

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ М. В. ЛОМОНОСОВА»**

На правах рукописи

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

Диссертация

на соискание учёной степени доктора медицинских наук

научный консультант:

академик РАН Всеволод Арсеньевич Ткачук

Москва – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	8
ГЛАВА 1. ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ И СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ РАЗВИТИЯ МЕТОДОВ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ В РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	20
1.1 Регенеративная медицина – основы направления и переход от клеточной терапии к тканевой инженерии	20
1.1.1 Клеточная терапия как основной метод начальных этапов развития регенеративной медицины	20
1.1.2 Кризис клеточной терапии и его причины	22
1.1.3 Тканевая инженерия в регенеративной медицине	24
1.1.4 Актуальность исследований в области тканевой инженерии как направления развития регенеративной медицины	38
1.2 Основные представления о регенерации как физиологическом процессе	39
1.2.1 Обновление тканей и репаративная регенерация	39
1.2.2 Этапы репаративной регенерации, ее регуляция и исходы	40
1.3 Мезенхимные стромальные клетки как участники регенеративных процессов	52
1.3.1 Актуальные представления о происхождении мезенхимных стромальных клеток <i>in</i> <i>vivo</i>	52
1.3.2 Механизмы участия мезенхимных стромальных клеток в репаративной регенерации	55
1.4 Использование мезенхимных стромальных клеток в клеточной терапии и тканевой инженерии	60
1.4.1 Основные области применения мезенхимных стромальных клеток в клеточной терапии	60
1.4.2 Использование мезенхимных стромальных клеток в тканевой инженерии и практический опыт их применения	64
1.4.3 Актуальные представления о механизмах самоорганизации мезенхимных стромальных клеток и их важность для тканевой инженерии	83
1.4.4 Обзор клинического опыта применения клеточных пластов и дефицит исследований с использованием мезенхимных стромальных клеток	86
1.4.5 Генетическая модификация клеточных пластов как инструмент увеличения их эффективности	89
1.4.6 Существующие ограничения использования клеточных пластов	93

1.5 Обоснование актуальности разработки платформы для тканевой инженерии на основе клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток	94
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	96
2.1 Объекты исследования	96
2.2 Клеточные культуры	96
2.2.1 Одобрение этического комитета и источник первичного донорского материала	96
2.2.2 Выделение и культивирование мезенхимных стромальных клеток человека	96
2.2.3 Выделение и культивирование мезенхимных стромальных клеток мыши и крысы	97
2.2.4 Культуры фибробластов дермы и эндотелия пупочной вены человека	97
2.3. Методы получения, характеристики и децеллюляризации клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток жировой ткани	98
2.3.1 Методы сборки и открепления клеточных пластов.....	98
2.3.2 Децеллюляризация клеточных пластов и обработка ДНКазой I	98
2.3.3 Гистологическая характеристика и окрашивание конструкций в культуре	99
2.4 Экспериментальные модели и протоколы	100
2.4.1 Экспериментальные модели <i>in vitro</i>	100
2.4.2 Экспериментальные модели <i>in vivo</i> и протоколы их оценки.....	102
2.5 Модификация клеточных из мезенхимных стромальных клеток с помощью вирусных векторов	109
2.5.1 Амплификация бакуловирального вектора в клетках Sf9	109
2.5.2 Трансдукция мезенхимных стромальных клеток бакуловирусными векторами	110
2.5.3 Трансдукция клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток бакуловирусными векторами и экспрессия VEGF165	110
2.5.4 Оценка флуоресценции методом проточной цитометрии (FACS)	111
2.5.5 Подсчет клеток и анализ выживаемости	111
2.6. Биохимические методы исследования	111
2.6.1 Иммуноферментный анализ	111
2.6.2 Мультиплексный иммуноферментный анализ	112
2.6.3 Анализ удельного содержания белков внеклеточного матрикса	112
2.6.4 Ингибиторный анализ	113
2.6.5 Гистохимическая детекция активности щелочной фосфатазы	113
2.7 Иммунофлуоресцентное мечение в культуре	113
2.8 Молекулярно-биологические методы	114

2.8.1 Нормировка по содержанию ДНК для учета соотношения количества клеток в культурах мезенхимных стромальных клеток, клеточных пластах и различных областях конструкции.....	114
2.8.2 Выделение и секвенирование РНК, биоинформатический анализ дифференциальной экспрессии генов	114
2.9 Статистическая обработка результатов	115
ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА И ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ КЛЕТОЧНЫХ ПЛАСТОВ ИЗ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ	116
3.1 Разработка метода получения клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток человека	116
3.2 Влияние индивидуальных свойств донора и культуральных характеристик мезенхимных стромальных клеток на продолжительность сборки клеточных пластов	119
3.3 Гистологическая характеристика клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток человека	122
3.4 Получение децеллюляризованного внеклеточного матрикса клеточных пластов.....	125
на основе мезенхимных стромальных клеток человека.....	125
3.5 Оценка биологической активности секрета, продуцируемого мезенхимными стромальными клетками, в составе клеточных пластов	129
3.6 Получение клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток.....	131
жировой ткани животных	131
ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ КЛЕТОЧНЫХ ПЛАСТОВ ДЛЯ ЗАЖИВЛЕНИЯ ДЕФЕКТОВ МЯГКИХ ТКАНЕЙ.....	133
4.1 Оценка эффективности клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток	133
на модели глубокой раны кожи с дефицитом мягких тканей у крысы	133
4.1.1 Обоснование актуальности разработки и выбор модели	133
4.1.2 Трансплантация клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток ускоряет закрытие глубокого раневого дефекта кожи	134
4.1.3 Оценка удержания мезенхимных стромальных клеток, трансплантированных в зону раневого дефекта в виде суспензии или в составе пласта	136
4.1.4 Трансплантация мезенхимных стромальных клеток стимулирует созревание грануляционной ткани и ускоряет формирование рубца на месте раневого дефекта кожи.....	137
4.2 Исследование эффективности трансплантации клеточных пластов, суспензии мезенхимных стромальных клеток, а также их секрета на модели пролежневого дефекта кожи у мыши	140

4.2.1 Обоснование актуальности разработки и выбор модели	140
4.2.2 Трансплантация клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток ускоряет заживление пролежневого дефекта и завершается полноценной регенерацией кожи	141
4.2.3 Трансплантация клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток стимулирует рост грануляционной ткани на ранних сроках заживления пролежня	146
4.2.4 Капиллярная васкуляризация грануляционной ткани снижается под действием секрета и клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток.....	147
4.2.5 Визуализация мезенхимных стромальных клеток, трансплантированных путем инъекции суспензии или с помощью трансплантации клеточного пласта	149
4.3 Выяснение механизма регенераторного действия мезенхимных стромальных клеток в составе клеточных пластов при заживлении дефектов мягких тканей	150
ГЛАВА 5. ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ КЛЕТОЧНЫХ ПЛАСТОВ ИЗ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО АНГИОГЕНЕЗА	156
5.1 Обоснование актуальности разработки и выбор модели	156
5.2 Восстановление кровотока в ишемизированной задней конечности мышцы под действием мезенхимных стромальных клеток, трансплантированных с помощью инъекции или в виде пластов.....	157
5.3 Оценка плотности кровеносных сосудов после трансплантации клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток и с помощью внутримышечной инъекции	159
5.4 Уменьшение распространенности некроза ишемизированных скелетных мышц после трансплантации клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток	160
5.5 Визуализация клеточных пластов, оценка их жизнеспособности и васкуляризации после подкожной трансплантации.....	162
ГЛАВА 6. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ КЛЕТОЧНЫХ ПЛАСТОВ ИЗ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ДЛЯ УСИЛЕНИЯ ИХ АНГИОГЕННОГО И РЕГЕНЕРАТОРНОГО ПОТЕНЦИАЛА	166
6.1 Выбор векторной системы для модификации мезенхимных стромальных клеток и клеточных пластов на их основе.....	166
6.2 Оптимизация условий бакуловирусной трансдукции мезенхимных стромальных клеток.....	168
6.3 Стимуляция экспрессии трансгена после трансдукции и оценка выживаемости мезенхимных стромальных клеток после модификации бакуловирусом	170
6.4 Продукция VEGF165 после бакуловирусной трансдукции клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток	171

6.5 Исследование ангиогенной эффективности клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток, экспрессирующих VEGF165, на модели ишемии задней конечности мыши.....	172
6.6 Оценка выживаемости модифицированных пластов из мезенхимных стромальных клеток после подкожной трансплантации	174
6.7 Исследование пролиферации и апоптоза мезенхимных стромальных клеток в составе трансплантированных клеточных пластов, экспрессирующих VEGF165.....	176
6.8 Исследование плотности кровеносных сосудов после трансплантации модифицированных клеточных пластов, экспрессирующих VEGF165	178
6.9 Оценка распространенности некроза ишемизированной скелетной мышцы после трансплантации клеточных пластов, экспрессирующих VEGF165, и немодифицированных конструкций	179
ГЛАВА 7. ОЦЕНКА ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК В СОСТАВЕ КЛЕТОЧНЫХ ПЛАСТОВ И ВЫЯСНЕНИЕ МЕХАНИЗМА САМООРГАНИЗАЦИИ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПРИ ФОРМИРОВАНИИ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ	182
7.1 Актуальность направления исследований и формулировка задачи	182
7.2 Выяснение эффективности дифференцировки мезенхимных стромальных клеток в составе клеточных пластов	182
7.3 Оценка морфологических изменений в ходе сборки клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток	184
7.4 Самоорганизация мезенхимных стромальных клеток и оценка фенотипа клеток в исходе сборки клеточного пласта	185
7.5 Дифференцированный анализ окружения в составе компактных и разреженных областей клеточных пластов.....	190
7.5.1 Оценка содержания коллагена I типа и клеточного фибронектина в составе клеточных пластов и их компактных областей	190
7.5.2 Определение ферментативной активности щелочной фосфатазы в составе клеточных пластов и их компактных областей	193
7.6 Анализ транскриптома мезенхимных стромальных клеток разреженных и компактных областей клеточных пластов.....	194
7.7 Экспериментальная валидация результатов биоинформатического	201
анализа транскриптома	201
7.7.1 Выяснение роли малых Rho-ГТФаз в компактизации мезенхимных	201
стромальных клеток	201

7.7.2 Выяснение роли малых Rho-ГТФаз в хондрогенной дифференцировке мезенхимных стромальных клеток в составе клеточных пластов	203
7.7.3 Выяснение механизма подавления транскрипционной активности SREBP-1 в компактных областях клеточного пласта	204
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	209
ВЫВОДЫ	218
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	220
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	221
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	223

ВВЕДЕНИЕ

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 [1, 2].

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 [3]. 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 [4].

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, вводимых 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 [5]. 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 [6]. 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 [7].

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) [8, 9].

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 [10, 11]. 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 [12]. 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 заякоренных в его составе факторов роста и цитокинов, которые рецептируются клетками как сигналы тканевого окружения [13]. 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 [14, 15]. 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 [16].

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 [17, 18].

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 секретома.
4. После трансплантации клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток на поверхность пролежневого дефекта впервые показана регенерация кожи без образования рубца, а в составе секретома 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 секретома 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 ГТФаз семейства Rho 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,

родственный 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 секретама 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 фиброзирование 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 секретама 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 (CTERP) (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 ручной 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.

ГЛАВА 1. ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ И СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ РАЗВИТИЯ МЕТОДОВ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ В РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1 Регенеративная медицина – основы направления и переход от клеточной терапии к тканевой инженерии

1.1.1 Клеточная терапия как основной метод начальных этапов развития регенеративной медицины

Принято считать, что термин «регенеративная медицина» (РМ) был впервые использован профессором Ларри Р. Кайзером в 1992 в работе «Будущее многопрофильных систем», в которой основная задача РМ формулировалась как «восстановление функций органов путем замены утраченных тканей новыми» [2]. В настоящее время ее определяют как *область медицины, которая ставит своей задачей восстановление структуры и функции поврежденных органов и тканей* [1].

Появившись как развитие классической медицины, в XXI веке РМ стала обширной междисциплинарной областью, включающей исследование процессов дифференцировки, миграции, пролиферации клеток, создание искусственных органов, клеточных и тканеинженерных конструкций (ТИК) для восстановления тканей и решения проблем трансплантологии [16].

Наибольшие надежды в РМ длительное время возлагались на направление *клеточной терапии*, методической основой которой являются методы выделения и культивирования клеток человека с последующим введением в организм для восстановления тканей и органов.

Значительным событием, которое придало импульс развитию клеточной терапии на несколько десятилетий, стала демонстрация Till и McCulloch возможности восстановления кроветворения путем трансплантации клеток костного мозга (КМ) животным, подвергшимся высоким дозам облучения, которое вызывает гибель гематопозитических стволовых клеток (ГСК) и угнетение гемопоэза [19].

В ней было показано, что после трансплантации аллогенных ГСК красного КМ они образовывали в селезенке облученного реципиента колонии, в составе которых были обнаружены клетки всех трех кроветворных ростков, а результатом трансплантации стало возобновление кроветворения. Основой восстановления гемопоэза в организме облученного животного являлась способность трансплантированных ГСК воссоздавать функционирующий КМ.

В XX столетии особое внимание биологов к радиохимии и радиобиологии, обусловленное особенностями политической ситуации в мире, а также рядом техногенных катастроф, привело к тому, что развитие клинических методов трансплантации КМ шло очень быстро и демонстрировало впечатляющие успехи. Дальнейшие достижения в области гематологии и трансфузиологии стали основой для укрепления парадигмы о том, что при обнаружении стволовых клеток (СК) в других тканях они также могут быть использованы для трансплантации и восстановления органов человека.

Открытие негемопоезических тканеспецифичных СК и создание эффективных методов их культивирования стали дополнительными стимулами для разработок в этой области. Этот тип СК в современной литературе также называют *постнатальными СК*, *СК взрослого организма*, или используют эквивалентный термин *резидентные СК*, отражающий их локализацию и участие в регенерации и обновлении конкретного типа ткани или органа. Наличие у них ключевых признаков СК – способности к дифференцировке в один или несколько специализированных клеточных типов, а также самообновление путем асимметричного деления – позволило постулировать их ключевую роль в поддержании тканевого гомеостаза, обновлении и восстановлении тканей в течение всей жизни [20].

В организме человека постнатальные СК, вероятно, сохраняются со времен внутриутробного развития в форме минорных субпопуляций слабо дифференцированных клеток [21]. Впоследствии тканеспецифичные СК были выделены из большинства паренхиматозных органов, дермы, центральной нервной системы (ЦНС), легких и кишечника [22]. Фенотипическая характеристика по поверхностным маркерам и кластерам дифференцировки (CD) позволила добиться их точной идентификации для экспериментальных работ и клинического применения [23]. Позднее роль СК взрослого организма в заживлении тканей или восстановления утраченных частей тела была показана у многих организмов, что позволило рассчитывать на успех их применения в РМ. Данные об их роли в регенерации и обновлении печени, миокарда, нервной системы, структур опорно-двигательного аппарата и других органов определили направление трансляционных исследований и клинического внедрения этих методов [24].

По мере развития этого направления также предлагавшиеся для медицинского использования эмбриональные СК и выделенные из фетальных тканей плюри- и мультипотентные клетки были практически полностью вытеснены из практического применения. Очевидные этические и биомедицинские риски, связанные с их применением, привели к запретам или жестким, но оправданным ограничениям в подавляющем большинстве государств, где разрешены методы клеточной терапии.

Еще одной важнейшей вехой в развитии РМ стало использование для клеточной терапии мультипотентных мезенхимных стволовых/стромальных клеток (МСК), которое, бурно начавшись в 1990-х годах, сохраняет приоритет в этой области и по сей день.

Данный тип клеток обладает мультипотентностью, которую определяют как способность дифференцироваться в адипо-, остео- и хондрогенном направлениях, а также имеет высокую секреторную активность. В состав секрета МСК входит несколько сотен молекул, в т.ч. факторы роста (ФР), хемо- и цитокины, а также внеклеточные везикулы (ВВ), которые в комплексе обладают активирующим действием на процессы обновления и регенерации. Возможность относительно простого выделения и культивирования, присутствие в большинстве тканей взрослого организма, а также важная роль в регенерации – все эти свойства, о которых подробно пойдет речь в соответствующих разделах настоящего обзора, сделали МСК одним из наиболее важных объектов для клеточной терапии и ТИ [22]. Дальнейшие клинические исследования (КИ) применения резидентных СК и МСК из различных источников поставили ряд вопросов, которые привели РМ к переходу приоритета в пользу ТИ, о причинах которого будет сказано далее.

1.1.2 Кризис клеточной терапии и его причины

Потенциал постнатальных СК и МСК как инструментов клеточной терапии быстро удалось показать на животных моделях многих заболеваний. Однако после этапа культивирования стволовые и прогениторные клетки, как правило, необратимо теряют способность восстанавливать ткани *in vivo*, равно как исследователям не удавалось сформировать их полноценные эквиваленты *ex vivo* методами ТИ. Также проблемой стало то, что в культурах даже при комплексных воздействиях гормонов и ФР не удается активировать в тканеспецифичных СК полноценные программы органо- или гистогенеза. Например, хорошо изученные сателлитные клетки-предшественники после выделения из скелетных мышц могут быть активированы *in vitro* и даже экспрессируют ряд необходимых для слияния и миогенеза факторов транскрипции [22]. Итогом таких манипуляций является формирование структур, напоминающих миофибриллы, однако не демонстрирующих регулируемой сократительной активности и не способных после трансплантации сопрягаться с мышечной тканью [22, 25]. Аналогичным образом введение локально или системно большинства типов СК и МСК, выделенных из тканей взрослого организма, не дает ожидаемого результата в виде регенерации в значимом объеме поврежденного органа или его функциональных элементов.

Одной из ключевых физиологических причин этого стала неспособность культивируемых СК к автономной регуляции дифференцировочной программы, которая *in vivo* осуществляется за счет специфического микроокружения, которое получило название *ниши*.

Итогом развития этих представлений стало положение о том, что функциональной единицей процесса регенерации является не сама СК с ее автономными свойствами, а комплекс, СК и ее специфического регуляторного окружения – ниши [22]. В современном представлении о ходе регенеративного процесса именно нише отводится роль рецепции активирующих дифференцировку стимулов и участие в контроле СК на ее различных этапах [26]. В этой связи позволим себе напомнить, что в состав ниши помимо самой СК входят заякоренные в ткани растворимые ФР, цитокины, ВВ, белки ВКМ и клетки стромального типа, поддерживающие ее структуру [27]. Отсутствие этих элементов в культуре приводит к утрате или блокировке целого ряда важных для участия в регенерации свойств СК.

Вторым моментом, который сказался на эффективности применения клеточной терапии, стало резкое снижение жизнеспособности как СК, так и МСК, связанное с процедурой их введения в организм. Общепринятое снятие клеток с культуральных сосудов с помощью протеолитических ферментов, вызывающих разрушение наработанного клетками матрикса, а также межклеточных контактов, приводит к развитию *аноикиса* (от греч. «бездомный»). Этим термином определяют механизм программируемой смерти при потере клеткой связи с матриксом и другими клетками. Введенный в 1994 году Francis [28], он прочно закрепился в литературе и стал отражением важнейшего свойства многоклеточных организмов, заключающегося в препятствовании транслокации и интеграции клеточных элементов из одной части тела в другую. Из всех клеток человеческого организма аноикис не характерен только для форменных элементов крови, чье суспендированное состояние необходимо для функционирования этой ткани.

Активация аноикиса в снятых с культуральной посуды и подготовленных к введению клетках становится причиной их быстрой гибели после инъекционной трансплантации в поврежденные ткани. При потере контакта с окружением в клетках запускается программа гибели или появляется склонность к программируемой смерти при неблагоприятных стимулах и отсутствии сигналов от других клеток и матрикса. В итоге значительная часть клеток может необратимо терять жизнеспособность в процессе получения клеточной суспензии и при ее прохождении через иглу или катетерную систему. Введенная клетка в неблагоприятных условиях поврежденной ткани с выраженной гипоксией, воспалением, высокой концентрацией реактивных форм кислорода, а также возможным присутствием чужеродных микроорганизмов подвергается стрессу, который может стать для нее фатальным. Показано, что после введения суспендированных клеток уже в течение первых 2-3 дней около $\frac{3}{4}$ трансплантированных клеток

подвергаются апоптозу и быстро погибают, а через 4-5 дней в ткани сохраняется лишь десятая часть инъецированного материала [6, 29].

Можно заключить, что наибольшее распространение классическая техника клеточной терапии получила для крови, форменные элементы которой не обладают постоянной пространственной связью с матриксом и соседними клетками. ГСК хорошо переносят инфузию и предшествующие ей процедуры – отмывку, консервирование и даже генетическую модификацию, например, с помощью вирусных векторов [30]. Обладая уникальной способностью к хоумингу – направленной миграции в свою тканевую нишу, ГСК оказались способны давать начало аллогенному КМ.

Несмотря на то, что фундаментальные предпосылки для разработки методов клеточной терапии с помощью СК и МСК были корректными, регенераторная эффективность этих методов оказалась скромной, в том числе и в силу технических причин. Доставить в ткани и органы большое количество клеток без их массивной гибели оказалось невозможным, т.к. культивированные *ex vivo* клетки было необходимо снять и инъецировать в ткани-мишени. Тем не менее, следует отметить, что в период с 1995 по 2015 годы было инициировано и проведено более 1000 КИ препаратов для клеточной терапии, которые дали важнейшую информацию о безопасности, возможных рисках и побочных эффектах ее применения и стали стимулом для поиска оптимальных показаний и протоколов их применения для медицинских целей [31, 32]. Результаты этого «золотого века» клеточной терапии заложили научную, этическую и практическую основу современных методов иммунотерапии в онкологии (CAR-T лимфоциты, дендритно-клеточные вакцины), гематологии, а также для успешного лечения орфанных заболеваний системы крови и клеточного иммунитета.

1.1.3 Тканевая инженерия в регенеративной медицине

Задачей ТИ является *конструирование и выращивание ex vivo живых функциональных тканей и органов для последующей трансплантации пациенту с целью замены или стимуляции регенерации структур организма*. Ключевым отличием от клеточной терапии является то, что ТИ подразумевает восстановление трехмерной структуры ткани путем организации клеток под влиянием различных условий. ТИ также предлагается как эффективное решение описанной выше проблемы, возникающей при инъекционном введении культивированных клеток, а также как перспективный способ решения проблемы глобального дефицита донорских органов и ряда других задач современной трансплантологии [7].

Идея об использовании регенераторного потенциала и морфогенетических программ определенных типов клеток для формирования тканей вне организма появилась в начале 1990-х

годов [7]. В отличие от клеточной терапии, где определяющими для успеха являются автономные (сохраняемые клетками в культуре) свойства, методы ТИ в большей степени опираются на создание для клеток определенного комплекса условий и сигналов, которые позволяют им осуществлять свои функции в составе искусственно сформированной структуры.

Для формирования ТИК с трехмерной структурой общепринятым подходом является использование *скаффолдов* – материалов различного происхождения, которые воспроизводят тканеподобную организацию клеток и сохраняют целостность комплекса вплоть до трансплантации или замены нефункционирующих органов и тканей. Также для формирования окружения в состав конструкций могут включаться регуляторные молекулы – ФР и цитокины. Наконец, часть растворимого окружения формируют сами клетки, импрегнированные в используемый материал [9]. Сочетание «клетки – скаффолды – сигнальные молекулы» иногда называют «триадой ТИ», которую рассматривают как базовый набор для создания эффективного и физиологичного метода получения искусственных тканей или органов для последующей трансплантации [33].

Отдельная группа подходов в ТИ связана с так называемыми биореакторными методами, которые используют для решения трех задач:

- 1) имитация *ex vivo* состояния близкого к организму для исследований в области физиологии;
- 2) культивирование клеток с целью дальнейшего клинического использования;
- 3) создание тканевых и органоподобных структур, которые могут затем быть трансплантированы или использованы для поиска новых терапевтических мишеней и моделирования заболеваний [34].

Биореакторы представляют собой инженерные системы разной сложности, способные моделировать различные условия: парциальное напряжение кислорода, перфузию, напряжение сдвига, механические воздействия (сжатие, сдвиг), а также несколько факторов в комплексе и с периодической сменой этих воздействий [35]. Следует сразу отметить, что возможности этих методов в РМ в настоящее время далеки от практического медицинского использования. Ключевым преимуществом биореакторов является управляемое моделирование условий, приближенных к физиологическим и обеспечивающих эффективность дифференцировки, что в будущем позволит создавать очень сложные, близкие к нативным органы и ткани [5].

С помощью биореакторов за последнее десятилетие получены впечатляющие результаты. Были созданы потенциально применимые в клинике эквиваленты печени, кожи, костной ткани, суставных хрящей, сердца [36]. В целом, хотя возможности биореакторов по

созданию органов *ex vivo* значительно превышают потенциал большинства классических методик, их основы остаются прежними и опираются на использование скаффолдов и клеточного материала, который их заселяет. Рассмотрим некоторые общие принципы и наиболее распространенные методы ТИ, которые используются в РМ.

Скаффолды как основа подходов тканевой инженерии

Скаффолды (англ. *scaffold* – букв. «помост») в ТИ определяют как трехмерные структуры из различных материалов, чья функция состоит в имитации условий ткани с целью пространственной организации клеток, а также обеспечения их функционирования, в т.ч. дифференцировки [37]. С физиологической точки зрения свойства скаффолдов в значительной степени воспроизводят функции внеклеточного матрикса (ВКМ) – многокомпонентного макромолекулярного комплекса, окружающего клетки всех тканей организма за исключением крови. Формируя структуру ткани, ВКМ является также сигнальным комплексом, содержащим позиционные инструкции и поддерживающим жизнеспособность клеток.

Состав ВКМ может варьировать в зависимости от ткани, однако его физиологические функции, в целом, консервативны между тканями и даже видами и заключаются в следующем [38]:

1. обеспечение адгезии, регуляции, направленной миграции клеток, а также сигналов о наличии связи клеточного элемента с тканью;
2. формирование необходимых механических свойств ткани (жесткости, упругости и вязкости): характер укладки волокон коллагена I типа может задавать, растяжимость а минерализация ВКМ обеспечивает твердость ткани [39];
3. позиционная сигнализация: RGD-мотив фибронектина в составе ВКМ является важнейшим активатором интегринового сигналинга, а сигнальные участки белков ВКМ обеспечивают ориентацию клеток в тканях;
4. предоставление клеткам достаточных для рецепции удельных концентраций регуляторных молекул (факторов роста и цитокинов): показано, что гепарансульфатпротеогликаны ВКМ активируют димеризацию заякоренных в пористом матриксе мономеров основного FGF, необходимую для обеспечения его связывания со своим рецептором;
5. создание динамически изменчивых условий для клеток, достигаемых за счет регулируемой перестройки, деградации и синтеза ВКМ: это свойство особенно важно при масштабных событиях, сопровождающихся изменениями структуры ткани – морфогенезе, васкуляризации, заживлении после повреждения и фиброзировании.

С учетом перечисленных выше функций логически оптимальным является использование в качестве скаффолда образца ВКМ органа, выбранного для воссоздания. Однако сложность состава и укладки, а также динамичность нативного ВКМ сделали практически невозможной полную имитацию его свойств *ex vivo*. Тем не менее, используя ключевой для РМ принцип биоподобия, в настоящее время сформулированы свойства скаффолдов, сочетание которых определяет их применимость в тканевой инженерии [40]. К ним относятся:

- 1) пространственная структура: скаффолд должен предоставлять пространство для васкуляризации, роста и ремоделирования ткани, а также не создавать барьера для диффузии нутриентов и интеграции готовой конструкции в организм реципиента;
- 2) биосовместимость с клетками и тканями: заселение скаффолда и интеграция в организме определяются его совместимостью с живыми структурами организма, а также архитектурой и механическими свойствами, которые должны быть приближены к формируемому *ex vivo* органу или ткани;
- 3) биоактивность: способность скаффолда по аналогии с ВКМ регулировать активность клеток за счет сигналов, факторов роста и цитокинов, входящих в его состав или высвобождаемых во время культивирования и после трансплантации;
- 4) механические свойства: скаффолды, обладая определенными показателями жесткости и упругости должны соответствовать свойствам создаваемой ткани, стабилизировать имеющийся в ней дефект, причем в силу механочувствительности клеток эти параметры могут оказывать серьезное влияние на их жизнеспособность и дифференцировку [41];
- 5) биodeградируемость: растворимость или способность к деградации под действием ферментов, причем важно, чтобы материал скаффолда был способен разрушаться со скоростью, пропорциональной росту новых тканей, а продукты разрушения выводились из организма без накопления токсичных метаболитов [42].

Развитие биоорганической химии и материаловедения дало широкий спектр материалов для использования в тканевой инженерии. Для успешного создания тканеинженерной конструкции важнейшим этапом является подбор скаффолда, который в той или иной степени отвечает перечисленным требованиям. Большинство применяющихся в РМ скаффолдов представляют собой природные или синтетические полимеры [33].

Природные скаффолды представлены целлюлозой, мажорными белками, входящими в состав ВКМ (коллагенами различных типов, фибронектином), альгинатами, хитозаном и его сополимерными формами, гиалуроновой кислотой [43, 44]. Одним из недостатков перечисленных материалов является относительно низкая механическая прочность, которая

ограничивает их применение для восстановления тканей, которым предстоит выдерживать механические нагрузки. Вторым недостатком натуральных скаффолдов является сложность и дороговизна их получения вкупе с быстрой деградацией, что сужает область их применения в тканевой инженерии. Тем не менее, высокая биосовместимость и минимальная токсичность делают их удачным материалом для тканевой инженерии кожи и в качестве скаффолда для эквивалентов паренхиматозных и полых органов (печень, поджелудочная железа, сердце).

Синтетические скаффолды представлены, в основном, неорганическими соединениями (гидроксиапатит, трикальцийфосфат, гипс, стеклокерамика), а также органическими полимерами - алифатические полиэфиры, полиэтиленгликоль (ПЭГ) [45]. Многие из них имеют хорошую механическую прочность, поэтому могут быть использованы для ТИ тканей, имеющих твердую структуру. Один из наиболее часто используемых скаффолдов на основе полилактид-ко-гликолида, чаще упоминаемого под аббревиатурой PLGA (англ. *polylactic-co-glycolic acid*), применим для ТИ хрящевой и костной ткани [46]. Синтетические полимеры мало иммуногенны, однако их структура и состав мало способствуют адгезии клеток при изготовлении тканеинженерных конструкций [42]. В отличие от натуральных носителей синтетические и, в особенности, минеральные скаффолды обычно обладают низкой совместимостью с нативными тканями организма реципиента, что ограничивает их применение. Для решения этой проблемы разрабатывались методы модификации скаффолдов, например, путем покрытия их белками ВКМ, среди которых чаще других используются фибронектин или коллаген I типа. Их нанесение на поверхность синтетического скаффолда обеспечивает адгезию клеток; кроме того, такая обработка придает скаффолду биоактивность за счет сигнализации, активируемой связыванием клеточных рецепторов с ВКМ. Такие биомиметические приемы позволяют инертному с точки зрения физиологии материалу регулировать дифференцировку и пролиферацию клеток, а также состояние их цитоскелета и секреторную активность [47, 48].

Возможным недостатком, который ограничивает применение натурального или синтетического скаффолда, является вероятность развития воспалительной реакции в организме реципиента. Естественный ответ на инородный объект может приводить к избыточной продукции воспалительных цитокинов, которая будет препятствовать заживлению и интеграции ТИК. Имплантация скаффолдов синтетической природы чаще приводит к избыточному воспалению с выраженным депонированием СТ. Это может приводить к фиброзу вокруг имплантированной конструкции либо в случае биоразрушаемого носителя к его быстрой деградации и потере целостности [49].

Помимо этого, создание крупных ТИК может быть затруднительно в связи с тем, что центральная часть таких структур вследствие недостатка кислорода и нутриентов зачастую

подвергается некрозу, что замедляет восстановление и заживление тканей [50]. На сегодняшний день поиск и разработка материала, который будет отвечать требованиям идеального скаффолда и позволит решить проблему фиброза и ограниченности объема конструкций, остается важнейшим направлением практических исследований в этой области. Эта задача была частично решена за счет использования подходов, основанных на получении нативного (т.е. синтезируемого самими клетками) ВКМ, таких как децеллюляризация тканей, создание сфероидов и пластов, о которых речь пойдет ниже.

*Применение децеллюляризованного внеклеточного матрикса (дВКМ)
в качестве скаффолда*

Децеллюляризованный ВКМ (дВКМ) получают из алло- или ксеногенных тканей с помощью различных методов, позволяющих удалить их клеточный компонент, сохраняя матрикс максимально интактным. Готовый дВКМ представляет собой плотную структуру из различных белков, протеогликанов и фибриллярных компонентов, синтезированных клетками в ходе формирования ткани. Важным достоинством дВКМ является оптимальная имитация физиологического окружения и архитектуры нативных тканей, что способствует интеграции вносимых клеток. Кроме того, нативный ВКМ лучше подвергается физиологическому и репаративному ремоделированию, поэтому его децеллюляризованные формы лучше приживаются и заселяются клетками *ex vivo* и после трансплантации готовой конструкции в организм реципиента [51]. Данный подход особенно активно применяется в тканевой инженерии клапанов сердца, сосудов, нервов, сухожилий и связок [52, 53, 54].

Первым этапом процедуры является децеллюляризация, которая осуществляется с помощью различных физических и химических методов. Выбор способа получения очищенного дВКМ является очень важным для разработки эффективного метода ТИ. Наиболее удачные подходы позволяют сохранить специфические лиганды и сигнальные молекулы, что в дальнейшем влияет на эффективность интеграции клеток и их организацию в тканеподобные структуры. Физические методы включают обработку ультразвуком, механические воздействия, давление и замораживание/оттаивание при определённых температурных режимах. В результате этого происходит разрушение мембран клеток, их содержимое отмывается в буферных растворах, в результате чего остается плотная масса уложенного дВКМ [51]. Зачастую дополнительным воздействием становится обработка щелочами, кислотами и хелатирующими веществами, среди которых распространением получила этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА). Ферментативная обработка может включать

воздействие протеазами (как правило, трипсином) или эндонуклеазами, чтобы избавиться от нежелательных остаточных макромолекул [55].

Полученный из тканей и органов грызунов дВКМ, как правило, используют для поисковых экспериментов *in vitro* и разработки методов децеллюляризации. При использовании в качестве исходного материала органов более крупных животных могут быть получены образцы дВКМ жизненно важных органов, пригодные для потенциального применения в клинике.

Вторым важнейшим этапом после получения дВКМ является *рецеллюляризация* – заселение скаффолда клетками, которое проводится вне организма и может занимать длительное (до нескольких недель) время.

Множество работ посвящено разработке и оценке ТИК на основе дВКМ из органов животных – в основном, свиней, кроликов, крыс и мышей. В ряде случаев были достигнуты впечатляющие результаты и созданы прототипы искусственных органов. Одним из самых знаковых в этой области стало исследование Ott и соавт., которые в 2008 году смогли *ex vivo* создать бьющееся сердце на основе дВКМ из сердца мыши [56]. Позднее группа Barakat показала эффективную интеграцию и функциональную активность человеческих гепатоцитов после их внесения в дВКМ свиной печени [57].

Несмотря на преимущества применения дВКМ для ТИ, в этой области остается ряд проблем, которые ограничивают использование данного метода в клинической практике. Ключевым остается процесс получения дВКМ, при котором остаточные химические соединения и ферменты могут контаминировать готовый тканеинженерный орган и быть причиной токсических воздействий на организм реципиента. Кроме того, при создании на основе дВКМ искусственных органов со сложной тканевой архитектурой (например, почки) не удастся добиться развертывания полноценной программы морфогенеза, которая характерна для поэтапного развития в эмбриогенезе [58]. Из-за этого даже после заселения матрикса клетками с высоким дифференцировочным потенциалом и при комбинировании их с клетками сосудистого и нейрального ряда в большинстве случаев формируется неполноценная структура или же возникают ее aberrации различного масштаба. В результате этого полученный искусственный орган не может конкурировать с донорским, а эффективность его трансплантации значительно ниже, чем потенциальные риски. Еще одним важным недостатком этой технологии является длительность протоколов, начиная от забора органа, подлежащего децеллюляризации и до получения готового тканеинженерного эквивалента, заселенного клетками. Этот процесс может занимать до 1,5 месяцев и требует нескольких трудоемких этапов.

Таким образом, данные методы составляют одно из самых привлекательных направлений в этой области, однако им еще предстоит пройти длительный путь до создания на основе дВКМ искусственных органов, которые смогут решить актуальные проблемы трансплантологии. Тем не менее, в последние годы наметился существенный прогресс в применении дВКМ для ТИ хряща, сухожилий, жировой ткани и кожи, который позволяет рассчитывать на появление перспективных продуктов по соответствующим показаниям [8].

Сфероиды как одна первых платформ тканевой инженерии

Сфероиды определяют как самоорганизующиеся шарообразные ТИК, состоящие из клеток, объединенных белками ВКМ, обеспечивающими их функционирование и стабильность. Сборка сфероидов в значительной степени зависит от соотношения сил взаимной адгезии клеток и их адгезии к культуральному пластику, которую для этого минимизируют.

Наиболее распространенный метод сборки сфероидов на основе культивирования клеток в «висячей капле» был описан Kelm в 2003 году [59]. Суть метода заключается в культивировании клеток на нижней части перевернутой чашки Петри в капле объемом 20-30 мкл. При этом под действием гравитации и поверхностного натяжения клетки собираются в шаровидный агрегат, поддерживаемые активными межклеточными взаимодействиями. Нарбатываемый при агрегации ВКМ играет ключевую роль, так как опосредованное интегринами взаимодействие клеток с его белками предшествует формированию прямых межклеточных кадгериновых контактов. Таким образом, в формировании сфероида можно выделить три этапа [60]:

1. рассеянные в объеме клетки связываются за счет взаимодействий интегринов с молекулами ВКМ;
2. агрегированные клетки увеличивают синтез кадгеринов, которые обеспечивает более плотную межклеточную адгезию;
3. увеличение числа плотных кадгериновых связей способствует формированию и стабилизации шарообразной структуры [61].

Сфероиды имеют неоценимое преимущество перед заселенными скаффолдами – входящий в их состав комплекс ВКМ и сформированные межклеточные контакты гораздо ближе к нативным тканям, что обеспечивает лучшее выживание, дифференцировку и интеграцию клеток после имплантации [62].

Тем не менее, получаемые таким образом конструкции имеют ограничение в объеме, т.к. жизнеспособность клеток в сфероиде варьирует от периферии к его центру. Это связано с тем,

что многослойная структура сфероиды не обеспечивает переноса питательных веществ, полноценного доступа к кислороду и эффективного выведения накапливающихся продуктов обмена.

Формирующийся градиент вызывает депривацию клеток, изменение соотношения мертвых и живых элементов, а также приводит к функциональной гетерогенности клеток в его составе. В структуре сфероиды можно послойно выделить зоны пролиферирующих, покоящихся и мертвых клеток (рисунок 1). Внешний слой содержит клетки с интактными ядрами, они активно делятся и хорошо снабжаются кислородом и питательными веществами. Клетки, расположенные глубже, хуже обогащаются кислородом и питательными веществами, поэтому их метаболическая активность снижается. В центре сфероиды располагается ядро, которое зачастую описывается как некротическое с высокой долей мертвых клеток и дебриса, низким рН и высоким содержанием молочной кислоты [63].

Помимо диаметра конструкции важными факторами, влияющими на состояние клеток в ее составе, являются их количество, а также длительность культивирования и поддержания сфероиды. Принято считать, что чем больше клеток в сфероиде и чем дольше они культивируются, тем выше вероятность появления некротического ядра с характерными для него и описанными выше признаками [64].

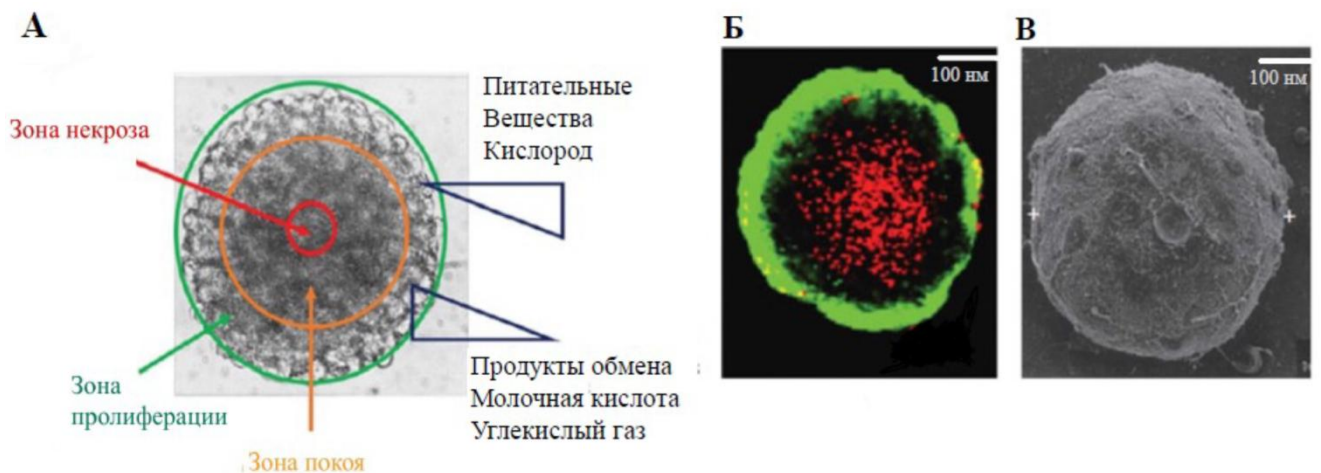


Рисунок 1 – Структура сфероиды на примере конструкции из опухолевых стволовых клеток. Схематическое изображение зон в составе сфероиды (А) – окружностями обозначены зоны пролиферации (зеленый), покоящихся клеток (оранжевый) и некротического ядра (красный). Микрофотография аналогичного сфероиды (Б) с визуализацией живых (зеленый) и погибших (красный) клеток и его же микрофотография (В), полученная методом сканирующей электронной микроскопии. Адаптировано из [63]

Сфероиды активно применяют при изучении процессов канцерогенеза и фармакологическом изучении лекарственных препаратов. К их очевидным преимуществам относят трехмерную структуру и нативный состав наработанного клетками ВКМ [59]. Ряд исследователей рассматривают гетерогенность клеточного состава как преимущество данного вида ТИК, так как она воспроизводит анизотропию условий, характерную для здоровых тканей и солидных опухолей [63].

К настоящему времени практическое применение сфероидов из стволовых и зрелых клеток ограничено, в том числе из-за наличия в их составе зоны некроза и недостаточного понимания морфофункциональных характеристик клеток в составе конструкции. Так, формирующийся в ядре сфероидов градиент гипоксии, ацидоз и низкая васкуляризация в значительной степени воспроизводят условия канцерогенеза, что вызывает опасения с точки зрения безопасности этого метода.

Биопечать (биопринтинг) и область ее применения

Концепция 3D-печати была впервые описана Jones еще в 1974 году, а в 1981 году Kodama предложил использование фотоотверждаемых термореактивных полимеров для изготовления трехмерных пластиковых моделей в качестве раннего процесса т.н. аддитивного производства [65].

В зависимости от материалов и производственных процессов методы 3D-печати можно разделить на небиологическую 3D-печать и 3D-биопечать. В 3D-биопечати небольшие единицы биоматериалов, биохимических веществ и живых клеток взаимно позиционируются для изготовления тканеподобных 3D-структур [66]. По сравнению с небиологической 3D-печатью, где результатом является формирование бесклеточного скаффолда, 3D-биопечать стремится создать структуры с механическими и биологическими свойствами, которые обеспечат ее совместимость с живыми клетками для восстановления функций тканей и органов [67]. Существует несколько преимуществ 3D-биопечати по сравнению с обычной 3D-печатью, включая точное распределение и гетерогенность плотности клеток, а также масштабируемость и экономичность. Тем не менее, проблемы в области разработки и последующего широкого применения 3D-биопечати в медицине не позволяют активно использовать этот подход. В частности, выбор пригодных биоматериалов сильно ограничен, существующие методы печати необходимо совершенствовать для повышения ее скорости и улучшения точности, а обеспечение определенных биологических функций без ущерба для механических свойств требует недостижимого в настоящее время разрешения 3D-принтера.

В последние годы был опубликован ряд исчерпывающих обзорных статей, посвященных развитию 3D-биопечати, в частности, Murphy и соавт., которые представили системную статью, подробно описывающую почти все аспекты 3D-биопечати, включая принципы, методы визуализации и дизайна, технологии и выбор материала [67].

Технически в этой области внедрено три основных метода: струйная, лазерная и экструзионная биопечать. С учетом сложности внедрения и особенностей методов сконцентрируемся на основных областях применения 3D-биопечати в РМ и обсудим существующие ограничения этой платформы.

Основным компонентом для этих методов являются так называемые биочернила, т.е. используемая для 3D-биопечати композиция, составляющая основу ТИК, которую затем заселяют клетками или трансплантируют в организм реципиента [68].

3D-биопечать быстро превращается в массовую отрасль благодаря своему разнообразию и потенциальным применениям. В целом, применения биопечати можно разделить на две основные группы: 1) регенерация тканей, например, печать кровеносных сосудов, сердечных клапанов, тканей опорно-двигательного аппарата, печени, нервов и кожи; и 2) биомедицинские приложения, включая поиск и скрининг лекарств [69].

В области печати сосудистых сетей крайне сложно добиться характеристик кровеносных сосудов близких к физиологическим, что осложняется наличием у артерий и вен тканеспецифичных свойств. Относительно успешной была 3D-печать сосудистой сети из метакрилового желатина [70], а также биочернил на основе Pluronic F127, которые после печати были сжижены охлаждением и удалены с получением открытых сосудистых каналов размером до 45 мкм [71]. Тем не менее, эти работы остаются интересными экспериментальными достижениями далекими от трансляции в практику.

Для биопечати сердечных клапанов активно использовали печать гидрогелями. В частности, с их помощью удалось сформировать аналог трехстворчатого сердечного клапана на основе гиалуроновой кислоты, желатина и интерстициальных клеток аортального клапана человека с сохранением высокой жизнеспособности клеток в течение 7 дней [72]. Тем не менее, гидрогели и биочернила на их основе не обладают достаточной гибкостью и эластичностью, а их механические свойства далеки от параметров нативной ткани [73].

Технология производства искусственной кости может быть основана как на методах небиологической, так 3D-биопечати. Среди всех доступных методов биопечать обладает уникальным преимуществом точного контроля биологической архитектуры и механических свойств. Среди материалов для решения этой задачи использовали двухфазный фосфат кальция, гидроксиапатиты и трикальцийфосфат. В ряде работ достигнутая структурная точность скаффолдов на основе двухфазного фосфата кальция превысила 96,5%, однако говорить об их

активном применении в клинике еще преждевременно [74]. Интересные результаты были получены при использовании минерализованного ВКМ, продуцируемого МСК из нижней носовой раковины человека, в качестве дополнения к 3D-биопечатным каркасам на основе PLGA и β -трикальцийфосфата. Данный скаффолд показал высокие остеоиндуктивные и остеокондуктивные свойства с сохранением органических и неорганических компонентов после имплантации [75].

Использование 3D-биопечати имеет перспективы и для получения хрящевых эквивалентов. Для этой цели успешно использовали чернила на основе поликапролактона, ПЭГ, гиалуроновой кислоты, альгинатов [76]. Все они в той или иной степени были эффективны с точки зрения выживаемости клеток (до 80-90%) и их индукции в хондро- и адипогенном направлениях. Также в ряде работ отмечалось накопление в течение нескольких недель значимых количеств гликозаминогликанов – обязательного компонента зрелого хряща [77]. Вкупе с удовлетворительными показателями биоразлагаемости гидрогели вызывали незначительную экспрессию провоспалительных генов в макрофагах и даже снижали смоделированную острую иммунную реакцию [78].

Несмотря на достижения 3D-биопечати и получение ТИК со структурой, мимикрирующей дерму, печень, щитовидную железу и др., эти подходы остаются далекими от клинического применения. Это связано как с наличием в составе конструкций химических полимеров, так и с тем фактом, что архитектура этих ТИК все еще отличается от нативной. В этой связи данное направление рассматривается в ТИ, скорее, как перспективное нежели сформировавшееся практическое поле. Основной областью применения ТИК, полученных с помощью 3D-биопечати, остается скрининг лекарственных средств и моделирование различных тканей *in vivo*, где этот подход незаменим. В будущем, вероятно, произойдет активное проникновение методов 3D-биопечати в такую важную область как моделирование тканей человека на т.н. чипах, использование которых повышает эффективность исследований в фармакологии и при поиске новых мишеней лекарственных средств.

Клеточные пласты – адгезионные минимальные тканеинженерные конструкции

Клеточные пласты (КП) определяют как плоскую минимальную ТИК, состоящую из одного или нескольких типов жизнеспособных клеток, объединенных наработанным ими в культуре матриксом, а также обогащенную растворимыми факторами, заякоренными в его составе [12, 79].

Технология КП была создана группой Okano в конце 1990-х и на момент появления позиционировалась как метод неинъекционной доставки клеток для терапии без использования

скаффолдов или синтетических носителей [10, 80]. Данный подход решал подробно описанную в разделе 1.1.2 настоящего обзора проблему аноиксиса и падения жизнеспособности клеток при их ферментативном снятии с подложки или носителя.

Входящие в состав КП компоненты матрикса обеспечивают сохранение межклеточных сигналов и сигнализацию от рецептирующих ВКМ интегринов, что препятствует активации аноиксиса после снятия КП с культуральной посуды.

Возможность получения КП появилась после разработки культуральных сосудов с термочувствительным покрытием на основе поли-N-изопропилакриламида, способного менять свои свойства в зависимости от температуры окружающей среды. В условиях культивирования при температуре 37°C это покрытие является гидрофобным и способствует адгезии клеток. При снижении температуры менее 32°C полимер переходит в гидрофильное состояние и молекулы воды проникают в толщу материала, превращая его в набухший полимерный слой между пластиком и ТИК, что способствует откреплению пласта (рисунок 2).

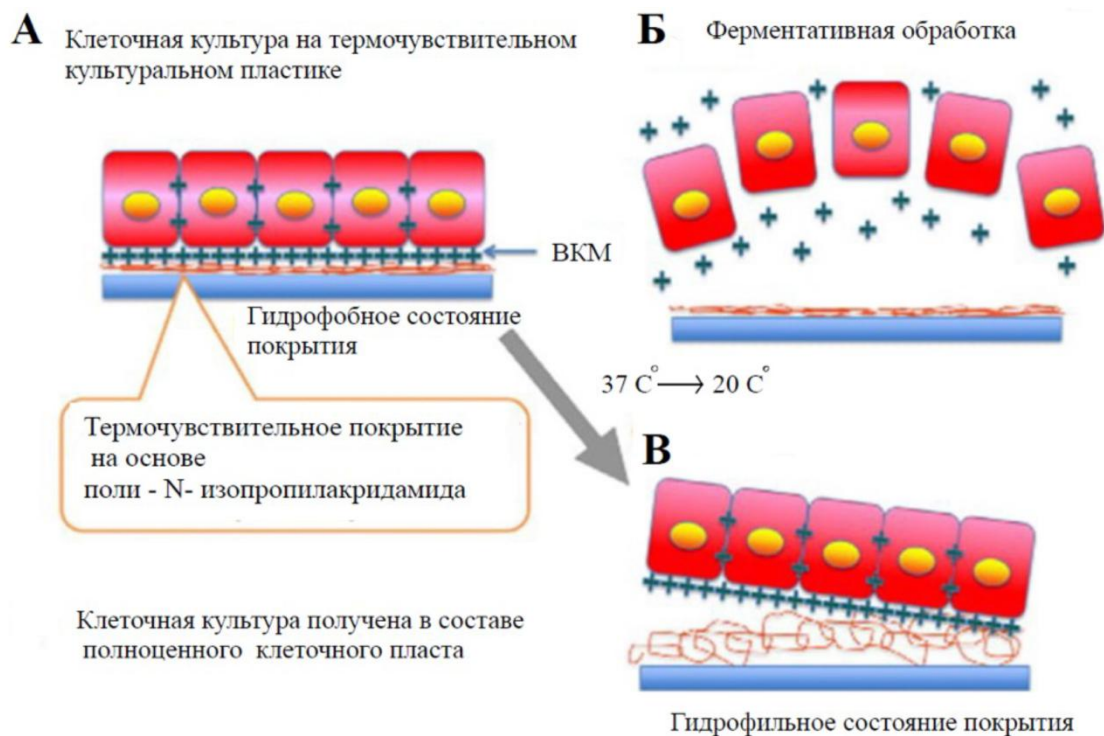


Рисунок 2 – Получение клеточных пластов на термочувствительном покрытии из поли-N-изопропилакриламида. Условия при температуре 37°C (А): клетки соединены за счет межклеточных контактов, внеклеточный матрикс адгезирует их к полимерному покрытию; открепление клеток с помощью протеаз (Б) приводит к разрушению матриксных белков и межклеточных контактов, а открепление пласта (В) при понижении температуры до 32°C за счет набухания полимера сохраняет матрикс и межклеточные контакты в составе конструкции. Адаптировано из [14]

По сравнению с конструкциями на основе скаффолдов КП имеют ряд существенных технических преимуществ. Во-первых, их получение не требует сложных и дорогостоящих технологий и реактивов, поэтому возможно в любой клеточной лаборатории. Во-вторых, КП состоят только из клеток и нативного, т.е. синтезированного ими в культуре ВКМ и не содержат ксеногенных и синтетических компонентов [81]. Механическая стабильность КП обеспечена белками ВКМ и межклеточными взаимодействиями в отличие от скаффолдов, чья конструкция основана на материалах искусственного происхождения или обработанных нативных матриксах (например, дВКМ) [82]. В результате, при использовании КП исключаются ограничения, связанные с деградацией синтетического материала, сопровождающейся высвобождением токсичных продуктов и развитием воспаления [83]. Кроме того, ВКМ в составе КП выполняет роль не просто естественного каркаса для клеток, но и является структурой, осуществляющей регуляцию регенеративных процессов [84]. Напомним, что в составе матрикса оказываются заякоренными секретируемые клетками ФР и цитокины, а также ВВ, несущие микроРНК и другие компоненты, способные активировать программы регенерации [85]. Кроме того, в составе КП по сравнению со сфероидом клетки имеют более равномерный доступ к содержащимся в культуральной среде нутриентам и кислороду.

Изначально описанный выше метод использовали, в основном, для получения КП из эпителиальных клеток, полученных из разных источников: роговицы [86], слизистой ротовой полости [87] и кожи [88]. Клиническое применение таких ТИК оказалось эффективным для заживления небольших поверхностных дефектов кожи, травм роговицы и при восстановлении слизистой оболочки пищевода после резекции опухолевых новообразований [89]. При дальнейшем развитии этой технологии были получены КП из эндотелиальных клеток (ЭК), кардиомиоцитов, первичных фибробластов и миоцитов [89]. КП из кардиомиоцитов оказались способны к стимулированной и спонтанной пульсации, а послойная укладка нескольких конструкций через 45 минут приводила к электромеханическому сопряжению с синхронной пульсацией за счет формирования щелевых контактов между слоями клеток [79, 90, 91].

Проблема создания крупных ТИК на основе КП в перспективе может быть решена за счет использования префабрикации, позволяющей получить васкуляризованные конструкции. Так, сокультивирование КП из кардиомиоцитов с ЭК приводило к формированию васкуляризованных конструкций, причем плотность ее возрастала *in vivo* после трансплантации их животным и способствовала выживаемости клеток [79, 92]. Такого рода конструкции могут трансплантироваться самостоятельно с созданием значимых объемов «плюс-ткани», а также использоваться для пластики полых органов или получения их эквивалентов вне организма.

1.1.4 Актуальность исследований в области тканевой инженерии как направления развития регенеративной медицины

Таким образом, в настоящее время ТИ располагает широким и достаточно эффективным набором методов, которые могут использоваться в РМ. Несмотря на ожидания, связанные с перспективами биореакторных методов и 3D-биопечати, основные результаты, которые могут в ближайшее время транслироваться в практику, опираются на использование автономных свойств клеток в культуре. В частности, на их способность синтезировать ВКМ, формировать относительно простые, но в то же время удобные для трансплантации ТИК, а также на регуляцию дифференцировки и выживаемости в составе таких структур. При этом существующие тканеинженерные подходы (сфероиды, КП), хотя и имеют ряд ограничений, успешно решают одну из главных проблем клеточной терапии, связанную с обеспечением выживаемости трансплантируемых клеток и регуляцией их дифференцировки и интеграции в организм реципиента.

В составе ТИК возникают регуляторные и сигнальные связи, которые невозможны в простой культуре и тем более в суспензии клеток. Следовательно, статус трансплантированных в их составе СК и МСК в корне отличается от такового в стандартных препаратах для клеточной терапии. В целом, основной задачей направления в настоящее время становится поиск оптимальных *платформ*, т.е. многофункциональных подходов, которые, опираясь на воспроизводимые и удобные в применении методы ТИ, смогут максимально широко использоваться в РМ. Сфероиды стали одним из примеров такого платформенного подхода, однако их использование в клинической практике и для решения проблем трансплантологии ограничено целым рядом факторов. При этом как платформа для моделирования и лекарственного скрининга они получили широкое распространение и позволили получить множество интересных результатов. С учетом имеющихся предпосылок мы можем взять на себя смелость утверждать, что не менее интересной альтернативной платформой могут стать ТИК в виде пластов из различных типов клеток, выбор которых становится важной задачей при создании такого подхода.

В РМ, как и в любой медицинской области, выбор объекта и мишени опирается на фундаментальные представления о регенерации, которая позволяет телу человека поддерживать свою целостность и восстанавливаться после повреждения в течение всей жизни. В связи с этой задачей целесообразно обратиться к основным знаниям о физиологических механизмах восстановления человеческого организма.

1.2 Основные представления о регенерации как физиологическом процессе

1.2.1 Обновление тканей и репаративная регенерация

Феномен регенерации является основой неотъемлемой способности живого к поддержанию целостности и формы. Этот физиологический процесс идет на всех уровнях организации живой системы – от молекул (нуклеиновые кислоты, АТФ, глюкоза, амфиболиты и др.) до частей тела и даже организма целиком. В неповрежденной ткани ключевым является *физиологическое обновление* – постоянный процесс замещения отслуживших клеточных элементов, в основном, за счет пролиферации зрелых клеток или активации резидентных СК с последующей дифференцировкой. Клетки имеют заданный период жизни, по истечении которого происходит их программируемая гибель с последующим замещением вновь образованными. Этот цикл является основой постоянства клеточного состава – *тканевого гомеостаза*, который определяется динамичными процессами гибели и появления новых клеток [22].

Типичным примером эффективно идущего обновления считают функционирование красного КМ или крипты кишечника, которые обеспечивают поддержание состава крови и структуры слизистой оболочки кишки соответственно. Скорость обновления является жестко закрепленным тканеспецифичным параметром, любые резкие изменения которого вызывают серьезные отклонения в структуре и функции ткани. Постоянное обновление клеточного состава с разной интенсивностью идет в коже, жировой ткани, во всех паренхиматозных и полых органах, сердце и нервной системе. Гибель и появление новых клеток формируют подобие прямой и обратной реакции с константами, меняющимися под влиянием неблагоприятных условий – дефицита питания, истощения, хронического воспаления и, наконец, старения организма в целом [22].

При повреждении, которое может быть вызвано разными воздействиями, происходит однократная или хроническая утрата большого количества клеток и иных элементов ткани. Принципы восстановления структуры в такой ситуации отличаются от описанного выше процесса обновления. Большинство авторов середины XX века указывали, что ключевым ответом на повреждение является локальная активация программы *роста ткани* [93, 94], направленного на восстановление целостности организма. Если рассматривать обязательные для любого повреждения воспаление и гомеостаз как необходимые для выживания защитные реакции, то воссоздание разрушенной структуры требует именно роста ткани, которого не происходит при обновлении. Таким образом, помимо вызывающей его причины и масштаба

гибели клеток, процесс *репаративной регенерации* отличается от обновления наличием *фазы роста*, основу которой закладывают первичные реакции на повреждение.

1.2.2 Этапы репаративной регенерации, ее регуляция и исходы

Гемостаз и рецепция повреждения

При достаточно обширном повреждении любой ткани основными чертами являются разрушение межклеточного вещества и массивная гибель клеток. Пространство, образовавшееся в зоне повреждения, заполняется содержимым кровеносных сосудов и элементами, которые отсутствовали в этой ткани – например, клетками воспаления и белками плазмы крови.

Первичный ответ в виде гемостаза активируется фактором фон Виллебранда (vWF) и коллагеном тканей, которые связываются с гликопротеином Ib (GPIb) тромбоцитов и вызывают их распластывание и дегрануляцию [95]. При этом содержимое тромбоцитарных гранул, содержащих, в том числе, ФР (PDGF, VEGF, TGF- β и др.), а также медиаторы (серотонин, АДФ), попадает в ткани. На этом этапе активированные тромбоциты являются одним из немногих и, возможно, основным источником ФР [96] – ключевых регуляторов поздних этапов заживления. Благодаря гемостазу, их содержание растет уже через несколько минут после повреждения и сопровождающего его кровотечения. Таким образом, они начинают оказывать свое плеотропное действие уже на ранних этапах регенерации – в ходе гемостаза и воспаления.

Активация тромбоцитов поначалу идет по принципу положительной обратной связи, обеспечивая формирование тромбоцитарного сгустка, а также выброс достаточно большого количества активаторов следующих стадий свертывания крови. Вторым ключевым моментом является запуск каскада свертывания крови экспонированным на поверхности клеток тканевым фактором, что приводит к формированию фибринового свертка [95]. Его функция не ограничена остановкой кровотечения – ниже будет отражена его роль как первичного структурного матрикса для дальнейшего процесса заживления [96], а клетки крови, заключенные в его составе, активно продуцируют спектр биологически активных веществ, диффундирующих в ткани.

За описание событий, связанных с остановкой кровотечения, зачастую упускают тот момент, что этот этап является крайне важным для рецепции тканью самого факта повреждения. Кровь рассматривается как важнейший участник первых этапов ответа на повреждение, поскольку она не является тканеспецифичной и обладает двойственной функцией:

- при повреждении она способна к его рецепции, причем кровь единообразно рецептирует повреждение вне зависимости от повреждаемой ткани, а отличающиеся характеристики гемостаза в разных органах связаны с тканеспецифичной экспрессией факторов, его регулирующих [97];
- контакт периферической ткани с компонентами крови является обязательной частью рецепции повреждения, а выделяющиеся при ее свертывании субстанции, вносят существенный вклад в пул ФР и активацию воспаления.

С точки зрения рецепции не менее важным оказывается и то, что гибель клеток сопровождается выбросом молекул, сигнализирующих о повреждении. Основным механизмом клеточной гибели при обширном повреждении является некроз, в исходе которого содержимое клеток изливается во внеклеточное пространство. Компоненты разрушенных клеток и попавшие из внешней среды факторы начинают непосредственно воздействовать на окружающие ткани, сообщая информацию о степени повреждения, его природе, а также инвазии микроорганизмов. Механизмы рецепции повреждения, не ассоциированные с активацией гемостаза, изучены слабее, однако установлено, что компоненты погибших клеток представляют собой ассоциированные с повреждением молекулярные паттерны (англ. *damage-associated molecular patterns*, или DAMPs), а компоненты проникающих из внешней среды микроорганизмов – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (англ. *pathogen-associated molecular patterns*, или PAMPs). DAMPs представляют собой молекулы, выполняющие различные функции внутри клетки и в норме крайне редко оказывающиеся в межклеточном пространстве. PAMPs представлены, в основном, различными частями микроорганизмов, часто контаминирующих зону повреждения. В отличие от DAMPs, PAMPs практически отсутствуют в неповрежденных тканях организма. Как правило, это компоненты бактериальной клеточной стенки или жгутиков, а также чужеродная ДНК и РНК [98]. Липополисахарид – компонент внешней мембраны грамотрицательных бактерий – наиболее хорошо изученный представитель PAMPs.

Оба упомянутых класса молекул сигнализируют о повреждении посредством различных рецепторов распознавания паттернов (англ. *pattern recognition receptors*, или PRR) [98]. В настоящее время описаны целые классы рецепторов, отнесенных к PRR, также в эту же группу зачастую относят и различные внутриклеточные ДНК-сенсоры [98, 99].

Основные данные о сигнальных каскадах, активируемых PAMPs и DAMPs, получены при изучении клеток иммунной системы, однако позднее было показано, что PRR имеются на большинстве других типов клеток, в том числе на СК, МСК, а также клетках паренхимы [98, 99, 100]. Репертуар PRR и сопряжение активируемых ими сигнальных путей с даунстрим-

мишенями могут варьировать в различных клеточных популяциях, что приводит к вариабельности ответа на повреждение.

Таким образом, на ранних этапах гемостаз и прочно ассоциированная с ним рецепция повреждения являются важнейшими активаторами соответствующих программ в других типах клеток. При этом, не связанные с гемостазом механизмы рецепции повреждения изучены хуже, однако убедительно показано участие DAMPs и PAMPs и их рецепторов.

Сосудистая реакция на повреждение и таксис лейкоцитов

Микроокружение, формируемое в ответ на рецепцию повреждения, становится регуляторной основой для дальнейших этапов заживления, и одной из ранних фаз является сосудистая реакция, зависящая от активности ЭК. Последние содержат внутриклеточные гранулы – тельца Вейбеля-Паладе, заполненные биологически активными веществами, например, эндотелином-1, IL-8, растворимой формой vWF и др. [101]. При повреждении эндотелий дегранулирует содержимое телец Вейбеля-Паладе в ткани, внося вклад в гемостаз и в формируемый в тканях пул медиаторов воспаления [95]. Высвобождаемый эндотелин-1 вызывает сокращение поврежденных сосудов, vWF – активацию и агрегацию тромбоцитов, а IL-8 является мощным хемокином для нейтрофилов и других иммунных клеток [101]. Вазоконстрикция в первые минуты после повреждения, вызываемая также активацией симпатической нервной системы, краткосрочна и быстро нивелируется за счет активности тучных клеток. Продуцируемый ими гистамин и другие вазоактивные медиаторы вызывают более длительную вазодилатацию с усилением проницаемости сосудов [96]. Результатом вазодилатации становится увеличение объема кровотока вблизи зоны повреждения, сопровождаемое открытием дополнительных капилляров, а также покраснением, разогревом и отеком тканей. Последний развивается за счет ретракции ЭК и увеличения фенестр между ними, в результате чего плазма крови начинает выходить из сосудов в окружающие ткани [95]. Из-за уменьшения объема плазмы кровь в сосудах сильно сгущается, в результате чего движение форменных элементов замедляется и развивается стаз. Вместе с образованием пор между ЭК это создает условия для роллинга и адгезии лейкоцитов к стенкам сосудов с последующей миграцией в зону повреждения и окружающие её ткани [96].

Первыми мигрируют нейтрофилы: приходя в зону повреждения, они взаимодействуют с компонентами воспалительного микроокружения, проходя стадии праймирования и активации [102]. Нейтрофилы, попавшие в окружение с низким уровнем медиаторов воспаления и высоким содержанием PAMPs и DAMPs, начинают дегранулировать, продуцировать свободные радикалы и выбрасывают во внеклеточное пространство ДНК [103]. При их дегрануляции и

продукции свободных радикалов происходит выброс в ткани молекул, обладающих бактерицидным и бактериостатическим действием. Однако под влиянием свободных радикалов и матриксных металлопротеиназ (ММП) увеличивается зона повреждения, что приводит к секреции тканями медиаторов воспаления [103]. В таком окружении они начинают активно фагоцитировать дебрис и подвергаться апоптозу, за счет чего происходит очищение зоны повреждения [104].

Моноциты начинают мигрировать из системного кровотока вместе с нейтрофилами, но делают это значительно медленнее, поэтому накопление их достаточного количества происходит, когда количество нейтрофилов уже начинает снижаться по описанному выше механизму [95]. В зоне повреждения моноциты начинают дифференцироваться в макрофаги, чей функциональный фенотип зависит от регуляторного окружения, в которое они попадают. Известно, что макрофаги могут приобретать провоспалительный (M1) и противовоспалительный (M2) фенотип, однако *in vivo* в зоне повреждения ситуация гораздо сложнее. M1-макрофаги продуцируют преимущественно провоспалительные цитокины (TNF- α , IL-1 β , IL-6), а после переключения фенотипа на M2 – ФР и противовоспалительные цитокины (PDGF, VEGF, TGF- β , IL-10 и др.).

Описанные *in vitro* M1- и M2-фенотипы являются противоположными точками континуума возможных фенотипов, в той или иной степени обладающих признаками как M1, так и M2 макрофагов [105]. При заживлении острого повреждения многих органов в первые дни преобладают макрофаги провоспалительного типа, но в течение нескольких суток происходит смена фенотипа и большинство составляют макрофаги с противовоспалительным фенотипом [105]. Одним из сильнейших стимулов такого «переключения» фенотипа являются апоптотические тельца нейтрофилов, которые фагоцитируются макрофагами [106, 107]. Это приводит к очередной смене регуляторного микроокружения и способствует разрешению воспаления, а также дальнейшему заживлению тканей [108].

Роль резидентных иммунокомпетентных клеток в регуляции воспаления

Характеристики развивающейся воспалительной реакции определяются составом пула медиаторов воспаления, который зависит от тканеспецифичных механизмов рецепции повреждения. При этом воспаление сохраняет стереотипные черты, не зависящие от характеристик повреждающего стимула или типов повреждаемых тканей [95]. Это объясняется одной из главных особенностей медиаторов воспаления – способностью вызывать продукцию клетками других медиаторов воспаления по принципу положительной обратной связи, что

обеспечивает присутствие относительно устойчивого пула этих молекул независимо от первоначального стимула и места их образования.

Среди резидентных иммунокомпетентных клеток, активно отвечающих на образующиеся провоспалительные факторы, наиболее представлены тканевые макрофаги и дендритные клетки (ДК). Они обнаружены в различных органах и тканях, причем массово они представлены в слизистых оболочках, а также в органах, контактирующих с внешней средой или подверженных высокой антигенной нагрузке. ДК и тканевые макрофаги несут множество PRR, распознающих PAMPs и/или DAMPs, преимущественно Toll-подобные рецепторы (TLR, англ. *toll-like receptor*) Активация TLR приводит к их взаимодействию с цитоплазматическими адаптерными белками (MyD88, TRIF, MAL), запускающими соответствующие внутриклеточные сигнальные каскады. Как правило, это приводит к активации ассоциированных с воспалением факторов транскрипции NFκB и AP-1, которые индуцируют экспрессию генов множества цито- и хемокинов (TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8, IFN-I) [100].

Медиаторы воспаления, выделяемые в ответ на рецепцию повреждения ДК и тканевыми макрофагами, обладают мощным провоспалительным действием. Кроме того, они способны индуцировать секрецию факторов воспаления другими клетками по принципу положительной обратной связи. Эта положительная обратная связь со временем увеличивает количество клеток, продуцирующих провоспалительные цитокины и хемокины. Этот ответ является критически важным для индукции и масштабирования воспаления, однако без механизмов, сдерживающих эту положительную обратную связь, повреждение приводило бы к гибели от септического шока [100]. Важнейшим фактором сдерживания воспаления является продукция противовоспалительных цитокинов привлекаемыми из системного кровотока лейкоцитами, однако из числа резидентных клеток эту роль берут на себя стромальные клетки, к которым относятся и упомянутые выше МСК.

Роль стромальных клеток в регуляции ответа на повреждение

Определение роли стромальных клеток в репаративной регенерации затруднено прежде всего потому, что не существует достаточно надежных критериев их обнаружения *in vivo* среди множества подобных им клеточных типов. Это связано как с отсутствием экспрессии ими высокочувствительных и специфичных маркеров, так и с высокой гетерогенностью данной популяции [96].

Стромальные клетки обладают еще одной особенностью, затрудняющей их изучение *in vivo*, – высокой пластичностью, которая становится особенно важной при их рассмотрении в контексте процессов заживления. Маловероятно, что в физиологических

условиях стромальные клетки способны трансдифференцироваться в клеточные типы другого эмбрионального листка, но в пределах пула стромальных клеток и его производных фенотипические переходы происходят. Они обусловлены, скорее, транзиторным влиянием окружения, а не изменением автономных, т.е. стойко закрепленных свойств, приобретенных в эмбриогенезе. Таким образом, современное представление о стромальных клетках, скорее, описывает их как гетерогенную популяцию фибробластоподобных элементов СТ, хотя данная позиция имеет ряд возражений, основанных, в том числе, на транскриптомном анализе одиночных клеток.

Большинство данных о рецепции стромальными клетками повреждения и характеристиках ответа на него получены в исследованиях *in vitro* или *in vivo* при разработке методов клеточной терапии, однако сформированная на их основе концепция устойчива и принимается большинством исследователей.

Стромальные клетки экспрессируют ряд PRR и функциональные рецепторы провоспалительных цитокинов, активация которых в зависимости от контекста вызывает приобретение стромальными клетками про- или противовоспалительного фенотипа. Если стромальные клетки находятся в нормальном микроокружении, они могут отвечать на DAMPs и PAMPs продукцией провоспалительных цитокинов. Стромальные клетки, находящиеся в воспалительном окружении, в ответ на эти же стимулы начинают производить противовоспалительные молекулы [109]. На ранних этапах ответа на повреждение большинства тканей ярко выражено воспаление, поэтому стромальные клетки преимущественно противодействуют его развитию. Основными механизмами противодействия воспалительному ответу является продукция стромальными клетками PGE₂, IL-1ra, IL-10, которые подавляют в зоне повреждения чрезмерную секрецию провоспалительных цитокинов и прерывают положительную обратную связь каскада активации воспаления [109, 110, 111].

Несмотря на важность стромальных клеток в регуляции и смягчении острого воспалительного ответа, им присуща еще одна важнейшая функция, связанная не с ответом на повреждение, а с инициацией роста ткани. Ее можно обозначить как формирование уникальной СТ, носящей название *грануляционной* и ассоциированной исключительно с процессами заживления и репаративной регенерации.

*Грануляционная ткань – ее структура, механизмы формирования
и ремоделирования*

Этапность процессов заживления такова, что по завершении формирования фибринового свертка, на основе которого разворачивается дальнейший процесс роста ткани, начинается переход к образованию специализированной структуры, получившей название *грануляционной ткани* (ГТ). Данный термин в значительной степени обусловлен ее морфологией, в которой значимое место занимают многочисленные капилляры, придающие ей зернистый вид (от лат. *granum* — зерно) [112].

Определение грануляционной ткани и роль стромальных клеток
в ее образовании

ГТ является специфичной для процесса заживления временной соединительнотканной структурой, характеризующейся высокой плотностью пронизывающих ее кровеносных сосудов, а также обогащенной активированными стромальными клетками и клетками иммунной системы. Функционально она необходима для закрытия зоны повреждения за счет контракции ее краев, а также является местом событий, определяющих исход заживления в фиброзирование или полную регенерацию.

Рост ГТ начинается уже через 48-72 ч. после повреждения, когда капиллярные ростки ответвляются от мелких сосудов сохранной ткани и начинают направленный рост в зону повреждения. Непосредственно в зоне повреждения образование ГТ начинается с пролиферации и миграции стромальных, ЭК и эпителиальных клеток.

Под стромальными клетками в аспекте формирования ГТ чаще всего подразумевают фибробласты, составляющие ее основу и ответственные за синтез, депонирование и ремоделирование ВКМ. Однако к стромальным клеткам относят также перициты, гладкомышечные клетки (ГМК) и МСК. О проблематике определения МСК как клеточного типа и их роли в репаративной регенерации речь пойдет в дальнейших разделах настоящего обзора, сейчас же сконцентрируемся на ходе образования ГТ.

Под влиянием ФР, цито- и хемокинов стромальные клетки перемещаются из окружающей ткани в зону повреждения. Миграция клеток в область повреждения сквозь участки, богатые поперечно-сшитыми волокнами фибрина, требует достаточной протеолитической активности. Механизмы, позволяющие стромальным клеткам проникать в толщу фибринового свертка, слабо изучены, однако установлена важная роль фибронектина как субстрата для миграции клеток [113]. На данном этапе для области повреждения

характерна высокая плотность макрофагов, активно способствующих миграции стромальных клеток путем продукции спектра протеаз и фагоцитоза дебриса. Они также секретируют ФР, необходимые для координации процесса роста ГТ, в котором преобладает *фиброплазия*, т.е. увеличение объема СТ за счет увеличения числа клеток [114].

Стромальные клетки синтезируют коллагены и протеогликаны [115], которые замещают фибрин и создают каркас будущей ГТ. Важно отметить, что для фиброплазии недостаточно только пролиферации клеток СТ, требуется также депонирование коллагена, для процессинга и сшивания которого необходимо достаточное количество кислорода [116]. В результате этого возникает ситуация, при которой для полноценного роста ГТ необходима васкуляризация, которая обеспечивается активно идущим *ангиогенезом*. Во взрослом организме новые сосуды формируются путем образования ответвлений от предсуществующих [117], для чего необходимы последовательные стадии активации, пролиферации и миграции ЭК, после чего происходит стабилизация образованных сосудов или их апоптотический регресс [118].

Критическая роль ангиогенеза в формировании грануляционной ткани, его этапы и регуляция

Основным стимулом ангиогенеза является гипоксия, которая связана с тем, что при росте ГТ стромальные клетки уже не могут получать достаточное количество кислорода за счет диффузии на расстоянии более 100 мкм от ближайшего капилляра. Наиболее чувствительны к гипоксии локальные ЭК, в которых гипоксия стимулирует стабилизацию индуцируемых гипоксией факторов транскрипции HIF (hypoxia-inducible factor) [119], под контролем которых находится экспрессия основного активатора ангиогенеза – VEGF и его изоформ, отличающихся различной длиной зрелого ФР. Помимо HIF и VEGF существует целый спектр молекул, регулирующих ветвление и рост сосудов – ангиопоэтины (Ang-1 и -2), FGF2, HGF, некоторые хемокины, гормоны и нейропептиды [118].

В образовании и поддержании кровеносных сосудов следует отметить решающее значение ВКМ. В покоящихся сосудах ЭК и перициты окружены базальной мембраной, преимущественно состоящей из коллагена IV и ламининов, а интерстициальный ВКМ из коллагена I и эластина обеспечивает прочность стенки. Действие ангиогенных ФР приводит к ослаблению плотных контактов между ЭК и продукции протеаз – активаторов плазминогена и проколлагеназ. Все это вызывает фрагментацию базальной мембраны и позволяет ЭК образовывать новые кровеносные сосуды в толще ГТ. Следует отметить, что протеолитическое расщепление ВКМ должно быть предельно точно отрегулировано за счет

динамического равновесия его активаторов и ингибиторов. При недостаточной дестабилизации ЭК не смогут приступить к миграции в толщу ткани, а при избыточной активности протеаз будут разрушены необходимые им для подвижности и навигации субстраты и сигнальные молекулы [120]. В этой связи закладка и дальнейший рост ГТ зависят от скоординированной активности стромальных клеток и ЭК, в частности от сбалансированной регуляции ангиогенеза и стабилизации новых сосудов, которая требует прямого контактного взаимодействия упомянутых выше типов клеток [121].

После первичного активного ветвления капилляров наступает этап созревания сосудистой сети, который является определяющим для их функциональности и зависит от взаимодействия ЭК с перицитами. Как было сказано выше, прямой контакт ЭК и стромальных клеток, в т.ч. перицитов, необходим для стабилизации вновь образованного сосуда. Ассоциация перицитов и ЭК приводит к снижению пролиферативной и миграционной активности последних, что останавливает ветвление сосуда и резко повышает его проницаемость, а также выживаемость ЭК при неблагоприятных условиях и гипоксии. [122]. Ключевым аттрактантом стромальных клеток и предшественников перицитов является одна из форм тромбоцитарного фактора роста – PDGF-BB, состоящая из двух В-субъединиц и способная связываться с рецептором PDGFR- β . При подавлении связывания лиганда со своим рецептором или падении концентрации PDGF-BB наблюдается избыточная ангиогенная активность с хаотичной топографией сосудов, а также ростом их проницаемости, которую определяют термином «текучесть» [123]. В норме после формирования стабильного контакта перицитов с ЭК в составе сосудистой стенки возникают взаимные сигнальные воздействия, которые останавливают миграцию и пролиферацию ЭК и активируют синтез компонентов базальной мембраны, что дополнительно стабилизирует сосуд в составе ГТ или иной ткани [121].

