

Макаревич Павел Игоревич

**Клеточные пласты из мультипотентных мезенхимных стромальных клеток
как платформа для тканевой инженерии в регенеративной медицине**

3.1.14 – Трансплантология и искусственные органы

Автореферат диссертации на соискание учёной степени
доктора медицинских наук

Москва, 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Научный консультант:

академик РАН,
доктор биологических, профессор

Ткачук Всеволод Арсеньевич

Официальные оппоненты:

Буравкова Людмила Борисовна – член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, заведующая отделом «Молекулярно-клеточная биомедицина», заместитель директора по научной работе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр Российской Федерации - Институт медико-биологических проблем Российской академии наук».

Воротеляк Екатерина Андреевна – член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, руководитель лаборатории клеточной биологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова Российской академии наук».

Астрелина Татьяна Алексеевна – доктор медицинских наук, профессор, руководитель Центра биомедицинских и аддитивных технологий, заведующая кафедрой регенеративной медицины, гематологии, молекулярной цитогенетики с курсом педиатрии Медико-биологического университета инноваций и непрерывного образования Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» Федерального медико-биологического агентства Российской Федерации.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт цитологии Российской академии наук».

Защита диссертации состоится «11» июля 2024 г. в 14.00 часов на заседании Диссертационного Совета ДСТИО 001.21 при ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России по адресу: 123182, Москва, ул. Щукинская, дом 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, а также на сайте <http://www.transpl.ru>.

Автореферат разослан « »

2024 г.

Ученый секретарь

диссертационного Совета ДСТИО 001.21
кандидат ветеринарных наук

Волкова Елена Алексеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

На рубеже XX и XXI веков произошло уникальное для медицины событие – сформировалось ее новое фундаментальное и клиническое направление – *регенеративная медицина*, которая к настоящему времени получила развитие практически во всех отраслях здравоохранения. Особое внимание в этой области уделяется нерешенным или недостаточно разработанным медицинским проблемам, к которым относят онкологические, орфанные заболевания, а также состояния, требующие трансплантации органов или при которых не существует эффективных способов этиотропного или патогенетического лечения (Daar, A.S., 2007; Polykandriotis, E., 2010).

Среди источников клеточного материала для регенеративной медицины значительный интерес представляют мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, обнаруженные практически во всех органах и обладающие спектром свойств, делающих их привлекательным объектом для применения в медицинских целях (Jovic, D., 2022). Помимо мультипотентности, т.е. способности к дифференцировке в остео-, хондро- и адипогенном направлениях, мезенхимные стромальные клетки обладают выраженной паракринной активностью, которая опосредована их секретомом – комплексом продуцируемых мезенхимными стромальными клетками цитокинов, факторов роста, хемокинов, пептидов, а также внеклеточных везикул (Kalinina, N.I., 2011).

Выделяемые из большинства тканей взрослого организма и хорошо культивируемые, они длительное время рассматривались как универсальная платформа для клеточной терапии. Клинические исследования клеточной терапии мезенхимными стромальными клетками в конце 1990-х годов продемонстрировали многообещающие результаты, которые стали основой разработки клеточных продуктов, введшихся в обращение в странах Евросоюза, США и Японии. Однако на этапе клинических исследований поздних фаз (в т.ч. многоцентровых) в клеточной терапии выявили ряд проблем, связанных с ее недостаточно высокой эффективностью (Berthiaume, F., 2011). Оказалось, что после введения в ткань в виде суспензии используемые для клеточной терапии мезенхимные стромальные клетки резко теряли жизнеспособность. Причиной этому является апоптоз, вызванный потерей коммуникации с внеклеточным матриксом и другими клетками. По данным ряда исследований, в первые сутки активация апоптоза происходила в 60-80% мезенхимных стромальных клеток, введенных с помощью инъекции (Mamidi, M.K., 2012). Действительно, вырванные из тканевого и регуляторного контекста стволовые клетки и мезенхимные стромальные клетки в большинстве случаев неспособны полноценно реализовать свою регенераторную программу, в связи с чем клиническая эффективность дорогостоящей терапии оказывалась значительно ниже ожиданий.

На фоне неудач клинических исследований клеточной терапии значительный прогресс произошел в тканевой инженерии. Ее основной целью является не просто выделение и приумножение необходимых клеток, а их организация в тканеподобную структуру, формируемую *ex vivo* для дальнейшей трансплантации реципиенту. Отдаленные перспективы тканевой инженерии связывают с возможностью получения искусственных органов, что позволит решить ряд проблем современной трансплантологии (Vacanti, C.A., 1991).

Тканевая инженерия стала одним из наиболее технологичных направлений регенеративной медицины, использующим широкий спектр методов, связанных с биореакторными подходами, 3D-печатью и искусственными матриксами различного происхождения. Поисковые и прикладные

исследования в этой области показали принципиальную возможность реконструкции тканевого окружения, обеспечивающего выживание, интеграцию и дифференцировку стволовых клеток. Однако сложность получения и дороговизна применяемых технологий остаются факторами, ограничивающими применение тканеинженерных конструкций. Наиболее продвинутыми в плане внедрения в клинику являются методы по созданию тканеинженерных эквивалентов кожи, роговицы, полых органов и компонентов опорно-двигательного аппарата (костей, хряща) (Porzionato, A., 2018; Sharma, B., 2004).

Начиная с 2000-х годов значительный интерес привлекла технология, получившая название *клеточных пластов* (англ. *cell sheets*). Поначалу ставшая новым методом трансплантации клеток, позднее она была признана самостоятельным гибким и относительно недорогим подходом в тканевой инженерии. Минимальные тканеинженерные конструкции в виде пластов из клеток и метод их открепления без использования протеолитических ферментов были предложены группой Okano (Okano, T., 1993; Макаревич, П.И., 2015). Основанная изначально на длительном культивировании эпителиальных клеток, она позднее была адаптирована к использованию мезенхимных стромальных клеток и сочетает удобство получения за счет продукции клетками внеклеточного матрикса, объединяющего их в единую конструкцию (Yamato, M., 2004). Гибкость этого подхода позволила получить пласты различной формы и размера из многих типов клеток, а также за счет дополнительных этапов модификации или преколонизации придать этим тканеинженерным конструкциям дополнительные важные для регенерации характеристики и свойства. При этом трансплантация мезенхимных стромальных клеток в виде клеточных пластов значительно улучшала показатели выживаемости за счет наличия в их составе внеклеточного матрикса, а также закоренных в его составе факторов роста и цитокинов, которые рецептируются клетками как сигналы тканевого окружения (Guo, R., 2021). Использование клеточных пластов показало эффективность при создании тканеинженерных конструкций для реконструкции дефектов костной и хрящевой ткани, а пласты из эпителиоцитов использовались в клинике для лечения поражений пищевода, мягких тканей и роговицы (Kanai, N., 2014; Kondo, M., 2020). Важной характеристикой клеточного пласта является способность мезенхимных стромальных клеток в их составе дифференцироваться после трансплантации, что крайне редко наблюдается при инъекционном введении. С учетом мультипотентности мезенхимных стромальных клеток это сделало их потенциальным инструментом тканевой инженерии при лечении переломов костей и заболеваний, вызывающих дегенерацию суставного хряща (Ntege, E.H., 2020).

Несмотря на перспективность клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток взрослого организма как основы нового платформенного решения в тканевой инженерии, все еще сохраняется ряд пробелов в знаниях, которые могут сдерживать их активное применение. Так, при очевидной применимости пластов мезенхимных стромальных клеток для стимуляции регенерации дефектов кожи и подлежащих тканей, механизмы их регенераторной эффективности остаются недостаточно изученными. Кроме того, использование клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток получило большее распространение в травматологии и челюстно-лицевой хирургии, но не для лечения распространенных дефектов мягких тканей – ран и пролежней. Внимание в этой области чаще уделялось использованию клеточных пластов из эпителиальных клеток и мезенхимных стромальных клеток для укрытия дефектов слизистых оболочек или трофических язв сосудистого генеза (Mizoguchi, T., 2021; Takagi, R., 2012).

Также можно констатировать недостаточно активную разработку применения пластов из мезенхимных стромальных клеток для терапевтического ангиогенеза – стратегии, с которой

связывают перспективы лечения заболеваний, вызываемых нарушением кровоснабжения и ишемией. Мезенхимные стромальные клетки как объект клеточной терапии, направленной на восстановление перфузии, показали низкую эффективность из-за быстрой гибели вводимых в суспензии клеток, однако использование пластов из них потенциально решает эту проблему. Все это создает объективные предпосылки для изучения потенциала клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток как средства стимуляции ангиогенеза.

Наконец, достаточно поверхностно оказались изучены изменения свойств мезенхимных стромальных клеток в составе этих конструкций, равно как и механизмы самоорганизации клеток в многослойные пласты, которые зачастую рассматриваются исключительно как подготовленные к доставке клетки, объединенные наработанным в культуре матриксом. При этом с учетом регуляторной роли белков внеклеточного матрикса, оказывающих при контакте с клеткой воздействие на широкий спектр физиологических процессов, данная позиция нуждается в актуализации и, возможно, пересмотре.

В связи с изложенным можно сделать заключение об актуальности данного направления исследований, причем не только с позиции трансляционных разработок новых продуктов на базе технологии клеточных пластов. В понимании механизмов, определяющих эффективность и безопасность методов тканевой инженерии, необходимо заполнить имеющиеся пробелы, сдерживающие развитие этого перспективного направления регенеративной медицины.

Цель исследования

Экспериментальная разработка и обоснование применения минимальных тканеинженерных конструкций в виде клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток как новой платформы в регенеративной медицине.

Задачи исследования

1. Оптимизировать методы получения тканеинженерных конструкций в виде пластов из мезенхимных стромальных клеток, дать их гистологическую характеристику и оценить возможность получения бесклеточных скаффолдов на их основе.

2. Установить влияние пола, возраста доноров и культуральных характеристик мезенхимных стромальных клеток жировой ткани человека на продолжительность сборки клеточных пластов.

3. Провести исследование эффективности трансплантации клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток для стимуляции заживления раневого и пролежневых дефектов кожи в сравнении с инъекционным введением суспензии или секрета мезенхимных стромальных клеток.

4. Оценить выживаемость мезенхимных стромальных клеток, трансплантированных экспериментальным животным в составе пластов, и охарактеризовать их влияние на ключевой этап репаративного процесса – формирование и васкуляризацию грануляционной ткани.

5. Установить механизмы, лежащие в основе влияния клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток на процесс заживления кожных дефектов после трансплантации данного типа конструкций.

6. Оценить ангиогенную и регенераторную эффективность клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток при их трансплантации в экспериментальной модели ишемии задней конечности у мыши.

7. Разработать и охарактеризовать метод модификации клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток с помощью рекомбинантного вирусного вектора с целью обогащения секрета тканеинженерных конструкций ангиогенным фактором роста (VEGF165).

8. Сравнить ангиогенную и протективную эффективность трансплантации модифицированных клеточных пластов, экспрессирующих VEGF165, и немодифицированных конструкций.

9. Исследовать механизмы самоорганизации и дифференцировочный потенциал мезенхимных стромальных клеток в составе клеточных пластов, а также установить факторы, определяющие изменения свойств мезенхимных стромальных клеток при формировании тканеинженерной конструкции.

Научная новизна

1. Разработаны и оптимизированы протоколы получения клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток жировой ткани животных и человека, а также предложены подходы для их эффективной децеллюляризации с получением структурированных бесклеточных скаффолдов, состоящих из депонированных белков внеклеточного матрикса.

2. Впервые исследовано влияние свойств донора и культуральных характеристик мезенхимных стромальных клеток на продолжительность сборки клеточных пластов, а в качестве способа прогнозирования времени, необходимого для получения готовой конструкции, предложено измерение длительности лаг-фазы на пассаже, предшествующем сборке конструкции.

3. Для стимуляции заживления ран и пролежней кожи в экспериментах *in vivo* установлено преимущество трансплантации клеточных пластов над введением суспензии мезенхимных стромальных клеток или их секрета.

4. После трансплантации клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток на поверхность пролежневого дефекта впервые показана регенерация кожи без образования рубца, а в составе секрета пластов обнаружено увеличение содержания молекулярных эффекторов, опосредующих необходимую для этого стабилизацию кровеносных сосудов грануляционной ткани.

5. Предложен оригинальный механизм высокой регенераторной эффективности клеточных пластов, получивший название «триггерного» и заключающийся в кратковременном и мощном паракринном действии секрета мезенхимных стромальных клеток на рост грануляционной ткани при заживлении дефектов кожи, а также стабилизацию кровеносных сосудов в ее толще.

6. Впервые предложено использование трансплантации клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток в качестве средства терапевтического ангиогенеза при ишемии нижней конечности и установлено их преимущество над введением мезенхимных стромальных клеток в суспензии.

7. Разработан эффективный метод трансдукции клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток с помощью бакуловирусного вектора с геном VEGF165, обеспечивающий повышение эффективности конструкций как средства терапевтического ангиогенеза в скелетных мышцах.

8. Впервые показаны структурная и функциональная гетерогенность тканеинженерных конструкций в виде пластов из мезенхимных стромальных клеток и установлены механизмы ее формирования.

9. Впервые установлен феномен коммитирования мезенхимных стромальных клеток в составе клеточных пластов с предпочтительным выбором направления дифференцировки в плотные структуры (кость и хрящ), а также показана роль спонтанной конденсации мезенхимных стромальных клеток *in vitro* в определении дифференцировочного пути.

10. Показана необходимость активации малых Rho-ГТФаз для самоорганизации мезенхимных стромальных клеток, в исходе которой транскриптомный профиль приобретает схожесть с изменениями при конденсации мезенхимы, идущей при формировании и регенерации плотных структур опорно-двигательного аппарата (костей и хрящей).

Теоретическая и практическая значимость

Результаты, полученные на моделях *in vivo*, обосновывают использование клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток жировой ткани в качестве гибкой и эффективной платформы для тканевой инженерии в регенеративной медицине, в частности, для стимуляции заживления дефектов мягких тканей и как средства терапевтического ангиогенеза. Представленные данные указывают на высокую регенераторную эффективность клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток и убедительно показывают их преимущество по сравнению с суспензией клеток или препаратами их секрета. В целом, это позволяет перейти к проведению соответствующих доклинических исследований с целью разработки тканеинженерного клеточного продукта для применения в медицинской практике.

Данные об изменении транскриптома и состава секрета мезенхимных стромальных клеток при их переводе в форму клеточных пластов вносят существенный вклад в обоснование позиции о преимущественно паракринном действии тканеинженерных конструкций этого типа.

В экспериментах *in vivo* и *in vitro* обоснована целесообразность модификации клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток для увеличения эффективности их трансплантации с целью восстановления кровоснабжения тканей, страдающих от ишемии. Разработанный протокол бакуловирусной трансдукции, приводящий к обогащению секрета пластов фактором VEGF165, позволяет усилить проангиогенное действие трансдуцированной конструкции по сравнению с немодифицированными клеточными пластами.

Впервые показанные изменения дифференцировочного потенциала мезенхимных стромальных клеток в составе клеточных пластов, которые можно определить как коммитирование в остео- и хондрогенном направлениях, указывают на возможность их использования в качестве основного или вспомогательного метода тканевой инженерии кости и хряща.

Впервые высказано предположение о сохранении у мезенхимных стромальных клеток автономной способности к самоорганизации, и предложено рассматривать процесс сборки тканеинженерных конструкций в виде пластов из мезенхимных стромальных клеток как процесс, родственной конденсации мезенхимы в ходе морфогенеза и регенерации плотных структур опорно-двигательного аппарата.

Методология и методы исследования

Методология исследования сформирована на основании научных заделов коллектива, а также основных работ российских и зарубежных исследователей в области физиологии, регенеративной биологии и медицины, клеточной биологии и тканевой инженерии. Поставленные в работе задачи решались с помощью культуральных, молекулярно-биологических, биохимических, микроскопических, гистологических, биотехнологических и статистических методов, а также с использованием описанных в литературе экспериментальных моделей патологических состояний у человека.

Основные методы исследования:

1. Выделение первичных культур клеток из тканей человека и животных с дальнейшим культивированием.
2. Клеточные модели *in vitro* и методы их анализа.
3. Иммуногистологические, морфометрические и стандартные гистологические методы исследования культур и образцов тканей, а также методы микроскопии.
4. Экспериментальные модели глубокой раны с дефицитом мягких тканей или пролежня кожи с трансплантацией мезенхимных стромальных клеток в виде клеточных пластов, их суспензии или с введением секрета мезенхимных стромальных клеток.
5. Экспериментальная модель ишемии задней конечности с подкожной трансплантацией клеточных пластов или введением суспензии мезенхимных стромальных клеток в ишемизированные скелетные мышцы с дальнейшей прижизненной оценкой кровотока (лазер-доплеровское сканирование).
6. Биохимические методы, в т.ч. мультиплексный иммуноферментный анализ и ингибиторные исследования в культуре.
7. Выделение нуклеиновых кислот, РНК-секвенирование и биоинформатический анализ.
8. Культивирование клеток-продуцентов и амплификация бакуловирусных частиц.
9. Вирусная трансдукция клеток и тканеинженерных конструкций, а также проточная цитометрия.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Многослойные клеточные пласты могут быть получены из первичных мезенхимных стромальных клеток жировой ткани человека и животных путем культивирования в стандартных средах с добавлением аскорбиновой кислоты в течение 7-12 суток, после чего могут быть откреплены от стандартных культуральных емкостей без ферментативной обработки или использования термочувствительных покрытий.

2. Возможность децеллюляризации клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток с помощью дезоксихолата натрия 0,5% или CHAPS 0,5% с последующей обработкой ДНКазой I позволяет получить бесклеточные препараты внеклеточного матрикса, которые могут использоваться в качестве скаффолда или культурального покрытия для других типов клеток.

3. При получении клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток жировой ткани человека возможно прогнозирование времени сборки готовой конструкции по продолжительности лаг-фазы на пассаже, предшествующем сборке пласта.

4. При глубоких ранах и пролежнях кожи трансплантация клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток превосходит по эффективности введение суспензии и инъекцию секрета вследствие усиления паракринной активности мезенхимных стромальных клеток в составе конструкций и изменения репертуара продуцируемых ими факторов, регулирующих рост, созревание и васкуляризацию грануляционной ткани.

5. При кратковременном (от 3 до 7 суток) сохранении трансплантированного клеточного пласта на поверхности пролежневого дефекта его высокая паракринная активность оказывается достаточной для значимых изменений процесса заживления, которые заключаются в стимуляции роста грануляционной ткани, а также стабилизации пронизывающих ее кровеносных сосудов, что обеспечивает регенерацию без значимого фиброзирования кожи.

6. Трансплантация клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток является эффективным средством терапевтического ангиогенеза и обладает выраженным проангиогенным и протективным действием на ишемизированные скелетные мышцы, которое опосредовано компонентами секрета клеток в составе конструкции.

7. Бакуловирусная трансдукция клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток приводит к увеличению продукции VEGF165 и является эффективным и безопасным методом повышения ангиогенного действия данного вида тканеинженерных конструкций.

8. Формирование клеточных пластов сопровождается самоорганизацией мезенхимных стромальных клеток, в результате которой происходит их коммитирование с усилением остео- и хондрогенной дифференцировки без значимых изменений адипогенеза, что обосновывает их применение для тканевой инженерии костной и хрящевой тканей.

9. Молекулярные и транскриптомные паттерны, вовлеченные в самоорганизацию мезенхимных стромальных клеток при сборке клеточных пластов, стойко сохраняются в культуре клеток, т.е. являются автономными, а с учетом морфологической картины и характера коммитирования наиболее близким аналогом *in vivo* является процесс конденсации мезенхимы.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов обеспечивается четкой постановкой задач в соответствии с целью исследования, использованием современных лабораторных методов с последующей корректной обработкой первичных данных, с обоснованным использованием статистических методов, методологически корректным дизайном экспериментов *in vivo*, *in vitro* и *in silico*, а на этапе анализа – критической оценкой выводов и использованием научной литературы для соотнесения результатов исследований с современным уровнем знаний в данной области науки.

Апробация диссертационной работы состоялась 18 октября 2023 г. на заседании ученого совета Медицинского научно-образовательного центра Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Основные положения и результаты диссертации были доложены и обсуждены на III Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 15-18 ноября 2017 г.), IV Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 20-23 ноября 2019 г.); V Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 23-25 ноября 2022 г.), II международном конгрессе «Передовые клеточные технологии: от исследования к практике

(СТЕРP) (Москва, 11-13 апреля 2018 г.), Сеченовском международном биомедицинском саммите (SIBS) (Москва, 21-23 мая 2018 г.), конференции «StemCellBio-2018: Фундаментальная наука как основа трансляционной медицины» (Санкт-Петербург, 15-17 ноября 2018 г.), Всероссийской конференции с международным участием «Актуальные проблемы клеточной биологии и клеточных технологий» (Санкт-Петербург, 8-11 октября 2019 г.), всероссийской конференции «Синтетическая биология и биофармацевтика» (Новосибирск, 24-28 июля 2022 г.), научно-практической конференции «Актуальные вопросы, достижения и нерешенные проблемы современной травматологии и ортопедии» (Смоленск, 8-9 сентября 2022 г.), конференциях азиатско-тихоокеанского отделения Международного общества тканевой инженерии и регенеративной медицины (TERMIS-AP) (Тайбэй, Тайвань, 3-6 сентября 2016 г.; Чеджу, Ю. Корея, 5-8 октября 2022 г.) и XXVI Конгрессе Европейского общества генной и клеточной терапии (ESGCT) (Лозанна, Швейцария, 16-19 октября 2018 г.).

