

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт морфологии человека»

Федеральное государственное бюджетное учреждение
Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика
В.И. Кулакова Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Арутюнян Ирина Владимировна

АНГИОГЕННЫЕ СВОЙСТВА МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ
КЛЕТОК ПУПОЧНОГО КАНАТИКА

Специальность 03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук
Фатхудинов Т.Х.

Москва – 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

	ВВЕДЕНИЕ.....	6
1	ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	16
2	МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	36
2.1	Гистологическое и иммуногистохимическое исследование строения пупочного канатика.....	36
2.2	Выделение первичной культуры из пупочного канатика человека ферментативным методом.....	37
2.3	Выделение первичной культуры из пупочного канатика крысы методом эксплантов.....	38
2.4	Анализ иммунофенотипа МСК ПК.....	38
2.5	Направленная дифференцировка МСК ПК.....	39
2.6	Иммуноцитохимическое исследование экспрессии Ki67, виментина и гладкомышечного актина в культуре МСК ПК.....	40
2.7	Линия эндотелиальных клеток EA.hy926.....	40
2.8	Приготовление кондиционированных сред.....	41
2.9	Измерение концентрации VEGF-A в средах, кондиционированных МСК ПК и EA.hy926.....	42
2.10	Оценка влияния среды, кондиционированной МСК ПК, на пролиферацию эндотелиальных клеток.....	42
2.11	Направленная миграция эндотелиальных клеток в градиенте факторов, секретируемых МСК ПК.....	43
2.12	Оценка влияния кондиционированной МСК ПК среды на подвижность эндотелиальных клеток на модели «рана монослоя».....	44
2.13	Эндотелиальная дифференцировка МСК ПК на стандартной подложке.....	44

2.14	Оценка влияния кондиционированной МСК ПК среды на эндотелиальные клетки при моделировании ангиогенеза в матриксе базальной мембраны <i>in vitro</i>	45
2.15	Оценка взаимодействия МСК ПК и эндотелиальных клеток при моделировании ангиогенеза в матриксе базальной мембраны <i>in vitro</i>	46
2.16	Эндотелиальная дифференцировка МСК ПК в матриксе базальной мембраны	46
2.17	Экспериментальные животные.....	47
2.18	Моделирование ишемии задних конечностей крыс.....	47
2.19	Подготовка клеточного трансплантата.....	49
2.20	Трансплантация МСК ПК	49
2.21	Тест толерантности к физическим нагрузкам «рота-род».....	50
2.22	Выведение животных из эксперимента	50
2.23	Морфометрическое исследование.....	51
2.24	Иммуногистохимическое исследование.....	52
2.25	Колокализационный анализ.....	53
2.26	Статистический анализ.....	53
3	РЕЗУЛЬТАТЫ	54
3.1.	Получение и характеристика культур мультипотентных стромальных клеток пупочного канатика	54
3.1.1	Строение пупочного канатика человека.....	54
3.1.2	Строение пупочного канатика крысы.....	58
3.1.3	Выделение первичной культуры из пупочного канатика человека.....	59
3.1.4	Выделение первичной культуры из пупочного канатика крысы.....	60
3.1.5	Анализ иммунофенотипа МСК ПК.....	61
3.1.6	Направленная дифференцировка МСК ПК.....	63
3.1.7	Иммуноцитохимическое исследование фенотипа культуры МСК ПК...	66
3.2	Исследование ангиогенных свойств МСК ПК <i>in vitro</i>	68

3.2.1	Линия эндотелиальных клеток EA.hy926.....	68
3.2.2	Измерение концентрации VEGF-A в средах, кондиционированных МСК ПК и EA.hy926.....	69
3.2.3	Оценка влияния среды, кондиционированной МСК ПК, на пролиферацию эндотелиальных клеток.....	70
3.2.4	Направленная миграция эндотелиальных клеток в градиенте факторов, секретируемых МСК ПК	71
3.2.5	Оценка влияния кондиционированной МСК ПК среды на подвижность эндотелиальных клеток на модели «рана монослоя».....	72
3.2.6	Эндотелиальная дифференцировка МСК ПК на стандартной подложке.....	74
3.2.7	Оценка влияния кондиционированной МСК ПК среды на эндотелиальные клетки линии EA.hy926 при моделировании ангиогенеза в матриксе базальной мембраны <i>in vitro</i>	77
3.2.8	Оценка взаимодействия МСК ПК и эндотелиальных клеток линии EA.hy926 при моделировании ангиогенеза в матриксе базальной мембраны <i>in vitro</i>	80
3.2.9	Эндотелиальная дифференцировка МСК ПК в матриксе базальной мембраны	86
3.3	Исследование ангиогенных свойств МСК ПК <i>in vivo</i>	89
3.3.1	Моделирование ишемии задних конечностей крыс.....	89
3.3.2	Трансплантация МСК ПК	89
3.3.3	Тест толерантности к физическим нагрузкам «рота-род».....	89
3.3.4	Морфометрическое исследование очага ишемического повреждения скелетной мышечной ткани	90
3.3.5	Оценка влияния трансплантации МСК ПК на макрофагальную инфильтрацию в очаге повреждения ишемизированной ткани	94
3.3.6	Морфометрическое исследование ангиогенеза в очаге ишемического повреждения скелетной мышечной ткани.....	98

3.3.7	Исследование распределения трансплантированных МСК ПК в ишемизированной ткани.....	101
3.3.8	Исследование элиминации трансплантированных МСК ПК в ишемизированной ткани.....	105
3.3.9	Оценка дифференцировки трансплантированных МСК ПК в эндотелиальном направлении	108
4	ОБСУЖДЕНИЕ	112
5	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	133
6	ВЫВОДЫ.....	137
7	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	139
8	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	141

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

По данным Всемирной организации здравоохранения заболевания, связанные с нарушением кровоснабжения органов и тканей, являются основной причиной смертности в экономически развитых странах [ВОЗ, 2014]. Поиск новых методов лечения ишемического поражения тканей привел к разработке концепции терапевтического ангиогенеза, который представляет собой совокупность методов стимуляции восстановления микроциркуляторного русла в ишемизированной ткани. Принято считать, что данная стимуляция запускает одновременно два процесса – васкулогенез и ангиогенез. Васкулогенез, в норме существующий лишь в пренатальный период, предполагает формирование кровеносных сосудов за счет предшественников эндотелиальных клеток, мигрирующих к очагу ишемии. Ангиогенез же является многоступенчатым процессом продления уже существующих сосудов, их прорастания в поврежденные ткани и последующего созревания [Isner et al., 2001; Парфенова, Ткачук, 2007]. Таким образом, наиболее эффективной представляется стратегия ангиогенной терапии, направленная одновременно на мобилизацию эндогенных прогениторных клеток и локальное повышение уровня проангиогенных факторов в ишемизированной ткани.

Методы терапевтического ангиогенеза менялись с течением времени. Прямая доставка экзогенных факторов роста и цитокинов оказалась недостаточно эффективной, что связано, в первую очередь, с коротким временем полужизни белков *in vivo* [Ylä-Herttuala et al., 2007]. Так, например, для VEGF-A (ключевого фактора ангиогенеза как в пренатальном, так и в постнатальном периоде) время полужизни не превышает нескольких часов [Stefanini et al., 2008].

Предполагалось, что введение генетических конструкций (плазмид или вирусных векторов) обеспечит более длительное и равномерное высвобождение ангиогенного фактора. Оказалось, что процент трансфицированных таким образом эндогенных клеток очень невелик [Vaughan et al., 2006], а экспрессия

белка практически полностью исчезает в течение 2 недель [Парфенова, Ткачук, 2007]. Тем не менее, результаты, полученные в доклинических исследованиях, позволили перейти к клиническим испытаниям (II и III фазы) безопасности и эффективности генной терапии ишемии тканей с применением конструкций, содержащих HGF, VEGF-A-121 и -165, FGFb [Shimamura et al., 2014]. Основным же недостатком данного метода считается ограничение терапевтического эффекта действием одного гена, тогда как ангиогенез является сложным процессом, регулируемым одновременно многими факторами роста и цитокинами [Liew, O'Brien, 2012].

В настоящее время особую надежду исследователи возлагают на стимуляцию ангиогенеза в ишемизированной ткани с помощью стволовых/прогениторных клеток [Lawall et al., 2010; Liew, O'Brien, 2012; Лебедев и др., 2013]. Клеточная терапия развивается преимущественно эмпирическим путем, что позволило, с одной стороны, клинически доказать наличие терапевтического эффекта, с другой стороны, до сих пор не объяснило механизма развития этого эффекта. Среди исследователей нет единого мнения об оптимальном типе трансплантируемых клеток, их количестве, сроке и способе введения [Liew, O'Brien, 2012; Raval, Losordo, 2013].

Клинические испытания показали безопасность применения различных типов клеточных трансплантатов (аутогенных CD133+ или CD34+ клеток, моноклеаров периферической крови или костного мозга и др.), однако эффективность их была не так высока, как при проведении доклинических исследований [Liew, O'Brien, 2012]. Использование в качестве клеточного трансплантата мультипотентных стромальных клеток (МСК) является наиболее перспективным методом терапевтического ангиогенеза: показано, что введение МСК в ишемизированную ткань приводит к одновременной активации сразу нескольких механизмов (паракринного, заместительного, трофического, иммуномодулирующего), оказывающих влияние на все этапы образования и созревания сосудов [Liew, O'Brien, 2012; Yan et al., 2013; Bronckaers et al., 2014]. В

соответствии с данными регистра клинических испытаний FDA (<http://www.clinicaltrials.gov/>) зарегистрированы десятки клинических исследований (3 фаза) безопасности и эффективности трансплантации МСК для лечения острого инфаркта миокарда, ишемического инсульта и критической ишемии нижних конечностей. Большинство подобных работ было выполнено с использованием МСК костного мозга – «золотого стандарта» для сравнения свойств МСК.

Известно, что принадлежность клеточных культур к МСК не обозначает идентичности их биологических свойств, а служит только базисом для их дальнейшей характеристики [Dominici, 2006]. Свойства МСК в значительной степени зависят от ткани-источника и особенностей самого донора, что влияет не только на пролиферативный и пластический потенциал культуры, ее секретом, уровень экспрессии связанных с иммунным ответом генов, но в конечном итоге и на механизм реализации терапевтического потенциала клеток и его эффективность.

В настоящее время внимание исследователей все больше привлекают МСК из неонатальных источников. Так, например, МСК, выделенные из пупочного канатика, обладают наиболее высоким пролиферативным потенциалом, пластичностью и иммуномодулирующей активностью, на высоком уровне экспрессируют гены, вовлеченные в развитие и функционирование сердечно-сосудистой системы, не обладают туморогенностью и считаются оптимальным ресурсом для аллогенной трансплантации [De Kock et al., 2012; Gauthaman et al., 2012; Liang, Han, 2012; Lv et al., 2012; Li X. et al., 2014]. При этом вартонов студень пупочного канатика обладает важной особенностью – в нем отсутствуют капилляры, что исключает МСК ПК из одного ряда с МСК из других источников, занимающих *in vivo*, по мнению некоторых авторов, нишу перицитов [da Silva Meirelles et al., 2008; Covas et al., 2008; Caplan, 2009]. Более того, в секретоме МСК ПК сдвинут баланс про- и антиангиогенных факторов по сравнению с МСК костного мозга или жировой ткани [Balasubramanian et al., 2012; Amable et al.,

2014; Kuchroo et al., 2015], что указывает на использование иных путей реализации проангиогенного потенциала данных клеток.

Данное исследование посвящено изучению механизмов ангиогенной активности МСК ПК и оценке перспективы их применения для клеточной терапии ишемического повреждения скелетной мышечной ткани.

Степень разработанности темы исследования

В последние несколько лет количество работ, посвященных изучению свойств МСК ПК, значительно возросло. Накоплен большой массив данных, касающихся эффективности выделения первичной культуры из пуповины, ее пролиферативных свойств, стабильности кариотипа, особенностей транскриптома и секретома.

В то же время крайне противоречивы данные, касающиеся взаимодействия МСК ПК с эндотелиальными клетками *in vitro* (влияния на пролиферацию и миграцию, поведения при моделировании ангиогенеза в матриксе базальной мембраны и т.д.), и только в некоторых работах обсуждается роль фактора роста эндотелия сосудов (Vascular Endothelial Growth Factor – VEGF) в данном взаимодействии. Условия и конечный результат дифференцировки МСК ПК в эндотелиальном направлении также различаются у отдельных групп исследователей.

Проведенные доклинические исследования продемонстрировали безопасность и эффективность применения МСК ПК при использовании разных экспериментальных моделей ишемического повреждения тканей. В настоящее время в качестве основных механизмов терапевтической активности МСК ПК рассматривают трофический эффект и паракринное воздействие на резидентные прогениторные клетки и клетки иммунной системы, ремоделирование внеклеточного матрикса, ангиогенез и апоптоз. При этом различаются способы моделирования ишемии, объем клеточного трансплантата, сроки введения,

конечные точки эксперимента, методы оценки результатов, что затрудняет анализ полученных данных.

МСК ПК считаются иммунопривилегированными клетками, однако в последнее время все чаще поднимается вопрос их выживаемости/элиминации после трансплантации, хотя данные эти противоречивы.

В литературе также отсутствуют данные о влиянии аллогенной трансплантации МСК ПК на интенсивность воспалительной реакции и поляризацию макрофагов в очаге ишемического повреждения скелетной мышцы.

Таким образом, ангиогенный потенциал МСК ПК и механизмы его реализации *in vitro* и *in vivo* требуют дальнейшего исследования.

Цель исследования

Целью настоящей работы является изучение механизмов реализации ангиогенной активности мультипотентных стромальных клеток пупочного канатика *in vitro* и влияния аллогенной трансплантации мультипотентных стромальных клеток пупочного канатика на регенерацию ишемизированной скелетной мышечной ткани *in vivo*.

Задачи исследования

1. Получить клеточные культуры из пупочного канатика человека и крысы и подтвердить их принадлежность к мультипотентным стромальным клеткам.
2. Оценить паракринное воздействие мультипотентных стромальных клеток пупочного канатика на пролиферацию, подвижность и направленную миграцию эндотелиальных клеток *in vitro*.

3. Исследовать взаимодействие мультипотентных стромальных клеток пупочного канатика и эндотелиальных клеток при моделировании ангиогенеза в матриксе базальной мембраны *in vitro*.

4. Определить возможность дифференцировки мультипотентных стромальных клеток пупочного канатика в эндотелиальном направлении *in vitro*.

5. Выявить особенности репаративной регенерации скелетной мышцы при аллогенной трансплантации мультипотентных стромальных клеток пупочного канатика на модели ишемии задних конечностей крыс.

6. Оценить миграцию, выживаемость и дифференцировку мультипотентных стромальных клеток пупочного канатика после внутримышечной трансплантации.

Объект и предмет исследования – механизмы реализации ангиогенных свойств мультипотентными стромальными клетками пупочного канатика.

Теоретической и методологической базой диссертации послужили научные и учебно-методические разработки отечественных и зарубежных ученых по проблеме терапевтического ангиогенеза.

Информационной базой исследования послужили научные монографии, статьи в рецензируемых научных журналах, материалы тематических конференций, а также собственные данные.

Диссертация соответствует Паспорту научной специальности 03.03.04 Клеточная биология, цитология, гистология согласно пунктам 1, 2, 5, 6 и 7. Научная новизна исследования

Научная новизна исследования

Впервые установлено, что МСК ПК используют VEGF-A-независимый путь паракринной стимуляции пролиферации, подвижности и направленной миграции эндотелиальных клеток.

Показано, что VEGF-A является необходимым, но недостаточным индуктором эндотелиальной дифференцировки МСК ПК при культивировании на стандартной подложке; однако при культивировании в матриксе базальной мембраны МСК ПК, взаимодействуя с эндотелиальными клетками, способны *in vitro* приобретать CD31+фенотип без влияния экзогенного VEGF-A.

Выявлено, что аллогенные МСК ПК распознаются и элиминируются иммунной системой реципиента после внутримышечной трансплантации в ишемизированную скелетную мышечную ткань.

Продемонстрировано, что аллогенная трансплантация МСК ПК стимулирует активацию прорегенераторных M2 макрофагов в области ишемического повреждения.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Полученные в исследованиях *in vitro* и *in vivo* данные могут быть использованы для дальнейших исследований механизмов реализации репаративного потенциала МСК ПК и разработки новых методик терапевтического ангиогенеза.

Выявление VEGF-A-независимого пути паракринного воздействия МСК ПК на эндотелиальные клетки может служить теоретическим обоснованием трансплантации МСК ПК пациентам, не отвечающим на VEGF-A-опосредованную индукцию ангиогенеза.

Данные о динамике элиминации аллогенных МСК ПК иммунной системой реципиента после внутримышечной трансплантации могут быть учтены при разработке клинических подходов для лечения ишемии нижних конечностей.

Методология и методы исследования

Методологически работа построена на принципах системного анализа комплекса данных, включавших результаты *in vitro* и *in vivo* исследования.

В работе использованы следующие методы: культивирование клеток млекопитающих, проточная цитофлуориметрия, иммуноферментный анализ, колориметрический МТТ-тест, моделирование «раны монослоя», исследование клеточной миграции с помощью transwell-системы, моделирование ангиогенеза в матриксе базальной мембраны *in vitro*, моделирование ишемии задних конечностей крыс, тест толерантности к физическим нагрузкам «рота-род», иммуноцито- и иммуногистохимическое окрашивание, морфометрические методы, световая, флуоресцентная и конфокальная микроскопия, колокализационный анализ, статистический анализ.

Положения, выносимые на защиту

МСК ПК *in vitro* стимулируют пролиферацию, подвижность и направленную миграцию эндотелиальных клеток VEGF-A-независимым путем.

МСК ПК при культивировании на стандартной подложке способны дифференцироваться в эндотелиоцитоподобные CD31+ клетки, при этом ростовой фактор VEGF-A является необходимым, но недостаточным индуктором дифференцировки. При сокультивировании в матриксе базальной мембраны МСК ПК за счет контактного и паракринного взаимодействия с эндотелиальными клетками линии EA.hy926 способны приобретать CD31+фенотип без влияния экзогенного VEGF-A.

Аллогенная внутримышечная трансплантация МСК ПК при ишемии задних конечностей крыс способствует восстановлению функции конечности, обеспечивает стимуляцию регенерации и ангиогенеза, что проявляется уменьшением площади повреждения, а также увеличением количества и объемной плотности кровеносных сосудов.

МСК ПК выживают в течение 30 суток после введения, мигрируют в область повреждения, не дифференцируются в эндотелиальные и гладкомышечные клетки кровеносных сосудов, но элиминируются макрофагами. При этом в области повреждения наблюдается уменьшение количества общей популяции (CD68+) макрофагов с одновременным увеличением доли прорегенераторных M2 (CD206+) макрофагов.

Степень достоверности и апробация работы

Достоверность результатов обусловлена следующими положениями: последовательное и логичное изложение задач исследования, использование современных апробированных методов исследования, корректность применения релевантных моделей *in vitro* и *in vivo*, значительный объем данных для каждой экспериментальной группы, достаточное количество групп сравнения в экспериментах, адекватное применение методов статистического анализа.

Материалы диссертации были доложены на I Национальном Конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2013), Всероссийской научной конференции «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» (Москва, 2014), II Национальном Конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2015), Всероссийской научной конференции «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» (Москва, 2016).

Личное участие автора заключалось в планировании и проведении исследования, статистической обработке, обобщении и анализе полученных результатов, подготовке публикаций.

Публикации

По материалам диссертационной работы опубликовано 16 научных работ, из них 8 статей в рецензируемых научных изданиях, входящих в перечень ВАК.

Внедрение результатов работы

Результаты исследования внедрены в лекционные курсы для студентов и ординаторов ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова» Минздрава России.

Объём и структура работы

Диссертация изложена на 168 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, собственных результатов, обсуждения результатов, заключения, выводов и списка литературы, включающего в себя 236 российских и зарубежных источника. Работа иллюстрирована 53 рисунками и 5 таблицами.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Происхождение и строение пупочного канатика человека

Пупочный канатик человека является дериватом амниотической ножки, посредством которой зародыш с 15 суток развития связан с хорионом. Помимо мезенхимы амниотической ножки в формировании канатика принимают участие аллантаис со своими сосудами и желточный стебелек. Снаружи амниотическая ножка покрывается амниотической оболочкой, однослойный эпителий которой в области пупочного отверстия срастается с эпителием кожи плода. Строму пупочного канатика составляет соединительная ткань со специальными свойствами, не встречающаяся в организме человека после его рождения. Это слизистая соединительная ткань, называемая также вартонов студень (в англоязычной литературе “Wharton’s Jelly”) по имени английского анатома Томаса Вартона (Thomas Wharton, 1614-1673), описавшего ткань. Источником развития вартонова студня является внезародышевая мезодерма эмбриобласта. Основное вещество ткани содержит значительное количество гликозаминогликанов, особенно гиалуроновой кислоты и хондроитин сульфата, фибриллярный компонент представлен коллагеновыми волокнами, эластические волокна отсутствуют. Клеточный компонент вартонова студня представлен производными мезенхимы (фибробластами, миофибробластами, гладкими миоцитами, мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками). Вартонов студень предохраняет пупочные сосуды (две пупочные артерии, по которым течет венозная кровь от плода, и одну вену, по которой течет насыщенная кислородом кровь к плоду) от сжатия, обеспечивая упругость канатика [Щеголев и др., 2010; Bongso, Fong, 2013].

Пупочный канатик – источник МСК

В 1974 г. было показано, что пуповинная кровь является источником гемопоэтических стволовых и прогениторных клеток [Knudtzon, 1974], при этом

остальные ткани пупочного канатика оставались просто биологическим отходом, не представлявшим научной ценности. Отношение к пупочному канатику было кардинальным образом пересмотрено, когда в 1991 г. К. McElreavey и соавт. описали культуру фибробластоподобных клеток, выделенных из вартонова студня [McElreavey et al., 1991]. Впервые предположение о принадлежности данных клеток к мультипотентным мезенхимальным стромальным клеткам (МСК) была высказана в 2003 году [Romanov et al., 2003], а в 2004 году в пользу этого предположения были приведены дополнительные доказательства: наличие рецепторов к белкам внеклеточного матрикса CD44 и CD105, интегринов CD29 и CD51, синтез фермента CD73, отсутствие экспрессии гемопоэтических маркеров CD34 и CD45, возможность индуцированной дифференцировки в остециты, хондроциты, адипоциты и кардиомиоциты [Wang et al., 2004].

Происхождение МСК в вартоновом студне пупочного канатика

В известной работе Х. Wang и соавт. (2008) было показано, что гемопоэтические клетки и МСК из желточного мешка и области аорты-гонады-мезонефроса мигрируют по пупочному канатику в область плаценты, а затем обратно в печень и костный мозг зародыша. Во время этих двух волн миграции часть клеток задерживается в вартоновом студне и сохраняется в нем на протяжении всего срока гестации. При этом новое микроокружение изменяет свойства мигрирующих клеток, что, возможно, и объясняет их отличие от МСК костного мозга [Wang et al., 2008].

Выделение первичной культуры МСК из пупочного канатика

Большинство протоколов выделения первичной культуры МСК из пупочного канатика состоят из трех этапов:

1. удаление эпителия, кровеносных сосудов и периваскулярной ткани;
2. механическое измельчение и ферментативная обработка с использованием трипсина, коллагеназ I, II, IV типов, диспазы, протеазы, гиалуронидазы;

3. перенос в культуральную среду (чаще стандартные культуральные среды с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки, человеческой сыворотки или обогащенной тромбоцитами плазмы, которые могут быть дополнены ростовыми факторами FGFb, EGF, PDGF, VEGF) [Li, Cai, 2012; Bongso, Fong, 2013; Batsali et al., 2013; Van Pham et al., 2015].

Время ферментативной обработки может колебаться от 30 минут [Tong et al., 2011] до 6 [Zeng et al., 2011], 16 [Wang et al., 2004] и даже 18 часов [Yang et al., 2008]. В некоторых работах после инкубации ткань дополнительно обрабатывают с помощью гомогенизатора [Tong et al., 2011] или дополнительно пропускают через фильтры, постепенно уменьшая диаметр пор от 100 до 70 или 40 мкм [Can, Karahuseyinoglu, 2007; Tong et al., 2011].

Также для выделения МСК может быть применен метод эксплантов, который позволяет избежать повреждающего действия ферментов на клетки и сокращает время обработки биоматериала (в англоязычной литературе эта процедура также называется “plate and wait”) [Salehinejad et al., 2012; Trivanović et al., 2013]. Данный метод был успешно применен для выделения МСК из пупочных канатиков человека [Petsa et al., 2009; Majore et al., 2011], свиньи [Carlin et al., 2006], крысы [Ganta et al., 2009], козы [Azari et al., 2011], лошади [Gittel et al., 2013]. Метод эксплантов позволяет выделять фракцию клеток с более высоким пролиферативным потенциалом [Salehinejad et al., 2012; Han et al., 2013], но при этом более гетерогенную фенотипически [Majore et al., 2011; Margossian et al., 2012].

В работе Ниа J. и соавт., опубликованной в 2014 году, было проведено сравнение трех ферментативных методов и трех вариантов метода эксплантов. Было показано, что выделение МСК методом эксплантов из фрагментов пупочного канатика толщиной 10 мм позволяло получить клетки с более высокими пролиферативными характеристиками, однако ни один из шести способов не оказывал в итоге влияния на иммунофенотип или пластичность культуры [Hua et al., 2014]

По данным литературы эффективность выделения первичной культуры МСК из пупочного канатика человека составляет 100%. Для сравнения: эффективность выделения культуры МСК из пуповинной крови не превышает 60%, амниотической жидкости – 90%, плаценты – варьирует от 62,5% до 100% [Bieback, Brinkmann, 2010]. Следует особо отметить, что практически во всех культуральных лабораториях работают с пупочными канатиками, полученными после кесарева сечения, т.к. при родоразрешении через естественные родовые пути значительно возрастает риск контаминации первичного биоматериала.

Пролиферативный потенциал и стабильность кариотипа МСК ПК

МСК ПК имеют более высокий пролиферативный потенциал, чем МСК костного мозга («золотой стандарт» для сравнения любых МСК), или МСК из других постнатальных (жировой ткани) и неонатальных источников (плаценты и амниотической мембраны) [Lu et al., 2006; Chen et al., 2009; Wu et al., 2009; Shaer et al., 2014; Li X. et al., 2014]. По разным данным период удвоения культуры МСК ПК человека составляет около 21 ч [Shaer et al., 2014], 24 ч [Lu et al., 2006], 40 ч [Han et al., 2013; Li X. et al., 2014] или 45 ч [Badowski et al., 2014]. Достаточное количество исходного материала (масса пуповины около 40 г), высокая теломеразная активность позволяют получить из одного образца свыше 10^9 клеток при сохранении нормального кариотипа в течение 6 пассажей [Karahuseyinoglu et al., 2007; Ruan et al., 2014].

Ряд авторов указывают на высокую стабильность кариотипа МСК ПК, в том числе, по сравнению с клеточными культурами иного происхождения: отсутствие хромосомных аномалий в культивируемых МСК ПК на отдаленных сроках (до 25 пассажей) [Chen et al., 2014; Sabapathy et al., 2014]. Вместе с тем нельзя игнорировать сообщения о нарушении генетической стабильности МСК ПК. Совсем недавно опубликована единственная статья, демонстрирующая возможность хромосомных аномалий при культивировании МСК ПК не на отдаленных сроках – получение клона с дериватом хромосомы 7 на 7 пассаже. При этом в том же исследовании МСК жировой ткани продемонстрировали

гораздо более высокий процент хромосомных аномалий, включая трисомии 7 и 9 хромосом [Kim J.A. et al., 2015]. В другой работе было проведено сравнение 9 клонов МСК ПК на 3 и 30 пассажах: в двух клонах не было выявлено нарушений, 7 клонов имели 1 или более вариаций числа копий ДНК, из них в одном была выявлена трисомия по 10 хромосоме. Трансплантация измененных клонов не приводила к появлению опухолей у иммунодефицитных мышей, однако авторы работы настаивают на важности мониторинга генетической стабильности МСК ПК перед клиническим применением [Wang Y. et al., 2013]. На этом же акцентируют внимание члены ISCT (International Society for Cellular Therapy) в своей проблемной статье, посвященной контролю качества клеточных трансплантатов [Borghesi et al., 2013].

Экспрессия специфических маркеров в МСК ПК

Профиль экспрессии поверхностных маркеров и маркеров плюрипотентности МСК ПК на сегодняшний день исследован достаточно полно (табл. 1 и 2).

Таблица 1. Экспрессия поверхностных маркеров МСК ПК (по данным [Can, Karahuseyinoglu, 2007; Bongso, Fong, 2013; Batsali et al., 2013; El Omar et al., 2014]).

Положительные маркеры		Противоречивые данные	Отрицательные маркеры	
CD10	CD58	CD54	CD3	CD49a
CD13	CD59	CD106	CD11b	CD50
CD29	CD61	CD117	CD14	CD53
CD44	CD73	CD144	CD19	CD56
CD49b	CD90	CD146	CD31	CD71
CD49c	CD105		CD33	CD80
CD49d	CD166		CD34	CD86
CD49e	CD325		CD38	CD133
CD51	HLA-I		CD40	CD140 α
CD56			CD45	HLA-II

Таблица 2. Экспрессия маркеров плюрипотентности МСК ПК (по данным [Can, Karahuseyinoglu, 2007; Nekanti et al., 2010; Fong et al., 2011; Bongso, Fong, 2013; Batsali et al., 2013; El Omar et al., 2014]).

Положительные маркеры		Противоречивые данные
REX2	Tra-1-81	STRO-1
GD2	SSEA-1	OCT4
SOX2	DNMT3B	SSEA4
NANOG	GABRB3	
Tra-1-60		

Данные об уровне экспрессии в МСК ПК маркеров плюрипотентности противоречивы: по некоторым данным маркеры присутствуют только на ранних пассажах [Tantrawatpan et al., 2013], только в присутствии фидерных клеток [Fong et al., 2007], только при культивировании в условиях гипоксии (снижении содержания кислорода до 5%) [Drela et al., 2014] или культивировании в виде суспензии после отбора CD105⁺ клеток [Amiri et al., 2014]. При этом значимость присутствия маркеров эмбриональных стволовых клеток может быть нивелирована: МСК ПК экспрессируют SSEA4 на протяжении минимум 9 пассажей, однако между SSEA4⁺ и SSEA4⁻ субпопуляциями не обнаружено различий в пролиферативном и дифференцировочном потенциалах [He et al., 2014].

Дифференцировочный потенциал МСК ПК

Пластичность МСК ПК очень высока: *in vitro* при добавлении в культуральную среду специфических индукторов МСК способны дифференцироваться в остеобласты, хондробласты, адипоциты, дермальные фибробласты, гладкомышечные клетки, скелетномышечные клетки, кардиомиоциты, эндотелиоподобные клетки, гепатоцитоподобные клетки, одонтобластоподобные клетки, инсулин-, глюкагон- и соматостатин-продуцирующие клетки, клетки потовых желез, нейроглиальные клетки, (олигодендроциты), дофаминергические нейроны [Can et al., 2007; Kadam et al.,

2010; Datta et al., 2011; Han et al., 2011; Li D.R. et al., 2012; Yang et al., 2013; Wang H. et al., 2014; Chen Y. et al., 2015]. В 2014 г. была продемонстрирована возможность индукции экспрессии МСК маркеров примордиальных зародышевых клеток и мужских половых клеток, что ранее было показано только для ЭСК и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток [Li N. et al., 2014; Latifpour et al., 2014].

Опубликованы работы, в которых сравнивали дифференцировочный потенциал МСК ПК и МСК из других источников. Выявлен более высокий уровень экспрессии эндотелий-специфичных маркеров и формирование более разветвленной сети капилляроподобных структур при моделировании ангиогенеза в матриксе базальной мембраны у МСК ПК по сравнению с МСК костного мозга [Chen et al., 2009]. Эффективность дифференцировки МСК ПК в инсулин-продуцирующие клетки была на 72% выше, чем у МСК костного мозга [Wu et al., 2009]. Также МСК ПК продемонстрировали более высокий остеогенный потенциал, чем МСК, выделенные из плаценты, жировой ткани или костного мозга [Li X. et al., 2014]. При формировании нейросфер МСК ПК экспрессировали больше нейротрофических факторов, чем МСК костного мозга или жировой ткани [Balasubramanian et al., 2013]. При этом МСК ПК и костного мозга показали одинаковую эффективность дифференцировки в дофаминергические нейроны [Datta et al., 2011].

В ряде работ продемонстрирована возможность направленной дифференцировки МСК ПК после генетической модификации (трансдукции или трансфекции). МСК с повышенной экспрессией фактора роста гепатоцитов HGF дифференцируются *in vitro* в дофаминергические нейроны [Li J.F. et al., 2013], способствуют *in vivo* ремиелинизации нервных волокон и восстановлению моторных функций при внутримозговом кровоизлиянии [Liu et al., 2010]. После аденовирусного внедрения кДНК фактора стероидогенеза SF-1 МСК ПК дифференцируются в гормон-продуцирующие клетки, причем уровень секреции кортизола и тестостерона, а также выживаемость модифицированных клеток

выше, чем при трансдукции МСК костного мозга [Wei et al., 2012]. Внедрение гена CD61 (интегрин $\beta 3$) позволяет получить МСК ПК, на высоком уровне экспрессирующие маркер мужских половых клеток акрозин и маркеры мейоза Stra8 и Scp3 [Li B. et al., 2016].

Интересно, что пластичность МСК может зависеть от условий протекания беременности. Так, МСК, выделенные из пупочного канатика пациенток с преэклампсией, лучше отвечают на нейроглиальную дифференцировку, чем МСК здоровых доноров [Joerger-Messerli et al., 2014]. При этом недоношенность беременности не влияет на нейрональную дифференцировку МСК ПК [Messerli et al., 2013], но снижает эффективность остеогенной дифференцировки [Penolazzi et al., 2009]. Гестационный сахарный диабет не влияет на иммунофенотип МСК, но подавляет их пролиферативный и пластический потенциал, а также значительно снижает уровень экспрессии генов, регулирующих функциональную активность митохондрий ND2, ND9, COX1, PGC-1 α и TFAM [Kim J. et al., 2015]. Таким образом, нарушение метаболизма материнского организма во время беременности оказывает значимое влияние на биологические свойства МСК ПК, что должно быть учтено при клиническом использовании этого типа клеток.

Транскриптом МСК ПК

В 2012 году De Kock и соавт. опубликовали работу, в которой было проведено сравнение профилей экспрессии генов культур МСК, выделенных из четырех различных источников. В МСК ПК человека была значимо повышена экспрессия генов, связанных с развитием и функционированием печени и сердечно-сосудистой системы по сравнению с МСК, выделенными из костного мозга, жировой ткани или кожи. Наиболее выраженные различия были выявлены для следующих генов: HAND1 (heart and neural crest derivatives expressed 1), играющий критическую роль в развитии сердца, AFP (alpha-fetoprotein), основной белок плазмы, продуцируемый печенью в пренатальный период, DKK1 (dickkopf homolog 1), ингибитор WNT-сигнального пути, вызывающего дифференцирование плюрипотентных стволовых клеток в прогениторные клетки

эндодермы и мезодермы, DSG2 (desmoglein 2), важный компонент десмосом в эпителиальных клетках, KRT8,18,19 (кератины 8, 18, 19), белки промежуточных филаментов эпителиальных клеток [De Kock et al., 2012].

В 2010 году Hsieh и соавт. опубликовали интересные данные, касающиеся профилей экспрессии генов МСК ПК и МСК костного мозга. Оказалось, что для этих двух типов клеток в перечне 50 наиболее сильно экспрессирующихся генов не было ни одного общего! В десятку генов с максимальной экспрессией в МСК ПК вошли гены, кодирующие рецептор к соматостатину 1, член 4 суперсемейства иммуноглобулинов (белок клеточной адгезии), гладкомышечный γ -актин, ретикулон 1 (эволюционно-консервативный белок эндоплазматического ретикулума), натрийуретический пептид типа В, кератин 8, рецептор окситоцина, десмоглеин 2 и десмоколлин 3 (белки десмосом), а также миокардин (основной ген, управляющий дифференциацией сосудистых миоцитов). В работе также было показано, что в МСК ПК экспрессия генов, связанных с клеточной пролиферацией (EGF), PI3K-NF κ B сигнальным путем (TEK) и нейрогенезом (RTN1, NRP1 и NRP2), была выше, чем в МСК костного мозга [Hsieh et al., 2010].

Аллогенная трансплантация МСК костного мозга широко используется в доклинических и клинических исследованиях, однако не так давно было показано, что выживаемость клеток после аллогенной трансплантации крайне мала вследствие активации иммунной системы реципиента [Huang X.-P. et al., 2010; Tano N. et al., 2016]. При сравнении уровня экспрессии HLA-антигенов, костимулирующих факторов и молекул иммунотолерантности в МСК ПК и МСК костного мозга было обнаружено, что экспрессия МНС II молекул (HLA-DMA, -DRA и -DPB1) в МСК ПК в 16, 36 и 4 раза соответственно ниже, чем в МСК костного мозга. Уровень экспрессии связанных с иммунным ответом генов TLR4, TLR3, JAG1, NOTCH2 и NOTCH3 в МСК ПК оказался ниже в 38, 4, 5 и 3 раза соответственно, чем в МСК костного мозга [Li X. et al., 2014]. Эти данные позволяют предположить, что аллогенные МСК ПК будут вызывать более слабый иммунный ответ и дольше выживать в организме реципиента, что может

обеспечить будущее широкое применение МСК ПК в качестве аллогенного трансплантата.

Секретом МСК ПК

МСК продуцируют множество биоактивных веществ, обеспечивающих паракринный механизм их терапевтической активности. Однако секретом МСК ПК значительно отличается от МСК из других источников. Одним из наиболее существенных отличий является практически полное отсутствие синтеза VEGF-A (основного проангиогенного фактора как в пренатальный, так и в постнатальный период); в МСК костного мозга или жировой ткани уровень секреции данного фактора роста выше в 10^3 и 10^2 раз соответственно [Amable et al., 2014; Kuchroo et al., 2015]. При этом уровень экспрессии гена *veg*f является детектируемым [Kuchroo et al., 2015], а по некоторым данным даже близок к уровню в МСК костного мозга [Lu et al., 2006]. В МСК ПК продукция некоторых проангиогенных факторов (включая ангиогенин и PLGF) также снижена, а продукция анти-ангиогенных факторов (включая тромбоспондин-1 и эндостатин) повышена по сравнению с МСК костного мозга и жировой ткани [Amable et al., 2014; Kuchroo et al., 2015]. В противоположность этому в МСК ПК выше уровень секреции проангиогенных хемокинов CXCL1, CXCL2, CXCL5, CXCL6 и CXCL8, а также проангиогенных ростовых факторов HGF, bFGF, VEGF-D, PDGF-AA, TGF- β 2, G-CSF [Balasubramanian et al., 2012; Amable et al., 2014].

Сравнение с МСК костного мозга и жировой ткани показало, что в МСК ПК повышен уровень секреции нейротрофических факторов, таких, как NGF (фактор роста нервов), нейротрофины 3 и 4, а также нейротрофический фактор глиии [Balasubramanian et al., 2013].

Также высказано предположение, что МСК ПК являются лучшими кандидатами для поддержания экспансии гематопозитических стволовых клеток, чем МСК костного мозга, т.к. секретируют больше гематопозитических ростовых

факторов и цитокинов– G-CSF, GM-CSF, LIF, IL-1 α , IL-6, IL-8 и IL-11 [Friedman et al., 2007].

Иммуномодулирующие свойства МСК ПК

В 2008 г. была опубликована статья М. Weiss и соавт., в которой впервые были подробно изучены иммунные свойства МСК ПК [Weiss et al., 2008]. Авторы сделали пять основных выводов:

- 1) МСК ПК подавляют пролиферацию стимулированных конканавалином А клеток селезенки (ксеногенная модель) и активированных моноклеарных клеток периферической крови (аллогенная модель);
- 2) сами МСК ПК не способны вызвать пролиферацию клеток селезенки и Т-клеток;
- 3) МСК ПК экспрессируют иммуносупрессивную изоформу HLA-G6, ингибирующую цитолитическую активность НК-клеток;
- 4) МСК ПК не экспрессируют костимулирующие молекулы CD40, CD80 и CD86, обеспечивающие активацию Т-лимфоцитов;
- 5) МСК ПК продуцируют противовоспалительные цитокины, обеспечивающие их иммуномодулирующие свойства [Weiss et al., 2008].

В настоящее время считается, что иммуномодулирующая активность МСК ПК обеспечена паракринным механизмом. Так, например, синтез данными клетками IL-6 препятствует созреванию дендритных клеток [Deng et al., 2014], синтез простагландина E₂ (PGE2) ингибирует цитолитическую активность НК-клеток [Chatterjee et al., 2014], а синтез индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO) ингибирует дифференцировку Т-хелперов [Liu et al., 2015]. После стимулирования IL-1 β в МСК ПК значительно повышается уровень транскрипции иммуномодулирующих цитокинов TGF β 1, IDO, TSG6 и PGE2, причем сильнее, чем в МСК костного мозга и плаценты [Sabapathy et al., 2014].

В последнее время все больше работ посвящено культивированию МСК без использования ксеногенных компонентов (xeno-free стандарт культивирования).

Показано, что данные условия не влияют на ростовые характеристики, иммунофенотип и дифференцировочный потенциал МСК ПК [Venugopal et al., 2011; Swamynathan et al., 2014; Chen et al., 2014; Van Pham et al., 2015]. МСК ПК, культивированные в бессывороточной среде или среде с добавлением GMP (Good Manufacture Practice)-сертифицированной человеческой сыворотки, сильнее подавляют пролиферацию Т-клеток в смешанной культуре лимфоцитов по сравнению с МСК, культивированными в среде с добавлением ксеногенной (эмбриональной телячьей) сыворотки [Hartmann et al., 2010]. Более того, в культивируемых в хено-free условиях МСК доля апоптотических клеток ниже, уровень секреции HGF и PGE₂ выше, а сама культура менее иммуногенна [Hartmann et al., 2010; Swamynathan et al., 2014].

Несомненно, введение хено-free стандарта культивирования МСК для дальнейшего их клинического использования является лишь вопросом времени.

Доклинические исследования с использованием МСК ПК

За последние несколько лет опубликованы результаты десятков экспериментальных работ ведущих научных лабораторий с использованием МСК ПК. Показана эффективность применения этого типа клеток у животных с моделированием инфаркта миокарда [Santos Nascimento et al., 2014], повреждения легких [Liu et al., 2014], субтотальной резекции печени [Ельчанинов и др., 2014], аутоиммунного энцефаломиелита [Donders et al., 2015], полнослойной кожной раны [Shohara et al., 2012; Sabapathy et al., 2014], декстран-индуцированного колита [Lin et al., 2015], артрита [Santos et al., 2013] и многих других. Также опубликованы единичные работы, в которых продемонстрировано усиление репаративного потенциала МСК ПК при гиперэкспрессии гена *hgf* на моделях церебральной геморрагии [Liu et al., 2010] и повреждения пазух носа [Li J. et al., 2015].

Предполагаемые механизмы терапевтической активности МСК ПК

Все исследователи подтверждают миграцию трансплантированных МСК в поврежденные ткани или органы (хоминг), при этом «встраивание» (англ. engraftment) значительно выше при локальном введении клеток. Однако современных работах все меньше внимания уделяют заместительному механизму реализации терапевтической активности МСК. Было показано, что МСК ПК человека после трансплантации мигрировали в очаг ишемического повреждения головного мозга крысы, где дифференцировались в глиальные, нейрональные, даблкортин (белок незрелых нейронов)-положительные и сосудистые эндотелиальные клетки [Ding et al., 2007]. В другом похожем исследовании МСК ПК человека также мигрировали в очаг ишемического повреждения головного мозга крысы, но дифференцировались только в эндотелиальном направлении [Liao et al., 2009]. Подобные работы все же единичны, при этом возможность трансдифференцировки после ксеногенной трансплантации оставляет место здоровому скептицизму.

Несмотря на впечатляющую пластичность *in vitro*, в настоящее время считается, что МСК ПК после трансплантации не способны полностью изменить свой фенотип и выполнять функции основных клеток поврежденной ткани [Fan et al., 2011]. Терапевтический эффект МСК ПК не зависит от трансдифференцировки *in vivo*, что было продемонстрировано на моделях острого повреждения почек [Fang et al., 2012], повреждения спинного мозга [Yang et al., 2008; Zhang et al., 2009], CCl₄-индуцированного фиброза печени [Tsai et al., 2009], полнослойной кожной раны [Shohara et al., 2012] и других.

В настоящее время в качестве основных механизмов терапевтической активности МСК рассматривают трофический эффект и паракринное воздействие на резидентные прогениторные клетки и клетки иммунной системы, ремоделирование внеклеточного матрикса, ангиогенез и апоптоз [Santos et al., 2013; Santos Nascimento et al., 2014; Sabapathy et al., 2014; Liu et al., 2014; Donders et al., 2014; Lin et al., 2015].

Не так давно было высказано предположение о существовании еще одного механизма терапевтической активности МСК: способности переключать М1 (классически активированный) путь активации макрофагов на М2 (альтернативно активированный) [Dayan et al., 2011]. Основными активаторами поляризации макрофагов по М1 фенотипу являются Th1 цитокины ($IFN\gamma$ и $TNF\alpha$), патоген-ассоциированные молекулярные комплексы (липополисахариды, липопротеины, липотеикоевая кислота), микроорганизмы, цитомегаловирус, белки теплового шока и др. М1 макрофаги являются активными продуцентами эффекторных молекул (активных форм кислорода и метаболитов азота) и провоспалительных цитокинов IL-12 и IL-23, IL-1 β , IL-6, IL-18, $TNF\alpha$. Альтернативная форма активации М2 объединяет различные формы макрофагов, активированных неклассическим путем, в результате действия IL-4 или IL-13, IL-10, TGF β , витамина D3, глюкокортикоидов и др. молекул. М2 макрофаги экспрессируют большое количество маннозных рецепторов, фагоцитарных рецепторов и рецепторов галактозного типа, метаболизм аргинина у них сдвинут в сторону выработки орнитина и полиаминов с помощью аргиназы. Они обладают повышенной фагоцитарной активностью, а за счет синтеза большого количества факторов роста (VEGF, EGF, PDGF) и противовоспалительных цитокинов (IL-10) активно стимулируют процессы регенерации и ремоделирования тканей, ангиогенез, а также обладают проопухолевой активностью [Монастырская и соавт., 2008; Луста, Орехов, 2014]. Таким образом, определяя выбор пути активации макрофагов, МСК выполняют функцию раннего регулятора воспаления и оказывают значительное влияние на динамику и эффективность репаративных процессов [Proctor, 2013].

Экспериментальные исследования *in vivo* подтверждают, что трансплантация МСК изменяет баланс М1/М2 макрофагов в поврежденной ткани, при этом МСК из различных источников могут отличаться по эффективности воздействия. Так, на модели эмфиземы легких было показано, что МСК жировой ткани способны только снижать количество М1 макрофагов, а МСК костного

мозга способны еще и увеличивать количество M2 макрофагов [Antunes et al., 2014]. На модели сепсиса было показано, что введение МСК костного мозга снижает уровень провоспалительных цитокинов $IFN\gamma$, $TNF\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$ и увеличивает уровень противовоспалительного $IL-10$ [Lombardo et al., 2015], при этом источником $IL-10$ являются не сами МСК, а активированные ими по M2 пути макрофаги [Németh et al., 2009].

На сегодняшний день опубликованы лишь единичные работы, подтверждающие способность МСК ПК влиять на поляризацию макрофагов *in vivo*. Одно из таких исследований было посвящено моделированию патогенеза системной красной волчанки, для которой характерно снижение доли M2 макрофагов. Было продемонстрировано, что трансплантация МСК ПК человека мышам линии B6.MRL-Fas(lpr), также характеризующейся низким содержанием альтернативно-активированных макрофагов, приводила к повышению доли M2 макрофагов с 9,47% до 38,8% среди всех перитонеальных макрофагов (у контрольных мышей линии C57BL/6 данный показатель составлял 51,6%). Сокультивирование макрофагов, полученных из периферической крови людей, больных системной красной волчанкой, с МСК ПК также приводило к значимому увеличению доли M2 макрофагов. Более того, внутривенное введение МСК ПК таким пациентам также значимо увеличивало долю M2 макрофагов спустя сутки после трансплантации [Deng et al., 2015].

Данные о влиянии аллогенной трансплантации МСК ПК на поляризацию макрофагов в ишемизированной скелетной мышечной ткани в литературе отсутствуют.

Доклинические исследования трансплантации МСК ПК при моделировании ишемического повреждения скелетной мышечной ткани

Обнадёживающие результаты были получены при использовании МСК ПК для терапии ишемического повреждения скелетной мышечной ткани. Наиболее интересные данные представлены в таблице 3.

Таблица 3. Результаты доклинических исследований трансплантации МСК ПК при моделировании ишемического повреждения скелетной мышечной ткани.

Модель	Животные	Воздействие	Результаты	Источник
Ишемия задних конечностей (иссечение бедренной артерии)	Вистар крысы	1×10^6 МСК ПК человека или микровезикулы, полученные в культуре МСК ПК человека, внутримышечно, через 24 часа после повреждения	усиление кровотока в обеих опытных группах, подтвержденное лазерной доплерометрией, увеличение плотности капилляров через 2 недели после повреждения	Zhang H.C. et al., 2012
Ишемия задних конечностей (иссечение бедренной артерии и ее ветвей)	BALB/c Slc-nu/nu мыши	5×10^6 МСК ПК человека, преддифференцированные в эндотелиальном направлении, внутримышечно, через 6 часов после повреждения	улучшение кровообращения, увеличение плотности кровеносных сосудов	Choi et al., 2013
Ишемия задних конечностей (лигирование бедренной артерии и ее ветвей)	Sprague-Dawley крысы	3×10^6 МСК ПК человека или 3×10^6 МСК ПК человека с повышенной экспрессией эритропоэтина, внутримышечно, одновременно с повреждением	увеличение плотности капилляров в обеих опытных группах через 4 недели после повреждения	Li J.P. et al., 2015

Как видно из таблицы, во всех подобных работах описывают результаты ксеногенной трансплантации МСК ПК человека экспериментальным животным. При этом различаются способы моделирования ишемии, объем клеточного трансплантата, сроки введения, конечные точки эксперимента, методы оценки результатов.

Моделирование ишемии задних конечностей у крыс

Оценка безопасности и эффективности клеточной терапии невозможна без использования адекватной экспериментальной модели ишемического повреждения конечностей. Повреждения периферических сосудов удобнее

изучать на крупных лабораторных животных (например, собаках [Зусманович и др., 1982] или свиньях [Radowsky et al., 2015]), однако подавляющее большинство исследований выполнено на кролика, крысах и мышах.