Таким образом, на раннем этапе основными процессами, характеризующими развитие ГТ, являются фиброплазия и ангиогенез [95, 96, 124]. Стромальные клетки активно продуцируют ВКМ, в котором преобладают фибронектин и коллаген III типа, ЭК формируют густую сеть капилляров, большинство из которых не покрыты перицитами и проницаемы для плазмы крови, т.е. являются текучими капиллярами [96]. Хотя высокая васкуляризация является следствием роста ГТ и необходимости обеспечения клеток в ее составе кислородом и нутриентами, доставляемыми током крови, устоявшаяся точка зрения заключается и в том, что капилляры ГТ играют важную роль в процессах фиброобразования.

Фенотипический переход стромальных клеток в миофибробласты и ремоделирование грануляционной ткани

По мере роста ГТ происходит постепенный переход к стадии *ремоделирования*, которая заключается в активной реорганизации ВКМ с контракцией краев раны/дефекта. Завершаться данный процесс может либо воссозданием структуры ранее существовавшей ткани (эпиморфная регенерация), либо фиброгенезом и формированием в зоне повреждения нефункционального рубца [125].

Примерно на 4-5-ые сутки стромальные клетки в составе ГТ начинают приобретать фенотип *миофибробластов*. Миофибробласты, источником которых могут служить большинство типов стромальных клеток, характеризуются присутствием в цитоплазме выраженных пучков актиновых микрофиламентов, обеспечивающих их высокую сократительную способность. Они также склонны к гиперпродукции ВКМ и активно секретируют тканевые ингибиторы металлопротеиназ (TIMP) при низкой продукции протеолитических ферментов [126, 127], что делает их ключевыми эффекторами окончательного формирования рубца [112].

Фенотипический переход стромальных клеток в миофибробласты активируется TGF- β 1 и PDGF, а также механическим стрессом, которому подвержены ткани в зоне повреждения [128]. Действие механического стресса также связано с TGF- β 1, поскольку вызывает его высвобождение из ВКМ и переход из связанной (неактивной) в свободную (активную) форму [129]. Дополнительным *in vitro* подтверждением значимости TGF- β 1 является факт достаточности его воздействия для индукции дифференцировки стромальных клеток в миофибробласты [130].

TGF- β 1, связываясь со своими рецепторами, приводит к активации белков SMAD, а также некоторых SMAD-независимых сигнальных путей, включая MAP-киназные и каскады малых ГТФаз (RhoA и др.) [131]. Это вызывает значительное увеличение экспрессии основного маркера миофибробластов, которым принято считать α -гладкомышечный актин (α -ГМА). Повышение продукции и снижение деградации белков ВКМ смещают баланс в сторону их депонирования во внеклеточном пространстве [132]. В состав образующихся актиновых филаментов включается α -ГМА, обеспечивающий миофибробластам необходимую сократительную способность [128, 129]. Также при этом отмечается рост продукции и накопления в составе матрикса коллагенов I и III типов и депонирование сплайс-формы фибронектина с дополнительным внеклеточным доменом A (ВД-A) [128, 133]. За счет этого сформированная ГТ приобретает способность к контракции, необходимой для сближения краев зоны повреждения или раны.

В ходе поздних стадий ремоделирования ВКМ в составе ГТ замещается кросс-сшитыми фибриллами коллагена I типа. Они не поддаются лизису эндогенными протеазами, а миофибробласты и другие клеточные типы уходят в апоптоз, в результате чего формируется рубец [95, 96]. Рубец на месте повреждения затем подвергается окончательному ремоделированию, которое может занимать несколько недель и уже необратимо. Созревший рубец представляет собой слабо васкуляризованный и практически лишенный клеток депозит коллагена I типа, который не может быть замещен функциональными клеточными элементами и не восприимчив к экзогенным вмешательствам методами РМ, например, клеточной терапии.

С учетом изложенного выше возникает закономерная точка зрения о двойственной роли стромальных клеток, которые, с одной стороны, необходимы для ранозаживления, подавления воспаления, формирования ГТ и роста ткани, и в то же время являются источниками миофибробластов, чья активность ассоциируется с образованием рубца, но не регенерацией. Рассмотрим известные данные о роли стромальных клеток в этом процессе и проанализируем возможность полноценной регенерации в организме человека.

*Координирующая роль стромальных клеток в ходе развития
и восстановления тканей человека*

Изложенные выше механизмы в сжатой форме отражают лишь основные принципы регенерации у человека с акцентом на репаративный ответ, т.е. процессы, идущие после повреждения. Актуальные представления в этой области все чаще обращаются к биологии развития и рассматривают рост ткани в ответ на повреждение как сложно скоординированный процесс, который во взрослом организме идет по пути, отличающемуся от того, который он же проходит в период эмбриогенеза.

В эмбриогенезе формирование сложных по архитектуре тканей и органов начинается с нестрогой упорядоченной массы клеток, которая затем выполняет определенную программу развития, опираясь на динамически изменяющиеся сигналы и межклеточные взаимодействия. При этом важнейшую координирующую роль в этом процессе выполняет *эмбриональная мезенхима* – низкодифференцированная СТ, дающая начало практически всем зрелым СТ будущего организма [134]. Ее высокая (по сравнению с эпителиальными клетками) подвижность, а также паракринная активность являются залогом регуляции дифференцировочных процессов и пространственной организации закладок частей тела и органов. Ярким примером такого участия является самоорганизация путем конденсации, включающей миграцию и агрегацию мезенхимных клеток в области закладок конечностей, зубов, опорно-двигательного аппарата, полых и паренхиматозных органов. Считается, что

именно активация мезенхимы и ее ранних производных дает старт морфогенетических процессам, обеспечивая формирование органов и их созревание [135].

Еще одной особенностью эмбриональных СТ млекопитающих является способность к эпиморфной регенерации органов, которые во взрослом организме всегда отвечают на значимое повреждение образованием рубца. Интересно, что после рождения быстро (в течение нескольких суток) это свойство практически полностью утрачивается, возможно, из-за контакта с атмосферным уровнем кислорода. Колоссальный окислительный стресс из-за нового уровня оксигенации тканей в первые часы и дни после рождения приводит к высокому содержанию свободных радикалов [136] и шквалу эпигенетических модификаций, напрямую влияющих на экспрессию сотен генов, кодирующих белки, а также регуляторные РНК. В результате, хотя с точки зрения последовательности ДНК организм остается практически неизменным, уже через неделю после рождения мы имеем дело с принципиально другим состоянием генома с точки зрения масштабов эпигенетической модификации и профиля экспрессии [137]. Именно по этой причине многие исследователи высказывают серьезные сомнения в том, что сравнение механизмов регенерации у эмбриона и взрослого человека релевантно и позволит достичь принципиально важных результатов в этой области [22].

Тем не менее, это дает основания полагать, что стромальные клетки взрослого организма при определенных условиях и воздействиях (гипоксия, модуляция экспрессии генов и модификация эпигенетического статуса) способны активировать программы координации процессов морфогенеза и эпиморфной регенерации, характерные для ранних стадий развития организма.

Постнатальный период развития содержит этапы и примеры клеточной самоорганизации. Классическим является феномен эктопического роста, который у человека установлен для селезенки, костной ткани и эндометрия [138, 139, 140]. Его существование указывает на возможность активации программ самоорганизации клеток во взрослом организме, хотя традиционно считается, что этот этап практически полностью завершается в ходе развития. Дополнительным аргументом в пользу важности исследования роли стромальных клеток в регуляции безрубцового заживления тканей человека является то, что при заживлении переломов, идущем без рубца, остеогенезу предшествует этап конденсации, который очень напоминает идущую в эмбриогенезе самоорганизацию мезенхимы.

В целом, мы можем прийти к заключению, что в организме человека эпиморфная регенерация существенно ограничена, однако нельзя сказать, что она полностью исключена.

Склонность к репаративному фиброзу, наблюдаемую в большинстве органов человека, чаще всего объясняют потерей клеточной пластичности, однако исход ранозаживления может зависеть от особенностей межклеточных взаимодействий и организации структуры ткани, а

также от тканеспецифичного репертуара растворимых факторов, секретируемых в ответ на повреждение. Вероятно, роль клеток стромы в этом процессе заключается в формировании первичной соединительнотканной структуры, которая выполняет функцию матрицы для формирования более высоких уровней организации ткани [22]. При этом их роль, скорее всего, не ограничена исключительно ее «постройкой» – они являются активными участниками событий, секретируя ФР, цитокины и другие регуляторные молекулы [141].

Фокус усилий, которые несколько десятилетий назад были сконцентрированы на биологии СК как универсального инструмента для РМ, в настоящее время переместился на клетки иммунной, нервной и кровеносной систем. Их участие в регуляции баланса регенерации и фиброобразования после повреждения в значительной степени говорит о критической роли микроокружения, без которого реализация СК их регенераторного потенциала становится невозможной.

Таким образом, формирование архитектуры органов как в эмбриогенезе, так и в постнатальном периоде зависимы от стромального компонента СТ, происходящего от клеток эмбриональной мезенхимы, обладающих координирующей ролью в ходе морфогенеза. Понимание механизмов этой координации и возможности их частичной или полной активации в стромальных клетках СТ взрослого организма может оказаться ключом к управлению восстановлением ткани и сдвигу его исхода в сторону регенерации.

Поскольку СТ и строма являются активными участниками как эпиморфной регенерации, так и формирования рубца, именно на них, вероятно, будет сосредоточено внимание исследователей. В такой концепции стромальные клетки вообще и МСК, о которых пойдет речь ниже, рассматриваются как регуляторная и направляющая сила, ответственная за создание регуляторного микроокружения и вносящая существенный вклад в исход репаративной регенерации.

1.3 Мезенхимные стромальные клетки как участники регенеративных процессов

1.3.1 Актуальные представления о происхождении мезенхимных стромальных клеток *in vivo*

Мультипотентные МСК были выделены в 1968 г. советским гистологом и клеточным биологом А.Я. Фриденштейном из аспиринов красного КМ и описаны им как субпопуляция негематопоэтических клеток, быстро адгезирующих к культуральной емкости и приобретающих веретеновидную морфологию, напоминающую фибробласты [142].

Дальнейшее развитие этих работ привело к формулировке гипотезы о стромальной стволовой клетке костного мозга, которая может быть источником хондроцитов и остеобластов, однако это не исключает возможности ее дифференцировки в другие типы клеток, формирующих соединительные ткани (СТ) [143]. В пользу этого говорили результаты экспериментов Фриденштейна и других авторов, в которых гетеротопическая трансплантация стромальных клеток КМ заканчивалась эктопическим формированием агрегатов, морфологически идентичных кости, хрящу и жировой ткани. [144].

В 1991 г. А. Caplan предположил, что открытые А.Я. Фриденштейном клетки сохраняются с периода эмбрионального развития и играют роль резерва, который получил название *мезенхимных стволовых клеток* [145]. Им также было высказано предположение о том, что эти клетки можно наращивать *in vitro* с целью дальнейшего применения в рамках клеточной терапии и восстановления тканей человека после повреждения. В дальнейшем А. Caplan не раз возвращался к вопросу идентичности МСК, но в 2017 году он пересмотрел свое исходное предположение и рекомендовал избегать использования термина *стволовые* при расшифровке аббревиатуры МСК [146].

Согласно определению Международного общества клеточной терапии (ISCT), которое было сформулировано в 2006 году, помимо фибробластоподобной морфологии и адгезии к культуральному пластику критериями идентификации МСК *in vitro* являются:

- мультипотентность, заключающаяся в способности к индуцированной дифференцировке в остеобласты, хондроциты и адипоциты;
- наличие триады поверхностных маркеров CD73, CD90, CD105;
- отсутствие маркеров CD34, CD45, CD14, CD19, HLA-DR, характерных для клеток эндотелия, ГСК или клеток иммунной системы [147].

Их четкость и достаточно высокая точность позволила использовать их не только, как руководство для идентификации МСК, но также для гармонизации и уменьшению вариабельности данных и выводов, получаемых учеными при работе с МСК *in vitro*.

Выяснение точной локализации МСК *in vivo* является достаточно большой научной проблемой, так как не установлено каких-либо маркеров данного типа клеток, не перекрывающихся с другими клеточными популяциями. Доминирующей, хотя и регулярно подвергаемой критике, в настоящее время является теория о происхождении МСК из т.н. *перицитов*.

Периваскулярная локализация МСК *in vivo* была впервые предположена в начале 2000-х гг. [21, 148] и в дальнейшем эта гипотеза подкреплялась данными о выделении из стенок сосудов пуповины, аорты и вен человека клеток, идентифицированных как МСК [149, 150, 151].

Перициты определяют как периваскулярные клетки, расположенные на уровне микроциркуляторного русла во всех тканях организма. Они обладают достаточно широким спектром функций помимо обеспечения стабильности кровеносных сосудов. В связи с этим в настоящее время перициты рассматривают в качестве прямых участников физиологических процессов – воспалительного ответа, репаративного фиброза и канцерогенеза [152].

Несмотря на то, что о перицитах было известно с конца XIX века, а их активные исследования велись несколько десятилетий, ученые столкнулись с аналогичной МСК проблемой идентичности клеток. Общепринятый подход, опирающийся на кластеры дифференцировки (CDs) или поверхностные маркеры не позволяет однозначно идентифицировать данный тип клеток. На роль маркеров перицитов в разное время претендовали нестин, CD146, десмин, PDGFR β , однако не один из этих белков не оказался исключительным маркером перицитов.

В этой связи уже спустя почти 100 лет после обнаружения перицитов самым надежным способом идентификации популяции перицитов все еще остается их локализация и морфология, особенностями которых являются периваскулярное расположение и интеграция клетки в базальную мембрану [153].

Решение задачи определения источника МСК и их локализации *in vivo* связывали с использованием метода сортировки клеток, с помощью которого предполагалось определить какие из выделяемых клеток дают начало культурам, положительным по МСК. Crisan и соавт., используя этап предварительного сортировки первичной суспензии, доказали что перициты в разных тканях являются типичными МСК по критериям ISCT [154]. В ряде дальнейших работ эти результаты были независимо воспроизведены другими исследователями [155]. Однако, повторим, что возможность происхождения МСК из перицитов не может исключить происхождения части МСК из других источников в составе тканей. В пользу того, что не все МСК имеют перицитарное происхождение говорит, например, выделение МСК из хорошо известной аваскулярной ткани – роговицы. Строма роговицы представлена кератоцитами – разновидностью фибробластов, которые в данном случае могут быть источником МСК [156].

Еще одной особенностью МСК, которую необходимо учитывать при таких исследованиях, является их тканеспецифичность. Данному предмету посвящены публикации, в которых МСК из 3-4 источников сравнивали по пролиферативному и дифференцировочному потенциалу, а также иммунофенотипу и способности паракринно регулировать рост нервов, воспаление, ангиогенез и другие процессы за счет их секрета или его фракций [157]. Поддержание МСК тканеспецифичных свойств в культуре (в т.ч. в течение достаточно продолжительного времени) свидетельствует об автономности этих характеристик, которые

считаются отражением тканеспецифичной программы МСК, входящих в состав стромы конкретной ткани или органа.

В целом, можно предположить, что МСК происходят из нескольких пулов клеток – перицитов, фибробластов и/или фибробластоподобных клеток стромы, однако после выделения в культуру они обладают набором одинаковых характеристик, что облегчает их идентификацию. При этом ряд тканеспецифичных свойств может сохраняться в культуре длительное время, что говорит об их автономности, которая не противоречит их отнесению к единому типу клеток.

Заключая, можно сказать, что вопрос о фенотипе и локализации МСК в организме остается открытым и общая картина заключается в том, что в организме они представлены гетерогенной популяцией стромальных клеток [158]. В ее состав могут входить перициты, фибробласты, МСК, а также еще не идентифицированные переходные формы, существование которых можно предположить, исходя из динамичности свойств МСК после выделения в культуру.

1.3.2 Механизмы участия мезенхимных стромальных клеток в репаративной регенерации

С учетом упомянутой выше роли стромальных клеток в восстановлении тканей после повреждения следует уделить внимание механизмам участия в этом процессе МСК как неотъемлемой части стромы органов.

Ключевым событием в этом плане следует считать активацию МСК при повреждении [159]. Данный феномен не следует путать с активацией СК в классическом понимании, которая, как правило, связана с их выходом из состояния покоя и запуском дифференцировки. Рецепция МСК повреждения в значительной степени опирается на общие механизмы, описанные для клеток стромы (см. раздел 1.2.2.4), хотя этот этап исследован менее подробно, чем последующие события. Одним из важных факторов, обуславливающих активацию МСК в поврежденной ткани, является их периваскулярная локализация, чувствительность к нейромедиаторам (в т.ч. симпатической и парасимпатической нервных систем), а также гормонам и провоспалительным цитокинам [160, 161]. Также следует упомянуть, что многие свойства МСК, например, скорость дифференцировки и спектр секретируемых ими цитокинов и ФР, могут обладать тканеспецифичными особенностями. При этом общие принципы, лежащие в основе их участия в регенерации, остаются актуальными для большинства известных типов МСК и будут изложены ниже.

Долгое время считалось, что основной вклад в восстановление тканей МСК (в т.ч. вводимые при клеточной терапии) вносят путем дифференцировки, что полностью соответствовало актуальным на тот момент представлениям о наличии у них свойства стволовости. Наиболее убедительные данные были получены для трех основных векторов дифференцировки МСК – в osteo-, хондро- и адипогенном направлениях. При этом рядом авторов отстаивалась точка зрения о том, что МСК способны давать начало также миоцитам, а миофибробласты и сейчас иногда рассматриваются как одно из специфических для ранозаживления направлений их дифференцировки. В отношении МСК, вводимых при клеточной терапии, было показано, что они могут приобретать некоторые фенотипические характеристики клеток поврежденной ткани [162], хотя и не становятся ее функциональными элементами, которые восстанавливаются из резидентных СК. Также были предприняты попытки *in vitro* дифференцировки МСК и в кардиомиоциты [163], гепатоциты [164], нейроны и клетки глии [165], которые не входят в триаду основных дифференцировочных направлений. В дальнейшем многие из упомянутых результатов удавалось воспроизвести лишь частично, в связи с чем рядом авторов ставится под сомнение наличие у МСК автономной способности к дифференцировке в неканонических направлениях.

Помимо мультипотентности МСК обладают спектром эффектов, опосредованных их секреторной активностью и действием растворимых факторов, продуцируемых ими как в покое, так и в активированном поврежденном состоянии. Этот комплекс продуцируемых МСК сигнальных молекул, ФР, а также белков ВКМ и внеклеточных везикул различных типов в настоящее время определяют термином *секретом* [4]. Основным механизмом его действия считается смешанная ауто- и паракринная сигнализация, которая необходима для постоянного обновления тканей, а также в ходе репаративной регенерации, идущей в абсолютном большинстве органов с участием МСК. Современный консенсус заключается в том, что действие секретомы МСК и, таким образом, именно их паракринная активность является основным регулятором роста ткани и ее восстановления после повреждения. При этом действие компонентов секретомы МСК сопоставимо с эффектами, получаемыми при прямом сокультивировании или введении МСК в ткани [166], что указывает на его высокую активность как регулятора регенерации. Следует еще раз упомянуть критическую роль МСК как источника противовоспалительных факторов, необходимых для прекращения острой фазы ответа на повреждение. Для последней характерно наличие каскада эффектов воспалительных хемо- и цитокинов с положительной обратной связью и именно МСК берут на себя роль противовеса в этой точке перехода от воспаления к заживлению и росту ткани (рисунок 3).

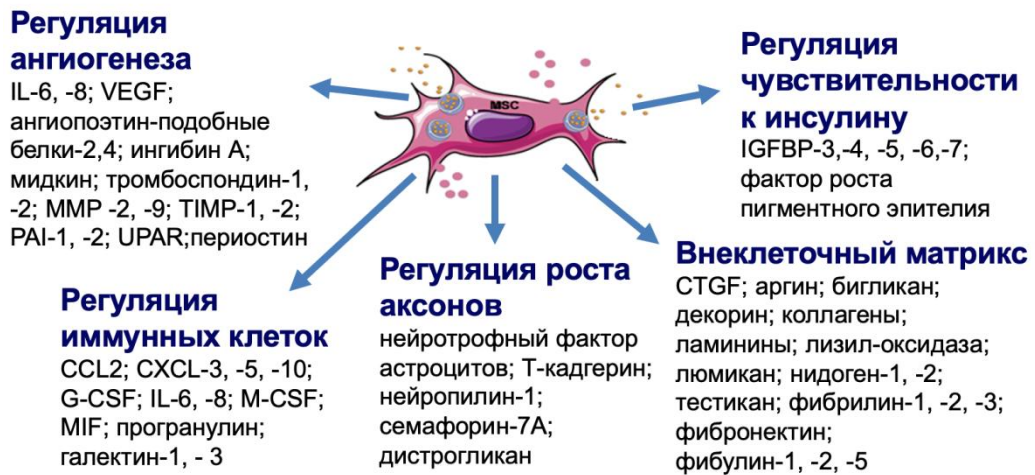


Рисунок 3 – Состав секретома мезенхимных стромальных клеток человека, его основные функциональные молекулярные группы и наиболее известные представители. Адаптировано из [22]

Нельзя не затронуть вопрос об аутокринной регуляции МСК, т.е. рецепции ими компонентов собственного секретома и ответа на них. Значительное число работ посвящено эффектам секретома МСК на другие типы клеток, однако в последние годы внимание стали уделять его влиянию на сами МСК. Показана роль аутокринно действующего PGE₂ на обновление пула МСК и его сохранение [167], а также важность интерферона- γ в качестве раннего активатора дифференцировки МСК в остеобласты [168]. Различные данные об аутокринной регуляции адипогенной дифференцировки МСК появляются в течение последних лет [169], однако конкретного компонента в составе секретома МСК, способствующего их же переходу в преадипоциты и зрелые клетки жировой ткани, определить до сих пор не удалось. На эту роль претендуют факторы из семейства Wnt [169], длинная некодирующая РНК *ROA* и ее мишень – пентраксин-3 [170], а также универсально распространенный кофермент НАД⁺ [171]. Можно сделать вывод о том, что секретом МСК передает важные функциональные сигналы не только окружающим клеткам, но и самим МСК, обеспечивая, в первую очередь, выбор ими дифференцировочного пути или же удержание в недифференцированном состоянии.

С учетом регенераторного действия секретома МСК он стал удачным объектом для создания на его основе лекарственных препаратов с комплексным составом. Являясь коктейлем из различных молекул, такой препарат отвечает современным представлениям о регуляции регенерации ткани. Комбинированное действие его компонентов приводит к усилению сигнала в точках амплификации – общих для сигнальных каскадов молекулах, воссоздавая картину кооперативной регуляции суммой стимулов, а не одиночными молекулами. Данное направление в биофармацевтике получило название *клеточной терапии без клеток* (англ. *cell-free cell therapy*). Полученные нашими коллегами данные *in vivo* указывают на наличие у

секретома МСК мощного ангиогенного и нейротрофного действия, а также способности стимулировать заживление кожи после ожогов и восстанавливать сперматогенез [166, 172].

Еще одной важной особенностью секретома является адаптивность его состава, которая обеспечивается ответом МСК на микроокружение, в том числе и после введения экзогенных клеток с целью терапии. Так, при характерных для поврежденных тканей гипоксии и высоком содержании воспалительных цитокинов (например, IL-8 или TNF- α) они способны в определенном диапазоне увеличивать продукцию IL-10, PGE2, VEGF165, HGF, GDNF, PDGF-BB и других компонентов секретома [173, 174]. Показано, что в таких условиях у МСК резко растет экспрессия ангиогенных (VEGF, HGF, bFGF) и нейтрофических (GDNF, NGF) ФР и снижается продукция антиангиогенных белков (PAI-1, тромбоспондина), что приводит к переключению действия секретома [175]. Действительно, такая адаптивность состава секретома МСК ускоряет разрешение воспаления в его острой и острейшей фазах, а на более поздних этапах способствует росту капилляров и нервных окончаний, необходимых для регенерации и восстановления ткани (рисунок 4).

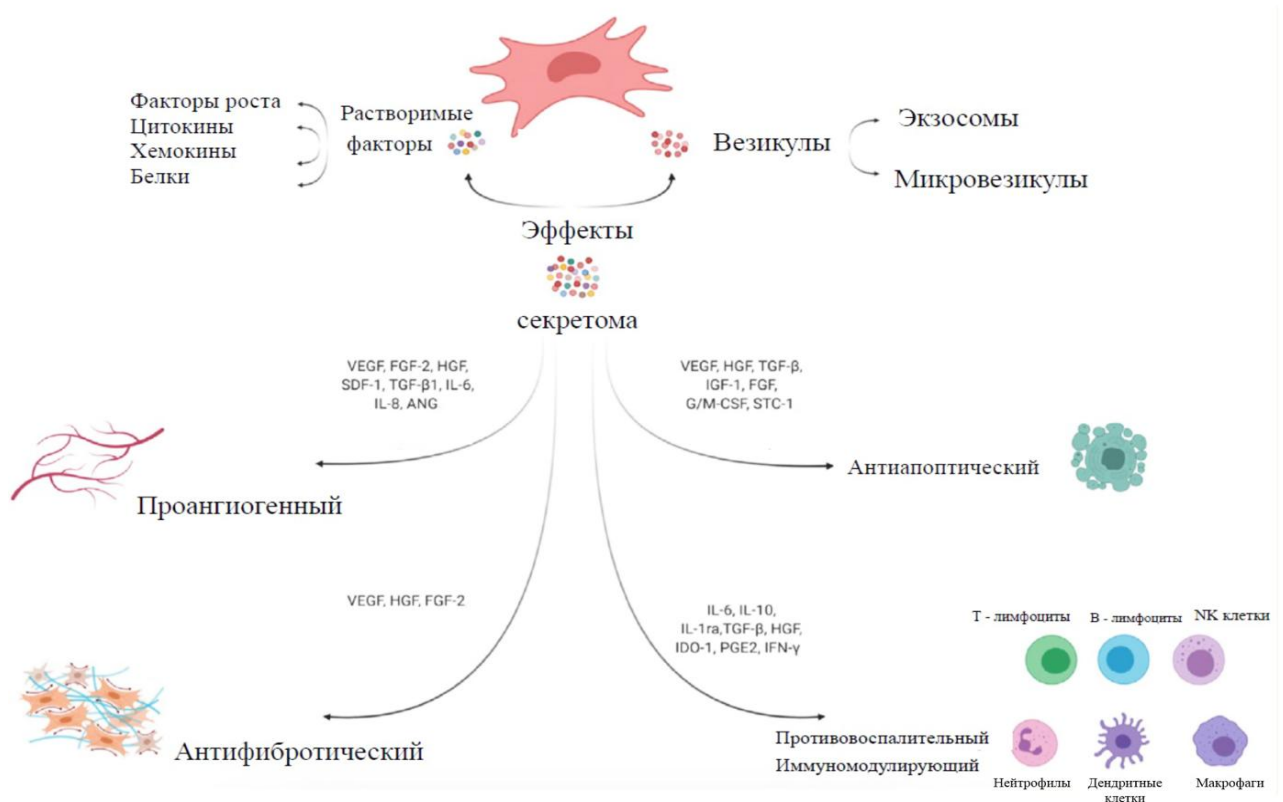


Рисунок 4 – Основные регенераторные эффекты секретома мезенхимных стромальных клеток и вовлеченные в них молекулы. Адаптировано из [176]

В целом, наиболее важные механизмы участия МСК в репаративных процессах после повреждения можно сформулировать следующим образом:

1. дифференцировка МСК в трех ключевых для них направлениях и интеграция зрелых клеток в ткани – данный процесс, вероятно, ограничен тканями опорно-двигательного аппарата и жировой тканью;
2. формирование стромального компонента и ремоделирование ВКМ, обеспечивающего как формирование нормальной архитектуры ткани, так и восстановление ее целостности путем фиброзирования;
3. пара- и аутокринная регуляция функций других клеток и самих МСК, которая имеет важное для этапности регенерации свойство адаптивности в зависимости от условий окружения.

Все перечисленное выше укладывается в современные представления об МСК как о популяции локальных клеток-регуляторов, которые в неповрежденной ткани, благодаря своей периваскулярной локализации рецептируют сигналы как системного уровня (из кровотока или нервной системы), так и локальные, т.е. динамически возникающие в ткани. В результате этого МСК обеспечивают тканевую гомеостаз за счет своей дифференцировки и продукции секрета, а также прямых контактов с другими типами клеток.

При повреждении и связанной с ним активации стромы на первый план выходит паракринное действие МСК за счет компонентов секрета, составляющих сложный спектр биологически активных молекул и белков ВКМ, а также ВВ. С точки зрения физиологической регуляции активация МСК повреждением резко меняет состав их секрета, действие которого является одним из основополагающих звеньев восстановления структуры ткани, которое зачастую завершается образованием рубца. Дополнительную трудность этой ситуации придает способность МСК давать начало миофибробластам, участвующим в фиброплазии и фиброзировании ткани. С учетом важности секрета как регулятора дифференцировки МСК во всех трех ключевых направлениях нельзя исключить, что приобретение фенотипа миофибробластов может быть предметом аутокринной регуляции компонентами секрета. Убедительных данных о действии аутокринных факторов из состава секрета МСК на их же переход в миофибробласты к настоящему времени не опубликовано, что, впрочем, оставляет вопрос открытым и создает интересное поле для исследований. Все это убеждает в том, что при репаративной регенерации МСК за счет продукции секрета способны быть важным регуляторным звеном процесса и заслуживают внимания как объект разработки в РМ.

Подробно осветив современные представления о роли и функциональной значимости МСК в репаративной регенерации, перейдем к обзору накопленных данных о возможности их применения в клеточной терапии и ТИ.

1.4 Использование мезенхимных стромальных клеток в клеточной терапии и тканевой инженерии

С учетом физиологических свойств МСК, а также возможностей получения и культивирования их рассматривали как перспективный объект для использования в РМ, начиная с 1980-х годов, когда клеточная терапия и ТИ являлись исключительно экспериментальными направлениями [41, 82].

Исторически сложилось, что первое время основным источником МСК являлся красный КМ. Однако со временем выяснилось, что технология получения МСК из него является недостаточно эффективной в связи с тем, что количество МСК в строме КМ относительно низкое (2-3 МСК на 10^5 клеток стромы). Также получение клеток КМ является инвазивной процедурой с определенным риском осложнений [177]. На данный момент, наиболее перспективным источником МСК, помимо КМ, считается жировая ткань (ЖТ) [178]. Исследования показали, что количество МСК, получаемых из подкожной ЖТ, в 10 – 100 раз выше, чем из КМ [179]. Кроме того, процедура забора ЖТ относительно малоинвазивна, в связи с чем данный источник МСК приобрел популярность в РМ. Помимо упомянутых выше тканей МСК для клинического использования успешно выделяют из дермы, пупочного канатика и Вартонова студня, пуповинной и менструальной крови, а также пульпы зуба. Следует также указать, что к 2020 году почти в половине КИ ($n=476/1033$) тканевой источник МСК не указывался, а сами клетки описаны просто как «аллогенные МСК» [3].

1.4.1 Основные области применения мезенхимных стромальных клеток в клеточной терапии

Быстро установленная минимальная иммуногенность МСК наряду с их протективным действием на клетки пораженной ткани дали начало разработке подходов к их терапевтическому применению. Одни из первых КИ с использованием клеточной терапии МСК показали возможность поддержания гемопоза у больных со злокачественными опухолями [180] и продемонстрировали эффективность при несовершенном остеогенезе у пациентов детского возраста [181]. В дальнейшем введение МСК в/в или локально показало свою перспективность для лечения онкологических, сердечно-сосудистых, неврологических и аутоиммунных заболеваний [182].

Опиравшиеся на иммуносупрессивные свойства МСК были проведены еще в 1990-х годах для лечения сепсиса или при тяжелых случаях реакции по типу «трансплантат против хозяина», при которых МСК способствовали снижению воспалительной реакции и ускорению

выздоровления [183, 184, 185]. В основе этого эффекта лежит способность МСК модулировать активность клеток иммунной системы за счет непосредственного контакта и продукции иммуносупрессивных факторов [186]. Так, МСК подавляют активность Т-лимфоцитов и секрецию ими провоспалительных цитокинов, а также способны регулировать соотношение Th1/Th2. Также установлено, что МСК могут подавлять активацию и созревание дендритных и NK-клеток [187]. При контакте с МСК повышается жизнеспособность В-клеток и одновременно уменьшается их пролиферация в связи с остановкой клеточного цикла. Кроме того, МСК влияют на секрецию антител и производство костимулирующих молекул В-лимфоцитами [188].

Клеточная терапия с помощью МСК была предложена как способ лечения реакции отторжения трансплантата у пациентов, не отвечающих на медикаментозную иммуносупрессию. Впервые эффективность такой терапии была оценена в 2004 году и было показано, что инфузия МСК привела к выраженному иммуносупрессивному эффекту, который длился месяцы и годы после терапии [189]. При трансплантации органов, которая остается безальтернативной при терминальной органной недостаточности острое и хроническое иммунное отторжение трансплантата остается частым явлением, несмотря на высокоэффективную иммуносупрессивную терапию. В основе реакции отторжения трансплантата лежит сложный патофизиологический процесс, в котором участвуют аллореактивные Т-хелперы. При этом наблюдается повышение секреции провоспалительных цитокинов (TNF, IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-12), активация дендритных клеток, макрофагов и NK-клеток [190]. Основной задачей при лечении реакции отторжения трансплантата является ингибирование провоспалительных цитокинов, концентрация которых коррелирует с тяжестью реакции [191].

Заслуживающие внимания результаты были получены при использовании МСК для лечения ревматоидного артрита [186]. Характерным признаком этого заболевания является активность аутореактивных Т-клеток, которая приводит к воспалению синовиальной оболочки суставов, приводящему к их медленному разрушению [192]. Значительную роль в воспалительном процессе играют Th1 и Th17, которые проникают в ткани сустава, высвобождая провоспалительные цитокины и хемокины. Большое количество этих клеток, а также медиаторов воспаления способствуют макрофагальной инфильтрации и активации нейтрофилов, продуцирующих свободные радикалы, цитокины и ферменты, участвующие в деградации ВКМ [193]. В экспериментах *in vivo* было показано, что введение МСК вызывает снижение числа Th1 и Th17, а также подавляло продукцию ими провоспалительных факторов (IFN- γ , TNF- α , IL-1 α и 1 β , IL-6 и IL-17). Помимо этого, было обнаружено, что МСК способствуют увеличению продукции IL-10, который является противовоспалительным цитокином и изменяет активность Treg клеток [194]. К настоящему времени в мире завершено

более 10 КИ по системному введению МСК из различных источников, которые убедительно показали эффективность данного метода клеточной терапии ревматоидного артрита [195]. Иммуномодулирующее действие МСК также лежит в основе клинической эффективности при системной красной волчанке и осложнениях болезни Крона [186].

В свете недавних событий было выяснено, что МСК эффективны при COVID-19. В исследованиях с участием больных пневмонией, вызванной COVID-19, трансплантация МСК способствовала улучшению клинической картины при минимальных нежелательных явлениях [196, 197]. Данный эффект МСК объясняют продукцией IL-10, индоламин-2,3-диоксигеназы и простагландина E2. Эти факторы изменяют активность иммунных клеток, инфильтрирующих легочную ткань, и способствуют разрешению отека [196]. Еще одним фактором эффективности считается то обстоятельство, что при системной инфузии МСК агрегируют преимущественно в легких, где способствуют восстановлению легочного эпителия, уменьшению фиброза и нормализации газообменной функции легких.

Эффекты МСК, во многом, объясняются их паракринной активностью и действием компонентов секретомы, однако существует ряд заболеваний, при которых способность к дифференцировке играет первостепенную роль. Применение МСК при дефектах костной и хрящевой ткани показывает свою эффективность именно благодаря тому, что они способны дифференцироваться в хондробласты и остеобласты *in vivo*.

У взрослых и пожилых лиц суставы и костная ткань обладают ограниченным потенциалом к восстановлению в связи с остеопорозом, а также низкой способностью к пролиферации хондроцитов и слабой васкуляризацией суставного хряща.

Клеточная терапия с помощью введения МСК была предложена как способ лечения дефектов костной ткани после того, как Garner-Molto в экспериментах на мышах было показано, что трансплантированные МСК способствуют восстановлению костной ткани в области перелома за счет секреции BMP-2, который является мощным индуктором остеогенеза [198].

Всего к настоящему времени завершено или проводится не менее 18 КИ по использованию МСК для лечения переломов различных локализаций и сложности [199]. Большинство этих исследований показало эффективность МСК для стимуляции заживления и консолидации переломов различной сложности и локализации. Помимо переломов МСК также активно применялись в рамках КИ у больных с несовершенным остеогенезом, межпозвоночными грыжами и остеопорозом различного генеза [200].

Присущая МСК способность дифференцироваться в хондроциты используется при терапии заболеваний, связанных с деструкцией хрящевой ткани, например, остеоартрита. В основе патогенеза данного заболевания лежит разрушение суставного хряща, связанное с

хроническим воспалением, неизбежно приводя к инвалидизации пациента. С 2008 года было проведено 23 КИ, в которых была показана безопасность и умеренная эффективность инъекционной терапии МСК для лечения данного заболевания, приводившая к уменьшению его клинических проявлений [201].

Еще одной интересной областью применения МСК можно назвать лечение травматических повреждений головного мозга и периферической нервной системы, а также нейродегенеративных заболеваний: болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, бокового амиотрофического склероза и мультисистемной атрофии. Терапия этих заболеваний с помощью МСК показала свою эффективность на животных моделях, а также в КИ. На сегодняшний день зарегистрировано более 125 КИ с применением МСК для лечения заболеваний, связанных с различными повреждениями нервной системы [202].

Показано, что МСК способны после внутривенного введения преодолевать гематоэнцефалический барьер и способствовать восстановлению структур ЦНС. При этом терапевтический эффект МСК в лечении патологий нервной системы обычно связывают с двумя механизмами. Как было описано выше, МСК способны секретировать нейротрофические факторы роста, в частности, ИDNF, который относится к трансформирующим факторам роста и оказывает мощный антиапоптотический эффект на дофаминергические нейроны [203]. Это обосновывает возможность использования МСК при болезни Паркинсона, вызываемой гибелью дофаминергических нейронов черной субстанции головного мозга. На моделях *in vivo* было показано, что восстановление уровня BDNF за счет МСК способствует их выживанию и уменьшает проявление симптомов. В ходе дальнейших КИ пациентам с прогрессирующим надъядерным параличом (тяжелая форма болезни Паркинсона), осуществляли введение МСК в церебральные артерии, что приводило к улучшению клинической картины несмотря на то, что для данного состояния характерно стремительное ухудшение моторных функций [202].

Таким образом, на протяжении последних десятилетий МСК показывали свою эффективность для лечения целого ряда различных заболеваний. Перспективность отрасли не вызывает сомнений, однако большинство КИ, в которых была показана эффективность клеточной терапии с помощью МСК, имели открытый дизайн и не были рандомизированными. Эти КИ ранних фаз не стали основанием для регистрации большинства разработанных клеточных продуктов, однако они поддерживали отрасль, интерес к ней и проведение новых исследований в этой области. Опираясь на полученный в ходе них опыт, рассмотрим основные преимущества и недостатки клеточной терапии с использованием МСК, баланс которых в дальнейшем предопределили переход приоритета в пользу методов ТИ.

1.4.2 Использование мезенхимных стромальных клеток в тканевой инженерии и практический опыт их применения

Одной из базовых причин, стимулировавших переход от клеточной терапии к ТИ, стала низкая эффективность суспендированных МСК в силу их недостаточной выживаемости после введения.

С учетом роли МСК в репаративной регенерации, их высокой секреторной и дифференцировочной активности очевидным является их потенциал не только для клеточной терапии, но и для разработки подходов ТИ. Подходы ТИ послужили платформой для разработки новых методов РМ, эксплуатирующих важную физиологическую роль МСК в обновлении и репаративной регенерации тканей человека [12, 204].

Критически рассмотрим преимущества и недостатки наиболее распространенных подходов ТИ, использующих МСК.

Тканеинженерные конструкции на основе мезенхимных стромальных клеток в комбинации со скаффолдами

Исследования биосовместимости МСК с кандидатными скаффолдами исходно были начаты в связи с тем, что при культивировании клеток на жесткой поверхности из отрицательно заряженного полистирола клетки их морфология и состояние цитоскелета драматически изменялись, что сопровождалось потерей ими ряда свойств в культуре [205]. Жесткость пластика, приближающаяся к 1000 кПа, в сотни и тысячи раз превышает жесткость тканей, из которых выделяют МСК (например, 0,3 кПа для красного костного мозга и около 5 кПа для подкожного жира).

Вначале для решения этой задачи было предложено нанесение на чашки субстратов на основе гидрогелей с варьируемыми показателями жесткости, которые позволили приблизить характеристики микроокружения к физиологическим, а также создали возможность управления дифференцировкой МСК в определенном направлении [206, 207] и их иммуномодулирующей паракринной активностью [208]. Дальнейшие фундаментальные работы показали, что механические сигналы являются мощными регуляторами активности МСК, в т.ч. их регенераторного потенциала.

С учетом данных о том, что функции МСК регулируются жесткостью, упругостью, а также взаимодействием материала с сигнальными системами клетки, необходимо комплексно подходить к задаче его подбора. Идеальный скаффолд зачастую должен объединять свойства, многие из которых определяются его химической структурой и

биологическим происхождением. Кратко опишем наиболее часто используемые скаффолды и приведем их характеристику с точки зрения использования в ТИ [209].

Биокерамика обладает объективными преимуществами при создании материалов для восстановления костных дефектов и позволяет избежать трансплантации ауто- или аллокости [210]. Керамические материалы отличаются хрупкостью, однако выходом стало применение плазменного напыления и электрофоретического осаждения для создания керамических композитов. Наиболее часто применительно к МСК упоминаются титан-керамические композиты, состоящие из титана и биоактивной керамики (гидроксиапатит, фосфат кальция и волластонит) [211]. Они обладают биологической активностью *in vitro* и более удобными для применения *in vivo* механическими свойствами [212, 213].

Костный цемент на основе фосфата кальция был разработан в 1986 г. и состоит из тетракальцийфосфата и безводного бикальцийфосфата, обладающих хорошей биосовместимостью, остеокондуктивностью и резорбируемостью. Его комбинация с МСК способствовала регенерации костной ткани и ускорила заживление ее дефектов у животных [214, 215]. Заселение конструкций на основе пористой биокерамики из фосфата кальция МСК КМ приводило к улучшению биосовместимости и ускорению консолидации экспериментальных костных дефектов у животных [216, 217].

Дальнейшее развитие этих подходов связано с методами порошкового литья под давлением, с помощью которых на основе титан-гидроксиапатитных композитов удалось получить скаффолды со сложной формой и геометрией, а также уникальными параметрами пористости. Все это позволило создать внутри скаффолда высокую плотность МСК при высокой биосовместимости этого материала, которые в совокупности позволили добиться эффективной остеодифференцировки МСК *in vivo* [218].

Среди множества КИ следует отметить работы Gómez-Barrena и соавт., которые использовали МСК в сочетании с биокерамическим скаффолдом для восстановления нарушенной консолидации переломов трубчатых костей (плечевой, бедренной, большеберцовой). В качестве биоматериала ими использовались 1-2 мм гранулы из композита на основе 20% гидроксиапатита и 80% трикальцийфосфата. При этом они смогли подтвердить эффективную консолидацию не только с помощью лучевого исследования, но и гистологически (исследование ORTHO1). Действительно, проведенные биопсии областей имплантации показали формирование близкой к нативной костной ткани, окружавшей импрегнированные биокерамические частицы [219]. Следует отметить, что во всех случаях использовались вспомогательные технологии остеосинтеза с помощью пластин и штифтов, т.е. метод ТИ являлся вспомогательным и дополнял основной протокол необходимого лечения перелома.

В целом, из-за упомянутого сочетания двух взаимосвязанных механических свойств - хрупкости и биомеханической прочности – материалы на основе биокерамики в сочетании с МСК могут использоваться исключительно для восстановления костной ткани. Широкий опыт их применения в КИ показывает перспективность этой группы методов ТИ. При этом отсутствуют убедительные и достаточные по мощности КИ по сравнению биоматериалов между собой или обоснованию их преимущества над стандартными методами остеосинтеза или использованием компрессионно-дистракционных методов – например, аппарата Илизарова.

Еще одним популярным материалом для ТИ с использованием МСК стали *альгинаты*. Альгинаты представляют собой класс поликатионных сополимеров, получаемых из бурых водорослей, которые имеют различные соотношения остатков 1,4-связанной В-D-маннуроновой кислоты (М) и α -L-глутамина (G). Они способны к мягкому гелеобразованию, отличаются хорошей биоразлагаемостью и могут использоваться в виде инъекций. Их гидрофильность, низкая иммуногенность и дешевизна, а также биосовместимость с живыми клетками сочетается с удобной текстурой, что позволяет биоматериалу адаптироваться к особенностям ткани и форме дефекта.

Комбинация альгинатов с МСК повышает механическую прочность конструкции и способствует регенерации тканей за счет паракринного действия МСК, секретом которых высвобождается через толщу альгинатного скаффолда. В исследованиях ТИК на основе МСК и альгината многими авторами отмечалось значительное усиление васкуляризации тканей, которое объясняется проангиогенными свойствами самого альгината и действием компонентов секрета МСК [220].

Интересной с точки зрения механизма представляется исследование Sahu и соавт., в котором *ex vivo* МСК, инкапсулированные в альгинат, сокультивировали с хрящом больного остеоартритом [221]. При этом произошло значительное увеличение содержания в среде культивирования противовоспалительных белков, (IL-10, HGF), которое затем сопровождалось ростом общего содержания гликозаминогликанов и уровня TIMP-1, а также снижением доли апоптотических клеток в хряще. Из этого был сделан вывод, что МСК, инкапсулированные в альгинат, паракринно стимулируют пролиферацию и выживаемость хондроцитов и могут приводить к регенерации хряща при остеоартрите.

Основным недостатком альгината является низкая механическая стабильность, а также то обстоятельство, что биосовместимость может колебаться в зависимости от молекулярной массы, чистоты и вязкости раствора альгината [222]. Сочетание альгината с другими компонентами, такими как RGD-пептид или ФР (например, BMP-2) повышает его механическую прочность и может применяться при трансплантации МСК для ускорения

регенерации кости, хряща и миокарда [223, 224]. В настоящее время не опубликовано данных КИ комбинаций биоматериалов на основе альгинатов с МСК, большинство разработок находится на стадии экспериментальных или регуляторных доклинических исследований, в которых отмечены минимальные токсикологические и иммунологические риски применения альгинатных биоматериалов.

Значительный прогресс был достигнут с применением в ТИ *хитозана* и его производных. Хитозан представляет собой биоактивный полимер с широким спектром потенциального клинического применения. За последнее десятилетие хитозан нашел свое применение для доставки лекарств, генной терапии и тканевой инженерии. К преимуществам хитозана относят его антибактериальное действие, минимальную токсичность, легкость модификации, биodeградируемость и дешевизну, что важно при массовом производстве. Кроме того, хитозановые материалы доступны в различных формах: мембраны, губки, гели, микро- и наночастицы, каркасные пористые скаффолды и нановолокна [225, 226]. В сочетании с МСК оптимальные свойства показали макропористые каркасы из хитозана и альгинатно-хитозановых полиэлектролитных комплексов. Важный для ТИК параметр механической стабильности зависел от размера пор и их количества на единицу объема (пористости), причем увеличение пористости вызывало снижение механической стабильности [227]. В их составе было показано долгосрочное выживание с активной пролиферацией до 90% МСК, а увеличение продукции FGF2, которое происходит при инкорпорации МСК в такие скаффолды, способствует регенерации тканей при острых и хронических повреждениях [228]. Показано, что ТИК на основе комбинации хитозана с МСК обладают высокой биосовместимостью и остеогенными свойствами. У крыс хитозановые скаффолды, заселенные МСК, ускоряли заживление дефекта бедренной кости по сравнению с контрольными группами (пустым скаффолдом или МСК) [229].

Высокая проницаемость хитозановых скаффолдов для секрета МСК, в т.ч. для ВВ, была установлена Zhao и соавт. Было показано, что фракция ВВ, продуцируемая МСК, может быть эффективно загружена в хитозановый скаффолд, который в таком случае играет роль релиз-системы. Такая конструкция, вызывала у животных быстрое заживление кожной раны, которое было сопоставимо с результатами применения скаффолда, заселенного МСК. Механизм действия везикулярной фракции секрета МСК заключался в стимуляции пролиферации, миграции фибробластов и активации экспрессии генов, ассоциированных с замедлением старения. Также было показано, что под влиянием ВВ падал уровень MMP и росла продукция TIMP, что приводило к замедлению ремоделирования ВКМ [230]. К наиболее перспективным областями потенциального применения хитозановых скаффолдов в сочетании с МСК относят стимуляцию заживления дефектов мягких тканей (кожи, жировой

клетчатки), в т.ч. трофического генеза, а также восстановление почек, периферических нервов и миокарда [231]. Основной массив работ в этой области посвящен регенерации костной ткани и суставных хрящей, однако с учетом отсутствия КИ, вопрос об их эффективности остается открытым.

Одними из первых мягких биоматериалов стали *гидрогели*, которые отличаются низкой стоимостью и простотой синтеза, а также слабой иммунореактивностью, высокой гидрофильностью и относительной стабильностью.

Высокая гидрофильность обеспечивается наличием гидрофильных групп (-ОН, -CONH-, -CONH₂- и -SO₃H) в образующих гидрогелевые структуры полимерах. Это свойство гидрогелей очень важно, т.к. благодаря высокому содержанию воды, эластичной консистенции и низкому поверхностному натяжению биологических жидкостей они обладают физическими параметрами сходными с живыми тканями [232].

Выделяют два основных подкласса гидрогелей – гидрогели для инъекций или мукоадгезивные гидрогели [233]. Инъекционные *in situ* гидрогели переходят в твердую форму за счет ферментативных кросс-сшивок, сшивок по основанию Шиффа, существуют также фото- и термоактивируемые гидрогели [234]. Адгезия обоих видов гидрогелей обеспечивается возникающими в ткани электростатическими взаимодействиями, ковалентными связями и/или взаимодействиями гидрогелей с сайтами узнавания интегринов на клетках [235].

Комбинации гидрогелей с МСК из различных источников показали эффективность как на животных моделях, так и в КИ. В работе Genovese и соавт. инкапсуляция микросфероидов из МСК в фибриногеновый гидрогель позволила получить инъекционную форму для восстановления объемных дефектов скелетных мышц. В опыте на мышинной модели ее инъекция приводила к росту экспрессии миогенных маркеров (MyoD и миогенин), увеличению массы мышечной ткани, централизации ядер в созревающих миофибриллах и мелких волокнах, а также к повышению экспрессии маркеров про- и противовоспалительных макрофагов [236].

Гидрогели на основе фибрина в сочетании с МСК нашли применение в качестве нервных кондуитов – конструкций для направленного встречного роста поврежденных концов периферических нервов. В этом направлении интересной стала комбинация МСК с системой доставки лекарств на основе фибринового для медленного локального высвобождения иммуносупрессивного препарата (такролимуса). Из суспендированных в фибриновом гидрогеле микросфер на основе PLGA такролимус высвобождался путем устойчивой диффузии через поверхность микросфер, а затем через гидрогель. Полученный

таким образом скаффолд сочетал локальную доставку такролимуса и введение МСК в этом же геле. В результате этого удалось избежать системных побочных эффектов такролимуса, одновременно индуцируя местную иммунотолерантность к МСК, что увеличивало их выживаемость и стимулировало регенерацию периферических нервов [237].

Клинически чаще всего для доставки МСК использовались гидрогели на основе коллагена I типа и наиболее масштабной можно считать работу Не и соавт., которая представляет собой рандомизированное исследование по оценке эффективности внутримиекардиального введения коллагенового гидрогеля, нагруженного МСК пупочного канатика. В исследование было включено 50 пациентов с хронической ишемической болезнью сердца (ИБС), которым предстояло проведение аортокоронарного шунтирования (АКШ). Из них были сформированы группы терапии (АКШ и инъекция коллагена+МСК) и контроля (АКШ и инъекция МСК или только АКШ). Через 12 месяцев у пациентов, которым была выполнена внутримиекардиальная инъекция коллагена, нагруженного МСК, размер гиподинамической (т.е. дисфункциональной) области миокарда снизился на -3,1% (-6,20–0,02%) по сравнению с группой АКШ, где прирост составил +8,59% (-3,06–20,25%). В группе инъекции МСК без гидрогеля размер гиподинамической области вырос на 5,19% (-1,85–12,22%), что в очередной раз показало малую эффективность инъекционной клеточной терапии. Данная работа стала первым большим рандомизированным КИ, показавшим, что гидрогели из коллагена в сочетании с МСК безопасны и применимы для восстановления функции пораженного ишемией миокарда [238].

Таким образом, можно признать, что наиболее существенный клинический прогресс достигнут в области применения именно гидрогелей. К зарегистрированным клеточным продуктам, использующим их в качестве основы, относится Holoclar (Holostem Therapie Avanzate S.R.L., Италия). Он представляет собой аутологичные лимбальные стволовые клетки роговицы на подложке из фибринового гидрогеля, которая используется для их переноса на поверхность роговицы с целью лечения термических и химических ожогов у взрослых. В ходе КИ и после регистрации Holoclar успешно применялся у нескольких сотен пациентов, показав удовлетворительный профиль безопасности и высокую эффективность [239]. Иных клеточных продуктов на базе МСК и гидрогелей в настоящее время не зарегистрировано, однако некоторые из них активно проходят различные фазы регуляторных КИ, в основном, по показаниям в области ортопедии, офтальмологии и хирургии.

Основные ограничения применения скаффолдов в тканевой инженерии на основе мезенхимных стромальных клеток

Использование биосовместимых скаффолдов различной природы имеет свои преимущества, сочетание их с МСК показало хорошие результаты *in vivo* и *in vitro*. В основном, это связано с повышением выживаемости МСК и повышением их ауто- и паракринной активности, а также регуляцией дифференцировки, что обеспечивает регенераторный потенциал таких ТИК. Тем не менее, клиническое применение этих подходов еще находится на ранних этапах, что связано с рядом важных ограничений.

Вариативность характеристик биоматериалов позволяет выбирать оптимальные показания для каждого конкретного скаффолда и, вероятно, в будущем они найдут свои ниши в медицинской практике. Тем не менее, в настоящий момент большинство работ в этой области ограничено фундаментальными или доклиническими исследованиями, а КИ явно недостаточно для широкого внедрения методов трансплантации МСК с помощью скаффолдов. В большей степени это связано с относительной «молодостью» данной области, но нельзя упускать и то обстоятельство, что долгосрочные исследования влияния биоматериалов на МСК отсутствуют. Кроме того, совместимость клеток и биоматериалов оценивается, в основном, по показателям пролиферации, жизнеспособности и/или склонности к апоптозу. При этом длительное взаимодействие МСК с биоматериалами несомненно устроено более сложно и вовлекает системы механочувствительности, интегриновой сигнализации и эпигенетической регуляции в ответ на свойства скаффолда. В этой связи нам только еще предстоит оценить влияние скаффолдов на дифференцировку МСК и судьбу клеток реципиента, а также на отсроченный исход репаративной регенерации.

Использование мезенхимных стромальных клеток в 3D-биопечати

В качестве клеточного компонента для заселения скаффолдов, полученных методами 3D-печати, МСК используются более 10 лет и на эту тему опубликовано множество экспериментальных работ. В большой степени перспективы использования МСК в 3D-печати связывают с их паракринным действием на окружающие ткани и способностью дифференцироваться в osteo- и хондрогенных направлениях.

Lian и соавт. показали, что многослойные пористые бионические губки, изготовленные с помощью 3D-печати, обладают высокой совместимостью с МСК, причем они модулируют паракринную функцию клеток, повышают адгезию, удержание, выживаемость и пролиферацию МСК, а также значительно стимулируют продукцию ими противовоспалительных, ангио- и

остеогенных ФР и цитокинов. Оценка эффективности *in vivo* на модели дефекта дистального отдела бедренной кости у крыс показала, что трансплантация МСК, предварительно (за 24 ч) высаженных на напечатанные скаффолды, эффективно способствовала регенерации васкуляризированной кости [240].

С точки зрения показаний оригинальным может считаться исследование на животных эффективности 3D-печати в сочетании с МСК для восстановления эндометрия. В исследовании Ji и соавт. использовали 3D-биопечать гидрогелевого скаффолда для заселения его МСК, полученными из ИПСК человека, после чего имплантировали его в поврежденный рог матки крысы. Показано, что такая ТИК вызывала полноценную регенерацию эндометрия с образованием соединительнотканного и железистого компонентов богатых стромальными, эпителиальными, а также ЭК реципиента. Кроме того, у животных отмечалось улучшение показателей, связанных с рецептивной функцией эндометрия. Увеличивалось образование пинопод, возрастала продукция LIF и интегрин $\alpha\beta 3$, в результате чего отмечалось частичное восстановление эффективности имплантации и поддержания беременности [241].

В ближайшие годы такого рода разработки, обладающие трансляционным потенциалом для создания подходов персонализированной медицины, вероятно, останутся экспериментальными вплоть до первого применения 3D-биопечати в клинике. Вполне вероятно, что именно МСК станут основными клеточными объектами для заселения напечатанных конструкций, а выбор показаний будет определяться свойствами скаффолда и его применимостью для регенерации конкретной структуры организма.

*Тканеинженерные конструкции на основе сфероидов
из мезенхимных стромальных клеток*

Многоклеточные сферические конструкции из МСК (сфероиды) формируются за счет автономной способности этих клеток к самоорганизации в различных культуральных условиях, о которых речь шла в соответствующем разделе данного обзора литературы [242]. Важную роль в поддержании целостности играет ВКМ, экспрессия МСК молекул адгезии и интегринов, что суммарно создает более физиологичные условия для существования клеток вне организма.

В плане практического применения сфероиды также рассматриваются как универсальный инструмент для решения проблемы трансплантации МСК с сохранением их жизнеспособности, секреторной активности и дифференцировочного потенциала. Также их возможно использовать для формирования тканеподобных конструкций большого объема в качестве «строительного блока». Слияние сфероидов или объединение их с помощью различных гидрогелей, матриксных белков и биоматериалов позволяет получать крупные

конструкции на основе МСК [243, 244]. Методы 3D-печати также нашли применение в ТИ с помощью сфероидов из МСК – их инкорпорация в сложные конструкции из белков ВКМ, полученные на 3D-принтерах, обладает высокой точностью позиционирования. Такие конструкции обладают достаточной механической прочностью за счет сочетания свойств скаффолда и активации дифференцировки МСК в плотные СТ [245].

В ряде работ было показано увеличение регенераторного потенциала МСК в составе сфероидов. Это, в значительной степени, объяснялось как локальным удержанием доставляемого материала (МСК из состава сфероидов не способны к миграции из места введения [246]), так и увеличением паракринной активности и выживаемости объединенных матриксом клеток. На моделях ишемического повреждения и механической травмы различных тканей и органов удалось показать, что МСК в составе сфероидов обладают высокой экспрессией факторов стволовости, повышенной продукцией ангиогенных (FGF2, ангиогенин, HGF, VEGF) и противовоспалительных факторов (IL-10, PGE₂), что приводило к более выраженному регенераторному эффекту [247].

МСК ЖТ, которые активно использовались в клеточной терапии, также показали свою эффективность в виде сфероидных ТИК. В частности, на крысиной модели ишемического повреждения почки трансплантация сфероидов из МСК ЖТ увеличивала выживаемость животных и интеграцию клеток в ткань по сравнению с суспензией клеток. На гистологическом уровне сфероиды в отличие от введения суспензии активно подавляли апоптоз в ишемизированной почке, а также индуцировали ангиогенный ответ и восстановление кровоснабжения, что приводило к улучшению функции органа [246].

На модели незаживающей кожной раны у мыши трансплантация сфероидов из МСК ЖТ в сочетании с гидрогелем из гиалуроновой кислоты была более эффективной по сравнению с гидрогелем, заполненным суспензией аналогичных клеток. Культивирование сфероидов в гидрогелевом скаффолде приводило к росту экспрессии маркеров стволовости (Nanog, Oct-4), а их доставка на поверхность дефекта вызывала быструю эпителизацию и регенерацию дермы. Роль усиления секреторной активности МСК ЖТ в составе сфероидов была показана на модели такого тяжелого и необратимого состояния как эмфизема легких, которую у мышей можно вызвать введением панкреатической эластазы. Трансплантация сфероидов из МСК ЖТ значительно улучшала состояние ткани легких за счет увеличенной (по сравнению с суспендированными МСК) продукции FGF2 и HGF [248], которые повышали продукцию белков ВКМ, в т.ч. эластина, играющего важную роль в поддержании целостности альвеол.

МСК КМ, обладающие противовоспалительным действием за счет секреции растворимых факторов, значительно усиливали их продукцию при переводе в сфероидную форму. Было показано, что собранные из 40 тыс. МСК КМ сфероиды обладали оптимальным

противовоспалительным и проангиогенным действием, причем последнее могло быть усилено культивированием в низком (1%) содержании O_2 [249]. Таким образом, гипоксическое состояние МСК в ядре сфероидов может стимулировать паракринную активность МСК, а кратковременное усиление гипоксии повышало ангиогенное действие секрета инкорпорированных МСК. Аналогично при помещении сфероидов в состав фибриновых гелей было отмечено увеличение продукции VEGF165 и ПГЕ₂, причем этот ответ коррелировал с параметрами жесткости геля [244]. Это еще раз демонстрирует важность механосенсинга для МСК в составе ТИК, а также способность элементов сфероидов распознавать жесткость дифференцированно и отвечать на нее модуляцией паракринного действия.

Интересным направлением использования сфероидов из МСК КМ оказалось подавление неспецифического аутоиммунного воспаления. У мышей с язвенным колитом инъекция сфероидов приводила не только к улучшению состояния толстой кишки, но и к снижению системного уровня воспалительных цитокинов (IFN- γ , TNF- α , IL-6 и IL-17a), а также уменьшению числа макрофагов и нейтрофилов в крови [250].

Невозможно обойти стороной и пул работ, в которых сфероиды из МСК КМ использовались для ТИ костной ткани. Известно, что в составе сфероидов в клетках возрастает спонтанная экспрессия мРНК целого ряда факторов, вовлеченных в остеогенную дифференцировку (*Runx2*, *ALP*, *OSX* и *OPN*), которая затем резко дополнительно увеличивается при индукции ее соответствующими веществами [244, 251]. Было показано, что имплантация сфероидов из МСК КМ в область критического дефекта бедренной кости у крысы, приводила к успешной регенерации в течение 12 недель, а также резкому усилению критически важной для остеогенеза васкуляризации. В случае плоской кости (на модели дефекта свода черепа у крысы) сфероиды из МСК КМ также успешно вызывали полную регенерацию, которая завершалась за 4 недели [251]. Внимания также заслуживает и подход дополнительного усиления остеогенной активности МСК в составе сфероидов с помощью модификации клеток методами генной терапии. Так, трансфекция сфероидов геном *Runx2*, кодирующим ключевой транскрипционный активатор остеогенной дифференцировки, привела к ускорению заживления дефекта бедренной кости у крысы по сравнению с обычными сфероидом [252].

В отношении регенерации плотных СТ целесообразно упомянуть использование мультисфероидных ТИК, при которых производится слияние нескольких сфероидов из МСК. Для регенерации хряща удавалось получить сфероиды до 1 мм в диаметре, причем это приводило к резкому увеличению продукции коллагена II и протеогликанов [253]. 3D-конструкции костной ткани удалось получить с помощью сфероидов из МСК ЖТ, которые дополнялись минерализованными остеоиндуктивными волокнами, активирующими дифференцировку в остеогенном направлении [254].

Таким образом, сфероиды являются достаточно удобным и универсальным методом трансплантации МСК, в их составе они приобретают ряд свойств, которые в дальнейшем благоприятно сказываются на репаративной регенерации. Широкий арсенал методов модификации и прекондиционирования клеток, а также их сочетание с другими тканеинженерными подходами (3D-печать, аддитивные технологии), позволяют управлять их свойствами и делают их привлекательным инструментом ТИ. Перспективы развития этого направления связывают с получением тканевых эквивалентов кости, хряща, ЖТ и паренхиматозных органов, что может решить ряд проблем современной трансплантологии.

Тем не менее, их общепризнанными недостатками остаются: 1) сферическая форма, из-за которой их сложно рассматривать для создания покрытий, в которых имеется потребность при дефектах кожи, слизистых оболочек, роговицы; 2) наличие выраженного гипоксического градиента и формирование некротического ядра в сфероидах большого диаметра и 3) связанные с градиентом нутриентов и кислорода возможные сдвиги дифференцировочного статуса клеток в их составе, в т.ч. и ассоциированные с канцерогенезом [255, 256].

В отношении клинического применения сфероидов из МСК к настоящему времени нет данных о завершенных КИ этого типа продуктов. В Японии с 2022 года проводится КИ I фазы (jRCTb032220281) по оценке безопасности и эффективности сфероидов из хондроцитов, полученных путем дифференцировки МСК ЖТ, у пациентов с остеоартритом коленного сустава; его результаты ожидаются не ранее 2024 года.

Успешным примером сфероидной культуры, применяемой в практике, может считаться клеточный продукт на основе «аутологичных хондроцитов, объединенных ВКМ», по форме относящийся к сфероидным ТИК. Разработанный немецкой компанией «Co.Don AG» и производимый в России АО «Генериум», данный продукт стал первым отечественным биомедицинским клеточным продуктом, получившим разрешение на проведение регистрационных КИ. В настоящее время этот клеточный продукт имеет регистрацию ЕМА и FDA и активно применяется в практике, демонстрируя высокую эффективность.

Клеточные пласты на основе мезенхимных стромальных клеток

Тканевая инженерия с использованием клеточных пластов (КП) на сегодняшний день является одной из самых многообещающих подходов в РМ. По разработанному Okano и соавт. методу к настоящему моменту успешно получены КП из эпителиальных и стромальных клеток различных органов и тканей – кожи, слизистой рта, мочевого пузыря, роговицы, гепатоцитов и кардиомиоцитов. Эффективность КП из эпителиальных клеток была продемонстрирована в клинике для стимуляции заживления язв кожи и эрозий слизистой оболочки пищевода [14, 18].

Из заслуживающих внимание областей применения КП из МСК, в которых экспериментально и/или клинически показана их эффективность, следует назвать их трансплантацию с целью восстановления сердца, периодонтальной мембраны, кожи, костей, пищевода, кишечника, почки, артерий и головного мозга – кратко эти исследования суммированы в таблице 1 ниже [15].

Аллогенный сценарий получения КП из соматических МСК является доминирующим, т.к. наработка аутологичной конструкции требует длительного процесса от забора и размножения *ex situ* до получения готового к трансплантации КП. Зачастую клиническая ситуация требует быстрой подготовки ТИК, а вариабельность свойств клеток из-за индивидуальных различий пациентов является основным препятствием для эффективной стандартизации получаемых КП. Отличия первичных культур МСК по скорости пролиферации также затрудняют получение готовых тканеинженерных конструкций в заданные сроки [257, 258]. Кроме того, важная для успеха в клинике паракринная активность МСК значительно снижается при наличии у донора заболеваний, которые являются коморбидными состояниями при целом спектре нозологий. Показано негативное влияние на регенераторную активность МСК высокого уровня глюкозы (сахарный диабет), холестерина, кахексии, сопутствующих аутоиммунных заболеваний и ряда хронических инфекций [259, 260].

Использование аутологичного протокола получения КП из МСК целесообразно при плановых и многоэтапных методах лечения, а также в ситуациях, когда подразумевается длительная интеграция клеток в слабо обновляющуюся ткань и совершенно необходимо избежать иммунного ответа на трансплантированную ТИК [261]. Высокая пролиферативная способность МСК и современные методы масштабирования позволяют формировать охарактеризованные банки клеток, из которых при необходимости возможно более быстрое получение готовой к трансплантации аллогенной конструкции [15]. В пользу широкого применения аллогенных КП из МСК говорит и крайне низкая представленность (вплоть до полного отсутствия) МНС II у этого типа клеток, что позволяет рассчитывать на устойчивость КП к возможному отторжению иммунной системой аллореципиента [262].

С точки зрения источника материала для получения КП большинство исследователей использует МСК, выделенные из КМ, ЖТ или периодонтальной связки. Все они обладают мультипотентностью и способностью к образованию колоний *in vitro*, которая коррелирует с возможностью получения КП. Интересно что по нашим данным МСК, выделяемые с менструальным отделяемым, источником которых служит эндометрий матки, не формируют конструкций в виде КП [263]. Это, вероятно, является отражением тканеспецифичных свойств МСК эндометрия, который характеризуется многократной регенерацией в течение репродуктивного периода жизни женщины.

Среди созданных методов получения КП исторически основным является использование культуральной посуды, покрытой термочувствительными полимерами [264], свойства которой изложены в разделе 1.1.3.5. Помимо этого подхода для снятия КП могут применяться позднее созданные электро- [265], pH- [266] и магниточувствительные системы [267]. Тем не менее, именно термочувствительный пластик в настоящее время наиболее широко применяется для получения КП из самых разных клеток, не требуя дополнительного оборудования в лаборатории или клинике. Он также лишен недостатков методов, основанных на изменении (чаще понижении) pH, которое значимо влияет на важные для регенераторной активности свойства клеток. Термочувствительный пластик использовался в клинике в успешных исследованиях с использованием как аутологичных, так и аллогенных КП, что сделало его стандартом с точки зрения клинической безопасности и эффективности их применения [268, 269]. Основным недостатком этого метода является высокая цена термочувствительных покрытий, которая ограничивает их применение. В этой связи актуальным остается вопрос отработки протоколов снятия КП из МСК, в т.ч. механическим способом, с применением низких концентраций протеаз или хелатирующих соединений, снижающих адгезию.

Исследования эффективности доставки *in vivo* показали, что пласты из МСК могут локально удерживаться на поверхности ткани-мишени до 2 месяцев, в зависимости от органа и методов детекции. Примечательно, что КП из МСК спонтанно и непосредственно адгезируют к тканям реципиента, т.е. в большинстве случаев не требуется дополнительных методов фиксации таких как швы или хирургический клей [270, 271].

Интересно, что с использованием системы отслеживания меченых GFP клеток было показано, что МСК могут мигрировать из КП в толщу ткани-мишени и экспрессировать маркеры ЭК и перицитов. Это позволяет предполагать прямую поддержку неоваскуляризации при участии МСК в дополнение к вкладу секретируемых ими ангиогенных ФР и цитокинов [272, 273].

Основные и наиболее значимые результаты экспериментальных исследований по применению КП из МСК, полученных из наиболее популярных тканевых источников, приведены в таблице 1. В целом, консенсус о механизме действия МСК, входящих в состав КП, не отличается от общепринятой точки зрения об их преимущественно паракринном влиянии на окружающие ткани. После трансплантации МСК в составе КП паракринно воздействуют на ткани в зоне повреждения и вокруг нее, способствуя васкуляризации и регенерации с рекрутированием клеток реципиента [270, 274, 275].

Способность МСК в составе КП дифференцироваться (что крайне редко наблюдается при инъекционном введении) сделала их перспективным инструментом для лечения переломов костей и заболеваний с дегенерацией суставного хряща [15, 276]. В соответствующем разделе

обзора будут рассмотрены возможные механизмы, лежащие в основе эффективности КП из МСК для регенерации структур опорно-двигательного аппарата, сейчас же сфокусируемся на основных практических результатах в этой области, которые для удобства кратко суммированы в таблице 2.

Использование КП для регенерации костей ткани было впервые предложено Ouyang и соавт. в 2006 г. [277]. Ими было проанализировано влияние КП из МСК на заживление дефектов крупных костей. Конструкции в этой работе собирали на деминерализованных костных трансплантатах с помощью обертывания в несколько слоев. Было установлено, что при нанесении КП на достаточно крупные аллотрансплантаты *in vitro* происходило образование тканеподобной структуры в виде надкостницы, что было важно для полноценной трофики и дефектов костей. Ключевой находкой этой работы было то, что остеогенные ТИК могут быть изготовлены путем укладки нескольких КП из МСК послойно без каких-либо каркасов или сложных манипуляций. В дальнейшем было показано, что КП из МСК на ранних пассажах (до 3-го включительно), значительно лучше стимулировали формирование костной мозоли по сравнению с КП из МСК поздних (10-ого и далее) пассажей [278].

Эти результаты были подтверждены Zou и Long, которые показали образование кортикальной пластинки после имплантации костного аллотрансплантата, обернутого КП из МСК КМ [279], а также усиление остеоинтеграции трансплантата с образованием мозоли [280]. В определенной степени эти данные были дополнены Uchihara и соавт., в исследовании которых такая же процедура была эффективной для восстановления структуры бедренной кости крыс после облучения [281].

Для индукции остеогенеза КП из МСК также успешно комбинировали с биоматериалами различной природы. Первой такой работой стало исследование Chen и соавт., в котором в качестве подложки для КП использовали скаффолд из PLGA, на котором их трансплантировали подкожно крысам [282]. В исходе этого эксперимента было показано эктопическое образование плотной минерализованной ткани.

В дальнейшем на моделях костных дефектов показали свою эффективность сочетания КП на основе МСК из различных источников с коралловыми частицами [283] и скаффолдами из поли-ε-капролактона (PLC)/β-трикальцийфосфата [284]. Полученные таким способом ТИК стимулировали образование кости при критических дефектах свода черепа и бедренной кости у крыс.

С целью усиления остеогенеза КП из МСК также комбинировали со скаффолдами, нагруженными биологически активными молекулами, с целью реализации подхода, который часто упоминается под названием *функционализации*. Усиление остеогенеза было показано при использовании скаффолдов из сульфата кальция или альгината, нагруженного человеческим

BMP-2 [285, 286], а также наночастиц хитозана/гиалуроновой кислоты, обогащенных микроРНК-21 [287]. Аналогичные результаты были получены при комбинировании КП из МСК с биологическими агентами без скаффолдов. Для этой цели использовали желатин и фактор стромальных клеток-1 (SDF-1). Под действием желатина КП эффективнее индуцировались в остеогенном направлении по сравнению с обычными пластами [288], а внесение SDF-1 при культивировании вплоть до трансплантации повышало эффективность образования новой кости и увеличивало скорость консолидации перелома [289].

В целом, эти результаты сформировали концепцию о том, что комбинация КП из МСК со скаффолдами является перспективной технологией для регенерации при дефектах костей, в т.ч. и критического размера. При этом нельзя обойти стороной и результаты, касающиеся эффективности КП без скаффолдов, так как форма в виде пласта и возможность манипуляции без подложки, являются одним из ключевых преимуществ перед другими видами ТИК.

Без использования скаффолдов остеогенную эффективность пластов из МСК *in vivo* впервые показала группа Akahane. В их работе КП из МСК КМ крысы были индуцированы в остеогенном направлении и затем свернуты в трубчатые структуры, которые трансплантировали подкожно тем же животным. Через 6 недель после этого была обнаружена эктопическая кальцификация трубчатых конструкций, что укрепило мнение о перспективности использования КП для реконструкции костей [290]. Позднее те же авторы вводили неиндуцированные в остеогенном направлении КП с помощью иглы большого диаметра под кожу и в некротизированную кость [291]. Их результаты подтвердили эктопическую оссификацию при инъекционной трансплантации КП и ее эффективность для восстановления костей при остеонекрозе. Эти данные были подтверждены двумя независимыми исследованиями, в которых использование КП из МСК КМ без экзогенных скаффолдов привело к полному восстановлению неспособного к консолидации перелома бедренной кости у крыс [292], а также ускорило эктопическое формирование полностью функциональных трехмерных костных трансплантатов, обладающих механическими свойствами, сравнимыми с нативной костью [293].

Эти результаты убедительно обосновывают возможность использования КП МСК без скаффолдов для создания платформенных решений в ТИ. Такой подход имеет ряд существенных преимуществ, среди которых можно выделить воспроизводимость и дешевизну этой технологии, а также отсутствие воспалительных реакций, вызываемых компонентами скаффолда, продуктами его биodeградации или физико-химическими характеристиками.

Таблица 1 – Основные исследования эффективности клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток (из [15])

Орган-мишень	Модель (вид)	Источник МСК	Размер КП	Время сборки	Количество МСК	Свойства <i>in vitro</i>	Выживаемость КП	Терапевтический эффект
Сердце	Инфаркт миокарда (крыса)	ЖТ	24×24 мм ²	3 дня	10 ⁶ кл./крысу	Секреция VEGF165 и HGF	Не менее 4 недель	Усиление ангиогенеза, подавление фиброза, улучшение функции миокарда
Периодонтальная мембрана	Трехстеночный внутрикостный дефект (собака)	ПС	8,8 см ²	5 дней	н/д (трехслойный КП)	Активность ЩФ, маркеры цементобластов и пародонта	Не менее 2 мес.	Регенерация пародонта (кости, цемента, волокна пародонта, нервные волокна)
Кожа	Раневой дефект на фоне СД 2 с ожирением (крыса)	ЖТ	8,8 см ²	7-8 дней	1,5×10 ⁵ кл./крысу	Секреция VEGF, HGF, TGF-β1, IGF-1, EGF и KGF	Не менее 2 мес	Ускорение заживления дефекта, усиление ангиогенеза
Пищевод	Подслизистая диссекция пищевода (свинья)	ЖТ	3,5 см ²	12 ч	1,2×10 ⁷ кл./крысу (двухслойный КП x4)	н/д	Не менее 3 дней	Восстановление питания и набор массы, уменьшение стриктур и формирования фиброза
Кишечник	Заживление кишечного анастомоза (свинья)	ЖТ	8,8 см ²	4 дня	2,4×10 ⁶ кл./крысу	Экспрессия генов <i>FGF2</i> и <i>TGF-β1</i>	Не менее 2 недель	Усиление синтеза коллагена, увеличение плотности анастомоза
Артерия	Повреждение бедренной артерии (крыса)	ЖТ	8,8 см ²	1-2 дня	6×10 ⁶ кл./крысу (трехслойный КП x2)	н/д	Не менее 2 недель	Реэндотелизация артерии Подавление пролиферации миофибробластов
Почка	Ишемия-реперфузия Почки (крыса)	КМ	8,8 см ²	1-2 дня	7,2×10 ⁶ кл./крысу	Секреция VEGF165 и HGF	Не менее 2 недель	Усиление ангиогенеза, подавление фиброза, улучшение функции почек

Сокращения: ЖТ – жировая ткань, КМ – костный мозг, КП – клеточный пласт; н/д – нет данных; МСК – мезенхимные стромальные клетки; ПС – периодонтальная связка; СД 2 – сахарный диабет 2 типа; ЩФ – щелочная фосфатаза; HGF – фактор роста гепатоцитов; TGF – трансформирующий фактор роста; EGF – эпидермальный фактор роста; KGF – фактор роста кератиноцитов; IGF – инсулиноподобный фактор роста.

