

НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ КЛИНИЧЕСКОЙ И  
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЛИМФОЛОГИИ – ФИЛИАЛ ФЕДЕРАЛЬНОГО  
ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО НАУЧНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ  
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ  
И ГЕНЕТИКИ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ  
АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи

Лыков Александр Петрович

Морфофункциональная характеристика мезенхимных стволовых клеток костного  
мозга человека и крыс при активации эритропоэтином

1.5.22. Клеточная биология

Диссертация на соискание ученой степени  
доктора медицинских наук

Научный консультант:  
доктор медицинских наук  
Повещенко Ольга Владимировна

Новосибирск 2023

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

ВВЕДЕНИЕ. ....	6
ГЛАВА 1 МЕЗЕНХИМНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ И ЭРИТРОПОЭТИН (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ) .....	17
1.1 Характеристика мезенхимных стволовых клеток. ....	17
1.1.1 Фенотип и функциональные свойства мезенхимных стволовых клеток. ....	17
1.1.2 Источники получения мезенхимных стволовых клеток. ....	23
1.1.3 Факторы, влияющие на функциональные свойства мезенхимных стловых клеток. ....	29
1.1.4 Сигнальные пути, вовлеченные в жизнедеятельность мезенхимных стволовых клеток. ....	35
1.1.5 Цитокины и функциональные свойства мезенхимных стволовых клеток. ....	40
1.2 Терапевтический потенциал мезенхимных стволовых клеток. ....	46
1.2.1 Мезенхимные стволовые клетки в лечении сердечно-сосудистых заболеваний. ....	46
1.2.2 Мезенхимные стволовые клетки в лечении критической ишемии конечностей. ....	48
1.2.3 Мезенхимные стволовые клетки в лечении дегенеративного процесса в позвоночнике. ....	50
1.2.4 Мезенхимальные стволовые клетки в лечении других патологий и состояний. ....	51
1.3 Мезенхимные стволовые клетки и эритропоэтин. ....	61
1.3.1 Краткая характеристика эритропоэтина. ....	61
1.3.2 Цитопротективный эффект эритропоэтина. ....	63
1.3.3 Эффекты эритропоэтина на мезенхимные стволовые клетки. ....	66
1.3.4 Терапевтический потенциал эритропоэтина и мезенхимных	

стволовых клеток. . . . .	68
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ. . . . .	76
2.1 Реактивы и препараты. . . . .	76
2.2 Объект исследования. . . . .	78
2.3 Получение и культивирование первичной культуры мезенхимных стволовых клеток человека и крыс. . . . .	84
2.4 Иммунофенотипирование клеток костного мозга животных и человека	86
2.5 Клеточный цикл и апоптоз/некроз мезенхимных стволовых клеток. . . .	87
2.6 Иммуногистохимия мезенхимных стволовых клеток. . . . .	88
2.7 Аутофагия мезенхимных стволовых клеток человека. . . . .	89
2.8 Трансмиссионная электронная микроскопия мезенхимных стволовых клеток человека. . . . .	89
2.9 Функциональные свойства клеток костного мозга человека и животных. . . . .	90
2.9.1 Дифференцировочный потенциал мезенхимных стволовых клеток человека. . . . .	90
2.9.2 Колониеобразующая способность мезенхимных стволовых клеток. .	91
2.9.3 Пролиферативный потенциал мезенхимных стволовых клеток. . . . .	91
2.9.4 Миграционный потенциал мезенхимных стволовых клеток. . . . .	94
2.10 Оценка уровня продукции цитокинов, ростовых факторов и оксида азота мезенхимных стволовых клеток. . . . .	96
2.11 Оценка параметров микроциркуляции в нижних конечностях крыс. . .	98
2.12 Патоморфологическое исследование мышц голени крыс. . . . .	98
2.13 Магнитно-резонансная томография хвостового отдела позвоночника крыс. . . . .	99
2.14 Патоморфологическое исследование дегенерации межпозвонкового диска крыс. . . . .	100
2.15 Статистический анализ. . . . .	100
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ. . . . .	101

3.1 Характеристика мезенхимных стволовых клеток костного мозга человека и крыс. . . . .	101
3.1.1 Характеристика мезенхимных стволовых клеток костного мозга человека. . . . .	101
3.1.2 Характеристика мезенхимных стволовых клеток костного мозга крыс	104
3.2 Влияние эритропоэтина на экспрессию кластеров дифференцировки на мезенхимных стволовых клетках костного мозга человека. . . . .	110
3.3 Влияние экспозиции мезенхимных стволовых клеток костного мозга человека с эритропоэтином на экспрессию рецепторов для канонического и неканонического сигнального пути для эритропоэтина. . . . .	111
3.4 Антиапоптотическое действие эритропоэтина на мезенхимные стволовые клетки. . . . .	113
3.4.1 Антиапоптотическое действие эритропоэтина на мезенхимные стволовые клетки костного мозга человека. . . . .	113
3.4.2 Антиапоптотическое действие эритропоэтина на мезенхимные стволовые клетки крыс. . . . .	117
3.5 Характеристика функционального потенциала мезенхимных стволовых клеток человека на разные сроки экспансии <i>in vitro</i> . . . . .	128
3.6 Влияние эритропоэтина на аутофагию и ультраструктуру мезенхимных стволовых клеток человека. . . . .	148
3.7 Изучение терапевтического потенциала комбинации мезенхимных стволовых клеток и эритропоэтина <i>in vivo</i> . . . . .	153
3.7.1 Эффективность биомедицинского клеточного продукта при ишемии конечности. . . . .	153
3.7.2 Терапевтический потенциал биомедицинского клеточного продукта при дегенерации межпозвонкового диска. . . . .	178
ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ СОБСТВЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ. . . . .	183
ЗАКЛЮЧЕНИЕ. . . . .	202

ВЫВОДЫ. . . . .	211
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ. . . . .	213
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ. . . . .	214
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ. . . . .	216
СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА. . . . .	298
ПРИЛОЖЕНИЕ А (справочное) Методика определения апоптоза/некроза на проточном цитометре. . . . .	308
ПРИЛОЖЕНИЕ Б (справочное) Кровоснабжение задней нижней конечности и принцип моделирования ишемии конечности. . . . .	311
ПРИЛОЖЕНИЕ В (обязательное) Таблицы данных. . . . .	312

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность избранной темы

Мезенхимные стволовые/стромальные клетки (МСК), производные мезодремальной паренхимы (полипотентный зародышевый листок), относятся к стволовым клеткам в силу способности к самообновлению и дифференцировки в различные типы клеток соединительной ткани [38; 87; 182; 326; 398].

МСК в костном мозге формируют нишу для гемопоэтических стволовых клеток, а продукция цитокинов и ростовых факторов регулирует процессы кроветворения. Для МСК характерно иммуномодулирующее влияние через кооперацию с Т- и В-клетками, натуральными киллерными клетками (NK), дендритными клетками (DC) как при прямом контакте, так и опосредованно через паракринный эффект. Отсутствие на мембране МСК антигенов главного комплекса гистосовместимости класса I и ко-стимулирующих молекул CD40, CD80, CD86, а также большей части антигенов главного комплекса гистосовместимости класса II, за исключением минорных антигенов гистосовместимости, способствует низкой иммуногенности МСК. Продукция МСК IL-4, IL-10 запускает иммуносупрессию, что способствует снижению уровня продукции TNF- $\alpha$  и IFN $\gamma$  клетками иммунной системы. Кроме этого, супрессорная активность МСК опосредуется через продукцию таких иммуносупрессивных факторов как IDO, PGE<sub>2</sub>, NO, TGF- $\beta$ , TSG-6, VEGF, HGF, IL-6, экспрессию поверхностных молекул с ингибиторной активностью sHLA-G, Galectin, B7-H1, и индукцию формирования клеток с регуляторной активностью Treg, толерогенных DC, Vreg, миелосупрессоров. МСК проявляют свое иммуномодулирующее влияние через активацию Treg, способных подавлять пролиферативный и секреторный потенциал лимфоцитов, NK. В очаге патологического процесса МСК подвергаются воздействию неблагоприятных факторов микроокружения (провоспалительный цитокиновый фон, наличие PAMP и DAMP, лигандов к TLR и рецепторам типа NLR, CLR и RLR, окислительный стресс, гипоксия, гипергликемия), что может вызвать

гиперпродукцию цитокинов, с одной стороны, или же угнетать заселение и приживание МСК, с другой стороны. Продуцируемые МСК в месте введения цитокины, такие как VEGF, IGF-1 и IL-6, являются медиаторами ангиогенеза и предотвращения апоптоза/некроза клеток [20; 27; 163; 326; 337].

Тканеспецифические стволовые клетки взрослого организма вовлечены в процесс регенерации после повреждения. Старение организма, острое повреждение или хронический иммуновоспалительный ответ в органах и тканях человека и животных уменьшают пул тканеспецифических стволовых клеток и/или нарушают их функциональные свойства, что существенно снижает их регенераторный потенциал [113; 409]. Способность МСК стимулировать процессы репарации/регенерации поврежденных органов и тканей делает эти клетки привлекательными для использования в качестве альтернативного способа лечения. Терапевтический потенциал МСК реализуется через способность клеток заселять и выживать в очаге патологического повреждения, дифференцироваться в тканеспецифические клетки и/или оказывать паракринный эффект, способствующий регенерации, а также активации местных стволовых клеток и привлечению МСК из костного мозга [24; 408; 460; 503; 504]. У животных при экспериментальных моделях заболеваний и в клинических исследованиях у человека показано, что введение МСК в патологический очаг способствует снижению выраженности патологического процесса [416].

МСК рассматривают как альтернативу традиционным способам лечения ишемии нижних конечностей и дегенеративно-дистрофических изменений позвоночника. Критическая ишемия конечностей является причиной инвалидности и смертности населения [14; 88; 308; 350; 368]. Люмбаго – причина утраты трудоспособности населения в возрасте до 45 лет [233; 246].

В основе действия стволовых/прогениторных клеток лежат два механизма: прямой, связан с встраиванием клеток в месте дефекта тканей, и паракринный, обусловлен действием продуцируемых клетками цитокинов, вовлеченных в процессы пролиферации, дифференцировки и гибели клеток [34; 40]. Имплантация аутологичных стволовых клеток костного мозга в поврежденный

миокард может быть перспективной терапией, направленной на повышение регенерации миокарда и восстановления сократительной способности желудочков [45; 403]. Показан терапевтический эффект внутривенного введения МСК пуповины человека у больных сердечной недостаточностью со сниженной фракцией выброса левого желудочка, выразившегося в улучшении показателей фракции выброса левого желудочка, снижении класса сердечной недостаточности по классификации Нью-Йоркской ассоциации кардиологов и улучшении качества жизни [403]. По данным 3-й фазы клинических исследований аллогенные МСК рассматривают как перспективный способ немедикаментозного лечения больных с сердечной недостаточностью [121].

Недостатком лечения дегенеративных процессов является кратковременный эффект от введенных стволовых клеток как следствие значительной гибели стволовых клеток в условиях неблагоприятного микроокружения.

Требуется разработка методов повышения устойчивости клеток к неблагоприятным факторам микроокружения в патологическом очаге и направленная модуляция их функций с использованием биологически активных молекул, способных увеличивать резистентность клеток к неблагоприятным факторам микроокружения и усиливать их репаративный эффект. Одной из таких перспективных молекул, по нашему мнению, может стать эритропоэтин (ЭПО).

ЭПО, гликопротеин с молекулярной массой 35 кДа, передает сигнал через связывание с рецептором к ЭПО (ЭПОР) на мембране клеток как эритроидного ряда (канонический сигнальный путь ЭПО), так и неэритроидных клеток, включая кардиомиоциты, миоциты, нервные и эндотелиальные клетки [301; 365; 477]. При неканоническом пути связывания ЭПО с ЭПОР и общей  $\beta$ -цепью цитокинов (CD131), отмечен цитопротективный эффект, включающий антиапоптотическое и противовоспалительное действие ЭПО при индукции стресс-реакции в ответ на TNF- $\alpha$  и/или липополисахарид [348]. Показано нейропротекторное действие ЭПО, через активацию MAPK и PI3K, участвующих в подавлении апоптоза [67]. В экспериментальной модели повреждения седалищного нерва у крыс лечение МСК и эритропоэтином усиливает регенерацию [441].

Малоисследованным остается вопрос, насколько ЭПО влияет на морфофункциональные свойства МСК костного мозга человека и животных в норме и при различных условиях кондиционирования (дефицит питательных веществ, гипогликемия и гипергликемия, окислительный стресс).

### **Степень разработанности темы диссертации**

Введение аутологичных мононуклеарных клеток или МСК костного мозга при критической ишемии нижних конечностей рассматривается как новая стратегия лечения [101]. Отмечено улучшение лодыжечно-плечевого индекса, увеличение периода безболезненной ходьбы, уменьшение размеров трофических язв и улучшение качества жизни больных с критической ишемией нижних конечностей после внутримышечного введения мононуклеаров костного мозга [404]. Показана терапевтическая эффективность трансплантации стромальных клеток из жировой ткани при критической ишемии нижних конечностей [368]. Аутологичные мононуклеары костного мозга рассматриваются как способ «непрямой реваскуляризации» пораженных конечностей при критической ишемии нижних конечностей с плохим дистальным сосудистым руслом [55]. Однако эффективность лечения КИНК и трофических язв с использованием МСК сохранялась на протяжении 4–6 месяцев после однократной инъекции клеток в мышцы голени.

В экспериментальной модели ишемии конечностей у крыс продемонстрировано увеличение заселения и выживаемости МСК, предобработанных ЭПО [382]. В модели дилатационной кардиомиопатии у крыс введение МСК, экспрессирующих ЭПО, способствовало снижению тяжести патологического процесса [310].

Введение ЭПО-трансфицированных МСК крысам с ишемией конечностей способствовало увеличению новых сосудов [175]. Сочетание МСК с ЭПО на экспериментальной модели повреждения спинного мозга у крыс показало лучший терапевтический потенциал в сравнении с лечением только МСК [202].

МСК рассматривают как альтернативу хирургическому способу лечения при дегенерации межпозвонкового диска [126; 503]. Введение МСК больным с дискогенными болями способствует улучшению качества жизни опосредованно через изменение катаболизма в дегенерированном межпозвонковом диске [499].

Однако, целый ряд вопросов относительно параметров и механизмов реализации потенциала МСК после экспозиции с ЭПО, в частности, изменения уровня экспрессии поверхностных молекул, функциональных свойств и аутофагии, практически не изучены.

### **Цель исследования**

Охарактеризовать морфофункциональные свойства мезенхимных стволовых клеток костного мозга человека и крыс при активации эритропоэтином.

### **Задачи исследования**

1. Изучить экспрессию рецепторов к эритропоэтину и рецептора к эритропоэтину, ассоциированным с общей бета цепью цитокинов, на мезенхимных стволовых клетках человека в ответ на эритропоэтин.

2. Изучить экспрессию молекул межклеточного взаимодействия (интегрины, молекулы адгезии) на мезенхимных стволовых клетках костного мозга человека в ответ на стимуляцию эритропоэтином.

3. Изучить функциональные изменения (апоптоз/некроз, пролиферация, миграция, секреция) мезенхимных стволовых клеток человека и крыс в условиях нормоксии, оксидативного стресса, гипогликемии, гипергликемии и дефицита ростовых факторов.

4. Оценить структурные изменения в мезенхимных стволовых клетках человека (аутофагия, ультраструктура клеток) в ответ на стимуляцию эритропоэтином.

5. Изучить параметры микроциркуляции в конечностях крыс с ишемией в ответ на введение мезенхимных стволовых клеток и сочетания мезенхимных стволовых клеток с эритропоэтином.

6. Исследовать уровень цитокинов в сыворотке крови и в мышцах голени у крыс с ишемией конечностей.

7. Изучить особенности регенерации пульпозного ядра межпозвонкового диска хвостового отдела крыс при применении мезенхимных стволовых клеток и сочетания мезенхимных стволовых клеток с эритропоэтином.

### **Научная новизна**

Впервые в работе проанализированы морфофункциональные свойства мезенхимных стволовых клеток костного мозга человека и крыс в ответ на активацию эритропоэтином, что позволило в эксперименте оценить терапевтический потенциал биомедицинского клеточного продукта (МСК и сочетание МСК с ЭПО), ускоряющего регенеративные процессы при ишемии конечностей и дегенерации пульпозного ядра межпозвонкового диска.

Впервые установлено, что ЭПО влияет на экспрессию ЭПОР, ко-экспрессию ЭПОР/CD131 и CD131, молекул адгезии (CD18, CD18/54, CD54, CD44, CD49a, CD146) на МСК костного мозга человека.

Приоритетным является выявление изменения уровня экспрессии маркера стволовости и проангиогенного потенциала – CD146.

Показано, что ЭПО проявляет антиапоптотическое действие на МСК человека и крыс в условиях окислительного стресса, гипогликемии, гипергликемии и дефицита ростовых факторов, что проявляется снижением доли клеток в апоптозе/некрозе, усилением пролиферации, миграции и секреции.

Приоритетными явились данные о возрастании под действием ЭПО активности аутофагии в МСК (увеличение экспрессии маркера аутофагии LC3B в 2,5 раза), что рассматривается как антивозрастное действие ЭПО, и об изменении структуры цитоплазмы клеток (увеличение плотности гранулярного ретикулума на 47 %), что указывает на возрастание синтетической активности клеток.

Впервые установлена динамика изменения уровня провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, ростовых факторов на системном (в сыворотке крови) и локальном (в мышцах голени) уровне организма при

лечении ишемии конечностей у крыс мезенхимными стволовыми клетками и сочетании мезенхимных стволовых клеток с эритропоэтином.

Впервые показано, что мезенхимные стволовые клетки и сочетание мезенхимных стволовых клеток с эритропоэтином усиливают регенерацию пульпозного ядра межпозвонкового диска при ее механическом повреждении.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Полученные результаты исследования позволяют изучить проблему влияния эритропоэтина на мезенхимные стволовые клетки человека и крыс. Изучение комплексной реакции мезенхимных стволовых клеток костного мозга человека и крыс позволяют теоретически обосновать использование эритропоэтина для надления стволовых клеток устойчивостью к неблагоприятным факторам микроокружения в очаге патологического процесса. Полученные результаты исследования позволяет оценить реактивность организма на системном и локальном уровне при использовании мезенхимных стволовых клеток и эритропоэтина. Сочетание мезенхимных стволовых клеток и эритропоэтина может быть использовано для лечения ишемии конечностей и дегенерации пульпозного ядра межпозвонкового диска.

Данные об особенностях изменения морфофункциональных свойств МСК костного мозга человека и крыс в ответ на активацию ЭПО могут быть использованы при изучении эффективности клеточных технологий в лечении ишемии и дегенерации межпозвонкового диска.

Полученные данные являются основой для разработки методов клеточной терапии в клинической практике.

### **Методология и методы диссертационного исследования**

На первом этапе работы для выявления особенностей морфологических и функциональных свойств МСК костного мозга человека и крыс выполнено изучение экспрессии поверхностных кластеров дифференцировки клеток, вовлеченных в межклеточное взаимодействие, и рецепторов к эритропоэтину,

пролиферативного и миграционного потенциала, секреции биологически активных молекул в ответ на стимуляцию клеток ЭПО *in vitro*. Выявлены эффекты ЭПО на апоптоз/некроз МСК человека и крыс в норме и при различных условиях кондиционирования клеток (дефицит ростовых факторов, гипо- и гипергликемия, окислительный стресс). Проведен анализ экспрессии маркера аутофагии (LC3B) и ультраструктуры МСК в ответ на ЭПО стимул. На втором этапе с целью изучения структурных и функциональных изменений, возникающих в мышцах при ишемии конечности и в пульпозном ядре межпозвонкового диска при механическом повреждении, без лечения и в условиях использования МСК с ЭПО. Структурные изменения в мышцах голени и пульпозном ядре межпозвонкового диска исследовали с помощью гистологического метода. Функциональные изменения в мышцах голени оценивали с использованием доплерографии, оценки уровней цитокинов, а функциональные изменения в пульпозном ядре межпозвонкового диска оценивали с использованием МРТ (изменение высоты межпозвонкового диска). На третьем этапе проводили статистический анализ полученных данных с использованием пакета программ Statistica 10.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Эритропоэтин инициирует изменение экспрессии рецепторов к эритропоэтину и молекул межклеточного взаимодействия на мембране мезенхимных стволовых клеток костного мозга человека.

2. Со-культивирование мезенхимных стволовых клеток костного мозга человека и крыс с эритропоэтином ведет к повышению устойчивости клеток к неблагоприятному микроокружению (окислительному стрессу, гипо- и гипергликемии, дефициту ростовых факторов).

3. Эритропоэтин проявляет антивозрастной эффект. Длительное культивирование мезенхимных стволовых клеток костного мозга человека с эритропоэтином способствует приобретению функциональных свойств,

характерных для клеток, находящихся на более ранних этапах роста *in vitro* и увеличению аутофагии, гранулярности эндоплазматического ретикулума.

4. Введение мезенхимных стволовых клеток, мезенхимных стволовых клеток с эритропоэтином при ишемии конечности и дегенерации межпозвонкового диска у крыс сопровождается усилением микроциркуляции в дистальном отделе конечности, снижением некротического поражения мышечных волокон, увеличением количества сосудов, питающих мышечные волокна, и активацией регенерации пульпозного ядра межпозвонкового диска.

### **Степень достоверности**

Достоверность и обоснованность результатов исследования обеспечена: достаточным объемом клеточных моделей (50 образцов костного мозга человека и 42 образца костного мозга крыс); моделированием ишемии задних конечностей (53 особи) и дегенерации межпозвонкового диска хвостового отдела позвоночника (35 особей) у крыс; адекватностью поставленных задач; корректным применением современных методов обработки данных; обсуждением результатов и аргументированных выводов исследования на научных конференциях и в рецензируемых публикациях.

### **Апробация работы**

Основные положения работы представлены в виде устных и постерных докладов и обсуждены: на 123-й международной конференции «Лимфология: от фундаментальных исследований к медицинским технологиям» (Новосибирск, 2016); на 3-м Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2017); на 11-й международной конференции «Multiconference BGRS/SB-2018/Systems Biology and Biomedicine» (Новосибирск, 2018); на Школе молодых ученых в рамках выполнения гранта РФФИ «Разработка тканеинженерных конструкций для открытого и транскатетерного замещения элементов сердечнососудистой системы (Заявка № 17-75-3000)» (Новосибирск, 2018); на 4-ом Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2019); на

Всероссийской мультikonференции с международным участием «Биотехнология – медицине будущего» (Новосибирск, 2019); на 5-ом национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2022).

Диссертационная работа апробирована на расширенном заседании ученого совета Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии – филиала Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (Новосибирск, 2021).

Диссертационная работа выполнена в соответствии с утвержденным направлением научно-исследовательской работы «Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии – филиала Федерального государственного бюджетного научного учреждения Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» по теме: «Разработка инновационных технологий прогнозирования развития, ранней диагностики, лекарственной и клеточной терапии социально-значимых заболеваний человека аутоиммунной, воспалительной и дисметаболической природы на основе анализа клинических, геномных, протеомных и метаболомных параметров», номер государственной регистрации 122022800132-1.

### **Внедрение результатов исследования**

Результаты исследования внедрены в лекционный курс кафедры терапии, гематологии и трансфузиологии (ФПК и ППВ) ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России и в экспериментальную работу лаборатории физиологии протективной системы Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии – филиала Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук».

## **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 27 научных работ, в том числе 1 свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ и 14 статей в научных журналах и изданиях, включенных в перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, из них 11 статьёй в журналах категории К1 и 2 статьи в журналах категории К2, входящих в список изданий, распределённых по категориям К1, К2, К3, в том числе 11 статей в журналах, входящих в международные реферативные базы данных и систем цитирования Scopus и WoS.

## **Объём и структура работы**

Диссертация изложена на 315 страницах машинописного текста и состоит из введения, трех глав, обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы. Список литературы представлен 505 источниками, из которых 437 – в зарубежных изданиях. Полученные результаты проиллюстрированы с помощью 29 таблиц и 42 рисунков.