В зависимости от задач исследования возможно моделирование ишемии скелетной мышечной ткани на разных стадиях развития заболевания – от незначительных сдвигов гемодинамики до развития выраженных повреждений тканей. Описанные в современной литературе методики моделирования ишемии конечности можно разделить на 4 основные группы:

1. лигирование или иссечение питающих сосудов конечности на различных уровнях (брюшинной аорты, поверхностной эпигастральной артерии, общей подвздошной артерии, бедренной артерии и ее ветвей, подкожной артерии, в том числе комбинированное повреждение нескольких сосудов) [Babucci et al., 2004; Piccinato et al., 2011; Zhang H.C. et al., 2012; Choi et al., 2013; Li J.P. et al., 2015];
2. сочетание иссечения артерий с введением склерозирующего раствора дистальнее места иссечения [Зусманович и др., 1982];
3. наложение жгута или компрессионной манжеты на конечность без хирургического вмешательства [Babucci et al., 2004, Souza Filho et al., 2009];
4. ампутация/реплантация конечности животного с последующим наложением артериовенозных шунтов [McCarty et al., 1995; Radowsky et al., 2015].

При моделировании ишемии конечностей на мышах и крысах необходимо учитывать, что среди них велика вариабельность сосудистого русла конечностей и значительно сильнее развиты механизмы компенсации повреждения кровотока [Ноздрачев, Поляков, 2001; Baumeister et al., 2004].

Клинические испытания с использованием МСК ПК

В настоящее время в FDA зарегистрированы десятки клинических испытаний (1-3 фаза) безопасности и эффективности применения нативных аллогенных МСК ПК для терапии социально значимых заболеваний. В

соответствии с данными регистра <http://www.clinicaltrials.gov/> (поисковые запросы “wharton jelly msc” и “umbilical cord msc”, исключены результаты, содержащие “blood-derived”) по состоянию на февраль 2016 г. зарегистрированы клинические исследования безопасности и эффективности трансплантации МСК ПК для лечения острого инфаркта миокарда, дилатационной и др. кардиомиопатий, критической ишемии нижних конечностей, бронхолегочной дисплазии у новорожденных, ВИЧ-инфекции, сахарного диабета I и II типов, острой и хронической печеночной недостаточности, аутоиммунного гепатита, цирроза печени различной этиологии, некротически-язвенного колита, острой апластической анемии, болезни Альцгеймера, системной красной волчанки, ревматоидного артрита, миелодиспластического синдрома, наследственной атаксии, травмы спинного мозга, болезни Бехтерева, остеоартрита, рассеянного склероза, миодистрофии Дюшенна, острой и устойчивой к стероидной терапии реакции «трансплантат против хозяина» и др. В таблице 4 представлены данные о проводимых клинических испытаниях МСК ПК для терапии ишемических повреждений ткани.

Таблица 4. Клинические испытания аллогенных МСК ПК для терапии ишемических повреждений ткани.

Фаза	Номер исследования	Заболевание	Реципиенты	Способ и кратность введения
1-2	NCT02323477	инфаркт миокарда	мужчины 30-80 лет	интрамиокардиально, однократно
1-2	NCT02635464	кардиомиопатия	мужчины и женщины 35-65 лет	интрамиокардиально, однократно
1-2	NCT02439541	кардиомиопатия	мужчины и женщины 18-80 лет	интракоронарно, повтор через 1 и 2 недели – внутривенно
1-2	NCT01216865	диабетическая стопа на фоне ишемии	мужчины и женщины	внутримышечно,

		конечности	старше 18 лет	однократно
1-2	NCT02287831	заболевания периферических артерий на фоне диабета II типа	мужчины и женщины 18-75 лет	внутримышечно, повтор через 4 и 8 недель
2-3	NCT02223897	ишемическое поражение желчных протоков после пересадки печени	мужчины и женщины 18-60 лет	внутривенно, повтор через 1, 2, 3 недели, затем через 2, 3, 4, 5, 6 месяцев

Как видно из таблицы, в трех исследованиях будет изучено влияние однократной трансплантации МСК ПК, еще в трех – будет проведена серия трансплантаций. Во всех случаях будет изучено влияние аллогенного трансплантата, что объясняется достаточно просто – банкирование МСК ПК началось всего несколько лет назад, поэтому набор группы реципиентов для проведения аутогенной трансплантации пока невозможен.

Интерес к пупочному канатику как к источнику МСК в последние годы стабильно растет. МСК ПК обладают наиболее высоким пролиферативным потенциалом, пластичностью и иммуномодулирующей активностью, на высоком уровне экспрессируют гены, вовлеченные в развитие и функционирование сердечно-сосудистой системы, не обладают туморогенностью и считаются оптимальным ресурсом для аллогенной трансплантации. Безопасность и эффективность применения МСК ПК продемонстрирована на различных экспериментальных моделях, в том числе ишемического повреждения тканей. Предполагают, что основными механизмами терапевтической активности МСК ПК являются трофический эффект и паракринное воздействие на резидентные прогениторные клетки и клетки иммунной системы, ремоделирование внеклеточного матрикса, ангиогенез и апоптоз, однако заместительный эффект также не может быть исключен. Среди возможных механизмов рассматривают и

влияние МСК ПК на поляризацию макрофагов, однако данные о запуске данного механизма при трансплантации МСК ПК в ишемизированную ткань отсутствуют.

Важной особенностью МСК ПК является сдвиг про-и антиангиогенных факторов в секретоме (в том числе практически полное отсутствие основного проангиогенного фактора VEGF-A), что поднимает вопрос эффективности применения данных клеток для терапии ишемического повреждения тканей. Сохраняющиеся на сегодняшний день противоречия и пробелы среди данных литературы о взаимодействии МСК ПК с эндотелиальными клетками и судьбе МСК ПК после трансплантации в ишемизированную ткань не позволяют сформировать единого представления о механизмах ангиогенной активности МСК ПК.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование включало три этапа.

На первом этапе были получены и охарактеризованы первичные клеточные культуры из пупочного канатика человека и крысы, была подтверждена их принадлежность к мультипотентным стромальным клеткам.

На втором этапе было проведено *in vitro* исследование возможных механизмов (паракринного и заместительного), обеспечивающих реализацию проангиогенного потенциала МСК ПК.

На третьем этапе было проведено *in vivo* исследование влияния аллогенной трансплантации МСК ПК на состояние скелетной мышечной ткани крысы с моделированной ишемией.

2.1 Гистологическое и иммуногистохимическое исследование строения пупочного канатика

Фрагменты пупочного канатика длиной 10 мм фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина на фосфатном буфере по Лилли в течение 72 часов, после чего в течение 24 часов промывали в проточной воде. После стандартной гистологической проводки образцы тканей заливали в парафин. Поперечные срезы окрашивали гематоксилином и эозином или по Маллори, обезвоживали и заключали в синтетическую монтирующую среду (все БиоВитрум, Россия).

Часть пуповин фиксировали жидким азотом. Криосрезы толщиной 5-7 мкм изготавливали с помощью криотома Leica CM1900 (Leica, Германия), используя стекла SuperFrost (Menzel, Германия). Срезы окрашивали с антителами против маркера перицитов CD146 (ab75769, Abcam, США) и маркера эндотелиоцитов

CD31 (ab24590, Abcam, США), ядра клеток докрашивали DAPI (Sigma-Aldrich, США).

2.2 Выделение первичной культуры из пупочного канатика человека ферментативным методом

Пуповину человека, нарезанную на фрагменты длиной 3-5 см, однократно промывали раствором Хенкса с цефазолином (1 г/л) и трижды промывали раствором Версена. Далее материал тщательно очищали от кровеносных сосудов и периваскулярной ткани. С помощью хирургических инструментов выделяли участки вартонова студня и измельчали их до состояния кашицы.

Для дезагрегации к материалу добавляли 5-кратный объем ферментативного раствора, содержащего 200 Ед/мл коллагеназы I типа и 40 Ед/мл диспазы в бессывороточной среде DMEM/F12, и инкубировали в течение 40 мин. при 37°C до растворения материала.

Полученную клеточную суспензию переносили в центрифужные пробирки и осаждали центрифугированием (10 минут, 220g), после чего супернатант удаляли. Осадок разводили ростовой средой (DMEM/F12 с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) до 10%), переносили в культуральную посуду и помещали в CO₂-инкубатор (37°C, 5% CO₂). Плотность посева составляла 10 тыс. клеток на 1 см².

После достижения клетками 80-90% конфлуентности монослоя их открепляли от подложки раствором трипсина-Версена, и осаждали центрифугированием (10 мин, 220g). Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в свежей ростовой среде и рассаживали с разведением в 7 раз в новую культуральную посуду.

Здесь и далее для культуральных работ использовали ЭТС производства GE (США), остальные среды, растворы и реактивы культуральной чистоты – производства НПП ПанЭко (Россия).

2.3 Выделение первичной культуры из пупочного канатика крысы методом эксплантов

Пупочные канатики (n=12) были получены от беременных крыс Sprague-Dawley (n=4) путем оперативного вмешательства (кесарева сечения) на поздних сроках гестации. Материал отмывали от крови стерильным раствором Хенкса с добавлением амикацина (Синтез, Россия) до 500 мг/л и максимально тщательно удаляли кровеносные сосуды. Далее стромальную ткань нарезали на небольшие фрагменты объемом 0,5-2 мм³ и помещали в культуральную посуду с минимальным количеством ростовой среды, не допуская флотирования эксплантов. В качестве ростовой среды использовали DMEM/F12 с добавлением ЭТС до 10%.

Посуду с эксплантами помещали в CO₂-инкубатор при стандартных условиях (5% CO₂, 37°C). По мере необходимости добавляли свежую среду. После открепления эксплантов клетки снимали раствором трипсина-Версена и рассаживали в новую культуральную посуду.

2.4 Анализ иммунофенотипа МСК ПК

Для определения экспрессии специфических поверхностных маркеров использовали метод проточной цитофлуориметрии. В процессе подготовки проб МСК ПК на 2-4 пассажах открепляли от подложки раствором трипсина-Версена, дважды отмывали от культуральной среды в растворе Хенкса, фиксировали 2%

параформальдегидом, снова дважды отмывали раствором Хенкса. Клетки ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере с добавлением ЭТС до 0,1% в концентрации 100 тыс. клеток в 100 мкл и добавляли антитела.

Для анализа иммунофенотипа МСК ПК человека (n=5) использовали BD Stemflow™ hMSC Analysis Kit для многоцветного иммунофенотипирования (BD, США). Для анализа иммунофенотипа МСК ПК крысы (n=5) использовали антитела к CD90, CD73, CD105, CD34, CD45, CD11b (все Antibodies-online Inc., США) в соответствии с рекомендациями производителя. После инкубации клетки отмывали от антител, ресуспендировали в 500 мкл фосфатно-солевого буфера и переносили в пробирки для проточной цитофлуориметрии. Анализ проводили на цитофлуориметре FACS Calibur с помощью программы Cell Quest (BD, США) или на цитофлуориметре Cytomics FC 500 с помощью программы CXP (Beckman Coulter, США).

2.5 Направленная дифференцировка МСК ПК

Для оценки пластичности полученных культур МСК ПК человека (n=3) и крысы (n=3) использовали клетки на 2-3 пассаже. По достижении клетками конфлуентного монослоя ростовую среду заменяли на дифференцировочную. В работе использовали готовые наборы StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit, StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit, StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit (Gibco, США) в соответствии с рекомендациями производителя. В качестве отрицательных контролей использовали культуры МСК ПК без воздействия дифференцировочных сред.

Для выявления адипогенеза клетки фиксировали спиртом-формалином (1:4) не более 3 минут и окрашивали раствором Судана III в течение 10 минут.

Для выявления очагов минерализации индуцированные в остеогенном направлении клетки фиксировали 70° спиртом и окрашивали 40 мМ ализариновым красным (pH=4,7) в течение 5 минут.

Для визуализации хондрогенной дифференцировки клетки фиксировали 4% формалином (не менее 1 часа) и окрашивали скопления мукополисахаридов 1% раствором альцианового синего (pH=2,5) в течение 24 часов.

2.6 Иммуноцитохимическое исследование экспрессии Ki67, виментина и гладкомышечного актина в культуре МСК ПК

МСК ПК на 2-3 пассажах переносили в чашки Петри с покровным стеклом, культивировали до достижения субконфлуентного монослоя. Клетки споласкивали раствором Хенкса, фиксировали 4% параформальдегидом и окрашивали с антителами против маркера пролиферации Ki67 (ab15580, Abcam, США), виментина (ab8978, Abcam, США) и гладкомышечного актина альфа (α SMA) (ab5694, Abcam, США) в соответствии с рекомендациями производителя. В качестве вторых использовали антитела, конъюгированными с FITC (ab97050 или ab6785, Abcam, США), ядра клеток докрашивали DAPI (Sigma-Aldrich, США). Стекла заключали в монтирующую среду Aqua-Poly-Mount (Polysciences, США). Исследование проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DM 4000 В и программного обеспечения LAS AF v.3.1.0 build 8587 (Leica Microsystems, Германия).

2.7 Линия эндотелиальных клеток EA.hy926

В качестве эндотелиальных клеток использовали линию EA.hy926 (CRL2922; ATCC, США). Данная линия было получена путем гибридизацией

первичной эндотелиальной линии HUVEC (эндотелиальные клетки вены пупочного канатика человека) с клетками карциномы легкого A549. EA.hy926 экспрессируют основные маркеры эндотелиальных клеток, в том числе молекулы клеточной адгезии VE-кадгерин, PECAM-1 (CD31), ICAM-1 и VCAM-1, эндотелин-1, простациклин, антиген, связанный с фактором VIII, имеют тельца Вейбеля-Паладе (специфические везикулы сосудистых эндотелиальных клеток, содержащие фактор фон Виллебранда и P-селектин) [Edgell et al., 1983; Vrekoussis et al., 2006; Kanlaya et al., 2009]. Высокая специфичность, характерная для строения и функциональной активности сосудистого эндотелия человека, в сочетании с преимуществами иммортализованной линии (стабильность свойств при пассировании, высокий пролиферативный потенциал, простота культивирования) послужили обоснованием широкого применения данной линии в научных исследованиях [Bouïs et al., 2001; Aranda, Owen, 2009].

В качестве ростовой среды использовали DMEM/F12 с добавлением ЭТС до 10%. Экспрессию эндотелиального маркера CD31 подтверждали с помощью окрашивания с антителами к CD31 (ab24590, Abcam, США).

2.8 Приготовление кондиционированных сред

После достижения конфлуентного монослоя культуры МСК ПК человека или EA.hy926 отмывали бессывороточной средой DMEM/F12 и добавляли свежую ростовую среду. Через 24, 48 или 72 ч среду собирали, центрифугировали при 2800g, собирали супернатант и пропускали через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм (GE Osmonics Labstore, США). Среду до измерения концентрации VEGF-A хранили при -70°C. Для экспериментов использовали среду, кондиционированную клетками в течение 72 ч.

2.9 Измерение концентрации VEGF-A в средах, кондиционированных МСК ПК и EA.hy926

Суммарное содержание секретируемых форм VEGF-A (-121 и -165) в средах, кондиционированных МСК ПК человека (n=3) или EA.hy926, определяли методом ИФА с помощью набора VEGF-ИФА-БЕСТ (Вектор-Бест, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Измерение оптической плотности ($\lambda=450$ нм) проводили с помощью спектрофотометра Multiskan GO (ThermoFisher Scientific, США). Анализ данных проводили с помощью онлайн-приложения <http://elisaanalysis.com/app>.

2.10 Оценка влияния среды, кондиционированной МСК ПК, на пролиферацию эндотелиальных клеток

EA.hy926 рассаживали в 96-луночный планшет из расчета 3×10^3 клеток в 200 мкл среды на лунку. Через 1, 2 или 3 суток ростовую среду заменяли на кондиционированную МСК ПК среду (n=3), кондиционированную МСК ПК среду с добавлением 200 нг/мл антител против VEGF (ab9570, Abcam, США) (n=3) или свежую ростовую среду (контрольные лунки). На 4 день пролиферацию эндотелиальных клеток оценивали с помощью МТТ-теста. Для этого МТТ (Sigma-Aldrich, США) добавляли в лунки до конечной концентрации 1,5 мг/мл и инкубировали в течение 2 часов при 37°C. Появление кристаллов формазана визуализировали с помощью инвертированного микроскопа (Zeiss, Германия). После удаления среды в лунки вносили 100 мкл диметилсульфоксида (Sigma-Aldrich, США), инкубировали 15 минут (режим «встряхивание») и измеряли оптическую плотность ($\lambda=570$ нм) с помощью спектрофотометра Multiskan GO (ThermoFisher Scientific, США).

2.11 Направленная миграция эндотелиальных клеток в градиенте факторов, секретируемых МСК ПК

Исследование клеточной миграции проводили с помощью transwell-системы (Рисунок 1).

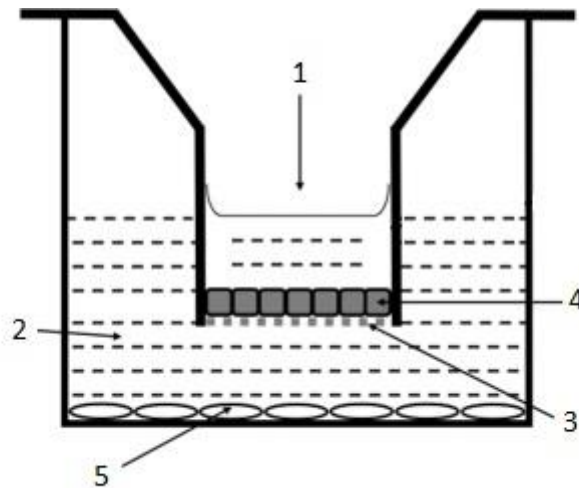


Рисунок 1 – Схема Transwell системы: 1 – верхняя камера, 2 – нижняя камера, 3 – мембрана с порами 8 мкм, 4 – эндотелиальные клетки линии EA.hy926, 5 – МСК ПК человека.

На дно лунки 24-луночного планшета переносили 10^5 МСК ПК человека ($n=3$) в 600 мкл среды. К половине лунок с клетками добавляли антитела против VEGF до конечной концентрации 200 нг/мл. В контрольные лунки вносили 600 мкл среды без клеток. Через 24 часа, после прикрепления клеток, в планшет помещали специальные вставки с мембраной (диаметр пор 8 мкм) (SPL Lifesciences, Южная Корея). В верхнюю камеру вносили 10^5 клеток линии EA.hy926 в 250 мкл среды. Через 1, 2 или 3 суток вставки вынимали, клетки с верхней поверхности мембраны удаляли, мигрировавшие на нижнюю поверхность мембраны эндотелиальные клетки фиксировали 4% параформальдегидом (Serva, Германия) и окрашивали DAPI (Sigma-Aldrich, США). С помощью флуоресцентного микроскопа Leica DM 4000 B и программного обеспечения LAS AF v.3.1.0 build 8587 (Leica Microsystems,

Германия) подсчитывали количество мигрировавших клеток в 8 полях зрения при увеличении $\times 100$ для каждой мембраны.

2.12 Оценка влияния кондиционированной МСК ПК среды на подвижность эндотелиальных клеток на модели «рана монослоя»

EA.hy926 переносили в 96-луночный планшет из расчета 3×10^4 клеток в 100 мкл среды на лунку. После прикрепления клеток оценивали степень конfluence и проводили замену среды. Моделирование раны монослоя проводили с помощью инструмента WoundMaker™ tool (Essen BioScience, США), разработанного для нанесения 96 стандартизованных царапин. После отмывания открепившихся клеток в лунки вносили 100 мкл кондиционированной МСК ПК среды (n=4), кондиционированной МСК ПК среды с добавлением 200 нг/мл антител против VEGF (n=4) или свежей ростовой среды (контрольные лунки). Наблюдение за миграцией эндотелиальных клеток осуществляли в течение 36 часов с помощью Time-Lapse микроскопа IncuCyte Zoom (Essen BioScience, США). Конfluence области раны оценивали с помощью автоматизированной системы сбора и обработки изображений (Essen BioScience, США).

2.13 Эндотелиальная дифференцировка МСК ПК на стандартной подложке

МСК ПК человека культивировали до достижения полного монослоя, после чего вносили дифференцировочную среду. Использовали 3 варианта дифференцировочных сред. Среда 1 состояла из ростовой среды и среды, кондиционированной клетками линии EA.hy926, в соотношении 1:1, в среду 2 дополнительно добавляли VEGF-A-165 (BioLegend, США) до 50 нг/мл, среда 3

содержала только ростовую среду и 50 нг/мл VEGF-A-165. Содержание эмбриональной телячьей сыворотки в контрольной и дифференцировочных средах было снижено до 5%, чтобы предотвратить избыточный рост клеток в течение длительного срока индукции (3 недели). Замену среды проводили 2 раза в неделю. Через 3 недели клетки фиксировали 4% параформальдегидом (Serva, Германия) и окрашивали с антителами к маркеру эндотелиоцитов CD31 (ab24590, Abcam, США) с использованием системы визуализации HRP/DAB (ABC) Detection IHC Kit (ab64259, Abcam, США).

2.14 Оценка влияния кондиционированной МСК ПК среды на эндотелиальные клетки при моделировании ангиогенеза в матриксе базальной мембраны *in vitro*

В качестве матрикса базальной мембраны использовали BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix Phenol Red Free (BD, США). Оттаявший матрикс добавляли в 48-луночный культуральный планшет из расчета 150 мкл геля на лунку и оставляли полимеризоваться при 37°C в течение 30 минут. Клетки линии EA.hy926 (35 тыс.) ресуспендировали в 500 мкл свежей ростовой среды, 500 мкл кондиционированной МСК ПК среды или 500 мкл кондиционированной МСК ПК среды с добавлением 200 нг/мл антител против VEGF и наносили на полимеризованный матрикс. Наблюдение за клетками осуществляли с помощью инвертированного микроскопа Axiovert 40 CFL (Zeiss, Германия). С помощью программного обеспечения AxioVs40 4.8.2.0 подсчитывали количество точек ветвления и среднюю длину ветвей формируемой сети в поле зрения (увеличение $\times 50$). Для каждой лунки обсчитывали не менее 6 полей.

2.15 Оценка взаимодействия МСК ПК и эндотелиальных клеток при моделировании ангиогенеза в матриксе базальной мембраны *in vitro*

Подготовку матрикса осуществляли описанным выше способом. Непосредственно перед экспериментом МСК ПК человека метили мембранным трейсером RKN26 (эмиссия в оранжевой области), а EA.hy926 – трейсером RKN67 (эмиссия в зеленой области) в соответствии с рекомендациями производителя (Sigma-Aldrich, США). Для моделирования ангиогенеза суспензию клеток (МСК ПК человека, EA.hy926 или смесь двух типов клеток в соотношении 1:1) наносили на полимеризованный матрикс из расчета 35 тыс. клеток в 500 мкл среды на лунку 48-луночного планшета. Наблюдение за клетками осуществляли с помощью инвертированного микроскопа Axiovert 40 CFL (Zeiss, Германия) и Time-Lapse микроскопа IncuCyte Zoom (Essen BioScience, США). С помощью программного обеспечения AxioVs40 4.8.2.0 подсчитывали количество точек ветвления и среднюю длину ветвей формируемой сети в поле зрения (увеличение $\times 50$). Для каждой лунки обсчитывали не менее 6 полей.

2.16 Эндотелиальная дифференцировка МСК ПК в матриксе базальной мембраны

Окрашивание формируемых в матриксе базальной мембраны структур оказалось невозможным из-за неспецифического связывания антител с самим матриксом, поэтому исследование проводили на криосрезах. Для этого материал переносили в среду для заключения Tissue-Tek® OCT Compound (Sakura Finetek, США) и замораживали при -70°C . Криосрезы толщиной 5-7 мкм окрашивали с антителами к маркеру эндотелиоцитов CD31 (ab24590, Abcam, США).

2.17 Экспериментальные животные

Экспериментальное исследование проводили на половозрелых самцах аутбредных крыс Sprague-Dawley (НПП «Питомник лабораторных животных ФИБХ РАН», Россия).

Животных осматривали для оценки состояния здоровья в течение всего срока исследования. Животным обеспечивали свободный доступ к корму и чистой воде, меняли подстилку по мере загрязнения, обеспечивая тем самым отсутствие контаминации, способной повлиять на результаты исследования.

Эксперимент соответствовал рекомендациям локального биоэтического комитета (Протокол № 8б заседания биоэтической комиссии ФГБУ «ННИИМЧ» РАМН от 10.11.2012), при его постановке руководствовались «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» в соответствии с приказами МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 и № 701 от 24.07.1978 и «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации» от 2003 г.

2.18 Моделирование ишемии задних конечностей у крыс

Моделирование ишемии задних конечностей проводили на половозрелых самцах аутбредных крыс Sprague-Dawley массой 180-200 г. Крыс наркотизировали золетилом (20 мг/кг) и рометаром (5 мг/кг). Операционный доступ осуществляли на правой задней конечности (Рисунок 2). На бедренный сосудисто-нервный пучок накладывали лигатуры: первую – в области паховой связки, вторую – на 0,5 см дистальнее. Проводили иссечение бедренной артерии, операционную рану ушивали.

Для выделения подколенной артерии операционный доступ обеспечивали на задней поверхности конечности на уровне коленного сустава. Мышцы голени

расширяли тупым способом, устанавливали ранорасширитель. Выделяли подколенную артерию и седалищный нерв. Подколенную артерию иссекали между двумя лигатурами. Рану ушивали и обрабатывали антисептиком. Послеоперационное обезболивание проводили однократно путем внутримышечного введения Баралгина М (Aventis Pharma, Индия) из расчета 10 мг на 1 кг массы животного.

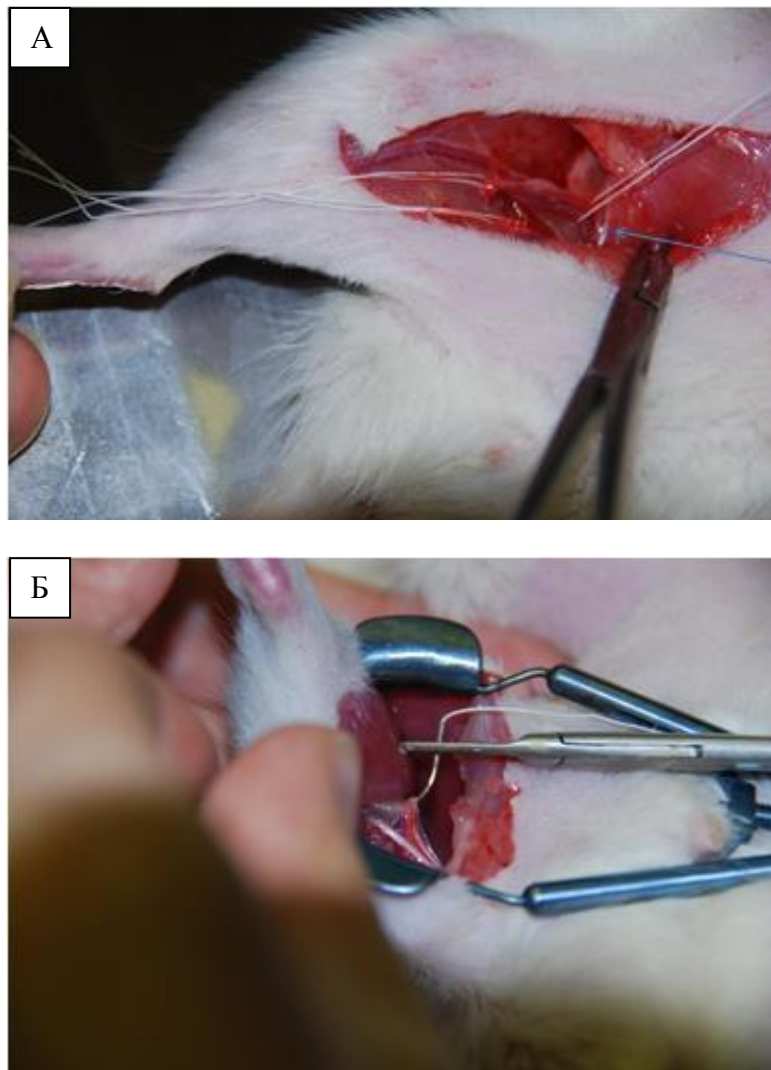


Рисунок 2 – Моделирование ишемии на задней правой конечности крысы. (а) – Лигирование и иссечение бедренной артерии. (б) – Лигирование и иссечение подколенной артерии.

2.19 Подготовка клеточного трансплантата

МСК ПК крысы (на 2-4 пассажах) открепляли от подложки раствором трипсина-Версена, дважды отмывали от диссоциирующего раствора 0,9% раствором NaCl с помощью центрифугирования. Клеточный осадок ресуспендировали в 0,9% растворе NaCl до конечной концентрации 5 млн клеток в 1 мл и переносили в инсулиновые шприцы (игла 26G).

Для части экспериментальных животных клетки после отмывания метили витальным мембранным трейсером PKH26 (Sigma-Aldrich, США) в соответствии с инструкцией производителя. Эффективность внедрения маркера подтверждали с помощью флуоресцентной микроскопии. В качестве контроля сохранности метки часть PKH26+МСК культивировали в течение 30 суток (максимальный срок эксперимента *in vivo*).

2.20 Трансплантация МСК ПК

Экспериментальные животные были разделены на 2 группы – экспериментальную и группу сравнения (таблица 5).

Таблица 5. Схема эксперимента.

Группы	Трансплантат	Фиксация материала	Всего животных	Распределение животных по срокам		
				3 сут	10 сут	30 сут
Экспериментальная группа	5 млн МСК ПК в 1 мл 0,9% NaCl	формалин	15	5	5	5
	5 млн МСК ПК+PKH26 в 1 мл 0,9% NaCl	крио	9	3	3	3
Группа сравнения	1 мл 0,9% NaCl	формалин	15	5	5	5
		крио	9	3	3	3

Через 7 дней после моделирования ишемии клеточную суспензию (5 млн МСК ПК крысы в 1 мл 0,9% раствора NaCl) вводили внутримышечно путем пятикратного обкалывания мышц голени с помощью инсулинового шприца (диаметр иглы 26G). Животным группы сравнения вводили 1 мл 0,9% раствора NaCl.

2.21 Тест толерантности к физическим нагрузкам «рота-род»

За 1 сутки до выведения животных из эксперимента, т.е. на 2, 9 или 29 сутки после трансплантации, проводили функциональный тест толерантности к физическим нагрузкам «рота-род», определяя суммарное время ходьбы крысы по вращающемуся валу при фиксированной не критической скорости.

2.22 Выведение животных из эксперимента

Животных выводили из эксперимента с помощью CO₂-камеры на 3, 10 или 30 сутки после трансплантации. Выделяли комплекс мышц голени: краниальную большеберцовую мышцу (*m. tibialis cranialis*), каудальную большеберцовую мышцу (*m. tibialis caudalis*), трехглавую мышцу голени (*m. triceps surae*), состоящую из икроножной мышцы (*m. gastrocnemius*) и камбаловидной мышцы (*m. soleus*), подошвенную мышцу (*m. plantaris*), длинную малоберцовую мышцу (*m. peroneus longus*), короткую малоберцовую мышцу (*m. peroneus brevis*).

2.23 Морфометрическое исследование

Материал, изъятый у животных без введения меченых клеток (по 15 животных из экспериментальной группы и группы сравнения), фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина на фосфатном буфере по Лилли в течение 72 часов, после чего в течение 24 часов образцы ткани промывали в проточной воде. После стандартной гистологической проводки образцы тканей заключали в парафин. Для изучения морфологических изменений, происходящих в ишемизированной мышце, на ротационном микротоме Accu-Cut SRM (Sakura, Япония) делали поперечные серийные срезы толщиной 5 мкм на 3 уровнях. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином, обезвоживали и заключали в синтетическую монтирующую среду (все БиоВитрум, Россия).

Морфометрическое исследование проводили с помощью микроскопа Leica DM 2500 (увеличение $\times 200$) и программного обеспечения ImageScope M (Leica Biosystems, Германия).

Морфометрическое исследование ишемического повреждения было проведено на микрофотографиях препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином. Методом точечного счета с помощью решетки с 25 узлами [Автандилов, 1990] определяли объемную плотность поврежденной ткани (некротизированных и атрофированных мышечных волокон). На каждую группу было просчитано 3750 точек (25 точек в поле зрения, по 10 выбранных случайным образом полей зрения со срезов, сделанных на 3 уровнях, для каждого из 5 животных).

Морфометрическое исследование ангиогенеза в очаге ишемического повреждения было проведено на микрофотографиях препаратов (увеличение $\times 400$), окрашенных на маркер эндотелиоцитов CD31 (ab 24590, Abcam, США). В качестве системы визуализации был использован набор mouse specific HRP/DAB kit (ab64259, Abcam, США) в соответствии с инструкцией производителя. В программе Adobe Photoshop CS6 были измерены количество и объемная

плотность сосудов микроциркуляторного русла (площадь сосудов относительно площади поля зрения, занимаемой поврежденной тканью). На каждое животное было обчислено по 30 выбранных случайным образом полей зрения на 3 уровнях, всего 450 полей в каждой группе.

2.24 Иммуногистохимическое исследование

Материал, изъятый у животных с введением меченых клеток (по 9 животных из экспериментальной группы и группы сравнения), фиксировали в жидком азоте, после чего готовили криосрезы на 4 уровнях толщиной 5-6 мкм. Ядра клеток докрашивали DAPI (Sigma-Aldrich, США). Исследование проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DM 4000 B и программного обеспечения LAS AF v.3.1.0 build 8587 (Leica Microsystems, Германия).

Криосрезы окрашивали с антителами к маркеру макрофагов CD68 (ab125212, Abcam, США), маркеру M2 активированных макрофагов CD206 (sc-34577, Santa Cruz Biotechnology, США), VEGF (ab 9570, Abcam, США), маркеру эндотелиоцитов CD31 (ab 24590, Abcam, США), гладкомышечному актину α SMA (ab5694, Abcam, США) в соответствии с рекомендациями производителя, затем антителами, конъюгированными с FITC (ab97050 или ab6785, Abcam, США), ядра клеток докрашивали DAPI (Sigma-Aldrich, США).

CD68+ и CD206+клетки в очаге повреждения подсчитывали как минимум в 100 полях зрения (по 25 полей на 4 уровнях) для каждого животного (увеличение $\times 400$) и определяли их отношение к общему количеству клеток.

Для визуализации метки PKH26 использовали систему фильтров «S-Orange» (возбуждающий фильтр – 546/12 нм, пропускающий – 585/40 нм).

Для выявления PKH26+CD68+клеток в красном и синем каналах отмечали ядра клеток с красным PKH26 в цитоплазме, затем в синем и зеленом каналах маркировали другим цветом ядра CD68+клеток среди отмеченных ранее клеток.

РКН26+CD68+клетки подсчитывали как минимум в 100 полях зрения (по 25 полей на 4 уровнях) для каждого животного (увеличение $\times 400$) и определяли их отношение к общему количеству клеток, несущих метку РКН26.

2.25 Колокализационный анализ

Колокализационный анализ проводили на криосрезах, окрашенных с антителами к CD68 (ab125212, Abcam, США), с помощью конфокального лазерного микроскопа Carl Zeiss LSM700 и программного обеспечения ZEN (Zeiss, Германия). Определяли коэффициент наложения Мандерса (MOC – the Mander's overlap coefficient). Обсчитывали по 10 полей на каждое животное.

2.26 Статистический анализ

Данные представлены в виде средних значений и стандартных отклонений (стандартных ошибок среднего) или медиан и перцентилей. При морфометрическом исследовании очага повреждения средние и стандартные отклонения определяли по формулам для долей, границы 95%-ных доверительных интервалов для долей рассчитывали с помощью ф-критерия. После проверки нормальности распределения данных сравнение выборочных долей проводили с помощью z-теста, времени выполнения тестов при нормальном распределении – с помощью t-теста для парных сравнений и теста Хольма-Сидака для множественных сравнений и при распределении, отличного от нормального – с помощью теста Манна-Уитни для парных сравнений и теста Данна для множественных сравнений. Для множественных сравнений в случае нормального распределения данных использовали однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA), при отличном от нормального распределении данных использовали ранговый дисперсионный анализ (ANOVA on ranks). Различия считали достоверными при 5% уровне значимости. Данные были проанализированы с помощью программы Sigma Stat 3.5 (Systat Software, США).

3 РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Получение и характеристика культур мультипотентных стромальных клеток пупочного канатика

3.1.1 *Строение пупочного канатика человека*

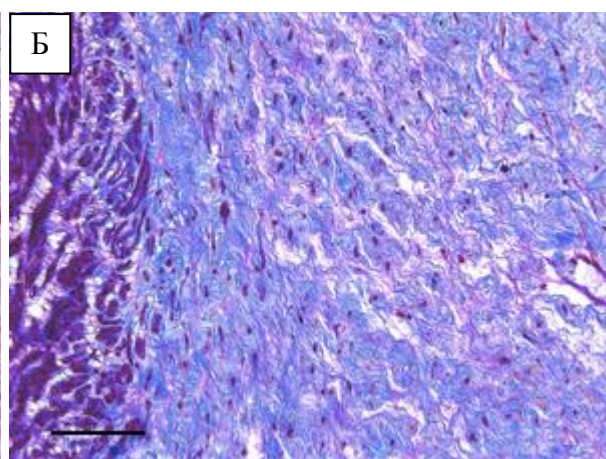
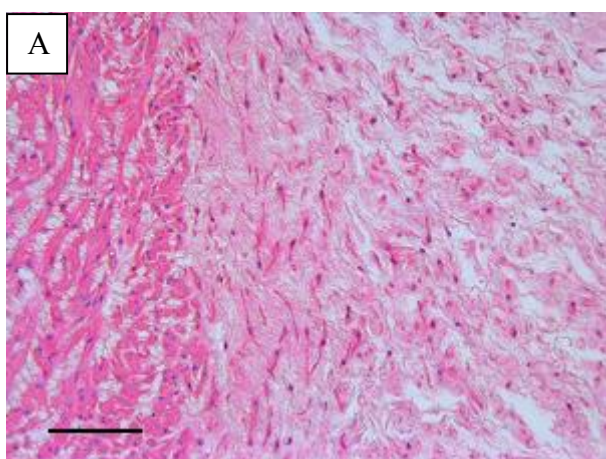
Длина пупочного канатика человека варьировала в пределах 35-60 см, толщина составляла около 1-1,5 см.

На гистологических препаратах хорошо видны 2 пупочные артерии (выпячивания мышечной стенки оболочек смыкаются в момент рождения ребенка, чтобы предотвратить кровотечение) и 1 пупочная вена, наполненная кровью. Сосуды окружены вартоновым студнем, в котором при окрашивании по Маллори выявляется значительное количество межклеточного вещества с рыхло расположенными коллагеновыми волокнами. Пупочный канатик покрыт однослойным призматическим эпителием (Рисунки 3 и 4).

Обзорные методы окрашивания и окрашивание клеточных ядер DAPI позволили выявить особенности распределения клеток в пуповине. Наиболее плотно клетки расположены в стенках кровеносных сосудов, чуть меньше – в периваскулярной области. В вартоновом студне клетки расположены редко, особенно в краевой зоне (Рисунки 4 и 5).



Рисунок 3 – Строение пупочного канатика человека. Панорамное изображение, масштабный отрезок 1 мм. Окрашивание гематоксилином и эозином.



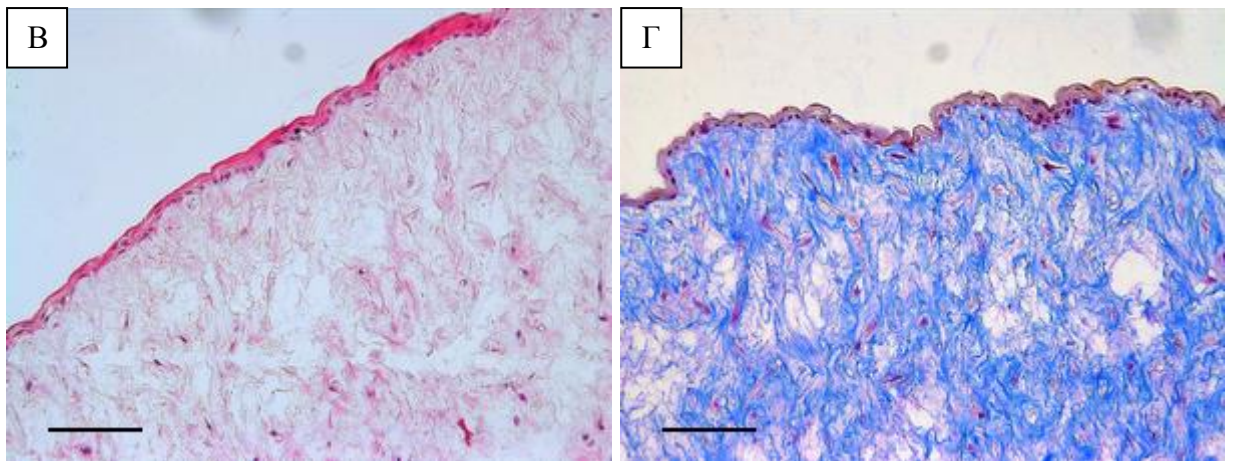


Рисунок 4 – Периваскулярная область (а, б) и краевая зона (в, г) пупочного канатика человека. Окрашивание гематоксилином и эозином (а, в), по Маллори (б, г). Светлопольная микроскопия, масштабный отрезок 100 мкм.

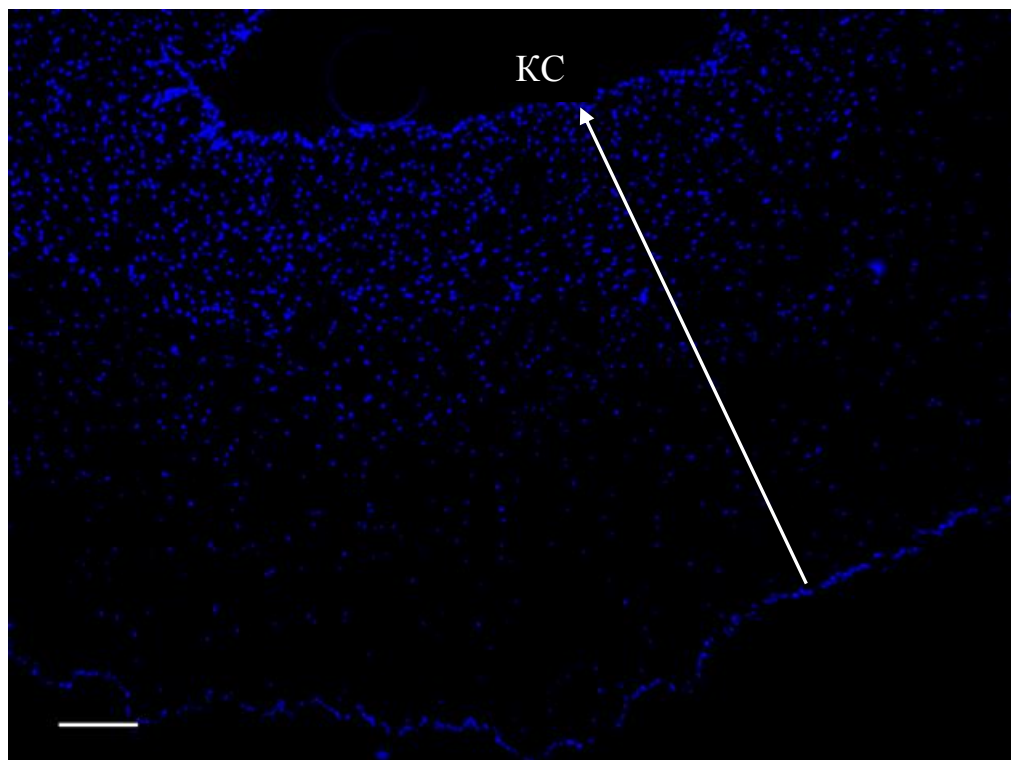


Рисунок 5 – Градиент распределения клеток в пупочном канатике человека. Ядра клеток окрашены DAPI (синий). Количество клеток на единицу площади возрастает в направлении от внешнего края пуповины к просвету кровеносного сосуда (КС). Флуоресцентная микроскопия, масштабный отрезок 200 мкм.

Иммуногистохимическое исследование выявило, что CD146+ клетки локализованы в стенках кровеносных сосудов, но не в вартоновом студне (Рисунок 6).

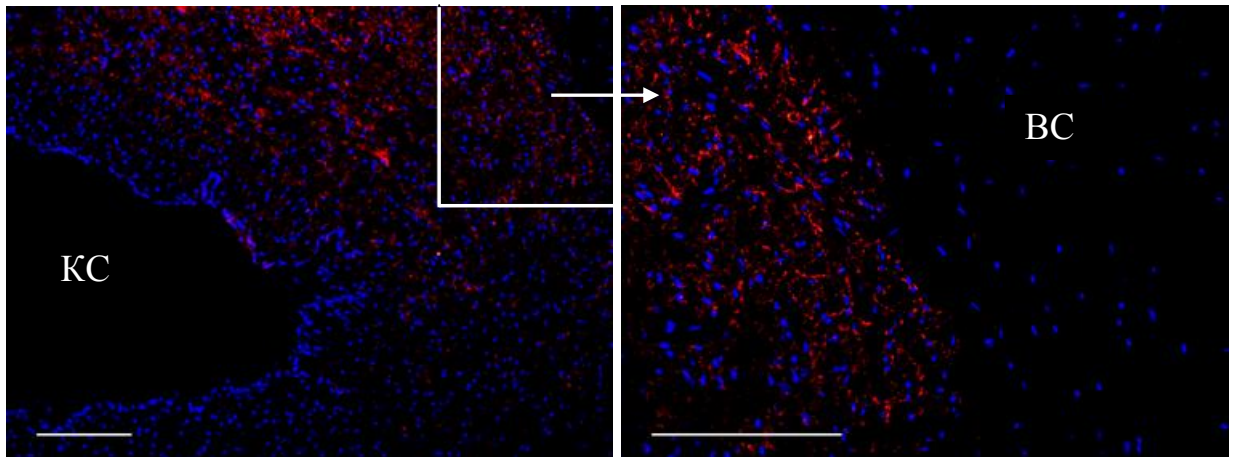


Рисунок 6 – Локализация CD146+ клеток (красный) в пупочном канатике человека. Ядра клеток докрашены DAPI (синий). КС – просвет кровеносного сосуда, ВС – вартонов студень. Флуоресцентная микроскопия, масштабный отрезок 200 мкм.

Окрашивание с антителами к CD31 показало, что в вартоновом студне отсутствуют капилляры, а CD31 экспрессируется только эндотелиальными клетками пупочных артерий и вены (Рисунок 7).

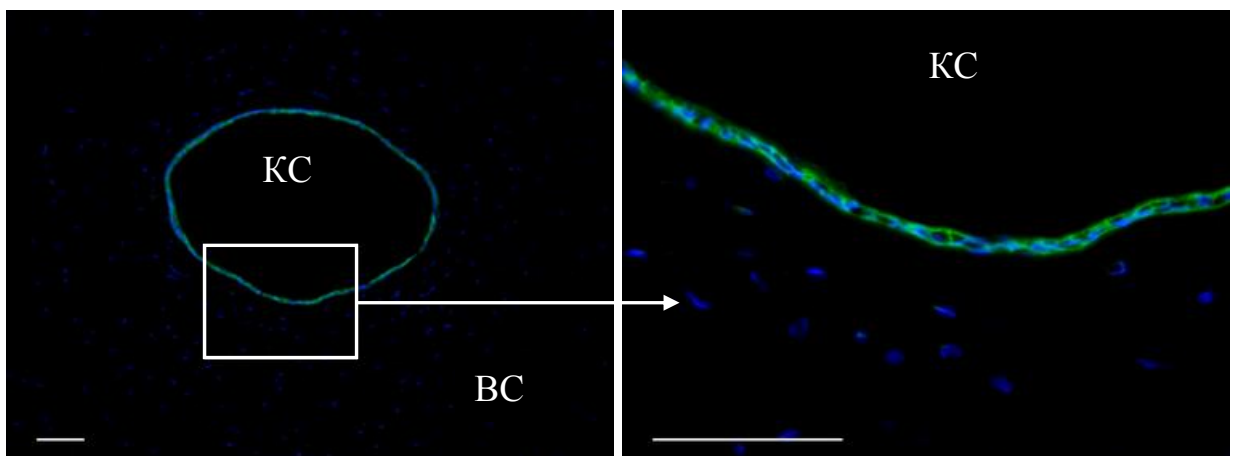


Рисунок 7 – Локализация CD31+ клеток (зеленый) в пупочном канатике человека. Ядра клеток докрашены DAPI (синий). КС – просвет кровеносного сосуда, ВС – вартонов студень. Флуоресцентная микроскопия, масштабный отрезок 100 мкм.

3.1.2 Строение пупочного канатика крысы

Пуповина крысы значительно меньше по размеру, чем у человека – всего 2-3 мм в диаметре, до 4-5 см в длину. На поперечном срезе пуповина имеет неправильную форму. Ближе к краю пуповины расположены кровеносные сосуды, их число варьирует от 3 до 7. На гистологических препаратах нет четкого отграничения стенок кровеносных сосудов, периваскулярной области и вартонова студня (Рисунки 8 и 9).

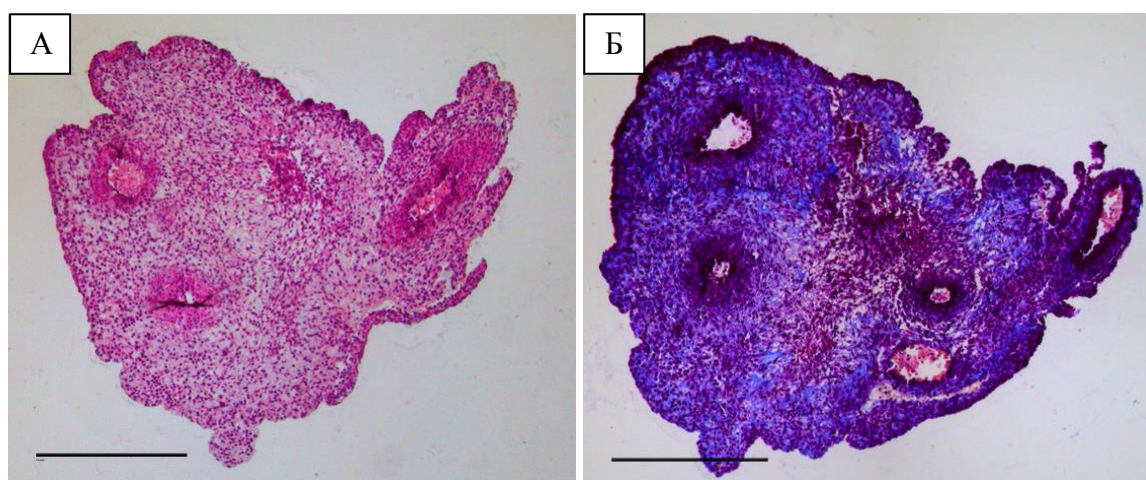


Рисунок 8 – Строение пупочного канатика крысы. Панорамное изображение, масштабный отрезок 500 мкм. Окрашивание гематоксилином и эозином (а), по Маллори (б).

