

На правах рукописи

СУЗДАЛЬЦЕВА ЮЛИЯ ГЕННАДИЕВНА

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

1.5.22 - клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва - 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова» Российской академии наук.

Научный консультант:

Киселев Сергей Львович

доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией эпигенетики человека и животных Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова» Российской академии наук

Официальные оппоненты:

Гольдштейн Дмитрий Вадимович,

доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией генетики стволовых клеток Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетического научного центра имени академика Н.П. Бочкова»

Глухов Александр Иванович,

доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории прототипирования и испытаний биотехнологических разработок Биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Малашичева Анна Борисовна,

доктор биологических наук, заведующий лабораторией Регенеративной биомедицины Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт цитологии» Российской академии наук

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Российской Федерации Институт медико-биологических проблем Российской академии наук (123007, Москва, Хорошевское шоссе 76 А)

Защита диссертации состоится «__» _____ 2022 года в _____ часов на заседании диссертационного совета 24.01.204.02 «Научно-исследовательского института морфологии человека имени академика А.П. Авцына» ФГБНУ "Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского" по адресу: 117418, г. Москва, ул. Цюрупы, д.3

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке «Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына» ФГБНУ "Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского" и на сайте www.med.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

доктор биологических наук

Косырева Анна Михайловна

Общая характеристика работы

Актуальность темы исследования. Острая воспалительная реакция является нормальным эволюционно-консервативным физиологическим ответом на повреждение ткани. Однако 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 (Furman D. et al., 2019). Одним из проявлений нарушения процессов регенерации, характеризующихся развитием хронического воспалительного процесса, является возникновение хронических длительно незаживающих ран. Лечение хронических ран представляет крайне сложную клиническую проблему. 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, тканевую инженерию. 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-Manriquez 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 до сих пор крайне мало подтверждений того, что данные о функциональных и фенотипических характеристиках ММСК, полученные *in vitro*, могут быть экстраполированы на

свойства ММСК in vivo (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-Manriquez 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.

Имуномодулирующая 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 плюрипотентное 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 раздельными 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 тоже 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 фитогемагглютинином (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 мультиплексного 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 (CTERP)" (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, 582 источника литературы.

Результаты исследования и обсуждение

Сравнительный анализ фенотипических и функциональных свойств ММСК, изолированных из постнатальных тканей человека.

В настоящее время многочисленные исследования продемонстрировали значительное сходство морфофункциональных свойств культивируемых ММСК, выделенных из различных тканевых источников. Нами также был проведен сравнительный анализ фенотипических и функциональных свойств ММСК, выделенных из жировой ткани, костного мозга, кожи взрослого человека и пуповины новорожденного. В наших экспериментальных условиях все выделенные из тканей ММСК, прикрепившиеся к поверхности культурального пластика, имели фибробластоподобную морфологию, обладали способностью к

экспансии. С помощью метода проточной цитофлюориметрии было показано, что они экспрессируют поверхностные маркеры ММСК CD105, CD73, CD90 и не экспрессируют поверхностные маркеры гемопоэтических клеток CD34, CD45, HLA-DR. Под действием специальных условий эти клетки обладали способностью дифференцироваться в адипогенном, хондрогенном и остеогенном направлении (рисунок 1).

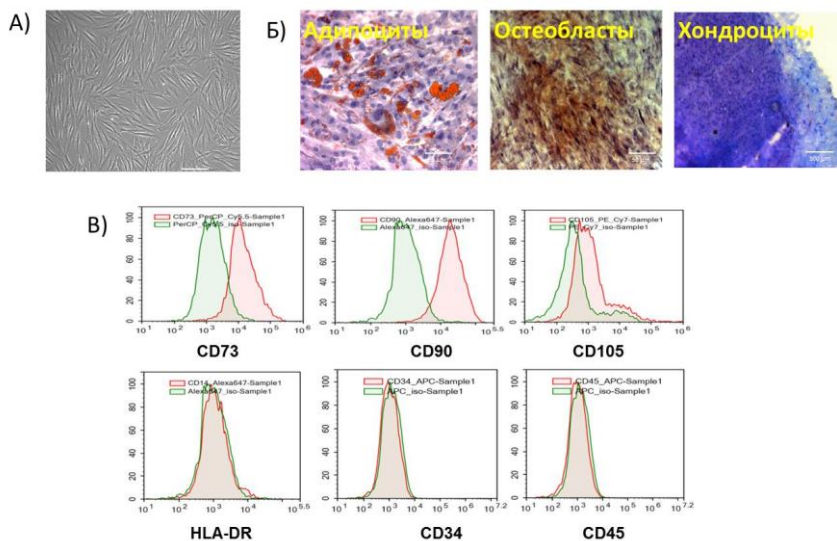


Рисунок 1. Репрезентативная характеристика морфологии, иммуноцитотипического профиля и дифференцировочного потенциала ММСК, выделенных из постнатальных тканей человека. А) - ММСК, адгезионная культура 2 пассажа с фиброблатоподобной морфологией. Б) - Дифференцировка ММСК в адипогенном (окраска масляным красным/гемаоксилином), остеогенном (окраска ализариновым красным) и хондрогенном (окраска толуидиновым голубым) направлении. В) Проточная флуориметрия ММСК, окрашенных антителами к поверхностным маркерам CD105, CD73, CD90, CD34, CD45, HLA-DR конъюгированных с флуорохромами фикоэритрином, Alexa Fluor 488, APC. Зеленым цветом выделен изотипический контроль; специфические поверхностные маркеры выделены красным цветом.

ММСК полученных культур обладали сходными свойствами по экспрессии виментина, коллагена 1 типа и молекул адгезии CD44, CD49b и CD54 (Yarygin K.N. et al., 2006, Lupatov A.Y. et al., 2006, Suzdal'tseva Y.G. et al., 2007). Таким образом, наши данные о сходных свойствах ММСК, выделенных из различных источников, согласуются с результатами, полученным другими

исследователями (Lv FJ 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 Международным Обществом Клеточной и Генной Терапии (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. Так нами впервые было показано, что значительная часть популяции ММСК пуповины экспрессировала нестин – маркер 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 2, а). ММСК дермального происхождения и ММСК костного мозга и жировой ткани нестин не экспрессировали (Yarugin K.N. et al., 2006). С использованием метода проточной цитометрии в ММСК полученных культур были выявлены также значительные различия в уровне экспрессии рецептора к фактору стволовых клеток (CD117), который также является маркером прогениторных клеток (рисунок 2, б) (Lupatov A. Y. et al., 2006). Впоследствии другими исследователями эти факты также были подтверждены (Kadam S.S., Bhone R.R, 2010, Montanucci P. et al., 2011, Liu Y et al., 2020)

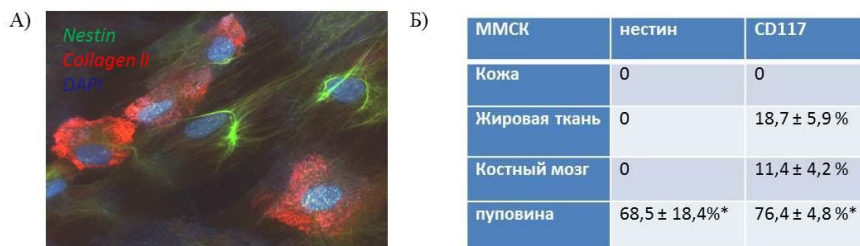


Рисунок 2. Экспрессия маркеров прогениторных клеток в ММСК. А) - Коэкспрессия нестина (FITC) и коллагена II типа (Rhod) в ММСК пуповины. Ядра окрашены DAPI. Увеличение $\times 630$. Б) – Относительное содержание клеток, экспрессирующих CD117 в культурах ММСК. Показаны средние величины и их ошибки из 3 независимых экспериментов. Звездочка показывает достоверность отличий при $P < 0.05$.

Одной из основных характеристик ММСК является их мультипотентность, т.е. способность при определенных условиях дифференцироваться в клетки разных типов тканей. Это свойство ММСК хорошо описано в литературе (Wang H.S. et al., 2004, Bieback K. et al., 2008, Reyes M. et al., 2009, Lv FJ et al., 2014, Kozłowska U. et al., 2019, Shin S et al.,

2021). В наших экспериментальных условиях ММСК полученных культур обладали также сходной способностью дифференцироваться в адипогенном, хондрогенном и остеогенном направлении. Однако в условиях остеогенной дифференцировки ММСК доля локусов, состоящих из клеток с высоким содержанием минерализованного матрикса, значительно различалась в зависимости от тканевого происхождения. Наибольшее количество минерализованных локусов было обнаружено в культурах ММСК, выделенных из костного мозга и жировой ткани. В ММСК кожи, такие локусы были единичными. ММСК пуповины 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, выделенными из других источников. ММСК жировой ткани, хуже дифференцировались в адипогенном направлении (Suzdal'tseva Y.G. et al., 2007). Эти и некоторые другие результаты говорят о том, что в пределах отдельной популяции ММСК имеется лишь небольшое количество клеток, способных к дифференцировке в трех направлениях: адипогенной, хондрогенной и остеогенной, большинство же клеток являются специализированными, т.е. коммитированными на функциональное поддержание гомеостаза тканей, из которых были выделены, и не являются мультипотентными.

Клеточно-опосредованная цитотоксичность аллогенных МПК по отношению к ММСК.

В настоящее время вопрос о том, избегают ли ММСК узнавания аллореактивными клетками при трансплантации, все еще остается открытым (Le Blanc K. et al., 2003, de Witte S.F.H. et al, 2018, Weiss A.R.R., Dahlke M.H., 2019). Метод сокультивирования различных клеток *in vitro* предоставляет возможность определения цитотоксичности аллореактивных НК по отношению к ММСК, а также изучить потенциальные возможности преодоления естественных барьеров врожденного и приобретенного иммунитета при аллогенных трансплантациях ММСК.

Мы провели исследование клеточно-опосредованной цитотоксичности при взаимодействии ММСК и МПК, содержащих субпопуляцию НК, в смешанных культурах *in vitro* с использованием набора Cytotox 96 (Promega, США), которое показало, что аллогенные ММСК не лизируются в присутствии иммунокомпетентных клеток реципиента (Suzdaltseva Y. G. et al, 2008). Полученные данные также подтверждаются другими исследованиями, которые показали, 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).

