

На правах рукописи

Арутюнян Ирина Владимировна

**АНГИОГЕННЫЕ СВОЙСТВА МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ
КЛЕТОК ПУПОЧНОГО КАНАТИКА**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт морфологии человека» и Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель: доктор медицинских наук, доцент
Фатхудинов Тимур Хайсамудинович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Романов Юрий Аскольдович
Институт экспериментальной кардиологии ФГБУ
«Российский кардиологический научно-
производственный комплекс» МЗ РФ,
в.н.с. научно-практической лаборатории
стволовых клеток человека

доктор биологических наук, доцент
Рубина Ксения Андреевна
Факультет фундаментальной медицины
ФГБОУВО «Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова»,
ст.н.с. НИЛ постгеномных технологий в медицине

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Российской Федерации Институт медико-биологических проблем Российской академии наук (ГНЦ РФ ИМБП РАН)

Защита состоится _____ 2017 года в ____ часов на заседании диссертационного совета (Д 001.004.01) Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт морфологии человека» по адресу: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д.3

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт морфологии человека» и на сайте <http://www.morfolhum.ru/>

Автореферат разослан «__» _____ 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного
совета, доктор медицинских наук

Л.П. Михайлова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 зоне ишемии. В настоящее время особую надежду исследователи возлагают на стимуляцию ангиогенеза в ишемизированной ткани с помощью стволовых/прогениторных клеток [Lawall, 2010; Liew, O'Brien, 2012; Лебедев, 2013]. Использование в качестве клеточного трансплантата мультипотентных стромальных клеток (МСК) является наиболее перспективным методом терапевтического ангиогенеза [Liew, O'Brien, 2012; Yan, 2013; Bronckaers, 2014]. В соответствии с данными регистра клинических испытаний FDA зарегистрированы десятки клинических исследований безопасности и эффективности трансплантации МСК для лечения острого инфаркта миокарда, ишемического инсульта и критической ишемии нижних конечностей.

Известно, что принадлежность клеточных культур к МСК не обозначает идентичности их биологических свойств, а служит только базисом для их дальнейшей характеристики [Dominici, 2006]. МСК, выделенные из пупочного канатика (МСК ПК), обладают высоким пролиферативным потенциалом, пластичностью и иммуномодулирующей активностью, экспрессируют гены, вовлеченные в развитие и функционирование сердечно-сосудистой системы, не обладают туморогенностью и считаются оптимальным ресурсом для аллогенной трансплантации [Lv, 2012; Li X., 2014]. При этом вартонов студень пупочного канатика обладает важной особенностью – в нем отсутствуют капилляры, что отличает МСК ПК от МСК, полученных из других источников (костного мозга, жировой ткани и др.), занимающих *in vivo*, по мнению некоторых авторов, нишу перидитов [da Silva Meirelles, 2008; Covas, 2008; Caplan, 2009]. Более того, в секретоме МСК ПК сдвинут баланс про- и антиангиогенных факторов по сравнению с МСК костного мозга или жировой ткани [Amable, 2014; Kuchroo, 2015], что указывает на использование этими клетками иных путей реализации проангиогенного потенциала.

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

За последние несколько лет был накоплен большой массив данных об эффективности выделения культуры МСК ПК, ее пролиферативных свойствах, стабильности кариотипа, особенностях транскриптома и секретомы. 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.

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 активацию макрофагов в области ишемического повреждения скелетной мышцы.

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

Целью исследования 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

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.

Продemonстрировано, 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.

Объем и структура работы

Диссертация изложена на 171 странице машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, собственных результатов, обсуждения результатов, заключения, выводов и списка литературы, включающего 236 российских и зарубежных источников. Работа иллюстрирована 53 рисунками и 5 таблицами.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение и характеристика МСК ПК

МСК человека выделяли из вартонова студня ферментативным методом (200 Ед/мл коллагеназы I типа и 40 Ед/мл диспазы, 40 минут). МСК крыс выделяли методом эксплантов. В качестве ростовой среды использовали DMEM/F12 с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки до 10%. Для анализа иммунофенотипа МСК ПК человека (n=5) использовали BD Stemflow™ hMSC Analysis Kit (BD, США). Для анализа иммунофенотипа МСК ПК крысы (n=5) использовали антитела к CD90, CD73, CD105, CD34, CD45, CD11b (все Antibodies-online Inc., США). 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). Для направленной дифференцировки *in vitro* использовали готовые среды StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit, Osteogenesis Differentiation Kit или Chondrogenesis Differentiation Kit (Gibco, США).

МСК ПК также окрашивали с антителами против виментина (ab8978) и гладкомышечного актина альфа (α SMA) (ab5694, Abcam, США).

Приготовление кондиционированных сред

Среду, кондиционированную МСК ПК человека или эндотелиальными клетками линии EA.hy926 (CRL2922; ATCC, США), центрифугировали при 2800g, собирали супернатант и пропускали через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм (GE Osmonics, США).

Измерение концентрации VEGF-A в кондиционированных средах

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) и спектрофотометра Multiskan GO (ThermoFisher Scientific, США).

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

EA.hy926 рассаживали в 96-луночный планшет из расчета 3×10^3 клеток на лунку. Через 1, 2 или 3 сут. 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 МТТ (Sigma-Aldrich, США) добавляли в лунки до конечной концентрации 1,5 мг/мл и инкубировали в течение 2 ч при 37°C. После удаления среды в лунки вносили 100 мкл диметилсульфоксида (Sigma-Aldrich, США), инкубировали 15 мин. и измеряли оптическую плотность ($\lambda=570$ нм) с помощью спектрофотометра Multiskan GO (ThermoFisher Scientific, США).

Оценка направленной миграции эндотелиальных клеток в градиенте факторов, секретируемых МСК ПК

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 в планшет помещали вставки с мембраной (диаметр пор 8 мкм) (SPL Lifesciences, Ю.Корея). В верхнюю камеру вносили 10^5 клеток линии EA.hy926 в 250 мкл среды. Через 1, 2 или 3 сут. мигрировавшие на нижнюю поверхность мембраны эндотелиальные клетки окрашивали DAPI (Sigma-Aldrich, США). С помощью 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.

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 на лунку. Моделирование раны монослоя проводили с помощью WoundMaker™ tool (Essen BioScience, США). 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). Конфлуентность области раны оценивали с помощью автоматизированной системы сбора и обработки изображений (Essen BioScience, США).

Изучение эндотелиальной дифференцировки МСК ПК *in vitro*

Дифференцировочная 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. Через 3 недели клетки фиксировали 4% параформальдегидом и окрашивали на маркер эндотелиоцитов CD31 (ab24590, Abcam, США).

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). 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. С помощью программного обеспечения AxioVs40 4.8.2.0 (Zeiss, Германия) подсчитывали количество точек ветвления и среднюю длину ветвей формируемой сети в поле зрения.

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

МСК ПК человека метили мембранным трейсером PKH26, EA.hy926 – трейсером PKH67 (Sigma-Aldrich, США). Суспензию клеток (МСК ПК человека, EA.hy926 или смесь двух типов клеток 1:1) наносили на полимеризованный матрикс из расчета 35 тыс. клеток 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).

Изучение эндотелиальной дифференцировки МСК ПК в матриксе базальной мембраны

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.

Экспериментальные животные

Исследование проводили на половозрелых самцах аутбредных крыс Sprague-Dawley (НПП «Питомник лабораторных животных ФИБХ РАН», Россия). Эксперимент соответствовал рекомендациям локального биоэтического комитета (Протокол № 86 заседания биоэтической комиссии ФГБУ «НИИМЧ» РАМН от 10.11.12), 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 РФ» от 2003 г.

Моделирование ишемии задних конечностей у крыс

Крыс наркотизировали зоветилом (20 мг/кг) и рометаром (5 мг/кг). Операционный доступ осуществляли на правой задней конечности. На бедренный сосудисто-нервный пучок накладывали лигатуры: первая лигатура – в области паховой связки; вторая – 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. 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.

Трансплантация МСК ПК

МСК ПК крысы (на 2-4 пассажах) ресуспендировали в 0,9% растворе NaCl до конечной концентрации 5 млн клеток в 1 мл. Для части экспериментальных животных клетки метили витальным мембранным трейсером PKH26. Через 7 дней после моделирования ишемии трансплантат вводили внутримышечно путем пятикратного обкалывания мышц голени (таблица 1).