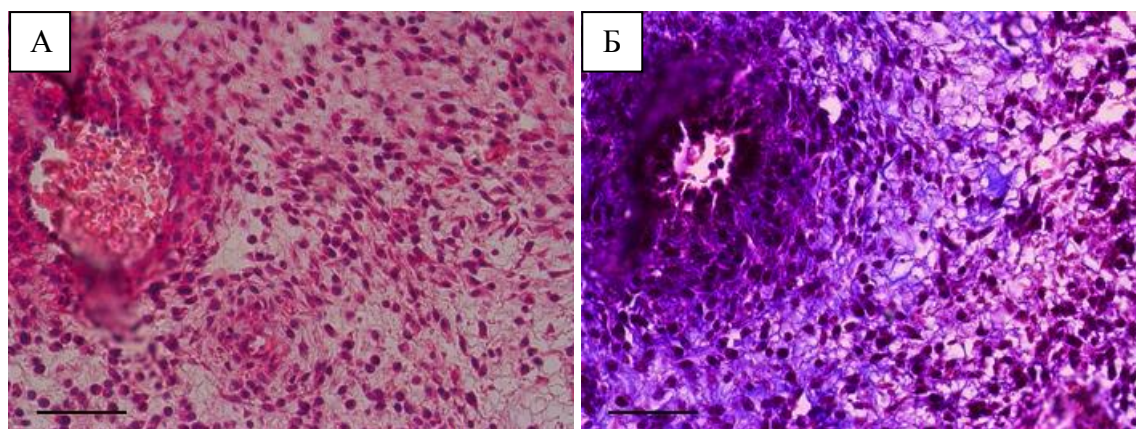


Рисунок 9 – Кровеносные сосуды и строма пупочного канатика крысы. Окрашивание гематоксилином и эозином (а), по Маллори (б). Светлопольная микроскопия, масштабный отрезок 50 мкм.

3.1.3 Выделение первичной культуры из пупочного канатика человека

С помощью ферментативного метода из 10 образцов пупочного канатика человека были успешно выделены 10 первичных клеточных культур. Прикрепившиеся к культуральной подложке клетки при малой конфлуентности монослоя имели характерную для движущихся клеток вытянутую форму с ведущим краем. Клетки активно пролиферировали, по мере увеличения конфлуентности принимали веретеновидную форму и формировали рисунок в виде волн (Рисунок 10).

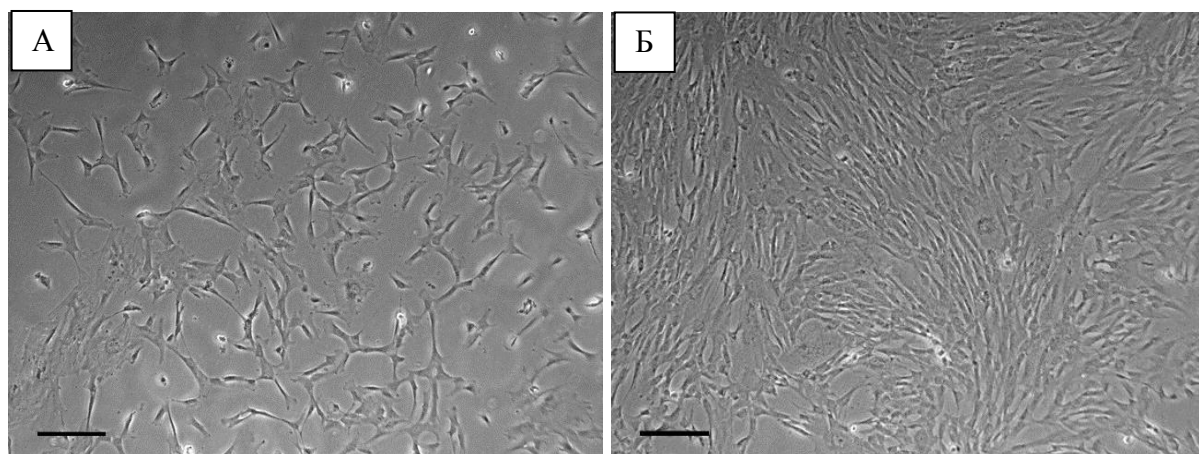


Рисунок 10 – Первичная культура клеток, выделенных ферментативным способом из вартонова студня пупочного канатика человека, через 5 суток (а) и 10 суток (б) после выделения. Фазово-контрастная микроскопия, масштабный отрезок 200 мкм.

Клетки на стадии субконфлуентного монослоя легко откреплялись стандартными диссоциирующими растворами от подложки. После переноса в новую культуральную посуду клетки прикреплялись к подложке уже в течение первого часа. Клетки сохраняли свою морфологию на протяжении минимум 4 пассажей (Рисунок 11).

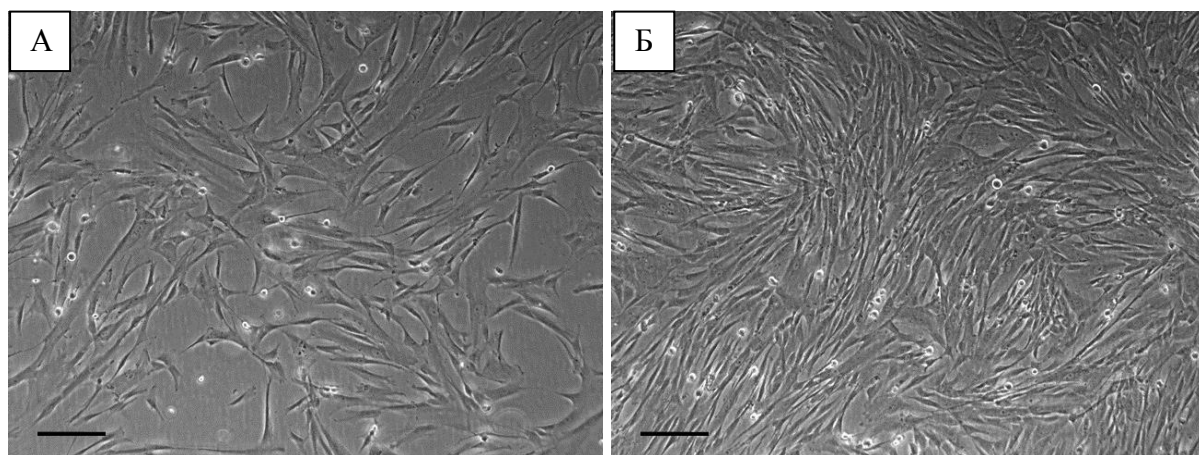


Рисунок 11 – Культура МСК ПК человека на 2 пассаже (а) и на 4 пассаже (б). Фазово-контрастная микроскопия, масштабный отрезок 200 мкм.

3.1.4 Выделение первичной культуры из пупочного канатика крысы

Активную миграцию клеток из фрагментов интерваскулярной стромы пупочного канатика крысы наблюдали уже на следующие сутки после прикрепления эксплантов к пластику. Клетки имели форму, характерную для поляризованного фибробласта с ярко выраженным активным (движущимся) краем. Открепление эксплантов от подложки происходило на 5-7 сутки культивирования (Рисунок 12).

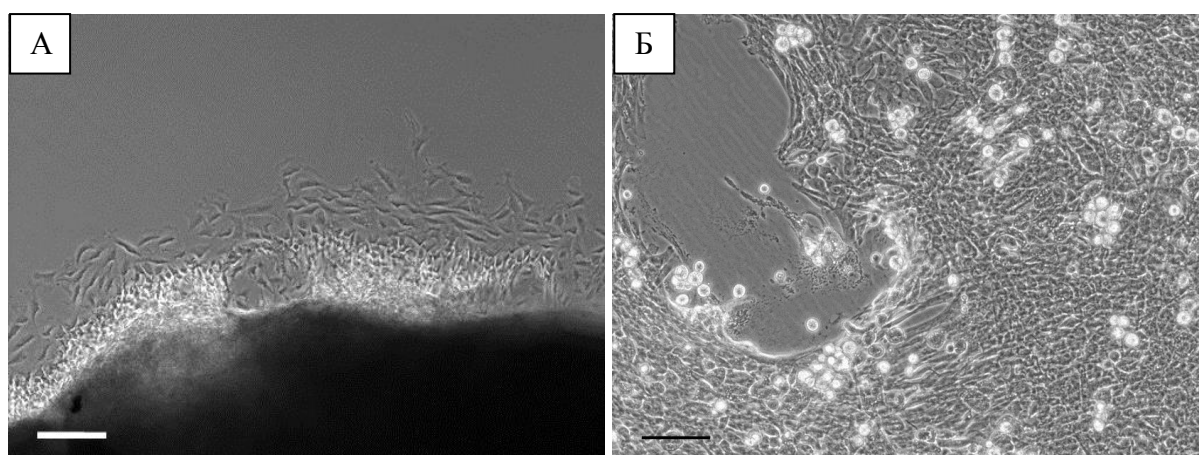


Рисунок 12 – Выделение клеточной культуры из пупочного канатика крысы методом эксплантов. (а) – Миграция клеток из экспланта на 3 сутки после

начала культивирования. (б) – Место открепления экспланта от культуральной подложки. Фазово-контрастная микроскопия, масштабный отрезок 200 мкм.

Клетки первичной культуры имели однотипную морфологию: небольшой размер (до 80 мкм), фибробластоподобная форма, центрально расположенное округлое ядро с четко визуализируемыми ядрышками, слабовыраженная зернистость цитоплазмы. Экспансия первичной культуры происходила не только за счет миграции клеток из эксплантов, но и за счет митотического деления прикрепившихся клеток, которое наблюдали уже на 3-4 сутки культивирования. В пассированной культуре сохранялась высокая митотическая активность (Рисунок 13).

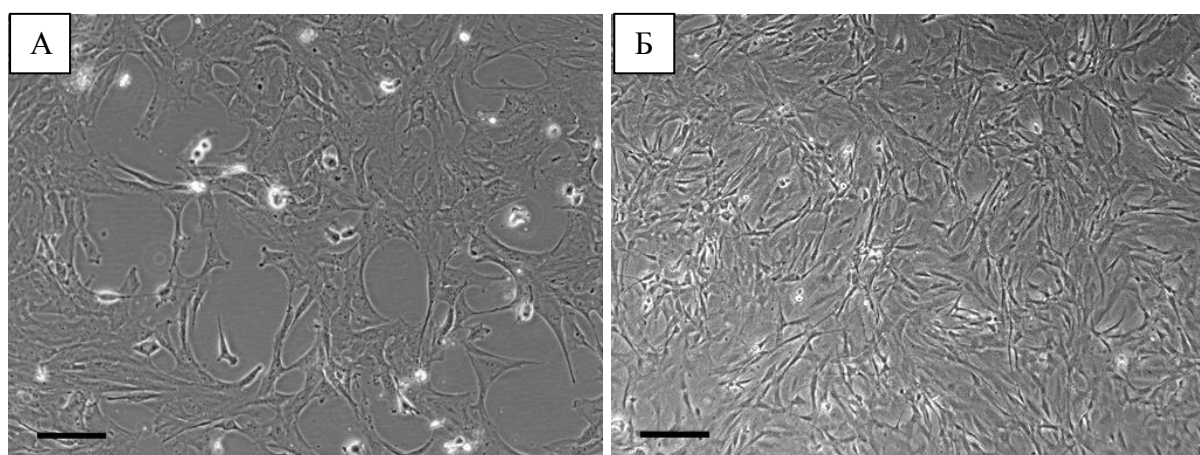
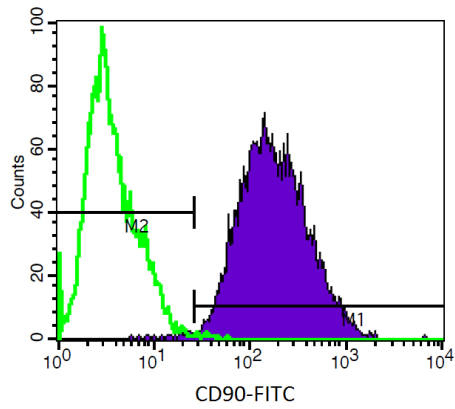


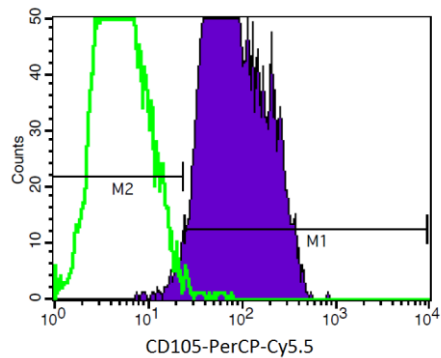
Рисунок 13 – Внешний вид культуры МСК ПК крысы на 1 пассаже (а) и на 4 пассаже (б). Фазово-контрастная микроскопия, масштабный отрезок 200 мкм.

3.1.5 Анализ иммунофенотипа МСК ПК

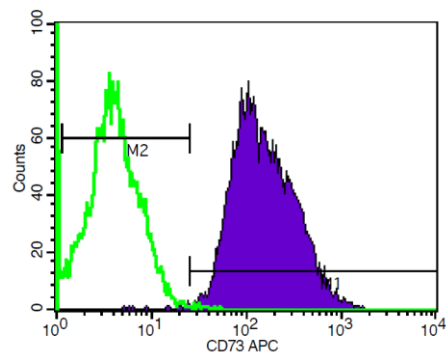
Анализ иммунофенотипа подтвердил специфический профиль экспрессии поверхностных антигенов, характерных для мультипотентных стромальных клеток. Для всех исследованных культур доля клеток, экспрессирующих положительные маркеры CD73, CD90 и CD105, составляла не менее 98%; доля клеток, экспрессирующих отрицательные маркеры CD45, CD34, CD11b, CD19 и HLA-DR, не превышала 1% (Рисунки 14 и 15).



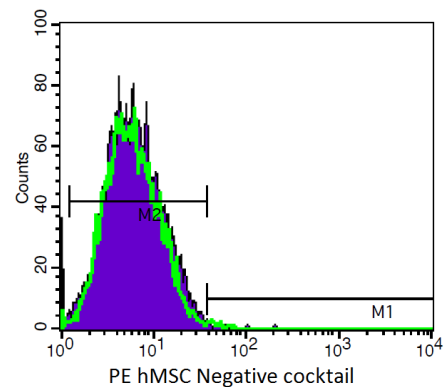
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo
All	1, 9910	11510	100.00	76.02	219.52	1
M1	26, 9910	11473	99.68	75.77	220.17	1
M2	1, 26	38	0.33	0.25	17.97	



Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo
All	1, 9910	11510	100.00	76.02	99.05	
M1	24, 9475	11283	98.03	74.52	100.64	
M2	1, 23	192	1.67	1.27	19.46	



Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo
All	1, 9910	11510	100.00	76.02	185.62	1
M1	25, 9910	11488	99.81	75.87	185.94	1
M2	1, 25	22	0.19	0.15	18.35	



Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo
All	1, 9910	11510	100.00	76.02	7.33	
M1	37, 9910	19	0.17	0.13	55.44	
M2	1, 37	11433	99.33	75.51	7.29	

Рисунок 14 – Анализ иммунофенотипа культуры МСК ПК человека. Желтым цветом выделена доля клеток, экспрессирующих данный маркер. В коктейль отрицательных маркеров входят PE CD45, PE CD34, PE CD11b, PE CD19 и PE HLA-DR.

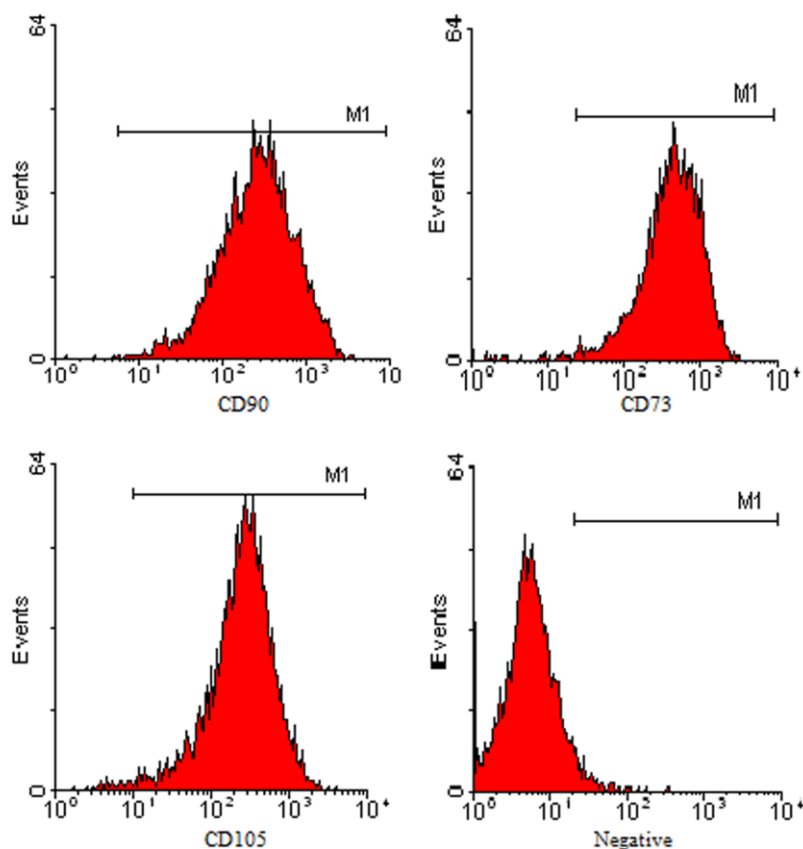


Рисунок 15 – Результаты анализа иммунофенотипа МСК ПК крысы. В качестве негативных представлены маркеры CD34, CD45, CD11b.

3.1.6 Направленная дифференцировка МСК ПК

МСК ПК не изменяли свой фенотип при культивировании в ростовой среде без воздействия индукторов.

В культуре МСК ПК липидные включения появлялись в отдельных клетках уже на 5-7 сутки адипогенной индукции. К 10-14 суткам доля таких клеток увеличивалась до 70-90% в зависимости от культуры, а сами включения становились более крупными, хотя слияния их не наблюдали. Окрашивание Суданом III подтвердило наличие в них нейтрального жира [Селиванов Е.В., 2003].

Через 7-10 суток после начала остеогенной индукции МСК ПК изменяли общий волновой рисунок монослоя. Через 21-28 суток индукции в культуре формировались скопления клеток в виде гребней, окрашивающихся на вершине в интенсивный красный цвет ализариновым красным S – красителем, образующим в слабокислой среде лаки при взаимодействии с отложениями кальция [Селиванов Е.В., 2003].

При хондрогенной индукции изменения морфологии МСК ПК также наблюдали через 7-10 дней: в монослое начинали формироваться скопления (узелки). К концу 3 недели индукции они увеличивались в размерах, принимали округлую форму. Окрашивание 1% раствором альцианового синего, pH=2,5, выявило мукополисахариды [Селиванов Е.В., 2003] во внеклеточном матриксе таких скоплений (Рисунки 16 и 17).

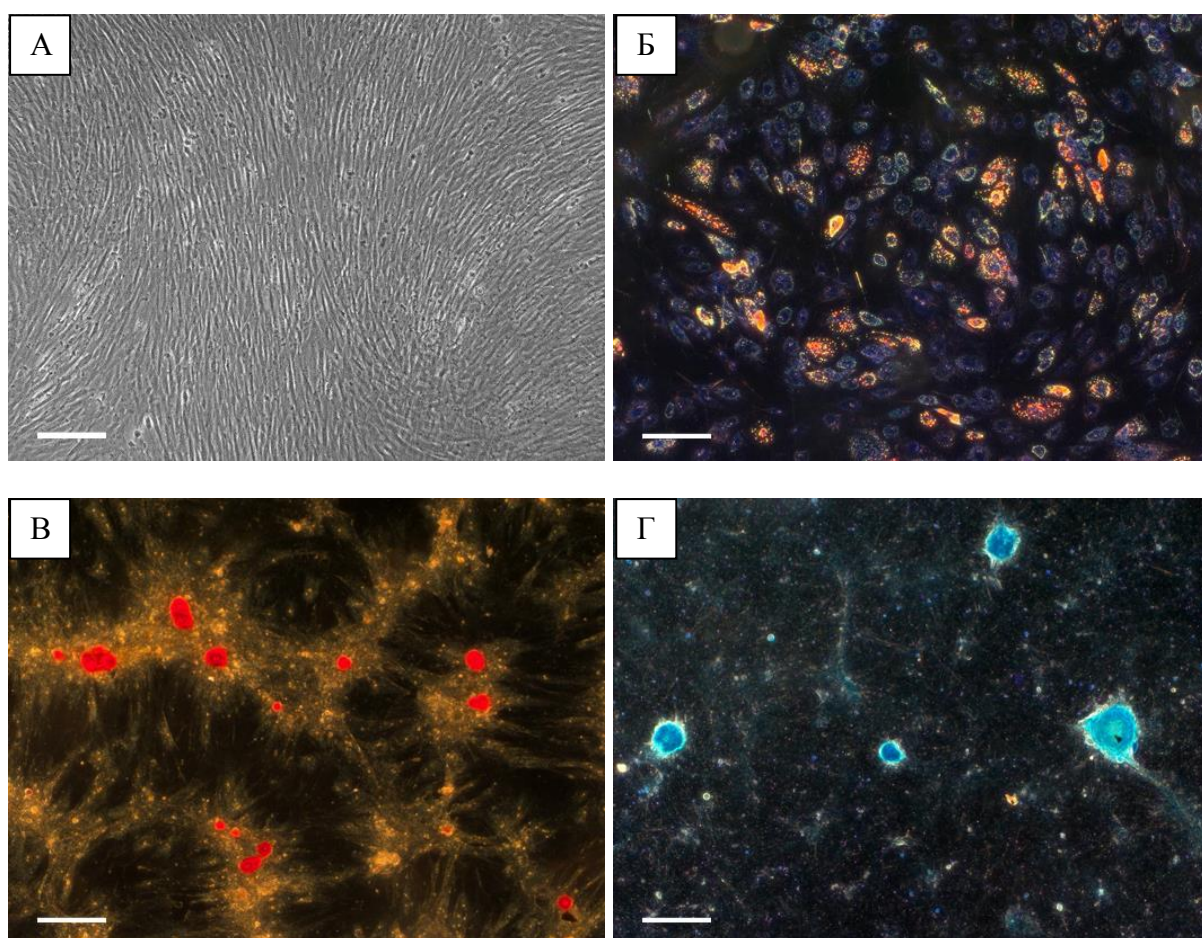


Рисунок 16 – Направленная дифференцировка МСК ПК человека. (а) – Контроль, культивирование МСК ПК в ростовой среде без добавления

индукторов в течение 4 недель. (б) – Адипогенная дифференцировка. Окрашивание Суданом III. (в) – Osteогенная дифференцировка. Окрашивание ализариновым красным. (г) – Хондрогенная дифференцировка. Окрашивание альциановым синим. Фазово-контрастная микроскопия (а), темнопольная микроскопия (б-г), масштабный отрезок 200 мкм.

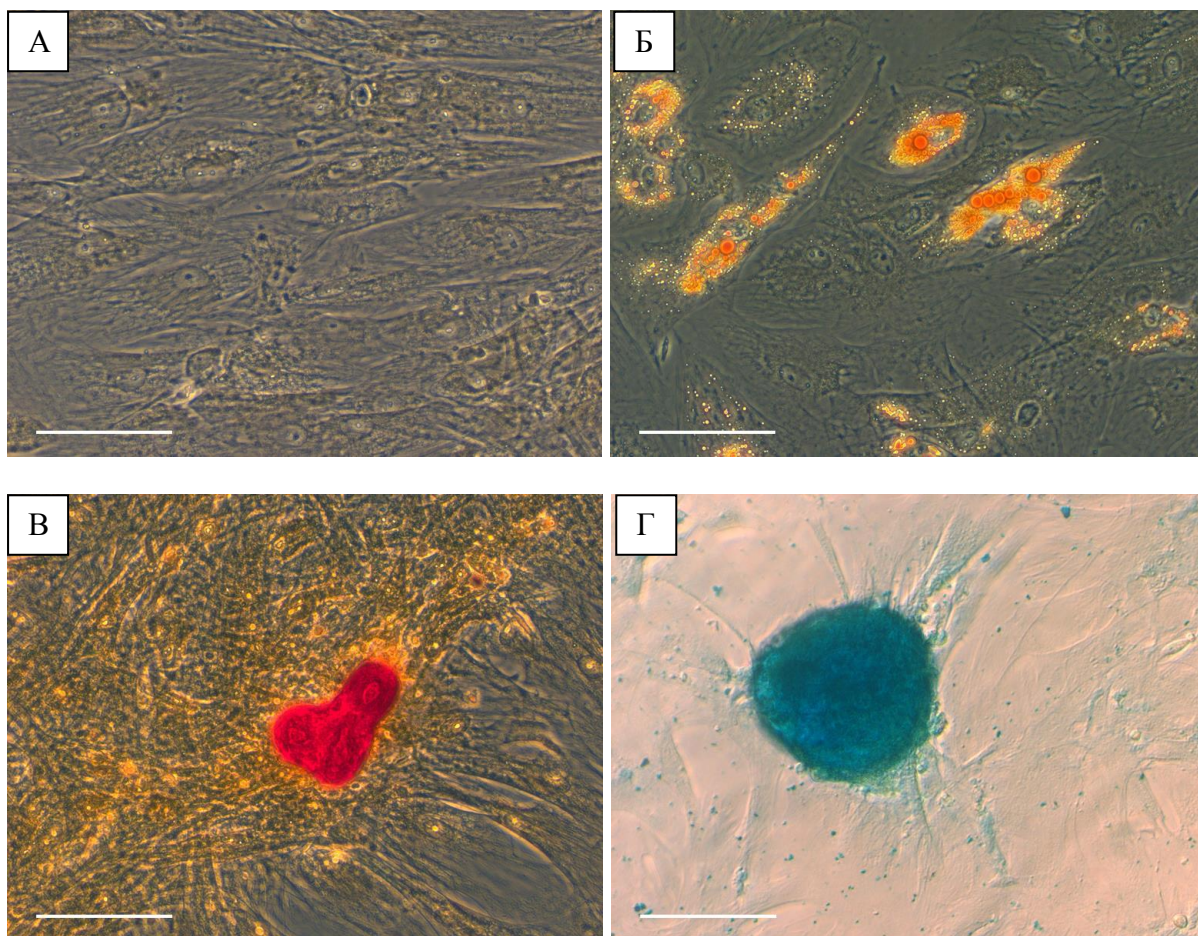


Рисунок 17 – Направленная дифференцировка МСК ПК крысы. (а) – Контроль, культивирование МСК ПК в ростовой среде без добавления индукторов в течение 4 недель. (б) – Адипогенная дифференцировка. Окрашивание Суданом III. (в) – Osteогенная дифференцировка. Окрашивание ализариновым красным S. (г) – Хондрогенная дифференцировка. Окрашивание альциановым синим. Фазово-контрастная микроскопия, масштабный отрезок 100 мкм.

3.1.7 Иммуноцитохимическое исследование фенотипа культуры МСК ПК

Иммуноцитохимическое исследование подтвердило высокий уровень экспрессии маркера пролиферации Ki67 (экспрессируется во всех фазах – G1, S, G2 и М – клеточного цикла, кроме G0) в культурах МСК ПК на 2-3 пассажах: доля Ki67⁺ клеток достигала 75-85% в зависимости от культуры (Рисунок 18).

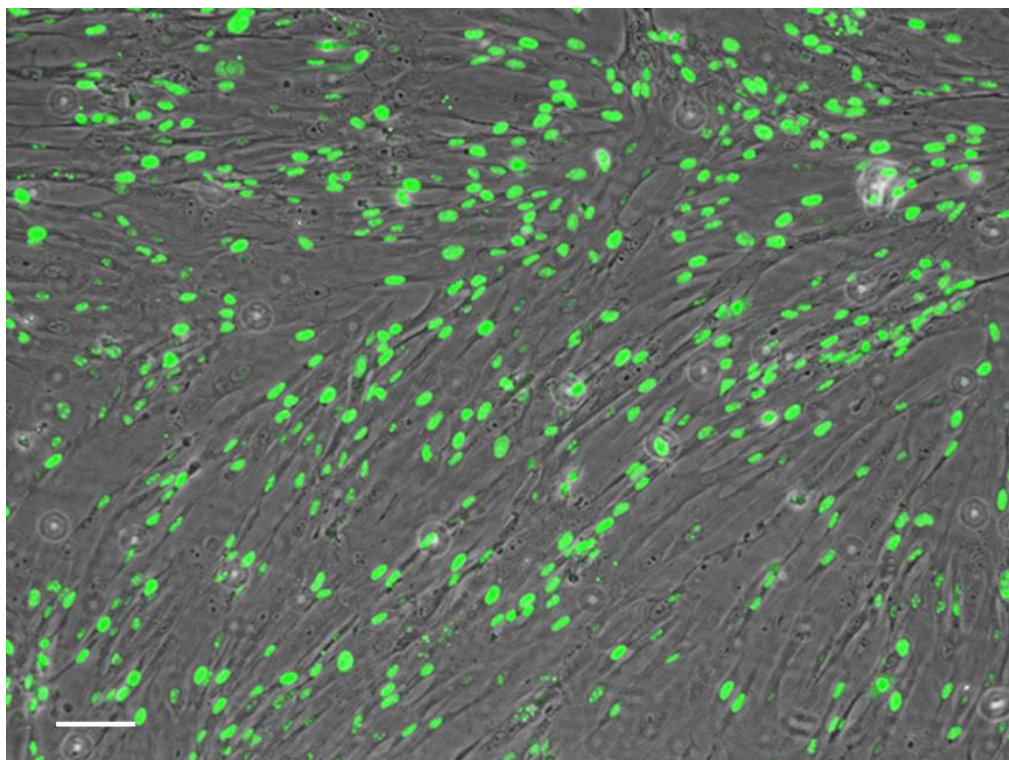


Рисунок 18 – Экспрессия маркера пролиферации Ki67 (зеленый) в культуре МСК ПК человека на 2 пассаже. Совмещение фазово-контрастной и флуоресцентной микроскопии, масштабный отрезок 100 мкм.

Виментин (белок промежуточных филаментов, характерный для клеток мезенхимного происхождения) и гладкомышечный актин альфа (α SMA) экспрессировались клетками как первичной, так и пассированной культуры МСК ПК (Рисунок 19 и 20).

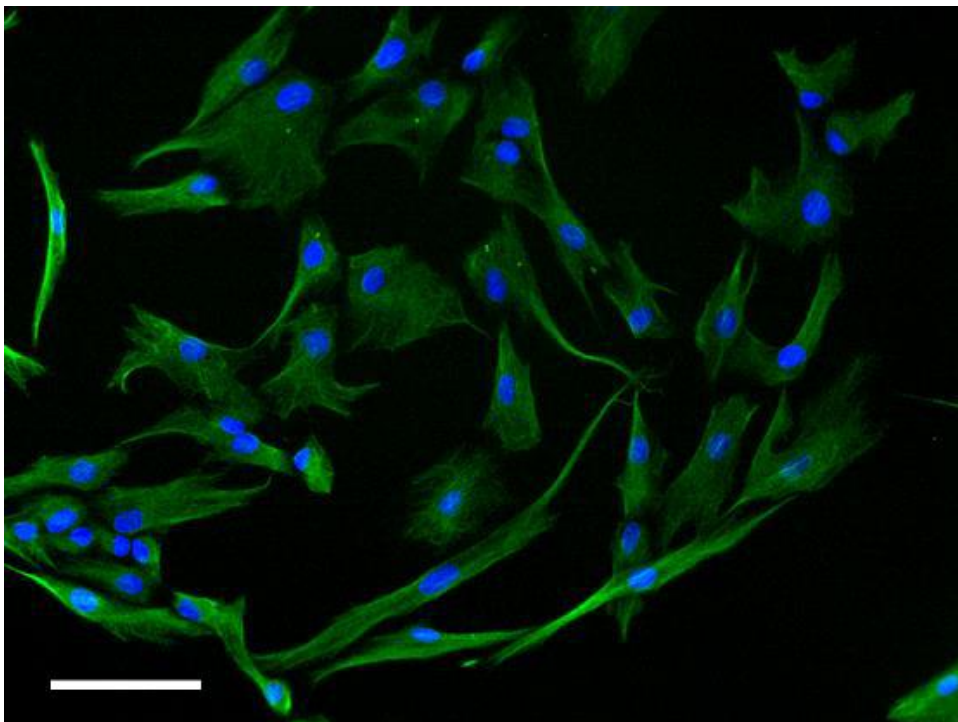


Рисунок 19 – Экспрессия виментина (зеленый) в МСК ПК человека. Ядра клеток докрашены DAPI (синий). Флуоресцентная микроскопия, масштабный отрезок 100 мкм.

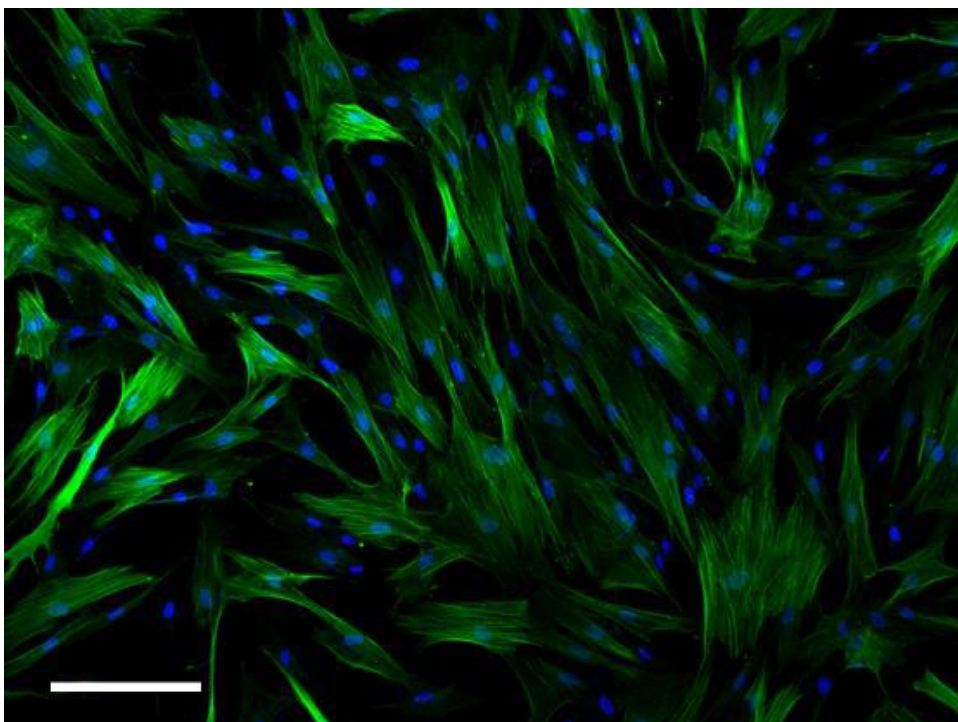


Рисунок 20 – Экспрессия α SMA (зеленый) в МСК ПК. Ядра клеток докрашены DAPI (синий). Флуоресцентная микроскопия, масштабный отрезок 200 мкм.

Клеточные культуры, выделенные из пупочного канатика человека или крысы, соответствуют всем требованиям, предъявляемым ISCT [Dominici et al., 2006] к мультипотентным стромальным клеткам: способность к росту на пластиковой подложке, специфический профиль экспрессии поверхностных антигенов, способность к дифференцировке в адипогенном, хондрогенном или остеогенном направлении *in vitro* под действием индукторов. Данные культуры не содержат CD31+ и CD146+клеток, как и сам вартонов студень, из которого они выделены. Для цитоскелета МСК ПК характерны виментиновые промежуточные филаменты и α SMA микрофиламенты.

3.2 Исследование ангиогенных свойств МСК ПК *in vitro*

3.2.1 Линия эндотелиальных клеток EA.hy926

Клетки линии EA.hy926 экспрессировали маркер эндотелиальных клеток CD31 (Рисунок 21).

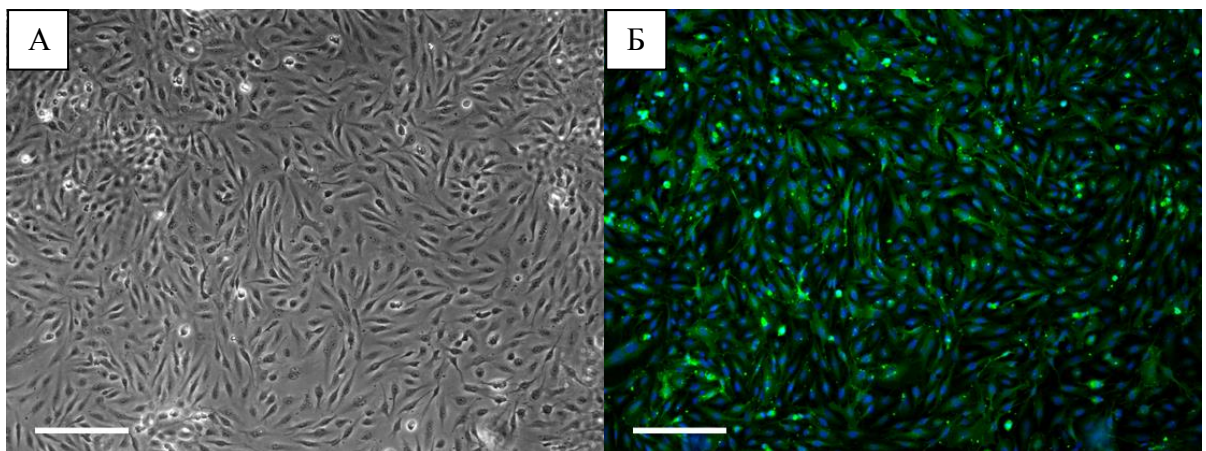


Рисунок 21 – Линия эндотелиальных клеток EA.hy926. (а) – Внешний вид клеток. Фазово-контрастная микроскопия, масштабный отрезок 200 мкм. (б) –

Экспрессия CD31 (зеленый) клетками линии EA.hy926. Ядра клеток докрашены DAPI (синий). Флуоресцентная микроскопия, масштабный отрезок 200 мкм.

3.2.2 Измерение концентрации VEGF-A в средах, кондиционированных МСК ПК и EA.hy926

В течение 3 суток в лунках планшета с эндотелиальными клетками линии EA.hy926 происходило постепенное увеличение концентрации растворимых форм VEGF-A (суммарно VEGF-A121 и VEGF-A165) с $57,3 \pm 7,7$ пкг/мл до $229,0 \pm 24,9$ пкг/мл. В лунках с МСК ПК человека содержание фактора не изменялось, оставаясь на уровне ростовой среды (Рисунок 22).

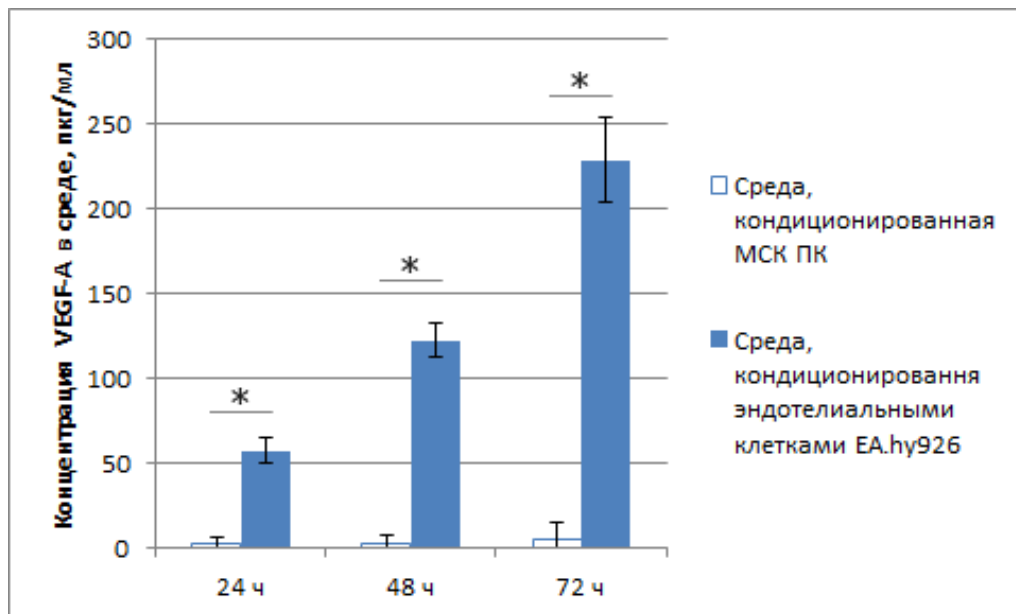


Рисунок 22 – Суммарное содержание секретируемых форм VEGF-A (-121 и -165) в средах, кондиционированных МСК ПК или эндотелиальными клетками в течение 24, 48 или 72 часов, определенное методом ИФА. Данные представлены в виде средних и стандартных отклонений.* – $p < 0,05$.

3.2.3 Оценка влияния среды, кондиционированной МСК ПК, на пролиферацию эндотелиальных клеток

МТТ-тест показал, что кондиционированная МСК ПК среда стимулировала пролиферацию эндотелиальных клеток линии EA.hy926. При увеличении времени инкубирования разница значений A570 между клетками, культивированными в контрольной (ростовой) и кондиционированной МСК ПК средами, увеличивалась, достигая 1,6 раз к 72 часам. Внесение в кондиционированную МСК ПК среду блокирующих антител к VEGF не влияло на стимуляцию пролиферации (Рисунок 23).

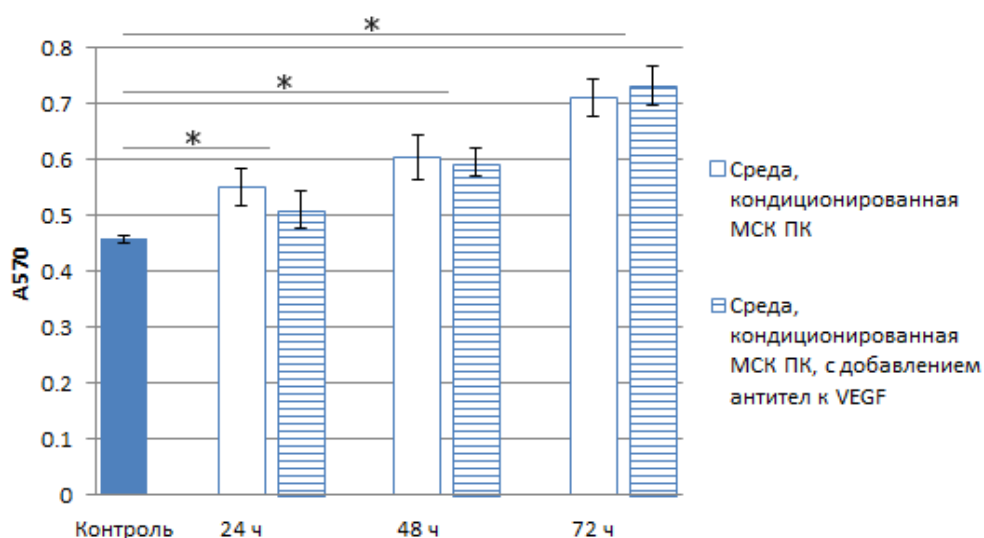
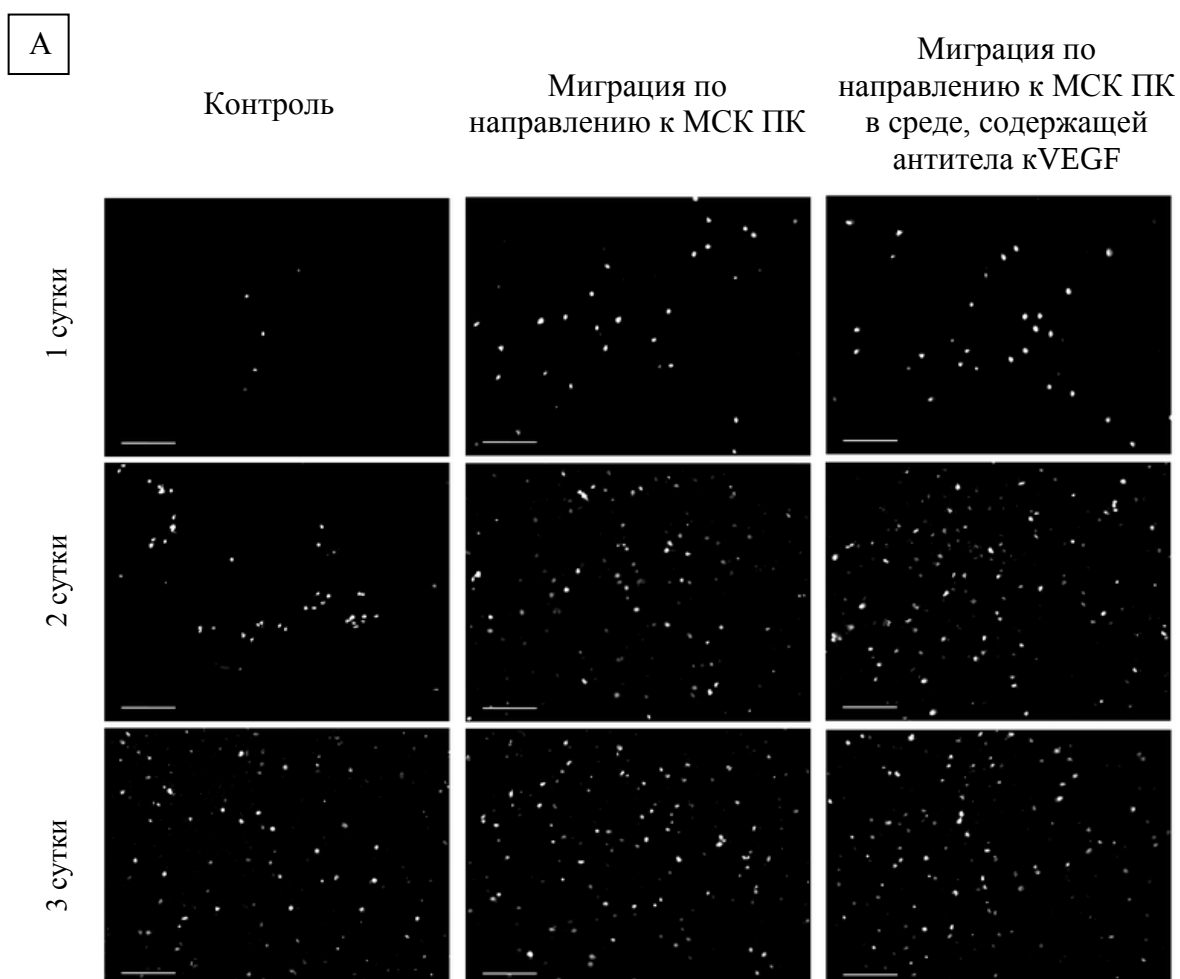


Рисунок 23 – Влияние кондиционированной МСК ПК среды на пролиферацию эндотелиальных клеток линии EA.hy926. Результаты МТТ-теста. Данные представлены в виде средних и стандартных отклонений. * – $p < 0,05$.

3.2.4 Направленная миграция эндотелиальных клеток в градиенте факторов, секретируемых МСК ПК

Результаты эксперимента показали, что МСК ПК выделяют факторы, являющиеся хемоаттрактантами для эндотелиальных клеток линии EA.hy926: число мигрировавших на нижнюю поверхность мембраны эндотелиальных клеток было значимо выше в лунках, содержащих МСК ПК, во всех временных точках. Внесение в лунки блокирующих антител к VEGF не изменяло стимулирующего действия кондиционированной МСК ПК среды (Рисунок 24).