Таблица 2 – Основные результаты использования клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток для регенерации костной и хрящевой тканей

Источник МСК	Комбинирование со скаффолдами или ФР	Тип исследования (<i>in vivo</i> , <i>in vitro</i> и животная модель)	Основные эффекты КП	Ссылка
МСК КМ человека	Деминерализованная кость или замороженные трансплантаты сухожилия	<i>In vitro</i>	КП из МСК эффективно дифференцируются в остео- и хондроциты; МСК в их составе могут принимать веретенообразную морфологию характерную для теноцитов	[277]
МСК КМ свиньи	Трубчатые костные графты создавались путем обматывания КП на сетчатые каркасы из PLGA	<i>In vitro</i> и <i>in vivo</i> Подкожная имплантация иммунодефицитным (nude) крысам	<i>In vitro</i> : в течение 8 недель наблюдалось формирование хрящеподобной ткани <i>In vivo</i> : в области подкожной имплантации сеток из PLGA в сочетании с КП формировалась плотная минерализованная ткань	[282]
МСК КМ человека	Аллокость оборачивалась КП из МСК	<i>In vivo</i> : подкожная имплантация иммунодефицитным (nude) мышам и трансплантация кроликам с сегментарным дефектом лучевой кости	Усиление репопуляции аллокости при ее комбинации с КП из МСК, а также увеличение толщины кортикальной пластинки и более эффективное сращение концов графта и кости при замещении сегментарного дефекта у кролика	[279]
МСК КМ крысы	-	<i>In vivo</i> : модель несращения перелома бедренной кости у крысы	Формирование мозоли в области перелома после трансплантации КП (через 8 недель) с последующим полным восстановлением структуры кости.	[292]
МСК КМ крысы	Диски из β -трикальцийфосфата	<i>In vivo</i> : крысам линии Fisher 344 имплантировали диски из пористого β -трикальцийфосфата с последующей инъекцией КП вокруг дисков.	Кальцификация и образование костной ткани вокруг дисков, которые обкальчивались КП немедленно или через 1 неделю после их подкожной имплантации	[291]

Сокращения: ВКМ – внеклеточный матрикс; ЖТ – жировая ткань, КМ – костный мозг, КП – клеточный пласт; МСК – мезенхимные стромальные клетки; н/д – нет данных; ФР – фактор роста; ЩФ – щелочная фосфатаза; BMP-2– костный морфогенный белок; PLGA – полилактид-ко-гликолид; SDF-1 – стромальный фактор

Продолжение таблицы 2 – Основные результаты использования клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток для регенерации костной и хрящевой тканей

Источник МСК	Комбинирование со скаффолдами или ФР	Тип исследования (<i>in vivo</i>, <i>in vitro</i> и животная модель)	Основные эффекты КП	Ссылка
МСК КМ крысы	-	<i>In vivo</i> : крысы линии Fisher 344	Через 4 недели после подкожной инъекции в местах инъекций наблюдалось образование твердой массы новообразованной кости с формированием сосудистой сети вокруг новообразованной ткани	[294]
МСК КМ кролика	Сульфат кальция, обогащенный рекомбинантным BMP-2	<i>In vitro</i> и <i>in vivo</i> Новозеландские белые кролики	<i>In vitro</i> : активность ЩФ в КП на обогащенном BMP-2 сульфате кальция была выше, чем в обычных КП <i>In vivo</i> : КП из МСК в сочетании с функционализированным скаффолдом вызывали образование большего объема костной ткани в области дефекта	[286]
МСК КМ кролика	Композитная конструкция в виде КП, обернутого вокруг сердечника в сочетании с частицами кораллов	<i>In vitro</i> и <i>in vivo</i> Иммунодефицитные (nude) мыши	<i>In vitro</i> : композитная конструкция сохраняла форму и обладала рентгенологической плотностью, устойчивостью к компрессии и отличалась высоким содержанием ВКМ <i>In vivo</i> : композитная конструкция подвергалась оссификации с рентгенологическую плотностью нативной костной ткани	[283]
МСК КМ мыши	Девитализированный аллогraft оборачивался КП из МСК для ревитализации	<i>In vitro</i> и <i>in vivo</i>	<i>In vitro</i> : МСК в составе КП сохраняли свой фенотип <i>In vivo</i> : КП из МСК вызывали образование хряща на границе графта и кости, а также усиливали остеоинтеграцию графта и костной мозоли через 4 и 6 недель после имплантации	[280]
МСК КМ крысы	Нанокompозит на основе ПЭИ-альгината в сочетании с плазмидой, кодирующей человеческий BMP-2	<i>In vitro</i> и <i>in vivo</i> Крысы линии Wistar с дефектом свода черепа	<i>In vitro</i> : при сочетании КП с нанокompозитом и плазмидой с геном <i>BMP2</i> отмечено увеличение экспрессии генов <i>SP7</i> и <i>ALP</i> <i>In vivo</i> : функционализированный КП вызывал формирование полноценной кости в зоне дефекта	[285]

Продолжение таблицы 2 – Основные результаты использования клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток для регенерации костной и хрящевой тканей

Источник МСК	Комбинирование со скаффолдами или ФР	Тип исследования (<i>in vivo</i> , <i>in vitro</i> и животная модель)	Основные эффекты КП	Ссылка
МСК КМ крысы	Фактор стромальных клеток-1 (SDF-1)	<i>In vitro</i> и <i>in vivo</i> Модель перелома (остеотомия большеберцовой кости) у крысы	<i>In vitro</i> : увеличение секреции BMP-2, ЩФ, остеокальцина и VEGF165 в КП после стимуляции SDF-1 <i>In vivo</i> : трансплантация КП в сочетании с локальными инъекциями SDF-1 вокруг импланта значительно усиливали эффективность заживления перелома	[289]
МСК ЖТ собаки	Скаффолд из поли-ε-капролактона/β-трикальцийфосфата оборачивался индуцированным в остеогенез КП	<i>In vitro</i> и <i>in vivo</i> Костный дефект критического размера у собаки (бигль)	<i>In vitro</i> : активность ЩФ была выше в индуцированных КП, как и экспрессия ассоциированных с остеогенезом генов <i>In vivo</i> : Индуцированные в остеогенном направлении КП в сочетании со скаффолдом вызывали успешную регенерацию и заживление костного дефекта критического размера	[284]
МСК КМ человека	Наночастицы из хитозана/гиалуроновой кислоты для доставки микроРНК-21	<i>In vitro</i>	микроРНК-21 усиливала остеогенную дифференцировку и формирование минерализованных узелков в КП: 1 отмечено увеличение экспрессии генов, ассоциированных с кальцификацией, продукции ЩФ и коллагена I	[287]
МСК КМ человека	Сегменты девитализированных аллогraftов	<i>In vivo</i> : аллогенная кость от мышей линии 129/J для имплантации мышам C57BL/6J	В группе КП увеличивался объем костной мозоли между концами аллотрансплантата и кости, в бедренной кости наблюдалось увеличение активности хондроостеокластов.	[278]
МСК ЖТ собаки	Желатин для индукции остеогенеза в КП	<i>In vitro</i>	При использовании желатина КП эффективнее дифференцировались в остеогенном направлении с усилением пролиферации по сравнению с обычным формированием КП	[288]

1.4.3 Актуальные представления о механизмах самоорганизации мезенхимных стромальных клеток и их важность для тканевой инженерии

Несмотря на убедительно показанную эффективность ТИК на основе МСК, а также кажущуюся простоту их получения, механизмы, лежащие в основе их сборки, а также изменения свойств клеток в составе конструкций, остаются слабо изученными и более сложными, чем это представляется исследователями прикладной направленности.

С описательной точки зрения основным свойством, обеспечивающим сборку КП, является быстрая пролиферация МСК и депонирование белков ВКМ, которые объединяют клетки в конструкцию. При этом важной характеристикой этого свойства является его автономность, т.е. сохранение после выделения МСК из ткани с потерей интеграции в регуляторные системы организма. Таким образом, можно прийти к заключению, что эта автономность является следствием прочно закрепленной внутренней клеточной программы по формированию тканей *de novo*. Наиболее выражена эта способность у предшественников МСК – клеток эмбриональной мезенхимы, для которых характерна самоорганизация [295]. Последнюю в биологии развития рассматривают как появление нового пространственного порядка элементов вследствие накопления и усложнения локальных взаимодействий между клетками. К последним относят дифференциальную адгезию клеток, совместную миграцию, диффузию сигнальных молекул и взаимные механические воздействия клеток и ВКМ [296].

В ходе органогенеза клетки эмбриональной мезенхимы являются организаторами и источниками инструктивных сигналов [297], причем их отличительным свойством является способность к самоорганизации путем конденсации (или мезенхимальной конденсации, англ. *mesenchymal condensation*). По определению конденсация мезенхимы является динамическим процессом, в ходе которого аморфные скопления мезенхимных клеток проходят этапы адгезии, агрегации и компактизации, в результате чего резко меняют свой фенотип или претерпевают дифференцировку в определенные типы клеток [298]. В ходе конденсации мезенхимные клетки активно мигрируют и пролиферируют, а их пространственная организация изменяется за счет дифференциальной адгезии и изменения морфологии цитоскелета [299].

Показано, что конденсация мезенхимы критически важна для формирования тканей опорно-двигательного аппарата, а наиболее изученной является конденсация эмбриональной мезенхимы при остеогенезе [300].

Интересно, что во взрослом организме при заживлении переломов МСК также претерпевают процесс, напоминающий конденсацию в эмбриогенезе. После начальной стадии образования гематомы и развития воспаления происходит активная миграция клеток-предшественников и МСК, которые затем организуются в агрегаты, претерпевающие

конденсацию подобную той, что происходит при эмбриогенезе [301]. Таким образом, стадия конденсации является ключевой для остеогенеза как в ходе внутриутробного развития, так и при репаративной регенерации костной ткани взрослого организма [302]. В пользу последнего утверждения косвенно говорят некоторые исследования по использованию МСК для лечения переломов.

Несмотря на очевидную способность костей скелета к полной регенерации, в клинике каждый десятый перелом консолидируются неполностью, в связи с чем возникло понятие о критическом размере дефекта. Кости с такими дефектами неспособны к полноценной регенерации даже при длительной иммобилизации, причем размеры критического дефекта варьируют в зависимости от анатомической области и степени повреждения мягких тканей [303]. Для трубчатых костей человека критическим является дефект протяженностью более 2 см при охвате более половины окружности кости. Интересно, что суспензия МСК в таких ситуациях оказалась достаточно малоэффективна [304], в то время как введение МСК в виде агрегатов, вызывает консолидацию перелома и даже полное восстановление кости [305]. Исходя из этого, можно предположить, что при введении в область критического дефекта МСК в диссоциированном виде неспособны к необходимой для остеогенеза конденсации. В противовес этому конденсированное состояние МСК в агрегатах, созданных перед введением, обеспечивает резкое улучшение терапевтического эффекта.

Исходя из этого, образование КП при длительном культивировании МСК можно рассматривать как своеобразную рефлексию программ эмбриональной мезенхимы и отражением их базового свойства к самоорганизации.

О возможном вовлечении процесса конденсации в этот процесс говорят данные о формировании хрящевых узелков (рисунок 5) в культурах, которые фигурируют в литературе как микромассы мезенхимных клеток высокой плотности (англ. *high-density micro-mass cultures*) [306, 307]. В многослойных культурах мезенхимных клеток из костей и зубов наблюдается также формирование костных узелков (англ. *bone-like nodules*) [308, 309]. Проллиферирующие предшественники остеобластов образуют многослойные конструкции, напоминающие КП, в которых путем конденсации формируются области повышенной плотности клеток (рисунок 6). Депонирование в этих областях коллагена I типа активирует остановку пролиферации таких клеток с выраженным ростом экспрессии и активности ЩФ. По прошествии нескольких суток культура содержит наполненные минерализованным ВКМ узелки, состоящие из остеобластов или дифференцирующихся в них клеток. Исследования костных узелков за последние 30 лет дали большой объем ценной информации о молекулярных механизмах остеогенной дифференцировки и минерализации ВКМ [310, 311].

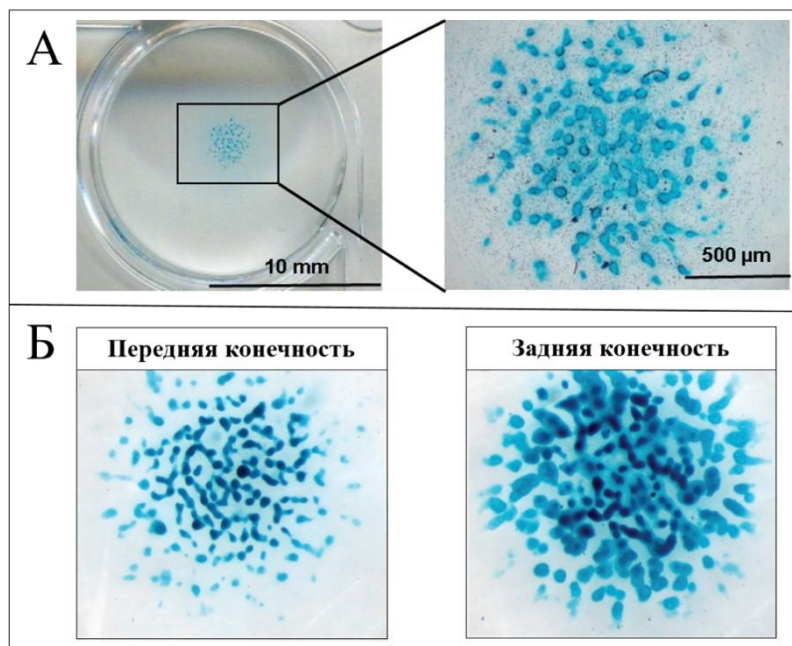


Рисунок 5 – Самоорганизация в клеточных культурах на примере микромаcсы мезенхимных клеток мышиногo эмбриона. На 12,5 дней после оплодотворения (А) паттерн хрящевых узелков зачатка передней конечности отличается по форме от зачатка задней конечности (Б). Окраска альциановым синим. Адаптировано из [312, 313]

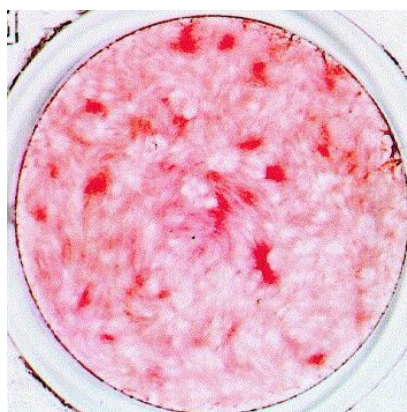


Рисунок 6 – Костные узелки в культуре мезенхимных стромальных клеток костного мозга на 14 день остеогенной дифференцировки. Клетки высевались в плотности 25 тыс. клеток/см². Окраска ализариновым красным. Заимствовано из [309]

В целом, приведенные данные *in vitro* объясняют результаты, упомянутых ранее исследований, в которых показано усиление остеогенеза при использовании КП или их сочетаний с различными скаффолдами. Тем не менее, работ, четко устанавливающих механизм самоорганизации МСК взрослого организма в ходе сборки КП и характер этой самоорганизации, в настоящее время не опубликовано. При этом весьма вероятно сопряжение механизмов конденсации с регуляцией дифференцировочного пути МСК, поэтому изучение

данного вопроса актуально не только с позиции эффективности сборки КП, но и обеспечения их безопасности в клинике.

Выяснение механизмов формирования КП и уточнение возможной роли процессов, напоминающих конденсацию эмбриональной мезенхимы важно и для выяснения причин модуляции активности МСК в их составе. Напомним, что паракринное действие считается одним из основных звеньев регенераторного действия КП из МСК. Понимание причин формирования КП и их связи с регуляцией состава секрета МСК является важным для определения механизмов действия этих ТИК.

1.4.4 Обзор клинического опыта применения клеточных пластов и дефицит исследований с использованием мезенхимных стромальных клеток

Легкость и воспроизводимость получения КП стала залогом их удобства для применения в клинике, однако результаты ниже свидетельствуют о том, что наибольшее распространение получили КП из клеток эпителия, миобластов, производных ИПСК и фибробластов, но не МСК. Представленный ниже краткий обзор КИ даст представление о возможностях применения КП и показаниях, при которых они продемонстрировали свою эффективность.

Исторически первым стало [269] использование КП из аутологичных культивированных клеток слизистой оболочки полости рта (англ. *COMES*), которые эндоскопически трансплантировали на поверхность дефектов пищевода, возникавших после удаления доброкачественных опухолей. При последующем наблюдении у всех пациентов (n=9) отмечено приживление КП и снижение частоты образования рубцов и стеноза пищевода, что было расценено как важный клинический эффект.

Расширение показаний для применения КП из *COMES* произошло в КИ их эффективности у больных с двусторонним тотальным дефицитом стволовых клеток роговицы (n=4). В нем было показано, что КП могут быть трансплантированы по поверхность роговицы без наложения швов с целью восстановления зрения и установлена их эффективность при двусторонних тяжелых поражениях роговицы. В дальнейшем [314, 315] КП из *COMES* показали свою эффективность для лечения дефицита лимбальных эпителиальных стволовых клеток (NCT02149732). В этом КИ оценивалась частота нежелательных явлений, которая была минимальной, а также эффективность по комбинированной конечной точке, которая включала долю неэпителизированной и эпителизированной роговицы, улучшение остроты зрения. В данном исследовании был подтвержден ранее сделанный вывод о том, что трансплантация КП из *COMES* является эффективным и безопасным методом реконструкции при тяжелых поражениях поверхностных структур глаза. В исследовании (NCT02415218), опубликованном в

2022 году Университетом Махидол (Тайланд) отмечено, что при дефиците лимбальных эпителиальных стволовых клеток трансплантация КП на основе COMEC вызвала быстрое восстановление эпителизации и значимое улучшение остроты зрения [316].

Помимо поверхностных структур глаза КП применялись в клинике для восстановления сетчатки. Группа Takahashi опубликовала результаты исследования КП из клеток пигментного эпителия сетчатки, которые были получены путем дифференцировки из ИПСК пациентов с возрастной макулярной дегенерацией [317] (UMIN000011929). Их трансплантация привела к интеграции КП, а также увеличению размера островков пигментации сетчатки. При ретроспективном анализе эффективность КП была сопоставима с введением суспензии аналогичных клеток, которое по данным исследования 2015 года (NCT01345006) приводило к регенерации фоточувствительных клеток сетчатки [318].

При лечении сердечно-сосудистых заболеваний КП также нашли свое применение – трансплантация тканеинженерных конструкций из аутологичных миобластов привела к значительному улучшению состояния 56-летнего мужчины с дилатационной кардиомиопатией [319]. Улучшение функции левого желудочка после трансплантации КП позволило ему отказаться от использования носимой вспомогательной насосной системы. Позднее эта же группа провела КИ безопасности и эффективности КП из аутологичных миобластов для лечения сердечной недостаточности у больных (n=7) с тяжелой ИБС (UMIN000008013). На основании улучшения показателей функционального класса (NYHA) и активности (SAS), а также эхокардиографических параметров (фракция выброса левого желудочка) было сделано заключение о безопасности и эффективности трансплантации этих ТИК пациентам с тяжелой хронической сердечной недостаточностью [320].

Более интересные результаты были получены в масштабном исследовании (UMIN000003273) по использованию КП из аутологичных клеток скелетных мышц. Конструкции были собраны из материала от 15 пациентов с ишемической кардиомиопатией и 12 пациентов с дилатационной кардиомиопатией [321], после чего были трансплантированы на поверхность миокарда при открытом хирургическом вмешательстве. Первичные данные подтвердили безопасность данного метода, однако лишь недавно были представлены отдаленные результаты этого вмешательства (UMIN000012906). Наиболее значимое улучшение было отмечено у больных с ишемической кардиомиопатией – более чем у 70% отмечено улучшение функции левого желудочка, общих функциональных возможностей и выживаемости [322]. Эти результаты обосновывают возможность использования КП для лечения безальтернативных состояний при различных сердечно-сосудистых заболеваниях, в первую очередь, с поражением миокарда. Интересным направлением развития в этой области может стать использование аутологичных кардиомиоцитов, полученных из ИПСК, применение

которых в виде КП ранее было одобрено в клинике и показало достаточный уровень безопасности для дальнейшей разработки [323].

Оригинальное показание было выбрано для КП из фибробластов кожи, которые успешно использовались как биоискусственный эквивалент с целью герметизации плевры у пациента с множественными буллами (UMIN000022554) [324]. Также трансплантацией КП из аутологичных клеток периодонтальной связки удалось добиться полного заживления дефекта с восстановлением окклюзионной функции (через 6 мес.) при тяжелом пародонтите [271].

Таким образом, к настоящему времени среди КИ, как ни удивительно, практически нет заслуживающих внимания работ с использованием КП из МСК в качестве клеточной основы конструкции. Аналогично удивительным является и тот факт, что КП из МСК не использовались в практической медицине ни по одному из популярных показаний, среди которых можно выделить дефекты кожи (в т.ч. трофические, например, язвы, пролежни или вызванные нарушением кровоснабжения), поражения роговицы и травмы костей и суставного хряща. В отношении регенерации мягких тканей можно упомянуть работу Намапо и соавт., которые опубликовали данные по безопасности и эффективности КП при язвах кожи нижних конечностей у больных с тяжелой венозной недостаточностью. В этом исследовании (UMIN000031645) КП смешанного состава из аутологичных фибробластов и мононуклеарных клеток периферической крови использовались для укрытия незаживающих трофических дефектов в нижней трети голени [17]. В результате этого отмечено полное закрытие и эпителизация дефектов у Пациента 1 (мелкий дефект) и Пациента 2 (крупные дефекты) на 31-ый и 116-ый дни соответственно, а также оба пациента отметили уменьшение болевых ощущений. У Пациента 3 полного закрытия не язвы не произошло, однако к 184-му дню ее размер значительно уменьшился, как и интенсивность болевого синдрома.

В целом, КП получили достаточно значимое внимание с точки зрения клинической разработки и применения. Всего к 2020 году по различным показаниям было завершено или продолжалось 45 КИ, в которые было включено 427 пациентов, которые частично или полностью выполнили протокол [325].

Заключая данный раздел, мы можем констатировать, что одни из наиболее популярных объектов РМ – аутологичные или аллогенные МСК из различных тканей – не получили должной разработки и развития в клиническом плане. При этом имеется большой пул интересных результатов экспериментальных работ по многим показаниям и понимание основных молекулярных и клеточных факторов, определяющих эффективность КП из МСК.

1.4.5 Генетическая модификация клеточных пластов как инструмент увеличения их эффективности

Общее мнение о механизме действия МСК в составе КП сводится к тому, что основным эффектором (как и в случае клеточной терапии) является их секретом. За счет диффузии в окружающие ткани он стимулирует репаративную регенерацию, миграцию и пролиферацию клеток, подавляет избыточное воспаление, активирует процессы дифференцировки, а также ангио- и нейрогенеза.

В этой связи возникает обоснованное предположение о том, что модификация состава секретом МСК может привести к усилению регенераторных эффектов МСК или изменению их направленности. Известно, что сам факт перевода МСК в форму КП может увеличивать продукцию ими компонентов секретом, однако более перспективным инструментом для этой задачи представляется использование генетической модификации клеток с помощью векторов. Данное направление берет свое начало в другой области РМ – генной терапии и ее частных направлениях, связанных с локальной экспрессией факторов, активирующих ангиогенез, рост аксонов, регенерацию тканей или восстановление их трофики. Применение векторного инструментария в культуре клеток человека является основой отдельной группы методов генной терапии, получивших название *генной терапии ex vivo* [326]. На основе этого подхода созданы эффективные методы клеточной терапии, применяемые в области онкогематологии, при орфанных заболеваниях и наследственных энзимопатиях, а также разработаны персонализированные продукты с применением технологий редактирования генома. Генетическая модификация МСК длительное время являлась областью интересов нашего коллектива и в эксперименте показала себя эффективной, например, для усиления ангиогенных свойств МСК ЖТ с помощью экспрессии VEGF165. Результатом такой модификации стали резкое увеличение скорости кровотока и плотности васкуляризации у мышей с ишемизированной задней конечностью [327]. Такого рода «альянс» генной терапии с клеточной терапией или ТИ является перспективным и технологически интересным методом управления составом секретом и, следовательно, эффективностью МСК.

Генетическая модификация КП из МСК осуществляется с помощью нескольких подходов, различающихся этапностью и типом используемых векторов. Клетки могут быть подвергнуты модификации на этапе культуры МСК перед сборкой КП или на этапе готовой ТИК перед ее трансплантацией (рисунок 7). В первом случае эффективность модификации с помощью как вирусных, так и невирусных векторов, будет достаточно высокой в силу относительно небольшого количества МСК в чашке, однако это может привести к замедлению сборки КП. Действительно, большинство методов трансфекции или вирусной трансдукции имеют

негативное влияние на скорость пролиферации МСК, могут активировать сигнальные пути, ассоциированные с иммунным ответом и подавлять жизнеспособность. Из-за этого чаще обращаются к модификации уже собранного КП, хотя при этом эффективность доставки генетической информации оказывается ниже из-за плотности клеток и ВКМ, который блокирует проникновение векторов в толщу КП [326].

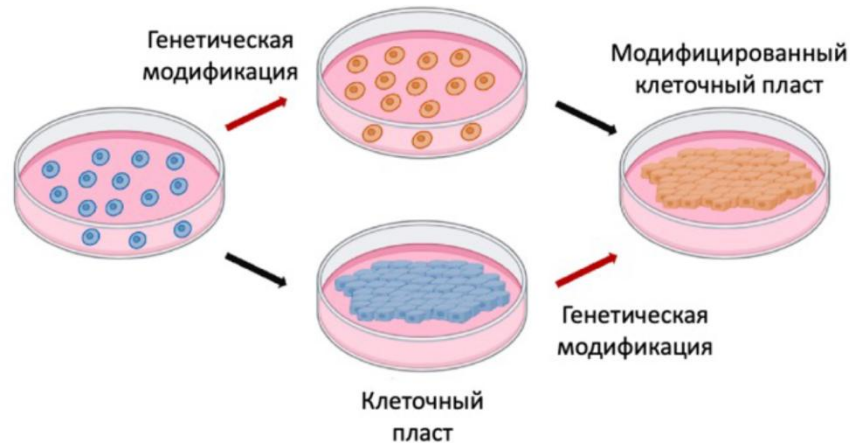


Рисунок 7 – Иллюстрация двух потенциальных подходов к генетической модификации клеточных пластов (пояснения см. в тексте). Адаптировано из [326]

Вторым методологически важным аспектом является выбор вектора, который может представлять собой рекомбинантный вирус или быть основан на невирусной доставке, как правило, с помощью плазмидных ДНК (пДНК) – кольцевых мобильных элементов генома бактерией, высших растений и грибов [328]. Сужая круг обзора, можно сразу отметить, что пДНК обладают крайне незначительной эффективностью доставки в МСК и в собранные из них КП, а вспомогательные методы достаточно сложны и вызывают снижение жизнеспособности клеток, поэтому данное направление не представляет существенного практического интереса. Кроме того, после модификации КП с помощью пДНК период активной продукции целевого белка редко превышает 5-7 суток, чего недостаточно для полноценного регенераторного ответа в ткани-мишени [329, 330]. В силу этих причин приоритетным инструментом генетической модификации КП из МСК стали вирусные частицы – аденовирусы, аденоассоциированные вирусы (ААВ), ретро-, ленти- и бакуловирусы [326]. Не углубляясь в структуру и классификацию вирусных систем, проанализируем основные результаты и области применения этого привлекательного для ТИ метода.

Аденовирусы, ставшие одним из первых инструментов для генной терапии, оказались высокоэффективны для модификации КП из МСК с целью повышения экспрессии хрящевого морфогенетического белка-1 (CDMP-1) [331], BMP-2 [332] и HGF [333]. При этом

эффективность доставки с помощью аденовирусных частиц составляла от 80 до 96% от общего числа клеток, а прирост продукции целевых белков мог достигать 2-го порядка и сохраняться на 30-50 суток практически без изменений. В опытах *in vivo* обогащение секретома КП из МСК этими факторами приводило к усилению терапевтического эффекта по сравнению с обычными КП или модифицированными контрольным белком (например, GFP) без активного влияния на регенерацию. В случае аденовирусных векторов определенным ограничением является тот факт, что они вызывают выраженный иммунный ответ и многие из них являются патогенными, вызывая ОРВИ, в связи с чем к настоящему времени вопросы их безопасности все еще исследуются. С учетом относительно недавно разработанных систем III поколения, представляющих собой «выпотрошенные», т.е. полностью лишённые нативных геномных последовательностей вирусы, что обеспечивает емкость до 35 тыс. п.о., перспективы развития данного направления выглядят достаточно благоприятными [334].

С позиции непатогенности более интересными выглядят векторы из группы AAV, для которых неизвестно ни одного вызываемого ими заболевания человека. Их гибкость и удобство получения, а также широкий спектр модификаций капсида, которые позволяют создавать уникальные векторные частицы, длительное время были объектом разработки нашего коллектива [327, 335]. Применительно к модификации КП из МСК интересные результаты были получены в экспериментах по доставке генов *COL7A* и *LAMA3* с целью лечения такого тяжелого заболевания как буллезный эпидермолиз с помощью аппликации соответствующих КП [336]. Несмотря на очевидную привлекательность AAV для модификации состава секретома МСК в составе КП, таких работ опубликовано немного. В значительной степени это связано с небольшой пакующей емкостью AAV (около 4,5 тыс п.о.), для расширения которой существует ряд решений, например, система Dual-AAV, позволяющая удвоить количество вносимой в клетки информации, однако требует и двух векторов в составе системы доставки [337].

Использование ретро- и лентивирусных векторов для модификации КП из МСК и обогащения их секретома ограничено и, как правило, используется для восстановления продукции нормального белка в моделях наследственных заболеваний. Это связано со способностью этих вирусов к интеграции в хроматин и вероятностью инсерционного мутагенеза. Действительно, при коррекции мутаций необходимо провести перманентную модификацию клеток, которая нежелательна и даже потенциально опасна для создания конструкций, которые должны паракринно стимулировать регенерацию. Основной массив опубликованных работ по модификации КП из МСК с помощью ретро- и лентивирусов посвящен созданию клеточных продуктов для лечения буллезного эпидермолиза и стимуляции остеогенеза. В одной из таких работ лентивирус с геном *BMP-1* эффективно увеличивал

остеогенную дифференцировку КП из МСК ЖТ кролика *in vitro* [338], в другой – доставка гена *BMP-7* в КП из МСК ЖТ бигля повышала регенераторную активность ТИК на модели дефекта костной ткани [339].

Из нестандартных систем для модификации КП заслуживают упоминания бакуловирусные векторы, которые основаны на непатогенных для человека вирусах насекомых. Их емкость, высокая эффективность доставки, а также отсутствие интеграции в хроматин сделали их важными инструментами в биотехнологии, где с их помощью в культурах клеток насекомых могут быть наработаны большие количества рекомбинантных белков. Тот факт, что они способны также *in vitro* проникать в клетки млекопитающих, включая человека, обосновал их применение для модификации КП из МСК. В этой области большой вклад внесла группа Ну из Университета Цинь-хуа (Тайвань), которая разработала ряд оригинальных векторных систем, протоколов получения бакуловирусов, а также их использования для трансдукции КП из МСК [340]. Ими было показано, что доставка генов растворимых ФР с помощью бакуловирусных векторов может быть инструментом для направленной модификации МСК и КП на их основе. Например, оверэкспрессия гена *BMP-2* совместно с микроРНК-148b значительно увеличила регенераторную активность МСК ЖТ на модели дефекта свода черепа у кролика [341]. Для модификации КП из МСК ими была предложена оригинальная CRISPR-зависимая система для таргетной активации тех или иных генов с целью обогащения секретома МСК их продуктом [342]. Наконец, на модели инфаркта миокарда у кролика было показано значительное усиление терапевтического эффекта КП из МСК ЖТ, в которых с помощью бакуловирусного вектора была увеличена продукция ключевого ангиогенного ФР VEGF165 [343]. В результате этого у животных улучшились показатели функции левого желудочка, увеличилась толщина его стенки и васкуляризация перинфарктной зоны миокарда, а также уменьшился размер рубца, что показало выраженное преимущество модифицированных КП над обычными по большинству исследованных показателей.

Приведенные выше примеры иллюстрируют возможности использования методов, которые стоят на стыке генной терапии и ТИ для получения конструкций, обладающих уникальными свойствами. С учетом представлений о регуляции репаративной регенерации с их помощью секретом может прицельно обогащаться факторами, регулирующими активацию стволовых клеток (Wnt), ангио- (VEGF, FGF2) и нейрогенеза (BDNF, GDNF, нейротрофины), подавляющими фиброз (HGF, MMP) или воспаление (IL-10). Понимание патогенеза заболеваний и состояний, при которых планируется применение таких КП, определяет выбор ФР или цитокина для модификации, а арсенал методов доставки целевого гена позволяет рассчитывать на использование этого подхода как части платформы ТИ на основе КП из МСК. Несомненно, что по некоторым показаниям, например, для восстановления костной ткани,

нельзя обойтись и без правильно подобранных биоматериалов, однако их применение не исключает дополнительную генетическую модификацию МСК в составе конструкций.

1.4.6 Существующие ограничения использования клеточных пластов

Несмотря на достигнутые экспериментальные успехи применения КП из МСК перед выходом этой технологии в клиническую практику необходимо решить ряд важных практических вопросов. В частности, не до конца изучена иммуногенность и долгосрочная выживаемость МСК после их имплантации в виде КП [277]. Ряд исследователей упирает на целесообразность использования именно аутологичной процедуры с целью минимизации рисков иммунологического конфликта и отторжения в особенности при трансплантации в толщу или на поверхность труднодоступных висцеральных и жизненно важных органов. Сохраняются существенные расхождения протоколов сборки КП и имеются разногласия об оптимальных сроках культивирования [282], а также стандартизации процедур получения КП для клинического применения [294].

Ключевым ограничением с точки зрения безопасности является использование МСК, размноженных *ex vivo*. Для их наращивания в достаточном количестве используют культуральную среду с добавлением фетальной бычьей сыворотки (ФБС), что создает риски контаминации. В качестве замены ФБС предлагаются аутологичный фибрин, обогащенный тромбоцитами, а также обогащенная тромбоцитами плазма [204], однако стандартизация протоколов при их использовании становится затруднительной. Другой важной проблемой технологии КП является отсутствие в составе конструкций васкуляризации и низкая проницаемость ВКМ для нутриентов, что может неблагоприятно сказываться при их использовании для регенерации, например, костей или миокарда [344]. Было показано, что тканевые трансплантаты большой толщины (400-600 мкм), собранные из нескольких уложенных послойно КП могут иметь выраженные некротические ядра из-за ограниченности пассивной диффузии. В качестве решения этой проблемы в настоящее время пытаются создавать трехмерные васкуляризированные КП или использовать их укладку в сочетании с предварительной васкуляризацией пласта клетками эндотелия [345].

В случае генетической модификации, которая является привлекательным инструментом функционализации и увеличения регенераторной эффективности КП вопросы безопасности выходят на первый план. Обеспечение доставки свободной от вирусных частиц ТИК, а также выяснение профиля иммуногенности и токсикологических показателей модифицированных КП становятся приоритетными для обеспечения трансляции их в клинику. Кроме того, чаще всего генетическая модификация приводит к резкому увеличению продукции (оверэкспрессии),

которое превышает физиологические концентрации целевого белка в здоровой и поврежденной ткани. Такое мощное паракринное действие на окружающие ткани и аутокринное влияние на МСК вкупе с фактом взаимодействия с вирусным вектором может быть ассоциировано с туморогенезом. Особенно это актуально при оверэкспрессии ФР – белков, обладающих выраженным митогенным действием.

Наконец, изготовление КП осуществляется вручную и требует высококвалифицированного оператора и контроля качества, единых подходов к которому не разработано. До трансплантации подготовленные КП должны быть охарактеризованы по ряду параметров, таких как количество клеток, процент жизнеспособности, стерильность конструкции и толщина КП. Кроме того, различия поверхностных характеристик материалов, используемых для культивирования МСК и сборки КП могут оказать существенное влияние на безопасность, эффективность и воспроизводимость получения продукта [346]. Важно также подчеркнуть, что при клиническом применении КП должны быть отрицательными по наличию микоплазм, эндотоксинов, бактерий, патогенных грибов и вирусов [347].

Эти факторы, несомненно, можно определить как сдерживающие трансляционные исследования, однако опыт применения КП из эпителиальных клеток, фибробластов и даже производных ИПСК, который был получен в КИ, указывает на возможность и целесообразность их практического применения. В этих работах была показана безопасность и эффективность их применения по многим показаниям и создание соответствующих подходов применительно к КП из МСК является вопросом времени и проведения соответствующих прикладных исследований и опытно-конструкторских разработок.

1.5 Обоснование актуальности разработки платформы для тканевой инженерии на основе клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток

Таким образом, суммируя приведенные выше данные об актуальном состоянии развития РМ вообще и ТИ в частности, можно сформулировать следующие положения, на которые опирается в дальнейшем представленная работа:

1. Среди подходов, направленных на замещение и восстановление структур организма после повреждения, большой практический интерес вызывают методы ТИ, развитие которых может быть важным для решения проблем трансплантологии и дефицита донорских тканей и органов.
2. Наиболее перспективным и хорошо изученным с фундаментальной точки зрения объектом для создания платформы в ТИ представляются мезенхимные стромальные клетки взрослого

организма (МСК), которые могут быть получены из разных органов, среди которых доступностью отличается подкожная жировая ткань.

3. Среди многочисленных подходов ТИ клеточные пласты (КП) имеют высокий практический потенциал для разработки платформенного решения, которое может применяться по широкому спектру показаний. Основой для этого являются следующие их свойства:
 - а. простота получения – процедура сборки представляет собой длительное культивирование при стандартных условиях с последующим снятием;
 - б. высокая жизнеспособность и секреторная активность клеток в их составе, а также возможность интеграции в организме реципиента после трансплантации;
 - в. нативность состава ВКМ, наработанного самими МСК в культуре и отсутствие ксеногенных или химических скаффолдов;
 - г. удобство доставки при поверхностной аппликации и возможность их инъектирования или укладки в более сложные конструкции;
 - д. возможность функционализации, генетической модификации или дополнения скаффолдами, медицинскими изделиями и матриксами;
4. Из широкого спектра возможного применения КП из МСК ряд перспективных показаний недостаточно подробно разработан, в частности, отсутствуют подробные работы по их применению при нарушении кровоснабжения и дефектах мягких тканей (глубоких ранах и пролежнях), относящихся к важным нерешенным проблемам современной медицины.
5. С учетом консенсуса о преимущественно паракринном действии как МСК, так и КП на их основе, перспективным подходом для усиления их регенераторного действия может быть генетическая модификация с целью повышения экспрессии ФР и цитокинов, вовлеченных в регуляцию репаративных процессов.
6. Несмотря на очевидную перспективность МСК как объекта для разработки ТИК в виде пластов, литературные данные о механизмах сборки и самоорганизации постнатальных МСК и исследования их состояния в составе конструкций представлены фрагментарными сведениями, что замедляет трансляционные исследования.

Заключая данный раздел, можно сделать вывод о том, что, КП имеют высокий потенциал для создания отдельной платформы, на основе которой могут быть разработаны прорывные методы ТИ, требующиеся современной РМ. Проведенные в данной работе исследования раскрывают данную позицию и расширяют представления о возможностях использования КП из МСК по многим перспективным с клинической точки зрения показаниям

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объекты исследования

Объектами исследования стали ТИК в виде пластов, получаемые из МСК жировой ткани человека и экспериментальных животных, также использованные для их изучения животные и клеточные модели.

2.2 Клеточные культуры

2.2.1 Одобрение этического комитета и источник первичного донорского материала

Процедура получения биоматериала человека и банкирования клеточных культур в исследовательских целях с информированного согласия доноров из числа пациентов Медицинского научно-образовательного центра (МНОЦ) МГУ имени М.В. Ломоносова была одобрена локальным этическим комитетом МНОЦ (IRB00010587, протокол №4 от 04.06.2018) [112].

2.2.2 Выделение и культивирование мезенхимных стромальных клеток человека

Первичные клеточные культуры МСК жировой ткани (МСК ЖТ) были получены из образцов подкожной жировой клетчатки добровольных доноров из числа пациентов МНОЦ МГУ имени М.В. Ломоносова в рамках формирования биобанка по направлению «Биоматериал человека» по проекту «Научные основы создания Национального банка-депозитария живых систем».

Клеточная линия МСК ЖТ человека, иммортализованная введением гена теломеразы, — ASC52telo (ATCC®, SCRC-4000) была получена из коммерческих источников (ATCC, США).

Клетки МСК ЖТ человека культивировали в CO₂ инкубаторе при 37°C и 5% CO₂ на чашках Петри или планшетах (Corning, США) в среде Advance Stem (HyClone, США), содержащей 10% Advance Stem Supplement (HyClone, США), 100 ед/мл пенициллина и 100 ед/мл стрептомицина, меняя среду в чашках каждые 72 часа. По мере необходимости культуры пассировали в соотношении 1:3-1:4 после снятия кратковременной обработкой

0,05% раствором трипсина-ЭДТА с ручным подсчетом плотности суспензии в камере Горяева.

2.2.3 Выделение и культивирование мезенхимных стромальных клеток мышь и крысы

МСК выделяли из подкожной ЖТ экспериментальных животных – крыс линии Wistar или мышей линии C57Bl/6. Выделенный образец ЖТ механически измельчали, полученный гомогенат помещали в равный объем смеси, содержащей 200 ед/мл коллагеназы I типа (Worthington, США) и 30 ед/мл диспазы (Corning, США). Инкубацию полученной смеси при 37°C в течение 1 часа вели с периодическим ручным встряхиванием для уменьшения образования осадка. По завершении инкубации к полученной смеси для инактивации ферментов добавляли равный объем среды DMEM/10% ФБС, однократно перемешивали, а затем осаждали осадок центрифугированием (200 g, 10 мин), после чего жидкость отбিরали отсосом, а осадок ресуспендировали в полной среде роста. Полученную суспензию клеток помещали в чистые чашки Петри в плотности 5 тыс. клеток/см² с последующим культивированием при стандартных условиях (см. выше протокол для МСК ЖТ человека) вплоть до 2-5 пассажа, на которых проводили соответствующие эксперименты или осуществляли сборку КП [348].

2.2.4 Культуры фибробластов дермы и эндотелия пупочной вены человека

Исследование активности секретома МСК ЖТ осуществлялось с использованием первичных культур эндотелия пупочной вены (HUVES) и фибробластов дермы человека. Указанные культуры были получены от здоровых доноров в рамках формирования направления «Биоматериал человека» по проекту «Научные основы создания Национального банка-депозитария живых систем». Культивирование фибробластов дермы и HUVES вели при стандартных условиях в средах DMEM/10% ФБС и EGM-2 (Lonza, Швейцария) соответственно. С целью усиления адгезии клеток при культивировании HUVES использовали покрытие культуральных емкостей 1% желатином.

2.3. Методы получения, характеристики и децеллюляризации клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток жировой ткани

2.3.1 Методы сборки и открепления клеточных пластов

Сборку КП из МСК ЖТ осуществляли на непокрытом культуральном пластике необходимого формата (чашки Петри или планшеты, Greiner, Германия или Corning, США) при стартовой плотности культуры 50 тыс. клеток/см² (МСК ЖТ человека и крысы) или 80 тыс. клеток/см² (МСК ЖТ мыши). Культивирование МСК ЖТ человека вели в среде роста AdvanceStem с добавлением 10% AdvanceStem Stem Cell Growth Supplement, а МСК ЖТ крысы и мыши в среде DMEM/10% ФБС. Сборка КП осуществлялась в течение 7-14 дней в зависимости от дизайна эксперимента с добавлением к среде роста L-аскорбиновой кислоты в концентрации 50 мкг/мл при заменах среды на свежую каждые 48 часов [348].

При откреплении готовой конструкции среду роста удаляли, КП промывали теплым ФСБ (ПанЭко, Россия) и далее использовали один из двух методов уменьшения адгезии КП к пластику:

1. промывали р-ром Версена (ПанЭко, Россия) и затем инкубировали в холодном р-ре Версена в течение 3-4 минут;
2. промывали р-ром Версена и затем инкубировали 10-15 сек. В 0,025% р-ре трипсина-ЭДТА (HyClone, США).

По окончании инкубации р-р Версена или трипсина-ЭДТА отбирали отсосом и добавляли теплый ФСБ, в котором края КП открепляли от посуды с помощью наконечника микропипетки объем 200 мкм. После этого им же проводили снятие, совершая движения от края лунки к ее центру. Полученная таким образом ТИК сохраняла целостность, флотировала в ФСБ и переносила манипуляции – перенос в капле буфера или на хирургическом инструменте.

2.3.2 Децеллюляризация клеточных пластов и обработка ДНКазой I

Для удаления клеточного компонента клеточные пласты промывали ФСБ, а затем обрабатывали растворами для децеллюляризации, наблюдая процесс разрушения клеток в инвертированный микроскоп в проходящем свете. После разрушения клеточного компонента раствор в лунке вновь меняли на ФСБ. Всего было изучено действие 5 веществ, обладающих децеллюляризирующим действием: дезоксихолат натрия (ДХН) 0,5%; 3-((3-

холаמידопропил)диметиламмоний)-1-пропансульфонат (CHAPS) 0,5%; додецилсульфат натрия (SDS) 0,05%; мочевины 0,2М; Triton X-100 1%. Образцы полученного после децеллюляризации ВКМ обрабатывали ДНКазой I (Fermentas, США) в концентрации 20 ЕД на лунку в буфере, содержащем 10 мМ Трис-НСl pH=7,4, 2,5 мМ MgCl₂, 0,5 мМ CaCl₂ непосредственно в культуральных планшетах в течение 12 часов при 37°C. О степени деградации ДНК под влиянием ДНКазы I судили по изменению сигнала после окраски ДНК-связывающим красителем DAPI [348].

2.3.3 Гистологическая характеристика и окрашивание конструкций в культуре

Открепленные КП погружали в среду для гистологического исследования Tissue-Tek® O.C.T. Compound (Sakura, США), после чего замораживали в парах жидкого азота. Полученные замороженные срезы толщиной 7-8 мкм на предметных стеклах и интактные КП на культуральном пластике фиксировали (4% параформальдегид на ФСБ) около 10 минут, затем отмывали трижды ФСБ и инкубировали 60 минут в растворе 10% сыворотки донора вторичных антител (осла) в ФСБ + 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА). После отмывки к зафиксированным образцам добавляли первичные кроличьи поликлональные антитела (Abscam, Великобритания) к коллагену I, III или IV типа, фибронектину или ламинину в соответствующем разведении в ФСБ/1% БСА на 15-16 часов при температуре +4°C. Для визуализации использовали вторичные антитела осла против антигенов кролика, конъюгированные с флуорофорами Alexa Fluor 594 или Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, США). Перед заключением под покровные стекла или микроскопией на чашках ядра докрасивали ДНК-связывающим красителем DAPI (Sigma, США).

Также непосредственно на лунках планшета часть интактных или децеллюляризованных КП была окрашена DAPI (Sigma-Aldrich, США) или гематоксилином (Dako, Дания) и эозином (Sigma-Aldrich, США) по протоколам производителей.

2.4 Экспериментальные модели и протоколы

2.4.1 Экспериментальные модели *in vitro*

Получение образцов секрета мезенхимных стромальных клеток жировой ткани

Образцы секрета МСК получали методом кондиционирования, для чего чашку с монослоем МСК ЖТ человека или собранным из них КП отмывали ФБС 3 раза по 10 минут для удаления остаточных компонентов среды. После этого к культурам добавляли среду DMEM без ФБС, которую затем использовали для мультиплексного ИФА и экспериментов на животных. Для анализа миграции фибробластов кожи и модели ангиогенеза кондиционирование проводили в среде EBM-2. В обоих случаях объем среды для кондиционирования рассчитывали, как 250 мкл/см², после чего проводили инкубацию при стандартных условиях культивирования в течение 7 суток. По окончании инкубации среду отбирали, центрифугировали (1500 g, 10 мин) и, не замораживая, использовали для экспериментов. С целью нормировки по содержанию ДНК оставшиеся на чашках МСК или КП из них лизировали добавлением реагента TRIzol (Thermo Fisher Scientific, США), после чего в полученных образцах с помощью набора для анализа dsDNA Quant-iT PicoGreen (Thermo Fisher Scientific, США) измеряли содержание [79, 112].

Методы оценки активности секрета мезенхимных стромальных клеток

Влияние компонентов секрета МСК ЖТ на миграцию фибробластов оценивали на модели «раны монослоя» (англ. *scratch assay*). Для этого фибробласты дермы в среде DMEM/10% ФБС высаживали по 15 тыс. клеток в лунки 96-луночного планшета и после адгезии в течение ночи ростовую среду с целью депривации заменяли на DMEM без ФБС на 24 часа. В начале эксперимента с помощью пластикового наконечника микропипетки емкостью 200 мкл прочерчивали «рану» клеточного монослоя, после чего среду отбирали и вносили такой же объем кондиционированной среды, полученной по методу, описанному выше. Миграция клеток оценивалась при помощи автоматизированной системы наблюдения за клеточными культурами Incucyte ZOOM (Essen Bioscience, США) в течение 1,5 суток. По окончании эксперимента в программном обеспечении Incucyte по микрофотографиям проводили расчет процентного изменения площади «раны» [79, 112].

Функциональный тест формирования капиллярных трубочек (англ. *tube assay*) проводили с использованием HUVEC на покрытии из белков ВКМ Matrigel® (Corning, США).

За час перед началом эксперимента дно 48-луночного планшета покрывали ВКМ, после чего высаживали HUVES 2-3 пассажа в количестве 65 тыс. клеток/луночку. После 12-часовой депривации и добавления кондиционированной среды формирование трубочек регистрировали через 12 часов с помощью фазово-контрастной микроскопии. Количество и протяженность капилляроподобных трубочек оценивали на полученных микрофотографиях с помощью плагина для обработки результатов («Tube assay») из пакета ImageJ (НИН, США).

*Оценка дифференцировки мезенхимных стромальных клеток жировой ткани
в составе клеточных пластов и в монослойной культуре*

Для дифференцировки МСК в составе монослойных культур и КП использовали наборы сред и реагентов StemPro Osteogenesis Differentiation Kit, StemPro Chondrogenesis Differentiation Kit или StemPro Adipogenesis Differentiation Kit (все – Gibco, США) по инструкциям производителей. Все эксперименты по дифференцировке, включая ингибиторный анализ, проводили в 12-луночных культуральных планшетах после сборки КП отработанным нами способом, завершавшимся формированием областей повышенной плотности. На 12-й день сборки КП параллельно, используя аналогичную стартовую плотность (15 тыс. клеток/см²), МСК высевали для получения монослойных культур в течение 48 ч. По истечении 48 ч, т.е. на 14-й день сборки КП и 2-й день культивирования монослойной культуры ростовые среды меняли на соответствующие среды для дифференцировки, а в контрольных точках – на среду DMEM (Gibco, США) с 10% ФБС (HyClone, США). Дальнейшие временные точки отсчитывали с первого дня индукции дифференцировки, а все используемые среды сменяли раз в 3 дня. Минеральные отложения окрашивали на 15 день дифференцировки ализариновым красным (Chemicon, США), липидные капли визуализировали на 18 день окрашиванием Oil Red O (Chemicon, США), хондрогенную дифференцировку оценивали на 21 день окрашиванием толуидиновым синим (0,1% раствор в 1% растворе NaCl, pH 2,3), (Sigma-Aldrich, США) в соответствии с инструкциями производителей. После микроскопии и получения изображений красители экстрагировали из культур добавлением чистого ДМСО (AppliChem, США), оптическую плотность полученных экстрактов измеряли на длинах волн 560 нм (ализариновый красный), 530 нм (Oil Red O) или 608 нм (толуидиновый синий) с помощью планшетного спектрофотометра EnVision Multilabel (Perkin-Elmer, США). Для нормировки количества экстрагированного красителя с учетом различного количества клеток в монослойной культуре и КП, дополнительно анализировали количество ДНК с использованием флуоресцентного зонда PicoGreen (см. раздел 2.8.1). Нормированные значения для контрольных культур (не индуцированных к дифференцировке), отражающие фоновое удерживание красителя, вычитали

из соответствующих значений, полученных для дифференцированных культур, в итоге вычисляя относительный показатель, отражающий эффективность дифференцировки для каждого типа культуры МСК (монослойная или КП, в присутствии или в отсутствии ингибирования).

Лазерная микродиссекция

Для препаративного выделения клеточных субпопуляций, сформировавших различные по плотности области КП, использовали метод лазерной микродиссекции с использованием системы Leica LMD6500 (Leica, Германия). Для этого сборку КП производили в специализированных для микродиссекции чашках с полиэтиленовой подложкой (WillCo-Dish, FWST-5030, Нидерланды). Через 14 дней культивирования в сформированном КП размечали компактные и разреженные области и производили автоматизированную микродиссекцию и сбор препаратов, обогащенных МСК одного из этих типов областей. После незамедлительно производили лизис собранных участков КП в соответствующем дальнейшему анализу буфере.

2.4.2 Экспериментальные модели *in vivo* и протоколы их оценки

Животная модель глубокой раны кожи с дефицитом мягких тканей у крысы

Манипуляции с животными получили одобрение Комитета по уходу и использованию животных МГУ им. М.В. Ломоносова (протокол №77-о от 09.02.2017). Модельным объектом являлись самцы крыс линии Wistar с массой тела не менее 300-400 г. Наркотизацию животных проводили в/м введением смеси Золетила-100 и Ксила с корректировкой дозы по массе тела, после чего триммером удаляли шерсть в области холки. Для моделирования глубокой раны скальпелем иссекали круглый лоскут стандартной площади (5,7 см²), после чего удаляли подкожную жировую клетчатку и ножницами формировали объемный дефект трапециевидных мышц. После контроля гемостаза края раны подшивали узловыми швами к внутреннему краю стерильного латексного кольца с внутренним диаметром 2,7 см для предотвращения естественной контракции краев дефекта. Затем рану укрывали стерильной салфеткой, пропитанной повидон-йодом, животных перевязывали и оставляли для восстановления в индивидуальных клетках под визуальным наблюдением оператора. В ходе наблюдения животных перевязывали дважды в неделю, используя изофлюрановый наркоз. При отсутствии спонтанного удаления латексного кольца фиксирующие его швы рассекали на 14 день после проведения операции.

Дизайн эксперимента по оценке эффективности клеточных пластов из МСК жировой ткани и трансплантация клеточного материала на модели глубокой раны кожи

Трансплантацию клеточного материала проводили на 7 сутки после операции. В рамках настоящего эксперимента были сформированы следующие группы:

1. «Контроль» (n=5) – животные без лечения.
2. «Суспензия МСК» (n=4) – инъекция суспензии МСК ЖТ в края и дно раны.
3. «Клеточный пласт» (n=5) – трансплантация КП из МСК ЖТ на поверхность раны.

Суспензию МСК ЖТ в стерильном ФСБ вводили пятью инъекциями объемом по 200 мкл в края и дно сформированного дефекта из расчета 1,5 млн. клеток на 1 животное. Открепленные от пластика КП площадью 9 см², предварительно собранные на 6-луночном планшете, переносили на рану в капле ФСБ на поверхность дефекта, после чего расправляли пинцетом для максимально полного укрытия дна с последующим укрытием гидроколлоидной повязкой Granuflex (Convatec, США, которая оставалась в ране вплоть до следующей перевязки животного.

В ходе эксперимента получаемые образцы ткани разделяли пополам, используя одну часть для фиксации в 4% р-ре формальдегида и приготовления парафиновых срезов (рутинные гистологические окраски), а вторую погружали в среду Tissue-Tek® O.C.T. Compound (Sakura, США). После заморозки в парах азота из нее получали замороженные срезы толщиной 7-8 мкм, которые использовали иммуногистологической визуализации с флуоресцентной меткой.

Модель пролежневого дефекта кожи у мыши

Протокол исследования на животных получил одобрение Комитета по уходу и использованию животных МГУ им. М.В. Ломоносова (разрешение № 67 от 15 марта 2018 г.). Моделирование пролежневого дефекта осуществляли по протоколу Stadler и соавт. [349] с использованием самцов мыши линии C57Bl/6 в возрасте 12–14 недель. После наркотизации изофлюраном проводили депиляцию в области спины и, оттянув складку кожи, накладывали с двух сторон пару круглых магнитов (Master Magnetics, США) диаметром 1,2 см. Через 12 часов магниты снимали и с целью формирования цикла ишемии и реперфузии через 12 часов накладывали вновь описанным выше способом. 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 и затрагивали собственно дерму, подкожную клетчатку и

мышечный слой [350]. В ходе моделирования животные удовлетворительно переносили манипуляции и получаемые таким образом дефекты сохранялись не менее 21 суток.

Дизайн сравнительного эксперимента по оценке эффективности клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток жировой ткани и трансплантация клеточного материала на модели пролежня кожи

Трансплантацию клеточного материала или введение образцов секретома МСК проводили непосредственно после формирования пролежня под ингаляционным наркозом (изофлюран). В ходе эксперимента животных распределяли на следующие группы (не менее 12-16 в каждой), причем у каждого животного ее проводили в оба симметричных пролежневых дефекта за исключением группы «Контроль».

1. «Контроль» – животные без лечения.
2. «Суспензия МСК» – введение суспензии 1 млн. МСК в ФСБ в суммарном объеме 150 мкл в края и дно пролежня (4-5 инъекций в каждый сформированный дефект).
3. «Секретом МСК» – введение 150 мкл кондиционированной среды МСК, содержащей секретом данного типа клеток в края и дно пролежня (4-5 инъекций в каждый сформированный дефект).
4. «Клеточный пласт» – трансплантация одного КП из МСК на поверхность каждого сформированного дефекта.

После трансплантации КП или инъекций на поверхность дефектов на 72 ч. наклеивали стерильные, прозрачные и водонепроницаемые медицинские изделия в виде пленок, предназначенных для укрытия ран (Tegaderm Film, 3М, США). Tegaderm Film удаляли через 3 суток после трансплантации. Материал для гистологического исследование в контрольных точках получали способом аналогичным использованному в модели глубокой раны кожи с дефицитом мягких тканей.

Макроскопическая оценка заживления

Оценку динамики закрытия глубокой раны кожи с дефицитом мягких тканей и пролежневых дефектов осуществляли путем фотосъемки в контрольных точках с последующим подсчетом площади на изображениях в программе ImageJ (НИН, США). При обработке результатов строили кривые Каплана-Мейера, а критерием успешного закрытия считалось значение площади <10% от площади первоначального сформированного дефект [79].

Оценка процессов роста и созревания грануляционной ткани

Морфометрическую оценку роста грануляционной ткани (ГТ) проводили на срезах, окрашенных гематоксилином и эозином. В модели пролежневого дефекта для оценки данного процесса использовали толщину ГТ, рассчитанную по соответствующим ориентирам на микрофотографии. Оценка ремоделирования ГТ проводилась по изменениям как ее площади, так и формированию депозитов коллагена на срезе. На модели глубокой раны с дефицитом мягких тканей подсчет площади ГТ осуществляли по методу Автандилова. Его суть заключается в подсчете числа ячеек сетки стандартного шага, заполненных изучаемой тканью, что минимизирует субъективный характер определения ее границ. Относительную площадь ГТ высчитывали на срезе как отношение числа квадратов, занятых ГТ не менее, чем наполовину, к общему числу занятых тканью квадратов.

Также на модели глубокой раны кожи с дефицитом мягких тканей проводили дополнительное окрашивание по Ван Гизону, при котором фуксин окрашивает коллагеновые волокна в пурпурный цвет при том, что прочие структуры окрашиваются пикриновой кислотой в желтый. В программе ImageJ (НИН, США) далее рассчитывали долю ткани, окрашенной в пурпурный цвет, по отношению к площади среза. На модели пролежневого дефекта для решения аналогичной задачи использовали трехцветное окрашивание по Массону, при котором богатая коллагеном соединительная ткань окрашивается в ярко-синий цвет на фоне бледно-розового или красного окрашивания цитоплазмы и ядер клеток в составе ткани.

Иммуногистологическая визуализация кровеносных сосудов

Иммуногистологическую визуализацию васкуляризации тканей проводили с помощью антител против CD31 и альфа-гладкомышечного актина (α -ГМА). Соответствующие флуоресцентные метки использовали для детекции ЭК капилляров или более крупных кровеносных сосудов, в т.ч. с гладкомышечными клетками в составе их стенки. Зафиксированные срезы тканей толщиной 7-8 мм инкубировали с первичными крысиными антителами против мышинового CD31 (Biolegend, США) и антителами кролика против α -ГМА (Abscam, Великобритания). После этого их отмывали и затем инкубировали со вторичными антителами с соответствующими флуоресцентными метками AlexaFluor-488 или -594 (Invitrogen, США). Подсчет плотности сосудов осуществляли на 6-8 срезах с ручным подсчетом и дальнейшим усреднением на единицу площади среза.

*Флуоресцентное мечение мезенхимных стромальных клеток перед трансплантацией
в составе клеточных пластов или в виде суспензии*

Прижизненное мечение МСК ЖТ осуществляли с помощью мембранного красителя RKN26 (Sigma, США) по протоколу производителя в суспензии или в форме КП, причем в последнем случае МСК метили перед началом сборки ТИК. После получения соответствующих гистологических образцов из них готовили замороженные срезы толщиной 7-8 мкм, которые затем фиксировали в 4% формальдегиде (10 мин) и докрашивали DAPI (Sigma-Aldrich, США).

*Мышиная модель ишемии задней конечности, инъекция суспензии мезенхимных стромальных
клеток жировой ткани и трансплантация клеточных пластов*

Манипуляции с животными были одобрены этическим комитетом (#385.06.2009.) в соответствии с внутренними требованиями Института экспериментальной кардиологии ФГБУ «НМИЦ кардиологии им. академика Е.И. Чазова».

Индукцию односторонней ишемии задней конечности проводили по ранее отработанному протоколу с помощью лигирования ветвей *a. femoralis* с ее дальнейшим иссечением [351]. В группе контроля (n=9) после иссечения *a. femoralis* кожа ушивалась непрерывным швом с помощью атравматической иглы шелком 5-0. В группе инъекции МСК ЖТ (n=8) в ишемизированные мышцы тремя равным инъекциями (в *m. biceps femoris*, *m. tibialis anterior* и *m. quadriceps femoris*) вводили суммарно 1,0 млн клеток в ФСБ; в группе трансплантации МСК ЖТ в виде КП (n=8) его накладывали на область иссеченного сосуда в капле ФСБ, затем осушали рану с помощью ватного тампона до адгезии трансплантата в течение 60-90 сек., после чего кожу ушивали [11].

В эксперименте с использованием модифицированных КП (см. метод получения в разделе 2.5.3) помимо отдельной группы нелеченого отрицательного контроля (n=9) были сформированы следующие группы исследования: группа «VEGF-КП МСК» (n=7), в которой описанным выше методом подкожно трансплантировали модифицированный КП, экспрессирующий VEGF165 человека, «КП МСК» (n=7) с трансплантацией КП после ложной трансдукции (добавление к клеткам среды Грейса (Gibco, США) после культивирования клеток Sf9 без амплификации бакуловируса, см. раздел 2.5.1) и «Инъекция МСК» (n=7) с введением суспензии 1,0 млн. МСК в 150 мкл ФСБ тремя равными инъекциями по способу, описанному выше. После операции степень нарушения кровотока оценивали с помощью лазер-доплеровского сканирования нижних конечностей.

Флуоресцентная метка клеточных пластов

Для детекции клеточных пластов на гистологических препаратах их метили с помощью флуоресцентного прижизненного красителя CMFDA (Invitrogen, США) согласно рекомендациям производителя непосредственно перед снятием для подкожной трансплантации мышам по протоколу, изложенному выше [352].

Оценка кровотока методом лазер-доплеровского сканирования

Для оценки скорости кровотока в задней конечности мыши использовали лазер-доплеровский сканер LDI2 (Moog, Великобритания). Измерение проводили сразу после операции, а затем на 7 и 14 дни под изофлюрановым наркозом по ранее отработанному протоколу [353].

Оценка плотности сосудов в передней большеберцовой мышце

После измерения скорости кровотока на 14 день животных выводили из опыта, а из ишемизированной конечности выделяли переднюю большеберцовую мышцу, которую замораживали в среде Tissue-Tek (Sacura Ltd., Япония) в парах жидкого N₂. Из замороженных блоков на криотоме (Microm HM 505E, Германия) получали серийные поперечные срезы толщиной 7 мкм с шагом 0,5 мм, после чего подсушенные на воздухе стекла со срезами хранили при -20°C [11].

Срезы фиксировали в ледяном ацетоне (20 мин. В морозильнике), осушали в вытяжном шкафу и погружали на 5 мин. в ФСБ, затем блокировали в течение 1 ч. в 10% сыворотке донора вторичных антител и отмывали 5 мин. в ФСБ. Зафиксированную ткань окрашивали первичными крысиными антителами против CD31 мыши (BD Pharmingen, США) и затем вторичными кроличьими антителами против иммуноглобулинов крысы, конъюгированными с красным флуорофором AlexaFluor594 (Invitrogen, США). Далее срезы ополаскивали в ФСБ и докрашивали первично-мечеными FITC-конъюгированными антителами против α -гладкомышечного актина (α -ГМА) (Sigma-Aldrich, США). После окрашивания и отмывки ядра клеток визуализировали с помощью DAPI и срезы заключали под покровные стекла. Для подсчета сосудов анализировали по 5-6 срезов на каждом стекле, после чего получали усредненное количество сосудов в поле зрения для каждого животного и для группы в целом [11].

Оценка площади некроза в скелетных мышцах

Для оценки площади некроза срезы скелетных мышц фиксировали 4% формальдегидом на ФСБ и затем окрашивали гематоксилином и эозином стандартным способом. Оценку площади некротизированных волокон на срезах проводили методом морфометрии в программе ImageJ (НИН, США). Некротизированными считались ануклеарные волокна с признаками плазмореаксиса, а к сопутствующим некрозу изменениям относили демаркационную клеточную инфильтрацию, которую не включали в площадь некротизированной ткани при обсчете, рассчитывая, как отдельный морфометрический показатель. Площадь сохранной мышечной ткани высчитывалась как площадь среза, не занятая некротизированными волокнами или инфильтратом клеток воспаления [11].

Визуализация клеточных пластов и оценка жизнеспособности трансплантированных клеток в их составе

Окрашенные с помощью CMFDA (см. выше) КП были визуализированы на свежих незафиксированных срезах двуглавой мышцы бедра, выделенной на 14 день из зоны трансплантации. Для оценки пролиферации и апоптоза срезы мышцы, покрытой КП, фиксировали в 4% формальдегиде на ФСБ, отмывали и после блокирования в 10% сыворотке донора вторичных антител окрашивали поликлональными кроличьими антителами против активированной каспазы-3 (Signaling technology, США) или Ki-67 (Abcam, Великобритания) в течение 1 ч. После этого стекла отмывали в ФСБ и докрашивали вторичными антителами против кроличьих IgG, конъюгированными с флуорофором AlexaFluor 594 (Invitrogen, США). Ядра клеток визуализировали с помощью DAPI, а окрашенные срезы заключали под покровными стеклами и использовали для флуоресцентной микроскопии с оценкой наличия клеток, окрашенных CMFDA (клетки пласта) с признаками апоптоза (активацией каспазы-3) или пролиферации (положительных по Ki-67) [11].

2.5 Модификация клеточных из мезенхимных стромальных клеток с помощью вирусных векторов

2.5.1 Амплификация бакуловирусного вектора в клетках Sf9

Оригинальные рекомбинантные бакуловирусы с генами eGFP (Vas-CE), VEGF165 человека (Vas-FCVW) и FLP-рекомбиназы (Vas-FLPo) были получены в лаборатории химической инженерии Университета Цинь-хуа (Тайвань) и предоставлены для исследований в рамках совместного гранта РФФИ и Министерства науки и технологий Тайваня. Они представляют собой двухкомпонентную систему для эффективной модификации клеток человека и животных. Кратко, последовательности eGFP, VEGF165 и FLP-рекомбиназы были получены из образцов мРНК с помощью реакции обратной транскрипции со специфичными праймерами и клонированы в плазмиду (pVas-CWPRE₂₂). После амплификации плазмиды использовались для конструирования рекомбинантных бакуловирусов с использованием коммерческой системы Vas-to-Vas (Invitrogen, США) по протоколу производителя.

Амплификация полученных векторов в лаборатории российской стороны в культуре клеток *Spodoptera frugiperda* (линия клеток Sf9) в среде Грейса (Gibco, США) с 10% содержанием ФБС. Культивирование клеток проводилось при постоянном перемешивании и температуре 27°C. Для этой цели насыщенная культура Sf9 в объеме среды равной 300 мл подвергалась заражению амплифицируемым бакуловирусом при кратности инфицирования (MOI) равной 0,01. При трансдукции использовалась следующая формула для расчета дозировки вирусных частиц:

$$\text{MOI} = (\text{T} * \text{V}) / \text{n} \quad (1),$$

где MOI – (англ. *multiplicity of infection*) кратность инфицирования,

T – титр вируса в млн. частиц/мл,

V – искомый объем вирусного стока для инфицирования

n – число клеток на лунке планшета.

При известном титре вируса, определяемом на этапе амплификации и эмпирически известном значении MOI, а также ранее определенном количестве клеток, не составляет труда вычислить объем вирусного стока, необходимый для добавления к культуре клеток для трансдукции с заданным MOI

В среднем, использовалось соотношение около 20-30 мкл стока на 300 мл культуры Sf9. После добавления вирусного стока к культуре клеток их помещали при постоянном перемешивании в инкубатор на 72 часа, после чего производилась оценка жизнеспособности

клеток в культуре. При эффективной инокуляции к исходу 3-х суток в культуре было около 60-70% жизнеспособных клеток. Далее культура инкубировалась при описанных условиях еще 48 часов, после чего проводилось осаждение клеточного дебриса центрифугированием при 300 об/мин. В течение 3 мин. Супернатант, содержащий бакуловирусные частицы, замораживали при температуре -80°C , а затем использовали для модификации МСК ЖТ или получения следующих пассажей бакуловирусных частиц.

2.5.2 Трансдукция мезенхимных стромальных клеток бакуловирусными векторами

Для отработки бакуловирусной трансдукции МСК ЖТ мыши на 3 пассаже наращивались до монослоя на 6-луночном планшете и затем подвергались бакуловирусной трансдукции Вас-СЕ с геном eGFP. Среду роста (DMEM с 4,5 г/л D-глюкозы и 10% ФСБ) удаляли, клетки дважды промывали ФСБ и добавляли бессывороточный 2,0 мл раствора для трансдукции: DMEM, α -MEM, р-р Хэнкса или ФСБ, содержащий Вас-СЕ с MOI=150 или 75. После этого планшет накрывали фольгой для защиты светочувствительного вектора и инкубировали при 27°C на шейкере в течение 3 или 6 часов. После трансдукции клетки промывали ФСБ, добавляли полную DMEM и клетки инкубировали в течение 15 часов с бутиратом натрия (NaBu) в рабочей концентрации 5 мМ. После этого клетки промывали, среду меняли на полную DMEM и клетки инкубировали в течение 48 часов перед FACS для оценки экспрессии eGFP.

Для оценки влияния карбонатного буфера на эффективность трансдукции МСК ЖТ мыши трансдуцировали Вас-СЕ (MOI=150) в р-ре Хэнкса, смешанном с 7,5% раствором NaHCO_3 для получения конечной концентрации 1,0 или 3,0 г/л NaHCO_3 .

2.5.3 Трансдукция клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток бакуловирусными векторами и экспрессия VEGF165

Для трансплантации на модели ишемии задней конечности мы формировали КП из МСК ЖТ мыши 3 пассажа в 12-луночном планшете. После этого их трансдуцировали Вас-FCVW/Вас-FLPo (MOI 150/15) в р-ре Хэнкса в течение 6 часов, перед откреплением обработав 5 мМ NaBu (15 часов) в полной среде DMEM. Уровень продукции VEGF165 оценивался методом ИФА (см. ниже) с нормировкой на число клеток в составе ТИК после ферментативной деструкции отдельно подготовленных КП.

Ложно-трансдуцированные КП для имитации условий трансдукции обрабатывали смесью р-ра Хэнкса и среды Грейса от неинфицированных Sf9.

2.5.4 Оценка флуоресценции методом проточной цитометрии (FACS)

МСК ЖТ мыши, трансдуцированные Вас-СЕ и экспрессирующие eGFP, инкубировали в среде роста DMEM/10% ФБС течение 48 часов, открепляли, фиксировали 1% формальдегидом в ФСБ и использовали для FACS для определения процента eGFP-позитивных клеток и их средней интенсивности флуоресценции (MFI) в канале FITC.

2.5.5 Подсчет клеток и анализ выживаемости

Для оценки выживаемости после трансдукции 25 тыс. МСК ЖТ мыши 3-го пассажа высевали на 48-луночный планшет в полной среде DMEM на 8 часов, далее депривировали (с 0% ФБС) в течение 4 часов в DMEM без сыворотки, а затем подвергали трансдукции Вас-СЕ (МОИ 150, 6 часов) в ФСБ или р-ре Хэнкса. После промывания клеток для трансдукции часть лунок использовали для ручного подсчета клеток с окраской трипановым синим. В оставшиеся лунки добавляли полную DMEM с NaBu (5 мМ) или без нее на 15 часов. После этого клетки снимали и подсчитывали таким же способом для получения их количества в конечной точке. Параллельно с экспериментальными лунками необработанные МСК ЖТ, прошедшие депривацию в течение 4 ч, служили контролем с оценкой в тех же временных точках.

2.6. Биохимические методы исследования

2.6.1 Иммуноферментный анализ

Иммуноферментный анализ (ИФА) для определения VEGF165 человека проводили с использованием коммерческого набора “Human VEGF165 Quantikine” (R&D systems, США) по протоколу производителя, при необходимости внося дополнительное разведение в исследуемые образцы.

2.6.2 Мультиплексный иммуноферментный анализ

Количественное определение ангиопоэтина-2, G-CSF, HGF, PDGF-BB и VEGF165 в образцах секретомов КП или монослоя МСК проводили методом мультиплексного ИФА с использованием набора «Human Angiogenesis assay» (Bio-Rad, США) на системе Bio-Plex® 200 (Bio-Rad, США) в соответствии с инструкциями производителя. Все получаемые значения для учета количества клеток в составе монослойной культуры и КП нормировались по концентрации ДНК в соответствующих лизатах (см. раздел 2.8.1) [79].

2.6.3 Анализ удельного содержания белков внеклеточного матрикса

Количество коллагена I типа и клеточного фибронектина (ВД-А) анализировали с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (дот-ИФА) [213]. Для этого лизаты КП, их участков или контрольных МСК выравнивали по концентрации белка до 1 мг/мл и наносили по 1 мкл на поверхность нитроцеллюлозной мембраны. После сорбции и высыхания капель проводили блокировку мембраны раствором 5% сухого молока в ФСБ, а мембрану, предназначенную для измерения концентрации белка, окрашивали раствором амидового черного. После блокировки мембраны инкубировали в растворах, содержащих первичные антитела к человеческому коллагену I типа (Abscam, Великобритания) или ВД-А фибронектину (Abscam, Великобритания) в ФСБ с 0,5% сухого молока. После трехкратной отмывки 0,1% раствором Tween-20 (Panreac, США) в ФСБ, проводили инкубацию в растворах соответствующих вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена (антитела осла против антигенов мыши или козы против антигенов крысы, Имтек, Россия) в ФСБ с 0,5% сухого молока. Белки интереса визуализировали с помощью раствора хемилюминисцентного субстрата Clarity ECL chemiluminescence kit (Bio-Rad Laboratories, США). Количественные вычисления с использованием полученных значений яркости люминисценции производили в программе ImageJ (НИН, США). Относительное содержание исследуемых белков в лизатах было получено путем нормировки данных дот-ИФА на общую концентрацию белка, измеренную с помощью окрашивания амидовым черным. При всех аналитических процедурах для построения калибровочных кривых и получения количественных данных использовали серийные разведения стандартных образцов с известной концентрацией анализируемого белка.

2.6.4 Ингибиторный анализ

Для ингибирования активности Rho-ассоциированных протеинкиназ ROCK-1 и ROCK-2 использовали ингибитор Y-27632 (Sigma-Aldrich, Германия) в концентрации 5 или 20 мкМ. Для подавления транскрипционной активности SREBP-1 использовали бетулин (Бетулафарм, Россия) в концентрации 5 мкМ.

2.6.5 Гистохимическая детекция активности щелочной фосфатазы

Гистохимическую детекцию активности ЩФ в КП из МСК проводили с хромогенным субстратом BCIP/NBT согласно методу, описанному ранее [211].

2.7 Иммунофлуоресцентное мечение в культуре

Иммунофлуоресцентное мечение клеточных культур осуществляли стандартным способом в лунках культуральных планшетов после фиксации в растворе 4% формальдегида (PanReac, США) в течение 10 минут. После каждого шага окрашивания лунки трижды отмывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ) в течение 3 минут. Для флуоресцентного мечения фибриллярного актина клетки инкубировали с фаллоидином, меченым Alexa Fluor 594 (Invitrogen, США) при 37°C в течение 1 часа. Для иммунофлуоресцентного мечения альфа-гладкомышечного актина (α -ГМА) проводили пермеабиллизацию в течение 10 минут 0,02% раствором Тритона X-100 (PanReac AppliChem, США) и блокирование в течение 1 часа 10% раствором сыворотки козы (Thermo Fisher Scientific, США) в ФСБ. После чего проводили инкубацию в растворе первичных кроличьих антител к α -ГМА (Abcam, Великобритания) в течение 16 часов при температуре 4°C. Далее инкубировали с раствором вторичных антител козы против антител кролика, меченых AlexaFluor 488 (Invitrogen, США), в течение 2 часов при комнатной температуре. Ядра метили раствором DAPI, 20 мкг/мл в течение 5 минут при комнатной температуре.

2.8 Молекулярно-биологические методы

2.8.1 Нормировка по содержанию ДНК для учета соотношения количества клеток в культурах мезенхимных стромальных клеток, клеточных пластах и различных областях конструкции

Для учета различного количества клеток в анализируемых препаратах (области КП с различной степенью компактизации) и культурах (монослой или КП) использовали метод нормировки на количество ДНК. Для этого мы анализировали количество ДНК в образце с помощью флуоресцентного зонда PicoGreen (Thermo Fisher Scientific, США) по описанному протоколу [210]. Для учета плотности клеток в различных областях КП при анализе неразделенных культур использовали окрашивание ядер гематоксилином либо окрашивание ДНК флуоресцентным интеркалирующим красителем Hoechst с оценкой интенсивности флуоресценции в анализируемой области.

2.8.2 Выделение и секвенирование РНК, биоинформатический анализ дифференциальной экспрессии генов

Перед проведением РНК-секвенирования МСК ЖТ в монослое или в виде КП лизировали с использованием реагента TRIzol (Thermo Fisher Scientific, США) по протоколу производителя с целью дальнейшей экстракции тотальной фракции РНК [348]. Полученные методом лазерной микродиссекции образцы областей КП использовали для выделения тотальной РНК и анализа транскриптома методом РНК-секвенирования. Качество и количество выделенной тотальной РНК проверяли на приборе BioAnalyser с набором RNA 6000 Nano Kit (Agilent, США). Далее из полиА-РНК были приготовлены библиотеки для массового параллельного секвенирования при помощи набора NEBNext® Ultra™ II RNA Library Prep (NEB, США) согласно инструкции к набору. Концентрацию библиотек определяли при помощи набора Qubit dsDNA HS Assay Kit – (Thermo Fisher Scientific) на приборе Qbit 2.0. Секвенирование проводили на приборе HiSeq1500 (Illumina, США) прочтениями длиной 50 нуклеотидов. Контроль качества коротких прочтений осуществляли с помощью алгоритмов FastQC, удаление адаптерных последовательностей – с помощью cutadapt, фильтрацию коротких прочтений по качеству – с помощью sickle. Выравнивание коротких прочтений на референсный геном человека (GRCh37) и последующий подсчет нуклеотидных прочтений, картировавшихся на каждый из аннотированных генов проводили в программе STAR. Относительную активность каждого гена определяли согласно покрытию этого гена

нуклеотидными чтениями на референсном геноме после картирования каждой библиотеки. Анализ дифференциальной экспрессии генов был проведен в среде R с использованием пакета edgeR. Нуклеотидные прочтения, картировавшиеся на каждый из аннотированных генов, фильтровали по числу прочтений на миллион, cpm (counts per million) и оставляли лишь гены, у которых значение cpm было выше 1,0 в двух и более образцах, после чего нормализовали число прочтений на каждый ген с помощью ТММ алгоритма в edgeR. Для каждого гена подбирались коэффициенты обобщенной линейной модели (Generalized Linear Model, GLM), с помощью которой затем рассчитывались изменения уровня экспрессии генов (log fold change), а также стандартные ошибки. Значимость дифференциальной экспрессии определяли с помощью теста отношения правдоподобия (likelihood ratio test). Функциональный анализ дифференциально экспрессированных генов, включающий анализ генных онтологий (Gene Ontology, GO) и анализ биохимических путей (Reactome) проводили с помощью библиотек R clusterProfiler и reactomePA. Кластеризацию генов по категориям GO осуществляли в онлайн-интерфейсах David 6.8, Enrichr и g:Profiler. Визуализация данных проведена с использованием библиотек ggplot2 и heatmap.2.

2.9 Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка результатов осуществлялась в пакете GraphPad Prism 6 (GraphPad, США). После проверки распределения на нормальность, рассчитывали описательные показатели: среднее значение, стандартное отклонение и стандартную ошибку среднего для параметрического распределения и медиану с межквартильным размахом для непараметрического. Для проверки значимости различий 2 групп использовали t-критерий Стьюдента или критерий Манна-Уитни для непараметрического распределения. Сравнение 3 и более групп между собой проводили с использованием дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим применением критериев Тьюки или Краскела-Уоллиса (непараметрический вариант ANOVA). 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 $p < 0,05$ [112, 133].

ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА И ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ КЛЕТОЧНЫХ ПЛАСТОВ ИЗ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ

3.1 Разработка метода получения клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток человека

Получение КП из МСК ЖТ человека являлось приоритетной задачей, так как они являются прототипом ТИК для дальнейшего возможного применения в клинике. Основными требованиями к КП являются их видимость невооруженным глазом, возможность снятия с культурального пластика без потери целостности, а также выполнимость манипуляций с полученной ТИК (перенос на хирургическом инструменте или в капле буфера). С учетом дороговизны и малой доступности термочувствительной культуральной посуды нами была также поставлена задача по откреплению КП от непокрытого пластика. Для этого было предложено использовать сочетание механического способа снятия с одним из двух воздействий: 1) кратковременной трипсинизации (10-15 сек) в 0,025% р-ре трипсина-ЭДТА или 2) инкубации КП в холодном р-ре Версена (0,5 мМ ЭДТА), обладающим хелатирующим действием. Оба этих воздействия могут снижать адгезию КП к покрытию и облегчать его механическое удаление с поверхности посуды.