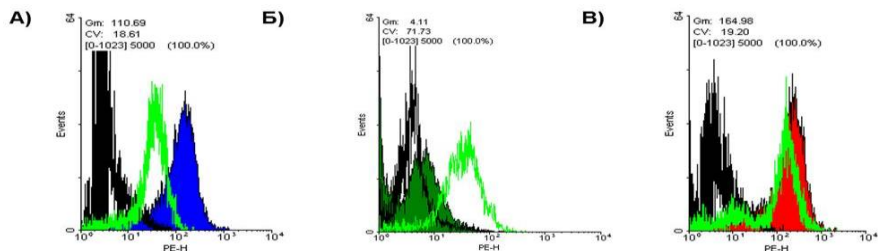


Рисунок 3. Изменение уровня экспрессии HLA I класса в MMCK выделенных их кожи (а), пуповины (б) и костного мозга (в) при сокультивировании с МПК. Репрезентативные данные проточной флуориметрии MMCK, окрашенных антителами к поверхностному маркеру HLA-ABC, конъюгированных с флуорохромом PE. Черным цветом выделен изотипический контроль. Зеленым незаштрихованным профилем обозначен уровень экспрессии HLA-ABC в интактных культурах MMCK. Цветным заштрихованным профилем обозначен уровень экспрессии HLA-ABC в MMCK после сокультивирования с МПК.

Имуноглобулин-подобные рецепторы, экспрессирующиеся на поверхности НК (KIR), играют ключевую роль в регуляции цитолитической активности. Лигандами для KIR-рецепторов являются антигены HLA I класса. Нами было установлено, что MMCK, выделенные из кожи, костного мозга и пуповины человека обладают высоким уровнем экспрессии HLA I класса (рисунок 3). Впервые было показано, что при сокультивировании с аллогенными иммунокомпетентными клетками уровень экспрессии HLA I класса в MMCK может изменяться (Suzdaltseva Y. G. et al., 2008). Впоследствии подобные данные были подтверждены также другими исследователями, которые предположили, что снижение уровня экспрессии HLA I класса в MMCK может происходить в результате клатрин-независимого эндоцитоза, а повышение – в результате воздействия провоспалительного микроокружения (Wang Y., et al., 2019). Также было показано, что клетки, обладающие саморегулирующейся экспрессией поверхностных белков HLA I класса, вызывают более слабый иммунный ответ (Deuse T. et al., 2011).

MMCK угнетают пролиферацию и активацию актМПК в смешанных культурах *in vitro*.

Функциональная активность MMCK по отношению к иммунокомпетентным клеткам, помимо уклонения от иммунного ответа, проявляется в способности модулировать провоспалительное микроокружение. 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). Для изучения иммуномодуляторных свойств ММСК *in vitro* в наших экспериментах мы использовали ММСК жировой ткани человека. Выбор этого источника ММСК был обусловлен доступностью материала здоровых доноров, а также данными о сходных свойствах ММСК независимо от источника происхождения. Дополнительным аргументом являлась также возможность использования ММСК жировой ткани как для аллогенных, так и для аутологичных трансплантаций.

Степень подавления пролиферации актМПК в присутствии ММСК оценивали через 24 ч в течение недели при различных соотношениях этих клеток: 1:10, 1:25, 1:50 и 1:100 (ММСК:актМПК). Сокультивирование производили в контактных и бесконтактных условиях. Мы установили, что ММСК в наибольшей степени подавляют пролиферацию актМПК через 48 ч сокультивирования. При более длительной инкубации данный эффект был менее выражен. Поэтому все дальнейшие измерения параметров, перечисленных выше, проводили именно через 48 ч сокультивирования. Наиболее значительное подавление пролиферации активированных МПК наблюдали при соотношении клеток 1:25 (ММСК: актМПК) (рисунок 4, а). Степень подавления пролиферации актМПК не зависела от наличия межклеточных контактов с ММСК в сокультуре (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 также впервые показали, что подавление пролиферации актМПК в присутствии ММСК связано со снижением количества активированных CD25+CD4+Т-лимфоцитов и не связано с апоптозом (рисунок 4, б) (Rubtsov Y. et al., 2017).

Таким образом, полученные нами результаты показали, что подавление пролиферации и активации актМПК осуществляется посредством растворимых факторов, секретируемых ММСК. Нами также было выявлено, что супернатанты интактных культур ММСК, не влияют на пролиферацию актМПК. Этот результат указывает на то, что ММСК не секретируют иммуносупрессивные факторы конститутивно, а только в ответ на стимулы, поступающие от провоспалительного микроокружения, создаваемого актМПК.

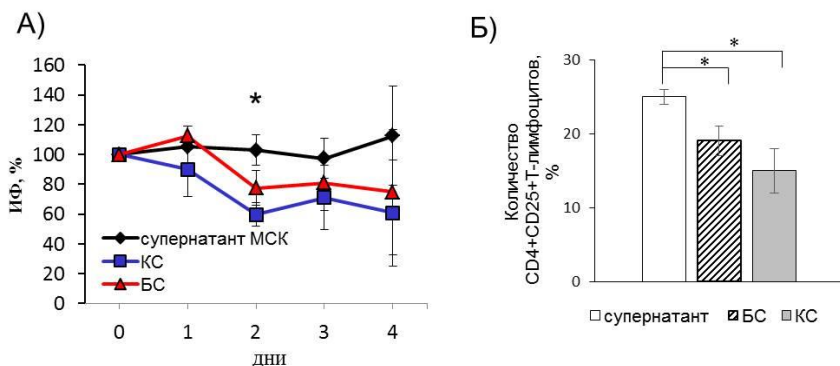


Рисунок 4. ММСК подавляют пролиферацию и активацию актМПК. А) – Динамика изменения пролиферации актМПК при сокультивировании с ММСК в соотношении 25:1 соответственно. Данные интенсивности флюоресценции CyQUANT®NF (ИФ) нормированы к уровню пролиферации (100 %) актМПК в стандартной среде культивирования. Показаны средние величины и их ошибки из 5 независимых экспериментов. Б) – Относительное количество CD25+CD4+T-лимфоцитов в % от общего количества CD4+T-лимфоцитов в условиях сокультивирования с ММСК в соотношении 1:25 через 48 ч. Показаны средние величины и их ошибки из 3 независимых экспериментов. Звездочка показывает достоверность отличий при $P < 0.05$. БС – бесконтактное сокультивирование, КС – контактное сокультивирование.

ММСК модулируют секрецию цитокинов в сокультурах с актМПК.

Для выяснения потенциальных растворимых факторов, оказывающих влияние на снижение активации и подавление пролиферации актМПК, мы провели анализ секретируемого цитокинового профиля в супернатантах отдельных и смешанных культур ММСК и актМПК. Мы исследовали уровни секреции 17 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, гранулоцит-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), IFN- γ , фактор некроза опухолей (TNF- α), а также моноцитарный хемотаксический протеин-1 (MCP-1), макрофагальный воспалительный протеин-1b (MIP-1b).

Мы показали, что актМПК секретируют все 17 исследуемых цитокинов. Мы показали также, что интактные ММСК в культуре конститутивно на высоком уровне экспрессируют преимущественно IL-8, IL-6 и MCP-1. Интересно, что базальный уровень секреции IL-6 был значительно выше в ММСК в состоянии покоя по сравнению с актМПК. Сходные уровни секреции TNF- α , IFN- γ и GM-CSF были обнаружены в ММСК и актМПК. Уровень секреции остальных цитокинов в ММСК был низким или были ниже предела обнаружения. 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, Ratushnyy A. et al., 2020).

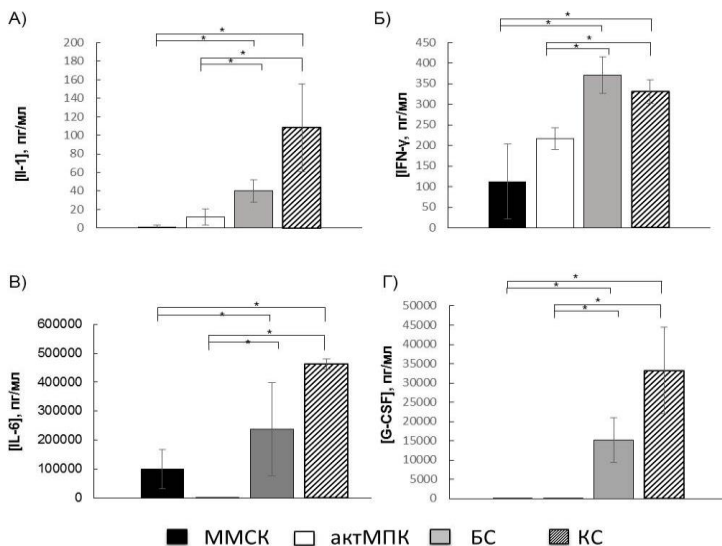


Рисунок 5. Увеличение секреции цитокинов в сокультурах MMCK и актМПК. А) – концентрация IL-1, Б) – концентрация IFN-γ, В) – концентрация IL-6, Г) – концентрация G-CSF. BC – бесконтактное сокультивирование, KC – контактное сокультивирование. Показаны средние величины и их ошибки из 3 независимых экспериментов. Звездочка показывает достоверность отличий при $P < 0.05$.

Мы впервые показали, что эффект подавления пролиферации актМПК в присутствии MMCK опровергается изменением соотношений некоторых цитокинов. Полученные данные показали, что в условиях совместного культивирования MMCK и актМПК в измеряемых образцах значительно увеличиваются концентрации IL-1, IL-6, IFN-γ, G-CSF (рисунок 5). Сокультивирование MMCK и актМПК как в контактных, так и бесконтактных условиях приводило также к увеличению концентраций IL-5, IL-10, IL-13 и MIP-1b, относительно супернатантов отдельных культур MMCK. Однако относительно супернатантов отдельных культур актМПК концентрации цитокинов IL-5, IL-10, IL-13 уменьшались (рисунок 6). Концентрации MIP-1b уменьшалась относительно отдельной культуры актМПК только в условиях контактного сокультивирования.

Значимых изменений в концентрациях остальных цитокинов при сокультивировании выявлено не было. Впервые было обнаружено, что в

регуляция синтеза IL-1, IL-6, G-CSF и MIP-1b зависит от образования адгезионных контактов между ММСК и актМПК (рисунок 5, а, в, г и рисунок 6, г).