Связь работы с научными программами, планами, темами

Диссертационная работа выполнялась в рамках государственного задания Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» по теме «Поиск мишеней, создание инновационных препаратов и тканеинженерных конструкций для регенеративной медицины» (2015-2017 гг.), № государственной регистрации 121061800164-2; гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 18-315-20053 «Выяснение физиологических механизмов регуляции дифференцировки постнатальных стволовых клеток в модельной нише» (2019-2020 гг.); грантов Российского научного фонда №19-75-00067 «Общие и тканеспецифичные свойства стромальных клеток при репаративной регенерации» (2020-2021 гг.) и № 19-75-30007 «Фундаментальные проблемы регенеративной медицины: регуляция обновления и репарации тканей человека» (2019 г.-н.в.); грантов Фонда президентских грантов №МК-1068.2019.7 «Выяснение тканеспецифичных механизмов взаимодействия клеток эндотелия и перицитов» (2019-2020 гг.) и №14.W01.17.2422-МК «Разработка инновационного биоматериала на основе бесклеточного матрикса, производимого мезенхимными стромальными клетками человека, для стимуляции регенеративных процессов» (2017-2018 гг.), а также в рамках Федеральной целевой программы «Исследования и разработки» по субсидии №14.610.21.0001 на проведение прикладных научных исследований, направленных на решение комплексных научно-технологических задач, по теме «Разработка технологической платформы и методических рекомендаций по проведению доклинических исследований биомедицинских клеточных продуктов».

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования внедрены в научно-исследовательскую и образовательную деятельность кафедры биохимии и регенеративной медицины Факультета фундаментальной медицины и Института регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного центра Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Личный вклад автора

Личный вклад автора заключается в постановке цели, формулировке задач и методологии исследования, а также в разработке и оптимизации протоколов получения и открепления клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток жировой ткани человека и животных с последующим созданием методов их эффективной децеллюляризации. В рамках оценки эффективности клеточных пластов как средства терапевтического ангиогенеза автором лично выполнена отработка методов амплификации бакуловирусных векторов и их использования для трансдукции клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток. Автор принимал участие в проведении экспериментов на животных, им были получены и обработаны гистологические препараты, проведен их морфометрический анализ и ручного подсчет структур. Автором разработаны подходы к оценке выживаемости трансплантированных клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток и проведены соответствующие эксперименты на животных. Автором выполнены статистическая обработка первичных данных, обобщение и анализ результатов работы в целом.

Автор выражает свою личную и коллегиальную благодарность своим многолетним научным руководителям и учителям академику РАН, д.б.н., профессору В.А. Ткачуку и члену-корреспонденту РАН, д.м.н., профессору Е.В. Парфеновой за неоценимую поддержку в ходе проведения исследования. Автор выражает благодарность коллективу лаборатории ангиогенеза Института экспериментальной кардиологии имени академика В.Н. Смирнова Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, сотрудникам Факультета фундаментальной медицины и Института регенеративной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, без помощи которых эта работа была невозможна.

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 27 научных работ, в том числе 25 статей: из них 8 – в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, 17 статей - в изданиях, индексируемых в международных наукометрических базах данных. Получено 2 патента РФ на изобретение.

Объем и структура работы

Диссертация построена по стандартной схеме и изложена на 254 страницах машинописного текста, текст состоит из введения и следующих за ним 7 глав, включающих литературный обзор по теме исследования, описание использованных материалов и методов, 5 глав с результатами работы, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка использованной литературы. Последний содержит ссылки на 17 отечественных и 404 зарубежных источника. Работа содержит 67 рисунков, 6 таблиц, и 1 формулу.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования стали тканеинженерные конструкции (ТИК) в виде пластов, получаемые из мезенхимных стромальных клеток жировой ткани (МСК) человека и экспериментальных животных, а также использованные для их изучения животные и клеточные модели. Сборку клеточных пластов (КП) из МСК осуществляли при стартовой плотности культуры 50 тыс. клеток/см² (МСК человека и крысы) или 80 тыс. клеток/см² (МСК мыши). Сборка КП осуществлялась 7-14 дней в зависимости с добавлением аскорбиновой кислоты (50 мкг/мл). Для открепления КП инкубировали в холодном р-ре Версена (ПанЭко, Россия) 3-4 минуты, а затем в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) края КП открепляли с помощью наконечника микропипетки. Для децеллюляризации КП обрабатывали растворами для децеллюляризации, содержащими дезоксихолат натрия 0,5%; SNAPs 0,5%; додецилсульфат натрия 0,05%; мочевины 0,2М или Triton X-100 1%. После децеллюляризации образец обрабатывали ДНКазой I (Fermentas, США), степень деградации ДНК оценивали по окраске DAPI.

Образцы секрета МСК получали методом кондиционирования: чашку с монослоем МСК человека или собранным из них КП отмывали ФСБ, после чего к культурам добавляли среду DMEM на 48-72 часа. Количественное определение факторов роста и цитокинов проводили методом мультиплексного ИФА с набором «Human Angiogenesis assay» (Bio-Rad, США) по инструкции производителя.

Для моделирования глубокой раны кожи с дефицитом мягких тканей использовали самцов крыс линии Wistar с массой тела не менее 300-400 г. После наркотизации в области холки иссекали круглый лоскут (5,7 см²), удаляли подкожную жировую клетчатку и формировали объемный дефект трапециевидных мышц. Края раны подшивали узловыми швами к стерильному латексному кольцу для предотвращения контракции. Трансплантацию клеточного материала проводили на 7 сутки после операции. В рамках эксперимента были сформированы следующие группы: «Контроль» (n=5) – животные без лечения; «Суспензия МСК» (n=4) – инъекция суспензии МСК в края и дно раны; «Клеточный пласт» (n=5) – трансплантация КП из МСК на поверхность раны. Суспензию МСК в стерильном ФСБ вводили пятью инъекциями из расчета 1,5 млн. клеток на 1 животное. Открепленные КП переносили в капле ФСБ и расправляли для полного укрытия дефекта.

Моделирование пролежневого (декубитального) дефекта кожи осуществляли с использованием самцов мыши линии C57Bl/6 в возрасте 12–14 недель. После наркотизации и депиляции в области спины, оттянув складку кожи, накладывали пару круглых магнитов (Master Magnetics, США) диаметром 1,2 см. Для формирования полноценного декубитального дефекта проводили 3 цикла ишемии и реперфузии (12:12 ч) суммарной продолжительностью 72 ч. Получаемые в итоге 2 симметричных дефекта по гистологической картине соответствовали 2-3 стадиям пролежня кожи. Трансплантацию клеточного материала или введение секрета МСК проводили непосредственно после формирования пролежня. В ходе эксперимента были сформированы следующие группы (n=12-16 в каждой): «Контроль» – животные без лечения; «Суспензия МСК» – введение

суспензии 1 млн. МСК в ФСБ в суммарном объеме 150 мкл в края и дно пролежня 4-5 инъекциями; «Секретом МСК» – введение 150 мкл кондиционированной среды содержащей секретом МСК в края и дно пролежня 4-5; «Клеточный пласт» – трансплантация одного КП из МСК на поверхность каждого сформированного дефекта.

Индукцию односторонней ишемии задней конечности проводили путем лигирования ветвей *a. femoralis* с ее иссечением и ушиванием кожи непрерывным швом. В группе контроля (n=9) после операции кожа ушивалась; в группе инъекции МСК (n=8) в ишемизированные мышцы тремя инъекциями вводили суммарно 1,0 млн клеток в ФСБ; в группе трансплантации КП (n=8) его накладывали на область иссеченного сосуда в капле ФСБ, после чего кожу ушивали. Для оценки скорости кровотока использовали лазер-доплеровский сканер LDI2 (Moog, Великобритания): измерение проводили сразу после операции, а затем на 7 и 14 дни.

Используя эту же модель, мы оценили эффективность модифицированных КП, экспрессирующих фактор роста VEGF165 человека и полученных с помощью бакуловирусной трансдукции. Готовые КП инкубировали в р-ре Хэнкса, содержащем векторы *Vac-FCVW/Vac-FLPo* (MOI 150/15) в течение 6 часов, после чего КП отмывали и в течение 15 часов стимулировали продукцию белка бутиратом натрия (5 мМ). В данном опыте помимо нелеченого отрицательного контроля (n=9) была сформирована группа «VEGF-КП МСК» (n=7), в которой трансплантировали модифицированный КП, экспрессирующий VEGF165 человека; «КП МСК» (n=7) с трансплантацией КП после ложной трансдукции и «Инъекция МСК» (n=7) с введением суспензии 1,0 млн. МСК тремя равными инъекциями. После операции степень нарушения и восстановление кровотока оценивали с помощью лазер-доплеровского сканирования с дальнейшей оценкой на 7 и 14 день.

Морфометрическую оценку роста грануляционной ткани (ГТ) проводили на срезах, окрашенных гематоксилином и эозином. Оценку ремоделирования ГТ проводили по изменению ее площади и формированию депозитов коллагена, окрашенных по Ван Гизону или Массону. Иммуногистологическую оценку васкуляризации проводили с помощью антител к CD31 и α -гладкомышечному актину (α -ГМА). Для оценки некроза срезы скелетных мышц окрашивали гематоксилином и эозином с измерением площади некротизированных волокон в программе ImageJ (НИН, США). Для оценки пролиферации и апоптоза срезы мышцы, покрытые КП, метили антителами к активированной каспазе-3 (Signaling technology, США) или Ki-67 (Abcam, Великобритания)

Количество коллагена I типа и клеточного (ВД-А) фибронектина анализировали с помощью твердофазного ИФА на мембранах с мечением первичными антителами к человеческому коллагену I типа (Abcam, Великобритания) или ВД-А фибронектину (Abcam, Великобритания). Гистохимическую детекцию активности щелочной фосфатазы в КП проводили с хромогенным субстратом BCIP/NBT. Для дифференцировки МСК в составе монослойных культур и КП использовали наборы сред и реагентов «StemPro» (Gibco, США) для адипо-, остео- и хондрогенной дифференцировок по инструкциям производителей. Для ингибирования активности Rho-ассоциированных протеинкиназ ROCK-1/2 использовали ингибитор Y-27632 (Sigma-Aldrich, Германия) в концентрации 5 или 20 мкМ. Для подавления активности SREBP-1 использовали бетулин (Бетулафарм, Россия) в концентрации 5 мкМ.

Для препаративного разделения различных по плотности областей КП использовали лазерный микродиссектор Leica LMD6500 (Leica, Германия). Перед проведением РНК-секвенирования МСК в монослое или в виде КП лизировали с использованием реагента TRIzol (Thermo Fisher Scientific, США) по протоколу производителя. Далее тотальную РНК использовали для получения полиА-фракции, на основании которой готовили библиотеки для массового секвенирования с оценкой распределения длин фрагментов и секвенированием на приборе HiSeq1500 (Illumina, США) с длиной прочтения 50 нуклеотидов. Анализ дифференциальной экспрессии генов был проведен в среде R с использованием пакета edgeR. Значимость дифференциальной экспрессии определяли с помощью теста отношения правдоподобия, а функциональный анализ дифференциально экспрессированных генов включал анализ генных онтологий (Gene Ontology, GO) и биохимических путей (Reactome).

Обработка результатов осуществлялась в пакете GraphPad Prism 6 (GraphPad, США). Для проверки значимости различий 2 групп использовали t-критерий Стьюдента или критерий Манна-Уитни. Сравнение 3 и более групп между собой проводили с использованием дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим применением критериев Тьюки или Краскела-Уоллиса. Наступление событий по мере наблюдения представляли в виде кривых Каплана-Мейера. Корреляционный анализ проводили по методу Пирсона. Все различия считались статистически значимыми при значении ошибки $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработка метода получения клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток человека

Получение КП из МСК человека стало приоритетной задачей, так как они являлись ключевым объектом исследования в данной работе. По стандартному протоколу сборки КП (стартовая культура 50 тыс. клеток/см², 7 дней) мы получили ТИК, которые снимались с обычной культуральной посуды. При откреплении выбор был сделан в пользу р-ра Версена в связи с тем, что его эффективность была сопоставима с трипсином-ЭДТА. Кроме того, обработка р-ром Версена не приводит к деградации внеклеточного матрикса (ВКМ), а протокол с использованием трипсина-ЭДТА основан на кратковременной (от 10 до 20 сек), что вносит существенную вариабельность. Для снятия КП мы использовали одноразовый наконечник для микропипетки, которым очерчивали КП по краю и проводили снятие движениями от края лунки к центру (рисунок 1).

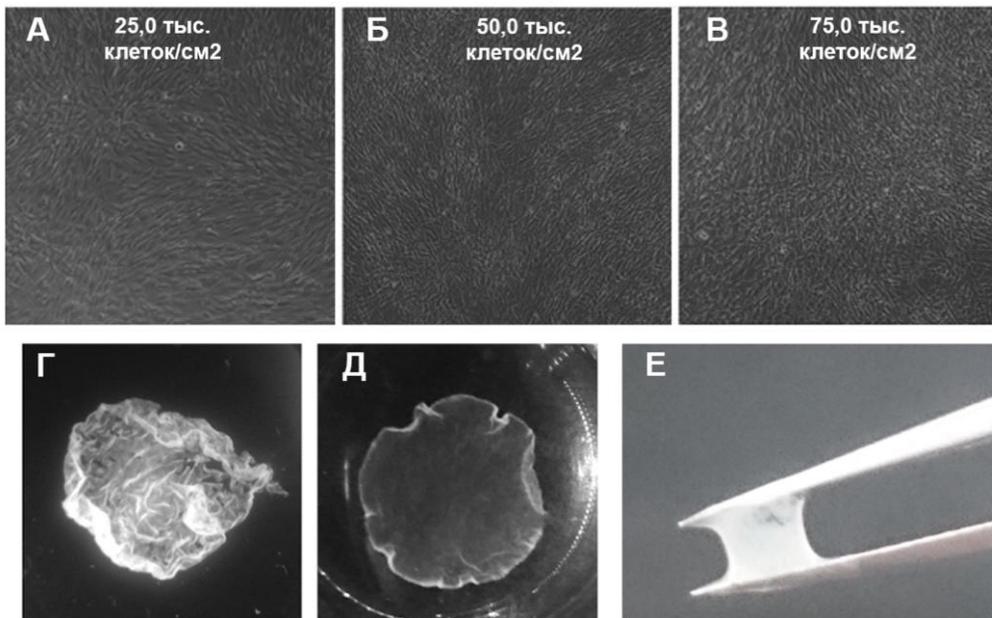


Рисунок 1 – Сборка клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток жировой ткани человека. Морфология клеток в составе клеточных пластов на 10, 7 и 3 сутки (А, Б и В соответственно) при указанной плотности стартовой культуры; вид клеточного пласта с недостаточной механической прочностью после снятия (Г); готовый к трансплантации клеточный пласт (Д) после открепления на 7 сутки и он же (Е) на браншах инструмента; А-В: фазово-контрастная микроскопия, ув. x 100; Г-Е: макrofотосъемка

Варьируя плотность стартовой культуры при сборке КП (10-25-50-75-100 тыс. клеток/см²), мы обнаружили ее обратную корреляцию с продолжительностью получения готовой ТИК. При плотности МСК 10,0 тыс. клеток/см² для получения КП требовалось 11-12 суток, а при плотностях 75,0 и 100,0 тыс. клеток/см² КП снимали уже через 48-72 ч. Продолжение культивирования приводило к контракции, после которой расправить и подготовить ТИК к трансплантации было невозможно.

Важной оптимизацией протокола получения КП стало внесение в среду роста L-аскорбиновой кислоты (50 мкг/мл), которая стимулирует пролиферацию клеток, продукцию компонентов ВКМ и их ферментативную сшивку (Wei, F., 2012). При этом нами было

обнаружено выраженное изменение морфологии МСК в составе ТИК, а также увеличение ее плотности.

Мы также отработали протоколы формирования КП из МСК мыши и крысы для использования в опытах *in vivo*. Плотность стартовой культуры в 50 тыс. клеток/см² для МСК крысы или 80 тыс. клеток/см² для МСК мыши позволяет к 7-му дню получить открепляемые и манипулируемые ТИК в виде пластов.

Все дальнейшие эксперименты с МСК человека, крысы и мыши проводились с использованием разработанных протоколов, которые могут рассматриваться как потенциальные технологии получения КП для клинического использования.

Влияние свойств донора и культуральных характеристик мезенхимных стромальных клеток на продолжительность сборки клеточных пластов

В качестве параметров, которые могут влиять на длительность сборки КП из МСК, мы исследовали возраст и пол доноров (n=14), а также культуральные характеристики МСК. Продолжительность сборки КП не коррелировала с полом и возрастом доноров. Соотношение полов было практически одинаковым (мужчины – 54 %, женщины – 46%), а медиана возраста доноров составила 35 лет, при этом возраст самого молодого донора составил 18, а самого старшего - 66 лет. МСК от донора 66 лет формировали КП примерно за такое же время (8 дней), как и МСК от донора 18 лет (9 дней).

Ключевыми параметрами, связанными с пролиферацией, являются время удвоения клеточной популяции и лаг-фаза культуры, под которой понимают время, необходимое для адгезии клеток к культуральному пластику и синтезу компонентов ВКМ, необходимых для пролиферации. В конце лаг-фазы популяция клеток начинает увеличиваться, переходя в фазу экспоненциального роста.

Оказалось, что длительность сборки КП не коррелирует с временем удвоения популяции, что оказалось удивительным, т.к. связь между скоростью пролиферации МСК и сборкой ТИК представлялась закономерной (рисунок 2, А).

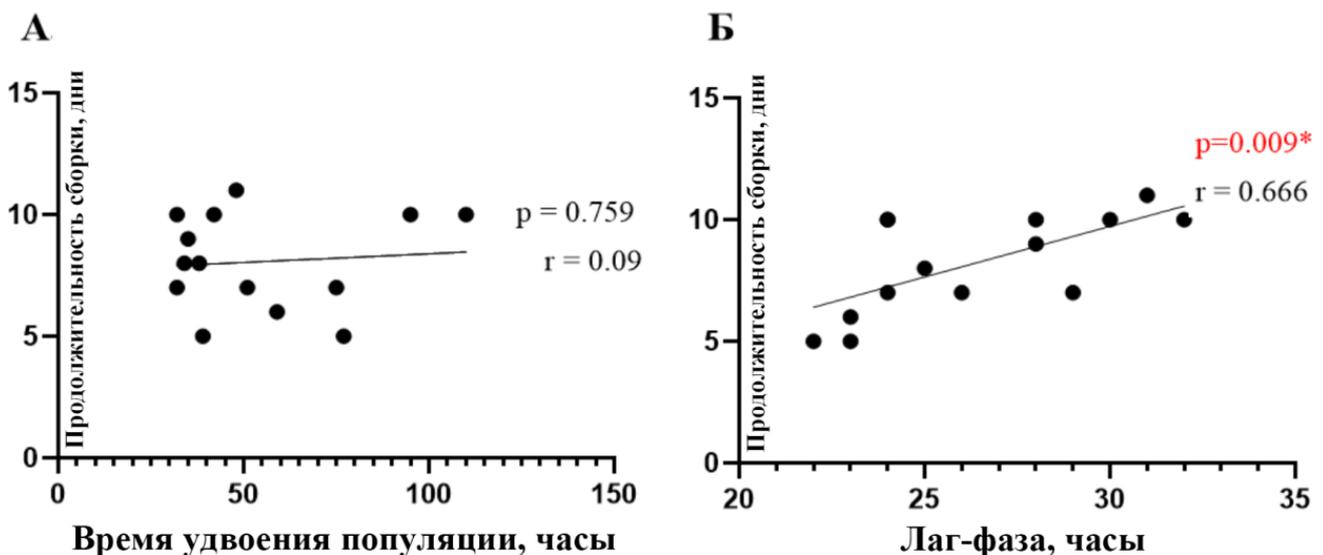


Рисунок 2 – Корреляция продолжительности сборки пластов из мезенхимных стромальных клеток жировой ткани человека с временем удвоения популяции (А) или продолжительностью лаг-фазы (Б); r - коэффициент Пирсона; * $p < 0,05$

При этом длительность лаг-фазы в культуре МСК напрямую коррелировала с продолжительностью сборки КП (рисунок 2, Б): культуры с короткой лаг-фазой формировали КП быстрее, чем с длительной. Вероятно, МСК с продолжительной лаг-фазой дольше адгезируют и медленно нарабатывают компоненты окружения, необходимые для запуска митоза. Таким образом, продолжительность лаг-фазы на ранних сроках культивирования МСК может быть использована для предварительной оценки срока готовности ТИК в виде пластов.

Гистологическая характеристика клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток человека

Иммунофлуоресцентное мечение компонентов ВКМ выявило в составе КП представленность коллагена I и III типов, фибронектина, а также компонента базальной мембраны – ламинина (рисунок 3, А-Г).

При гистологическом исследовании поперечных срезов КП по расположению ядер в 3-4 слоя мы опознали многослойную укладку клеток (рисунок 3). Толщина КП к 7 дню составила <40 мкм (в т.ч. по данным конфокальной микроскопии прикрепленного КП), чего достаточно для свободной диффузии O_2 и нутриентов из среды культивирования.

