR4 and hepatocyte growth factor-c-met axes and involves matrix metalloproteinases. *Stem Cells.* 2006 May;24(5):1254-64.
464. Sordi V., Malosio M.L., Marchesi F., Mercalli A., Melzi R., Giordano T., Belmonte N., Ferrari G., Leone B.E., Bertuzzi F., Zerbini G., Allavena P., Bonifacio E., Piemonti L. Bone marrow mesenchymal stem cells express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic islets. *Blood.* 2005 Jul 15;106(2):419-27.
465. Sotiropoulou P.A., Perez S.A., Gritzapis A.D., Baxevanis C.N., Papamichail M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells* 2006; 24:74–85.
466. Spaggiari G.M., Capobianco A., Becchetti S., Mingari M.C., Moretta L. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood* 2006; 107:1484–1490.
467. Spitzhorn L.S., Megges M., Wruck W., Rahman M.S., Otte J., Degistirici Ö., Meisel R., Sorg R.V., Oreffo R.O.C., Adjaye J. Human iPSC-derived MSCs (iMSCs) from aged individuals acquire a rejuvenation signature. *Stem Cell Res Ther.* 2019 Mar 18;10(1):100.
468. Springer T.A. Adhesion receptors of the immune system. *Nature.* 1990 Aug 2;346(6283):425-34.

469. Stadtfeld M., Hochedlinger K. Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes Dev.* 2010 Oct 15;24(20):2239-63.
470. Steingen C., Brenig F., Baumgartner L., Schmidt J., Schmidt A., Bloch W. Characterization of key mechanisms in transmigration and invasion of mesenchymal stem cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2008 Jun;44(6):1072-84.
471. Su J., Chen X., Huang Y., Li W., Li J., Cao K., Cao G., Zhang L., Li F., Roberts A.I., Kang H., Yu P., Ren G., Ji W., Wang Y., Shi Y. Phylogenetic distinction of iNOS and IDO function in mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression in mammalian species. *Cell Death Differ.* 2014 Mar;21(3):388-96.
472. Su W.H., Wang C.J., Fu H.C., Sheng C.M., Tsai C.C., Cheng J.H., Chuang P.C. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Extricate Bupivacaine-Impaired Skeletal Muscle Function via Mitigating Neutrophil-Mediated Acute Inflammation and Protecting against Fibrosis. *Int J Mol Sci.* 2019 Sep 3;20(17):4312. doi: 10.3390/ijms20174312.
473. Sun L., Akiyama K., Zhang H., Yamaza T., Hou Y., Zhao S., Xu T., Le A., Shi S. Mesenchymal stem cell transplantation reverses multiorgan dysfunction in systemic lupus erythematosus mice and humans. *Stem Cells.* 2009; 27: 1421-1432.
474. Sun N., Panetta N.J., Gupta D.M., Wilson K.D., Lee A., Jia F., Hu S., Cherry A.M., Robbins R.C., Longaker M.T., Wu J.C. Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from adult human adipose stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Sep 15;106(37):15720-5.
475. Suzdal'tseva Y.G., Burunova V.V., Vakhrushev I.V., Cheglakov I.B., Yarygin K.N. In vitro comparison of immunological properties of cultured human mesenchymal cells from various sources. *Bull Exp Biol Med.* 2008 Feb;145(2):228-31.
476. Suzdal'tseva YG, Burunova VV, Vakhrushev IV, Yarygin VN, Yarygin KN. Capability of human mesenchymal cells isolated from different sources to differentiation into tissues of mesodermal origin. *Bull Exp Biol Med.* 2007a Jan;143(1):114-21.
477. Suzdal'tseva Y.G., Burunova V.V., Petrakova N.V., Vakhrushev I.V., Yarygin K.N., Yarygin V.N. Comparative analysis of cytophenotypes of cells of mesenchymal lineage isolated from human tissues. *Bull Exp Biol Med.* 2007b Jan;143(1):147-54
478. Suzdal'tseva Yu. G., Goryunov, K. V., Rubtsov Yu. P. The Role of Intercellular Contacts in Induction of Indolamine-2,3-Dioxygenase Synthesis in MMSC from Adipose Tissue. *Cell and Tissue Biology*, September 2018, Volume 12, Issue 5, pp 391–401.
479. Suzdal'tseva Y., Zhidkih S., Kiselev S. L., Stupin V. Locally Delivered Umbilical Cord Mesenchymal Stromal Cells Reduce Chronic Inflammation in Long-Term Nonhealing Wounds: A Randomized Study. *Stem Cells Int.*, 2020, V. 2020, Article ID 5308609, 11 p.
480. Svensson K.J., Christianson H.C., Wittrup A., Bourseau-Guilmain E., Lindqvist E., Svensson L.M., Morgelin M., Belting M. Exosome uptake depends on ERK1/2-heat shock protein 27 signaling and lipid Raft-mediated endocytosis negatively regulated by caveolin-1. *J. Biol. Chem.* 2013, 288, 17713–17724.

481. Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007 Nov 30;131(5):861-72.
482. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-76.
483. Takeda J., Seino S., Bell G.I. Human Oct3 gene family: cDNA sequences, alternative splicing, gene organization, chromosomal location, and expression at low levels in adult tissues. *Nucleic Acids Res*. 1992 Sep 11;20(17):4613-20.
484. Taketani T., Oyama C., Mihara A., Tanabe Y., Abe M., Hirade T., Yamamoto S., Bo R., Kanai R., Tadenuma T., Michibata Y., Yamamoto S., Hattori M., Katsube Y., Ohnishi H., Sasao M., Oda Y., Hattori K., Yuba S., Ohgushi H., Yamaguchi S. Ex Vivo Expanded Allogeneic Mesenchymal Stem Cells With Bone Marrow Transplantation Improved Osteogenesis in Infants With Severe Hypophosphatasia. *Cell Transplant*. 2015;24(10):1931-43.
485. Takizawa N., Okubo N., Kamo M., Chosa N., Mikami T., Suzuki K., Yokota S., Ibi M., Ohtsuka M., Taira M., Yaegashi T., Ishisaki A., Kyakumoto S. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells propagate immunosuppressive/anti-inflammatory macrophages in cell-to-cell contact-independent and -dependent manners under hypoxic culture. *Exp Cell Res*. 2017 Sep 15;358(2):411-420.
486. Tang W, Zhang Y, Tang L, Zhang J, Xiong L, Wang B. Inhibitory effect of tranilast on the myofibroblast differentiation of rat mesenchymal stem cells induced by transforming growth factor-beta1 in vitro. *Mol Med Rep*. 2018 Dec;18(6):5693-5700.
487. Tani C., Vagnani S., Carli L., Querci F., Kühl A.A., Spieckermann S., Cieluch C.P., Pacini S., Fazzi R., Mosca M. Treatment with Allogenic Mesenchymal Stromal Cells in a Murine Model of Systemic Lupus Erythematosus. *Int J Stem Cells*. 2017 Nov 30;10(2):160-168
488. Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282:1145–1147.
489. Ti D., Hao H., Tong C., Liu J., Dong L., Zheng J. Zhao Y., Liu H., Fu X., Han W. LPS-preconditioned mesenchymal stromal cells modify macrophage polarization for resolution of chronic inflammation via exosome-shuttled let-7b. *J Transl Med*. 2015 Sep 19;13:308.
490. Timper K., Seboek D., Eberhardt M., Linscheid P., Christ-Crain M., Keller U., Müller B., Zulewski H. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Mar 24;341(4):1135-40.
491. Tkachuk V.A., Plekhanova O.S., Parfyonova Y.V. Regulation of arterial remodeling and angiogenesis by urokinase-type plasminogen activator. *Can. J. Physiol. Pharmacol*. 2009; 87: 231-251.
492. Tofiño-Vian M., Guillén M.I., Pérez Del Caz M.D., Silvestre A., Alcaraz M.J. Microvesicles from Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells as a New Protective Strategy in Osteoarthritic Chondrocytes. *Cell Physiol Biochem*. 2018 May 9;47(1):11-25.