Таблица 1. Схема эксперимента.

Группы	Трансплантат	Кол-во животных		
		3 сут	10 сут	30 сут
Экспериментальная группа	5 млн МСК ПК в 1 мл 0,9% NaCl	5	5	5
	5 млн МСК ПК, меченных PKH26, в 1 мл 0,9% NaCl	3	3	3
Группа сравнения	1 мл 0,9% NaCl	8	8	8

Тест толерантности к физическим нагрузкам «рота-род»

За 1 сут. до выведения животных из эксперимента определяли время ходьбы крысы по вращающемуся валу при фиксированной не критической скорости.

Морфометрическое исследование

Животных выводили из эксперимента с помощью CO₂-камеры на 3, 10 или

30 сут. после трансплантации. Выделяли комплекс мышц голени.

Морфометрическое исследование ишемического повреждения проводили с помощью микроскопа Leica DM 2500 и программного обеспечения ImageScore M (Leica Biosystems, Германия) на микрофотографиях препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином. Методом точечного счета с помощью решетки с 25 узлами [Автандилов, 1990] определяли объемную плотность поврежденной ткани. 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 области ишемического повреждения было проведено на микрофотографиях препаратов, окрашенных на маркер эндотелиоцитов CD31. В программе Adobe Photoshop CS6 были измерены количество и объемная плотность сосудов микроциркуляторного русла. На каждое животное было обчислено по 30 выбранных случайным образом полей зрения на 3 уровнях.

Иммуногистохимическое исследование

Материал, изъятый у животных с введением меченых клеток, фиксировали в жидком азоте. Готовили криосрезы на 4 уровнях толщиной 5-6 мкм. Криосрезы окрашивали с антителами к маркеру макрофагов CD68 (ab125212, Abcam, США), маркеру M2 активированных макрофагов CD206 (sc-34577, Santa Cruz Biotechnology, США), VEGF, маркеру эндотелиоцитов CD31, α SMA.

CD68+ и CD206+клетки в области 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.

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.

Статистический анализ

Данные представлены в виде средних значений и стандартных отклонений (стандартных ошибок среднего) или медиан и перцентилей. При морфометрическом исследовании области 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).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Строение пупочного канатика

Пупочный канатик человека содержит 2 пупочные артерии и 1 пупочную вену, окруженные вартоновым студнем (рис. 1А). Клетки, экспрессирующие маркер перицитов CD146, локализованы в стенках кровеносных сосудов, но не в вартоновом студне, что согласуется с данными других исследователей [Margossian, 2012] (рис. 1Б). В вартоновом студне отсутствуют капилляры, а CD31 экспрессируется только эндотелиальными клетками сосудов (рис. 1В).

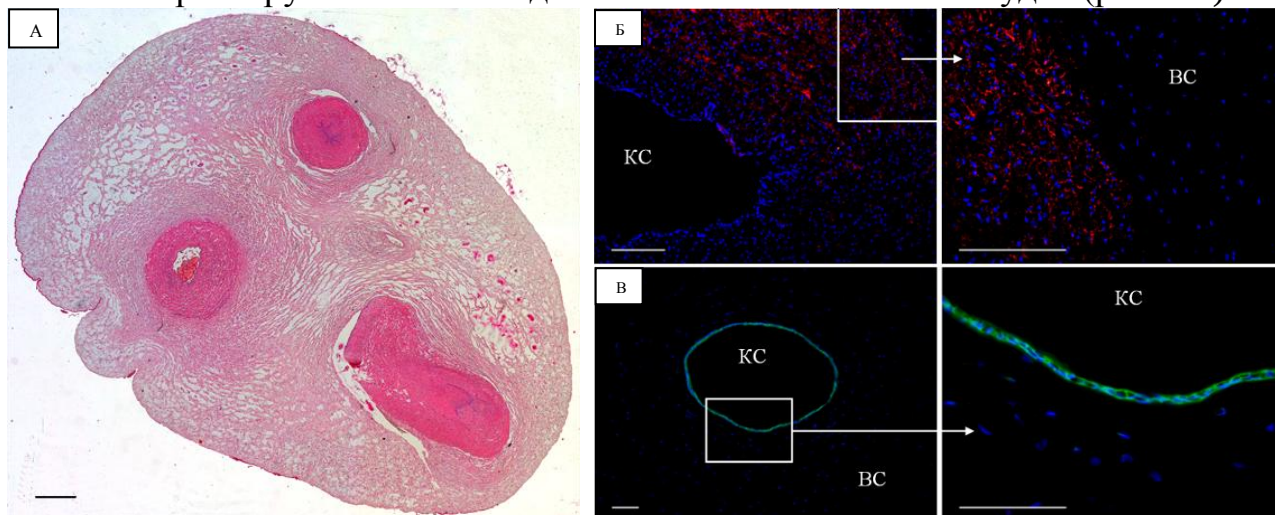


Рисунок 1 – Строение пупочного канатика человека. (а) – Панорамное изображение, масштабный отрезок 1 мм. Окрашивание гематоксилином и эозином. (б) – Локализация CD146+ клеток (красный) в пупочном канатике. Ядра клеток докрашены DAPI (синий). Масштабный отрезок 200 мкм. (в) – Локализация CD31+ клеток (зеленый) в пупочном канатике. Ядра клеток докрашены DAPI (синий). Масштабный отрезок 100 мкм. КС – просвет кровеносного сосуда, ВС – вартонов студень.

Выделение и характеристика МСК ПК

Выделенные из пупочного канатика человека ферментативным способом клетки активно пролиферировали, по мере увеличения конfluентности принимали веретеновидную форму и формировали рисунок в виде волн (рис. 2А). Активную миграцию клеток из эксплантов пупочного канатика крысы наблюдали значительно раньше, чем указано для эксплантов пупочных канатиков крупных млекопитающих (1 сутки по сравнению с 5-10 сутками) [Petsa, 2009; Majore, 2009; Majore, 2011] (рис. 2Б). Экспансия первичной культуры происходила не только за счет миграции клеток из эксплантов, но и за счет деления прикрепившихся клеток, которое наблюдали уже на 3-4 сут. культивирования (рис. 2В).

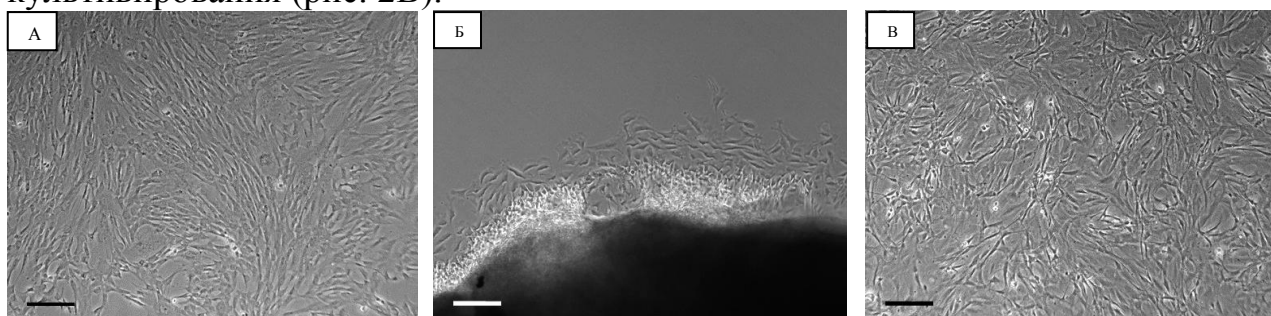


Рисунок 2 – Первичные культуры клеток, выделенные (а) ферментативным способом из пупочного канатика человека или (б, в) методом эксплантов из пупочного канатика крысы. Масштабный отрезок 200 мкм.

Для всех исследованных культур доля клеток, экспрессировавших положительные маркеры мультипотентных стромальных клеток CD73, CD90 и CD105, составляла более 98%, доля клеток, экспрессировавших отрицательные маркеры CD45, CD34, CD11b, CD19 и HLA-DR, не превышала 1%. Клетки были способны к индуцированной дифференцировке *in vitro* в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлениях. Таким образом, клеточные культуры, выделенные из пупочного канатика человека и крысы, соответствовали всем требованиям, предъявляемым к МСК [Dominici, 2006].