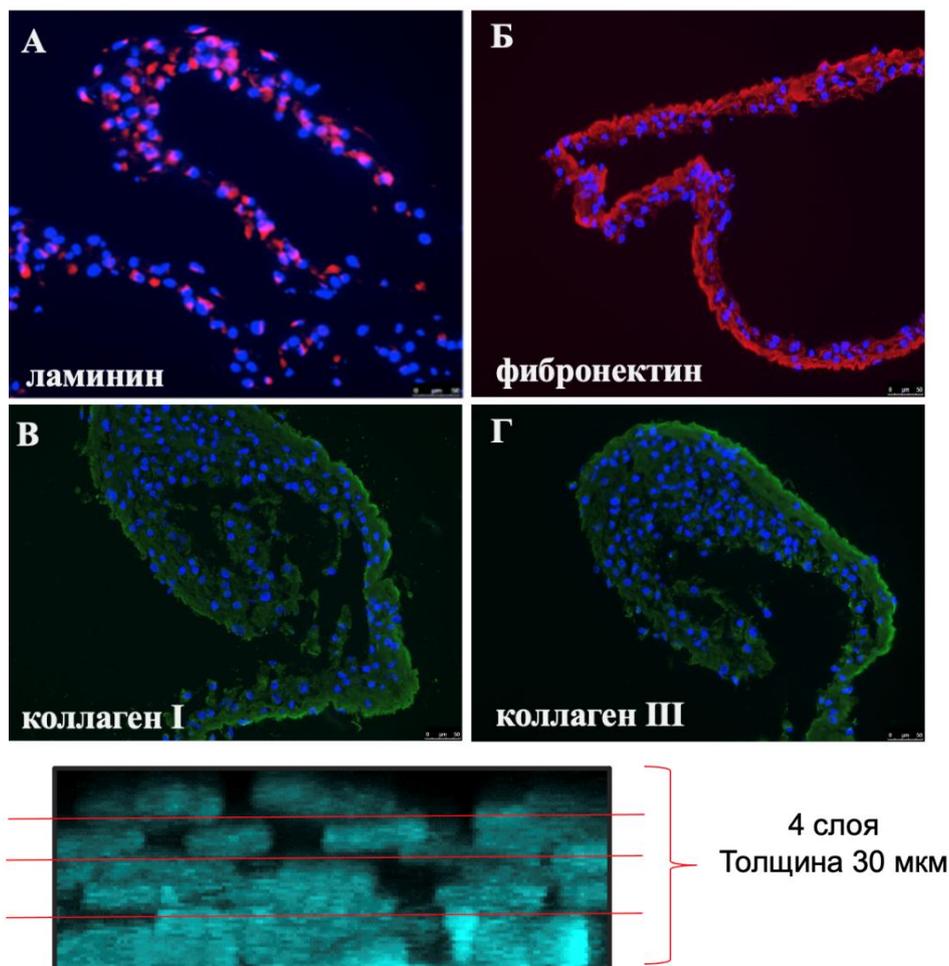


Рисунок 3 – Иммуногистологическая характеристика поперечных срезов клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток жировой ткани и конфокальная микроскопия конструкции. Иммунофлуоресцентное мечение белков матрикса (А-Г) и результаты конфокальной микроскопии до открепления клеточного пласта от чашки Петри (внизу); ядра помечены DAPI, масштабный отрезок – 100 мкм

Таким образом, получаемые с использованием разработанного протокола КП содержат значительное количество ВКМ, обеспечивающего пространственное объединение МСК и сигналы для поддержания их жизнеспособности и физиологической активности (Theocharis, A.D., 2016; Hynes, R.O., 2009). Эти результаты указывают не только на накопление значимого количества компонентов ВКМ в составе ТИК и ее многослойность, но и на дифференциальный характер депонирования. Равномерное накопление структурных компонентов ВКМ – коллагенов и фибронектина разительно отличалось от ламинина, составляющего основу базальной мембраны.

Получение децеллюляризованного внеклеточного матрикса клеточных пластов на основе мезенхимных стромальных клеток человека

Для получения децеллюляризованного ВКМ (дВКМ) КП из МСК человека обработали растворами, содержащими дезоксихолат натрия (ДХН) 0,5%; 3-((3-холамидопропил)диметиламмоний)-1-пропансульфонат (CHAPS) 0,5%; додецилсульфат натрия 0,05%; мочевины 0,2М или Triton X-100 1%.

Эффективным способом децеллюляризации КП с сохранением ВКМ оказалась кратковременная (5-10 мин) обработка раствором ДХН или CHAPS. Действие мочевины и додецилсульфата натрия приводило к нарушению целостности ВКМ, фиксации мембран с неполной децеллюляризацией, а Triton X-100 разрушал мембраны, сохраняя интактными ядра клеток.

Для оценки сохранности ВКМ после децеллюляризации мы провели иммуногистологическое исследование срезов КП и дВКМ. Коллаген III и фибронектин сохранялись после децеллюляризации ДХН и CHAPS, в связи с чем их можно рассматривать как перспективные вещества для получения дВКМ (рисунок 4).

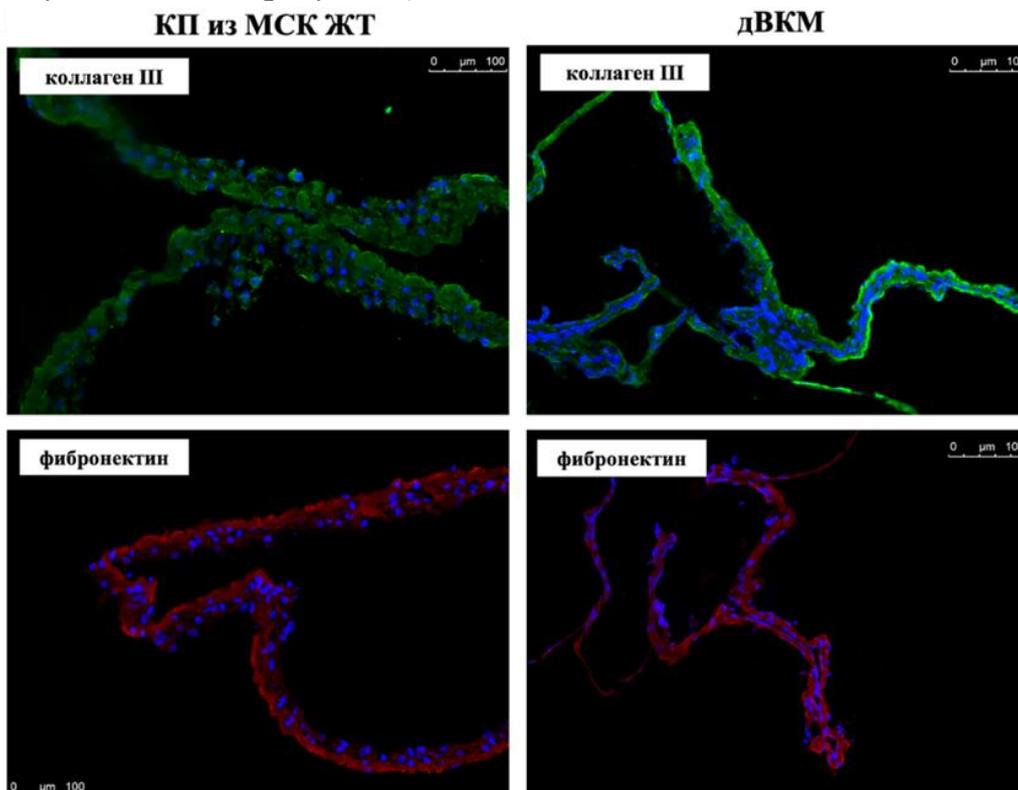


Рисунок 4 – Гистологическая характеристика клеточных пластов (КП) из мезенхимных стромальных клеток жировой ткани (МСК ЖТ) до и после децеллюляризации дезоксихолатом натрия 0,5%. Визуализированы коллаген III (зеленый) и фибронектин (красный). В составе децеллюляризованного внеклеточного матрикса (дВКМ) видны включения ДНК по окраске DAPI; ув. x200

Обнаруженные при окраске DAPI включения ДНК в составе дВКМ могут быть триггерами неспецифического воспалительного ответа, в связи с чем мы использовали обработку ДНКазой I, которая позволила значительно снизить присутствие ДНК.

Оценка эффективности клеточных пластов на модели глубокой раны кожи с дефицитом мягких тканей у крысы

При объемной потере мягких тканей ключевой задачей для сохранения функции и эстетической составляющей является быстрое заживление с минимальным фиброзированием. На 7 день после моделирования глубокой раны кожи с дефицитом подлежащих мягких тканей крысам трансплантировали 1,5 млн. МСК в суспензии или в виде КП.

Наблюдение с оценкой площади дефекта в течение 49 дней показало, что трансплантация КП на поверхность дефекта сокращала срок его закрытия по сравнению с контрольной группой. В группе КП площадь дефекта к 14-ым суткам составила $1,9 \pm 0,7$ см² против $5,3 \pm 0,2$ см² в группе нелеченого отрицательного контроля ($p < 0,05$). Введение МСК в виде суспензии к 14 дню оказало выраженный эффект, заключающийся в уменьшении площади дефекта (до $3,4 \pm 1,3$ см²), однако оно не достигало значимости по сравнению с иными группами эксперимента (рисунок 5).

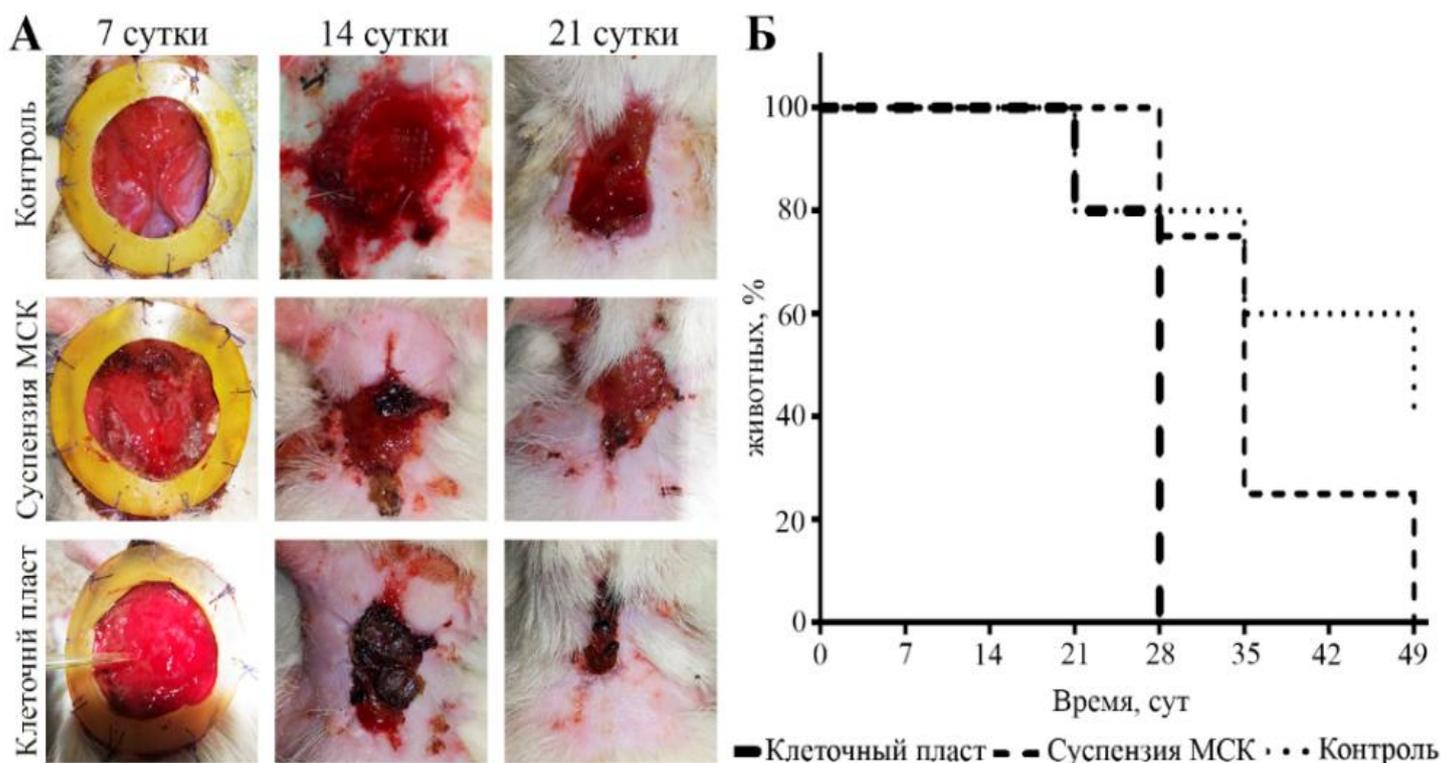


Рисунок 5 – Макроскопическая оценка динамики заживления дефектов (А) и кривая Каплана-Майера (Б), иллюстрирующая динамику достижения его полного закрытия. При сравнении динамики в парах «Клеточный пласт» - «Контроль» и «Клеточный пласт» - «Суспензия мезенхимных стромальных клеток» (МСК) была достигнута статистическая значимость ($p < 0,05$)

Вторым ключевым параметром эффективности являлся срок полного (<10% от исходной площади) закрытия дефекта. После трансплантации КП медиана срока полного закрытия дефекта равнялась 28 дням, в группе введения суспензии МСК – 35 дням, а в группе отрицательного контроля – 49 дней. К 28 дню после трансплантации КП полное закрытие дефекта произошло у всех животных, а в группе отрицательного контроля этот показатель составил лишь 20%. В конечной точке на 49-ый день в группе нелеченого контроля оставались животные с

незакрывшимися дефектами, что отражает тяжесть повреждения в использованной животной модели. Таким образом, значительное сокращение периода заживления показало превосходство КП над стандартным методом с введением эквивалентной дозы МСК в виде суспензии.

Морфометрический анализ окрашенных гематоксилином и эозином срезов показал, что как введение суспензии МСК, так и трансплантация КП приводили к значимому уменьшению площади грануляционной ткани (ГТ) на временном отрезке 14 – 21 день (рисунок 6).

Эти изменения отражали ее созревание и ремоделирование с апоптозом миофибробластов и депонированием коллагена, которые лежат в основе рубцевания. На препаратах из группы отрицательного контроля на 21 день было обнаружено уменьшение площади ГТ, однако при сравнении с 14 днем в той же группе оно не достигало статистической значимости (рисунок 6, А).

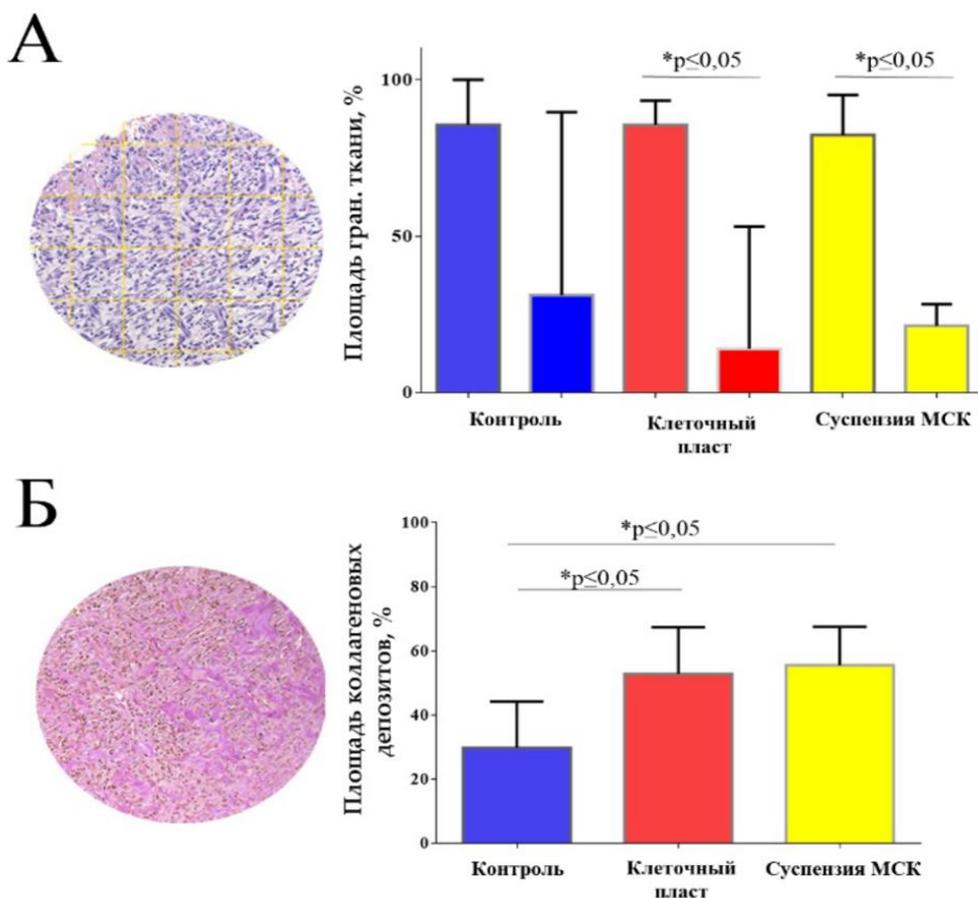


Рисунок 6 – Морфометрическая оценка репаративных процессов после трансплантации клеточных пластов или введения суспензии мезенхимных стромальных клеток (МСК) животным с глубокой раной кожи. Оценка площади грануляционной ткани (А) на 14 и 21 дни (окрашивание гематоксилином и эозином) и площади коллагена (Б) на 21 день (окрашивание по Ван Гизону); ув. $\times 100$, данные на графиках приведены в % от площади среза

Окрашивание по Ван Гизону с последующей морфометрией выявило на 14 и 21 дни в группах суспензии МСК и трансплантации КП значимый рост площади депозитов коллагена по сравнению с отрицательным контролем (рисунок 6, Б). Таким образом, МСК в составе КП и после инъекционного введения ускоряют необходимое для ранозаживления и образования рубца ремоделирование ГТ.

Формирование рубца является благоприятным исходом с точки зрения целостности ткани, а закрытие раны блокирует входные ворота для инфекций и уменьшает страдания, связанные с незаживающими дефектами мягких тканей. Наиболее вероятным механизмом действия МСК при

обоих способах доставки является паракринное действие, а преимущество КП может объясняться наличием в их составе белков ВКМ, а также более активной продукцией цитокинов и ФР.

Исследование эффективности трансплантации клеточных пластов, суспензии мезенхимных стромальных клеток, а также их секрета на модели пролежневого дефекта кожи у мыши

Причиной пролежней, относящихся к особому типу дефектов мягких тканей, является травмирование периодическим сдавливанием. Мы провели оценку эффективности КП и их суспензии на модели, пролежневого дефекта 2-3 стадии с некрозом жировой клетчатки и подлежащих мышц. С учетом убедительных данных о регенераторном потенциале секрета МСК мы также сформировали группу введения кондиционированной среды МСК. Трансплантацию МСК в виде суспензии или КП, а также инъекции секрета осуществляли под наркозом, после чего животные были разделены на следующие группы (по 12-16 животных в каждой): «Контроль» (животные без лечения), «Суспензия МСК» (1 млн. МСК в 150 мкл ФСБ 4-5 инъекциями), «Секретом МСК» (150 мкл кондиционированной среды 4-5 инъекциями) и «Клеточный пласт» (трансплантация КП на поверхность дефекта).

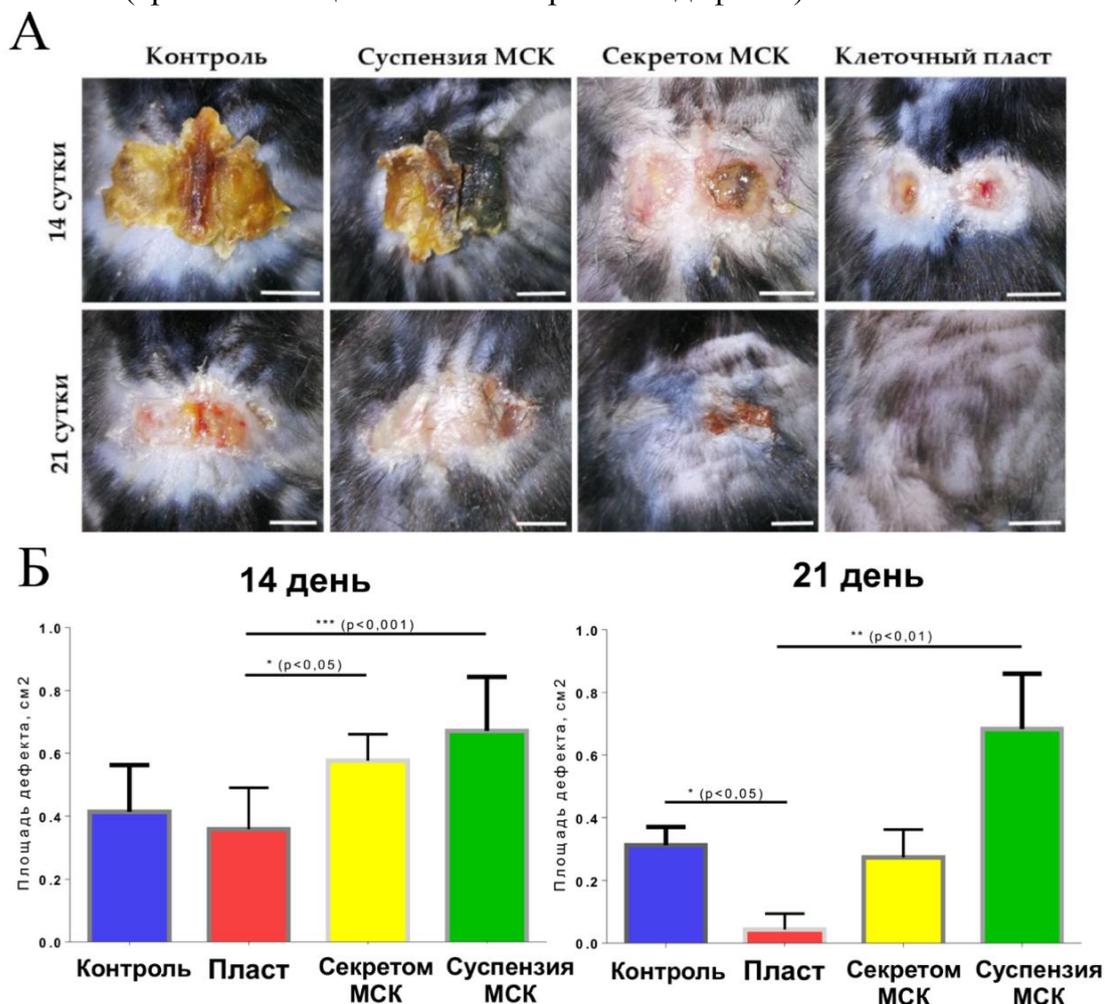


Рисунок 7 – Динамика закрытия пролежневого дефекта в экспериментальных группах после трансплантации клеточных пластов, введения суспензии мезенхимных стромальных клеток (МСК) или их секрета. Фотографии пролежня у животных из групп исследования (А), на которых видно закрытие дефекта с отсутствием рубцов кожи на 21 день эксперимента в группе «Клеточный пласт». На графиках (Б) приведена количественная оценка площади пролежня в группах исследования на 14 и 21 дни; масштабный отрезок – 5 мм

У большинства (3 из 4) животных в этой группе не удалось обнаружить рубцовых изменений кожи и наблюдалось формирование плотного волосяного покрова. Такой исход был зафиксирован только в группе КП, в прочих группах отмечались признаки незавершенного заживления или формирования рубца (рисунок 7, А). Оценка площади пролежня (рисунок 7, Б) также показала, что после трансплантации КП к 21 дню происходило полное закрытие дефекта, а суспензия МСК не обладала достаточно высокой эффективностью по сравнению с контролем.