## **Личный вклад автора**

Автором разработаны методологические подходы к реализации поставленной цели и решению задач, выполнены культуральные исследования, моделирование ишемии задней конечности и дегенерации межпозвонкового диска у крыс, проведена статистическая обработка и анализ с обобщением полученных результатов, подготовлены к публикации статьи. Патоморфологический анализ мышц голени и межпозвонковых дисков позвоночника проведен совместно с канд. мед. наук Морозовым Д. В. (НГМУ); определение аутофагии в МСК человека методом иммуноцитохимии – с канд. мед. наук Таскаевой Ю. С.; трансмиссионная электронная микроскопия МСК человека – с д-ром биол. наук Бгатовой Н. П.

# ГЛАВА 1 МЕЗЕНХИМНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ И ЭРИТРОПОЭТИН (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

## 1.1 Характеристика мезенхимных стволовых клеток

### 1.1.1 Фенотип и функциональные свойства мезенхимных стволовых клеток

Впервые о сохранности в соединительной ткани взрослого организма недифференцированных клеток эмбрионального генеза, которые локализовались вокруг сосудов и обладали плюрипотентностью, сообщается в работе Максимова «Соединительная ткань и кроветворные клетки» [1; 30]. Далее представление о наличии МСК в тканях взрослого организма как о мезенхимных камбиальных клетках, связанных с эндотелиальной выстилкой, было развито Заварзиным и Румянцевым [62]. В трудах Фриденштейна показано наличие адгезивной фракции костного мозга у мышей и человека, способной к остеогенной дифференцировке [30; 62]. С конца 20-го века и по настоящее время накопилось множество исследований, позволивших окончательно утвердить представление о существовании в организме человека и животных отдельной популяции мезенхимы, а именно мультипотентных мезенхимных/мезенхимальных стволовых/стромальных клетках (ММСК/МСК), являющейся общим источником клеточных элементов негемопоетической ткани.

Требования международного общества по клеточной терапии (ISCT), к «истинным» МСК:

- а) адгезия к пластику;
- б) экспрессия CD73, CD90, CD105 и отсутствие экспрессии CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a, CD19 и HLA-DR;
- в) дифференцировка в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлении [344].

Последние исследования дифференцировочного потенциала МСК указывают на их способность трансдифференцироваться и в другие типы тканей, например, способность нестин-позитивных МСК дифференцироваться в клетки астроглии [249].

Клетки костного мозга представляют собой пул различных клеток, способных к самоподдержанию, дифференцировке в различные типы коммитированных клеток, и находящихся на разных стадиях созревания [30; 122].

Для эмбриональных стволовых клеток человека характерна экспрессия *Nanog*, *Oct-4*, *Sox-2*, *Rex-1*, *Dnmt3b*, *Lin-28*, *Tdgf1*, *FoxD3*, *Tert*, *Utf-1*, *Gal*, *Cx43*, *Gdf3*, *Gtcm1*, *Terf1*, *Terf2*, *Lefty A* и *Lefty B* факторов, участвующих в самообновлении стволовых клеток.

Для ГСК присуща экспрессия CD34, но наличие комбинации CD133 и CD90 с утратой экспрессии CD38 и других линейных маркеров, обеспечивает однородность пула стволовых клеток [89].

МСК экспрессируют на клеточной мембране CD13, CD29, CD44, CD49e, CD54, CD71, CD73 (SH3 или SH4), CD90 (Thy-1), CD105 (SH2 или эндоглин), CD106, CD166, HLA-ABC и неэкспрессируют - CD14, CD31, CD34, CD45, CD62E, CD62L, CD62P и HLA-DR. Кроме этого, МСК неэкспрессируют костимуляторные молекулы CD80, CD86, CD40, Stro-1, CD271 (низко-аффинный рецептор фактора роста нервов), SSEA-4 (стадия специфичный эмбриональный антиген-4), CD146, CD49a, рецептор к лептину [42; 89; 461].

МСК, выделенные из костного мозга человека, экспрессируют CD10, CD73, CD140b, CD146, GD2 и CD271, а также белки, ассоциированные с плюрипотентностью клеток (*Oct4*, *Nanog* и *SSEA-4*), что позволяет предположить присутствие клеток различных популяций в трабекулах костей и среди клеток костного мозга [335]. При сопоставлении клеточных сигнальных рецепторов, способных влиять на функциональные свойства ГСК и МСК костного мозга, у мышей было показано, что МСК (CD73+, CD90+, CD105+, CD45-, CD34-, CD31-, c-Kit-) обладают высоким пролиферативным потенциалом, дифференцируются в мезодермальном направлении [89]. Для ГСК костного мозга выявлено 16 мРНК

(включая *Ptpnc, c-Kit, Csf3r, Csf2rb2, Ccr4, Cxcr3, Tie-1*), а для МСК 14 транскриптов (включая *Pdgfra, Ddr2, Ngfr, Mst1r, Fgfr2, Epha3, Ephb3*). Кроме этого, для 27 транскриптов характерно 2-х кратное увеличение уровней экспрессии в МСК в сравнении с ГСК (включая *Axl, Vmpr1a, Met, Pdgfrb, Fgfr1, Mertk, Cmkor1, Egfr, Epha7, Ephb4*), и 19 транскриптов, которые специфически экспрессировались выше в ГСК, нежели чем в МСК (*Ccr1, Csf1r, Csf2ra, EpoR, IL6ra, IL7r*); 11 транскриптов экспрессированы на более высоком уровне в ГСК и МСК (*Flt1, Insr, Kdr, Jak1, Agtrl1, Ccr3, Ednrb, Il3ra, Hoxb4, Tnfrsf1a, Abcb1b*), тогда как другие не выявлены ни в ГСК, ни в МСК (*Epha6, Epha8, Musk, Ntrk2, Ros1, Srms, Tnk1*).

При сопоставлении МСК человека и свиньи было показано, что МСК свиньи несут на своей мембране антигены, аналогичные МСК человека, включая CD90, MSCA-1 (TNAP/W8B2), CD44, CD29 и SLA I [258]. При селекции МСК свиньи и человека по CD271 выявлен большой прирост количества клеток от исходного количества МСК свиней по сравнению с МСК человека ( $1961 \pm 485$ ) кратно и ( $129 \pm 29$ ) кратно соответственно. В то же время дифференцировка в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлении клеток сопоставима, но адипогенная дифференцировка МСК свиней по срокам наступления опережала МСК человека.

Показано, что МСК мышей и кроликов «негативны» по CD90, МСК крыс по CD71, а МСК кроликов по CD29 [146]. В то же время МСК человека экспрессируют CD29, CD71 и CD90. МСК костного мозга кроликов экспрессируют CD44 ( $97,32 \pm 1,32$ ) %,  $\alpha$ -SMA ( $\alpha$ -гладкомышечный актин;  $95,1 \pm 2,0$ ) %, десмин ( $77,91 \pm 1,78$ ) % и виментин ( $95,68 \pm 3,58$ ) %, CD51 ( $12,99 \pm 1,42$ ) %. МСК кроликов не экспрессировали CD13, CD14, CD29, CD31, CD34, CD45, CD49d, CD49f, CD54, CD59, CD71, CD73, CD90, CD105, CD106, CD133, CD166, МНС I и МНС II (менее 4 %). МСК костного мозга человека экспрессируют CD13 ( $92,86 \pm 8,91$ ) %, CD29 ( $98,51 \pm 1,21$ ) %, CD44 ( $99,21 \pm 0,47$ ) %, CD59 ( $99,94 \pm 0,04$ ) %, CD73 ( $98,67 \pm 0,66$ ) %, CD90 ( $98,95 \pm 0,38$ ) %, CD105 ( $99,28 \pm 0,34$ ) %, CD166 ( $96,81 \pm 0,74$ ) %, МНС I

(98,63 ± 0,25) %,  $\alpha$ -SMA (85,55 ± 2,14) %, виментин (98,54 ± 0,29) %. Также МСК костного мозга человека экспрессируют CD71 (13,72 ± 0,87) %, десмин (6,17 ± 1,59) %, CD49d (5,44 ± 1,26) % и CD31 (4,64 ± 0,55) % и не экспрессируют CD14, CD34, CD45, CD49f, CD51, CD54, CD106, CD133, МНС II и цитокератин (менее 4 %).

МСК костного мозга крыс, выделенные по способности связываться с N-ацетил глюкозамином, опосредованно через виментин, экспрессировали CD90, CD29, CD44, CD54, CD73 и CD105, но не несли CD34, CD45 и CD11b/c, и были способны к дифференцировке в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлении [152; 300]. Кроме этого, такой способ выделения МСК из костного мозга способствовал получению клеток с более высокой экспрессией на поверхности клеток CD106, а также клеток с меньшим уровнем экспрессии маркера старения клеток –  $\beta$ -галактозидазы, чем на МСК, полученных традиционным методом адгезией к пластику.

МСК козы и овцы экспрессируют CD44, CD166, а также в меньшей степени CD34, CD45, CD105 и CD90, способны к дифференцировке в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлении, но отличаются по фенотипу от МСК человека [131].

МСК человека, утрачивают способность связываться с эндотелием, но экспрессируют гликовариант CD44. В составе гликовариант CD44 имеются N-связанные сиаллактозаминазы, которые могут быть  $\alpha$ (1,3)-фукозилированы, что придает им новые свойства (sLeX), создавая аналог E-/L-селектинов, как у ГСК. Это дает возможность формировать устойчивое связывание циркулирующих клеток с эндотелием, экспрессирующим E-селектин [70]. Кроме этого, авторы показали, что МСК, выделенные из жировой ткани, также не экспрессируют E-селектины, но аналогичная обработка клеток с созданием sLeX образа, инициирует устойчивое связывание клеток с E-селектином. Авторы показали, что хотя оба типа МСК не имели транскриптов, кодирующих  $\alpha$ (1,3)-фукозилтрансферазы, но одинаково экспрессируют гликозилтрансферазы, критически важные для создания сиаллактаминанов. В совокупности эти данные

показывают, что сборка CD44s гликоварианта, декорированного сиаллактаминамином, является консервативным признаком МСК человека. Показано, что МСК человека трансформированные глюкозилтрансфераза-программированной стереосубстанцией CD44 создают лиганд к E-селектину и, несмотря на отсутствие CXCR4, введенные в организм животных клетки проявляют тропизм к костной ткани [145]. Трансформация МСК запускает VLA-4 через образование стойкой связи с VCAM-1 (CD106). Активация VLA-4 опосредовано через Rac1/Rap1 ГТФаза сигнальный путь, приводящий к трансэндотелиальной миграции стимулированных эндотелиальных клеток пупочной вены без вовлечения хемокинов. С другой стороны, увеличение уровней экспрессии на МСК E- и L-селектинов наделяет их способностью мигрировать через стенки сосудов [471].

Наличие экспрессии CD146 на МСК признак высокой плюрипотентности и самоподдержания пула клеток [372].

МСК выходят из костного мозга в периферическое русло и мигрируют в ткани в ответ на действие повреждающих факторов (физические, химические, травмы, воспаление, гипоксия) [41; 43; 242; 311]. В процессе перехода МСК из костного мозга в периферическое русло клеткам приходится проникать через эндотелий сосудов. Существенная роль в трансэндотелиальной миграции МСК отводится молекулам адгезии: интегринам ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha v$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  и  $\beta 3$ ), VCAM-1, ICAM-1, CD166, CD105, CD49d [160; 165; 170; 282; 347; 463]. Интегрин- $\beta 1$  способствует перекатыванию и прикреплению МСК к эндотелиоцитам, в процесс перекатывания клеток вовлечено VLA-4/VCAM-1, обеспечивающее взаимодействие и прикрепление МСК к эндотелиоцитам.

Хотя интегрины и селектины опосредуют трансмиграцию МСК, но хемокины могут активировать лиганды, вовлеченные в процесс прикрепления, миграции, хемотаксиса и поддержание пула МСК в органах-мишенях. МСК экспрессируют широкий спектр хемокинов и хемокиновых рецепторов, что служит косвенным признаком вовлеченности их в хоминг. МСК экспрессируют хемокиновые рецепторы CCR1, CCR2, CCR4, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CCR10,

CXCR2, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5 и CXCR6 [47; 95; 103; 110; 200; 353; 361; 401]. Так, для миграции к поврежденному очагу МСК используют CXCR1, CXCR2, CXCR4, CCR1, CCR2, IL-8, MIP-1a и MCP-1.

Матриксные металлопротеиназы (ММП) семейство цинкзависимых протеолитических ферментов, которые обеспечивают деградацию внеклеточного матрикса непосредственно или же через сигнальные пути с их вовлечением, влияют на дифференцировку, миграцию, ангиогенез и пролиферацию МСК. Миграция и привлечение МСК в очаг повреждения увеличивается при повышении экспрессии CXCR4, MMP2, MT1-MMP [82].

МСК секретируют широкий спектр биологически активных молекул, через которые осуществляют как аутокринные, так и паракринные эффекты [177; 322; 401]. МСК секретируют провоспалительные (IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$ ) и противовоспалительные (IL-1RA, IL-10) цитокины, ростовые факторы (HGF, bFGF, EGF, SCF, VEGF, G-CSF, GM-CSF, M-, IL-3, IL-7, LIF, TGF- $\beta$ , SDF-1 $\alpha$ ), тромбоспондин-2, MCP1, MMP1, MMP8, MMP13 [38; 51; 148; 150; 193; 287; 323; 384; 437].

Одна из важнейших функций МСК – создание кроветворного микроокружения путем секреции цитокинов и хемоаттрактантов, а также прямых взаимодействий с кроветворными клетками [44; 177; 236; 336].

Для МСК характерна иммуномодулирующая активность, опосредуемая через Th17/Tr1, выражающаяся в снижении количества Т-лимфоцитов, секретирующих IL-17 и повышении количества Т-лимфоцитов-продуцентов TGF- $\beta$  [254; 323]. Кроме этого, МСК оказывают влияние на реактивность лимфоцитов и факторы врожденного иммунитета [20; 27; 163; 337].

Показано, что под влиянием КС-МСК увеличивается экспрессия FoxP3 и уровень продукции IL-10 Т-хелперами, что может быть связано с продукцией МСК IL-6 [337]. Также МСК способны к усилению фагоцитоза M1, M2a макрофагами и подавления M2b, а также менять уровень продукции макрофагами TNF- $\alpha$  подавляя в M1, M2a макрофагах и увеличивая в M2b, но не изменяя уровень продукции IL-10 [334]. Показана способность МСК костного мозга и

жировой ткани стимулировать рост опухолевых клеточных линий В16 и CA755 *in vivo* [31].

### 1.1.2 Источники получения мезенхимных стволовых клеток

МСК костного мозга наиболее изучены и апробированы как источник для клеточной терапии на экспериментальных моделях заболеваний у животных и в пилотных исследованиях лечения различных патологий у человека [8; 87; 120; 185; 339; 494]. Источником МСК являются – скелетные мышцы [146, 339], пупочный канатик [81; 143; 275; 399; 431], периферическая [371; 451] и менструальная кровь [318; 477], пульпа зубов [91; 412; 465], амниотическая жидкость [361; 455], моча [390; 474], фетальная ткань (запрещено по этическим принципам к клиническому использованию, но разрешено для исследований *in vitro*) [147; 261; 465].

В основном костный мозг забирают из грудной или подвздошной кости. Место забора костного мозга не влияет на способность МСК к дифференцировке в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлении не выявлено [279]. Анализ рецепторов, вовлеченных в реализацию хоминга МСК костного мозга, показал, что уже после второго пассажа на МСК экспрессируются хемокиновые рецепторы семейства CC (CCR1, CCR7, CCR9) и семейства CXС (CXCR4, CXCR5, CXCR6) [436; 471]. При росте в бессывороточной среде МСК продуцировали широкий спектр хемокиновых лигандов (CCL2, CCL4, CCL5, CCL20, CXCL12, CXCL8, CX3CL1). Стимулирование МСК хемокиновыми лигандами запускало фосфорилирование MAPK, включая ERK1 и ERK2, а также сигнальные пути, связанные с FAK. Более того, CXCL12 избирательно активирует STAT5, а CCL5–STAT1. Показана способность данных хемокиновых лигандов стимулировать хемотаксис МСК, а CXCL12 инициирует полимеризацию F-цитоскелета. На более поздних сроках культивирования (12–16-й пассаж), МСК костного мозга утрачивают экспрессию хемокиновых рецепторов и способность к хемотаксису, как следствие снижения экспрессии молекул адгезии (ICAM-1,

ICAM-2, VCAM-1) и CD157, хотя экспрессия CD90 и CD105 увеличивается. Изменения фенотипа клеток обусловлено замедлением темпа роста клеток и увеличением спонтанного апоптоза.

Показано, что увеличение срока культивирования МСК костного мозга с 14 суток до 28 или 42 суток способствует увеличению уровней коллагена 1 и 2 типа (маркеров хондрогенного потенциала клеток) [270].

Другим источником МСК является жировая ткань (стромально-васкулярная фракция жира) [55; 145; 372]. МСК жировой ткани имеют повышенный пролиферативный потенциал по сравнению с МСК костного мозга [222; 238]. Морфофункциональные свойства МСК из жировой ткани зависят от ее типа. Так, МСК висцерального жира проявляют большую жизнеспособность и выделяются в большем количестве в сравнении с МСК из подкожного жира [222; 488]. Более того, МСК висцерального жира собак, экспрессирующие на своей поверхности CD90 и CD105, проявляют более выраженную стволовость и способность к адипогенной дифференцировке по сравнению с МСК подкожного жира [132; 461]. Показано, что МСК из жировой ткани и липом собак имеют различия по форме – МСК жировой ткани округлые, а не фибробластоподобные [145]. В то же время МСК из обоих источников фенотипически не отличались, но экспрессия CD29 и CD90 была выше на МСК из липомы. Также для МСК из липомы характерна более выраженная дифференцировка в адипогенном направлении. Клеточный протеомный анализ выявил, что по уровню экспрессии в 95 % белковые пятна схожи у обоих источников МСК, что указывает на сходство протеомного состава клеток. При секретомном анализе клеток выявлено более 1 900 белков в КС от клеток и в 94 % они совпадали по уровню экспрессии. Также не выявлено существенного различия по уровню продукции цитокинов МСК из жировой ткани и липомы.

Сопоставление различного типа жировой ткани и возраста мышей показало, что МСК бурого жира от молодых мышей проявляют повышенную пролиферацию, остеогенную, адипогенную и миокардиоцитарную дифференцировку в сравнении с МСК из белого жира [386]. В то же время не

выявлено существенных различий в иммуносупрессии, уровня экспрессии *PDL1*, *CD54*, *CD106*, *iNOS*, *TNF- $\alpha$* , *IL-10* и *SOCS1* для МСК обоих типов жировой ткани. Авторы показали, что МСК старых мышей, выделенные из бурого жира, проявляют повышенную пролиферацию, остеогенную, адипогенную и миокардиоцитарную дифференцировку в сравнении с МСК из белого жира, однако, вместе с тем, демонстрировали сниженную иммуносупрессорную активность.

Показана способность МСК жировой ткани дифференцироваться в нейрональном направлении при наличии в среде ретиноевой кислоты и/или 5-азацитидина [47].

Сравнительный анализ МСК, выделенных из перикардального и подкожного жира крыс, показал, что оба типа МСК имели схожую морфологию и динамику роста на начальных этапах исследования, но после 25 суток культивирования МСК подкожного жира проявляли повышенную пролиферативную активность [355]. МСК перикардального жира экспрессируют транскрипционные факторы кардиогенеза (*GATA4*, *Isl1*, *Nkx2.5*, *MEF2c*) и лучше дифференцируются в миогенном направлении, но хуже в адипогенном и остеогенном направлении, способствуют репарации стенки желудочка сердца, васкулогенезу, миогенезу.

Сравнительный анализ хондрогенного потенциала МСК, выделенных из жировой ткани, Вартонова студня пуповины и пульпы молочного зуба человека, при культивировании в составе микросфер показал, что фенотипически эти клетки схожи (CD29+, CD44+, CD49b+, CD73+, CD90+, CD34-, CD45-, HLADR-), но наибольшим хондрогенным потенциалом обладали МСК из жировой ткани [52].

МСК крови пуповины человека экспрессируют на своей мембране CD90, CD73, CD105 и негативны по CD34, CD45, CD19, CD11, HLA-DR [174]. МСК из крови пуповины обладают более высокой пролиферативной способностью в сравнении с МСК костного мозга, полученных в биореакторе Quantum® (США) [69]. Более того, для МСК характерно повышение уровней экспрессии интегринов

CD29, CD49c и CD51/61 и сохранность длины теломеразы. Для МСК, полученных в биореакторе, характерно повышение активности генов *IDO*. В работе авторов проведен сравнительный анализ экспрессии поверхностных маркеров МСК крови пуповины и костного мозга человека по уровню экспрессии CD13, CD29, CD40, CD44, CD54, CD71, CD73, CD80, CD86, CD90, CD105, CD106, CD146, HLA-I и HLA-DR [34; 46]. Отмечено, что экспрессия CD54 и CD106 на МСК костного мозга выше.

При сопоставлении МСК (костного мозга, жировой ткани, пуповинной крови) показано, что фенотипически они схожи, обладают сопоставимой иммуносупрессорной активностью и дифференцировочным потенциалом, но МСК пуповинной крови проявляли более высокий пролиферативный потенциал и клональность, более низкие уровни экспрессии *p53*, *p21* и *p16* (маркеры старения) [140]. Со-культивирование МСК пуповинной крови с альвеолярными макрофагами, активированными липополисахаридом, существенно снижает уровни экспрессии провоспалительных цитокинов *IL-1 $\alpha$* , *IL-6* и *IL-8*, опосредованно через *Ang1*.

Показано, что МСК ткани пупочного канатика увеличивают свой секреторный потенциал в присутствии сыворотки пуповинной крови, в частности, увеличивается секреция HGF, G-CSF, GM-CSF и VEGF [36].

При сравнительном анализе МСК из костного мозга и мышечной ткани больных с остеоартритом, остеопорозом и здоровых доноров выявили, что доля CD45/CD19/CD14/CD34 негативных клеток у больных с остеоартритом меньше в сравнении с больными остеопорозом и донорами [149]. МСК больных остеоартритом имели сниженный потенциал к остеогенной дифференцировке, а МСК больных остеопорозом – сниженный потенциал к адипогенной дифференцировке по сравнению с донорами. Показано, что уровень экспрессии CD271 сопряжен с адипогенезом из МСК мышечной ткани. Уровень экспрессии CD73 на МСК костного мозга у больных остеоартритом снижен в сравнении с больными остеопорозом. Кроме этого, уровень экспрессии генов рецептора к

лептину снижен на МСК костного мозга больных остеоартритом в сравнении с больными остеопорозом и донорами.

МСК из Вартонова студня образуют монослой веретенообразных клеток, высокопролиферирующие клетки, экспрессируют CD90, CD105 и CD44, и не экспрессируют CD34 и HLA-DR, способны дифференцироваться в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлении [391].

В работе Merckx G. [et al.] [90] проведено сравнение ангиогенного потенциала кондиционированных сред (КС) МСК костного мозга и пульпы зуба, а также внеклеточных везикул МСК. Показано, что КС, не содержащие внеклеточные везикулы, проявляют больший хемотаксис эндотелиальных клеток. МСК пульпы зубов проявляли меньший хемотаксис и неоваскуляризацию эндотелиальными клетками в сравнении с МСК костного мозга. Показано, что МСК пульпы зубов и молочных зубов продуцируют 11 цитокинов, вовлеченных в процесс регенерации тканей на сопоставимом уровне с МСК костного мозга [494]. Более того, МСК молочных зубов значимо выше экспрессируют *HGF*, *MMP3* и *SDF-1 $\alpha$* , чем МСК костного мозга. МСК пульпы зуба также существенно выше экспрессируют *HGF* по сравнению с МСК костного мозга, а уровень продукции *SDF-1 $\alpha$*  ниже в сравнении с МСК молочных зубов. В то же время МСК костного мозга отличались от МСК молочных зубов и пульпы зубов большей экспрессией *MCP-1* и *MCP-3*. Показано, что криоконсервация МСК пульпы молочных зубов не влияет на остеогенную дифференцировку, а внесение в остеогенную среду витамина D3 способствует увеличению уровня экспрессии маркеров остеогенной дифференцировки (остеокальцина, щелочной фосфатазы, *BMP2*, *Runx2* и увеличению минерализации внеклеточного матрикса) [39].