С целью сборки КП из МСК жировой ткани человека нами были использованы клетки, полученные от 3 доноров на 2-3 пассаже с момента выделения. Снятые в суспензию МСК после подсчета и оценки жизнеспособности высаживали в лунки 6- или 12-луночных планшетов и затем культивировали 7-14 дней с добавлением DMEM/10% ФБС и заменой среды на новую каждые 48 часов.

При воспроизведении стандартного протокола получения КП, описанного в литературе (50 тыс. клеток/см², 7 дней) по истечении срока культивирования нам удалось получить требуемые ТИК, которые снимались с обычной культуральной посуды. При этом открепления КП удавалось добиться как с помощью кратковременной (10-15 сек.) обработки р-ром 0,025% трипсина-ЭДТА, так и с помощью обработки КП р-ром Версена в течение 2-3 мин. Для снятия КП, покрытого ФСБ, мы использовали обычный стерильный одноразовый наконечник (объем 200 мкм) для микропипетки, которым очерчивали КП по краю. После этого им же проводили снятие, совершая движения от края лунки к ее центру (рисунок 8). Полученная таким образом ТИК сохраняла целостность, флотировала в ФСБ и переносила манипуляции – перенос в капле буфера или на хирургическом инструменте.



Рисунок 8 – Последовательные стадии снятия клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток жировой ткани человека в фосфатно-солевом буфере с культурального пластика с помощью одноразового наконечника для микропипетки (6-луночный планшет)

Используя различные плотности МСК ЖТ (10-25-50-75-100 тыс. клеток/см²) при посадке стартовой культуры для сборки КП, мы обнаружили, что плотность клеток имеет обратную корреляцию с продолжительностью периода, который необходим для получения готовой к снятию ТИК. Так, при начальной плотности МСК ЖТ 10,0 тыс. клеток/см² время для получения КП составляло 11-12 суток, а при плотностях 75,0 и 100,0 тыс. клеток/см² КП могли быть сняты уже через 48-72 ч (рисунок 9). При этом продолжение культивирования КП приводило к тому, что происходило их спонтанное открепление и контракция, которые приводили ТИК в негодность, т.к. расправить ее и подготовить к трансплантации в таком виде было уже невозможно.

Второй важной оптимизацией протокола получения КП стало использование в качестве добавки к среде роста L-аскорбиновой кислоты, которая по данным литературы обладает способностью стимулировать продукцию белков ВКМ и их ферментативную сшивку *in vitro*, а также способствует пролиферации клеток [354].

Нами было обнаружено выраженное изменение морфологии МСК в составе ТИК, а также увеличение плотности конструкции при добавлении в среду культивирования L-аскорбиновой кислоты в концентрации 50 мкг/мл. Даже при минимальной использованной нами плотности МСК ЖТ в 10,0 тыс. клеток/см² за 11-12 суток удавалось получить манипулируемые и плотные ТИК. Анализ микрофотографий обнаружил, что в КП, полученных с добавлением L-аскорбиновой кислоты, отмечалась более высокая плотность и компактное расположение МСК по сравнению с обычным протоколом культивирования (рисунок 10).

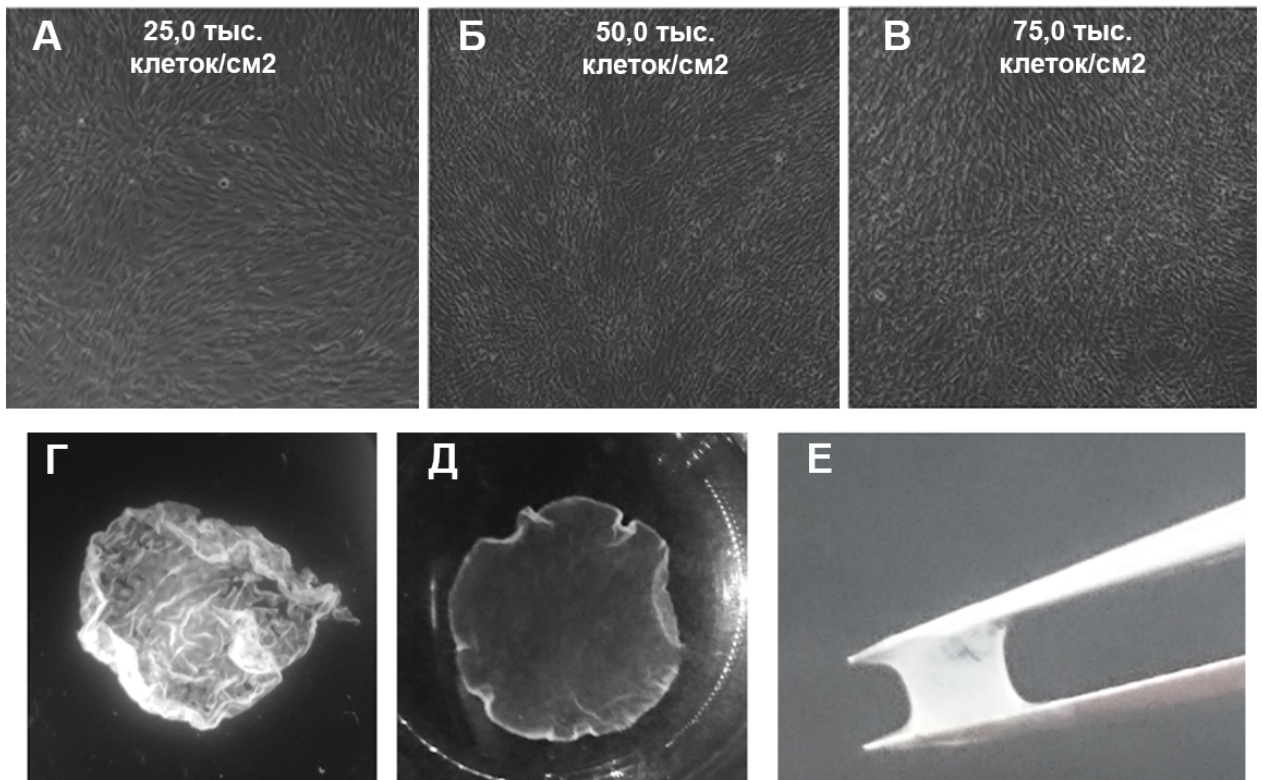


Рисунок 9 – Результаты сборки клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток жировой ткани человека при различной плотности стартовой культуры. Морфология готовых к откреплению пластов на (А) 10, (Б) 7 и (В) 3 сутки культивирования при указанной в подписи плотности стартовой культуры и (Г) вид клеточного пласта с недостаточной механической прочностью после снятия на 4 сутки; готовый к трансплантации клеточный пласт (Д) после открепления на 7 сутки и он же (Е), взятый на бранши микропинцета; А-В: фазово-контрастная микроскопия, ув. $\times 100$; Г-Д: макрофотосъемка

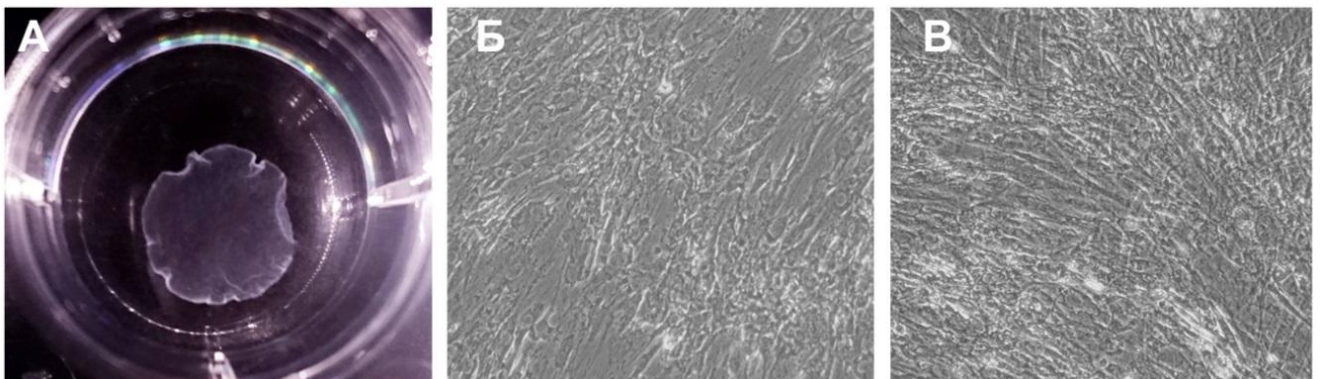


Рисунок 10 – Результаты сборки клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток жировой ткани человека в стандартной среде и при добавлении к ней L-аскорбиновой кислоты. Макрофотография открепленного и флотирующего клеточного пласта (А); микрофотография клеточного пласта (Б) на 12 сутки культивирования при начальной плотности культуры 10 тыс. клеток/см² и (В) то же при культивировании с добавлением L-аскорбиновой кислоты, 50 мкг/мл; фазово-контрастная микроскопия, ув. $\times 100$

С учетом полученных данных нами в дальнейшем был выбран протокол получения КП из МСК ЖТ человека с параметрами, приведенным в таблице 3.

Таблица 3 – Основные параметры разработанного протокола получения клеточных пластов из первичных мезенхимных стромальных клеток жировой ткани человека

№	Параметр	Значение или описание
1	Пассаж мезенхимных стромальных клеток жировой ткани человека	2-4
2	Плотность культуры при высадке	50,0 тыс. клеток/см ²
3	Среда культивирования	Полная среда AdvanceStem (HyClone, США) с добавлением 50 мкг/мл L-аскорбиновой к-ты
4	Периодичность замены среды	1 раз в 72 ч
5	Ожидаемый срок сборки тканеинженерной конструкции	Не менее 7 суток
6	Способ открепления клеточного пласта от культуральной посуды	Отмывка стерильным р-ром Версена и инкубация в холодном р-ре Версена в течение 2-3 минут с последующим механическим снятием

С целью открепления КП выбор был сделан в пользу использования р-ра Версена в связи с тем, что его эффективность была полностью сопоставима с трипсином-ЭДТА. При этом обработка р-ром Версена не приводит к деградации ВКМ и, кроме того, протокол с использованием трипсина-ЭДТА основан на кратковременной (от 10 до 20 сек), что вносит существенную вариабельность, т.к. соблюсти без отклонений столь короткие сроки затруднительно.

В дальнейшем все эксперименты с использованием МСК ЖТ человека проводились с использованием приведенного выше протокола, который в дальнейшем может рассматриваться как потенциальная технология получения КП для клинического использования.

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

В ходе работы были дополнительно получены и проанализированы образцы МСК ЖТ от 14 доноров и собранные из них КП. Несмотря на стандартизированные условия сборки ТИК при плотности стартовой культуры 50 тыс. клеток/см², сроки получения готовых КП значительно различались (рисунок 11). Хотя средний срок сборки КП составил 7-8 дней, можно заметить, что минимальный срок для сборки КП составил пять дней (2 донора), а максимальный – одиннадцать дней (2 донора).

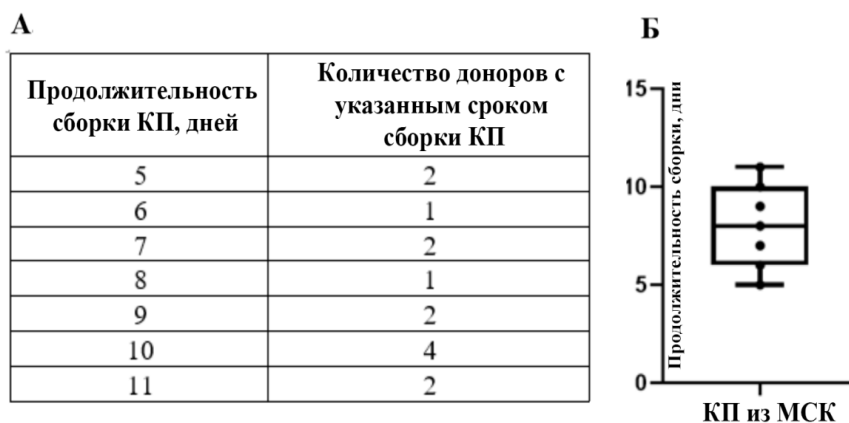


Рисунок 11 – Сроки получения клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток жировой ткани человека (А), статистическое распределение (Б) полученных образцов мезенхимных стромальных клеток по срокам сборки тканеинженерной конструкции (среднее значение \pm стандартное отклонение)

В качестве параметров, которые могут оказывать влияние на длительность сборки КП из МСК, нами были предложены индивидуальные особенности доноров (возраст, пол), а также культуральные характеристики МСК, использованных для получения КП, в первую очередь связанные с пролиферативной активностью (время удвоения популяции и лаг-фаза).

Индивидуальные характеристики доноров МСК ЖТ, использованных в работе, представлены ниже: 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 (рисунок 12).

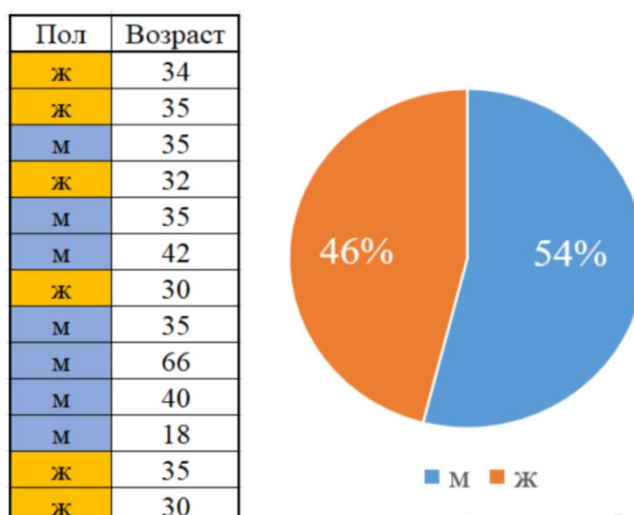


Рисунок 12 – Демографическая характеристика доноров мезенхимных стромальных клеток, использованных для получения клеточных пластов (n=14)

Из графиков ниже (рисунок 13) видно, что продолжительность сборки КП из МСК не зависела от основных индивидуальных характеристик доноров клеток – пола и возраста. Например, МСК ЖТ, полученные от донора 66 лет, формировали КП примерно за такое же время (8 дней), как и МСК от донора в возрасте 18 лет (9 дней).

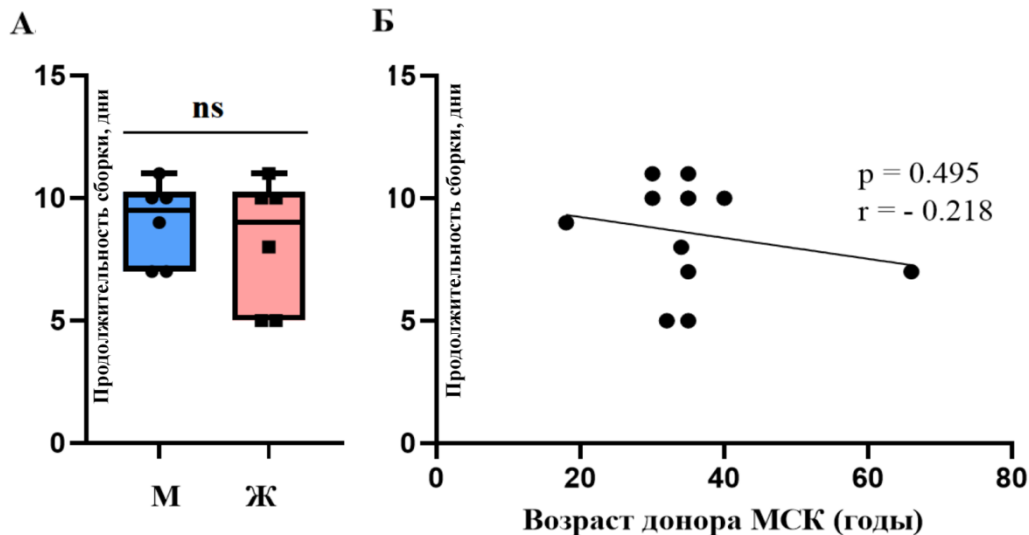


Рисунок 13 – Зависимость продолжительности сборки клеточных пластов от пола (А) доноров жировой ткани и их возраста (Б). На графике представлены результаты корреляционного анализа (r -коэффициент Пирсона), где «М» – мужчины, «Ж» – женщины; ns –отсутствие статистической значимости

Одними из ключевых параметров культуры, связанными с пролиферацией, являются время удвоения клеточной популяции и лаг-фаза. Под лаг-фазой понимают период времени, за который клетки адгезируют к культуральному пластику, увеличиваются в размерах, набирают компоненты ВКМ, необходимые для клеточного деления и роста популяции. В конце лаг-фазы популяция клеток начинает увеличиваться количественно, переходя в фазу экспоненциального роста.

Проведенный нами корреляционный анализ показал, что длительность сборки КП не связана с временем удвоения популяции, что оказалось довольно удивительным, т.к. связь между скоростью пролиферации МСК и накоплением достаточной массы клеток для сборки ТИК представлялась закономерной. При этом продолжительность лаг-фазы в культуре МСК напрямую коррелировала с продолжительностью сборки КП (рисунок 14). МСК с наименьшей длительностью лаг-фазы формировали КП быстрее, чем МСК с длинной лаг-фазой.

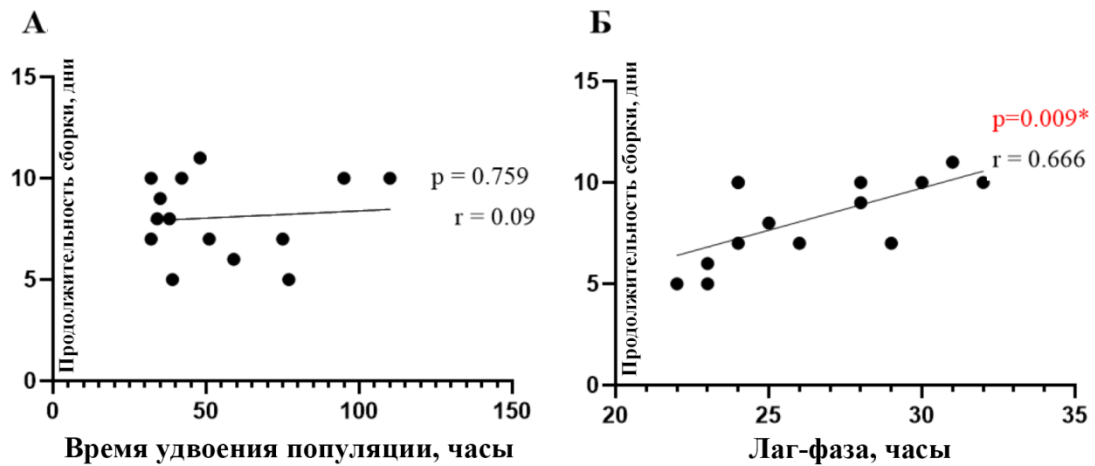


Рисунок 14 – Анализ корреляции продолжительности сборки пластов из мезенхимных стромальных клеток жировой ткани с временем удвоения популяции (А) или длительностью лаг-фазы (Б); r - корреляционный коэффициент Пирсона

Данная корреляция может объясняться тем, что МСК с продолжительной лаг-фазой дольше адгезируют и в дальнейшем медленно нарабатывают компоненты микроокружения, необходимые для запуска митоза. Учитывая, что сборка многоклеточной ТИК связана с процессами адгезии и организации ВКМ, длительность лаг-фазы культуры МСК может быть скоростью-лимитирующим параметром сборки КП. Таким образом, продолжительность лаг-фазы на ранних сроках культивирования МСК ЖТ может быть использована для предварительной оценки срока готовности ТИК в виде пластов.

3.3 Гистологическая характеристика клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток человека

При гистологическом исследовании поперечных срезов КП из МСК ЖТ мы обнаружили многослойный характер конструкции, что было хорошо видно по расположению ядер, окрашенных DAPI в 3-4 слоя (рисунок 15, А, Б). Такая морфология отличается от типично описываемых в литературе КП из эпителиальных клеток, которые имеют обычно не более 1-2 слоев. Толщина КП из МСК ЖТ к 7 дню составляла не более 40 мкм, чего вполне достаточно для свободной диффузии O_2 и нутриентов. Иммунофлуоресцентная визуализация компонентов ВКМ показала, что в составе КП имеется высокая представленность коллагена I типа и фибронектина (рисунок 15, В, Г). Помимо них было выявлено депонирование ключевых компонентов базальной мембраны – ламинина и коллагена IV типа (рисунок 15, Д, Е) [112, 355].

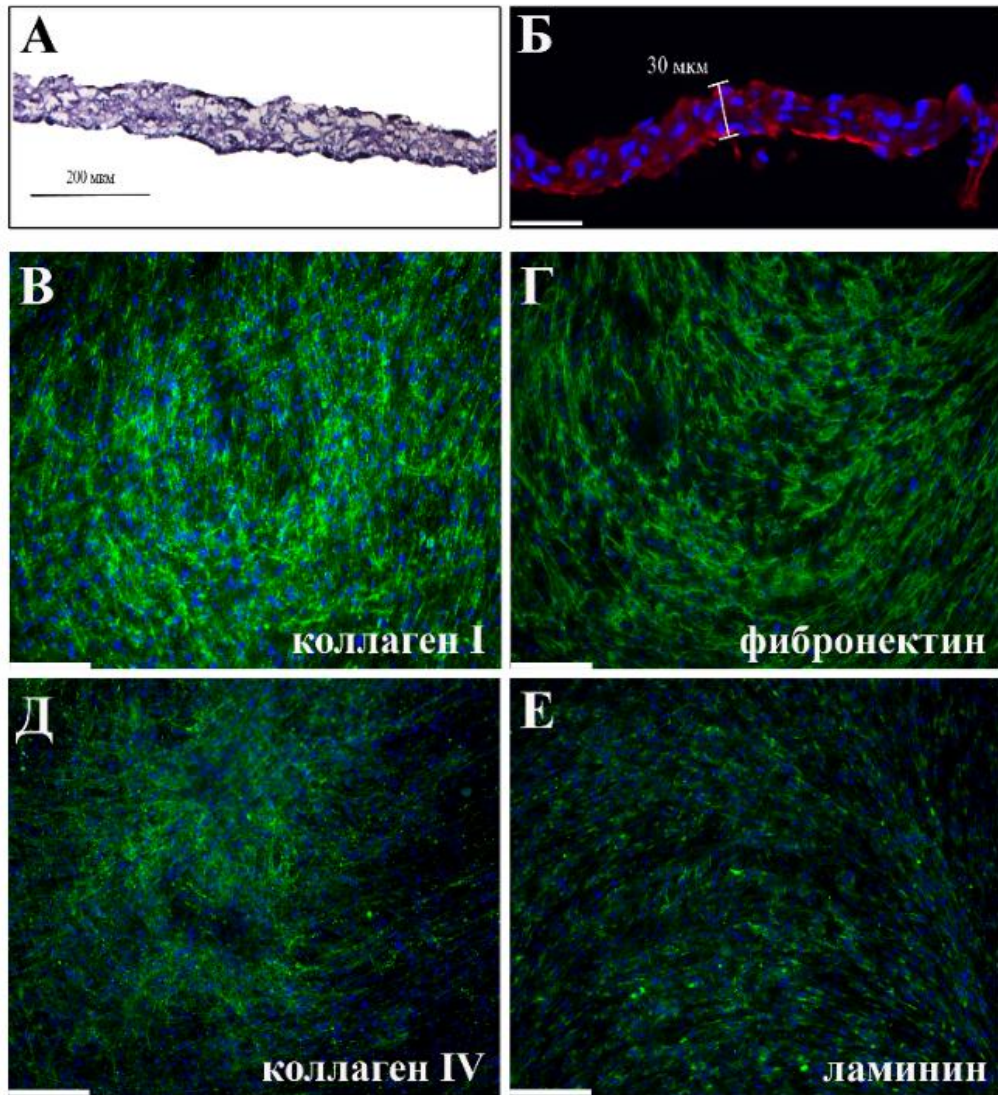


Рисунок 15 – Гистологическое исследование клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток жировой ткани человека. Микрофотографии поперечных срезов клеточных пластов после окрашивания гематоксилином (А) или иммунофлуоресцентной визуализации фибронектина (Б), а также компонентов внеклеточного матрикса (В-Е) в составе пласта до открепления от культуральной посуды. Масштабный отрезок – 100 мкм, ядра помечены DAPI

Таким образом, можно утверждать, что полученные нами с использованием отработанного протокола ТИК содержат значительные количества ключевых компонентов ВКМ, которые обеспечивают не только пространственное объединение МСК, но и сигналы для поддержания их функциональной активности [356, 357]. В частности, показано, что определяемая укладкой пространственная ориентация фибрилл ВКМ может через интегриновую рецепцию регулировать паракринную активность МСК [358]. Детектируемые в структуре КП основные белки базальной мембраны могут как способствовать миграции ЭК, так и стабилизировать формируемые ими структуры *in vitro*, имитируя процессы формирования стабильного сосудистого русла при участии перицитов и МСК [359].

С учетом того, что при неконфокальной микроскопии многослойных КП визуализация иммуномеченых белков ВКМ может быть некорректной, мы также провели иммуногистологическую характеристику поперечных срезов КП, результаты которой представлены на рисунке 16. Аналогично требовали уточнения и данные по толщине конструкции, так как после снятия с пластика контрактильные силы, имеющие место в составе ТИК, могут исказить реальную толщину КП. Для уточнения этого вопроса нами была проведена конфокальная микроскопия прикрепленного к пластику КП из МСК ЖТ после окрашивания ядер клеток DAPI, которая показала, что толщина конструкции *in vitro* составляет не более 4 слоев клеток, а высота от дна чашки высотой равна около 30 мкм.

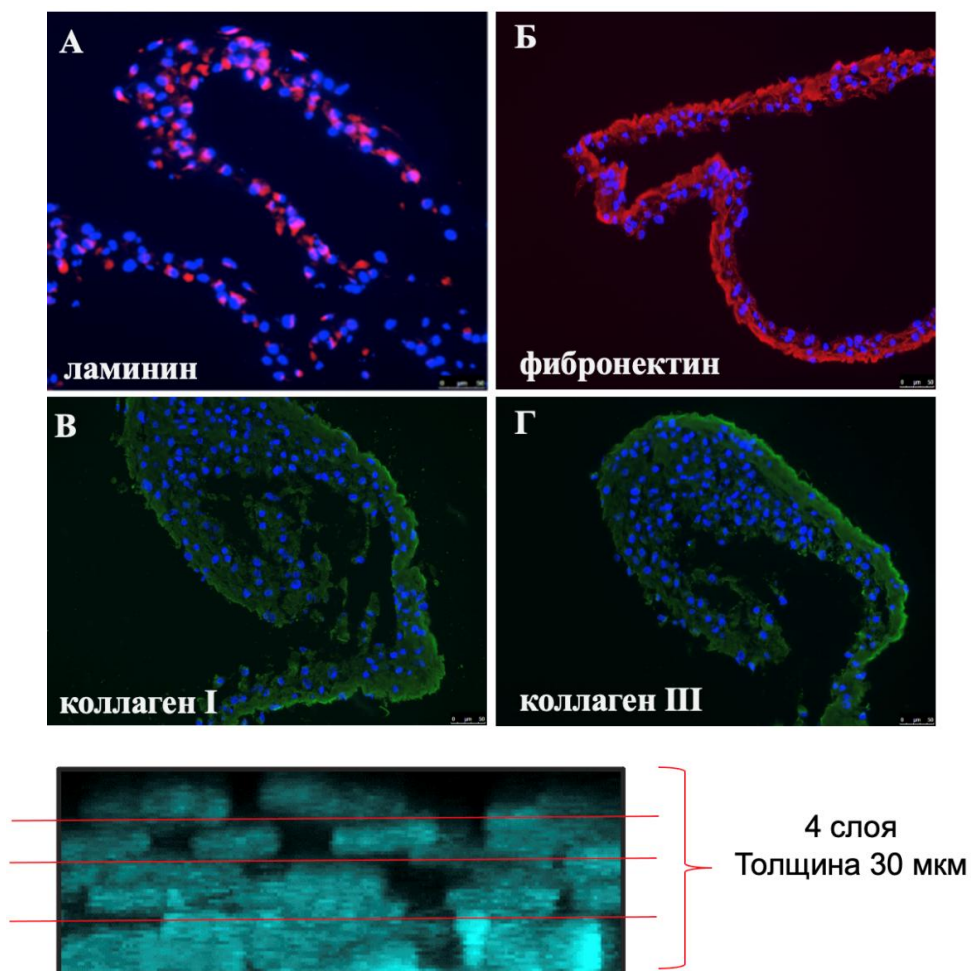


Рисунок 16 – Иммуногистологическая характеристика поперечных срезов клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток жировой ткани и конфокальная микроскопия прикрепленной конструкции. (А-Г): Иммунофлуоресцентное мечение белков внеклеточного матрикса в поперечных срезах клеточных пластов; (внизу): результаты конфокальной микроскопии до открепления клеточных пластов от чашки Петри; ядра помечены DAPI, масштабный отрезок 100 мкм

Из примечательных данных, полученных в ходе этой оценки, можно отметить паттерн распределения ламинина (рисунок 16), который, в целом, соответствовал картине при микроскопии КП целиком. Микрогранулярные внутриклеточные включения ламинина разительно отличались от гомогенно распределенных коллагенов I и III, а также фибронектина. К сожалению, нам не удалось воспроизвести на поперечных срезах результаты визуализации коллагена IV как второго ключевого компонента базальной мембраны. В целом, 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 белков базальной мембраны (ламинина и коллагена IV).

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

Методы ТИ, опирающиеся на использование дВКМ, достаточно хорошо себя зарекомендовали в этом направлении, однако их ограничением всегда является необходимость получения донорского органа. Дефицит тканей и органов является одним из наиболее актуальных вопросов в трансплантологии, поэтому в рамках оценки потенциала КП как тканеинженерной платформы, мы предприняли попытку провести их децеллюляризацию. В пользу такого развития говорили также приведенные выше данные о существенном накоплении белков ВКМ в составе КП.

Для получения препаратов внеклеточного матрикса полученные клеточные пласты были обработаны растворами на базе ФСБ, содержащими детергентные или хаотропные соединения. Всего было изучено действие 5 веществ, обладающих по данным литературы децеллюляризирующим действием: дезоксихолат натрия (ДХН) 0,5%; 3-((3-холамидопропил)диметиламмоний)-1-пропансульфонат (CHAPS) 0,5%; додецилсульфат натрия (SDS) 0,05%; мочевины 0,2М; Triton X-100 1%.

Наиболее эффективным способом децеллюляризации собранного КП с минимальной степенью повреждения ВКМ оказалась кратковременная (5-10 мин) обработка раствором ДХН или CHAPS (рисунок 17). Действие 0,2М мочевины и 0,05% SDS оказалось наименее удовлетворительным – эти вещества в большей степени разрушали связи между клетками и с пластиком, нарушая целостность матрикса. При этом наблюдался эффект, напоминающий фиксацию мембран, вследствие чего децеллюляризация была неполной. Интересным оказалось действие Triton X-100, однопроцентный раствор которого за 10 минут разрушал

цитоплазматические мембраны клеток, однако ядра оставались неповрежденными и были видны при окраске DAPI.

В представленных в литературных источниках работах по децеллюляризации тканей и органов как действующее вещество используется обычно SDS, мочевины, ДХН [360, 361, 362]. Полученные нами результаты свидетельствуют, что использование таких сильных агентов как SDS и мочевины, способных эмульгировать белки в случае с КП не оправдано. Для этих целей достаточно эффективным и мягким децеллюляризирующим агентом, не повреждающим матрикс, является ДХН, либо CHAPS.

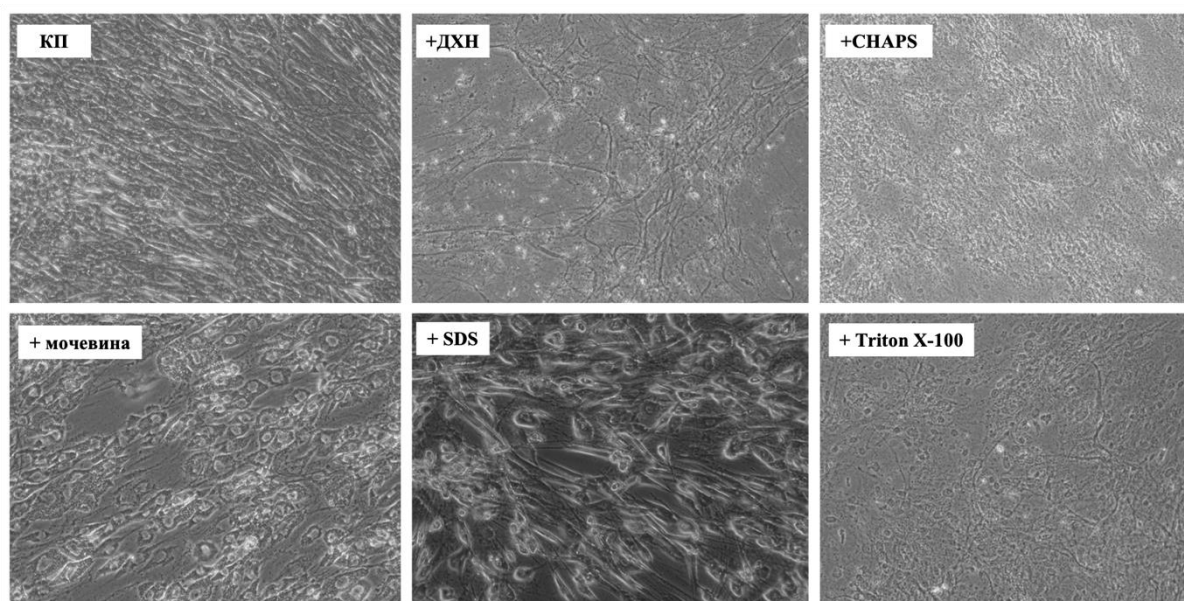


Рисунок 17 – Микрофотографии, иллюстрирующие действие различных веществ в ходе децеллюляризации клеточных пластов; фазово-контрастная микроскопия, ув. x100

Ход процесса децеллюляризации КП из МСК ЖТ приведен на рисунке 18, на примере использования ДХН в концентрации 0,5% хорошо видно градуальное уменьшение числа интактных ядер вплоть до полного их отсутствия. Остаточные гематоксилин-позитивные компоненты были расценены нами как ДНК, высвобожденная из ядер при их лизисе и связанная с компонентами дВКМ. Для оценки сохранности остаточных белков матрикса в составе децеллюляризованной конструкции и проверки этого предположения мы провели дополнительные гистологические исследования на поперечных срезах КП и полученных из них образцов дВКМ.

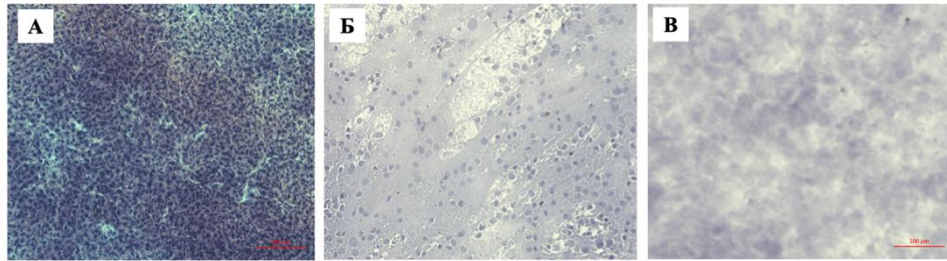


Рисунок 18 – Этапы децеллюляризации клеточных пластов в чашке на примере влияния 0,5% дезоксихолата натрия. Клеточный пласт до начала процедуры децеллюляризации (А), после децеллюляризации в течение 2 мин. (Б) и в течение 4 мин (В). Микроскопия в проходящем свете, окрашивание гематоксилином и эозином; ув. x100 (А) и x200 (Б, В)

С помощью антител к коллагену III и фибронектину нами была произведена иммунофлуоресцентная окраска поперечных срезов КП до и после децеллюляризации ДХН (рисунок 19). Было показано, что указанные компоненты ВКМ сохраняются в его составе после децеллюляризации, а также была выявлена остаточная ДНК. В особенности высокий уровень остаточной ДНК выявлялся в препаратах, полученных децеллюляризацией CHAPS, где распределение ДНК имело ретикулярную структуру, ассоциированную с границами бывших клеток. В препаратах, обработанных дезоксихолатом натрия, свечение было гораздо слабее и не имело какой-либо пространственной организации. В обработанных Тритон X-100 препаратах ожидаемо выявлялись компактные ядра разрушенных клеток.

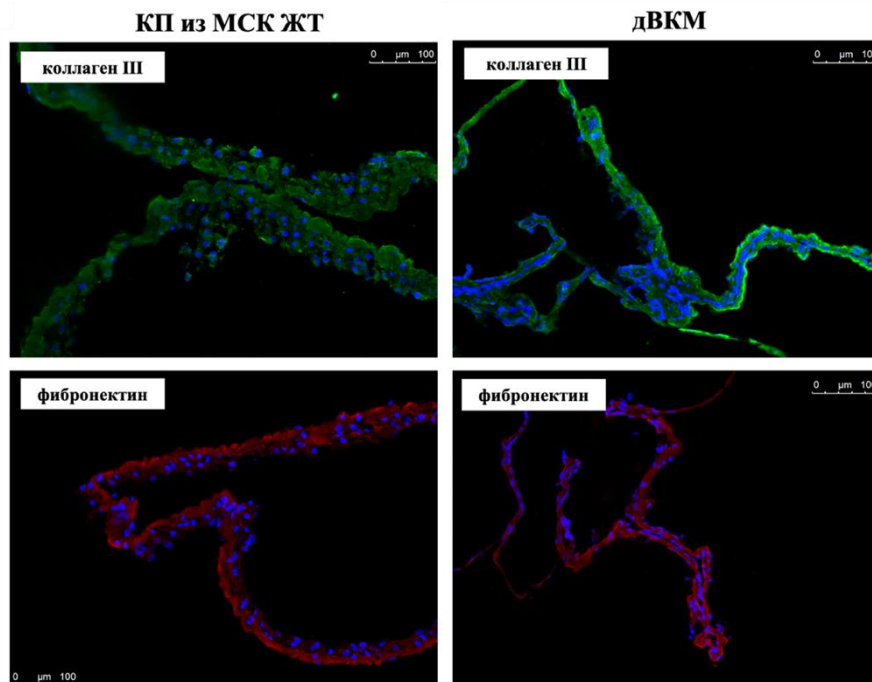


Рисунок 19 – Гистологическая характеристика клеточных пластов до и после децеллюляризации 0,5% дезоксихолатом натрия. В составе образца децеллюляризованного матрикса видны диффузные включения остаточной ДНК; ув. x200, ядра докрашены DAPI

Так как ДНК и хроматин могут быть триггерами неспецифических иммунных реакций и вызывать воспалительный ответ в ткани, то после децеллюляризации остаточную ДНК было желательно удалить из состава матрикса, не повреждая его, для чего использовали обработку ДНКазой I (рисунок 20).

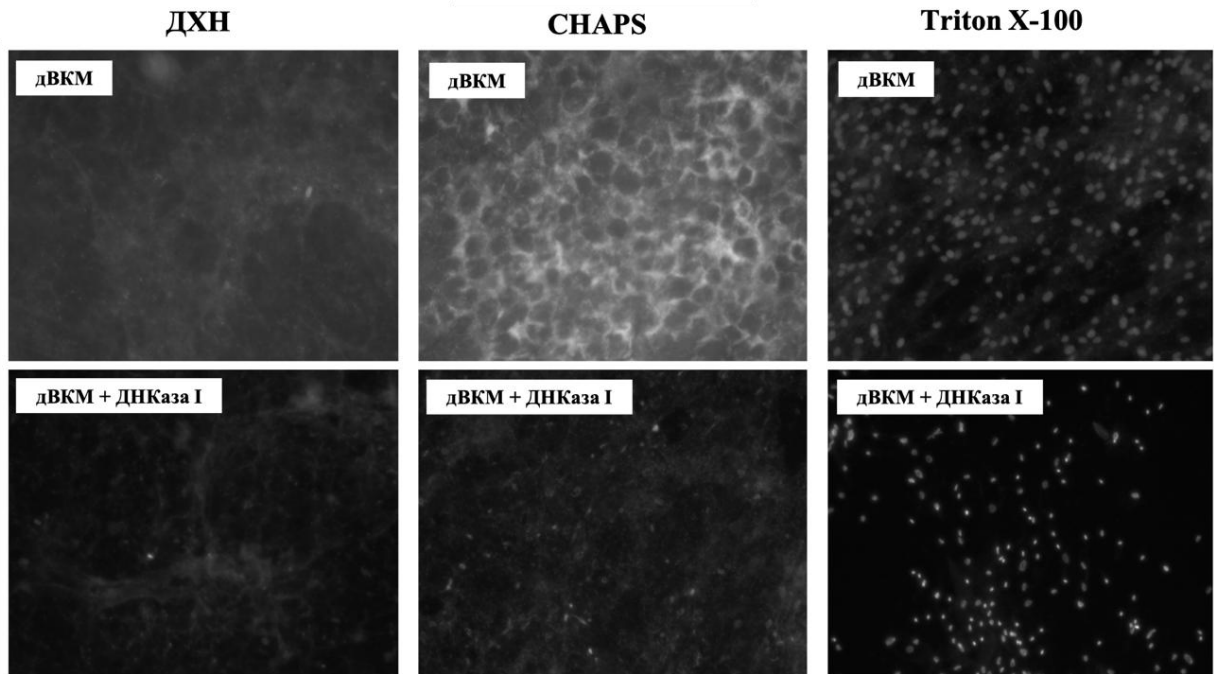


Рисунок 20 – Удаление остаточной ДНК из децеллюляризованных препаратов внеклеточного матрикса с помощью ДНКазы I. Верхний ряд – образец децеллюляризованного матрикса до обработки, нижний – после обработки. Внеклеточный матрикс был получен обработкой клеточных пластов дезоксихолатом натрия, CHAPS или Triton X-100; ув. x100, ДНК окрашена DAPI

Наличие остаточной ДНК при децеллюляризации является общеизвестной проблемой в этой области [54, 360]. Решая ее описанным выше методом, мы получили предварительные результаты о его эффективности после децеллюляризации с помощью ДХН и CHAPS, однако не оценили полноту удаления ДНК из дВКМ на лунках планшета. В дВКМ после децеллюляризации ДХН и CHAPS визуально были обнаружены минимальные включения DAPI, в связи с чем их можно рассматривать как перспективные вещества для обработки КП. При дальнейшем масштабировании методов получения дВКМ из КП потребуется отработка количественной оценки содержания остаточной ДНК в получаемых таким образом препаратах.

3.5 Оценка биологической активности секретома, продуцируемого мезенхимными стромальными клетками, в составе клеточных пластов

Основным механизмом влияния КП на процессы регенерации и заживления является паракринное действие секретома, продуцируемого МСК в их составе. С целью нормировки результатов мы поставили задачу оценки количества МСК в собранных КП. Возможность подсчета количества МСК в составе КП была осложнена высокой плотностью ВКМ и отсутствием возможности его ферментативного или иного разрушения без массивной гибели клеток в составе ТИК. Для учета различия количества МСК в КП и в плотном монослое нами использован метод нормировки на количество ДНК после лизиса соответствующей культуры. Для препаративной оценки и нормировки мы использовали коммерческий ДНК-связывающий краситель PicoGreen (Thermo Fisher Scientific, США). Для этого нами были проведены измерения содержания ДНК по сигналу PicoGreen в лизатах известного количества первичных МСК ЖТ (исходя из моноплоидного кариотипа с 1 ядро в каждой клетке). Полученный таким образом калибровочный график показал линейный характер зависимости сигнала от числа клеток. После этого, измерив содержание ДНК в лизатах КП, мы могли рассчитать количество клеток, соответствующее измеренным значениям сигнала PicoGreen. С помощью этого метода было, в частности, установлено, что количество МСК в КП приблизительно в 4 раза выше, чем в плотной монослойной культуре МСК эквивалентной площади.

Основой оценки миграции фибробластов дермы является создание в культурах стандартизованной «раны» монослоя, площадь которой уменьшается под действием факторов, активирующих подвижность клеток. Нами было показано, что под действием неразбавленного секретома МСК в составе КП (рисунок 21) площадь «раны» значительно уменьшается по сравнению с контрольным образцом среды ЕВМ.

Действие секретома монослоя МСК и секретома КП, разведенного на соотношение количества ДНК в КП и в монослое, также вызывали уменьшение площади «раны», однако между ними не было зафиксировано статистически значимых отличий.

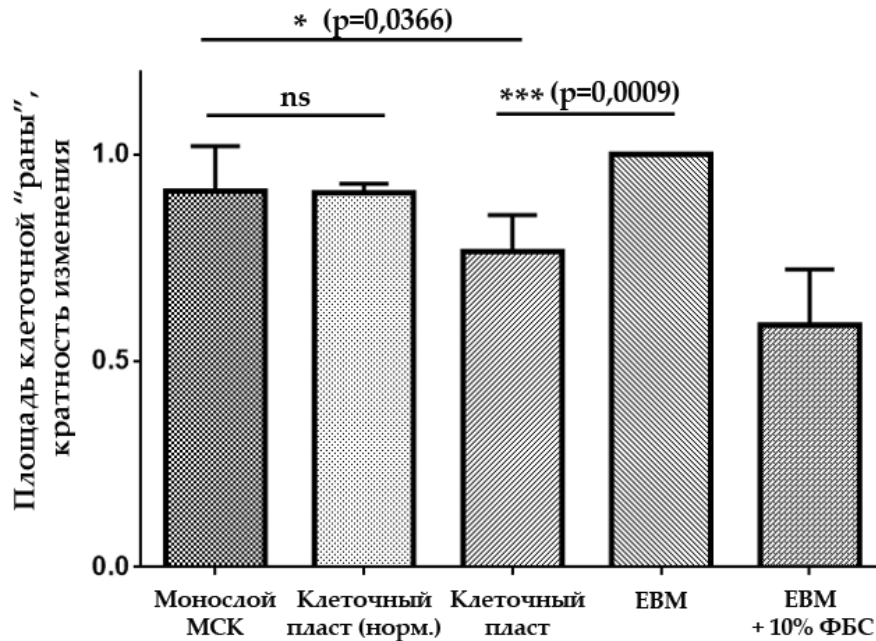


Рисунок 21 – Исследование миграции фибробластов кожи в *in vitro* в ответ на компоненты секрета мезенхимных стромальных клеток в составе монослоя или клеточных пластов. Представлено относительное изменение площади «раны» монослоя фибробластов кожи в сравнении с контрольным образцом среды ЕВМ (Lonza, Швейцария). Клеточный пласт (норм.) – образец секрета клеточных пластов после разведения по соотношению, полученному нормировкой на количество ДНК. Клеточный пласт – образец секрета клеточных пластов без разведения. Положительный контроль – среда ЕВМ/10% ФБС; ns – $p > 0,05$

Исследование на модели *tube assay*, которую используют для оценки ангиогенной активности, показало способность секрета МСК в составе КП стимулировать формирование капилляроподобных структур ЭК человека (HUVEC). Следует отметить, что активация ангиогенеза под действием секрета КП была более выраженной, чем после стимуляции образцами секрета монослоя МСК (рисунок 22). Нормированный образец секрета КП, разведенный по соотношению количества ДНК в КП и в монослое не превосходил образец секрета монослоя МСК и уступал неразведенному препарату секрета КП.

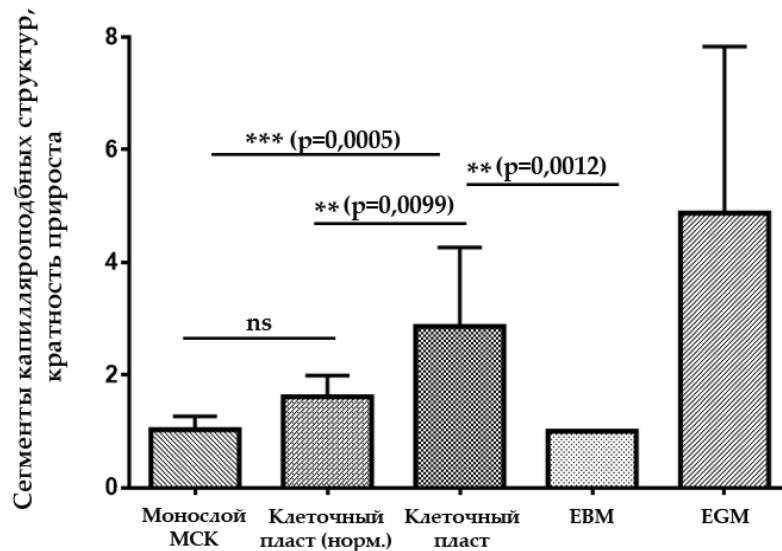


Рисунок 22 – Исследование ангиогенной активности секрета мезенхимных стромальных клеток в составе монослоя или клеточных пластов. Представлена кратность прироста количества капилляроподобных структур в сравнении с контрольным образцом среды ЕВМ (Lonza, Швейцария). Клеточный пласт (норм.) – образец секрета клеточных пластов после разведения по соотношению, полученному нормировкой на количество ДНК. Клеточный пласт – образец секрета клеточных пластов без разведения. Положительный контроль – среда роста эндотелия EGM/2% фетальной бычьей сыворотки с факторами роста (Lonza, Швейцария); ns – $p > 0,05$

На данном этапе на стандартных моделях *in vitro* нами была показана биологическая активность секрета МСК в составе КП. При этом секретом КП значительно превосходил образцы монослоя МСК как по способности активировать миграцию фибробластов кожи, так и по индукции ангиогенного ответа в культурах ЭК. Следует отметить, что при разбавлении секрета МСК до относительной концентрации, рассчитанной по нормировочному соотношению, данный эффект нивелировался до уровня секрета монослойной культуры МСК.

3.6 Получение клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток жировой ткани животных

Перед проведением дальнейших экспериментов мы отработали методы формирования КП из МСК ЖТ мыши и крысы, которые в дальнейшем были использованы в опытах *in vivo*. Эксперименты с различной плотностью стартовой культуры первичных МСК ЖТ проводили на 6- и 12-луночных планшетах. Мы показали, плотность стартовой культуры в 50 тыс. клеток/см² для МСК ЖТ крысы или 80 тыс. клеток/см² для МСК ЖТ мыши позволяет уже к 7-му дню получить снимаемые с культурального пластика и манипулируемые ТИК (рисунок 23).

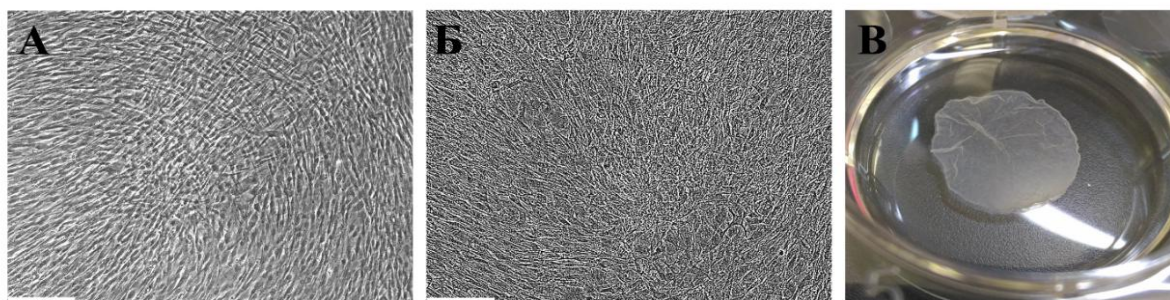


Рисунок 23 – Морфология мезенхимных стромальных клеток жировой ткани человека (А) и крысы (Б) в составе клеточного пласта и макрофотография клеточного пласта из мезенхимных стромальных клеток жировой ткани мыши (В) непосредственно после открепления от поверхности 6-луночного планшета; А и Б: фазово-контрастная микроскопия; масштабный отрезок 200 мкм; ув. x100

В разработанных протоколах (представлены в сжатом виде в таблице 4) необходимым условием успешного и быстрого формирования КП было добавление к соответствующей среде роста L-аскорбиновой кислоты в концентрации 50 мкг/мл

. Отличия в стартовой плотности культуры связаны с тем, что МСК ЖТ мыши несколько меньше, чем полученные от крысы и человека, однако это не сказывалось на механических свойствах и сроках культивирования до получения готовых КП.

Таблица 4 – Основные параметры разработанных протоколов получения клеточных пластов из первичных мезенхимных стромальных клеток жировой ткани животных

№	Параметр	Значение или описание	
		Мышь C57/Bl6 (самцы 10-12 нед.)	Крыса Wistar (самцы, 300 -350 г)
1	Пассаж мезенхимных стромальных клеток жировой ткани человека	5-6	4-5
2	Плотность культуры при высадке	80,0 тыс. клеток/см ²	50,0 тыс. клеток/см ²
3	Среда культивирования	Среда DMEM (1,0 г/л глюкозы)/10% ФБС с добавлением 50 мкг/мл L-аскорбиновой к-ты	
4	Периодичность замены среды	1 раз в 72 ч	
5	Ожидаемый срок сборки тканеинженерной конструкции	Не менее 7 суток	
6	Способ открепления клеточного пласта от культуральной посуды	Отмывка стерильным р-ром Версена и инкубация в холодном р-ре Версена в течение 4-5 минут с последующим механическим снятием	

Таким образом, нами были получены животные аналоги пластов из МСК ЖТ человека, что позволило перейти к исследованию специфической регенераторной активности конструкций на соответствующих животных моделях.

ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ КЛЕТОЧНЫХ ПЛАСТОВ ДЛЯ ЗАЖИВЛЕНИЯ ДЕФЕКТОВ МЯГКИХ ТКАНЕЙ

4.1 Оценка эффективности клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток на модели глубокой раны кожи с дефицитом мягких тканей у крысы

4.1.1 Обоснование актуальности разработки и выбор модели

При острых ранах с объемной потерей мягких тканей ключевой задачей с точки зрения сохранения функции и эстетической составляющей является ускоренное заживление с минимальным фиброзированием. Для решения этой проблемы не существует широко внедренных методов клеточной терапии, хотя экспериментальные работы (в т.ч. отечественных групп) убедительно свидетельствуют о перспективности такого подхода. В РФ ежегодно хирургическая помощь различного объема оказывается 400 тыс. пациентам с повреждениями кожных покровов.

Клеточная терапия с использованием МСК продемонстрировала способность увеличивать васкуляризацию раневого слоя и ускорять заживление на моделях ожогов и кожных ран у животных [363], однако при этом остается актуальной проблема выживаемости трансплантированных клеток, которая может быть решена трансплантацией КП. Несмотря на кажущуюся очевидность такого использования КП из МСК, исследования в этой области часто используют модели с недостаточно глубоким или поверхностным раневым дефектом. Из-за высокой способности кожи грызунов к регенерации результаты таких работ не всегда могут быть адекватно экстраполированы на соответствующую клиническую ситуацию.

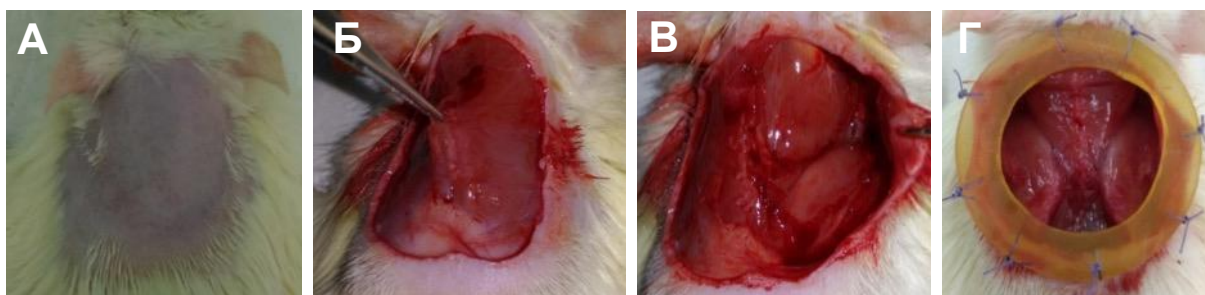


Рисунок 24 – Создание шинированной кожной раны крысы с дефицитом мягких тканей. Наркотизированное животное после сбривания шерсти на холке перед операцией (А) по иссечению кожно-фасциальный лоскута; пинцетом захвачены мягкие ткани, подлежащие удалению (Б). То же после иссечения трапецевидных мышц спины с одной стороны (В) и сформированный дефект (Г) с латексным кольцом, к которому подшиты края раны

Этапы создания шинированного дефекта кожи и подлежащих мягких тканей крысы представлены выше (рисунок 24). Исходя из описанных выше предпосылок, мы остановили свой выбор на модели глубокой раны кожи с дефицитом подлежащих мягких тканей. Глубокое повреждение с вовлечением подкожной клетчатки и скелетных мышц воспроизводит клинически неблагоприятную ситуацию с дефицитом тканей, при которой оправдано использование методов ТИ. Шинирование краев раны к латексному кольцу позволяет замедлить активное сближение краев раны, характерное для грызунов, а установленный нами срок спонтанного заживления дефекта при данном способе моделирования составлял не менее 40-50 дней. За счет этого также удалось добиться максимально наглядной и эффективной оценки динамики закрытия раны в ходе ее заживления.

4.1.2 Трансплантация клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток ускоряет закрытие глубокого раневого дефекта кожи

После моделирования глубокой раны с дефицитом мягких тканей животных распределили в следующие группы: «Контроль» (без лечения), «Суспензия МСК» (инъекции суспензии МСК ЖТ в края и дно дефекта) и «Клеточный пласт» (трансплантация 1 КП из МСК на поверхность раны).

На основании оценки количества МСК в составе КП *in vitro* животным в соответствующих группах были трансплантированы сопоставимые дозы МСК: 1,5 млн. МСК в виде гомогенной суспензии или КП площадью 9,4 см². При проведении операции, а также в течение всего срока наблюдения погибших животных в группах опыта не было.

На 7-ые сутки после моделирования дефекта (по истечении периода гемостаза, разрешения первичного отека и воспаления) в фазу активного роста грануляций животным трансплантировали МСК ЖТ в виде суспензии (1,5 млн.) или в виде КП с сопоставимым количеством МСК. В послеоперационном периоде все животные удовлетворительно перенесли трансплантацию МСК. В указанных временных точках (рисунок 25) из области заживающего дефекта забирали образцы ткани для последующего гистологического анализа с окрашиванием гематоксилином и эозином и по Ван Гизону. Наблюдение за животными и обработка полученных макрофотографий с оценкой площади дефекта продолжалось в течение 49 суток. Статистический анализ показал, что трансплантация на поверхность шинированного дефекта КП из МСК резко сокращала срок его полного закрытия по сравнению с контрольной группой. Действительно, в группе клеточных пластов из МСК площадь дефекта к 14-ым суткам составила 1,9±0,7 см² против 5,3±0,2 см² в группе нелеченого отрицательного контроля (p<0,05). В суспендированном виде введение 1,5 млн. МСК также оказало выраженный эффект,

заключившийся в уменьшении к 14 суткам площади дефекта (до $3,4 \pm 1,3 \text{ см}^2$), однако это отличие не достигало статистической значимости по сравнению с прочими группами эксперимента.

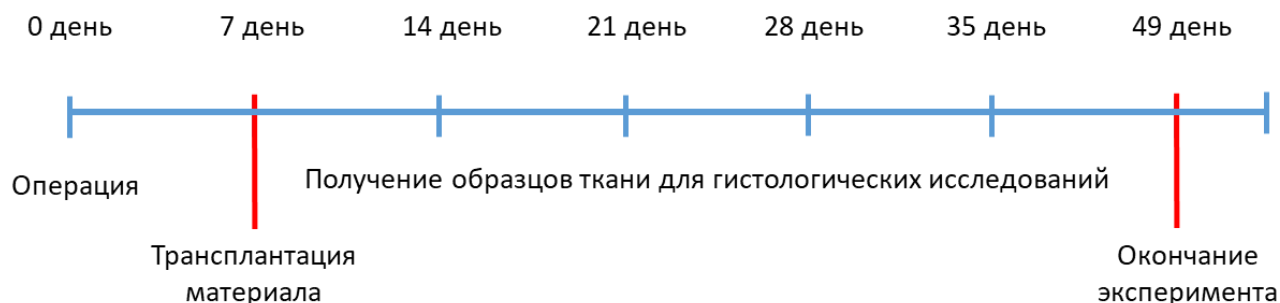


Рисунок 25 – Схема эксперимента по оценке эффективности мезенхимных стромальных клеток жировой ткани в виде суспензии или в составе клеточных пластов на модели глубокой раны кожи с дефицитом мягких тканей

Вторым ключевым параметром эффективности являлся срок (в днях), по истечении которого происходило полное закрытие шинированного дефекта. За критерий полного закрытия принималось уменьшение площади дефекта на макрофотографии $<10\%$ от исходной с учетом стандартного размера моделируемых повреждений.

После трансплантации КП медиана срока полного закрытия дефекта равнялась 28 суткам, а в группе введения эквивалентной дозы МСК в виде суспензии – 35 суткам. При этом в группе нелеченого отрицательного контроля медиана срока полного закрытия раневого дефекта составила 49 суток. Кроме того, после трансплантации КП из МСК к обозначенному выше сроку (28 суток) произошло полное закрытие дефекта у всех животных (100%) при том, что в тот же срок в группе отрицательного контроля этот показатель составил лишь 20%. В конечной точке эксперимента (на 49-ый день) в группе нелеченого контроля еще оставались животные с незакрывшимися дефектами, что отражает глубину и тяжесть повреждения, которое создавалось в использованной нами животной модели (рисунок 26).

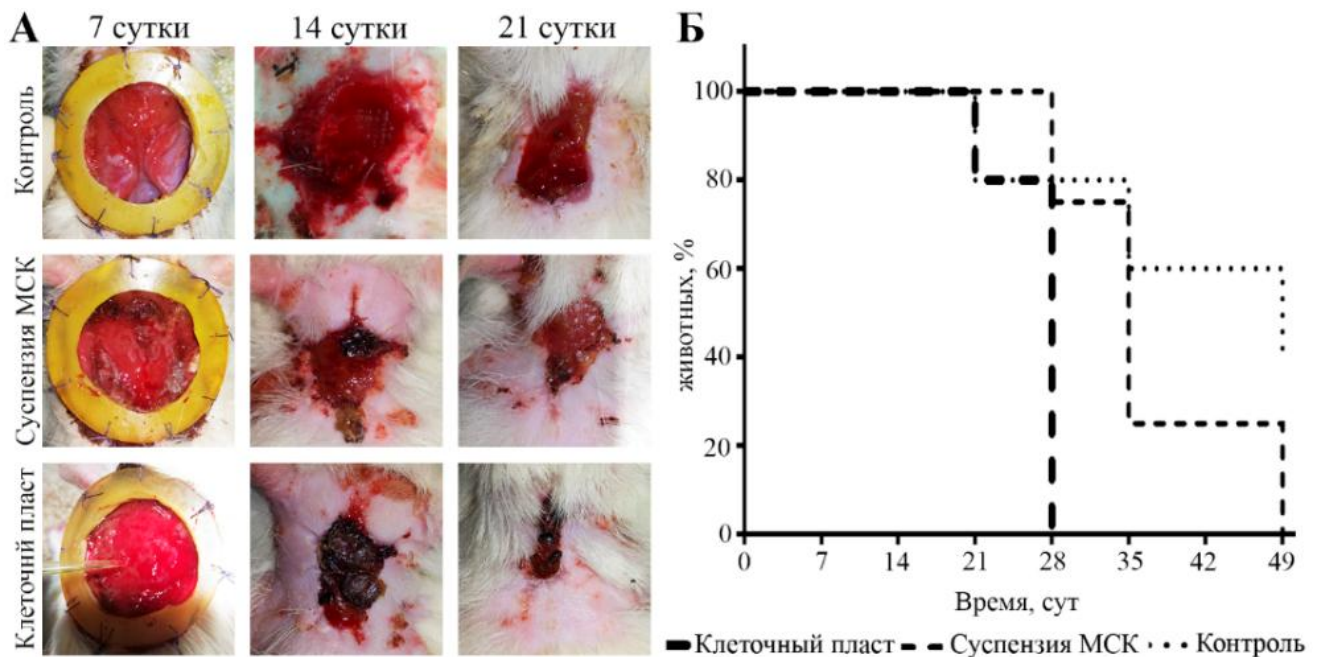


Рисунок 26 – Макроскопическая оценка динамики заживления в группах исследования (А) и кривая Каплана-Майера (Б), иллюстрирующая достижение полного закрытия дефекта. При сравнении динамики в парах групп «Клеточный пласт» - «Контроль» и «Клеточный пласт» - «Суспензия мезенхимных стромальных клеток» достигнута статистическая значимость ($p < 0,05$)

В целом, на данном этапе было продемонстрировано, что трансплантация КП из МСК вызывала быструю контракцию краев дефекта, которая приводила к их сближению и уменьшению его площади. Кроме того, контракция раны приводила к спонтанному удалению шинирующего края раны кольца. Значительное сокращение периода полного заживления дефектов также является важным критерием эффективности созданного метода, который показал свое явное превосходство над введением эквивалентной дозы МСК в виде суспензии, являющимся стандартным методом клеточной терапии.

4.1.3 Оценка удержания мезенхимных стромальных клеток, трансплантированных в зону раневого дефекта в виде суспензии или в составе пласта

Одним из основных преимуществ использования КП как средства доставки является выраженное увеличение выживаемости клеток, объединенных в составе конструкции белками ВКМ. Исходя из этого, мы оценили сохранность доставленного клеточного материала гистологически. Для этого суспендированные МСК или собранные из них КП подвергались мечению с помощью прижизненного красителя РКН26 перед инъекцией в толщу дефекта или трансплантацией на его поверхность соответственно.

На препаратах тканей, забранных через 14 дней после трансплантации МСК, мы обнаружили меченые РКН26 МСК, причем введенные как в форме суспензии, так и в виде

пласта (рисунок 27). При этом на 21 день в группе введения суспензии МСК сигнала РКН26 обнаружено не было. Это соотносится с представлениями о том, что элиминация клеток после инъекционного введения происходит в течение первых 12-14 дней.

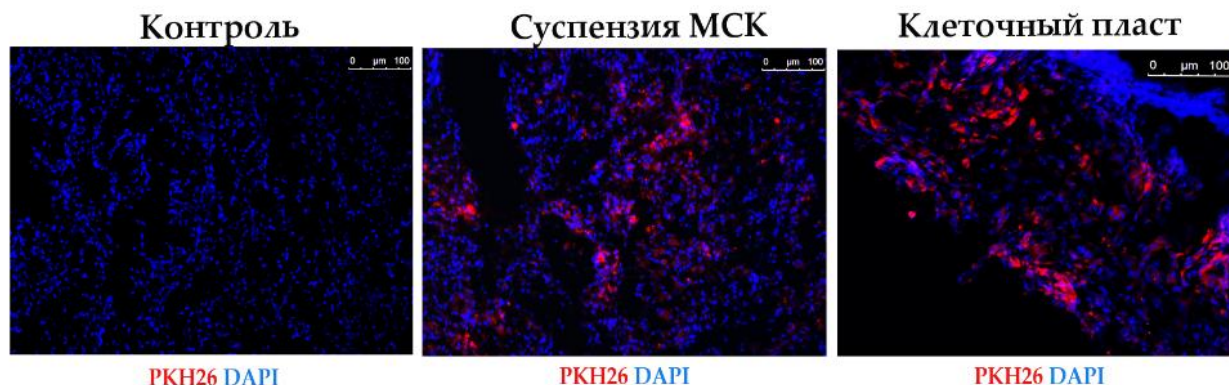


Рисунок 27 – Визуализация удержания трансплантированных мезенхимных стромальных клеток жировой ткани (РКН26, красный) в толще дна и стенок заживающей глубокой раны кожи (14 день); ядра помечены DAPI; масштабный отрезок соответствует 100 мкм

В противовес этому в группе трансплантации КП на срезах удалось визуализировать специфичный сигнал РКН26, наиболее вероятным источником которого являются выжившие или интегрировавшиеся МСК, доставленные в составе ТИК.

Таким образом, структура и состав созданной нами ТИК смогли обеспечить выживаемость трансплантированных МСК. Это позволяет с высокой долей уверенности утверждать, что наиболее вероятной причиной описанных выше регенераторных эффектов и отличий между группами является присутствие в зоне заживления мягких тканей жизнеспособных и функционально активных МСК.

4.1.4 Трансплантация мезенхимных стромальных клеток стимулирует созревание грануляционной ткани и ускоряет формирование рубца на месте раневого дефекта кожи

Сокращение площади дефекта и сроков заживления по нашему предположению могло сопровождаться изменением динамики созревания ГТ и дальнейшего формирования рубца. Образование рубца, хотя и рассматривается как негативный с медицинской точки зрения исход заживления, является необходимым для сохранения целостности и возобновления барьерной функции кожи. Кроме того, плохо заживающие дефекты мягких тканей, встречающиеся в хирургической практике, часто обусловлены нарушением или замедлением формирования

грануляций. Принимая во внимание, что ГТ рассматривают в качестве временной основы для дальнейшего роста формирующей рубец СТ, мы провели гистологический анализ ее состояния в области заживающих дефектов.

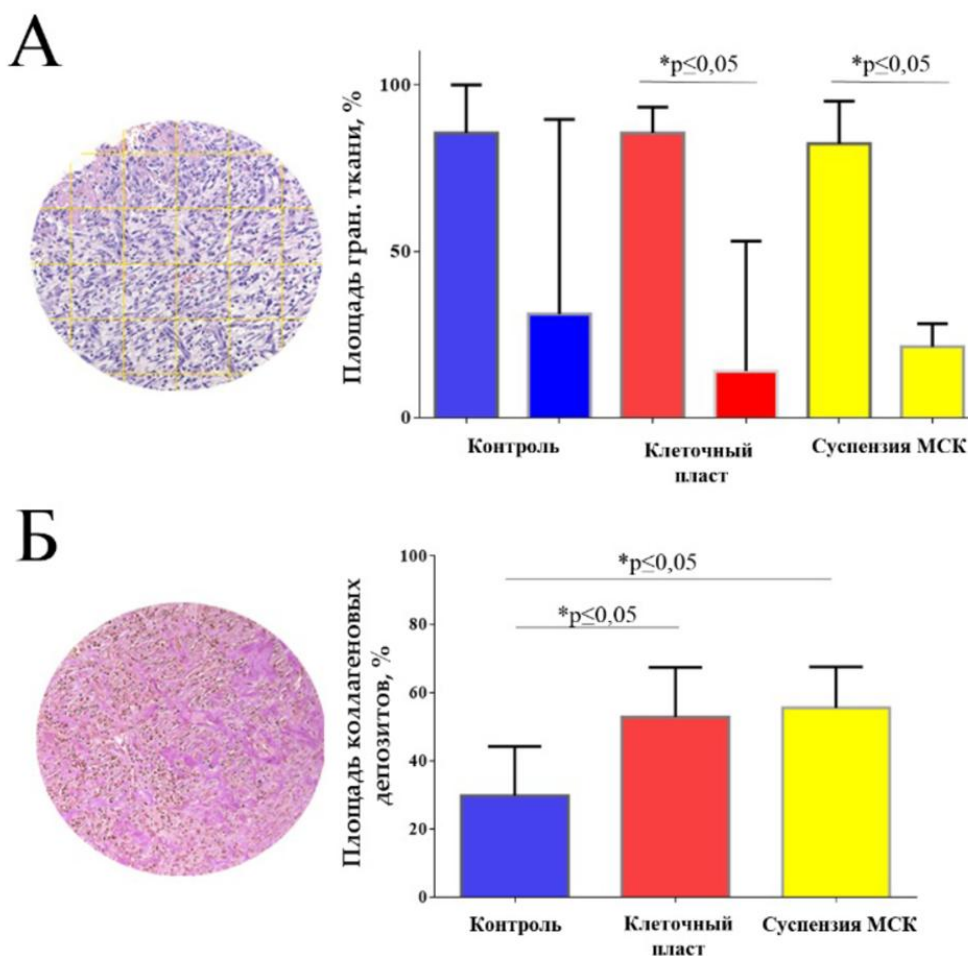


Рисунок 28 – Морфометрическая оценка репаративных процессов после трансплантации мезенхимных стромальных клеток в виде клеточных пластов или суспензии животным с глубокой раной кожи. Приведена оценка относительной площади грануляционной ткани (А) на 14 и 21 дни (окрашивание гематоксилином и эозином, ув. $\times 100$) и относительной площади отложений коллагена (Б) на 21 день (окрашивание по Ван Гизону, ув. $\times 100$); показатели рассчитаны как % от площади среза

Морфометрический анализ окрашенных гематоксилином и эозином срезов наглядно продемонстрировал, что введение суспензии МСК и трансплантация КП приводили к значимому уменьшению занимаемой ГТ площади на временном отрезке 14 – 21 день. Эти изменения указывают на ее созревание и ремоделирование, которое сопровождается апоптозом миофибробластов, депонированием коллагена и лежит в основе рубцевания. На срезах препаратов от животных из группы отрицательного контроля на 21 день было обнаружено уменьшение площади, занимаемой ГТ, однако при сравнении с 14 днем в той же группе оно не достигало статистической значимости (рисунок 28, А).

Как было сказано выше, созревание и ремоделирование ГТ сопровождаются активным синтезом стромальными клетками и миофибробластами коллагенов, а их сшивка и депонирование в конечном счете приводят к вытеснению иных тканевых элементов (клеток иммунной системы, ЭК и самих стромальных клеток) с образованием рубца. Визуализация окрашиванием по Ван Гизону с последующей морфометрией на 14 и 21 дни выявили в группах инъекции суспензии МСК и трансплантации КП значимое увеличение площади волокон коллагена по сравнению с отрицательным контролем (рисунок 28, Б).

Нами был сделан вывод о том, что оба способа трансплантации МСК вызывают изменение макроскопической картины заживления дефекта с быстрым переходом от стадии образования ГТ к ее регрессу и ремоделированию, лежащему в основе образования рубца. Такой исход, хотя и не является полноценной регенерацией, все же остается благоприятным с точки зрения восстановления целостности ткани. Закрытие раны с формированием рубца блокирует входные ворота для инфекций и уменьшает болевые ощущения, связанные с незаживающими дефектами мягких тканей.

В целом, полученные данные позволили сформулировать вывод о том, что МСК в составе КП и после инъекционного введения ускоряют необходимые для ранозаживления и образования рубца процессы ремоделирования ГТ. При этом было показано длительное удержание в зоне трансплантации МСК, трансплантированных в виде КП по сравнению с введением суспензии (21 день против 14 соответственно). Ускорение макроскопической динамики и сокращение сроков заживления можно связать с увеличением количества миофибробластов, чей актиновый цитоскелет необходим для контракции краев раны. Кроме того, именно миофибробласты являются основными продуцентами коллагенов, формирующих основу рубца и увеличение их депонирования, которое было показано при морфометрии, также может говорить в пользу их вклада в ускорение ранозаживления. Наиболее вероятным механизмом действия МСК при обоих способах доставки остается паракринное действие, а умеренное преимущество КП может объясняться наличием в их составе белков ВКМ, отсутствующих при введении суспензии, а также более активной продукцией цитокинов и факторов роста. Данное предположение подкрепляется также результатами, полученными в *in vitro* тестах функциональной активности, в которых секретом КП из МСК обладал выраженным воздействием на важные для заживления процессы миграции стромальных клеток и ангиогенеза.

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

4.2.1 Обоснование актуальности разработки и выбор модели

Формирование декубитальных язв, или пролежней, особенно часто происходит у пациентов малой или ограниченной подвижности, причем во всех возрастных группах. В мировой практике встречаемость пролежней у эти группах колеблется от 3 до 20%, а в РФ частота развития составляет от 3% до 40%. При некоторых нозологиях (например, у больных со спинальной травмой) она достигает 70-80%. Пролежневые дефекты не только доставляют страдания пациентам и ложатся в виде нагрузки на хирургическое звено медицинской помощи, но и являются входными воротами инфекций. При генерализации последних у ослабленных пациентов летальность осложнений достигает 70% даже при современном уровне антибиотикотерапии, а ежегодные затраты на паллиативную и хирургическую помощь достигают 1 млрд. рублей. При этом высокоэффективных методов заживления декубитальных дефектов в настоящее время не существует, а при ауто трансплантациях или пересадке трупной кожи частым осложнением остается образование объемных или ограничивающих движения рубцовых дефектов кожи.

Причиной пролежней, относящихся к особому типу дефектов мягких тканей, является травмирование длительным сдавлением. Их отличительной чертой является хроническое течение с длительным персистированием дефекта, заживление которого затруднено постоянными механическими воздействиями и влажностью. В отличие от острых ран, возникающих при механическом воздействии, в патогенезе пролежней важную роль играют циклы ишемии тканей и реперфузии, которые сопровождаются также нарушениями локальной иннервации, которые дополнительно ухудшают трофику тканей.

Многочисленные работы, в т.ч. наши собственные [121, 327], указывают на способность МСК оказывать проангиогенное и протективное действие при ишемических состояниях за счет входящих в состав секретом ангиогенных и противовоспалительных факторов. Исходя из этого, а также опираясь на наши данные по оценке биологической активности секрета КП (см. раздел 3.5), который эффективно индуцировал миграцию фибробластов и ангиогенез, мы предложили использование трансплантации КП из МСК для стимуляции заживления пролежней кожи.

Представленное далее исследование эффективности КП из МСК ЖТ или их суспензии проведено на модели, имитирующей по объему и глубине поражения пролежневый дефект 2-3

стадии с выраженным некрозом подкожной жировой клетчатки и подлежащих скелетных мышц. С учетом убедительных данных о регенераторном потенциале секретома МСК мы ввели в эксперимент дополнительную группу сравнения с введением кондиционированной среды МСК ЖТ, содержащей их секретом.

4.2.2 Трансплантация клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток ускоряет заживление пролежневого дефекта и завершается полноценной регенерацией кожи

Трансплантацию МСК в виде суспензии или в форме КП и инъекции секретома МСК осуществляли под ингаляционным наркозом, после чего животные были разделены на следующие группы (по 12-16 животных 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 инъекций равного объема на один дефект), «Секретом МСК» (введение 150 мкл кондиционированной среды МСК, содержащей секретом данного типа клеток в края и дно пролежня, 4-5 инъекций равного объема на один дефект) и «Клеточный пласт» (трансплантация одного КП из МСК на поверхность каждого сформированного дефекта). На рисунке 29 представлена схема описанного эксперимента.

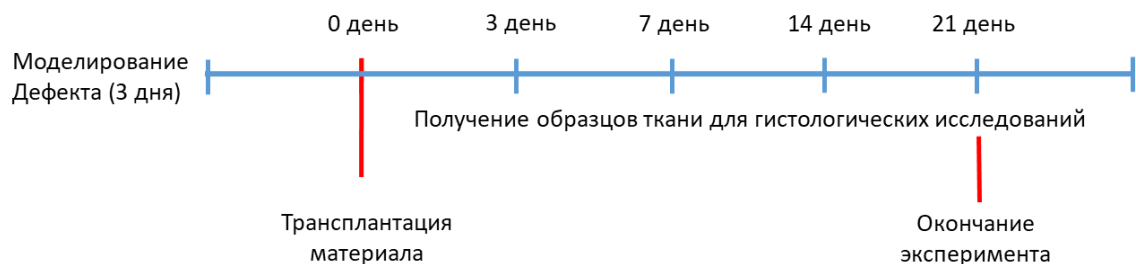


Рисунок 29 – Схема эксперимента по оценке эффективности мезенхимных стромальных клеток жировой ткани в виде суспензии, в составе КП, а также их секретома на модели пролежневого дефекта кожи

На 3 день после моделирования пролежня мы провели стандартную гистологическую оценку сформированного дефекта (рисунок 30), которая подтвердила глубокое вовлечение дермы, подкожной клетчатки и мышечного слоя, а также формирование ГТ в области пролежня.