493. Tomasek J.J., Gabbiani G., Hinz B., Chaponnier C., Brown R.A. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodeling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2002; 3: 349-363.
494. Tomchuck S.L., Zwezdaryk K.J., Coffelt S.B., Waterman RS, Danka ES, Scandurro AB. Toll-like receptors on human mesenchymal stem cells drive their migration and immunomodulating responses. *Stem Cells.* 2008; 26: 99-107.
495. Torres Crigna A., Uhlig S., Elvers-Hornung S., Klüter H., Bieback K. Human Adipose Tissue-Derived Stromal Cells Suppress Human, but Not Murine Lymphocyte Proliferation, via Indoleamine 2,3-Dioxygenase Activity. *Cells.* 2020 Nov 5;9(11):2419. doi: 10.3390/cells9112419.
496. Tse J.R., Engler A.J. Stiffness gradients mimicking in vivo tissue variation regulate mesenchymal stem cell fate. *PLoS One.* 2011; 6: e15978.
497. Tse W.T., Pendleton J.D., Beyer W.M., Egalka M.C., Guinan E.C. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation.* 2003 Feb 15;75(3):389-97.
498. Uday Chandrika K., Tripathi R., Kameshwari Y., Rangaraj N., Mahesh Kumar J., Singh S. Refunctionalization of Decellularized Organ Scaffold of Pancreas by Recellularization: Whole Organ Regeneration into Functional Pancreas. *Tissue Eng Regen Med.* 2020 Oct 24.
499. Ullah M., Liu D.D., Thakor A.S. Mesenchymal Stromal Cell Homing: Mechanisms and Strategies for Improvement. *iScience.* 2019 May 31;15:421-438.
500. Usovetskii I. A., Burunova V. V., Kovtun N. E., Suzdal'tseva Yu. G., Krasil'nikova Yu. B., Korotkii N. G., Yarygin K. N. Preparation of mixed keratinocyte and melanocyte cultures from biopsy specimens of pigmented skin sites of patients with vitiligo. *Bull Exp Biol Med.* 2009, July; 148 (1):103-105.
501. Urban V.S., Kiss J., Kovacs J., Gocza E., Vas V., Monostori E., Uher F. Mesenchymal stem cells cooperate with bone marrow cells in therapy of diabetes. *Stem Cells.* 2008;26:244–253.
502. Vakhrushev I.V., Suzdaltseva Y.G., Burunova V.V., Karalkin P.A., Lupatov A.Y., Yarygin K.N. Mesenchymal cells of the decidua: phenotype and initial evaluation of possibility of their use in bone tissue engineering. *Bull Exp Biol Med.* 2010 Jul;149(1):161-6.
503. Vazin T., Freed W.J. Human embryonic stem cells: derivation, culture, and differentiation: a review. *Restor Neurol Neurosci.* 2010;28(4):589-603.
504. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res.* 2009; 37(5): 1528-42.
505. Venkataiah V.S., Handa K., Njuguna M.M., Hasegawa T., Maruyama K., Nemoto E., Yamada S., Sugawara S., Lu L., Takedachi M., Murakami S., Okura H., Matsuyama A, Saito M. Periodontal Regeneration by Allogeneic Transplantation of Adipose Tissue Derived Multi-Lineage Progenitor Stem Cells in vivo. *Sci Rep.* 2019 Jan 29;9(1):921.
506. Villa-Diaz L.G., Brown S.E., Liu Y., Ross A.M., Lahann J., Parent J.M., Krebsbach P.H. Derivation of mesenchymal stem cells from human induced pluripotent stem cells cultured on synthetic substrates. *Stem Cells.* 2012 Jun;30(6):1174-81.

507. Vinogradov S.V., Suzdaltseva Y., Alakhov V.Yu., Kabanov A.V. Inhibition of herpes simplex virus 1 reproduction with hydrophobized antisense oligonucleotides. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994 Sep 15;203(2):959-66.
508. Vinogradov S.V., Suzdaltseva Y.G., Kabanov A.V. Block polycationic oligonucleotide derivative: synthesis and inhibition of herpes virus reproduction. *Bioconjug Chem.* 1996 Jan-Feb;7(1):3-6.
509. Vizoso F.J., Eiro N., Cid S., Schneider J., Perez-Fernandez R. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. *Int J Mol Sci.* 2017 Aug 25;18(9):1852. doi: 10.3390/ijms18091852.
510. Vlassov A.V., Magdaleno S., Setterquist R., Conrad R. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim Biophys Acta.* 2012 Jul;1820(7):940-8. 1.
511. Vodyanik M.A., Yu J., Zhang X., Tian S., Stewart R., Thomson J.A., Slukvin I.I. A mesoderm-derived precursor for mesenchymal stem and endothelial cells. *Cell Stem Cell.* 2010;7(6):718–729.
512. Vojtassák J., Danisovic L., Kubes M., Bakos D., Jarábek L., Ulicná M., Blasko M. Autologous biograft and mesenchymal stem cells in treatment of the diabetic foot. *Neuro Endocrinol Lett.* 2006 Dec;27 Suppl 2:134-7.
513. Wang D., Liu N., Xie Y., Song B., Kong S., Sun X. Different culture method changing CD105 expression in amniotic fluid MSCs without affecting differentiation ability or immune function. *J Cell Mol Med.* 2020 Apr;24(7):4212-4222.
514. Wang H., Zheng R., Chen Q., Shao J., Yu J., Hu S. Mesenchymal stem cells microvesicles stabilize endothelial barrier function partly mediated by hepatocyte growth factor (HGF). *Stem Cell Res Ther.* 2017 Sep 29;8(1):211.
515. Wang H.S., Hung S.C., Peng S.T., Huang C.C., Wei H.M., Guo Y.J., Fu Y.S., Lai M.C., Chen C.C. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells.* 2004;22(7):1330-7. doi: 10.1634/stemcells.2004-0013.
516. Wang S., Mo M., Wang J., Sadia S., Shi B., Fu X., Yu L., Tredget E.E., Wu Y. Platelet-derived growth factor receptor beta identifies mesenchymal stem cells with enhanced engraftment to tissue injury and pro-angiogenic property. *Cell Mol Life Sci.* 2018 Feb;75(3):547-561.
517. Wang Y., Chen X., Cao W., Shi Y. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nat Immunol.* 2014 Nov;15(11):1009-16.
518. Wang Y., Han B., Wang Y., Wang C., Zhang H., Xue J., Wang X., Niu T., Niu Z., Chen Y. Mesenchymal stem cell-secreted extracellular vesicles carrying TGF- β 1 up-regulate miR-132 and promote mouse M2 macrophage polarization. *J Cell Mol Med.* 2020 Sep 23.
519. Wang Y., Huang J., Gong L., Yu D., An C., Bunpetch V., Dai J., Huang H., Zou X., Ouyang H., Liu H. The Plasticity of Mesenchymal Stem Cells in Regulating Surface HLA-I. *iScience.* 2019 May 31;15:66-78.
520. Wang Y., Tian M., Wang F., Heng B.C., Zhou J., Cai Z., Liu H. Understanding the Immunological Mechanisms of Mesenchymal Stem Cells in