МСК ПК экспрессировали виментин (белок промежуточных филаментов, характерный для клеток мезенхимного происхождения) и гладкомышечный актин альфа (α SMA) (рис. 3). Некоторые авторы считают виментин и α SMA просто мезенхимальными маркерами, которые изначально экспрессируются клетками вартонова студня [Conconi, 2011; Sági, 2012; Jeremias, 2014], другие же говорят о приобретении МСК фенотипа миофибробластов *in vitro* [Farias, 2011; Ngo, 2014]. α SMA+фенотип МСК ПК позволяет некоторым авторам использовать по отношению к ним термин «миофибробласт-подобные клетки» (англ. “myofibroblast-like cells”) [Ohta, 2013; Kim, 2015].

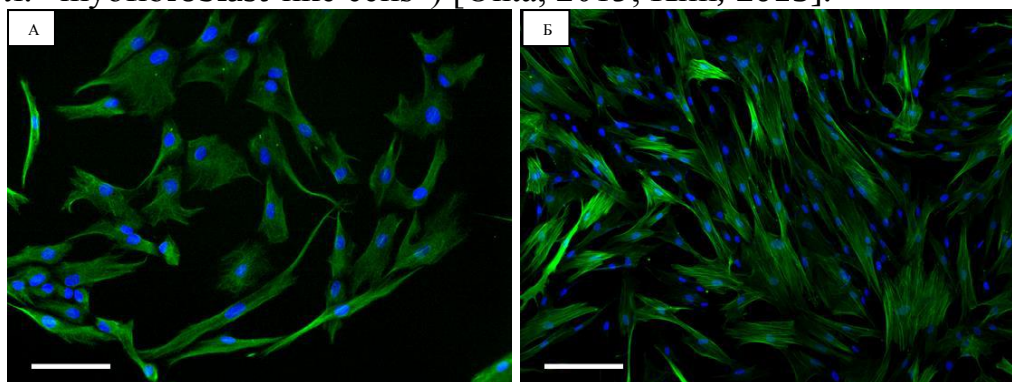


Рисунок 3 – Фенотип МСК ПК. (а) – Экспрессия виментина (зеленый) в МСК ПК человека. Ядра клеток докрашены DAPI (синий). Масштабный отрезок 100 мкм. (в) – Экспрессия α SMA (зеленый) в МСК ПК. Ядра клеток докрашены DAPI (синий). Масштабный отрезок 200 мкм.

Измерение концентрации VEGF-A в кондиционированных средах

В течение 3 суток в лунках планшета с эндотелиальными клетками линии EA.hy926 происходило постепенное увеличение концентрации растворимых форм VEGF-A (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, что согласуется с данными других исследователей. 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, 2014; Kuchroo, 2015].

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

Кондиционированная МСК ПК среда стимулировала пролиферацию

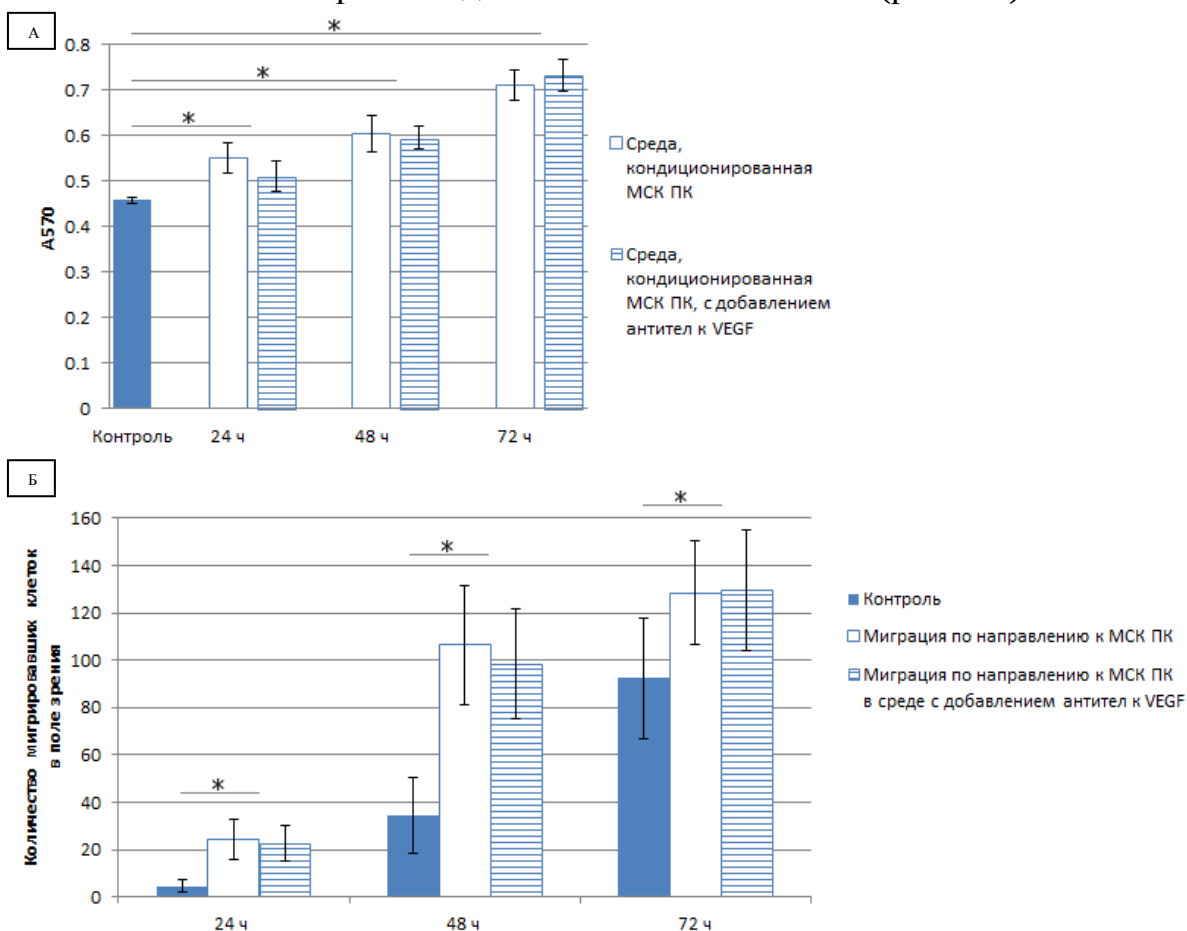
эндотелиальных клеток линии EA.hy926. Схожие результаты были получены ранее для других эндотелиальных клеток (HUVEC) [Choi, 2013]. Внесение в кондиционированную МСК ПК среду блокирующих антител к VEGF не влияло на стимуляцию пролиферации (рис. 4А).

Оценка направленной миграции эндотелиальных клеток в градиенте факторов, секретируемых МСК ПК

Число мигрировавших на нижнюю поверхность мембраны эндотелиальных клеток было значимо выше в лунках, содержащих МСК ПК, независимо от наличия блокирующих антител к VEGF, по сравнению с контрольными лунками во всех временных точках (рис. 4Б). Ранее было подтверждено, что на скорость миграции эндотелиальных клеток влияет присутствие в кондиционированной МСК ПК среде IL-8, HGF (Hepatocyte Growth Factor) и MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) [Shen, 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, 2014; Edwards, 2014].

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

«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]. Кондиционированная МСК ПК среда стимулировала скорость заполнения области раны эндотелиальными клетками (рис. 4В).