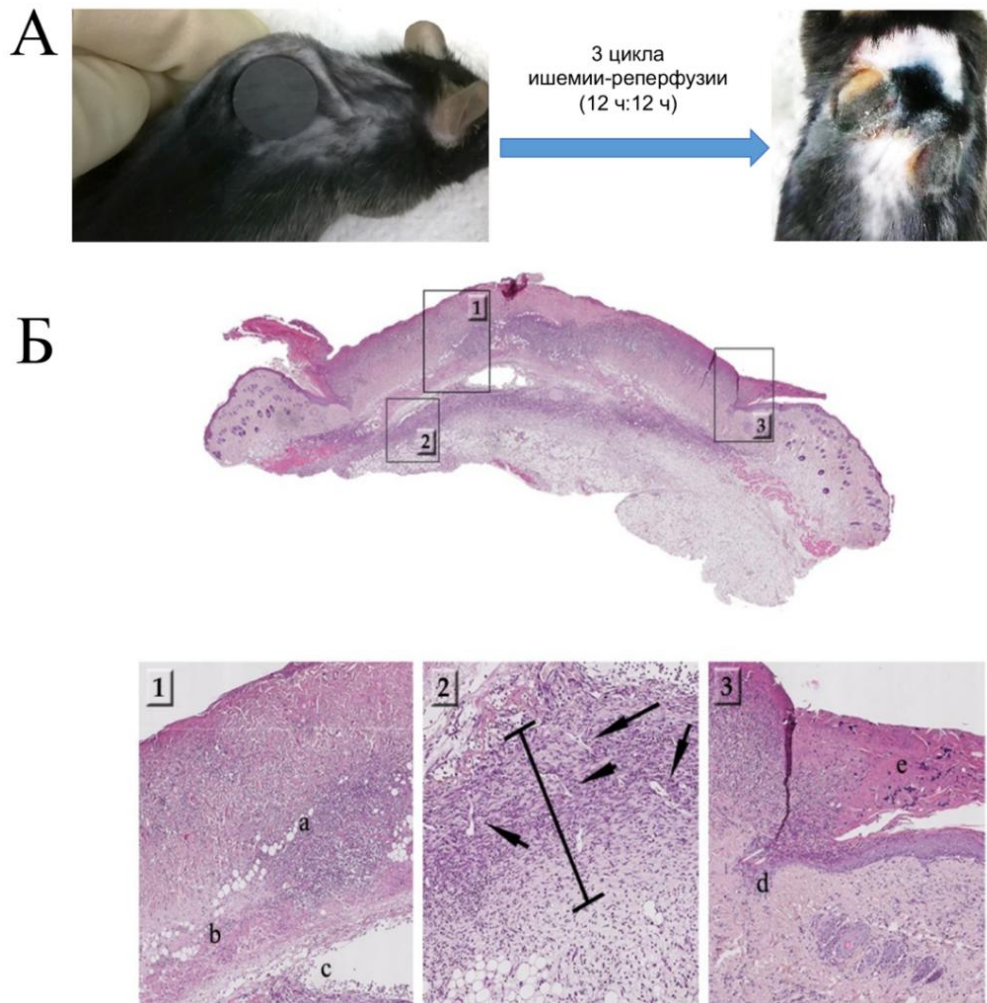


Рисунок 30 – Ход моделирования пролежневого дефекта с помощью магнитов (А) и гистологическая характеристика тканей в зоне пролежневого дефекта кожи на 3 день после его формирования (Б)

(1) – область повреждения ткани до (а) мышечного слоя с выраженной клеточной инфильтрацией (b) и отеком тканей (с)

(2) – область формирующейся ГТ и масштабная линия, соответствующая ее толщине с кровеносными сосудами, отмеченными стрелками

(3) – поверхность дефекта, на которой можно выделить слой мигрирующего эпителия (d) и сформированный струп, покрывающий дефект (e).

Окрашивание гематоксилином и эозином, масштабный отрезок 50 мкм.

При оценке динамики заживления пролежня и уменьшения его площади (рисунок 31) оказалось, что после трансплантации КП из МСК ЖТ к 21 дню происходило полное закрытие дефекта. При этом у большинства (3 из 4) животных в этой группе не удалось обнаружить на коже видимых рубцовых изменений и наблюдалось формирование плотного волосяного покрова. Такого рода исход к 21 дню был зафиксирован только в группе КП из МСК, в прочих группах отмечались признаки незавершенного заживления или формирования рубца на месте дефекта.

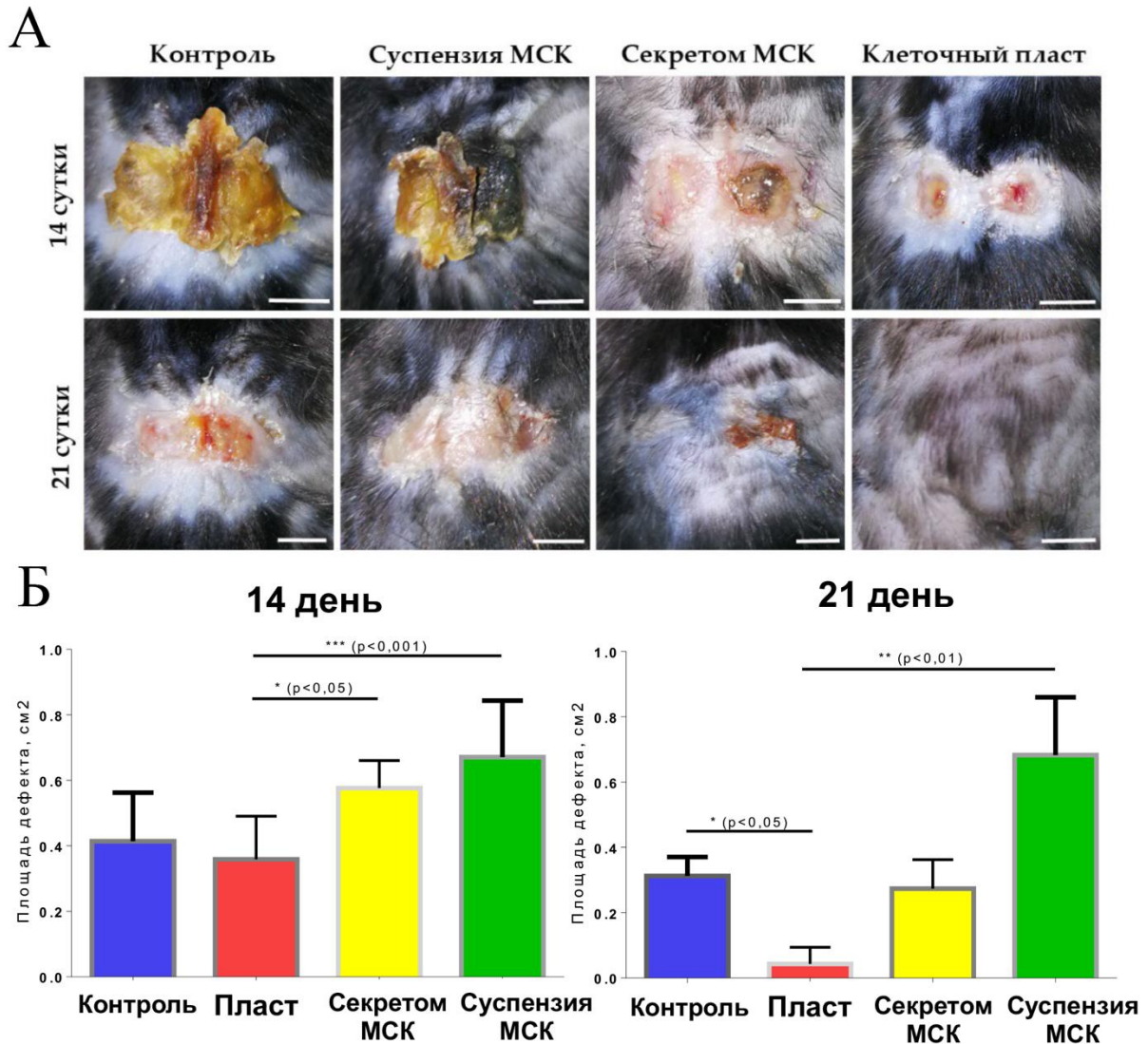


Рисунок 31 - Макроскопическая оценка закрытия пролежневого дефекта в экспериментальных группах. Фотографии зоны пролежня у животных из групп исследования (А), на которых обращает на себя внимание полное закрытие дефекта с отсутствием рубцов кожи на 21 день эксперимента в группе «Клеточный пласт». На графиках (Б) приведена количественная оценка площади пролежня в группах исследования на 14 и 21 день; масштабный отрезок соответствует 5 мм

Гистологическая оценка препаратов тканей, полученных на 14 день, показала полную эпителизацию пролежней во всех экспериментальных группах. Отличительной чертой группы КП стало активное созревание ГТ (рисунок 32), напоминавшее картину после аппликации КП из МСК на поверхность глубокой раны кожи у крысы (рисунок 28). На 21 день гистологическая картина, в целом, соответствовала типичному описанию поздних стадий заживления кожной раны с признаками формирования рубца различного объема и степени зрелости.

Примечательным было наблюдение, сделанное в группе животных, которым был трансплантирован КП: гистологическое исследование подтвердило полное заживление дефекта, совпадавшее с макроскопической картиной (рисунок 32). Важным гистологическим критерием

регенерации после трансплантации КП из МСК было обнаружение в толще дермы на месте пролежня железистых структур и волосяных фолликулов. Такого рода исход был зафиксирован только на препаратах кожи от животных, которым были трансплантированы КП, хотя следует отметить, что даже в этой группе к 21 дню не произошло полного восстановления подкожного жира и скелетных мышц (рисунок 32, А).

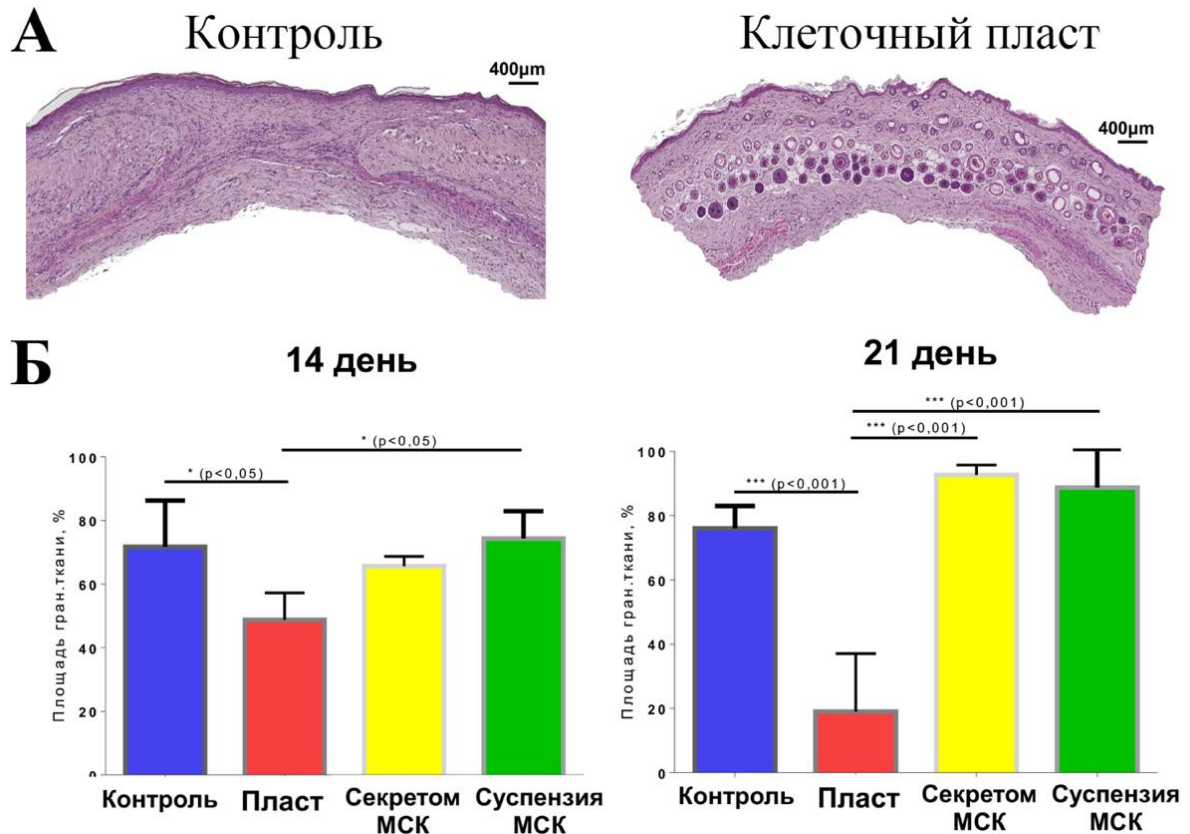


Рисунок 32 – Гистологическая оценка площади и ремоделирования грануляционной ткани в области пролежневого дефекта у животных из группы исследования. Гистологические препараты заживающего пролежневого дефекта на 21 день эксперимента (А): в группе контроля продолжается процесс ремоделирования грануляционной ткани и образования рубца; в образце из группы клеточных пластов визуализируется восстановление структуры дермы на месте дефекта, в качестве ориентира использовались невосстановившиеся подкожные мышцы. На графиках (Б) приведена количественная оценка площади грануляционной ткани на 14 и 21 дни

Ремоделирование ГТ сопровождается активным депонированием белков ВКМ, для визуализации которых использовали окрашивание по Массону (рисунок 33). При гистологическом и морфометрическом анализе полученных препаратов было показано, что на 14 день в группе КП происходит рост депонирования коллагена при снижении площади, занимаемой самой ГТ относительно площади среза.

Наше внимание также обратили на себя образцы кожи из группы трансплантации КП, в которой на 21 день было отмечено выраженное окрашивание анилиновым синим, что

указывало на большой объем сформированной СТ. Данную находку с учетом обнаружения нормально сформированных и расположенных придатков кожи мы расценили как признак восстановления дермы с характерной для нее укладкой компонентов ВКМ, окрашивающихся анилиновым синим.

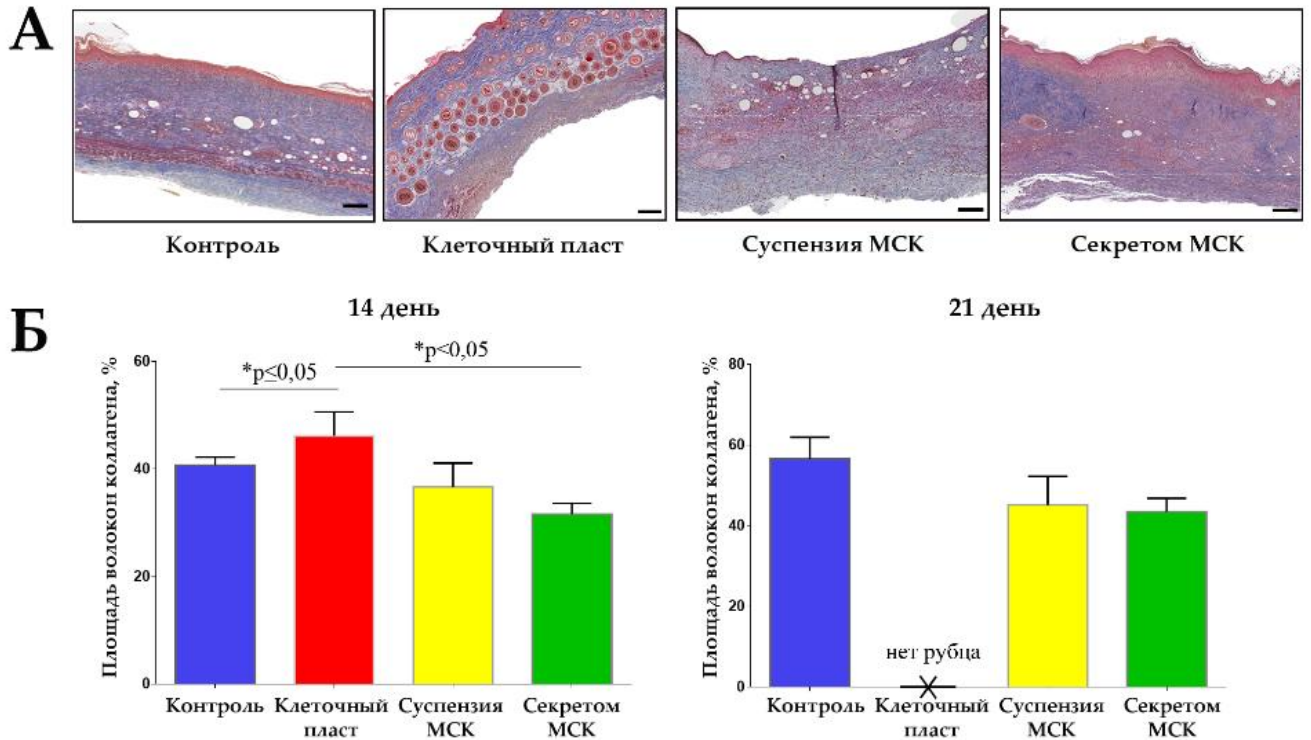


Рисунок 33 – Гистологическое исследование с визуализацией соединительной ткани в области пролежневого дефекта. Микрофотографии поперечных срезов из области заживающего пролежня на 21 день эксперимента (А). На графиках (Б) приведена количественная оценка площади волокон коллагена на поперечных срезах кожи в 21 день; окрашивание по Массону; масштабный отрезок 200 мкм

Мы также оценили возможность спонтанного полного восстановления кожи при данном способе моделирования пролежня, однако без лечения оно оказалось невозможным даже при длительном содержании животных. На 35 день у животных из контрольной группы заживление завершалось формированием визуально определяемых рубцов, гистологический анализ которых подтвердил типичную для фиброза кожи морфологию. гистологической картиной. Таким образом, трансплантация КП из МСК ускоряла процесс ранозаживления и приводила к изменению исхода процесса – вместо типичного для глубокого повреждения фиброза наблюдалось полноценное восстановление структуры кожи, которое было подтверждено гистологически.

4.2.3 Трансплантация клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток стимулирует рост грануляционной ткани на ранних сроках заживления пролежня

Результаты оценки скорости заживления пролежневого дефекта и гистологическая характеристика особенностей течения процесса указали на выраженные изменения хода роста и ремоделирования ГТ после трансплантации КП из МСК. С учетом важности пролиферативных процессов как для заживления, так и для формирования рубца, мы провели ряд дополнительных исследований на ранних (3 и 7 дней) временных точках. Мы использовали толщину ГТ как ключевой показатель в исследованиях на 3 день (рисунок 34, А) и обнаружили статистически значимое увеличение толщины ГТ по сравнению с контрольной группой только у животных, которым на поверхность пролежня трансплантировали КП. У них данный показатель был приблизительно в 1,5 раза выше по сравнению с нелеченым контролем. На 7 день это отличие становилось еще более выраженным, толщина ГТ достигала максимальных значений среди всех исследования именно в группе КП (рисунок 34, Б).

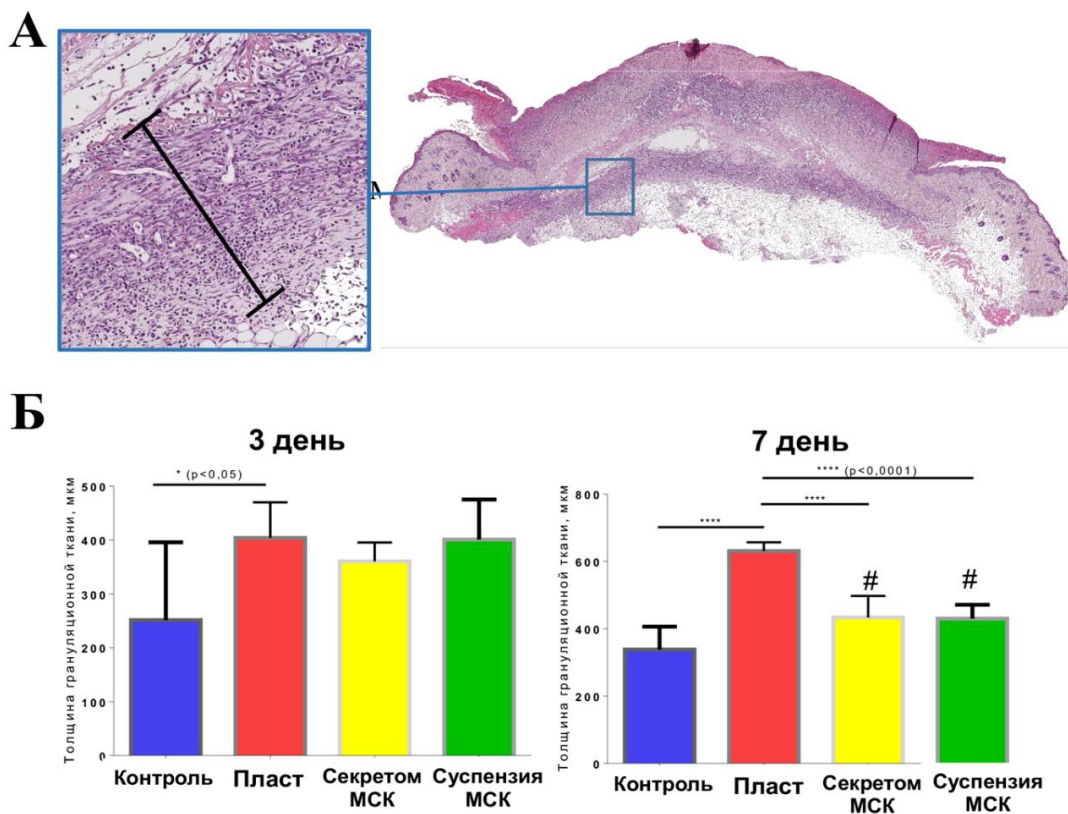


Рисунок 34 – Гистологическое и морфометрическое исследование хода формирования грануляционной ткани на ранних сроках эксперимента. Представлены поперечные срезы области пролежневого дефекта на 3 день, а также выноска с высоким увеличением и указанием измеряемой толщины грануляционной ткани (А) и результаты морфометрии толщины грануляционной ткани на 3 и 7 дни (Б); # $p < 0,05$ по сравнению с контролем; окрашивание гематоксилином и эозином

Следует обратить внимание и на то, что инъекция МСК в виде суспензии или введение секрета МСК также обладало стимулирующим действием на рост ГТ на 3 сутки с дальнейшим резким снижением к 7 дню, достигавшем значимости по сравнению с группой трансплантации КП (рисунок 34, Б).

4.2.4 Капиллярная васкуляризация грануляционной ткани снижается под действием секрета и клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток

Созревание ГТ и ее переход в стадию ремоделирования тесно связано с ее васкуляризацией, т.е. плотностью кровеносных сосудов различного калибра и типа. Для оценки данного параметра мы использовали поперечные срезы области пролежневого дефекта, на которых визуализировали антиген ЭК (CD31), а также гладкомышечных клеток и перицитов (α -ГМА) с последующим ручным подсчетом и анализом их плотности (рисунок 35). При статистическом анализе полученных результатов оказалось, что в группе трансплантации КП на 3 день происходило значимое снижение плотности CD31+ капилляров в сравнении с прочими группами исследования. На 7 день эта тенденция была менее выраженной и значимые отличия были достигнуты только в сравнении групп КП и введения суспензии МСК, однако при этом была обнаружена высокая плотность крупных сосудов с видимым просветом до 50 мкм. Их характерная морфология с кольцевым слоем ЭК в окружении муральных α -ГМА+ клеток (рисунок 35, А) указывала на их высокую стабильность, не характерную для ранних этапов формирования ГТ.

Действительно, стабилизация сосудов идет при активном участии обнаруженных нами муральных (α -ГМА+) клеток, контакт которых с ЭК приводит к депонированию белков базальной мембраны, нормализации проницаемости сосудов и перфузии ткани [364]. 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, нами было показано, что введение МСК как в виде суспензии, так и в форме КП, а также их секрета является мощным активатором роста ГТ на ранних сроках, что выражалось в увеличении ее толщины на срезах. При этом устойчивый рост ГТ после 3 суток наблюдался только после трансплантации КП из МСК (рисунок 35, Б).

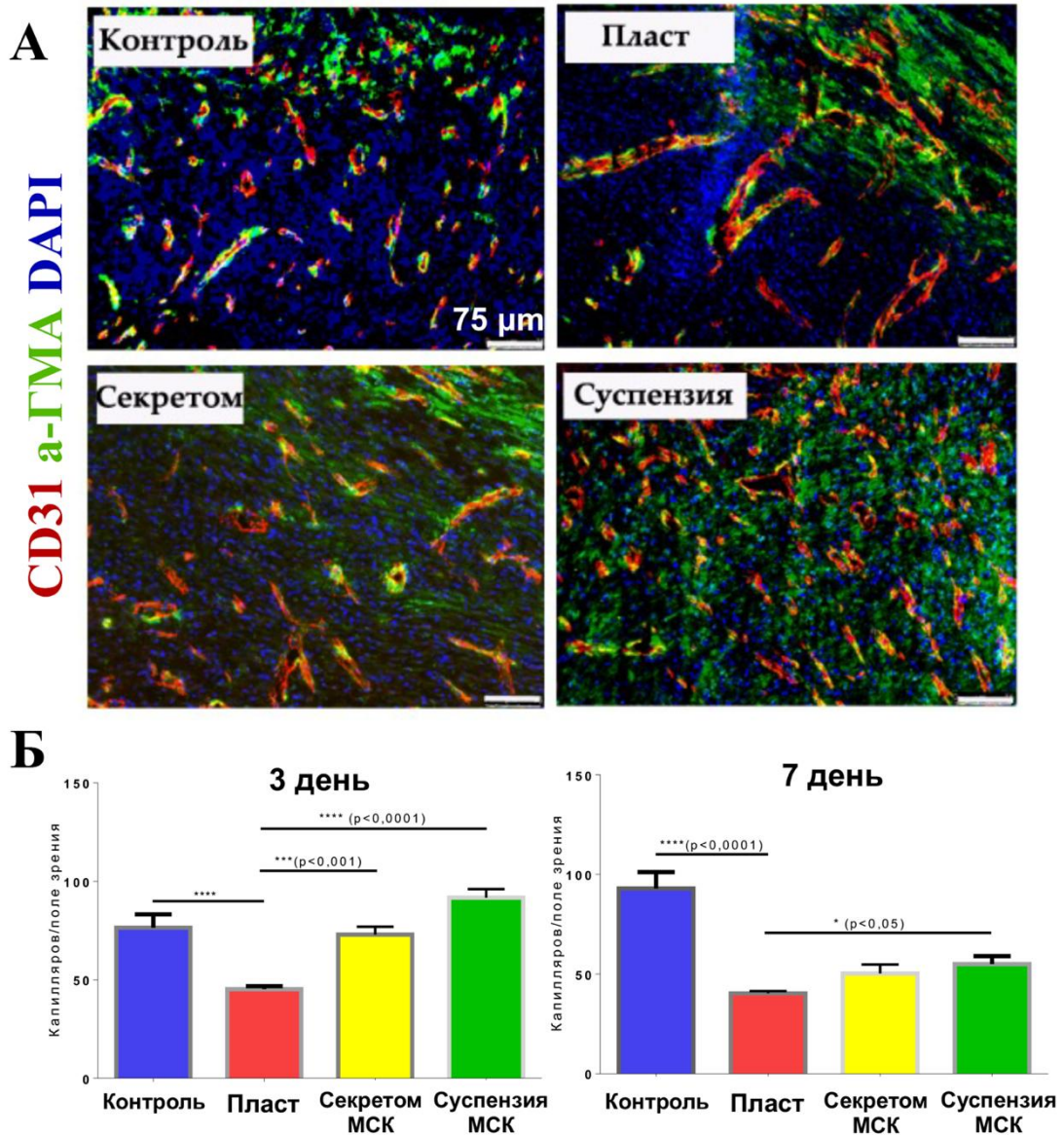


Рисунок 35 – Гистологическое исследование васкуляризации грануляционной ткани в зоне пролежневого дефекта. Микрофотографии (А) поперечных срезов грануляционной ткани в области пролежневого дефекта с визуализацией кровеносных сосудов (CD31 и α -ГМА) на 7 день. На графиках (Б) представлены результаты количественной оценки плотности кровеносных сосудов в пересчете на поле зрения. Масштабный отрезок – 75 мкм

Такая картина может быть связана как с более высокой сохранностью МСК в составе пласта, так и с действием продуцируемых ими растворимых факторов. Действительно, 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 капиллярной васкуляризации, что указывает на созревание ГТ и ее переход в фазу ремоделирования.

4.2.5 Визуализация мезенхимных стромальных клеток, трансплантированных путем инъекции суспензии или с помощью трансплантации клеточного пласта

Оценка удержания клеток в зоне трансплантации, а также исследование их выживаемости были проведены с использованием МСК, предварительно меченых мембранным флуоресцентным красителем (РКН26). После инъекционного введения МСК в виде суспензии сигнал РКН26 определялся в дерме и подлежащих тканях в течение всего периода наблюдения вплоть до 21 дня включительно (рисунок 36).

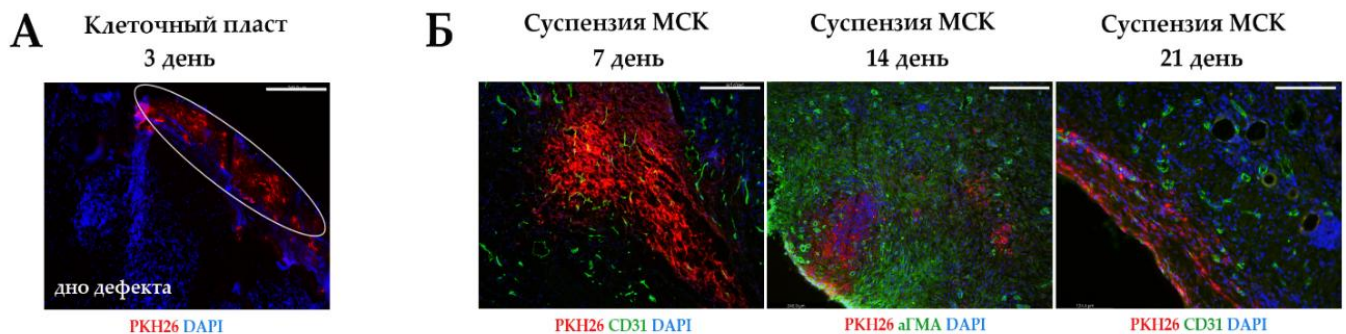


Рисунок 36 – Удержание трансплантата и выживаемость мезенхимных стромальных клеток в области заживающего пролежневого дефекта кожи. На поверхности дефекта сигнал от мезенхимных стромальных клеток в составе клеточного пласта определяется только на 3 день (А), а мезенхимные стромальные клетки, введенные инъекционно в виде суспензии, удавалось обнаружить в толще ткани до 21 дня (Б); масштабный отрезок – 250 мкм

Исследование удержания МСК, трансплантированных в составе КП, показало их присутствие только на 3 день наблюдения. На 7 день и далее ни в одном из образцов не был определен сигнал РКН26 от МСК в составе КП. В ряде случаев он был детектирован, однако не был ко-локализован ядрами, окрашенными DAPI. В таких ситуациях зачастую источником сигнала является клеточный дебрис (остаточные части меченых мембран) погибших или фагоцитированных клеток, в связи с чем его сложно рассматривать как подтверждение выживаемости МСК.

Таким образом, по нашим данным, трансплантированный на поверхность пролежня КП удерживался в зоне дефекта минимум 72 часа, после чего не позже 7 дня подвергался резорбции или отторгался с поверхности вместе со струпом. Тем не менее, в этой группе исследования исходом стала полная регенерация кожи без формирования рубца к 21 дню. Исходя из этого, мы предположили, что за время нахождения КП на поверхности дефекта (не менее 3 и не более 7 суток) его секретом, проникая в подлежащую толщу ГТ, задавал мощный

регенераторный импульс, которого было достаточно для успешной регенерации и/или блокирования фиброза. При этом наши данные по исследованию удержания МСК, введенных в виде суспензии, указывают на то, что они находились в толще ткани дольше. Однако исходом процесса заживления в этой ситуации являлось фиброзирование кожи, что указывает на их ограниченный регенераторный потенциал. Гистологический анализ образцов из группы суспензионного введения показал, что сигнал меченых МСК не совпадал с визуализированными α -ГМА+ миофибробластами (рисунок 36, 14 сутки) и CD31+ капиллярами (рисунок 36, 21 сутки), что не позволяет делать однозначных выводов об их судьбе после введения. Более интересным с точки зрения дальнейшего развития практического применения стал тот факт, что эффективность секрета МСК была сопоставима с введением суспензии МСК. Данное наблюдение согласуется с актуальными представлениями о механизме действия введенных МСК за счет паракринного действия продуцируемого ими секрета [172, 365]. Также это обосновывает целесообразность использования секрета МСК в качестве субстанции для создания препарата для «клеточной терапии без клеток» [366], направленного на стимуляцию заживления декубитальных язв.

4.3 Выяснение механизма регенераторного действия мезенхимных стромальных клеток в составе клеточных пластов при заживлении дефектов мягких тканей

Результаты исследований *in vivo* стали основанием для углубленного исследования секреторной активности МСК в составе КП. Наблюдавшееся на 3 день после трансплантации КП падение плотности капилляров в толще ГТ и литературные данные о корреляции васкуляризации ГТ с объемом рубца [367] стали поводом для оценки содержания ФР, регулирующих рост сосудов. Используя мультиплексный ИФА, мы показали, что КП из МСК продуцируют значимо больше ангиогенных факторов, причем этот прирост после нормировки на содержания ДНК оказался неравномерным для разных ФР и цитокинов. Например, кратность прироста содержания ангиопоэтина-2 в секрете КП по сравнению с монослоем МСК составила 5,1 раза, а аналогичный параметр для ключевого активатора ангиогенеза VEGF165 не достигал статистической значимости (рисунок 37). При этом в секрете КП содержание PDGF-BB – основного аттрактанта перицитов, участвующих в стабилизации и созревании сосудистого русла, было в 2,45 выше, чем в образце среды от монослоя МСК.

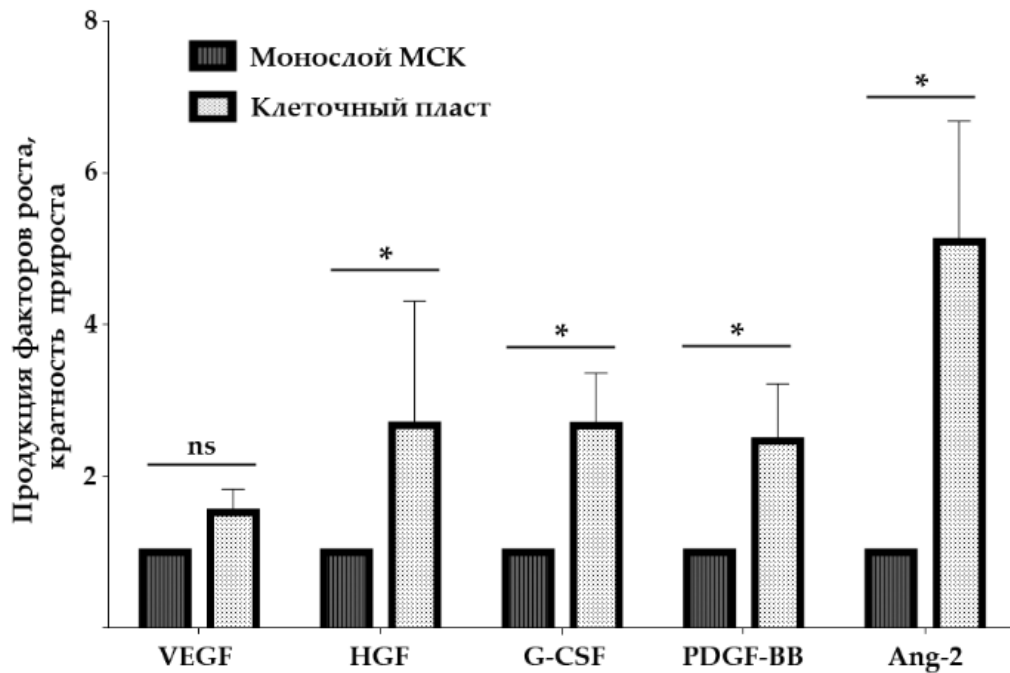


Рисунок 37 – Содержание ангиогенных факторов роста и цитокинов в секрете клеточных пластов и монослоя мезенхимных стромальных клеток. На графике представлена кратность прироста при сравнении секрета клеточного пласта и монослоя при нормировке по содержанию ДНК в лизате культуры; * $p < 0,05$ по сравнению с указанной на рисунке группой; ns – $p > 0,05$

Кратковременное удержание КП на поверхности пролежневого дефекта подкрепляет наше предположение о паракринном действии, которое мы определили термином «триггерное». Под этим термином имеется в виду отличительное свойство, заключающееся в том, что мощное воздействие секрета в течение 3-5 суток задает направление процессу заживления и этого кратковременного периода, который оканчивается после удаления или резорбции КП оказывается достаточно для изменения исхода репаративной регенерации.

С учетом полученных данных мультиплексного ИФА мы обратили внимание на результаты оценки ангиогенной активности секрета КП на модели *tube assay*. Напомним, что мы обнаружили активное формирование капилляроподобных структуры клетками HUVEC под действием секрета КП из МСК, которое превосходило эффект секрета МСК в монослойной культуре (рисунок 22). При этом результаты исследования васкуляризации ГТ на модели пролежневого дефекта свидетельствовали о снижении плотности капиллярных сосудов на 3 день после трансплантации КП (рисунок 35). Такого рода расхождение могло объясняться тем, что в ходе формирования сосудов активация ЭК ангиогенными ФР сменяется в дальнейшем из взаимодействием со стромальными клетками и перицитами, которые в модели ангиогенеза *in vitro* не представлены, но присутствуют в толще растущей ГТ. С учетом более высокой релевантности данных *in vivo* мы выдвинули предположение о том, что при

формировании КП состав секрета МСК в значительной степени способствует стабилизации, а не только активации роста сосудов. При этом процесс стабилизации сосудистого русла капиллярного калибра включает также и диссоциацию избыточных капилляров, которая объясняет снижение их плотности в толще ГТ на 3 день.

Данные мультиплексного ИФА в значительной степени поддерживают эту точку зрения, т.к. секретом КП содержал значимо больше ФР и цитокинов, активирующих таксис перицитов и стабилизацию кровеносных сосудов (PDGF-BB, ангиопоэтина-2, G-CSF, HGF), а содержание ключевого активатора пролиферации ЭК и ветвления капилляров (VEGF165) практически не изменялось по сравнению с монослоем МСК. Такой состав секрета не только способствует васкуляризации ГТ, без которой невозможно нормальное заживление, но и поддерживает необходимую функциональность и проницаемость сосудов. Таким образом, паракринное действие МСК в составе КП существенно отличается от эффектов секрета монослоя МСК или клеток в виде суспензии с точки зрения регуляции сопровождающего заживление ангиогенеза.

Спектр потенциальных изменений функционального статуса МСК был подкреплен результатами транскриптомного анализа с использованием библиотек, полученных методом секвенирования РНК, выделенной из монослоя МСК или собранных из них КП.

Кластеризацию данных по числу транскриптов мы выполняли с использованием модулей GeneOnthology и Enrichr, проводя сравнительный анализ по генам, экспрессия которых увеличивалась в 2 и более раза в КП по сравнению с монослоем МСК. Такого рода оценка обогащения по кластерам биологических процессов (BP) и молекулярных функций (MF) позволяет определить наиболее выраженные функциональные изменения и предположить их влияние на исследованные нами процессы заживления и регенерации. Так, при оценке кластеров MF мы обнаружили (рисунок 38), что среди генов с повышенной экспрессией многие относятся к числу регуляторов ремоделирования сосудов (кластер «*PDGF receptor binding*», GO:0005161) а также их взаимодействия с компонентами ВКМ (кластеры «*Collagen binding*», GO: 000518 и «*Protein binding involved in cell-matrix adhesion*», GO: 0098634). Поначалу кластер «*Regulation of cholesterol biosynthetic process*», GO: 0045540 с наивысшим комбинированным показателем по аннотации BP был для нас достаточно неожиданной находкой. Его более подробный анализ показал, что он, в основном, представлен транскриптами генов, кодирующих ферменты метаболизма жирных кислот. Среди их плеотропных функций достаточно убедительно показана роль ингибиторов ангиогенеза, причем как в нормальной, так и в поврежденной ткани, а также в солидных опухолях [368, 369]. При оценке кластеров генов с пониженной экспрессией мы обнаружили, что наиболее значимое снижение произошло среди генов, кодирующих активаторы ангиогенеза и пролиферации ЭК (в т.ч. из семейств FGF, Wnt,

Notch), входящих в кластеры «*Positive regulation of endothelial cell migration*», GO: 0010595 и «*Positive regulation of endothelial cell chemotaxis*», GO: 2001026. Такого рода изменения транскриптомного профиля хорошо соотносились с наблюдавшимися нами результатами опытов *in vivo* и *in vitro*, в которых стабилизация кровеносных сосудов явно преобладала над прямым ангиогенным действием в группах трансплантации КП или введения его секрета.

Таким образом, в значительной степени результаты трансплантации КП на модели пролежня определяются паракринным действием клеток, а преимущество перед секретомом и суспензией МСК может объясняться рядом причин. Во-первых, в составе КП содержится приблизительно в 4 раза больше клеток, чем в монослойной культуре сходной площади. Это может приводить к тому, что после трансплантации КП продукция компонентов секрета будет сфокусированной в подлежащих тканях. Во-вторых, присутствие в составе КП компонентов ВКМ способствует удержанию секретированных ФР и цитокинов, из-за чего их удельная концентрация в зоне аппликации ТИК может быть выше, чем после инъекций суспензии. Наконец, изменения репертуара продуцируемых компонентов секрета являются основным и наиболее значимым фактором, объясняющим модуляцию хода процесса заживления и, вероятно, исходы, наблюдавшиеся после трансплантации КП из МСК в обеих моделях дефектов кожи. При анализе полученных данных следует также учитывать временные сроки доставки МСК или их секрета. Так, на модели пролежневого дефекта доставку МСК и инъекцию секрета осуществляли на ранних сроках, причем результатом этого стал активный рост ГТ с увеличением числа стабилизированных сосудов и снижением плотности капилляров в ее толще. Ремоделирование ГТ, которое мы наблюдали на 14-21 дни после трансплантации КП, в значительной степени напоминало результаты на модели раневого дефекта, однако заживление пролежня завершилось без формирования рубца.

Исходя из этого, мы пришли к предположению о том, что при пролежне кожи трансплантация МСК в виде КП вызывает не только активацию роста ГТ, но также стабилизирует пронизывающие ее кровеносные сосуды капиллярного калибра и уменьшает их плотность. Все это приводит к формированию основы для паттерна ремоделирования ГТ, в исходе которого происходит регенерация кожи с полным восстановлением структуры.

RNA Sequencing/Molecular Function

Upregulated

	Term	P-value	Combined Score	Overlap
1	collagen binding (GO:0005518)	2,16E-07	112,523	11/52
2	transcription regulatory region sequence-specific DNA binding (GO:0000976)	4,33E-05	26,237	22/292
3	RNA polymerase II regulatory region DNA binding (GO:0001012)	7,77E-05	27,742	17/201
4	scavenger receptor activity (GO:0005044)	2,72E-04	67,743	5/21
5	integrin binding (GO:0005178)	3,80E-04	29,041	10/94
6	platelet-derived growth factor receptor binding (GO:0005161)	3,98E-04	83,491	4/13
7	serine-type endopeptidase activity (GO:0004252)	5,88E-04	19,735	15/196
8	protein binding involved in cell-matrix adhesion (GO:0098634)	7,67E-04	106,564	3/7
9	metalloendopeptidase activity (GO:0004222)	2,63E-03	22,181	7/65
10	mitogen-activated protein kinase kinase binding (GO:0031434)	1,10E-02	14,427	6/65

Downregulated

	Term	P-value	Combined Score	Overlap
1	protein-lysine 6-oxidase activity (GO:0004720)	1,03E-03	89,675	3/6
2	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase activity (GO:0046934)	1,11E-03	23,471	9/68
3	growth factor activity (GO:0008083)	1,24E-03	22,771	9/69
4	phosphatidylinositol bisphosphate kinase activity (GO:0052813)	1,52E-03	21,451	9/71
5	transmembrane receptor protein tyrosine kinase activity (GO:0004714)	2,20E-03	20,923	8/61
6	cadherin binding (GO:0045296)	2,31E-03	11,633	23/313
7	activin binding (GO:0048185)	5,51E-03	40,690	3/10
8	transforming growth factor beta receptor binding (GO:0005160)	6,36E-03	17,987	6/44
9	fibroblast growth factor receptor binding (GO:0005104)	9,54E-03	30,331	3/12
10	growth factor receptor binding (GO:0070851)	2,49E-02	8,374	8/92

RNA Sequencing/Biological Process

Upregulated

	Term	P-value	Combined Score	Overlap
1	extracellular matrix organization (GO:0030198)	2,27E-07	53,264	23/229
2	regulation of epithelial cell proliferation (GO:0050678)	6,43E-06	63,309	11/72
3	positive regulation of cell differentiation (GO:0045597)	1,40E-05	35,953	18/194
4	positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter (GO:0045944)	1,52E-05	21,307	47/848
5	regulation of cholesterol biosynthetic process (GO:0045540)	1,56E-05	76,747	8/40
6	regulation of cell migration (GO:0030334)	1,73E-05	28,870	24/316
7	cellular response to hormone stimulus (GO:0032870)	1,81E-05	52,044	11/80
8	regulation of cholesterol metabolic process (GO:0090181)	1,89E-05	73,578	8/41
9	regulation of angiogenesis (GO:0045765)	5,69E-05	30,628	16/177
10	extracellular matrix disassembly (GO:0022617)	7,98E-05	41,935	10/78

Downregulated

	Term	P-value	Combined Score	Overlap
1	extracellular matrix organization (GO:0030198)	6,41E-08	52,809	28/229
2	regulation of cell migration (GO:0030334)	2,00E-07	42,005	33/316
3	positive regulation of endothelial cell migration (GO:0010595)	2,21E-06	63,070	13/70
4	negative regulation of cell migration (GO:0030336)	1,57E-05	38,152	16/121
5	regulation of endothelial cell chemotaxis (GO:2001026)	8,15E-05	94,423	5/13
6	positive regulation of epithelial cell migration (GO:0010634)	1,13E-04	35,217	11/74
7	positive regulation of cell migration (GO:0030335)	3,48E-04	18,790	20/221
8	positive regulation of protein kinase B signaling (GO:0051897)	3,72E-04	22,698	14/127
9	positive regulation of angiogenesis (GO:0045766)	5,81E-04	22,637	12/103
10	positive regulation of vasculature development (GO:1904018)	6,34E-04	22,155	12/104

Рисунок 38 – Основные результаты биоинформатического анализа результатов РНК-секвенирования. Библиотеки, полученные после проведения анализа мезенхимных стромальных клеток в монослое и в виде клеточных пластов были нормализованы для анализа апрегулированных (зеленый) и даунрегулированных (красный) транскриптов. Отображение гистограмм с комбинированным подсчетом баллов и ранжированием кластеров поддерживалось значением «p» (использована кластеризация Gene ontology)

Можно предположить, что срок доставки клеточного материала также вносит существенный вклад в наблюдавшиеся отличия между двумя моделями кожных дефектов. Действительно, введение МСК, их секрета или трансплантация КП сразу после формирования пролежня способствовали изменению состава ГТ, так как по времени совпадали с ее формированием и ростом при заживлении дефекта. При этом трансплантация МСК или КП в модели глубокой раны кожи проводилась на 7 день, когда фаза ГТ была практически сформирована. В такой ситуации мы смогли добиться сокращения продолжительности заживления, но не изменения исхода процесса – в области зажившей раны наблюдался типичный для такого объема повреждения фиброз кожи.

Таким образом, нами были установлены как эффективность использования КП из МСК для стимуляции заживления дефектов мягких тканей, так и проанализированы возможные механизмы, определяющие их регенераторную активность и преимущество перед введением МСК или их секрета. Также были получены неожиданные данные о влиянии секрета КП на активность ангиогенеза в ГТ, которая может быть важным фактором, определяющим исход репаративной регенерации при ранах и пролежнях кожи. Все это обосновывает возможность дальнейшей практической разработки данного класса ТИК, которые могут применяться по соответствующим распространенным показаниям у широкого круга пациентов.

ГЛАВА 5. ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ КЛЕТОЧНЫХ ПЛАСТОВ ИЗ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО АНГИОГЕНЕЗА

Стимуляция роста кровеносных сосудов с помощью клеточной и генной терапии, известная как *терапевтический ангиогенез*, является перспективным методом лечения целого ряда ишемических заболеваний – ишемической болезни сердца, инфаркта миокарда и ишемии нижних конечностей [370].

В области ТИ разработки, направленные на восстановление кровоснабжения, традиционно велись с акцентом на создание биоэквивалентов кровеносных сосудов или инженерии васкуляризованных тканей. Однако с учетом данных о паракринном действии ТИК из МСК, а также обнаружения повышенного содержания ангиогенных ФР в секрете КП по сравнению с МСК в монослое мы предположили возможность их использования для стимуляции ангиогенеза в ишемизированных тканях.

5.1 Обоснование актуальности разработки и выбор модели

Для терапевтического ангиогенеза в эксперименте и в КИ были использованы суспензии из МСК КМ, плаценты, а также подкожного жира. При этом МСК ЖТ являются одним из наиболее доступных источников клеточного материала для терапевтического ангиогенеза [371]. Помимо паракринной активности ряд авторов указывают на их ограниченную способность к эндотелиальной дифференцировке [372] и возможное прямое участие в стабилизации сосудов при их миграции в периваскулярную область.

При этом эффективность клеточной терапии в клинике остается ниже ожидаемой [373], о чем говорят результаты исследований, в которых для индукции роста сосудов суспензию МСК ЖТ вводили в ткани с помощью инъекции. Процессы ангиогенеза и регенерации ткани требуют наличия стимула в течение продолжительного времени вплоть до нескольких недель [374].

В опытах на животных было показано, что пересадка клеточных пластов из МСК ЖТ на поверхность эпикарда сердца вызывает уменьшение размеров ИМ, индуцирует ангиогенез в периинфарктной зоне, что приводило к росту показателей перфузии по данным МРТ-кардиографии [343]. Вторым распространенным состоянием, при котором необходима индукция ангиогенеза, является хроническая ишемия нижних конечностей (ХИНК) и ее критическая форма (КИНК). При КИНК наиболее очевидным способом применения представляется аппликация КП из МСК ЖТ для закрытия язвенных дефектов, однако вопрос о наличии у них прямого ангиогенного действия изучен мало. Это является актуальной задачей,

так как трансплантация КП вполне может оказаться ценным вспомогательным методом во время реконструктивных операций или шунтирования, увеличивая шансы на сохранение конечности.

С учетом изложенных выше предпосылок нами была проведена работа по получению КП из МСК ЖТ и оценке их ангиогенного эффекта при подкожной трансплантации на ишемизированные мышцы задней конечности мыши.

5.2 Восстановление кровотока в ишемизированной задней конечности мыши под действием мезенхимных стромальных клеток, трансплантированных с помощью инъекции или в виде пластов

В опыте на модели ишемии задней конечности мыши мы оценили эффективность трансплантации МСК в виде суспензии и в форме КП по сравнению с отрицательным контролем. В сформированных группах животных были выполнены операции по индукции ишемии, после чего 1,0 млн МСК вводили в ткани тремя внутримышечными инъекциями или интраоперационно трансплантировали в виде КП в область резецированной бедренной артерии.

Использованный нами способ подкожной трансплантации КП без применения специальных материалов (например, фибринового клея) основан на том, что поверхность операционной раны имеет достаточно высокую адгезивность и позволяет КП быстро (в течение 1-2 мин.) и эффективно прикрепляться, после чего он может быть укрыт кожей. Похожий способ был использован в работе Tatsumi и соавт., которые у мышей с моделью гемофилии А успешно использовали КП из трансдуцированных миобластов, продуцирующих FVIII, в качестве подкожных «помп» для компенсации нарушения гемостаза [375].

Лазер-доплеровское сканирование для оценки скорости подкожного кровотока в день индукции ишемии, показало, что операция вызывала падение скорости кровотока в оперированной конечности до $7,7 \pm 1,4\%$ по сравнению со здоровой конечностью. За две недели наблюдения за животными нами не было зафиксировано ампутаций конечности или выраженных гангренозных изменений, хотя в контрольной группе (индукция ишемии без введения клеток) были отмечены единичные дистальные некрозы пальцев.

Исследование динамики перфузии конечности показало, что по сравнению с отрицательным контролем в группах введения МСК отмечались более высокие показатели скорости кровотока в конечной точке исследования, причем введение МСК с помощью инъекции уступало по эффективности методу трансплантации КП (рисунок 39).

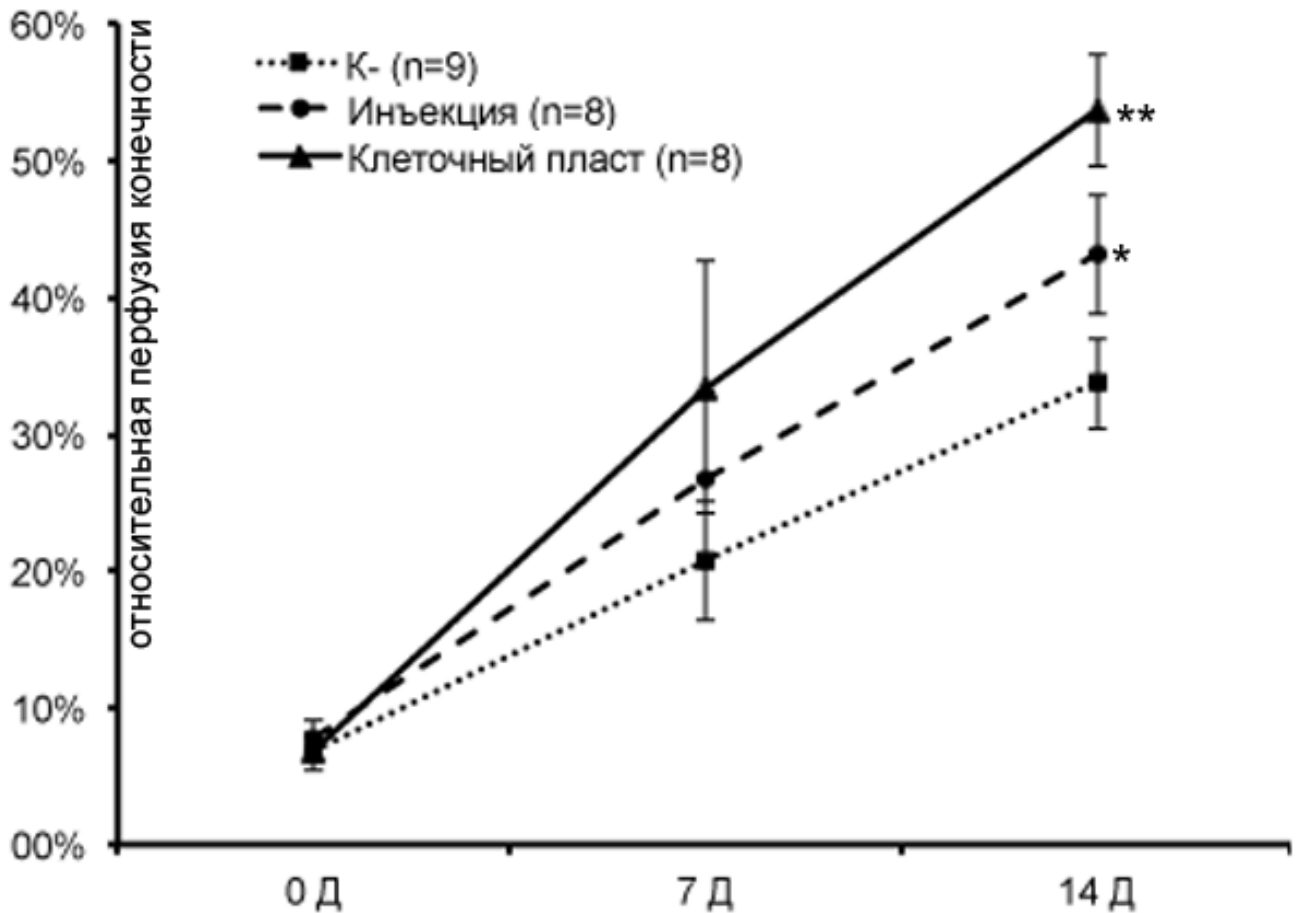


Рисунок 39 – Восстановление кровотока в ишемизированной конечности в группах эксперимента; * $p=0,01$ по сравнению с отрицательным контролем; ** $p=0,03$ по сравнению с группой инъекции мезенхимных стромальных клеток

В группе с внутримышечной инъекции МСК ЖТ на 14 день относительная перфузия (определяемая как процентное отношение скоростей перфузии в ишемизированной и здоровой конечностях) была значимо выше, чем в группе отрицательного контроля ($43,1 \pm 4,4\%$ по сравнению с $33,7 \pm 3,2\%$ соответственно; $p=0,003$). При этом подкожная трансплантация КП обладала максимальной эффективностью и приводила к восстановлению перфузии до $53,7 \pm 4,7\%$, что было значимо выше, чем в группе инъекционного введения МСК ($p=0,03$) и отрицательного контроля ($p=0,001$).

Сходные данные на модели инфаркта миокарда были получены Sekine и соавт.; в ней ими также было сделано предположение о роли более высокой выживаемости клеток в составе КП, которое подтвердили с помощью метода прижизненной визуализации трансплантата [376].

5.3 Оценка плотности кровеносных сосудов после трансплантации клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток и с помощью внутримышечной инъекции

Действие МСК ЖТ при ишемических состояниях в значительной степени обусловлено паракринной активностью клеток, секретирующих ангиогенные ФР и цитокины. Анализ плотности сосудов в ишемизированной передней большеберцовой мышце, выделенной из конечностей подопытных животных, проводили на замороженных срезах, окрашенных на маркеры клеток эндотелия (CD31) и гладкомышечных клеток (α -ГМА) (рисунок 40).

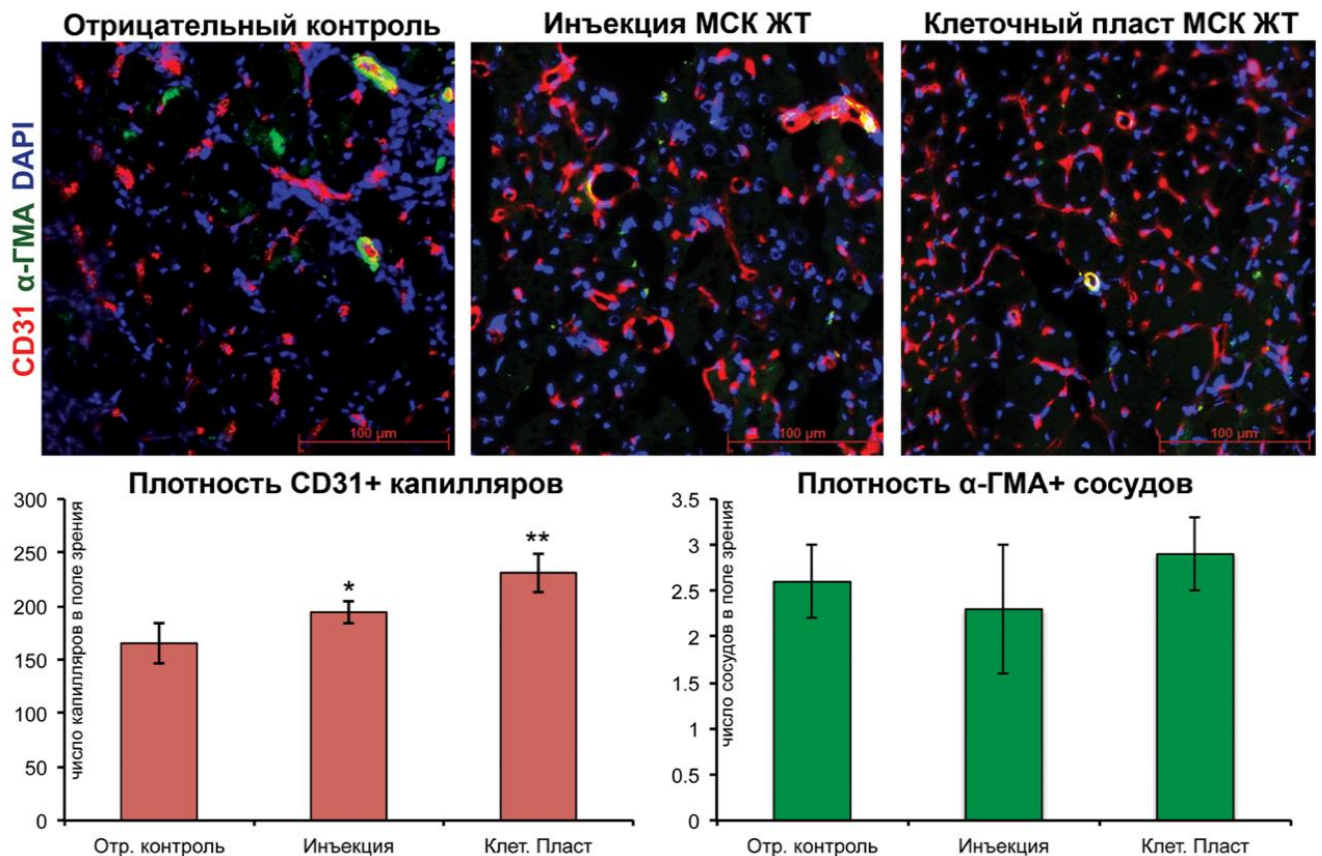


Рисунок 40 – Оценка плотности кровеносных сосудов в передней большеберцовой мышце ишемизированной конечности мыши на 14 день эксперимента. Верхний ряд - микрофотографии окрашенных срезов с визуализированными кровеносным сосудами; ув. $\times 200$; нижний ряд - результаты анализа плотности сосудов в пересчете на поле зрения; * $p=0,03$ по сравнению с отрицательным контролем; ** $p=0,007$ по сравнению с группой инъекции мезенхимных стромальных клеток

Результаты гистологического исследования плотности сосудов подкрепляли полученные нами данные лазер-доплеровского сканирования. Анализ микрофотографий показал, что инъекция МСК приводила к значимому увеличению ($p=0,03$) плотности CD31+ капилляров по сравнению с контрольной группой, где плотность капилляров на поле зрения составила $165,3 \pm 19,3$. При этом показатель плотности капилляров в группе трансплантации

КП был значимо выше, чем в группе инъекции эквивалентной дозы МСК ($231,1 \pm 18,6$ по сравнению с $194,4 \pm 10,4$ соответственно; $p=0,007$). Таким образом, на данном этапе нами был обнаружен выраженный ангиогенный эффект МСК, как вводимых внутримышечно, так и трансплантированных в виде КП с явным преимуществом последних. При этом оценка плотности крупных α -ГМА-позитивных сосудов, имеющих просвет, не выявила значимых различий между группами исследования (см. графики на рисунке 40).

Расхождение такого рода не исключает обнаруженной нами разницы по показателям восстановления кровотока в группах КП из МСК ЖТ и их суспензии, так как капиллярное русло играет ключевую роль в обеспечении трофики [377] и имеет очень ключевое влияние на скорость перфузии ткани, определяемую доплеровскими методами [378].

5.4 Уменьшение распространенности некроза ишемизированных скелетных мышц после трансплантации клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток

Уменьшение площади некроза является одним из ключевых показателей эффективности ангиогенной терапии. Этот эффект реализуется за счет нормализации сосудистой трофики и антиапоптотического действия цитокинов, продуцируемых МСК. При морфометрическом анализе площади некротизированной ткани на срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, было установлено, что площадь ткани с признаками некроза значимо снижалась после трансплантации МСК (рисунок 41).

Снижение площади некротизированных волокон на срезах совпадало с тенденцией к более высокой плотности капиллярных сосудов в этих группах. Сравнение результатов, полученных после инъекции МСК и трансплантации КП показало, что последние обладают умеренным, но статистически значимым преимуществом по сравнению с инъекционным введением (рисунок 41).

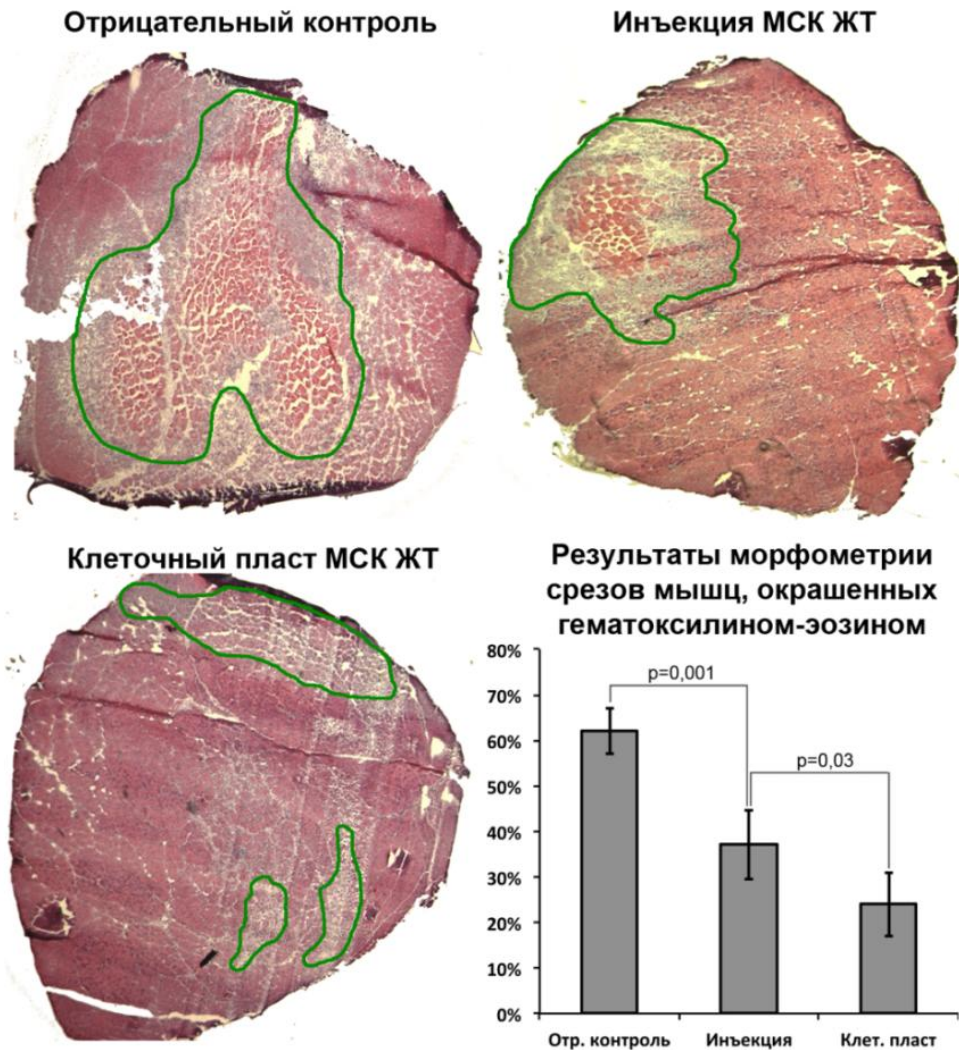


Рисунок 41 – Результаты морфометрии площади некроза на срезах передней большеберцовой мышцы: (микрофотографии) срезы ишемизированных мышц животных из различных групп исследования и (график) количественные результаты морфометрии площади некроза (% от площади среза); на срезах - окрашивание гематоксилином и эозином, зеленой линией выделены зоны некроза

Уменьшение площади некротизированной ткани является важным индикатором нормализации трофики ткани, в т.ч. за счет восстановления кровоснабжения. Следует сразу же упомянуть о том, что выраженность некроза может варьировать в зависимости от используемой линии мышей. В частности, ранее мы наблюдали, что при индукции ишемии у мышей линии BALB-C отмечаются массивные гангрены и ампутации в то время, как линия C57 характеризуется определенной устойчивостью к развитию некроза мышц. Это связано с тем, что у мышей линии C57 более развито по сравнению с BALB-C капиллярное русло и микроциркуляторное звено обладает способностью эффективно справляться с нарушениями трофики при ишемии [379].

5.5 Визуализация клеточных пластов, оценка их жизнеспособности и васкуляризации после подкожной трансплантации

Более высокая выживаемость МСК в составе трансплантированного КП считается одним из факторов, который лежит в основе их терапевтической эффективности. Для обнаружения трансплантированных таким образом МСК участок *m. quadriceps femoris* в области аппликации КП иссекался и затем использовался для получения замороженных срезов, на которых детектировали ТИК по внесенной перед трансплантацией метке (краситель CMFDA). Для детальной оценки судьбы трансплантированных МСК мы провели иммунофлуоресцентную визуализацию клеток эндотелия (CD31) и маркеров апоптоза и пролиферации: активной каспазы-3 и Ki-67 соответственно.

Было установлено, что по истечении 14 дней подкожно трансплантированные КП сохранялись в виде многослойной массы, в которой были обнаружены меченые CMFDA клетки (трансплантированные МСК), а также клетки реципиента, не несущие метки (рисунок 42). По маркеру CD31 в толще КП были обнаружены признаки выраженной капилляризации. Вторым важным аспектом при трансплантации клеточного материала является сохранность клеток и возможность их пролиферации, которую оценивали с помощью гистологического окрашивания на маркеры активации апоптоза (каспаза-3) и пролиферации (Ki-67) (рисунок 42, В, Г). При этом среди CMFDA+ МСК в толще КП были обнаружены клетки как с признаками пролиферации, так и единичные апоптотические клетки [11].

Важной находкой в данной работе является то, что подкожно трансплантированный КП обладает достаточно хорошей выживаемостью и был обнаружен при гистологическом исследовании в опытах с ТИК, мечеными красителем CMFDA (см. рисунок 42, А, Б). Трансплантат, имевший на срезах форму многоклеточной массы, содержал как исходно доставленные в составе КП МСК (CMFDA+ клетки), так и клетки, инвазировавшие в его толщу и не имевшие флуоресцентной метки. К таковым могут, вероятнее всего, относиться не только лейкоциты [380], но и клетки эндотелия реципиента, которые визуализировались при гистологическом окрашивании.

Обнаруженные в составе КП множественные сосуды имели капиллярный размер (точечные CD31+ сосуды без видимого просвета), что указывало не только на выживание трансплантированных МСК ЖТ, но и на взаимодействие КП с организмом реципиента (рисунок 42, Д, Е) и его васкуляризацию. Сходные результаты были ранее получены при трансплантации КП из клеток эндотелия [381] и СК сердца [92], однако нами была впервые

обнаружена васкуляризация пластов из МСК ЖТ, которые не со-культивировались с эндотелиоцитами.

Обнаружение в толще КП клеток с признаками как апоптоза, так и пролиферации позволило нам сделать выводы о судьбе трансплантированных клеток. Предварительные данные указывают на то, что в толще КП имеются как пролиферирующие (Ki-67+), так и апоптотические клетки (позитивные по каспазе-3), причем среди них имеются как МСК ЖТ (CMFDA+ клетки), так и клетки, пришедшие в толщу пласта из организма хозяина (рисунок 42, В, Г). Важность последнего наблюдения заключается в том, что трансплантированные клетки не оказываются инкапсулированы, как это происходит, например, при введении суспензии в ЦНС [175].

Таким образом, полученные нами данные свидетельствовали о наличии ангиогенного и тканепротективного действия МСК, доставляемых обоими способами, а также об их высокой выживаемости в составе КП. При этом КП обладали более высокой эффективностью, вероятно, оказывая действие по паракринному механизму, как и клетки, введенные инъекционно. Фактором, обеспечивающим более высокую эффективность КП является повышенная выживаемость МСК при таком способе трансплантации, а также наличие синтезированного ими ВКМ, содержащего ангиогенные ФР и цитокины.

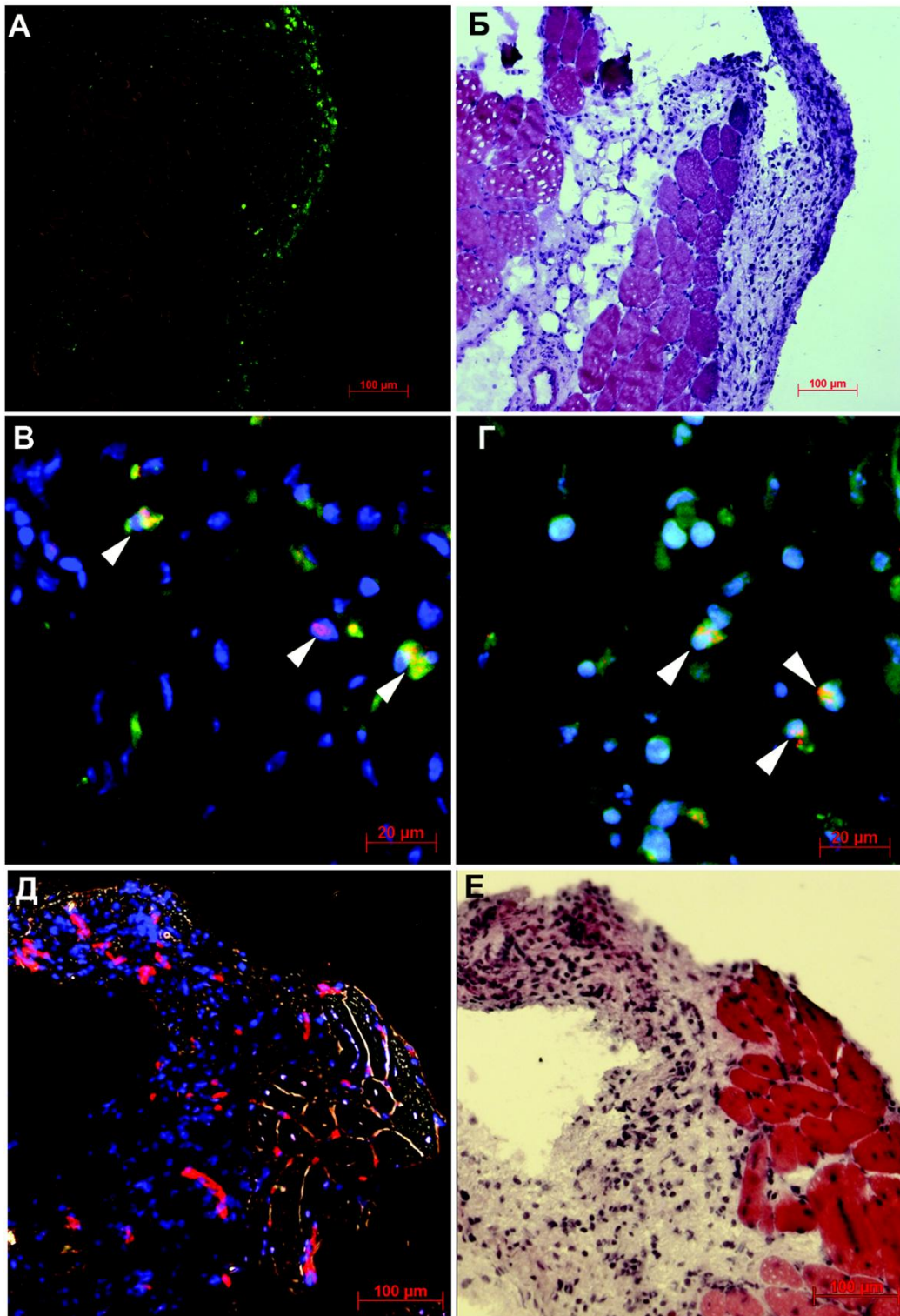


Рисунок 42 – Результаты гистологического исследования клеточных пластов, извлеченных на 14 день после трансплантации с подлежащими тканями. Верхний ряд: детекция трансплантированных мезенхимных стромальных клеток по сигналу SMFDA (A, зеленый сигнал) и соответствующий параллельный срез (B); средний ряд: детекция в толще клеточного пласта пролиферирующих и апоптотических клеток; окрашивание на Ki-67 (B, красный) и активированную каспазу-3 (Г, красный); нижний ряд: капиллярная васкуляризации клеточных пластов на 14 день эксперимента (D) и соответствующий параллельный срез (E) – визуализация CD31 (D, красный); на (B) и (E) – окрашивание гематоксилином и эозином, ядра (B-D) докрашены DAPI

Также было установлено, что трансплантированный КП сохраняется до 14 дней в жизнеспособном состоянии, подвергается капиллярной васкуляризации и характеризуется наличием пролиферирующих клеток и умеренным апоптозом. Полученные данные свидетельствуют о том, что КП из МСК ЖТ активно взаимодействуют с организмом реципиента и являются потенциально эффективным средством для терапевтического ангиогенеза при КИНК и связанных с ней хирургических реконструктивных вмешательствах.

ГЛАВА 6. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ КЛЕТОЧНЫХ ПЛАСТОВ ИЗ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ДЛЯ УСИЛЕНИЯ ИХ АНГИОГЕННОГО И РЕГЕНЕРАТОРНОГО ПОТЕНЦИАЛА

Показанная нами эффективность КП из МСК ЖТ как средства терапевтического ангиогенеза, а также установленный паракринный механизм их действия стали основанием для цикла работ по генетической модификации КП с целью обогащения их секретом соответствующими ФР. Стратегия комбинированной генной и клеточной терапии для этих целей разрабатывалась коллективом в течение длительного времени и показала, что ангиогенное и регенераторное действие МСК при ишемии может быть значительно усилено путем повышения продукции VEGF165 с помощью вирусных векторов, несущих его ген [327]. Кроме того, нас заинтересовал тот факт, что при переводе МСК из монослойной культуры в форму КП происходило усиление продукции многих важных для ангиогенеза ФР и цитокинов, но не VEGF165 – ключевого индуктора миграции ЭК и ветвления капилляров (рисунок 37). Исходя из этого, именно он был выбран нами в качестве мишени и объекта для модификации КП с помощью рекомбинантных вирусных векторов.

6.1 Выбор векторной системы для модификации мезенхимных стромальных клеток и клеточных пластов на их основе

Основным инструментом в этой работе стала разработанная совместно с группой проф. Ни оригинальная бакуловирусная система, состоящая из двух векторов, несущих комплементарную ДНК (кДНК) VEGF165 человека фланкированную FRT-последовательностями и дрожжевую FLPo-рекомбиназу [340, 382]. Принцип работы этой системы заключается в том, что после совместной трансдукции FLPo-рекомбиназа вырезает по специфичным для нее FRT-сайта экспрессионную кассету, которая при этом приобретает форму миникольцевой ДНК и с которой идет эффективная экспрессия гена интереса (трансгена). Общая схема работы такой системы и ее производных приведена на рисунке 43.

Преимуществом миникольцевой ДНК является отсутствие избыточных элементов, которые доставляются вместе с вирусным вектором – по сути, она состоит из гена интереса и последовательностей, необходимых для его экспрессии [383]. Это приводит как к более высокой и более длительной экспрессии продукта, которая в случае описанной системы на основе бакуловирусов составляла не менее 30 дней *in vitro*.

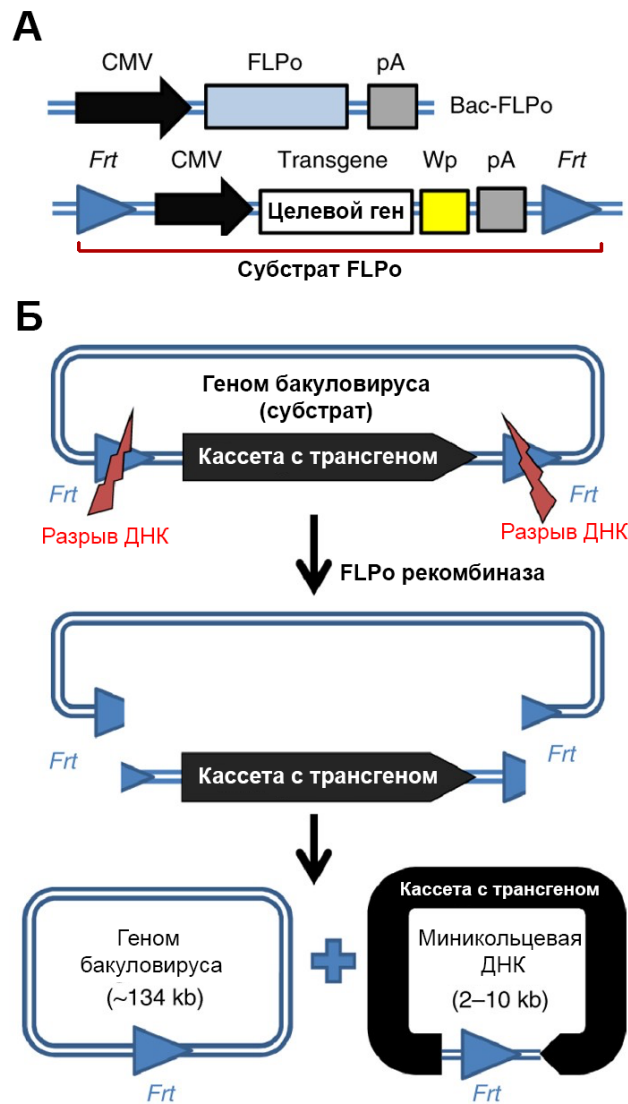


Рисунок 43 – Бакуловиральная система FLPo/FRT для экспрессии с помощью миникольцевых ДНК в клетках млекопитающих. Схема векторных конструкций (А) с генами FLPo-рекомбиназы и целевым геном в окружении FRT-сайтов и принцип работы системы после ко-трансдукции двумя бакуловиральными вирусами (Б). Адаптировано из [382]

Данная система позволила нашим коллегам ранее модифицировать МСК ЖТ и, повышая экспрессию ФР из семейств BMP, TGF- β или регуляторных микроРНК, увеличить их остеогенный [384, 385], хондрогенный [386] и ангиогенный потенциал [382] для использования в клеточной терапии. Приведенные работы использовали введение МСК в виде суспензии, нас же заинтересовала возможность модификации КП из МСК с помощью разработанной бакуловиральной системы.