- Allogeneic Transplantation: From the Aspect of Major Histocompatibility Complex Class I. *Stem Cells Dev.* 2019 Sep 1;28(17):1141-1150.
521. Wang Y., Wang H., Guo J., Gao J., Wang M., Xia M., Wen Y., Su P., Yang M., Liu M., Shi L., Cheng T., Zhou W., Zhou J. LGR4, Not LGR5, Enhances hPSC Hematopoiesis by Facilitating Mesoderm Induction via TGF-Beta Signaling Activation. *Cell Rep.* 2020 May 5;31(5):107600.
522. Weiss A.R.R., Dahlke M.H. Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells (MSCs): Mechanisms of Action of Living, Apoptotic, and Dead MSCs. *Front Immunol.* 2019 Jun 4;10:1191.
523. Warejcka D.J., Harvey R., Taylor B.J., Young H.E., Lucas P.A. A population of cells isolated from rat heart capable of differentiation into several mesodermal phenotypes. *J. Surg. Res.*, 1996, V. 62, N. 2, p. 233-242.
524. Watanabe K., Nakamura T., Onodera S., Saito A., Shibahara T., Azuma T. A novel GNAS-mutated human induced pluripotent stem cell model for understanding GNAS-mutated tumors. *Tumour Biol.* 2020 Sep;42(9):1010428320962588.
525. Waterman R.S., Tomchuck S.L., Henkle S.L., Betancourt AM. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One.* 2010 Apr 26; 5(4):e10088.
526. Wegmeyer H., Bröske A.M., Leddin M., Kuentzer K., Nisslbeck A.K., Hupfeld J., Wiechmann K., Kuhlen J., von Schwerin C., Stein C., Knothe S., Funk J., Huss R., Neubauer M. Mesenchymal stromal cell characteristics vary depending on their origin. *Stem Cells Dev.* 2013 Oct 1;22(19):2606-18.
527. Wernig M., Zhao J.P., Pruszak J., Hedlund E., Fu D., Soldner F., Broccoli V., Constantine-Paton M., Isacson O., Jaenisch R. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Apr 15;105(15):5856-61.
528. Werts E.D., DeGowin R.L., Knapp S.K., Gibson D.P. Characterization of marrow stromal (fibroblastoid) cells and their association with erythropoiesis. *Exp Hematol.* 1980 Apr;8(4):423-33.
529. Whitby D.J., Ferguson M.W. The extracellular matrix of lip wounds in fetal, neonatal and adult mice. *Development.* 1991; 112: 651-668.
530. Winston T.S., Suddhapas K., Wang C., Ramos R., Soman P., Ma Z. Serum-Free Manufacturing of Mesenchymal Stem Cell Tissue Rings Using Human-Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Int.* 2019 Jan 15;2019:5654324.
531. Wislet-Gendebien S., Wautier F., Leprince P., Rogister B. Astrocytic and neuronal fate of mesenchymal stem cells expressing nestin. *Brain Res Bull.* 2005 Dec 15;68(1-2):95-102.
532. de Witte S.F.H., Luk F., Sierra Parraga J.M., Gargasha M., Merino A., Korevaar S.S., Shankar A.S., O'Flynn L., Elliman S.J., Roy D., Betjes M.G.H., Newsome P.N., Baan C.C., Hoogduijn M.J. Immunomodulation By Therapeutic Mesenchymal Stromal Cells (MSC) Is Triggered Through Phagocytosis of MSC By Monocytic Cells. *Stem Cells.* 2018 Jan 17. doi: 10.1002/stem.2779.
533. Wobma H.M., Kanai M., Ma S.P., Shih Y., Li H.W., Duran-Struuck R., Winchester R., Goeta S., Brown L.M., Vunjak-Novakovic G. Dual IFN- γ /hypoxia