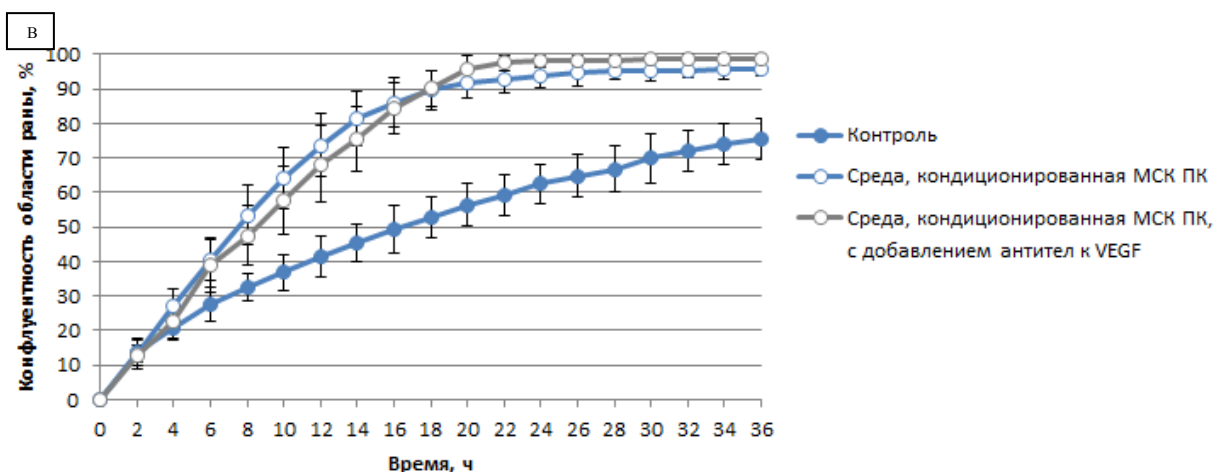


Рисунок 4 – Результаты воздействия кондиционированных МСК ПК сред на эндотелиальные клетки линии EA.hy926. (а) – Влияние кондиционированной МСК ПК среды на пролиферацию эндотелиальных клеток. Результаты МТТ-теста. (б) – Количественная оценка миграции эндотелиальных клеток линии EA.hy926 по направлению к МСК ПК. (в) – Влияние кондиционированной МСК ПК среды на скорость заполнения раны монослоем эндотелиальными клетками. Данные представлены в виде средних и стандартных отклонений. * – $p < 0,05$.

Изучение эндотелиальной дифференцировки МСК ПК *in vitro*

При культивировании МСК ПК в среде с добавлением VEGF-A-165 и кондиционированной эндотелиальными клетками среды на всей поверхности появлялся новый рисунок, напоминающий крупноячеистую сеть (рис. 5А). Формировались тубулярные структуры, собранные из нескольких десятков вытянутых узких клеток с продолговатым ядром, положительно окрашивающихся на маркер эндотелия CD31+ (рис. 5Б). Эти данные отличаются от результатов других исследователей, которые не выявили экспрессии маркеров эндотелия в МСК ПК [Choi, 2013], либо не обнаружили изменения морфологии клеток и их организации [Chen, 2009] при воздействии более сложных дифференцировочных сред.

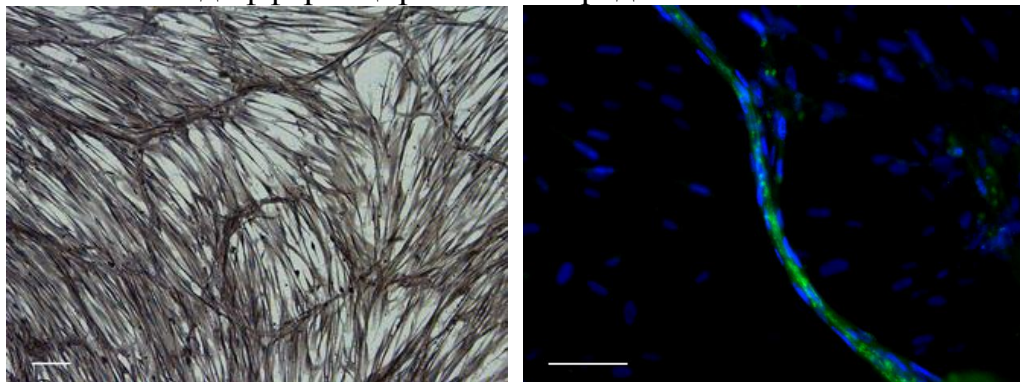


Рисунок 5 – Эндотелиальная дифференцировка МСК ПК *in vitro*. (а) – Светлопольная микроскопия, масштабный отрезок 200 мкм. (б) – Окрашивание на маркер эндотелиоцитов CD31 (зеленый), ядра клеток докрашены DAPI (синий). Масштабный отрезок 100 мкм.

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, 2014].

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

Культивирование эндотелиальных клеток в матриксе базальной мембраны 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, 2009]. 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 (рис. 6). 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.

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

МСК ПК, как и эндотелиальные клетки линии EA.hy926, были способны формировать тубулярные структуры на поверхности матрикса базальной мембраны, однако сборка начиналась уже через 1 час после наслаивания суспензии. При сокультивировании МСК ПК и эндотелиальных клеток линии EA.hy926 формируемая сеть по своим характеристикам была ближе к сети, организованной только МСК ПК (рис. 6).

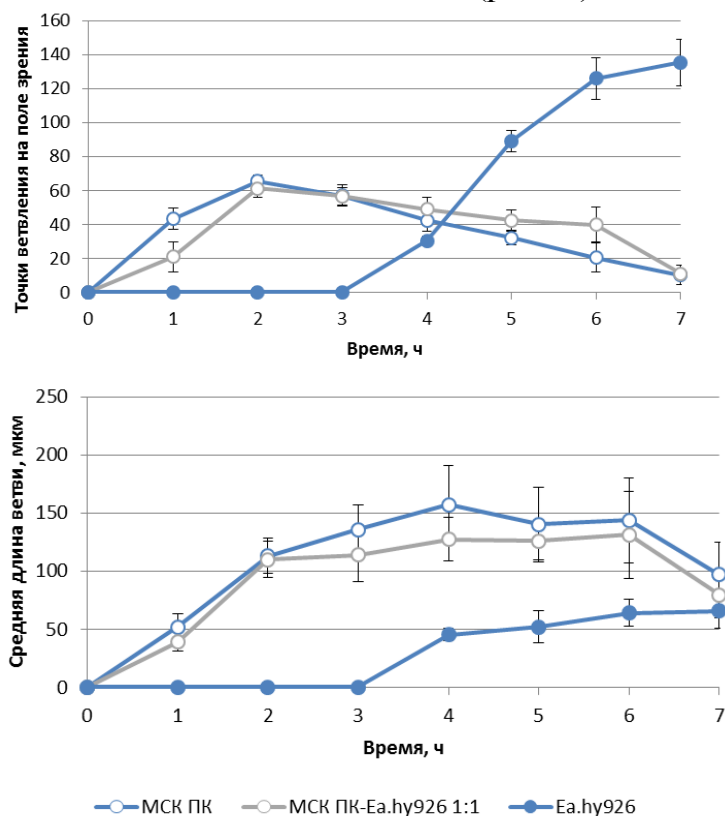


Рисунок 6 – Моделирование ангиогенеза *in vitro*. Характеристика формируемых клетками сетей (число точек ветвления и средняя длина ветви).

Данные представлены в виде средних и стандартных отклонений.

При этом основу сети оставляли именно МСК ПК, а EA.hy926 были ассоциированы с ними (рис. 7). Полученные данные отличаются от результатов других исследователей, которые считают, что в организации подобных тубулярных структур МСК выполняют только второстепенную функцию [Lozito, 2009; Blocki, 2013; Choi, 2013].

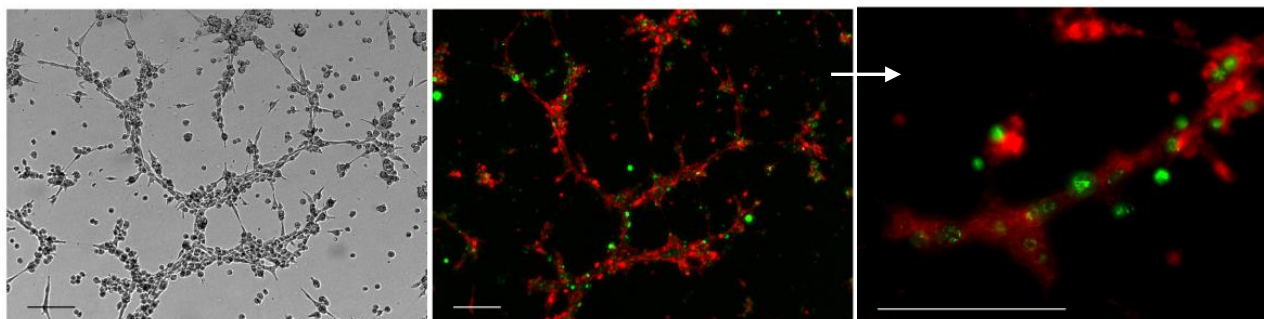


Рисунок 7 – Формирование общей тубулярной сети МСК ПК (несут красную метку RKN26) и клетками линии EA.hy926 (несут зеленую метку RKN67) в матриксе базальной мембраны *in vitro*. Масштабный отрезок 100 мкм.