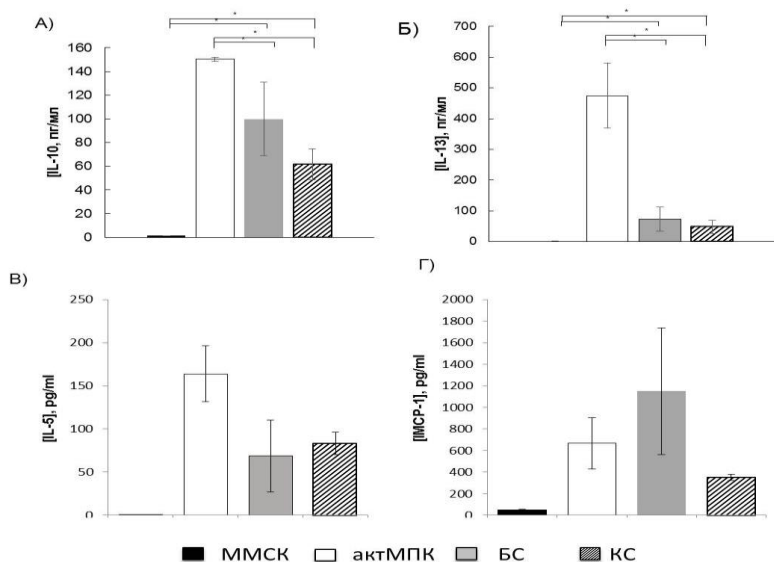


Рисунок 6. Уменьшение относительного содержания цитокинов в супернатантах ММСК и актМПК при сокультивировании. А) – концентрация IL-10, Б) – концентрация IL-13, В) – концентрация IL-5, Г) – концентрация MCP-1. БС – бесконтактное сокультивирование, КС – контактное сокультивирование. Показаны средние величины и их ошибки из 3 независимых экспериментов. Звездочка показывает достоверность отличий при $P < 0.05$.

Полученные результаты свидетельствует о способности ММСК осуществлять динамическое модулирование цитокинового микроокружения в зависимости от поступающих извне сигналов и участвовать в регуляции синтеза этих молекул актМПК. Теоретическая значимость такого эксперимента заключается в обосновании использования IL-1, IL-6, IFN- γ , G-CSF для прекондиционирования ММСК перед трансплантацией для усиления их иммуномодуляторных свойств.

Участие медиаторов воспаления индол-2,3-диоксиназы (IDO), индуцируемой NO-синтазы (iNOS), циклооксигеназы-2 (COX-2) в механизмах подавления пролиферации актМПК, опосредуемых ММСК.

Среди потенциальных растворимых факторов, выделяемых в очаге воспаления и участвующих в механизмах иммуносупрессии, могут быть также

такие медиаторы воспаления, как COX-2, IDO и iNOS. Для выяснения участия этих факторов в механизмах подавления пролиферации актМПК мы произвели анализ экспрессии этих факторов в ММСК. Оценку уровня экспрессии генов IDO, iNOS, COX-2 в ММСК проводили с помощью ПЦР в реальном времени.

Мы показали, что ММСК интактных культур конститутивно экспрессируют фермент COX-2. В сокультуре уровень экспрессии этого фермента в ММСК возрастал прямопропорционально количеству актМПК и не зависел от наличия или отсутствия контактов между этими клетками (рисунок 7, б.). Таким образом, конститутивная продукция значительных количеств COX-2/PGE2, IL-6, IL-8, IFN- γ , MCP-1 интактными культивируемыми ММСК позволило нам сделать вывод об обладании ими исходно провоспалительным фенотипом, что косвенно подтверждается результатами других исследователей (Chen K. et al., 2010, Kim O.H. et al., 2019, Zhang Z. et al., 2019).

В наших условиях ММСК в интактной культуре не экспрессировали IDO. Индукция экспрессии гена IDO в ММСК происходила как при контактном, так и бесконтактном сокультивировании с актМПК. Эти данные указывают на то, что воздействие провоспалительных стимулов вызывают в ММСК фенотипические изменения, выражающиеся в индукции синтеза IDO (рисунок 7, в). (Rubtsov Y. et al., 2017, Suzdaltseva Y. G. et al., 2018). 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 при бесконтактном сокультивировании с актМПК прямопропорционально зависел от соотношения клеток в сокультуре. Уровень экспрессии IDO в ММСК был существенно более высоким при контактном сокультивировании с актМПК по сравнению с бесконтактным и не зависел от количества актМПК (рисунок 7, а). Этот факт дает основания предполагать, что контактные взаимодействия между ММСК жировой ткани и актМПК могут играть важную роль 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.

В наших экспериментальных условиях ММСК, культивируемые в стандартных условиях, не экспрессировали iNOS. Сокультивирование с актМПК также не приводило к индукции экспрессии гена iNOS в ММСК (рисунок 7, в) (Rubtsov Y. et al., 2017).

Регуляция синтеза IDO, COX-2 и iNOS в клетках связана с активацией сигнальных каскадов IFN- γ и TNF- α . Связывание IFN- γ со своим рецептором индуцирует синтез регуляторного фактора интерферона IRF-1, являющегося критическим в регуляции синтеза IDO. Связывание TNF- α со своим рецептором приводит к активации сигнального пути транскрипционного фактора NF κ B, который регулирует экспрессию более 400 генов, в том числе iNOS и COX-2.

Мы показали, что в условиях сокультивирования в супернатантах возрастает концентрация IFN- γ , что в совокупности с индукцией IDO в ММСК указывает на участие сигнального каскада IFN- γ в индукции функциональной активности ММСК. В то же время мы не выявили значимых изменений концентраций TNF- α в тех же условиях, что в совокупности с отсутствием индукции экспрессии iNOS в ММСК указывает на то, что в наших условиях сигнальный каскад TNF- α в индукции функциональной активности свойств ММСК не задействован.

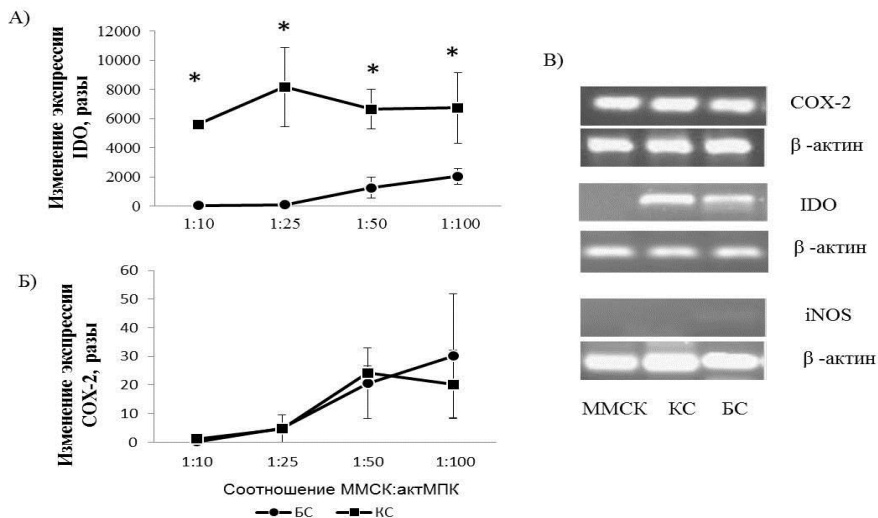


Рисунок 7. Изменение экспрессии ферментов COX-2, IDO и iNOS в ММСК при сокультивировании с актМПК. А) – относительное изменение экспрессии гена IDO. ПЦР в реальном времени. Представлены средние величины и их ошибки из 3 независимых экспериментов. Б) – относительное изменение экспрессии гена COX-2. ПЦР в реальном времени. Представлены средние величины и их ошибки из 3 независимых экспериментов. * показывает достоверность отличий при $P < 0,05$. В) – репрезентативная электрофореграмма продуктов ПЦР. БС – бесконтактное сокультивирование, КС – контактное сокультивирование.

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

Как было отмечено ранее подавление пролиферации актМПК осуществляется в основном посредством растворимых факторов, выделяемых ММСК в ответ на провоспалительное микроокружение. Однако межклеточные контакты также могут вносить определенный вклад в этот эффект. Для установления роли межклеточных контактов в проявлении эффекта подавления пролиферации актМПК мы проанализировали субпопуляции активированных и

интактных МПК, способных образовывать плотные межклеточные контакты с ММСК в условиях контактного сокультивирования (рисунок 8, а).

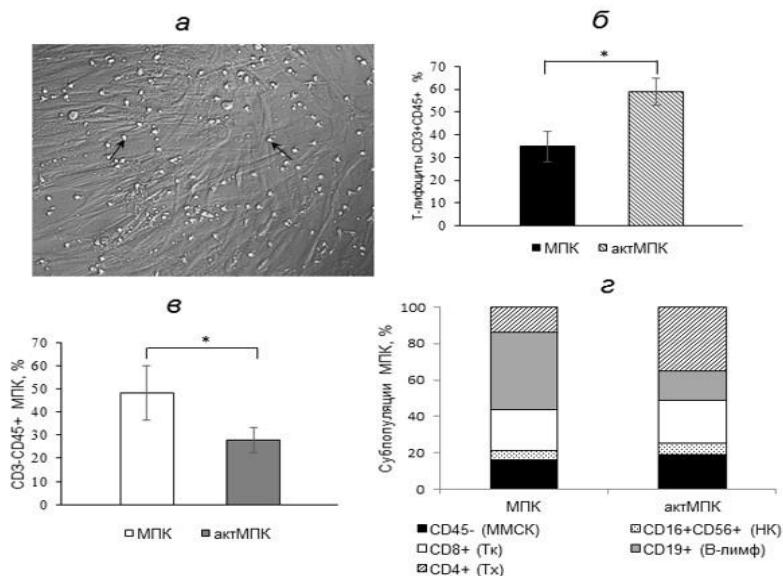


Рисунок 8. Активация МПК способствует усилению их способности образовывать контакты с ММСК. а -- фотография культуры ММСК после сокультивирования с актМПК; стрелками указаны МПК, образовавшие плотные контакты с ММСК; б – доля CD3+ Т-лимфоцитов, связавшихся с ММСК в % от общего количества CD45+ МПК; в -- 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 (* $p < 0,05$).