Анализ со-культивирования МСК из амниона с МСК жировой ткани показал, что первый тип МСК усиливает пролиферацию, остеогенную дифференцировку, ангиогенный потенциал и секрецию адипонектина МСК из жировой ткани [484]. Данный эффект МСК амниона отменялся U0126 (высокоселективный ингибитор сигнального пути ERK1/2 и MAPK), что служит

доказательством индукции регенерации кости МСК жировой ткани с использованием данных сигнальных путей.

Показано, что для МСК, выделенных из крови плодов, характерна экспрессия CD29, CD44, SH2, SH3, SH4 и отсутствие CD45, CD34, CD14, CD68, vWF и HLA-DR, продукция пролил-4-гидроксилазы,  $\alpha$ -SMA, фибронектина, ламинина и виментина [261; 376]. Также МСК крови плодов дифференцировались в остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлении. Кроме этого, в костном мозге и печени плодов первого триместра выявлены МСК, которые по морфологии, кинетике роста и фенотипу сопоставимы с МСК крови, способны к дифференцировке в адипоциты, остеоциты и хондроциты, даже после выделения и экспансии от единичных клеток. МСК из легочной ткани плодов экспрессируют CD13, CD29, CD44, CD90, CD105, CD166 и HLA-ABC. МСК легких плодов не экспрессируют CD14, CD31, CD34, CD38, CD41a, CD42b, CD45, CD49d, CD61, CD106, CD133 и HLA-DR, 90 % клеток находятся в  $G_0G_1$  фазе клеточного цикла, дифференцируются в нейрональном направлении [147].

В работе Ну С. [465] показано, что МСК из легочной ткани плодов обладают повышенной миграцией, а МСК из костного мозга плодов – меньшей. Показано, что в МСК под действием SDF-1 $\alpha$  или PDGF-BB возрастает реаранжировка актина и фосфорилирование паксиллина, обеспечивающих двигательную активность клеток. МСК имеют более высокий дифференцировочный и миграционный потенциал, меньшую долю клеток в S и  $G_2/M$  фазах клеточного цикла в сравнении с «немигрирующими» МСК. МСК легочной ткани человека не отличаются от МСК костного мозга по фенотипу, генам стволовости, дифференцировки в клеточные элементы мезодермы, а также влиянию на лимфоциты [128]. В то же время МСК легочной ткани человека в большей степени экспрессируют маркер стволовости нестин, а в ответ на обработку ретиноевой кислотой усиливают эпителиальную поляризацию. Показано, что выделенные из ткани легкого больных легочным фиброзом клетки экспрессировали CD44, CD90 и CD105, а также Oct3/4 и Nanog (маркеры плюрипотентности). Выявленное сочетание экспрессии CXCR4 с CD44, CD90 или

CD105 свидетельствует о костномозговом происхождении данных клеток. МСК существенно снижали пролиферацию легочных фибробластов и усиливали репарацию/регенерацию легочного эпителия, а наибольший выход МСК отмечен у больных с фиброзом легких, нежели с эмфиземой легких или доноров [353].

Установлено, что МСК синовиальной жидкости вовлечены в регенерацию хрящевой ткани и проявляют более выраженный хондрогенный потенциал по сравнению с МСК костного мозга или жировой ткани [352]. На обогащенной популяции МСК по LNGFR и CD90 из синовиальной оболочки методом проточной цитометрии показано, что количество таких клеток высокое [389]. По потенциалу дифференциации в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлении они сопоставимы с МСК костного мозга.

Стволовые клетки, выделенные из мочи, схожи по фенотипу с МСК и поддаются репрограммированию в индуцибельные плюрипотентные стволовые клетки и могут быть использованы *in vitro* для фармакодиагностики [474].

Опухоль также является источником МСК. Так, из ткани опухоли молочной железы выделены МСК с фенотипом CD45-/CD90+, с высоким пролиферативным потенциалом, устойчивым к окислительному стрессу [37].

### **1.1.3 Факторы, влияющие на функциональные свойства мезенхимных стволовых клеток**

Источник получения МСК существенно влияет на количество получаемых клеток и их функциональный потенциал [78; 192; 412]. Также на функциональные свойства МСК влияет и состояние здоровья донора клеток, например, МСК лошадей, страдающих метаболическим синдромом, обладают сниженным пролиферативным потенциалом, способностью к дифференцировке в остеогенном и хондрогенном направлении, имеют повреждения митохондрий и повышенный уровень аутофагии [61; 455].

На функциональные свойства МСК существенное влияние оказывает возраст донора МСК – чем старше донор клеток, тем ниже пролиферативный

потенциал [105; 428]. В работе показано, что в крови молодых и старых лошадей содержатся МСК, обладающие ингибирующим влиянием на пролиферацию лимфоцитов и индукцию продукции IL-10 [105]. Установлено, что источник получения МСК существенно влияет на профиль МСК. Так, МСК костного мозга проявляли повышенную миграционную способность, а МСК из синовиальной жидкости, наибольший пролиферативный потенциал. МСК костного мозга лучше заживляли дефекты кожи, чем МСК из синовиальной жидкости и жировой ткани (брыжеечный, шейный и хвостовой жир) [85; 411].

В ходе культивирования МСК *in vitro* высок риск возникновения повреждений генетического материала, что может служить пусковым механизмом трансформации клеток в опухолевые клетки [83; 143]. В норме МСК защищены от этого балансом активности опухоль-супрессирующего гена *p53* и эпигенетическими факторами при культивировании клеток *in vitro*. В работе на МСК из амниотической жидкости, амниотической мембраны, эндометрия и Вартонова студня показано, что МСК из амниотической жидкости больше экспрессировали *p53* и на более стабильном уровне в течение длительного срока культивирования [361]. В то же время МСК из эндометрия и Вартонова студня показали вариабельность экспрессии *p53* при длительном сроке культивирования. Эпигенетический анализ выявил стабильную экспрессию *H19* в МСК из амниотической жидкости, амниотической мембраны и эндометрия, а для МСК из Вартонова студня характерна флуктуация уровней экспрессии *H19*. Таким образом, не исключен риск мутаций в МСК при длительном сроке культивирования *in vitro*.

При длительном культивировании МСК костного мозга *in vitro* в средах DMEM и  $\alpha$ MEM показана утрата типичной фибробластоподобной морфологии, гомогенности и равномерности формирования монослоя [169]. Хотя культивирование МСК в DMEM лучше сказывается на пролиферативном потенциале клеток на ранних пассажах, со временем отмечено падение скорости удвоения популяции в обеих средах. По мере увеличения номера пассажа клеток отмечено снижение уровня экспрессии CD146 в среде DMEM. Сохраняется

адипогенная дифференцировка МСК 4-го и 8-го пассажа, но снижается остеогенная дифференцировка.

Кроме этого, по мере старения клеток в них происходят изменения функционирования клеточных органелл. Одним из механизмов старения клеток является гиперактивация mTORC1. Старение стволовых клеток ведет к снижению регенеративного потенциала и истощению пула стволовых клеток в органах и тканях взрослого организма, что снижает эффект лечения аутологичными стволовыми клетками. Полагают, что подавление mTORC1 является ключом к сохранению пула стволовых клеток. В качестве терапевтических агентов рассматриваются активаторы АМПК: 5-аминоимидазол-4-карбоксамид рибонуклеотид; А769662; метформин; NAD<sup>+</sup> [305]. На МСК жировой ткани кошек показано, что длительность культивирования *in vitro* клеток снижает пролиферативный потенциал, уровень экспрессии генов плюрипотентности (*Sox2*, *Nanog*, *Klf4*) и маркеров принадлежности к «истинным» МСК (CD9, CD44, CD90, CD105). В то же время по мере старения клеток возрастает способность к дифференцировке в адипогенном и остеогенном направлении и увеличивается доля стареющих клеток [304].

Оксидативный стресс способствует снижению дифференцировочного потенциала «стареющих» (senescent) МСК [183; 240]. Кроме этого, для «стареющих» МСК характерно снижение миграции и хоминга, а секретом клеток содержит в большом количестве факторы, способные инициировать системный воспалительный процесс, подавлять иммуномодулирующее действие МСК и усиливать пролиферацию и миграцию опухолевых клеток.

На функциональную активность МСК влияет микрогравитация, ионизирующее излучение через инициацию альтерации в геноме клеток [3; 49].

Способ наращивания массы МСК, а именно в 2D или 3D модели, также оказывает свой эффект на морфофункциональные свойства клеток [476]. Как в 2D, так и в 3D культуре МСК способствовали экспансии CD34 гемопоэтических стволовых клеток. Сопоставление секретома МСК, из 3D модели на скафолдах из поликапролактона и желатина, показало в 5 раз более высокое содержание HGF и

CD54 по сравнению с секретомом из 2D модели [133]. Фибробласты роговицы в присутствии секретомы 3D МСК закрывают «раневой дефект» на 95 % через 48 часов по сравнению с 50 % для секретомы 2D МСК культур. На экспериментальной модели дефекта роговицы у кроликов скафолды с МСК усиливают репарацию роговицы. Методом иммуногистохимии установлено, что МСК на скафолде способствуют уменьшению образования в раневом дефекте роговицы  $\alpha$ -SMA позитивных клеток, что свидетельствует о подавлении миофибробластной трансформации МСК роговицы.

Функциональные свойства МСК зависят от микроокружения. Так, синтетические материалы, например, полиэтилентерефталат и политетрафторэтилен (ПТФЭ), оказывают неблагоприятное влияние на пролиферацию и миграцию клеток, а обработка поверхности протезов белками (фибронектин, желатин) усиливает заселение клетками. Максимальная площадь монослоя из МСК на ПТФЭ-поверхности выявлена при культивировании со смесью фибронектина и коллагенов I и IV типов [6; 9; 50]. Показано, что наличие в питательной среде VEGF стимулирует пролиферацию и миграцию фибробластов, но существенно не влияет на функциональную активность МСК. Эритропоэтин стимулирует пролиферацию и не оказывает существенного влияния на миграцию клеток [13]. Показано, что обогащенная тромбоцитами плазма и лизат тромбоцитов стимулируют пролиферацию, миграцию и колониобразование МСК [218]. В режиме реального времени показано, что обогащенная тромбоцитами плазма обладает наибольшим стимулирующим эффектом, а на миграцию стимулирующее влияние оказывает как обогащенная тромбоцитами плазма, так и лизат тромбоцитов [54]. Показано, что на МСК костного мозга от молодых крыс перекись водорода оказывает неблагоприятное действие, ингибируя способность к дифференцировке в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлении, уровень экспрессии стволовых белков (stemness-related proteins), миграцию и колониобразование [181].

В работе показано, что МСК, выделенные из базальной децидуальной оболочки плаценты, устойчивы к окислительному стрессу, индуцированному

перекисью водорода, а культивирование клеток с высоким содержанием глюкозы усиливает адгезию, инвазию и экспрессию генов связанных с выживанием, пролиферацией, миграцией, инвазией, противовоспалительными, анти-хемоаттрактантными и антимикробными свойствами клеток [178; 378; 438]. Высокое содержание глюкозы (16,5 мМ) в питательной среде подавляет миграцию МСК костного мозга крыс и способствует снижению секреции CXCR4, экспрессии мРНК *CXCR4* и *MMP2*, что указывает на подавление миграции клеток через SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 сигнальный путь.

Показано, что МСК костного мозга человека выживают в неблагоприятном микроокружении, индуцированном экспериментальной моделью дегенерации межпозвонкового диска, при этом усиливается миграция, продукция IL-6, IL-8, MCP-1, PGE<sub>2</sub> и снижается продукция TGF- $\beta$ 1 [283].

Установлено, что дефицит глюкозы критичен для выживания МСК [358; 383]. Более того, аноксия (0,1 % O<sub>2</sub>), а не гипоксия (1–5 % O<sub>2</sub>) лучше влияют на функциональный статус МСК, запуская метаболизм глюкозы по пути анаэробного гликолиза для синтеза АТФ, а клетки не используют глутамин, серин или пируват как источник для получения энергии. В отсутствие глюкозы МСК не способны адаптировать метаболизм, что может быть следствием малого внутриклеточного запаса глюкозы, а это ведет к быстрому истощению энергетического запаса клеток и как результат к низкой выживаемости. С другой стороны, отмечено, что гипоксическое прекондиционирование МСК увеличивает их терапевтический потенциал при инфаркте миокарда [15].

В работе Shall G. [et al.] [179] исследован эффект глюкозы на остеогенную дифференцировку МСК. Так, при уровнях глюкозы в диапазоне 5,5–25 мМ отмечено активирование пролиферации МСК, а при нарастании концентрации глюкозы в питательной среде (44 мМ) существенное подавление пролиферативного потенциала клеток. Активность ЩФ (щелочная фосфатаза), количество депозитов кальция и качество минерализации в клетках снижались дозозависимо по мере роста концентрации глюкозы. Кроме этого, высокий уровень глюкозы подавлял экспрессию в МСК мРНК *Runx2* и *Osterix*.

Показано, что МСК пульпозного ядра межпозвонкового диска существенно снижают пролиферативный потенциал, колониобразование, миграцию, повышают уровень экспрессии белков SIRT1, SIRT6, HIF-1 $\alpha$  и GLUT-1, апоптоз, клеточное старение и уровень экспрессии *каспазы-3* [315].

Обработка МСК из Вартонова студня сывороткой крови от больных сахарным диабетом 2 типа ведет к снижению выживаемости и повышенному выделению лактатдегидрогеназы, снижению продукции VEGF и антиоксидантной активности в сравнении с МСК, культивированных в стандартных условиях [81].

Показано, что ЭПК, простимулированные фактором Виллебранда, усиливают адгезию МСК. В то же время МСК не способны прикрепляться к фактору Виллебранда, что указывает на стимулирование адгезии МСК как на результат влияния непосредственно ЭПК, реализуемое через сигнальные молекулы (ERK-1/-2, p38 MAPK) без влияния на гены или уровень экспрессии поверхностных молекул адгезии (E-селектин, P-селектин, VCAM-1 и ICAM-1) [448].

Отмечено токсическое влияние наноструктурированных частиц диоксида кремния на такие свойства МСК костного мозга крыс Wistar как адгезия к пластику, образование монослоя, пролиферация. Кроме этого, под влиянием диоксида кремния происходит увеличение количества апоптотических клеток, снижение электронной плотности цитоплазмы клеток за счет их набухания и дистрофических изменений органелл, и увеличение внутриклеточного содержания наноструктурированных частиц диоксида кремния [58; 59].

Терапевтические агенты, например, ресвератрол увеличивает миграционный потенциал МСК крови пуповины человека [399]. Кроме этого, показано, что предобработанные препаратом МСК снижают депозицию амилоидного белка В, гиперфосфорилирование Тау и окислительный стресс. Также МСК снижают воспаление в мозге, взаимодействуя с астроцитами и микроглией, и подавляют сигнальные пути, опосредуемые MAPK, ERK, p38 и JNK в гиппокампе мышей.

Десинхроноз существенно снижает количество МСК в костном мозге [5].

Показано, что культивирование МСК в остеогенной-кондиционной среде, содержащей комплекс биоактивных веществ, обеспечивающих дифференцировку МСК в остеогенном направлении, ведет к увеличению экспрессии факторов транскрипции *RUNX2* и *Osterix* [66].

#### **1.1.4 Сигнальные пути, вовлеченные в жизнедеятельность мезенхимных стволовых клеток**

Для обеспечения взаимосвязи МСК с клетками организма осуществляется взаимодействие, опосредуемое сигнальными путями (эндокринные, паракринные, аутокринные, нейромедиаторные) [137]. Пролиферация и миграция МСК чувствительна к изменениям внеклеточного матрикса, физическим и химическим факторам [407]. Стресс оболочки, жесткость матрицы, адгезивность поверхности, микро- и нано топография, определяют форму клеток и линейную дифференциацию МСК даже в отсутствие специфических сигналов.

Механотрансдукция (клеточные процессы, которые транслируют механические стимулы в биохимические сигналы, что позволяет клеткам адаптироваться к их физическому окружению) рассматривается как основной путь передачи сигналов от внеклеточного матрикса через цитоскелет к сигнальным путям и экспрессии генов. В механотрансдукцию вовлечены все компоненты цитоскелета (первичные реснички, очаги фокальной адгезии/спаек, актин, микротрубочки, промежуточные филаменты).

Дифференцировка МСК опосредуется сложной сетью сигнальных путей с вовлечением RhoA/ROCK, Akt/Erk, YAP/TAZ эффекторов Hippo, которые запускаются как химическими, так и механическими стимулами. На рисунке 1 представлены основные сигнальные пути, вовлеченные в регуляцию процессов самообновления, пролиферации и дифференцировки.

Существенная роль в регуляции пролиферации и дифференцировки МСК отводится TGF- $\beta$  (контролирует пролиферацию и дифференцировку клеток) [154; 303; 433]. Удаление *Tgfb2* из МСК, опосредованное через доксициклин-

репресслируемый трансген Sp7-Cre во время внутриутробного развития плода, способствует накоплению CXCL12-ретикулярных клеток и адипоцитов в костном мозге, снижению количества остеобластов [432]. Кроме этого, отмечен сдвиг лимфопоэза в сторону миелопоэза. Показана способность МСК костного мозга инициировать уменьшение длины теломер, снижение активности теломеразы и уровня экспрессии hTERT в клетках линии эритромиелолейкоза человека K-562, как регулятора активности теломераз при наличии в питательной среде IL-6, IL-8 и TGF- $\beta$  [287].

Также МСК снижали уровень экспрессии генов  $\beta$ -катенина и увеличивали экспрессию p53, что указывает на опосредованное влияние цитокинов и ростового фактора на K-562 через сигнальный путь Wnt-5 $\alpha$ / $\beta$ -catenin и P53. На модели повреждения спинного мозга у крыс показано, что МСК костного мозга существенно подавляют пролиферацию астроцитов спинного мозга, снижают уровень экспрессии TGF- $\beta$ 1 на ранних этапах течения патологического процесса, что указывает на возможность МСК подавлять TGF- $\beta$ /Smad сигнальные пути [311].

Существенное значение в функционировании МСК играет и Wnt, низкой плотности липопротеид (LRP) 5/6 – секретируемый гликопротеин, который связывается с серпентиновыми рецепторами. На стадии эмбриона данный сигнальный путь участвует в регуляции транскрипции, обеспечивает клеткам полярность и усиливает пролиферацию, дифференцировку, миграцию клеток. Сигнальный путь Wnt/ $\beta$ -катенина регулирует пролиферацию и предопределяет судьбу эмбриональных нервных стволовых клеток [488].

Так, на трансгенных мышах показано, что Sox11 (интронный ген кодирует члены семейства транскрипционных факторов группы SOX, SRY-related HMG-box, участвующих в регуляции эмбрионального развития и в определении судьбы клетки) индуцируется Wnt7b в МСК [489].

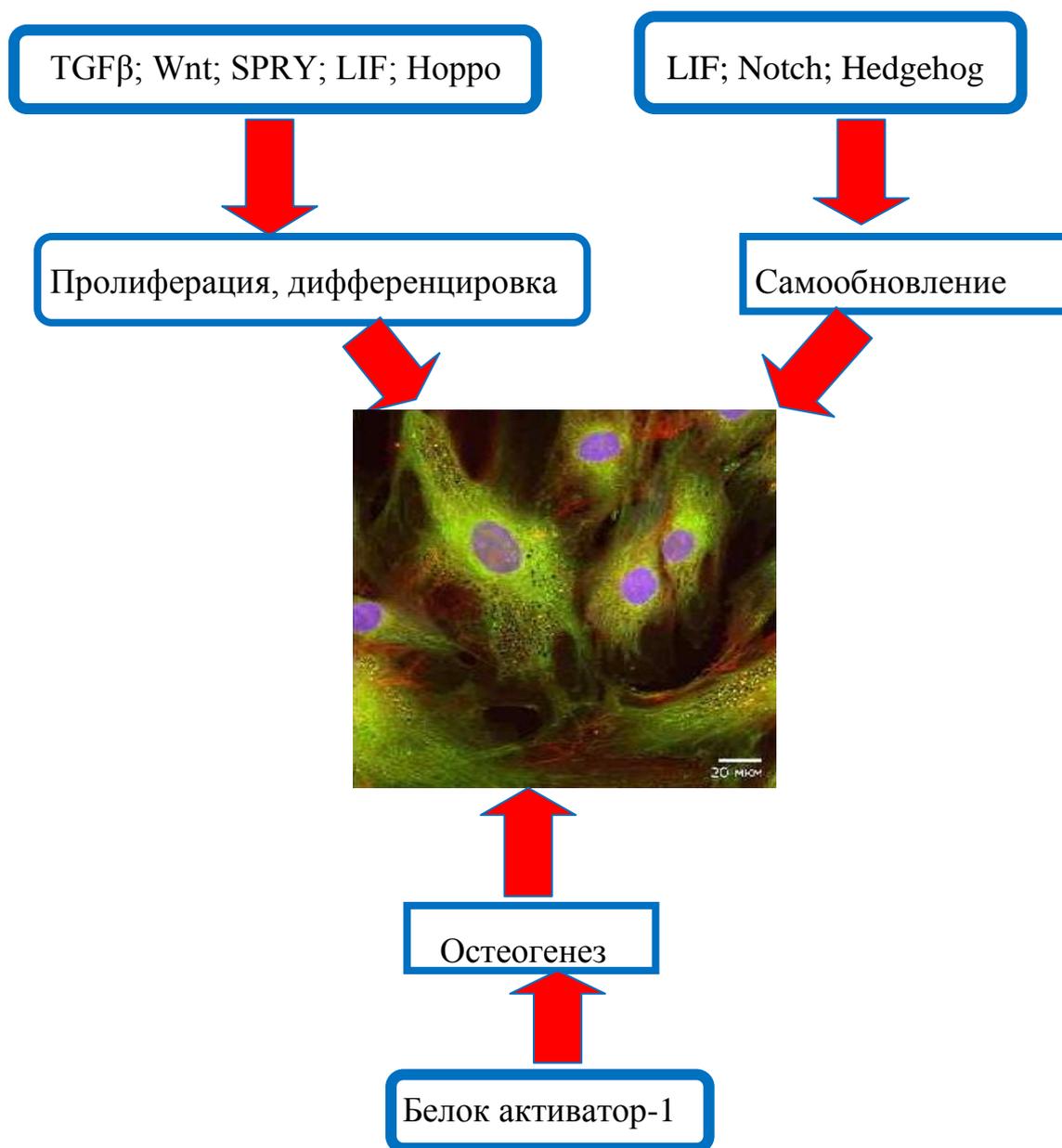


Рисунок 1 – Эффекты сигнальных путей на МСК

Показано, что *Wnt7b* в МСК костномозгового происхождения снижает остеопороз и увеличивает сращение переломов костей. При переломах костей установлено увеличение экспрессии *Wnt7b* в МСК, которые располагаются в пределах перелома костей. Более того, показано, что *Wnt7b*-индуцированный *Sox11* в МСК усиливает их самообновление и остеогенную дифференцировку. *Wnt7b* активирует  $Ca^{2+}$ -зависимый *Nfatc1* сигнальный путь, способный непосредственно индуцировать транскрипцию *Sox11*, который, в свою очередь,

активирует транскрипцию связанную с пролиферацией транскрипционных факторов в МСК костного мозга.

Белки проростков (SPRY) вовлечены в контроль пролиферации, дифференцировки и выживания клеток, опосредованно через подавление ERK [71]. Белок SPRY4 подавляет остеогенную дифференцировку, но стимулирует адипогенез МСК *in vitro*. Подавление активности SPRY4 в костном мозге C57BL/6 мышей *in vivo*, блокирует накопление жира и способствует дифференцировке остеобластов при удалении яичников. Белок SPRY4 ингибирует участок интеграции MMTV в Wnt/ERK сигнальном пути. Инактивация сигнала Wnt ведет к снижению подавления адипогенной дифференцировки и стимуляции остеогенной дифференцировки малой интерферирующей РНК *Spry4* (siRNA). В свою очередь,  $\beta$ -катенин ингибирует экспрессию *Spry4*. О важности сигнального пути *Wnt* для МСК свидетельствует работа Xuan Z. [et al.] [493], показавшая, что обработка МСК крови пуповины ингибитором/активатором Wnt (хлорид лития/кверцетин) в выборе направления дифференцировки клеток в соединительнотканном направлении. Так, LiCl усиливал пролиферацию, но не влиял на дифференцировку, а кверцетин снижал экспрессию маркеров стволовости, экспрессию генов-мишеней *Wnt* и способствовало остеогенезу.