Изучение эндотелиальной дифференцировки МСК ПК в матриксе базальной мембраны

Во всех группах формируемая тубулярная сеть была нестабильна и окончательно разбиралась в течение 24 часов, образуя плотные кластеры клеток, что согласуется с данными других исследователей [Portalska, 2012; Blocki, 2013; Choi, 2013]. На 5-7 сут. в лунках, содержащих только EA.hy926 или смесь МСК ПК и EA.hy926, наблюдали появление центров спрутинга. Формируемая сеть была очень стабильна (срок наблюдения более 30 суток) и имела множество точек ветвления. Постепенно происходило объединение разрозненных центров спрутинга в единую сеть (рис. 8).

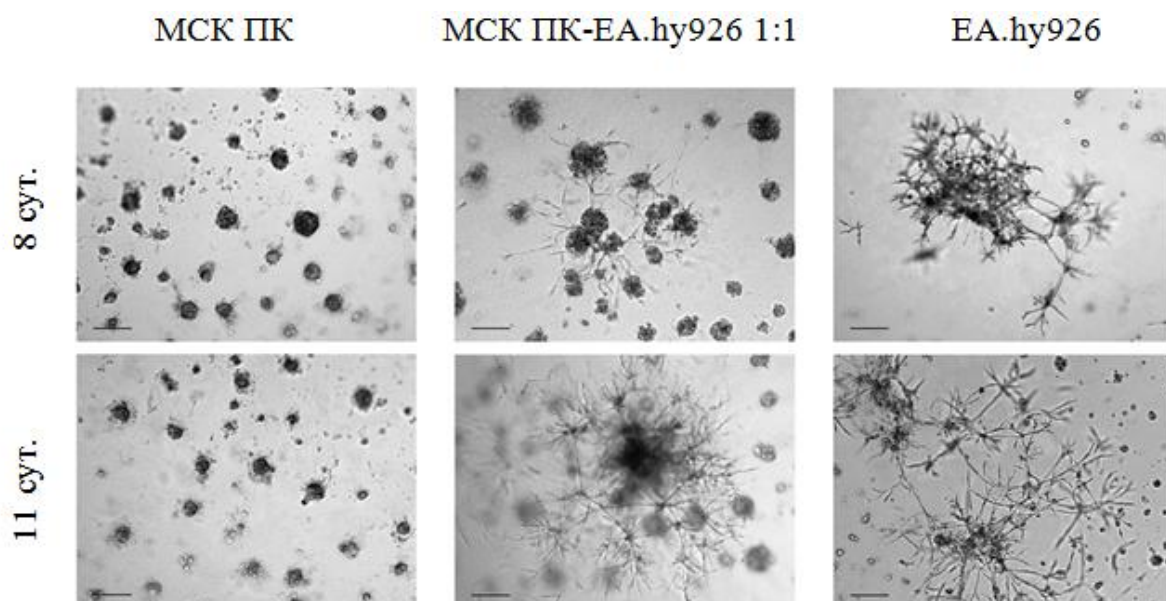


Рисунок 8 – Формирование стабильной трехмерной капилляроподобной сети из кластеров EA.hy926 или МСК ПК-EA.hy926 в матриксе базальной мембраны. Масштабный отрезок 200 мкм.

Вторичный спрутинг характерен для эндотелиальных клеток [Castellon, 2002]. Однако оказалось, что основой вновь формируемой стабильной сети стали не эндотелиальные клетки, а МСК ПК (рис. 9). Похожую стабильную (минимум в течение 7 дней) сеть в матриксе базальной мембраны формировали МСК костного мозга, преддифференцированные в эндотелиальном направлении [Portalska, 2012].

Было высказано предположение, что такой вторичный спрутинг стал следствием эндотелиальной дифференцировки МСК ПК, которую может стимулировать контакт МСК с матриксом эндотелиальных клеток [Lozito, 2009]. Наиболее распространенным маркером эндотелиальной дифференцировки является CD31, который не экспрессируется на поверхности нативных МСК [Lozito, 2009; Rouwkema, 2009; Portalska, 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 маркер эндотелиоцитов CD31 (рис. 9).

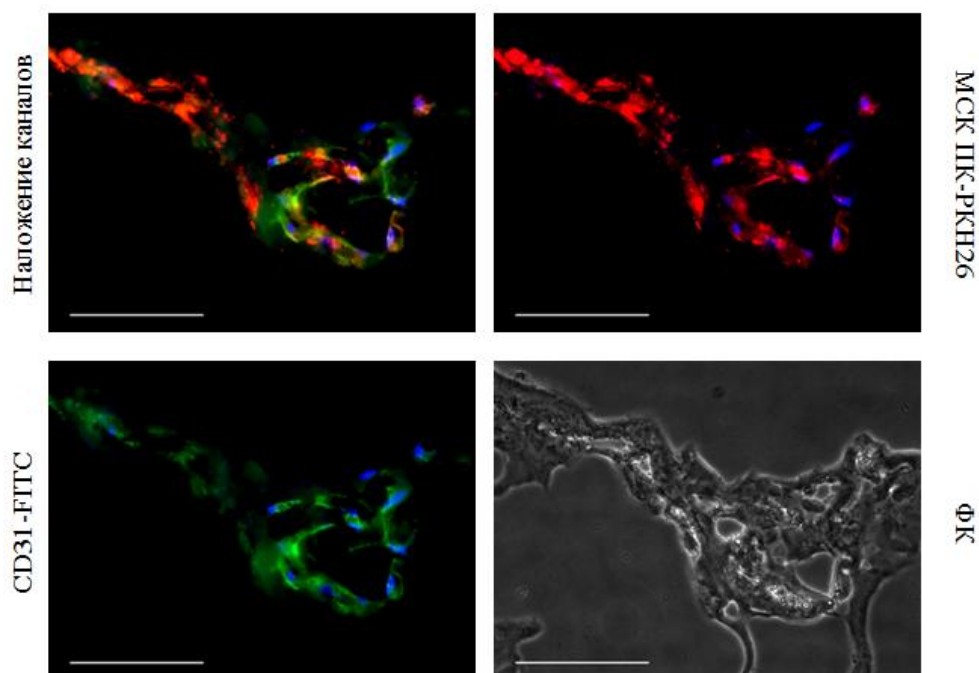


Рисунок 9 – Экспрессия CD31 (зеленый) в МСК ПК (красный) в составе капиллярноподобной сети при длительном сокультивировании с эндотелиальными клетками линии EA.hy926 в матриксе базальной мембраны. Ядра клеток докрашены DAPI (синий). Масштабный отрезок 100 мкм.

Моделирование ишемии задних конечностей у крыс

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

Тест толерантности к физическим нагрузкам «рота-род»

После моделирования ишемии задних конечностей происходило

статистически значимое сокращение времени прохождения животными теста в обеих группах. В группе с введением МСК ПК на 9 и 29 сут. время прохождения теста было достоверно больше, чем в группе сравнения (рис. 10).

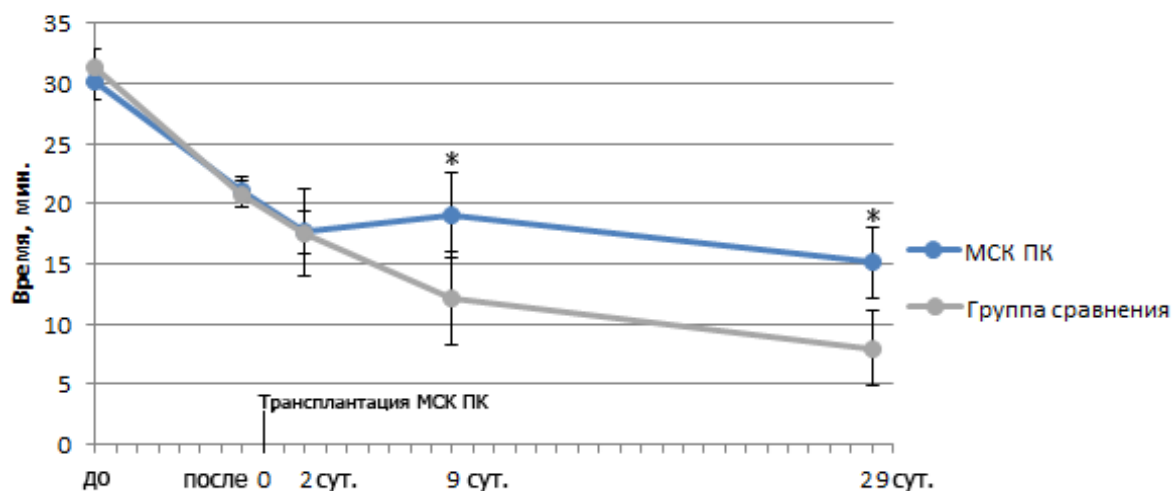


Рисунок 10 – Результаты прохождения крысами теста толерантности к физическим нагрузкам «рота-род»: исходные значения (точка «до»), после моделирования ишемии (точка «после»), на 2, 9 и 29 сут. после трансплантации. Данные представлены в виде арифметических средних и границ 95% доверительных интервалов. * – $p < 0,05$.