С помощью иммуноцитотипического анализа было показано, что в условиях эксперимента среди клеток субпопуляции CD45+CD3- (не Т-лимфоцитов) способность образовывать межклеточные контакты с ММСК при активации ФГА снижалась (рисунок 8, в). В тоже время активация МПК приводила к увеличению доли Т-лимфоцитов (CD45+CD3+), связавшихся с ММСК (рисунок 8, б). 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 8, г).

Таким образом, мы установили, что именно контактные взаимодействия между активированными CD4+Т-лимфоцитами и ММСК являются важным

условием для индукции функциональной активности ММСК (Suzdaltseva Y. G. et al., 2018).

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

Основными белками, участвующими в образовании межклеточных контактов, являются молекулы адгезии. Другим механизмом образования межклеточных контактов является взаимодействие рецепторных пар.

Для того, чтобы установить молекулы адгезии, участвующие в образовании межклеточных контактов между ММСК и актМПК при сокультивировании в контактных условиях, мы исследовали уровень экспрессии генов ICAM-1, VCAM, PECAM, N-кадгерина, Т-кадгерина, Р-кадгерина, Е-селектина, Р-селектина, L-селектина в каждом из указанных типов клеток отдельно.

Проведенный нами анализ мРНК показал, что единственной молекулой, уровень экспрессии которой возрастал и в ММСК, и в актМПК при сокультивировании, была ICAM-1 (рисунок 9, а). С помощью проточной цитометрии было показано, что экспонирование ICAM-1 на поверхности мембраны ММСК драматически увеличивалось именно в условиях контактного сокультивирования с актМПК (рисунок 9, б). Уровень экспрессии ICAM-1 возрастал также и в актМПК. Однако это происходило в основном в CD4-субпопуляциях МПК (рисунок 9, в). Уровень экспрессии ICAM-1 в субпопуляции CD4+Т-лимфоцитов оставался стабильным. Этот факт указывает на то, что в установлении межклеточных контактов между CD4+ Т-лимфоцитами и ММСК участвуют именно ICAM-1, экспрессирующийся на поверхности ММСК (Suzdaltseva Y.G. et al., 2018).

Рецептором для ICAM-1 служит молекула LFA-1, которая экспрессирована на поверхности CD4+ Т-лимфоцитов. Ранее на других клеточных моделях было показано, что взаимодействие рецепторной пары Т-клеточный LFA1 и ICAM1 играет важную роль в усилении синтеза IFN- γ в МПК (Bleijs D.A. et al., 1999; Yoshida A. et al., 2002).

Для того, чтобы проверить, участвует ли ICAM-1 в регуляции подавления пролиферации актМПК, мы заблокировали ICAM-1, экспрессированный на поверхности ММСК и актМПК с помощью специфических антител. Однако было обнаружено, что антителоопосредованное блокирование ICAM-1 не влияет на уровень IDO в ММСК при сокультивировании с актМПК как на транскрипционном, так и на белковом уровнях. Таким образом, мы показали, что взаимодействие молекул межклеточной адгезии не участвует в механизмах регуляции функциональной активности ММСК (Rubtsov Y. et al., 2017).

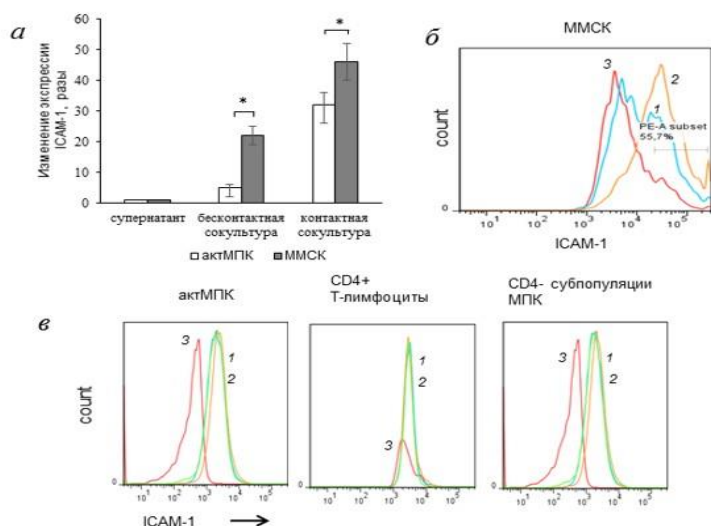


Рисунок 9. Изменение уровня экспрессии ICAM-1 в ММСК и актМПК при их совместном культивировании. а – относительные изменения уровня экспрессии гена ICAM-1 в ММСК и актМПК; представлены средние величины и их ошибки из 3 независимых экспериментов (*P < 0.05). б -- поверхностный маркер ICAM-1 на ММСК при 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.

Далее мы проверили другие молекулы, экспрессирующиеся на поверхности CD4+ Т-лимфоцитов, также могут участвовать в процессе установления межклеточных контактов с ММСК за счет взаимодействия рецепторных пар. Мы показали, что при сокультивировании с актМПК в ММСК индуцируется синтез коstimуляторных молекул CD80/CD86 и молекулы HLA-DR, характерных для дендритных клеток (рисунок 10) (Suzdaltseva Y.G., 2018).

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. 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 . 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 (рисунок 11).

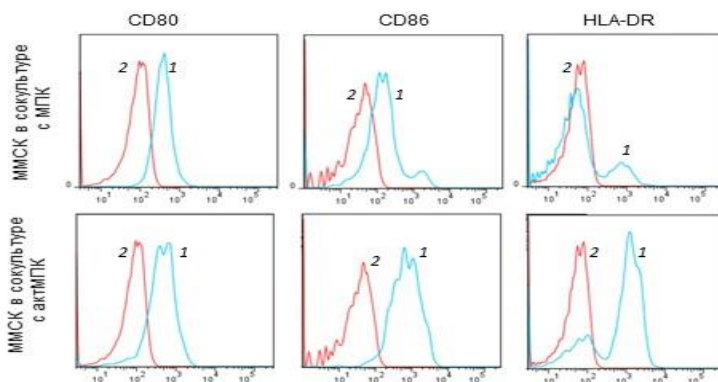


Рисунок 10. Экспрессии поверхностных костимуляторных молекул CD80/CD86 и HLA-DR в ММСК жировой (кривые 1) ткани при сокультивировании с интактными МПК и актМПК в течение 48 ч. Проточная цитометрия. Кривые 2 - изотипический контроль.

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

Эксперименты *in vitro*, проведенные нами, показали, что ММСК, обладают множественными паракринными и выраженными иммуномодулирующими свойствами, позволяющими им осуществлять регуляцию воспалительных процессов. Эти свойства ММСК делают их весьма перспективными объектами для создания лекарственных препаратов и обосновывают их применение при заболеваниях, связанных с нарушением течения воспалительных процессов (например, при хронических ранах) для стимуляции регенеративных процессов. Мы предложили использовать для лечения хронических ран ММСК, выделенные из пуповины, поскольку этот источник не вызывает морально-этических возражений, т. к. пуповина забирается после нормальных родов. В наших условиях полученные ММСК пуповины обладали более высокой пролиферативной активностью и замедленным старением в культуре. ММСК пуповины новорожденного также выгодно отличались от ММСК взрослого человека относительно высоким содержанием прогениторных клеток, экспрессирующих нестин и CD117. Полученные ММСК пуповины были также проверены на инфекционную безопасность.

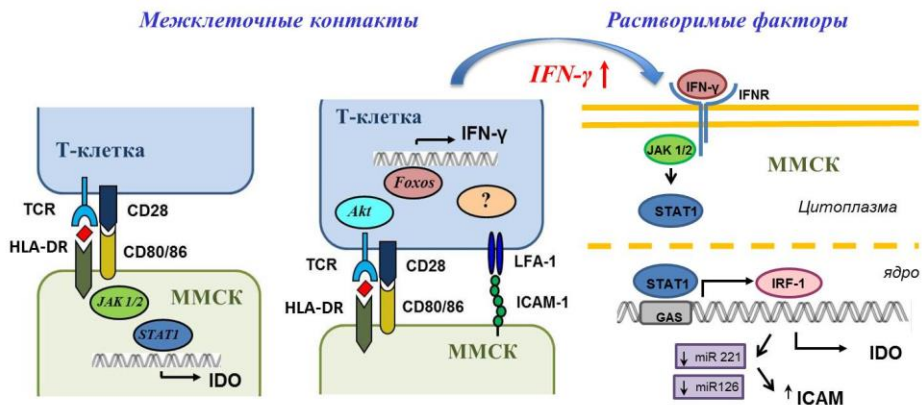


Рисунок 11. Перекрестная регуляция экспрессии IDO при взаимодействии с активированными CD4⁺ Т-лимфоцитами. Взаимодействие рецепторных пар HLA-DR и костимуляторных молекул CD80/CD86 на MMCK и Т-клеточных рецепторов (TCR) и CTLA4/CD28 на Т-лимфоцитах вызывают индукцию синтеза и функциональной активности IDO в MCK. Связывание рецепторной пары ICAM-1 на MMCK 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 MMCK.

Перед проведением клинических исследований с участием человека были проведены необходимые доклинические исследования безопасности и эффективности препарата MMCK 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, которые показали, что введение препарата MMCK не вызывало у подопытных животных интоксикацию и гибель, не оказывало мутагенного, иммуноотоксического, эмбриотоксического и тератогенного действия, и не влияло на репродуктивные функции. На модели полнослойных кожных ран крыс пострепродуктивного периода было также установлено положительное влияние препарата MMCK на динамику изменения площадей ран, подтверждаемых данными гистологического исследования, в которых было установлено, увеличение длины и количества слоев новообразованного эпидермиса в опытной группе по сравнению с контрольной (Silina E. V. et al., 2021, Silina E. et al., 2021). Было установлено также отсутствие aberrантных процессов при заживлении ран после введения MMCK. На основании результатов проведенных доклинических

исследований было сделано заключение о возможности использования препарата ММСК пуповины в клинических исследованиях с участием человека.

В первой фазе клинического исследования, одобренного этическим комитетом РНИМУ им. Н.И. Пирогова, оценивали безопасность подкожного введения суспензии ММСК пуповины у 30 здоровых добровольцев 30-60 лет. 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).