- priming enhances immunosuppression of mesenchymal stromal cells through regulatory proteins and metabolic mechanisms. *J Immunol Regen Med.* 2018 Mar;1:45-56.
534. Wodarz A., Gonzalez C. Connecting cancer to the asymmetric division of stem cells. *Cell.* 2006. 124(6): pp. 1121-1123.
535. Wu K.H., Cheng C.C., Li J.P., Weng T.F., Yang S.F., Pan H.H., Chao Y.H. Toll-like receptor signalling associated with immunomodulation of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in mice with systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2020 Feb;29(2):165-175.
536. Wu M., Zhang R., Zou Q., Chen Y., Zhou M., Li X., Ran R., Chen Q. Comparison of the Biological Characteristics of Mesenchymal Stem Cells Derived from the Human Placenta and Umbilical Cord. *Sci Rep.* 2018 Mar 22;8(1):5014.
537. Wu Y., Chen L., Scott P.G., Tredget E.E. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells.* 2007 Oct;25(10):2648-59.
538. Wu Y., Huang S., Enhe J., Ma K., Yang S., Sun T., Fu X. Bone marrow-derived mesenchymal stem cell attenuates skin fibrosis development in mice. *Int Wound J.* 2013 2014 Dec;11(6):701-10.
539. Xie Z., Hao H., Tong C., Cheng Y., Liu J., Pang Y., Si Y., Guo Y., Zang L., Mu Y., Han W. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells elicit macrophages into an anti-inflammatory phenotype to alleviate insulin resistance in type 2 diabetic rats. *Stem Cells.* 2016;34(3):627-639.
540. Xu W., Xu R., Li Z., Wang Y., Hu R. Hypoxia changes chemotaxis behaviour of mesenchymal stem cells via HIF-1 α signalling. *J Cell Mol Med.* 2019 Mar;23(3):1899-1907.
541. Xue M., Jackson C.J. Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring. *Adv Wound Care.* 2015 Mar 1;4(3):119-136.
542. Yagi H., Soto-Gutierrez A., Parekkadan B., Kitagawa Y., Tompkins R.G., Kobayashi N., Yarmush M.L. Mesenchymal stem cells: Mechanisms of immunomodulation and homing. *Cell Transplant.* 2010;19(6):667-79. Epub 2010 Jun 3. Review.
543. Yamanaka S. Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy-Promise and Challenges. *Cell Stem Cell.* 2020 Oct 1;27(4):523-531.
544. Yamanaka S., Blau H.M. Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature.* 2010 Jun 10;465(7299):704-12.
545. Yang H.J., Kim K.J., Kim M.K., Lee S.J., Ryu Y.H., Seo B.F., Oh D.Y., Ahn S.T., Lee H.Y., Rhie J.W. The stem cell potential and multipotency of human adipose tissue-derived stem cells vary by cell donor and are different from those of other types of stem cells. *Cells Tissues Organs.* 2014;199(5-6):373-83.
546. Yang R., Gao H., Chen L., Fang N., Chen H., Song G., Yu L., Zhang Q., Zhang T. Effect of peripheral blood-derived mesenchymal stem cells on macrophage polarization and Th17/Treg balance in vitro. *Regen Ther.* 2020 May 16;14:275-283.
547. Yang Y, Zhu S, Li Y, Lu Q, Zhang Q, Su L, Zhang Q, Zhao Y, Luo Y, Liu Y. Human umbilical cord mesenchymal stem cells ameliorate skin fibrosis development