Морфометрическое и иммуногистохимическое исследование области ишемического повреждения скелетной мышечной ткани

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 (рис. 11). Полученные данные коррелируют с результатами других исследователей, в том числе и при моделировании ишемии на других видах лабораторных животных. [Laurila, 2009; Rigamonti, 2013; Pellegrin, 2014].

В области ишемического повреждения на 3 и 10 сут. после трансплантации 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 сут. после трансплантации в обеих группах инфильтрация сохранялась вокруг атрофированных и отдельных некротизированных мышечных волокон. На 30 сут. 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 (рис. 11А). На всех сроках исследования объемная плотность области ишемического повреждения ткани в группе с введением МСК ПК была статистически значимо меньше, чем в группе сравнения (рис. 11Б).

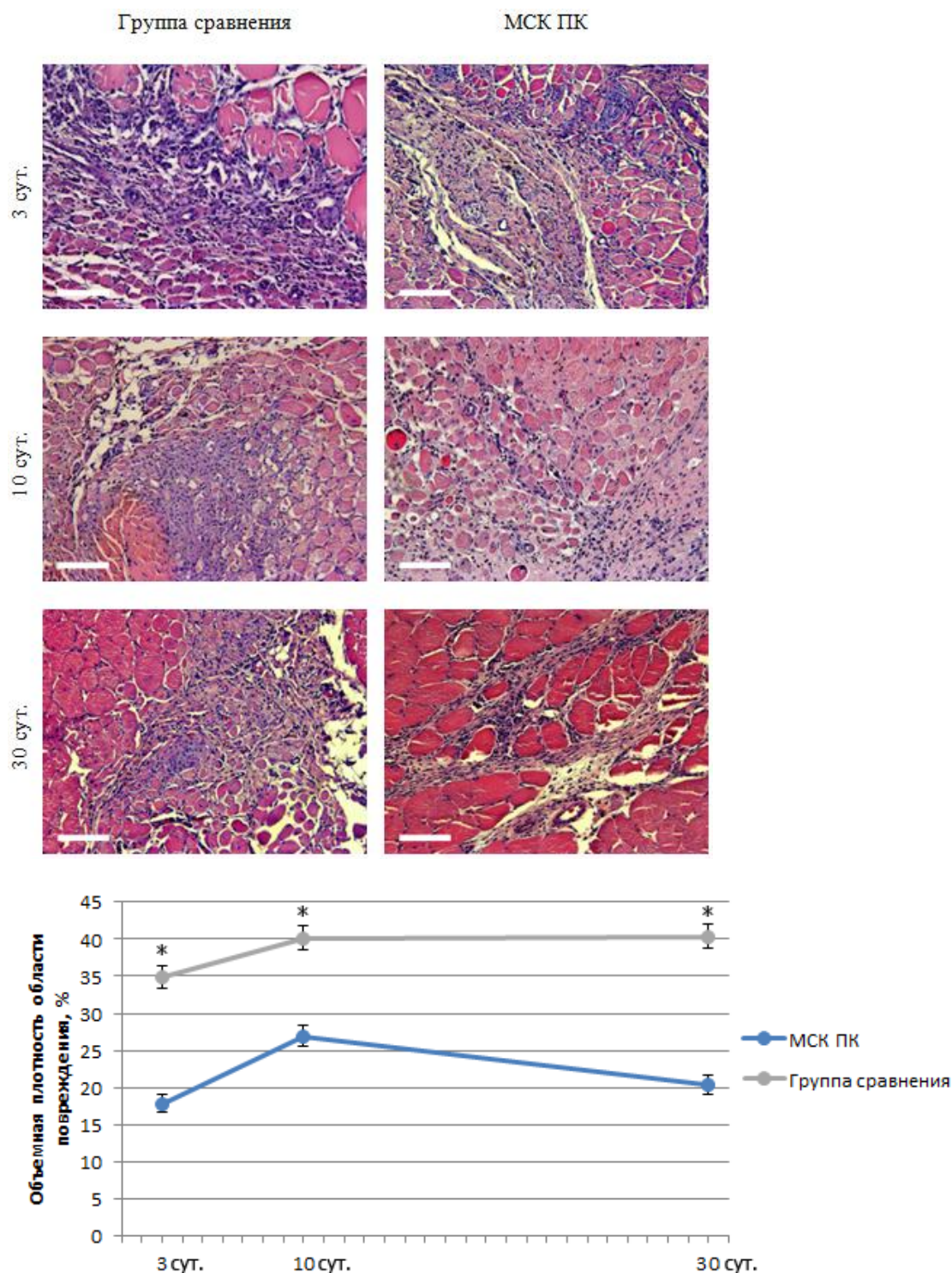


Рисунок 11 – Область ишемического повреждения скелетной мышечной ткани. (а) – Окрашивание гематоксилином и эозином. Масштабный отрезок 100 мкм. (б) – Объемная плотность области ишемического повреждения. Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего. * – $p < 0,05$.

Для скелетной мышечной ткани крыс и мышей с моделированной ишемией характерно развитие выраженной воспалительной инфильтрации. Если в первые часы в инфильтрате присутствуют в основном нейтрофилы, то через 3 суток после повреждения их замещают макрофаги [Rigamonti, 2013]. Интенсивность макрофагальной инфильтрации постепенно снижалась в обеих группах, что согласуется с данными других исследователей [Laurila, 2009;

Pellegrin, 2014]. В группе с введением МСК ПК на 3 сут. после трансплантации доля CD68+макрофагов была достоверно ниже, чем в группе сравнения ($45,30 \pm 2,38\%$ против $56,22 \pm 5,46\%$). Доли CD68+клеток на 10 и 30 сут. не отличались между группами (рис. 12).

Показано, что в очаге повреждения ишемизированной мышцы часть макрофагов выбирают M2 путь активации [Pellegrin, 2014; Zordan, 2014]. В группе сравнения доля CD206+клеток (M2 активированных макрофагов) имела тенденцию к росту ($25,68 \pm 3,28\%$ на 3 сут. после введения и $29,38 \pm 3,11$ на 30 сут.), не достигая, однако, статистически значимых отличий. В группе с введением МСК ПК на 3 сут. было выявлено значимое увеличение доли M2 макрофагов до $42,05 \pm 2,77\%$. Тенденция при этом была обратной: на 10 сут. 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 $26,34 \pm 3,5\%$). На 30 сут. отличий между группами выявлено не было (рис. 12).