Гистологическая оценка взятых на 14 день препаратов выявила полную эпителизацию пролежней во всех экспериментальных группах. У животных, которым был трансплантирован КП, гистологическое исследование подтвердило полное заживление дефекта, совпавшее с макроскопической картиной. Важным гистологическим признаком было наличие в толще дермы на месте пролежня желез и волосяных фолликулов, однако даже в этой группе к 21 дню не произошло восстановления подкожной мышцы и жировой клетчатки (рисунок 8).

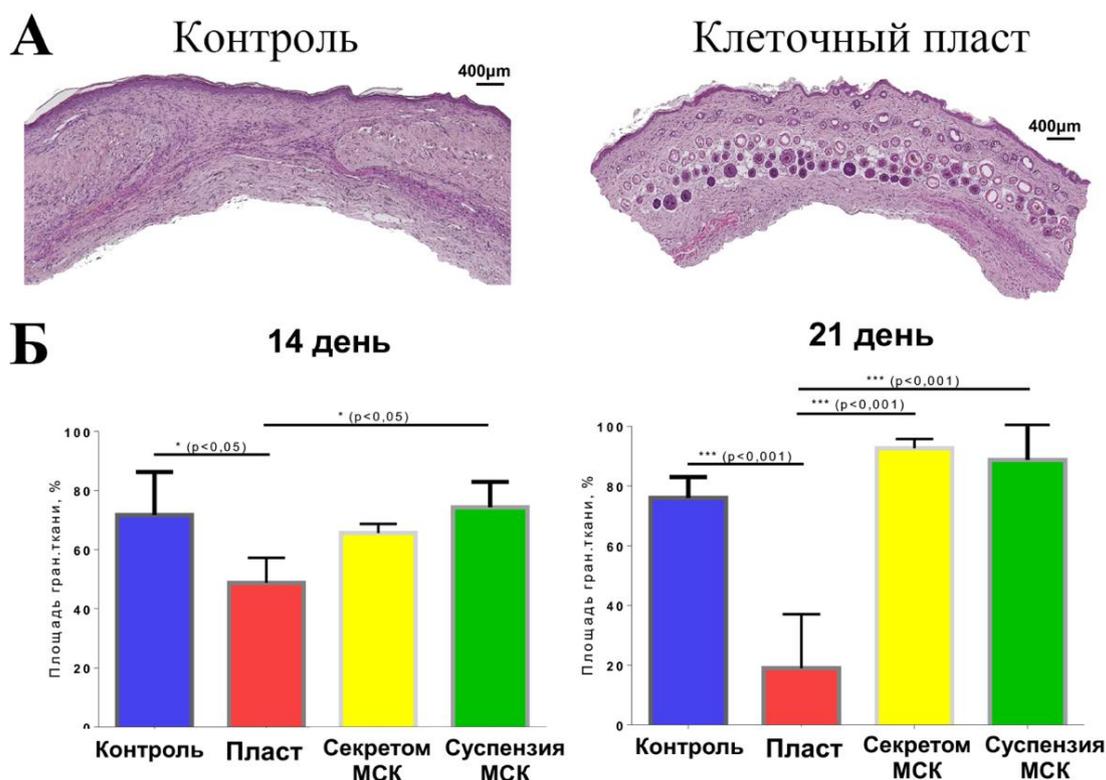


Рисунок 8 – Гистологическая оценка площади и ремоделирования грануляционной ткани после введения мезенхимных стромальных клеток (МСК) в виде пластов, суспензии или инъекции препаратов их секрета. Препараты пролежневого дефекта на 21 день эксперимента (А): в группе контроля идет ремоделирование грануляционной ткани (гран. ткани) с образованием рубца; в группе клеточных пластов визуализируется восстановление структуры дермы (в качестве ориентира использовались неполностью восстановившиеся подкожные мышцы). На графиках (Б) приведена оценка площади грануляционной ткани на 14 и 21 дни

Так как стромальные клетки способствуют росту ГТ за счет пролиферации и депонирования ВКМ, мы использовали ее толщину как ключевой показатель для анализа ранних сроков процесса (на 3 и 7 дни). (рисунок 9). При этом мы обнаружили статистически значимое увеличение толщины ГТ (приблизительно в 1,5 раза по сравнению с контрольной группой) только после трансплантации КП. На 7 день это отличие становилось более выраженным, а толщина ГТ достигала максимальных значений именно в группе КП. Инъекция суспензии МСК или введение их секрета также увеличивали толщину ГТ на 3 сутки с дальнейшим значимым снижением к 7 дню по сравнению с группой КП.

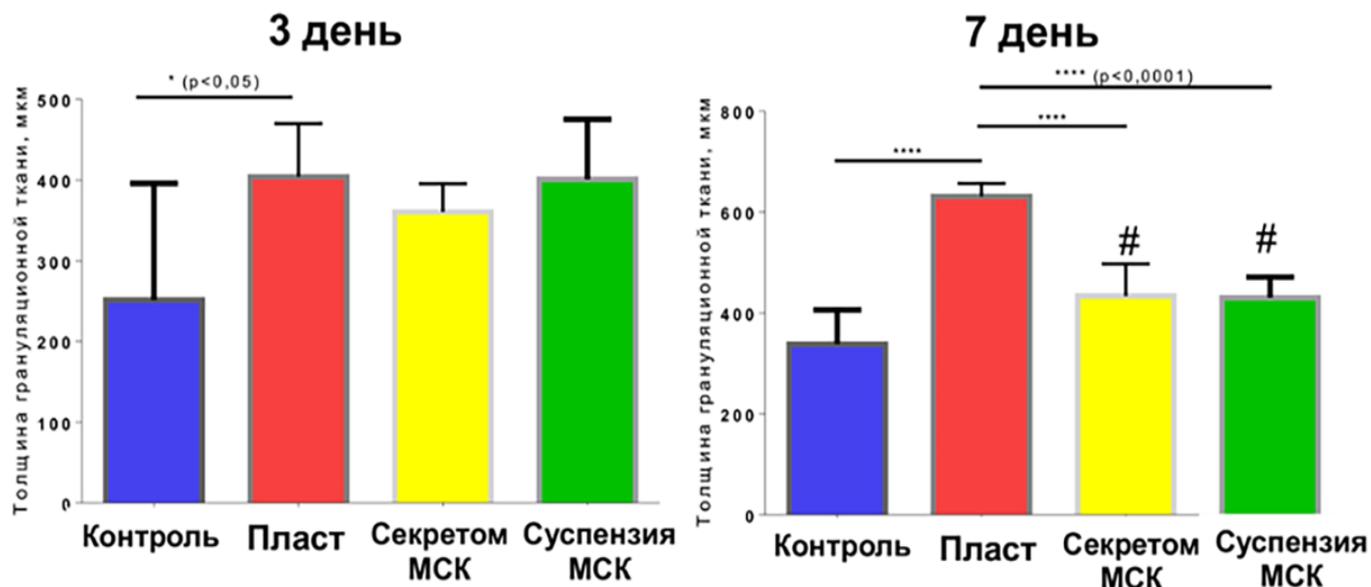


Рисунок 9 – Морфометрическая оценка формирования грануляционной ткани по толщине на 3 и 7 дни эксперимента после введения мезенхимных стромальных клеток (МСК) в виде пластов, суспензии или инъекции препаратов их секрета.; # $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Созревание ГТ и ее переход в стадию ремоделирования тесно связаны с плотностью кровеносных сосудов в ее составе. Для оценки васкуляризации мы использовали поперечные срезы области пролежневого дефекта, на которых визуализировали эндотелиоциты (CD31), а также гладкомышечные клетки и перициты (α -ГМА) для дальнейшего подсчета и оценки их плотности (рисунок 10).

Анализ полученных результатов выявил в группе КП значимое снижение плотности CD31+ капилляров на 3 день в сравнении с прочими группами. На 7 день эта тенденция была менее выраженной и значимые отличия были достигнуты только в сравнении групп КП и суспензии МСК, однако при этом была обнаружена высокая плотность крупных сосудов с видимым просветом до 50 мкм. Их характерная морфология с наличием муральных α -ГМА+ клеток (рисунок 10, А) указывала на нехарактерную для ранних этапов формирования ГТ стабилизацию сосудов. В рамках данного наблюдения следует обратить внимание на эффекты секрета МСК, который демонстрировал сходное с КП и превосходящее суспензию МСК действие на васкуляризацию ГТ.

Таким образом, введение МСК как в виде суспензии, так и в форме КП, а также их секрета является мощным активатором роста ГТ. При этом устойчивый рост ГТ после 3-их суток наблюдался только после трансплантации КП (рисунок 10, Б). Это может быть связано с более высокой сохранностью МСК в составе пласта, а также с действием продуцируемых ими растворимых факторов. При поверхностной трансплантации КП он может быть источником градиента ФР и цитокинов, который определяет быстрый направленный рост ГТ. Изменения васкуляризации ГТ под действием КП можно описать как стабилизацию сосудистого русла и уменьшение плотности капилляров, что указывает на созревание ГТ и ее переход в фазу ремоделирования.

Оценка удержания и выживаемости МСК была проведена с использованием МСК меченых мембранным флуоресцентным красителем (РКН26). После введения МСК в виде суспензии сигнал РКН26 определялся в дерме и подлежащих тканях в течение всего периода наблюдения вплоть до 21 дня включительно

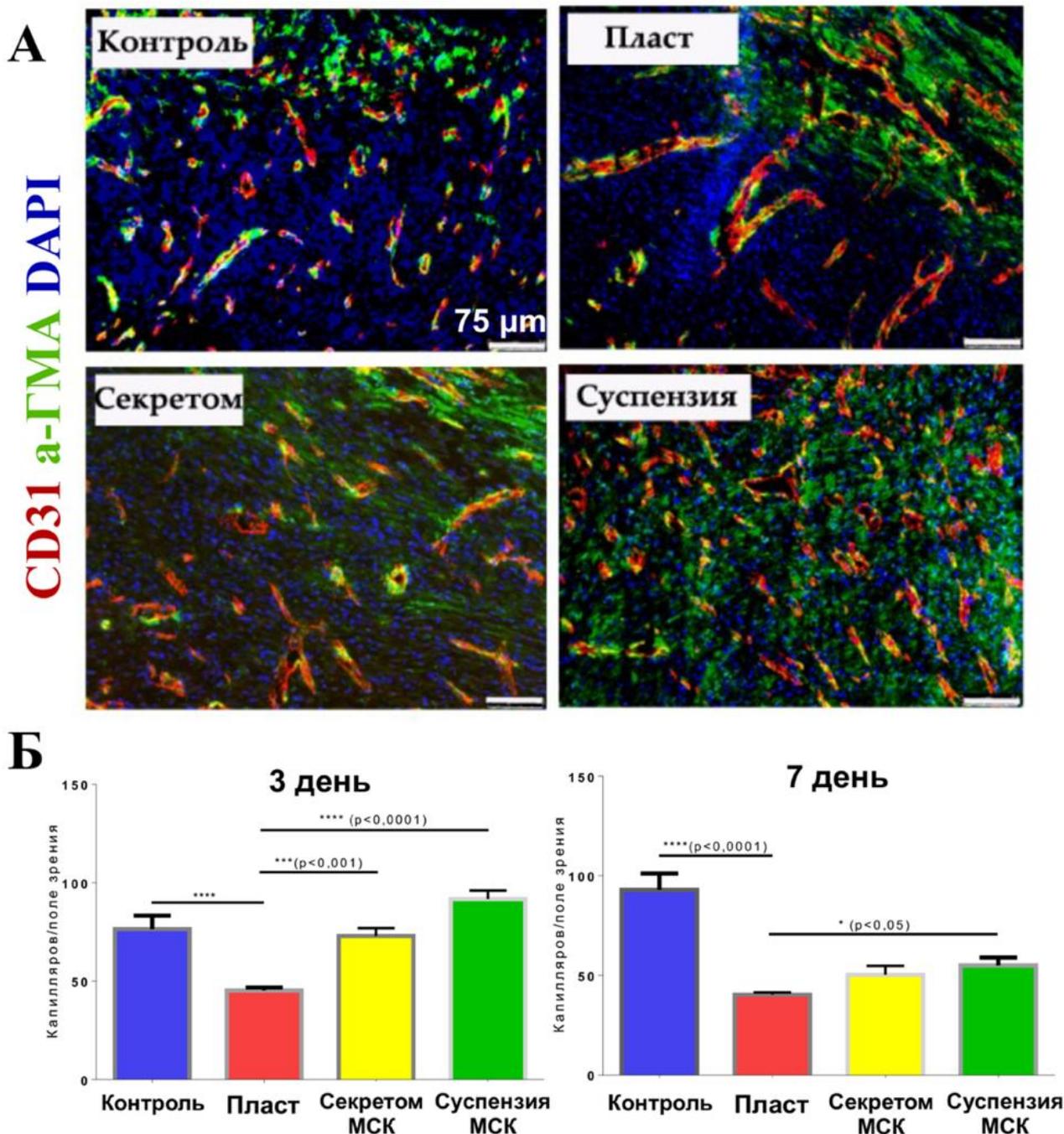


Рисунок 10 – Гистологическое исследование васкуляризации грануляционной ткани в зоне пролежневого дефекта после введения мезенхимных стромальных клеток (МСК) в виде пластов, суспензии или инъекции препаратов их секрета. Микрофотографии (А) поперечных срезов грануляционной ткани с визуализацией кровеносных сосудов (CD31 и α -гладкомышечного актина (α -ГМА)) на 7 день. На графиках (Б) представлены результаты оценки плотности кровеносных сосудов. Масштабный отрезок – 75 мкм

Исследование удержания КП показало их наличие только на 3 день, а на 7 день и далее ни в одном из образцов не был определен сигнал РКН26 или он не был ко-локализован с окрашенными DAPI ядрами. Таким образом, трансплантированный КП удерживался в зоне дефекта минимум 72 часа, после чего не позже 7 дня подвергался резорбции или отторгался вместе со струпом. Тем не менее, в этой группе исходом стала полная регенерация кожи без формирования рубца. Мы предположили, что за время нахождения КП на поверхности дефекта его секретом, проникая в подлежащую ГТ, задавал регуляторный импульс, которого было достаточно для полноценной регенерации.

Выяснение механизма регенераторного действия клеточных пластов при заживлении дефектов мягких тканей

Результаты *in vivo* стали основанием для углубленного исследования секреторной активности МСК в составе КП. Кратковременное удержание КП на поверхности пролежневого дефекта подкрепляло наше предположение о паракринном действии, которое мы определили термином «триггерное». Этим термином определяется активное действие секрета в течение 3-7 суток (время удержания КП), которое задает направление процессу заживления. Используя мультиплексный ИФА, мы показали, что КП продуцируют больше ангиогенных факторов, причем этот прирост был неравномерным для разных ФР и цитокинов.

Так, кратность прироста содержания ангиопоэтина-2 в секрете КП по сравнению с монослоем МСК составила 5,1 раза, а для ключевого активатора ангиогенеза VEGF165 она не достигала значимости (рисунок 11). При этом в секрете КП содержание PDGF-BB – аттрактанта перитцитов, участвующих в стабилизации сосудистого русла, было в 2,45 раза выше, чем в секрете монослоя МСК.

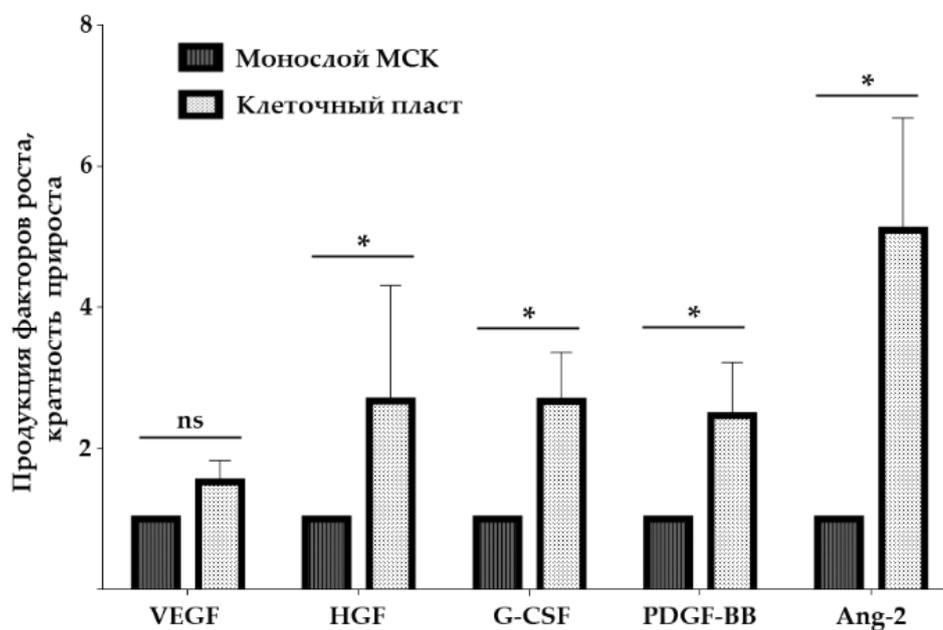


Рисунок 11 – Содержание ангиогенных факторов роста и цитокинов в секрете клеточных пластов и монослоя мезенхимных стромальных клеток. Представлена кратность прироста в секрете клеточного пласта при нормировке по ДНК; * $p < 0,05$; ns – $p > 0,05$

Спектр потенциальных изменений функционального статуса МСК был подкреплен результатами транскриптомного анализа после секвенирования РНК, выделенной из монослоя МСК или собранных КП. Кластеризацию данных проводили по биологическим процессам (BP) и молекулярным функциям (MF). В кластерах генов с повышенной экспрессией многие относились к числу регуляторов ремоделирования сосудов («*PDGF receptor binding*», GO:0005161) и взаимодействия клеток с ВКМ («*Collagen binding*», GO: 000518 и «*Protein binding involved in cell-matrix adhesion*», GO: 0098634). При кластеризации генов с пониженной экспрессией наиболее значимое снижение произошло среди активаторов ангиогенеза и пролиферации эндотелия («*Positive regulation of endothelial cell migration*», GO: 0010595 и «*Positive regulation of endothelial cell chemotaxis*», GO: 2001026). Данные транскриптомного профиля совпадали с результатами анализа секрета КП и опытами *in vivo*, в которых наблюдалась выраженная стабилизация кровеносных сосудов в толще ГТ после трансплантации КП.

Мы пришли к заключению, что при пролежне кожи трансплантация КП по триггерному механизму на ранних сроках активирует рост ГТ и стабилизирует пронизывающие ее кровеносные капилляры без увеличения их количества. Это приводит к формированию паттерна ремоделирования ГТ, в исходе которого происходит регенерация с полным восстановлением структуры.

Исследование эффективности клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток для терапевтического ангиогенеза

Состоянием, для которого активно разрабатываются методы *терапевтического ангиогенеза*, является хроническая ишемия нижних конечностей (ХИНК) и ее критическая форма (КИНК). При КИНК аппликация КП предлагается для закрытия язвенных дефектов, однако вопрос об их прямом ангиогенном действии изучен мало. В связи с этим мы оценили ангиогенную эффективность КП из МСК при трансплантации на ишемизированные скелетные мышцы.

На модели ишемии задней конечности мыши 1,0 млн. МСК вводили ткани тремя внутримышечными инъекциями или интраоперационно трансплантировали в виде КП в область резецированной бедренной артерии. Исследование динамики перфузии конечности показало более высокие показатели скорости кровотока в группах введения МСК по сравнению с отрицательным контролем. При этом инъекционное введение МСК уступало трансплантации КП (рисунок 12).

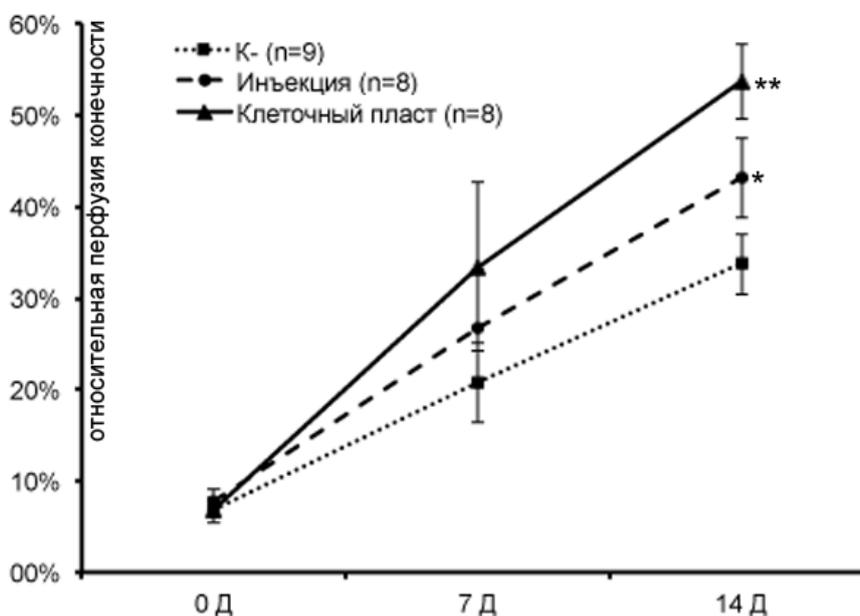


Рисунок 12 – Восстановление кровотока в ишемизированной конечности у животных из различных групп эксперимента; * $p=0,01$ по сравнению с отрицательным контролем (К-); ** $p=0,03$ по сравнению с группой инъекции мезенхимных стромальных клеток

В группе инъекции МСК на 14 день относительная перфузия была значимо выше, чем в отрицательном контроле ($43,1 \pm 4,4\%$ по сравнению с $33,7 \pm 3,2\%$ соответственно; $p=0,003$). Подкожная трансплантация КП обладала максимальной эффективностью, приводя к восстановлению перфузии до $53,7 \pm 4,7\%$, что было значимо выше, чем в группе инъекционного введения МСК ($p=0,03$) или отрицательного контроля ($p=0,001$).