Самообновление и стволовость МСК зависит от активности Notch сигнального пути. Показана высокая экспрессия *Jagged-1* МСК костного мозга мышей, а *Notch1* в предшественниках регуляторных дендритных клеток [334; 356]. siRNA-Notch1 подавляет пролиферацию и экспрессию *TGF- $\beta$ 1* и *c-Myc*, но увеличивает экспрессию *p53* в МСК костного мозга мышей. Также siRNA-Notch1 стимулирует остеогенную дифференцировку МСК [497].

Сигнальный путь LIF активирует JAK (JAK1, JAK2 и JAK3) в МСК [31; 60]. При активации LIF активируется STAT3, что затрагивает гены эмбриональных стволовых клеток (*Oct4*, *NANOG*, *c-myc*), деления и самообновления клеток без дифференцировки. Активация LIF/JAK/STAT сигнального пути также обеспечивает самообновление клеток, а при активации PI3K увеличивается выживание клеток. Увеличение экспрессии рецептора к LIF (LIFR) в процессе

адипогенеза МСК, а на модели LIFR-нокдаун выявлено угнетение адипогенной дифференцировки МС [174]. Кроме этого, в нокдаун-LIFR МСК человека снижается экспрессия PPAR $\gamma$ . Показано, что на ранних этапах остеогенной дифференцировки МСК снижается экспрессия LIFR [173]. При индукции сверхэкспрессии LIFR на МСК отмечено угнетение остеогенеза. В то же время LIFR siRNA активировала остеогенную дифференцировку МСК.

Сигнальный путь Hippo, состоящий из MST1/2 (макрофаг-стимулирующий белок 1, 2 или серин-треонин киназа 4, фосфорилирует гидроксильную группу (-OH) в остатках серина или треонина) и LATS1/2 (большая опухоль-супрессирующая киназа 1, 2), также влияет на пролиферацию и дифференцировку клеток. При активации Hippo сигнального пути инактивируется YAP (Yes 1 ассоциированный белок регуляции транскрипции), что запускает фосфорилирование серотонина в позиции 127. Наряду с TAZ, YAP относится к ко-активаторам транскрипции. В момент дефосфорилирования LATS1/2, происходит перенос YAP/TAZ в ядро клеток, где он связывается с транскрипционными факторами и индуцирует подавление пролиферации и апоптоза клеток, поддерживает стволовость. YAP способствует выбору остеогенной дифференцировки МСК [491].

Белок 1, модифицирующий активность рецепторов RAMP1, вовлечен в остеогенез. МСК костного мозга с сверхэкспрессией RAMP1, дифференцировались в остеогенном направлении [394]. Также показано, что RAMP1 увеличивает экспрессию маркеров, характерных для остеоцитов (ЩФ, RUNT2, остеопонтин). Обработка МСК вертепорфином вела к блокированию Yap1 и, как следствие, нарушению остеогенеза.

Сигнальный путь Hedgehog связан с функционированием полипептида Hedgehog Desert (Dhh), Indian (Ihh) и Sonic (Shh) важен для эмбриогенеза. Сигнальный путь инициируется связыванием этих лигандов с трансмембранным рецептором Patched (PTCH), что ведет к отмене его ингибирующего влияния на трансмембранный рецептор Smoothed (SMO), который, в свою очередь, активирует семейство транскрипционных факторов *GLI*, регулирующих

экспрессию генов, кодирующих белки пути НН. Этот путь эффективен в самообновлении и регенерации эмбриональных стволовых клеток и зрелых стволовых клеток. Показана роль Hedgehog сигнального пути в старении МСК [273]. Трансфицированные *Ihh*-siRNA МСК костного мозга человека проявили признаки стареющих клеток (повышенная активность  $\beta$ -галактозидазы, индукция ингибиторов клеточного цикла (*p53/p16*), развитие ассоциированного со старением секреторного фенотипа (SASP), активация активных форм кислорода и mTOR-путей, а также стимулирование асимметричной дифференцировки). Обработка клеток *Ihh* отменяла признаки старения. В работе Al Muraikhi N. [243] исследован эффект антагониста SMO/ингибитора Hedgehog, BMS-833923, на остеогенную дифференцировку скелетных (мезенхимных) стволовых клеток человека. Отмечено подавление остеогенной дифференцировки стволовых клеток (снижение уровней ЦФ, минерализации и экспрессии генов, связанных с остеогенезом). Культивирование МСК костного мозга с симвастатином, способствует повышению активности ЦФ, минерализации внеклеточного матрикса, экспрессии мРНК *ALP*, *COL1*, *OCN*, а также экспрессии и ядерной транслокации *Gli1* [260]. Обработка клеток циклопамином, ингибитором Hedgehog сигнального пути, снижала остеогенез, но при внесении в культуру симвастатина удавалось частично индуцировать остеогенную дифференцировку МСК. Анализ возможных связей *Gli1* по базе данных Gen Ontology and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, выявил наличие связи с MAPK, сигнальными путями гиппокампа, инсулином и глюкагоном, а также на основании анализа сети взаимодействий белок-белок, определены *Gli1*-взаимодействующие белки типа *Rpp2r1a*, *Rac1*, *Etf1* и *XPO1/CRM1*.

### **1.1.5 Цитокины и функциональные свойства мезенхимных стволовых клеток**

Функциональный потенциал МСК модулируется цитокинами. Так, инкубация МСК с провоспалительными цитокинами  $IL-1\alpha$ ,  $IL-1\beta$ ,  $TNF-\alpha$  и  $IFN-\gamma$

ведет к смене спектра продукции биологически активных молекул [284]. Показано, что МСК в присутствии IL-1 $\alpha$  и IL-1 $\beta$ , увеличивают продукцию G-CSF, которая блокируется внесением в культуру IL-1Ra. Под влиянием IL-1 $\beta$  усиливается хондрогенная дифференцировка МСК, снижается экспрессия молекул адгезии и плюрипотентности, возрастает экспрессия IL-6 и IL-8 [380]. Кроме этого, IL-1 $\beta$  опосредованно через p38/MAPK сигнальный путь усиливал адгезию между МСК и ЭПК через ICAM-1 [239; 285]. Выявлена способность мелатонина сохранять IL-1 $\beta$ -индуцированную хондрогенную дифференцировку МСК, опосредованно через усиление экспрессии мРНК и белка COL2A1, маркеров хондрогенеза (*ACAN*, *SOX9*, *COL10A1*), а также через изменение метаболизма клеток (MMP9, MMP13 и ADAMTS4), и снижение фосфорилирования p65, I $\kappa$ B $\alpha$ , что отражает способность мелатонина подавлять активацию NF- $\kappa$ B IL-1 $\beta$  [322].

В экспериментах с использованием МСК костного мозга крупного рогатого скота установлено, что IL-2 и FGF способствуют нарастанию клеточной биомассы *in vitro* [31].

Предобработка МСК жировой ткани IL-4, IL-6 в отдельности или вместе в течение 3 суток не влияет на экспрессию генов в клетках при последующем культивировании в условии нормоксии (20 % O<sub>2</sub>) или гипоксии (1 % O<sub>2</sub>) [259]. В то же время IL-4 снижает экспрессию генов *RUNX2*, *COL1*, активность ЦФ и уровней продукции VEGF как при нормоксии, так и при гипоксии, а также снижает минерализацию клеток при гипоксии. С другой стороны, IL-6 повышает минерализацию МСК в условиях нормоксии, а также увеличивает экспрессию генов *RUNX2* как при нормоксии, так и при гипоксии. Не выявлено влияния на фосфорилирование эффекторного белка P70S6K для mTORC1 IL-4 и IL-6. Сочетание IL-4 и IL-6 отменяет ингибирующее действие IL-4 на активность ЦФ и уровень продукции VEGF, но снижает уровень экспрессии генов *RUNX2*, *COL1*. Показано, что IL-4 подавляет остеогенную дифференцировку и стимулирующее влияние на ангиопоэз МСК из жировой ткани человека. Культивирование МСК костного мозга человека с комбинацией GM-CSF и IL-4 в течение 1 месяца

трансформирует их в опухолеподобные клетки, а при введении мышам способствуют большому росту очагов в легких [236].

МСК, выделенные из пульпы здорового зуба и из пульпы воспаленного зуба, имели сравнимый уровень экспрессии CD44, CD73, CD90 и CD105 [362]. В то же время МСК пульпы здорового зуба продуцировали меньший уровень IL-6, обладали сниженным остеогенным потенциалом и повышенным нейрогенным потенциалом по сравнению с МСК пульпы больного зуба. Добавление в питательную среду к МСК здорового зуба IL-6 способствовало возрастанию остеогенного потенциала и снижению нейрогенного потенциала, а нейтрализующие антитела к IL-6 подавляли остеогенный потенциал и увеличивали нейрогенный потенциал МСК больного зуба.

Показана роль IL-6 и IL-6R в репарации тканей, особенно в метаболизме костной ткани. Показано увеличение уровней IL-6 и IL-6R, особенно мембранной формы IL-6R, но не растворимой формы IL-6 R, при остеогенной дифференцировке МСК костного мозга [286]. Экзогенный IL-6 и растворимый IL-6R усиливают остеогенный потенциал МСК, а антитела к ним подавляют остеогенез.

В работе показано, что IL-8 усиливал пролиферацию и аутофагию МСК костного мозга человека по сравнению с МСК, культивированных в условиях гипоксии и при добавлении в питательную среду ингибитора Akt (MK2206), а также уменьшал количество апоптотических клеток [186]. Активация пролиферации и аутофагии, и снижение выраженности апоптоза, а также повышенный уровень экспрессии МСК Akt, STAT3 и VEGF, указывают на протективный эффект IL-8, опосредуемый через Akt/STAT3 сигнальный путь.

Хотя IL-8 проявляет про-опухолевый эффект МСК, но снижение его продукции МСК может увеличить их терапевтический потенциал при лечении опухолей [300]. На МСК плаценты, секретирующих IL-8 и экспрессирующих к нему мембранный рецептор CXCR2, но не CXCR1, с помощью лентивирус-опосредованного внедрения малой интерферирующей РНК, были получены клетки с устойчивым подавлением IL-8, данные клетки характеризуются

наличием возрастных изменений. На 9-е сутки в этих клетках выявлены морфологические изменения (крупные, уплощенные клетки), снижался пролиферативный потенциал, колониобразование, дифференцировка в адипогенном и остеогенном направлении, а также иммуносупрессорная активность. Высокая активность  $\beta$ -галактозидазы, ассоциированной с возрастными изменениями в клетках, а также изменение профиля экспрессии генов, указывают на то, что дефицит цитокина играет существенную роль в старении МСК. Высокий уровень p-Akt и снижение экспрессии *FOXO3a*, указывают на то, что в инициации и поддержании старения клеток существенная роль отводится активным формам кислорода. Парадоксально, но лиганды для CXCR2 были снижены в «предстарческих» IL-8-молчащих МСК, а в «старых» МСК отмечена активация данных лигандов, что указывает на антагонистическую плейотропию сигнального пути IL-8/CXCR2 в МСК плаценты.

Наряду с VEGF, IL-8 также участвует в процессе ангиогенеза в очаге повреждения органов и тканей [260]. Показано, что IL-8 стимулирует продукцию VEGF и фосфорилирование Akt, ERK, причем эти эффекты отменяются ингибиторами или siRNA-опосредованном глушении Akt и ERK в МСК костного мозга человека. Стимулированная IL-8 продукция МСК VEGF усиливает формирование сосудоподобных структур на матрикеле. Введение крысам с экспериментальным инсультом головного мозга, предобработанных IL-8 МСК человека, способствует уменьшению зоны инфаркта и увеличению ангиогенеза. Таким образом, IL-8 стимулирует продукцию VEGF МСК человека, опосредованно через PI3K/Akt и MAPK/ERK сигнальные пути. Показано, что на уровень продукции МСК VEGF влияет дифференцировка в остеогенном направлении [96].

Экспрессия *PDL1* в МСК увеличивается в ответ на стимуляцию IL-17, IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  [288].

Миграция МСК возрастает в ответ на стимуляцию IL-22, в сочетании с IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  [310]. Показана способность усиливать экспрессию транскрипционных

факторов адипогенеза и остеогенеза IL-22. Остеогенный потенциал МСК возрастает в ответ на IL-22, а IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  подавляют остеогенез.

МСК со сверхэкспрессией IL-37 (цитокин семейства IL-1) способны снижать врожденный и адаптивный иммунный ответ [324].

TGF-1, -2, -3 вовлечены практически во все аспекты функционирования МСК [151]. Семейство TGF- $\beta$  – это ключевой медиатор, напрямую коммитирующий выбор направления дифференцировки МСК [434]. Показано, что добавление в хондрогенную среду TGF- $\beta$ 1, IGF-I, BMP2 и BMP4 по эффекту на МСК синовиальной оболочки существенно не отличаются друг от друга, за исключением TGF- $\beta$ 1, который менее всего влиял на хондрогенез, но комбинация TGF- $\beta$ 1 и BMP4 усиливает хондрогенез в сравнении с другими комбинациями ростовых факторов [11].

Исследован эффект прекондиционирования МСК пуповинной крови человека с IL-10 и TGF- $\beta$ 1 на иммунорегуляторный потенциал везикул и показано, что везикулы экспрессировали CD9, CD44, CD63 и CD81 [312]. Везикулы от предобработанных TGF- $\beta$ 1 МСК усиливали апоптоз мононуклеаров периферической крови и увеличивали долю Treg, отмечено увеличение количества IL-6 и снижение количества TGF- $\beta$ 1 в везикулах.

TGF- $\beta$ 3 способствовал экспрессии на МСК крыс агрекана и коллагена 2 типа, а также увеличивал уровень мРНК *коллагена 2 типа, агрекана и коллагена X*, а также уровней белков HIF-1 $\alpha$ , коллагена I1 типа, но снижал уровень  $\beta$ -катенина. Следовательно, TGF- $\beta$ 3 усиливает хондрогенную дифференцировку МСК, опосредованно через подавление активности Wnt/ $\beta$ -катенин сигнального пути [133]. Показано, что сочетание TGF- $\beta$ 3 и IGF-1 запускает продукцию матрикса хряща и увеличивает экспрессию агрекана, коллагена 1 и 2 типа МСК из суставной жидкости [136].

Показано, что TGF- $\beta$ 1, GDF-5 (ростовой фактор дифференцировки 5), IGF-1, BMP2 влияли на хондрогенную дифференцировку пери-адипоцитов костного мозга собак [183]. В ответ на BMP-2 стимул в МСК усиливается продукция гликозаминогликана, снижается экспрессия мРНК *коллагена 10* типа. GDF-5

способствовал усилению продукции гликозаминогликана и коллагена 2 типа, и не стимулировал экспрессию мРНК *коллагена 10* типа, а IGF-1 существенно не влиял на хондрогенную дифференцировку клеток.

Под влиянием IFN- $\gamma$  МСК приобретают противовоспалительный потенциал [262; 444]. Введение в организм предобработанных IFN- $\gamma$  МСК снижает выраженность реакции трансплантат против хозяина у NOD-SCID мышей, но при подавлении активности *IDO* этот эффект не наблюдается [421]. Гены *IDO* экспрессируются в МСК через IFN- $\gamma$ /JAK/STAT1 сигнальный путь, а введение МСК сверх экспрессирующих *IDO* повышает выживаемость животных.

На костномозговых МСК мышей с фенотипом *iNOS*<sup>-/-</sup> и *Fas*<sup>-/-</sup> показано, что IFN- $\gamma$  и TNF $\alpha$  инициируют апоптоз, стимулируют *iNOS* и соответственно продукцию NO [184]. *iNOS* и NO увеличивали *Fas* в МСК и повышали *Fas* агонист-индуцированный апоптоз. Кроме этого, NO стимулирует через IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  подавление аутофагии, что способствует усилению стресса эндоплазматического ретикулума и апоптоза.

ММР вовлечены в выбор направления дифференцировки МСК [82]. Кроме этого, ММР влияют на пролиферацию, миграцию и ангиогенный потенциал МСК.

Концентрат ростовых факторов, выделенных из обогащенной тромбоцитами плазмы, усиливает пролиферацию МСК десны, остеогенную дифференцировку, опосредованно через регуляцию экспрессии *DMP1*, *DSPP*, *BMP2* и *RUNX2* [349].

Показано, что плазма, обогащенная тромбоцитами, усиливает жизнеспособность, пролиферацию, долю клеток в фазах клеточного цикла G<sub>1</sub>-S, миграцию МСК жировой ткани [54; 373; 374]. Отмечено усиление пролиферации МСК из жировой ткани даже в присутствии 1 % плазмы, обогащенной тромбоцитами, опосредованной через ERK1/2, Akt, JNK сигнальные пути [372]. Активирующий эффект плазмы, обогащенной тромбоцитами на пролиферацию, адипогенную и остеогенную дифференцировку и подавление апоптоза МСК менструальной крови, показан в работе [501]. Показана возможность использования лизата тромбоцитов как альтернативы другим компонентам питательных сред для экспансии МСК [255].

## **1.2 Терапевтический потенциал мезенхимных стволовых клеток**

### **1.2.1 Мезенхимные стволовые клетки в лечении сердечно-сосудистых заболеваний**

Сердечно-сосудистые заболевания, в частности инфаркт миокарда, являются одной из причин смертности во всем мире [118; 158; 182]. Утрата капиллярной сети и перфузии миокарда после инфаркта ведет к апоптозу эндотелиоцитов, что в свою очередь, способствует увеличению зоны ишемии и развитию желудочковой недостаточности. Кроме этого, инфаркт миокарда ведет к незаменимой утрате части кардиомиоцитов и формированию рубца, что является ключевым моментом в развитии сердечной недостаточности. Успехи современной фармакологии и хирургии в улучшении качества жизни больных после инфаркта миокарда не способствуют регенерации мышечной массы сердца и не могут обратить вспять ишемию миокарда, поэтому необходимость в разработке новых методов лечения, направленных на репарацию/регенерацию миокарда востребована.

МСК способствуют регенерации миокарда [14; 18; 65; 121; 124; 241; 245; 273; 293; 295; 342; 302; 480; 487]. Клеточные технологии, в том числе и МСК ориентированные, рассматриваются как потенциально новый метод регенерации поврежденных тканей и перспективная стратегия лечения сердечной недостаточности [427]. В экспериментальной модели инфаркта миокарда у мышей введение CD105-позитивных МСК из костного мозга или пуповины способствовало улучшению сократительной функции миокарда левого желудочка [125].

МСК скелетных мышц и жировой ткани способствовали увеличению фракции выброса левого желудочка (ФВЛЖ), уменьшению размера инфаркта миокарда [320]. МСК жира без эндотелиальных клеток или с эндотелиальными прогениторными клетками, увеличивают ФВЛЖ [245]. С другой стороны, при моделировании инфаркта миокарда у NOD/SCID мышей интрамиокардиальное

введение МСК человека увеличивало толщину стенки желудочка, но не влияло на ФВЛЖ [153].

Известно, что при инфаркте миокарда увеличивается нагрузка на предсердия, которые берут на себя некоторые функции желудочков, направленные на поддержание кровообращения. Результатом этой компенсаторной активности предсердий является ремоделирование сердечной деятельности и гипертрофия предсердий. При моделировании инфаркта миокарда у крыс, перевязкой левой нисходящей коронарной артерии, введение МСК или КС-МСК по периметру инфаркта интрамиокардиально приводило к уменьшению высоты зубца Р на ЭКГ, что свидетельствует о значительном снижении повреждения тканей передней и задней стенок сердца. Поскольку некротический миокард не участвует в возбуждении, следовательно, на ЭКГ, регистрируемой в отведениях с положительным электродом над зоной некроза, в первую очередь выявляется нарушение процесса деполяризации желудочков – изменения комплекса QRS, характер которых зависит от глубины и локализации повреждения миокарда. Внутримышечное введение МСК или КС-МСК, особенно МСК, способствовало уменьшению дефицита кардиомиоцитов в передней и задней стенках сердца, о чем свидетельствует комплекс QRS в стандартных отведениях ЭКГ по сравнению с контрольной группой крыс. Известно, что основными признаками ишемии миокарда у человека, по данным ЭКГ, являются изменения полярности, амплитуды и формы Т-волны, а также положения сегмента RS-T, которые зависят от локализации зоны ишемии миокарда относительно полюсов регистрируемого отведения. Интрамиокардиальное введение КС-МСК приводило к значительному увеличению Т-волны в стандартных отведениях ЭКГ. Так, повреждение тканей передней стенки сердца после перевязки левой коронарной артерии усиливалось в ранние сроки после введения КС-МСК, тогда как в задней стенке сердца это явление происходило в конечные сроки наблюдения. В комплексе на основании регистрации электрической активности миокарда показано, что интрамиокардиальное введение МСК и КС-МСК при остром инфаркте миокарда улучшает

сократительную способность предсердий и желудочков, проведение электрического импульса из синоаурикулярного узла в зону ишемии миокарда [65].

По данным позитронно-эмиссионной томографии показано, что МСК, меченные  $^{18}\text{F}$ -Fluoro-deoxyglucose ( $^{18}\text{F}$ -FDG) выявлялись на большей площади ишемизированного миокарда [374]. Показано, что МСК, меченные  $^{18}\text{F}$ -FDG заселяют большую площадь ИМ, способствуют увеличению ФВЛЖ, формировали новые сосуды и дифференцировались в миоциты [165; 273]. Отслежена миграция МСК в зону инфаркта миокарда [408]. Показано улучшение сократительной способности миокарда. На модели инфаркта миокарда у мини-свиней МСК жировой ткани снижали апоптоз миокарда, повышали репаративные процессы, обусловленные увеличением экспрессии генов *VEGF*, *GM-CSF*, *SDF-1 $\alpha$* , и увеличением количества макрофагов М2 типа [293]. В работе авторов показан эффект заселенного МСК кремнийсодержащего гидрогеля при инфаркте миокарда (уменьшение размера инфаркта, увеличение толщины рубца) [328].

При изопротеренол-индуцированном инфаркте миокарда у крыс введение МСК пупочного канатика в виде суспензии или сфероидов способствовало снижению повреждения миокарда, образованию рубцов и нормализации функциональных показателей сердца [14].

Терапевтический эффект трансплантации МСК опосредуется через регенерацию миокарда, ангиогенез, апоптоз миокарда и подавление ремоделирования сердца.

### **1.2.2 Мезенхимные стволовые клетки в лечении критической ишемии конечностей**

Критическая ишемия нижних конечностей (КИНК) часто является причиной инвалидизации и смертности. В силу низкой эффективности традиционного лечения перспективным направлением в лечении больных с

КИНК становится клеточная терапия, в частности трансплантация МСК [56; 88; 101; 305; 308; 340; 350; 405].

Терапия стволовыми клетками при ишемии задних конечностей мышей улучшает перфузию крови, стимулирует ангиогенез и артериогенез [23; 28; 48; 68; 80; 141; 151; 308; 366; 368; 404; 419; 492], уменьшает частоту аутоампутаций и снижает мышечную атрофию и фиброз, а после инъекции меченые МСК выявлялись между мышечными волокнами, но не встраивались в зрелые коллатерали [406]. КС-МСК, обработанных TNF- $\alpha$ , снижают частоту потери конечностей, усиливают перфузию и ангиогенез, как следствие усиления миграции эндотелиальных прогениторных клеток в зону повреждения в ответ на паракринный стимул (IL-6 и IL-8) [409].

Авторы показали отсутствие влияния лечения больных КИНК клетками костного мозга, с учетом дозы и способа введения клеток, на частоту ампутаций [101]. В то же время при введении МСК не выявлено ампутаций. Количество заживления язвенных дефектов не зависело от способа введения клеток, но количество заживления язвенных дефектов кожи, лодыжечно-плечевой индекс, транскутанное напряжение кислорода выше при введении МСК.

Введение внутримышечно аутологичных мононуклеаров костного мозга в ишемизированную конечность мышей ускорило процесс ангиогенеза [68].

Показано, что после инъекции МСК при легировании вен нижних конечностей у крысы попадают в регионарные лимфатические узлы и вызывают в них формирование участков гиперплазии и гипертрофии [28], а также встраиваются во вновь формирующиеся сосуды [46].