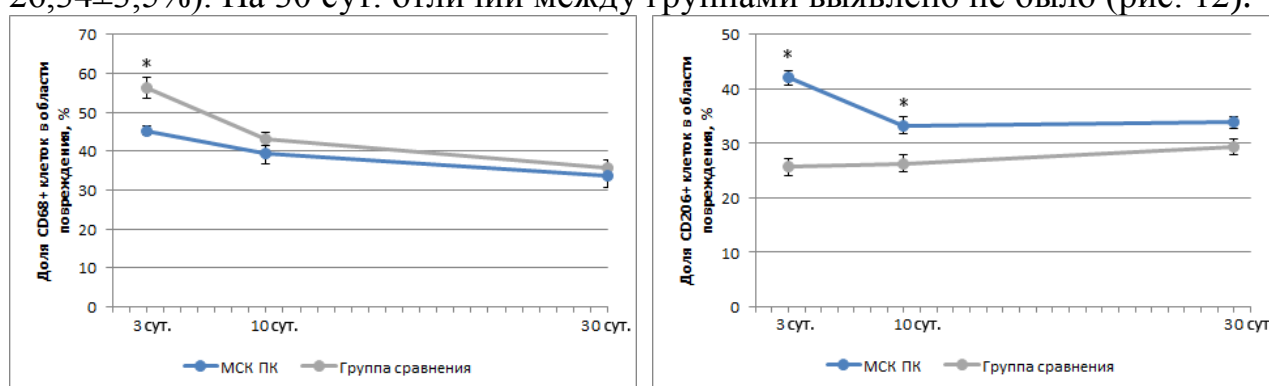


Рисунок 12 – Инфильтрация области ишемического повреждения CD68+ и CD206+ (M2 активированными) макрофагами на 3 сут. после трансплантации.. Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего.* – $p < 0,05$.

Морфометрическое исследование ангиогенеза в области ишемического повреждения скелетной мышечной ткани

Для морфометрического исследования ангиогенеза был выбран метод иммуногистохимического окрашивания на маркер эндотелиоцитов CD31 [Ishii, 2011; Kano, 2014; Rahman, 2014]. Количество и объемная плотность сосудов микроциркуляторного русла значимо не отличались между группами на 3 и 30 сут. после трансплантации. На 10 сут. в группе с введением МСК ПК и количество сосудов, и их объемная плотность были значимо выше, чем в группе сравнения (рис. 13).

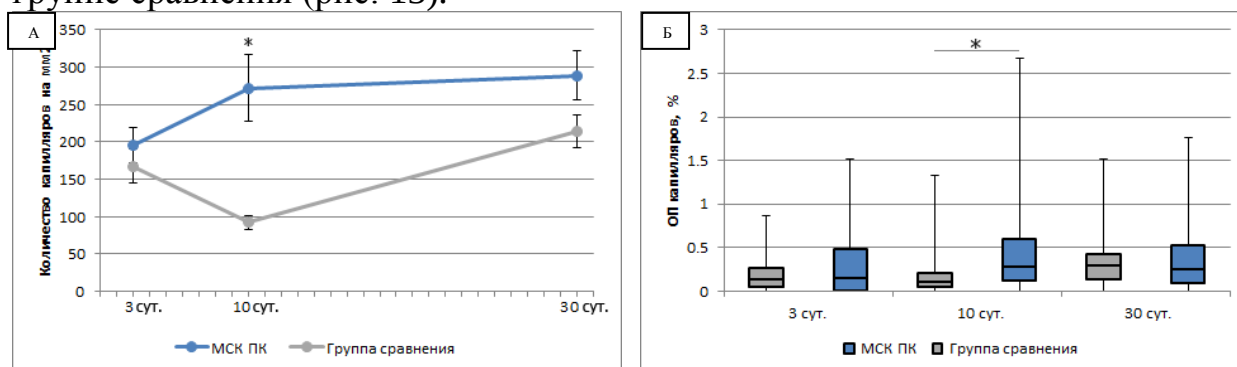


Рисунок 13 – Ангиогенез в области повреждения. (а) – Количество сосудов

микроциркуляторного русла в пересчете на 1 мм². Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего. (б) – Объемная плотность сосудов. Данные представлены в виде min, Q1, Me, Q3, max. * – $p < 0,05$.

Исследование распределения трансплантированных МСК ПК в ишемизированной ткани

На 3 сут. после трансплантации клетки, несущие метку РКН26, располагались как в центре, так и у самой границы области ишемического повреждения. На 10 сут. распределение клеток становилось более диффузным, часть их располагалась в перимизии мышечных волокон перифокальной зоны. На 30 сут. РКН26+клетки были локализованы в соединительно-тканых прослойках и перимизии. Сходные данные о локализации трансплантированных МСК были получены другими исследователями [Ishii, 2011; Noad, 2013]

Исследование элиминации трансплантированных МСК ПК в ишемизированной ткани

Часть меченых клеток имели фенотип РКН26+CD68+, т.е. метка, встроенная в мембраны аллогенных МСК ПК, попадала в макрофаги. Возможность захвата витального маркера резидентными клетками *in vivo* показана для большинства использующихся меток (красителей, радиоактивных и наноразмерных частиц, репортерных генов) [Pawelczyk, 2009; Lin, 2013]. Доля CD68+клеток среди всех РКН26+клеток значительно возросла с $48,1 \pm 3,2\%$ на 3 сут. до $76,2 \pm 3,9\%$ на 30 сут. после трансплантации (рис. 14).

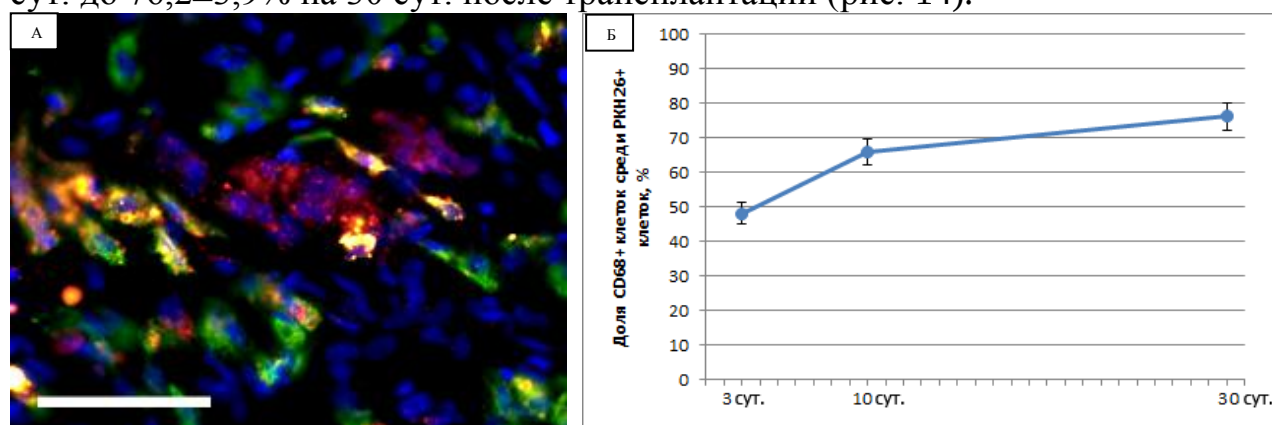


Рисунок 14 – Элиминация МСК ПК резидентными макрофагами. (а) – Появление метки РКН26 (красный) в CD68+клетках (зеленый). Ядра клеток докрашены DAPI (синий). Масштабный отрезок 50 мкм. (б) – Доля CD68+клеток среди РКН26+клеток. Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего.

Оценка дифференцировки трансплантированных МСК ПК в эндотелиальном направлении

Лишь часть трансплантированных аллогенных МСК ПК выживала в ишемизированной мышце в отдаленный период после введения. Тем не менее, дифференцировка этих клеток в эндотелиальном направлении была теоретически возможна [Zhang W., 2013; Zhang J.C., 2014]. Иммуногистохимическое исследование показало, что основным источником VEGF в ишемизированной мышце являются сохраненные мышечные волокна

перифокальной зоны, что совпадает с данными других исследователей [Germani, 2003]. Трансплантированные клетки на всех сроках исследования располагались в том числе и рядом с сохраненными мышечными волокнами, подвергаясь, таким образом, действию эндогенного VEGF. Однако метка PKN26 отсутствовала в составе стенок капилляров или более крупных кровеносных сосудов на всех сроках эксперимента (рис. 15). Не нашли подтверждения эндотелиальной дифференцировки МСК ПК, трансплантированных в ишемизированную скелетную мышечную ткань, и другие исследователи [Choi, 2013].

Важно заметить, что и через 30 сут. после трансплантации часть PKN26+клеток экспрессировала α SMA (рис. 15), который не синтезируется макрофагами [He, Marneros, 2013], что еще раз подтверждает, что на данном сроке часть трансплантированных МСК ПК выживала и сохраняла фенотип миофибробластов.