6.2 Оптимизация условий бакуловирусной трансдукции мезенхимных стромальных клеток

Используя отработанную ранее методику получения КП из МСК ЖТ мыши (см. раздел 2.3.1), мы приступили к подбору условий для их трансдукции бакуловирусными векторами. В связи с тем, что поверхностные рецепторы, необходимые для проникновения бакуловирусов в клетки млекопитающих, не идентифицированы [387, 388], мы оптимизировали культуральные условия и кратность инфицирования (MOI, англ. *multiplicity of infection*). Под последним понимают ключевой для дозирования вектора параметр, который представляет собой отношение количества вирусных частиц/геномов к количеству клеток-мишеней на единицу площади или объема.

На данном этапе с целью визуализации мы использовали бакуловирусный вектор, несущий ген зеленого флуоресцентного белка (eGFP), получивший название «Vas-CE», с последующим анализом клеток методом проточной цитометрии и подсчетом их количества.

Мы обнаружили, что количество eGFP⁺ клеток в культуре МСК ЖТ мыши было выше при добавлении бакуловируса к клеткам в ФСБ или р-ре Хэнкса (англ. *Hanks' balanced salt solution*, HBSS), чем при проведении аналогичной процедуры в стандартных средах α -MEM или DMEM. Это воспроизводилось как при проведении кратковременной трансдукции в течение 3 часов, так и при более длительной инкубации продолжительностью 6 часов (рисунок 44, А). Мы также убедились, что в р-ре Хэнкса повышение MOI до 150 значительно увеличивало долю eGFP⁺ клеток по сравнению с MOI=75 ($91,9 \pm 10,1$ по сравнению с $71,2 \pm 9,5\%$ соответственно; $p=0,01$) с закономерным увеличением интенсивности флуоресценции eGFP по данным проточной цитометрии (рисунок 44, Б). Интенсивность флуоресценции косвенно отражает количество продуцируемого внутриклеточно eGFP и при инкубации МСК с Vas-CE в течение 6 ч мы не обнаружили ее роста при увеличении MOI с 75 до 150 ни в одной из использованных буферных растворов или культуральных сред. При короткой инкубации продолжительностью 3 часа в ФСБ интенсивность флуоресценции значительно росл с увеличением MOI до 150 (рисунок 44, Б, В).

Среди протестированных сред и буферов α -MEM и DMEM, в которых трансдукция шла менее эффективно, готовятся на основе карбонатного буфера и содержат 2,2 и 3,7 г/л NaHCO_3 , а ФСБ и р-р Хэнкса основаны на буферных свойствах фосфатных солей и содержат 0 и 0,35 г/л NaHCO_3 соответственно.

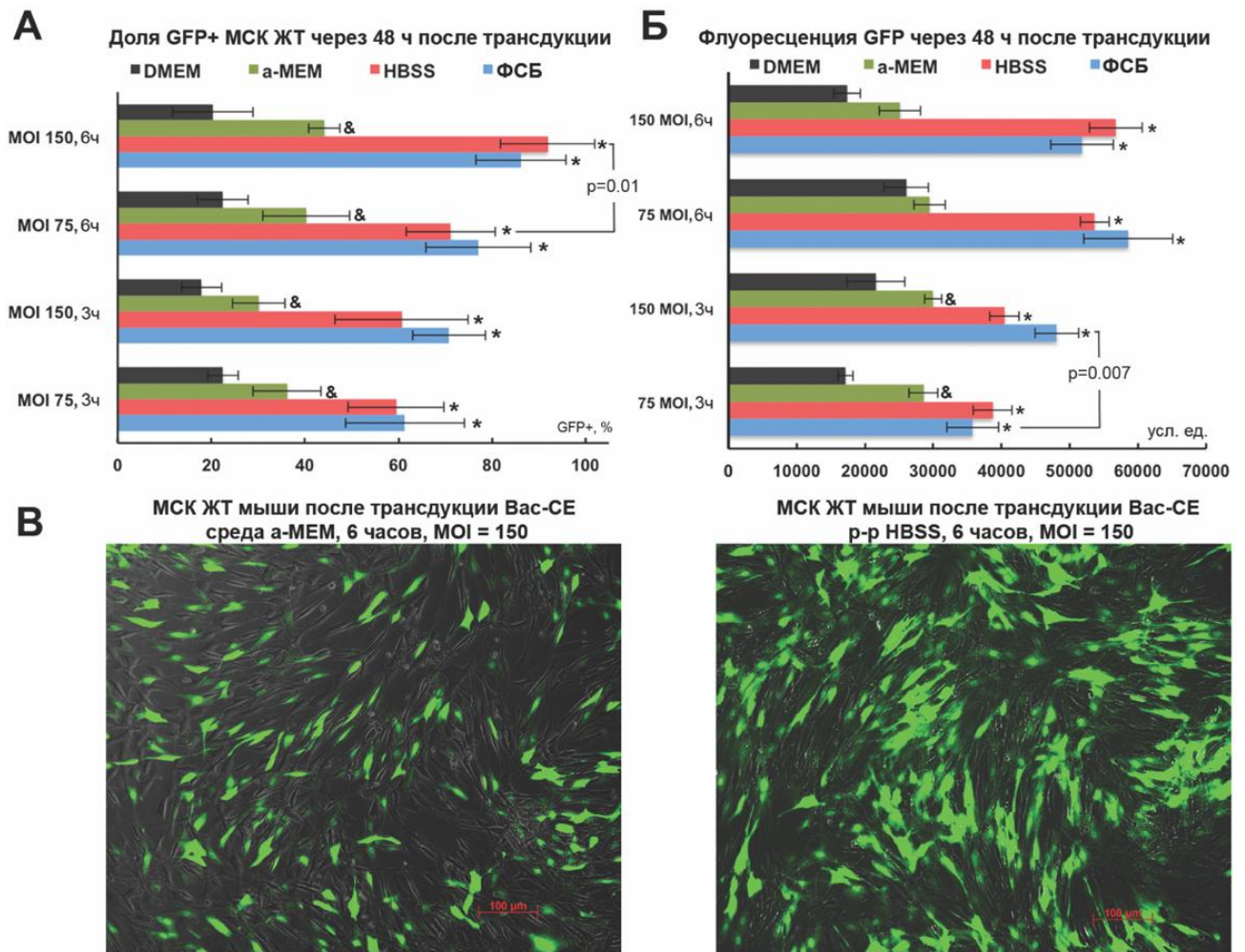


Рисунок 44 – Влияние среды, времени инкубации и кратности инфицирования на эффективность бакуловирусной трансдукции мезенхимных стромальных клеток жировой ткани мыши. Максимальная эффективность трансдукции (А) была достигнута при внесении Вас-СЕ в фосфатном солевом буфере (ФСБ) или р-ре Хэнкса (HBSS) в течение как 3, так и 6 часов независимо от кратности инфицирования (MOI), а интенсивность флуоресценции (Б) хорошо соотносилась с долей eGFP+ клеток. Репрезентативные изображения мезенхимных стромальных клеток (В), экспрессирующих eGFP, через 48 часов после трансдукции Вас-СЕ в α -MEM или р-ре Хэнкса. * $p < 0,025$ по сравнению с DMEM и α -MEM в аналогичных условиях трансдукции; & $p < 0,05$ по сравнению с DMEM при аналогичных условиях трансдукции

Из литературы известно, что внесение в буфер, содержащий бакуловирус, NaHCO_3 по не до конца ясной причине ухудшает его проникновение в клетки млекопитающих [389].

Действительно, доведение концентрации NaHCO_3 до 1,0 г/л в р-ре Хэнкса, показавшем оптимальные свойства, резко снижало эффективность трансдукции Вас-СЕ (с $89,5 \pm 4,2\%$ до $44,2 \pm 6,5\%$; $p = 0,009$), а при доведении концентрации NaHCO_3 до 3,0 г/л она падала до $29,5 \pm 3,7\%$. Полученные результаты позволили нам исключить использование α -MEM и DMEM с карбонатным буфером и в дальнейшем для трансдукции МСК мы вносили бакуловирусы в ФСБ или р-ре Хэнкса.

6.3 Стимуляция экспрессии трансгена после трансдукции и оценка выживаемости мезенхимных стромальных клеток после модификации бакуловиром

Для оценки выживаемости МСК ЖТ мыши после бакуловирусной трансдукции и воздействия бутирата натрия (NaBu) (5 мМ) мы трансдуцировали клетки Вас-СЕ в ФСБ или р-ре Хэнкса, после чего далее инкубировали их в присутствии NaBu или без него.

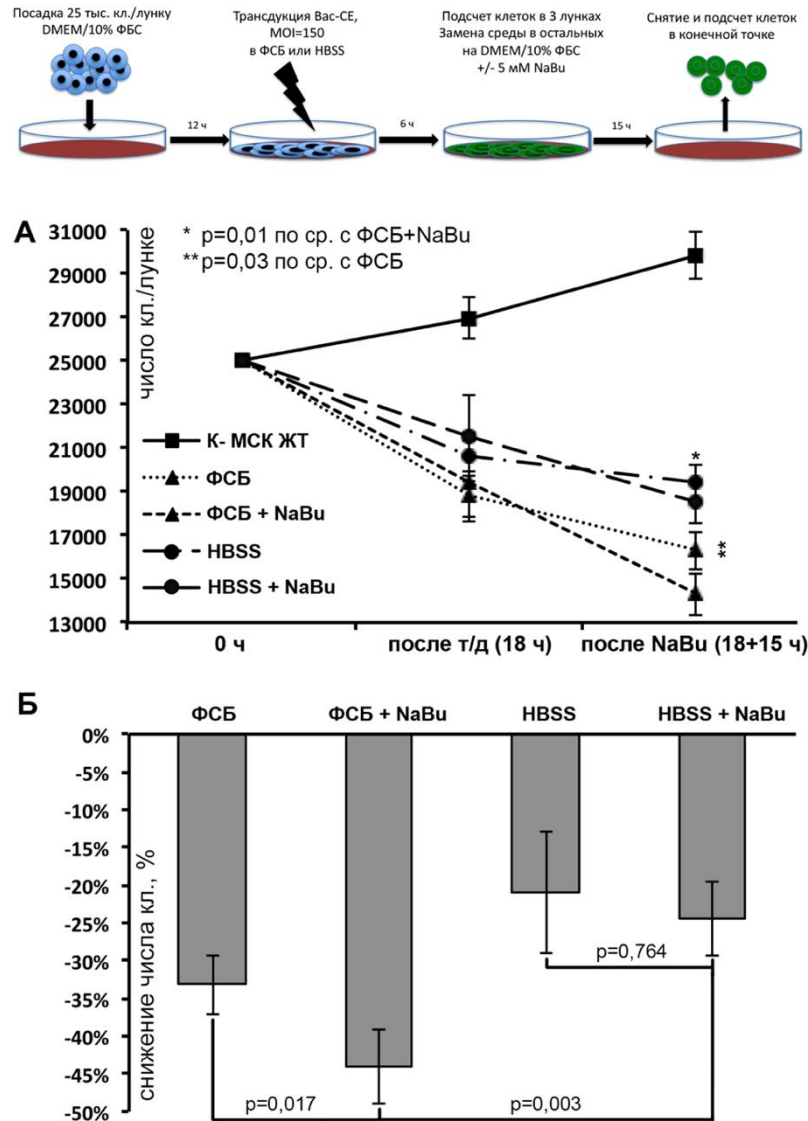


Рисунок 45 – Оценка выживаемости мезенхимных стромальных клеток жировой ткани мыши после бакуловирусной трансдукции (т/д) в фосфатном солевом буфере (ФСБ) или р-ре Хэнкса (HBSS) со стимуляцией бутиратом натрия (NaBu). Динамика количества клеток (А) показывает, что использование р-ра Хэнкса обеспечивает более высокую выживаемость в конечной точке по сравнению с фосфатным солевым буфером. Нормировка снижения числа клеток в конечной точке (18+15 часов), выраженная в % от исходных 25 тыс. клеток (Б), подтверждает преимущество р-ра Хэнкса

Внесение в среду культивирования NaBu является эффективным способом увеличения выхода экспрессируемого белка за счет его действия как неспецифического ингибитора гистондеацетилаз. Он вызывает ремоделирование хроматина и даже при кратковременном воздействии резко повышает продукцию целевого белка, однако при высоких концентрациях обладают токсическим действием [390].

После 6 часов трансдукции Vac-CE (MOI=150) мы зафиксировали сопоставимое уменьшение количества клеток на 15-20% как в ФСБ, так и в р-ре Хэнкса (рисунок 45, А), причем в ФСБ это снижение было чуть более заметным. После отмывки и инкубации в среде DMEM/10% ФБС с добавлением 5mM NaBu в течение 15 часов во всех образцах отмечалось снижение числа МСК по сравнению с контрольной средой DMEM/10% ФБС (рисунок 45, Б). Особенно выраженным падение числа клеток было после обработки NaBu в ФСБ, достигавшее $-44,1 \pm 5,4\%$, что было значимо хуже, чем без инкубации с 5 mM NaBu в таком же буфере ($-33,7 \pm 4,4\%$; $p=0,017$). Тем не менее, выживаемость МСК в конечной точке эксперимента была выше при использовании в качестве буферной системы р-ра Хэнкса, в т.ч. и после обработки клеток NaBu.

Таким образом, более богатый по сравнению с ФСБ состав р-ра Хэнкса, содержащего, в т.ч. 1,0 г/л D-глюкозы, оказался более благоприятной средой для проведения как трансдукции, так и обработки МСК NaBu, сглаживая токсическое действие последнего и стресс, вызванный вирусной инфекцией с высокой MOI. Исходя из этого, бакуловиральная трансдукция КП из МСК ЖТ с целью повышения продукции VEGF165 проводилась в р-ре Хэнкса.

6.4 Продукция VEGF165 после бакуловиральной трансдукции клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток

Отработанный нами протокол бакуловиральной трансдукции КП из МСК ЖТ мыши (1,0 млн. клеток) в р-ре Хэнкса в течение 6 часов был использован для экспрессии VEGF165 человека с помощью двух векторов – «Vac-FCVW» с геном VEGF165 фланкированным FRT-последовательностями и «Vac-FLP» с геном дрожжевой FLPo-рекомбиназы. При обеих выбранных MOI (75 или 150) мы с помощью видоспецифичной ИФА обнаружили продукцию VEGF165 человека, которая значимо возрастала при обработке 5mM NaBu (рисунок 46) уже через 48 часов.

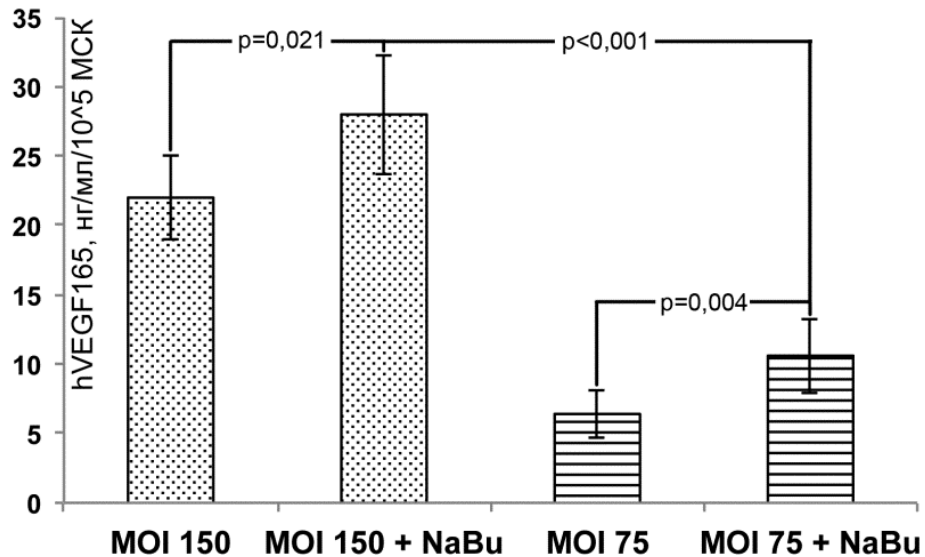


Рисунок 46 – Продукция человеческого VEGF165 клеточными пластами из мезенхимных стромальных клеток мыши после трансдукции Vac-FCVW/Vac-FLPo. Данные иммуноферментного анализа через 48 часов после трансдукции, концентрацию VEGF165 нормализовали на количество клеток после трипсинизации клеточных пластов

Хорошо видно также, что удвоение MOI (с 75 до 150) давало кратный прирост продукции VEGF165, которая при дополнительной стимуляции NaBu достигала $27,2 \pm 4,0$ нг/мл/ 10^5 клеток.

6.5 Исследование ангиогенной эффективности клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток, экспрессирующих VEGF165, на модели ишемии задней конечности мыши

После индукции односторонней ишемии задней конечности МСК в кол-ве 1,0 млн. клеток были введены в ишемизированные мышцы с помощью инъекции или путем трансплантации КП с ушиванием кожи над его поверхностью. КП хорошо адгезировал на поверхности скелетной мышцы и не требовал дополнительной фиксации. В группе трансплантации КП вне зависимости от того, был ли он трансдуцирован для экспрессии VEGF165, мы зафиксировали увеличение перфузии ишемизированной конечности, начиная с 7 дня (диаграмма на рисунке 47). На 7-й день мы не выявили значимых отличий показателей перфузии между группой трансдуцированных КП, экспрессирующих VEGF165 (VEGF-КП МСК) и группой КП, подвергнутых ложной трансдукции (КП МСК) ($44,3 \pm 11,6\%$ по сравнению с $35,2 \pm 11,1\%$ соответственно; $p = 0,286$). На 7 день только группа VEGF-КП МСК показала значимое отличие показателей перфузии по сравнению нелеченым отрицательным контролем, в котором она не превышала $22,7 \pm 8,5\%$. К 7 дню в группе инъекции МСК наблюдались незначительные

положительные изменения со средним значением относительной перфузии $26,7 \pm 5,3\%$ ($p=0,36$ по сравнению с нелеченым 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 ключевым индикатором усиления ангиогенного ответа после трансдукции стало значимое ($p = 0,038$) превосходство группы VEGF-КП МСК по сравнению с ложно-трансдуцированными КП МСК. Введение суспензии МСК в нашем эксперименте приводило к умеренной тенденции к приросту скорости кровотока ($40,2 \pm 4,8\%$), но без статистической значимости по сравнению с нелечеными мышами ($p=0,19$) и значимо уступая трансплантации КП ($p=0,01$).

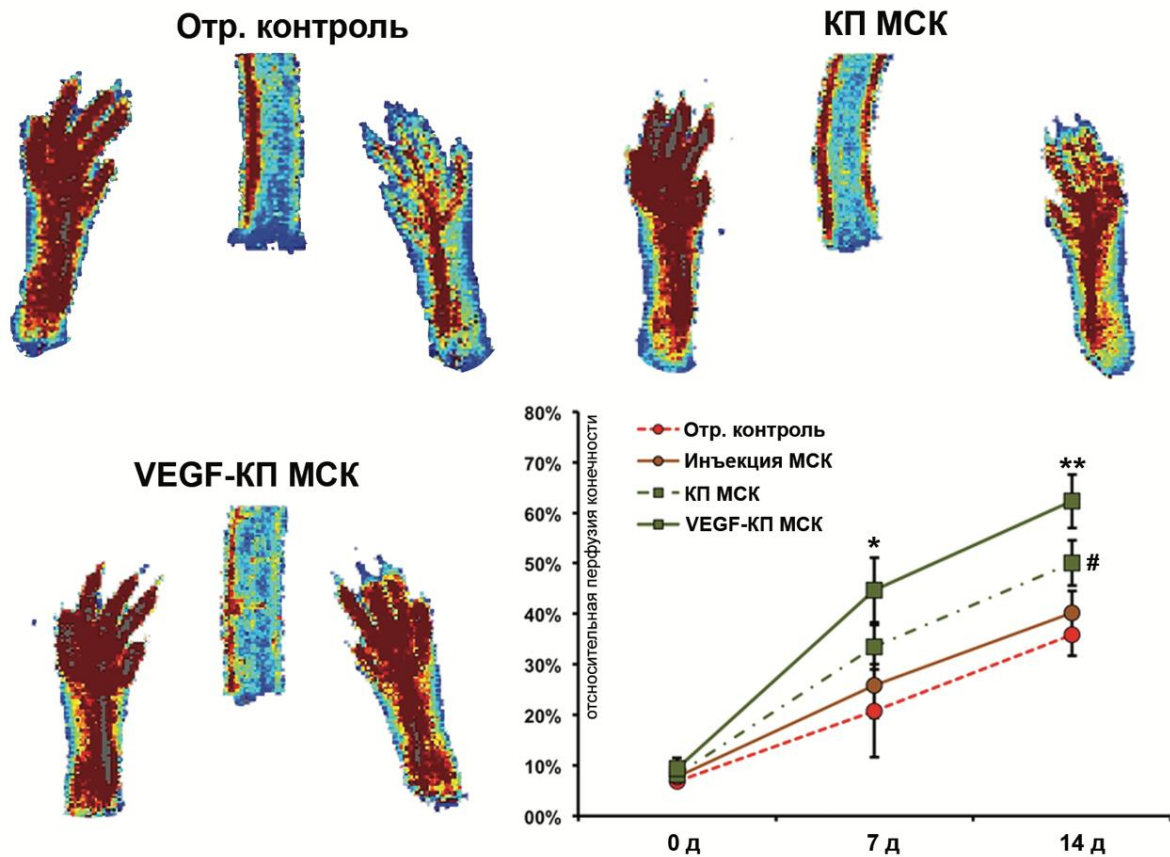


Рисунок 47 – Динамика восстановления перфузии ишемизированной конечности в группах эксперимента. Представлены полученные на 14 день доплеровские сканограммы задних конечностей мышей; диаграмма отражает динамику перфузии конечности в группе нелеченого отрицательного контроля ($n=9$) или животных, которым подкожно трансплантировали VEGF-экспрессирующие клеточные пласты («VEGF-КП МСК», $n=7$), ложно-трансдуцированные клеточные пласты («КП МСК», $n=7$) или внутримышечно вводили мезенхимные стромальные клетки («Инъекция МСК», $n=7$); $*p < 0,025$ по сравнению с нелеченым контролем; $ p=0,007$ по сравнению с нелеченым контролем и $p=0,038$ по сравнению с группой «КП МСК»; $\# p=0,01$ по сравнению с группой «Инъекция МСК»**

Следует отметить, что действие экспрессируемого VEGF165 по нашим данным, оставалось локальным, несмотря на высокую продукцию этого ФР после трансдукции КП соответствующими векторами. Для исключения системной диссеминации человеческого белка мы провели ИФА образцов плазмы, взятой у животных на 3 и 7 дни после трансплантации генетически модифицированных КП. При этом мы не выявили VEGF165 в центральной венозной крови – значения оптической плотности были ниже порога детекции ИФА и совпадали с таковыми для образца плазмы, взятого до трансплантации КП.

6.6 Оценка выживаемости модифицированных пластов из мезенхимных стромальных клеток после подкожной трансплантации

После умерщвления животных кожу в области трансплантации аккуратно рассекали, после чего мы могли обнаружить КП, плотно адгезированный к мышцам, но не к подкожной клетчатке. Это позволило нам выделить часть мышцы вместе с ТИК, которая выглядела как полупрозрачный диск, расположенный на поверхности ткани в области ранее иссеченной *a. femoralis*. Полученные срезы ткани позволили нам на 14 день обнаружить CMFDA+ МСК в составе КП, которые перед трансплантацией были помечены этим красителем (рисунок 48, нижний ряд). Для флуоресцентной метки МСК, которые вводились инъекционно, мы использовали красный краситель CM-Dil, и с его помощью смогли обнаружить включения МСК, расположенные вокруг мышечных волокон в средней части среза около места инъекции (рисунок 48, верхний ряд). При окрашивании срезов гематоксилином и эозином мы показали, что КП имели многослойную структуру толщиной 50-100 μm . ТИК не были окружены фиброзной капсулой и располагались непосредственно на поверхности мышцы, что позволяет рассчитывать на диффузию продуцируемых МСК компонентов секрета в толщу ткани.

При оценке судьбы трансплантированных КП мы обнаружили, что их толщина составляла до 100 μm , что является пограничным значением для порога диффузии и, соответственно, мы могли рассчитывать на васкуляризацию ТИК. Иммунофлуоресцентная визуализация CD31 и α -ГМА на срезах *m. quadriceps femoris*, покрытой трансплантированным КП, обнаружила в толще меченых CMFDA ТИК множественные капилляры и редкие α -ГМА+ кровеносные сосуды более крупного диаметра (рисунок 49, А и Б).

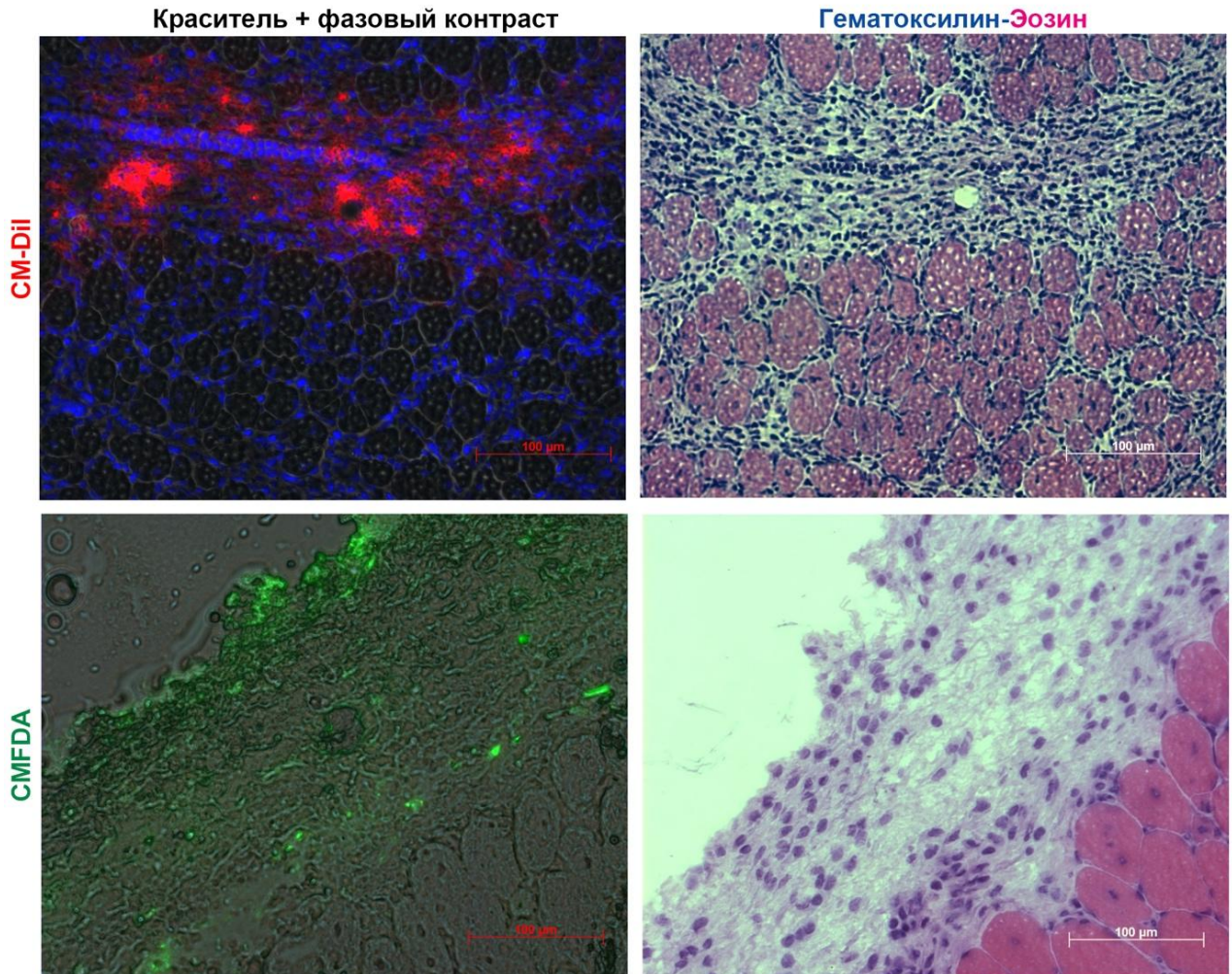


Рисунок 48 – Выживаемость мезенхимных стромальных клеток после подкожной трансплантации клеточных пластов или внутримышечного введения суспензии мезенхимных стромальных клеток. Перед трансплантацией клеточные пласты поместили CMFDA (зеленый), а суспендированные мезенхимные стромальные клетки – красителем CM-Dil (красный). На 14 день после трансплантации образцы скелетных мышц использовали для обнаружения сигнала в зоне доставки на поверхности *m. quadriceps femoris* или в толще *m. tibialis anterior*. В CMFDA-меченых пластах окрашивание ядер DAPI не проводили из-за значительного гашения сигнала после промывки срезов буфером или фиксации. Параллельные срезы окрашены гематоксилином и эозином

Васкуляризация КП была нами обнаружена во всех исследованных образцах КП, причем как в группе VEGF-КП МСК, так и в ложно-трансдуцированных КП. Интересно, что непосредственно под КП мы обнаружили большое количество «молодых» мышечных волокон с центрально расположенными ядрами [391], присутствие которых говорит об активации процесса регенерации скелетных мышц (рисунок 49, А).

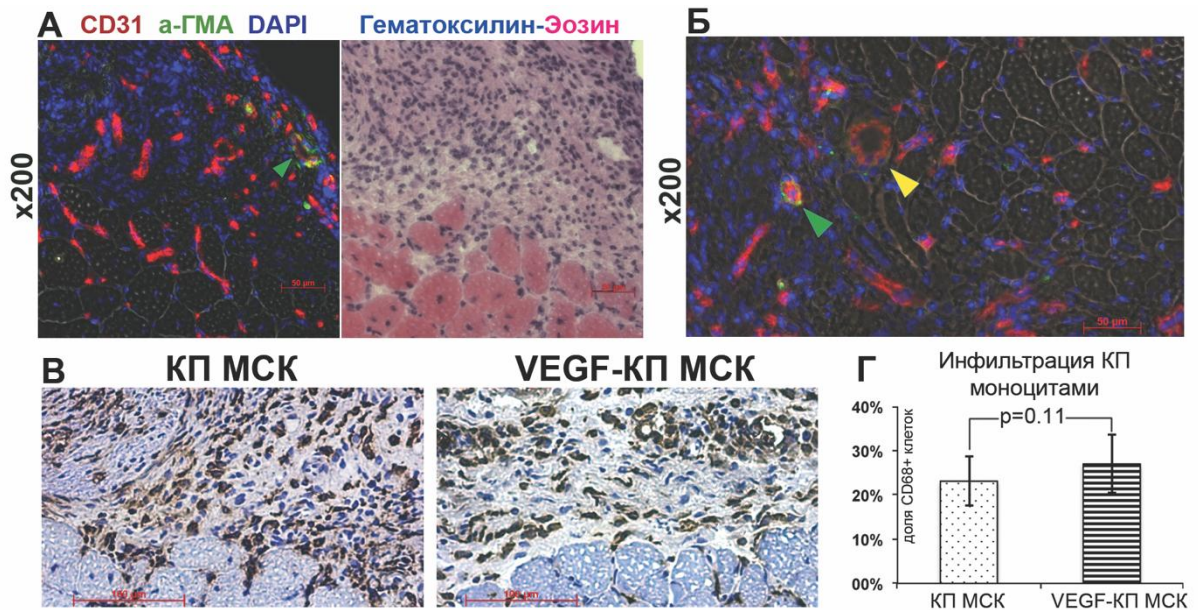


Рисунок 49 – Оценка васкуляризации и моноцитарной инфильтрации в трансплантированных клеточных пластах. На срезах клеточных пластов, были визуализированы кровеносные сосуды и клетки моноцитарного ряда; репрезентативное изображение кровеносных сосудов в клеточных пластах (А) и соответствующее окрашивание гематоксилином и эозином; репрезентативное изображение крупных сосудов (Б) в трансплантированных клеточных пластах (зеленая стрелка – α -гладкомышечный актин(+), желтая стрелка – α -гладкомышечный актин(-) 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 существенных отличий между ложно-трансдуцированными КП и VEGF-КП МСК (рисунок 49, В и Г).

6.7 Исследование пролиферации и апоптоза мезенхимных стромальных клеток в составе трансплантированных клеточных пластов, экспрессирующих VEGF165

Важнейшим с точки зрения интеграции ТИК вопросом является судьба клеток в ее составе, отслеживание которой достаточно затруднительно методически. Иммунофлуоресцентная визуализация маркеров Ki-67 и активированной каспазы-3 на срезах *m. quadriceps femoris*, покрытой меченым CMFDA КП, позволила оценить долю МСК с признаками пролиферации и апоптоза в толще конструкции на 14 день после ее трансплантации.

Ниже представлены микрофотографии, на которых указаны пролиферирующие (Ki-67+) МСК с меткой CMFDA, которые были трансплантированы в составе КП, а также делящиеся

клетки, не имеющие метки (рисунок 50). Пролiferация обоих типов клеток была нами 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 и пластов, трансдуцированных контрольным вектором, составила $6,01 \pm 1,2\%$ и $6,28 \pm 2,1\%$ соответственно ($p > 0,05$).

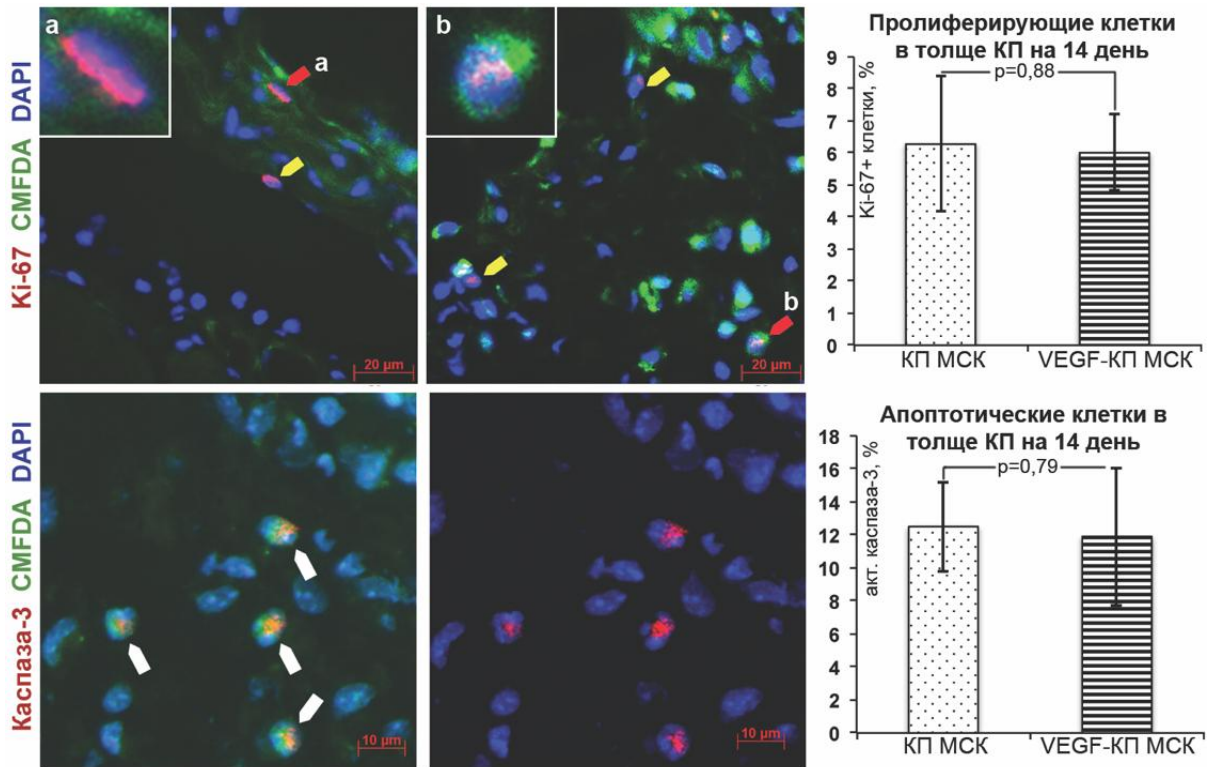


Рисунок 50 – Пролiferация и апоптоз клеток в толще подкожно трансплантированных клеточных пластов. На 14 день после трансплантации клеточные пласты выделяли с подлежащей мышцей и окрашивали на Ki-67 и активированную каспазу-3. Верхний ряд: слева и посередине – CMFDA+ (красные стрелки) и CMFDA- (желтые 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. Графики в правой колонке иллюстрируют результаты ручного подсчета пролиферирующих и апоптотических клеток в толще клеточных пластов

Оценка встречаемости апоптотических клеток показала, что сигнал, соответствующий активированной каспазе-3 обнаруживался как в ядрах, так и в цитоплазме клеток, что отражает различные стадии апоптоза. При этом статистически значимых отличий между группами нами выявлено не было (рисунок 50) – в VEGF-КП доля апоптотических клеток составила $11,9 \pm 4,2\%$, а в контрольных КП после ложной трансдукции – $12,5 \pm 2,7\%$ ($p > 0,05$).

6.8 Исследование плотности кровеносных сосудов после трансплантации модифицированных клеточных пластов, экспрессирующих VEGF165

При оценке васкуляризации *m. tibialis anterior*, расположенной анатомически ниже зоны иссечения *a. femoralis*, мы обнаружили, что к 14 дню плотность CD31+ капилляров в обеих группах трансплантации КП была выше, чем в нелеченом контроле (рисунок 51). Ручной подсчет показал, что в группе КП МСК плотность капилляров на поле зрения составила $224,3 \pm 11,8$ 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).

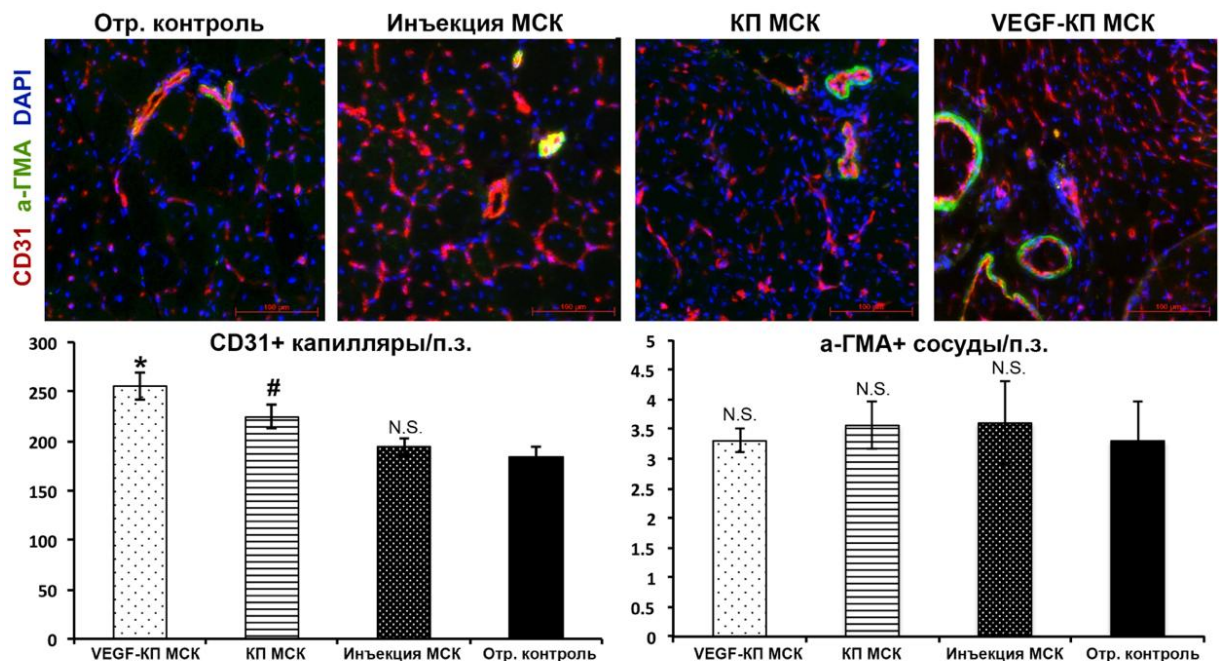


Рисунок 51 - Анализ плотности кровеносных сосудов на срезах скелетных мышц животных из групп эксперимента. Верхний ряд – репрезентативные изображения срезов *m. tibialis anterior*, забранных на 14 день; иммунофлуоресцентная визуализация CD31 и α-гладкомышечного актина; ядра докрашены DAPI, увеличение $\times 200$; нижний ряд – графическое представление анализа плотности кровеносных сосудов со средними групповыми значениями в поле зрения (п.з.); $n=6$ /группе; * $p < 0,05$ по сравнению с нелеченым контролем; ** $p < 0,025$ по сравнению с инъекцией суспензии и нелеченым контролем; N.S. – $p > 0,05$

После инъекционного введения МСК плотность капилляров была значимо ($p=0,01$) ниже, чем в группе трансплантации КП, после которой плотность капилляров составила $194,5 \pm 8,8$ в поле зрения. К нашему удивлению, это было незначимо выше, чем в группе отрицательного

нелеченого контроля ($p=0,032$), однако эти данные коррелировали с отсутствием усиления перфузии после инъекции МСК по сравнению с контрольной группой.

Восстановление кровотока при ишемии конечности происходит также за счет ремоделирования мелких коллатералей и формирования более крупных кровеносных сосудов с выраженной муральной компонентой в виде α -ГМА+ клеток. Проведенная во всех экспериментальных группах гистологическая оценка плотности крупных кровеносных сосудов выявила сопоставимую плотность (на поле зрения), которая составила $3,31 \pm 0,6$ в группе отрицательного нелеченого контроля; $3,5 \pm 0,61$ в группе инъекции МСК; $3,56 \pm 0,4$ в КП МСК и $3,41 \pm 0,21$ в группе трансплантации VEGF-КП МСК ($p > 0,05$; тест Крускала-Уоллиса). Возможным объяснением отсутствия отличий групп по интенсивности ангиогенеза является относительно ранний срок окончания эксперимента – 14 дней, которых недостаточно для полноценного ангиогенеза в ишемизированной ткани.

6.9 Оценка распространенности некроза ишемизированной скелетной мышцы после трансплантации клеточных пластов, экспрессирующих VEGF165, и немодифицированных конструкций

Предотвращение некроза скелетных мышц является важнейшим гистологическим параметром, который напрямую связан с важнейшей для клинического применения конечной точкой – вероятностью гангрены и ампутации конечности. Наблюдавшееся нами усиление перфузии и увеличение плотности кровеносных сосудов могло благоприятно сказаться на кровоснабжении и, соответственно, снизить гипоксию и некроз скелетных мышц.

Мы использовали срезы *m. tibialis anterior*, расположенной в области, страдающей от наиболее тяжелой ишемии после иссечения *a. femoralis*. Морфометрический анализ окрашенных гематоксилином и эозином срезов проводился с помощью пакета ImageJ (НИН, США) и на каждом срезе выделялись по площади области сохранных мышц, инфильтрации клетками воспаления и некротизированная область с разрушенными и лишенными ядер «тенями» мышечных волокон. В группе нелеченого контроля соотношение эти трех типов областей было близким к 1:1:1 (график на рисунке 52). При инъекционном введении 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 более, чем двухкратным преимуществом по сравнению с группой 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).

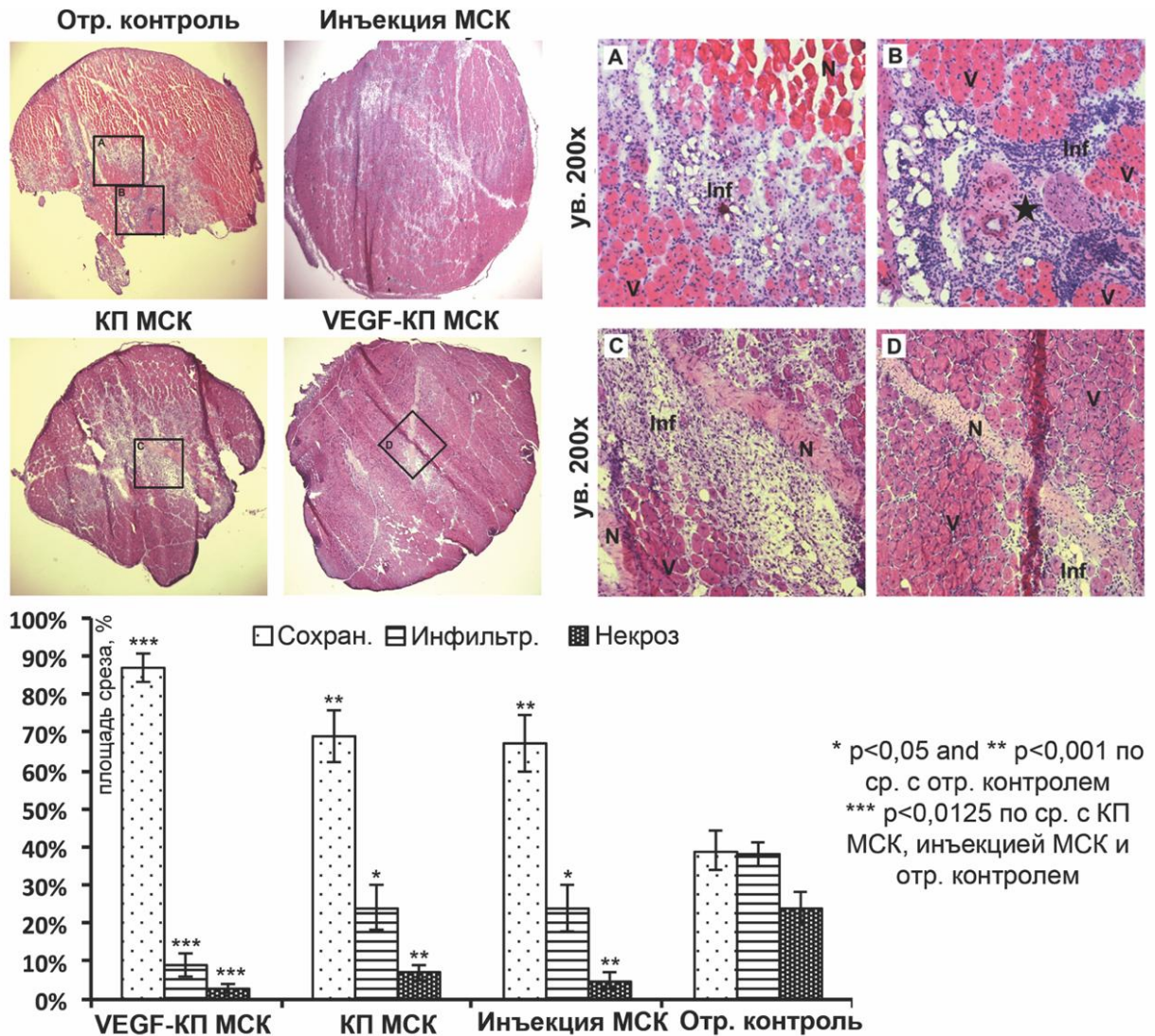


Рисунок 52 – Результаты морфометрии скелетных мышц в группах исследования. Вверху слева – микрофотографии срезов мышц, окрашенных гематоксилином и эозином; вверху справа (A-D) – выноски с микрофотографий, обозначенные соответствующими буквами на фотографиях вверху слева: А – пограничный участок с некротическими волокнами (N), воспалительно-клеточным инфильтратом (Inf) и жизнеспособной тканью (V); В – артерио-венозно-нервный комплекс (звездочка) с выраженной воспалительной экстравазацией; С и D – фиброз на месте разрешившегося ишемического некроза. Нижний ряд – графическое представление результатов морфометрии

Закономерно в обеих группах, где была выполнена трансплантация КП из МСК ЖТ, наблюдалось резкое увеличение площади сохранной ткани, которое было максимальным в группе VEGF-КП МСК (рисунок 52).

Таким образом, на данном этапе нами был разработан подход к получению модифицированных ТИК в виде пластов из МСК ЖТ, проведен подробный анализ их

эффективности и установлено преимущество как перед суспензионным введением и 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. Эффективность такой стратегии подтверждена нами как в функциональном тесте (лазер-доплер), так и гистологически по усилению капиллярного ангиогенеза после трансплантации VEGF-КП МСК. Помимо стандартной оценки выживаемости клеток мы также оценили протективные свойства разработанной конструкции и обнаружили резкое уменьшение распространенности некроза в мышцах. Его можно отнести на счет как прямого действия обогащенного VEGF165 секретомы, так и объяснить нормализацией кровоснабжения мышц.

Основным механизмом действия КП из МСК с высокой экспрессией VEGF165 является локальное паракринное действие, высокая степень интеграции КП подтверждается васкуляризацией ТИК, а также присутствием в ее толще пролиферирующих МСК. Не менее важным результатом стало подтверждение отсутствия выраженного апоптоза и моноцитарной инфильтрации, которая теоретически могла быть вызвана трансдукцией бакуловирусом *in vitro*, а также провоспалительным действием VEGF165.

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

ГЛАВА 7. ОЦЕНКА ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК В СОСТАВЕ КЛЕТОЧНЫХ ПЛАСТОВ И ВЫЯСНЕНИЕ МЕХАНИЗМА САМООРГАНИЗАЦИИ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПРИ ФОРМИРОВАНИИ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ

7.1 Актуальность направления исследований и формулировка задачи

Помимо опосредованной продукцией секрета паракринной активности, важность которой для регенераторной эффективности КП была нами показана выше, нас интересовал вопрос о дифференцировочном потенциале МСК при переходе в ТИК в виде пласта. К настоящему времени молекулярные механизмы самоорганизации, лежащей в основе получения ТИК на основе МСК, изучены достаточно поверхностно. В этой связи мы поставили задачу по углубленному изучению транскриптомного профиля МСК для определения дальнейшего направления исследований и выяснения закономерностей, действующих в КП как клеточной системе *ex vivo*.

Кроме того, нами было выдвинуто предположение о том, что самоорганизация МСК идет с вовлечением процесса конденсации, который присущ источнику этого типа клеток – эмбриональной мезенхиме в ходе морфогенеза и формирования СТ организма во внутриутробном развитии, а также имеет важную роль в регенерации опорно-двигательного аппарата после повреждения [298, 300].

7.2 Выяснение эффективности дифференцировки мезенхимных стромальных клеток в составе клеточных пластов

Для исследования способности МСК в составе КП к дифференцировке нами был проведен сравнительный анализ ее эффективности в плотном монослое МСК ЖТ и в КП, собранном из них за 10 суток культивирования. В связи с данными о вариабельности первичного донорского материала [392, 393], в экспериментах ниже мы использовали коммерчески доступную линию ASC52telo (ATCC® SCRC-4000, ATCC, США). Она представляет собой культуру МСК ЖТ, иммортализованных введением гена теломеразы (*TERT*), что позволяет пассировать их по заявлениям производителя до 70-80 пассажа без потери фенотипа МСК, пролиферативной активности и стабильности кариотипа.

В ходе данного эксперимента нами были оценены три основных направления дифференцировки МСК: остео-, хондро- и адипогенное (рисунок 53, А). Следует уделить внимание методу оценки эффективности дифференцировки, которая затруднительна в составе

ТИК из-за высокой структурной плотности и накопления ВКМ в ходе их сборки. Количественную оценку эффективности дифференцировки МСК в КП и монослое осуществляли в экстрактах, полученных добавлением ДМСО к культурам после окрашивания культур соответствующими красителями и лизирования. Фотометрию экстрактов проводили на длинах волн, соответствующих использованным красителям (Oil Red O, ализариновый красный или толуидиновый синий).

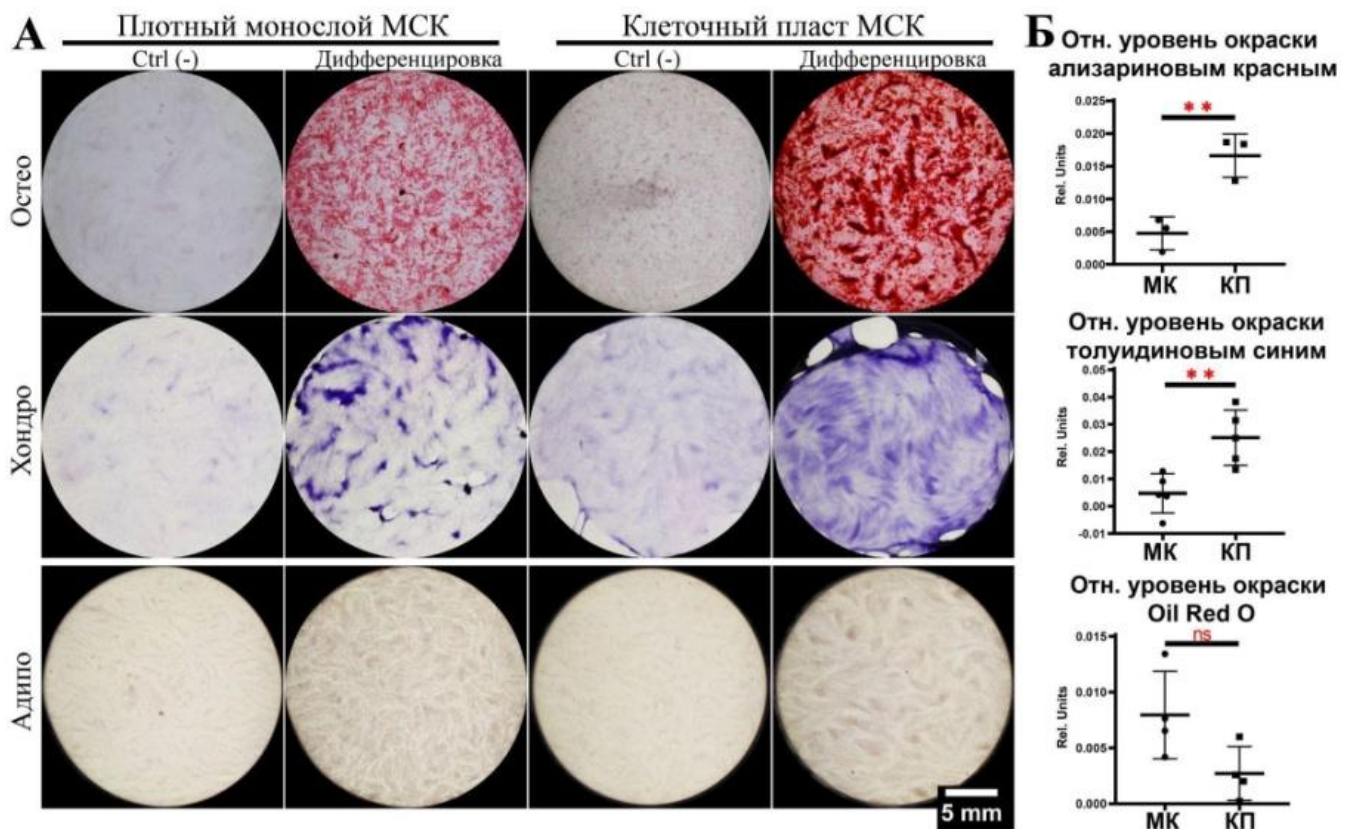


Рисунок 53 – Сравнительный анализ эффективности дифференцировки мезенхимных стромальных клеток в составе клеточных пластов и в монослойных культурах. Монослойные культуры и пласты, окрашенные на 15 день остеогенной дифференцировки, 21 день хондрогенной или 18 день адипогенной дифференцировки (А). Результаты сравнительного анализа содержания специфических красителей (Б) после окончания дифференцировки в монослое или в составе пласта (n=3). Окрашивание ализариновым красным, толуидиновым синим или Oil Red O

Нормировка количества экстрагированного красителя для поправки на различие количества клеток в монослойной культуре и КП велась с использованием флуоресцентного красителя PicoGreen. Отражающие фоновое удержание красителей значения контрольных культу вычитали из показателей дифференцированных культур и в итоге вычисляли относительный показатель эффективности дифференцировки МСК в монослое и в составе КП.

Мы обнаружили, что МСК в составе КП эффективнее дифференцируются в остео- и хондрогенном направлениях по сравнению с монослойными культурами (рисунок 53, Б).

Различия эффективности дифференцировки МСК в адипогенном направлении между культурами достигали пограничных значений ($p = 0,06$), причем в КП имела тенденция к снижению адипогенной дифференцировки (рисунок 53, нижний ряд).

Таким образом, в данном эксперименте мы наблюдали усиление эффективности дифференцировки МСК, которое можно было бы объяснить увеличением числа клеток, депонирования ВКМ и усилением их секреторной активности с аутокринным влиянием на МСК. Нами было установлено, что в составе ТИК в виде пластов МСК усиливают дифференцировку в направлениях, морфогенез которых зависит от конденсированного состояния мезенхимы – остео- и хондрогенном (рисунок 53, А). При этом мы не обнаружили усиления адипогенеза (рисунок 53, Б), что говорит о предпочтительном пути дифференцировки в плотные СТ, что воспроизводит основные черты конденсации мезенхимы при развитии и регенерации *in vivo* [298, 299, 300]. Исходя из этого, нами был сделан вывод, что в составе КП МСК претерпевают конденсацию с выбором двух направлений дифференцировки, исключая одно из них и повышающим эффективность остальных. Такой ход событий позволяет предполагать, что локальное окружение КП или события в ходе его сборки способствуют коммитированию МСК в остео- и хондрогенном направлениях.

Получив эти данные, мы решили подробнее описать процесс сборки КП из монослойной культуры МСК и провели анализ как во времени с помощью цейтраферной съемки, так и по морфологии клеток в составе КП в конечной точке.

7.3 Оценка морфологических изменений в ходе сборки клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток

В связи с тем, что для описанного выше эксперимента использовали иммортализованную культуру МСК (ASC52telo), мы также решили провести сборку КП из первичных МСК жировой ткани здоровых доноров ($n=5$). Было обнаружено, что клетки, как первичных культур, так и иммортализованной линии обладали способностью формировать многослойные конструкции в виде пластов, в которых к 12-14 дню культивирования образовывались области повышенной плотности клеток (рисунок 54).

Было отмечено, что в первичных культурах МСК ЖТ области повышенной плотности были меньше по сравнению с иммортализованной линией ASC52telo. Данное различие могло определять формирование структур переменного размера и формы, в т.ч. в ходе регенерации. В качестве ближайшей аналогии можно привести отличие паттернов в культурах высокой плотности (микромассах) мезенхимных клеток [394], выделенных из различных участков эмбриона (например, верхней и нижней конечностей) [395].

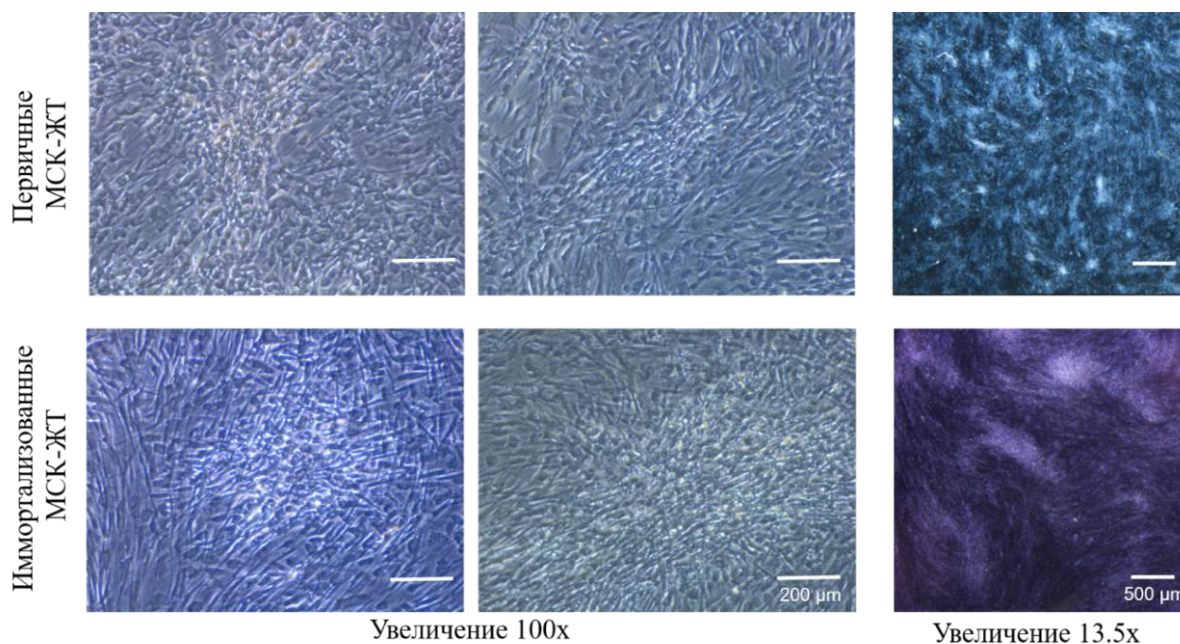


Рисунок 54 – Первичные и иммортализованные мезенхимные стромальные клетки жировой ткани образуют области повышенной плотности в составе тканеинженерных конструкций в виде пластов; микрофотографии на 14 день культивирования, фазово-контрастная микроскопия

Одной из особенностей первичных культур МСК является высокая вариативность их характеристик, в т.ч. связанная с особенностями донора ткани, из которых они выделены. В этой связи для дальнейших исследований мы приняли решение использовать коммерчески доступную иммортализованную линию МСК ЖТ человека ASC52telo (ATCC, США). Они продемонстрировали, в общих чертах, сопоставимый с первичными МСК паттерн самоорганизации при сборке КП и представлялись нам более удобным объектом для поисковой работы.

7.4 Самоорганизация мезенхимных стромальных клеток и оценка фенотипа клеток в исходе сборки клеточного пласта

При цейтраферной съемке в течение 14 суток 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 концентрической миграции МСК с активной пролиферацией клеток, начиная с 7-8 дня. Области высокой плотности стабилизировались к 9-11 дням и в дальнейшем сохранялись в готовой к снятию ТИК. До уточнения механизма и характеристик образованных областей высокой плотности в составе КП, мы использовали термин «компактные области», а процесс их самоорганизации был обозначен термином «компактизация». Помимо областей с повышенной плотностью в структуре КП в ходе

самоорганизации дифференцируются области с более низкой плотностью, называемые далее «разреженными областями». При оценке изменения площади вовлеченных в процесс компактизации областей (рисунок 55) оказалось, что она при этом значительно уменьшается, в среднем от 2 до 8 раз по сравнению с исходной.

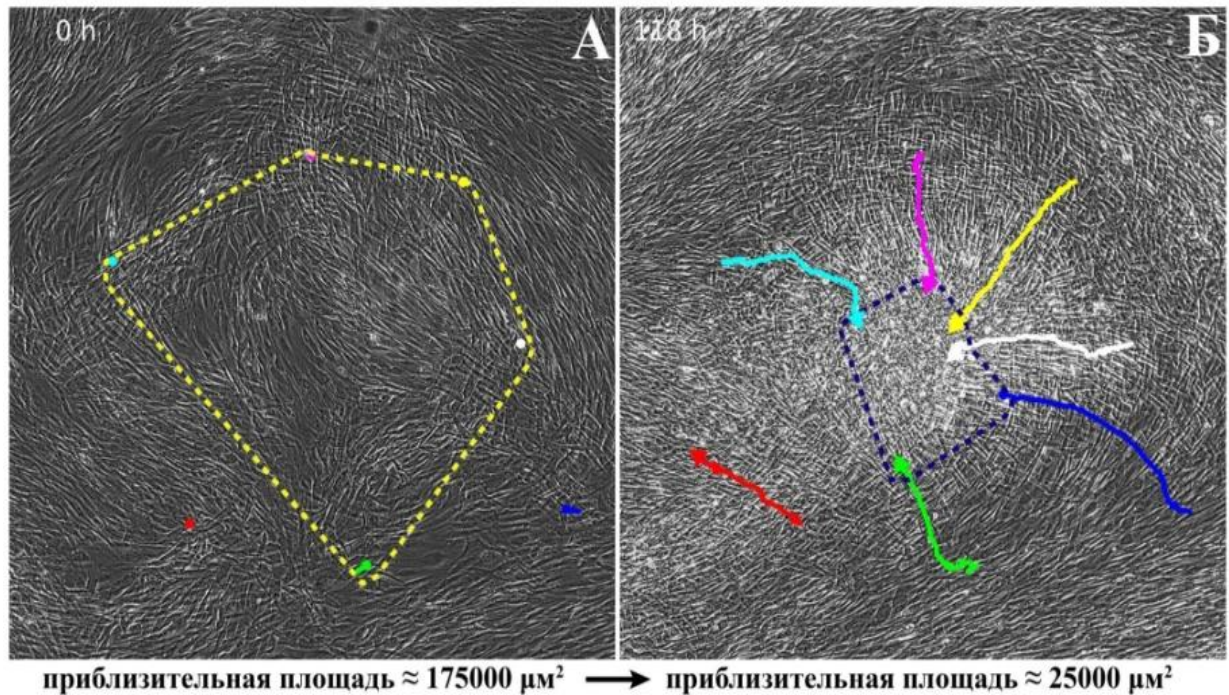


Рисунок 55 – Спонтанное формирование компактных областей в клеточных пластах путем групповой миграции мезенхимных стромальных клеток сопровождается уменьшением площади затронутых областей. Первоначальное состояние наблюдаемой области в культуре, и она же через 118 ч. Цветными точками отмечены клетки, произвольно выбранные на поверхности культуры в начале наблюдения, а треками того же цвета их траектории. Площадь пунктирного многоугольника, заключающего выбранные точки в первоначальный момент наблюдения (А), составляет $\approx 175000 \text{ мкм}^2$, а через 118 ч (Б) площадь многоугольника, заключающего выбранные точки, уменьшилась до 25000 мкм^2 . Фазово-контрастная микроскопия; ув. $\times 100$; стоп-кадры цейтраферной съемки

В результате описанных выше процессов ландшафт клеточной культуры приобретал отчетливую анизотропную структуру (рисунок 56). Подобный паттерн, ранее названный «холмы и долины» (англ. “*hills and valleys*”), описан в первичных культурах гладкомышечных клеток человека [396, 397], сходную картину анизотропии клеточной плотности наблюдали в многослойной культуре МСК КМ при формировании ими костных узелков [308, 309].

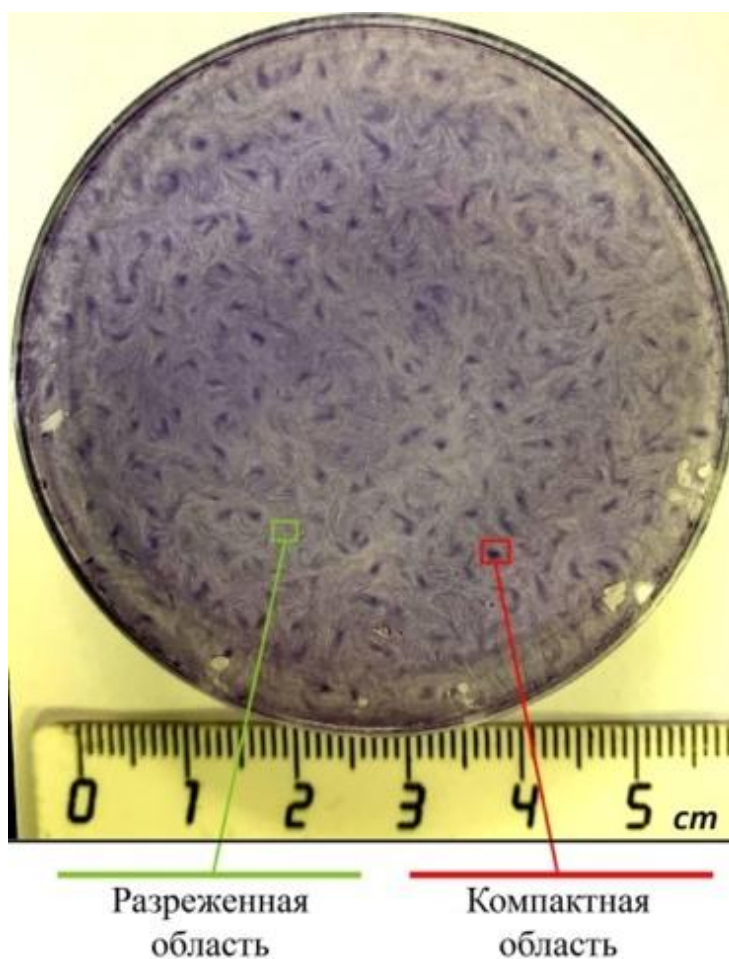


Рисунок 56 – Клеточный пласт, окрашенный гематоксилином для контрастирования областей с различной степенью компактизации. Компактные области визуализируются как участки клеточных пластов с высокой плотностью ядер и окружены разреженными областями низкой плотности. Клеточные пласты собирали в чашках диаметром 60 мм в течение 14 дней

Цейтраферная съемка процесса компактизации также зафиксировала активную миграцию клеток, которая требует перестройки и реорганизации цитоскелета, в т.ч. актинового. С целью визуализации фибрилл F-актина в различных областях КП нами был использован флуоресцентно меченый фаллоидин. Анализ полученных изображений показал, что компактные области КП содержат клетки, в которых актиновые филаменты организованы в напоминающие стресс-фибриллы регулярные структуры (рисунок 57), не наблюдавшихся в разреженных областях. Такого рода перестройки указывают на то, что при компактизации МСК в составе КП происходят очень выраженные изменения статуса актинового цитоскелета, необходимого для миграции клеток.

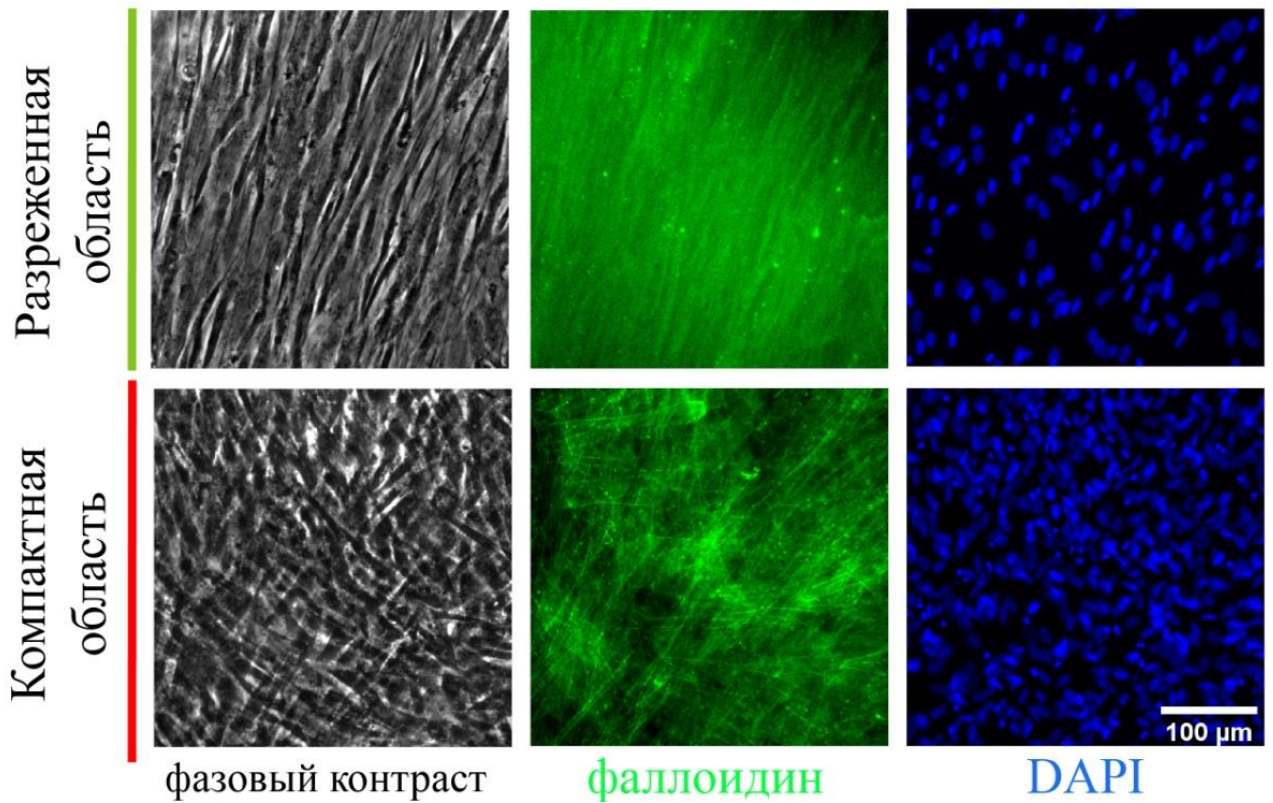


Рисунок 57 – Характеристика состояния цитоскелета мезенхимных стромальных клеток в компактных областях. Окраска флуоресцентно меченым фаллоидином выявила присутствие актиновых стресс-фибрилл в клетках, находящихся в составе компактных областей; флуоресцентная и фазово-контрастная микроскопия; ув. $\times 200$; ядра клеток окрашены DAPI

Известно, что появление в цитоплазме МСК актиновых фибрилл связано с их участием в репаративной регенерации и, в частности, с фенотипическим переходом в миофибробласты. Одним из ключевых маркеров миофибробластов является увеличение накопления α -ГМА, за счет которого они способны к выраженной контракции, необходимой для сближения краев раны и ее заживления [398, 399]. Поскольку процесс компактизации, наблюдавшийся нами, сопровождался уменьшением площади, которое можно отнести к феномену контракции, мы оценили представленность α -ГМА⁺ клеток, позитивных по главному маркеру миофибробластов (рисунок 58).

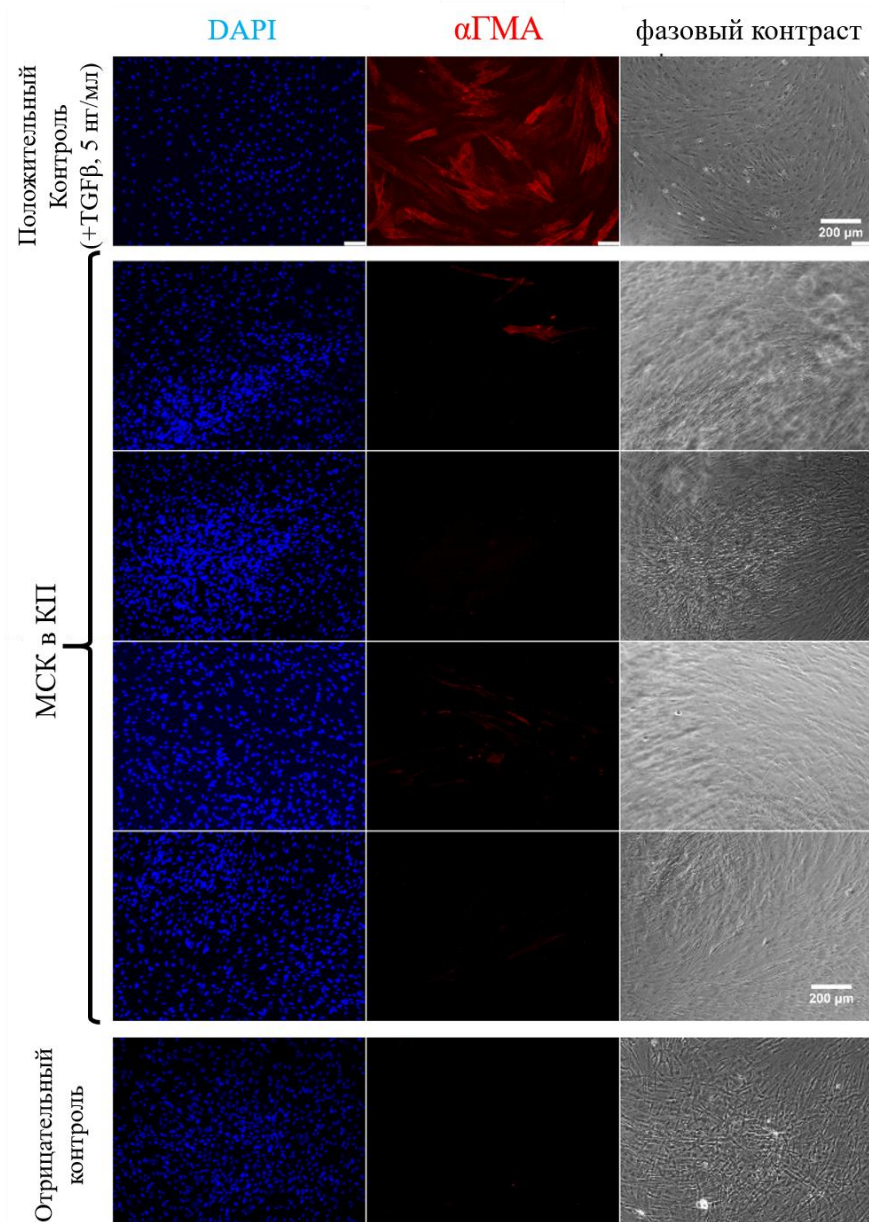


Рисунок 58 – Визуализация α -гладкомышечного актина в составе собранного клеточного пласта. Иммунофлуоресцентная визуализация с помощью антител к α -гладкомышечному актину не выявила значительного количества миофибробластов. Положительный контроль: индуцированная TGF- β 1 (5 нг/мл, 4 дня) культура мезенхимных стромальных клеток с признаками дифференцировки в миофибробласты; флуоресцентная и фазово-контрастная микроскопия; ув. $\times 100$; ядра клеток окрашены DAPI

Мы не обнаружили значимой представленности α -ГМА+ клеток в КП и их компактных областях, что не позволяет связать миграцию МСК при компактизации с появлением способных к контракции миофибробластов. В значительной степени это подкрепляет предположение о сходстве наблюдавшейся миграции с процессами конденсации, которая ассоциирована не с появлением миофибробластов, а с сонаправленной агрегацией МСК с последующими изменениями их транскриптомного и функционального профиля.

Ход самоорганизации МСК в составе КП (рисунок 55) и показанные нами изменения организации актинового цитоскелета МСК в компактных областях КП (рисунок 57) указывают на определенное сходство компактизации МСК *in vitro* с процессом конденсации мезенхимы. Отсутствие значимой представленности α -ГМА+ клеток после формирования КП (рисунок 58) указывает на то, что в данном состоянии они не приобретают фенотип миофибробластов и теоретически *in vivo* могут быть звеном эпиморфной регенерации, а не фиброобразования, для которого миофибробласты являются основным клеточным эффектором.

7.5 Дифференцированный анализ окружения в составе компактных и разреженных областей клеточных пластов

7.5.1 Оценка содержания коллагена I типа и клеточного фибронектина в составе клеточных пластов и их компактных областей

В процессы конденсации мезенхимы *in vivo* и *in vitro* активно вовлечены белки ВКМ, состав которого может значимо меняться, в т.ч. с выраженным локальным перераспределением и ремоделированием. Так, клеточный фибронектин (также упоминаемый под названием «ВД-А фибронектин») играет роль в инициации конденсации [298], а коллагены различных типов определяют влияние конденсации на дифференцировочную способность клеток [134, 300]. Показанная нами высокая минерализация ВКМ (рисунок 53, А), локализация которой после остеогенной дифференцировки совпадала с компактными областями в составе КП, говорит о содержании в них ВКМ компетентного к минерализации. Сравнение состава ВКМ в компактных и разреженных областях КП проводили с помощью дот-ИФА, в ходе которого полуколичественно определяли содержание коллагена I типа и клеточного фибронектина. Для этого мы использовали лизаты областей КП с различной степенью компактизации, разделенных путем лазерной микродиссекции (рисунок 59). Также в качестве референсных образцов мы провели анализ лизатов монослойной культуры МСК и всего КП без деления областей микродиссекцией.



Рисунок 59 – Использование микродиссекции для разделения компактных и разреженных областей клеточного пласта из иммортализованных мезенхимных стромальных клеток жировой ткани (ASC52telo)

Для нормировки при сравнении образцов мы определяли количество общего белка с помощью неспецифического красителя (амидового черного), а для количественного определения содержания белков ВКМ использовали калибровку, полученную при анализе стандартных образцов МСК с серийным разведением. В результате оказалось, что в лизатах цельных КП содержание коллагена I типа было сопоставимо с содержанием в тотальной фракции монослоя МСК, в то время как содержание клеточного фибронектина в КП было увеличено в 4,5-5 раз (рисунок 60, А и Б, верхняя часть).