Ангиогенезу ишемизированных скелетных мышц способствует трансплантация клеточных пластов МСК жировой ткани [17].

В работе авторов исследована длительность терапевтического влияния МСК костного мозга при КИНК и диабетической стопе, которая колебалась в пределах 3–6 месяцев [313].

### **1.2.3 Мезенхимные стволовые клетки в лечении дегенеративного процесса в позвоночнике**

Боль в пояснице является одной из основных причин обращения за медицинской помощью людей в возрасте до 45 лет. Причиной болей в пояснице является дегенерация межпозвонкового диска и другие патологические процессы, такие как спондилез, сколиоз, спондилолистез, опухоли, инфекции и посттравматические переломы [4]. Межпозвоночный диск лежит между соседними позвонками позвоночного столба и состоит из трех основных компонентов: пульпозного ядра, фиброзного кольца и смыкающихся хрящевых пластинок. Пульпозное ядро обычно состоит из звездчатых хондроцитов, окруженных внеклеточным матриксом, который в основном, состоит из коллагена 2 типа и протеогликанов, и благодаря обилию гидрофильных структур сопротивляется физической нагрузке. При дегенерации межпозвонкового диска было показано, что в пульпозном ядре снижается синтез и содержание коллагена I типа и протеогликанов. В связи с этим предпринимаются различные попытки стимулировать регенерацию в межпозвонковом диске факторами роста и клеточной терапией.

МСК костного мозга используются в регенеративной медицине для лечения дегенеративных заболеваний, в том числе и при патологии опорно-двигательной системы [26; 40; 44; 187; 233; 266; 327; 401; 495; 499].

Введение МСК из синовиальной оболочки при дегенерации межпозвонкового диска у кроликов способствует более высокой экспрессии коллагена I типа вокруг клеток пульпозного ядра, синтезу оставшимися клетками пульпозного ядра коллагена 2 типа и ингибированию экспрессии деструктивных ферментов и воспалительных цитокинов, что приводит к сохранности структуры межпозвонкового диска. Внутривенное введение аллогенных МСК крысам с дегенерацией межпозвонкового диска уменьшает выраженность дегенеративного процесса, при этом не происходит существенных изменений в составе внеклеточного матрикса. Показано, что МСК способствуют локальному

снижению уровня GLUT-1 (выявляемого в ответ на гипоксию) и выпячиванию грыжи, увеличению доли Pax5+ В-лимфоцитов и неизменности доли CD68+ макрофагов в грыже [426]. Кроме того, исследование *in vitro* показало, что совместное культивирование клеток пульпозного ядра с МСК приводит к наибольшему увеличению продукции внеклеточного матрикса [111].

В работе показано, что МСК инкорпорированные в носитель на основе трикальция фосфата у больных с дегенерацией межпозвонкового диска, улучшали клиническую картину заболевания [102].

#### **1.2.4 Мезенхимальные стволовые клетки в лечении других патологий и состояний**

##### ***В дерматологии***

Длительно незаживающие язвенные дефекты стопы (диабетическая стопа) являются одним из основных осложнений сахарного диабета [500]. В 25 % случаев тяжесть диабетической стопы нарастает и является причиной ампутаций [364]. Заживление раневого дефекта кожи – сложный процесс, включающий воспалительную реакцию, ангиогенез и формирование внеклеточного матрикса, и ремоделирование рубцовой ткани. Клеточные элементы, вовлеченные в данный процесс, а также многочисленные факторы роста и цитокины, высвобождаемые клетками в месте раны, регулируют эти процессы и приводят к закрытию раны. Нерегулируемые процессы заживления могут задержать восстановление и привести к формированию длительно незаживающих ран, таким как те, которые наблюдаются при сахарном диабете [157; 357]. Введение МСК представляются альтернативным способом лечения длительно незаживающих язвенных дефектов кожи различного генеза, так как данные клетки являются источником получения клеток соединительной ткани, уменьшения апоптоза, обновления клеточного состава и модуляции воспалительной реакции и иммунного ответа в зоне дефекта кожи [252; 417].

Показано, что МСК мобилизуются и привлекаются (хоминг) в ишемизированные ткани, где опосредованно через продукцию ростовых факторов и цитокинов способствуют ангиогенезу и ремоделированию внеклеточного матрикса, что ускоряет процесс заживления ран [111; 153; 481; 482].

Глубокие и обширные ожоги кожи требуют длительного и дорогостоящего лечения. Помимо специфических осложнений, связанных с самими ранами, могут наблюдаться нарушения иммунной системы и других органов и систем, ухудшающих состояние больных и иногда ведущих к смертельному исходу. МСК представляются как альтернативным способом лечения ожогов, направленным на ускорение процессов регенерации кожных покровов [74; 129; 155; 224; 229; 289; 454; 484]. Показано, что лечение МСК увеличивает долю выживших крыс, а также долю крыс с реэпителизацией ожогов [491]. МСК плаценты усиливают эпителизацию ран, через регулирование выраженности воспалительной реакции опосредованно контролируя уровень продукции про- и противовоспалительных цитокинов [268].

МСК введенные внутрикожно, мигрируют в более глубокие слои кожи и дифференцируются в адипоциты [294], а введенные внутривенно МСК мигрируют в зону ожоговой раны [275]. Остеопонтин стимулирует миграцию МСК *in vitro*, и рекрутирование эндогенных МСК в зону ожога и дифференциацию их в кератиноциты, и эндотелиальные клетки [268]. Внутривенное введение экзосом МСК жировой ткани способствовало уменьшению рубцов, увеличению соотношения коллагена 3 типа к коллагену 1 типа [226]. Также экзосомы МСК поглощаются и интернализируются фибробластами, что ускоряет их миграцию, пролиферацию и синтез коллагена, увеличивая экспрессию генов *N-кадгерина*, *циклина-1*, *PCNA* и *коллагена 1* и *3* типа [495].

Сравнительное исследование эффективности суспензии МСК или в виде клеточных пластов при шинированном дефекте кожи и мягких тканей у крысы показало, что использование МСК в виде пластов ускоряет заживление дефекта [25].

Инъекции МСК и КС-МСК или фибробластов с плазмой, обогащенной тромбоцитами или без нее, способствуют быстрому заживлению ожогов как у интактных, так и при стрептозотоцин-индуцированном сахарном диабете [35; 45; 115].

Диабетический пузырь редкое проявление сахарного диабета, которое можно облегчить инъекциями МСК [166].

Со-культивирование МСК человека с кератиноцитами привело к увеличению CXCL12 (SDF1) и ENA78 (CXCL5) в КС, что является ответом клеток на сигналы, полученные от кератиноцитов. Введением МСК в область граничащую с краями раны кожи улучшает заживление, так же, как и КС [150].

### ***В гинекологии***

Децидуальные стромальные клетки/децидуальные мезенхимные стволовые клетки участвуют в поддержании и развитии беременности, обеспечивая индукцию иммунологической толерантности матери и плода [256]. Хроническое воспаление органов малого таза является наиболее частой причиной репродуктивных нарушений у женщин, к которым относится бесплодие [351].

На экспериментальной модели дисфункции яичников индуцированной химиотерапией у крыс показано, что введение МСК увеличивает количество созревающих фолликулов и лютеиновых телец с яйцеклетками внутри [232]. Введение МСК человека мышам с индуцированной химиотерапией недостаточности яичников способствовала по данным мазков из влагалища, изменению уровней эстрогенов, репопуляции растущих фолликулов [250].

Показано, что МСК или КС-МСК значительно усиливают репарацию дефектов матки, скорость имплантации эмбрионов, снижают экспрессию маркеров фиброза,  $\alpha$ -SMA и TGF- $\beta$ , повышают экспрессию стромального маркера эндометрия *виментина* и эпителиального маркера *цитокератина-19*, повышают экспрессию сосудистых маркеров CD31, VEGF-A и MMP9, а также понижают экспрессию IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 [163]. На модели преждевременной недостаточности яичников у крыс выявлено, что МСК пуповины человека

восстанавливают нарушенную секрецию гормонов и фолликулогенез, а также снижают апоптоз клеток яичника [257]. Показано, что терапия стволовыми клетками является эффективной и безопасной в маточной нише [147] и, что повышение уровня CXCL12 увеличивает приживание стволовых клеток в поврежденных участках матки.

Преэклампсия является мультисистемным расстройством течения беременности и является причиной материнской и перинатальной заболеваемости и смертности [359]. На экспериментальной модели преэклампсии у крыс введение МСК пуповинной крови человека способствует снижению артериального давления, увеличению массы плода [486]. Показан терапевтический потенциал МСК пуповины человека при экспериментальной модели преэклампсии, индуцированной липополисахаридом [486]. Введение МСК способствовало снижению артериального давления, увеличению массы плодов. Кроме этого, уровень TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 и ICAM-1 снижался, а уровень IL-10 повышался. Также экспрессия мРНК *TNF- $\alpha$* , *IL-6*, *MMP2*, *MMP9* и *ICAM-1* уменьшались, а экспрессия мРНК *IL-10*, *PPAR $\gamma$*  и *LRI* возрастала.

На модели хронического воспаления генитальной сферы у крыс показано, что введение МСК или КС-МСК способствует увеличению циркуляции гемолимфы и лимфатического дренажа, уменьшению воспаления [7; 24; 42]. Хроническое воспаление сопровождалось увеличением диаметра вен, капилляров и лимфатических сосудов. МСК уменьшают количество вен, диаметр вен, кровеносных капилляров и лимфатических сосудов, увеличивают количество капилляров, лимфатических капилляров, микролимфатических и тканевых лимфатических узлов. МСК, вводимые под слизистую оболочку влагалища, обладают способностью уменьшать количество вен, диаметры всех исследуемых сосудов и обладают способностью увеличивать количество капилляров, лимфатических капилляров, микролимфатических и тканевых лимфатических узлов. Внутривенное введение КС-МСК увеличивало количество капилляров, микролимфатического и тканевого лимфатического узла, тогда как уменьшались диаметры всех исследуемых сосудов. КС-МСК, вводимые под слизистую

оболочку влагалища, увеличивают количество всех исследуемых сосудов, микролимфатических и тканевых лимфатических узлов, тогда как не оказывают существенного влияния на диаметр сосуда. Таким образом, МСК и продукты секреции МСК способствуют усилению циркуляции гемолимфы и лимфодренажа, уменьшению воспаления у крыс с индуцированной введением золотистого стафилококка генитальной инфекцией. При внутриутробной инфекции отмечены преждевременные роды и перинатальная травма головного мозга [354]. Введение МСК до индукции внутриутробной инфекции способствует уменьшению частоты преждевременных родов на 21 %, как результат повышения уровня IL-10 в сыворотке крови, IL-4 в тканях плаценты и снижением уровня IL-6 в тканях мозга плодов, снижения активации микроглии.

Исследован эффект МСК из Вартонова студня при экспериментальной модели аборта, индуцированного введением бромкриптина, вызывающего дегенеративные изменения в децидуальных клетках [457]. Отмечено, что МСК из Вартонова студня предотвращают развитие дегенеративных изменений в клетках децидуальной оболочки, способствуют нормализации уровня IL-10, IFN- $\gamma$  и IL-17 в децидуальных тканях, плаценты и сыворотке крови (увеличение уровня IL-10 и снижение уровня IFN- $\gamma$  и IL-17).

Введение МСК из крови пуповины крыс, с индуцированным внутриматочным введением спирта воспалительным процессом в матке, способствовало имплантации эмбрионов, снижению фиброзированию [456].

### ***При воспалительных процессах в кишечнике***

Воспалительные заболевания слизистой оболочки кишечника (ВЗСК) включают в себя комплекс патологических процессов, протекающих в кишечнике (неспецифический язвенный колит, болезнь Крон) [367]. ВЗСК чаще встречаются среди населения экономически развитых стран, в частности среди жителей Северной Европы, с частотой 1:200. Несмотря на прогресс, достигнутый в лечении традиционными методами, данная патология остается актуальной проблемой, так как лечение имеет выраженные побочные эффекты и не всегда

эффективно. Для изучения эффективности медикаментозной терапии обычно используют химически индуцированную модель воспалительного заболевания кишечника у грызунов [367]. Преимуществом данной модели является легкость инициирования воспалительного процесса, воспроизводимость, длительность воспалительного процесса и управляемость воспалительной реакцией. Колит, индуцированный декстран сульфатом натриевой солью (DSS) является экспериментальной моделью для изучения воспалительных заболеваний кишечника.

ВЗСК – хронические рецидивирующие заболевания, при которых провоспалительные иммунные клетки и цитокины индуцируют повреждение кишечной ткани и ведут к инвалидизации [479; 483]. МСК с их регенеративными, дифференцировочными и иммуномодулирующими способностями могут влиять на репарацию поврежденных тканей при ВЗСК [300; 400; 423; 450; 473].

Эффективность терапии стволовыми клетками была показана при остром радиоактивном энтерите у крыс на структуре слизистой оболочки кишечника, наблюдалось больше количество регенерированных клеток и более выраженная пролиферативная активность [99]. На собаках было показано, что МСК индуцируют регенерацию кишечного эпителия и регулируют секрецию сывороточных цитокинов и экспрессию радиопротекторных белков и, таким образом, могут быть полезны в разработке новых и эффективных средств защиты от острого лучевого энтерита [100]. Локальное введение МСК жировой ткани в перианальные свищи способствовало заживлению [312; 479].

В экспериментальной модели ВЗСК, индуцированной DSS, терапия стволовыми клетками, защищала от развития тяжелого колита, уменьшала потерю веса и диарею, восстанавливала проницаемость слизистой оболочки и предотвращала снижение уровня глутатиона и активности супероксиддисмутазы, что свидетельствует об антиоксидантном свойстве МСК [94; 117; 367; 473]. МСК или КС-МСК при DSS-индуцированном колите увеличивали уровень TGF- $\beta$ 1, Treg, IL-10 и снижали уровень IL-17 [423; 443]. Показано, что КС-МСК околоплодных вод человека снижали тяжесть колита у мышей, повышали уровень

белка TGF- $\beta$ 1, в то время как уровень белка TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10 и MMP2 снижался [460]. Кроме того, при DSS-индуцированном колите МСК подавляют воспалительный фенотип дендритных клеток [296]. Активация сигнального пути TGF- $\beta$  может лежать в основе терапевтического действия МСК при DSS-индуцированном колите [483].

При колите, индуцированном тринитробензолсульфоновой кислотой, показано, что МСК в дозе  $10^6$  уменьшали количество иммунного инфильтрата и повреждение нервов в стенке толстой кишки [448]. Введение МСК, полученных из амниона человека, или КС-МСК значительно уменьшало инфильтрацию нейтрофилов и моноцитов/макрофагов, и снижало уровень экспрессии *TNF- $\alpha$* , *CXCL1* и *CCL2* при тринитробензолсульфокилотном колите [455]. Преимуществом данной модели является легкость инициирования воспалительного процесса, воспроизводимость, длительность воспалительного процесса и управляемость воспалительной реакцией. Колит, индуцированный декстран сульфатом натриевой солью является экспериментальной моделью для изучения воспалительных заболеваний кишечника [249]. Для лечения колитов можно вводить МСК через лимфатические узлы [114; 184].

При колите, индуцированном индометацином, МСК способны встраиваться в участки повреждения кишечника, пролиферировать и трансдифференцироваться в кишечные стволовые клетки, которые восстанавливают поврежденные кишечные ткани [466].

На мышях с DSS-индуцированным воспалением кишечника, однократное внутривенное введение МСК или КС-МСК, от мышей с флуоресцирующим зеленым белком, способствовало восстановлению длины ворсинок, увеличивало количество клеток Панета, пролиферирующих клеток и числа митозов, уменьшению воспалительной инфильтрации, а также их встраиванию в толщу кишки [57].

### *При других патологиях*

Способность МСК к самообновлению, иммуномодулированию и дифференцировки в различные типы тканей, продукции биологически активных молекул, а также простота выделения и наращивания клеточной биомассы в достаточном количестве, способствовала их внедрению в клиническую терапию различных воспалительно-дегенеративных процессов [1; 10; 50; 53; 110; 179; 231; 269; 327; 331; 410; 416; 498]. Однако эффективность клеточной терапии зависит от неблагоприятных факторов микроокружения, в которые попадают МСК, влияющих на приживание введенных клеток, поэтому разрабатываются стратегии надления МСК новыми возможностями, используя генетическую модификацию или прекондиционирование клеток с различными факторами с целью увеличения выживаемости клеток [183]. В настоящее время клеточные технологии используют для восстановления функционирования органов и тканей, ускорения заживления раневых дефектов.

Так, МСК нашли свое применение в лечении опорно-двигательного аппарата [1; 77; 79; 345]. В работе исследован эффект и миграция МСК при повреждении головки бедренной кости [123]. Через 72 часа МСК выявлялись в различных органах животных, включая головной мозг, легкие, сердце, почки, кишечник, тазобедренные суставы. Через 6 недель МСК были выявлены в легких, печени, костном мозге и в головках бедренных костей (здоровой и поврежденной), при этом больше всего клеток выявлено в костном мозге [123]. МСК жировой ткани способствуют регенерации мышц, сухожилий, костей и хрящей. Анализ статей, опубликованных по лечению остеоартроза коленного сустава МСК, показал, что эта технология безопасна, дает обнадеживающие результаты восстановления и регенерации суставного хряща [164]. Показано, что МСК, подвергшиеся остеогенной дифференцировке и встроенные в составе аутологичных фибриновых сгустков, при лечении атрофического псевдоартроза способствуют нормализации функций конечностей [476].

Не только сами МСК, но и продукты их секреции используются в лечении опорно-двигательного аппарата. Экзосомы МСК костного мозга сферической

формы и диаметром 122 нм, экспрессировавшие CD9, CD63 и CD81, ускорили сращение переломов костей у крыс. В основе терапевтического потенциала экзосом МСК лежит индукция проостеогенеза через BMP2/Smad1/RUNX2 сигнальный путь [225]. Введение МСК пуповины (с фенотипом CD29+, CD4+, CD73+, CD90+, HLA-ABC+, CD34-, CD45- и HLA-DR-) совместно с гидрогелем гиалуроновой кислоты улучшали заживление дефектов хряща коленного сустава в эксперименте на мини-свиньях [490].

МСК нашли свое применение в офтальмологии [33; 133; 223; 414; 441]. Показан терапевтический потенциал МСК и КС-МСК в заживлении повреждений роговицы в экспериментальной модели на фибробластах глаз лошади [413]. Сочетание субконъюнктивальной инъекции МСК и полисахаридного геля (из орхидеи) ускорило заживление химического ожога роговицы у крыс [375]. Отмечено усиление терапевтического потенциала МСК в присутствии полисахарида, обусловленного увеличением экспрессии *TGF- $\beta$* , *TSP-1* и уменьшением экспрессии *TNF- $\alpha$* , *MIP-1 $\alpha$* , *MCP-1*, *VEGF* и *MMP2*. В то же время авторы отметили ингибирующее влияние КС-МСК крыс на фибробласты роговицы человека [458]. Показан терапевтический потенциал МСК при лечении пигментной ретинопатии, который связан со снижением влияния оксидативного стресса и апоптоза в сетчатке глаза [309].

У мышей с лазер-индуцированным поражением сетчатки глаз МСК костного мозга способствовали уменьшению размера дефекта сетчатки и апоптоза клеток, при этом МСК не мигрировали в зону поражения после их внутривенной инъекции мышам [453].

Ишемия и реперфузия донорских органов вызывает повреждения в них вследствие кислородного голодания в период ишемии и окислительного стресса в период поступления крови в них [358]. Разрабатываются технологии снижения повреждения донорских органов в момент их транспортировки и подготовки кживлению (консервационные растворы, приборы для перфузии, ингибиторы МАРК), а также использование МСК.

МСК используют для терапии повреждений нервной ткани [420; 459]. Так, метаанализ публикаций по лечению неонатальной гипоксической ишемической энцефалопатии МСК показал, что улучшается сенсомоторная и когнитивная функции на модели гипоксии у животных. Показано возможность использования МСК в лечении больных с рассеянным склерозом [402]. В экспериментальной модели повреждения седалищного нерва МСК улучшали функцию стопы [420].

Нестин-позитивные МСК усиливают рост клеток астроглии из нервных прогениторных клеток эмбрионов. Так, прирост GFAP-позитивных клеток ассоциирован с уменьшением количества Tuj1- и O4-позитивных клеток. Существенная роль в этом влиянии нестин-позитивных МСК связана с экспрессией мРНК *LIF*, *CNTF*, *BMP2* и *BMP4* [253].

У крыс с преходящей окклюзией срединной церебральной артерии введение МСК уже через 24 часа и вплоть до 14 дня улучшали функции нервной системы, даже без существенного влияния на размер зоны инфаркта головного мозга. В то же время отмечено снижение гибели нервной ткани в группах получивших МСК костного мозга или жировой ткани в сравнении с контролем [167].

Показано, что после резекции 2/3 печени у крыс внутривенное введение МСК в нижнюю полую вену способствовало увеличению количества пролиферирующих гепатоцитов [12]. Золотым стандартом лечения при конечной стадии заболеваний печени является аллотрансплантация, но МСК рассматриваются как альтернативный способ лечения. Так, показана эффективность использования МСК для лечения конечных стадий патологии печени в нескольких клинических исследованиях [343]. МСК рассматривают как альтернативный способ лечения фиброза печени [107]. Кондиционирование МСК с факторами, ассоциированными с фиброзом печени, такими как TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  и TGF- $\beta$ 1, приводило к увеличению аутофагии опосредованно через регуляцию Beclin1. В то же время подавление активности Beclin1 в МСК увеличивает их антифибротический эффект. Показано, что МСК или экзосомы из МСК способствует снижению тяжести поражения печени четыреххлористым углеродом (CCl<sub>4</sub>) подавляя уровень мРНК *простагландин-эндопероксид синтазы*

2 и *липоксигеназы*, восстанавливая уровень белка SLC7A11 в гепатоцитах, что свидетельствует об ингибировании ферроптоза гепатоцитов [338].

В эксперименте на крысах введение МСК со сверхэкспрессией CXCR4 улучшало приживление трансплантата почки [388].

Показано, что инсулин-продуцирующие МСК после их введения животным с сахарным диабетом приживаются и снижают уровень глюкозы [234].

Клеточная терапия применяется для лечения различных заболеваний. Костный мозг, жировая ткань, пуповинная кровь, менструальная кровь могут быть источником взрослых стволовых клеток с терапевтическим потенциалом. Применение стволовых клеток и кондиционированных сред стволовых клеток является перспективной альтернативной терапией, обладающей высоким потенциалом регенеративной медицины для лечения широкого спектра заболеваний и поражений, а также может обеспечить безопасную стратегию лечения в подходах регенеративной медицины.

МСК следует с осторожностью использовать у иммунокомпроментированных лиц, так как накапливаются данные о том, что МСК являются «нишей/резервуаром» для патогенов [371].

## **1.3 Мезенхимные стволовые клетки и эритропоэтин**

### **1.3.1 Краткая характеристика эритропоэтина**

ЭПО (молекулярная масса 35 кДа) представляет собой гликопротеин из 135 остатков аминокислот, содержащий большое количество сиаловой кислоты, которая защищает молекулу от деградации и удлиняет период ее циркуляции в крови. Гипоксия в постнатальном периоде является основным сигналом для продукции клетками почек эритропоэтина. ЭПО взаимодействует с рецепторами для него не только на клетках эритроидного ростка кроветворения, но и на негемопоэтических клетках организма человека и животных, включая клетки сердца, мозга, поджелудочной железы и почек. К продукции ЭПО способны не

только клетки почек, но и других органов, полагают, что таким образом в ответ на повреждение запускается механизм самообновления в органах и тканях. Основные клетки-мишени ЭПО – это предшественники эритроцитов [470]. ЭПО связывается с высоко-аффинным рецептором к эритропоэтину (ЭПОР), относящимся к 1 классу суперсемейства рецепторов цитокинов (IL-2, IL-3, IL-6, G-CSF и тромбопоэтин). ЭПОР – трансмембранный протеин, после связывания с ЭПО запускает димеризацию, далее фосфорилирование тирозина и активацию JAK2-тирозинкиназы. ЭПОР имеются на предшественниках эритроцитов, а также на кардиомиоцитах, миоцитах, нервных и эндотелиальных клетках [22; 67; 301; 337; 365; 381; 449]. Синтез ЭПО в основном осуществляется в юкстамедуллярном аппарате почек, но экспрессия иРНК *ЭПО* показана в селезенке, печени, легких, яичках, яичнике и мозге. Гипоксия, сниженное парциальное насыщение кислородом усиливают синтез ЭПО, опосредованно через связь HIF-1 с участком гена *ЭПО*. Показано, что при связывании ЭПО с ЭПОР может быть задействовано три специфических внутриклеточных сигнальных пути: фосфатидилинозитол-3-киназа B, Ras-митоген-активируемая протеинкиназа и некоторые члены семейства сигнальных преобразователей и активаторов транскрипции (STAT) [221]. Эффективность лечения ЭПО может быть снижена при высоком содержании в крови гомоцистеина, как результат N-гомоцистеинилирования белков за счет взаимодействия высоко реактивного гомоцистеина тиолактона (HTL) и остатков лизина [346].