Результаты гистологического исследования плотности сосудов подкрепляли полученные нами данные лазер-доплеровского сканирования. Количественный анализ показал, что инъекция МСК приводила к значимому увеличению ($p=0,03$) плотности CD31+ капилляров по сравнению с контрольной группой, где плотность капилляров составила $165,3 \pm 19,3$ /поле зрения. При этом плотность капилляров в группе КП была значимо выше, чем после инъекции эквивалентной дозы МСК ($231,1 \pm 18,6$ по сравнению с $194,4 \pm 10,4$ соответственно; $p=0,007$). Оценка плотности α -ГМА-позитивных сосудов, имеющих просвет, не выявила значимых различий между группами исследования. Таким образом, нами был обнаружен выраженный ангиогенный эффект МСК, как вводимых внутримышечно, так и трансплантированных в виде КП с явным преимуществом последних.

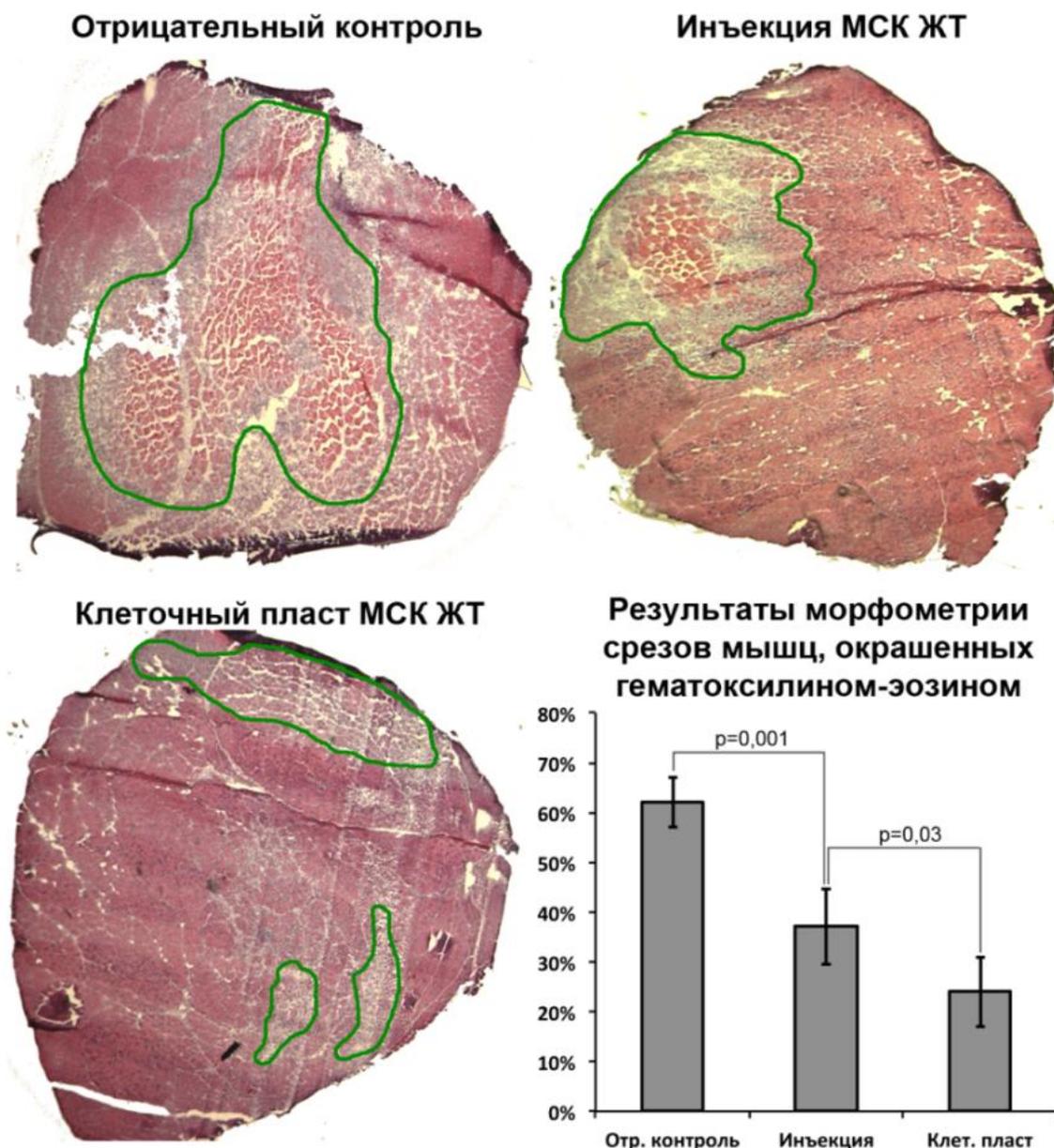


Рисунок 13 – Морфометрия распространенности некроза в ишемизированной мышце после трансплантации мезенхимных стромальных клеток жировой ткани (МСК ЖТ) в виде суспензии или клеточного паста: срезы мышц, а также график с результатами количественной оценки некроза в % от площади среза; окрашивание гематоксилином и эозином; зеленой линией выделены зоны некроза

Сравнение результатов, полученных после инъекции МСК и трансплантации КП показало, что последние обладают умеренным, но статистически значимым преимуществом по сравнению с инъекционным введением (рисунок 13).

При морфометрическом анализе некротизированной ткани на срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, было установлено, что ее площадь значительно снижалась после трансплантации МСК. Уменьшение площади некротизированных волокон на срезах совпадало с тенденцией к более высокой плотности капиллярных сосудов в этих группах (рисунок 13).

Для обнаружения трансплантированных МСК участок мышечной ткани в области аппликации КП иссекался и использовался для получения срезов, на которых ТИК детектировали по внесенной перед трансплантацией метке (краситель CMFDA).

По истечении 14 дней подкожно трансплантированные КП сохранялись в виде многослойной массы, в которой были обнаружены меченые CMFDA трансплантированные МСК, а также клетки реципиента, не несущие метки. По маркеру CD31 в толще КП были обнаружены признаки капилляризации. Сохранность клеток и возможность их пролиферации оценивали с помощью гистологического окрашивания на маркеры активации апоптоза (каспаза-3) и пролиферации (Ki-67). Наши данные указывают на то, что в толще КП имеются как пролиферирующие (Ki-67+), так и апоптотические клетки (позитивные по каспазе-3), причем среди них встречались МСК ЖТ (CMFDA+ клетки) и клетки, пришедшие в толщу пласта из организма хозяина.

Генетическая модификация клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток для усиления их ангиогенного потенциала

Показанная эффективность КП из МСК как средства терапевтического ангиогенеза вкупе с паракринным механизмом их действия стали основанием для модификации КП с целью обогащения их секретом соответствующими ФР. Основным инструментом в этой работе стала оригинальная бакуловирусная система из векторов, кодирующих VEGF165 человека с FRT-последовательностями и FLPo-рекомбиназу (Chen, C.-Y., 2011; Sung, L.Y., 2014). После совместной трансдукции FLPo- вырезает по FRT-сайтам экспрессионную кассету, приобретающую форму миникольцевой ДНК. Ее преимуществом является более высокая и длительная экспрессия трансгена.

Для экспрессии VEGF165 человека был отработан протокол бакуловирусной трансдукции КП из МСК мыши (1,0 млн. клеток) в р-ре Хэнкса в течение 6 часов с помощью двух векторов. При MOI = 75 мы обнаружили продукцию VEGF165, которая значительно возрастала при обработке КП 5 мМ NaBu уже через 48 часов. Удвоение MOI до 150 давало прирост продукции VEGF165, которая после стимуляции NaBu достигала $27,2 \pm 4,0$ нг/мл/ 10^5 клеток.

Исследование ангиогенной эффективности клеточных пластов, экспрессирующих VEGF165, на модели ишемии задней конечности мыши

После индукции односторонней ишемии задней конечности МСК жировой ткани мыши в кол-ве 1,0 млн. клеток были введены в ишемизированные мышцы с помощью инъекции или путем трансплантации КП как было описано выше. В группе трансплантации КП вне зависимости от модификации было отмечено увеличение перфузии ишемизированной конечности, начиная с 7 дня (диаграмма на рисунке 14).

На 7 день мы не выявили значимых отличий перфузии между трансдуцированными КП, экспрессирующими VEGF165 (VEGF-КП МСК) и КП после ложной трансдукции (КП МСК) ($44,3 \pm 11,6\%$ по сравнению с $35,2 \pm 11,1\%$ соответственно; $p = 0,286$), однако группа VEGF-КП МСК показала значимый рост перфузии по сравнению с отрицательным контролем.

В конце эксперимента на 14 день обе группы трансплантации КП показали значительное улучшение перфузии конечностей, которая составила $62,3 \pm 6,8\%$ в группе VEGF-КП МСК и $50,1 \pm 6,5\%$ в группе КП МСК ($p < 0,05$ по сравнению с $35,8 \pm 6,6\%$ в группе нелеченого контроля). На 14 день индикатором усиления ангиогенного ответа после модификации стало значимое ($p = 0,038$) увеличение перфузии в группе VEGF-КП МСК по сравнению с ложно-трансдуцированными КП МСК. Введение суспензии МСК приводило к росту скорости кровотока ($40,2 \pm 4,8\%$) без статистической значимости по сравнению с нелеченым контролем ($p = 0,19$) и значимо уступая трансплантации КП ($p = 0,01$).

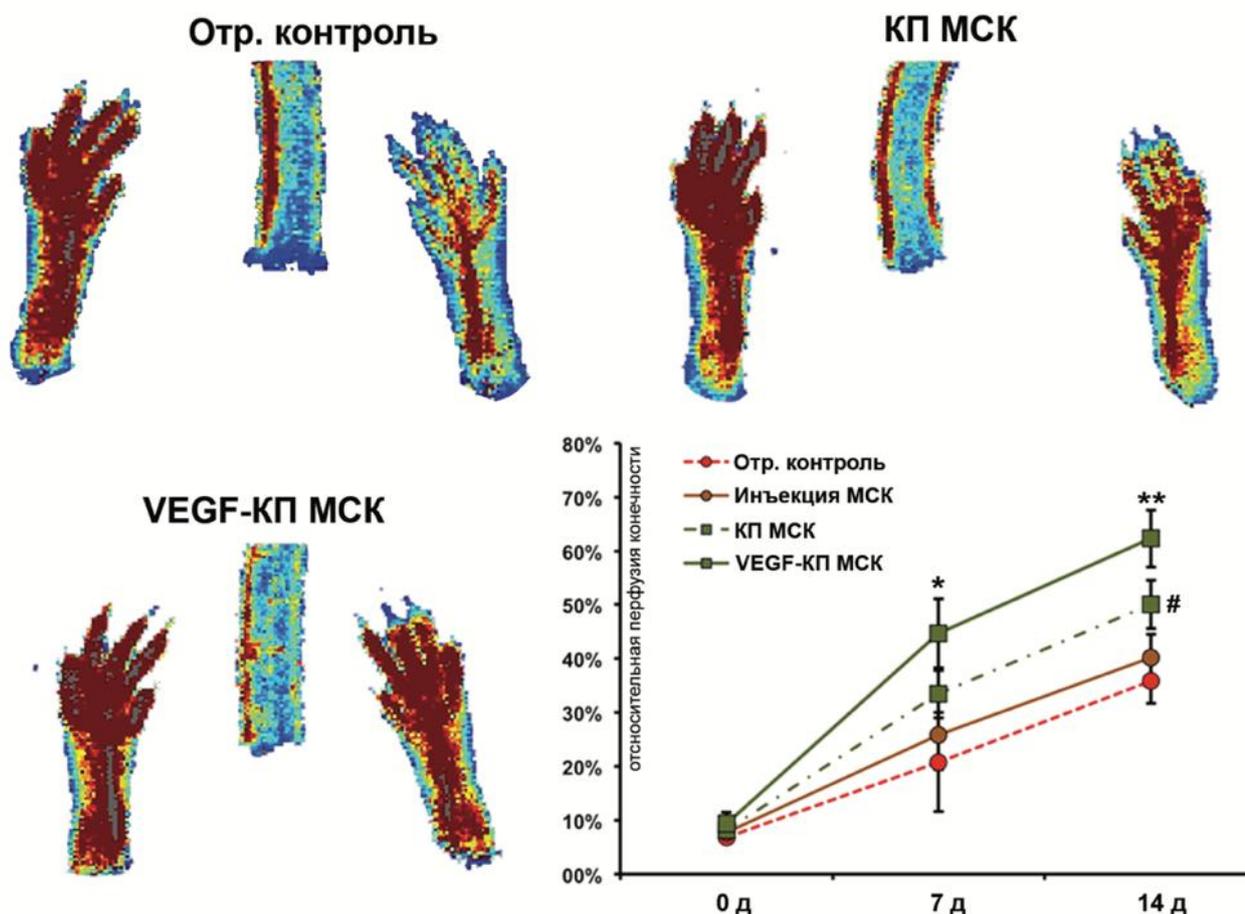


Рисунок 14 – Восстановление перфузии ишемизированной конечности мыши в группах эксперимента. Приведены доплеровские изображения на 14 день; график отражает динамику в группе отрицательного контроля ($n=9$); после подкожной трансплантации клеточных пластов (КП) из мезенхимных стромальных клеток (МСК), экспрессирующих VEGF165 («VEGF-КП МСК», $n=7$); после ложной трансдукции («КП МСК», $n=7$) или введения суспензии клеток внутримышечно («Инъекция МСК», $n=7$); * $p < 0,025$ по сравнению с нелеченым отрицательным контролем; ** $p = 0,007$ по сравнению с отрицательным контролем и $p = 0,038$ по сравнению с группой «КП МСК»; # $p = 0,01$ по сравнению с группой «Инъекция МСК»

После умерщвления животных мы могли обнаружить КП, адгезированный к мышцам, что позволило выделить их вместе с ТИК, которая выглядела как полупрозрачный диск на поверхности ткани. После окрашивания срезов гематоксилином и эозином мы показали, что КП

сохранили многослойную структуру и толщину 50-100 μm . ТИК не были окружены фиброзной капсулой и располагались непосредственно на поверхности мышцы, что позволяло рассчитывать на диффузию компонентов секрета в ее толщу.

Иммунофлуоресцентная визуализация CD31 и α -ГМА обнаружила в толще меченых CMFDA КП множественные капилляры и единичные α -ГМА+ кровеносные сосуды более крупного диаметра (рисунок 15, А и Б). Вазкуляризация КП была показана во всех исследованных образцах КП, причем как в группе VEGF-КП МСК, так и в ложно-трансдуцированных КП.

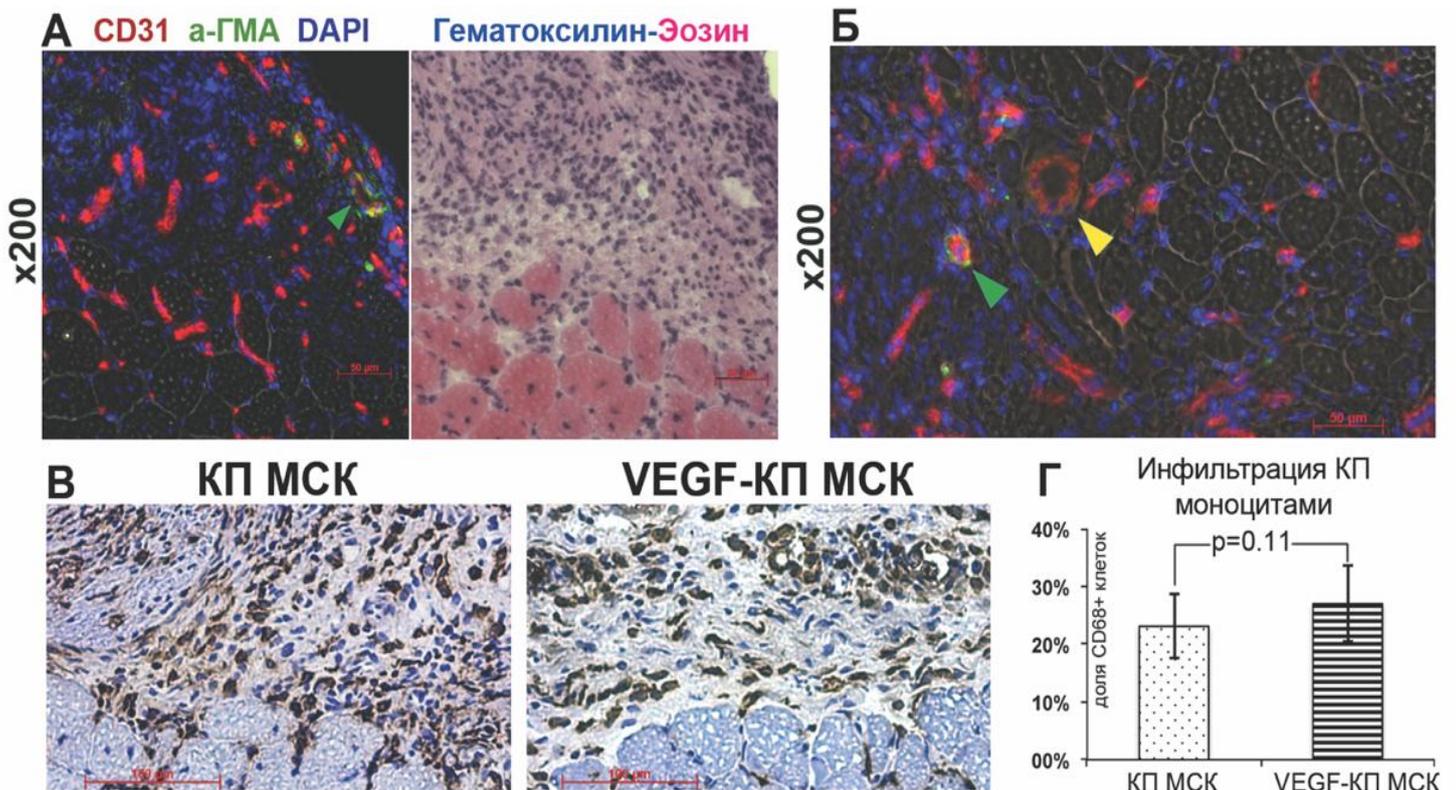


Рисунок 15 – Оценка васкуляризации и моноцитарной инфильтрации в подкожно трансплантированных клеточных пластах (КП) из мезенхимных стромальных клеток (МСК). На срезах клеточных пластов, были визуализированы кровеносные сосуды и клетки моноцитарного ряда; репрезентативное изображение кровеносных сосудов в клеточных пластах (А) и соответствующее окрашивание гематоксилином и эозином; репрезентативное изображение крупных сосудов (Б) в трансплантированных клеточных пластах (зеленая стрелка – α -ГМА(+), желтая стрелка – α -ГМА(-) сосуды); микрофотографии инфильтрации CD68+ моноцитами в толще пластов (В) и графическое представление результатов подсчета моноцитов в толще пластов (Г). Иммунофлуоресцентная микроскопия

При оценке количества CD68+ клеток моноцитарного ряда, таксис которых мог быть активирован экспрессией обладающего воспалительным действием VEGF165, мы не выявили отличий между ложно-трансдуцированными КП и VEGF-КП МСК (рисунок 15, В и Г).

Пролиферация МСК была обнаружена как в контрольных КП, так и в экспрессирующих VEGF165 после бакуловирусной трансдукции, а количественный анализ не выявил значимых отличий. Доля Ki-67+ клеток в толще VEGF-КП МСК и КП МСК составила $6,01 \pm 1,2\%$ и $6,28 \pm 2,1\%$ соответственно ($p > 0,05$).

Оценка встречаемости апоптотических клеток показала, что сигнал активированной каспазы-3 обнаруживался в ядрах и в цитоплазме клеток, что отражает различные стадии апоптоза. Значимых отличий между группами выявлено не было (рисунок 16) – в VEGF-КП МСК доля апоптотических клеток составила $11,9 \pm 4,2\%$, а после ложной трансдукции – $12,5 \pm 2,7\%$ ($p > 0,05$).