Проведя лазерную микродиссекцию КП и разделив компактные и разреженные области ТИК, мы провели аналогичный сравнительный анализ. Нами было выявлено 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 (рисунок 60, А и Б, нижняя часть), между которыми не было выявлено значимых различий его содержания. Таким образом, нами был установлен дифференциальный характер депонирования структурных белков ВКМ между областями КП с различной степенью компактизации МСК.

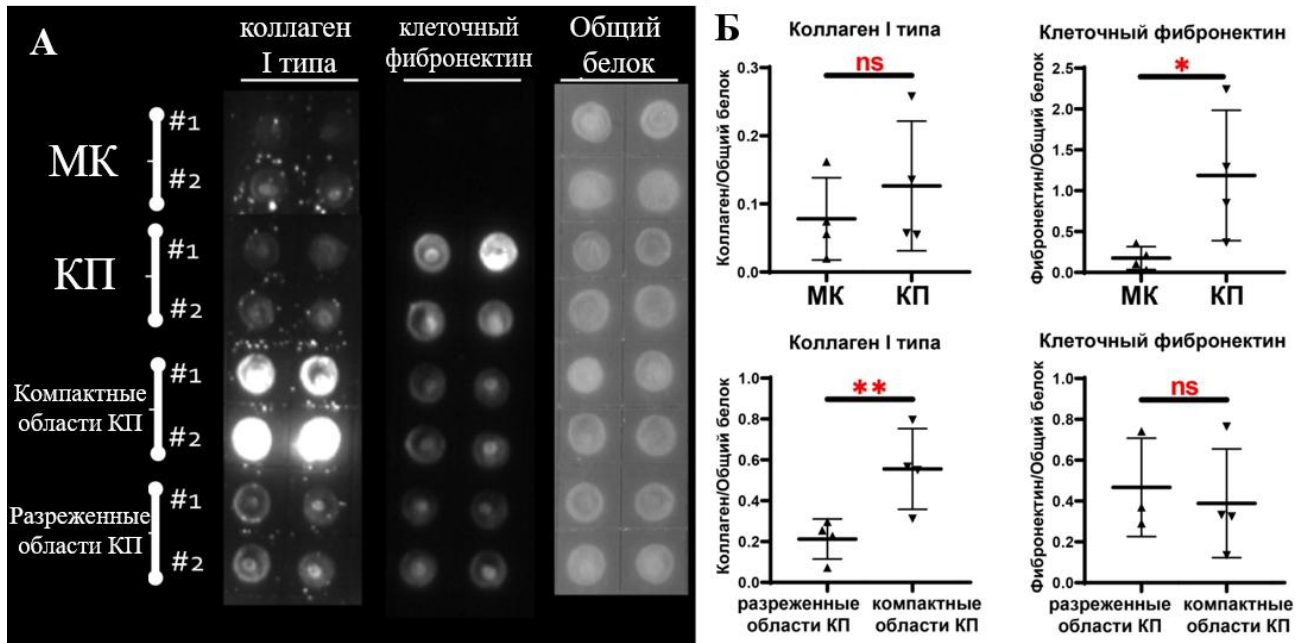


Рисунок 60 – Анализ содержания компонентов внеклеточного матрикса в монослойных культурах и клеточных пластах из мезенхимных стромальных клеток. Результаты оценки методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием серийного разведения стандартных образцов для получения калибровочных кривых; дополнительная нормировка проведена на общее количество белка, измеренное в каждой пробе с помощью окраски амидовым черным. Репрезентативные результаты (А) одной из повторов эксперимента ($n=4$) и их статистический анализ (Б)

Клеточный фибронектин известен как один из ключевых компонентов ВКМ для инициации конденсации мезенхимных клеток *in vivo*, а его количество определяет геометрические характеристики конденсатов. Его депонирование является проявлением дифференциальной способности мезенхимы различного происхождения к самоорганизации, определяющей форму органов. Известно, что депонирование фибронектина необходимо именно на этапе инициации процесса конденсации [400, 401]. На более поздних стадиях его экспрессия падает, что объясняет его равномерное распределение в составе КП после компактизации МСК и окончания его сборки. При такой интерпретации полученных нами результатов процесс компактизации имеет еще одно важное сходство с конденсацией мезенхимы *in vivo* – необходимость фибронектина для реализации начальных стадий событий. Коллаген I типа является основным белком костного ВКМ, подвергающимся минерализации, и на ранних этапах остеогенеза его депонирование критически важно для успешной оссификации [402]. Коллаген I типа способствует остеогенной дифференцировке МСК за счет интегрин-опосредованной активации сигнального пути ERK1/2 [403]. В этой связи обнаруженное нами обогащение компактных областей КП коллагеном I типа до начала остеогенной дифференцировки может рассматриваться как косвенный признак коммитирования клеток в

этих областях. Выявленные нами характеристики матриксного окружения позволили нам провести определенную аналогию между компактными областями КП и описанными *in vivo* конденсатами мезенхимы, участвующими в формировании костной ткани и ее восстановлении после перелома.

7.5.2 Определение ферментативной активности щелочной фосфатазы в составе клеточных пластов и их компактных областей

Ферментативная активность щелочной фосфатазы может повышаться в МСК на самых ранних этапах остеогенеза и в дальнейшем необходима для успешной минерализации ВКМ [402]. Локальная активность ЩФ оценивалась нами гистохимическим методом в сформированных КП без индукции остеогенной дифференцировки. Для этого полученные конструкции инкубировали с хромогенным субстратом ЩФ (BCIP/NBT), при расщеплении которого образуется цветной нерастворимый осадок. При этом в компактных областях КП детектировали выраженную ферментативную активность (рисунок 61, А, Б).

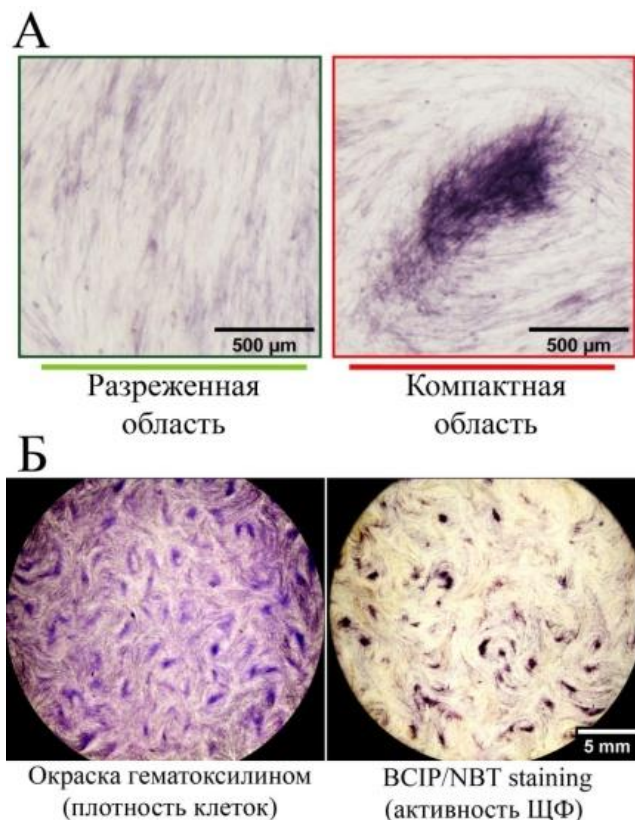


Рисунок 61 – Локальная активность щелочной фосфатазы спонтанно повышается в компактных областях клеточных пластов. Репрезентативные изображения компактных и разреженных областей (А) с визуализированной активностью щелочной фосфатазы; световая микроскопия (светлое поле), ув. 80х. и микрофотографии клеточных пластов, окрашенных гематоксилином (Б) для визуализации плотности клеток (слева) или хромогенным субстратом для выявления активности ЩФ (справа); световая микроскопия

В разреженных областях КП активность ЩФ была близка к фоновой несмотря на присутствие там большого количества МСК, которое хорошо видно в образцах с параллельным окрашиванием ядер гематоксилином (рисунок 61, Б). Таким образом, активность ЩФ была преимущественно ограничена компактными областями КП. Интересно, что при добавлении ВСIP/NBT к монослойной культуре МСК какой-либо ферментативной активности ЩФ детектировать не удалось.

В целом, мы пришли к заключению, что компактные области КП характеризовались рядом особенностей, предрасполагающих к остеогенезу. К ним можно отнести обогащение коллагеном I типа (рисунок 60) и высокую локальную активность ЩФ (рисунок 61). Спонтанное появление этих особенностей вне индукции остеогенной дифференцировки позволило предположить, что МСК способны к автономной самоорганизации, в результате которой их дифференцировочный путь определяется механизмами, сходными с конденсацией мезенхимы *in vivo*.

7.6 Анализ транскриптома мезенхимных стромальных клеток разреженных и компактных областей клеточных пластов

Обнаруженные нами изменения эффективности дифференцировки и характера депонирования ВКМ, а также возможная связь с автономной способностью МСК к самоорганизации, которую мы рассматривали как конденсацию, потребовали оценки транскриптомного профиля клеток в составе КП. Этот метод позволяет строить 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), характерных для компактных и разреженных областей КП, разделенных путем лазерной микродиссекции. Сравнение компактных областей КП с разреженными выявило 368 значимо ап-регулируемых и 168 даун-регулируемых кодирующих белки генов.

Анализ кластеризованных транскриптов ДЭГ показал, что многие из них относились к онтологиям, которые имели похожие биологические функции или перекрывались по составу. Некоторые из них имели аннотировались как имеющие связь с регенерации и репарации тканей, а также с передачей сигнала, метаболизмом липидов и активностью малых Rho-ГТФаз (рисунок 62).

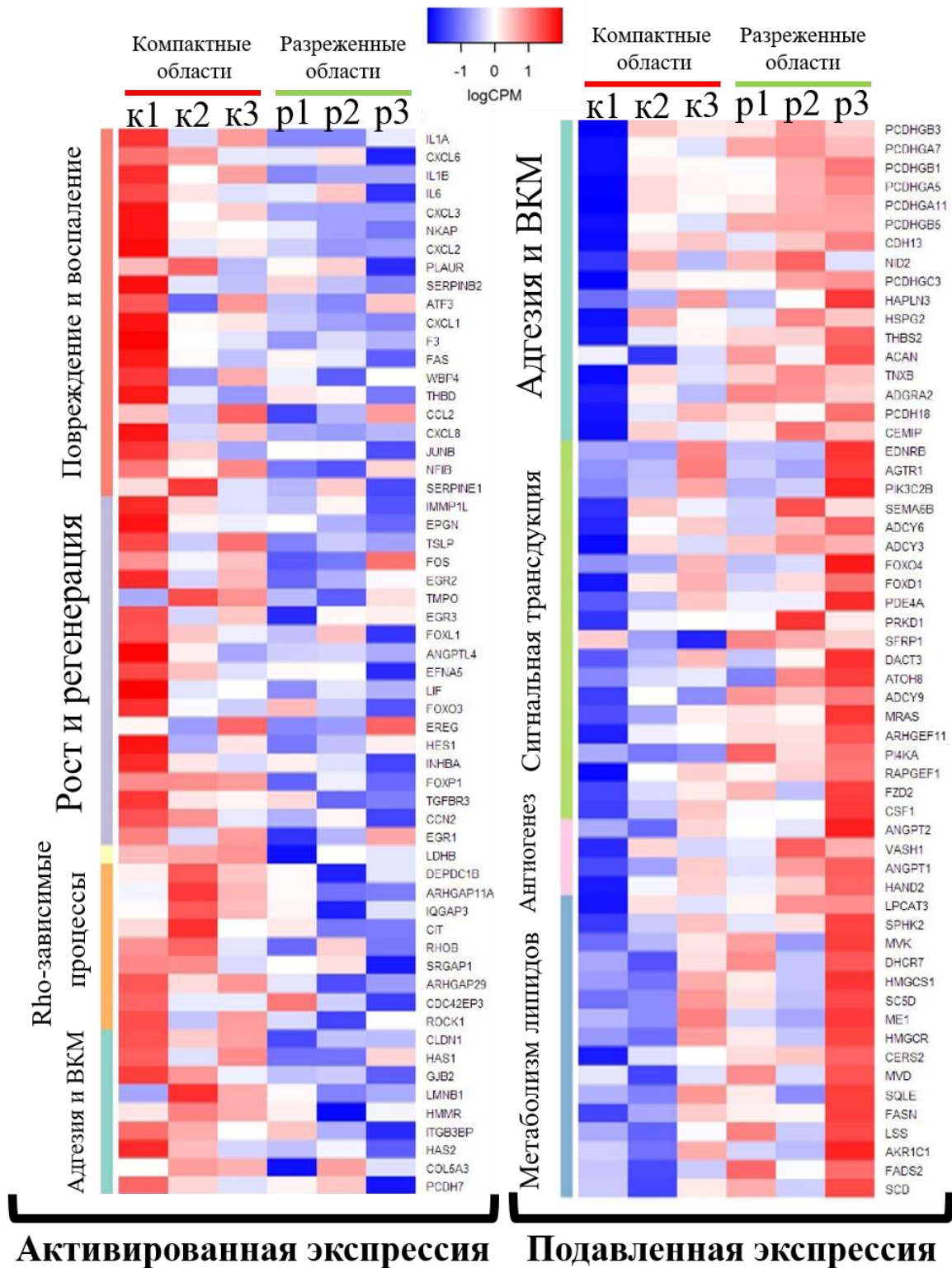


Рисунок 62 – Тепловая карта (heat map), иллюстрирующая дифференциальную экспрессию генов в клетках компактных и разреженных областей клеточных пластов. Значения экспрессии нормализованы с использованием количества транскриптов на миллион (CPM). Столбцы представляют отдельные образцы, а строки – гены с активированной (красный) и подавленной относительной экспрессией (синий). Образцы сгруппированы по принадлежности к компактным или разреженным областям и биологическим повторам (n=3). Цветовые панели слева от тепловых карт показывает ассоциацию дифференциально экспрессирующихся генов с их биологическими функциями

Используя базу Gene Ontology (GO), мы провели аннотацию транскриптов и обнаружили, что среди 368 ап-регулируемых ДЭГ значительное количество (таблица 5) относится к генам, вовлеченным в пролиферацию клеток (n=70), морфо- и ангиогенез (n=46), а также ответ на повреждение (n=28). В составе 168 даун-регулируемых при компактизации генов удалось выделить кластеры генов (таблица 6), продукты которых связаны с метаболизмом липидов (n=20), адгезией клеток (n=12) или с формированием и функцией кровеносных сосудов (n=18).

Таблица 5 – Ключевые группы Gene ontology, выявленные при анализе генов с повышенной в компактных областях экспрессией

Число уникальных генов	Описание функциональной группы	Список дифференциально экспрессированных генов в составе групп	Список групп и идентификаторы Gene ontology
70	Пролиферация	<i>NUF2; TPX2; CDC25C; SMC2; CDCA8; KIF2C; BUB1; KIF23; CDC20; CDKN1C; SGO2; AURKA; MND1; BUB1B; GEN1; SMC4; ESPL1; KIF22; FANCD2; NCAPH; MYBL2; CDCA5; MAP9; KIF18B; PKMYT1; CKS2; SMC3 SPC25; SKA1; CENPQ; SKA3; IL1A; TOP2A; CENPE; IL1B; LIF; KIF20B; CENPF; ASPM; RGCC; MKI67; CCNB1; BIRC5; NDC80; ANLN; DLGAP5; UBE2C; NCAPG; KIF11; PLK1; PRC1; SPAG5; KIF4A; TTK; AURKB; PTTG1; SGO1; EREG; KIF14; HJURP; CDCA2; KNLI; CENPK; EPGN; USP16; TACC3; PHIP; NEK2; KIFC1; TRIP13</i>	nuclear division (GO:0000280) chromosome segregation (GO:0007059)
28	Повреждение и воспаление	<i>IL6; JUNB; FOXP1; NFKBIA; FOS; ZC3H12A; AKAP12; THBD; ABCA1; VIM; HMGB1; SERPINB2; PLAUR; TNFAIP3; BDKRB1; CXCL6; CCL2; SERPINE1; HMGB2; GJB2; CLDN1; TRIB1; CXCL8; CXCL1; CXCL3; CXCL2; IL1B; PTGS2</i>	response to molecule of bacterial origin (GO:0002237) fibrinolysis (GO:0042730)
49	Морфогенез, ангиогенез	<i>EGR1; HES1; CCNB1; CDC20; CDKN1C; EREG; KIF14; TRIP13; NFIA; SCLT1; CCN2; ERRF1; VIM; LIF; ASPM; INHBA; HMGB2; FOSL1; GJB2; JUNB; EIF2S2; PRDM1; E2F7; TIPARP; PLK4; STC1; KDM5A; CCNF; ARID4A; ARID4B; RHOB; AURKA; FOXO3; CXCL8; IL1A; IL1B; CYP1B1; PTGS2; TNFAIP3; RGCC; F3; SERPINE1; IL6; ANGPTL4; ZC3H12A; ROCK1; BTG1; KLF2; DDIT3</i>	anatomical structure maturation (GO:0071695) developmental maturation (GO:0021700) collagen biosynthetic process (GO:0032964) reproductive system development (GO:0061458) regulation of vasculature development (GO:1901342)
14	Ремоделирование хроматина	<i>CENPU; RSF1; ITGB3BP; KDM5A; HMGB1; HJURP; HMGB2; KNLI; ANP32E; CENPK; BAZ2B; HELLS; CENPQ; CENPM</i>	chromatin remodeling (GO:0006338)

Таблица 6 – Ключевые группы Gene ontology, выявленные при анализе генов с подавленной в компактных областях экспрессией

Число уникальных генов	Описание функциональной группы	Список дифференциально экспрессированных генов в составе групп	Список групп и идентификаторы Gene ontology
20	Метаболизм липидов	<i>HMGCR; ME1; HMGCS1; CYP51A1; GPER1; SC5D; SPHK2; MVD; SREBF2; INSIG1; MVK; LSS; SQLE; AGTR1; CARM1; PRKD1; THRA; FASN; SCD; DHCR7</i>	regulation of lipid metabolic process (GO:0019216);
18	Формирование и функция сосудов	<i>THBS2; FOXO4; GRIP2; ANGPT1; ADCY6; EDNRB; HMGCR; GPER1; ADGRA2; HSPG2; VASH1; AGTR1; PRKD1; EGLN1; TERT; ANGPT2; SFRP1; GTF2I;</i>	vascular process in circulatory system (GO:0003018) regulation of vasculature development (GO:1901342)
12	Межклеточная адгезия	<i>PCDHGB3; PCDH18; PCDHGA7; PTPRS; PCDHGA5; PCDHGA11; PCDHGC3; PCDHGB5; PCDHGB1; SCARF; MDGA1; CDH13</i>	cell-cell adhesion via plasma-membrane adhesion molecules (GO:0098742)

Аннотация с помощью биоинформатического алгоритма Reactome pathways показала, что по молекулярным функциям среди активированных ДЭГ 35 генов были функционально ассоциированы с активностью малых ГТФаз семейства Rho (рисунок 63, А). Их регуляторные и сигнальные функции связаны с необходимой для миграции и пролиферации клеток перестройкой цитоскелета, в том числе критичной для мезенхимальной конденсации *in vivo* [3]. Также показано, что активность ГТФаз семейства Rho позитивно влияет на дифференцировку МСК в osteo- и хондрогенном направлениях [404, 405].

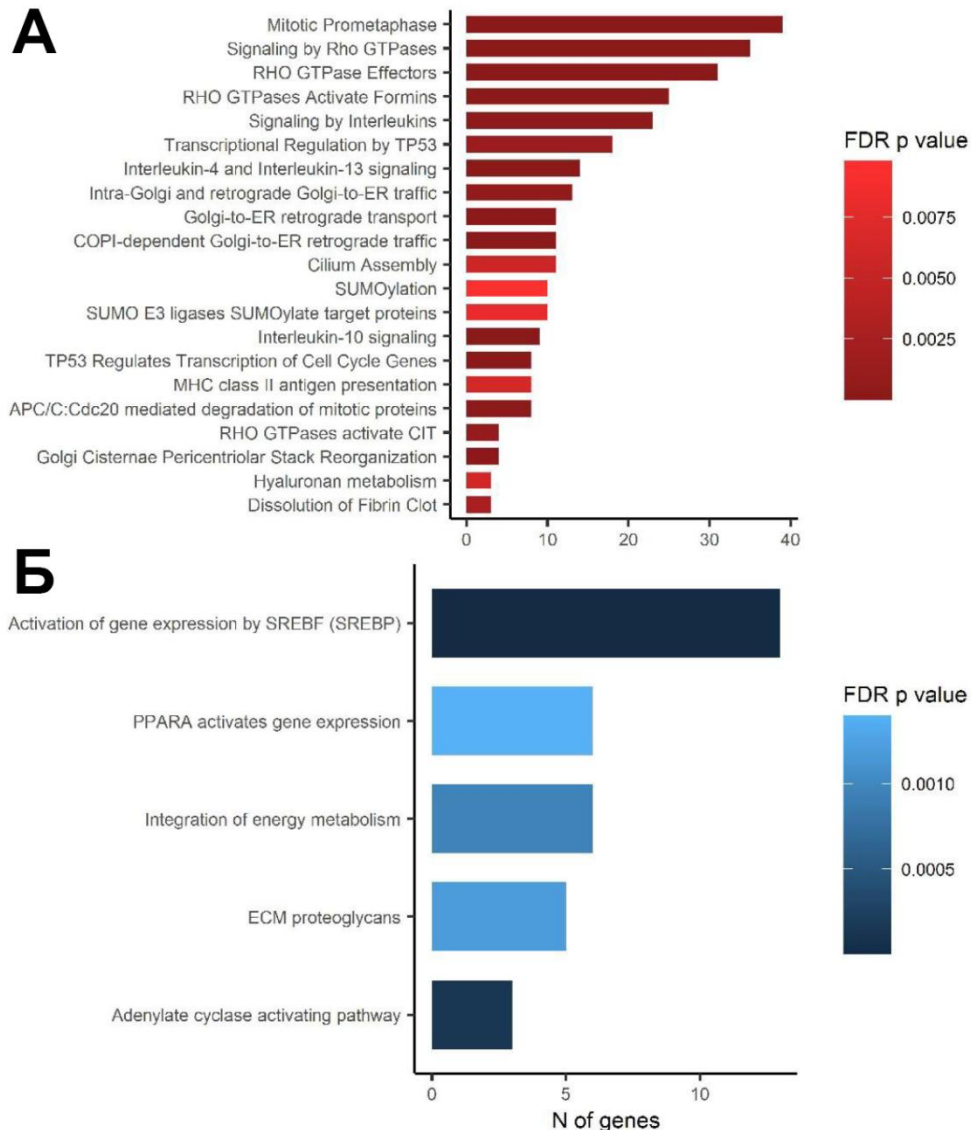


Рисунок 63 – Сравнительный анализ дифференциально экспрессирующихся генов в мезенхимных стромальных клетках компактных и разреженных областей клеточного пласта с помощью алгоритма Reactome. Гистограмма показывает количество активированных (А, красный) и подавленных (Б, синий) генов, которые аннотируются в обозначенные группы Reactome pathways. Скорректированные значения статистической значимости (FDR p-value) обозначены яркостью цвета

Такого рода находки укладывались в ранее показанные нами изменения статуса актинового цитоскелета и дифференцировки МСК, а также позволили предположить, что компактизация может активировать данный сигнальный путь или зависеть от его активности.

Биоинформатический анализ показал, что среди даунрегулированных в компактных областях генов значимая часть (13, около 8% от общего числа подавленных ДЭГ) регулируется одним транскрипционным фактором – SREBP-1 (рисунок 63, Б). 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 [406]. Выявленное по выявлены по данным биоинформатического анализа подавление его активности в компактных областях КП могло быть причиной отмеченного нами снижения адипогенного потенциала МСК.

Выявленная в компактных областях КП повышенная экспрессия генов, участвующих в синтезе ДНК, цитокенезе, реорганизации хроматина, которые являются ключевыми этапами пролиферации, указывает на повышение готовности МСК к делению под действием митогенных факторов и условий окружения. Пролиферация – один из важнейших этапов конденсации мезенхимы [298, 299], поэтому данная находка в значительной степени согласовывалась с предположением о ее сходстве с процессами компактизации МСК при сборке КП. Насколько повышенная способность к пролиферации согласуется с данными об увеличенном потенциале дифференцировки МСК в некоторых направлениях, который обычно связан со снижением пролиферации, остается не до конца ясным.

Паттерн с повышением экспрессии генов, связанных с иммунитетом – например, цитокинов (n=16), также имеет свое физиологическое объяснение. Он может отражать повышение продукции цитокинов, необходимое при компактизации для активного взаимодействия с клетками иммунной системы, присутствующими в зоне повреждения. Схожая транскриптомная сигнатура (11 из 16 совпадающих генов в кластере GO “cytokine receptor binding”), определяемая как *пан-цитокиновый ответ* (англ. *pan-cytokine response*), описана в ходе анализа сфероидов из МСК [407]. Согласно выводам авторов работы, такой ответ являлся характерной чертой транскриптомного профиля МСК в составе сфероидов и связан с эпигенетическими перестройками хроматина. При этом был отмечен также переход МСК к мезенхимному и стволовому фенотипу, что приводило к увеличению их способности поддерживать другие СК подобно тому, как это делают стромальные клетки их ниш. В компактных областях КП среди арегулированных генов также была идентифицирована группа генов, связанная с ремоделированием хроматина (таблица 6).

В компактных областях КП среди кластеров ДЭГ со сниженной экспрессией (таблица 7) выделялись протокадгеринины (n=9) – группа белков, определяющих способность к

гомофильным межклеточным взаимодействиям [408]. Снижение их экспрессии является свидетельством изменений дифференциальной адгезии в ходе самоорганизации МСК. В ходе формирования КП происходит перераспределение субпопуляций в пространстве в зависимости от их дифференциальной адгезии. Кроме того, в ходе конденсации мезенхимы *in vivo* описана роль дифференциальной адгезии при инициации и прекращения данного процесса [409, 410], однако данное предположение требует дополнительной экспериментальной проверки.

7.7 Экспериментальная валидация результатов биоинформатического анализа транскриптома

7.7.1 Выяснение роли малых Rho-ГТФаз в компактизации мезенхимных стромальных клеток

Биоинформатические данные о дифференциальной экспрессии в компактных и разреженных областях КП указали на возможную связь наблюдавшейся компактизации МСК с активацией сигнального пути малых ГТФаз семейства Rho. Проверку данной гипотезы осуществили наиболее удобным для нас методом в рамках серии опытов *in vitro* с добавлением Y-27632 – селективного химического ингибитора Rho-ассоциированных протеинкиназ 1 и 2 (ROCK-1/2). Ингибитор вносили на разных сроках формирования КП в концентрации 5 мкМ, после чего вели инкубацию до 14-го дня. Соединение Y-27632 вносили, начиная с 1, 3, 5, 8, 10 или 13 дня; таким образом, время инкубации с ним составляло, соответственно, 14, 12, 10, 7, 5 или 2 дней культивирования.

Оказалось, что инкубация с Y-27632 в концентрации 5 мкМ в течение 7, 10, 12 и 14 дней приводила к значимому уменьшению количества компактных областей, сформированных в КП 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-му дню (рисунок 64. А, Б).

Активность сигнального пути малых Rho-ГТФаз влияет на пролиферацию клеток, в связи с чем мы должны были оценить влияние ингибирования ROCK-1/2 на количество клеток в составе КП. Для этого нами был проведен анализ удельного содержания ДНК в лизатах формирующихся КП, полученных на соответствующей временной точке. В результате этого мы показали, что внесение Y-27632 на любом сроке формирования КП приводило к статистически значимому снижению относительного содержания ДНК по сравнению с контрольной культурой (ДМСО), что говорит о подавлении пролиферации МСК на фоне ингибирования ROCK1/2 (рисунок 64, В).

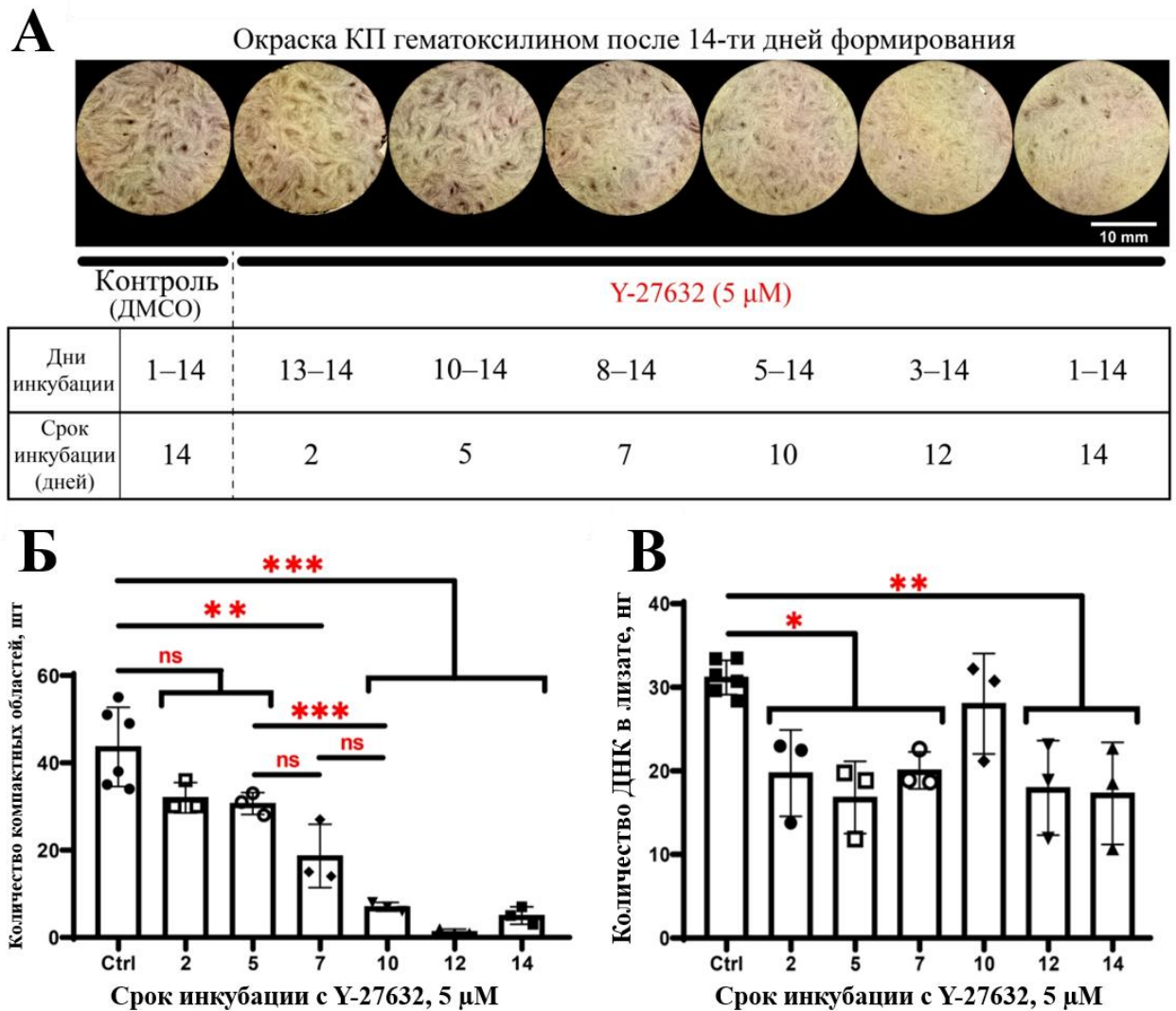


Рисунок 64 – Формирование компактных областей клеточных пластов нарушается при подавлении активности ROCK-1/2. Общий вид клеточного пласта на 14 день инкубации с Y-27632 (А); окрашивание гематоксилином; сравнительный анализ количества компактных областей после ингибирования ROCK-1/2 разной продолжительности (Б). Количество компактных областей к 14 дню снижается при ингибировании ROCK-1/2 (Y-27632) на ранних (первые 7 дней) стадиях формирования клеточного пласта; (В) сравнительный анализ количества ДНК, измеренного в лизатах клеточных культур после ингибирования ROCK-1/2

Важно отметить, что все экспериментальные точки за исключением 10-го дня характеризовались сопоставимым снижением удельного содержания ДНК по сравнению с контролем и не отличались друг от друга. В целом, связанное с подавлением пролиферации снижение содержания ДНК было равномерным среди проанализированных точек и никак не зависело от продолжительности инкубации формирующегося КП с Y-27632 (рисунок 64, В).

Возможно, альтернативные сигнальные пути, не зависящие от активности ROCK-1/2, в данной ситуации способны активировать и поддерживать пролиферацию МСК. Также нельзя исключать возможность адаптации МСК и системы контроля клеточного цикла к подавлению

ROCK-1/2. Таким образом, снижение количества компактных областей может быть частично связано с подавляющим пролиферацию ингибированием ROCK-1/2, однако в данном эксперименте оно носило фоновый характер и не могло стать причиной выявленных отличий.

Наши результаты указывают на то, что Rho-ассоциированные протеинкиназы 1 и 2 (ROCK-1/2) являются необходимыми для инициации и осуществления процесса компактизации. При этом активность ROCK-1/2 не оказалась критическим фактором для поддержания компактного состояния МСК после завершения этого процесса, вероятно за счет накопленных структурных белков ВКМ. Показанная нами зависимость процесса компактизации МСК в КП подтвердила сходство ее механизмов с процессами конденсации мезенхимы *in vivo*.

7.7.2 Выяснение роли малых Rho-ГТФаз в хондрогенной дифференцировке мезенхимных стромальных клеток в составе клеточных пластов

Морфогенез СТ, составляющих основу структур опорно-двигательной системы (костей, хрящей, связочного аппарата) зависит от активности сигнального пути малых ГТФаз семейства Rho. Более того, в ряде работ показано, что хондрогенная дифференцировка МСК в культуре резко теряет эффективность при его подавлении различными способами, а его активация, напротив, способствует ей [400, 405].

Ранее мы обнаружили, что в составе КП хондрогенная дифференцировка МСК идет с большей эффективностью (рисунок 53), которую мы связали с самоорганизацией МСК, напоминающей конденсацию мезенхимы. Транскриптомный анализ выявил, в свою очередь, признаки повышенной экспрессии Rho-зависимых генов в компактных областях КП (рисунок 63, А). Эти данные подкреплялись результатами ингибиторного анализа, который показал, что активность Rho-ассоциированных протеинкиназ ROCK-1/2 является необходимой для запуска и ход компактизации МСК (рисунок 64). Таким образом, мы смогли обоснованно выдвинуть предположение о ключевой роли сигнального пути Rho в регуляции хондрогенной дифференцировки МСК, которая усиливается в компактных областях КП.

Выяснение вклада активности сигнального пути малых Rho-ГТФаз в хондрогенную дифференцировку МСК в составе КП потребовало проведения ингибиторного анализа в ходе дифференцировки КП и монослойной культуры клеток. Методически для этого был использован стандартный протокол дифференцировки МСК в хондроцитарном направлении в течение 21 дня с добавлением Y-27632 (20 мкМ) – ингибитора Rho-ассоциированных протеинкиназ ROCK-1/2. В результате проведенной оценки (рисунок 65) мы установили, что в таких условиях происходит нивелирование усиления хондрогенной дифференцировки МСК, которое было характерно для КП по сравнению с монослойной культурой.

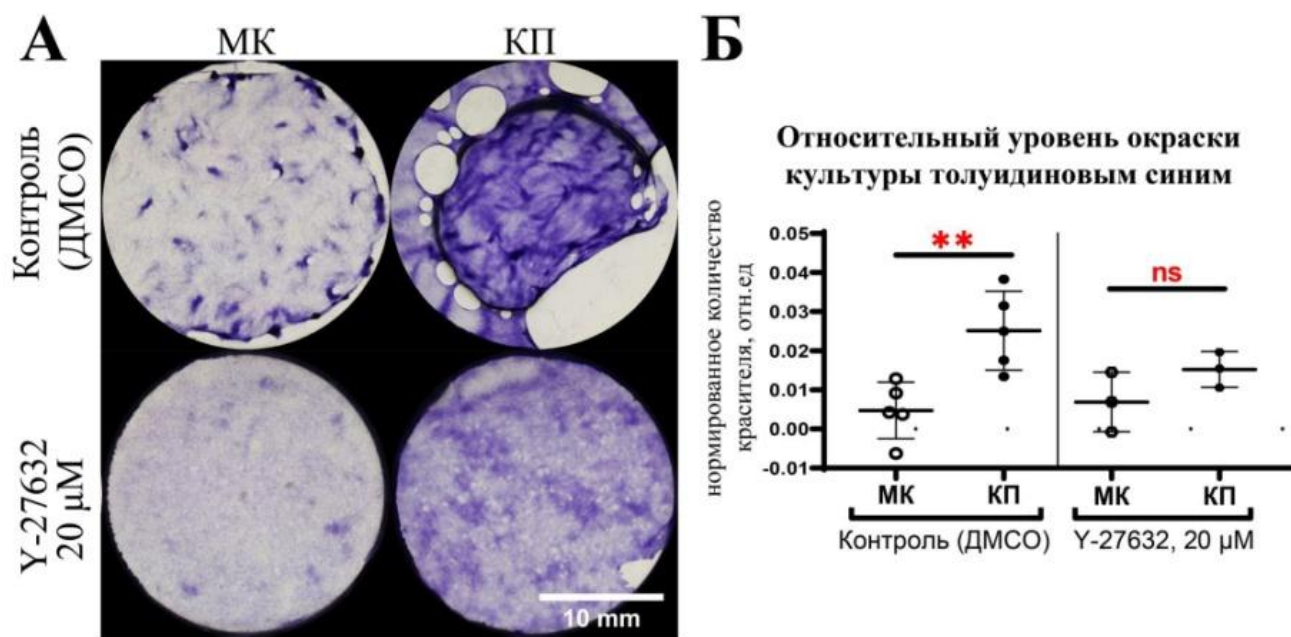


Рисунок 65 – Ингибирование ROCK-1/2 нивелирует увеличение эффективности хондрогенной дифференцировки мезенхимных стромальных клеток в клеточных пластах. Монослойная культура и клеточный пласт, окрашенные толуидиновым синим (А) на 21 день хондрогенной дифференцировки; на фотографиях приведена поверхность 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

Таким образом, мы установили, что в составе КП повышение эффективности дифференцировки МСК в хондрогенном направлении опосредовано активностью сигнального пути малых ГТФаз семейства Rho в МСК компактных областей. Эти результаты согласуются с данными литературных источников о роли сигнального пути Rho в регуляции хондрогенной дифференцировки.

7.7.3 Выяснение механизма подавления транскрипционной активности SREBP-1 в компактных областях клеточного пласта

Выявленная нами транскриптомная сигнатура, указавшая на подавление активности транскрипционного фактора SREBP-1 в компактных областях КП соответствовала результатам анализа дифференцировки МСК (рисунок 53). Основными мишенями, регулируемые SREBP-1 являются гены, кодирующие ферменты метаболизма липидов и факторы адипоцитарной дифференцировки [406, 411].

Анализ ДЭГ показал, что при компактизации МСК падает экспрессия многих генов, регулируемых SREBP-1, в т.ч. *FASN* (синтаза жирных кислот), *ACACA* (ацетил-кофермент-А

карбоксилаза), *ME* (малик-фермент). С учетом данных о высокой активности сигнального пути Rho мы предприняли попытку оценить ее возможный вклад в подавление SREBP-1, для чего провели эксперименты по адипогенной дифференцировке в присутствии Y-27632 (20 мкМ) - ингибитора ROCK-1/2 и бетулина (20 мкМ), способного блокировать созревание SREBP-1 [412].

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 (рисунок 66, А). При этом добавление сочетания Y-27632+бетулин, т.е. дополнительное подавление SREBP-1 нивелировало этот эффект, снижая его вплоть до значений в контрольном образце монослоя МСК (рисунок 65, А). Данные закономерности не удалось полностью воспроизвести в КП, вероятно, в связи с тем, что в их составе содержатся как компактные, так и разреженные области. Причиной этого является анализ лизатов КП, на основе которого оценивалась эффективность включения Oil Red O и адипогенной дифференцировки. При этом происходила нейтрализация разнонаправленных изменений в областях КП с разной степенью компактизации, в т.ч. на фоне добавления ингибиторов выбранных нами мишеней (рисунок 66, А).

Чтобы обойти это методическое затруднение мы прибегли к использованию микроскопии КП с окраской липидных капель красителем Нильский красный (Nile Red). При этом мы подтвердили рост накопления липидов в компактных областях КП на фоне добавления Y-27632 в ходе адипогенной дифференцировки, как мы это смогли обнаружить ранее при анализе дифференцирующихся МСК в монослое (рисунок 66, Б). Кроме того, внесение комбинации Y-27632+бетулин при адипогенной дифференцировке приводило к подавлению накопления липидов МСК в компактных областях КП аналогично тому, как это происходило в монослойной культуре (рисунок 66, А). Таким образом, это позволило нам подтвердить локальный характер обнаруженных нами Rho-зависимых изменений активности адипогенеза и их связь с регуляцией транскрипционного фактора SREBP-1.

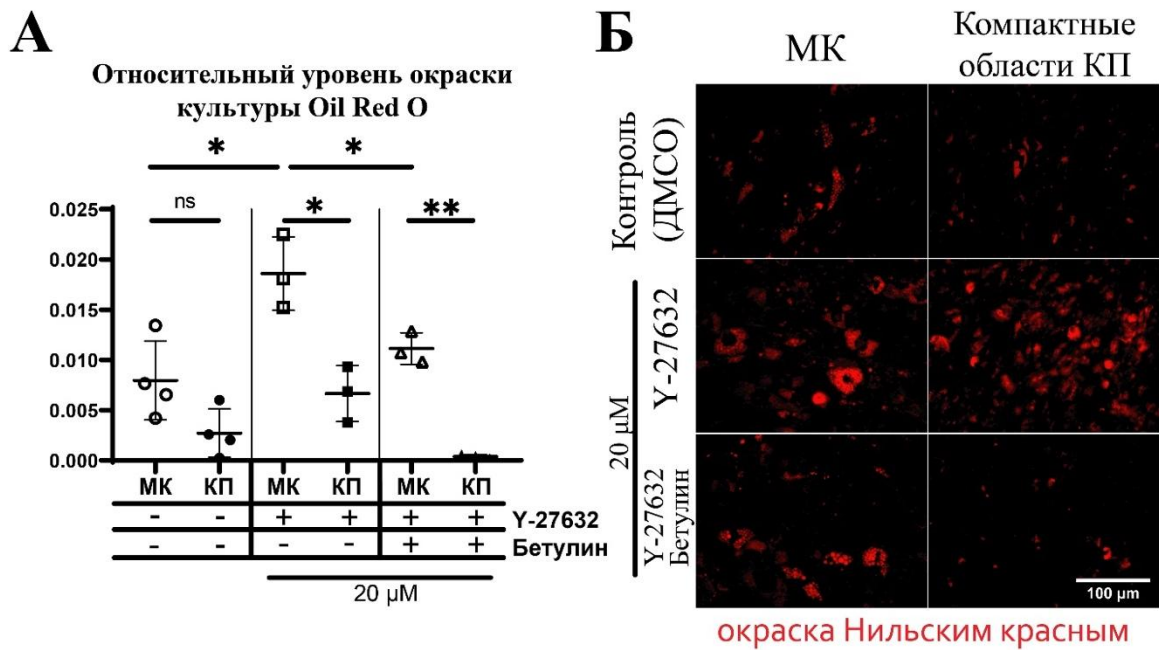


Рисунок 66 – Эффективность адипогенной дифференцировки увеличивается в компактных областях клеточных пластов при подавлении активности ROCK-1/2. Сравнительный анализ эффективности адипогенеза (А) в монослойной культуре и тотальных клеточных пластах на фоне подавления активности ROCK-1/2 и SREBP-1 (бетулин); 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 SREBP-1; флуоресцентная микроскопия, ув. x50

Отсутствие усиления адипогенной дифференцировки в компактизованных областях КП нам удалось объяснить подавлением транскрипционного фактора SREBP-1, причиной которого является активность Rho-ассоциированных протеинкиназ ROCK-1/2. В литературе описано угнетение созревания SREBP-1 при активации сигнального пути Rho, который играет ключевую роль в рецепции механических свойств микроокружения при выборе направления дифференцировки СК [413]. Вне контекста исследований в области ТИ ранее было показано, что сигнальный путь Rho может регулировать ход адипогенеза за счет активации АМФ-активируемой протеинкиназы (АМФК), которая вызывает подавление созревания SREBP-1 [413]. На основании полученных нами результатов можно представить механизм Rho-зависимого подавления активности адипогенного фактора SREBP-1 в виде схемы (рисунок 67).

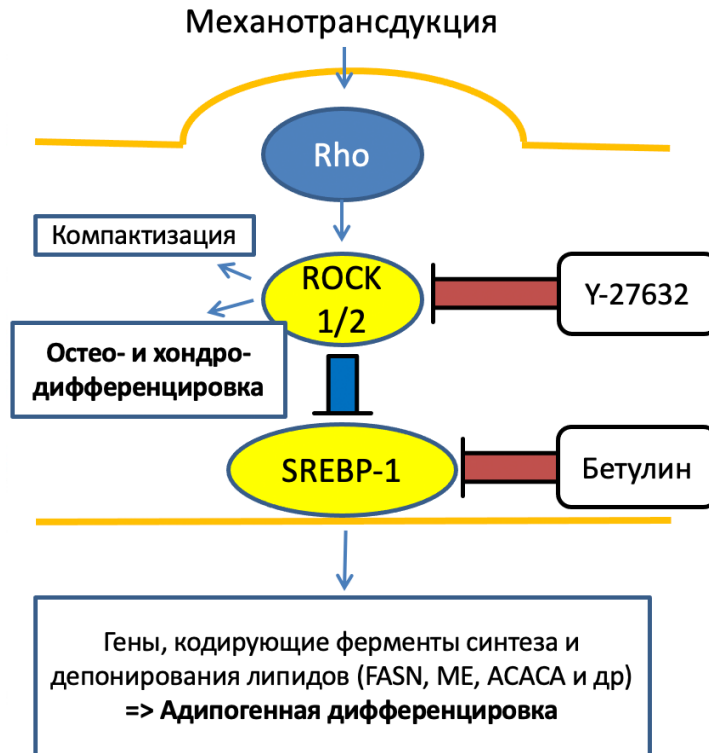


Рисунок 67 – Схематическое изображение установленного механизма ROCK-1/2-зависимого подавления адипогенного транскрипционного фактора SREBP-1, участвующего в коммитировании мезенхимных стромальных клеток в компактных областях клеточных пластов

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 ТИ:

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

На волне интереса, связанной с неудовлетворительными результатами клинических исследований клеточной терапии, значительное внимание привлекли подходы с использованием тканеинженерных конструкций, получивших название клеточных пластов. Технология получения клеточных пластов близка традиционным методам клеточной терапии и основана на культивировании мезенхимных стромальных клеток. При этом на этапе трансплантации применение клеточных пластов лишено многих недостатков, присущих введению мезенхимных стромальных клеток и других клеточных типов в суспензии [6, 29]. Наконец, нативное происхождение и процессинг белков внеклеточного матрикса, продуцируемых мезенхимными стромальными клетками в культуре, обеспечивают биосовместимость клеточных пластов. Все это сделало клеточные пласты из мезенхимных стромальных клеток взрослого организма перспективным инструментом для создания безопасной и эффективной платформы тканевой инженерии, в рамках которой возможна разработка тканеинженерных конструкций для решения актуальных медицинских проблем в области хирургии и трансплантологии.

В нашей 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. В начале работы значительные усилия были направлены на получение прототипов клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток жировой ткани взрослого организма. Оптимизация протоколов получения клеточных пластов позволила подобрать плотности стартовой культуры на емкостях разного формата (50 тыс. клеток/см² для мезенхимных стромальных клеток жировой ткани человека и крысы и 80 тыс. клеток/см² для мезенхимных стромальных клеток жировой ткани мыши), при использовании которых в течение 7-10 суток можно получить готовый к откреплению пласт. Дополнительно с целью стимуляции пролиферации, а также продукции и сшивки белков внеклеточного матрикса нами было предложено основанное на данных литературы [414] дополнение культуральной среды L-аскорбиновой кислотой (50 мкг/мл). Это позволяет ускорить процесс сборки и повысить плотность конструкции, что становится важным при переносе клеточных пластов для трансплантации в буфере или на хирургическом инструменте с последующей аппликацией.

При откреплении клеточных пластов мы изначально решили избегать использования пластика с термочувствительным полимерным покрытием, как дорогого и не всегда доступного расходного материала. Сосредоточившись на механическом снятии клеточных пластов после обработки одним из способов, уменьшающих его адгезию, мы показали оптимальные

результаты при использовании р-ра Версена (инкубация 2-3 минуты), но не 0,025% трипсина. Выбор в пользу раствора Версена связан с тем, что его эффективность была полностью сопоставима с ферментативным методом и не несет присущих протеолитической обработке рисков деградации внеклеточного матрикса. Кроме того, протоколы с использованием трипсина оперируют периодами от 10 до 20 сек., что вносит вариабельность – соблюсти без отклонений столь короткие интервалы затруднительно даже опытному оператору. Сходные данные были получены нами в другом исследовании, где объектом служили клеточные пласты из стволовых клеток сердца. При сравнении собранных из них клеточных пластов, снятых с термочувствительных подложек (UpCell, Sigma-Aldrich, США) или открепленных с помощью р-ра Версена мы не обнаружили их отличий по жизнеспособности, частоте апоптоза и экспрессии маркеров стволовости [415]. Таким образом, разработанный нами протокол получения клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток жировой ткани человека может рассматриваться как основа технологии их производства и масштабироваться с учетом конкретных показаний и дополнительных требований к процедуре трансплантации конструкции.

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 ($r=0,666$; $p=0,009$) с продолжительностью сборки. Возможно, мезенхимные стромальные клетки с длительной лаг-фазой требуют больше времени для адгезии и значительно медленнее нарабатывают необходимые для начала пролиферации компоненты микроокружения. Учитывая, что в культуре мезенхимных стромальных клеток сборка многоклеточного пласта связана с процессами адгезии клеток и организацией внеклеточного матрикса [416], длительность лаг-фазы может быть скоростью-лимитирующим параметром. Ее оценка в культуре позволит корректировать сроки подготовки конструкций для плановых вмешательств и может быть частью регламента производства клеточных пластов.

Полученная нами гистологическая характеристика конструкций выявила депонирование значимых количеств компонентов внеклеточного матрикса в составе клеточных пластов, толщина которых в прикрепленном виде составила 35-40 мкм. С помощью конфокальной микроскопии была установлена многослойная (3-4 слоя) структура клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток жировой ткани, что отличает их от пластов из эпителиальных клеток, в которых обычно присутствует 1-2 слоя. Толщина клеточных пластов в 40 мкм говорит о возможности диффузии в достаточном количестве O_2 и содержащихся в культуральной среде нутриентов и указывает на их гомогенную доступность для находящихся в

составе пластов клеток. Это выгодно отличает их от другого распространенного типа конструкций в виде сфероидов, для которых характерно образование зон, в которых клетки имеют разную степень жизнеспособности из-за депривации и падения оксигенации.

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 O_2 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 их трансплантации для стимуляции заживления дефектов мягких тканей

Нами было получено два важных для дальнейшей оценки результата: 1) трансплантация клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток превосходила инъекцию суспензии эквивалентного количества мезенхимных стромальных клеток по способности стимулировать закрытие дефекта мягких тканей и 2) наиболее выраженные изменения затрагивали процесс формирования и созревания грануляционной ткани в зоне дефекта. Следует отметить, что масштаб и характер этих изменений отличался, но основной особенностью трансплантации клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток стало быстрое созревание и ремоделирование грануляционной ткани с закрытием дефекта. На модели острой раны с дефицитом тканей мы не добились полной регенерации, и описанные выше события приводили к формированию рубца, однако с точки зрения сохранения целостности ткани и восстановления барьерной функции покровов это можно отнести к положительным результатам. Вкупе с выраженным ускорением закрытия дефекта (у всех животных после трансплантации клеточных

пластов к 29-му из 49 дней наблюдения происходило его полное закрытие) по сравнению с введением суспензии и нелеченым контролем, мы можем сделать вывод о высоком регенераторном потенциале предложенной тканеинженерной конструкции.

При оценке регенераторной эффективности клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток на модели пролежневого дефекта был получен впечатляющий результат в виде полной регенерации дермы и придатков кожи (желез и волосяных луковиц) у 3 из 4 животных к 21 дню. Этот результат хорошо соотносился с полученными нами гистологическими данными, которые подтвердили близкую к нормальной структуру дермы в области зажившего декубитального дефекта. В этом же эксперименте помимо группы инъекции мезенхимных стромальных клеток в виде суспензии мы также оценили эффективность кондиционированной среды, содержащей секретом монослоя мезенхимных стромальных клеток. Его введение в края дефекта показало сопоставимую с инъекцией мезенхимных стромальных клеток эффективность, что подкрепляет возможность использования секрета в качестве основы для самостоятельного препарата, стимулирующего заживление мягких тканей. Тем не менее, только в группе трансплантации клеточных пластов результатом стала полная регенерация, подтвержденная с помощью гистологического анализа.

Тем удивительнее оказалось, что время удержания конструкции на поверхности пролежневого дефекта не превышало 7 суток. Кратковременное удержание пластов на 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.

Пристальное внимание к составу и толщине грануляционной ткани в нашем исследовании связано с ее ролью временной соединительной ткани, на основе которой идет формирование новой структуры на месте разрушенной повреждением. Кроме того, в толще грануляционной ткани происходит ряд событий, определяющих масштаб фиброобразования, который зависит от дифференцировки стромальных клеток в миофибробласты, текучести сосудов в ее составе или их ассоциации с перicyтами, а также от скорости накопления и характера укладки внеклеточного матрикса. Стадии роста и ремоделирования грануляционной ткани разделяются нечетко, однако большая часть исследователей сходятся на том, что характер ремоделирования в рубец или в соединительную ткань подобную нативной определяется именно на ранних сроках процесса – в фазе роста грануляционной ткани [417, 418].

В обеих использованных моделях повреждения кожи после трансплантации клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток увеличивалась толщина грануляционной ткани, а также происходили активные процессы ее ремоделирования. В группе доставки мезенхимных стромальных клеток в виде клеточных пластов на пролежни кожи к 3 дню происходило увеличение толщины грануляционной ткани по сравнению с инъекцией суспензии или секретома, а на более поздних сроках (14 день) в этой же группе быстро шло уменьшение толщины грануляционной ткани, указывающие на ее ремоделирование, которое завершалось заживлением без рубца.

При этом помимо толщины и скорости ремоделирования грануляционной ткани, одним из важных изменений картины заживления пролежневого дефекта стала плотность кровеносных сосудов, пронизывающих грануляции. После трансплантации клеточных пластов на 3 и 7 дни мы отметили резкое снижение числа капиллярных сосудов по сравнению с контрольной группой, а также группами инъекции мезенхимных стромальных клеток или их секретома. После трансплантации клеточных пластов число капилляров снижалось, при этом увеличивалось число крупных сосудов с наличием α -ГМА+ муральных клеток. Проведенный нами анализ состава секретома клеточных пластов в значительной степени объяснил эти результаты – при переходе мезенхимных стромальных клеток из формы монослоя в клеточные пласты в составе их секретома кратно (в 2-4,5 раза) росла доля факторов, отвечающих за стабилизацию кровеносных сосудов. При этом содержание ключевого активатора ангиогенеза – VEGF165 значимо не изменялось. Таким образом, с учетом паракринного механизма действия клеточных пластов можно также сделать вывод о том, что функциональный состав секретома мезенхимных стромальных клеток (в части его компонентов, регулирующих ангиогенез) обеспечивает стабилизацию кровеносных сосудов, но не увеличение их количества в грануляционной ткани. Эти данные были также подкреплены результатами транскриптомного профилирования клеточных пластов, которое показало обогащение функциональных групп, ассоциированных с уменьшением активности ангиогенеза и миграции эндотелия по сравнению с монослоем мезенхимных стромальных клеток. Несмотря на важность ангиогенеза для успешного ранозаживления, было показано, что его подавление с помощью антител к VEGF165 приводит к блокированию фиброза и уменьшению объема рубца, образующегося на месте кожной раны [419]. Это объясняется тем, что большинство сосудов, пронизывающих грануляционную ткань, не имеют сформированной базальной мембраны, из-за чего происходит утечка белков плазмы, которые вносят вклад в фиброзирование на месте дефекта кожи.

Таким образом, нами была показана высокая регенераторная эффективность клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток при дефектах мягких тканей различной этиологии и объема, а также установлен их паракринный механизм действия, определяющий их

преимущество перед введением клеток в виде суспензии. На уровне ткани наиболее вероятными мишенями их действия с учетом локальной диффузии компонентов секретома являются грануляционная ткань и входящие в ее состав кровеносные сосуды. Стабилизация последних, вероятно, вносит вклад в уменьшение фиброза и способствует полной регенерации дермы, которую мы наблюдали при трансплантации клеточных пластов на модели пролежневого дефекта.

Опираясь на полученный профиль секретома мезенхимных стромальных клеток, а также на данные о его влиянии на ангиогенез и рост ткани в области, на которую производилась трансплантация клеточных пластов, мы предприняли попытку оценить ангиогенную эффективность конструкций на модели ишемии задней конечности у мыши. С учетом отсутствия в литературе данных такого рода, а также широкой распространенности хронической ишемии нижних конечностей и низкой эффективности клеточной терапии, мы провели прямое сравнительное исследование методов трансплантации клеточных пластов и суспензионного введения мезенхимных стромальных клеток в эквивалентном количестве.

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 значимо превосходило показатель в группе инъекции мезенхимных стромальных клеток. В отношении последней можно отметить, что суспензия также улучшала перфузию значимо по сравнению с нелеченым контролем.

Данные лазер-доплеровского исследования об эффективности клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток были подкреплены гистологическим исследованием, которое выявило повышение плотности капилляров и уменьшение площади некроза, которые свидетельствовали об эффективном ангиогенезе и восстановлении трофики тканей. Суспензионное введение мезенхимных стромальных клеток также оказало выраженный эффект на плотность сосудов и снижение некроза скелетных мышц, однако уступало по обоим показателям трансплантации клеточных пластов.

Полученные нами результаты показали не только преимущество клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток перед введением суспензии в ишемизированную скелетную мышцу, но и впервые позволили охарактеризовать состояние клеточных пластов при подкожной трансплантации. Мы смогли детектировать их по флуоресцентной метке на 14 день после проведения хирургического вмешательства, а также обнаружили признаки интеграции: наличие капиллярных сосудов и пролиферирующих (Ki-67+) клеток, в т.ч. и несущих метку, внесенную перед трансплантацией клеточных пластов. Встречаемость в толще конструкции

клеток с признаками активации апоптоза (каспаза-3) 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 наши собственные результаты о возможности усиления ангиогенного действия мезенхимных стромальных клеток с помощью экспрессии VEGF165 [327], мы предприняли попытку использовать эту же стратегию для клеточных пластов и расширить возможности данной платформы.

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. Наиболее интересные результаты по эффективности и жизнеспособности мезенхимных стромальных клеток были получены при внесении бакуловирусных частиц в р-ре Хэнкса со временем инкубации равным 6 часам.

В опыте на модели ишемии задней конечности у мыши мы обнаружили, что трансплантация клеточных пластов, экспрессирующих VEGF165 после бакуловирусной трансдукции, приводила к резкому росту перфузии конечности, превосходя как ложно-трансдуцированные клеточные пласты, так и введение суспензии мезенхимных стромальных клеток в виде инъекции.

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

При анализе удержания трансплантированного клеточного пласта мы также обнаружили признаки его васкуляризации, причем не только капиллярами, но и сосудами более крупного калибра с α -ГМА+ стенками. Мы не обнаружили в значимого усиления инвазии клеток моноцитарного ряда или усиления апоптоза мезенхимных стромальных клеток в составе генетически модифицированных клеточных пластов. Данный результат указывает на

отсутствие усиления иммунного ответа и сохранность мезенхимных стромальных клеток, подвергшихся трансдукции бакуловирусом и экспрессирующих высокие титры VEGF165. Аналогично мы не обнаружили роста доли пролиферирующих клеток в модифицированных клеточных пластах, что сняло вопрос о возможном митогенном действии VEGF165 на клетки в его составе.

Вопрос о происхождении сосудов в толще трансплантированного пласта остается открытым. Непродолжительное время нахождения мезенхимных стромальных клеток в культуре и использование стандартных условий культивирования (DMEM/10% ФБС) при нормальном напряжении O₂ практически полностью исключают возможность того, что часть мезенхимных стромальных клеток успела реализовать умеренный потенциал к дифференцировке в эндотелиальном направлении [372]. Наиболее вероятным является механизм васкуляризации за счет прорастания капилляров из тканей реципиента по аналогии с тем, как это происходит бесклеточными конструкциями из белков внеклеточного матрикса [327, 420].

Основным механизмом регенераторного потенциала клеточных пластов является паракринное действие секрета, однако нами был также поставлен вопрос о механизме самоорганизации клеток и изменении их к дифференцировке в составе пластов. При этом нами было показано повышение эффективности дифференцировки мезенхимных стромальных клеток в остео- и хондрогенном направлениях при незначимых изменениях адипогенеза. Эти результаты указывают, скорее, на реализацию определенной программы, активируемой при формировании клеточных пластов, нежели на кумулятивный эффект количества клеток и накопленных факторов микроокружения. Выбор мезенхимными стромальными клетками предпочтительных направлений дифференцировки позволил сделать предположение об их коммитировании в формирование 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 мы в рамках работы именовали «компактными» и «разреженными» соответственно. Мы впервые обратили внимание на их появление в толще клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток и связали их с наблюдавшимся усилением дифференцировки в остео- и хондрогенном направлениях.

Разделив компактные и разреженные области клеточных пластов с помощью лазерной микродиссекции, мы смогли провести их РНК-секвенирование. Биоинформатический анализ полученных транскриптомных данных показал, что в компактных областях имелись признаки высокой активности сигнального пути, ассоциированного с малыми Rho-ГТФазами 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. При ее подавлении также полностью нивелировалось наблюдавшееся нами усиление хондрогенеза. Более того, 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 [299]. 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 [421]. Наша работа стала первым упоминанием в одном контексте процессов организации тканеинженерных конструкций из мезенхимных стромальных клеток и конденсации эмбриональной мезенхимы, а также обнаружившей гетерогенность структуры и свойств клеток в составе клеточных пластов. Большая часть источников, включая наши ранние работы, указывают на гомогенность клеточных пластов и их преимущество перед сфероидами по этому параметру.

С прикладной точки зрения обнаруженные нами изменения дифференцировки свойств мезенхимных стромальных клеток, которые мы описали как коммитирование в сторону тканей опорно-двигательного аппарата, объясняют многократно воспроизведенные доклинические результаты об эффективности мезенхимных стромальных клеток для восстановления костной ткани и хрящей. Кроме того, они на уровне механизма обосновывают расширение показаний для их применения и позволяют в будущем предложить подходы для направленного запуска клеточных пластов в дифференцировку перед трансплантацией.

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 завершалось 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 СОКРАЩЕНИЙ

ВВ	–	внеклеточные везикулы
ВД-А	–	дополнительный внеклеточный домен А
ВКМ	–	внеклеточный матрикс
ГСК	–	гематопоэтическая стволовая клетка
ГМК	–	гладкомышечная клетка
ГМА	–	гладкомышечный актин
ГТ	–	грануляционная ткань
дВКМ	–	децеллюляризованный внеклеточный матрикс
ДК	–	дендритные клетки
КИ	–	клиническое исследование
КИНК	–	критическая ишемия нижних конечностей
КМ	–	костный мозг
КП	–	клеточный пласт
МСК	–	мезенхимные стромальные клетки
ЖТ	–	жировая ткань
ММП	–	матриксная металлопротеиназа
ОА	–	остеоартроз
ПЭГ	–	полиэтиленгликоль
РМ	–	регенеративная медицина
СК	–	стволовая клетка
СТ	–	соединительная ткань
СЭМ	–	сканирующая электронная микроскопия
ТИ	–	тканевая инженерия
ТИК	–	тканеинженерная конструкция
УЗ	–	ультразвук
УФ	–	ультрафиолетовый
ФБС	–	фетальная бычья сыворотка
ФР	–	фактор роста
ФСБ	–	фосфатно-солевой буфер
ХИНК	–	хроническая ишемия нижних конечностей
ЦНС	–	центральная нервная система
ЭДТА	–	этилендиаминтетрауксусная кислота
ЭК	–	эндотелиальные клетки

- BDNF – мозговой нейротрофический фактора
- BMP – костный морфогенетический белок
- AP-1 – активирующий белок-1
- CD – кластер дифференцировки
- COMEC – культивированные клетки слизистой оболочки полости рта
- CHAPS – 3-((3-холамидопропил)диметиламмоний)-1-пропансульфонат
- DAPI – 4,6-диамиидно-2-фенилиндол
- DAMPs – ассоциированные с повреждением молекулярные паттерны
- FGF – фактор роста фибробластов
- HBSS – буферный раствор Хэнкса
- HIF – индуцируемый гипоксией фактор транскрипции
- HGF – фактор роста гепатоцитов
- IFN – интерферон
- IGF – инсулиноподобный фактор роста
- IL – интерлейкин
- NF κ B – ядерный фактор κ -B
- PAMPs – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны
- PDGF – тромбоцитарный фактор роста
- PDGFR – рецептор тромбоцитарного фактора роста
- PGE2 – простагландин E2
- PLGA – полилактид-ко-гликолид
- PRR – рецептор распознавания паттернов
- TGF- β – трансформирующий фактор роста бета
- TIMP – тканевой ингибитор металлопротеазы
- TLR – Toll-подобный рецептор
- TNF- α – фактор некроза опухолей- α
- VEGF – эндотелиальный фактор роста сосудов
- vWF – фактор фон Виллебранда

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A proposed definition of regenerative medicine / A.S. Daar, H.L. Greenwood // *J Tissue Eng Regen Med.* – 2007. – V. 1. – №. 3. – P. 179-184.
2. Regenerative medicine: then and now - an update of recent history into future possibilities / E. Polykandriotis, L.M. Popescu, R.E. Horch // *J Cell Mol Med.* – 2010. – V. 14. – №. 10. – P. 2350-2358.
3. A brief overview of global trends in MSC-based cell therapy / D. Jovic, Y. Yu, D. Wang [et al.] // *Stem Cell Rev Rep.* – 2022. – V. 18. – №. 5. – P. 1525-1545.
4. Mesenchymal stem cells in tissue growth and repair / N.I. Kalinina, V.Y. Sysoeva, K.A. Rubina [et al.] // *Acta Naturae.* – 2011. – V. 3. – №. 4. – P. 30-37.
5. Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges / F. Berthiaume, T.J. Maguire, M.L. Yarmush // *Annu Rev Chem Biomol Eng.* – 2011. – V. 2. – P. 403-430.
6. Impact of passing mesenchymal stem cells through smaller bore size needles for subsequent use in patients for clinical or cosmetic indications / M.K. Mamidi, G. Singh, J.M. Husin [et al.] // *J Transl Med.* – 2012. – V. 10. – P. 229.
7. Functional organ replacement, the new technology of tissue engineering / C.A. Vacanti, J.P. Vacanti // *Surg Technol Int.* – 1991. – V. 1. – P. 43-49.
8. Tissue-engineered grafts from human decellularized extracellular matrices: a systematic review and future perspectives / A. Porzionato, E. Stocco, S. Barbon [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2018. – V. 19. – №. 12. – P. 4117.
9. Engineering structurally organized cartilage and bone tissues / B. Sharma, J.H. Elisseeff // *Ann Biomed Eng.* – 2004. – V. 32. – №. 1. – P. 148-159.
10. A novel recovery system for cultured cells using plasma-treated polystyrene dishes grafted with poly(N-isopropylacrylamide) / T. Okano, N. Yamada, H. Sakai [et al.] // *J Biomed Mater Res.* – 1993. – V. 27. – №. 10. – P. 1243-1251.
11. 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 [et al.] // *Гены и Клетки.* – 2015. – V. 10. – №. 3. – P. 68-77.
12. Cell sheet engineering / M. Yamato, T. Okano // *Materials Today.* – 2004. – V. 7. – №. 5. – P. 42-47.

13. Cell sheet formation enhances the therapeutic effects of human umbilical cord mesenchymal stem cells on myocardial infarction as a bioactive material / R. Guo, F. Wan, M. Morimatsu [et al.] // *Bioact Mater.* – 2021. – V. 6. – №. 9. – P. 2999-3012.
14. Cell sheets engineering for esophageal regenerative medicine / N. Kanai, M. Yamato, T. Okano // *Ann Transl Med.* – 2014. – V. 2. – №. 3. – P. 28.
15. Novel therapies using cell sheets engineered from allogeneic mesenchymal stem/stromal cells / M. Kondo, S. Kameishi, D.W. Grainger [et al.] // *Emerg Top Life Sci.* – 2020. – V. 4. – №. 6. – P. 677-689.
16. Advances in regenerative therapy: A review of the literature and future directions / E.H. Ntege, H. Sunami, Y. Shimizu // *Regen Ther.* – 2020. – V. 14. – P. 136-153.
17. A pilot study using cell-mixed sheets of autologous fibroblast cells and peripheral blood mononuclear cells to treat refractory cutaneous ulcers / T. Mizoguchi, K. Suehiro, K. Ueno [et al.] // *Am J Transl Res.* – 2021. – V. 13. – №. 8. – P. 9495-9504.
18. Cell sheet technology for regeneration of esophageal mucosa / R. Takagi, M. Yamato, N. Kanai [et al.] // *World J Gastroenterol.* – 2012. – V. 18. – №. 37. – P. 5145-5150.
19. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells / A.J. Becker, C.E. Mc, J.E. Till // *Nature.* – 1963. – V. 197. – P. 452-454.
20. Tissue resident stem cells: till death do us part / H. Raveh-Amit, S. Berzsenyi, V. Vas [et al.] // *Biogerontology.* – 2013. – V. 14. – №. 6. – P. 573-590.
21. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp / S. Shi, S. Gronthos // *J Bone Miner Res.* – 2003. – V. 18. – №. 4. – P. 696-704.
22. 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. – V. 85. – №. 1. – P. 15-33.
23. Introduction to stem cells and regenerative medicine / G. Kolios, Y. Moodley // *Respiration.* – 2013. – V. 85. – №. 1. – P. 3-10.
24. Stem cells in regenerative biology and medicine / D.L. Stocum // *Wound Repair Regen.* – 2001. – V. 9. – №. 6. – P. 429-442.
25. Growth factors for skeletal muscle tissue engineering / B.C. Syverud, K.W. VanDusen, L.M. Larkin // *Cells Tissues Organs.* – 2016. – V. 202. – №. 3-4. – P. 169-179.
26. Concise review: tailoring bioengineered scaffolds for stem cell applications in tissue engineering and regenerative medicine / S. Cosson, E.A. Otte, H. Hezaveh [et al.] // *Stem Cells Transl Med.* – 2015. – V. 4. – №. 2. – P. 156-164.
27. The stem cell niche / M.R. Walker, K.K. Patel, T.S. Stappenbeck // *J Pathol.* – 2009. – V. 217. – №. 2. – P. 169-180.

28. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis / S.M. Frisch, H. Francis // *J Cell Biol.* – 1994. – V. 124. – №. 4. – P. 619-626.
29. Efficacy of mesenchymal stem cell-delivery using perpendicular multi-needle injections to the skin: Evaluation of post-ejection cellular health and dermal delivery / F. Rangatchew, B.S. Rasmussen, J.D. Svalgaard [et al.] // *Burns.* – 2023. – V. 49. – №. 3. – P. 633-645.
30. Genetic engineering of hematopoiesis: current stage of clinical translation and future perspectives / L. Naldini // *EMBO Mol Med.* – 2019. – V. 11. – №. 3. – P. e9958.
31. Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (SafeCell): a systematic review and meta-analysis of clinical trials / M.M. Lalu, L. McIntyre, C. Pugliese [et al.] // *PLoS One.* – 2012. – V. 7. – №. 10. – P. e47559.
32. Stem cell therapies in clinical trials: progress and challenges / A. Trounson, C. McDonald // *Cell Stem Cell.* – 2015. – V. 17. – №. 1. – P. 11-22.
33. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations / B.P. Chan, K.W. Leong // *Eur Spine J.* – 2008. – V. 17 Suppl 4. – №. Suppl 4. – P. 467-479.
34. Role of bioreactor technology in tissue engineering for clinical use and therapeutic target design / C. Selden, B. Fuller // *Bioengineering (Basel).* – 2018. – V. 5. – №. 2. – P. 32.
35. An update to space biomedical research: tissue engineering in microgravity bioreactors / A. Barzegari, A.A. Saei // *Bioimpacts.* – 2012. – V. 2. – №. 1. – P. 23-32.
36. Bioreactor design and validation for manufacturing strategies in tissue engineering / D. Lim, E.S. Renteria, D.S. Sime [et al.] // *Biodes Manuf.* – 2022. – V. 5. – №. 1. – P. 43-63.
37. A review of 3D polymeric scaffolds for bone tissue engineering: principles, fabrication techniques, immunomodulatory roles, and challenges / A.G. Abdelaziz, H. Nageh, S.M. Abdo [et al.] // *Bioengineering (Basel).* – 2023. – V. 10. – №. 2. – P. 204.
38. Extracellular matrix revisited: roles in tissue engineering / Y. Kim, H. Ko, I.K. Kwon [et al.] // *Int Neurourol J.* – 2016. – V. 20. – №. Suppl 1. – P. S23-29.
39. Технологии тканевой инженерии и регенеративной медицины в лечении дефектов хрящевой ткани суставов / Ю.Б. Басок, В.И. Севастьянов // *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* – 2016. – V. 18. – №. 4. – P. 102-122.
40. A review on the use of computational methods to characterize, design, and optimize tissue engineering scaffolds, with a potential in 3D printing fabrication / S. Zhang, S. Vijayavenkataraman, W.F. Lu [et al.] // *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* – 2019. – V. 107. – №. 5. – P. 1329-1351.
41. Современное состояние тканевой инженерии для восстановления хрящевой ткани / Е.Е. Бекетов, Е.В. Исаева, П.В. Шегай [et al.] // *Гены и Клетки.* – 2019. – V. 14. – №. 2. – P. 12-20.
42. The immune reaction and degradation fate of scaffold in cartilage/bone tissue engineering / D. Yang, J. Xiao, B. Wang [et al.] // *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* – 2019. – V. 104. – P. 109927.

43. Photocrosslinked hyaluronic acid hydrogels: natural, biodegradable tissue engineering scaffolds / J. Baier Leach, K.A. Bivens, C.W. Patrick, Jr. [et al.] // *Biotechnol Bioeng.* – 2003. – V. 82. – №. 5. – P. 578-589.
44. Collagen-based biomaterials as 3D scaffold for cell cultures: applications for tissue engineering and gene therapy / B. Chevally, D. Herbage // *Med Biol Eng Comput.* – 2000. – V. 38. – №. 2. – P. 211-218.
45. Poly(alpha-hydroxyl acids)/hydroxyapatite porous composites for bone-tissue engineering. I. Preparation and morphology / R. Zhang, P.X. Ma // *J Biomed Mater Res.* – 1999. – V. 44. – №. 4. – P. 446-455.
46. Bone augmentation using a highly porous PLGA/beta-TCP scaffold containing fibroblast growth factor-2 / T. Yoshida, H. Miyaji, K. Otani [et al.] // *J Periodontal Res.* – 2015. – V. 50. – №. 2. – P. 265-273.
47. Fabrication of porous substrates: a review of processes using pore forming agents in the biomaterial field / E. Chevalier, D. Chulia, C. Pouget [et al.] // *J Pharm Sci.* – 2008. – V. 97. – №. 3. – P. 1135-1154.
48. Rapid prototyping of tissue-engineering constructs, using photopolymerizable hydrogels and stereolithography / B. Dhariwala, E. Hunt, T. Boland // *Tissue Eng.* – 2004. – V. 10. – №. 9-10. – P. 1316-1322.
49. Bone tissue engineering using human mesenchymal stem cells: effects of scaffold material and medium flow / L. Meinel, V. Karageorgiou, R. Fajardo [et al.] // *Annals of biomedical engineering.* – 2004. – V. 32. – P. 112-122.
50. Advances in multicellular spheroids formation / X. Cui, Y. Hartanto, H. Zhang // *J R Soc Interface.* – 2017. – V. 14. – №. 127. – P. 20160877.
51. Decellularization of tissues and organs / T.W. Gilbert, T.L. Sellaro, S.F. Badylak // *Biomaterials.* – 2006. – V. 27. – №. 19. – P. 3675-3683.
52. Axonal regeneration through acellular muscle grafts / S. Hall // *J Anat.* – 1997. – V. 190 (Pt 1). – №. Pt 1. – P. 57-71.
53. The use of ultrasonication to aid recellularization of acellular natural tissue scaffolds for use in anterior cruciate ligament reconstruction / J.H. Ingram, S. Korossis, G. Howling [et al.] // *Tissue Eng.* – 2007. – V. 13. – №. 7. – P. 1561-1572.
54. Децеллюляризованный внеклеточный матрикс для тканевой инженерии (обзор) / Е.В. Исаева, Е.Е. Бекетов, Н.В. Аргучинская [et al.] // *Современные технологии в медицине.* – 2022. – V. 14. – №. 3. – P. 57-69.
55. Recent advancements in decellularized matrix technology for bone tissue engineering / M. Safdari, B. Bibak, H. Soltani [et al.] // *Differentiation.* – 2021. – V. 121. – P. 25-34.

56. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart / H.C. Ott, T.S. Matthiesen, S.-K. Goh [et al.] // *Nature Medicine*. – 2008. – V. 14. – №. 2. – P. 213-221.
57. Use of decellularized porcine liver for engineering humanized liver organ / O. Barakat, S. Abbasi, G. Rodriguez [et al.] // *J Surg Res*. – 2012. – V. 173. – №. 1. – P. e11-25.
58. Компоненты внеклеточного матрикса в восстановлении поврежденных тканей: биохимические взаимодействия и протективный эффект / К.И. Мелконян, А.О. Бирюкова, Н.Н. Улитина [et al.] // *Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины*. – 2019. – V. 9. – №. 4. – P. 55-62.
59. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types / J.M. Kelm, N.E. Timmins, C.J. Brown [et al.] // *Biotechnol Bioeng*. – 2003. – V. 83. – №. 2. – P. 173-180.
60. A simple hanging drop cell culture protocol for generation of 3D spheroids / R. Foty // *J Vis Exp*. – 2011. — №. 51. – P. 2720.
61. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research / R.Z. Lin, H.Y. Chang // *Biotechnol J*. – 2008. – V. 3. – №. 9-10. – P. 1172-1184.
62. 3D cell culture systems: tumor application, advantages, and disadvantages / O. Habanjar, M. Diab-Assaf, F. Caldefie-Chezet [et al.] // *Int J Mol Sci*. – 2021. – V. 22. – №. 22. – P. 12200.
63. The multicellular tumor spheroid model for high-throughput cancer drug discovery / D.V. LaBarbera, B.G. Reid, B.H. Yoo // *Expert Opin Drug Discov*. – 2012. – V. 7. – №. 9. – P. 819-830.
64. Масштабируемая биофабрикация и морфологическая оценка тканевых сфероидов / А.А. Грядунова, Е.А. Буланова, Е.В. Кудан [et al.] // *Клиническая и экспериментальная морфология*. – 2019. – V. 8. – №. 2. – P. 12-20.
65. Automatic method for fabricating a three- dimensional plastic model with photo- hardening polymer / H. Kodama // *Review of Scientific Instruments*. – 1981. – V. 52. – №. 11. – P. 1770-1773.
66. 3D bioprinting for engineering complex tissues / C. Mandrycky, Z. Wang, K. Kim [et al.] // *Biotechnol Adv*. – 2016. – V. 34. – №. 4. – P. 422-434.
67. 3D bioprinting of tissues and organs / S.V. Murphy, A. Atala // *Nat Biotechnol*. – 2014. – V. 32. – №. 8. – P. 773-785.
68. Введение в 3D-биопринтинг: история формирования направления, принципы и этапы биопечати / Ю.Д. Хесуани, Н.С. Сергеева, В.А. Миронов [et al.] // *Гены и Клетки*. – 2018. – V. 13. – №. 3. – P. 38-45.
69. 3D bioprinting for biomedical devices and tissue engineering: A review of recent trends and advances / S. Derakhshanfar, R. Mbeleck, K. Xu [et al.] // *Bioact Mater*. – 2018. – V. 3. – №. 2. – P. 144-156.