Во второй фазе клинические исследования были проведены по протоколу открытого пилотного исследования эффективности и безопасности клеточной терапии ММСК. 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, включающая лекарственные (антиоксиданты, ангиопротекторы, адекватное обезболивание), оперативные и инструментальные методы, не приводила к положительной динамике заживления ран в соответствии со шкалой BWAT (Bates-Jensen Wound Assessment Tool). 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. Средний возраст составил около 60 лет. 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.

Пациентам из группы клеточной терапии дополнительно к стандартному лечению осуществляли введение суспензии ММСК пуповины однократно периферии раневого дефекта (подкожно и внутримышечно), в дно раны (интрагрануляционно или внутримышечно).

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 2 и 4 недели от начала проведения инъекций.

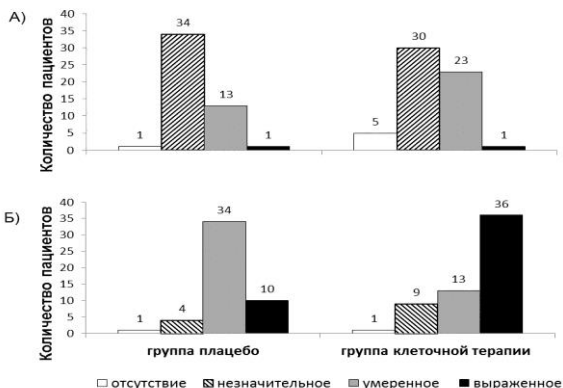


Рисунок 12.

Качественная характеристика грануляционной ткани в группе плацебо и группе клеточной терапии. А) – в начале наблюдения, Б) – через 15 дней. Звездочка показывает достоверность отличий, критерий X^2 , $p < 0,05$.

Грануляционная ткань до начала лечения в группе плацебо и в группе клеточной терапии была незначительно или умеренно выражена. Различия между группами по критерию X^2 недостоверны. 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 X^2 между группами достоверны, $p < 0,05$ (Рисунок 12).

Оценка уровня микроциркуляции крови в области хронических ран с помощью транскутанного измерения кислорода тканей (рисунок 13, а) 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, $p < 0,05$).

После проведенной терапии показатели базального уровня артериального систолического давления большеберцовой артерии, измеряемого с помощью лазерной доплеровской флоуметрии, изменялись незначительно в контрольной группе сравнения. В группе клеточной терапии объемная скорость кровотока увеличивалась в 1,84 раза по сравнению с начальными наблюдениями (рисунок 13, б).

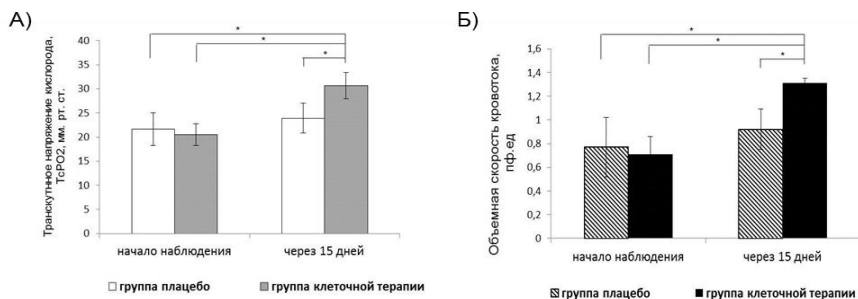


Рисунок 13. Динамика изменения параметров микроциркуляции крови в области хронических ран у пациентов. А) – изменение базального уровня транскутанного напряжения кислорода TcPO₂. Показаны средние величины и их ошибки измерений. Звездочка показывает достоверность отличий, критерию t, p<0,05. Б) – изменение показателей базального уровня артериального систолического давления большеберцовой артерии. Показаны средние величины и их ошибки измерений объемной скорости кровотока. Звездочка показывает достоверность отличий, UMW, p<0,05.

Мы также показали, что введение пуповины оказывало положительное влияние на динамику заживления ран у пациентов. Измерения проводили через 2 и 4 недели от начала проведения инъекций. До начала лечения средняя площадь ран группы плацебо и группы клеточной терапии была сопоставима. Различия между группами были статистически недостоверны. 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] см², а в группе клеточной терапии - Me=5,00 [6,07-11,8] см² (U-тест, p <0,05). В абсолютном выражении площадь ран в группе клеточной терапии составила Me =15,75[5,33 - 26,19] см², а в группе плацебо - Me = 27,60 2 [17,6 - 35,84] см². Различия между группами были статистически значимыми (U тест, p <0,01) (рисунок 14). Скорость заживления ран в двух группах также значительно отличались. В группе клеточной терапии в течении первых 15 дней скорость заживления ран составила 2,19 ± 1, 58% в день и 0,73 ± 1,2% в день в группе плацебо (U-тест, p <0,01). Пациентам с обширными ранами на образовавшуюся грануляционную ткань проводили аутодермопластику расщепленным лоскутом. Уменьшение площади ран, заживающих естественным образом, происходило как в результате краевой эпителизации, так и за счет контракции.

Через четыре недели после начала 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. Результаты заживления хронических ран были лучше у пациентов с синдромом диабетической стопы и язвами, вызванными многоуровневыми окклюзиями артерий малого калибра, которые не могли быть удалены хирургическим путем.

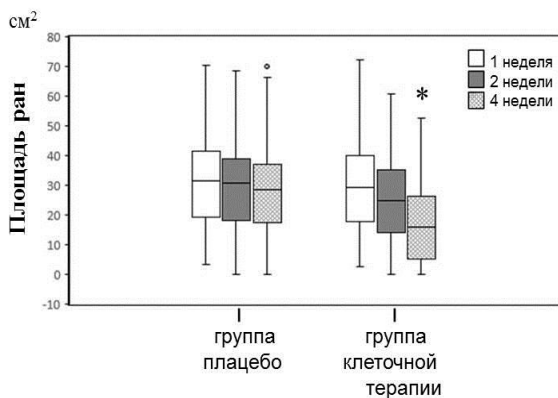


Рисунок 14. Динамика изменения площади ран у пациентов. Данные представлены как медиана, верхний и нижний квартили, максимальное и минимальное значение. Звездочка показывает достоверность отличий, U-тест, $p < 0,05$). Символ «o» обозначает выброс из выборки данных.

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.

Таким образом, мы показали, что введение ММСК пуповины пациентам с длительно незаживающими ранами дополнительно к стандартному лечению приводило к активизации регенеративных процессов в хроническом раневом дефекте и ускорению заживления ран. Введение ММСК вызывало активный

рост и созревание грануляционной ткани, создавая 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. Проведенные ограниченные клинические исследования показали, что применение суспензии ММСК пуповины для терапии хронических ран является эффективным и безопасным методом и служит обоснованием получения новых клеточных препаратов для практического здравоохранения (Регистрационное удостоверение Росздравнадзора № ФС-2006/341).

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

Известно, что регенеративный потенциал тканей снижается с возрастом. У взрослого человека заживление поврежденной ткани обычно сопровождается образованием рубца. Современные лекарственные средства, в том числе 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 в отличие от взрослых, у плодов до третьего триместра гестации заживление поврежденных тканей происходит с полной регенерацией (Colwell A.S. et al., 2003, Helmo F.R. et al., 2013, Erickson JR, Echeverri K., 2018, Gnyawali S.C. et al., 2020). Однако исследования молекулярных механизмов регенерации тканей на ранних стадиях развития человека затруднены по причине практического отсутствия материала для сопоставимых исследований.

В данной работе мы предприняли попытку создать клеточные модели ММСК, соответствующие разным стадиям развития организма из одного источника ИПСК. Мы использовали метод репрограммирования соматических клеток в плюрипотентные состояние, разработанный японскими исследователями Takahashi K. и Yamanaka S. (2006). Дифференцировка ИПСК в мезодермальном направлении позволяет воспроизвести процессы эмбриогенеза *in vitro* и предоставляет возможность получения клеток примитивной мезодермы и ММСК для исследования молекулярных механизмов регенерации фетальных тканей.

Для получения ИПСК культивируемые ММСК человека мы репрограммировали факторами Oct3/4, Sox2, Klf4, and c-Myc с использованием эквивалентного количества рекомбинантных вирусов Сендая в плюрипотентное состояние, сходное с эмбриональными клетками. Полученные ИПСК обладали характерной морфологией, экспрессировали поверхностные антигены (SSEA4, TRA-1-60/81), транскрипционные факторы (OCT4, NANOG, SOX2) и в культуре

эмбрионидных телец были способны к спонтанной дифференцировке в эктодермальном, энтодермальном и мезодермальном направлении (рисунок 15). Таким образом, полученные клетки обладали общепризнанными признаками, характерными для ИПСК (Takahashi K. et al., 2007, Lowry W.E. et al., 2008, Yu J. et al., 2007, Brambrink T. et al., 2008, Sun N. et al, 2009, Panova A.V. et al., 2020).

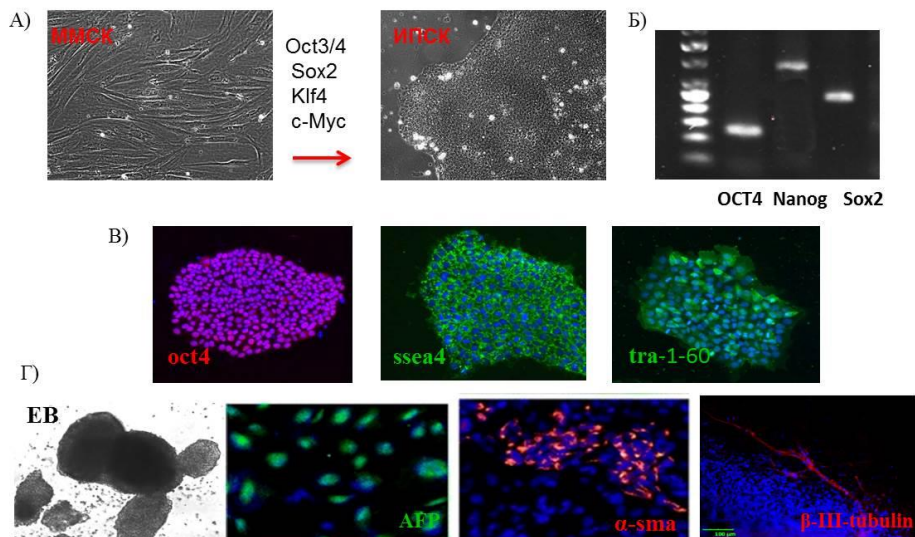


Рисунок 15. Характеристика ИПСК. А) - Морфология колоний ИПСК человека. Увеличение x200. Б) - Экспрессия маркеров плюрипотентности Oct4, Nanog, Sox2 в линиях ИПСК. Репрезентативная элект рофореграмма продуктов ПЦР. В) - Экспрессия транскрипционного фактора Oct4 (PE), гликолипида SSEA-4 (FITC) и протеогликана 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.