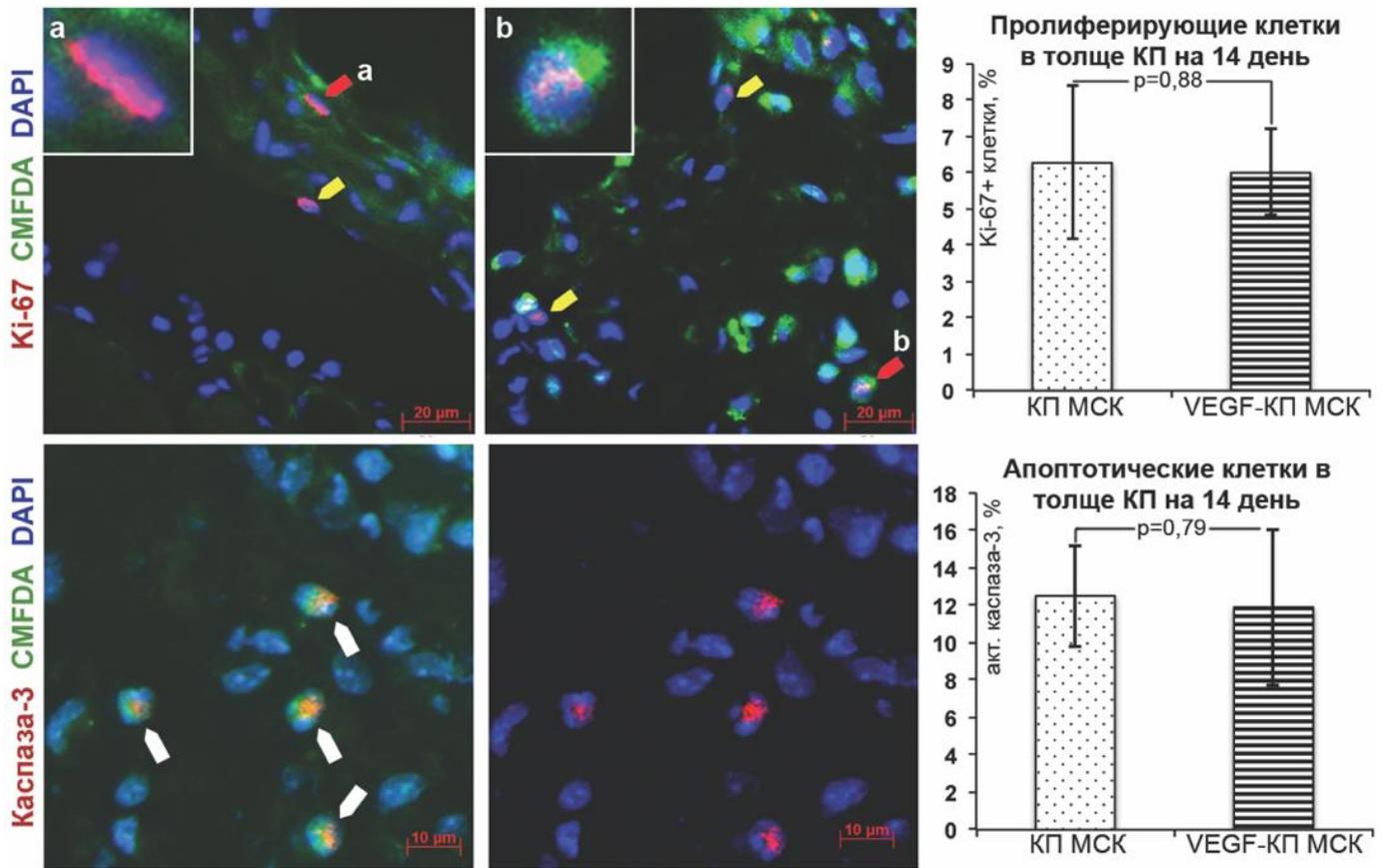


Рисунок 16 – Пролиферация и апоптоз клеток в толще подкожно трансплантированных клеточных пластов (КП) из мезенхимных стромальных клеток (МСК). На 14 день после трансплантации клеточные пласты выделяли с подлежащей мышцей и окрашивали на Ki-67 и активированную каспазу-3. Верхний ряд: слева и посередине – CMFDA+ (красные стрелки) и CMFDA- (желтые стрелки) клетки с Ki-67+ ядрами. Ув. x400. Нижний ряд: слева и посередине – репрезентативные изображения клеток, положительных по активированной каспазе-3 (белые стрелки). Ув. x630; иммунофлуоресцентная микроскопия. Графики в правой колонке иллюстрируют результаты ручного подсчета пролиферирующих и апоптотических клеток в толще клеточных пластов

Для оценки некротических изменений мы использовали срезы *m. tibialis anterior*, страдающей от наиболее тяжелой ишемии после иссечения *a. femoralis*. При морфометрическом анализе на каждом срезе выделяли области сохранных мышц, инфильтрации клетками воспаления и некротизированную область с разрушенными «тенями» мышечных волокон. В группе нелеченого контроля соотношение этих трех областей было близким к 1:1:1 (рисунок 17). При инъекционном введении МСК распространенность некроза снижалась с $26,3 \pm 4,3\%$ (группа контроля) до $5,7 \pm 1,9\%$ ($p = 0,001$), а после трансплантации КП составила $6,9 \pm 2,0\%$ ($p = 0,001$). Минимальная распространенность некроза ($2,9 \pm 1,3\%$) была зафиксирована после трансплантации модифицированных VEGF-КП МСК, которая обладала преимуществом по сравнению с группами КП МСК и инъекционного введения ($p < 0,01$ для обоих сравнений).

Занимаемая клетками воспаления площадь также была значимо снижена в группах КП МСК и инъекционного введения ($24,2 \pm 5,7\%$ и $23,8 \pm 5,1\%$ соответственно) по сравнению с нелеченым отрицательным контролем ($37,4 \pm 4,6\%$; $p < 0,05$ для обоих сравнений). Закономерно в обеих группах, где была выполнена трансплантация КП из МСК, наблюдалось резкое увеличение площади сохранной ткани, которое было максимальным в группе VEGF-КП МСК.

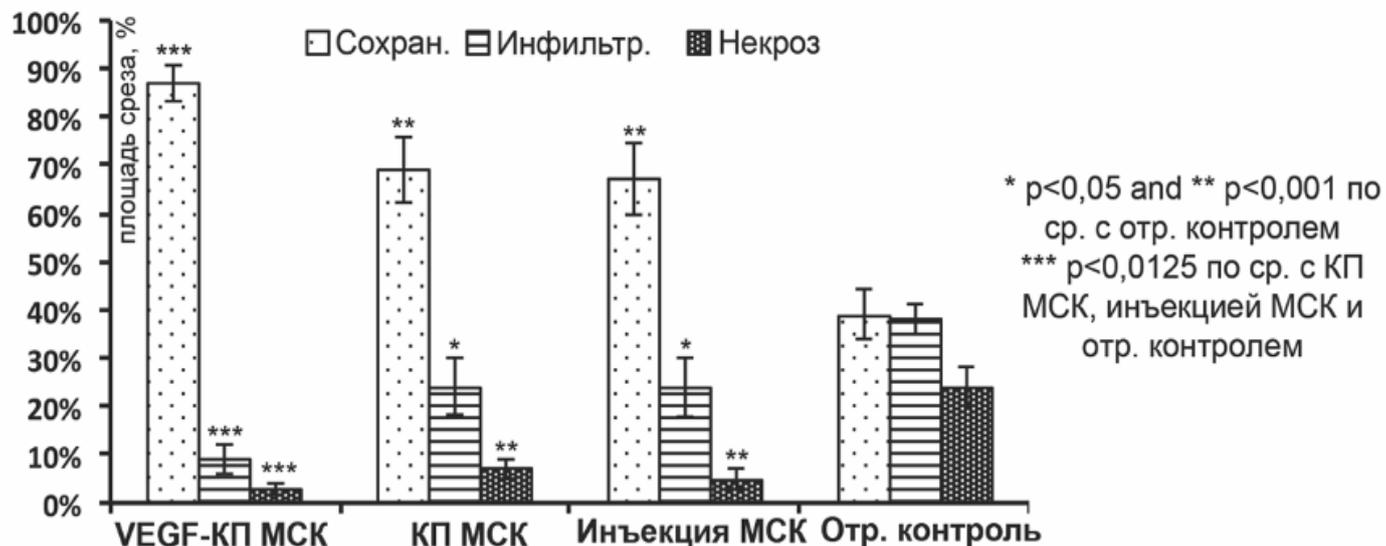


Рисунок 17 – Оценка некроза скелетных мышц в группах исследования по результатам морфометрического анализа после подкожной трансплантации клеточных пластов (КП) из мезенхимных стромальных клеток (МСК) или пластов, экспрессирующих VEGF165 (VEGF-КП МСК)

При оценке васкуляризации мы обнаружили, что к 14 дню плотность CD31+ капилляров в обеих группах трансплантации КП была выше, чем в нелеченом контроле. В группе КП МСК количество капилляров на поле зрения составило $224,3 \pm 11,8$ по сравнению с $184,3 \pm 10,6$ в нелеченом отрицательном контроле ($p < 0,001$). Наибольшая плотность капилляров была отмечена в группе модифицированных VEGF-КП МСК со средним значением $255,6 \pm 13,7$ ($p = 0,006$ по сравнению с КП МСК; $p < 0,001$ по сравнению с отрицательным нелеченым контролем). После инъекционного введения МСК плотность капилляров была значимо ($p = 0,01$) ниже, чем в группе трансплантации КП МСК, после которой плотность капилляров составила $194,5 \pm 8,8$ в поле зрения. Это было незначимо выше группы нелеченого контроля ($p = 0,032$), что коррелировало с отсутствием усиления перфузии в группе инъекции МСК. Оценка плотности крупных кровеносных сосудов не выявила отличий между группами инъекции МСК, трансплантации КП МСК и VEGF-КП МСК ($p > 0,05$; тест Краскелла-Уоллиса).

На данном этапе нами был разработан подход к получению модифицированных ТИК в виде пластов из МСК, проведен подробный анализ эффективности и установлено их преимущество как перед суспензионным введением так и перед КП, не подвергавшимся модификации. Подобранные условия трансдукции с помощью оригинальной векторной системы на основе бакуловируса позволили быстро (в течение 6 часов) получить КП с высокой экспрессией ключевого активатора ангиогенеза – VEGF165.

Проведенное исследование обосновывает использование трансплантации модифицированных КП из МСК для стимуляции ангиогенеза в ишемизированных тканях и может при дальнейшей разработке найти применение по показаниям из числа сердечно-сосудистых заболеваний.

Оценка дифференцировки мезенхимных стромальных клеток в составе клеточных пластов и выяснение механизма их самоорганизации при формировании тканеинженерных конструкций

К настоящему времени молекулярные механизмы самоорганизации, лежащие в основе получения ТИК на основе МСК, изучены достаточно поверхностно. Помимо опосредованной продукцией секрета паракринной активности, важность которой для регенераторной эффективности КП была нами убедительно показана выше, нас интересовал вопрос о дифференцировочном потенциале МСК при переходе в ТИК в виде пласта.

Нами были оценены три основных направления дифференцировки МСК: остео-, хондро- и адипогенное (рисунок 18, А). Мы обнаружили, что МСК в составе КП эффективнее дифференцируются в остео- и хондрогенном направлениях по сравнению с монослойными культурами (рисунок 18). Различия эффективности дифференцировки МСК в адипогенном направлении между культурами достигали пограничных значений ($p = 0,06$), причем в КП имела тенденция к снижению эффективности адипогенной дифференцировки (рисунок 18, нижний ряд).

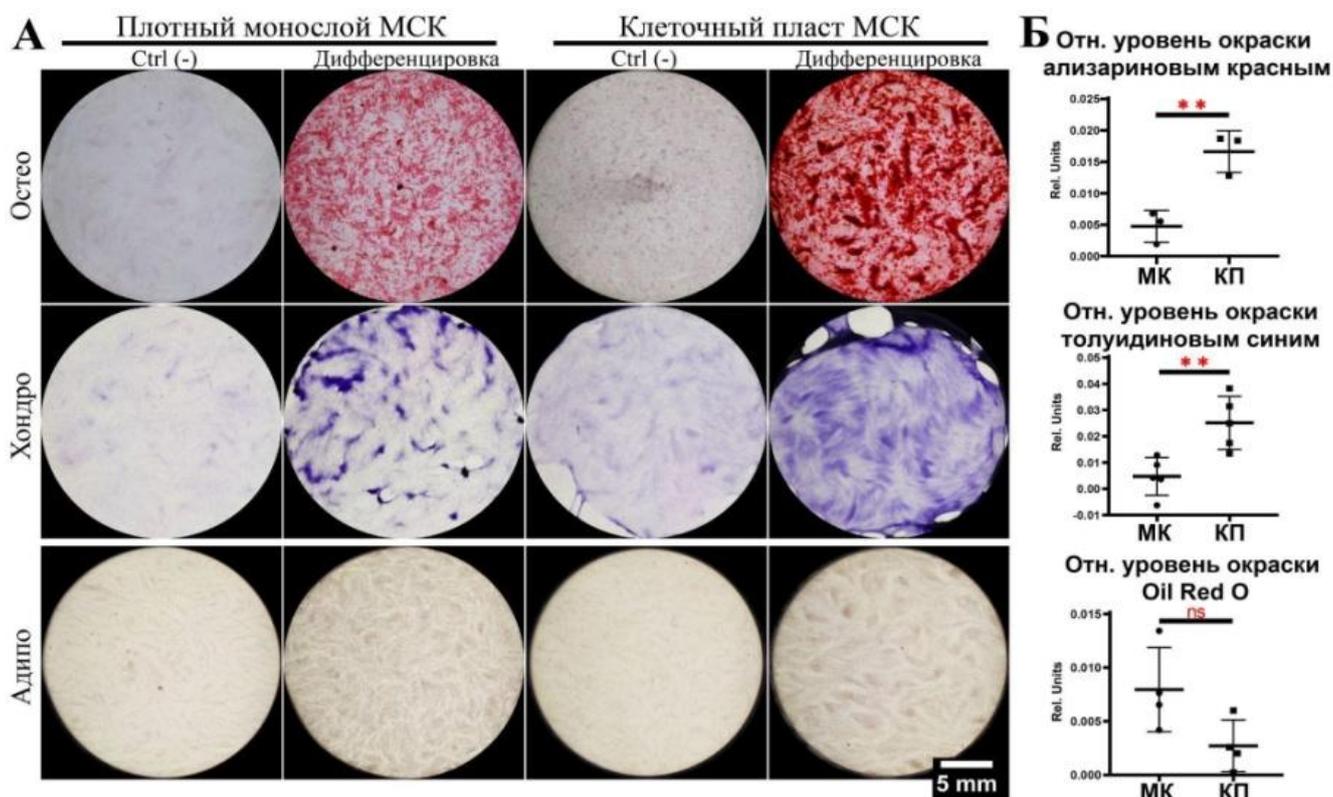


Рисунок 18 – Сравнительный анализ эффективности дифференцировки мезенхимных стромальных клеток (МСК) в составе клеточных пластов (КП) и в монослойных культурах (МК). Монослойные культуры и пласты, окрашенные на 15 день остеогенной дифференцировки, 21 день хондрогенной или 18 день адипогенной дифференцировки (А). Результаты сравнительного анализа содержания специфических красителей (Б) после окончания дифференцировки в монослойной культуре или в составе пласта ($n=3$). Окрашивание ализариновым красным, толуидиновым синим или Oil Red O

Таким образом, в составе пластов МСК усиливают индуцированную дифференцировку в направлениях, морфогенез которых зависит от конденсированного состояния мезенхимы, – остео- и хондрогенном. При этом мы не обнаружили усиления адипогенеза (рисунок 18, Б), что

говорило о предпочтительном пути дифференцировки в плотные СТ и в определенной степени воспроизводит основные черты конденсации мезенхимы при развитии и регенерации *in vivo*.

Получив эти данные, мы решили подробнее описать процесс сборки КП из монослойной культуры МСК. При цейтраферной съемке в ходе формирования КП мы отметили формирование областей повышенной плотности из гомогенно выглядящей культуры иммортализованных МСК (ASC52telo). Было обнаружено, что формирование этих областей имеет характер спонтанной компактизации - концентрической миграции МСК с активной пролиферацией клеток, начиная с 7-8 дня. Области высокой плотности, получившие название «компактных», стабилизировались к 9-11 дням и сохранялись в готовой к снятию ТИК в окружении областей низкой плотности, получивших название «разреженных».

Ход самоорганизации МСК в составе КП показал определенное сходство компактизации МСК *in vitro* с процессом конденсации мезенхимы. Отсутствие значимой представленности α -ГМА+ клеток после формирования КП указывает на то, что в данном состоянии они не приобретают фенотип миофибробластов и могут быть звеном эпиморфной регенерации, а не фиброобразования, для которого миофибробласты являются основным клеточным эффектором.

Проведя лазерную микродиссекцию КП и разделив области ТИК, мы обнаружили обогащение компактных областей КП коллагеном I типа с его относительным содержанием в 4 раза выше, чем в разреженных областях того же пласта. В то же время клеточный фибронектин был относительно равномерно распределен между исследованными областями КП. Таким образом, нами был установлен дифференциальный характер депонирования структурных белков ВКМ между областями КП с различной степенью компактизации МСК.

Коллаген I типа является основным белком ВКМ, подвергающимся минерализации, и на ранних этапах остеогенеза его депонирование критически важно для успешной оксификации в дальнейшем. В этой связи обнаруженное нами обогащение компактных областей КП коллагеном I типа до начала остеогенной дифференцировки может рассматриваться как ранний признак коммитирования клеток в этих областях.

Анализ транскриптома мезенхимных стромальных клеток разреженных и компактных областей клеточных пластов

Обнаруженные изменения эффективности дифференцировки и характера депонирования ВКМ, а также возможная связь с автономной способностью МСК к самоорганизации, которую мы рассматривали как аналог конденсации мезенхимы, потребовали оценки транскриптомного профиля клеток в составе КП. Этот метод позволяет построить гипотезы о возможных молекулярных механизмах и сигнальных осях, вовлеченных в процесс, а также сопоставить их с известными маркерами, характерными для конденсации мезенхимы.

Биоинформатический анализ данных РНК-секвенирования сгенерировал массивы дифференциально экспрессируемых генов (ДЭГ) компактных и разреженных областей КП, разделенных путем лазерной микродиссекции. Исследование с помощью алгоритма Reactome pathways указало на возможную связь компактизации МСК с активацией сигнального пути малых Rho-ГТФаз. Проверку данного предположения мы осуществляли *in vitro* с добавлением Y-27632 – химического ингибитора Rho-ассоциированных протеинкиназ 1 и 2 (ROCK-1/2).

Инкубация формирующихся КП с Y-27632 в концентрации 5 мкМ в течение 7, 10, 12 и 14 дней приводила к значимому уменьшению количества компактных областей в конечной точке (14 дней). При этом инкубация в течение 2 или 5 последних дней формирования КП не оказала

влияния на количество компактных областей к 14 дню (рисунок 19. А, Б). Активность сигнального пути малых Rho-ГТФаз способна влиять на пролиферацию клеток, в связи с чем мы оценили действие ингибитора ROCK-1/2 на количество клеток в составе КП. Для этого нами был проведен анализ удельного содержания ДНК в лизатах формирующихся КП на соответствующей временной точке.

В результате этого мы показали, что внесение Y-27632 на любом сроке формирования КП приводило к статистически значимому снижению содержания ДНК по сравнению с контрольной культурой (ДМСО), что говорит о подавлении пролиферации МСК (рисунок 19, В). В целом, связанное с подавлением пролиферации снижение содержания ДНК было равномерным среди проанализированных точек и не зависело от продолжительности инкубации формирующегося КП с Y-27632 (рисунок 19, В).

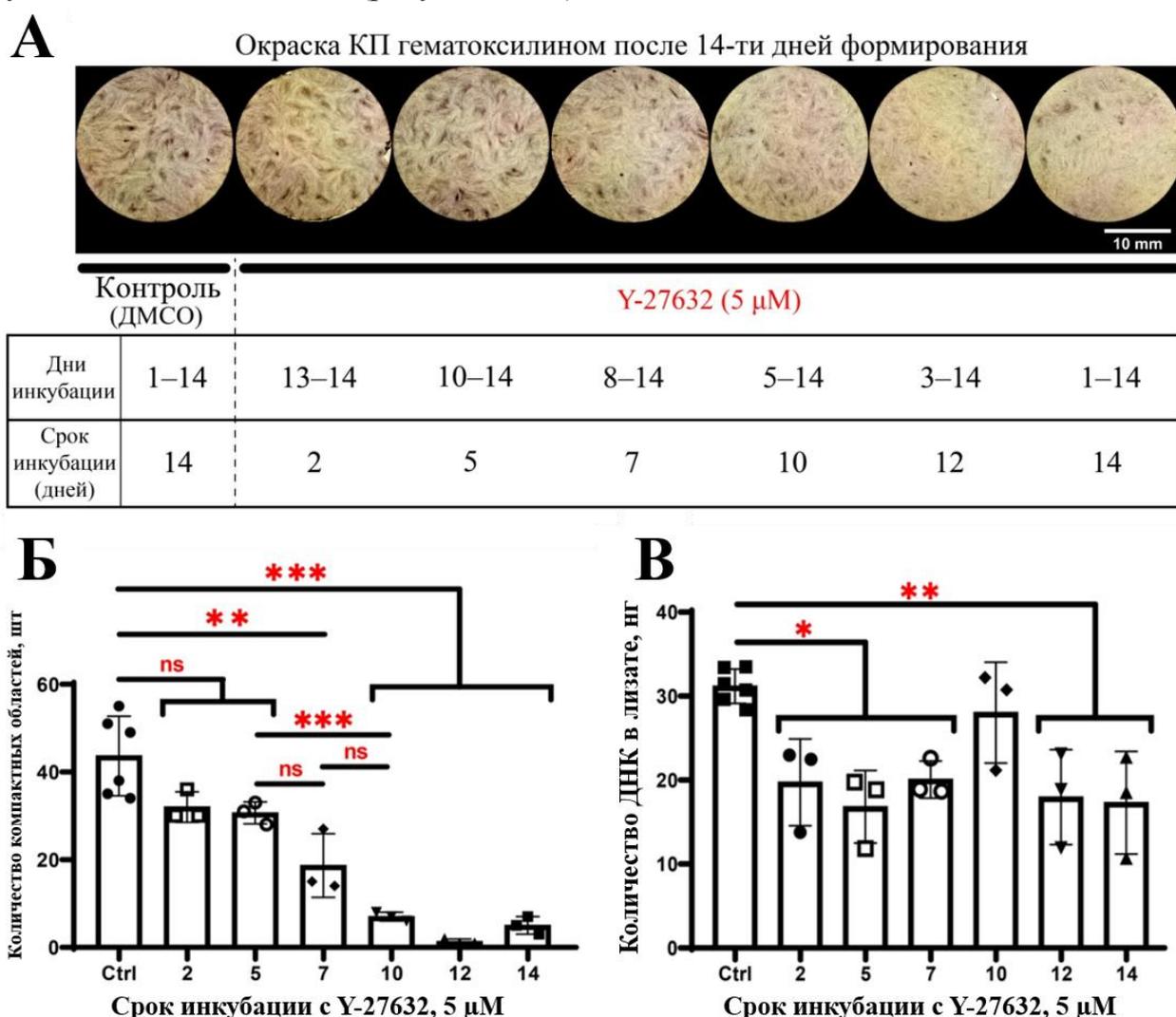


Рисунок 19 – Формирование компактных областей клеточных пластов (КП) нарушается при подавлении активности Rho-ассоциированных протеинкиназ 1 и 2 (ROCK-1/2). Общий вид клеточного пласта на 14 день инкубации с Y-27632 (А); окрашивание гематоксилином; сравнительный анализ количества компактных областей при ингибировании ROCK-1/2 разной продолжительности (Б). Количество компактных областей к 14 дню снижается при ингибировании ROCK-1/2 (Y-27632) на ранних (первые 7 дней) стадиях формирования пласта; (В) сравнительный анализ количества ДНК в лизатах культур

Наши результаты подтвердили, что Rho-ассоциированные протеинкиназы 1 и 2 (ROCK-1/2) являются необходимыми для инициации и процесса компактизации. Активность ROCK-1/2 не оказалась критическим фактором для поддержания компактного состояния МСК после

завершения этого процесса. Показанная нами зависимость процесса компактизации подтвердила сходство ее механизмов с процессами конденсации мезенхимы *in vivo*, играющими ключевую роль в морфогенезе тканей, составляющих основу опорно-двигательной системы (костей, хрящей, связочного аппарата). Опираясь на это, мы выдвинули предположение о роли сигнального пути малых Rho-ГТФаз в регуляции хондрогенной дифференцировки МСК, усиление которой мы наблюдали в компактных областях.