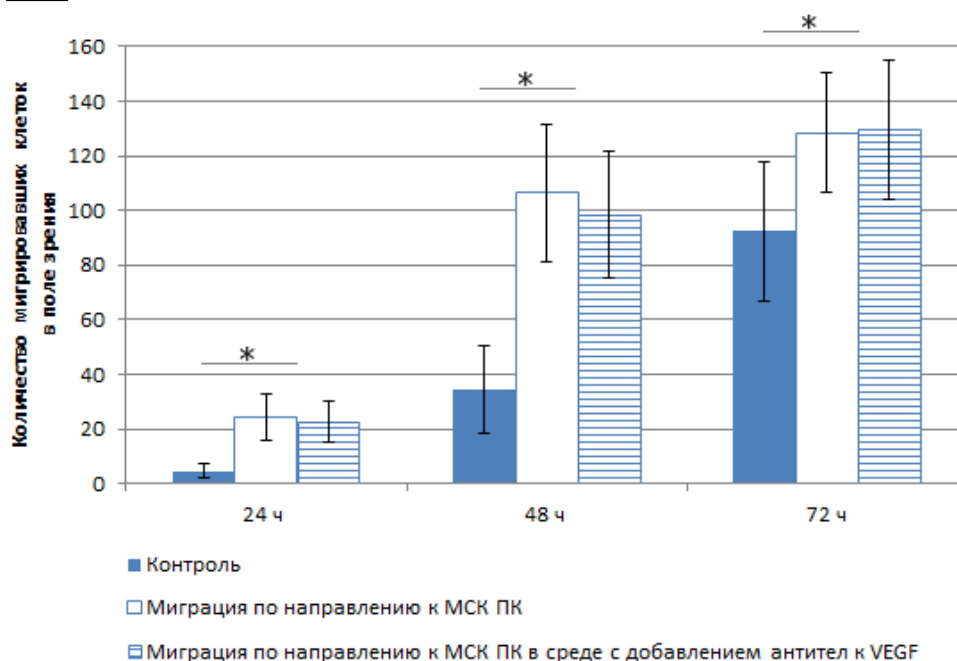
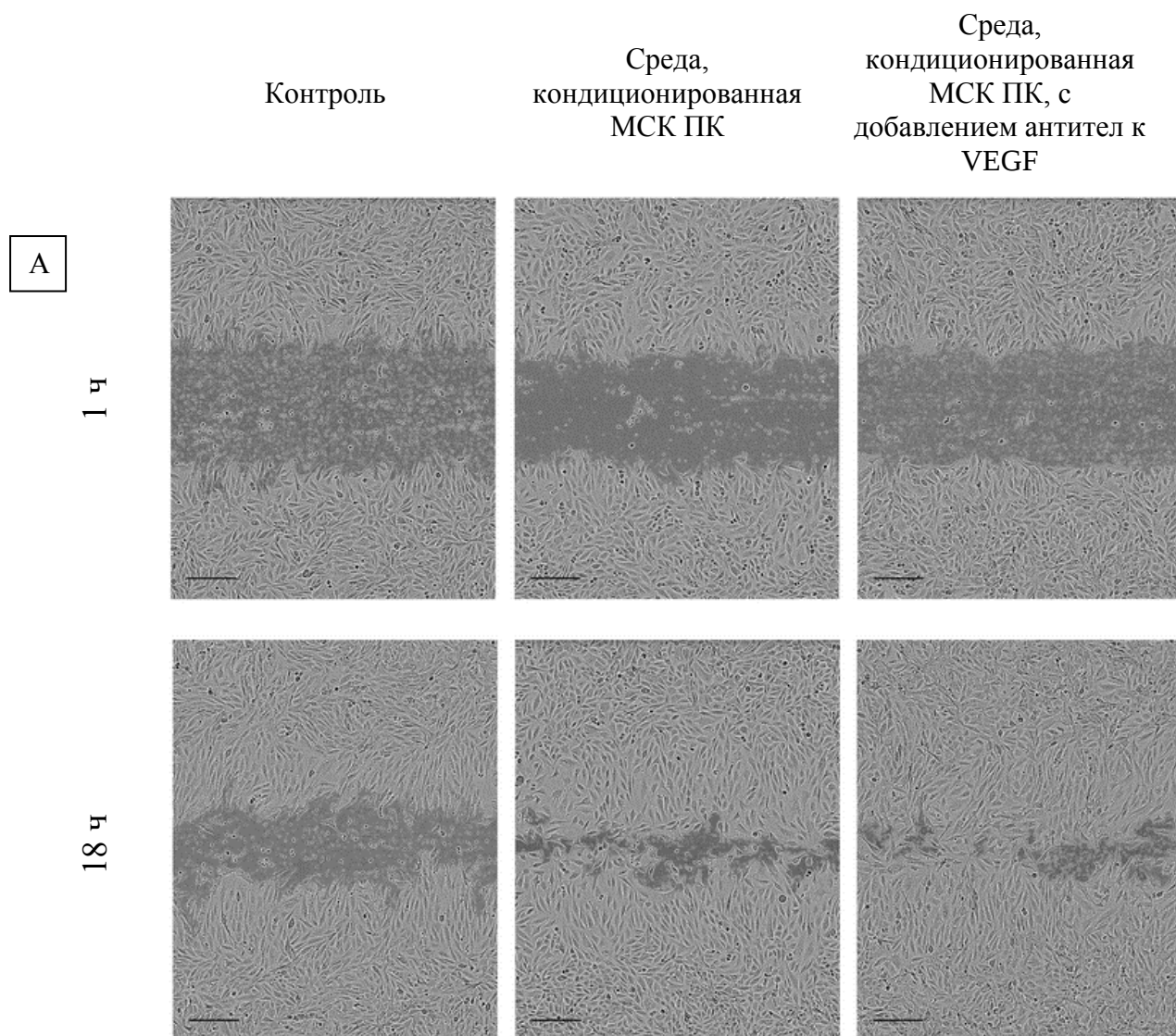


Рисунок 24 – Миграция эндотелиальных клеток линии EA.hy926 по направлению к МСК ПК. (а) – Эндотелиальные клетки на нижней поверхности мембраны. Ядра клеток окрашены DAPI. Флуоресцентная микроскопия, масштабный отрезок 200 мкм. (б) – Количественная оценка направленной миграции. Данные представлены в виде средних и стандартных отклонений.* – $p < 0,05$.

3.2.5 Оценка влияния кондиционированной МСК ПК среды на подвижность эндотелиальных клеток на модели «рана монослоя»

Исследование, проведенное на модели «рана монослоя», также подтвердило, что кондиционированная МСК ПК среда стимулировала подвижность эндотелиальных клеток, определяемую по скорости заполнения раны. Разница в конfluентности области раны становилась статистически значимой уже через 8 часов после нанесения царапины, при этом добавление блокирующих антител к VEGF к кондиционированной МСК ПК среде не подавляло подвижность клеток. К примеру, конfluентность области раны через 18 часов

после начала эксперимента составляла в лунках с ростовой средой $52,68 \pm 5,80\%$, в лунках с кондиционированной МСК ПК средой – $89,74 \pm 5,63\%$, в лунках с кондиционированной МСК ПК средой и антителами к VEGF – $90,04 \pm 5,26\%$ (Рисунок 25).



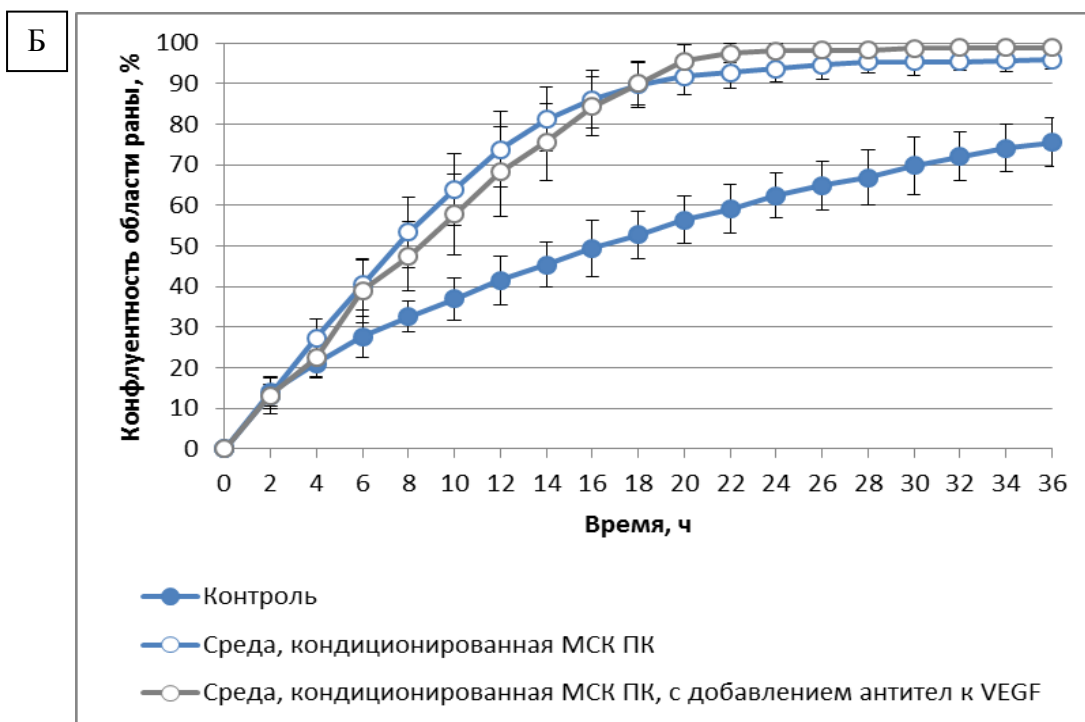


Рисунок 25 – Влияние кондиционированной МСК ПК среды на скорость заполнения раны монослоя эндотелиальными клетками линии EA.hy926. (а) – кадры из видеофильма, снятого с помощью TimeLapse микроскопии. Фазово-контрастная микроскопия, масштабный отрезок 200 мкм. (б) – Количественная оценка конфлуентности области раны. Данные представлены в виде средних и стандартных отклонений. Значимые отличия ($p < 0,05$) между контрольной и экспериментальными группами начинаются с точки «8 часов».

3.2.6 Эндотелиальная дифференцировка МСК ПК на стандартной подложке

МСК ПК, культивируемые в контрольной среде (без добавления индукторов) не изменяли свою форму и характерное для монослоя МСК расположение клеток в виде волн, сохраняли контактное торможение и не приобретали CD31+ фенотип (Рисунок 26).

МСК ПК, культивируемые в кондиционированной эндотелиальными клетками среде, не изменяли свою форму, но плотность клеток была выше, а в монослое появлялись единичные островки CD31+ клеток (Рисунок 26).

Наиболее выраженные изменения происходили с МСК ПК, культивированными в среде с использованием VEGF-A-165 и кондиционированной эндотелиальными клетками среды. Вместо характерных волн на всей поверхности появлялся новый рисунок, напоминающий крупноячеистую сеть. Формировались тубулярные структуры (от 3 до 5 на чашку Петри диаметром 35 мм), собранные из нескольких десятков вытянутых узких клеток с продолговатым ядром, положительно окрашивающихся на маркер эндотелия CD31+ (Рисунки 26 и 27).

Использование VEGF-A-165 в качестве единственного индуктора приводило к потере МСК контактного торможения, клетки начинали расти в несколько слоев, приобретали схожую с вышеописанной морфологию, но не формировали тубулярных структур и не экспрессировали CD31 (Рисунок 26).

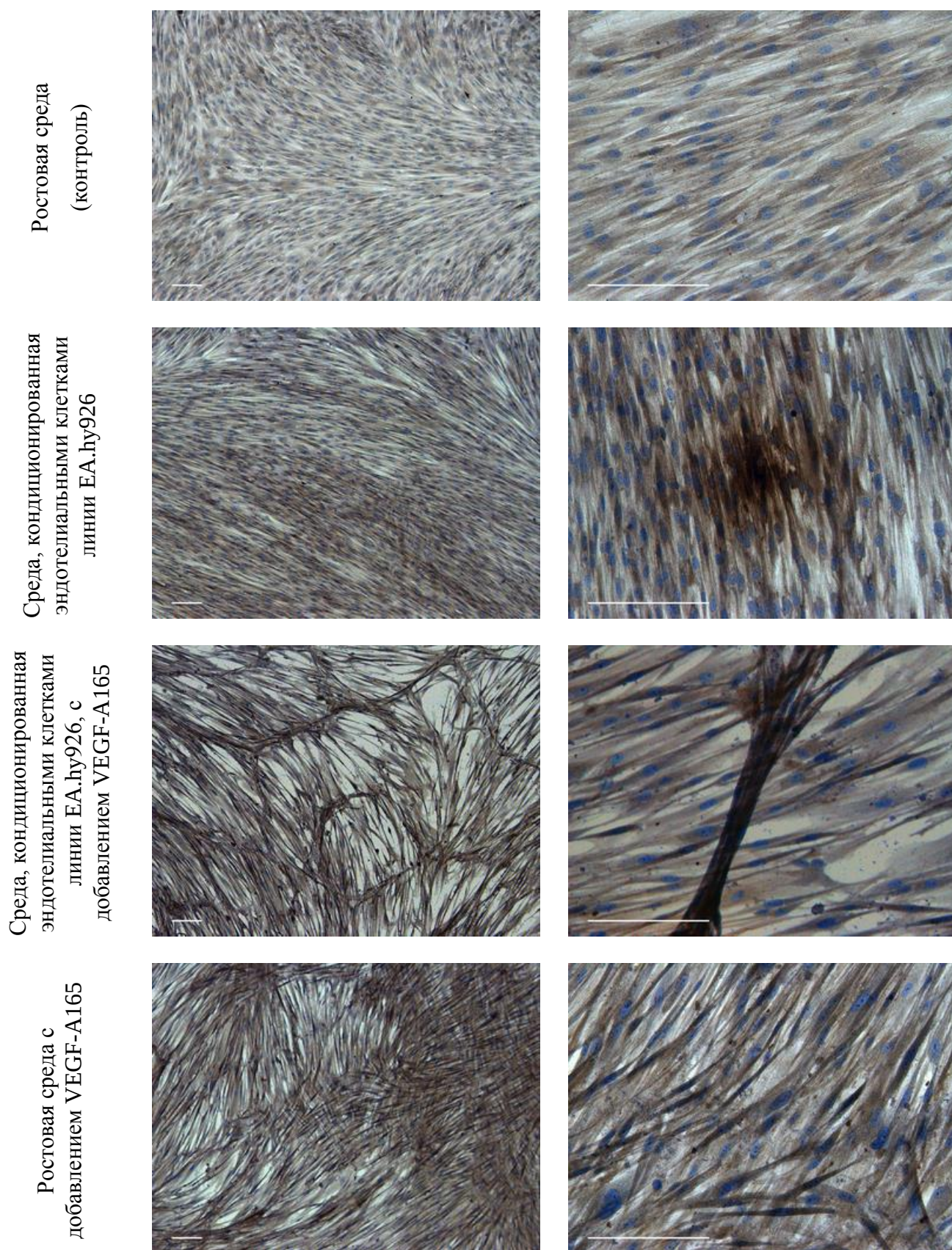


Рисунок 26 – Эндотелиальная дифференцировка МСК пупочного канатика *in vitro*. Иммуноцитохимическое окрашивание на маркер эндотелиоцитов CD31

(темно-коричневый), ядра клеток докрашены гематоксилином. Светлопольная микроскопия, масштабный отрезок 200 мкм.

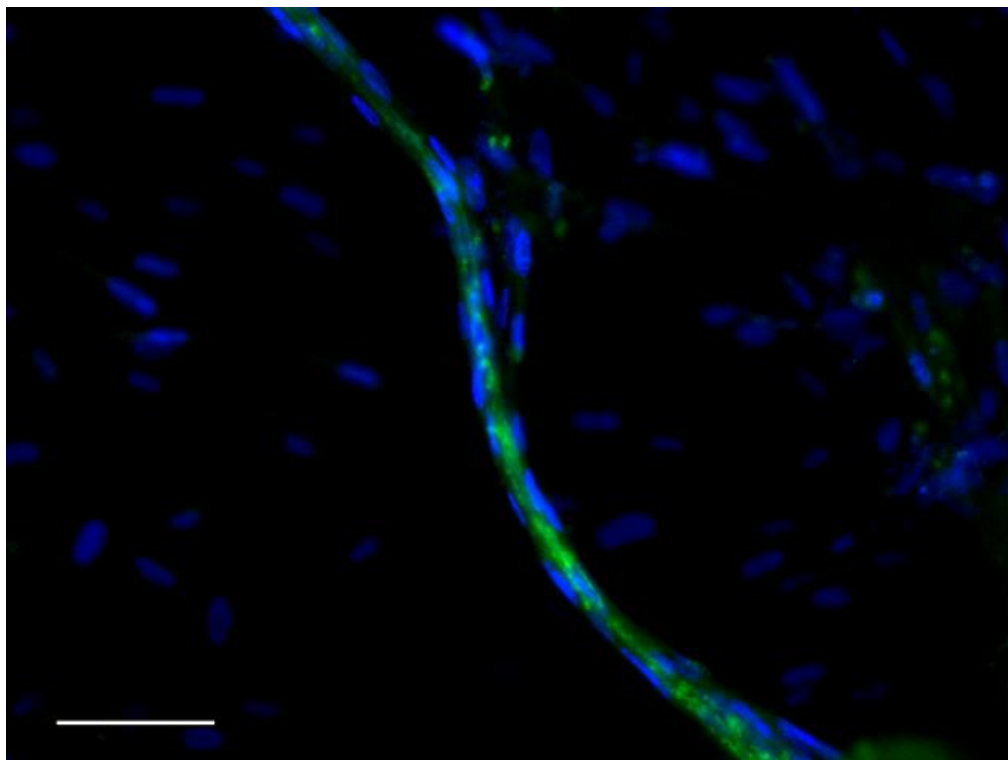
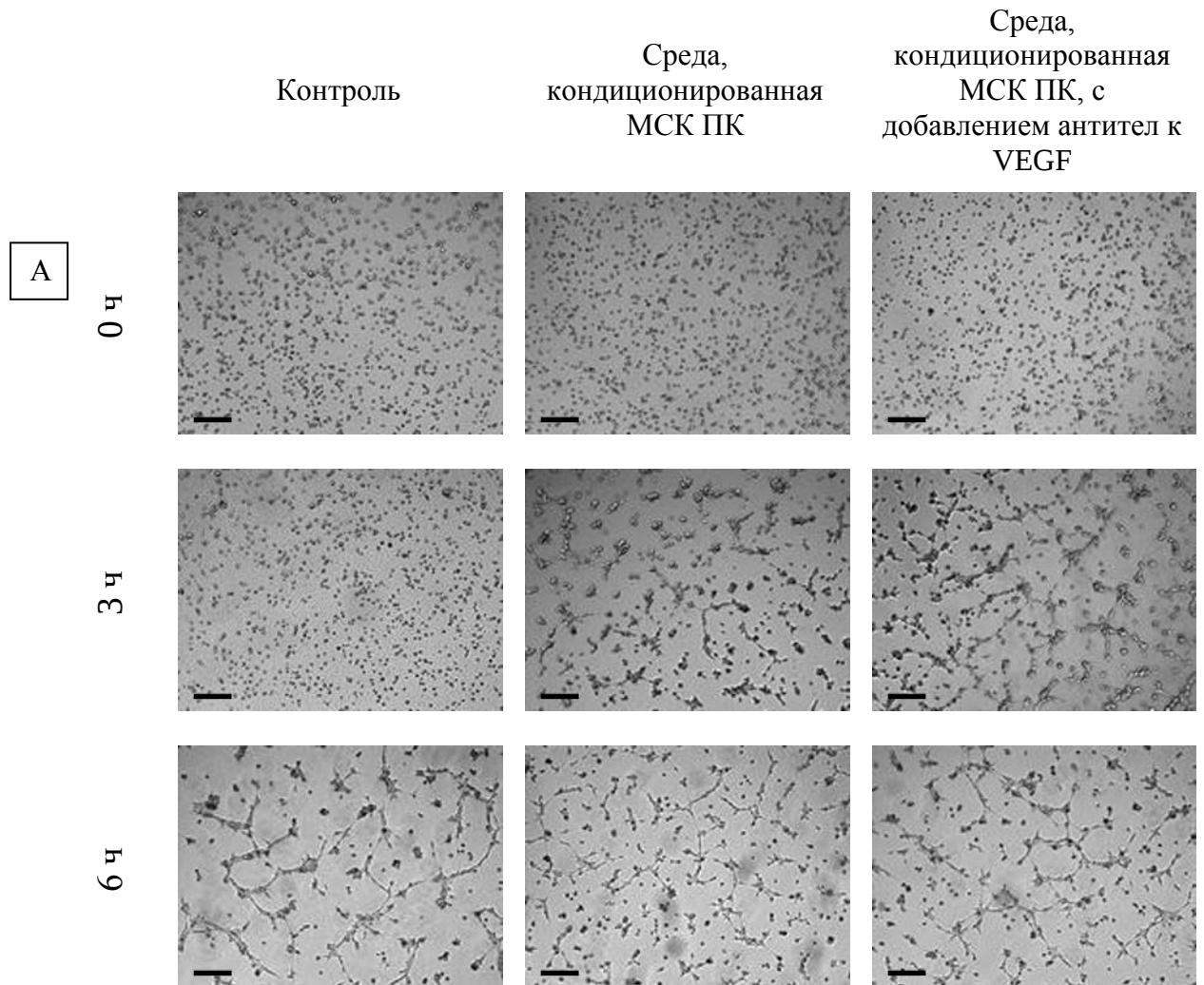


Рисунок 27 – Тубулярная структура, образованная МСК ПК под действием кондиционированной эндотелиальными клетками среды с добавлением VEGF-A165. Окрашивание на маркер эндотелиоцитов CD31 (зеленый), ядра клеток докрашены DAPI (синий). Флуоресцентная микроскопия, масштабный отрезок 100 мкм.

3.2.7 Оценка влияния кондиционированной МСК ПК среды на эндотелиальные клетки линии EA.hy926 при моделировании ангиогенеза в матриксе базальной мембраны in vitro

Эндотелиальные клетки линии EA.hy926 в лунках с ростовой средой начинали формировать тубулярную сеть в матриксе базальной мембраны только через 4 часа после начала эксперимента. Добавление кондиционированной МСК

ПК среды (с блокирующими антителами к VEGF или без них) не влияло на параметры сети (число точек ветвления, средняя длина ветви), но ускоряло начало сборки сети на 1 час (Рисунок 28).



Б

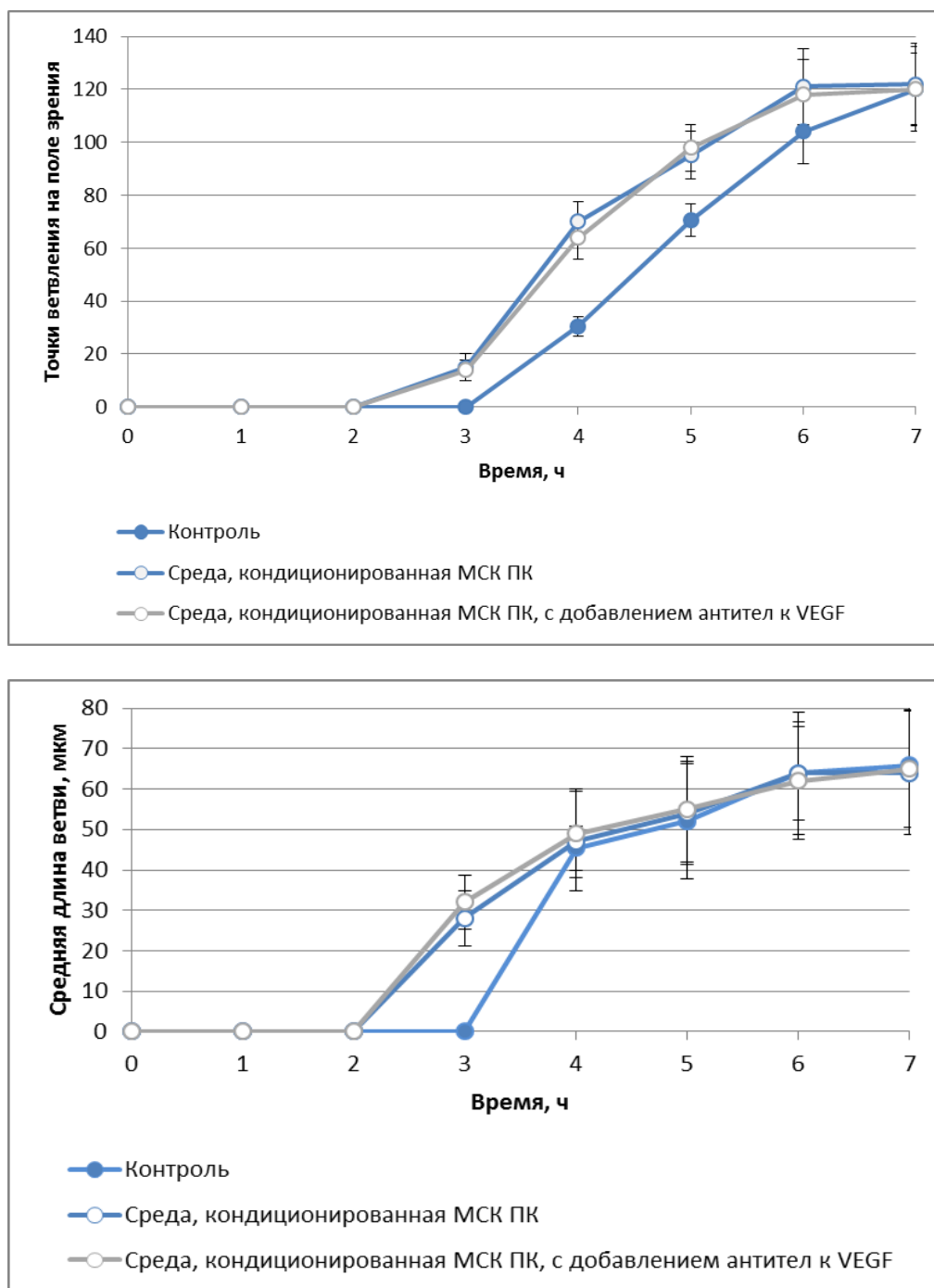


Рисунок 28 – Влияние кондиционированной МСК ПК среды на формирование тубулярной сети эндотелиальными клетками линии EA.hy926 в матриксе базальной мембраны. (а) – Формирование сети в матриксе базальной мембраны эндотелиальными клетками. Фазово-контрастная микроскопия, масштабный отрезок 200 мкм. (б) – Количественная оценка влияния кондиционированной МСК ПК среды на характеристики формируемой сети (число точек ветвления и среднюю длину ветви). Данные представлены в виде средних и стандартных отклонений.

3.2.8 Оценка взаимодействия МСК ПК и эндотелиальных клеток линии EA.hy926 при моделировании ангиогенеза в матриксе базальной мембраны *in vitro*

Витальное мечение МСК ПК красителем RKN26 (эмиссия в оранжевой области спектра) и эндотелиальных клеток линии EA.hy926 красителем RKN67 (эмиссия в зеленой области спектра) было проведено с высокой эффективностью: флуоресцентная метка была равномерно распределена между всеми клетками. После мечения клетки не изменяли свои адгезивные свойства и морфологию (Рисунок 29).

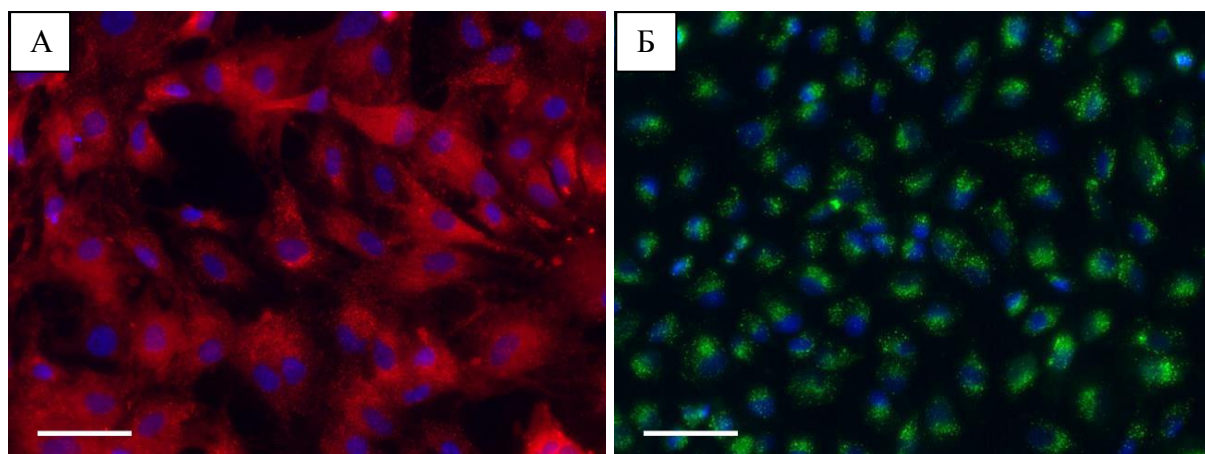


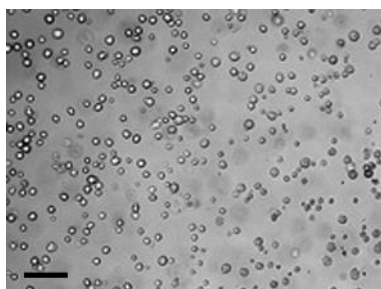
Рисунок 29 – Высокая эффективность витального мечения МСК ПК красителем RKN26 (красный) (а) и эндотелиальных клеток линии EA.hy926 красителем RKN67 (зеленый) (б). Ядра клеток докрашены DAPI (синий). Флуоресцентная микроскопия, масштабный отрезок 100 мкм.

МСК ПК, как и эндотелиальные клетки линии EA.hy926, были способны формировать тубулярные структуры на поверхности матрикса базальной мембраны, однако сборка сети из МСК ПК начиналась уже через 1 час после наслаивания суспензии. При этом формируемая сеть имела более грубое строение (более крупные ячейки неправильной формы, ветви образованы пучками клеток) (Рисунок 30).

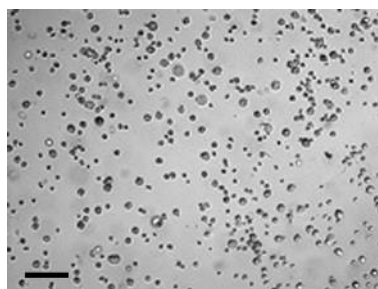
A

0 ч

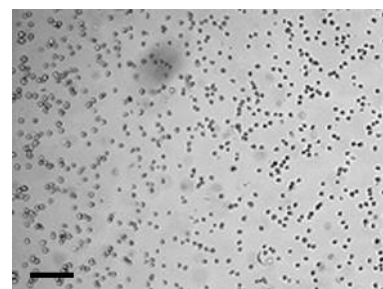
МСК ПК



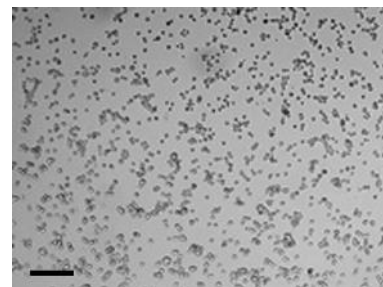
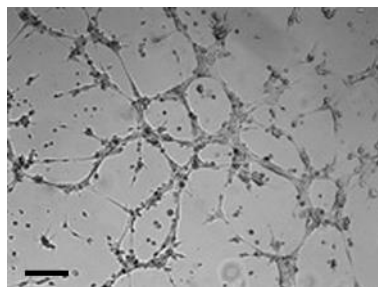
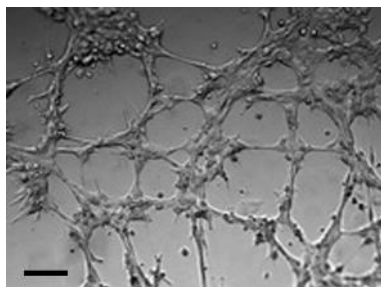
МСК ПК-ЕА.hy926 1:1



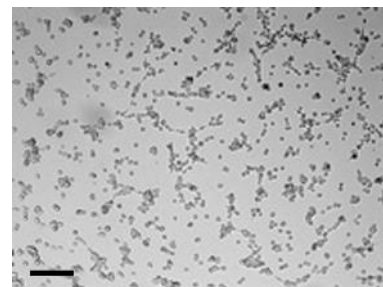
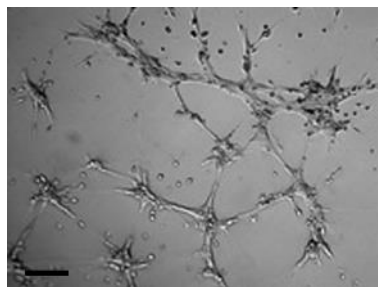
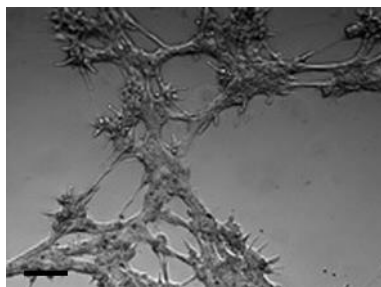
ЕА.hy926



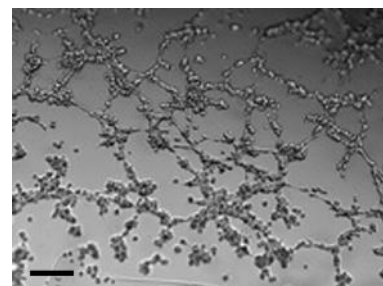
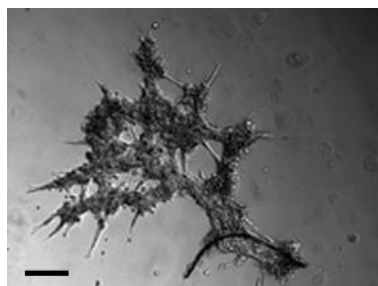
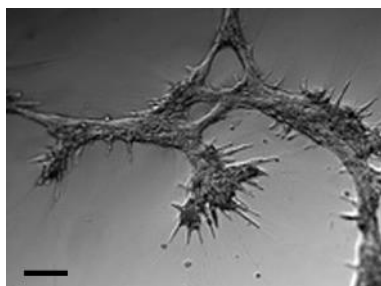
2 ч



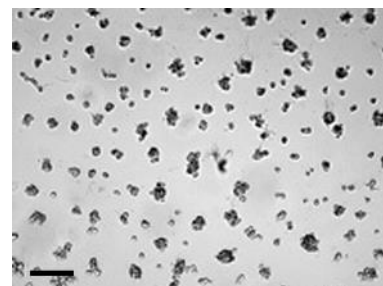
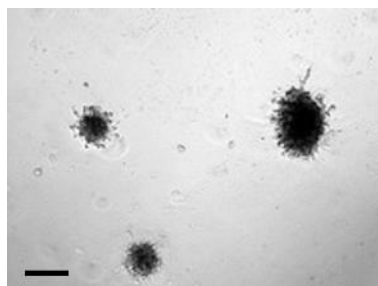
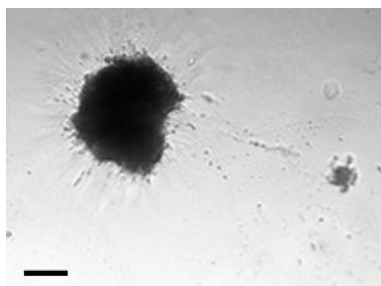
4 ч



6 ч



24 ч



Б

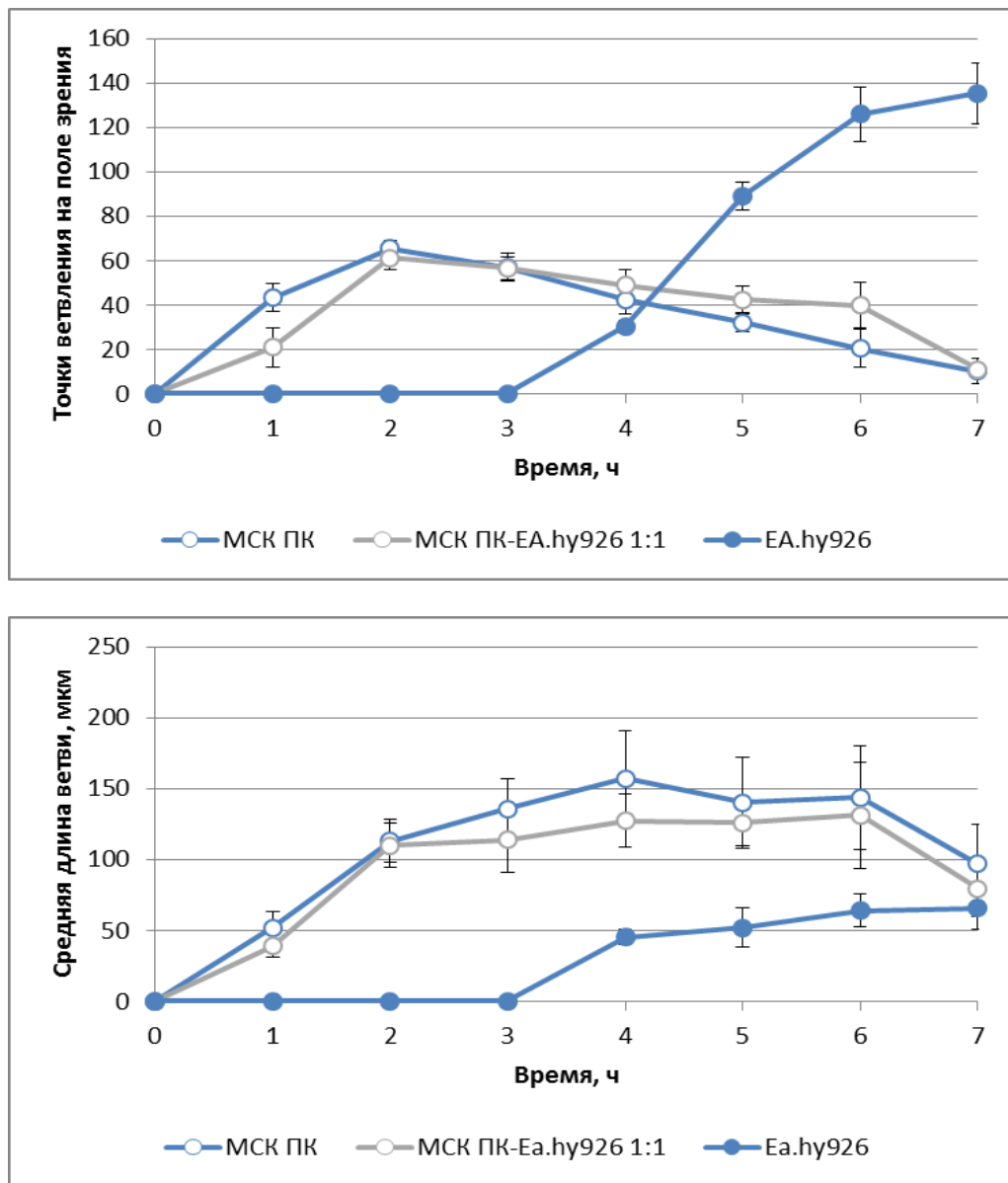


Рисунок 30 – Взаимодействие МСК ПК и эндотелиальных клеток линии EA.hy926 при моделировании ангиогенеза *in vitro*. (а) – Формирование тубулярной сети МСК ПК, эндотелиальными клетками линии EA.hy926 или смесью МСК ПК и EA.hy926 в матриксе базальной мембраны. Фазово-контрастная микроскопия, масштабный отрезок 200 мкм. (б) – Характеристика формируемых клетками сетей (число точек ветвления и средняя длина ветви). Данные представлены в виде средних и стандартных отклонений.

При сокультивировании МСК ПК и эндотелиальных клеток линии EA.hy926 формируемая сеть по своим характеристикам (время сборки, длина ветвей, число точек ветвления) была ближе к сети, организованной только МСК

ПК. При этом основу сети оставляли именно РКН26+МСК ПК, а РКН67+ЕА.hy926 были ассоциированы с ними (Рисунки 30 и 31).

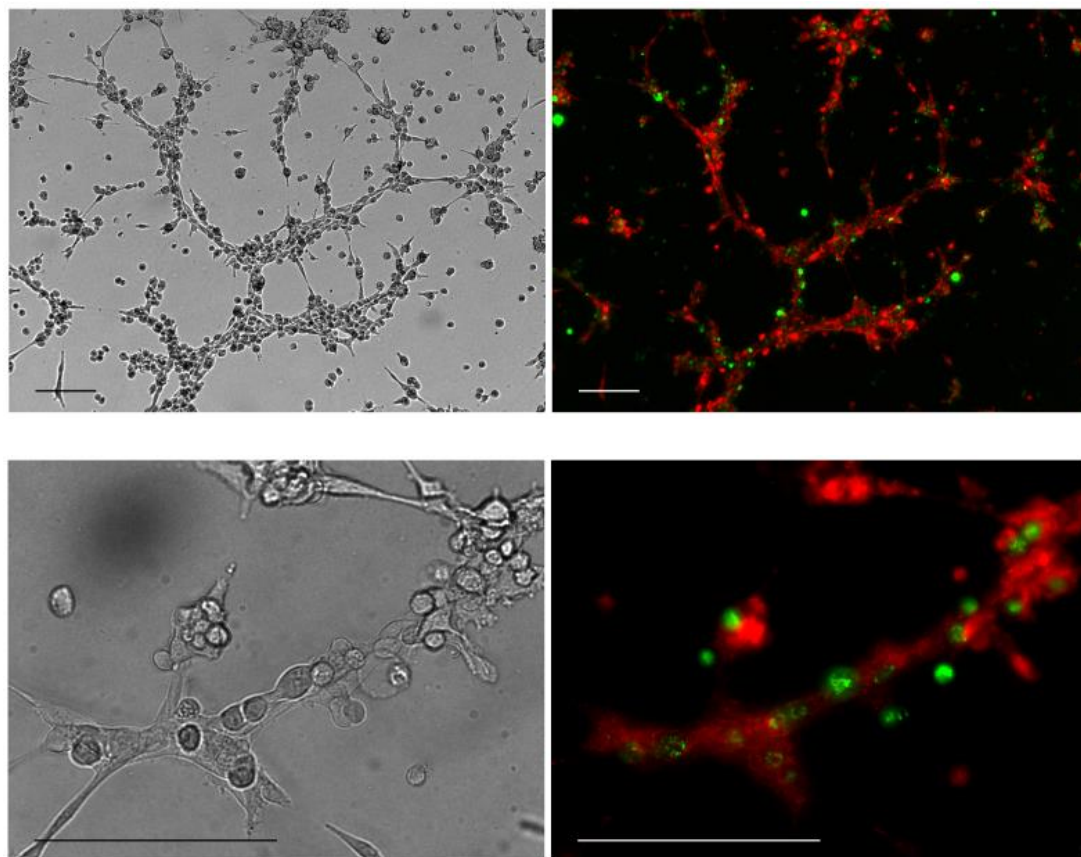


Рисунок 31 – Формирование общей тубулярной сети МСК ПК и эндотелиальными клетками линии ЕА.hy926. МСК ПК несут витальную метку РКН26 (красный), ЕА.hy926 несут витальную метку РКН67 (зеленый). Фазово-контрастная и флуоресцентная микроскопия, масштабный отрезок 100 мкм.

Во всех трех группах формируемая тубулярная сеть была нестабильна и окончательно разбиралась в течение 24 часов, образуя плотные кластеры клеток (Рисунки 30 и 32). Данные кластеры не являлись стационарными структурами, но в течение нескольких суток были способны к ограниченному движению и слиянию (Рисунок 32).

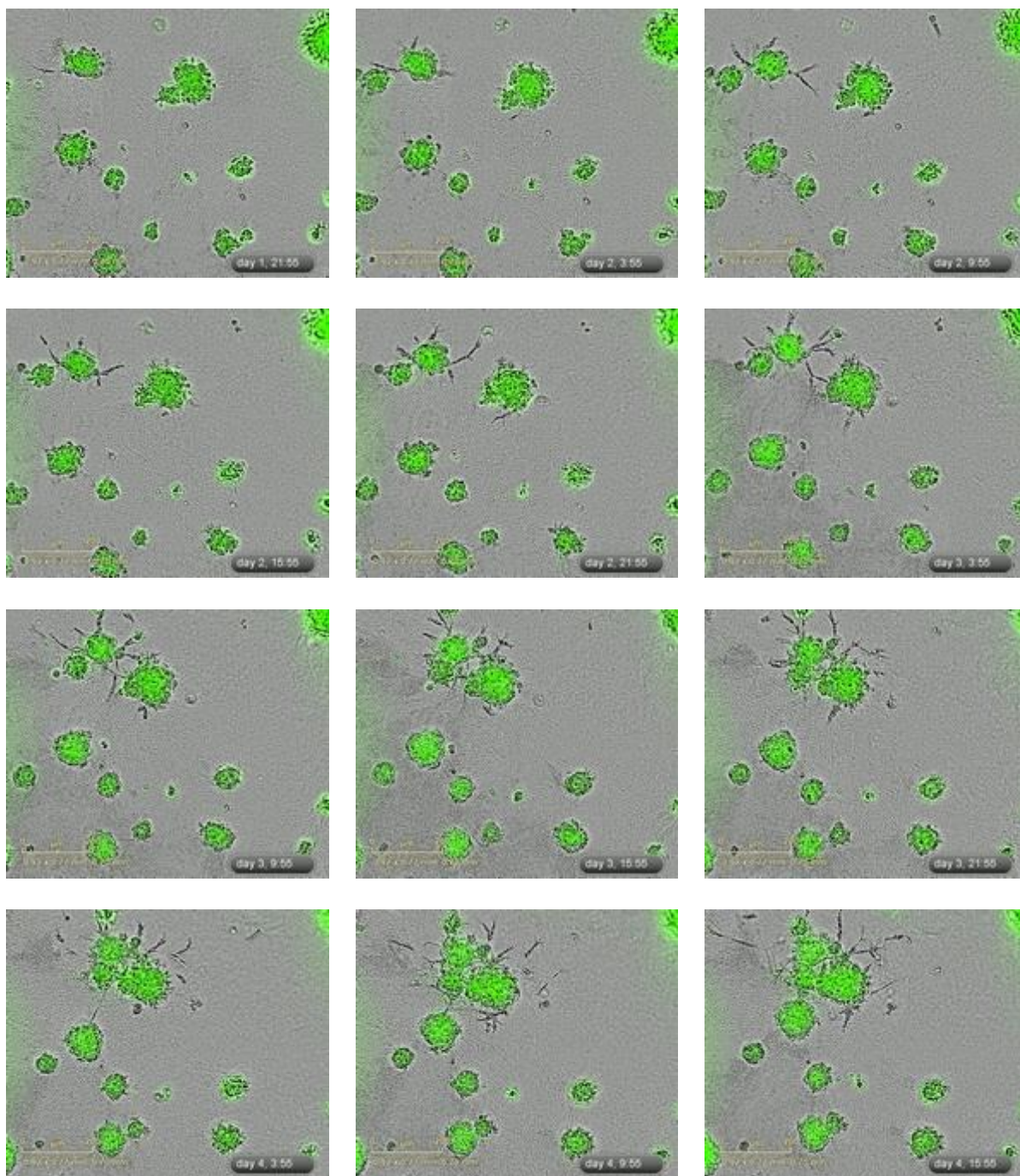


Рисунок 32 – Способность кластеров клеток к ограниченной подвижности и слиянию в матриксе базальной мембраны. Эндотелиальные клетки линии Ea.hy926 несут витальную метку PKH67 (зеленый). Совмещение фазово-контрастной и флуоресцентной микроскопии, масштабный отрезок 200 мкм. Отдельные кадры из видеофильма, снятого с помощью Time-Lapse микроскопии, временная разница между кадрами 6 ч.

Движение кластеров клеток останавливалось приблизительно к 5-7 суткам, при этом их число было различным для разных групп: $430 \pm 21,2$ на лунку для EA.hy926, $137,1 \pm 9,2$ для смеси МСК ПК и EA.hy926, $93 \pm 9,2$ для МСК ПК (Рисунок 33).

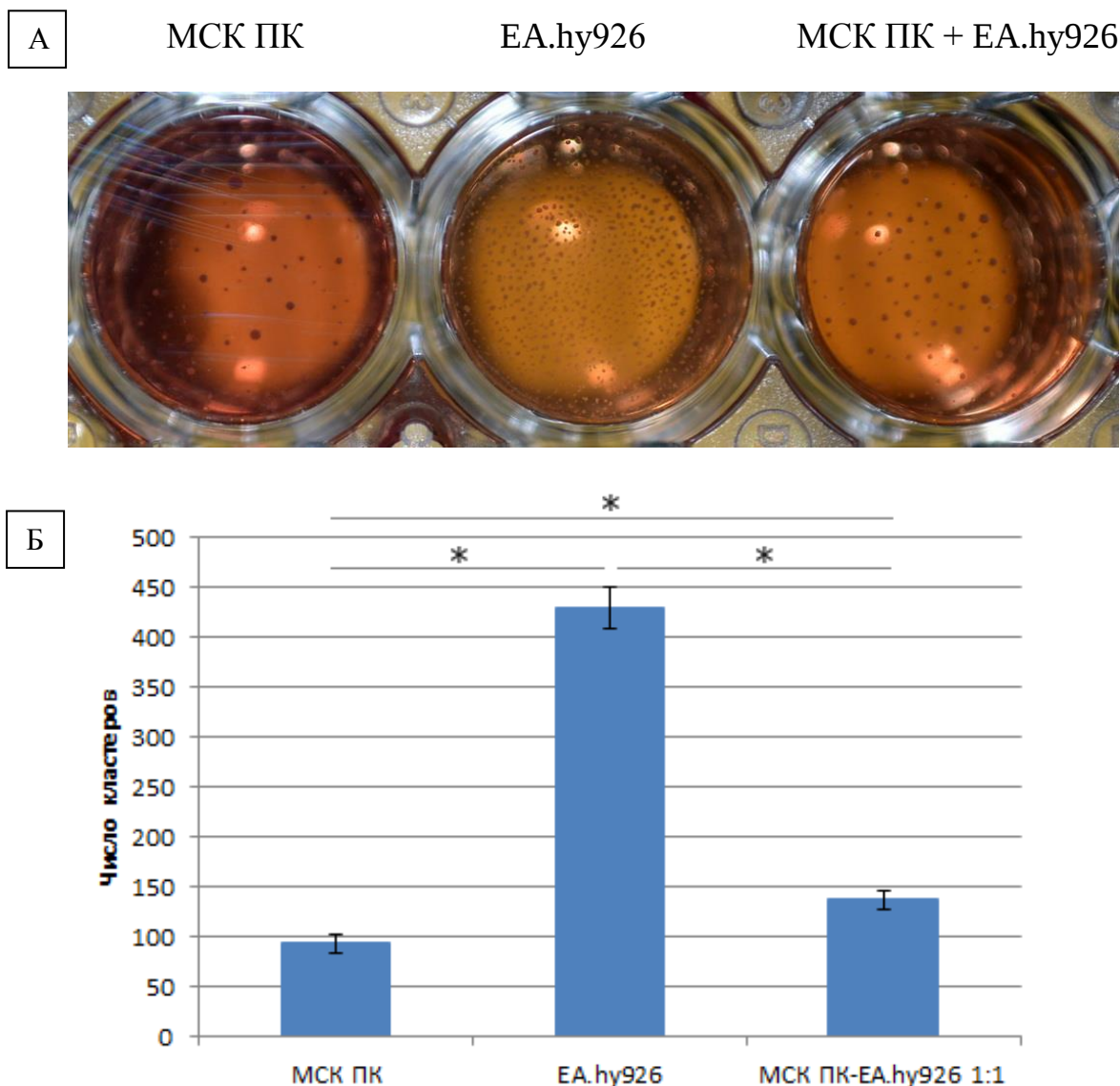


Рисунок 33 – Формирование кластеров МСК ПК, клеток линии EA.hy926 или смеси двух типов клеток в соотношении 1:1 в матриксе базальной мембраны на 7 сутки после разборки тубулярной сети. (а) – Макросъемка. (б) – Количество формируемых кластеров, шт. на лунку 48-луночного планшета. Данные представлены в виде средних и стандартных отклонений.* – $p < 0,05$.

3.2.9 Эндотелиальная дифференцировка МСК ПК в матриксе базальной мембраны

На 5-7 сутки в лунках, содержащих только EA.hy926 или смесь МСК ПК и EA.hy926, наблюдали появление центров спрутинга – разрастания клеток из образованных ранее кластеров. Клетки имели характерную вытянутую форму, а сама формируемая ими сеть оказалась очень стабильной (срок наблюдения составил более 30 суток) и имела множество точек ветвления, чаще всего дихотомического. Постепенно происходило объединение разрозненных центров спрутинга в единую сеть (Рисунок 34).