- in a mouse model of bleomycin-induced systemic sclerosis. *Exp Ther Med*. 2020 Dec;20(6):257.
548. Yang Z., Schmitt J.F., Lee E.H. Immunohistochemical Analysis of Human Mesenchymal Stem Cells Differentiating into Chondrogenic, Osteogenic, and Adipogenic Lineages. *Methods Mol Biol*. 2011; 698:353-366.
549. Yarygin K.N., Suzdal'tseva Y.G., Burunova V.V., Voronov A.V., Petrakova N.V., Cheglakov I.B., Stupin V.A., Yarygin V.N. Comparative study of adult human skin fibroblasts and umbilical fibroblast-like cells. *Bull Exp Biol Med*. 2006 Jan;141(1):161-6.
550. Yi X., Chen F., Liu F., Peng Q., Li Y., Li S., Du J., Gao Y., Wang Y. Comparative separation methods and biological characteristics of human placental and umbilical cord mesenchymal stem cells in serum-free culture conditions. *Stem Cell Res Ther*. 2020 May 19;11(1):183.
551. Yin J.L., Wu Y., Yuan Z.W., Gao X.H., Chen H.D. Advances in scarless foetal wound healing and prospects for scar reduction in adults. *Cell Prolif*. 2020 Oct 15:e12916.
552. Yoo H.S., Lee K., Na K., Zhang Y.X., Lim H.J., Yi T.1, Song S.U., Jeon M.S. Mesenchymal stromal cells inhibit CD25 expression via the mTOR pathway to potentiate T-cell suppression. *Cell Death Dis*. 2017 Feb 23;8(2):e2632.
553. Yoo K.H., Jang I.K., Lee M.W., Kim H.E., Yang M.S., Eom Y., Lee J.E., Kim Y.J., Yang S.K., Jung H.L., Sung K.W., Kim C.W., Koo H.H. Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues. *Cell Immunol*. 2009;259(2):150-6.
554. Yoshida A., Kohka Takahashi H., Iwagaki H., Yoshino T., Morichika T., Yokoyama M., Itoh H., Mori S., Akagi T., Nishibori M., Tanaka N. Essential role of ICAM-1/LFA-1 interaction in synergistic effect of IL-18 and IL-12 on IFN-gamma production in human PBMC. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol*. 2002 Mar;365(3):181-6.
555. Young H.E., Mancini M.L., Wright R.P., Smith J.C., Black A.C. Jr, Reagan C.R., Lucas P.A. Mesenchymal stem cells reside within the connective tissues of many organs. *Dev. Dyn.*, 1995, V. 202, N. 2, p. 137-144.
556. Yu J., Vodyanik M.A., Smuga-Otto K., Antosiewicz-Bourget J., Frane J.L., Tian S., Nie J., Jonsdottir G.A., Ruotti V., Stewart R., Slukvin II, Thomson J.A. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007;318(5858):1917-20.
557. Yu M., Xiao Z., Shen L., Li L. Mid-trimester fetal blood-derived adherent cells share characteristics similar to mesenchymal stem cells but full-term umbilical cord blood does not. *Br J Haematol*. 2004 Mar;124(5):666-75.
558. Yu Y., Situ Q., Jia W., Li J., Wu Q., Lei J. Data driven mathematical modeling reveals the dynamic mechanism of MSC-induced neovascularization. *FASEB J*. 2019 Mar;33(3):3496-3509.
559. Yuan O., Lin C., Wagner J., Archard J.A., Deng P., Halmai J., Bauer G., Fink K.D., Fury B., Perotti N.H., Walker J.E., Pollock K., Apperson M., Butters J., Belafsky P., Farwell D.G., Kuhn M., Nolta J., Anderson J.D. Exosomes Derived from