Выяснение вклада активности сигнального пути малых Rho-ГТФаз в хондрогенную дифференцировку МСК в составе КП потребовало ингибиторного анализа. Для этого был использован стандартный протокол дифференцировки МСК в хондроцитарном направлении с добавлением ингибитора Rho-ассоциированных протеинкиназ ROCK-1/2. В результате оценки (рисунок 20) мы установили, что в таких условиях происходит нивелирование усиления хондрогенной дифференцировки МСК, которое было характерно для КП по сравнению с монослойной культурой. Таким образом, мы установили, что в составе КП повышение эффективности дифференцировки МСК в хондрогенном направлении опосредовано активностью сигнального пути малых Rho-ГТФаз в МСК компактных областей. Эти результаты согласуются с данными литературы о роли сигнального пути малых Rho-ГТФаз в регуляции хондрогенной дифференцировки.

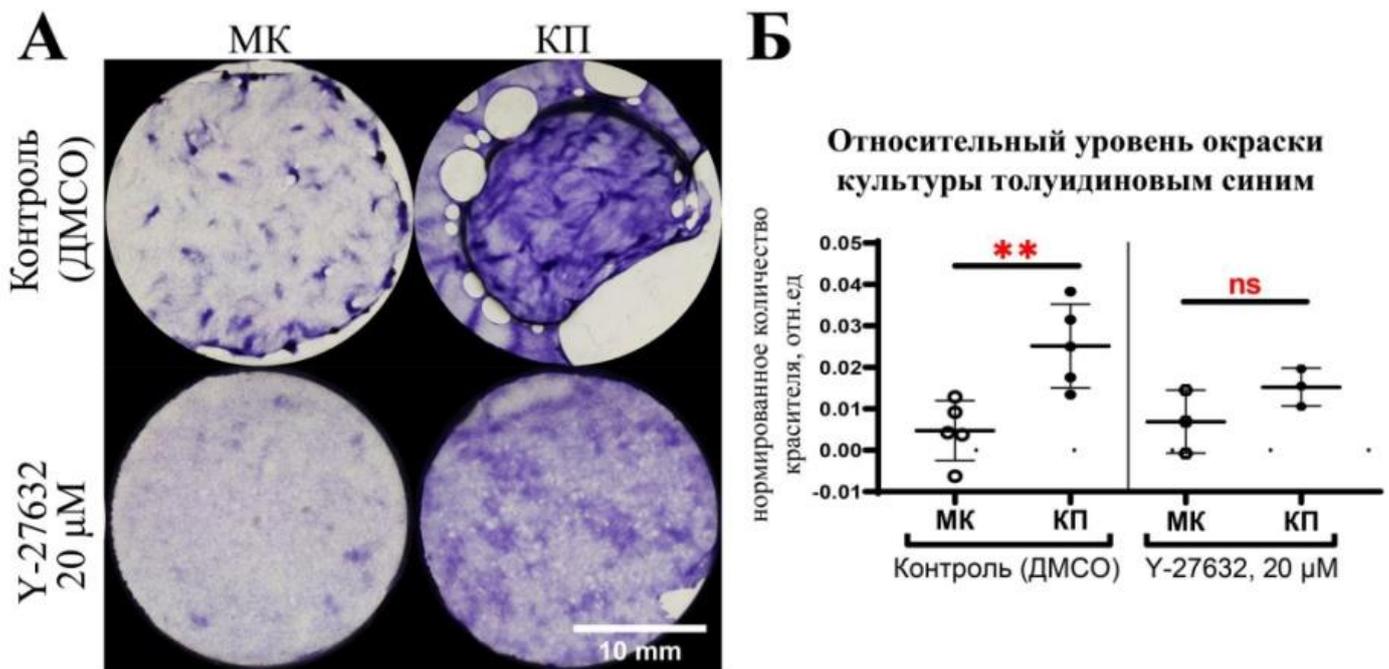


Рисунок 20 – Ингибирование Rho-ассоциированных протеинкиназ 1 и 2 (ROCK-1/2) нивелирует увеличение эффективности хондрогенной дифференцировки мезенхимных стромальных клеток в составе пластов. Монослойная культура (МК) и клеточный пласт (КП), окрашенные толуидиновым синим (А) на 21 день хондрогенной дифференцировки; на фотографиях приведена поверхность лунки 12-луночного планшета после индукции дифференцировки в контрольной культуре или при добавлении ингибитора ROCK-1/2 (Y-27632); анализ нормированного количества толуидинового синего (Б) после хондрогенной дифференцировки в присутствии Y-27632

Биоинформатический анализ показал, что среди даунрегулируемых в компактных областях генов значимая часть ($n=13$, около 8% от общего числа подавленных ДЭГ) регулируется стерол-зависимым фактором-1 SREBP-1. Он является одним из ключевых регуляторов транскрипции генов, продукты которых контролируют синтез и липидов, а его

активность необходима для их накопления в ходе адипогенной дифференцировки МСК (Fujii, N., 2017). Выявленная нами транскриптомная сигнатура, указавшая на подавление активности транскрипционного фактора SREBP-1 в компактных областях КП соответствовала результатам анализа дифференцировки МСК (рисунок 18).

Мы провели эксперименты по адипогенной дифференцировке в присутствии Y-27632 (20 мкМ) и бетулина (20 мкМ), блокирующего созревание SREBP-1. Ингибирование ROCK-1/2 в ходе адипогенной дифференцировки монослойной культуры привело к значимому росту ее эффективности, оцениваемой по содержанию липофильного красителя Oil Red O, связывающегося с липидными включениями, а добавление сочетания Y-27632+бетулин (т.е. дополнительное подавление SREBP-1) нивелировало этот эффект (рисунок 21, А).

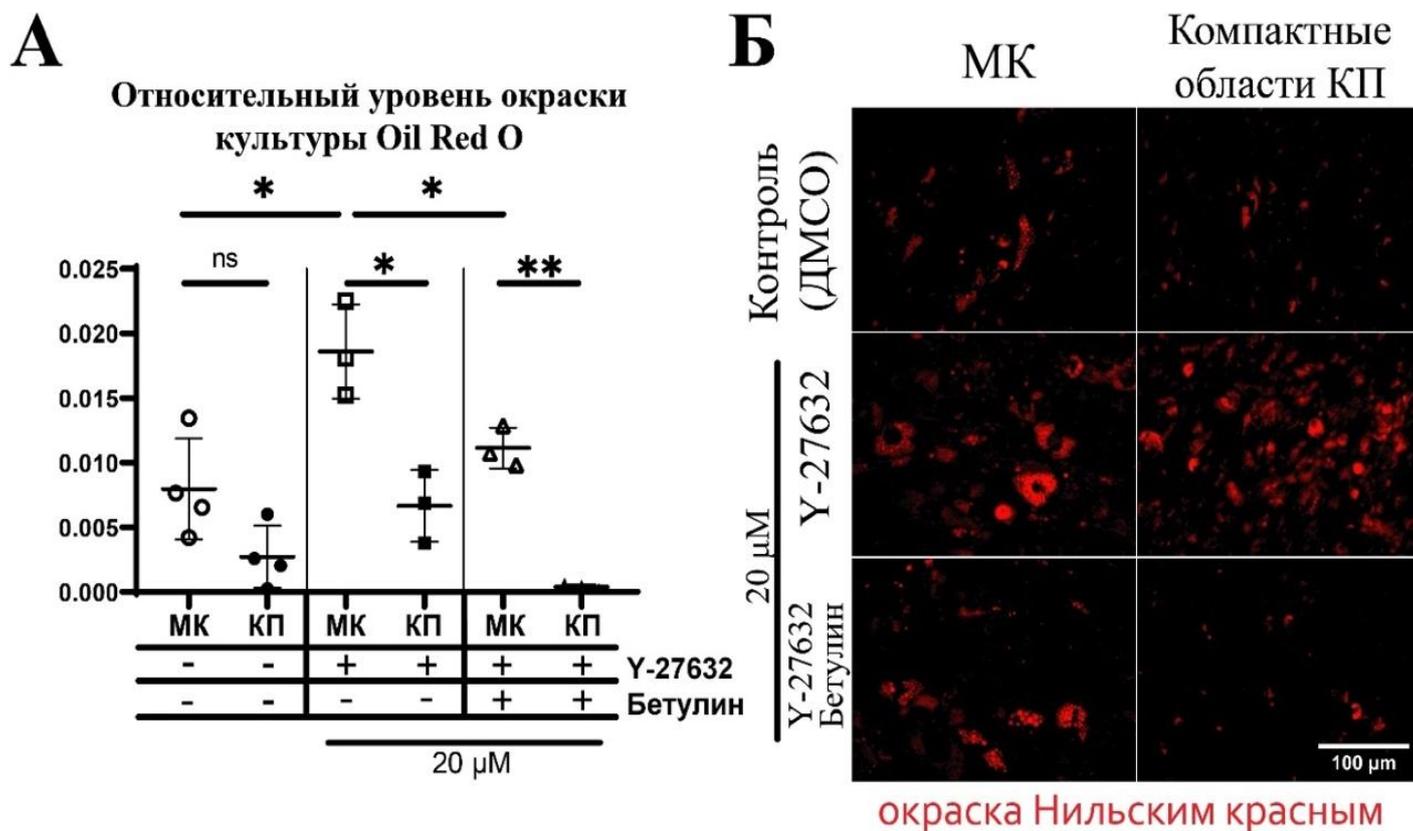


Рисунок 21 – Эффективность адипогенной дифференцировки увеличивается в компактных областях клеточных пластов (КП) при подавлении активности Rho-ассоциированных протеинкиназ 1 и 2 (ROCK-1/2). Сравнительный анализ эффективности адипогенеза (А) в монослойной культуре (МК) и клеточных пластах на фоне подавления активности ROCK-1/2 и SREBP-1 (бетулин); после дифференцировки липофильный краситель Oil Red O экстрагирован для измерения оптической плотности с нормализацией на количество ДНК; липидные капли, окрашенные нильским красным (Nile Red) в монослойных культурах и в компактных областях (Б) после адипогенной дифференцировки на фоне подавления ROCK-1/2 и стерол-зависимого фактора-1 (SREBP-1); флуоресцентная микроскопия, ув. x50

Для визуализации изменений адипогенной дифференцировки в КП, характеризующихся наличием компактных областей, мы прибегли к окраске липидных капель красителем Нильский красный (Nile Red) с последующей микроскопией. Мы обнаружили рост накопления липидов в компактных областях КП на фоне добавления Y-27632 в ходе адипогенной дифференцировки (рисунок 21, Б). Внесение комбинации Y-27632+бетулин е приводило к подавлению накопления липидов МСК в компактных областях КП аналогично тому, как это происходило в монослойной культуре (рисунок 21, А). Таким образом, мы подтвердили локальный характер

обнаруженных нами Rho-зависимых изменений активности адипогенеза и их связь с регуляцией транскрипционного фактора SREBP-1.

На основании полученных нами результатов можно представить механизм Rho-зависимого подавления активности адипогенного фактора SREBP-1 в виде схемы (рисунок 22).

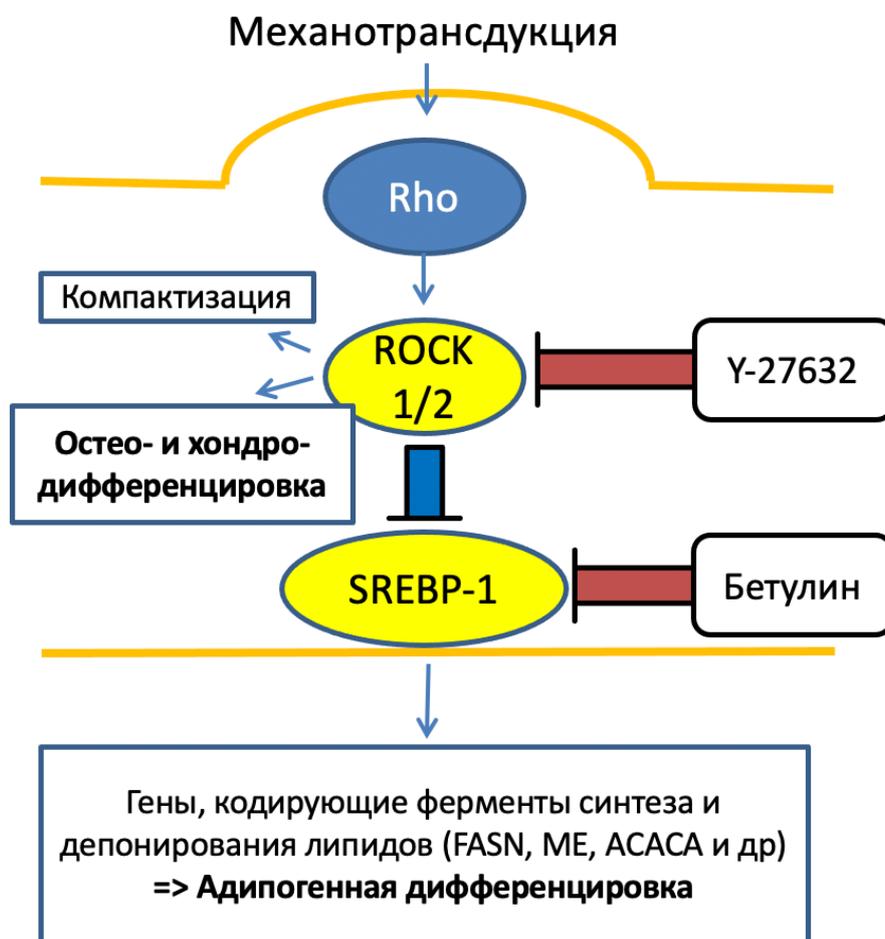


Рисунок 22 – Схематическое изображение установленного механизма участия Rho-ассоциированных протеинкиназ 1 и 2 (ROCK-1/2) и стерол-зависимого фактора-1 (SREBP-1) в коммитировании мезенхимных стромальных клеток (МСК) в компактных областях клеточных пластов (FASN – синтаза жирных кислот, ME – малик-фермент, ACACA – ацетил-коэнзим А карбоксилаза 1)

Подводя общий итог этой части работы, можно сказать, что нами было обнаружено несколько важных свойств ТИК в виде пластов из МСК, которые в будущем могут быть использованы для создания методов тканевой инженерии:

1. Было показано, что в составе КП МСК ЖТ спонтанно коммитируются в направлении плотных СТ (кости и хряща), но не жировой ткани, что нашло свое отражение при оценке индуцированной дифференцировки.

2. При сборке КП была обнаружена спонтанная компактизация МСК, которая по ряду признаков позволяет соотнести ее с процессами конденсации мезенхимы, идущими в ходе развития, роста и при заживлении переломов костей.

3. Транскриптомный анализ показал существенные изменения экспрессии генов при переходе МСК из монослоя в форму пласта, а также выраженные отличия компактных и разреженных областей в пределах одной конструкции. Такие данные говорят о формировании

гетерогенности микроокружения и анизотропии условий, которая ранее не была установлена для ТИК в виде пластов клеток.

4. Условия компактных областей характеризуются высоким депонированием коллагена I, спонтанным повышением активности ЩФ и, таким образом, могут способствовать остеогенезу, усиление которого в опытах с дифференцировкой было наиболее выраженным именно в компактных областях.

5. Усиление хондрогенной дифференцировки МСК в составе КП нивелировалось ингибирование ROCK-1/2, т.е. было Rho-зависимым, что характерно для нативных процессов конденсации мезенхимы при формировании хрящевой ткани.

6. Расшифрованный молекулярный механизм ингибирования адипогенной дифференцировки МСК при компактизации и сборке КП включает Rho-зависимый регуляторный каскад, итогом которого является подавление созревания SREBP-1 – ключевого транскрипционного регулятора финальных этапов адипогенеза.

Полученные данные не только позволяют предлагать использование КП для моделирования и исследования процессов конденсации постнатальной мезенхимы, но и существенно расширяют наши представления о состоянии МСК в составе таких конструкций. Расшифровка механизмов регуляции дифференцировки МСК в составе КП открывает возможности для управления этим процессом с целью получения эффективных конструкций для замещения дефектов костной ткани и хрящей, а также создания новых методов ТИ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе было проведено комплексное исследование, направленное на экспериментальную разработку и обоснование применения в регенеративной медицине минимальных тканеинженерных конструкций в виде пластов из мезенхимных стромальных клеток. Оптимизация протоколов позволила подобрать плотности стартовой культуры мезенхимных стромальных клеток человека, мыши и крысы, при которых в течение 7-10 суток можно получить пласт, готовый к откреплению с помощью обработки раствором Версена и механическим отделением от посуды.

Мы оценили связь характеристик донора (пола, возраста) и культур первичных мезенхимных стромальных клеток (времени удвоения, лаг-фазы) с продолжительностью сборки клеточных пластов. Оказалось, что пол и возраст донора не коррелируют с длительностью сборки, в то время как из двух параметров, описывающих поведение клеток *in vitro*, только лаг-фаза показала средней силы корреляцию с продолжительностью сборки. Ее оценка в культуре позволит корректировать сроки подготовки конструкций для плановых вмешательств и может быть частью регламента производства клеточных пластов.

Полученная гистологическая характеристика конструкций выявила депонирование значимых количеств компонентов внеклеточного матрикса (коллагена I, III и IV, а также фибронектина и ламинина) в составе клеточных пластов, толщина которых в прикрепленном виде составила 35-40 мкм. При такой толщине клеточных сохраняется возможность диффузии в достаточном количестве O₂ и содержащихся в культуральной среде нутриентов.

Наличие белков внеклеточного матрикса позволило провести химическую децеллюляризацию клеточных пластов и получить образцы внеклеточного матрикса. Оптимальные результаты были получены при использовании дезоксихолата натрия 0,5% и 3-((3-холамидопропил)диметиламмоний)-1-пропансульфоната 0,5%.

Образцы децеллюляризованного матрикса могут использоваться для исследования его роли в регуляции функций и дифференцировки мезенхимных стромальных клеток, а также в качестве скаффолдов для тканевой инженерии или культуральных работ.

Отработав протоколы получения клеточных пластов и проведя их комплексную характеристику, мы перешли к оценке их регенераторного потенциала на животных моделях. В ходе этой работы мы сфокусировались на состояниях, которые оказались недостаточно подробно разработаны с точки зрения применения клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток.

Первый цикл работ был посвящен оценке эффективности и выяснению механизма действия клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток жировой ткани при трансплантации для стимуляции заживления дефектов мягких тканей. Нами было получено два важных результата: 1) трансплантация пластов из мезенхимных стромальных клеток превосходила инъекцию эквивалентной по количеству клеток суспензии мезенхимных стромальных клеток по способности стимулировать закрытие дефекта мягких тканей и 2) наиболее выраженные изменения при этом затрагивали процесс формирования и созревания грануляционной ткани в зоне дефекта. На модели острой раны с дефицитом тканей заживление завершалось формированием рубца, однако с учетом быстрого восстановления барьерной функции покровов после трансплантации клеточного пласта это можно отнести к положительным результатам.

На модели пролежневого дефекта после трансплантации клеточного пласта был получен впечатляющий результат в виде полной регенерации дермы и придатков кожи (желез и волосяных луковиц) к 21 дню. Этот результат соотносился с гистологическими данными, которые подтвердили близкую к нормальной структуру дермы в области зажившего декубитального дефекта. Тем удивительнее оказалось, что время удержания конструкции на поверхности пролежневого дефекта не превышало 7 суток. Кратковременное удержание пластов в дефекта в совокупности с выраженным регенераторным эффектом, описанным выше, позволило сделать вывод о паракринном действии клеточных пластов, которое мы определили как «триггерное». Под этим термином имеется в виду мощное воздействие продуцируемого клеточными пластами секрета в течение 3-5 суток, которое задает направление процессу заживления. Этого кратковременного воздействия, вероятно, оказывается достаточно для обеспечения эпиморфной регенерации кожи.

На уровне ткани наиболее вероятными мишенями триггерного эффекта с учетом локальной диффузии секрета являются грануляционная ткань и входящие в ее состав кровеносные сосуды. Стабилизация последних может вносить вклад в уменьшение фиброза и способствовать полной регенерации дермы, которую мы наблюдали после трансплантации клеточных пластов на модели пролежневого дефекта.

Опираясь на полученный профиль секрета мезенхимных стромальных клеток, а также на данные о его влиянии на ангиогенез и рост ткани, мы предприняли попытку оценить ангиогенную эффективность конструкций на модели ишемии задней конечности у мыши.

Ключевым результатом с точки зрения функционального исхода стало увеличение перфузии ишемизированной задней конечности мыши после трансплантации клеточных пластов, которое на 14 день было максимальным среди всех групп и превосходило показатели в группе инъекции

мезенхимных стромальных клеток. Данные лазер-доплеровского сканирования были подкреплены гистологическим исследованием, которое выявило рост плотности капилляров и уменьшение площади некроза. Суспензионное введение мезенхимных стромальных клеток также оказало выраженный эффект на плотность сосудов и снижение некроза скелетных мышц, однако уступало трансплантации клеточных пластов.