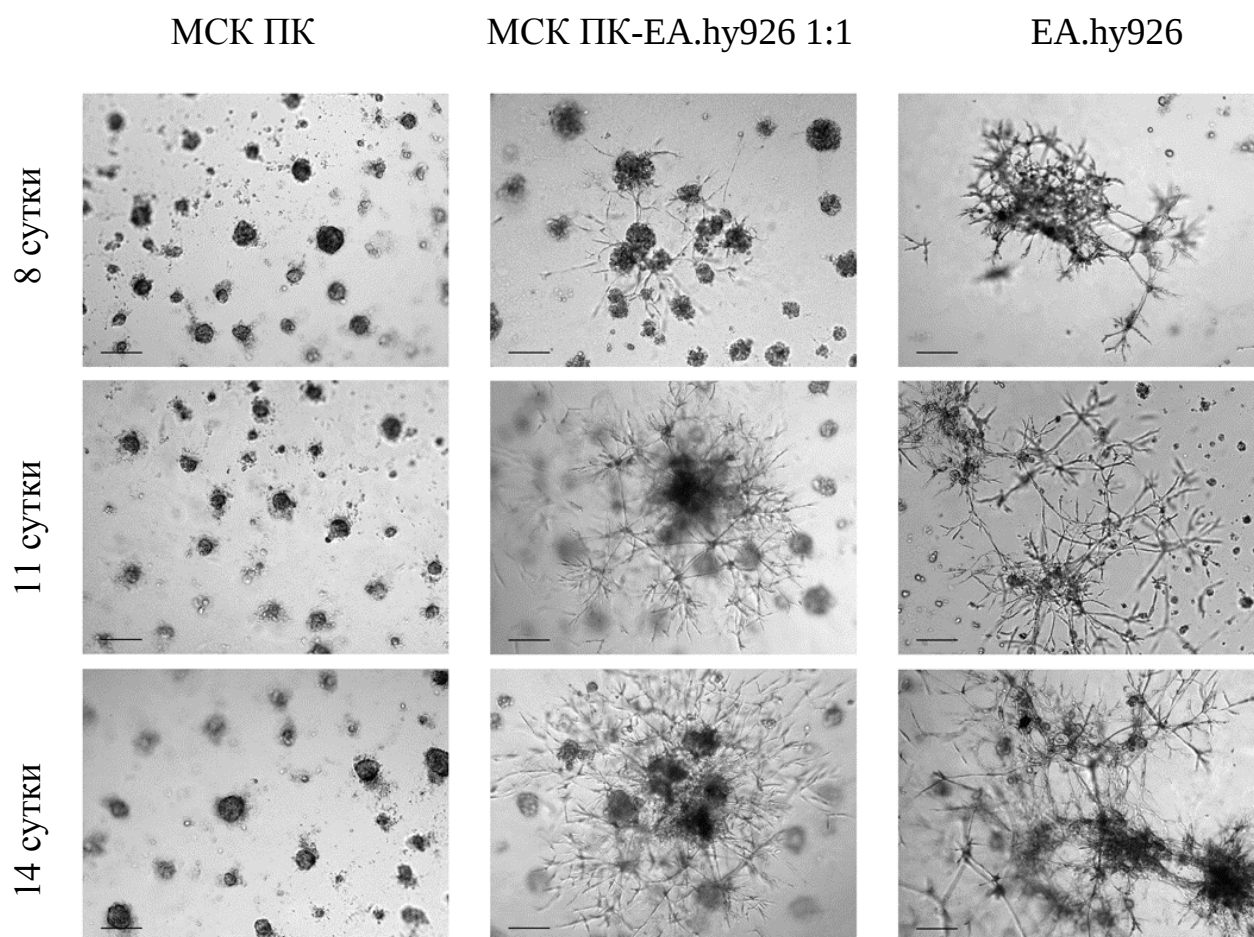


Рисунок 34 – Формирование стабильной трехмерной капилляроподобной сети из кластеров EA.hy926 или МСК ПК-EA.hy926 в матриксе базальной мембраны (вторичный спрутинг). Фазово-контрастная микроскопия, масштабный отрезок 200 мкм.

При этом оказалось, что стабильную разветвленную структуру формировали РКН26+МСК ПК, в то время как РКН67+ЕА.hy926 оставались в центре кластеров (Рисунок 35).

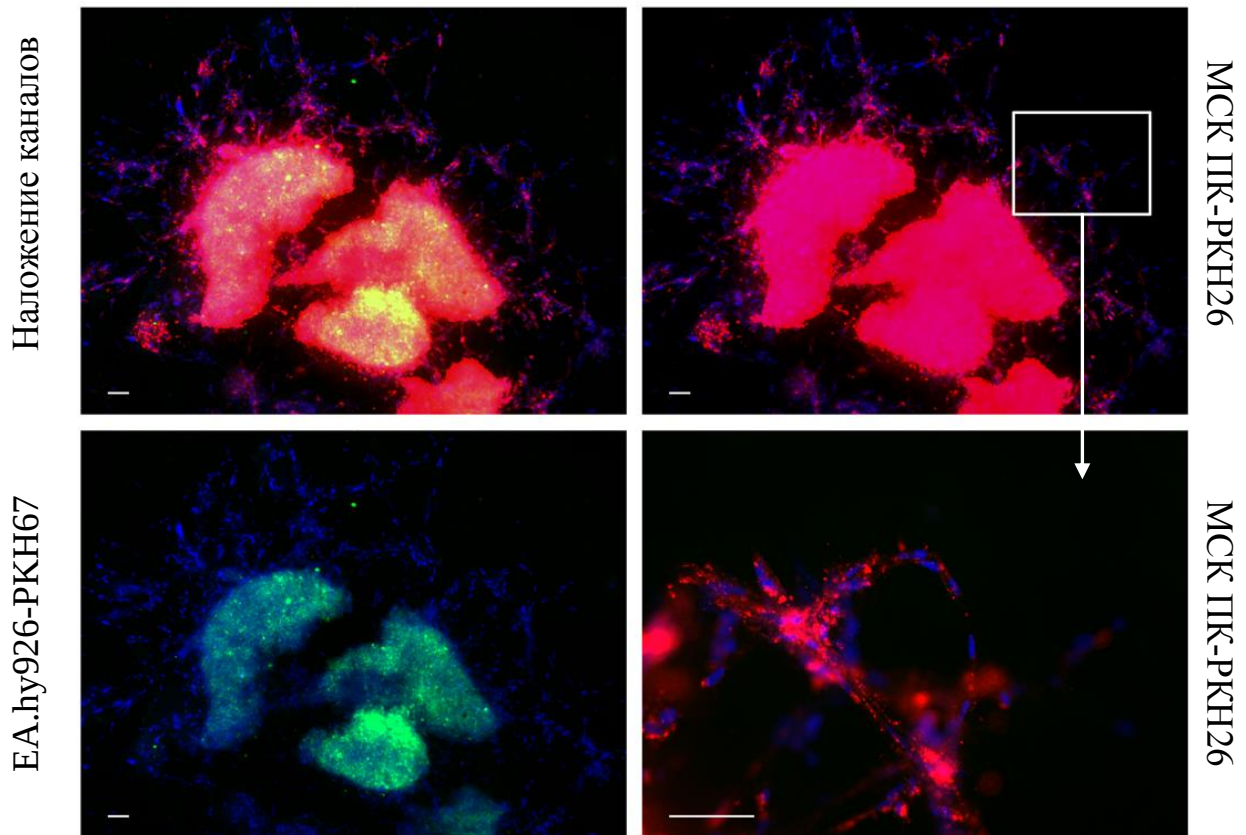


Рисунок 35 – Вторичный спрутинг МСК ПК из кластеров при длительном сокультивировании МСК ПК (красный) и эндотелиальных клеток линии ЕА.hy926 (зеленый) в матриксе базальной мембраны. Ядра клеток докрашены DAPI (синий). Флуоресцентная микроскопия, масштабный отрезок 100 мкм.

Было высказано предположение, что МСК ПК при сокультивировании с ЕА.hy926 в матриксе базальной мембраны проявляют способность к спрутингу из-за дифференцировки в эндотелиальном направлении. Окрашивание клеток непосредственно в матриксе оказалось невозможным из-за неспецифической адгезии антител к матриксу, поэтому для исследования были приготовлены криосрезы. Оказалось, что МСК ПК при сокультивировании с ЕА.hy926 в условиях данного эксперимента начинали экспрессировать CD31 (Рисунок 36).

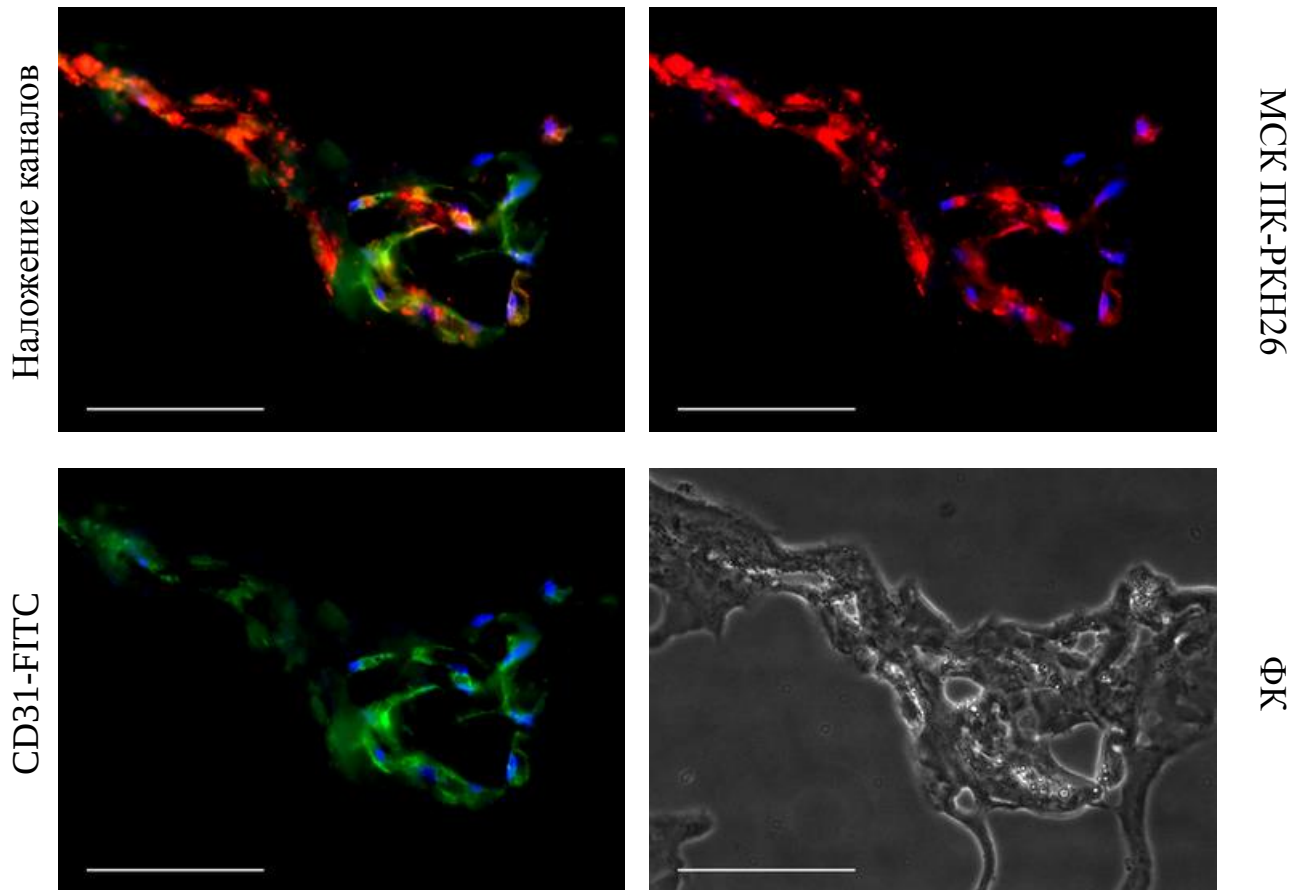


Рисунок 36 – Экспрессия маркера эндотелиоцитов CD31 (зеленый) в МСК ПК (красный) в составе капилляроподобной сети при длительном сокультивировании с эндотелиальными клетками линии EA.hy926 в матриксе базальной мембраны. Ядра клеток докрашены DAPI (синий). Флуоресцентная и фазово-контрастная микроскопия, масштабный отрезок 100 мкм.

В секрете МСК ПК практически отсутствуют растворимые формы основного проангиогенного фактора VEGF-A, при этом кондиционированная МСК ПК среда стимулирует пролиферацию, подвижность и направленную миграцию эндотелиальных клеток линии EA.hy926 *in vitro*. VEGF-A является необходимым, но недостаточным индуктором эндотелиальной дифференцировки МСК ПК при культивировании на стандартной подложке. МСК ПК способны к вторичному спрутингу и дифференцировке в эндотелиоцитоподобные CD31+клетки при длительном сокультивировании с эндотелиальными клетками в матриксе базальной мембраны без воздействия экзогенного VEGF-A.

3.3 Исследование ангиогенных свойств МСК ПК *in vivo* Моделирование ишемии задних конечностей у крыс

Животные удовлетворительно переносили оперативное вмешательство. Смертность составила 0%. В течение 1-2 суток животные полностью исключали оперированную конечность из движения. На 7 сутки крысы активно передвигались, однако иногда подволакивали поврежденную конечность. Развития гангрены не наблюдали.

3.3.2 Трансплантация МСК ПК

Животные удовлетворительно переносили внутримышечную трансплантацию МСК ПК. Введение 1 мл раствора 0,9% NaCl или суспензии клеток не представляло какой-либо технической сложности.

В случае использования клеток, несущих витальную метку PKN26, суспензия приобретала бледно-розовый оттенок. Клетки не образовывали скоплений, введение проходило без каких-либо особенностей.

3.3.3 Тест толерантности к физическим нагрузкам «рота-род»

При использовании теста «рота-род» было отмечено значимое сокращение времени прохождения животными теста после моделирования ишемии в обеих группах. В группе сравнения происходило дальнейшее снижение времени бега (от $20,8 \pm 0,7$ мин сразу после операции до $8,0 \pm 2,4$ мин на 29 сутки). В экспериментальной группе снижение происходило менее интенсивно (от $21,0 \pm 0,6$ мин после операции до $13,2 \pm 1,4$ мин на 29 сутки). Более того, в группе с

введением МСК ПК на 9 и 29 сутки время прохождения теста было достоверно больше, чем в группе сравнения (Рисунок 37).

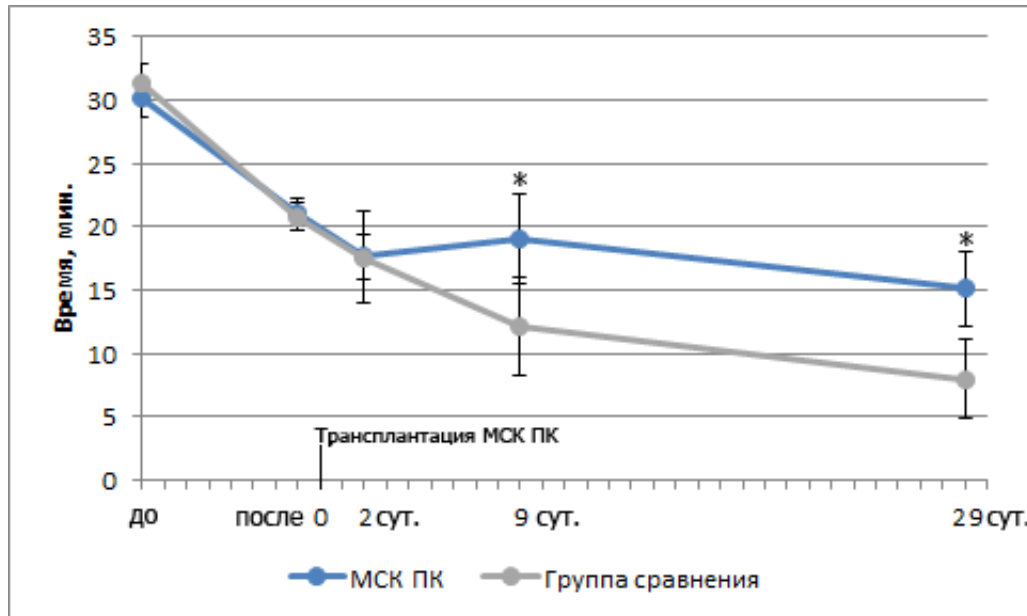


Рисунок 37 – Результаты прохождения крысами теста толерантности к физическим нагрузкам «рота-род»: исходные значения (точка «до»), после моделирования ишемии (точка «после»), на 2, 9 и 29 сутки после трансплантации. Данные представлены в виде арифметических средних и границ 95% доверительных интервалов. * – $p < 0,05$.

3.3.4 Морфометрическое исследование очага ишемического повреждения скелетной мышечной ткани

Повреждение мышечной ткани конечности после моделирования ишемии имело очаговый характер и было локализовано в разных участках икроножных мышц. На гистологических препаратах можно было выявить три зоны в зависимости от степени повреждения: интактная область, перифокальная область, очаг ишемического повреждения.

В неповрежденной мышечной ткани диаметр мышечных волокон и толщина перимизия не изменялись, миосимпласты содержали большое количество ядер по периферии волокна. В перифокальной области чередовались участки неповрежденной мышечной ткани и участки с гипо- и атрофированными мышечными волокнами. Поврежденные волокна имели меньший диаметр при сравнении с нормальными миоцитами и располагались на значительном расстоянии друг от друга вследствие отека и разрастания стромы. (Рисунок 38).

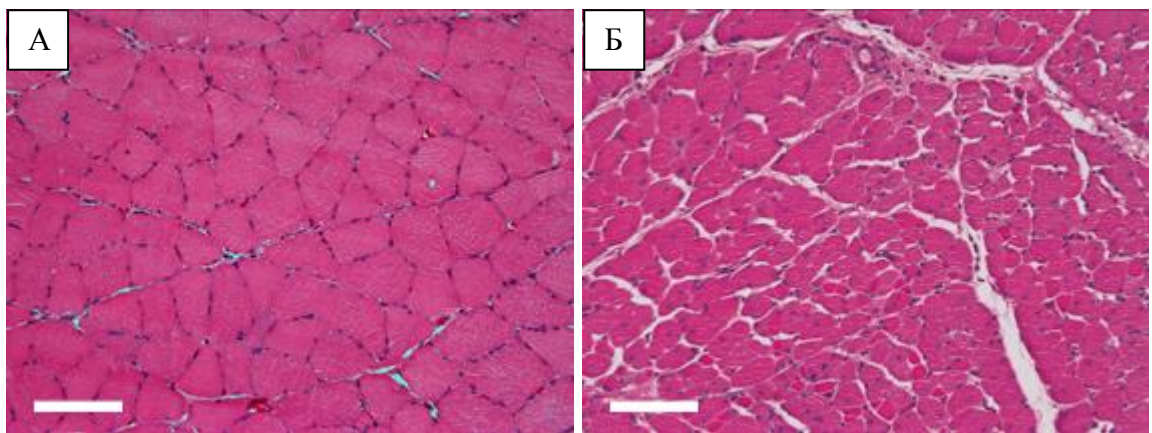


Рисунок 38 – Интактная (а) и перифокальная (б) области скелетной мышечной ткани после моделирования ишемии, 3 сутки после моделирования ишемии. Окрашивание гематоксилином и эозином, масштабный отрезок 100 мкм.

В очаге ишемического повреждения на 3 и 10 сутки после трансплантации (10 и 17 сутки после повреждения) в экспериментальной группе и группе сравнения наблюдали множественный некроз мышечных волокон, верифицируемый по их характерному набуханию и отсутствию ядер по периферии волокон, а также выраженную лимфогистиоцитарную инфильтрацию. На 10 сутки после трансплантации в обеих группах инфильтрация сохранялась вокруг атрофированных и отдельных некротизированных мышечных волокон. На 30 сутки после трансплантации в группе сравнения продолжались процессы некротизации отдельных волокон и диффузной инфильтрации. В группе с

введением МСК ПК поврежденные мышечные волокна были замещены прослойками фиброзной ткани (Рисунок 39).

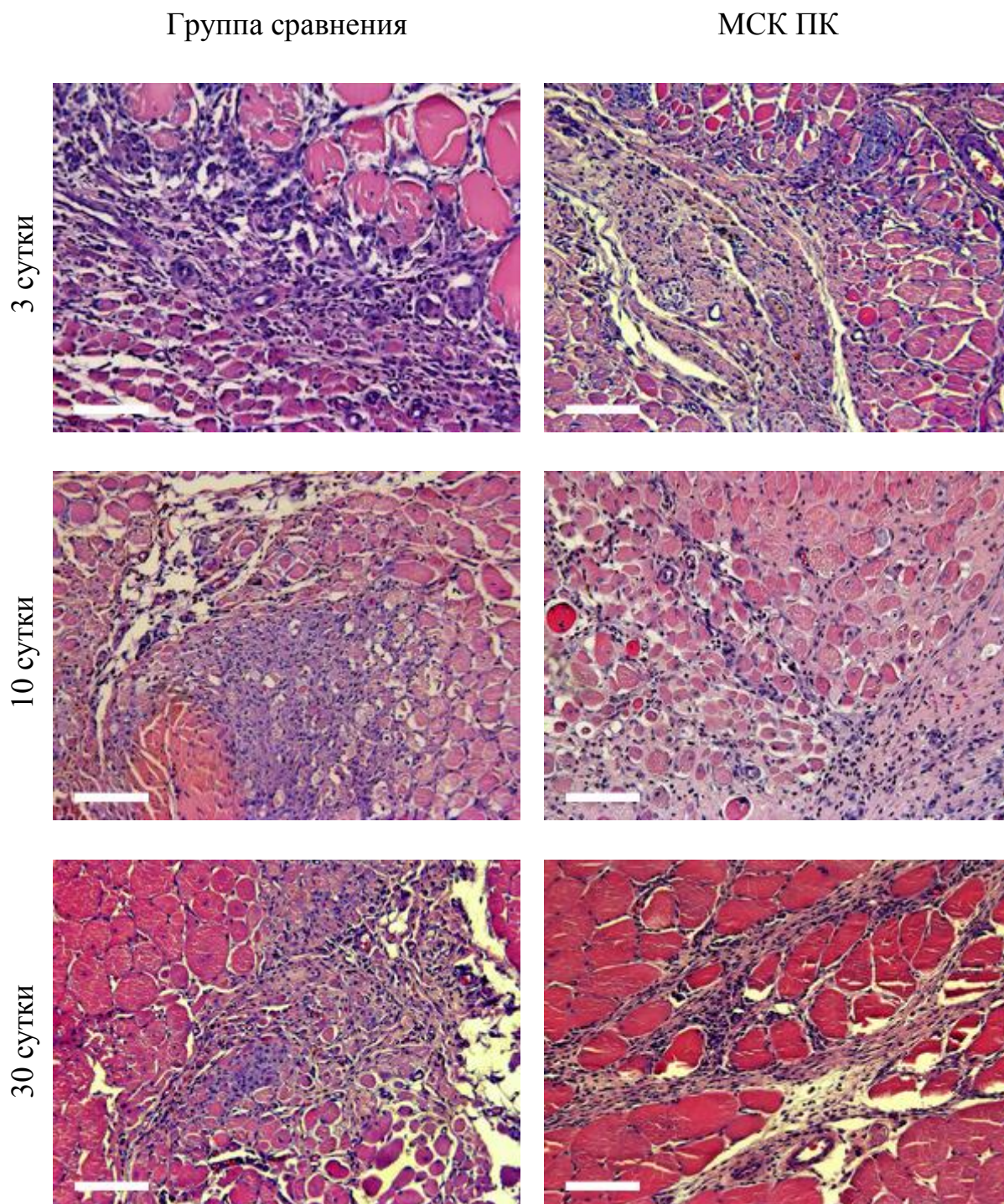


Рисунок 39 – Очаг ишемического повреждения скелетной мышечной ткани, асептическое воспаление. Окрашивание гематоксилином и эозином. Светлопольная микроскопия, масштабный отрезок 100 мкм.

На всех сроках исследования объемная плотность поврежденной ткани (некротизированных и атрофированных мышечных волокон) в группе с введением МСК ПК была статистически значимо меньше, чем в группе сравнения. Были выявлены и различия в динамике: если у контрольных крыс объемная плотность повреждения значимо возрастала к 30 суткам (от $34,93 \pm 0,78\%$ до $40,40 \pm 0,80\%$), то в экспериментальной группе площадь повреждения достоверно возрастала на 10 сутки (от $17,79 \pm 0,62\%$ до $26,93 \pm 0,72\%$), а на 30 сутки статистически значимо снижалась до $20,37 \pm 0,66\%$ (Рисунок 40).

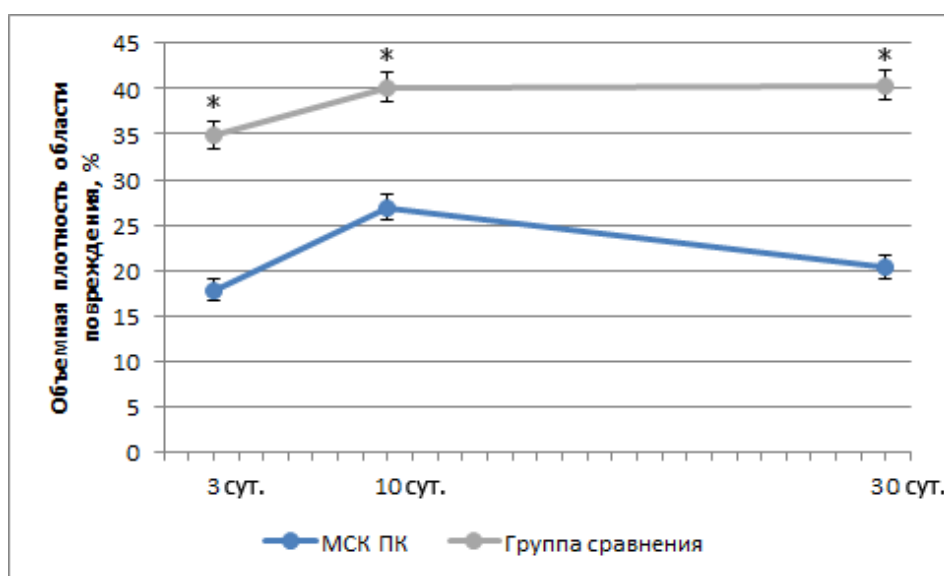


Рисунок 40 – Объемная плотность поврежденной ткани (некротизированных и атрофированных мышечных волокон) на 3, 10 и 30 сутки после трансплантации. Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего. * – $p < 0,05$.

3.3.5 Оценка влияния трансплантации МСК ПК на макрофагальную инфильтрацию в очаге повреждения ишемизированной ткани

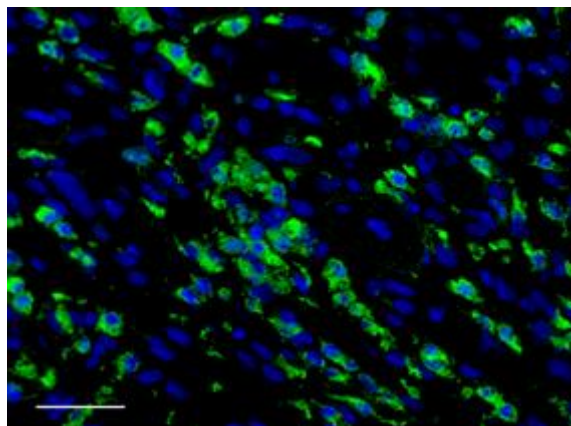
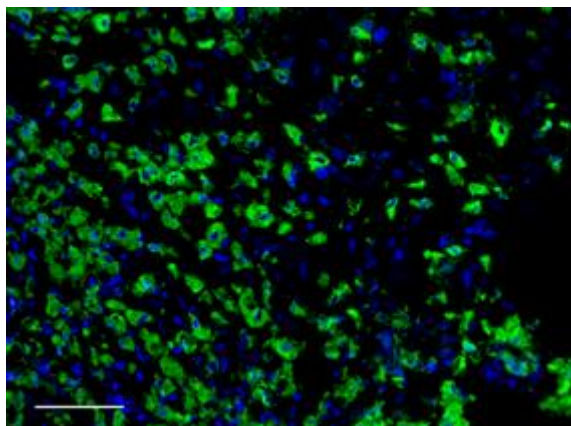
На криосрезах после иммуногистохимического окрашивания в очаге ишемического повреждения можно было четко визуализировать клетки, экспрессировавшие маркер макрофагов CD68; форма этих клеток варьировала от округлой до веретеновидной. В группе сравнения на 3 сутки после трансплантации (10 сутки после моделирования ишемии) доля CD68+ клеток в очаге повреждения была очень высокой и достигала $56,22 \pm 5,46\%$. В группе с введением МСК ПК на том же сроке доля CD68+клеток ($45,30 \pm 2,38\%$) была достоверно ниже, чем в группе сравнения. Интенсивность макрофагальной инфильтрации постепенно снижалась в обеих группах, при этом доли CD68+клеток на 10 и 30 сутки не отличались между группами (Рисунок 41).

А

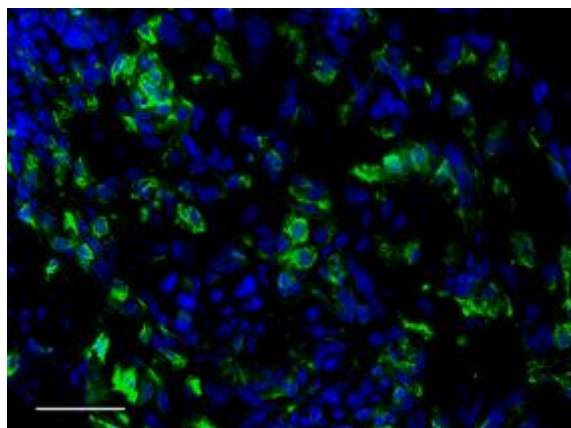
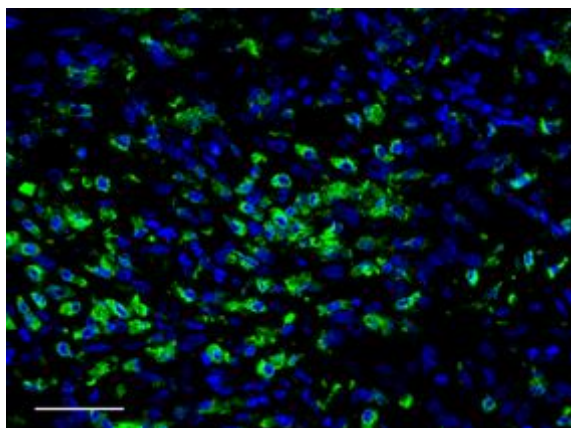
Группа сравнения

МСК ПК

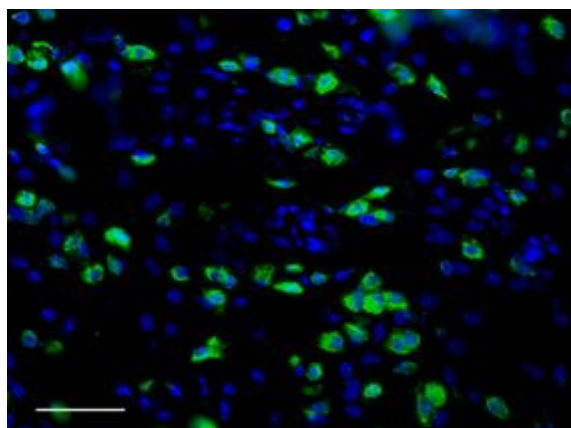
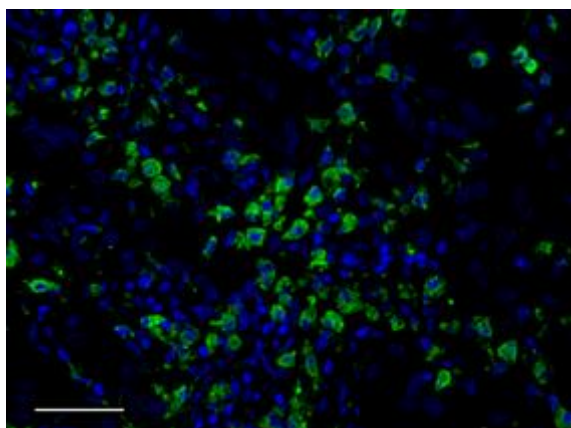
3 сутки



10 сутки



30 сутки



Б

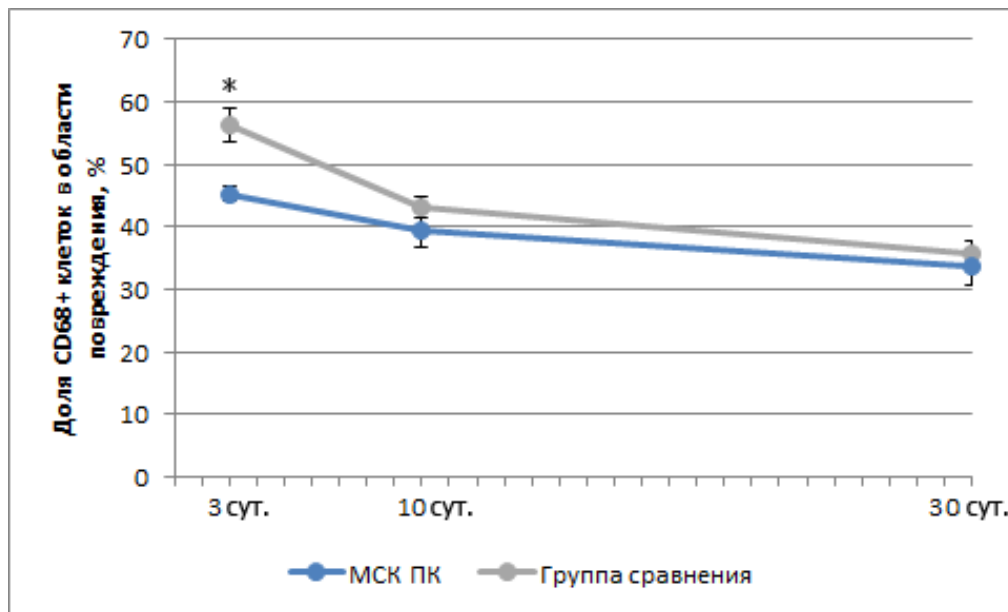


Рисунок 41 – Инфильтрация очага ишемического повреждения скелетной мышечной ткани CD68+клетками на 3, 10 и 30 сутки после трансплантации. (а) – CD68+клетки (зеленый) в очаге ишемического повреждения. Ядра клеток докрашены DAPI (синий). Флуоресцентная микроскопия, масштабный отрезок 50 мкм. (б) – Количественная оценка доли CD68+клеток в очаге ишемического повреждения. Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего.* – $p < 0,05$.

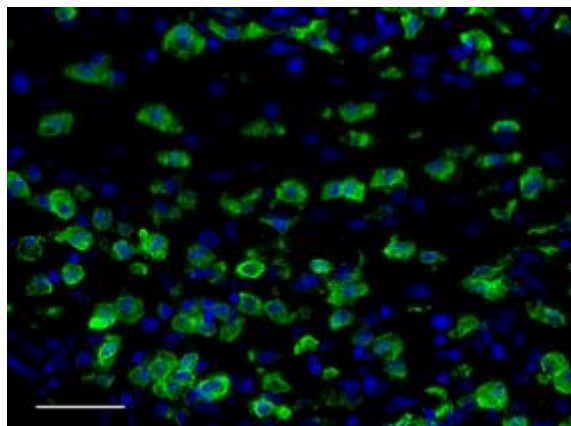
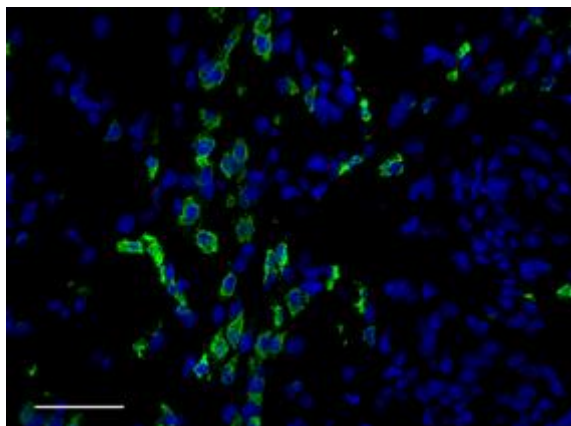
В очаге ишемического повреждения скелетной мышечной ткани также присутствовали крупные клетки округлой формы, экспрессировавшие маркер альтернативно активированных M2a и M2c макрофагов CD206 [Gensel J.C., Zhang B., 2015]. В группе сравнения доля CD206+клеток имела тенденцию к росту ($25,68 \pm 3,28\%$ на 3 сутки после введения и $29,38 \pm 3,11$ на 30 сутки), не достигая, однако, статистически значимых отличий. В группе с введением МСК ПК на 3 сутки было выявлено значимое увеличение доли M2 макрофагов до $42,05 \pm 2,77\%$. Тенденция при этом была обратной: на 10 сутки в группе с введением МСК ПК доля M2 макрофагов снижалась, но все же оставалась достоверно выше, чем в группе сравнения ($33,33 \pm 3,06\%$ против $26,34 \pm 3,5\%$), а на 30 сутки отличий между группами выявлено уже не было (Рисунок 42).

А

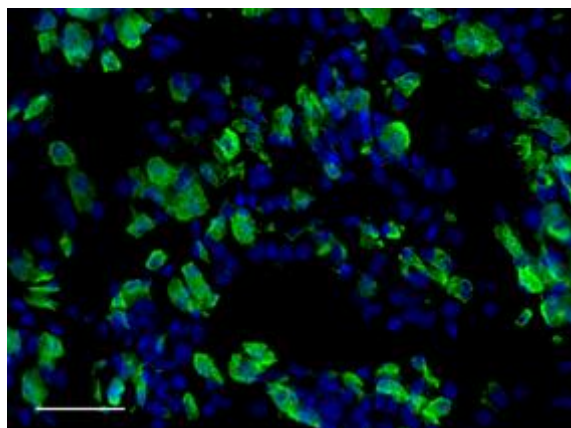
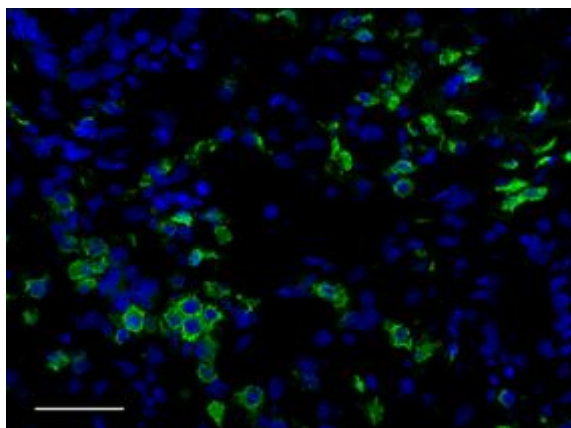
Группа сравнения

МСК ПК

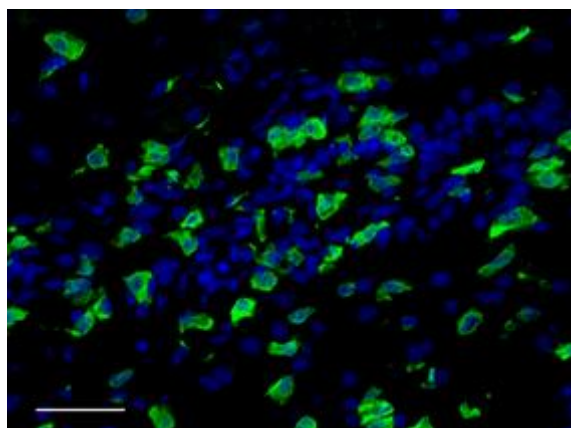
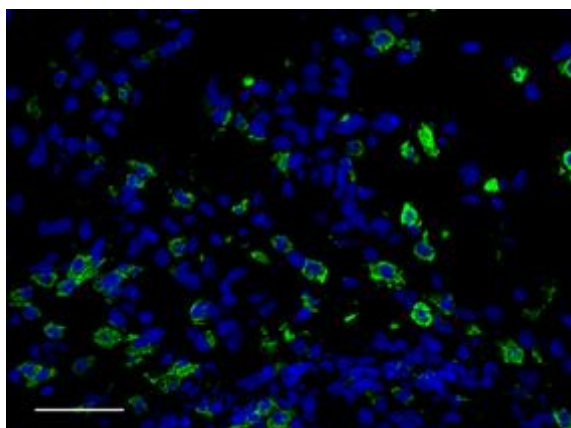
3 сутки



10 сутки



30 сутки



Б

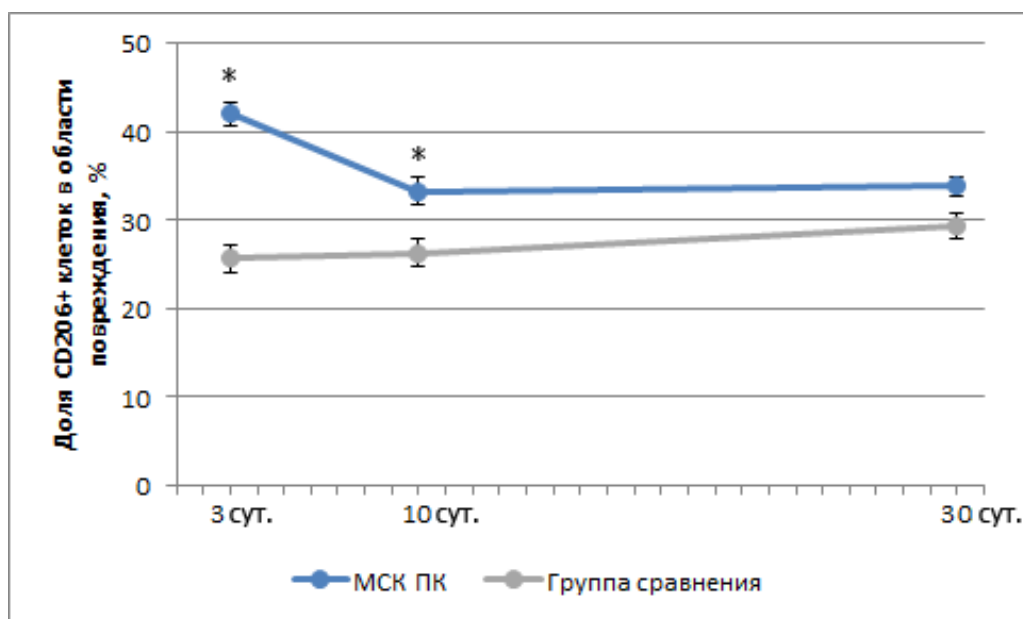


Рисунок 42 – Инфильтрация очага ишемического повреждения скелетной мышечной ткани CD206+клетками на 3, 10 и 30 сутки после трансплантации. (а) – CD206+клетки (зеленый) в очаге ишемического повреждения. Ядра клеток докрашены DAPI (синий). Флуоресцентная микроскопия, масштабный отрезок 50 мкм. (б) – Количественная оценка доли CD206+клеток в очаге ишемического повреждения. Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего. * – $p < 0,05$.

3.3.6 Морфометрическое исследование ангиогенеза в очаге ишемического повреждения скелетной мышечной ткани

Иммуногистохимическое окрашивание на маркер эндотелиоцитов CD31 позволило хорошо визуализировать сосуды микроциркуляторного русла (артериолы, венулы, капилляры) в очаге повреждения (Рисунок 43).

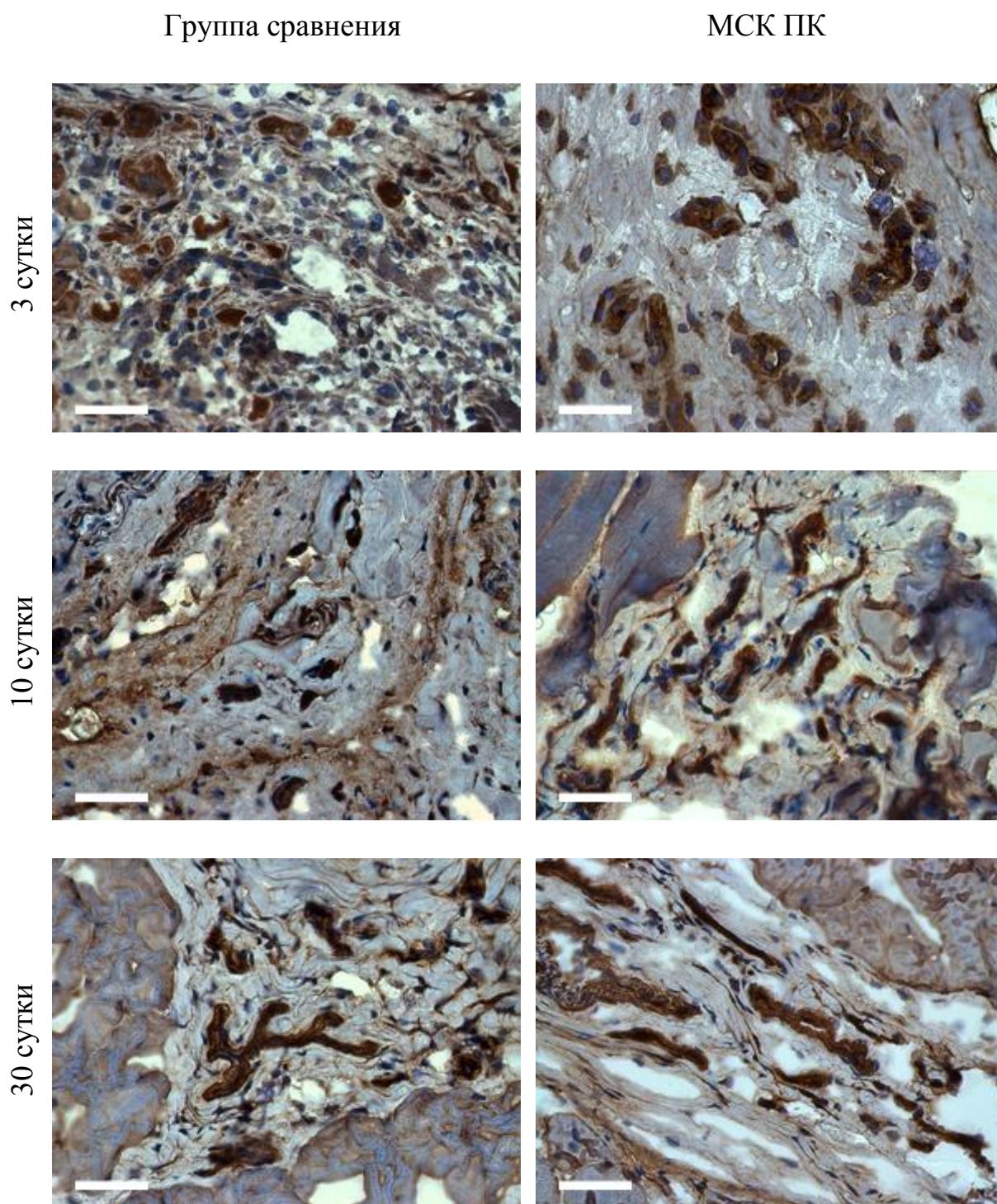


Рисунок 43 – Кровеносные сосуды в очаге ишемического повреждения скелетной мышечной ткани на 3, 10 и 30 сутки после трансплантации. Иммуногистохимическое окрашивание на маркер эндотелиоцитов CD31 (темно-коричневый). Ядра клеток докрашены гематоксилином. Светлопольная микроскопия, масштабный отрезок 50 мкм.

Количество и объемная плотность сосудов микроциркуляторного русла значительно не отличались между группами на 3 сутки после трансплантации. На 10 сутки в группе с введением МСК ПК и количество сосудов, и их объемная плотность были значимо выше, чем в группе сравнения: $429,4 \pm 44,6$ на 1 мм^2 против $234,0 \pm 19,1$ на 1 мм^2 , $10,8 \pm 1,1\%$ против $6,2 \pm 1,2\%$ соответственно. При этом на 30 сутки после трансплантации статистически значимая разница по этим показателям между группами снова отсутствовала (Рисунки 44 и 45).

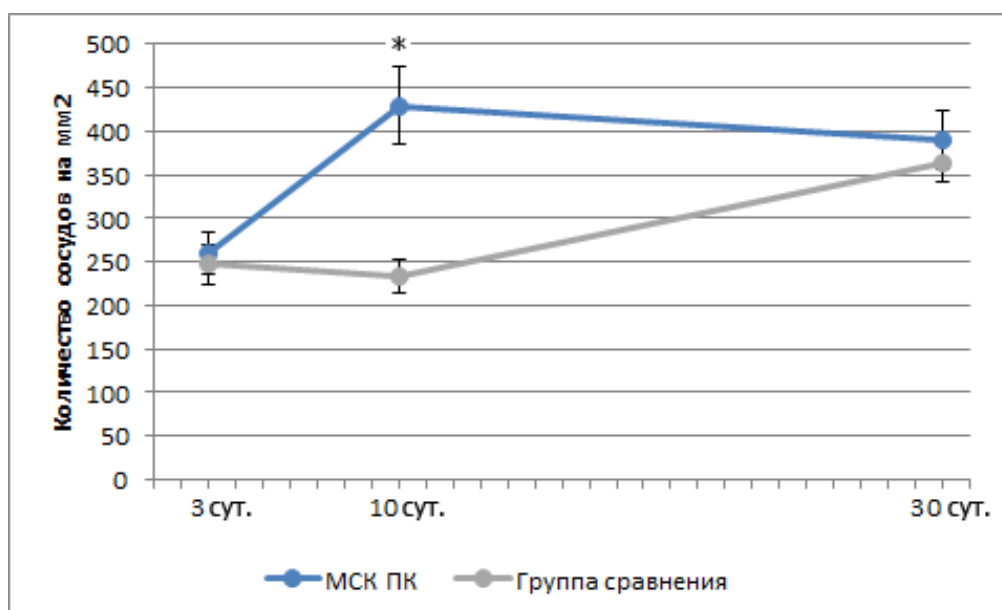


Рисунок 44 – Количество сосудов микроциркуляторного русла в пересчете на 1 мм^2 в очаге ишемического повреждения скелетной мышечной ткани на 3, 10 и 30 сутки после трансплантации. Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего. * – $p < 0,05$.

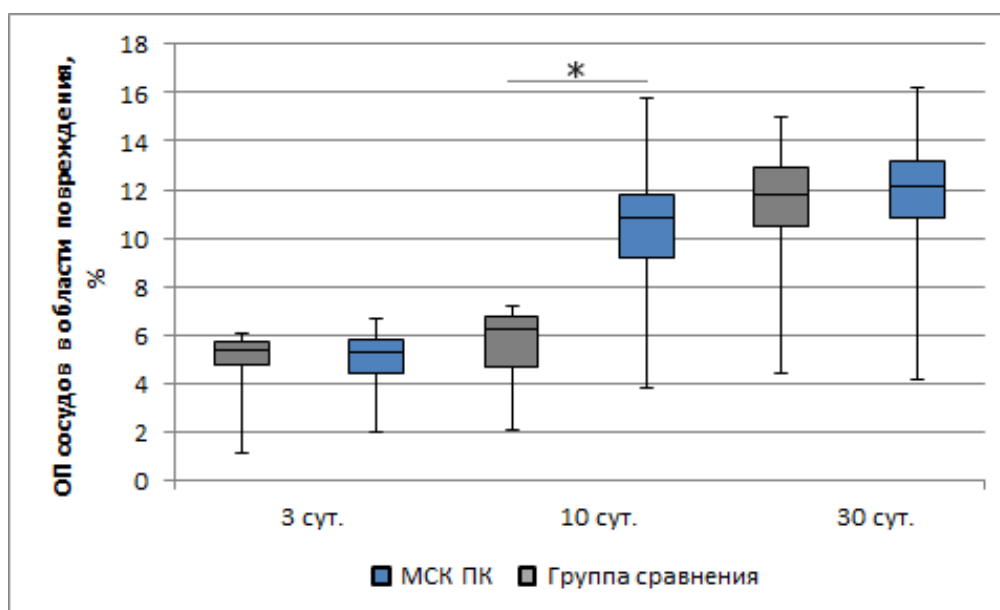


Рисунок 45 – Объемная плотность сосудов микроциркуляторного русла в очаге ишемического повреждения скелетной мышечной ткани на 3, 10 и 30 сутки после трансплантации. Данные представлены в виде min, Q1, Me, Q3, max. * – $p < 0,05$.