- Human Primed Mesenchymal Stem Cells Induce Mitosis and Potentiate Growth Factor Secretion. *Stem Cells Dev.* 2019 Mar 15;28(6):398-409. doi: 10.1089/scd.2018.0200. Epub 2019 Feb 26.
560. Yun M.H. Changes in Regenerative Capacity through Lifespan. *Int J Mol Sci.* 2015 Oct 23;16(10):25392-432.
561. Zaehres H., Lensch M.W., Daheron L., Stewart S.A., Itskovitz-Eldor J., Daley G.Q. High-efficiency RNA interference in human embryonic stem cells. *Stem Cells.* 2005 Mar;23(3):299-305.
562. Zappia E., Casazza S., Pedemonte E., Benvenuto F., Bonanni I., Gerdoni E., Giunti D., Ceravolo A., Cazzanti F., Frassoni F., Mancardi G., Uccelli A. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood.* 2005; 106: 1755-1761.
563. Zavan B., Vindigni V., Gardin C., D'Avella D., Della Puppa A., Abatangelo G., Cortivo R. Neural potential of adipose stem cells. *Discov Med.* 2010 Jul;10(50):37-43.
564. Zha K., Li X., Yang Z., Tian G., Sun Z., Sui X., Dai Y., Liu S., Guo Q. Heterogeneity of mesenchymal stem cells in cartilage regeneration: from characterization to application. *NPJ Regen Med.* 2021 Mar 19;6(1):14.
565. Zhai L.J., Zhao K.Q., Wang Z.Q., Feng Y., Xing S.C. Mesenchymal stem cells display different gene expression profiles compared to hyaline and elastic chondrocytes. *Int J Clin Exp Med.* 2011;4(1):81-90.
566. Zhang B., Yin Y., Lai R.C., Tan S.S., Choo A.B., Lim S.K. Mesenchymal stem cells secrete immunologically active exosomes. *Stem Cells Dev.* 2014 Jun 1;23(11):1233-44.
567. Zhang B., Wang M., Gong A., Zhang X., Wu X., Zhu Y., Shi H., Wu L., Zhu W., Qian H., Xu W. HucMSC-Exosome Mediated-Wnt4 Signaling Is Required for Cutaneous Wound Healing. *Stem Cells.* 2015 Jul;33(7):2158-68.
568. Zhang B., Wu X., Zhang X., Sun Y., Yan Y., Shi H., Zhu Y., Wu L., Pan Z., Zhu W., Qian H., Xu W. Human umbilical cord mesenchymal stem cell exosomes enhance angiogenesis through the Wnt4/ β -catenin pathway. *Stem Cells Transl Med.* 2015 May;4(5):513-22.
569. Zhang J., Guan J., Niu X., Hu G., Guo S., Li Q., Xie Z., Zhang C., Wang Y.3. Exosomes released from human induced pluripotent stem cells-derived MSCs facilitate cutaneous wound healing by promoting collagen synthesis and angiogenesis. *J Transl Med.* 2015 Feb 1;13:49.
570. Zhang Q., Li Q., Zhu J., Guo H., Zhai Q., Li B., Jin Y., He X., Jin F. Comparison of therapeutic effects of different mesenchymal stem cells on rheumatoid arthritis in mice. *PeerJ.* 2019 Jun 3;7:e7023.
571. Zhang W., Ge W., Li C., You S., Liao L., Han Q., Deng W., Zhao R.C. Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Stem Cells Dev* 2004; 13:263–271.
572. Zhang Y., Babczyk P., Pansky A., Kassack M.U., Tobiasch E. P2 Receptors Influence hMSCs Differentiation towards Endothelial Cell and Smooth Muscle Cell Lineages. *Int J Mol Sci.* 2020 Aug 27;21(17):6210.

573. Zhang Y., Ge X.H., Guo X.J., Guan S.B., Li X.M., Gu W., Xu W.G. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Inhibit the Function of Dendritic Cells by Secreting Galectin-1. *Biomed Res Int.* 2017;2017:3248605.
574. Zhang Y., Li C.D., Jiang X.X., Li H.L., Tang P.H., Mao N. Comparison of mesenchymal stem cells from human placenta and bone marrow. *Chin Med J (Engl).* 2004 Jun;117(6):882-7.
575. Zhang Z., Huang S., Wu S., Qi J., Li W., Liu S., Cong Y., Chen H., Lu L., Shi S., Wang D., Chen W., Sun L. Clearance of apoptotic cells by mesenchymal stem cells contributes to immunosuppression via PGE2. *EBioMedicine.* 2019 Jul; 45: 341–350.
576. Zhao H.B., Ma H., Ha X.Q., Zheng P., Li X.Y., Zhang M., Dong J.Z., Yang Y.S. Salidroside induces rat mesenchymal stem cells to differentiate into dopaminergic neurons. *Cell Biol Int.* 2014 Apr;38(4):462-71.
577. Zhao R, Liang H, Clarke E, Jackson C, Xue M. Inflammation in Chronic Wounds. *Int J Mol Sci.* 2016 Dec 11;17(12):2085.
578. Zhou J., Chen A., Wang Z., Zhang J., Chen H., Zhang H., Wang R., Miao D., Jin J. Bmi-1 determines the stemness of renal stem or progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020 Sep 3;529(4):1165-1172.
579. Zhou K., Guo S., Tong S., Sun Q., Li F., Zhang X., Qiao Y., Liang G. Immunosuppression of Human Adipose-Derived Stem Cells on T Cell Subsets via the Reduction of NF-kappaB Activation Mediated by PD-L1/PD-1 and Gal-9/TIM-3 Pathways. *Stem Cells Dev.* 2018 Sep 1;27(17):1191-1202.
580. Zhou Y., Yamamoto Y., Xiao Z., Ochiya T. The Immunomodulatory Functions of Mesenchymal Stromal/Stem Cells Mediated via Paracrine Activity. *J Clin Med.* 2019 Jul 12;8(7):1025.
581. Zion E.H., Chandrasekhara C., Chen X. Asymmetric inheritance of epigenetic states in asymmetrically dividing stem cells. *Curr Opin Cell Biol.* 2020 Aug 29;67:27-36.
582. Zou X.Y., Yu Y., Lin S., Zhong L., Sun J., Zhang G., Zhu Y.. Comprehensive miRNA Analysis of Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stromal Cells and Extracellular Vesicles. *Kidney Blood Press Res.* 2018;43(1):152-161.
583. Zuk P.A., Zhu M., Ashjian P., De Ugarte D.A., Huang J.I., Mizuno H., Alfonso Z.C., Fraser J.K., Benhaim P., Hedrick M.H. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 2002 Dec;13(12):4279-95.