Нам удалось показать не только преимущество клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток перед введением суспензии в ишемизированную скелетную мышцу, но и охарактеризовать состояние конструкций после подкожной трансплантации. На 14 день мы обнаружили признаки их интеграции: наличие капиллярных сосудов, пролиферирующих клеток, в т.ч. и несущих метку, внесенную перед трансплантацией клеточных пластов. Встречаемость клеток с признаками активации апоптоза была невысокой (<10%), что говорило о высокой жизнеспособности мезенхимных стромальных клеток в ее составе. Приведенные данные в значительной степени расширяют возможности использования клеточных пластов по ряду показаний, актуальных для кардиологии и сосудистой хирургии.

Принимая во внимание преимущественно паракринный механизм действия клеточных пластов, мы предприняли попытку обогатить его состав ангиогенным фактором роста VEGF165 с помощью вирусной трансдукции и таким образом расширить возможности созданной платформы. Для решения этой задачи мы использовали бакуловирусную двухкомпонентную систему для доставки последовательности, кодирующей VEGF165 человека. Оптимизация условий трансдукции позволила добиться высокой эффективности в отношении мезенхимных стромальных клеток жировой ткани и пластов из них. Концентрация VEGF165 составила 20-25 нг/мл/10⁵ клеток в составе пласта, что говорило об успешном обогащении секрета этим ангиогенным фактором роста.

В опыте на модели ишемии задней конечности у мыши мы обнаружили, что трансплантация клеточных пластов, экспрессирующих VEGF165, приводила к приросту перфузии конечности, превосходя как ложно-трансдуцированные клеточные пласты, так и введение суспензии мезенхимных стромальных клеток в виде инъекции. При анализе удержания трансплантированного клеточного пласта мы также обнаружили признаки его васкуляризации и не обнаружили усиления инвазии клеток моноцитарного ряда или апоптоза клеток в составе генетически модифицированных пластов. Аналогично мы не обнаружили роста доли пролиферирующих клеток в модифицированных пластах, что сняло вопрос о потенциально небезопасном митогенном действии VEGF165.

Вопрос о происхождении сосудов, появляющихся в толще трансплантированного пласта, остается открытым. По нашим представлениям наиболее вероятной является васкуляризация за счет прорастания капилляров из тканей реципиента по аналогии с тем, как это происходит с бесклеточными конструкциями на основе белков матрикса. При этом несомненным является вклад действия секрета мезенхимных стромальных клеток на формирование и стабилизацию кровеносных сосудов.

Анализ гистологических показателей подтвердил преимущество модифицированных клеточных пластов как по плотности капилляров, так и по уменьшению доли некротизированных мышечных волокон. Таким образом, нами было показана применимость стратегии генетической модификации для обогащения секрета мезенхимных стромальных клеток и установлена ее эффективность как метода стимуляции ангиогенеза в ишемизированной мышце.

В составе клеточных пластов нами установлено повышение эффективности дифференцировки мезенхимных стромальных клеток в остео- и хондрогенном направлениях при незначимых изменениях адипогенеза. Такого рода результаты указывают, скорее, на реализацию определенной программы, активируемой при формировании клеточных пластов, нежели на кумулятивный эффект количества клеток и накопленных факторов окружения в составе конструкции. Выбор мезенхимными стромальными клетками предпочтительных направлений дифференцировки позволил сделать вывод об их коммитировании в сторону формирования плотных соединительных тканей, что хорошо соотносилось с дальнейшими результатами.

Детальный анализ самоорганизации мезенхимных стромальных клеток в ходе формирования клеточных пластов показал образование двух типов областей – с высокой и низкой плотностью клеток, которые в рамках работы называли «компактными» и «разреженными» соответственно.

Разделив компактные и разреженные области клеточных пластов с помощью лазерной микродиссекции, мы провели их РНК-секвенирование. Биоинформатический анализ полученных данных показал, что в компактных областях имелись признаки высокой активности сигнального пути малых Rho-ГТФаз и признаки подавления активности транскрипционного регулятора адипогенеза SREBP-1. Дальнейшая экспериментальная валидация подтвердила эти находки, а также показала, что паттерн организации мезенхимных стромальных клеток в виде компактных и разреженных областей определяется активностью ROCK-1/2 равно как и наблюдавшееся нами в составе клеточных пластов усиление хондрогенеза. Подавление активности SREBP-1, которое объясняло отсутствие усиления адипогенной дифференцировки в составе клеточных пластов, оказалось частью даунстрим действия сигнального пути малых Rho-ГТФаз, что дополнило картину молекулярного механизма наблюдавшихся нами эффектов.

Все перечисленные признаки, а также морфологическая картина роднят описанный нами процесс самоорганизации мезенхимных стромальных клеток в ходе формирования клеточных пластов с фундаментальным морфогенетическим событием – конденсацией мезенхимы (Ray, P., 2015). Выявленная реорганизация цитоскелета, ключевой вклад малых Rho-ГТФаз, а также коммитирование клеток с предпочтительным путем дифференцировки в плотные соединительные ткани являются типичными признаками конденсации мезенхимных клеток в ходе формирования опорно-двигательного аппарата и при заживлении переломов (Dunlop, L.L., 1995). С прикладной точки зрения обнаруженные изменения дифференцировки мезенхимных стромальных клеток, которые мы описали как коммитирование в сторону тканей опорно-двигательного аппарата, объясняют доклинические результаты об их эффективности мезенхимных для восстановления костной ткани и хрящей.

В целом, проведенное исследование обосновывает статус клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток как платформы в тканевой инженерии. В пользу этого дополнительно говорят простота получения и воспроизводимость состава, возможность децеллюляризации, применимость по широкому спектру показаний и возможность генетической модификации клеточных пластов. Наконец, убедительное преимущество клеточных пластов над суспензионным введением даже при краткосрочном удержании конструкции на поверхностных дефектах позволяет рассматривать их как более совершенный способ применения мезенхимных стромальных клеток в регенеративной медицине.

ВЫВОДЫ

1. Получаемые по разработанному протоколу клеточные пласты из мезенхимных стромальных клеток жировой ткани человека и животных являются многослойными тканеинженерными конструкциями, обогащенными внеклеточным матриксом, что позволяет откреплять их от культуральных емкостей без ферментативной обработки или термочувствительных покрытий, а также получать децеллюляризованные скаффолды, содержащие депонированные структурные белки внеклеточного матрикса.
2. Продолжительность сборки клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток жировой ткани человека коррелирует с длительностью лаг-фазы культуры на пассаже, предшествующем началу сборки, однако не зависит от пола, возраста донора или времени удвоения клеточной популяции.
3. При глубоких ранах кожи с дефицитом мягких тканей экспериментально подтверждено преимущество трансплантации клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток, заключающееся в ускорении закрытия дефектов мягких тканей по сравнению с инъекционным введением эквивалентного количества клеток, однако заживление завершилось образованием рубца.
4. Установлено, что трансплантация клеточного пласта из мезенхимных стромальных клеток на поверхность пролежневого дефекта приводит к заживлению без образования рубца с восстановлением гистологической структуры кожи, чего не наблюдалось после введения суспензии мезенхимных стромальных клеток или их секрета.
5. Кратковременное (от 3 до 7 дней) удержание клеточного пласта из мезенхимных стромальных клеток на поверхности пролежневого дефекта приводит к заживлению без образования рубца к 21 дню, что указывает на паракринное влияние конструкций на ранние этапы заживления как основу дальнейшей регенерации.
6. Трансплантация клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток ускоряет созревание и ремоделирование подлежащей грануляционной ткани, а также стимулирует формирование в ее толще стабильных кровеносных сосудов за счет паракринного действия секрета пластов, обогащенного факторами, вызывающими стабилизацию сосудов, но не активацию ангиогенеза.
7. Трансплантация клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток является эффективным методом терапевтического ангиогенеза при ишемии конечности и превосходит инъекционное введение по показателям скорости кровотока, васкуляризации и защиты скелетных мышц от некроза.
8. Модификация клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток с помощью двухкомпонентной бакуловирусной системы приводит к обогащению секрета ангиогенным фактором VEGF165, что значительно увеличивает эффективность пластов при ишемии конечности, иллюстрируя значимость паракринного действия конструкций на ткани реципиента.
9. Самоорганизация мезенхимных стромальных клеток в составе клеточного пласта и их коммитирование зависят от активности сигнального пути малых Rho-ГТФаз, что вкупе с данными транскриптомного анализа позволяет сделать вывод о схожести этих процессов с конденсацией мезенхимы, необходимой для формирования и регенерации плотных структур опорно-двигательного аппарата мезодермального происхождения – костей и хряща.
10. Формирование клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток сопровождается спонтанным образованием областей высокой плотности клеток, при котором происходит их коммитирование, в остео- и хондрогенном направлениях, опосредованное ростом активности сигнального пути малых Rho-ГТФаз и подавлением транскрипционного фактора SREBP-1.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для получения пригодных для трансплантации клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток человека рекомендуется оптимальная плотность стартовой культуры 50 тыс. клеток/см² с добавлением в среду роста 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты с культивированием в стандартных условиях не менее 7 суток.
2. В качестве метода прогнозирования длительности сборки конструкции целесообразно проведение промежуточной оценки лаг-фазы в культуре мезенхимных стромальных клеток с помощью автоматизированных систем, рассчитывающих кривую роста клеточной культуры на пассаже перед сборкой клеточного пласта.
3. Для децеллюляризации клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток оптимальным представляется последовательное использование дезоксихолата натрия 0,5% или CHAPS 0,5% с дальнейшей обработкой ДНКазой I с целью уменьшения содержания остаточной ДНК в составе полученного матрикса.
4. Регенераторный потенциал клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток реализуется за счет паракринного действия даже при кратковременном (3-7 суток) нахождении конструкции на поверхности пролежня кожи, что позволяет проводить необходимую хирургическую обработку после трансплантации.
5. При ишемии нижних конечностей трансплантацию клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток целесообразно использовать в качестве метода терапевтического ангиогенеза, направленного на увеличение васкуляризации, восстановление перфузии и уменьшение некроза скелетных мышц.
6. Для трансдукции клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток с использованием рекомбинантных бакуловирусных векторов оптимальным является использование фосфатных буферов (в частности, раствора Хэнкса) с последующей стимуляцией бутиратом натрия (5мМ) в течение 15 часов.
7. Разработанный протокол модификации клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток позволяет добиться экспрессии целевого фактора роста VEGF165 на уровне 22-25 нг/мл/10⁵ клеток через 48 часов после трансдукции.
8. С учетом коммитированного статуса мезенхимных стромальных клеток в составе клеточных пластов целесообразна их трансплантация в качестве основного или дополнительного метода восстановления костной и хрящевой тканей человека.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Терапевтический ангиогенез с применением факторов роста: современное состояние и перспективы развития / П.И. Макаревич, К.А. Рубина, Д. Дыйканов, Ткачук В.А., Парфёнова Е.В. // Кардиология. – 2015. – Т. 55. – №. 9. – С. 59-71.
2. Трансплантация клеточных пластов из мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани эффективно индуцирует ангиогенез в ишемизированных скелетных мышцах / П.И. Макаревич, М.А. Болдырева, К.В. Дергилёв, Е.В. Глуханюк, А.Ю. Ефименко, В.А. Ткачук, Е.В. Парфёнова // Гены и клетки. – 2015. – Т. 10. – №. 3. – С. 68-77.
3. Тканеинженерные конструкции на основе пластов клеток для регенеративной медицины / К.В. Дергилев, П.И. Макаревич, М.Ю. Меньшиков // Гены и клетки. – 2016. – V. 11. – №. 3. – P. 23-32.
4. Клеточные пласты из мезенхимных стромальных клеток жировой ткани человека и получение препаратов внеклеточного матрикса методом децеллюляризации / П.П. Нибирицкий, Т.А. Дусь, О.А. Григорьева, Г.Д. Сагарадзе, А.Ю. Ефименко, П.И. Макаревич // Технологии живых систем. – 2016. – Т. 13. – №. 6. – С. 4-13.
5. Ниша стволовой клетки / П.П. Нибирицкий, Г.Д. Сагарадзе, А.Ю. Ефименко, П.И. Макаревич, В.А. Ткачук // Цитология. – 2018. – Т. 60. – №. 8. – С. 575-586.
6. Сыворотка менструальной крови оказывает противофиброзное действие на мезенхимные стромальные клетки эндометрия человека / Р.Ю. Еремичев, О.А. Макаревич, Н.А. Александровская, К.Ю. Кулебякин, Д.Т. Дыйканов, П.И. Макаревич // Цитология. – 2018. – Т. 60. – №. 2. – С. 96-103.
7. Растворимые факторы, образуемые при заживлении эндометрия, подавляют его "фиброзирование" *in vitro* / Р.Ю. Еремичев, О.А. Григорьева, К.Ю. Кулебякин, А.Ю. Ефименко, П.И. Макаревич // Гены и клетки. – 2018. – Т. 13. – №. 2. – С. 63-66.
8. Биохимическая регуляция регенеративных процессов факторами роста и цитокинами: основные механизмы и значимость для регенеративной медицины / П.И. Макаревич, А.Ю. Ефименко, В.А. Ткачук // Биохимия. – 2020. – Т. 85. – №. 1. – С. 15-33.
9. Enhanced angiogenesis in ischemic skeletal muscle after transplantation of cell sheets from baculovirus-transduced adipose-derived stromal cells expressing VEGF165 / P.I. Makarevich, M.A. Boldyreva, E.V. Gluhanyuk [et al.] // Stem Cell Res Ther. – 2015. – V. 6. – P. 204.
10. Regulation of adipose tissue stem cells angiogenic potential by tumor necrosis factor-alpha / E.S. Zubkova, I.B. Beloglazova, P.I. Makarevich [et al.] // J Cell Biochem. – 2016. – V. 117. – №. 1. – P. 180-196.
11. P. Makarevich, Y. Parfyonova, Therapeutic angiogenesis: foundations and practical application. In Physiologic and pathologic angiogenesis, Dan, S.; S. Agneta, Eds. IntechOpen: Rijeka, 2017; p Ch. 17.
12. Comparison of cardiac stem cell sheets detached by Versene solution and from thermoresponsive dishes reveals similar properties of constructs / K.V. Dergilev, P.I. Makarevich, Z.I. Tsokolaeva [et al.] // Tissue Cell. – 2017. – V. 49. – №. 1. – P. 64-71.
13. Adipose-derived stem cell sheets functionalized by hybrid baculovirus for prolonged GDNF expression and improved nerve regeneration / M.N. Hsu, H.T. Liao, K.C. Li, ..., P.I. Makarevich [et al.] // Biomaterials. – 2017. – V. 140. – P. 189-200.
14. C-kit cardiac progenitor cell based cell sheet improves vascularization and attenuates cardiac remodeling following myocardial infarction in rats / K. Dergilev, Z. Tsokolaeva, P. Makarevich [et al.] // Biomed Res Int. – 2018. – V. 2018. – P. 3536854.

15. CRISPR-based activation of endogenous neurotrophic genes in adipose stem cell sheets to stimulate peripheral nerve regeneration / M.N. Hsu, H.T. Liao, V.A. Truong, ..., P.I. Makarevich [et al.] // *Theranostics*. – 2019. – V. 9. – №. 21. – P. 6099-6111.
16. Unveiling mesenchymal stromal cells' organizing function in regeneration / P.P. Nimiritsky, R.Y. Eremichev, N.A. Alexandrushkina, ..., P.I. Makarevich// *Int J Mol Sci*. – 2019. – V. 20. – №. 4. – P. 823
17. Cell sheets of mesenchymal stromal cells effectively stimulate healing of deep soft tissue defects / N.A. Aleksandrushkina, N.V. Danilova, O.A. Grigorieva, ..., P.I. Makarevich // *Bull Exp Biol Med*. – 2019. – V. 167. – №. 1. – P. 159-163.
18. Transplantation of adipose stromal cell sheet producing hepatocyte growth factor induces pleiotropic effect in ischemic skeletal muscle / M.A. Boldyreva, E.K. Shevchenko, Y.D. Molokotina, ..., P. Makarevich [et al.] // *Int J Mol Sci*. – 2019. – V. 20. – №. 12. –
19. Cell sheets from adipose tissue MSC induce healing of pressure ulcer and prevent fibrosis via trigger effects on granulation tissue growth and vascularization / N. Alexandrushkina, P. Nimiritsky, R. Eremichev, ..., P. Makarevich// *Int J Mol Sci*. – 2020. – V. 21. – №. 15. –
20. Hox-positive adult mesenchymal stromal cells: beyond positional Identity / M.A. Kulebyakina, P.I. Makarevich // *Front Cell Dev Biol*. – 2020. – V. 8. – P. 624.
21. Growth factors in regeneration and regenerative medicine: "the cure and the cause" / K.Y. Kulebyakin, P.P. Nimiritsky, P.I. Makarevich// *Front Endocrinol (Lausanne)*. – 2020. – V. 11. – P. 384.
22. Self-organization provides cell fate commitment in MSC sheet condensed areas via ROCK-dependent mechanism / P. Nimiritsky, E. Novoseletskaia, R. Eremichev, ... , P. Makarevich // *Biomedicines*. – 2021. – V. 9. – №. 9. – P. 1192.
23. Editorial: regulation of adult stem cells fate and function in natural and artificial microenvironments / P.I. Makarevich, Y.C. Hu // *Front Cell Dev Biol*. – 2022. – V. 10. – P. 955568.
24. Decreased insulin sensitivity in telomerase-immortalized mesenchymal stem cells affects efficacy and outcome of adipogenic differentiation in vitro / K. Kulebyakin, P. Tyurin-Kuzmin, A. Efimenko, ... P. Makarevich // *Front Cell Dev Biol*. – 2021. – V. 9. – P. 662078.
25. Scar-free healing of endometrium: tissue-specific program of stromal cells and its induction by soluble factors produced after damage / R. Eremichev, M. Kulebyakina, N. Alexandrushkina, ... P. Makarevich // *Front Cell Dev Biol*. – 2021. – V. 9. – P. 616893.

ПАТЕНТЫ НА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Ткачук В.А., Акопян Ж.А., Ефименко А.Ю., Григорьева О.А., Макаревич П.И., Нимирицкий П.П., Новоселецкая Е.С. Патент на изобретение RU 2718907 С1, 15.04.2020 «Биоматериал на основе бесклеточного матрикса, производимого мезенхимными стромальными клетками человека, способ его получения и способ применения для стимуляции регенеративных процессов»
2. Дергилев К.В., Цоколаева З.И., Макаревич П.И., Белоглазова И.Б., Зубкова Е.С., Болдырева М.А., Ратнер Е.И., Парфенова Е.В. Патент на изобретение RU 2636464 С2, 23.11.2017 «Способ получения и использования тканеинженерных конструкций на основе прогениторных клеток для лечения заболеваний сердца»

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ВД-А – дополнительный внеклеточный домен А
- ВКМ – внеклеточный матрикс
- ГСК – гематопозитическая стволовая клетка
- ГТ – грануляционная ткань
- КИНК – критическая ишемия нижних конечностей
- КП – клеточный пласт
- МСК – мезенхимные стромальные клетки
- ЖТ – жировая ткань
- ТИК – тканеинженерная конструкция
- ФБС – фетальная бычья сыворотка
- ФР – фактор роста
- ФСБ – фосфатно-солевой буфер
- ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота
- ВР – биологический процесс
- CHAPS – 3-((3-холамидопропил)диметиламмоний)-1-пропансульфонат
- DAPI – 4,6-диамиидно-2-фенилиндол
- FGF – фактор роста фибробластов
- HGF – фактор роста гепатоцитов
- IGF – инсулиноподобный фактор роста
- MF – молекулярные функции
- PDGF – тромбоцитарный фактор роста
- ROCK-1/2 – Rho-ассоциированные протеинкиназы 1 и 2
- SREBP1 – стерол-зависимый фактор-1
- VEGF – эндотелиальный фактор роста сосудов

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает свою искреннюю признательность своим учителям – научному консультанту диссертации академику РАН, д.б.н. Всеволоду Арсеньевичу Ткачуку и члену-корреспонденту РАН, д.м.н. Елене Викторовне Парфёновой за многолетнюю поддержку, доверие и наставничество, без которых эта работа была бы невозможной.

Я искренне признателен всем сотрудникам, аспирантам и студентам Кафедры биохимии и регенеративной медицины Факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, где я начал свой научный путь и Лаборатории ангиогенеза Института экспериментальной кардиологии Национального медицинского исследовательского центра имени ак. Е.И. Чазова, где я провел замечательные годы во время аспирантуры и с которыми сохраняю тесные научные и теплые человеческие отношения.

Огромный вклад в эту работу внесли мои самые близкие коллеги – сотрудники, аспиранты и студенты лабораторий Института регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного центра МГУ имени М.В. Ломоносова. Их перечисление заняло бы несколько страниц, и я просто хотел бы поблагодарить всех, кто помогал и поддерживал меня на этом пути делом, словом или идеями. В особенности я признателен нынешним и бывшим сотрудникам моей лаборатории – к.б.н. Н.А. Александровской, к.м.н. Р.Ю. Еремичеву, к.б.н. П.П. Нирицкому и к.б.н. Е.А. Слободкиной, чьими диссертационными работами мне посчастливилось руководить.

Отдельно я хотел бы поблагодарить мою напарницу и соратницу – к.м.н. Анастасию Юрьевну Ефименко и двух замечательных коллег, без организационной, моральной и человеческой помощи которых я бы не справился со многими задачами и ситуациями – к.м.н. Жанну Алексеевну Акопян и к.э.н. Елену Владимировну Тарасову.

В этой работе весомый вклад внесли мои российские и зарубежные коллабораторы, а решающий - коллеги из Медицинского научно-образовательного центра МГУ имени М.В. Ломоносова – начиная от его директора, академика РАН, д.м.н. Армаиса Альбертовича Камалова и заканчивая каждым сотрудником, врачом и аспирантом, с которым мне довелось работать в эти годы.

За первые дни работы в лаборатории я благодарен к.м.н. Л.М. Самоходской, при поддержке которой я делал первые шаги в науке. Невозможным был бы успех моей научной деятельности без участия университетских и школьных преподавателей, которые заложили базу для дальнейшего научного труда.

Я выражаю свою самую теплую благодарность моим родителям, чей вклад в мой выбор профессии и вуза был решающим и, наконец, безгранично признателен моей семье за поддержку, терпение и помощь, без которых эта работа не была бы завершена.