3.3.7 Исследование распределения трансплантированных МСК ПК в ишемизированной ткани

После процедуры витального мечения маркером RKN26 во всех клетках наблюдали появление свечения мембранных органелл клетки с максимумом эмиссии 567 нм. Внедрение метки не влияло на способность клеток к пролиферации, при этом флуоресцирующие частицы равномерно распределялись по дочерним клеткам (Рисунок 46). Сохранность детектируемого уровня метки RKN26 в МСК ПК была подтверждена при культивировании в течение 30 суток (максимальный срок эксперимента *in vivo*).

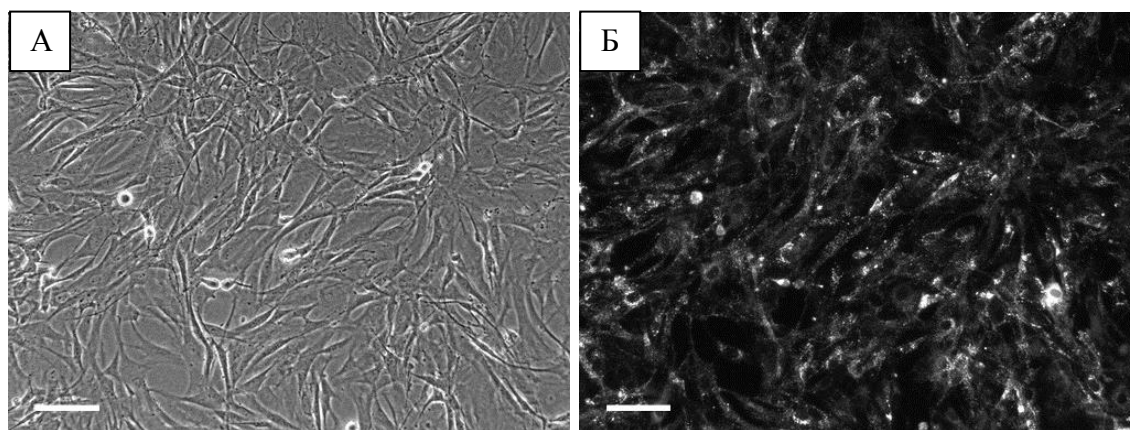


Рисунок 46 – Внешний вид культуры МСК ПК крысы после витального мечения трейсером РКН26. Прижизненная съемка. Фазово-контрастная (а) и флуоресцентная (б) микроскопия, масштабный отрезок 100 мкм.

На 3 сутки после трансплантации в очаге повреждения хорошо визуализировались скопления меченых клеток – треки введения. РКН26+клетки располагались как в центре, так и у самой границы очага повреждения, вблизи сохраненных мышечных волокон. На 10 сутки на отдельных участках были также видны скопления меченых клеток, однако большей частью их распределение становилось диффузным, а часть клеток располагалась в перимизии мышечных волокон перифокальной зоны. На 30 сутки после введения РКН26+клетки были локализованы в соединительнотканых прослойках и перимизии (Рисунки 47 и 48).

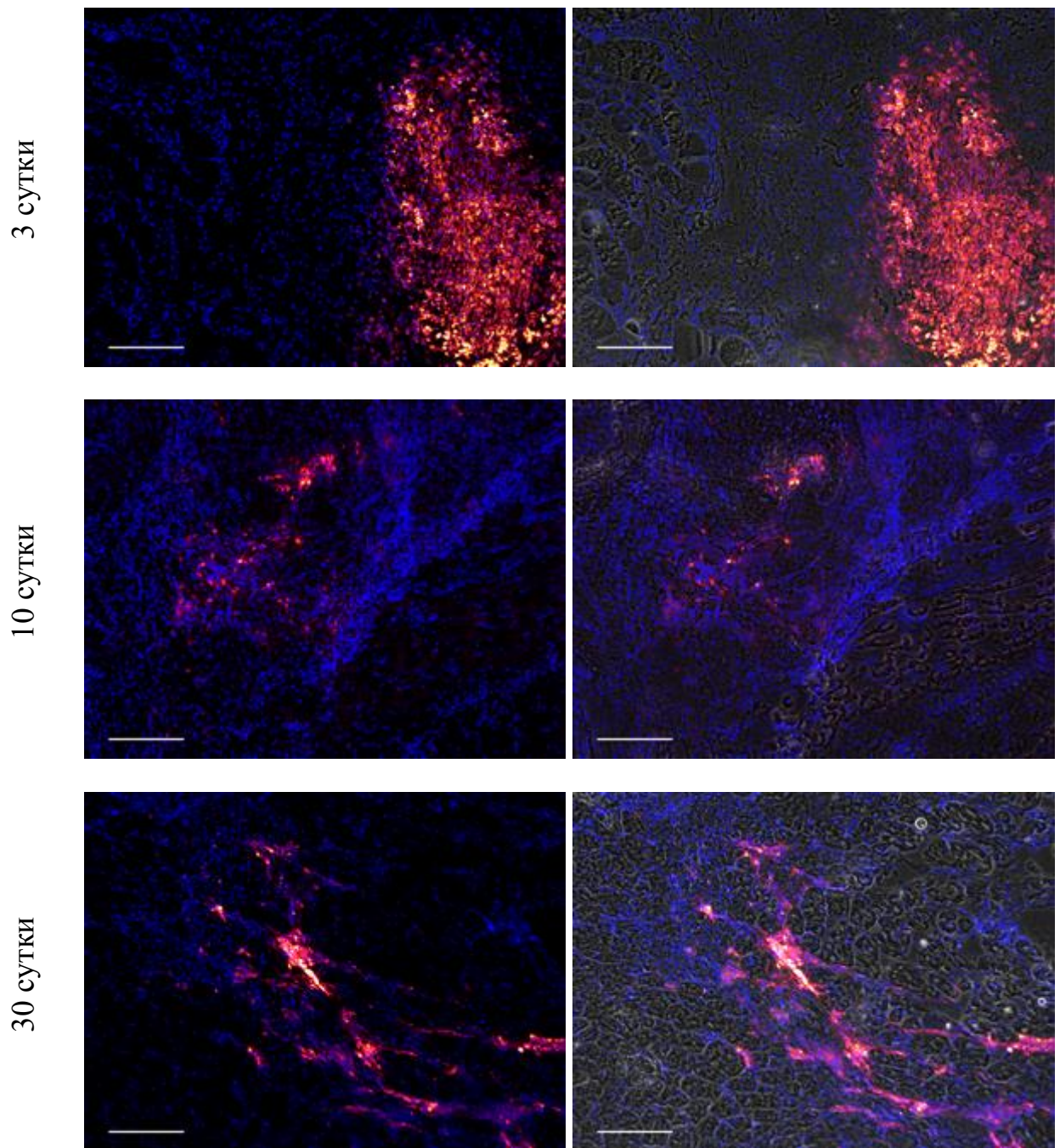


Рисунок 47 – Распределение МСК ПК, меченных PKH26 (оранжево-красный), в очаге ишемического повреждения скелетной мышечной ткани на 3, 10 и 30 сутки после трансплантации. Ядра клеток докрашены DAPI (синий). Совмещение флуоресцентной и фазово-контрастной микроскопии, масштабный отрезок 200 мкм.

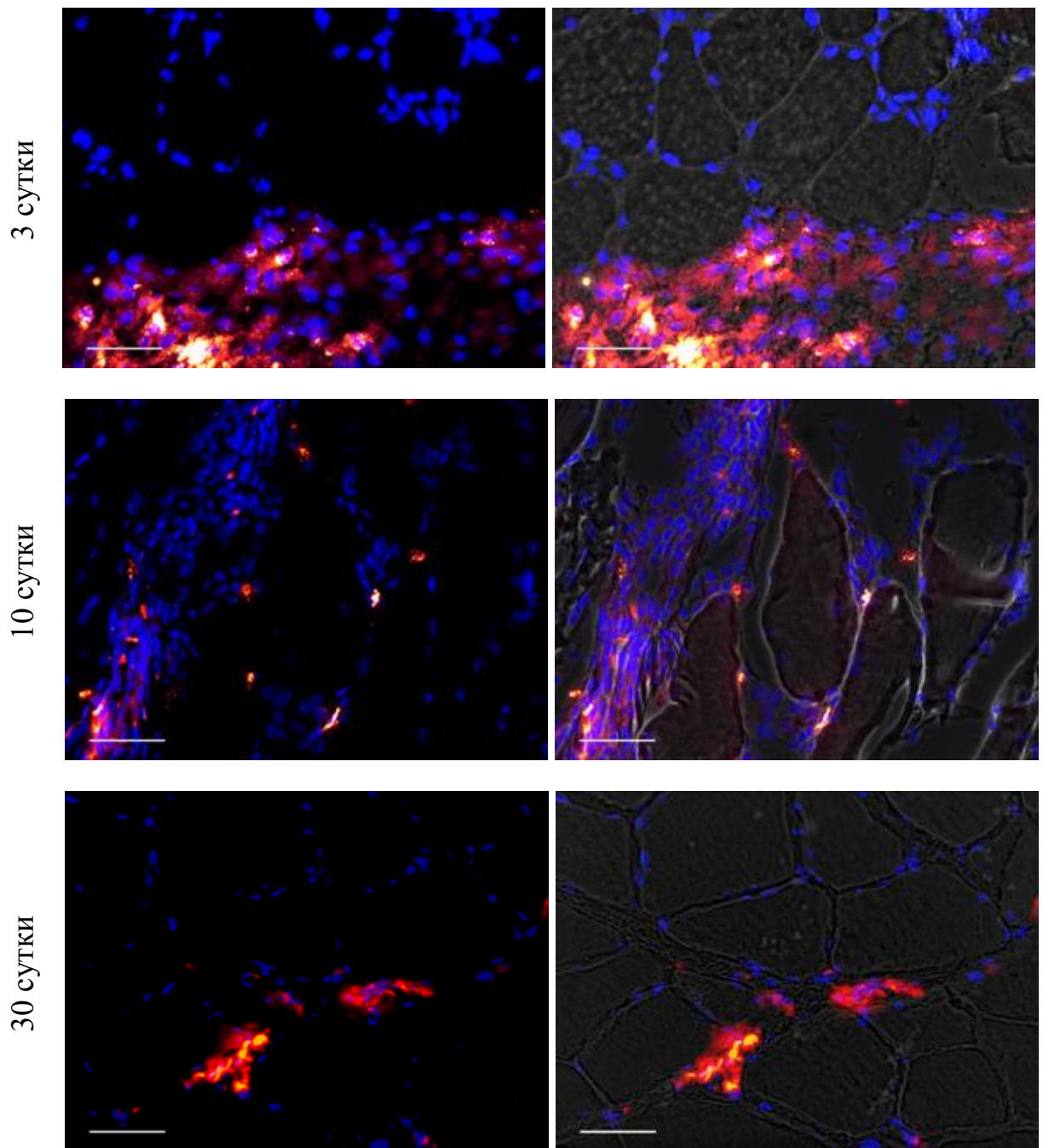
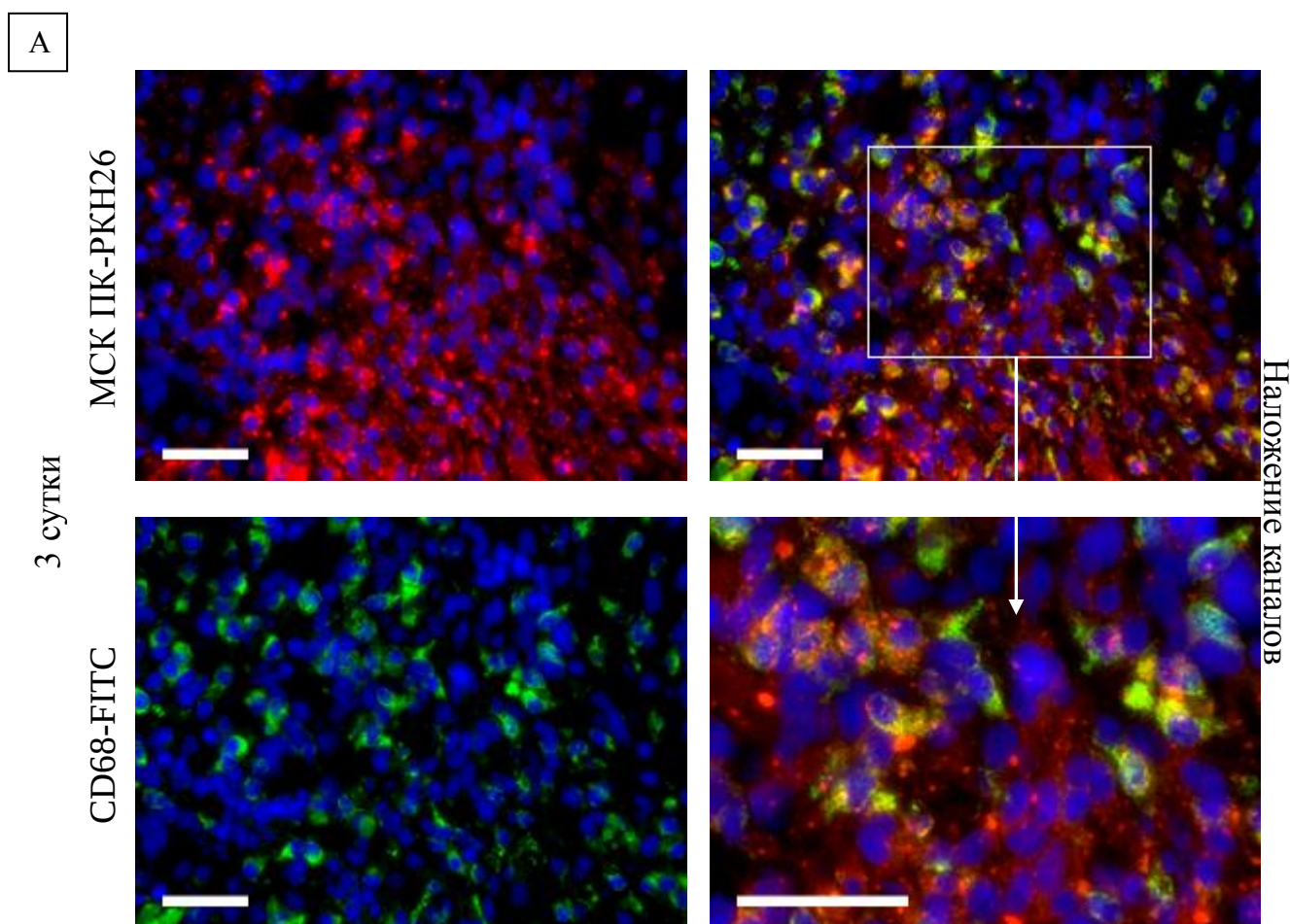
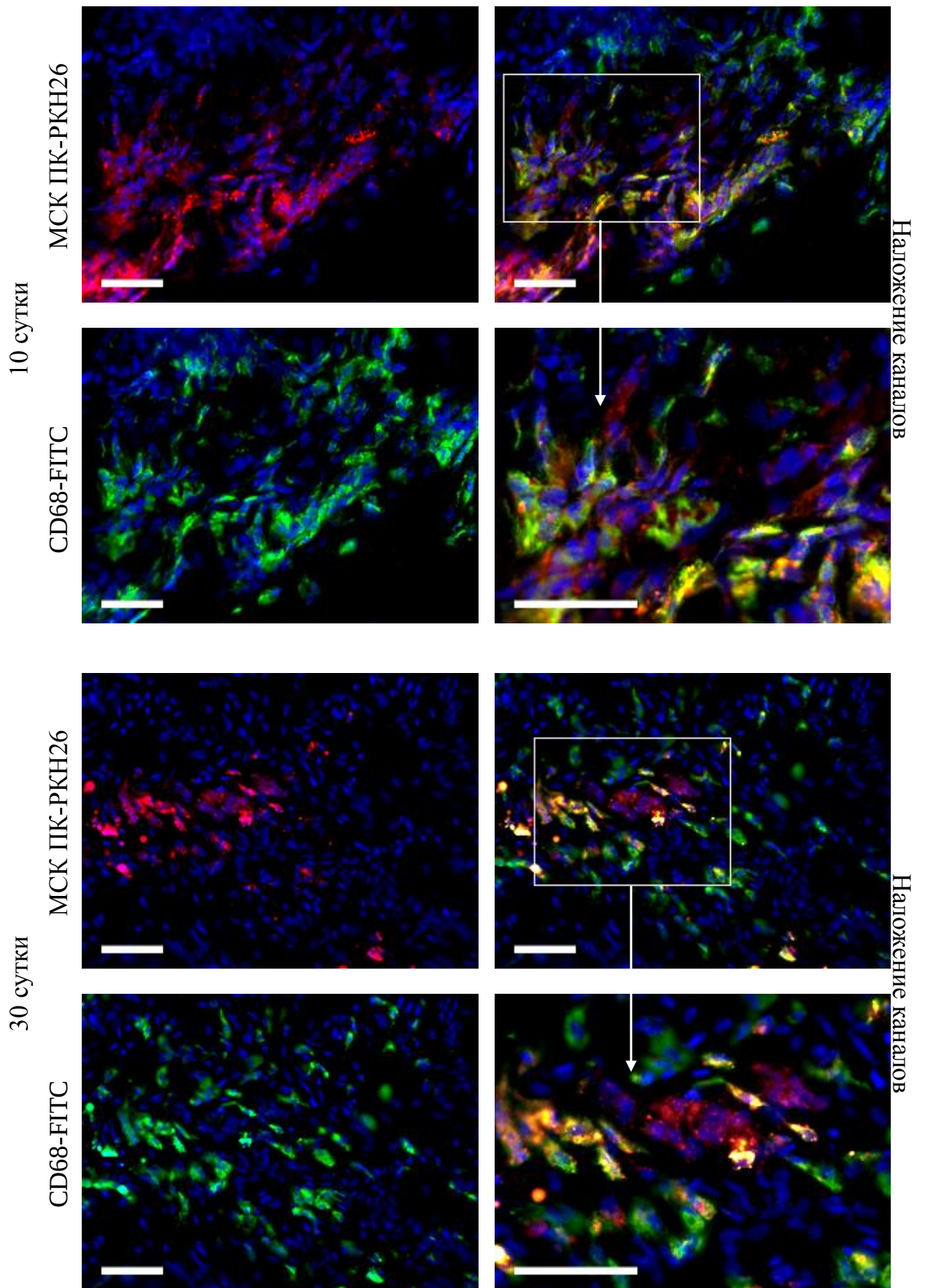


Рисунок 48 – Локализация МСК ПК, меченных PKH26 (оранжево-красный), вблизи мышечных волокон на 3, 10 и 30 сутки после трансплантации. Ядра клеток докрашены DAPI (синий). Совмещение флуоресцентной и фазово-контрастной микроскопии, масштабный отрезок 50 мкм.

3.3.8 Исследование элиминации трансплантированных МСК ПК в ишемизированной ткани

При иммуногистохимическом окрашивании криосрезов с антителами к маркеру макрофагов CD68 было выявлено, что часть меченых клеток имели фенотип PKN26+CD68+, т.е. метка, встроенная в мембраны аллогенных МСК ПК, попадала в резидентные макрофаги. Доля CD68+клеток среди всех PKN26+клеток значительно возрастала с $48,1 \pm 3,2\%$ на 3 сутки до $76,2 \pm 3,9\%$ на 30 сутки после трансплантации (Рисунок 49).





Б

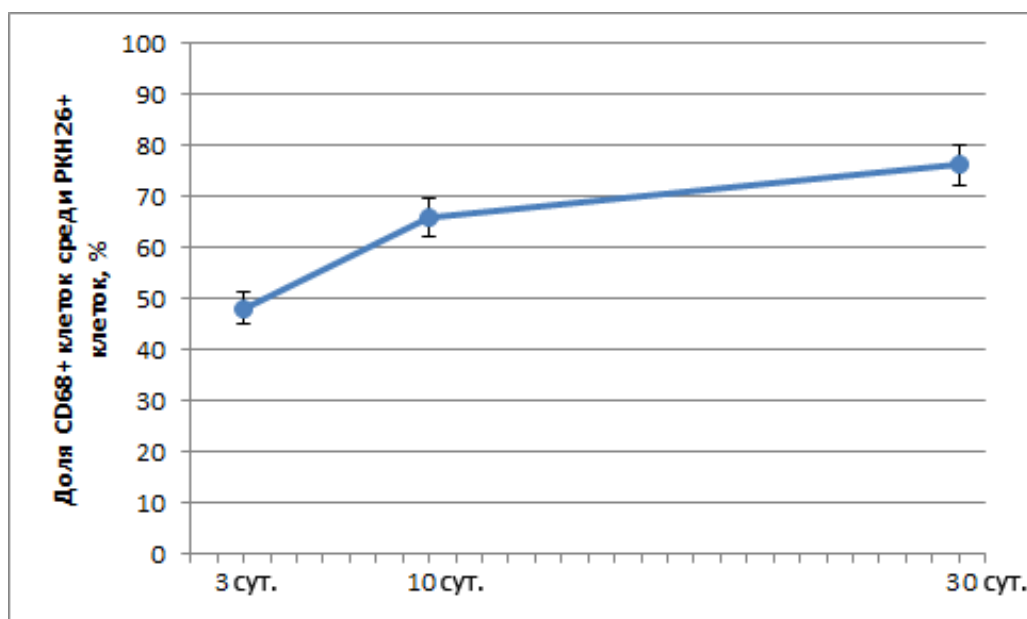


Рисунок 49 – Элиминация трансплантированных МСК ПК резидентными макрофагами. (а) – Появление метки RKN26 (красный) в CD68+клетках (зеленый) в очаге ишемического повреждения скелетной мышечной ткани на 3, 10 и 30 сутки после трансплантации. Ядра клеток докрашены DAPI (синий). Флуоресцентная микроскопия, масштабный отрезок 50 мкм. (б) – Количественная оценка доли CD68+клеток среди всех клеток, несущих витальную метку RKN26. Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего.

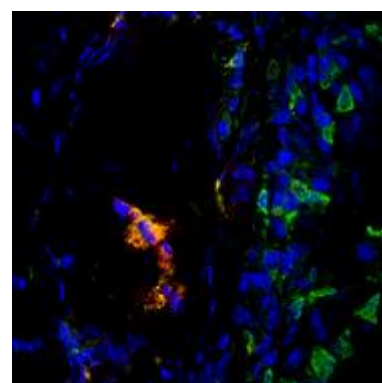
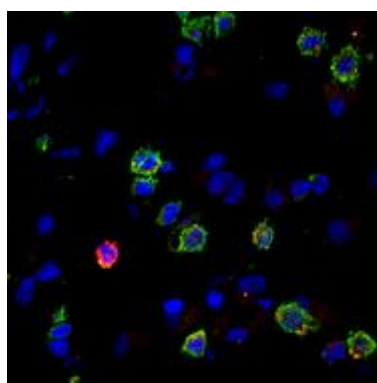
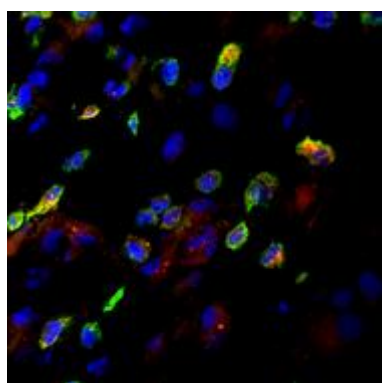
Проведенный колокализационный анализ подтвердил значимое увеличение МОС (коэффициента наложения Мандерса) с $0,70 \pm 0,03$ на 3 сутки после введения клеток до $0,86 \pm 0,04$ на 30 сутки (Рисунок 50).

А

3 сутки

10 сутки

30 сутки



Б

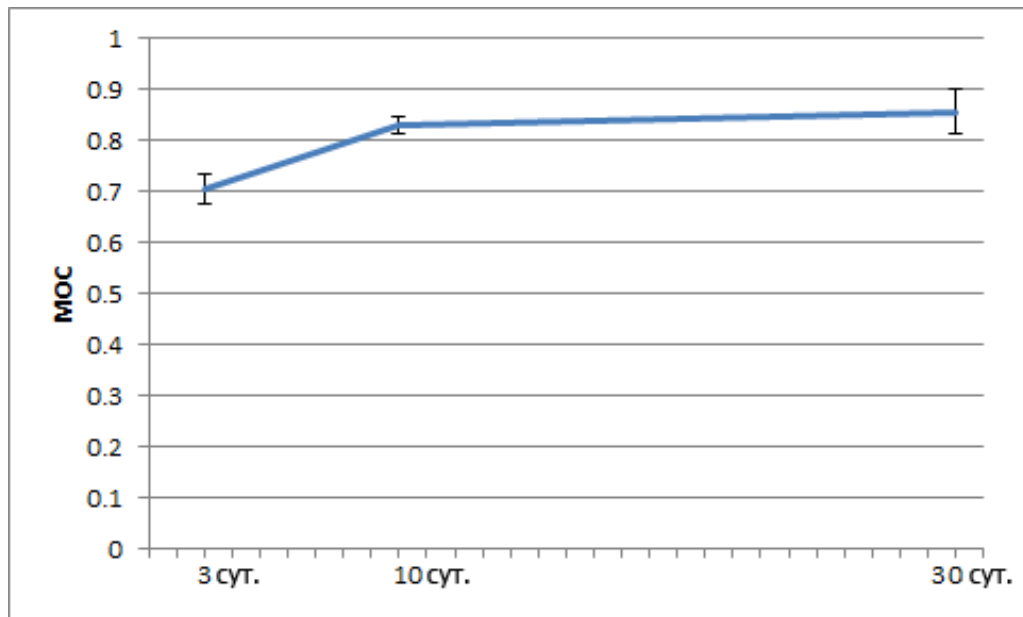


Рисунок 50 – Колокализация метки РКН26 и флуорохрома FITC при окрашивании криосрезов на маркер макрофагов CD68. (а) – Появление метки РКН26 (красный) в CD68+ клетках (зеленый) в очаге ишемического повреждения скелетной мышечной ткани на 3, 10 и 30 сутки после трансплантации. Ядра клеток докрашены DAPI (синий). Конфокальная микроскопия, $\times 400$. (б) – Результаты колокализационного анализа. Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего.

3.3.9 Оценка дифференцировки трансплантированных МСК ПК в эндотелиальном направлении

Иммуногистохимическое исследование показало, что основным источником VEGF в ишемизированной скелетной мышечной ткани были сохраненные мышечные волокна (Рисунок 51).

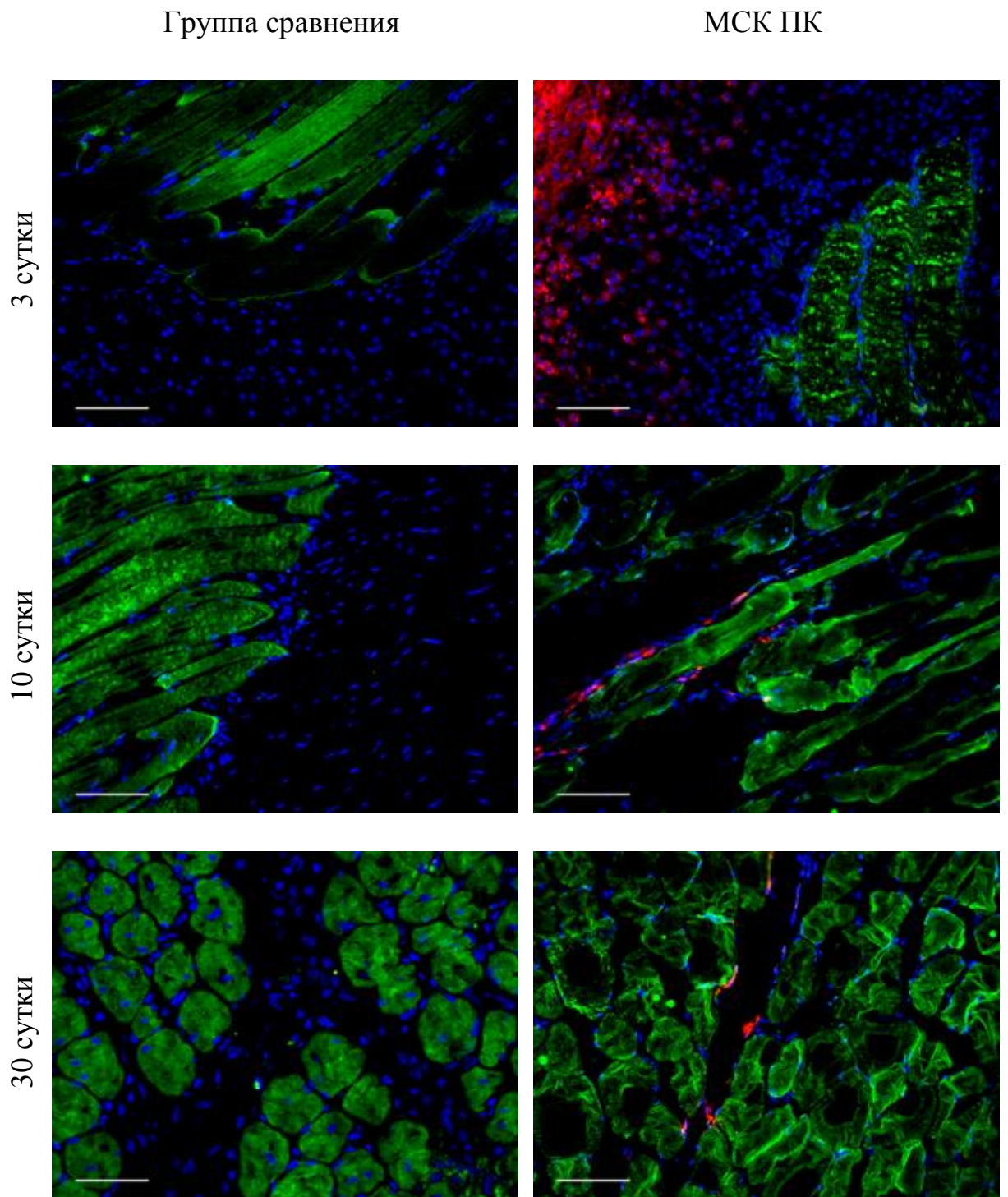


Рисунок 51 – Экспрессия VEGF (зеленый) в скелетных мышечных волокнах. МСК ПК несут метку PKH26 (красный). Ядра клеток докрашены DAPI (синий). Флуоресцентная микроскопия, масштабный отрезок 100 мкм.

Метка РКН26 отсутствовала в составе стенок капилляров или более крупных кровеносных сосудов на всех сроках эксперимента (Рисунки 52 и 53). При этом часть РКН26+ клеток сохраняла экспрессию α SMA (Рисунок 53).

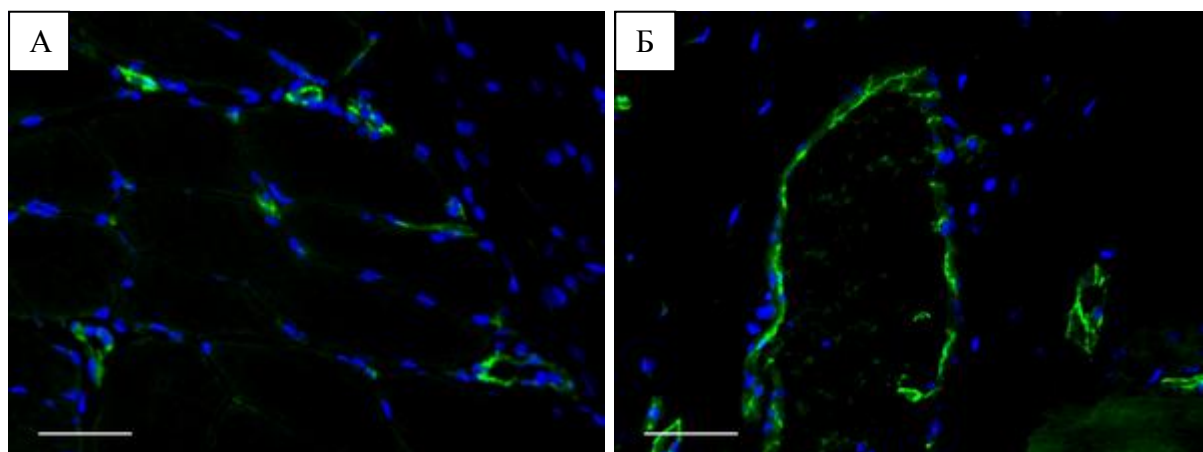
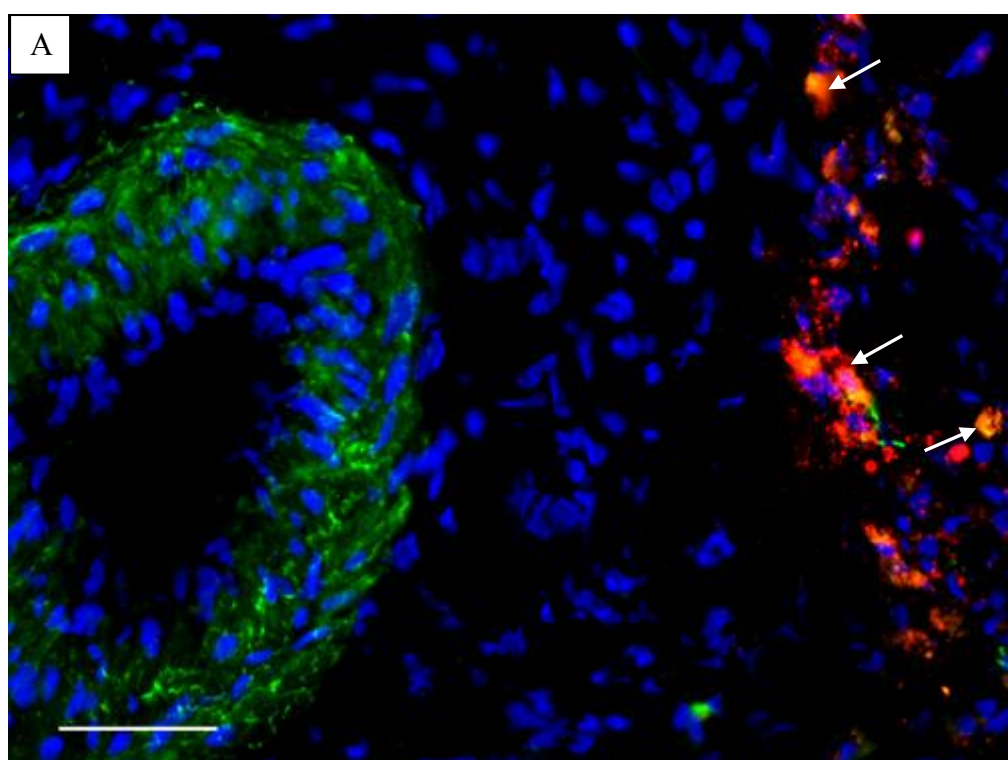


Рисунок 52 – Отсутствие МСК ПК-РКН26 в составе стенок капилляров (а) и кровеносных сосудов большего калибра (б), окрашенных с антителами к CD31 (зеленый). 30 сутки после трансплантации. Ядра клеток докрашены DAPI (синий). Флуоресцентная микроскопия, масштабный отрезок 50 мкм.



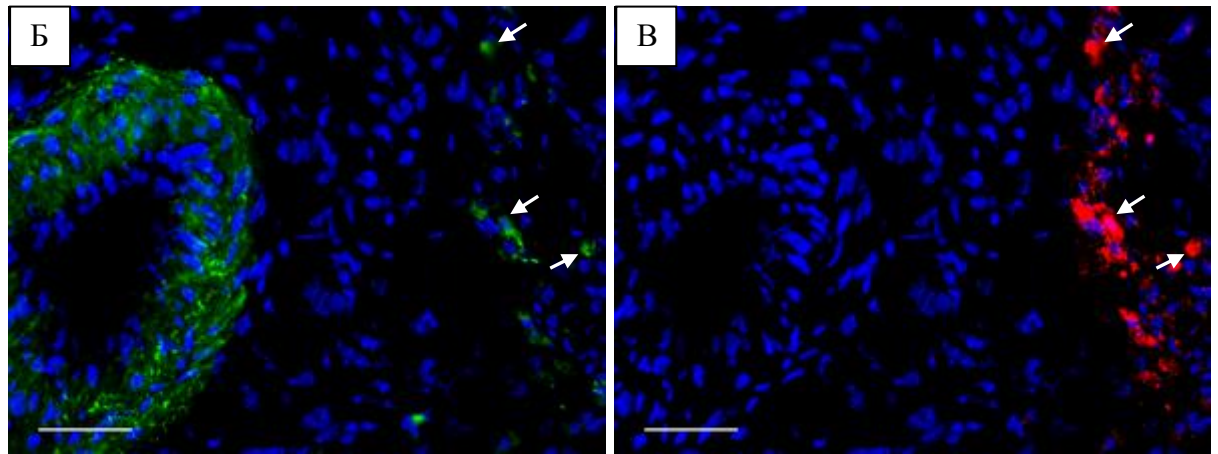


Рисунок 53 – Отсутствие МСК ПК-РКН26 (красный) в составе стенок кровеносных сосудов, окрашенных с антителами к α SMA (зеленый). 30 сутки после трансплантации. (а) – Наложение каналов. (б) – Зеленый и синий каналы. (в) – Красный и синий каналы. Стрелками указаны РКН26+ α SMA+ клетки. Ядра клеток докрашены DAPI (синий). Флуоресцентная микроскопия, масштабный отрезок 50 мкм.

Исечение бедренной и подколенной артерий у крыс приводило к развитию инфаркта скелетных мышц с выраженной макрофагальной инфильтрацией и последующим формированием рубца. В группе животных с введением МСК ПК время прохождения теста толерантности к физическим нагрузкам «рота-род» было выше, а объемная плотность ишемического повреждения ниже, чем в группе сравнения. Введение МСК ПК стимулировало М2 активацию макрофагов и образование кровеносных сосудов в очаге ишемического повреждения. Иммунная система реципиента распознавала и элиминировала аллогенные МСК ПК. Часть клеток выживала в течение 30 суток после трансплантации, однако введенные клетки не дифференцировались в эндотелиальные или гладкомышечные клетки кровеносных сосудов.

4 ОБСУЖДЕНИЕ

Под термином «МСК пупочного канатика» исследователи подразумевают клеточные культуры, выделенные из различных участков пуповины – вартонова студня (в этом случае в англоязычной литературе используют определение WJ-MSCs, Wharton's Jelly-derived MSCs), периваскулярной области (PV-MSCs, Perivascular Zone-derived MSCs), субэндотелиального слоя (SE-MSCs, Subendothelial Layer-derived MSCs), амниотической оболочки (AM-MSCs, Amnion-derived MSCs) или пуповины целиком (wUC-MSCs, whole Umbilical Cord-derived MSCs). Проведенный анализ литературных данных показал, что именно вартонов студень является оптимальным источником для выделения клеток, которые полностью соответствуют всем требованиям, предъявляемым к МСК, и обладают наиболее высоким терапевтическим потенциалом [Conconi et al., 2011; Subramanian et al., 2015].

В вартоновом студне пуповины человека клетки расположены редко, они окружены значительным количеством аморфного межклеточного вещества, обеспечивающего ригидность пуповины (Рисунки 3-5), поэтому для выделения первичной культуры был выбран ферментативный метод, эффективность которого составила 100% (Рисунки 10 и 11).

Вартонов студень не содержит капилляров (Рисунок 6) и CD146+клеток (Рисунок 6). Некоторые исследователи считают экспрессию CD146 одним из признаков «стволовости» (англ. “stemness”) клеточной культуры [Lv F.J. et al., 2014; Jin et al., 2016]. Однако по данным литературы экспрессия CD146 характерна для многих клеточных типов: эндотелиальных клеток (независимо от размера и анатомического расположения кровеносного сосуда), перицитов, гладкомышечных клеток, клеток промежуточного трофобласта, эпителиальных клеток молочных желез [Li Q. et al., 2003]. Данные об уровне экспрессии CD146 в МСК ПК достаточно противоречивы [Can, Karahuseyinoglu, 2007; Bongso, Fong, 2013; Batsali et al., 2013; El Omar et al., 2014], что может быть связано с выбором

способа выделения МСК. Первичные культуры, выделенные из субэндотелиального слоя или периваскулярной зоны пупочного канатика, будут обогащены CD146+ клетками, в то время как выделенные из вартонова студня культуры будут содержать лишь примесные CD146+клетки [Margossian et al., 2012]. Таким образом, отсутствие CD146+клеток в исследованных культурах МСК ПК является закономерным.

Строение пупочного канатика крысы во многом отличается от пуповины человека: маленький размер, низкая ригидность, переменное количество кровеносных сосудов (от 3 до 7), высокая плотность распределения клеток в интерваскулярной строме (Рисунки 8 и 9). После очищения ткани от кровеносных сосудов оставалось очень небольшое количество материала, поэтому для выделения первичной культуры был выбран метод эксплантов (Рисунки 12 и 13), эффективность которого составила также 100%.

В отличие от результатов других исследователей, работавших с эксплантами пупочных канатиков человека, козы или свиньи, не было обнаружено деления первичной культуры на субпопуляции, отличающихся по значению ядерно-цитоплазматического индекса, размеру и морфологии, или формирования клеточных скоплений на стадии конфлюэнтного монослоя [Mitchell et al., 2003; Carlin et al., 2006; Majore et al., 2009; Azari et al., 2011]. Кроме того, активное прикрепление клеток к пластику происходило значительно раньше, чем указано для эксплантов пупочных канатиков крупных млекопитающих (1 сутки по сравнению с 5-10 сутками) [Petsa et al., 2009; Majore et al., 2009; Majore et al., 2011]. Высокая скорость миграции клеток из эксплантов может быть связана именно с особенностями строения пупочного канатика крысы по сравнению с пуповиной крупных плацентарных животных: высокая плотность клеток и минимальное количество межклеточного вещества, которое могло бы препятствовать их движению.

Для верификации принадлежности к МСК культур, выделенных из пупочного канатика человека или крысы, в соответствии с требованиями ISCT [Dominici et al., 2006] были проведены исследования, подтверждающие их

способность к росту на пластиковой подложке без использования фидерного слоя или покрытия белками, специфический профиль экспрессии поверхностных антигенов, способность к дифференцировке в адипогенном, хондрогенном или остеогенном направлении *in vitro* под действием индукторов (Рисунки 14-17).

Особое внимание было уделено маркеру CD105 (эндоглин, белок комплекса рецептора к TGFβ): в соответствии с требованиями ISCT CD105 является обязательным маркером для верификации МСК [Dominici et al., 2006], однако данные по уровню его экспрессии в МСК ПК различных исследователей противоречат друг другу. В большинстве работ указано, что CD105 присутствует на поверхности МСК ПК [Can, Karahuseyinoglu, 2007; Bongso, Fong, 2013; Batsali et al., 2013; El Omar et al., 2014], и экспрессия данного маркера сохраняется при длительном культивировании на протяжении минимум 16 пассажей [Shi et al., 2015]. Однако в отдельных исследованиях показано, что CD105 в этих клетках не экспрессируется (при сохранении дифференцировочного потенциала) [Kadam et al., 2009] или появляется только на 5 пассаже [Bakhshi et al., 2008]. Уменьшение уровня экспрессии основных положительных маркеров МСК CD73, CD90, CD105 может происходить и при изменении условий культивирования, например, гипоксии [Majumdar et al., 2013]. В соответствии с представленными результатами, полученными с помощью проточной цитофлуориметрии, доля CD73+, CD90+ и CD105+ клеток в описываемых условиях культивирования значимо не колебалась и превышала 98% во всех исследованных культурах МСК ПК (Рисунки 14 и 15).

Иммуноцитохимическое исследование подтвердило высокий пролиферативный потенциал МСК ПК: доля Ki67+ клеток на 2-3 пассаже достигала 75-85% в зависимости от культуры (Рисунок 18). Для МСК костного мозга, например, этот показатель составляет около 35% [Carrier-Ruiz et al., 2015], а для МСК жировой ткани значительно варьирует в зависимости от условий культивирования – от 8% при культивировании с ЭТС до 80% при замене ЭТС на аллогенную человеческую сыворотку [Paula et al., 2015].

В цитоскелете всех исследованных культур присутствовали виментиновые промежуточные филаменты и α SMA+пучки микрофиламентов (Рисунки 19 и 20). Некоторые авторы считают виментин и α SMA просто мезенхимальными маркерами, которые изначально экспрессируются клетками вартонова студня [Conconi et al., 2011; Sági et al., 2012; Jeremias et al., 2014], другие же говорят о приобретении МСК фенотипа миофибробластов *in vitro* [Farias et al., 2011; Ngo et al., 2014].

Основным регулятором индукции/поддержания α SMA+фенотипа является TGF β 1, однако данные о взаимосвязи экспрессии α SMA+, МСК и TGF β 1 крайне противоречивы. По одним данным МСК сами поддерживают α SMA+фенотип за счет аутокринной продукции TGF β 1 [Porova et al., 2010]. По другим данным МСК приобретают α SMA+фенотип под воздействием экзогенного TGF β 1, причем данное изменение фенотипа обратимо [Desai et al., 2014]. В некоторых работах показано, что экзогенный TGF β 1 не является достаточным индуктором α SMA+фенотипа, который МСК приобретают только под воздействием TGF β 1-содержащих экзосом, полученных из опухолевых клеток [Chowdhury et al., 2015]. Опубликованы данные и о том, что МСК, напротив, подавляют TGF β 1-индуцированный синтез α SMA за счет секреции BMP7 [Lv S. et al., 2014].

Сходство МСК ПК с миофибробластами является объектом активного обсуждения [Corrao et al., 2013], однако по данным литературы экспрессия виментина и α SMA характерна для МСК, выделенных не только из пупочного канатика [Romanov et al., 2003; Farias et al., 2011; Choi et al., 2013; Coskun, Can, 2015], но и костного мозга [Sági et al., 2012; Ngo et al., 2014], жировой ткани [Sági et al., 2012], легких [Porova et al., 2010], кожи [Jeremias et al., 2014], селезенки, тимуса и стенки аорты [Sági et al., 2012]. α SMA+фенотип МСК ПК позволяет некоторым авторам использовать по отношению к ним термин «миофибробласт-подобные клетки» (англ. “myofibroblast-like cells”) [Ohta et al., 2013; Kim et al., 2015], однако не отрицает их принадлежность к МСК.

На втором этапе работы было проведено исследование ангиогенных свойств МСК ПК *in vitro*.

МСК ПК оказались неспособны секретировать растворимые формы VEGF-A – ключевого фактора ангиогенеза как в пренатальном, так и в постнатальном периоде [Chung, Ferrara, 2011] (Рисунок 22). В единичных работах описана способность МСК ПК секретировать VEGF-A [Edwards et al., 2014], однако подавляющее большинство работ подтверждает очень низкий уровень секреции VEGF-A или полное его отсутствие в кондиционированной МСК ПК среде. Так, например, показано, что в МСК костного мозга или жировой ткани уровень секреции данного фактора роста выше в 10^3 и 10^2 раз соответственно [Amable et al., 2014; Kuchroo et al., 2015].

Столь необычное отсутствие VEGF-A в секретоме МСК ПК может быть связана с особенностями строения ткани-источника клеток: в вартоновом студне, в отличие от большинства тканей организма, полностью отсутствуют капилляры (Рисунок 7). Показано, что на 6 неделе развития зародыша в вартоновом студне идет активный процесс кроветворения и образования капилляров, однако уже на 7-9 неделе кроветворение угасает, а капилляры подвергаются обратному развитию [Дорофиенко, 2011]. Можно предположить, что *in situ* в стромальных клетках вартонова студня в этот период развития происходит остановка синтеза VEGF-A, за которой следует утрата капилляров. В пользу этого предположения свидетельствует то, что нокаутные по гену VEGFR2 (основного эффекторного рецептора VEGF-A) мыши гибнут на 8-е сутки внутриутробного развития из-за отсутствия формирования кровеносных сосудов [Shalaby et al., 1995]. Перенос клеток вартонова студня в условия *in vitro* не приводит к появлению VEGF-A в секретоме МСК ПК, хотя детектируемый уровень транскрипции гена *vegf* сохранен [Kuchroo et al., 2015], а по некоторым данным даже близок к уровню в МСК костного мозга [Lu et al., 2006].

Полученные в данной работе данные, а также результаты других исследований, приведенные ниже, подтверждают наличие проангиогенного потенциала МСК ПК, реализуемого в том числе и с помощью паракринного механизма, но без участия VEGF. Почему наличие VEGF-A-независимого пути

стимуляции ангиогенеза может быть столь важным? Дело в том, что результаты клинических испытаний с использованием VEGF-A121 или -165 (в виде экзогенных белков или генетических конструкций) достаточно противоречивы и не всегда соответствуют ожиданиям исследователей [Ylä-Herttuala et al., 2007; Ouma G.O. et al., 2013; Shimamura et al., 2014]. Анализ литературных данных показывает, что самый первый этап регуляции действия VEGF-A начинается еще на уровне связывания белка с рецепторами VEGFR1 и VEGFR2. VEGFR2 запускает внутриклеточные каскады, обеспечивающие выживаемость, пролиферацию и миграцию эндотелиоцитов, привлечение прогениторных клеток, формирование и созревание новых кровеносных сосудов, VEGFR1 же является основным сдерживающим регулятором VEGF-A [Shibuya, 2006; Ylä-Herttuala et al., 2007]. Воздействие VEGF-A (экзогенного в условиях *in vitro* или эндогенного при моделировании ишемии *in vivo*) сдвигает баланс VEGFR1/VEGFR2 рецепторов в пользу VEGFR1, значительно снижая эффективность ангиогенной терапии [Imoukhuede et al., 2011; Imoukhuede et al., 2013]. Более того, высказано предположение о вариабельности количества и соотношения рецепторов VEGFR1 и VEGFR2 внутри человеческой популяции, объясняющей индивидуальные различия ответа пациентов на терапию с использованием VEGF-A [Imoukhuede et al., 2013]. В данных условиях стратегия терапевтического ангиогенеза, дополненная клеточной терапией с использованием МСК ПК, запускающих VEGF-A-независимый механизм стимуляции ангиогенеза, может оказаться более эффективной.