ЭПО и ЭПОР выявлены не только на клетках эритрона, но и на других соматических клетках, включая эндотелиальные клетки, а также на опухолевых клетках [63]. Показано, что клетки плоскоклеточного рака легких и клетки аденокарциномы легких человека содержат мРНК *ЭПО*, *ЭПОР*, растворимые ЭПОР, HIF-1 $\alpha$  и FHN-1 (фактор, ингибирующей HIF-1 $\alpha$ ), но уровень их содержания был различным. Частота выявления ЭПО составила 50 %, ЭПОР – в 96 % и ко-экспрессии ЭПО/ЭПОР – в 50 % случаев.

Показано, что в период эмбрионального развития у мышей предшественники кардиомиоцитов экспрессируют ЭПОР, а по мере взросления

плода уровень экспрессии снижается [217]. В сердце человека также выявлены клетки, экспрессирующие ЭПОР.

Изучена роль TNF- $\alpha$  в «неэффективном» эритропоэзе при талассемии [430]. Показано, что TNF- $\alpha$  индуцировал снижение уровня белка ЭПОР и ЭПО-индуцированной пролиферации клеток эритрона.

Показано, что ЭПО усиливает и подавляет адипогенез МСК через снижение активности PPAR $\gamma$ . Сочетание ЭПО и IGF1 усиливает остеогенез МСК крыс [505].

### **1.3.2 Цитопротективный эффект эритропоэтина**

Цитопротекторные свойства ЭПО опосредуются через ЭПОР/CD131 сигнальный путь, что послужило основой для поиска фармацевтических агентов из пептидов короткой последовательности, например ARA290 (специфический агонист ЭПОР/CD131)) [344]. ЭПО и ARA290 усиливают экспрессию CD131 в ответ на стресс, что ведет к антиапоптотическому и противовоспалительному эффекту. Кроме этого, ARA290 преодолевает индуцированное TNF- $\alpha$  ингибирование активации транскрипционного фактора, связанного с реакцией клеток на стресс, SRF (сывороточный фактор ответа), HSF1 (белок теплового шока 1) и AP1 (активирующий белок 1).

На рисунке 2 представлены канонический и неканонический пути влияния ЭПО на клетки.



Рисунок 2 – Канонический (ЭПО/ЭПОР) и неканонический (ЭПОР/CD131) путь реализации эффектов ЭПО на клетки

ЭПО способен предотвращать апоптоз кардиомиоцитов [204; 220; 310]. В эксперименте на крысах с дилатационной кардиомиопатией введение МСК, несущих ЭПО, снижало тяжесть заболевания, через подавление активности p-NF-κB и p-P38, что увеличивало провоспалительный фон, и активацию p-Akt сигнального пути, способствуя снижению апоптоза миокардиоцитов.

При нейротоксичности головного мозга, индуцированной кислородом, ЭПО противодействует регуляции связанных с генами аутофагии белков Atg-3, -5, -12, Beclin-1, связанного с микротрубочками белка 1 легкой цепи 3 (LC3) LC3A-II и LC3B-II, которые являются ключевыми белками активности аутофагии [101]. В клетках микроглии и астроцитах головного мозга ЭПО защищает астроциты от окислительного стресса (перекись водорода) и усиливает продукцию NO, подавляет образование активных форм кислорода и супероксидных ионов [363].

Показано, что асиало-рЭПО (дериват ЭПО, лишенный гемопоэтической активности), через подавление проапоптотической протеинкиназы Mst1 и FOXO3 снижал апоптоз и аутофагию в клеточной линии кардиомиоцитов мышцы HL-1 [395]. Это подтверждалось снижением фрагментации/конденсирования ядер, изменением соотношения *Bax/Bcl2*, p-Bad/Bad, цитозоль/митохондриальной цитозоль C и активности каспазы-3, а также восстановлением уровней маркеров аутофагии Beclin1, p62 и LC3B-II.

Установлено, что ЭПО снижал воспалительную реакцию в нервах, после ожога, через снижение активности микроглии, экспрессии *iNOS* и *COX-2* в вентральном роге спинного мозга крыс [196]. Также ЭПО менял экспрессию *pAKT*, *mTOR* и апоптотических индикаторов, таких как *BAX*, *BCL-2* и *расщепленная каспаза-3*. Кроме того, ЭПО снижал активность индуцированной ожогом аутофагии, характеризующейся экспрессией маркеров аутофагии LC3B и ATG5, в вентральном роге спинного мозга.

Антиапоптотическое действие ЭПО на нейрональные клетки коры головного мозга выявлено в ответ на кислородное и глюкозное голодание через изменение экспрессии расщепленной каспазы-3 и соотношения *Bcl-2/Bax* [214].

Показано, что ЭПО подавляет Fas- и нейтрофил-опосредованный апоптоз клеток A549 (клетки альвеолярного эпителия человека) и NHBE (нормальные клетки бронхиального эпителия человека) [194].

Эффективность лечения и антиапоптотическое действие ЭПО зависит от уровня гомоцистеина в организме, способного N-гомоцистеинилировать белки как следствие взаимодействия между высокореактивным тиолактоном гомоцистеина и остатками лизина, что ведет к снижению антиапоптотического действия ЭПО [342].

### 1.3.3 Эффекты эритропоэтина на мезенхимные стволовые клетки

Предобработка мобилизованных G-CSF мононуклеаров костного мозга эритропоэтином в течение 6 часов, способствовала увеличению экспрессии васкулогенных факторов (*IL-8*, *IL-10*, *bFGF*, *PDGF*, *MMP9*) и молекул адгезии (*интегрин  $\alpha V$* ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 8$ ) через активацию JAK2 и Akt сигнальных путей [211]. КС от клеток, прекоиндированных с ЭПО, содержали IL-8, IL-10, TNF-а и PDGF, которые усиливали способность эндотелиальных клеток к миграции и образованию трубок. Наряду с этим, ЭПО повышал способность адгезировать к эндотелиальным клеткам и к фибронектину.

ЭПО способствует выживанию, пролиферации и дифференцировке эритроидных клеток-предшественников. ЭПО также может стимулировать пролиферацию и ангиогенез эндотелиальных клеток, экспрессирующих рецепторы к ЭПО [200; 468]. Показано, что ЭПО индуцирует образование ЭПОР на эндотелиальных клетках (HUVES – эндотелиальные клетки вен пуповины человека, HUAES – эндотелиальные клетки артерий человека и TrNBMEC – клетки микрососудистой сети костного мозга человека) при низком парциальном напряжении кислорода (2 %). Кроме этого, ЭПО увеличивал экспрессию *eNOS* и дозозависимо увеличивал продукцию NO клетками. Установлено, что ЭПО активирует циклическую гуанозинмонофосфатазу. Предобработка ЭПК ЭПО усиливает эндотелизацию спиральной эмболизации аневризмы шеи в экспериментальной модели на крысах [220]. Отмечено также, что ЭПО повышал жизнеспособность и миграцию клеток.

ЭПОР классически включает две субъединицы, но может также ассоциироваться с  $\beta$ -общей цепью (CD131) [381]. Сочетание введения эндотелиальных прогениторных клеток с ЭПО способствовало их приживлению в миокарде у мышей с инфаркта миокарда [329]. Обработка ЭПК ЭПО увеличивала экспрессию ЭПОР и CD131, пролиферацию, миграцию и формирование сосудисто-подобных структур. Обработка клеток H9C2 поверхностным пептидом

эритропоэтина спирали В увеличивала экспрессию *miR-21* и снижала аутофагию и апоптоз при проведении процедуры гипоксии/реоксигенации [203].

Показано наличие на МСК человека ЭПОР и способность ЭПО стимулировать ангиогенез, усиливать хемотаксис, миграцию и активацию MMP2. В работе исследован эффект различных концентраций ЭПО (1, 10, 100 и 1000 МЕ/мл) на миграцию МСК [349]. Максимальный эффект на миграцию оказывала доза в 100 МЕ/мл ЭПО. Выявлено, что ЭПО снижал апоптоз МСК человека при окислительном стрессе [272]. ЭПО способен программировать в МСК про-ангиогенный потенциал [191].

ЭПО стимулирует остеогенез МСК из пародонтальной связки человека и пародонта, повышает пролиферацию, усиливает фосфорилирование p38 (МАРК сигнальный путь) [201; 208; 440]. ЭПО стимулирует остеогенез и подавляет адипогенез МСК опосредованно через ингибирование PPAR $\gamma$ , а IGF-1 через TAZ активирует остеогенез [505]. При совместном использовании ЭПО и IGF-1 усиливается остеогенез МСК, отменяется при активации PPAR $\gamma$ .

Показано, что ЭПО подавляет адипогенную дифференцировку МСК *in vitro*, снижая экспрессию мРНК PPAR $\gamma$ , ССААТ-энхансера связывающего белка  $\alpha$ , жирно кислотного связывающего белка 4 и адипонектина в процессе адипогенеза и повышает фосфорилирование белка ERK, p38 МАРК и PPAR $\gamma$  во время дифференцировки МСК в адипоциты [279].

Изучена возможность ЭПО способствовать трансдифференцировке МСК в кератиноциты на модели ожога у крыс [73]. Предобработанные ЭПО МСК увеличивали экспрессию *виментина* в ране и уровень IL-10 при одновременном снижении IL-1 и COX2. Отмечено усиление ангиогенеза и эпителизации ран при лечении МСК, обработанных ЭПО, и очень редко трансдифференцировка МСК в кератиноциты.

МСК являются основными продуцентами HGF [207]. Исследован эффект ЭПО на экспрессию генов *HGF* и уровень белка в МСК. Показано, что ЭПО в дозе 4 МЕ/мл увеличивал уровень экспрессии гена *HGF* через 24 и 48 часов, что приводило к повышению уровня HGF в КС-МСК через 48 часов.

Показана способность ЭПО усиливать секрецию VEGF МСК в микроокружении с повышенным содержанием глюкозы, снижать повреждающее влияние глюкозы на МСК, способствовать пролиферации и миграции, ингибировать индуцированную высоким уровнем глюкозы продукцию TNF- $\alpha$  *in vitro*, а *in vivo* усиливать ангиогенез в области язв диабетической стопы у мышей [193].

При гипергликемии снижается пролиферативный потенциал МСК, но ЭПО способствует пролиферации, снижению старения и высвобождения провоспалительных факторов, увеличивает продукцию проангиогенных цитокинов и повышает способность МСК формировать сосудисто-подобные структуры, опосредованно через Akt/FoxO3a сигнальный путь [189].

Исследован эффект ЭПО на механическое растяжение МСК с использованием блока деформации Flexcell [321]. Показано увеличение пролиферации и остеогенной дифференцировки, увеличение уровней ЩФ, минерализации внеклеточного матрикса и экспрессии генов остеогенеза, которые устранялись в присутствии ингибитора ERK1/2 сигнального пути.

МСК пуповины человека, стимулированные ЭПО и PDGF-BB, высвобождали больше экзосом, проявлявших повышенный пролиферативный эффект на эндотелиальные клетки вен пуповины человека, а также усиливали ангиогенез [112].

#### **1.3.4 Терапевтический потенциал эритропоэтина и мезенхимных стволовых клеток**

Смертность, инвалидизация после инсульта головного мозга, низкая эффективность медикаментозной терапии послужили основой поиска альтернативных методов лечения, включая использование ЭПО [205; 352]. Проспективный анализ лечения больных традиционным способом и с использованием ЭПО, не выявил существенных различий по смертности, но

продемонстрировал улучшение неврологических показателей на фоне лечения ЭПО.

ЭПО проявляет антиапоптотическое и протективное действие на различные типы тканей при ишемии, вовлечен в ангиогенез, нейрогенез и иммунный ответ [96; 415].

ЭПО способствует снижению тяжести клинической картины, как результат повышения экспрессии гемоксигеназы-1 в тканях головного мозга и селезенке при аутоиммунном энцефаломиелите [199]. Кроме этого, показано снижение экспрессии мРНК *IFN-γ*, *IL-23*, *IL-6* и *IL-17* и повышение экспрессии мРНК *IL-4* и *IL-10* в головном мозге. ЭПО снижает апоптоз нейрональных клеток головного мозга в условиях индукции гипоксии и дефицита глюкозы, что подтверждается подавлением экспрессии белка расщепленной каспазы-3, изменением соотношения *Bcl-2/Bax*. При этом ЭПО не влияет на уровень экспрессии белка *Akt* и *Erk1/2*, но увеличивает фосфорилирование *Akt* и снижает фосфорилирование *Erk1/2* [214]. На экспериментальной модели травмы спинного мозга введение ЭПО способствует восстановлению двигательной активности, снижению уровня апоптоза и гибели двигательных нейронов, увеличению аутофагии и активности ERK [206]. В экспериментальной модели гипоксического/ишемического повреждения головного мозга у новорожденных крыс введение ЭПО снижало экспрессию *Fas/FasL*, что указывает на подавление апоптоза клеток головного мозга [168].

ЭПО снижает экспрессию мРНК провоспалительных цитокинов/хемокинов и повышает экспрессию мРНК противовоспалительных цитокинов, а также ЭПОР и β-цепи цитокинов в HUVEC культивированных в условиях гипергликемии [218].

Гипоксия/реоксигенация играет важную роль в патогенезе некротического энтероколита. Обработка животных ЭПО, до индукции гипоксии/реоксигенации в тонкой кишке, способствует снижению выраженности некротических процессов и апоптоза [442].

Исследован эффект терапии КИНК ЭПО на ишемию сердца (удаленный ишемизированный орган) в эксперименте. Показано, что сочетание ЭПО с ЭПК при КИНК эффективно восстанавливает кровоток в ишемизированной нижней конечности и сохраняет функцию сердца [162].

Эффективность клеточной терапии инфаркта миокарда зависит от типа используемых стволовых клеток (не все клетки могут дифференцироваться в кардиомиоциты), а также выживаемости трансплантата. Отмечен терапевтический потенциал прекондиционированных гипоксией МСК при инфаркте миокарда за счет: а) формирования фенотипа клеток, устойчивых к гипоксии (усиление экспрессии HIF-1 $\alpha$ , активация ERK1/2-киназы, Akt-киназы, усиление экспрессии ЭПОР и продукции ЭПО, повышение уровня Vcl-2 и Vcl-xL); б) повышенной продукции факторов роста (VEGF, HGF), экспрессии VEGFR2 и HGF-рецептора; в) усиления формирования рецепторов CXCR4 и CXCR7, которые обеспечивают хоминг стволовых клеток в зоне ишемии [15].

Терапевтический потенциал дарбепоедина альфа исследован при инфаркте миокарда [300]. Показано, что ЭПО предотвращал дилатацию левого желудочка сердца и улучшал сердечную функцию, что было связано с увеличением роста капилляров. Показан терапевтический эффект МСК в сочетании с VEGF, и ЭПО (по отдельности или вместе) [360]. Жизнеспособность МСК в миокарде зависит от образования межклеточного контакта, который нарушается активными формами кислорода в ишемизированном миокарде, а ЭПО проявляет защитные свойства. Проведено сравнительное исследование терапевтической эффективности различных способов введения ЭПО (эпикардiallyно, внутрибрюшинно и интрамиокардiallyно) на крысах, показавшее эффективность инъекций ЭПО перикардiallyно [302]. Введение ЭПО перикардiallyно увеличивает уровень SDF1, CXCR4, CD34, Vcl-2, циклин D1, Cdc2 и MMP2, индуцирует TGF- $\beta$ /Wnt-сигнальный путь в внутримыокардiallyных МСК-нишах за счет прямой активации АКТ и повышения регуляции сигналов FOS и Fzd7, а также усиливает внутрисердечную пролиферацию МСК через 24 часа после инфаркта миокарда.

На экспериментальной модели КИНК у крыс установлено, что МСК-трансфицированные ЭПО способствовали большему образованию сосудов [307]. Агонист ЭПОР/CD131 (ARA290) усиливал пролиферацию, миграцию и резистентность к апоптозу эндотелиальных прогениторных клеток *in vitro*, а *in vivo* на модели КИНК ангиогенез [95]. На экспериментальной модели ишемии нижних конечностей у крыс введение МСК костного мозга, предобработанных ЭПО, повышало выживаемость в месте введения, перфузию и рост капилляров [382].

Эффективность ЭПО при ишемическом инсульте показана в работе [205]. Так, лечение ЭПО способствовало уменьшению выраженности неврологического дефицита (индекс Бартеля меньше 35), отдаленного неблагоприятного неврологического исхода (MANE; смерть, рецидивирующий инсульт). В эксперименте на модели транзиторной окклюзии мозговой артерии у крыс показано, что предобработка ЭПО эндотелиальных прогениторных клеток способствовала их миграции и приживлению в головном мозге [216]. Апоптоз клеток Шванна при сахарном диабете способствует развитию диабетической нейропатии [502]. Со-культивирование клеток Шванна с МСК и МСК со сверх-экспрессией ЭПО, при нормальных и повышенных уровнях глюкозы способствовало восстановлению клеток Шванна через подавление апоптоза.

На модели повреждения спинного мозга у крыс показано, что лечение МСК с ЭПО дает лучший терапевтический эффект по сравнению с лечением только МСК [202]. ЭПО может способствовать рекрутированию МСК в очаг повреждения спинного мозга, повышать экспрессию *BDNF* (ростовой нейротрофический фактор) и *VEGF* и ускорять восстановление неврологической функции. Оси *SDF-1 $\alpha$ /CXCR4* отводится важная роль в рекрутировании МСК костного мозга в патологический очаг [202]. На экспериментальной модели повреждения спинного мозга лечение МСК+ЭПО улучшало опорно-двигательные функции крысы с повреждением спинного мозга, отмечено также снижение уровней экспрессии *TNF- $\alpha$*  и увеличение уровней экспрессии *SDF-1 $\alpha$*  в поврежденном спинном мозге. ЭПО повышал экспрессию *CXCR4* на МСК, что

способствовало миграции МСК. На модели травмы спинного мозга у крысы показано, что ЭПО увеличивал количество  $\beta$  тубулин-позитивных новых нейронов и О4-позитивных олигодендроцитов [215].

В экспериментальной модели острого повреждения почек у крыс, введение ЭПО существенно не влияло на клинико-лабораторные показатели функционирования почек, но увеличивало содержание CD133+ и CD34+ эндотелиальных прогениторных клеток, как в периферической крови, так и в почечных сосудах [196]. Показан эффект ЭПО на функциональные свойства МСК костного мозга при остром повреждении почек. Так, ЭПО увеличивал долю клеток округлой и овальной формы с внешним видом булыжной мостовой, увеличивалось количество «грубого» эндоплазматического ретикулама, лизосом и митохондрий, отмечено увеличение продукции цитокинов. Исследован эффект микроокружения при остром повреждении почек на миграцию МСК при терапии ЭПО [195]. В такой ситуации ЭПО усиливает хемотаксический эффект микроокружения, вызванного повреждением почек, на МСК. Также отмечено повышение уровней SDF-1 $\alpha$  в микроокружении и активация PI3K/АКТ и MAPK в клетках, которые могли стимулировать миграцию МСК. Введение предобработанных ЭПО МСК, способствует снижению отторжения трансплантата почек через индукцию иммуносупрессии [379]. К ограничениям эффективности лечения МСК можно отнести факт отсутствия специфического самонаведения клеток при внутривенном способе введения и раннюю гибель, обусловленную неблагоприятным микроокружением. Показано, что преинкубация МСК с ЭПО (10, 100, 500 и 1000 МЕ/мл) в течение 24 и 48 часов по-разному влияет на пролиферацию, морфологию цитоскелета, миграцию и экспрессию CXCR4. ЭПО в дозе 500 МЕ/мл при 48-часовой предобработке МСК увеличивал пролиферацию, перестройку цитоскелета, миграцию в сторону поврежденных клеток линии НК2 *in vitro*. Предобработанные эритропоэтином МСК, улучшают функцию почек, снижают интерстициальную инфильтрацию лимфоцитами, набухание канальцев, некроз и интерстициальный фиброз *in vivo* при циклоспорин-индуцированной нефротоксичности. При радиационном

повреждении почек у крыс лечение сочетанием МСК с ЭПО снижает нефротоксичность [435].

Введение МСК предобработанных ЭПО через 24 часа после острого повреждения почек ишемией/реперфузией снижает в сыворотке крови уровень IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$ , но повышает уровень IL-10. В основе терапевтического эффекта лежит способность ЭПО повышать экспрессию *SIRT1* и *Bcl-2*, но снижать – *p53* [116].

На экспериментальной модели острого повреждения легких у мышей, инициированного интратрахеальной инстилляцией липополисахарида, показано, что введение эндотелиальных прогениторных клеток в сочетании с ЭПО существенно снижало тяжесть повреждения легких [287]. МСК, модифицированные геном ЭПО, при бронхолегочной дисплазии способствовали снижению апоптоза эпителия дыхательных путей, снижали уровень провоспалительных цитокинов и соотношение экспрессии белка Р-38/Р38 МАРК на ранних сроках после оперативного вмешательства [462]. На модели бронхолегочной дисплазии у новорожденных мышей, индуцированной гипероксией, введение МСК и ЭПО по отдельности или вместе снижало вызванное гипероксией повреждение легких (уменьшение фиброза, увеличение количества альвеол, подавление эпителиально-мезенхимального перехода), причем сочетание МСК и ЭПО более выражено снижало уровень TGF- $\beta$ 1 [332]. В модели сепсиса, индуцированного введением липополисахарида, показано, что сочетание введения МСК с ЭПО существенно снижало лейкоцитарную инфильтрацию легких и зон тубулярной атрофии почек, способствовало гиперплазии белой пульпы селезенки и коркового вещества тимуса [67]. МСК Вартонова студня использовали для доставки гена ЭПО в клетки сетчатки глаза *in vitro* [276].

МСК с встроенным лентивирусом геном ЭПО проявляют большую жизнеспособность и миграцию, а введение таких клеток при CCl<sub>4</sub>-индуцированном повреждении печени угнетают фиброз в печени [209].

Показано, что SDF-1 $\alpha$  и ЭПО рекрутируют МСК в очаг перелома костей [352]. ЭПО и BMP2 стимулируют остеогенную дифференцировку МСК *in vitro*. Созданные ЭПО-высвобождающие каркасы *in vivo* у мышей ускорили сращение костных дефектов. ЭПО мобилизует МСК в область костного дефекта [193]. Выявлен цитопротекторный эффект МСК *in vitro* на клеточной линии PC12 при индукции апоптоза CoCl<sub>2</sub>, обусловленный продукцией ЭПО [72]. Установлено снижение экспрессии *Bcl-2*, *Bcl-X(L)* и повышение экспрессии *Bax*, *Bak*, *каспазы-9* и *каспазы-3*.

### **Заключение**

МСК, в зависимости от необходимости, получают из самых разных органов и тканей человека и животных, нужное количество клеток получают, размножая выделенные клетки *in vitro*. Эти клетки способны к дифференциации в клеточные элементы соединительной ткани, секретируют широкий спектр биологически активных молекул, что позволяет использовать МСК для лечения, как у животных, так и у человека. Терапевтический потенциал МСК подтвержден в ряде экспериментальных моделей заболевания у животных и поисковых клинических исследованиях у человека. Однако эффективность и длительность терапевтического потенциала МСК зависит от возраста, состояния здоровья донора клеток, а также от способности противостоять к неблагоприятным факторам микроокружения. Для повышения устойчивости МСК к неблагоприятным факторам микроокружения используют культивирование в гипоксических условиях или в присутствии биологически активных молекул, в том числе, и ЭПО. Имеющиеся сведения о влиянии ЭПО на МСК, в основном, затрагивают вопросы влияния на дифференцировочный потенциал клеток и устойчивость к окислительному стрессу, но практически нет исследований влияния ЭПО на рецепторный репертуар и функциональные свойства МСК (клеточный цикл, секреторный потенциал). Показана эффективность МСК, трансфицированных ЭПО, комбинации МСК с ЭПО при некоторых патологических процессах, но такие исследования малочисленны, а полученные

результаты противоречивы. В этом аспекте большой интерес представляет изучение влияния ЭПО на функциональные свойства МСК и их терапевтический потенциал.

## ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Реактивы и препараты

В работе были использованы: фиколл/верографин (Панэко, Россия); забуференный физиологический раствор (ЗФР, БиолоТ, Россия); питательные среды: RPMI-1640, DMEM (БиолоТ, Россия); L-глутамин (Merck, США); FCS (Featal Calf Serum - эмбриональная телячья сыворотка; HyClone, США); гентамицин (Дальхимфарм, Россия); HEPES-буфер (БиолоТ, Россия); 0,2 % раствор трипанового синего в ЗФР (Biochem, Франция); 0,25 % раствор трипсина/0,02 % раствор этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) (Биолот, Россия); гепарин (Гедеон Рихтер, Венгрия); РНКаза (Самсон-Мед, Россия); бычий сывороточный альбумин (БСА; Биолот, Россия); азид натрия, акридиновый оранжевый, этидиум бромид, перекись водорода (Merck, США); 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2 Н-тетразолиум бромида (МТТ; Merck, США); эритропоэтин (Рекормон; ЛаРош, Швейцария); D-глюкоза (Acros Organics, Бельгия); формалин 10 % забуференный нейтральный (Merck, США); 10 % ЭДТА (AppliChem, Германия); 1 % раствор OsO<sub>4</sub> (Merck, США); Эпон (Serva, Германия); ацетат уранил, цитрат свинца (Merck, США); раствор для фиксации клеток (FACS Lyse, BD, США); коммерческий набор Annexin V-FITC/PI Apoptosis Detection Kit (BD, США); Твин 20 (Merck, США); толуидиновый синий (Merck, США); кетамина, ксилазин (Merck, США); фенобарбитал (АО Татхимфармпрепараты, Россия); дексаметазона натрия фосфата (Дальхимфарм, Россия); изобутилметилксантина, β-глицерофосфата, аскорбат-2-фосфата, TGF-β (Merck, США); масляный красный О (Serva, Германия); 1 % раствор азотнокислого серебра и 5 % раствор тиосульфата натрия (Merck, США); гематоксилин-эозин (БиолоТ, Россия); метиленовый синий (Merck, США).

Для изучения иммунофенотипа клеток использовали моноклональные антитела, меченные флуорохромами (FITC, PE, APC) – CD18, CD34, CD45, CD44,

CD49a, CD54, CD90, CD131, CD146 (BD, США); CD73 (BioLegend, США); CD105 (eBioscience, США) и ЭПОР (R&D Systems®, США).

Для иммуногистохимии МСК крыс использовали первичные кроличьи против крысы моноклональные антитела CD90, Collagen I, Fibronectin и von Willebrand factor (vW) (Abcam, США); Vimentin и  $\alpha$ -SMA (R&D Systems®, США); вторичные антитела козы против кролика или мыши IgG H&L, меченные FITC или Cy3, ядра докрашивали DAPI (BD, США).

Для иммуноцитохимии МСК человека использовали моноклональные антитела мыши к LC3B, конъюгированные с AlexaFluor@488 (Abcam, США) DAPI (BD, США).

Секретом МСК крыс оценивали с использованием ИФА наборов для определения уровня IL-1 beta Rat ELISA Kit, IL-2 Rat ELISA Kit, IL-4 Rat ELISA Kit, IL-6 Rat ELISA Kit, IL-10 Rat ELISA Kit, Rat TNF- $\alpha$  ELISA Kit и TGF beta-1 Rat ELISA Kit (Invitrogen, США); IL-8 (ABclonal, США); GM-CSF (Abcam, США); IFN $\gamma$  (R&D Systems®, США).

Секретом МСК человека оценивали с использованием ИФА наборов: Интерлейкин-2-ИФА-БЕСТ, Интерлейкин-4-ИФА-БЕСТ, Интерлейкин-6-ИФА-БЕСТ, Интерлейкин-8-ИФА-БЕСТ, Интерлейкин-10-ИФА-БЕСТ, альфа-ФНО-ИФА-БЕСТ, гамма-Интерферон-ИФА-БЕСТ, ЭРИТРОПОЭТИН-ИФА-БЕСТ и VEGF-ИФА-БЕСТ (Вектор, Россия); Human MMP-9 Platinum ELISA и Human ICAM-1 Platinum ELISA (eBioscience, Австрия); Human CXCL12/SDF-1 $\alpha$ , Human PDGF-AB и Human FGF basic, Human IGF-1 Quantikine® ELISA и Human Free BDNF Quantikine® ELISA (R&D Systems®, США); GM-CSF Human ELISA Kit и Human TIMP-1 ELISA Kit (Invitrogen, США); Human SDF-1 (CXCL 12A) ELISA Kit (Thermo Scientific, США), Human Vimentin Simple Step ELISA® Kit, Human Fibronectin Simple Step ELISA® Kit и Total Collagen Assay Kit (Perchlorate-Free) (Abcam, США); IL-1 beta Rat ELISA Kit, IL-4 Rat ELISA Kit, IL-6 Rat ELISA Kit, IL-10 Rat ELISA Kit, Rat EPO ELISA Kit и Rat TNF- $\alpha$  ELISA Kit (Invitrogen, США); IL-8 (ABclonal, США).

Уровень продукции стойких метаболитов оксида азота (NO)-нитритов (NO<sub>2</sub>) клетками, в сыворотке крови и экстракте мышц голени определяли с использованием реактива Грисса – смесь равных объемов 0,1 % раствора N-(1-нафтил) этилендиамина гидрохлорида и 1 % раствора p-амино-бензен-сульфамида на основе уксусной кислоты (ICN, США).

## **2.2 Объект исследования**

Работа выполнена на 130 половозрелых крысах-самцах породы Wistar (возраст 12–14 недель, масса 250–300 г), полученных из вивария Федерального исследовательского центра Института цитологии и генетики СО РАН. Животных содержали по 5 голов на клетку, при комнатной температуре ( $22,0 \pm 0,5$ ) °C, влажности воздуха 65–70 %, 12-часовом цикле день/ночь, свободном доступе к корму и питьевой воде. Содержание животных, эксперименты с животными выполнены с соблюдением принципов гуманности, в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных и принципов Хельсинской декларации, протокола Этического комитета Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Института цитологии и генетики СО РАН. Моделирование ишемии в задней левой лапе, дегенеративного процесса в межпозвонковом диске хвостового отдела, проведение лазерной доплеровской флоуметрии в области стопы, проведение МРТ исследования позвоночника хвостового отдела, выведение из эксперимента и забор бедренных костей у крыс проводили с соблюдением правил асептики и антисептики под анестезией.

В работе использован биологический материал (аспират костного мозга) больных ИБС, который забирали на базе ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр» имени академика Е. Н. Мешалкина Министерства здравоохранения Российской Федерации. Исследование проведено в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice) и принципами Хельсинской декларации 2013 г. До включения в исследование от

всех участников получено письменное информированное согласие. В исследование включено 50 образцов костного мозга от больных с ИБС, находившихся на лечении в клинике с января 2016 г. по май 2018 г. включительно.

В работе проведено комплексное сравнительное исследование молекулярно-биологических, иммунофенотипических и функциональных характеристики МСК человека и животных (рисунок 3).



Рисунок 3 – Дизайн исследования

Кроме этого исследованы морфофункциональные свойства МСК на позднем пассаже (8-й пассаж) и МСК, полученных культивированием клеток 4-го пассажа в присутствии ЭПО (МСК–ЭПО).

Дизайн оценки морфофункциональных свойств МСК человека и крыс представлен на рисунке 4.

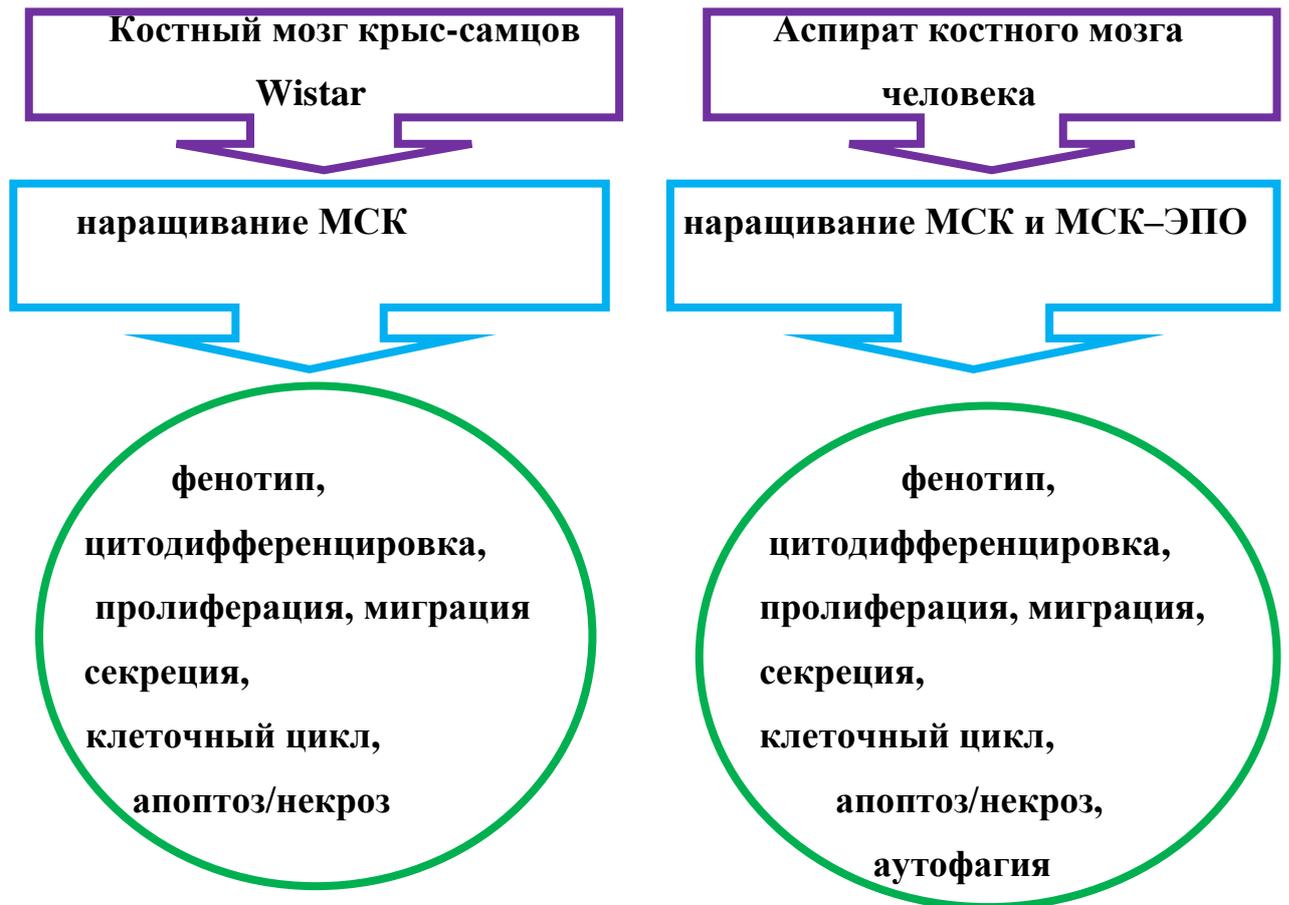


Рисунок 4 – Дизайн оценки морфофункциональных свойств мезенхимных стволовых клеток костного мозга человека и крыс

Ишемию конечностей моделировали на 48 крысах-самцах Wistar случайным образом разделенных на 4 группы по 12 голов в каждой, дополнительно 5 крыс служили в качестве контроля (см. приложение А). Выведение животных из эксперимента, исследование параметров микроциркуляции, забор биологического материала проводили через 1, 7, 14, 21 и 28 суток от момента индукции ишемии (Рис. 5).

**Контрольная группа (интактные животные)** составила 5 животных, которым не модулировали ишемию и не вводили никаких исследуемых биомедицинских продуктов.



Рисунок 5 – Дизайн исследований при ишемии задней левой конечности у крыс Wistar

Опытные группы ишемии задней левой лапы составили по 12 животных (по 3 животных на точку отсчета – 7-е, 14-е, 21-е и 28-е сутки). Через 24 часа после моделирования ишемии измеряли только параметры микроциркуляции. Наркоз индуцировали внутрибрюшинным введением 15 мг/кг кетамина и 2 мг/кг ксилазина, далее животных фиксировали на операционном столе, на левом бедре выстригали шерсть на внутренней поверхности бедра, область разреза

обрабатывали 70 % этанолом и 5 % спиртовым раствором йода. Рассекали кожу в средней трети бедра до 1 см, выделяли бедренную артерию и накладывали 2 лигатуры, между ними перерезали бедренную артерию, убеждались в отсутствии кровотечения и ушивали рану, обрабатывали рану 5 % спиртовым раствором йода, и возвращали в клетку для грызунов со свободным доступом к пище и воде.

**Группа, получавшая лечение физиологическим раствором (ФР):** 12 крысам моделировали ишемию по вышеописанной методике. После перевязки и перерезки бедренной артерии, в толщу мышц голени вводили по 0,2 мл ФР в пять точек.

**Группа МСК:** у 12 животных моделировали ишемию перевязкой и перерезкой бедренной артерии слева, с последующим введением в толщу мышц голени в 5 точек  $2,5 \times 10^5$  аллогенных МСК костного мозга крысы в 0,2 мл ФР.

**Группа МСК+ЭПО:** 12 животным перевязкой и перерезкой левой бедренной артерии в средней трети бедра модулировали ишемию, в толщу мышц голени в 5 точек вводили  $2,5 \times 10^5$  аллогенных МСК костного мозга крыс-самцов Wistar и 6,68 МЕ ЭПО (Рекормон, Швейцария) в 0,2 мл ФР. Доза ЭПО подобрана на основании собственных и литературных данных [134].

Дегенерацию межпозвонкового диска (ДМПД) моделировали на 35 крысах-самцах Wistar, случайным образом разделенных на 4 группы. Выведение животных из эксперимента, исследование параметров микроциркуляции, забор биологического материала проводили на 7-е, 14-е и 21-е сутки от момента индукции ДМПД (рисунок 6).

Данный раздел исследования выполнен совместно с врачом-нейрохирургом нейрохирургического центра ЧУЗ «Клиническая больница «РЖД–Медицина» г. Новосибирск» Садыковой Ж. на базе SPF-вивария ИЦиГ СО РАН.

**Контрольная группа:** (интактные животные) составила 5 животных, которым не модулировали ДМПД и не вводили никаких исследуемых биомедицинских продуктов.

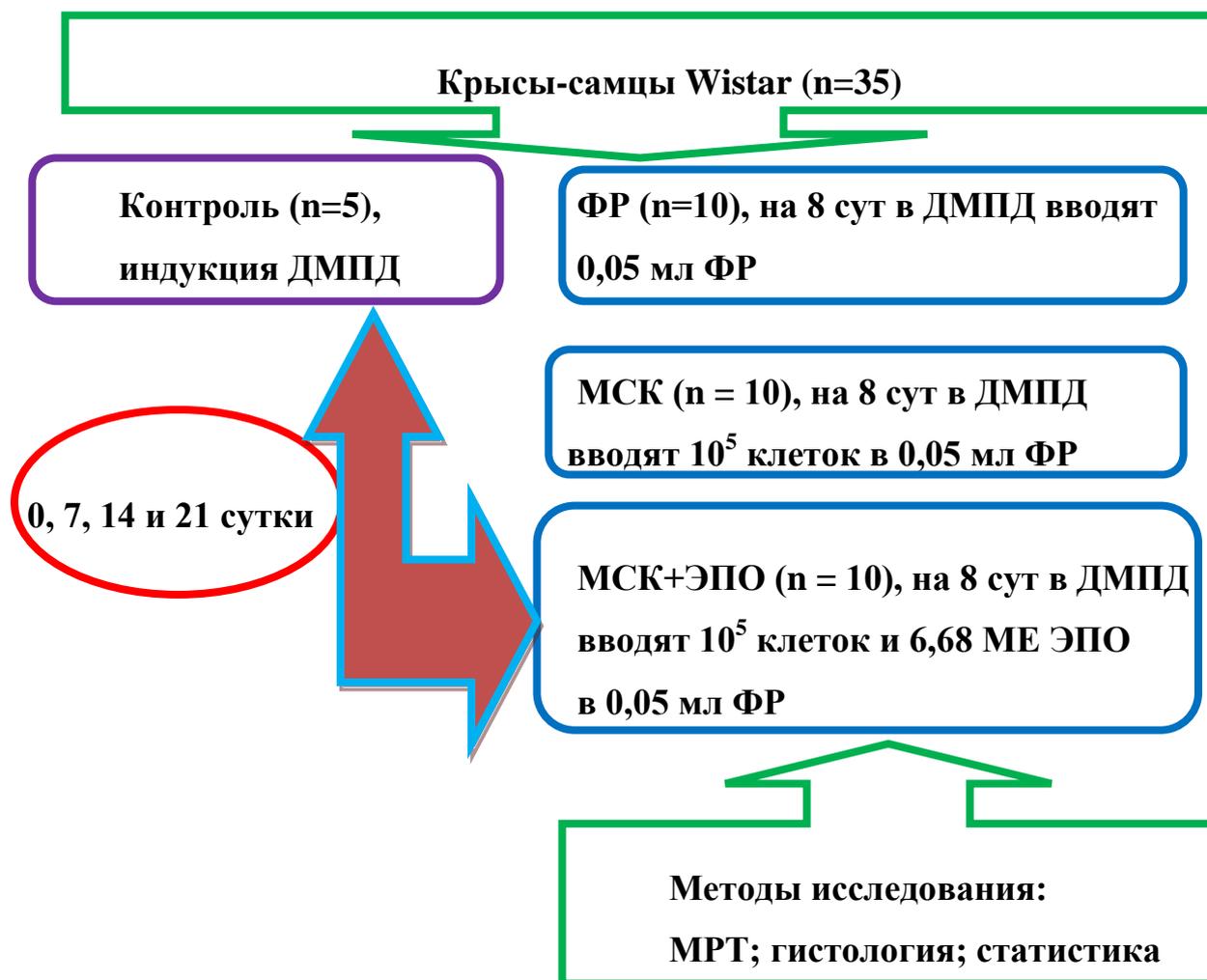


Рисунок 6 – Дизайн исследования при дегенерации межпозвонкового диска у крыс Wistar

**Группа ФР:** на 10 крысах-самцах Wistar после введения в наркоз (40 мг/кг кетамина и 60 мг/кг фенобарбитала, внутривенно), животных фиксировали на животе, определяли межпозвоночный диск между С6-7 (см. приложение А). Далее хвост обрабатывали 70 % этанолом и 5 % спиртовым раствором йода, иглой 21G прокалывали фиброзное кольцо на уровне С6-7, пересекая пульпозное ядро до противоположного фиброзного кольца, делали 3–4 круговых движения иглой и оставляли иглу на 30 с, извлекали иглу, место прокола кожи обрабатывали 5 % спиртовым раствором йода. Через 7 суток в область ДМПД С6-7 вводили 0,05 мл

физиологического раствора (ФР). На 14-е и 21-е сутки из эксперимента выводили по 5 животных.

**Группа МСК:** после индукции у 10 животных с ДМПД на 7-е сутки в область ДМПД Со6-7 вводили  $10^5$  МСК в 0,05 мл ФР. На 14-е и 21-е сутки из эксперимента выводили по 5 животных.

**Группа МСК+ЭПО:** после индукции у 10 животных с ДМПД на 7-е сутки в область ДМПД Со6-7 вводили  $10^5$  МСК и 33,4 МЕ ЭПО в 0,05 мл ФР. На 14-е и 21-е сутки из эксперимента выводили по 5 животных.

### **2.3 Получение и культивирование первичной культуры мезенхимных стволовых клеток человека и крыс**

Костный мозг человека забирали пункцией плоских костей одноразовыми иглами для трепанобиопсии длиной 100 мм и диаметром 11–15G в одноразовые шприцы на 20 мл, в которые предварительно набирали гепарин из расчета 50 МЕ на 1 мл аспирата костного мозга. Далее аспират костного мозга транспортировали в лабораторию клеточных технологий НИИКЭЛ – филиал ИЦиГ СО РАН, где выделяли и инкубировали моноклеарные клетки костного мозга с ЭПО, с последующим возвратом в клинику. Процедура выделения моноклеаров костного мозга человека проводилась с соблюдением принципов асептики и антисептики в стерильной зоне лаборатории клеточных технологий (стерильный бокс), в ламинарном шкафу биологической защиты II-а класса, при соответствующей экипировке персонала (стерильные перчатки, хирургические костюмы, маски, шапочки, стерильные халаты, бахилы). Аспират костного мозга разводили физиологическим раствором в соотношении 1:3, наслаивали на градиент плотности фиколл/верографина ( $\rho = 1,077$ ) г/л в 50 мл стерильные пластиковые культуральные конические пробирки с завинчивающимися крышками (TPP, Швейцария), помещали в центрифугу с охлаждением Eppendorf и осаждали при 1 500 оборотов в минуту в течение 30 минут. Далее собирали интерфазное кольцо, помещали в новые стерильные пробирки на 50 мл и

доводили объем физиологическим раствором до 50 мл, осаждали при 1 500 оборотов в минуту в течение 5 минут. Надосадочную жидкость удаляли, вносили 1 мл физиологического раствора, оценивали жизнеспособность и количество выделенных клеток в камере Горяева. Далее ядродержащие клетки костного мозга человека в питательной среде DMEM с 10 % FCS, 2 mM L-глутамин, 5 mM HEPES-буфера, 80 мкг/мл гентамицина в концентрации  $10^6$  клеток/см<sup>2</sup> вносили в культуральные флаконы T75 и культивировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°C/5 % CO<sub>2</sub> в течение 72 часов. Неприлипшие клетки удаляли, обновляли питательную среду и растили до получения конfluenceности монослоя клеток 80–90 %. Смену питательной среды осуществляли каждые 3–4 дня. Пересев (пассаж) клеток осуществляли 0,25 % раствором трипсина/0,02 % раствором ЭДТА. В работе использовали МСК 4-го и 8-го пассажа.

Для получения первичной культуры МСК–ЭПО были использованы МСК костного мозга человека (4-й пассаж). МСК в питательной среде DMEM с 10 % FCS, 2 mM L-глутамин, 5 mM HEPES-буфера, 80 мкг/мл гентамицина и 33,4 МЕ/мл ЭПО, в концентрации  $10^6$  клеток/см<sup>2</sup> вносили в культуральные флаконы T75 и культивировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°C/5 % CO<sub>2</sub> до получения конfluenceности монослоя клеток 80–90 %. Смену среды осуществляли каждые 3–4 дня. Пересев клеток осуществляли 0,25 % раствором трипсина/0,02 % раствором ЭДТА. В работе использовали МСК–ЭПО 0-го и 3-го пассажа.