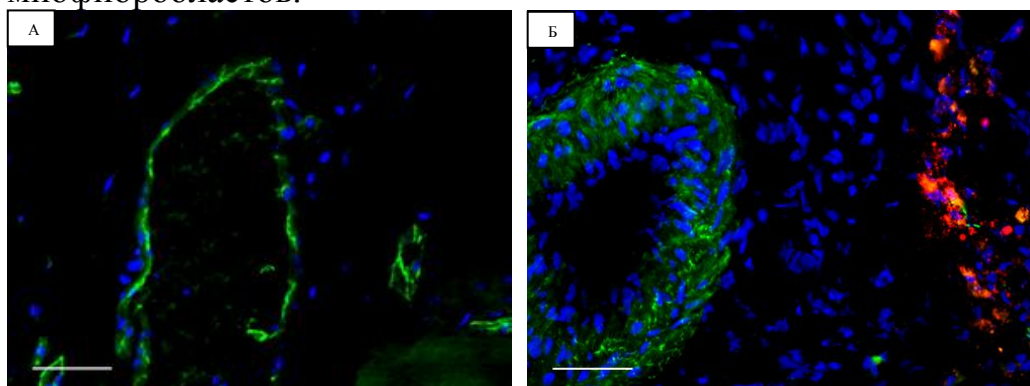


Рисунок 15 – Отсутствие МСК ПК, несущих метку PKN26, в составе стенок капилляров и кровеносных сосудов большего калибра (а), окрашенных с антителами к CD31 (зеленый) или α SMA (зеленый) (б). 30 сут. после трансплантации. Ядра клеток докрашены DAPI (синий). Масштабный отрезок 50 мкм.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Клеточные культуры, выделенные из пупочного канатика человека или крысы, соответствуют всем требованиям, предъявляемым к мультипотентным стромальным клеткам. Данные культуры не содержат CD31+ и CD146+клеток. Для цитоскелета МСК ПК характерны виментиновые промежуточные филаменты и α SMA микрофиламенты.

В секрете МСК ПК практически отсутствуют растворимые формы VEGF-A. Кондиционированная МСК ПК среда стимулирует пролиферацию, подвижность и направленную миграцию эндотелиальных *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 CD31+клетки при длительном сокультивировании с эндотелиальными клетками в матриксе базальной мембраны без воздействия экзогенного VEGF-A.

На модели ишемии задних конечностей крыс было показано, что в группе животных с введением МСК ПК время прохождения теста толерантности к физическим нагрузкам было выше, а объемная плотность ишемического

повреждения ниже, чем в группе сравнения. Введение МСК ПК стимулировало М2 активацию макрофагов и образование кровеносных сосудов в области ишемического повреждения. Часть клеток выживала в течение 30 суток после трансплантации, однако введенные МСК ПК не дифференцировались в эндотелиальные или гладкомышечные клетки кровеносных сосудов.

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 М2 (CD206+) макрофагов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в ведущих рецензируемых научных журналах и изданиях, рекомендованных ВАК России

1. Umbilical Cord as Prospective Source for Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy. / **Arutyunyan I.**, Elchaninov A., Makarov A., Fatkhudinov T. // Stem Cells International. – 2016. – V. 2016.– article ID 6901286, 17 pages.
2. Role of VEGF-A in angiogenesis promoted by umbilical cord-derived mesenchymal stromal/stem cells: *in vitro* study. / **Arutyunyan I.**, Fatkhudinov T., Kananykhina E., Usman N., Elchaninov A., Makarov A., Bolshakova G., Goldshtein D., Sukhikh G. // Stem Cell Research & Therapy – 2016. – V. 7. – N. 1 – P. 46.
3. Ангиогенный потенциал мультипотентных стромальных клеток пупочного канатика: исследование *in vitro*. / **Арутюнян И.В.**, Кананыхина Е.Ю., Фатхудинов Т.Х., Ельчанинов А.В., Макаров А.В., Раимова Э.Ш., Большакова Г.Б., Сухих Г.Т. // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2016. – № 1. – С. 3-12.
4. Влияние эндотелиальных клеток на ангиогенные свойства мультипотентных стромальных клеток пупочного канатика при моделировании ангиогенеза в матриксе базальной мембраны. / **Арутюнян И.В.**, Фатхудинов Т.Х., Ельчанинов А.В., Макаров А.В., Кананыхина Е.Ю., Усман Н.Ю., Раимова Э.Ш., Гольдштейн Д.В., Большакова Г.Б. // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2015. – № 4. – С. 270-278.
5. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки пупочного канатика: биологические свойства и клиническое применение. / **Арутюнян И.В.**, Макаров А.В., Ельчанинов А.В., Фатхудинов Т.Х. // Гены и клетки. – 2015. – Т. 10 – № 2. – С. 30-38.
6. Elimination of allogeneic multipotent stromal cells by host macrophages in different models of regeneration. / **Arutyunyan I.**, Elchaninov A., Fatkhudinov T., Makarov A., Kananykhina E., Usman N., Sukhikh G., Bolshakova G., Glinkina V., Goldshtein D. // International Journal of Clinical and Experimental Pathology. – 2015. – V. 8. – № 5. – P. 4469-4480.
7. Элиминация РКН26-меченных МСК при аллогенной трансплантации. / **Арутюнян И.В.**, Ельчанинов А.В., Фатхудинов Т.Х., Макаров А.В., Кананыхина Е., Большакова Г.Б., Глинкина В.В., Гольдштейн Д.В., Сухих Г.Т. // Гены и клетки. – 2014. – Т. 9. – № 3-А. – С. 45-52.
8. Роль рецепторов VEGF-A165 в ангиогенезе. / **Арутюнян И.В.**, Кананыхина Е.Ю., Макаров А.В. // Гены и клетки. – 2013. – Т. 8. – № 1. – С. 12-18.

Статьи в научных рецензируемых журналах

9. Влияние трансплантации мультипотентных стромальных клеток пупочного канатика на состояние ишемизированной мышечной ткани

конечностей крыс. / Макаров А.В., **Арутюнян И.В.**, Фатхудинов Т.Х., Ельчанинов А.В., Кананыхина Е.Ю., Володина П.А., Васюкова О.А., Ким А.А., Кириенко Е.Е., Большакова Г.Б. // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2013. – № 4 (8). – С. 45-52.

10. Верификация хронической ишемии нижних конечностей при моделировании на лабораторных животных. / **Арутюнян И.В.**, Макаров А.В., Фатхудинов Т.Х., Глинкина В.В., Гольдштейн Д.В., Большакова Г.Б. // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2012. – № 3. – С. 47-53.

11. Выделение культуры мультипотентных стромальных клеток пупочного канатика крысы методом эксплантов. / **Арутюнян И.В.**, Макаров А.В., Фатхудинов Т.Х., Ельчанинов А.В., Гольдштейн Д.В., Большакова Г.Б. // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2012. – № 3. – С. 57-62.

Тезисы докладов научных конференций

12. Роль VEGF-A в реализации проангиогенного потенциала МСК пупочного канатика: исследование *in vitro*. / **Арутюнян И.В.** // Научная конференция с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии». Сборник научных трудов. – 2016. – С. 13-14.

13. Поляризация макрофагов при трансплантации мультипотентных стромальных клеток. / Фатхудинов Т.Х., **Арутюнян И.В.**, Ельчанинов А.В. // Научная конференция с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии». Сборник научных трудов. – 2016. – С. 184-185.

14. Проангиогенный потенциал мультипотентных стромальных клеток пупочного канатика человека: исследование *in vitro*. / **Арутюнян И.В.**, Кананыхина Е.Ю., Макаров А.В. // II Национальный Конгресс по регенеративной медицине (с международным участием). Материалы Конгресса. – 2015. – С. 11-12.

15. Трансплантация мультипотентных стромальных клеток при критической ишемии задних конечностей крыс. / **Арутюнян И.В.**, Макаров А.В., Ельчанинов А.В., Кананыхина Е.Ю., Фатхудинов Т.Х., Большакова Г.Б. // Всероссийская научная конференции «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» с международным участием. Сборник научных трудов. – 2014. – С. 23-25.

16. Влияние трансплантации мультипотентных стромальных клеток пупочного канатика на состояние ишемизированной мышечной ткани конечностей крыс. / **Арутюнян И.В.**, Макаров А.В., Ельчанинов А.В., Кананыхина Е.Ю., Фатхудинов Т.Х. // I Национальный Конгресс по регенеративной медицине (с международным участием). Материалы Конгресса. – 2013. – С. 18.