Считается, что процесс неоангиогенеза в ишемизированной ткани включает в себя два основных этапа. На первом этапе происходит активация эндотелиоцитов, макрофагов и гладкомышечных клеток, начинается запуск внутриклеточных каскадов, приводящих к локальному растворению базальной мембраны сосудов, пролиферации и направленной миграции эндотелиоцитов, привлечению предшественников эндотелиоцитов. На втором этапе происходит созревание сосудов за счет формирования внеклеточного матрикса и привлечения гладкомышечных клеток и перицитов [Isner et al., 2001; Парфенова, Ткачук, 2007].

Предполагается, что VEGF-A играет ключевую роль в самом начале первого этапа: в условиях гипоксии транскрипционный фактор HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1) обеспечивает 30-кратное увеличение синтеза VEGF в течение нескольких минут [Carmeliet, 2003], при этом возрастает не только концентрация VEGF в кровотоке, но и увеличивается стабильность мРНК и время полужизни самого белка [Shima et al., 1995; Stefanini et al., 2008]. Возникает вопрос: могут ли МСК ПК, не секретирующие VEGF-A, стимулировать пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток?

Результаты МТТ теста показали, что кондиционированная МСК ПК среда стимулирует пролиферацию эндотелиальных клеток линии EA.hy926 (Рисунок 23). Схожие результаты были получены ранее для других эндотелиальных клеток (HUVEC) [Choi et al., 2013]. Литературные данные о влиянии МСК на пролиферацию эндотелиальных клеток довольно противоречивы из-за разнообразия источников обоих типов клеток [Bronckaers et al., 2014]. Показано, например, что МСК костного мозга (в том числе культивированные в условиях гипоксии) не оказывают влияния на динамику роста линии EA.hy926 [Burlacu et al., 2013]. Отсутствие в кондиционированной МСК ПК среде растворимых форм VEGF-A позволяет предположить, что линия Ea.hy926 отвечает на действие иного индуктора. Недавно было опубликовано подтверждение влияния на пролиферацию EA.hy926 другого фактора данного семейства цитокинов – VEGF-B [Zhang G.H. et al., 2014], однако литературные данные о синтезе VEGF-B различными типами МСК отсутствуют.

Transwell-системы широко используют для оценки хемотаксиса, который играет важную роль на ранних этапах ангиогенеза. Результаты опыта показали, что МСК ПК секретируют факторы, являющиеся хемоаттрактантами для эндотелиальных клеток линии EA.hy926 (Рисунок 24). Аналогичные результаты были получены ранее для других типов клеток – HUVEC [Choi et al., 2013, Shen et al., 2015], HMEC1 (микроваскулярных эндотелиальных клеток) и N2a (клеток

нейробластомы), причем эффект МСК пупочного канатика был выражен сильнее по сравнению с МСК костного мозга [Hsieh et al., 2013].

Таким образом, МСК ПК секретируют факторы, способные привлекать эндотелиальные и прогениторные клетки, стимулируя при этом их подвижность. Известно, что одним из таких факторов, стимулирующих перестройку цитоскелета и направленную миграцию клеток линии EA.hy926 за счет активации p38 MAP(mitogen-activated protein)-киназ, является IL-8 [Lai et al., 2012]. Также было подтверждено, что на скорость миграции эндотелиальных клеток влияет присутствие в кондиционированной МСК ПК среде HGF и MCP-1 (monocyte chemoattractant protein - 1) [Shen et al., 2015]. Эти данные согласуются с результатами других исследователей, показавших, что уровень секреции IL-8, HGF и MCP-1 в МСК пупочного канатика значительно выше, чем в МСК костного мозга или жировой ткани [Amable et al., 2014; Edwards et al., 2014].

«Рана монослоя» считается одной из наиболее простых и удобных моделей исследования регенерации *in vitro*, которая по сути одновременно характеризует пролиферацию и направленную миграцию клеток [Rodriguez et al., 2005]. Среда, кондиционированная МСК ПК, стимулировала подвижность эндотелиальных клеток при заполнении раны монослоя (Рисунок 25).

Проведенные эксперименты продемонстрировали, что МСК ПК секретируют факторы, стимулирующие пролиферацию, подвижность и направленную миграцию эндотелиальных клеток. В качестве дополнительного контроля во всех экспериментах в кондиционированную МСК ПК среду были добавлены блокирующие антитела к VEGF, что не приводило к снижению стимулирующего действия среды. Таким образом, было доказано, что паракринное воздействие МСК ПК на пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток осуществляется VEGF-A-независимым путем.

Изучение возможного заместительного механизма проангиогенной активности МСК ПК было проведено в виде индукции дифференцировки в эндотелиальном направлении. Данные о возможности дифференцировки МСК в

эндотелиальные клетки очень противоречивы: отличаются наборы индукторов (основным является VEGF-A165 в концентрации 50 нг/мл), длительность дифференцировки (от 2 до 28 суток), оцениваемые маркеры (наиболее распространенные CD31, vWF, VE-cadherin, VEGFR2) и итоговые результаты [Vater et al., 2011].

Проведенное исследование показало, что МСК ПК способны приобретать CD31+фенотип *in vitro*, при этом VEGF-A165 является необходимым, но не достаточным индуктором дифференцировки (Рисунки 25 и 26). Для успешной индукции было необходимо совместное воздействие VEGF-A165 и кондиционированной эндотелиальными клетками линии EA.hy926 среды, которая по литературным данным содержит целый коктейль гормонов, ростовых факторов и цитокинов: IL-8, IL-10, IL-18, TNF- α , G-CSF, VEGF, эритропоэтин и др. [Лыков и др., 2014]. Эти данные отличаются от результатов других исследователей, которые не выявили экспрессии маркеров эндотелия в МСК ПК при воздействии в течение 14 суток сложных дифференцировочных сред, содержащих EGF, VEGF, FGFb, IGF-1, гидрокортизон и др. индукторы [Choi et al., 2013]. В другом исследовании МСК ПК после культивирования в течение 12 дней в среде с добавлением VEGF, EGF и гидрокортизона начинали равномерно экспрессировать маркеры эндотелия (vWF, VE-кадгерин, VEGFR2), но при этом морфология клеток и их организация не изменялись [Chen et al., 2009].

В настоящее время принято считать, что *in vitro* исследование в принципе не способно подтвердить дифференцировку МСК в полноценные эндотелиоциты, а в отношении МСК, экспрессирующих специфические маркеры, предложено использовать термин «эндотелиоцитоподобные клетки» [Bronckaers et al., 2014]. Еще одим спорным вопросом является незаменимость использования VEGF-A165 в качестве основного индуктора, т.к. показано, что на поверхности МСК не экспрессируются рецепторы к VEGF, а воздействие его опосредовано связыванием с PDGF-рецепторами [Ball et al., 2007; Ball et al., 2010].

Следующий этап *in vitro* исследования включал в себя ряд экспериментов, проведенных с использованием матрикса базальной мембраны в качестве подложки для клеток.

В кровеносных сосудах эндотелий отделен от рыхлой волокнистой соединительной ткани субэндотелиального слоя базальной мембраной. В 1988 году Kubota и соавт. показали, что эндотелиальные клетки, помещенные на базальную мембрану *in vitro*, в течение нескольких часов прикрепляются к ней, вытягиваются и формируют капилляроподобную сеть. Более того, организованные таким образом клетки были способны к захвату ацетилированных липопротеинов низкой плотности (один из маркеров функциональной активности эндотелия), что не наблюдали для эндотелиальных клеток, культивируемых в монослое или на поверхности коллагена I типа [Kubota et al., 1988].

Основными компонентами базальной мембраны сосудов являются ламинины 8 и 10 и коллаген IV типа, связанные между собой гликопротеинами (энтактином). В состав мембран также входят коллагены VIII, XV, XVIII типов, протеогликаны, ростовые факторы, фибронектин, тромбоспондины 1 и 2, матриксные металлопротеиназы и другие молекулы. В 1986 году из мышинной саркомы Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) был получен сходный по составу растворимый внеклеточный матрикс [Kleinman et al., 1986], который в настоящее время является стандартизированным, полностью охарактеризованным (проведен протеомный анализ [Hughes et al., 2010]) и коммерчески доступным продуктом. В данной работе был использован BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix. Данный матрикс обогащен ламинином-1, коллагеном IV типа, протеогликанами, энтактином/нидогеном и ростовыми факторами bFGF, EGF, IGF-1, PDGF, NGF, TGFβ [Arnaoutova et al., 2009], данные о содержании VEGF в описании продукта и научной литературе отсутствуют.

Культивирование эндотелиальных клеток на EHS матриксах по сути является *in vitro* моделью ангиогенеза и включает в себя последовательные этапы

данного процесса: адгезию, миграцию, протеазную активность клеток, их поляризацию и формирование тубулярных структур [Arnaoutova et al., 2009]. Было показано, что к подобной самоорганизации способны и другие типы клеток, в том числе МСК [Annabi et al., 2003]. Данная модель ангиогенеза *in vitro* приобрела широкое распространение благодаря простоте метода, небольшим временным затратам и возможности количественной оценки результата после подбора оптимальных условий для конкретного типа клеток. Формирование тубулярных структур в EHS матриксах используется для изучения влияния на ангиогенез различных факторов: гипоксии [Annabi et al., 2003], NO- и VEGF-сигнального пути [Gomes et al., 2013], отдельных компонентов секрета клеток [Albini et al., 2000; Estrada et al., 2009; Burlacu et al., 2013] и взаимодействия разных клеточных типов [Burlacu et al., 2013; Blocki et al., 2013].

Эндотелиальные клетки линии EA.hy926 были способны формировать тубулярную сеть в матриксе базальной мембраны, при этом добавление кондиционированной МСК ПК среды (с блокирующими антителами к VEGF или без них) не влияло на параметры сети, но ускоряло начало ее сборки на 1 час (Рисунок 28). Более интересные результаты были получены при сокультивировании МСК ПК и эндотелиальных клеток: формируемая сеть по своим характеристикам (время сборки, длина ветвей, число точек ветвления) была ближе к сети, организованной только МСК ПК. При этом основу сети оставляли именно МСК ПК, а эндотелиальные клетки были ассоциированы с ними (Рисунки 29 и 30). Полученные данные отличаются от результатов других исследователей, которые предполагают, что при сокультивировании МСК и эндотелиальных клеток в EHS матриксах в организации тубулярной структуры МСК выполняют только второстепенную функцию [Lozito et al., 2009; Blocki et al., 2013; Choi et al., 2013]. По-видимому, эти различия обусловлены условиями проведения эксперимента, главным образом, изменением соотношения МСК и эндотелиальных клеток, а также особенностями самих клеточных культур.

Во всех трех группах формируемая тубулярная сеть была нестабильна и окончательно разбиралась в течение 24 часов, образуя плотные кластеры клеток (Рисунки 29 и 31), что согласуется с данными других исследователей [Portalska et al., 2012; Blocki et al., 2013; Choi et al., 2013]. В большинстве подобных работ разборка сети означает окончание эксперимента, и дальнейшая судьба клеток не интересует исследователя. В данном исследовании съемка с помощью Time-Lapse микроскопии была продолжена при частоте 8 кадров в сутки. Оказалось, что образованные кластеры не являлись стационарными структурами, но в течение нескольких суток были способны к ограниченному движению и слиянию (Рисунки 31 и 32).

Дальнейшее наблюдение обнаружило явление вторичного спрутинга (формирование тубулярных ветвящихся выростов из кластеров клеток после разборки первичной сети) при сокультивировании МСК ПК и эндотелиальных клеток. Следствием его стало формирование стабильной (срок наблюдения более 30 суток) трехмерной сети в матриксе базальной мембраны (Рисунок 34).

Вторичный спрутинг характерен для эндотелиальных клеток [Castellon et al., 2002]. Однако прижизненная съемка с помощью флуоресцентной микроскопии показала, что основой вновь формируемой стабильной сети стали не эндотелиальные клетки, как это логично было бы предположить, а МСК ПК (Рисунок 35). Похожую стабильную (минимум в течение 7 дней) сеть в матриксе базальной мембраны формировали МСК костного мозга, преддифференцированные в эндотелиальном направлении [Portalska et al., 2012].

Было высказано предположение, что МСК ПК при сокультивировании с клетками линии EA.hy926 в матриксе базальной мембраны проявляют способность к спрутингу вследствие дифференцировки в эндотелиальном направлении. Ранее было продемонстрировано, что эндотелиальную дифференцировку МСК стимулирует контакт с матриксом эндотелиальных клеток [Lozito et al., 2009]. Наиболее распространенным маркером эндотелиальной дифференцировки является CD31, который не экспрессируется на

поверхности нативных МСК [Lozito et al., 2009; Rouwkema et al., 2009; Portalska et al., 2012]. Окрашивание клеток непосредственно в геле оказалось невозможным из-за адгезии антител к матриксу, поэтому для исследования были приготовлены криосрезы. Оказалось, что МСК ПК при сокультивировании с EA.hy926 в условиях описываемого эксперимента начинали экспрессировать CD31 (Рисунок 36). Важно заметить, что спрутинг наблюдали для смеси эндотелиальных клеток и только 2 из 5 исследуемых культур МСК ПК, что подтверждает представление о том, что разные культуры при соответствии всех формальных признаков принадлежности к МСК могут обладать морфо-функциональной вариабельностью [Pacini et al., 2014]. Можно предположить, что полученные на модели спрутинга различия между несколькими культурами МСК ПК были обусловлены именно их разной восприимчивостью к индукторам эндотелиальной дифференцировки.

На третьем этапе работы было проведено исследование ангиогенных свойств МСК ПК *in vivo*.

Физиологический тест «рота-род» отражает функциональное состояние мышечной ткани конечностей экспериментальных животных. Прогрессирующее ухудшение показателей в группе сравнения свидетельствует об адекватности выбранной модели, позволяющей получить длительное ишемическое повреждение скелетной мышечной ткани. Замедление этого процесса в экспериментальной группе подтверждает наличие положительного эффекта трансплантации МСК ПК на функциональное состояние ишемизированной конечности крыс. Данный эффект проявлялся не сразу, а был несколько отложен во времени (достоверные различия были зафиксированы только на 9 сутки после трансплантации) и сохранялся до окончания эксперимента (Рисунок 37).

Характер и динамика морфологических изменений скелетной мышечной ткани подтвердили, что иссечение бедренной и подколенной артерий у крыс обеспечивает острую ишемию икроножных мышц, которая сопровождается их некрозом с выраженной и длительной воспалительной реакцией с последующим образованием рубца (Рисунок 39). Полученные данные коррелируют с результатами других исследователей, в том числе и при моделировании ишемии

на других видах лабораторных животных. [Laurila et al., 2009; Rigamonti et al., 2013; Pellegrin et al., 2014].

Морфометрическое исследование показало, что на всех сроках эксперимента площадь очага повреждения в группе с введением МСК ПК была статистически значимо меньше, чем в группе сравнения (Рисунок 40).

Для скелетной мышечной ткани крыс и мышей с моделированной ишемией характерно развитие типичного сосудистого некроза, сопровождающийся выраженной воспалительной инфильтрацией. Если в первые часы в инфильтрате присутствуют в основном нейтрофилы, то через 3 суток после повреждения их замещают макрофаги [Rigamonti et al., 2013]. При этом интенсивность инфильтрации очага ишемического повреждения CD68+клетками постепенно снижается [Laurila et al., 2009; Pellegrin et al., 2014]. Приведенная оценка относительного содержания макрофагов в ткани ($56,22 \pm 5,46\%$ всех клеток в группе сравнения и $45,30 \pm 2,38\%$ в группе с введением МСК ПК) кажется на первый взгляд очень высокой (Рисунок 41). При пересчете же на единицу площади среза получается, что абсолютное число макрофагов колебалось от 1 тыс. до 2,5 тыс. на 1 мм^2 , что соответствует данным других исследователей [Laurila et al., 2009; Zordan et al., 2014].

Известно, что блокирование макрофагальной инфильтрации значительно ухудшает динамику регенерации ишемизированной скелетной мышечной ткани [Shireman et al., 2007; , Contreras-Shannon et al., 2007], однако значимость отдельных субпопуляций макрофагов в процессе восстановления данного типа ткани до конца не изучена. Полученные в настоящей работе результаты подтвердили данные других исследователей о том, что в очаге повреждения ишемизированной мышцы часть макрофагов выбирают M2 путь активации [Pellegrin et al., 2014; Zordan et al., 2014]. При этом однократная аллогенная трансплантация МСК ПК значимо увеличивала долю M2 макрофагов, обладающих противовоспалительными и проангиогенными свойствами, в течение как минимум 10 суток после введения (Рисунок 42).

Считается, что основным медиатором M2 пути активации макрофагов является простагландин E2 (PGE2) [Prockop, 2013], синтез которого культурой МСК ПК значительно возрастает под действием провоспалительных цитокинов IL-1 β и TNF α [Sabapathy et al., 2014]. При ишемическом повреждении скелетной мышцы уровень IL-1 β в ткани через 3 суток возрастает приблизительно в 31 раз, а TNF α – в 12 раз, и такой уровень цитокинов сохраняется до 3 недель [Fan et al., 2013]. Транзиентное повышение уровня IL-1 β и TNF α определяет, таким образом, временные рамки для успешного проведения клеточной терапии, что согласуется с результатами других исследователей: введение МСК через 1 неделю после индукции ишемии эффективнее восстанавливает кровоток в поврежденной конечности, чем трансплантация через 24 часа [Moon et al., 2006], а наиболее поздним сроком, при котором введение МСК в ишемизированную конечность является эффективным, составляет 10 суток для мышей и 3 недели для крыс [Liew, O'Brien, 2012]. Можно предположить, что после трансплантации (в описываемом эксперименте – на 7 сутки после повреждения) высокое содержание провоспалительных цитокинов IL-1 β и TNF α в ишемизированной мышце стимулировало секрецию трансплантированными клетками PGE2, который в свою очередь запустил M2 путь активации макрофагов. По данным литературы синтезируемый МСК PGE2 также способен ингибировать активацию других клеток иммунной системы, включая NK-клетки, гранулоциты, дендритные клетки и T1-хелперы; тем более парадоксальным выглядит наблюдение, что системное введение PGE2 оказывает провоспалительное действие [Madrigal et al., 2014]. Данное противоречие еще раз подтверждает, что биологическая активность МСК обусловлена более сложными, многоступенчатыми механизмами и не должна сводиться в представлении исследователя к изучению отдельной молекулы или каскада реакций.

МСК пупочного канатика, стимулируя M2 путь активации макрофагов, в значительной степени влияют на цитокиновый профиль ткани, затрагивающий не только воспаление и иммунный ответ, но и ангиогенез. Показано, что именно M2 макрофаги являются локальным источником HGF на ранних этапах после

повреждения мышечной ткани [Sawano et al., 2014]. Также M2 макрофаги синтезируют целый пул проангиогенных факторов, включая VEGF, FGFb, IGF1, Ccl2 и PGF, при этом M2a подтип макрофагов стимулирует ангиогенез в основном FGF-опосредованным путем, а основным эффектором M2c макрофагов является PGF [Wu et al., 2010; Jetten et al., 2014]. Кроме того, показано, что M2a макрофаги на высоком уровне секретируют PDGF-BB, а M2c макрофаги – MMP9, совместно обеспечивая спрутинг эндотелиальных клеток за счет ремоделирования внеклеточного матрикса и привлечения перicyтов [Spiller et al., 2014]. Совсем недавно на модели инфаркта миокарда было продемонстрировано, что локальная совместная доставка FGF и HGF привлекает в очаг повреждения M2 макрофаги и сопровождается активным формированием сосудов, а блокирование макрофагальной инфильтрации значительно подавляет ангиогенез. Результаты исследования позволили авторам даже ввести новый термин «проангиогенные макрофаги» (англ. “pro-angiogenic macrophages”) [Barbay et al., 2015].

Итак, трансплантация МСК ПК приводила к временной активации «проангиогенных» M2 макрофагов в очаге ишемического повреждения. Стимулировало ли это образование кровеносных сосудов? Для морфометрического исследования неоангиогенеза в очаге ишемического повреждения был выбран метод иммуногистохимического окрашивания на маркер эндотелиоцитов CD31 [Ishii et al., 2011; Kano et al., 2014; Rahman et al., 2014] (Рисунок 43). Результаты исследования показали, что трансплантация МСК ПК увеличивала количество и объемную плотность сосудов на 10 сутки после введения, но к 30 суткам достоверных различий между группами уже не было (Рисунки 44 и 45). По данным других исследователей трансплантация МСК ПК увеличивала объемную плотность кровеносных сосудов на 21 день после введения клеток. Однако следует учитывать, что эти данные были получены при введении клеток через 6 часов после моделирования ишемии; таким образом, увеличение объемной плотности сосудов было показано в точке 21 сутки после ишемического повреждения, что довольно близко к полученным в данном исследовании результатам (17 сутки после повреждения) [Choi et al., 2013].

Таким образом, введение МСК ПК в ишемизированную скелетной мышечную ткань запускало временную активацию М2 макрофагов, обладающих противовоспалительными и проангиогенными свойствами, что сопровождалось ускорением восстановления функций скелетных мышц, уменьшением площади очага повреждения, а также увеличением количества и объемной плотности кровеносных сосудов в самом очаге повреждения. Основной предполагаемый механизм данной активации – паракринный, что подтверждается данными других исследователей, показавших, что М2 активацию макрофагов *in vivo* способна стимулировать кондиционированная МСК ПК среда [Shohara et al., 2012].

В научной литературе активно обсуждается вопрос о том, насколько значим заместительный механизм терапевтической активности МСК ПК. Эффективным способом исследования выживаемости, миграции и дифференцировки трансплантированных клеток является их прижизненное маркирование перед введением [Lin et al., 2013]. Одним из наиболее распространенных маркеров является РКН26 (Sigma-Aldrich, США), представляющий собой высокоэффективный мембранный трейсер с длинным алифатическим хвостом и максимумом эмиссии 567 нм. В линейке РКН (РКН-2, -3, -26, -67) максимальную продолжительность флуоресценции показал именно РКН26: по данным производителя она составляет 100 дней, однако опубликованы данные и о свечении меченых клеток в течение 14,5 месяцев [Rieck, 2003]. Маркером РКН26 пользуются уже более 20 лет, за это время было показано, что данная метка не влияет на скорость пролиферации [Li P. et al., 2013] и возможность направленной дифференцировки МСК [Tao et al., 2014], а длительность наблюдения трансплантированных клеток *in vivo* составляет не менее 6-8 недель [Kramann et al., 2013; Zheng et al., 2013]. При культивировании РКН26+МСК сохранность маркера была подтверждена как минимум в течение 30 суток, что является максимальным сроком для эксперимента *in vivo*.

Исследование распределения трансплантированных меченых клеток показало, что со временем МСК мигрируют из локальных скоплений (треков введения, хорошо визуализируемых на 3 сутки после введения) и располагаются

диффузно в очаге повреждения и перимизии перифокальной зоны (Рисунки 47 и 48). Сходные данные о локализации трансплантированных МСК в очаге ишемического повреждения скелетной мышцы и перимизии были получены другими исследователями [Ishii et al., 2011; Noad et al., 2013]

Метка РКН26 была хорошо визуализируема на всех сроках эксперимента. При этом РКН26, как и все экзогенные маркеры, имеет существенный недостаток – возможность реутилизации метки другими, изначально не мечеными, клетками. Ранее было показано, что добавление дебриса, полученного путем гипотонического лизиса из РКН26-меченных клеток, к культуре интактных клеток через 7 дней приводило к появлению флуоресцирующих клеток. Более того, при введении такого дебриса в хвостовую вену крысы через 7 дней светящиеся клетки появлялись в печени, селезенке, периферической крови и, в меньшей степени, головном мозге животного [Li P. et al., 2013]. Логично предположить, что фрагменты клеточных мембран со встроенным трейсером РКН26 могут быть утилизированы *in vivo* макрофагами, как это происходит при прямом введении красящего раствора РКН26 [Maus et al., 2001].

При окрашивании криосрезов с антителами на маркер макрофагов CD68 было выявлено, что часть клеток имела фенотип CD68+РКН26+, что говорит о попадании метки в резидентные макрофаги. (Рисунок 50). Со временем доля CD68+клеток относительно всех меченых клеток значимо возрастала с $48,1 \pm 3,2\%$ на 3 сутки до $76,2 \pm 3,9\%$ на 30 сутки после трансплантации; эти данные коррелировали с оценкой МОС при колокализационном анализе (Рисунки 49 и 50). На основании этих данных нельзя однозначно утверждать, что 76% всех трансплантированных клеток были элиминированы резидентными макрофагами к 30 суткам после трансплантации, поскольку неизвестно соотношение фагоцитирующих макрофагов на одну исходно меченую клетку (одна аллогенная клетка могла стать донором метки для нескольких макрофагов или, наоборот, один макрофаг мог захватить фрагменты меченых мембран нескольких клеток), а также скорость распада вторично реутилизированной метки. Полученные результаты говорят лишь о том, что 76% всех наблюдаемых в данный момент

меченых клеток являются на самом деле макрофагами, реутилизировавшими метку PKN26.

Могло ли быть появление CD68+PKN26+клеток результатом слияния? В отношении данного феномена при клеточной трансплантации в научной литературе много противоречивой информации. В подавляющем большинстве исследований *in vivo* не найдено доказательств слияния трансплантированных и резидентных клеток [Sato et al., 2005; Xu et al., 2010]. В одной из современных работ на эту тему было показано, что при сокультивировании МСК с клетками эпителиальных линий доля слившихся клеток может достигать $1,3 \pm 0,2\%$, причем все они в 1,3-1,8 раз крупнее исходных клеток, а большинство содержит 2 и более ядер. В этом же исследовании при подкожной трансплантации NOG иммунодефицитным мышам одновременно МСК и клеток эпителиальных линий через 50 дней наблюдали лишь единичные слившиеся клетки (но слившиеся не с клетками реципиента, а с совместно введенными экзогенными) [Ferrand et al., 2011]. В данном же исследовании среди CD68+PKN26+клеток не наблюдали аномально крупных или многоядерных клеток. Действительно, возможность слияния клеток отрицать полностью нельзя, однако слияние столь значительной доли всех трансплантированных клеток считается маловероятным.

Таким образом, появление CD68+PKN26+клеток можно рассматривать как результат фагоцитоза трансплантированных меченых клеток или их фрагментов макрофагами *in vivo*. Анализ литературных данных подтвердил закономерность данного вывода. Так, в эксперименте *in vitro* было показано, что сокультивирование меченых МСК костного мозга и активированных макрофагов в течение 96 ч приводило к появлению макрофагов с меткой, доля их в случае использования наночастиц оксида железа составляла до 20%, а для BrdU – около 10% [Pawelczyk et al., 2008]. Эта же группа авторов показала, что подкожное локальное введение меченых МСК в матриксе Матригель™ приводит через 14 дней к появлению меченых макрофагов, мигрировавших к месту повреждения; доля макрофагов составляет от 5% до 15% всех меченых клеток в зависимости от типа маркера (наночастицы оксида железа, BrdU или лентивирусная трансдукция

GFP) [Pawelczyk et al., 2009]. Возможность захвата витального маркера резидентными клетками *in vivo* показана для большинства использующихся меток (красителей, радиоактивных и наноразмерных частиц, репортерных генов) [Pawelczyk et al., 2009; Lin et al., 2013].

Выходом из сложившейся ситуации могло бы стать использование иммунодефицитных экспериментальных животных, однако в большинстве распространенных в настоящее время линий (SCID, NOD/SCID, Rag2, nude) функциональная активность макрофагов не затронута. Возможно, более эффективным окажется использование линии мышей NOD/SCIDIL2r^{null}, несущей дополнительную мутацию в γ -цепи рецептора IL-2, в которых также повреждены дендритные клетки и макрофаги [Ito et al., 2002]. При этом следует учитывать, что утилизация метки возможна и иными клетками ретикулоэндотелиальной системы [Noad et al., 2013].

Как было показано выше, лишь часть трансплантированных аллогенных МСК ПК выживала в ишемизированной мышце в отдаленный период после введения. Тем не менее, дифференцировка этих клеток в эндотелиальном направлении теоретически была возможна. По данным литературы около 45% аутогенных МСК костного мозга, меченных GFP, положительно окрашивались с антителами к маркеру эндотелиоцитов CD31 через 2 недели после трансплантации в скелетную мышцу с моделированной ишемией [Zhang J.C. et al., 2014]. Для МСК ПК также была продемонстрирована возможность экспрессии эндотелиальных маркеров через 6 недель после трансплантации в ишемизированную ткань на модели инфаркта миокарда [Zhang W. et al., 2013].

Иммуногистохимическое исследование показало, что основным источником VEGF в ишемизированной мышце являются сохраненные мышечные волокна перифокальной зоны (Рисунок 51), что совпадает с данными других исследователей [Germani et al., 2003]. В неповрежденной мышце VEGF синтезируют только сателлитные клетки [Germani et al., 2003], однако гипоксия индуцирует экспрессию транскрипционного фактора HIF-1 в мышечных волокнах

[Wang T et al., 2014], что обеспечивает запуск синтеза VEGF в срок от нескольких минут до нескольких часов [Rissanen et al., 2002; Carmeliet, 2003].

Трансплантированные клетки на всех сроках исследования располагались в том числе и рядом с сохраненными мышечными волокнами (Рисунки 48 и 51), подвергаясь, таким образом, действию основного индуктора эндотелиальной дифференцировки VEGF. Однако метка PKN26 не была обнаружена в составе капилляров или стенок более крупных кровеносных сосудов, окрашенных с антителами CD31 и α SMA (Рисунки 52 и 53). Не нашли подтверждения эндотелиальной дифференцировки МСК ПК, трансплантированных в ишемизированную скелетную мышечную ткань, и другие исследователи [Choi et al., 2013]. Возможность эндотелиальной дифференцировки МСК зачастую подвергается сомнению [Bronckaers et al., 2014]. Одной из причин является то, что *in vivo* в ишемизированной ткани уровень VEGF-A приблизительно в 10^3 раз меньше, чем в используемых для дифференцировки *in vitro* индукционных средах с добавлением данного фактора до 50 нг/мл [Jiang et al., 2014]. Важно заметить, что и через 30 суток после трансплантации часть PKN26+клеток экспрессировала α SMA (Рисунок 53), который не синтезируется макрофагами [He, Marneros, 2013], что еще раз подтверждает, что на данном сроке часть трансплантированных МСК ПК выживала и сохраняла фенотип миофибробластов.

5 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Интерес к пупочному канатику как к источнику МСК в последние годы стабильно растет. В настоящее время накоплен значительный массив данных, касающихся биологических свойств данных клеток и их терапевтического потенциала. В то же время имеющиеся противоречия и пробелы не позволяют сформировать единого представления о механизмах проангиогенной активности МСК ПК.

Клеточные культуры, выделенные из пупочного канатика человека и крысы, соответствовали всем требованиям, предъявляемым к мультипотентным стромальным клеткам: способность к росту на пластиковой подложке без использования фидерного слоя или покрытия белками, специфический профиль экспрессии поверхностных антигенов, способность к дифференцировке в адипогенном, хондрогенном или остеогенном направлении *in vitro* под действием индукторов [Dominici et al., 2006]. Данные культуры не содержали CD31+ и CD146+клеток, как и сам вартонов студень, из которого они были выделены. Для цитоскелета МСК ПК характерны виментиновые промежуточные филаменты и α SMA микрофиламенты, что подтверждает сходство их фенотипа с миофибробластами.

В секретоме МСК ПК практически отсутствовали растворимые формы основного проангиогенного фактора VEGF-A, при этом кондиционированная МСК ПК среда стимулировала пролиферацию, подвижность и направленную миграцию эндотелиальных клеток линии EA.hy926 *in vitro*. Таким образом, реализация паракринного механизма проангиогенной активности МСК ПК осуществляется VEGF-A-независимым путем, что может быть важно с точки зрения клинического применения МСК ПК для пациентов, не отвечающих на VEGF-A-опосредованную индукцию ангиогенеза.

МСК ПК взаимодействовали с эндотелиальными клетками при культивировании в матриксе базальной мембраны, при этом МСК ПК не играли второстепенную роль. Более того, на модели вторичного спрутинга было обнаружено, что МСК ПК способны приобретать CD31+фенотип при длительном сокультивировании с эндотелиальными клетками, формируя стабильную капилляроподобную сеть. С одной стороны это наблюдение показало, что МСК ПК способны к дифференцировке в эндотелиальном направлении без воздействия экзогенного VEGF-A, в отличие от индукции на стандартной пластиковой подложке. С другой стороны, к вторичному спрутингу в условиях данного эксперимента была способна лишь часть культур МСК ПК, что подтверждает представление о том, что разные культуры при соответствии всех формальных признаков принадлежности к МСК могут обладать морфо-функциональной вариабельностью. Таким образом, предполагаемый заместительный механизм проангиогенной активности МСК ПК также является отчасти VEGF-A-независимым.

Моделирование ишемии задних конечностей крыс было осуществлено путем иссечения бедренной и подколенной артерий. Адекватность модели была верифицирована с помощью тестов толерантности к физическим нагрузкам и морфометрического исследования, которые подтвердили развитие инфаркта скелетных мышц с выраженной макрофагальной инфильтрацией и последующим формированием рубца.

Морфометрическое исследование показало, что аллогенная внутримышечная трансплантация МСК ПК крысы ускоряла репаративные процессы в ишемизированной скелетной мышце, что проявлялось в уменьшении как самого очага повреждения, так и макрофагальной инфильтрации в нем. Также было подтверждено стимулирующее влияние МСК ПК на образование сосудов микроциркуляторного русла в очаге повреждения.

Для изучения механизмов проангиогенной активности МСК ПК было проведено исследование распределения, выживания и дифференцировки в

эндотелиальном направлении меченых МСК ПК после трансплантации. Оказалось, что со временем МСК ПК мигрировали из области введения и располагались диффузно в очаге повреждения и перимизии перифокальной зоны. Однако окрашивание с антителами к маркеру макрофагов CD68+ показало, что на самом деле часть этих клеток являлась макрофагами, захватившими витальную метку PKN26. Доля макрофагов среди всех меченых клеток увеличивалась со временем, что было подтверждено данными колокализационного анализа. Появление CD68+PKN26+клеток можно рассматривать как результат фагоцитоза трансплантированных меченых клеток или их фрагментов макрофагами *in vivo*, что опровергает представление о МСК ПК как об исключительно иммунопривилегированных клетках. Выявление витального маркера PKN26 (как и других экзогенных маркеров) в живых клетках не может быть однозначным доказательством экзогенного происхождения клетки, что обуславливает необходимость проведения дополнительных исследований для правильной интерпретации результатов. Другое заключение, которое можно сделать из полученных данных, говорит о потенциально большей эффективности многократной трансплантации МСК по сравнению с однократным введением.

Реализация заместительного механизма теоретически была возможна: небольшая часть МСК ПК выживала в течение длительного времени после введения и подвергалась воздействию эндогенного VEGF, синтезируемого сохраненными мышечными волокнами. Однако доказательств дифференцировки этих клеток в эндотелиальном направлении *in vivo* не было получено. Таким образом, заместительный механизм проангиогенной активности МСК ПК не является ведущим: дифференцировка не доказана, а сами клетки со временем элиминируются иммунной системой реципиента.

Итак, некоторое время МСК ПК все же выживали в очаге ишемического повреждения, не дифференцировались в клетки мышечной ткани и кровеносных сосудов, но влияли при этом на размеры очага повреждения, а также макрофагальную инфильтрацию и ангиогенез в нем. Было высказано

предположение, что этот эффект достигается за счет паракринной индукции ангиогенеза и смещения баланса провоспалительных и противовоспалительных макрофагов в очаге ишемического повреждения ткани. Иммуногистохимическое исследование подтвердило данное предположение; при этом стимуляция M2 активации макрофагов была временной, что коррелирует с данными об элиминации МСК ПК. Можно заключить, что исследование поляризации макрофагов как промежуточного элемента последовательности «трансплантация МСК – восстановление ишемизированной ткани» имеет важное значение для фундаментальных исследователей и клиницистов.

6 ВЫВОДЫ

1. Клеточные культуры, полученные из вартонова студня пупочного канатика человека и крысы, обладают свойствами мультипотентных стромальных клеток: способностью к росту на необработанной культуральной подложке, специфическим набором поверхностных антигенов, способностью к индуцированной дифференцировке *in vitro* в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлениях.

2. Кондиционированная мультипотентными стромальными клетками пупочного канатика среда *in vitro* стимулирует пролиферацию, подвижность и направленную миграцию эндотелиальных клеток линии EA.hy926 VEGF-A-независимым путем.

3. Мультипотентные стромальные клетки пупочного канатика при культивировании на стандартной подложке способны дифференцироваться в эндотелиоцитоподобные CD31+ клетки, при этом ростовой фактор VEGF-A является необходимым, но недостаточным индуктором дифференцировки. При сокультивировании в матриксе базальной мембраны мультипотентные стромальные клетки пупочного канатика за счет контактного и паракринного взаимодействия с эндотелиальными клетками линии EA.hy926 способны приобретать CD31+фенотип без влияния экзогенного VEGF-A.

4. Аллогенная внутримышечная трансплантация мультипотентных стромальных клеток пупочного канатика при ишемии задних конечностей крыс способствует восстановлению функции конечности, оцениваемой в тесте толерантности к физической нагрузке.

5. Трансплантация аллогенных мультипотентных стромальных клеток пупочного канатика при ишемии задних конечностей крыс обеспечивает стимуляцию регенерации и ангиогенеза, что проявляется уменьшением площади

повреждения, а также увеличением количества и объемной плотности кровеносных сосудов.

6. Трансплантированные мультипотентные стромальные клетки пупочного канатика выживают в течение 30 суток после введения, мигрируют в область повреждения, но не дифференцируются в эндотелиальные и гладкомышечные клетки кровеносных сосудов.

7. Трансплантированные аллогенные мультипотентные стромальные клетки пупочного канатика активно элиминируются макрофагами. При этом в области повреждения наблюдается уменьшение количества общей популяции (CD68+) макрофагов с одновременным увеличением доли прорегенераторных M2 (CD206+) макрофагов.

7 СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

МСК – мультипотентные стромальные клетки

МСК ПК – мультипотентные стромальные клетки пупочного канатика

ЭСК – эмбриональные стволовые клетки

ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка

CD – cluster of differentiation, кластер дифференцировки

CXCL – the chemokine (C-X-C motif) ligand, лиганд хемокина с мотивом C-X-C

DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole, 4',6-диамидино-2-фенилиндол

EGF – epidermal growth factor, эпидермальный фактор роста

FGF – fibroblast growth factor, фактор роста фибробластов

FITC – fluorescein isothiocyanate, флуоресцеин изотиоцианат

G-CSF – granulocyte-colony stimulating factor, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор

GM-CSF – granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

HGF – hepatocyte growth factor, фактор роста гепатоцитов

HIF-1 – hypoxia-inducible factor-1, индуцируемый гипоксией фактор 1

HLA – human leukocyte antigens, человеческие лейкоцитарные антигены

HUVEC – human umbilical vein endothelial cells, эндотелиальные клетки вены пупочного канатика человека

IDO – indolamin-2,3-dioxygenase, индоламин-2,3-диоксигеназа

IFN – interferon, интерферон

IGF – insulin-like growth factor, инсулиноподобный фактор роста

IL – interleukin, интерлейкин

ISCT – International Society for Cellular Therapy, международное общество клеточной терапии

LIF – leukemia inhibitory factor, лейкемический ингибиторный фактор

MCP – monocyte chemoattractant protein, моноцитарный хемотаксический протеин

MMP – matrix metalloproteinase, матриксная металлопротеиназа

MOC – the Mander's overlap coefficient, коэффициента наложения Мандерса

NGF – nerve growth factor, фактор роста нервов

PDGF – platelet-derived growth factor, тромбоцитарный фактор роста

PE – phycoerythrin, фикоэритрин

PECAM-1 – platelet/endothelial cell adhesion molecule 1 (CD31), молекула адгезии тромбоцитов-эндотелиальных клеток-1 (CD31)

PGE2 – prostaglandin E2, простагландин E2

PLGF – placental growth factor, плацентарный фактор роста

SMA –smooth muscle actin, гладкомышечный актин альфа

TGF – transforming growth factor, трансформирующий фактор роста

TNF – tumor necrosis factor, фактор некроза опухоли

TSG6 – TNF-stimulated gene 6 protein, белок TNF-стимулированного гена 6

VEGF – vascular endothelial growth factor, фактор роста эндотелия сосудов

VEGFR – vascular endothelial growth factor receptor, рецептор фактора роста эндотелия сосудов

VE-кадгерин – vascular endothelial, белок клеточной адгезии эндотелия сосудов из семейства кадгеринов

8 СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Автандилов Г.Г.** Медицинская морфометрия. / Автандилов Г.Г. – М.: Медицина, 1990. – 384 с.
2. **ВОЗ.** Мировая статистика здравоохранения, 2013 г.– 2014. – 170 с. ISBN: 978 92 4 456458 5.
3. **Дорофиенко Н.Н.** Формирование пупочного канатика на ранних этапах гестации. / Дорофиенко Н.Н. // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2011. – № 41. — С. 38-41.
4. **Ельчанинов А.В.** Влияние мультипотентных стромальных клеток на функцию митохондрий клеток регенерирующей печени. / Ельчанинов А.В., Володина М.А., Арутюнян И.В. [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2014. – № 4. – С. 253-259.
5. **Зусманович Ф.Н.** Пат. 1101875 СССР, МПК⁷ С 09 В 23/28, 3412748/28-13. Способ моделирования ишемии конечностей [Текст] / Зусманович Ф.Н., Бунов В.С., Левитина В.Х., Беркуцкая Т.С.; заявитель и патентообладатель Курганский НИИ экспериментальной и клинической ортопедии и травматологии. – заявл. 19.03.82 ; опубл. 07.07.84, Бюл. № 25. – 3 с.
6. **Лебедев С.В.** Клеточная терапия критической ишемии нижних конечностей (проблемы и перспективы). / Лебедев С.В., Карасев А.В., Кунгурцев В.В. // Вестник РАМН. – 2013. – № 3. – С. 33-44.
7. **Луста К.А.** Роль провоспалительных и противовоспалительных медиаторов в атерогенезе. / Луста К.А., Орехов А.Н. // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2014. – № 3(11). – С. 64-76.
8. **Лыков А.П.** Влияние секреторных факторов эндотелиальных клеток на пролиферативную и миграционную способность мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток человека. / Лыков А.П., Бондаренко

- Н.А., Сахно Л.В. [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 4-2. – С. 296-301.
9. **Монастырская Е.А.** М1 и М2 фенотипы активированных макрофагов и их роль в иммунном ответе и патологии. / Монастырская Е.А., Лямина С.В., Малышев И.Ю. // Патогенез. – 2008. – № 6(4). – С. 31-39.
 10. **Ноздрачев А.Д.** Анатомия крысы (Лабораторные животные) / Ноздрачев А.Д., Поляков Е.Л. — СПб.: Издательство «Лань», 2001. – 464 с.
 11. **Парфенова Е.В.** Терапевтический ангиогенез: достижения, проблемы, перспективы. / Парфенова Е.В., Ткачук В.А. // Кардиологический вестник. – 2007. – № 2(2). – С. 5-15.
 12. **Селиванов Е.В.** Красители в биологии и медицине. / Селиванов Е.В. – Барнаул: Азбука, 2003. – 40 с.
 13. **Щеголев А.И.** Морфология плаценты. / Щеголев А.И., Дубова Е.А., Павлов К.А. – Москва: НЦАГиП им. В. И. Кулакова, 2010. – 48 с.
 14. **Albini A.** Inhibition of angiogenesis and vascular tumor growth by interferon-producing cells: A gene therapy approach. / Albini A., Marchisone C., Del Grosso F. [et al.] // Am J Pathol. – 2000. – Vol. 156(4). – P. 1381-93.
 15. **Amable P.R.** Gene expression and protein secretion during human mesenchymal cell differentiation into adipogenic cells. / Amable P.R., Teixeira M.V., Carias R.B. [et al.] // BMC Cell Biol. – 2014. – Vol. 15. – P. 46.
 16. **Amable P.R.** Protein synthesis and secretion in human mesenchymal cells derived from bone marrow, adipose tissue and Wharton's jelly. / Amable P.R., Teixeira M.V., Carias R.B. [et al.] // Stem Cell Res Ther. – 2014. – Vol. 5(2). – P. 53.
 17. **Amiri F.** Positive selection of Wharton's jelly-derived CD105+ cells by MACS technique and their subsequent cultivation under suspension culture condition: A simple, versatile culturing method to enhance the multipotentiality of mesenchymal stem cells. / Amiri F., Halabian R., Dehgan Harati M. [et al.] // Hematology. – 2015. – Vol. 20(4). – P. 208-16.

18. **Annabi B.** Hypoxia promotes murine bone-marrow-derived stromal cell migration and tube formation. / Annabi B., Lee Y.T., Turcotte S. [et al.] // *Stem Cells*. – 2003. – Vol. 21(3). – P. 337-47.
19. **Antunes M.A.** Effects of different mesenchymal stromal cell sources and delivery routes in experimental emphysema. / Antunes M.A., Abreu S.C., Cruz F.F. [et al.] // *Respir Res*. – 2014. – Vol. 5. – P. 118.
20. **Aranda E.** A semi-quantitative assay to screen for angiogenic compounds and compounds with angiogenic potential using the EA.hy926 endothelial cell line. / Aranda E., Owen G.I. // *Biol Res*. – 2009. – Vol. 42(3). – P. 377-89.
21. **Arnaoutova I.** The endothelial cell tube formation assay on basement membrane turns 20: state of the science and the art. / Arnaoutova I., George J., Kleinman H.K. [et al.] // *Angiogenesis*. – 2009. – Vol. 12(3). – P. 267-74.
22. **Azari O.** Effects of transplanted mesenchymal stem cells isolated from Wharton's jelly of caprine umbilical cord on cutaneous wound healing; histopathological evaluation. / Azari O., Babaei H., Derakhshanfar A. [et al.] // *Vet Res Commun*. – 2011. – Vol. 35(4). – P. 211-22.
23. **Babuccu O.** Evaluation by scintigraphy of hindlimb ischemia in a rat model. / Babuccu O., Peksoy I., Hosnuter M. [et al.] // *J Reconstr Microsurg*. – 2004. – Vol. 20(5). – P. 405-10.
24. **Badowski M.** Mixed effects of long-term frozen storage on cord tissue stem cells. / Badowski M., Muise A., Harris D.T. // *Cytotherapy*. – 2014. – Vol. 16(9). – P. 1313-21.
25. **Bakhshi T.** Mesenchymal stem cells from the Wharton's jelly of umbilical cord segments provide stromal support for the maintenance of cord blood hematopoietic stem cells during long-term ex vivo culture. / Bakhshi T., Zabriskie R.C., Bodie S. [et al.] // *Transfusion*. – 2008. – Vol. 48(12). – P. 2638-44.
26. **Balasubramanian S.** Comparison of chemokine and receptor gene expression between Wharton's jelly and bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. / Balasubramanian S., Venugopal P., Sundarraj S. [et al.] // *Cytotherapy*. – 2012. – Vol. 14(1). – P. 26-33.

27. **Balasubramanian S.** Higher propensity of Wharton's jelly derived mesenchymal stromal cells towards neuronal lineage in comparison to those derived from adipose and bone marrow. / Balasubramanian S., Thej C., Venugopal P. [et al.] // *Cell Biol Int.* – 2013. – Vol. 37(5). – P. 507-15.
28. **Ball S.G.** Vascular endothelial growth factor can signal through platelet-derived growth factor receptors. / Ball S.G., Shuttleworth C.A., Kielty C.M. // *J Cell Biol.* – 2007. – Vol. 177(3). – P. 489-500.
29. **Ball S.G.** Neuropilin-1 regulates platelet-derived growth factor receptor signalling in mesenchymal stem cells. / Ball S.G., Bayley C., Shuttleworth C.A. [et al.] // *Biochem J.* – 2010. – Vol. 427(1). – P. 29-40.
30. **Barbay V.** Role of M2-like macrophage recruitment during angiogenic growth factor therapy. / Barbay V., Houssari M., Mekki M. [et al.] // *Angiogenesis.* – 2015. – Vol. 18(2). – P. 191-200.
31. **Batsali A.K.** Mesenchymal stem cells derived from Wharton's Jelly of the umbilical cord: biological properties and emerging clinical applications. / Batsali A.K., Kastrinaki M.C., Papadaki H.A. [et al.] // *Curr Stem Cell Res Ther.* – 2013. – Vol. 8(2). – P. 144-55.
32. **Baumeister S.P.** Comparison of six methods for the assessment of ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle following composite tissue allotransplantation. / Baumeister S.P., Ofer N., Kleist C. [et al.] // *J Reconstr Microsurg.* – 2004. – Vol. 20(3). – P. 253-9.
33. **Bieback K.** Mesenchymal stromal cells from human perinatal tissues: From biology to cell therapy. / Bieback K., Brinkmann I. // *World J Stem Cells.* – 2010. – Vol. 2(4). – P. 81-92.
34. **Blocki A.** Not all MSCs can act as pericytes: functional in vitro assays to distinguish pericytes from other mesenchymal stem cells in angiogenesis. / Blocki A., Wang Y., Koch M. [et al.] // *Stem Cells Dev.* – 2013. – Vol. 22(17). – P. 2347-55.
35. **Bongso A.** Phenotype and Differentiation Potential of Stromal Populations Obtained from Various Zones of Human Umbilical Cord: An Overview. / Bongso

- A., Fong C.-Y. // *Stem Cell Reviews and Reports*. – 2013. – Vol. 9(2). – P. 226-240.
36. **Borghesi A.** Genomic alterations in human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells call for stringent quality control before any possible therapeutic approach. / Borghesi A., Avanzini M.A., Novara F. [et al.] // *Cytotherapy*. – 2013. – Vol. 15(11). – P. 1362-73.
 37. **Bouïs D.** Endothelium in vitro: a review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research. / Bouïs D., Hospers G.A, Meijer C. [et al.] // *Angiogenesis*. – 2001. – 4(2). – P. 91-102.
 38. **Bronckaers A.** Mesenchymal stem/stromal cells as a pharmacological and therapeutic approach to accelerate angiogenesis. / Bronckaers A., Hilkens P., Martens W. [et al.] // *Pharmacol Ther*. – 2014. – Vol. 143(2). – P. 181-96.
 39. **Burlacu A.** Factors secreted by mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells have complementary effects on angiogenesis in vitro. / Burlacu A., Grigorescu G., Rosca A.M. [et al.] // *Stem Cells Dev*. – 2013. – Vol. 22(4). – P. 643-53.
 40. **Can A.** Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells. / Can A., Karahuseyinoglu S. // *Stem Cells*. – 2007. – Vol. 25(11). – P. 2886-95.
 41. **Caplan A.I.** Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. / Caplan A.I. // *J Pathol*. – 2009. – Vol. 217(2). – P. 318-24.
 42. **Carlin R.** Expression of early transcription factors Oct-4, Sox-2 and Nanog by porcine umbilical cord (PUC) matrix cells. / Carlin R., Davis D., Weiss M. [et al.] // *Reprod Biol Endocrinol*. – 2006. – Vol. 4. – P. 8.
 43. **Carmeliet P.** Angiogenesis in health and disease. / Carmeliet P. // *Nat. Med*. – 2003. – Vol. 9(6). – P. 653-60.
 44. **Carrier-Ruiz A.** Biological behavior of mesenchymal stem cells on poly-ε-caprolactone filaments and a strategy for tissue engineering of segments of the peripheral nerves. / Carrier-Ruiz A., Evaristo-Mendonça F., Mendez-Otero R. [et al.] // *Stem Cell Res Ther*. – 2015. – Vol. 6. – P. 128.