ПРИЛОЖЕНИЕ А



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ

РЕГИСТРАЦИОННОЕ УДОСТОВЕРЕНИЕ

№ ФС-2006/ 341от 04 декабря 2006 г.Действительно до 04 декабря 2009 г.

Название медицинской технологии:

**Клеточный материал из пуповины человека: получение,
культивирование, хранение и транспортировка**

Аннотация:

Методика относится к клеточным биотехнологиям, направлена на получение фибробластоподобных клеток из пуповины новорожденного (с согласия роженицы и при условии нормального течения беременности и срочных родах на 38-40 неделях гестации) и включает следующие стадии: тестирование донора (матери), забор биоматериала, транспортировка, выделение и культивирование клеточной культуры, типирование клеток, тестирование и паспортизация клеточного материала, криоконсервация и длительное криохраниение.

Показания, противопоказания и материально-техническое оснащение изложены в приложении*.

Разработчик/заявитель:

ГОУВПО «Российский государственный медицинский университет
Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»
(Российская Федерация, 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1).

Соразработчик: ООО «Медицинские технологии»

(Российская Федерация, 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1 стр.1).

Уровень/масштаб использования:

ГОУ ВПО РГМУ Росздрава; ООО «Медицинские технологии».

Медицинская технология предназначена для:

квалифицированных специалистов с медицинским и/или биологическим образованием, имеющих опыт работы с культурами эукариотических клеток не менее 3-х лет.

Руководитель



(подпись) печать)

Р.У.Хабриев

* Регистрационное удостоверение без приложения недействительно.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубочайшую признательность своему руководителю Киселеву Сергею Львовичу, профессору Института Общей Генетики им. Н.И. Вавилова, за всестороннюю поддержку, многолетнее сотрудничество и ценные обсуждения и рекомендации по подготовке настоящего исследования к публичной защите. Автор искренне благодарен чл.-корр. РАН Ярыгину Константину Никитичу и академику РАН Ткачуку Всеволоду Арсеньевичу за возможность выполнять научные исследования в возглавляемых ими лабораториях на самом высоком уровне. Автор выражает признательность за продуктивное сотрудничество, обсуждение исследований и энтузиазм своим сотрудникам Горюнову Кириллу Владимировичу, Воротникову Александру Вячеславовичу, Кудряшовой Татьяне Владимировне. Особенно глубокую благодарность автор приносит Ступину Виктору Александровичу, профессору кафедры госпитальной хирургии РНИМУ им. Пирогова, за неоценимую помощь и безоговорочную поддержку в практическом воплощении результатов данного исследования. Автор благодарит сотрудников Городской клинической больницы №15 им О.М. Филатова Жидких С.Ю., Горюнова С.В., Пар В.И., Смирнову Г.О., Жидких Н.В., Привиденцева А.И. за помощь в проведении клинических исследований. Автор благодарит заведующую лабораторией роста и развития ФГБНУ НИИМЧ им. ак. А.П. Авцына Большакову Галину Борисовну и заместителя директора по научному развитию Фатхудинова Тимура Хайсамудиновича этого же института за ценные замечания, предложения и комментарии при работе над текстом диссертации.

В завершение, теплые слова благодарности моей семье за понимание, терпение и поддержку.