Затем полученные ИПСК под воздействием комбинаций ингибитора Rho киназы, активина А, факторов роста bFGF и BMP-4, биологически активных низкомолекулярных соединений LY294002 и SHR99021 были дифференцированы в клетки параксиальной мезодермы (рисунок 16, 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 16, 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 16, 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.

Далее посредством культивирования в стандартной среде клетки параксиальной мезодермы были дифференцированы в ММСК (ИПСК-ММСК). Через три недели культивирования клеток ранней мезодермы 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.

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.

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. Тем не менее эти гипотезы все еще ждут своего подтверждения.

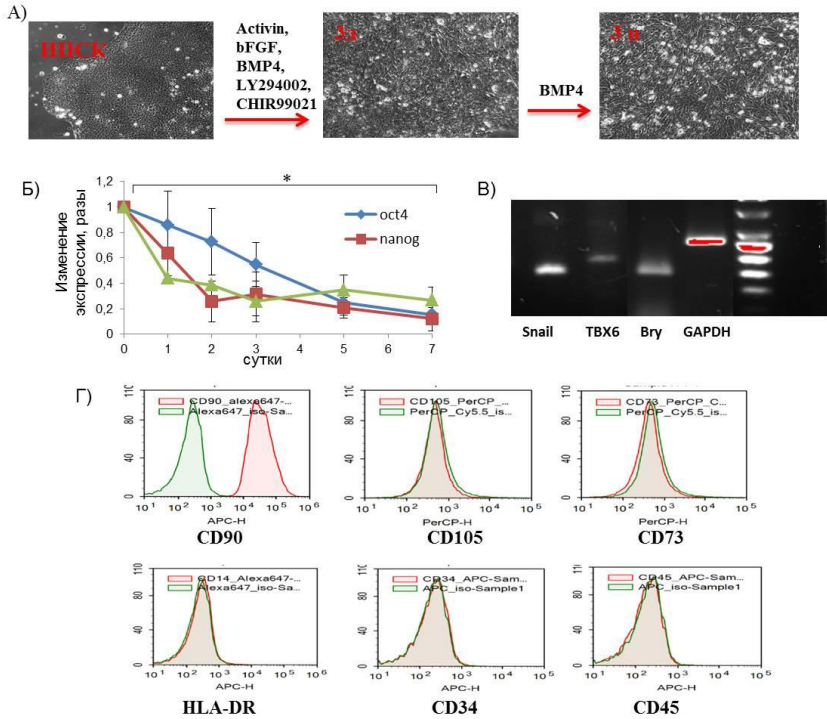


Рисунок 16. Дифференцировка ИПСК в клетки параaxиальной мезодермы. А) - Морфологические изменения ИПСК в процессе дифференцировки в клетки параaxиальной мезодермы. Увеличение x200. Б) – Изменение экспрессии маркеров плюрипотентности Oct4, Nanog, Sox2 в ИПСК в процессе дифференцировки в клетки параaxиальной мезодермы. Представлены средние величины и их ошибки из 3 независимых экспериментов, * 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 параaxиальной мезодермы, дифференцированных из ИПСК. Данные проточной цитометрии. Зеленым цветом выделен изотипический контроль; специфическое окрашивание на поверхностные маркеры выделены красным цветом. Д – дни, п – пассажи.

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* ММСК, выделенных из различных тканей человека, а также исследование молекулярных механизмов, участвующих в активации их функциональной активности, стало революционным шагом в этом направлении.

Именно поэтому высокочажными 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 иммунных клеток под действием ММСК, посредством установления межклеточных контактов через взаимодействие рецепторных пар CD80/CD86 и ICAM-1 на поверхности ММСК и CTLA4/CD28 и LFA1 на поверхности CD4+T-лимфоцитов (соответственно), образующих регуляторную петлю с обратной положительной связью, способствующей затуханию воспалительной реакции; доказательство способности ММСК модулировать цитокиновое микроокружение и смещать баланс в пользу регенерации; а также подтверждение эффективности препарата ММСК в лечении хронических ран в клинических исследованиях.

В перспективе, новые данные, полученные в данной работе, позволят отказаться от дорогостоящих технологий 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+Т-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 исходно 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 печатных работ, опубликованных по теме диссертации:

Статьи в журналах, соответствующих Перечню ВАК

1. **Suzdaltseva Y**, Zhidkih S, Kiselev SL, Stupin V. Locally Delivered Umbilical Cord Mesenchymal Stromal Cells Reduce Chronic Inflammation in Long-Term Nonhealing Wounds: A Randomized Study. *Stem Cells Int.* 2020 Feb 14;2020:5308609. doi: 10.1155/2020/5308609. eCollection 2020.
2. 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. <https://doi.org/10.3390/pathophysiology28030024>
3. **Suzdaltseva YuG**, Goryunov KV, Rubtsov YuP. 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. <https://link.springer.com/article/10.1134/S1990519X18050085>
4. 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. doi: 10.1155/2017/6516854. Epub 2017 Jun 27.
5. Silina EV, Stupin VA, **Suzdaltseva YG**, Aliev SR, Abramov IS, Khokhlov NV. 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 1;13(9):1467. doi: 10.3390/polym13091467.

6. **Suzdal'tseva YG**, Burunova VV, Petrakova NV, Vakhrushev IV, Yarygin KN, Yarygin VN. Comparative analysis of cytophenotypes of cells of mesenchymal lineage isolated from human tissues. *Bull Exp Biol Med.* 2007 Jan;143(1):147-54. doi: 10.1007/s10517-007-0037-7.
7. **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.* 2007 Jan;143(1):114-21. doi: 10.1007/s10517-007-0030-1.
8. **Suzdal'tseva YG**, Burunova VV, Vakhrushev IV, Cheglakov IB, Yarygin KN. In vitro comparison of immunological properties of cultured human mesenchymal cells from various sources. *Bull Exp Biol Med.* 2008 Feb;145(2):228-31. doi: 10.1007/s10517-008-0057-y.
9. Yarygin KN, **Suzdal'tseva YG**, Burunova VV, Voronov AV, Petrakova NV, Cheglakov IB, Stupin VA, Yarygin VN. Comparative study of adult human skin fibroblasts and umbilical fibroblast-like cells. *Bull Exp Biol Med.* 2006 Jan;141(1):161-6. doi: 10.1007/s10517-006-0117-0.
10. Lupatov AY, Karalkin PA, **Suzdal'tseva YG**, Burunova VV, Yarygin VN, Yarygin KN. Cytofluorometric analysis of phenotypes of human bone marrow and umbilical fibroblast-like cells. *Bull Exp Biol Med.* 2006 Oct;142(4):521-6. doi: 10.1007/s10517-006-0407-6.
11. Rubtsov YP, **Suzdal'tseva YG**, Goryunov KV, Kalinina NI, Sysoeva VY, Tkachuk VA. Regulation of Immunity via Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. *Acta Naturae.* 2012 Jan;4(1):23-31.
12. Burunova VV, **Suzdal'tseva YG**, Voronov AV, Cheglakov IB, Vakhrushev IV, Yarygin KN, Yarygin VN. Development and introduction of production standards for cell products of mesenchymal origin. *Bull Exp Biol Med.* 2008 Apr;145(4):526-30. doi: 10.1007/s10517-008-0133-3.
13. Manturova NE, Smirnova GO, Silina EV, **Suzdal'tseva YG**, Stupin VA 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.
14. Vakhrushev IV, **Suzdal'tseva YG**, Burunova VV, Karalkin PA, Lupatov AY, Yarygin KN. Mesenchymal cells of the decidua tooth pulp: cytophenotype and initial evaluation of possibility of their use in bone tissue engineering. *Bull Exp Biol Med.* 2010 Jul;149(1):161-6. doi: 10.1007/s10517-010-0897-0.
15. Usovetskii IA, Burunova VV, Kovtun NE, **Suzdal'tseva YG**, Krasil'nikova YB, Korotkii NG, Yarygin KN. Preparation of mixed keratinocyte and melanocyte cultures from biopsy specimens of pigmented skin sites of patients with vitiligo. *Bull Exp Biol Med.* 2009 Jul;148(1):103-5. doi: 10.1007/s10517-009-0646-4.
16. Lemieux P, Vinogradov SV, Gebhart CL, Guérin N, Paradis G, Nguyen HK, Ochietti B, **Suzdal'tseva YG**, Bartakova EV, Bronich TK, St-Pierre Y, Alakhov VY, Kabanov AV. Block and graft copolymers and NanoGel copolymer networks for DNA

delivery into cell. *J Drug Target.* 2000;8(2):91-105. doi: 10.3109/10611860008996855.

17. 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. С. 494-499.

18. Kabanov AV, Vinogradov SV, **Suzdaltseva YG**, Alakhov VYu. Water-soluble block polycations as carriers for oligonucleotide delivery. *Bioconjug Chem.* 1995 Nov-Dec;6(6):639-43. doi: 10.1021/bc00036a001

19. Vinogradov SV, **Suzdaltseva Y**, Alakhov VYu, Kabanov AV. Inhibition of herpes simplex virus 1 reproduction with hydrophobized antisense oligonucleotides. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994 Sep 15;203(2):959-66. doi: 10.1006/bbrc.1994.2275

20. Vinogradov SV, **Suzdaltseva YG**, Kabanov AV. Block polycationic oligonucleotide derivative: synthesis and inhibition of herpes virus reproduction. *Bioconjug Chem.* 1996 Jan-Feb;7(1):3-6. doi: 10.1021/bc9500913.

Патенты:

1. Способ оценки иммуносупрессивных свойств мезенхимальных стромальных клеток человека. Авторы: Рубцов Ю.П., Ткачук В.А., Суздальцева Ю.Г., Горюнов К.В. Патент на изобретение #RU 2539750, 27 января 2015. Заявка № 2012146826/10 от 02.11.2012.