45. **Castellon R.** // Effects of angiogenic growth factor combinations on retinal endothelial cells. / Castellon R., Hamdi H.K., Sacerio I. [et al.] // *Exp Eye Res.* – 2002. – Vol. 74(4). – P. 523-35.
46. **Chatterjee D.** Role of gamma-secretase in human umbilical-cord derived mesenchymal stem cell mediated suppression of NK cell cytotoxicity. / Chatterjee D., Marquardt N., Tufa D. [et al.] // *Cell Commun Signal.* – 2014. – Vol. 12(1). – P. 63.
47. **Chen G.** Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells do not undergo malignant transformation during long-term culturing in serum-free medium. / Chen G., Yue A., Ruan Z. [et al.] // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9(6). – P. e98565. eCollection 2014.
48. **Chen M.Y.** Endothelial differentiation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. / Chen M.Y., Lie P.C., Li Z.L. [et al.] // *Exp Hematol.* – 2009. – Vol. 37(5). – P. 629-40.
49. **Chen Y.** Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells: A New Therapeutic Option for Tooth Regeneration. / Chen Y., Yu Y., Chen L. [et al.] // *Stem Cells Int.* – 2015. – P. 549432.
50. **Choi M.** Proangiogenic features of Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal/stem cells and their ability to form functional vessels. / Choi M., Lee H.S., Naidansaren P. [et al.] // *Int J Biochem Cell Biol.* – 2013. – Vol. 45(3). – P. 560-70.
51. **Chowdhury R.** Cancer exosomes trigger mesenchymal stem cell differentiation into pro-angiogenic and pro-invasive myofibroblasts. / Chowdhury R., Webber J.P., Gurney M. [et al.] // *Oncotarget.* – 2015. – 6(2). – P. 715-31.
52. **Chung A.S.** Developmental and pathological angiogenesis. / Chung A.S., Ferrara N. // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* – 2011. – Vol. 27. – P. 563-84.
53. **Conconi M.T.** Phenotype and Differentiation Potential of Stromal Populations Obtained from Various Zones of Human Umbilical Cord: An Overview. /

- Conconi M.T., Di Liddo R., Tommasini M. [et al.] // The Open Tissue Engineering and Regenerative Medicine Journal. – 2011. – Vol. 4. – P. 6-20.
54. **Contreras-Shannon V.** Fat accumulation with altered inflammation and regeneration in skeletal muscle of CCR2^{-/-} mice following ischemic injury. / Contreras-Shannon V., Ochoa O., Reyes-Reyna S.M. [et al.] // Am J Physiol Cell Physiol. – 2007. – Vol. 292(2). – P. 953-67.
 55. **Corrao S.** Umbilical cord revisited: from Wharton's jelly myofibroblasts to mesenchymal stem cells. / Corrao S., La Rocca G., Lo Iacono M. [et al.] // Histol Histopathol. – 2013. – Vol. 28(10). – P. 1235-44.
 56. **Coskun H.** The assessment of the in vivo to in vitro cellular transition of human umbilical cord multipotent stromal cells. / Coskun H., Can A. // Placenta. – 2015. – Vol. 36(2). – P. 232-9.
 57. **Covas D.T.** Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146⁺ perivascular cells and fibroblasts. / Covas D.T., Panepucci R.A., Fontes A.M. [et al.] // Exp Hematol. – 2008. – Vol. 36(5). – P. 642-54.
 58. **da Silva Meirelles L.** In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. / da Silva Meirelles L., Caplan A.I., Nardi N.B. [et al.] // Stem Cells. – 2008. – Vol. 26(9). – P. 2287-99.
 59. **Datta I.** Neuronal plasticity of human Wharton's jelly mesenchymal stromal cells to the dopaminergic cell type compared with human bone marrow mesenchymal stromal cells. / Datta I., Mishra S., Mohanty L. [et al.] // Cytotherapy. – 2011. – Vol. 13(8). – P. 918-32.
 60. **Dayan V.** Mesenchymal stromal cells mediate a switch to alternatively activated monocytes/macrophages after acute myocardial infarction. / Dayan V., Yannarelli G., Billia F. [et al.] // Basic Res Cardiol. – 2011. – Vol. 106(6). – P. 1299-310.
 61. **De Kock J.** Mesoderm-derived stem cells: the link between the transcriptome and their differentiation potential. / De Kock J., Najar M., Bolleyn J. [et al.] // Stem Cells Dev. – 2012. – Vol. 21(18). – P. 3309-23.

62. **Deng W.** Mesenchymal stem cells promote CD206 expression and phagocytic activity of macrophages through IL-6 in systemic lupus erythematosus. / Deng W., Chen W., Zhang Z. [et al.] // Clin Immunol. – 2015. – Vol. 161(2). – P. 209-216.
63. **Deng Y.** Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells instruct dendritic cells to acquire tolerogenic phenotypes through the IL-6-mediated upregulation of SOCS1. / Deng Y., Yi S., Wang G. [et al.] // Stem Cells Dev. – Vol. 2014. – 23(17). – P. 2080-92.
64. **Desai V.D.** Reversible modulation of myofibroblast differentiation in adipose-derived mesenchymal stem cells. / Desai V.D., Hsia H.C., Schwarzbauer J.E. // PLoS One. – Vol. 2014. – 9(1). – P. e86865. eCollection 2014.
65. **Ding D.C.** Enhancement of neuroplasticity through upregulation of beta1-integrin in human umbilical cord-derived stromal cell implanted stroke model. / Ding D.C., Shyu W.C., Chiang M.F. [et al.] // Neurobiol Dis. – 2007. – Vol. 27(3). – P. 339-53.
66. **Dominici M.** Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. / Dominici M., Le Blanc K., Mueller I. [et al.] // Cytotherapy. – 2006. – Vol. 8(4). – P. 315-7.
67. **Donders R.** Human Wharton's jelly-derived stem cells display immunomodulatory properties and transiently improve rat experimental autoimmune encephalomyelitis. / Donders R., Vanheusden M., Bogie J.F. [et al.] // Cell Transplant. – 2015. – Vol. 24(10). – P. 2077-98.
68. **Drela K.** Low oxygen atmosphere facilitates proliferation and maintains undifferentiated state of umbilical cord mesenchymal stem cells in an hypoxia inducible factor-dependent manner. / Drela K., Sarnowska A., Siedlecka P. [et al.] // Cytotherapy. – 2014. – Vol. 16(7). – P. 881-92.
69. **Edwards S.S.** Functional analysis reveals angiogenic potential of human mesenchymal stem cells from Wharton's jelly in dermal regeneration. / Edwards

- S.S., Zavala G., Prieto C.P. [et al.] // *Angiogenesis*. – 2014. – Vol. 17(4). – P. 851-66. doi: 10.1007/s10456-014-9432-7.
70. **El Omar R.** Umbilical cord mesenchymal stem cells: the new gold standard for mesenchymal stem cell-based therapies? / El Omar R., Beroud J., Stoltz J.F. [et al.] // *Tissue Eng Part B Rev.* – 2014. – Vol. 20(5). – P. 523-44.
 71. **Estrada R.** Secretome from mesenchymal stem cells induces angiogenesis via Cyr61. / Estrada R., Li N., Sarojini H. [et al.] // *J Cell Physiol.* – Vol. 2009. – 219(3). – P. 563-71.
 72. **Fan C.G.** Therapeutic potentials of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord. / Fan C.G., Zhang Q.J., Zhou J.R. // *Stem Cell Rev.* – 2011. – Vol. 1. – P. 195-207.
 73. **Fan W.** mTORC1 and mTORC2 play different roles in the functional survival of transplanted adipose-derived stromal cells in hind limb ischemic mice via regulating inflammation in vivo. / Fan W., Cheng K., Qin X. [et al.] // *Stem Cells.* – 2013. – Vol. 31(1). – P. 203-14.
 74. **Fang T.C.** Renoprotective effect of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in immunodeficient mice suffering from acute kidney injury. / Fang T.C., Pang C.Y., Chiu S.C. [et al.] // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7(9). – P. e46504.
 75. **Farias V.A.** Human umbilical cord stromal stem cell express CD10 and exert contractile properties. / Farias V.A., Linares-Fernández JL, Peñalver JL. [et al.] // *Placenta.* – 2011. – Vol. 32(1). – P. 86-95.
 76. **Ferrand J.** Human bone marrow-derived stem cells acquire epithelial characteristics through fusion with gastrointestinal epithelial cells. / Ferrand J., Noël D., Lehours P. [et al.] // *PLoS One.* – 2011. – Vol. 6(5). – P. e19569.
 77. **Fong C.Y.** Comparative growth behaviour and characterization of stem cells from human Wharton's jelly. / Fong C.Y., Richards M., Manasi N. [et al.] // *Reprod Biomed Online.* – 2007. – Vol. 15(6). – P. 708-18.
 78. **Fong C.Y.** Human Wharton's jelly stem cells have unique transcriptome profiles compared to human embryonic stem cells and other mesenchymal stem cells. /

- Fong C.Y., Chak L.L., Biswas A. [et al.] // *Stem Cell Rev.* – 2011. – Vol. 7(1). – P. 1-16.
79. **Friedman R.** Umbilical cord mesenchymal stem cells: adjuvants for human cell transplantation. / Friedman R., Betancur M., Boissel L. [et al.] // *Biol Blood Marrow Transplant.* – 2007. – Vol. 13(12). – P. 1477-86.
 80. **Ganta C.** Rat umbilical cord stem cells completely abolish rat mammary carcinomas with no evidence of metastasis or recurrence 100 days post-tumor cell inoculation. / Ganta C., Chiyo D., Ayuzawa R. [et al.] // *Cancer Res.* – 2009. – Vol. 69(5). – P. 1815-20.
 81. **Gauthaman K.** Extra-embryonic human Wharton's jelly stem cells do not induce tumorigenesis, unlike human embryonic stem cells. / Gauthaman K., Fong C.Y., Suganya C.A. [et al.] // *Reprod Biomed Online.* – 2012. – Vol. 24(2). – P. 235-46.
 82. **Gensel J.C.** Macrophage activation and its role in repair and pathology after spinal cord injury. / Gensel J.C., Zhang B. // *Brain Res.* – 2015. – Vol. 1619. – P. 1-11.
 83. **Germani A.** Vascular endothelial growth factor modulates skeletal myoblast function. / Germani A., Di Carlo A., Mangoni A. [et al.] // *Am J Pathol.* – 2003. – Vol. 163(4). – P. 1417-28.
 84. **Gittel C.** Isolation of equine multipotent mesenchymal stromal cells by enzymatic tissue digestion or explant technique: comparison of cellular properties. / Gittel C., Brehm W., Burk J. [et al.] // *BMC Vet Res.* – 2013. – Vol. 9. – P. 221.
 85. **Gomes S.A.** S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) enhances vasculogenesis by mesenchymal stem cells. / Gomes S.A., Rangel E.B., Premer C. [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2013. – Vol. 110(8). – P. 2834-9.
 86. **Han Y.** Differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into dermal fibroblasts in vitro. / Han Y., Chai J., Sun T. [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2011. – Vol. 413(4). – P. 561-5.

87. **Han Y.F.** Optimization of human umbilical cord mesenchymal stem cell isolation and culture methods. / Han Y.F., Tao R., Sun T.J. [et al.] // *Cytotechnology*. – 2013. – Vol. 65(5). – P. 819-27.
88. **Hartmann I.** Umbilical cord tissue-derived mesenchymal stem cells grow best under GMP-compliant culture conditions and maintain their phenotypic and functional properties. / Hartmann I., Hollweck T., Haffner S. [et al.] // *J Immunol Methods*. – 2010. – Vol. 363(1). – P. 80-9.
89. **He H.** Stage-specific embryonic antigen 4 in Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells is not a marker for proliferation and multipotency. / He H., Nagamura-Inoue T., Tsunoda H. [et al.] // *Tissue Eng Part A*. – 2014. – Vol. 20(7-8). – P. 1314-24.
90. **He L.** Macrophages are essential for the early wound healing response and the formation of a fibrovascular scar. / He L., Marneros A.G. // *Am J Pathol*. – 2013. – Vol. 182(6). – P. 2407-17.
91. **Hsieh J.Y.** Functional module analysis reveals differential osteogenic and stemness potentials in human mesenchymal stem cells from bone marrow and Wharton's jelly of umbilical cord. / Hsieh J.Y., Fu Y.S., Chang S.J. [et al.] // *Stem Cells Dev*. – 2010. – Vol. 19(12). – P. 1895-910.
92. **Hsieh J.Y.** Mesenchymal stem cells from human umbilical cord express preferentially secreted factors related to neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis. / Hsieh J.Y., Wang H.W., Chang S.J. [et al.] // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8(8). – P. e72604. eCollection 2013.
93. **Hua J.** Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord matrix: proliferation and multilineage differentiation as compared to mesenchymal stem cells from umbilical cord blood and bone marrow. / Hua J., Gong J., Meng H. [et al.] // *Cell Biol Int*. – 2014. – Vol. 38(2). – P. 198-210.
94. **Huang X.-P.** Differentiation of allogeneic mesenchymal stem cells induces immunogenicity and limits their long-term benefits for myocardial repair. /

- Huang X.-P., Sun Z., Miyagi Y. [et al.] // *Circulation*. – 2010. – Vol. 122. – P. 2419-2429.
95. **Hughes C.S.** Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. / Hughes C.S., Postovit L.M., Lajoie G.A. // *Proteomics*. – 2010. – Vol. 10(9). – P. 1886-90.
 96. **Imoukhuede P.I.** Endothelial cell-by-cell profiling reveals temporal dynamics of VEGFR1 and VEGFR2 membrane-localization following murine hindlimb ischemia. / Imoukhuede P.I., Dokun A.O., Annex B.H. [et al.] // *Am J Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2013. – Vol. 304(8). – P. 1085-93.
 97. **Imoukhuede P.I.** Quantification and cell-to-cell variation of vascular endothelial growth factor receptors. / Imoukhuede P.I., Popel A.S. // *Exp. Cell. Res.* – 2011. – Vol. 317(7). – P. 955-65.
 98. **Ishii M.** Enhanced angiogenesis by transplantation of mesenchymal stem cell sheet created by a novel magnetic tissue engineering method. / Ishii M., Shibata R., Numaguchi Y. [et al.] // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2011. – Vol. 31(10). – P. 2210-5.
 99. **Isner J.M.** Angiogenesis and cardiovascular disease. / Isner J.M., Vale P., Symes J. [et al.] // *Dialogues in Cardiovascular Medicine*. – 2001. – Vol 6(3). – P. 145-172.
 100. **Ito M.** NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. / Ito M., Hiramatsu H., Kobayashi K. [et al.] // *Blood*. – 2002. – Vol. 100(9). – P. 3175-82.
 101. **Jeremias T. da S.** Dermal substitutes support the growth of human skin-derived mesenchymal stromal cells: potential tool for skin regeneration. / Jeremias T. da S., Machado R.G., Visoni S.B. [et al.] // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9(2). – P. e89542. eCollection 2014.
 102. **Jetten N.** Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo. / Jetten N., Verbruggen S., Gijbels M.J. [et al.] // *Angiogenesis*. – 2014. – Vol. 17(1). – P. 109-18.

103. **Jiang Q.** Norepinephrine stimulates mobilization of endothelial progenitor cells after limb ischemia. / Jiang Q., Ding S., Wu J. [et al.] // PLoS One. – 2014. – Vol. 9(7). – P. e101774. eCollection 2014.
104. **Jin H.J.** Downregulation of Melanoma Cell Adhesion Molecule (MCAM/CD146) Accelerates Cellular Senescence in Human Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells. / Jin H.J., Kwon J.H., Kim M. [et al.] // Stem Cells Transl Med. – 2016. – Vol. 5(4). – P. 427-39.
105. **Joerger-Messerli M.** Preeclampsia enhances neuroglial marker expression in umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. / Joerger-Messerli M., Brühlmann E., Bessire A. [et al.] // J Matern Fetal Neonatal Med. – 2015. – Vol. 28(4). – P. 464-9.
106. **Kadam S.S.** Islet neogenesis from the constitutively nestin expressing human umbilical cord matrix derived mesenchymal stem cells. / Kadam S.S., Bhonde R.R. // Islets. – 2010. – Vol. 2(2). – P. 112-20.
107. **Kadam S.S.** Simultaneous isolation of vascular endothelial cells and mesenchymal stem cells from the human umbilical cord. / Kadam S.S., Tiwari S., Bhonde R.R. [et al.] // In Vitro Cell Dev Biol Anim. – 2009. – Vol. 45(1-2). – P. 23-7.
108. **Kanlaya R.** Alterations in actin cytoskeletal assembly and junctional protein complexes in human endothelial cells induced by dengue virus infection and mimicry of leukocyte transendothelial migration. / Kanlaya R., Pattanakitsakul S.N., Sinchaikul S. [et al.] // J Proteome Res. – 2009. – Vol. 8(5). – P. 2551-62.
109. **Kano Y.** The effects of PGC-1 α on control of microvascular P(O₂) kinetics following onset of muscle contractions. / Kano Y., Miura S., Eshima H. [et al.] // J Appl Physiol (1985). – 2014. – Vol. 117(2). – P. 163-70.
110. **Karahuseyinoglu S.** Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. / Karahuseyinoglu S., Cinar O., Kilic E. [et al.] // Stem Cells. – 2007. – Vol. 25(2). – P. 319-31.

111. **Kim J.** Umbilical cord mesenchymal stromal cells affected by gestational diabetes mellitus display premature aging and mitochondrial dysfunction. / Kim J., Piao Y., Pak Y.K. [et al.] // *Stem Cells Dev.* – 2015. – Vol. 24(5). – P. 575-86.
112. **Kim J.A.** Cytogenetic heterogeneity and their serial dynamic changes during acquisition of cytogenetic aberrations in cultured mesenchymal stem cells. / Kim J.A., Im K.O., Park S.N. [et al.] // *Mutat Res.* – 2015. – Vol. 777. – P. 60-8.
113. **Kleinman H.K.** Basement membrane complexes with biological activity. / Kleinman H.K., McGarvey M.L., Hassell J.R. [et al.] // *Biochemistry.* – 1986. – Vol. 25(2). – P. 312-8.
114. **Knudtson S.** In vitro growth of granulocytic colonies from circulating cells in human cord blood. Knudtson S. // *Blood.* – 1974. – Vol. 43(3). – P. 357-61.
115. **Kramann R.** Osteogenesis of heterotopically transplanted mesenchymal stromal cells in rat models of chronic kidney disease. / Kramann R., Kunter U., Brandenburg V.M. [et al.] // *J Bone Miner. Res.* – 2013. – Vol. 28(12). – P. 2523-34.
116. **Kubota Y.** Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. / Kubota Y., Kleinman H.K., Martin G.R. [et al.] // *J Cell Biol.* – 1988. – Vol. 107(4). – P. 1589-98.
117. **Kuchroo P.** Paracrine factors secreted by umbilical cord-derived mesenchymal stem cells induce angiogenesis in vitro by a VEGF-independent pathway. / Kuchroo P., Dave V., Vijayan A. [et al.] // *Stem Cells Dev.* – 2015. – Vol. 24(4). – P. 437-50.
118. **Lai Y.** Interleukin-8 induces the endothelial cell migration through the Rac 1/RhoA-p38MAPK pathway. / Lai Y., Liu X.H., Zeng Y. [et al.] // *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* – 2012. – Vol. 16(5). – P. 630-8.
119. **Latifpour M.** Differentiation of Human Umbilical Cord Matrix-Derived Mesenchymal Stem Cells into Germ-Like Cells. / Latifpour M., Shakiba Y., Amidi F. [et al.] // *Avicenna J Med Biotechnol.* – 2014. – Vol. 6(4). – P. 218-227.

120. **Laurila J.P.** SOD3 reduces inflammatory cell migration by regulating adhesion molecule and cytokine expression. / Laurila J.P., Laatikainen L.E., Castellone M.D. [et al.] // PLoS One. – 2009. – Vol. 4(6). – P. e5786.
121. **Lawall H.** Stem cell and progenitor cell therapy in peripheral artery disease. / Lawall H., Bramlage P., Amann B. [et al.] // A critical appraisal. Thromb. Haemost. – 2010. – Vol. 103. – P. 696–709.
122. **Li B.** Overexpression of CD61 promotes hUC-MSC differentiation into male germ-like cells. / Li B., Liu W., Zhuang M. [et al.] // Cell Prolif. – 2016. – Vol. 49(1). – P. 36-47.
123. **Li D.R.** Methods of isolation, expansion, differentiating induction and preservation of human umbilical cord mesenchymal stem cells. / Li D.R., Cai J.H. // Chin Med J (Engl). – 2012. – Vol. 125(24). – P. 4504-10.
124. **Li J.** Hepatocyte Growth Factor Gene-Modified Mesenchymal Stem Cells Augment Sinonasal Wound Healing. / Li J., Zheng C.Q., Li Y. [et al.] // Stem Cells Dev. – 2015. – Vol. 24(15). – P. 1817-30.
125. **Li J.F.** Differentiation of hUC-MSC into dopaminergic-like cells after transduction with hepatocyte growth factor. / Li J.F., Yin H.L., Shuboy A. [et al.] // Mol Cell Biochem. – 2013. – Vol. 381(1-2). – P. 183-90.
126. **Li J.P.** Transplantation of erythropoietin gene-transfected umbilical cord mesenchymal stem cells as a treatment for limb ischemia in rats. / Li J.P., Wang D.W., Song Q.H. [et al.] // Genet Mol Res. – 2015. – Vol. 14(4). – P. 19005-15.
127. **Li N.** BMP4 promotes SSEA-1(+) hUC-MSC differentiation into male germ-like cells in vitro. / Li N., Pan S., Zhu H. [et al.] // Cell Prolif. – 2014. – Vol. 47(4). – P. 299-309.
128. **Li P.** PKH26 can transfer to host cells in vitro and vivo. / Li P., Zhang R., Sun H. [et al.] // Stem Cells Dev. – 2013. – Vol. 22(2). – P. 340-4.
129. **Li Q.** Differential expression of CD146 in tissues and endothelial cells derived from infantile haemangioma and normal human skin. / Li Q., Yu Y., Bischoff J. [et al.] // J Pathol. – 2003. – Vol. 201(2). – P. 296-302.

130. **Li X.** Comprehensive characterization of four different populations of human mesenchymal stem cells as regards their immune properties, proliferation and differentiation. / Li X., Bai J., Ji X. [et al.] // *Int J Mol Med.* – 2014. – Vol. 34(3). – P. 695-704.
131. **Liang L.,** Han Z.C. Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells: Biology and Clinical Application. In: Stoltz J.F., editor. *Regenerative Medicine and Cell Therapy.* Amsterdam: IOS Press. – 2012. – P. 62-70.
132. **Liao W.** Therapeutic effect of human umbilical cord multipotent mesenchymal stromal cells in a rat model of stroke. / Liao W., Xie J., Zhong J. [et al.] // *Transplantation.* – 2009. – Vol. 87(3). – P. 350-9.
133. **Liew A.** Therapeutic potential for mesenchymal stem cell transplantation in critical limb ischemia. / Liew A., O'Brien T. // *Stem Cell Res Ther.* – 2012. – Vol. 3(4). – P. 28.
134. **Lin C.S.** Commonly used mesenchymal stem cell markers and tracking labels: Limitations and challenges. / Lin C.S., Xin Z.C., Dai J. [et al.] // *Histol. Histopathol.* – 2013. – Vol. 28(9). – P. 1109-16.
135. **Lin Y.** Transplantation of human umbilical mesenchymal stem cells attenuates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. / Lin Y., Lin L., Wang Q. [et al.] // *Clin Exp Pharmacol Physiol.* – 2015. – Vol. 42(1). – P. 76-86.
136. **Liu A.M.** Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells with forced expression of hepatocyte growth factor enhance remyelination and functional recovery in a rat intracerebral hemorrhage model. / Liu A.M., Lu G., Tsang K.S. [et al.] // *Neurosurgery.* – 2010. – Vol. 67(2). – P. 357-65.
137. **Liu L.** Intranasal versus intraperitoneal delivery of human umbilical cord tissue-derived cultured mesenchymal stromal cells in a murine model of neonatal lung injury. / Liu L., Mao Q., Chu S. [et al.] // *Am J Pathol.* – 2014. – Vol. 184(12). – P. 3344-58.
138. **Liu R.** Umbilical cord mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of circulating T follicular helper cells in patients with primary Sjögren's syndrome

- through the secretion of indoleamine 2,3-dioxygenase. / Liu R., Su D., Zhou M. [et al.] // *Rheumatology (Oxford)*. – 2015. – Vol. 54(2). – P. 332-42.
139. **Lombardo E.** Mesenchymal stem cells as a therapeutic tool to treat sepsis. / Lombardo E., van der Poll T., DelaRosa O. [et al.] // *World J Stem Cells*. – 2015. – Vol. 7(2). – P. 368-79.
 140. **Lozito T.P.** Human mesenchymal stem cells express vascular cell phenotypes upon interaction with endothelial cell matrix. / Lozito T.P., Kuo C.K., Taboas J.M. [et al.] // *J Cell Biochem*. – 2009. – Vol. 107(4). – P. 714-22.
 141. **Lu L.L.** Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. / Lu L.L., Liu Y.J., Yang S.G. [et al.] // *Haematologica*. – 2006. – Vol. 91(8). – P. 1017-26.
 142. **Lv F.** Intrinsic properties of mesenchymal stem cells from human bone marrow, umbilical cord and umbilical cord blood comparing the different sources of MSC. / Lv F., Lu M., Cheung K.M. [et al.] // *Curr Stem Cell Res Ther*. – 2012. – Vol. 7(6). – P. 389-99.
 143. **Lv F.J.** Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. / Lv F.J., Tuan R.S., Cheung K.M. [et al.] // *Stem Cells*. – 2014. – Vol. 32(6). – P. 1408-19.
 144. **Lv S.** Mesenchymal stem cells ameliorate diabetic glomerular fibrosis in vivo and in vitro by inhibiting TGF- β signalling via secretion of bone morphogenetic protein 7. / Lv S., Liu G., Sun A. [et al.] // *Diab Vasc Dis Res*. – 2014. – Vol. 11(4). – P. 251-261.
 145. **Madrigal M.** A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. / Madrigal M., Rao K.S., Riordan N.H. // *J Transl Med*. – 2014. – Vol. 12. – P. 260.
 146. **Majore I.** Growth and differentiation properties of mesenchymal stromal cell populations derived from whole human umbilical cord. / Majore I., Moretti P., Stahl F. [et al.] // *Stem Cell Rev*. – 2011. – Vol. 7(1). – P. 17-31.

147. **Majore I.** Identification of subpopulations in mesenchymal stem cell-like cultures from human umbilical cord. / Majore I., Moretti P., Hass R. [et al.] // *Cell Commun Signal.* – 2009. – Vol. 7. – P. 6.
148. **Majumdar D.** Influence of ischemic microenvironment on human Wharton's Jelly mesenchymal stromal cells. / Majumdar D., Bhonde R., Datta I. // *Placenta.* – 2013. – Vol. 34(8). – P. 642-9.
149. **Margossian T.** Mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly: comparative phenotype analysis between tissue and in vitro expansion. / Margossian T., Reppel L., Makdissy N. [et al.] // *Biomed Mater Eng.* – 2012. – Vol. 22(4). – P. 243-54.
150. **Maus U.** Monocytes recruited into the alveolar air space of mice show a monocytic phenotype but upregulate CD14. / Maus U., Herold S., Muth H. [et al.] // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* – 2001. – Vol. 280(1). – P. 58-68.
151. **McCarty M.E.** Sympathetic blockade of isolated rat hindlimbs by intra-arterial guanethidine: the effect on blood flow and arterial-venous shunting. / McCarty M.E., Grossi E.A., Cutting C. [et al.] // *Microsurgery.* – 1995. – Vol. 16(7). – P. 476-81.
152. **McElreavey K.D.** Isolation, culture and characterisation of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord. / McElreavey K.D., Irvine A.I., Ennis K.T. // *Biochem Soc Trans.* – 1991. – Vol. 19(1). – P. 29S.
153. **Messerli M.** Stem cells from umbilical cord Wharton's jelly from preterm birth have neuroglial differentiation potential. / Messerli M., Wagner A., Sager R. [et al.] // *Reprod Sci.* – 2013. – Vol. 20(12). – P. 1455-64.
154. **Mitchell K.E.** Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. / Mitchell K.E., Weiss M.L., Mitchell B.M. [et al.] // *Stem Cells.* – 2003. – Vol. 21(1). – P. 50-60.
155. **Moon M.H.** Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve postnatal neovascularization in a mouse model of hindlimb ischemia. / Moon

- M.H., Kim S.Y., Kim Y.J. [et al.] // *Cell Physiol Biochem.* – 2006. – Vol. 17(5-6). – P. 279-90.
156. **Nekanti U.** Long-term expansion and pluripotent marker array analysis of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. / Nekanti U., Rao V.B., Bahirvani A. [et al.] // *Stem Cells Dev.* – 2010. – Vol. 19(1). – P. 117-30.
 157. **Németh K.** Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. / Németh K., Leelahavanichkul A., Yuen P.S. [et al.] // *Nat Med.* – 2009. – Vol. 15(1). – P. 42-9.
 158. **Ngo M.A.** Human mesenchymal stem cells express a myofibroblastic phenotype in vitro: comparison to human cardiac myofibroblasts. / Ngo M.A., Müller A., Li Y. [et al.] // *Mol Cell Biochem.* – 2014. – Vol. 392(1-2). – P. 187-204.
 159. **Noad J.** MRI tracking of transplanted iron-labeled mesenchymal stromal cells in an immune-compromised mouse model of critical limb ischemia. / Noad J., Gonzalez-Lara L.E., Broughton H.C. [et al.] // *NMR Biomed.* – 2013. – Vol. 26(4). – P. 458-67.
 160. **Ohta N.** Umbilical Cord Matrix Stem Cells for Cytotherapy of Breast Cancer. In: Shah K., editor. *Stem Cell Therapeutics for Cancer.* Wiley-Blackwell. – 2013. – P. 111-126.
 161. **Ouma G.O.** Therapeutic angiogenesis in critical limb ischemia. / Ouma G.O., Zafrir B., Mohler E.R. 3rd [et al.] // *Angiology.* – 2013. – Vol. 64(6). – P. 466-80.
 162. **Pacini S.** Are MSCs angiogenic cells? New insights on human nestin-positive bone marrow-derived multipotent cells. / Pacini S., Petrini I. // *Front Cell Dev Biol.* – 2014. – Vol. 2. – P. 20. eCollection 2014.
 163. **Paula A.C.** Human adipose tissue-derived stem cells cultured in xeno-free culture condition enhance c-MYC expression increasing proliferation but bypassing spontaneous cell transformation. / Paula A.C., Martins T.M., Zonari A. [et al.] // *Stem Cell Res Ther.* – 2015. – Vol. 6. – P. 76.
 164. **Pawelczyk E.** In vitro model of bromodeoxyuridine or iron oxide nanoparticle uptake by activated macrophages from labeled stem cells: implications for

- cellular therapy. / Pawelczyk E., Arbab A.S., Chaudhry A. [et al.] // *Stem Cells*. – 2008. – Vol. 26(5). – P. 1366-75.
165. **Pawelczyk E.** In vivo transfer of intracellular labels from locally implanted bone marrow stromal cells to resident tissue macrophages. / Pawelczyk E., Jordan E.K., Balakumaran A. [et al.] // *PLoS One*. – 2009. – Vol. 4(8). – P. e6712.
 166. **Pellegrin M.** Experimental peripheral arterial disease: new insights into muscle glucose uptake, macrophage, and T-cell polarization during early and late stages. / Pellegrin M., Bouzourène K., Poitry-Yamate C. [et al.] // *Physiol Rep*. – 2014. – Vol. 2(2). – P. e00234.
 167. **Penolazzi L.** Influence of obstetric factors on osteogenic potential of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. / Penolazzi L., Vecchiatini R., Bignardi S. [et al.] // *Reprod Biol Endocrinol*. – 2009. – Vol. 7. – P. 106.
 168. **Petsa A.** Effectiveness of protocol for the isolation of Wharton's Jelly stem cells in large-scale applications. / Petsa A., Gargani S., Felesakis A. [et al.] // *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. – 2009. – Vol. 45(10). – P. 573-6.
 169. **Piccinato C.E.** Assessment of gait dynamics in rats submitted to limb ischemia. / Piccinato C.E., Sousa A.C., Prado W.A. [et al.] // *Acta Cir Bras*. – 2011. – Vol. 26(6). – P. 490-5.
 170. **Popova A.P.** Autocrine production of TGF-beta1 promotes myofibroblastic differentiation of neonatal lung mesenchymal stem cells. / Popova A.P., Bozyk P.D., Goldsmith A.M. [et al.] // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. – 2010. – Vol. 298(6). – P. L735-43.
 171. **Portalska K.** Endothelial differentiation of mesenchymal stromal cells. / Portalska K., Leferink A., Groen N. [et al.] // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7(10). – P. e46842.
 172. **Prockop D.J.** Concise review: two negative feedback loops place mesenchymal stem/stromal cells at the center of early regulators of inflammation. / Prockop D.J. // *Stem Cells*. – 2013. – Vol. 31(10). – P. 2042-6.

173. **Radowsky J.S.** Noninvasive Multimodal Imaging to Predict Recovery of Locomotion after Extended Limb Ischemia. / Radowsky J.S., Caruso J.D., Luthra R. [et al.] // PLoS One. – 2015. – Vol. 10(9). – P. e0137430. eCollection 2015.
174. **Rahman M.M.** CD13 promotes mesenchymal stem cell-mediated regeneration of ischemic muscle. / Rahman M.M., Subramani J., Ghosh M. [et al.] // Front Physiol. – 2014. – Vol. 4. – P. 402.
175. **Raval Z.** Cell therapy of peripheral arterial disease: from experimental findings to clinical trials. / Raval Z., Losordo D.W. // Circ Res. – 2013. – Vol. 112(9). – P. 1288-302.
176. **Rieck B.** Unexpected durability of PKH 26 staining on rat adipocytes. / Rieck B. // Cell Biol. Int. – 2003. – Vol. 27(5). – P. 445-7.
177. **Rigamonti E.** Requirement of inducible nitric oxide synthase for skeletal muscle regeneration after acute damage. / Rigamonti E., Touvier T., Clementi E. [et al.] // J Immunol. – 2013. – Vol. 190(4). – P. 1767-77.
178. **Rissanen T.T.** Expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 (KDR/Flk-1) in ischemic skeletal muscle and its regeneration. / Rissanen T.T., Vajanto I., Hiltunen M.O. [et al.] // Am J Pathol. – 2002. – Vol. 160(4). – P. 1393-403.
179. **Rodriguez L.G.** Wound-healing assay. / Rodriguez L.G., Wu X., Guan J.L. // Methods Mol Biol. – 2005. – Vol. 294. – P. 23-9.
180. **Romanov Y.A.** Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. / Romanov Y.A., Svintsitskaya V.A., Smirnov V.N. // Stem Cells. – 2003. – Vol. 21(1). – P. 105-10.
181. **Rouwkema J.** The use of endothelial progenitor cells for prevascularized bone tissue engineering. / Rouwkema J., Westerweel P.E., de Boer J. [et al.] // Tissue Eng Part A. – 2009. – Vol. 15(8). – P. 2015-27.
182. **Ruan Z.B.** Karyotype stability of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells during in vitro culture. / Ruan Z.B., Zhu L., Yin Y.G. [et al.] // Exp Ther Med. – 2014. – Vol. 8(5). – P. 1508-1512.

183. **Sabapathy V.** Human Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells plasticity augments scar-free skin wound healing with hair growth. / Sabapathy V., Sundaram B., V M S. [et al.] // PLoS One. – 2014. – Vol. 9(4). – P. e93726.
184. **Sági B.** Positional identity of murine mesenchymal stem cells resident in different organs is determined in the postsegmentation mesoderm. / Sági B., Maraghechi P., Urbán V.S. [et al.] // Stem Cells Dev. – 2012. – Vol. 21(5). – P. 814-28.
185. **Salehinejad P.** Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly. / Salehinejad P., Alitheen N.B., Ali A.M. [et al.] // In Vitro Cell Dev Biol Anim. – 2012. – Vol. 48(2). – P. 75-83.
186. **Santos J.M.** The role of human umbilical cord tissue-derived mesenchymal stromal cells (UCX®) in the treatment of inflammatory arthritis. / Santos J.M., Bárcia R.N, Simões S.I. [et al.] // J Transl Med. – 2013. – Vol. 11. – P. 18.
187. **Santos Nascimento D.** Human umbilical cord tissue-derived mesenchymal stromal cells attenuate remodeling after myocardial infarction by proangiogenic, antiapoptotic, and endogenous cell-activation mechanisms. / Santos Nascimento D., Mosqueira D., Sousa L.M. [et al.] // Stem Cell Res Ther. – 2014. – Vol. 5(1). – P. 5.
188. **Sato Y.** Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. / Sato Y., Araki H., Kato J. [et al.] // Blood. – 2005. – Vol. 106(2). – P. 756-63.
189. **Sawano S.** Supplementary immunocytochemistry of hepatocyte growth factor production in activated macrophages early in muscle regeneration. / Sawano S., Suzuki T., Do M.K. [et al.] // Anim Sci J. – 2014. – Vol. 85(12). – P. 994-1000.
190. **Shaer A.** Isolation and characterization of Human Mesenchymal Stromal Cells Derived from Placental Decidua Basalis; Umbilical cord Wharton's Jelly and Amniotic Membrane. / Shaer A., Azarpira N., Aghdaie M.H. [et al.] // Pak J Med Sci. – 2014. – Vol. 30(5). – P. 1022-6.

191. **Shalaby F.** Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. / Shalaby F., Rossant J., Yamaguchi T.P. [et al.] // *Nature*. – 1995. – Vol. 376. – P. 62-66
192. **Shen C.** Conditioned medium from umbilical cord mesenchymal stem cells induces migration and angiogenesis. / Shen C., Lie P., Miao T. [et al.] // *Mol Med Rep*. – 2015. – Vol. 12(1). – P. 20-30.
193. **Shi Z.** The effect of extended passaging on the phenotype and osteogenic potential of human umbilical cord mesenchymal stem cells. / Shi Z., Zhao L., Qiu G. [et al.] // *Mol Cell Biochem*. – 2015. – Vol. 401(1-2). – P. 155-64.
194. **Shibuya M.** Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. / Shibuya M. // *J. Biochem. Mol. Biol*. – 2006. – Vol. 39(5). – P. 469-78.
195. **Shima D.T.** Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human epithelial cells is mediated by increases in mRNA stability. / Shima D.T., Deutsch U., D'Amore P.A. // *FEBS Lett*. – 1995. – Vol. 370(3). – P. 203-8.
196. **Shimamura M.** Gene therapy for peripheral arterial disease. / Shimamura M., Nakagami H., Taniyama Y. [et al.] // *Expert Opin Biol Ther*. 2014;14(8). – P. 1175-84.
197. **Shireman P.K.** MCP-1 deficiency causes altered inflammation with impaired skeletal muscle regeneration. / Shireman P.K., Contreras-Shannon V., Ochoa O. [et al.] // *J Leukoc Biol*. – 2007. – Vol. 81(3). – P. 775-85.
198. **Shohara R.** Mesenchymal stromal cells of human umbilical cord Wharton's jelly accelerate wound healing by paracrine mechanisms. / Shohara R., Yamamoto A., Takikawa S. [et al.] // *Cytotherapy*. – 2012. – Vol. 14(10). – P. 1171-81.
199. **Souza Filho M.V.** Hind limb ischemic preconditioning induces an anti-inflammatory response by remote organs in rats. / Souza Filho M.V., Loiola R.T., Rocha E.L. [et al.] // *Braz J Med Biol Res*. – 2009. – Vol. 42(10). – P. 921-9.
200. **Spiller K.L.** The role of macrophage phenotype in vascularization of tissue engineering scaffolds. / Spiller K.L., Anfang R.R., Spiller K.J. [et al.] // *Biomaterials*. – 2014. – Vol. 35(15). – P. 4477-88.

201. **Stefanini M.O.** A compartment model of VEGF distribution in blood, healthy and diseased tissues. / Stefanini M.O., Wu F.T., Mac Gabhann F. [et al.] // *BMC Syst Biol.* – 2008. – Vol. 2. – P. 77.
202. **Subramanian A.** Comparative Characterization of Cells from the Various Compartments of the Human Umbilical Cord Shows that the Wharton's Jelly Compartment Provides the Best Source of Clinically Utilizable Mesenchymal Stem Cells. / Subramanian A., Fong C.Y., Biswas A. [et al.] // *PLoS One.* – 2015. – Vol. 10(6). – P. e0127992. eCollection 2015.
203. **Swamynathan P.** Are serum-free and xeno-free culture conditions ideal for large scale clinical grade expansion of Wharton's jelly derived mesenchymal stem cells? A comparative study. / Swamynathan P., Venugopal P., Kannan S. [et al.] // *Stem Cell Res Ther.* – 2014. – Vol. 5(4). – P. 88.
204. **Tano N.** Allogeneic mesenchymal stromal cells transplanted onto the heart surface achieve therapeutic myocardial repair despite immunologic responses in rats. / Tano N., Kaneko M., Ichihara Y. [et al.] // *J Am Heart Assoc.* – 2016. – Vol. 5(2). – pii: e002815.
205. **Tantrawatpan C.** Pluripotent gene expression in mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly and their differentiation potential to neural-like cells. / Tantrawatpan C., Manochantr S., Kheolamai P. [et al.] // *J Med Assoc Thai.* – 2013. – Vol. 96(9). – P. 1208-17.
206. **Tao R.** Optimization of in vitro cell labeling methods for human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. / Tao R., Sun T.J., Han Y.Q. [et al.] // *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* – 2014. – Vol. 18(8). – P. 1127-34.
207. **Tong C.K.** Generation of mesenchymal stem cell from human umbilical cord tissue using a combination enzymatic and mechanical disassociation method. / Tong C.K., Vellasamy S., Tan B.C. [et al.] // *Cell Biol Int.* – 2011. – Vol. 35(3). – P. 221-6.
208. **Trivanović D.** Mesenchymal stem cells isolated from peripheral blood and umbilical cord Wharton's jelly. / Trivanović D., Kocić J., Mojsilović S. [et al.] // *Srp Arh Celok Lek.* – 2013. – Vol. 141(3-4). – P. 178-86.

209. **Tsai P.C.** The therapeutic potential of human umbilical mesenchymal stem cells from Wharton's jelly in the treatment of rat liver fibrosis. / Tsai P.C., Fu T.W., Chen Y.M. [et al.] // *Liver Transpl.* – 2009. – Vol. 15(5). – P. 484-95.
210. **Van Pham P.** Isolation and proliferation of umbilical cord tissue derived mesenchymal stem cells for clinical applications. / Van Pham P., Truong N.C., Le P.T.. [et al.] // *Cell Tissue Bank.* –2016. – Vol. 17(2). – P. 289-302.
211. **Vater C.** Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. / Vater C., Kasten P., Stiehler M. // *Acta Biomater.* – 2011. – Vol. 7(2). – P. 463-77.
212. **Vaughan E.E.** Intracellular trafficking of plasmids for gene therapy: mechanisms of cytoplasmic movement and nuclear import. / Vaughan E.E., DeGiulio J.V., Dean D.A. // *Curr Gene Ther.* – 2006. – Vol. 6(6). – P. 671-81.
213. **Venugopal P.** Isolation, characterization, and gene expression analysis of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells under xeno-free culture conditions. / Venugopal P., Balasubramanian S., Majumdar A.S. [et al.] // *Stem Cells Cloning.* – 2011. – Vol. 4. – P. 39-50. eCollection 2011.
214. **Vrekoussis T.** Modulation of vascular endothelium by imatinib: a study on the EA.hy 926 endothelial cell line. / Vrekoussis T., Stathopoulos E.N., De Giorgi U. [et al.] // *J Chemother.* – 2006. – Vol. 18(1). – P. 56-65.
215. **Wang H.** How important is differentiation in the therapeutic effect of mesenchymal stromal cells in liver disease? / Wang H., Zhao T., Xu F. [et al.] // *Cytotherapy.* – 2014. – Vol. 16(3). – P. 309-18.
216. **Wang H.S.** Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. / Wang H.S., Hung S.C., Peng S.T. [et al.] // *Stem Cells.* – 2004. – Vol. 22(7). – P. 1330-7.
217. **Wang T.** Putative role of ischemic postconditioning in a rat model of limb ischemia and reperfusion: involvement of hypoxia-inducible factor-1 α expression. / Wang T., Zhou Y.T., Chen X.N. [et al.] // *Braz J Med Biol Res.* – 2014. – Vol. 47(9). – P. 738-45.

218. **Wang X.Y.** Identification of mesenchymal stem cells in aorta-gonad-mesonephros and yolk sac of human embryos. / Wang X.Y., Lan Y., He W.Y. [et al.] // *Blood*. – 2008. – Vol. 111(4). – P. 2436-43.
219. **Wang Y.** Long-term cultured mesenchymal stem cells frequently develop genomic mutations but do not undergo malignant transformation. / Wang Y., Zhang Z., Chi Y. [et al.] // *Cell Death Dis.* – 2013. – Vol. 4. – P. e950.
220. **Wei X.** Differentiation of umbilical cord mesenchymal stem cells into steroidogenic cells in comparison to bone marrow mesenchymal stem cells. / Wei X., Peng G., Zheng S. [et al.] // *Cell Prolif.* – 2012. – Vol. 45(2). – P. 101-10.
221. **Weiss M.L.** Immune properties of human umbilical cord Wharton's jelly-derived cells. / Weiss M.L., Anderson C., Medicetty S. [et al.] // *Stem Cells*. – 2008. – Vol. 26(11). – P. 2865-74.
222. **Wu L.F.** Differentiation of Wharton's jelly primitive stromal cells into insulin-producing cells in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. / Wu L.F., Wang N.N., Liu Y.S. [et al.] // *Tissue Eng Part A*. – 2009. – Vol. 15(10). – P. 2865-73.
223. **Wu W.K.** IL-10 regulation of macrophage VEGF production is dependent on macrophage polarisation and hypoxia. / Wu W.K., Llewellyn O.P., Bates D.O. [et al.] // *Immunobiology*. – 2010. – Vol. 215(9-10). – P. 796-803.
224. **Xu H.** Transplantation of neuronal cells induced from human mesenchymal stem cells improves neurological functions after stroke without cell fusion. / Xu H., Miki K., Ishibashi S. [et al.] // *J Neurosci Res.* – 2010. – Vol. 88(16). – P. 3598-609.
225. **Yan J.** Mesenchymal stem cells as a treatment for peripheral arterial disease: current status and potential impact of type II diabetes on their therapeutic efficacy. / Yan J., Tie G., Xu T.Y. [et al.] // *Stem Cell Rev.* – 2013. – Vol. 9(3). – P. 360-72.
226. **Yang C.C.** Transplantation of human umbilical mesenchymal stem cells from Wharton's jelly after complete transection of the rat spinal cord. / Yang C.C., Shih Y.H., Ko M.H. [et al.] // *PLoS One*. – 2008. – Vol. 3(10). – P. e3336.

227. **Yang S.** Capacity of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells to differentiate into sweat gland-like cells: a preclinical study. / Yang S., Ma K., Feng C. [et al.] // *Front Med.* – 2013. – Vol. 7(3). – P. 345-53.
228. **Ylä-Herttuala S.** Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. / Ylä-Herttuala S., Rissanen T.T., Vajanto I. [et al.] // *J Am Coll Cardiol.* – 2007. – Vol. 49(10). – P. 1015-26.
229. **Zeng H.L.** Hypoxia-mimetic agents inhibit proliferation and alter the morphology of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. / Zeng H.L., Zhong Q., Qin Y.L. [et al.] // *BMC Cell Biol.* – 2011. – Vol. 12. – P. 32.
230. **Zhang G.H.** Effects of vascular endothelial growth factor B on proliferation and migration in EA.Hy926 cells. / Zhang G.H., Qin R., Zhang S.H. [et al.] // *Mol Biol Rep.* – 2014. – Vol. 41(2). – P. 779-85.
231. **Zhang H.C.** Microvesicles derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells stimulated by hypoxia promote angiogenesis both in vitro and in vivo. / Zhang H.C., Liu X.B., Huang S. [et al.] // *Stem Cells Dev.* – 2012. – Vol. 21(18). – P. 3289-97.
232. **Zhang J.C.** Bone marrow mesenchymal stem cells overexpressing human basic fibroblast growth factor increase vasculogenesis in ischemic rats. / Zhang J.C., Zheng G.F., Wu L. [et al.] // *Braz J Med Biol Res.* – 2014. – Vol. 47(10). – P. 886-94.
233. **Zhang L.** Cograftered Wharton's jelly cells-derived neurospheres and BDNF promote functional recovery after rat spinal cord transection. / Zhang L., Zhang H.T., Hong S.Q. [et al.] // *Neurochem Res.* – 2009. – Vol. 34(11). – P. 2030-9.
234. **Zhang W.** Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells promote myocardial regeneration and cardiac repair after miniswine acute myocardial infarction. / Zhang W., Liu X.C., Yang L. [et al.] // *Coron Artery Dis.* – 2013. – Vol. 24(7). – P. 549-58.
235. **Zheng S.X.** Comparison of cardiac stem cells and mesenchymal stem cells transplantation on the cardiac electrophysiology in rats with myocardial

- infarction. / Zheng S.X., Weng Y.L., Zhou C.Q. [et al.] // Stem Cell Rev. – 2013. – Vol. 9(3). – P. 339-49.
236. Zordan P. Macrophages commit postnatal endothelium-derived progenitors to angiogenesis and restrict endothelial to mesenchymal transition during muscle regeneration. / Zordan P., Rigamonti E., Freudenberg K. [et al.] // Cell Death Dis. – 2014. – Vol. 5. – P. e1031.