70. Hydrogel bioprinted microchannel networks for vascularization of tissue engineering constructs / L.E. Bertassoni, M. Cecconi, V. Manoharan [et al.] // *Lab Chip*. – 2014. – V. 14. – №. 13. – P. 2202-2211.
71. 3D bioprinting of vascularized, heterogeneous cell-laden tissue constructs / D.B. Kolesky, R.L. Truby, A.S. Gladman [et al.] // *Adv Mater*. – 2014. – V. 26. – №. 19. – P. 3124-3130.
72. Three-dimensional printed trileaflet valve conduits using biological hydrogels and human valve interstitial cells / B. Duan, E. Kapetanovic, L.A. Hockaday [et al.] // *Acta Biomater*. – 2014. – V. 10. – №. 5. – P. 1836-1846.
73. Recent advances in bioprinting techniques: approaches, applications and future prospects / J. Li, M. Chen, X. Fan [et al.] // *J Transl Med*. – 2016. – V. 14. – P. 271.
74. Direct 3D powder printing of biphasic calcium phosphate scaffolds for substitution of complex bone defects / M. Castilho, C. Moseke, A. Ewald [et al.] // *Biofabrication*. – 2014. – V. 6. – №. 1. – P. 015006.
75. Ornamenting 3D printed scaffolds with cell-laid extracellular matrix for bone tissue regeneration / F. Pati, T.H. Song, G. Rijal [et al.] // *Biomaterials*. – 2015. – V. 37. – P. 230-241.
76. 3D printing of composite tissue with complex shape applied to ear regeneration / J.S. Lee, J.M. Hong, J.W. Jung [et al.] // *Biofabrication*. – 2014. – V. 6. – №. 2. – P. 024103.
77. Bio-inspired hydrogel composed of hyaluronic acid and alginate as a potential bioink for 3D bioprinting of articular cartilage engineering constructs / C. Antich, J. de Vicente, G. Jimenez [et al.] // *Acta Biomater*. – 2020. – V. 106. – P. 114-123.
78. Controllable fabrication of hydroxybutyl chitosan/oxidized chondroitin sulfate hydrogels by 3D bioprinting technique for cartilage tissue engineering / C. Li, K. Wang, X. Zhou [et al.] // *Biomed Mater*. – 2019. – V. 14. – №. 2. – P. 025006.
79. Cell Sheets of Mesenchymal Stromal Cells Effectively Stimulate Healing of Deep Soft Tissue Defects / N.A. Aleksandrushkina, N.V. Danilova, O.A. Grigorieva [et al.] // *Bull Exp Biol Med*. – 2019. – V. 167. – №. 1. – P. 159-163.
80. Allogeneic mesenchymal stem cell sheet therapy: A new frontier in drug delivery systems / K. Kim, S. Bou-Ghannam, S. Kameishi [et al.] // *J Control Release*. – 2021. – V. 330. – P. 696-704.
81. Mesenchymal stem cell sheets: a new cell-based strategy for bone repair and regeneration / M. Chen, Y. Xu, T. Zhang [et al.] // *Biotechnol Lett*. – 2019. – V. 41. – №. 3. – P. 305-318.
82. Comparison of different tissue-derived stem cell sheets for periodontal regeneration in a canine 1-wall defect model / Y. Tsumanuma, T. Iwata, K. Washio [et al.] // *Biomaterials*. – 2011. – V. 32. – №. 25. – P. 5819-5825.
83. Application of mesenchymal stem cell sheet to treatment of ischemic heart disease / D. Chang, T. Fan, S. Gao [et al.] // *Stem Cell Res Ther*. – 2021. – V. 12. – №. 1. – P. 384.

84. Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles for regenerative therapy and immune modulation: Progress and challenges toward clinical application / D. Allan, A. Tieu, M. Lalu [et al.] // *Stem Cells Transl Med.* – 2020. – V. 9. – №. 1. – P. 39-46.
85. Сравнительная эффективность эпикардимальной трансплантации прогениторных клеток сердца в виде клеточных пластов и интрамиокардиальных инъекций при стимуляции регенеративных процессов в постинфарктном сердце / К.В. Дергилёв, З.И. Цоколаева, И.Б. Белоглазова [et al.] // *Кардиология.* – 2019. – V. 59. – №. 5. – P. 53-60.
86. Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded ex vivo on a temperature-responsive cell culture surface / K. Nishida, M. Yamato, Y. Hayashida [et al.] // *Transplantation.* – 2004. – V. 77. – №. 3. – P. 379-385.
87. Treatment of oesophageal ulcerations using endoscopic transplantation of tissue-engineered autologous oral mucosal epithelial cell sheets in a canine model / T. Ohki, M. Yamato, D. Murakami [et al.] // *Gut.* – 2006. – V. 55. – №. 12. – P. 1704-1710.
88. Thermo-responsive culture dishes allow the intact harvest of multilayered keratinocyte sheets without disperse by reducing temperature / M. Yamato, M. Utsumi, A. Kushida [et al.] // *Tissue engineering.* – 2001. – V. 7. – №. 4. – P. 473-480.
89. Tissue Engineering Based on Cell Sheet Technology / N. Matsuda, T. Shimizu, M. Yamato [et al.] // *Advanced Materials.* – 2007. – V. 19. – №. 20. – P. 3089-3099.
90. Two-dimensional manipulation of cardiac myocyte sheets utilizing temperature-responsive culture dishes augments the pulsatile amplitude / T. Shimizu, M. Yamato, A. Kikuchi [et al.] // *Tissue engineering.* – 2001. – V. 7. – №. 2. – P. 141-151.
91. Electrically communicating three-dimensional cardiac tissue mimic fabricated by layered cultured cardiomyocyte sheets / T. Shimizu, M. Yamato, T. Akutsu [et al.] // *J. Biomed. Mater. Res.* – 2002. – V. 60. – №. 1. – P. 110-117.
92. Bioengineered cardiac cell sheet grafts have intrinsic angiogenic potential / S. Sekiya, T. Shimizu, M. Yamato [et al.] // *Biochemical and biophysical research communications.* – 2006. – V. 341. – №. 2. – P. 573-582.
93. Growth induced by damage / T.S. Argyris // *Adv Morphog.* – 1968. – V. 7. – P. 1-43.
94. Tissue repair: / R.M.H. McMinn, J.J. Pritchard. – New York, : Academic Press, 1969. – 432 p.
95. Robbins & Cotran pathologic basis of disease: / V. Kumar, A.K. Abbas, J.C. Aster. – Philadelphia, PA: Elsevier, 2021. – 1379 p.
96. Wound healing: a cellular perspective / M. Rodrigues, N. Kosaric, C.A. Bonham [et al.] // *Physiol Rev.* – 2019. – V. 99. – №. 1. – P. 665-706.
97. Tissue-specific hemostasis in mice / N. Mackman // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2005. – V. 25. – №. 11. – P. 2273-2281.

98. Pattern recognition receptors and inflammation / O. Takeuchi, S. Akira // *Cell*. – 2010. – V. 140. – №. 6. – P. 805-820.
99. DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases / T. Gong, L. Liu, W. Jiang [et al.] // *Nat Rev Immunol*. – 2020. – V. 20. – №. 2. – P. 95-112.
100. Janeway's immunobiology: / K. Murphy, C. Weaver. – New York, NY: Garland Science/Taylor & Francis Group, LLC, 2016. – 904 p.
101. Dynamics and plasticity of Weibel-Palade bodies in endothelial cells / M.G. Rondaj, R. Bierings, A. Kragt [et al.] // *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. – 2006. – V. 26. – №. 5. – P. 1002-1007.
102. The Healing Power of Neutrophils / M. Phillipson, P. Kubes // *Trends Immunol*. – 2019. – V. 40. – №. 7. – P. 635-647.
103. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation / E. Kolaczkowska, P. Kubes // *Nat. Rev. Immunol*. – 2013. – V. 13. – №. 3. – P. 159-175.
104. The multifaceted functions of neutrophils / T.N. Mayadas, X. Cullere, C.A. Lowell // *Annu Rev Pathol*. – 2014. – V. 9. – P. 181-218.
105. Macrophage phenotypes during tissue repair / M.L. Novak, T.J. Koh // *Journal of leukocyte biology*. – 2013. – V. 93. – №. 6. – P. 875-881.
106. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling / A. Mantovani, S.K. Biswas, M.R. Galdiero [et al.] // *The Journal of pathology*. – 2013. – V. 229. – №. 2. – P. 176-185.
107. Clearance of apoptotic neutrophils and resolution of inflammation / M.C. Greenlee-Wacker // *Immunol. Rev*. – 2016. – V. 273. – №. 1. – P. 357-370.
108. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis / T.A. Wynn, K.M. Vannella // *Immunity*. – 2016. – V. 44. – №. 3. – P. 450-462.
109. Mesenchymal Stem/Stromal Cells (MSCs): Role as Guardians of Inflammation / D.J. Prockop, J.Y. Oh // *Mol. Ther*. – 2012. – V. 20. – №. 1. – P. 14-20.
110. Mesenchymal stromal cells and the innate immune response / K. Le Blanc, L.C. Davies // *Immunology Letters*. – 2015. – V. 168. – №. 2. – P. 140-146.
111. Concise Review: Two negative feedback loops place mesenchymal stem/stromal cells at the center of early regulators of inflammation / D.J. Prockop // *Stem Cells*. – 2013. – V. 31. – №. 10. – P. 2042-2046.
112. Клеточные пласты из мезенхимных стромальных клеток эффективно стимулируют заживление глубоких дефектов мягких тканей / Н. Александрюшкина, Н. Данилова, О. Григорьева [et al.] // *Клеточные технологии в биологии и медицине*. – 2019. — №. 1. – P. 42-47.
113. Role of fibronectin in normal wound healing / E.A. Lenselink // *Int Wound J*. – 2015. – V. 12. – №. 3. – P. 313-316.

114. Macrophage phenotypes regulate scar formation and chronic wound healing / M. Hesketh, K.B. Sahin, Z.E. West [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2017. – V. 18. – №. 7. – P. 1545.
115. Collagen matrices attenuate the collagen-synthetic response of cultured fibroblasts to TGF-beta / R.A. Clark, L.D. Nielsen, M.P. Welch [et al.] // *J Cell Sci.* – 1995. – V. 108 (Pt 3). – P. 1251-1261.
116. The Molecular and cellular biology of wound repair: / R.A.F. Clark, P.M. Henson. – New York: Plenum Press, 1988. – 597 p.
117. Angiogenesis in health and disease / P. Carmeliet // *Nat Med.* – 2003. – V. 9. – №. 6. – P. 653-660.
118. Терапевтический ангиогенез с применением факторов роста: современное состояние и перспективы развития / П.И. Макаревич, К.А. Рубина, Д. Дыйканов [et al.] // *Кардиология.* – 2015. – V. 55. – №. 9. – P. 59-71.
119. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system / C.W. Pugh, P.J. Ratcliffe // *Nature medicine.* – 2003. – V. 9. – №. 6. – P. 677-684.
120. The role of proteinases in angiogenesis, heart development, restenosis, atherosclerosis, myocardial ischemia, and stroke: insights from genetic studies / A. Luttun, M. Dewerchin, D. Collen [et al.] // *Curr Atheroscler Rep.* – 2000. – V. 2. – №. 5. – P. 407-416.
121. P.I. Makarevich, Y.V. Parfyonova, Therapeutic Angiogenesis: Foundations and Practical Application. In *Physiologic and Pathologic Angiogenesis*, Dan, S.; S. Agneta, Eds. IntechOpen: Rijeka, 2017; p 257.
122. Molecular regulation of vessel maturation / R.K. Jain // *Nat. Med.* – 2003. – V. 9. – №. 6. – P. 685-693.
123. PDGF, TGF-beta, and heterotypic cell-cell interactions mediate endothelial cell-induced recruitment of 10T1/2 cells and their differentiation to a smooth muscle fate / K.K. Hirschi, S.A. Rohovsky, P.A. D'Amore // *The Journal of cell biology.* – 1998. – V. 141. – №. 3. – P. 805-814.
124. Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing / N.S. Greaves, K.J. Ashcroft, M. Baguneid [et al.] // *J Dermatol Sci.* – 2013. – V. 72. – №. 3. – P. 206-217.
125. Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring / M. Xue, C.J. Jackson // *Advances in wound care.* – 2015. – V. 4. – №. 3. – P. 119-136.
126. Mechanisms of force generation and transmission by myofibroblasts / B. Hinz, G. Gabbiani // *Current opinion in biotechnology.* – 2003. – V. 14. – №. 5. – P. 538-546.
127. Reversal of myofibroblast differentiation: a review / X. Yang, B. Chen, T. Liu [et al.] // *European journal of pharmacology.* – 2014. – V. 734. – P. 83-90.
128. The role of myofibroblasts in wound healing / B. Hinz // *Curr Res Transl Med.* – 2016. – V. 64. – №. 4. – P. 171-177.

129. Mechanical regulation of myofibroblast phenoconversion and collagen contraction / B. Hinz, C.A. McCulloch, N.M. Coelho // *Exp Cell Res.* – 2019. – V. 379. – №. 1. – P. 119-128.
130. The Scar-in-a-Jar: studying potential antifibrotic compounds from the epigenetic to extracellular level in a single well / C.Z. Chen, Y.X. Peng, Z.B. Wang [et al.] // *Br J Pharmacol.* – 2009. – V. 158. – №. 5. – P. 1196-1209.
131. TGF-beta1 signaling and tissue fibrosis / K.K. Kim, D. Sheppard, H.A. Chapman // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* – 2018. – V. 10. – №. 4. – P. a022293.
132. Human fibrotic diseases: current challenges in fibrosis research / J. Rosenbloom, E. Macarak, S. Piera-Velazquez [et al.] // *Fibrosis: methods and protocols.* – 2017. — P. 1-23.
133. Сыворотка менструальной крови оказывает противofiброзное действие на мезенхимные стромальные клетки эндометрия человека / Р. Еремичев, О. Макаревич, Н. Александрович [et al.] // *Цитология.* – 2018. – V. 60. – №. 2. – P. 96-103.
134. The control of chondrogenesis / M.B. Goldring, K. Tsuchimochi, K. Ijiri // *J Cell Biochem.* – 2006. – V. 97. – №. 1. – P. 33-44.
135. Developmental control of chondrogenesis and osteogenesis / R. Cancedda, P. Castagnola, F.D. Cancedda [et al.] // *Int J Dev Biol.* – 2000. – V. 44. – №. 6. – P. 707-714.
136. Oxygen and oxidative stress in the perinatal period / I. Torres-Cuevas, A. Parra-Llorca, A. Sanchez-Illana [et al.] // *Redox Biol.* – 2017. – V. 12. – P. 674-681.
137. Changes in regenerative capacity through lifespan / M.H. Yun // *Int J Mol Sci.* – 2015. – V. 16. – №. 10. – P. 25392-25432.
138. Ectopic spleen: An easily identifiable but commonly undiagnosed entity until manifestation of complications / K. Blouhos, K.A. Boulas, I. Salpigktidis [et al.] // *Int J Surg Case Rep.* – 2014. – V. 5. – №. 8. – P. 451-454.
139. Ectopic endometrium: the pathologist's perspective / A. Camboni, E. Marbaix // *Int J Mol Sci.* – 2021. – V. 22. – №. 20. – P. 10974.
140. Brief review of models of ectopic bone formation / M.A. Scott, B. Levi, A. Askarinam [et al.] // *Stem Cells Dev.* – 2012. – V. 21. – №. 5. – P. 655-667.
141. Mesenchymal stromal cells: new directions / A. Keating // *Cell Stem Cell.* – 2012. – V. 10. – №. 6. – P. 709-716.
142. Клетки предшественники для остеогенной и кроветворной тканей. Анализ гетеротопных трансплантатов костного мозга / А.Я. Фриденштейн, К.В. Петракова, А.И. Куролесова [et al.] // *Цитология.* – 1968. – V. 5. – P. 557-567.
143. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors / M. Owen, A.J. Friedenstein // *Ciba Found Symp.* – 1988. – V. 136. – P. 42-60.

144. Stromal mechanisms of bone marrow: cloning in vitro and retransplantation in vivo / A.J. Friedenstein // *Haematol Blood Transfus.* – 1980. – V. 25. – P. 19-29.
145. Mesenchymal stem cells / A.I. Caplan // *J Orthop Res.* – 1991. – V. 9. – №. 5. – P. 641-650.
146. Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! / A.I. Caplan // *Stem Cells Transl Med.* – 2017. – V. 6. – №. 6. – P. 1445-1451.
147. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement / M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller [et al.] // *Cytotherapy.* – 2006. – V. 8. – №. 4. – P. 315-317.
148. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow / S. Gronthos, A.C. Zannettino, S.J. Hay [et al.] // *J Cell Sci.* – 2003. – V. 116. – №. Pt 9. – P. 1827-1835.
149. Mesenchymal stem cells can be obtained from the human saphena vein / D.T. Covas, C.E. Piccinato, M.D. Orellana [et al.] // *Exp Cell Res.* – 2005. – V. 309. – №. 2. – P. 340-344.
150. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells / D.T. Covas, J.L. Siufi, A.R. Silva [et al.] // *Braz J Med Biol Res.* – 2003. – V. 36. – №. 9. – P. 1179-1183.
151. Multilineage potential of cells from the artery wall / Y. Tintut, Z. Alfonso, T. Saini [et al.] // *Circulation.* – 2003. – V. 108. – №. 20. – P. 2505-2510.
152. Molecular mechanisms underlying therapeutic potential of pericytes / C.R. Harrell, B. Simovic Markovic, C. Fellabaum [et al.] // *J Biomed Sci.* – 2018. – V. 25. – №. 1. – P. 21.
153. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises / A. Armulik, G. Genové, C. Betsholtz // *Dev Cell.* – 2011. – V. 21. – №. 2. – P. 193-215.
154. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs / M. Crisan, S. Yap, L. Casteilla [et al.] // *Cell Stem Cell.* – 2008. – V. 3. – №. 3. – P. 301-313.
155. Natural history of mesenchymal stem cells, from vessel walls to culture vessels / I.R. Murray, C.C. West, W.R. Hardy [et al.] // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2014. – V. 71. – №. 8. – P. 1353-1374.
156. Role of human corneal stroma-derived mesenchymal-like stem cells in corneal immunity and wound healing / Z. Veréb, S. Póliska, R. Albert [et al.] // *Scientific Reports.* – 2016. – V. 6. – №. 1. – P. 26227.
157. How similar are human mesenchymal stem cells derived from different origins? a review of comparative studies / N.K. Farkhad, A. Mahmoudi, E. Mahdipour // *Curr Stem Cell Res Ther.* – 2021. – V. 16. – №. 8. – P. 980-993.
158. Mesenchymal stem cells and pericytes: to what extent are they related? / L.E. de Souza, T.M. Malta, S. Kashima Haddad [et al.] // *Stem Cells Dev.* – 2016. – V. 25. – №. 24. – P. 1843-1852.
159. Activation, homing, and role of the mesenchymal stem cells in the inflammatory environment / L. Zachar, D. Bacenkova, J. Rosocha // *J Inflamm Res.* – 2016. – V. 9. – P. 231-240.

160. 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 [et al.] // *Front Cell Dev Biol.* – 2021. – V. 9. – P. 662078.
161. Functional heterogeneity of protein kinase A activation in multipotent stromal cells / P.A. Tyurin-Kuzmin, M.N. Karagyaur, K.Y. Kulebyakin [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2020. – V. 21. – №. 12. – P. 4442.
162. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains / G.C. Kopen, D.J. Prockop, D.G. Phinney // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1999. – V. 96. – №. 19. – P. 10711-10716.
163. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro / S. Makino, K. Fukuda, S. Miyoshi [et al.] // *J Clin Invest.* – 1999. – V. 103. – №. 5. – P. 697-705.
164. In vitro differentiation of embryonic and adult stem cells into hepatocytes: state of the art / S. Snykers, J. De Kock, V. Rogiers [et al.] // *Stem Cells.* – 2009. – V. 27. – №. 3. – P. 577-605.
165. Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues / A. Arthur, G. Rychkov, S. Shi [et al.] // *Stem Cells.* – 2008. – V. 26. – №. 7. – P. 1787-1795.
166. Characterization of secretomes provides evidence for adipose-derived mesenchymal stromal cells subtypes / N. Kalinina, D. Kharlampieva, M. Loguinova [et al.] // *Stem cell research & therapy.* – 2015. – V. 6. – P. 1-12.
167. PGE2 maintains self-renewal of human adult stem cells via EP2-mediated autocrine signaling and its production is regulated by cell-to-cell contact / B.C. Lee, H.S. Kim, T.H. Shin [et al.] // *Sci Rep.* – 2016. – V. 6. – P. 26298.
168. Autocrine regulation of interferon gamma in mesenchymal stem cells plays a role in early osteoblastogenesis / G. Duque, D.C. Huang, M. Macoritto [et al.] // *Stem Cells.* – 2009. – V. 27. – №. 3. – P. 550-558.
169. The role of paracrine and autocrine signaling in the early phase of adipogenic differentiation of adipose-derived stem cells / M. Hemmingsen, S. Vedel, P. Skafte-Pedersen [et al.] // *PLoS One.* – 2013. – V. 8. – №. 5. – P. e63638.
170. Long noncoding RNA repressor of adipogenesis negatively regulates the adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells through the hnRNP A1-PTX3-ERK axis / Y. Pan, Z. Xie, S. Cen [et al.] // *Clin Transl Med.* – 2020. – V. 10. – №. 7. – P. e227.
171. Regulation of human mesenchymal stem cell functions by an autocrine loop involving NAD⁺ release and P2Y₁₁-mediated signaling / F. Fruscione, S. Scarfi, C. Ferraris [et al.] // *Stem Cells Dev.* – 2011. – V. 20. – №. 7. – P. 1183-1198.

172. Conditioned medium from human mesenchymal stromal cells: towards the clinical translation / G. Sagaradze, O. Grigorieva, P. Nimiritsky [et al.] // *International journal of molecular sciences*. – 2019. – V. 20. – №. 7. – P. 1656.
173. Angiogenic properties of aged adipose derived mesenchymal stem cells after hypoxic conditioning / A. Efimenko, E. Starostina, N. Kalinina [et al.] // *J Transl Med*. – 2011. – V. 9. – P. 10.
174. Regulation of adipose tissue stem cells angiogenic potential by tumor necrosis factor- alpha / E.S. Zubkova, I.B. Beloglazova, P.I. Makarevich [et al.] // *Journal of cellular biochemistry*. – 2016. – V. 117. – №. 1. – P. 180-196.
175. Adipose-derived stem cells stimulate regeneration of peripheral nerves: BDNF secreted by these cells promotes nerve healing and axon growth de novo / T. Lopatina, N. Kalinina, M. Karagyaur [et al.] // *PloS one*. – 2011. – V. 6. – №. 3. – P. e17899.
176. Emergence of the stem cell secretome in regenerative engineering / L. Daneshmandi, S. Shah, T. Jafari [et al.] // *Trends Biotechnol*. – 2020. – V. 38. – №. 12. – P. 1373-1384.
177. Hepatogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells / R. Talens-Visconti, A. Bonora, R. Jover [et al.] // *World J Gastroenterol*. – 2006. – V. 12. – №. 36. – P. 5834-5845.
178. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies / P.A. Zuk, M. Zhu, H. Mizuno [et al.] // *Tissue Eng*. – 2001. – V. 7. – №. 2. – P. 211-228.
179. Сравнительная оценка источников мезенхимальных стволовых клеток: костный мозг и жировая ткань / К.В. Зайцев, И.А. Хлусов, О.Б. Жукова [et al.] // *Медицина и фармацевтика*. – 2019. – V. 9. – №. 10. – P. 4-7.
180. Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use / H.M. Lazarus, S.E. Haynesworth, S.L. Gerson [et al.] // *Bone marrow transplantation*. – 1995. – V. 16. – №. 4. – P. 557-564.
181. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta / E.M. Horwitz, D.J. Prockop, L.A. Fitzpatrick [et al.] // *Nat Med*. – 1999. – V. 5. – №. 3. – P. 309-313.
182. Shattering barriers toward clinically meaningful MSC therapies / O. Levy, R. Kuai, E.M.J. Siren [et al.] // *Sci Adv*. – 2020. – V. 6. – №. 30. – P. eaba6884.
183. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses / S. Aggarwal, M.F. Pittenger // *Blood*. – 2005. – V. 105. – №. 4. – P. 1815-1822.
184. Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells / K. Le Blanc // *Cytotherapy*. – 2003. – V. 5. – №. 6. – P. 485-489.

185. Clinical trials with mesenchymal stem cells: an update / T. Squillaro, G. Peluso, U. Galderisi // *Cell transplantation*. – 2016. – V. 25. – №. 5. – P. 829-848.
186. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects / F. Gao, S.M. Chiu, D.A. Motan [et al.] // *Cell Death Dis.* – 2016. – V. 7. – №. 1. – P. e2062.
187. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest energy of activated T cells / S. Glennie, I. Soeiro, P.J. Dyson [et al.] // *Blood*. – 2005. – V. 105. – №. 7. – P. 2821-2827.
188. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions / A. Corcione, F. Benvenuto, E. Ferretti [et al.] // *Blood*. – 2006. – V. 107. – №. 1. – P. 367-372.
189. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study / K. Le Blanc, F. Frassoni, L. Ball [et al.] // *Lancet*. – 2008. – V. 371. – №. 9624. – P. 1579-1586.
190. Cytolytic pathways in haematopoietic stem-cell transplantation / M.R. van den Brink, S.J. Burakoff // *Nat Rev Immunol.* – 2002. – V. 2. – №. 4. – P. 273-281.
191. Monoclonal antibodies for the prevention and treatment of graft-versus-host disease / R.J. Bruner, S.S. Farag // *Semin Oncol.* – 2003. – V. 30. – №. 4. – P. 509-519.
192. Therapeutic potential of human umbilical cord mesenchymal stem cells in the treatment of rheumatoid arthritis / Y. Liu, R. Mu, S. Wang [et al.] // *Arthritis Res Ther.* – 2010. – V. 12. – №. 6. – P. R210.
193. Treatment of experimental arthritis by inducing immune tolerance with human adipose-derived mesenchymal stem cells / M.A. Gonzalez, E. Gonzalez-Rey, L. Rico [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2009. – V. 60. – №. 4. – P. 1006-1019.
194. Administering human adipose-derived mesenchymal stem cells to prevent and treat experimental arthritis / B. Zhou, J. Yuan, Y. Zhou [et al.] // *Clin Immunol.* – 2011. – V. 141. – №. 3. – P. 328-337.
195. Mesenchymal stem cell-based therapy for rheumatoid arthritis / M. Sarsenova, A. Issabekova, S. Abisheva [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2021. – V. 22. – №. 21. – P. 11592.
196. The critical role of mesenchymal stromal/stem cell therapy in COVID-19 patients: An updated review / M. Ebrahimi, M.T.S. Rad, A. Zebardast [et al.] // *Cell Biochem Funct.* – 2021. – V. 39. – №. 8. – P. 945-954.
197. Transplantation of ACE2(-) mesenchymal stem cells improves the outcome of patients with COVID-19 pneumonia / Z. Leng, R. Zhu, W. Hou [et al.] // *Aging Dis.* – 2020. – V. 11. – №. 2. – P. 216-228.
198. Three-dimensional electrospun nanofibrous scaffolds displaying bone morphogenetic protein-2-derived peptides for the promotion of osteogenic differentiation of stem cells and bone regeneration / K. Ye, D. Liu, H. Kuang [et al.] // *J Colloid Interface Sci.* – 2019. – V. 534. – P. 625-636.

199. Adult stem cells for bone regeneration and repair / M.R. Iaquina, E. Mazzoni, I. Bononi [et al.] // *Front Cell Dev Biol.* – 2019. – V. 7. – P. 268.
200. Mesenchymal stem cells: amazing remedies for bone and cartilage defects / P. Kangari, T. Talaei-Khozani, I. Razeghian-Jahromi [et al.] // *Stem Cell Res Ther.* – 2020. – V. 11. – №. 1. – P. 492.
201. Mesenchymal stromal cell-based therapy for cartilage regeneration in knee osteoarthritis / X.N. Xiang, S.Y. Zhu, H.C. He [et al.] // *Stem Cell Res Ther.* – 2022. – V. 13. – №. 1. – P. 14.
202. Mesenchymal stem cells for neurological disorders / A. Andrzejewska, S. Dabrowska, B. Lukomska [et al.] // *Adv Sci (Weinh).* – 2021. – V. 8. – №. 7. – P. 2002944.
203. Human mesenchymal stem cells infiltrate the spinal cord, reduce demyelination, and localize to white matter lesions in experimental autoimmune encephalomyelitis / D. Gordon, G. Pavlovska, J.B. Uney [et al.] // *J Neuropathol Exp Neurol.* – 2010. – V. 69. – №. 11. – P. 1087-1095.
204. From micro to macro: the hierarchical design in a micropatterned scaffold for cell assembling and transplantation / K. Wang, X. Wang, C. Han [et al.] // *Adv Mater.* – 2017. – V. 29. – №. 2. – P. 1604600.
205. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility / R.J. Pelham, Y.-I. Wang // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 1997. – V. 94. – №. 25. – P. 13661-13665.
206. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification / A.J. Engler, S. Sen, H.L. Sweeney [et al.] // *Cell.* – 2006. – V. 126. – №. 4. – P. 677-689.
207. Extracellular-matrix tethering regulates stem-cell fate / B. Trappmann, J.E. Gautrot, J.T. Connelly [et al.] // *Nature Materials.* – 2012. – V. 11. – №. 7. – P. 642-649.
208. Matrix biophysical cues direct mesenchymal stromal cell functions in immunity / S.W. Wong, S. Lenzini, R. Giovanni [et al.] // *Acta biomaterialia.* – 2021. – V. 133. – P. 126-138.
209. Mesenchymal stromal/stem cell (MSC)-based vector biomaterials for clinical tissue engineering and inflammation research: a narrative mini review / J. Xue, Y. Liu // *J Inflamm Res.* – 2023. – V. 16. – P. 257-267.
210. Stem cell technology using bioceramics: hard tissue regeneration towards clinical application / H. Ohnishi, Y. Oda, H. Ohgushi // *Sci Technol Adv Mater.* – 2010. – V. 11. – №. 1. – P. 014110.
211. Биокерамика на основе фосфатов кальция: / С.М. Баринов, В.С. Комлев. – Москва: Наука, 2005. – 204 p.
212. Plasma sprayed wollastonite/TiO₂ composite coatings on titanium alloys / X. Liu, C. Ding // *Biomaterials.* – 2002. – V. 23. – №. 20. – P. 4065-4077.
213. Chitosan reinforced apatite-wollastonite coating by electrophoretic deposition on titanium implants / S. Sharma, V.P. Soni, J.R. Bellare // *J Mater Sci Mater Med.* – 2009. – V. 20. – №. 7. – P. 1427-1436.

214. Hydration mechanism of a calcium phosphate cement modified with phytic acid / K. Hurle, J. Weichhold, M. Brueckner [et al.] // *Acta Biomater.* – 2018. – V. 80. – P. 378-389.
215. Stem cells and calcium phosphate cement scaffolds for bone regeneration / P. Wang, L. Zhao, W. Chen [et al.] // *J Dent Res.* – 2014. – V. 93. – №. 7. – P. 618-625.
216. Cell therapy for bone disease: a review of current status / R. Cancedda, G. Bianchi, A. Derubeis [et al.] // *Stem Cells.* – 2003. – V. 21. – №. 5. – P. 610-619.
217. Repair of bone defects with marrow cells and porous ceramic. Experiments in rats / H. Ohgushi, V.M. Goldberg, A.I. Caplan // *Acta Orthop Scand.* – 1989. – V. 60. – №. 3. – P. 334-339.
218. Incorporation of wollastonite bioactive ceramic with titanium for medical applications: An overview / M.Y. Zakaria, A.B. Sulong, N. Muhamad [et al.] // *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* – 2019. – V. 97. – P. 884-895.
219. Early efficacy evaluation of mesenchymal stromal cells (MSC) combined to biomaterials to treat long bone non-unions / E. Gomez-Barrena, N. Padilla-Eguiluz, P. Rosset [et al.] // *Injury.* – 2020. – V. 51 Suppl 1. – P. S63-S73.
220. Bio-instructive hydrogel expands the paracrine potency of mesenchymal stem cells / N.M. Drzeniek, A. Mazzocchi, S. Schlickeiser [et al.] // *Biofabrication.* – 2021. – V. 13. – №. 4. – P. 10.1088/1758-5090/ac1080a1032.
221. Encapsulated mesenchymal stromal cell microbeads promote endogenous regeneration of osteoarthritic cartilage ex vivo / N. Sahu, P. Agarwal, F. Grandi [et al.] // *Adv Healthc Mater.* – 2021. – V. 10. – №. 8. – P. e2002118.
222. Biocompatibility of alginate-poly-L-lysine microcapsules for cell therapy / G. Orive, S.K. Tam, J.L. Pedraz [et al.] // *Biomaterials.* – 2006. – V. 27. – №. 20. – P. 3691-3700.
223. Anti-oxidant activity reinforced reduced graphene oxide/alginate microgels: Mesenchymal stem cell encapsulation and regeneration of infarcted hearts / G. Choe, S.W. Kim, J. Park [et al.] // *Biomaterials.* – 2019. – V. 225. – P. 119513.
224. Incorporation of small extracellular vesicles in sodium alginate hydrogel as a novel therapeutic strategy for myocardial infarction / K. Lv, Q. Li, L. Zhang [et al.] // *Theranostics.* – 2019. – V. 9. – №. 24. – P. 7403-7416.
225. Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications / A. Muxika, A. Etxabide, J. Uranga [et al.] // *Int J Biol Macromol.* – 2017. – V. 105. – №. Pt 2. – P. 1358-1368.
226. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications / I. Younes, M. Rinaudo // *Mar Drugs.* – 2015. – V. 13. – №. 3. – P. 1133-1174.
227. Treatment of critical-size femoral bone defects with chitosan scaffolds produced by a novel process from textile engineering / B. Zwingenberger, C. Vater, R.L. Bell [et al.] // *Biomedicines.* – 2021. – V. 9. – №. 8. –

228. Alginate-chitosan PEC scaffolds: A useful tool for soft tissues cell therapy / R. Bushkalova, M. Farno, C. Tenailleau [et al.] // *Int J Pharm.* – 2019. – V. 571. – P. 118692.
229. Evaluation of cross-linked chitosan microparticles for bone regeneration / A. Bhat, M.B. Dreifke, Y. Kandimalla [et al.] // *J Tissue Eng Regen Med.* – 2010. – V. 4. – №. 7. – P. 532-542.
230. Chitosan hydrogel-loaded MSC-derived extracellular vesicles promote skin rejuvenation by ameliorating the senescence of dermal fibroblasts / X. Zhao, Y. Liu, P. Jia [et al.] // *Stem Cell Res Ther.* – 2021. – V. 12. – №. 1. – P. 196.
231. A review on chitosan's uses as biomaterial: tissue engineering, drug delivery systems and cancer treatment / R. de Sousa Victor, A. Marcelo da Cunha Santos, B. Viana de Sousa [et al.] // *Materials (Basel).* – 2020. – V. 13. – №. 21. – P. 4995.
232. Hydrogel nanoparticles in drug delivery / M. Hamidi, A. Azadi, P. Rafiei // *Adv Drug Deliv Rev.* – 2008. – V. 60. – №. 15. – P. 1638-1649.
233. An engineered cell-laden adhesive hydrogel promotes craniofacial bone tissue regeneration in rats / M.M. Hasani-Sadrabadi, P. Sarrion, S. Pouraghaei [et al.] // *Sci Transl Med.* – 2020. – V. 12. – №. 534. –
234. Preparation of TGF-beta1-conjugated biodegradable pluronic F127 hydrogel and its application with adipose-derived stem cells / H.H. Jung, K. Park, D.K. Han // *J Control Release.* – 2010. – V. 147. – №. 1. – P. 84-91.
235. Self-crosslinked oxidized alginate/gelatin hydrogel as injectable, adhesive biomimetic scaffolds for cartilage regeneration / B. Balakrishnan, N. Joshi, A. Jayakrishnan [et al.] // *Acta Biomater.* – 2014. – V. 10. – №. 8. – P. 3650-3663.
236. Co-delivery of fibrin-laminin hydrogel with mesenchymal stem cell spheroids supports skeletal muscle regeneration following trauma / P. Genovese, A. Patel, N. Ziemkiewicz [et al.] // *J Tissue Eng Regen Med.* – 2021. – V. 15. – №. 12. – P. 1131-1143.
237. Combined local delivery of tacrolimus and stem cells in hydrogel for enhancing peripheral nerve regeneration / T.M. Saffari, K. Chan, S. Saffari [et al.] // *Biotechnol Bioeng.* – 2021. – V. 118. – №. 7. – P. 2804-2814.
238. Effect of intramyocardial grafting collagen scaffold with mesenchymal stromal cells in patients with chronic ischemic heart disease: a randomized clinical trial / X. He, Q. Wang, Y. Zhao [et al.] // *JAMA Netw Open.* – 2020. – V. 3. – №. 9. – P. e2016236.
239. Economic, clinical and social impact of simple limbal epithelial transplantation for limbal stem cell deficiency / P. Thokala, A. Singh, V.K. Singh [et al.] // *Br J Ophthalmol.* – 2022. – V. 106. – №. 7. – P. 923-928.

240. A low-temperature-printed hierarchical porous sponge-like scaffold that promotes cell-material interaction and modulates paracrine activity of MSCs for vascularized bone regeneration / M. Lian, B. Sun, Y. Han [et al.] // *Biomaterials*. – 2021. – V. 274. – P. 120841.
241. 3D Bioprinting a human iPSC-derived MSC-loaded scaffold for repair of the uterine endometrium / W. Ji, B. Hou, W. Lin [et al.] // *Acta Biomater*. – 2020. – V. 116. – P. 268-284.
242. Engineering multi-cellular spheroids for tissue engineering and regenerative medicine / S.J. Kim, E.M. Kim, M. Yamamoto [et al.] // *Adv Healthc Mater*. – 2020. — P. e2000608.
243. Injectable hydrogels for regenerative medicine / B.S. Kim, C.S. Cho // *Tissue Eng Regen Med*. – 2018. – V. 15. – №. 5. – P. 511-512.
244. Engineering fibrin hydrogels to promote the wound healing potential of mesenchymal stem cell spheroids / K.C. Murphy, J. Whitehead, D. Zhou [et al.] // *Acta Biomater*. – 2017. – V. 64. – P. 176-186.
245. Automated 3D bioassembly of micro-tissues for biofabrication of hybrid tissue engineered constructs / N.V. Mekhileri, K.S. Lim, G.C.J. Brown [et al.] // *Biofabrication*. – 2018. – V. 10. – №. 2. – P. 024103.
246. 3D spheroid culture enhances survival and therapeutic capacities of MSCs injected into ischemic kidney / Y. Xu, T. Shi, A. Xu [et al.] // *J Cell Mol Med*. – 2016. – V. 20. – №. 7. – P. 1203-1213.
247. Cellular spheroids of mesenchymal stem cells and their perspectives in future healthcare / H.-W. Han, S. Asano, S.-h. Hsu // *Applied Sciences*. – 2019. – V. 9. – №. 4. – P. 627.
248. Human adipose-derived mesenchymal stem cell spheroids improve recovery in a mouse model of elastase-induced emphysema / R.J. Cho, Y.S. Kim, J.Y. Kim [et al.] // *BMB Rep*. – 2017. – V. 50. – №. 2. – P. 79-84.
249. Multifactorial experimental design to optimize the anti-inflammatory and proangiogenic potential of mesenchymal stem cell spheroids / K.C. Murphy, J. Whitehead, P.C. Falahee [et al.] // *Stem Cells*. – 2017. – V. 35. – №. 6. – P. 1493-1504.
250. Intraluminal injection of mesenchymal stromal cells in spheroids attenuates experimental colitis / I. Molendijk, M.C. Barnhoorn, E.S. de Jonge-Muller [et al.] // *J Crohns Colitis*. – 2016. – V. 10. – №. 8. – P. 953-964.
251. Mesenchymal stem cell spheroids exhibit enhanced in-vitro and in-vivo osteoregenerative potential / Y. Yamaguchi, J. Ohno, A. Sato [et al.] // *BMC Biotechnol*. – 2014. – V. 14. – P. 105.
252. Treatment of bone defects by transplantation of genetically modified mesenchymal stem cell spheroids / K. Yanagihara, S. Uchida, S. Ohba [et al.] // *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development*. – 2018. – V. 9. – P. 358-366.

253. Three-dimensional scaffold-free fusion culture: the way to enhanced chondrogenesis of in vitro propagated human articular chondrocytes / M. Lehmann, F. Martin, K. Mannigel [et al.] // *European journal of histochemistry: EJH*. – 2013. – V. 57. – №. 4. – P. e31.
254. Fabrication of in vitro 3D mineralized tissue by fusion of composite spheroids incorporating biomineral-coated nanofibers and human adipose-derived stem cells / T. Ahmad, H.J. Shin, J. Lee [et al.] // *Acta Biomaterialia*. – 2018. – V. 74. – P. 464-477.
255. Short-term spheroid formation enhances the regenerative capacity of adipose-derived stem cells by promoting stemness, angiogenesis, and chemotaxis / N.C. Cheng, S.Y. Chen, J.R. Li [et al.] // *Stem Cells Transl Med*. – 2013. – V. 2. – №. 8. – P. 584-594.
256. Three-dimensional spheroid culture of human gingiva-derived mesenchymal stem cells enhances mitigation of chemotherapy-induced oral mucositis / Q. Zhang, A.L. Nguyen, S. Shi [et al.] // *Stem Cells Dev*. – 2012. – V. 21. – №. 6. – P. 937-947.
257. Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2, 3-dioxygenase and bystander M2 macrophage differentiation / M. François, R. Romieu-Mourez, M. Li [et al.] // *Molecular therapy*. – 2012. – V. 20. – №. 1. – P. 187-195.
258. Licensing by inflammatory cytokines abolishes heterogeneity of immunosuppressive function of mesenchymal stem cell population / E. Szabó, R. Fajka-Boja, É. Kriston-Pál [et al.] // *Stem cells and development*. – 2015. – V. 24. – №. 18. – P. 2171-2180.
259. Universal or personalized mesenchymal stem cell therapies: impact of age, sex, and biological source / D.M. Carp, Y. Liang // *Cells*. – 2022. – V. 11. – №. 13. – P. 2077.
260. Влияние сопутствующего сахарного диабета 2 типа на количество циркулирующих прогениторных клеток у больных с ишемической кардиомиопатией / Т.Н. Кочегура, Ж.А. Акопян, Г.В. Шаронов [et al.] // *Сахарный диабет*. – 2011. — №. 3. – P. 36-43.
261. Overcoming immunological barriers in regenerative medicine / J.L. Zakrzewski, M.R. Van Den Brink, J.A. Hubbell // *Nature biotechnology*. – 2014. – V. 32. – №. 8. – P. 786-794.
262. Immune evasion by neocartilage-derived chondrocytes: Implications for biologic repair of joint articular cartilage / H. Adkisson, C. Milliman, X. Zhang [et al.] // *Stem cell research*. – 2010. – V. 4. – №. 1. – P. 57-68.
263. 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 [et al.] // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2021. – V. 9. – P. 616893.
264. Mechanism of cell detachment from temperature-modulated, hydrophilic-hydrophobic polymer surfaces / T. Okano, N. Yamada, M. Okuhara [et al.] // *Biomaterials*. – 1995. – V. 16. – №. 4. – P. 297-303.

265. Polyelectrolyte coatings with a potential for electronic control and cell sheet engineering / O. Guillaume- Gentil, Y. Akiyama, M. Schuler [et al.] // *Advanced materials*. – 2008. – V. 20. – №. 3. – P. 560-565.
266. pH-controlled recovery of placenta-derived mesenchymal stem cell sheets / O. Guillaume- Gentil, O.V. Semenov, A.H. Zisch [et al.] // *Biomaterials*. – 2011. – V. 32. – №. 19. – P. 4376-4384.
267. Construction and harvest of multilayered keratinocyte sheets using magnetite nanoparticles and magnetic force / A. Ito, M. Hayashida, H. Honda [et al.] // *Tissue engineering*. – 2004. – V. 10. – №. 5-6. – P. 873-880.
268. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium / K. Nishida, M. Yamato, Y. Hayashida [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2004. – V. 351. – №. 12. – P. 1187-1196.
269. Prevention of esophageal stricture after endoscopic submucosal dissection using tissue-engineered cell sheets / T. Ohki, M. Yamato, M. Ota [et al.] // *Gastroenterology*. – 2012. – V. 143. – №. 3. – P. 582-588. e582.
270. Rat mesenchymal stromal cell sheets suppress renal fibrosis via microvascular protection / A. Imafuku, M. Oka, Y. Miyabe [et al.] // *Stem Cells Translational Medicine*. – 2019. – V. 8. – №. 12. – P. 1330-1341.
271. Periodontal regeneration with autologous periodontal ligament-derived cell sheets—a safety and efficacy study in ten patients / T. Iwata, M. Yamato, K. Washio [et al.] // *Regenerative therapy*. – 2018. – V. 9. – P. 38-44.
272. Allogeneic transplantation of an adipose-derived stem cell sheet combined with artificial skin accelerates wound healing in a rat wound model of type 2 diabetes and obesity / Y. Kato, T. Iwata, S. Morikawa [et al.] // *Diabetes*. – 2015. – V. 64. – №. 8. – P. 2723-2734.
273. Allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cell sheet that produces neurological improvement with angiogenesis and neurogenesis in a rat stroke model / B. Ryu, H. Sekine, J. Homma [et al.] // *Journal of Neurosurgery*. – 2019. – V. 132. – №. 2. – P. 442-455.
274. Multipotent mesenchymal stromal cell sheet therapy for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in a rat model / N. Kaibuchi, T. Iwata, M. Yamato [et al.] // *Acta Biomaterialia*. – 2016. – V. 42. – P. 400-410.
275. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction / Y. Miyahara, N. Nagaya, M. Kataoka [et al.] // *Nature medicine*. – 2006. – V. 12. – №. 4. – P. 459-465.
276. The properties of bioengineered chondrocyte sheets for cartilage regeneration / G. Mitani, M. Sato, J.I. Lee [et al.] // *BMC biotechnology*. – 2009. – V. 9. – №. 1. – P. 1-11.

277. Mesenchymal stem cell sheets revitalize nonviable dense grafts: implications for repair of large-bone and tendon defects / H.W. Ouyang, T. Cao, X.H. Zou [et al.] // *Transplantation*. – 2006. – V. 82. – №. 2. – P. 170-174.
278. Human mesenchymal stromal cell sheet enhances allograft repair in a mouse model / X. Shang, B. Shu, Y. Wang [et al.] // *Scientific Reports*. – 2017. – V. 7. – №. 1. – P. 7982.
279. A novel strategy incorporated the power of mesenchymal stem cells to allografts for segmental bone tissue engineering / X.H. Zou, H.X. Cai, Z. Yin [et al.] // *Cell Transplantation*. – 2009. – V. 18. – №. 4. – P. 433-441.
280. The effect of mesenchymal stem cell sheets on structural allograft healing of critical sized femoral defects in mice / T. Long, Z. Zhu, H.A. Awad [et al.] // *Biomaterials*. – 2014. – V. 35. – №. 9. – P. 2752-2759.
281. Osteogenic matrix cell sheets facilitate osteogenesis in irradiated rat bone / Y. Uchihara, M. Akahane, T. Shimizu [et al.] // *BioMed Research International*. – 2015. – V. 2015. –
282. Engineering tubular bone constructs / F. Chen, Y. Zhou, S.T. Barnabas [et al.] // *Journal of biomechanics*. – 2007. – V. 40. – P. S73-S79.
283. Engineering tubular bone using mesenchymal stem cell sheets and coral particles / W. Geng, D. Ma, X. Yan [et al.] // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2013. – V. 433. – №. 4. – P. 595-601.
284. Comparison of osteogenesis between adipose-derived mesenchymal stem cells and their sheets on poly-epsilon-caprolactone/beta-tricalcium phosphate composite scaffolds in canine bone defects / Y. Kim, S.H. Lee, B.-j. Kang [et al.] // *Stem Cells International*. – 2016. – V. 2016. – P. 8414715.
285. Efficiently engineered cell sheet using a complex of polyethylenimine–alginate nanocomposites plus bone morphogenetic protein 2 gene to promote new bone formation / H. Jin, K. Zhang, C. Qiao [et al.] // *International Journal of Nanomedicine*. – 2014. — P. 2179-2190.
286. Combined mesenchymal stem cell sheets and rhBMP-2-releasing calcium sulfate–rhBMP-2 scaffolds for segmental bone tissue engineering / Y. Qi, Y. Wang, W. Yan [et al.] // *Cell transplantation*. – 2012. – V. 21. – №. 4. – P. 693-705.
287. Improving the osteogenesis of human bone marrow mesenchymal stem cell sheets by microRNA-21-loaded chitosan/hyaluronic acid nanoparticles via reverse transfection / Z. Wang, G. Wu, M. Wei [et al.] // *International Journal of Nanomedicine*. – 2016. — P. 2091-2105.
288. Effect of gelatin on osteogenic cell sheet formation using canine adipose-derived mesenchymal stem cells / A.Y. Kim, Y. Kim, S.H. Lee [et al.] // *Cell Transplantation*. – 2017. – V. 26. – №. 1. – P. 115-123.

289. Combined use of mesenchymal stromal cell sheet transplantation and local injection of SDF-1 for bone repair in a rat nonunion model / G. Chen, T. Fang, Y. Qi [et al.] // *Cell Transplantation*. – 2016. – V. 25. – №. 10. – P. 1801-1817.
290. Osteogenic matrix sheet- cell transplantation using osteoblastic cell sheet resulted in bone formation without scaffold at an ectopic site- / M. Akahane, A. Nakamura, H. Ohgushi [et al.] // *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. – 2008. – V. 2. – №. 4. – P. 196-201.
291. Scaffold- free cell sheet injection results in bone formation / M. Akahane, H. Shigematsu, M. Tadokoro [et al.] // *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. – 2010. – V. 4. – №. 5. – P. 404-411.
292. Cell sheet transplantation of cultured mesenchymal stem cells enhances bone formation in a rat nonunion model / A. Nakamura, M. Akahane, H. Shigematsu [et al.] // *Bone*. – 2010. – V. 46. – №. 2. – P. 418-424.
293. Engineering scaffold- free bone tissue using bone marrow stromal cell sheets / D. Ma, L. Ren, Y. Liu [et al.] // *Journal of Orthopaedic Research*. – 2010. – V. 28. – №. 5. – P. 697-702.
294. Cell sheet injection as a technique of osteogenic supply / M. Akahane, T. Ueha, T. Shimizu [et al.] // *International Journal of Stem Cells*. – 2010. – V. 3. – №. 2. – P. 138-143.
295. From embryos to embryoids: How external signals and self-organization drive embryonic development / J.S. Morales, J. Raspopovic, L. Marcon // *Stem Cell Reports*. – 2021. – V. 16. – №. 5. – P. 1039-1050.
296. Self-organization of axial polarity, inside-out layer pattern, and species-specific progenitor dynamics in human ES cell-derived neocortex / T. Kadoshima, H. Sakaguchi, T. Nakano [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2013. – V. 110. – №. 50. – P. 20284-20289.
297. Advances and challenges in programming pattern formation using living cells / J. Lu, E. Simsek, A. Silver [et al.] // *Curr Opin Chem Biol*. – 2022. – V. 68. – P. 102147.
298. All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development / B.K. Hall, T. Miyake // *Bioessays*. – 2000. – V. 22. – №. 2. – P. 138-147.
299. Cytoskeletal reorganization drives mesenchymal condensation and regulates downstream molecular signaling / P. Ray, S.C. Chapman // *PLoS One*. – 2015. – V. 10. – №. 8. – P. e0134702.
300. The forgotten skeletogenic condensations: a comparison of early skeletal development amongst vertebrates / J.L. Giffin, D. Gaitor, T.A. Franz-Odenaal // *J Dev Biol*. – 2019. – V. 7. – №. 1. – P. 4.
301. Skeletal cell fate decisions within periosteum and bone marrow during bone regeneration / C. Colnot // *Journal of Bone and Mineral Research*. – 2009. – V. 24. – №. 2. – P. 274-282.
302. Common molecular pathways in skeletal morphogenesis and repair / C.M. Ferguson, T. Miclau, D. Hu [et al.] // *Ann N Y Acad Sci*. – 1998. – V. 857. – P. 33-42.

303. Fracture healing: mechanisms and interventions / T.A. Einhorn, L.C. Gerstenfeld // *Nat Rev Rheumatol.* – 2015. – V. 11. – №. 1. – P. 45-54.
304. Stem cell therapy: is there a future for reconstruction of large bone defects? / Y. Watanabe, N. Harada, K. Sato [et al.] // *Injury.* – 2016. – V. 47. – P. S47-S51.
305. Recapitulating endochondral ossification: a promising route to in vivo bone regeneration / E.M. Thompson, A. Matsiko, E. Farrell [et al.] // *J Tissue Eng Regen Med.* – 2015. – V. 9. – №. 8. – P. 889-902.
306. High density micromass cultures of embryonic limb bud mesenchymal cells: an in vitro model of endochondral skeletal development / M.A. Mello, R.S. Tuan // *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* – 1999. – V. 35. – №. 5. – P. 262-269.
307. Microtiter micromass cultures of limb-bud mesenchymal cells / D.F. Paulsen, M. Solursh // *In Vitro Cell Dev Biol.* – 1988. – V. 24. – №. 2. – P. 138-147.
308. Ultrastructural analysis of bone nodules formed in vitro by isolated fetal rat calvaria cells / U. Bhargava, M. Bar-Lev, C.G. Bellows [et al.] // *Bone.* – 1988. – V. 9. – №. 3. – P. 155-163.
309. Bone-like nodules formed by human bone marrow stromal cells: comparative study and characterization / N. Schecroun, C. Delloye // *Bone.* – 2003. – V. 32. – №. 3. – P. 252-260.
310. Mesenchymal stromal cell-produced components of extracellular matrix potentiate multipotent stem cell response to differentiation stimuli / E. Novoseletskaya, O. Grigorieva, P. Nimiritsky [et al.] // *Frontiers in Cell and Developmental Biology.* – 2020. – V. 8. – P. 555378.
311. Mechanobiologically induced bone-like nodules: Matrix characterization from micro to nanoscale / H. Rammal, M. Dubus, N.B. Bercu [et al.] // *Nanomedicine.* – 2020. – V. 29. – P. 102256.
312. Pitx1 determines characteristic hindlimb morphologies in cartilage micromass culture / N.C. Butterfield, C. Qian, M.P.O. Logan // *PLoS One.* – 2017. – V. 12. – №. 7. – P. e0180453.
313. Cartilage induction from mouse mesenchymal stem cells in high-density micromass culture / T. Iezaki, K. Fukasawa, T. Yamada [et al.] // *Bio Protoc.* – 2019. – V. 9. – №. 1. – P. e3133.
314. Cultured autologous oral mucosal epithelial cell sheet (CAOMECS) transplantation for the treatment of corneal limbal epithelial stem cell deficiency / C. Burillon, L. Huot, V. Justin [et al.] // *Investigative ophthalmology & visual science.* – 2012. – V. 53. – №. 3. – P. 1325-1331.
315. Prospective clinical trial of corneal reconstruction with biomaterial-free cultured oral mucosal epithelial cell sheets / Y.J. Kim, H.J. Lee, J.S. Ryu [et al.] // *Cornea.* – 2018. – V. 37. – №. 1. – P. 76-83.
316. Transplantation of autologous cultivated oral mucosal epithelial sheets for limbal stem cell deficiency at Siriraj Hospital: a case series / W. Booranapong, P. Kosrirukvongs, S. Duangsa-Ard [et al.] // *Journal of Medical Case Reports.* – 2022. – V. 16. – №. 1. – P. 298.

317. Characterization of human induced pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelium cell sheets aiming for clinical application / H. Kamao, M. Mandai, S. Okamoto [et al.] // *Stem cell reports*. – 2014. – V. 2. – №. 2. – P. 205-218.
318. Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: follow-up of two open-label phase 1/2 studies / S.D. Schwartz, C.D. Regillo, B.L. Lam [et al.] // *The Lancet*. – 2015. – V. 385. – №. 9967. – P. 509-516.
319. Tissue engineered myoblast sheets improved cardiac function sufficiently to discontinue LVAS in a patient with DCM: report of a case / Y. Sawa, S. Miyagawa, T. Sakaguchi [et al.] // *Surgery today*. – 2012. – V. 42. – P. 181-184.
320. Safety and efficacy of autologous skeletal myoblast sheets (TCD-51073) for the treatment of severe chronic heart failure due to ischemic heart disease / Y. Sawa, Y. Yoshikawa, K. Toda [et al.] // *Circulation Journal*. – 2015. – V. 79. – №. 5. – P. 991-999.
321. Phase I clinical trial of autologous stem cell–sheet transplantation therapy for treating cardiomyopathy / S. Miyagawa, K. Domae, Y. Yoshikawa [et al.] // *Journal of the American Heart Association*. – 2017. – V. 6. – №. 4. – P. e003918.
322. Long-term outcomes of autologous skeletal myoblast cell-sheet transplantation for end-stage ischemic cardiomyopathy / S. Kainuma, S. Miyagawa, K. Toda [et al.] // *Molecular Therapy*. – 2021. – V. 29. – №. 4. – P. 1425-1438.
323. 'Reprogrammed' stem cells approved to mend human hearts for the first time / D. Cyranoski // *Nature*. – 2018. – V. 557. – №. 7706. – P. 619-619.
324. Combined surgery and chondrocyte cell-sheet transplantation improves clinical and structural outcomes in knee osteoarthritis / M. Sato, M. Yamato, G. Mitani [et al.] // *npj Regenerative Medicine*. – 2019. – V. 4. – №. 1. – P. 4.
325. The preclinical and clinical progress of cell sheet engineering in regenerative medicine / D. Hu, X. Li, J. Li [et al.] // *Stem Cell Res Ther*. – 2023. – V. 14. – №. 1. – P. 112.
326. Genetically modified cell sheets in regenerative medicine and tissue engineering / Z. Jiang, N. Li, D. Zhu [et al.] // *Biomaterials*. – 2021. – V. 275. – P. 120908.
327. Transplantation of modified human adipose derived stromal cells expressing VEGF165 results in more efficient angiogenic response in ischemic skeletal muscle / E.K. Shevchenko, P.I. Makarevich, Z.I. Tsokolaeva [et al.] // *J Transl Med*. – 2013. – V. 11. – P. 138.
328. Plasmid engineering for controlled and sustained gene expression for nonviral gene therapy / E.V. van Gaal, W.E. Hennink, D.J. Crommelin [et al.] // *Pharmaceutical research*. – 2006. – V. 23. – №. 6. – P. 1053-1074.

329. Gene transfer therapy in vascular diseases / M.J. McKay, M.A. Gaballa // Cardiovascular drug reviews. – 2001. – V. 19. – №. 3. – P. 245-262.
330. Plasmid-based gene transfer in mouse skeletal muscle by electroporation / J.D. Schertzer, G.S. Lynch // Methods in molecular biology. – 2008. – V. 433. – P. 115-125.
331. Effects of cartilage-derived morphogenetic protein 1 (CDMP1) transgenic mesenchymal stem cell sheets in repairing rabbit cartilage defects / Y. Cui, M. Yao, Y. Liu [et al.] // Genet Mol Res. – 2016. – V. 15. – №. 2. – P. gmr.15028058.
332. Cell sheets of co- cultured BMP- 2- modified bone marrow stromal cells and endothelial progenitor cells accelerate bone regeneration in vitro / J. He, X. Han, S. Wang [et al.] // Experimental and Therapeutic Medicine. – 2019. – V. 18. – №. 5. – P. 3333-3340.
333. Adenovirus-mediated transfer of hepatocyte growth factor gene to human dental pulp stem cells under good manufacturing practice improves their potential for periodontal regeneration in swine / Y. Cao, Z. Liu, Y. Xie [et al.] // Stem cell research & therapy. – 2015. – V. 6. – №. 1. – P. 1-13.
334. No more helper adenovirus: production of gutless adenovirus (GLAd) free of adenovirus and replication-competent adenovirus (RCA) contaminants / D. Lee, J. Liu, H.J. Junn [et al.] // Experimental & Molecular Medicine. – 2019. – V. 51. – №. 10. – P. 1-18.
335. Transduction of rat and human adipose-tissue derived mesenchymal stromal cells by adeno-associated viral vector serotype DJ / E.S. Zubkova, I.B. Beloglazova, E.I. Ratner [et al.] // Biol Open. – 2021. – V. 10. – №. 9. – P. bio058461.
336. Somatic correction of junctional epidermolysis bullosa by a highly recombinogenic AAV variant / S.P. Melo, L. Lisowski, E. Bashkurova [et al.] // Molecular Therapy. – 2014. – V. 22. – №. 4. – P. 725-733.
337. Adeno-associated viral vectors as a tool for large gene delivery to the retina / I. Trapani // Genes. – 2019. – V. 10. – №. 4. – P. 287.
338. Overexpression of bone morphogenetic protein-1 promotes osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells in vitro / Z. Su, L. He, H. Shang [et al.] // Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research. – 2020. – V. 26. – P. e920122-920121.
339. Evaluation of mesenchymal stem cell sheets overexpressing BMP-7 in canine critical-sized bone defects / Y. Kim, B.-J. Kang, W.H. Kim [et al.] // International journal of molecular sciences. – 2018. – V. 19. – №. 7. – P. 2073.
340. Baculovirus as a gene delivery vector: recent understandings of molecular alterations in transduced cells and latest applications / C.-Y. Chen, C.-Y. Lin, G.-Y. Chen [et al.] // Biotechnology advances. – 2011. – V. 29. – №. 6. – P. 618-631.

341. Improved calvarial bone repair by hASCs engineered with Cre/loxP-based baculovirus conferring prolonged BMP-2 and MiR-148b co-expression / K.C. Li, S.C. Lo, L.Y. Sung [et al.] // *J Tissue Eng Regen Med.* – 2017. – V. 11. – №. 11. – P. 3068-3077.
342. CRISPR technologies for stem cell engineering and regenerative medicine / M.N. Hsu, Y.H. Chang, V.A. Truong [et al.] // *Biotechnol Adv.* – 2019. – V. 37. – №. 8. – P. 107447.
343. Baculovirus-transduced, VEGF-expressing adipose-derived stem cell sheet for the treatment of myocardium infarction / T.S. Yeh, Y.H. Fang, C.H. Lu [et al.] // *Biomaterials.* – 2014. – V. 35. – №. 1. – P. 174-184.
344. A concise review on the use of mesenchymal stem cells in cell sheet-based tissue engineering with special emphasis on bone tissue regeneration / A.C. Yorukoglu, A. Kiter, S. Akkaya [et al.] // *Stem cells international.* – 2017. – V. 2017. – P. 2374161.
345. Design of prevascularized three-dimensional cell-dense tissues using a cell sheet stacking manipulation technology / T. Sasagawa, T. Shimizu, S. Sekiya [et al.] // *Biomaterials.* – 2010. – V. 31. – №. 7. – P. 1646-1654.
346. Cell sheets in cell therapies / G.T. Kirby, A. Michelmore, L.E. Smith [et al.] // *Cytotherapy.* – 2018. – V. 20. – №. 2. – P. 169-180.
347. Middle ear mucosal regeneration by tissue-engineered cell sheet transplantation / K. Yamamoto, M. Yamato, T. Morino [et al.] // *NPJ Regenerative medicine.* – 2017. – V. 2. – №. 1. – P. 6.
348. Self-organization provides cell fate commitment in MSC sheet condensed areas via ROCK-dependent mechanism / P. Nimiritsky, E. Novoseletskaia, R. Eremichev [et al.] // *Biomedicines.* – 2021. – V. 9. – №. 9. – P. 1192.
349. Development of a simple, noninvasive, clinically relevant model of pressure ulcers in the mouse / I. Stadler, R.Y. Zhang, P. Oskoui [et al.] // *Journal of investigative surgery : the official journal of the Academy of Surgical Research.* – 2004. – V. 17. – №. 4. – P. 221-227.
350. 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 [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2020. – V. 21. – №. 15. – P. 5567.
351. Combined transfer of human VEGF165 and HGF genes renders potent angiogenic effect in ischemic skeletal muscle / P. Makarevich, Z. Tsokolaeva, A. Shevelev [et al.] // *PloS one.* – 2012. – V. 7. – №. 6. – P. e38776.
352. 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.

353. Delivery of nerve growth factor (NGF) gene via recombinant plasmid vector induces angiogenesis in murine ischemic hind limb / M.A. Boldyreva, P.I. Makarevich, L.M. Rafieva [et al.] // *Genes and Cells*. – 2014. – V. 9. – №. 4. – P. 81-87.
354. Vitamin C treatment promotes mesenchymal stem cell sheet formation and tissue regeneration by elevating telomerase activity / F. Wei, C. Qu, T. Song [et al.] // *Journal of cellular physiology*. – 2012. – V. 227. – №. 9. – P. 3216-3224.
355. Клеточные пласты из мезенхимных стромальных клеток жировой ткани человека и получение препаратов внеклеточного матрикса методом децеллюляризации / П.П. Нимирицкий, Т.А. Дусь, О.А. Григорьева [et al.] // *Технологии живых систем*. – 2016. – V. 13. – №. 6. – P. 4-13.
356. Extracellular matrix structure / A.D. Theocharis, S.S. Skandalis, C. Gialeli [et al.] // *Adv Drug Deliv Rev*. – 2016. – V. 97. – P. 4-27.
357. The extracellular matrix: not just pretty fibrils / R.O. Hynes // *Science*. – 2009. – V. 326. – №. 5957. – P. 1216-1219.
358. Nice neighborhood: emerging concepts of the stem cell niche / D.T. Scadden // *Cell*. – 2014. – V. 157. – №. 1. – P. 41-50.
359. The selective role of ECM components on cell adhesion, morphology, proliferation and communication in vitro / S. Schlie-Wolter, A. Ngezahayo, B.N. Chichkov // *Experimental cell research*. – 2013. – V. 319. – №. 10. – P. 1553-1561.
360. An overview of tissue and whole organ decellularization processes / P.M. Crapo, T.W. Gilbert, S.F. Badylak // *Biomaterials*. – 2011. – V. 32. – №. 12. – P. 3233-3243.
361. Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells / E. Rieder, M.T. Kasimir, G. Silberhumer [et al.] // *J Thorac Cardiovasc Surg*. – 2004. – V. 127. – №. 2. – P. 399-405.
362. Decellularization of fibroblast cell sheets for natural extracellular matrix scaffold preparation / Q. Xing, K. Yates, M. Tahtinen [et al.] // *Tissue Eng Part C Methods*. – 2015. – V. 21. – №. 1. – P. 77-87.
363. Adipose-derived stem cells for wound healing applications / M. Cherubino, J.P. Rubin, N. Miljkovic [et al.] // *Ann Plast Surg*. – 2011. – V. 66. – №. 2. – P. 210-215.
364. Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis / M. Hellström, H. Gerhardt, M. Kalén [et al.] // *The Journal of cell biology*. – 2001. – V. 153. – №. 3. – P. 543-553.

365. The mesenchymal stem cell secretome: A new paradigm towards cell-free therapeutic mode in regenerative medicine / P. Kumar, S. Kandoi, R. Misra [et al.] // *Cytokine & growth factor reviews*. – 2019. – V. 46. – P. 1-9.
366. Characterization of secretomes provides evidence for adipose-derived mesenchymal stromal cells subtypes / N. Kalinina, D. Kharlampieva, M. Loguinova [et al.] // *Stem cell research & therapy*. – 2015. – V. 6. – P. 221.
367. Regulation of scar formation by vascular endothelial growth factor / T.A. Wilgus, A.M. Ferreira, T.M. Oberyszyn [et al.] // *Lab Invest*. – 2008. – V. 88. – №. 6. – P. 579-590.
368. Omega-3 fatty acids modulate angiogenic processes in retinal microvascular endothelial cells / N. Matesanz, G. Park, A. Devine [et al.] // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. – 2008. – V. 49. – №. 13. – P. 3980-3980.
369. Regulation of tumor angiogenesis by dietary fatty acids and eicosanoids / D.P. Rose, J.M. Connolly // *Nutrition and cancer*. – 2000. – V. 37. – №. 2. – P. 119-127.
370. Mesenchymal stem cells at the intersection of cell and gene therapy / T.J. Myers, F. Granero-Molto, L. Longobardi [et al.] // *Expert opinion on biological therapy*. – 2010. – V. 10. – №. 12. – P. 1663-1679.
371. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT) / P. Bourin, B.A. Bunnell, L. Casteilla [et al.] // *Cytherapy*. – 2013. – V. 15. – №. 6. – P. 641-648.
372. Endothelial differentiation of adipose-derived stem cells: effects of endothelial cell growth supplement and shear force / L.J. Fischer, S. McIlhenny, T. Tulenko [et al.] // *The Journal of surgical research*. – 2009. – V. 152. – №. 1. – P. 157-166.
373. Safety and efficacy of autologous cell therapy in critical limb ischemia: a systematic review / E. Benoit, T.F. O'Donnell, A.N. Patel // *Cell transplantation*. – 2013. – V. 22. – №. 3. – P. 545-562.
374. Time course of arteriogenesis following femoral artery occlusion in the rabbit / I.E. Hofer, N. van Royen, I.R. Buschmann [et al.] // *Cardiovascular research*. – 2001. – V. 49. – №. 3. – P. 609-617.
375. A novel cell-sheet technology that achieves durable factor VIII delivery in a mouse model of hemophilia A / K. Tatsumi, M. Sugimoto, D. Lillicrap [et al.] // *PloS one*. – 2013. – V. 8. – №. 12. – P. e83280.
376. Cardiac cell sheet transplantation improves damaged heart function via superior cell survival in comparison with dissociated cell injection / H. Sekine, T. Shimizu, I. Dobashi [et al.] // *Tissue engineering. Part A*. – 2011. – V. 17. – №. 23-24. – P. 2973-2980.

377. Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in vivo / T. Asahara, C. Bauters, L.P. Zheng [et al.] // *Circulation*. – 1995. – V. 92. – №. 9 Suppl. – P. II365-371.
378. Relationship of skeletal muscle perfusion measured by contrast-enhanced ultrasonography to histologic microvascular density / M.A. Weber, H. Krakowski-Roosen, S. Delorme [et al.] // *Journal of ultrasound in medicine : official journal of the American Institute of Ultrasound in Medicine*. – 2006. – V. 25. – №. 5. – P. 583-591.
379. Differential necrosis despite similar perfusion in mouse strains after ischemia / P.K. Shireman, M.P. Quinones // *The Journal of surgical research*. – 2005. – V. 129. – №. 2. – P. 242-250.
380. Immune responses during healing of massive segmental femoral bone defects mediated by hybrid baculovirus-engineered ASCs / C.Y. Lin, K.J. Lin, K.C. Li [et al.] // *Biomaterials*. – 2012. – V. 33. – №. 30. – P. 7422-7434.
381. Pre-vascularization of in vitro three-dimensional tissues created by cell sheet engineering / N. Asakawa, T. Shimizu, Y. Tsuda [et al.] // *Biomaterials*. – 2010. – V. 31. – №. 14. – P. 3903-3909.
382. Efficient gene delivery into cell lines and stem cells using baculovirus / L.Y. Sung, C.L. Chen, S.Y. Lin [et al.] // *Nat Protoc*. – 2014. – V. 9. – №. 8. – P. 1882-1899.
383. Minicircle DNA: the future for DNA-based vectors? / A.M. Almeida, J.A. Queiroz, F. Sousa [et al.] // *Trends Biotechnol*. – 2020. – V. 38. – №. 10. – P. 1047-1051.
384. The use of ASCs engineered to express BMP2 or TGF-beta3 within scaffold constructs to promote calvarial bone repair / C.Y. Lin, Y.H. Chang, K.C. Li [et al.] // *Biomaterials*. – 2013. – V. 34. – №. 37. – P. 9401-9412.
385. Osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells and calvarial defect repair using baculovirus-mediated co-expression of BMP-2 and miR-148b / Y.H. Liao, Y.H. Chang, L.Y. Sung [et al.] // *Biomaterials*. – 2014. – V. 35. – №. 18. – P. 4901-4910.
386. Regenerating cartilages by engineered ASCs: prolonged TGF-beta3/BMP-6 expression improved articular cartilage formation and restored zonal structure / C.H. Lu, T.S. Yeh, C.L. Yeh [et al.] // *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. – 2014. – V. 22. – №. 1. – P. 186-195.
387. Host cell receptor binding by baculovirus GP64 and kinetics of virion entry / K.L. Hefferon, A.G. Oomens, S.A. Monsma [et al.] // *Virology*. – 1999. – V. 258. – №. 2. – P. 455-468.
388. Baculovirus GP64-mediated entry into mammalian cells / C. Kataoka, Y. Kaname, S. Taguwa [et al.] // *Journal of virology*. – 2012. – V. 86. – №. 5. – P. 2610-2620.
389. Baculovirus-mediated gene transfer is attenuated by sodium bicarbonate / H.C. Shen, H.P. Lee, W.H. Lo [et al.] // *The journal of gene medicine*. – 2007. – V. 9. – №. 6. – P. 470-478.

390. Histone deacetylase as a therapeutic target / O.H. Kramer, M. Gottlicher, T. Heinzel // Trends in endocrinology and metabolism: TEM. – 2001. – V. 12. – №. 7. – P. 294-300.
391. Incidence and severity of myofiber branching with regeneration and aging / C. Pichavant, G.K. Pavlath // Skeletal muscle. – 2014. – V. 4. – P. 9.
392. Impact of Donor Age on the Osteogenic Supportive Capacity of Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Matrix / M.S. Carvalho, L. Alves, I. Bogalho [et al.] // Front Cell Dev Biol. – 2021. – V. 9. – P. 747521.
393. Effects of donor age, gender, and in vitro cellular aging on the phenotypic, functional, and molecular characteristics of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells / O. Katsara, L.G. Mahaira, E.G. Iliopoulou [et al.] // Stem Cells Dev. – 2011. – V. 20. – №. 9. – P. 1549-1561.
394. Geometric analysis of chondrogenic self-organisation of embryonic limb bud cells in micromass culture / R.A. Rolfe, C.A. Shea, P. Murphy // Cell and Tissue Research. – 2022. — P. 1-14.
395. Involvement of Notch signaling in initiation of prechondrogenic condensation and nodule formation in limb bud micromass cultures / R. Fujimaki, Y. Toyama, N. Hozumi [et al.] // Journal of bone and mineral metabolism. – 2006. – V. 24. – P. 191-198.
396. Human vascular smooth muscle cells of diabetic origin exhibit increased proliferation, adhesion, and migration / P.L. Faries, D.I. Rohan, H. Takahara [et al.] // Journal of vascular surgery. – 2001. – V. 33. – №. 3. – P. 601-607.
397. Isolation and culture of vascular smooth muscle cells from rat placenta / C. He, M. Wang, Z. Yan [et al.] // Journal of Cellular Physiology. – 2019. – V. 234. – №. 6. – P. 7675-7682.
398. Evasion of apoptosis by myofibroblasts: a hallmark of fibrotic diseases / B. Hinz, D. Lagares // Nat Rev Rheumatol. – 2020. – V. 16. – №. 1. – P. 11-31.
399. Mesenchymal stem cells reversibly de-differentiate myofibroblasts to fibroblast-like cells by inhibiting the TGF-beta-SMAD2/3 pathway / R. Xu, M. Wu, Y. Wang [et al.] // Mol Med. – 2023. – V. 29. – №. 1. – P. 59.
400. Role of transforming growth factor- β in chondrogenic pattern formation in the embryonic limb: stimulation of mesenchymal condensation and fibronectin gene expression by exogenous TGF- β and evidence for endogenous TGF- β -like activity / C.M. Leonard, H.M. Fuld, D.A. Frenz [et al.] // Developmental biology. – 1991. – V. 145. – №. 1. – P. 99-109.
401. Functional analysis of fibronectin isoforms in chondrogenesis: Full-length recombinant mesenchymal fibronectin reduces spreading and promotes condensation and chondrogenesis of limb mesenchymal cells / D.G. White, H.P. Hershey, J.J. Moss [et al.] // Differentiation. – 2003. – V. 71. – №. 4-5. – P. 251-261.

402. In vitro mineralization of collagen / B.M. Oosterlaken, M.P. Vena, G. de With // *Advanced Materials*. – 2021. – V. 33. – №. 16. – P. 2004418.
403. ERK signaling pathways regulate the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on collagen I and vitronectin / R.M. Salasznyk, R.F. Klees, M.K. Hughlock [et al.] // *Cell Commun Adhes.* – 2004. – V. 11. – №. 5-6. – P. 137-153.
404. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment / R. McBeath, D.M. Pirone, C.M. Nelson [et al.] // *Developmental cell*. – 2004. – V. 6. – №. 4. – P. 483-495.
405. Functions of Rho family of small GTPases and Rho-associated coiled-coil kinases in bone cells during differentiation and mineralization / A. Strzelecka-Kiliszek, S. Mebarek, M. Roszkowska [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. – 2017. – V. 1861. – №. 5. – P. 1009-1023.
406. Sterol regulatory element-binding protein-1c orchestrates metabolic remodeling of white adipose tissue by caloric restriction / N. Fujii, T. Narita, N. Okita [et al.] // *Aging Cell*. – 2017. – V. 16. – №. 3. – P. 508-517.
407. Shift of EMT gradient in 3D spheroid MSCs for activation of mesenchymal niche function / S. Jeon, H.-S. Lee, G.-Y. Lee [et al.] // *Scientific reports*. – 2017. – V. 7. – №. 1. – P. 6859.
408. Protocadherins at the crossroad of signaling pathways / A. Pancho, T. Aerts, M.D. Mitsogiannis [et al.] // *Frontiers in Molecular Neuroscience*. – 2020. – V. 13. – P. 117.
409. Changes in cell migration of mesenchymal cells during osteogenic differentiation / M. Ichida, Y. Yui, K. Yoshioka [et al.] // *FEBS letters*. – 2011. – V. 585. – №. 24. – P. 4018-4024.
410. Loss of Eph-receptor expression correlates with loss of cell adhesion and chondrogenic capacity in Hoxa13 mutant limbs / H.S. Stadler, K.M. Higgins, M.R. Capecchi // *Development*. – 2001. – V. 128. – №. 21. – P. 4177-4188.
411. Transcription factors acting on the promoter of the rat fatty acid synthase gene / M. Schweizer, K. Roder, L. Zhang [et al.] // *Biochemical Society Transactions*. – 2002. – V. 30. – №. 6. – P. 1070-1072.
412. SREBP-1 inhibitor Betulin enhances the antitumor effect of Sorafenib on hepatocellular carcinoma via restricting cellular glycolytic activity / F. Yin, F. Feng, L. Wang [et al.] // *Cell death & disease*. – 2019. – V. 10. – №. 9. – P. 672.
413. Sterol regulatory element binding protein 1 couples mechanical cues and lipid metabolism / R. Bertolio, F. Napoletano, M. Mano [et al.] // *Nature communications*. – 2019. – V. 10. – №. 1. – P. 1326.

414. Ascorbic acid enhances the cardiac differentiation of induced pluripotent stem cells through promoting the proliferation of cardiac progenitor cells / N. Cao, Z. Liu, Z. Chen [et al.] // *Cell Res.* – 2012. – V. 22. – №. 1. – P. 219-236.
415. 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.
416. Mesenchymal stem cells: Molecular characteristics and clinical applications / F. Rastegar, D. Shenaq, J. Huang [et al.] // *World J Stem Cells.* – 2010. – V. 2. – №. 4. – P. 67-80.
417. Granulation tissue formation and remodeling / L. Häkkinen, H. Larjava, L. Koivisto // *Endodontic Topics.* – 2011. – V. 24. – №. 1. – P. 94-129.
418. Time course analysis of hypoxia, granulation tissue and blood vessel growth, and remodeling in healing rat cutaneous incisional primary intention wounds / Z. Lokmic, I.A. Darby, E.W. Thompson [et al.] // *Wound Repair Regen.* – 2006. – V. 14. – №. 3. – P. 277-288.
419. Angiogenesis and wound repair: when enough is enough / L.A. DiPietro // *Journal of leukocyte biology.* – 2016. – V. 100. – №. 5. – P. 979-984.
420. Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction / S.F. Badylak // *Transplant immunology.* – 2004. – V. 12. – №. 3-4. – P. 367-377.
421. Relationships between cellular condensation, preosteoblast formation and epithelial-mesenchymal interactions in initiation of osteogenesis / L.L. Dunlop, B.K. Hall // *Int J Dev Biol.* – 1995. – V. 39. – №. 2. – P. 357-371.