2. Способ повышения иммуносупрессивных свойств мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани. Авторы: Ткачук В.А., Суздальцева Ю.Г., Рубцов Ю.П., Горюнов К.В. Патент на изобретение RU 2526575 С2, 27.08.2014. Заявка № 2012146826/10 от 02.11.2012.

Главы в книгах и сборниках:

1. 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

2. 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 большим 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.

3. 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.
4. 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

Тезисы докладов на научных конференциях:

1. Yu.G. Suzdaltseva, S.V. Vinogradov. Inhibition of herpes simplex virus 1 reproduction with policomplexes. Abstract in 24th meeting of FEBS, Barcelona, Spain, 1996.
2. Н.В.Петракова, В.В.Бурунова, Ю.Г.Суздальцева, А.В.Воронов, К.Н.Ярыгин. Изучение уровня экспрессии нестина и фактора фон Виллибранда в первичной культуре клеток пуповины человека. Тезисы конференции «Биология стволовых клеток: фундаментальные аспекты», Москва, 17-18 ноября 2005 г., Москва, стр.57-58.
3. Ю.Г.Суздальцева, Н.В.Петракова, В.В.Бурунова, А.В.Воронов, К.Н.Ярыгин. Исследование фенотипа и способности к дифференцировке культур клеток постнатальных органов и тканей. Тезисы конференции «Биология стволовых клеток: фундаментальные аспекты», Москва, 17-18 ноября 2005 г., стр.66-67.
4. Ю.Г.Суздальцева, Н.В.Петракова, В.В.Бурунова, К.Н.Ярыгин. Экспериментальная оценка перспектив клинического применения культур постнатальных клеток человека мезенхимального ряда. Сборник тезисов и докладов 5 международного конгресса Cosmetik Expo, Москва, 8-11 февраля 2006 г., стр. 143-150.
5. В.В.Бурунова, Ю.Г.Суздальцева, Н.В.Петракова, Р.Г. Салимов, Т.К. Платонова, М.Ю. Серебряков, А.В. Воронов, К.Н. Ярыгин. Разработка методов получения культур клеток постнатальных органов и тканей человека, условий хранения, транспортировки и паспортизация клеточного материала. Сборник тезисов и докладов 5 международного конгресса Cosmetik Expo, Москва, 8-11 февраля 2006 г., стр. 150-153.
6. Ю.Г.Суздальцева, В.В.Бурунова, А.Ю. Лупатов, И.В. Вахрушев, П.А. Каралкин, К.Н. Ярыгин. Сравнительный анализ фенотипов и способности к дифференцировке клеток мезенхимального ряда, изолированных из тканей

человека. Материалы конференции «Стволовые клетки и перспектива их использования в здравоохранении, Москва, 24-25 мая 2006 г, стр.27-29.

7. В.В.Бурунова, Ю.Г.Суздальцева, А.В.Воронов, К.Н.Ярыгин. Проблемы стандартизации и безопасности при работе с культурами человеческих клеток. Материалы конференции «Стволовые клетки и перспектива их использования в здравоохранении, Москва, 24-25 мая 2006 г, стр. 64-65.

8. В.Н. Ярыгин, Ю.Г. Суздальцева, В.В. Бурунова, И.Б. Чеглаков, Р.В. Холоденко, И.В. Холоденко, А.Ю. Лупатов, И.В. Вахрушев, П.А. Каралкин, К.Н. Ярыгин. Сравнительная характеристика культивируемых человеческих клеток мезенхимального ряда, выделенных из разных источников. Тезисы докладов и сообщений Всероссийского симпозиума "Биология клетки в культуре", Санкт-Петербург, 17-19 октября 2006 г. Цитология, 2006, т. 48, №9, стр. 817-818.

9. В.В. Бурунова, Ю.Г. Суздальцева, А.В. Воронов, К.Н. Ярыгин. Проблемы безопасности при работе с культурами клеток человека. Тезисы докладов и сообщений Всероссийского симпозиума "Биология клетки в культуре", Санкт-Петербург, 17-19 октября 2006 г. Цитология, 2006, т. 48, №9, стр. 748-749.

10. В.Н. Ярыгин, К.Н. Ярыгин, В.А. Ступин, Ю.Г. Суздальцева, В.В. Бурунова, В.И. Пар, О.О. Носова, Г.О.Смирнова, Н.Е. Мантурова, Г.В. Топчиева. Клеточные технологии в коррекции возрастных изменений лица. Kosmetic international, 2006, №1, стр. 8-16.

11. Y. G. Suzdaltseva, V. V. Burunova, I.V. Vakhrushev, K. N. Yarygin. Comparison of cytophenotypes and differentiation ability of mesenchymal cells isolated from human postnatal tissues. Standardization and safety of stem-cell-based preparations. British-Russian Workshop in association with the European Commission. Stem cell: policy, research, and innovations. European Union – Russian Federation Perspectives. 15-16 march, 2007, p.43-44.

12. I. V. Vakhrushev, Y. G. Suzdaltseva, V. V. Burunova, K. N. Yarygin. Comparison of cytophenotypic profiles of mesenchymal cells isolated from various human tissues. British-Russian Workshop in association with the European Commission. Stem cell: policy, research, and innovations. European Union – Russian Federation Perspectives. 15-16 march, 2007, p. 7-8.

13. Ю.Г.Суздальцева, В.В.Бурунова, И.В. Вахрушев, И.Б. Чеглаков, К.Н. Ярыгин. Сравнительный анализ цитофенотипов, способности к дифференцировке и иммунологические свойства клеток мезенхимального ряда в культурах постнатальных органов и тканей человека. Тезисы конференции «Стволовые клетки и перспектива их использования в здравоохранении», Москва, РГМУ, 30-31 мая 2007 г., стр. 59-61.

14. В.В.Бурунова, Ю.Г.Суздальцева, А.В. Воронов, И.В. Вахрушев, К.Н. Ярыгин, Ярыгин В.Н. Внедрение производственных стандартов для клеточных материалов мезенхимального происхождения. Тезисы конференции «Стволовые

клетки и перспектива их использования в здравоохранении», Москва, РГМУ, 30-31 мая 2007 г., стр. 62.

15. А.Ю. Лупатов, П.А. Каралкин, Ю.Г.Суздальцева, В.В.Бурунова, В.Н. Ярыгин, К.Н. Ярыгин. Дифференциальный профиль поверхностных маркеров мезенхимальных стволовых клеток и фибробластов кожи человека. Тезисы конференции «Стволовые клетки и перспектива их использования в здравоохранении», Москва, РГМУ, 30-31 мая 2007 г., стр. 67

16. Вахрушев И.В., Суздальцева Ю.Г., Ярыгин К.Н. Использование постнатальных мезенхимальных стволовых клеток человека, иммобилизованных на синтетическом трёхмерном биodeградируемом матриксе, для инженерии костной ткани *in vitro*. Вестник российской академии медицинских наук, 2008, №6 стр. 84. Тезисы V Конференции молодых ученых России с международным участием «Фундаментальные науки и прогресс клинической медицины», Москва, 19-22 мая 2008 г.

17. Ларионова А.В., Суздальцева Ю.Г., Ярыгин К.Н, Ярыгин В.Н. Подбор клеточного материала для иммобилизации на биodeградируемые трехмерные матрицы с последующим использованием в инженерии хрящевой ткани. Тезисы конференции «Стволовые клетки и перспектива их использования в здравоохранении», Москва, 29 мая 2008 г., стр. 37.

18. Вахрушев И.В., Суздальцева Ю.Г., Ярыгин К.Н. Сравнительный анализ цитофенотипов и способности к дифференцировке мезенхимальных стволовых клеток костного мозга и пульпы зуба человека. Тезисы конференции «Стволовые клетки и перспектива их использования в здравоохранении», Москва, 29 мая 2008 г., стр. 9.

19. Суздальцева Ю.Г., Вахрушев И.В., Ярыгин К.Н. Пульпа зуба - источник постнатальных аутологичных мезенхимальных стволовых клеток. Тезисы всероссийской школы-конференции «Аутологичные стволовые и прогениторные клетки: экспериментальные и клинические достижения», Москва, ФФМ МГУ им. М.В. Ломоносова, 9-11 июня 2008 г., стр. 53.

20. Суздальцева Ю.Г., Ларионова А.В., Ярыгин К.Н, Ярыгин В.Н. Использование мезенхимальных стволовых клеток костного мозга и хондроцитов мыши для тканевой инженерии хрящевой ткани *in vitro*. Тезисы всероссийской школы-конференции «Аутологичные стволовые и прогениторные клетки: экспериментальные и клинические достижения», Москва, ФФМ МГУ им. М.В. Ломоносова, 9-11 июня 2008 г., стр. 54.

21. Жидких С.Ю., Суздальцева Ю.Г., Горюнов С.В., Пар В.И., Жидких Н.В., Привиденцев А.И., Ульянина А.А., Ступин В.А., Ярыгин К.Н. Возможности точечной терапии в лечении синдрома диабетической стопы. Тезисы докладов 4-го всероссийского съезда трансплантологов памяти ак. В.И. Шумакова, Москва, НИИ трансплантологии и искусственных органов, 9-10 ноября 2008, стр. 246-247.

22. Суздальцева Ю.Г., Чеглаков И.Б., Воронов А.В., Ярыгин К.Н. Клетки мезенхимального происхождения и аллогенные иммунокомпетентные клетки человека проявляют торерантность по отношению друг к другу в экспериментах *in vitro*. Тезисы докладов 4-го всероссийского съезда трансплантологов памяти ак. В.И. Шумакова, Москва, НИИ трансплантологии и искусственных органов, 9-10 ноября 2008, стр. 275-276.
23. Суздальцева Ю.Г., Жидких С.Ю., Пар В.И., Бурунова В.В., Горюнов С.В., Смирнова Г.О., Жидких Н.В., Воронов А.В., Ступин В.А., Ярыгин К.Н. Применение культивируемых мезенхимальных клеток, выделенных из пуповины, для лечения длительно незаживающих ран. Тезисы докладов 4-го всероссийского съезда трансплантологов памяти ак. В.И. Шумакова, Москва, НИИ трансплантологии и искусственных органов, 9-10 ноября 2008, стр. 276-277.
24. Ромащенко А.Д., Суздальцева Ю.Г., Кальсин В.А., Ковалев А.В. Использование мезенхимальных стволовых клеток костного мозга при атрофии зрительного нерва и пигментной дегенерации сетчатки. Сборник тезисов всероссийской научной школы-конференции «Аутологичные стволовые клетки: Экспериментальные и клинические исследования», 21-26 сентября 2009 г., стр.58-59.
25. Жидких С.Ю., Горюнов С.В., Суздальцева Ю.Г., Пар В.И., Жидких Н.В., Привиденцев А.И., Ступин В.А., Ярыгин К.Н. Клеточная терапия в лечении синдрома диабетической стопы. Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии: Сборник тезисов четвертого всероссийского симпозиума с международным участием: / Под редакцией: акад. РАН и РАМН С.П. Миронова – СПб.: Изд-во «Человек и его здоровье», 2010, стр. 256-257.
26. Жидких С.Ю., Суздальцева Ю.Г., Пар В.И., Бурунова В.В., Горюнов С.В., Смирнова Г.О., Жидких Н.В., Воронов А.В., Ступин В.А., Ярыгин К.Н. Влияние культивированных мезенхимальных стромальных клеток на репарацию хронических ран. Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии: Сборник тезисов четвертого всероссийского симпозиума с международным участием: / Под редакцией: акад. РАН и РАМН С.П. Миронова – СПб.: Изд-во «Человек и его здоровье», 2010. стр. 257-258.
27. Суздальцева Ю. Г., Чеглаков И.Б., Воронов А.В, Ярыгин К.Н. Взаимодействие клеток мезенхимального происхождения и аллогенных иммунокомпетентных клеток человека в экспериментах *in vitro*. Стволовые клетки и регенеративная медицина: сборник тезисов всероссийской научной школы-конференции, Москва, 2010, стр. 76-77.
28. Суздальцева Ю.Г., Рубцов Ю.П., Горюнов К.В., Ткачук В.А. Влияние мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани на активацию лимфоцитов периферической крови *in vitro*. Стволовые клетки и регенеративная медицина: сборник тезисов всероссийской научной школы-конференции, Москва, 2011, стр. 73-74.

29. Карагяур М.Н., Лопатина Т.В., Ткачук В.А., Суздальцева Ю.Г., Калинина Н.И., Стамбольский Д.В. Стимуляция посттравматического восстановления периферического нерва мезенхимальными стволовыми клетками опосредована продукцией нейротрофических факторов. Научные труды III конференции "Биология Стволовых Клеток: Фундаментальные аспекты", посвященная памяти академика Н.Г.Хрущова, Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Россия, 6-8 июня, 2011, стр.26
30. Семина Е.В., Карагяур М.Н., Сысоева В.Ю., Рубина К.А., Стамбольский Д.В., Суздальцева Ю.Г., Калинина Н.И., Ткачук В.А. Изучение влияния генно-терпевтического препарата на основе нейротрофического фактора роста BDNF на восстановление периферической иннервации. 2-я Международная Школа «Наноматериалы и нанотехнологии в живых системах», Россия, Моск.обл., Россия, 2011, стр.99
31. Suzdaltseva Y.G., Goryunov K.V., Rubtsov Y.P., Tkachuck V.A. Differential involvement of IFN- γ and TNF- α in immunosuppression mediated by human adipose-derived mesenchymal stem cells. ISSCR 10th Annual Meeting, Yokohama, Japan, 13-16 June, 2012, Poster session abstracts, V.2, p. 178.
32. Suzdaltseva Y.G., Goryunov K.V., Rubtsov Y.P., Tkachuck V.A. Immunosuppression mediated by human adipose derived MSC involves a cell contact-dependent mechanism. ISSCR 11th Annual Meeting, Boston, USA, 12-15 June, 2013, Poster session abstracts, V.1, p. 132.
33. Жидких С.Ю., Горюнов С.В., Суздальцева Ю.Г., Жидких Н.В., Привиденцев А.И., Абрамов И.С., Ярыгин К.Н., Ступин В.А. Мезенхимальные стволовые клетки пуповины человека в лечении хронических ран. Сборник тезисов I Национального конгресса по регенеративной медицине, ФГБУ НЦ АГ и П им. Кулакова, Москва, Россия, 4-6 декабря 2013, стр. 24
34. Горюнов К.В., Романов А.Ю., Суздальцева Ю.Г., Рубцов Ю.П., Ткачук В.А. Молекулярные механизмы, отвечающие за переход мезенхимных стромальных клеток человека из иммуностимулирующего в иммуносупрессирующее состояние. Научные труды IV Съезда Физиологов СНГ, Сочи-Дагомыс, Россия, 8-12 октября 2014, М: Медицина-Здоровье, тезисы, с. 149.
35. Суздальцева Ю.Г., Горюнов К.В., Рубцов Ю.П., Ткачук В.А. Роль межклеточных контактов в индукции синтеза IDO в ММСК жировой ткани. Материалы 2 национального конгресса по регенеративной медицине. ФГБУ НЦ АГ и П им. Кулакова, Москва, Россия, 3-5 декабря 2015, стр. 177. ISBN 978-5-906484-23-9
36. Романов А.Ю., Горюнов К.В., Суздальцева Ю.Г., Рубцов Ю.П., Ткачук В.А. Молекулярные механизмы иммуносупрессорной программы МСК in vitro. Материалы 2 национального конгресса по регенеративной медицине. ФГБУ НЦ АГ и П им. Кулакова, Москва, Россия, 3-5 декабря 2015, стр. 156. ISBN 978-5-906484-23-9

37. Суздальцева Ю.Г., Лагарькова М.А. Особенности стандартизации препаратов ММСК, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. Научные труды V съезда физиологов СНГ, V Съезда биохимиков России, конференции ADFLIM под редакцией А.И. Григорьева, Ю.В. Наточина, Р.И. Сепиашвили А.Г. Габибова, В.Т. Иванова, А.П. Савицкого. Сочи – Дагомыс, Россия 4–8 октября 2016, Acta Natura, 2016, спецвыпуск, том 2, стр. 152.
38. Suzdaltseva Y.G., Lagarkova M.A. The MMSCs models for studying the molecular mechanisms underlying tissue regeneration at different stages of human development. Recent Achievements in Stem Cells Research (CTERP), April 6-8, 2016, St. Petersburg, Russia, p. 50
39. Суздальцева Ю.Г., Лагарькова М.А. Мезенхимальные стволовые клетки в развитии фиброза при заживлении тканевых дефектов: новые подходы к изучению молекулярных механизмов регенерации тканей. Материалы конференции StemCellBio 2016: фундаментальная наука как основа клеточных технологий, 9-11 ноября 2016, Санкт-Петербург, стр. 53
40. Рубцов Ю.П., Горюнов К.В., Романов А.Ю., Суздальцева Ю.Г., Шаронов Г.В., Ткачук В.А. Молекулярные механизмы иммуномодуляции мезенхимными стромальными клетками: важная роль ICAM-1. Тезисы докладов конференции «Аутоиммунные и иммунодефицитные заболевания», Москва, Россия, 8-10 декабря 2016 г. Научно-практическая ревматология, 2016, V. 54, приложение 3, стр. 48.
41. Суздальцева Ю. ММСК как модель для изучения эпигенетических механизмов регуляции регенерации тканей. Материалы III национального конгресса по регенеративной медицине. Москва. 15–18 ноября 2017 г. Гены и клетки. 2017. Том XII, № 3, стр.237.
42. Suzdaltseva J. Gabashvili A. Goryunov K. Rubtcov Y. Tkachuck V. Immunosuppression mediated by mesenchymal stem cells involves cell-cell contact mechanism. 2018. FEBS Open Bio, 8:P.05-003-Wed. doi:10.1002/2211-5463.12453.
43. Суздальцева Ю.Г. Перекрестная регуляция экспрессии индол-2,3-диоксигеназы в ММСК при взаимодействии с активированными CD4+ Т-лимфоцитами. Acta Natura, 2019, Научные труды VI съезда физиологов СНГ, VI Съезда биохимиков России, IX Российского симпозиума «Белки и пептиды» под редакцией Р.И. Сепиашвили, В.А. Ткачука, А.Г. Габибова, А.И. Григорьева, В.Т. Иванова, М.А. Островского. Сочи – Дагомыс, Россия 1–6 октября 2019, Acta Natura, 2019, том 1, стр. 114.
44. Суздальцева Ю.Г. Исследование особенностей функциональной активности клеток, дифференцированных из ИПСК человека в мезодермальном направлении, для изучения молекулярных механизмов регенерации тканей. Научные труды Всероссийской научной конференции «Регенеративная биология и медицина», Москва, Россия, 15-16 апреля 2021, стр. 198.

Список сокращений

ГКГ – главный комплекс гистосовместимости
ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки
ММСК – мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки
МПК – мононуклеарные клетки периферической крови
НК – естественные киллерные клетки
ФГА – фитогемагглютинин
АРС – аллофикоцианин
BWAT – Bates-Jensen Wound Assessment Tool
СОХ – циклооксигеназа
СТLA4 – Т-лимфоцитарный антиген 4
FITC – флуоресцеин-5-изотиоцианат
GCP – Good Clinical Practice
ICAM – молекула межклеточной адгезии
IDO – индоламин-2,3-диоксигеназа
IFN- γ – интерферон-гамма
IL – интерлейкин
IL-R – рецептор к интерлейкину
iNOS – индуцируемая NO-синтаза
ISCT – Интернациональное Общество Клеточной Терапии
FGF – фактор роста фибробластов
G-CSF – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор
GM-CSF – гранулоцит-макрофагальный колониестимулирующий фактор
HGF – фактор роста гепатоцитов
HLA – человеческий лейкоцитарный антиген
KIR – иммуноглобулин-подобные рецепторы натуральных киллеров
LFA1 – функционально-ассоциированный антиген лимфоцитов 1, интегрин $\alpha L\beta 2$
MCP-1 – моноцитарный хемотаксический протеин-1
MIP-1b – макрофагальный воспалительный протеин-1b
PD-L – лиганд программируемой смерти
PE – фикоэритрин
PECAM – тромбоцитарно-эндотелиальная молекула клеточной адгезии
Per-CP – пиридинхлорофиллом
PGE2 – простагландин E2
SDF-1 – фактор стромальных клеток -1
TcR – Т-клеточный рецептор
TGF- трансформирующий фактор роста
TNF- α – фактор некроза опухолей альфа