После предварительной анестезии (15 мг/кг кетамина и 3 мг/кг ксилазина, внутривенно) животных выводили из эксперимента (n = 42). Выделяли бедренные кости, вымывали 5 мл ЗФР костный мозг, ресуспендировали и осаждали при 1 500 оборотов в минуту в течение 5 минут при температуре 22°C на центрифуге LMC 3 000 (Biosan, Латвия), процедуру повторяли дважды. Осадок ресуспендировали в 5 мл среды DMEM, подсчитывали количество и жизнеспособность клеток (0,2 % раствор трипанового синего в ЗФР) в камере Горяева. Жизнеспособность клеток была не ниже 95 %. Для получения первичной культуры МСК, ядродержащие клетки костного мозга крыс в концентрации  $10^5$  клеток/см<sup>2</sup> инкубировали в пластиковых флаконах T25 (TPP, Швейцария) в

питательной среде DMEM с добавлением 10 % FCS, 2 mM L-глутамина и 80 мкг/мл гентамицина в течение 3 суток при 37°C/5 % CO<sub>2</sub> в CO<sub>2</sub>-инкубаторе MCO-20A/C (Sony, Япония). Через 72 часа неприлипшие клетки удаляли, вносили 5 мл свежей питательной среды, состоящей из DMEM, 10 % FCS, 2 mM L-глутамина, 5 mM HEPES-буфера и 80 мкг/мл гентамицина. Питательную среду обновляли каждые 3–4 дня до достижения 80–90 % конfluenceности монослоя клеток. Далее удаляли надосадочную жидкость, промывали клетки 5 мл ЗФР для удаления остатков питательной среды, вносили 1 мл 0,25 % раствор трипсина/0,02 % раствор ЭДТА, инкубировали клетки в течение 5 минут при 37°C/5 % CO<sub>2</sub> для дезагрегации монослоя клеток, вносили 10 мкл FCS для нейтрализации ферментов, далее вносили 5 мл ЗФР, собирали клетки, переносили в центрифужные пробирки, осаждали при 1 500 оборотов в минуту в течение 5 минут, удаляли надосадочную жидкость, подсчитывали количество клеток и жизнеспособность, и далее рассаживали клетки в концентрации 10<sup>5</sup> клеток/см<sup>2</sup> в питательной среде для экспансии в T75 культуральных флаконах (TPP, Швейцария) до 4-го пассажа, что позволило получить монопопуляцию клеток, не содержащей примеси гемопоэтических стволовых клеток и эндотелиальных прогениторных клеток, с которой далее проводили исследования *in vitro* и *in vivo*.

#### **2.4 Иммунофенотипирование клеток костного мозга животных и человека**

Иммунофенотипирование МСК костного мозга человека проводили до и после кратковременной экспозиции с 33,4 МЕ/мл ЭПО (60 минут), а МСК костного мозга крыс без экспозиции с ЭПО.

В первичной культуре МСК человека и крыс (4-й пассаж) оценивали уровень экспрессии CD73, CD90, CD105, CD34 и CD45. Кроме этого, на МСК человека исследовали уровень экспрессии поверхностных молекул адгезии CD18, CD29, CD44, CD49a, CD54 и CD146, а также экспрессию ЭПОР и CD131 до и после экспозиции клеток с ЭПО в дозе 33,4 МЕ/мл в течение 1 часа и 72 часов *in*

*in vitro*. На первичной культуре МСК человека 8-го пассажа и МСК–ЭПО человека 0-го и 3-го пассажа исследовали уровень экспрессии CD18, CD29, CD44, CD49a, CD54, CD146, ЭПОР и CD131.

К суспензии клеток (50 мкл,  $10^6$  клеток/мл), помещенных в пробирки для цитофлуориметрии, добавляли по 5 мкл коммерческих моноклональных антител, меченных флуорохромами (флуоресцеинизотиоционат – FITC, фикоэритрин – PE, алофикоцианин – APC). Клетки инкубировали 30 минут при комнатной температуре, дважды отмывали от моноклональных антител, фиксировали в 0,5 мл раствора FACS Lyse. Определяли 10 000 событий на цитофлуориметре FACS Canto™ II и анализировали с помощью программы FACS Diva Software (BD, США) количество клеток экспрессирующих на мембране кластеры дифференцировки и выражали в процентах.

## **2.5 Клеточный цикл и апоптоз/некроз мезенхимных стволовых клеток**

Клеточный цикл МСК (4-й и 8-й пассаж) и МСК–ЭПО человека, МСК крыс до и после экспозиции с ЭПО исследовали с использованием пропидиум йодида, а апоптоз/некроз с использованием Annexin V-FITC/PI Apoptosis Detection Kit (BD, США). Аннексин V кальций-зависимый гликопротеин, который связывается с фосфотидилсерином (экспрессируются на внешней мембране клеток при апоптозе) в присутствии ионов кальция. Пропидиум йодид – ДНК-связывающий краситель (интеркалирующий, т.е. встраиваемый между двумя цепочками ДНК).

Для этого, клетки до и после инкубации с ЭПО дважды отмывали охлажденным ЗФР (4°C) осаждением при 1 500 оборотов в минуту в течение 5 минут, к осадку клеток добавляли 1 мл холодного 70 % этанолового спирта (минус 20°C) и держали в холодильнике в течение 4 часов. Клетки отмывали от спирта в ЗФР, вносили 5 мкл пропидиума йодида (20 мкг/мл) и 50 мкл РНКазы (100 мкг/мл) и инкубировали 30 минут при 37°C. На цитофлуориметре FACS Canto™ II с использованием программы FACS Diva Software анализировали не менее 30 000 событий, при анализе гистограммы распределения клеток выделяли

subG<sub>0</sub>G<sub>1</sub> (количество хромосом менее 2n), G<sub>0</sub>G<sub>1</sub> (количество хромосом 2n), G<sub>2</sub>/M (количество хромосом 2n–4n), S (количество хромосом более 4n) (см. приложение Б).

Апоптоз/некроз МСК человека и крыс определяли инкубацией клеток с 5 мкл аннексина V и пропидиум йодида (Annexin V-FITC/PI Apoptosis Detection Kit). Далее клетки отмывали, фиксировали и анализировали 10 000 событий на цитофлуориметре FACS Canto™ II с использованием программы FACS Diva Software. На гистограмме выделяли область гейта: для мертвых (некротических) клеток, окрашенных только пропидиум йодидом; для «раннего» апоптоза клеток, окрашенных только аннексином V; для апоптотических клеток, окрашенных аннексином V и пропидиум йодидом. Количество некротических (некроз) и апоптотических (ранний и поздний апоптоз) клеток выражали в относительных цифрах (в %) (см. приложение Б).

Кроме этого, апоптоз/некроз МСК и МСК–ЭПО человека оценивали методом витальной окраски акридиновым оранжевым (окрашивает ДНК, РНК) и этидиум бромидом (интеркалирующий агент для ДНК) (100 мкг/мл, 1:1) в течение 5 минут, с последующим удалением красителей отмывкой ЗФР и исследованием на инвертированном микроскопе Axio Observer Z1.

## 2.6 Иммуногистохимия мезенхимных стволовых клеток

МСК крыс фиксировали 4 % раствором формалина на ЗФР, отмывали трижды ЗФР. Далее вносили 1 % раствор БСА для блокировки неспецифического связывания меток, далее вносили первичные кроличьи против крысы антитела CD90, Collagen I (коллаген 1 типа), Fibronectin (фибронектин), Vimentin, α-SMA (гладкомышечный актин-альфа), von Willebrand factor (фактор Виллебранда) в дозе 10 мкг/мл на 3 часа при комнатной температуре. Отмывали клетки и вносили вторичные антитела козы против кролика или мыши IgG. Ядра прокрашивали 4',6-диамино-2-фенилиндолом синим (4',6-diamino-2-phenylindole, DAPI) флуоресцентный краситель для окрашивания нуклеиновых кислот, на

инвертированном микроскопе Axio Observer Z1 с использованием люминесценции оценивали наличие экспрессии данных маркеров и делали микрофотографии.

## **2.7 Аутофагия мезенхимных стволовых клеток человека**

$10^7$ /мл клеток в ЗФР наслаивали на предметные стекла, покрытые поли-L-лизинном, при 37°C в течение 60 минут, удаляли неприлипшие клетки промывкой ЗФР, фиксировали 4 % раствором формалина на ЗФР, пермеабелизовали этанолом и блокировали неспецифическое связывание антител 3 % раствором БСА с 0,1 % Твин 20. Иммуноцитохимическую реакцию проводили с применением моноклональных антител мыши к LC3B, меченые AlexoFluor@488 при 4°C в течение 16–18 часов. Далее клетки отмывали, ядра окрашивали DAPI, флуоресценцию анализировали на инвертированном микроскопе Axio Observer Z1.

## **2.8 Трансмиссионная электронная микроскопия мезенхимных стволовых клеток человека**

$10^6$  МСК 8-го пассажа и МСК–ЭПО отмывали в ЗФР, фиксировали 4 % раствором формалина на ЗФР в течение 24 часов при 4°C, далее фиксировали 1 % раствором OsO<sub>4</sub> при 4°C в течение 60 минут, обезвоживали в возрастающих концентрациях этанола, заключали в Эпон. Полутонкие срезы (1 мкм) готовили на ультратоме, красили толуидиновым синим, визуализировали на микроскопе (Leica DM 2 500, Германия). Далее готовили ультратонкие срезы (70–100 нм), контрастировали 1 % водным раствором ацетата уранила и цитратом свинца, по Рейнолдсу, просматривали в просвечивающем электронном микроскопе JEM 100 CX-II (Jeol, Япония), делали снимки, затем проводили морфометрический анализ с использованием программы Image J.

## **2.9 Функциональные свойства клеток костного мозга человека и животных**

### **2.9.1 Дифференцировочный потенциал мезенхимных стволовых клеток человека**

Для адипогенной дифференцировки первичной культуры МСК костного мозга человека и крыс (4-й пассаж), клетки культивировали в адипогенной питательной среде, состоящей из DMEM с 10 % FCS, 2 mM L-глутамина, 5 mM HEPES-буфер, 80 мкг/мл гентамицина,  $10^{-7}$  M дексаметазона натрия фосфата и 0,5 mM изобутилметилксантина при  $37^{\circ}\text{C}/5\% \text{CO}_2$  в течение 21 дня в 6-луночных культуральных планшетах (TPP, Швейцария). Каждые 3–4 дня меняли адипогенную питательную среду.

Для остеогенной дифференцировки первичной культуры МСК костного мозга человека и крыс (4-й пассаж) клетки культивировали в остеогенной питательной среде, состоящей из DMEM с 10 % FCS, 2 mM L-глутамина, 5 mM HEPES-буфер, 80 мкг/мл гентамицина,  $10^{-9}$  M дексаметазона, 10 mM  $\beta$ -глицерофосфата и 50 мкг/мл аскорбат-2-фосфата при  $37^{\circ}\text{C}/5\% \text{CO}_2$  в течение 21 дня в 6-луночных культуральных планшетах. Каждые 3–4 дня меняли адипогенную питательную среду.

Для хондрогенной дифференцировки первичной культуры МСК костного мозга человека и крыс (4-й пассаж) клетки культивировали в хондрогенной питательной среде, состоящей из DMEM с 10 % FCS, 2 mM L-глутамина, 5 mM HEPES-буфер, 80 мкг/мл гентамицина,  $10^{-7}$  M дексаметазона и 10 нг/мл TGF- $\beta$  при  $37^{\circ}\text{C}/5\% \text{CO}_2$  в течение 21 дня в 6-луночных культуральных планшетах. Каждые 3–4 дня меняли адипогенную питательную среду.

Морфологию МСК человека и крыс оценивали при смене питательной среды под инвертированным микроскопом Olympus (Япония), а микрофотографии делали после окрашивания клеток масляным красным O, по Вон-Косса (депозиты кальция) с последующим окрашиванием гематоксилин-

эозином, толуидиновым синим соответственно для адипоцитов, остеоцитов и хондроцитов на инвертированном микроскопе Axio Observer Z1 (Zeiss, Германия).

### **2.9.2 Колониеобразующая способность мезенхимных стволовых клеток**

Для оценки колониеобразующих единиц (КОЕ)  $10^3$  МСК крыс, МСК и МСК–ЭПО человека помещали в культуральный флакон Т75 на 14 суток в питательной среде, состоящей из DMEM с 10 % FCS, 2 mM L-глутамина, 5 mM HEPES-буфер, 80 мкг/мл гентамицина при 37°C/5 % CO<sub>2</sub>. Каждые 3–4 дня меняли питательную среду. На 15-е сутки питательную среду удаляли, промывали ЗФР и красили 1 % спиртовым раствором метиленового синего и подсчитывали количество КОЕ, содержащих более 50 клеток на инвертированном микроскопе Axio Observer Z1.

Кроме этого, колониеобразование первичной культуры МСК–ЭПО человека оценивали при индукции гипергликемии (64 mM D-глюкозы), дефицита ростовых факторов (0 % FCS), окислительного стресса (100 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) и ЭПО (33,4 МЕ/мл) по вышеописанной методике.

### **2.9.3 Пролиферативный потенциал мезенхимных стволовых клеток**

#### **МТТ тест**

Пролиферацию МСК человека и крыс оценивали косвенно по уровню преобразования растворимого 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2 Н-тетразолиум бромид (МТТ) в формазан в ходе реакции восстановления внутри клеток, опосредованного активностью НАДФ-Н-зависимых оксидаз.

Для этого,  $10^4$  МСК крыс/лунку вносили в 96-луночный планшет (TPP, Швейцария) в питательной среде RPMI 1 640 с низким содержанием D-глюкозы (11 mM) или DMEM с более высоким содержанием D-глюкозы (25 mM) с 10 % FCS, 2 mM L-глутамина, 5 mM HEPES-буфер, 80 мкг/мл гентамицина в

перекиси водорода (0 и 100 мкМ) и ЭПО (0 и 33,4 МЕ/мл) в триплетах, инкубировали в течение 72 часов при 37°C/5 % CO<sub>2</sub>.

10<sup>4</sup> МСК человека/лунку вносили в 96-луночный планшет в питательной среде DMEM с содержанием глюкозы (25 мМ D-глюкозы) с 0 % и 10 % FCS, 2 мМ L-глутамин, 5 мМ HEPES-буфер, 80 мкг/мл гентамицин сульфата в присутствии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0 и 100 мкМ) и ЭПО (0 и 33,4 МЕ/мл) в триплетах, инкубировали в течение 72 часов при 37°C/5 % CO<sub>2</sub>, далее по выше приведенной методике оценивали пролиферацию. Также оценивали пролиферативный потенциал МСК человека после предварительной экспозиции клеток с ЭПО в течение 24 часов с последующим удалением питательной среды и внесением свежей питательной среды DMEM (25 мМ D-глюкозы) с 0 % и 10 % FCS, 2 мМ L-глутамин, 5 мМ HEPES-буфер, 80 мкг/мл гентамицина и 100 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Пролиферацию 10<sup>4</sup> МСК (8-й пассаж) и МСК–ЭПО человека/лунку вносили в 96-луночный планшет в питательной DMEM (25 и 64 мМ D-глюкозы) с FCS (0 и 10 %), 2 мМ L-глутамин, 5 мМ HEPES-буфер, 80 мкг/мл гентамицина в присутствии перекиси водорода (0 и 100 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) и ЭПО (0 и 33,4 МЕ/мл) в триплетах, инкубировали в течение 72 часов при 37°C/5 % CO<sub>2</sub>, далее оценивали преобразование МТТ в формазан.

За 4 часа до окончания эксперимента планшеты центрифугировали при 1 500 оборотов в минуту в течение 5 минут на центрифуге с охлаждением Eppendorf (Германия), надосадочную жидкость удаляли и вносили 100 мкл среды DMEM без дополнительных ингредиентов, а также 10 мкл МТТ (5 г/л) и инкубировали в течение 4 часов при 37 °C/5 % CO<sub>2</sub>. Надосадочную жидкость удаляли (использовали для оценки уровней продукции оксида азота). В лунки вносили по 100 мкл DMSO, клетки ресуспендировали в DMSO и оставляли на 10 минут при комнатной температуре для полного лизиса клеток, с последующей оценкой оптической плотности продукта реакции в лунках на спектрофотометре FaxStat 2 100 при длине волны ( $\lambda = 492$ ) нм и выражали в условных единицах оптической плотности (ед. опт. плот.).

### По клеточному импедансу

Пролиферативный потенциал первичной культуры МСК человека и крыс также оценивали по показателям клеточного импеданса в режиме реального времени на приборе xCELLigence System (Roche Applied Science, Германия).

$10^4$  МСК крыс/лунку в питательной среде DMEM (25 mM D-глюкозы) с 1 % FCS, 2 mM L-глутамин, 5 mM HEPES-буфер, 80 мкг/мл гентамицина в присутствии ЭПО (34,4; 68 и 100 МЕ/мл) вносили в специализированные 16-луночные планшеты (E-16 Plate, Roche Applied Science, Германия) с встроенными в дно лунок датчиками из золота. Помещали в прибор и фиксировали дно планшетов к микро датчикам прибора специальным запирающим устройством и помещали прибор в CO<sub>2</sub>-инкубатор.

$10^4$  клеток МСК (8-й пассаж) или МСК-ЭПО человека/лунку в питательной среде DMEM с содержанием глюкозы (25 mM D-глюкозы) с FCS (0 и 10 %), 2 mM L-глутамин, 5 mM HEPES-буфер, 80 мкг/мл гентамицина в присутствии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0 и 100 мкМ) и ЭПО (0 и 33,4 МЕ/мл), а также при индукции гипергликемии внесением в питательную среду D-глюкозы до 64 mM и с ЭПО (0 и 33,4 МЕ/мл) вносили в специализированные 16-луночные планшеты (E-16 Plate, Roche Applied Science, Германия) с встроенными в дно лунок датчиками из золота. Помещали в прибор и фиксировали дно планшетов к микро датчикам прибора специальным запирающим устройством и помещали прибор в CO<sub>2</sub>-инкубатор.

Задавали время сканирования и интервал между сканированием, и прибор автоматически снимал параметры клеточного импеданса автоматически и строил графическое отображение полученных данных. Изменение импеданса на микроэлектродах, обусловленного прикреплением и распластыванием клеток, выражали как клеточный индекс (КИ), который автоматически вычисляется программой:  $(КИ = (R_n - R_b)/t)$ , где  $R_b$  – исходное значение импеданса в лунке, содержащей только ростовую среду для клеток,  $R_n$  – значение импеданса в любое время  $t$  в лунке, содержащей, помимо ростовой среды, тестируемые клетки. КИ, таким образом, отражает изменения количества клеток, качества прикрепления клеток и морфологию клеток в лунке, которые могут меняться во времени.

## 2.9.4 Миграционный потенциал мезенхимных стволовых клеток

### Вертикальная (трансмембранная) миграция

Трансмембранную миграцию МСК человека и крыс исследовали с использованием камер Бойдена с микропорами 8 мкм.

$10^4$  МСК крыс/лунку в триплетах вносили в камеры Бойдена в питательной среде RPMI 1 640 с низким содержанием D-глюкозы (11 mM) или DMEM с более высоким содержанием D-глюкозы (25 mM), которые были вставлены в лунки 24-луночного планшета (TPP, Швейцария), а в сами лунки 24-луночного планшета вносили питательную среду RPMI 1 640 или DMEM с 10 % FCS, 2 mM L-глутамина, 5 mM HEPES-буфер, 80 мкг/мл гентамицина в присутствии  $H_2O_2$  (0 и 100 мкМ) и ЭПО (0 и 33,4 МЕ/мл), инкубировали в течение 24 часов при 37°C/5 %  $CO_2$ .

$10^4$  МСК (8-й пассаж) или МСК–ЭПО человека/лунку в триплетах вносили в камеры Бойдена в питательной среде DMEM (25 D-глюкозы), которые были вставлены в лунки 24-луночного планшета, а в сами лунки 24-луночного планшета вносили питательную среду DMEM (25 и 64 mM D-глюкозы) с FCS (0 % и 10 %), 2 mM L-глутамина, 5 mM HEPES-буфер, 80 мкг/мл гентамицина в присутствии перекиси водорода (0 и 100 мкМ) и ЭПО (0 и 33,4 МЕ/мл), инкубировали в течение 24 часов при 37°C/5 %  $CO_2$ .

По окончании срока эксперимента, камеры Бойдена извлекали из лунок, удаляли жидкость, протирали верхнюю часть мембраны ватными тампонами для удаления клеток, красили гематоксилин-эозином в течение 15 минут, промывали, подсушивали и под инвертированным микроскопом Olympus подсчитывали количество мигрировавших в направлении ростовых факторов (хемотаксис) клеток и выражали в абсолютных единицах.

### **Горизонтальная миграция (тест заживления раневого дефекта монослоя клеток)**

Для исследования горизонтальной миграции в тесте «раневого поверхности»  $10^5$  МСК (8-й пассаж), МСК–ЭПО человека/лунку рассеивали в триплетах в 96-луночном планшете в питательной среде DMEM (25 мМ D-глюкозы) с 10 % FCS, 2 мМ L-глутамин, 5 мМ HEPES-буфер, 80 мкг/мл гентамицина и инкубировали в течение 24 часов при 37°C/5 % CO<sub>2</sub>. Через 24 часа в центре лунок проводили горизонтальную линию кончиком наконечника на 200 мкл, слущенные клетки удаляли вместе с питательной средой, лунки промывали ЗФР дважды. Создавали условия нормогликемии, гипергликемии (25 и 64 мМ D-глюкозы соответственно); окислительного стресса (0 и 100 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); разного уровня ростовых факторов (0 и 10 % FCS) и ЭПО (0 и 33,4 МЕ/мл). Культивировали клетки в приспособлении, имитирующем CO<sub>2</sub>-инкубационную камеру для микроскопа, задавая время (48 часов) и кратность сканирования (каждые 8 часов) на микроскопе Axio Observer Z1. В программе задавали параметры для измерения ширины «раневого дефекта» и высчитывали процент закрытия «раневого дефекта» по формуле:  $(\text{Зона закрытия раны} = 1) - (\text{ширина раневого дефекта через 48 часов} / \text{ширина раневого дефекта на 0 часов}) \times 100 \%$ .

### **По изменению клеточного импеданса**

Миграционный потенциал МСК крыс оценивали также и по изменению клеточного импеданса на приборе xCELLigence System в режиме реального времени.

$10^4$  МСК только в среде DMEM (25 мМ D-глюкозы) вносили в верхние лунки над мембраной с порами 8 мкм, в которые снизу были встроены микродатчики из золота. В нижние лунки 16-луночного 2-х уровневом планшета (CIM Plate, Roche Applied Science, Германия) вносили среду DMEM (25 мМ D-глюкозы) с 1 % FCS, 2 мМ L-глутамин, 5 мМ HEPES-буфер, 80 мкг/мл гентамицина и 33,4 МЕ/мл ЭПО. Далее микропланшеты помещали в прибор и фиксировали дно планшетов к микро датчикам прибора специальным

запирающим устройством, помещали прибор в CO<sub>2</sub>-инкубатор. Задавали время сканирования, интервал между сканированием, далее прибор автоматически снимал параметры клеточного импеданса автоматически и строил графическое отображение полученных данных. Изменение импеданса на микроэлектродах, обусловленного прикреплением и распластыванием клеток, выражали как клеточный индекс (КИ), который автоматически вычисляется программой:  $(КИ = (R_n - R_b)/t)$ , где  $R_b$  – исходное значение импеданса в лунке, содержащей только ростовую среду для клеток,  $R_n$  – значение импеданса в любое время  $t$  в лунке, содержащей, помимо ростовой среды, тестируемые клетки. КИ, таким образом, отражает изменения количества клеток, качества прикрепления клеток и морфологию клеток в лунке, которые могут меняться во времени.

## **2.10 Оценка уровня продукции цитокинов, ростовых факторов и оксида азота мезенхимных стволовых клеток**

### **Твердофазный иммуноферментный анализ**

Уровень цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , INF $\gamma$ , TGF $\beta$ -1, GM-CSF) в КС МСК крыс ( $2 \times 10^6$ /мл), росших в 5 мл DMEM с 10 % FCS, 2 мМ L-глутамин, 5 мМ HEPES-буфер, 80 мкг/мл гентамицина, культивировали в течение 48 часов при 37°C/5 % CO<sub>2</sub> в культуральных флаконах T25, оценивали с использованием коммерческих наборов на спектрофотометре (StatFax 2 100, США).

В КС от МСК 4-го пассажа человека ( $2 \times 10^6$  МСК в 5 мл питательной среды, состоящей из DMEM (25 мМ D-глюкозы) с 10 % FCS, 2 мМ L-глутамин, 5 мМ HEPES-буфер, 80 мкг/мл гентамицина культивировали в течение 48 часов при 37°C/5 % CO<sub>2</sub> в культуральных флаконах T25 определяли уровень продукции IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , VEGF, GM-CSF, TIMP-1, IFN- $\gamma$ , ЭПО, FGF basic, CXCL-12/SDF-1a, PDGF-AB, MMP9.

В КС МСК 8-го пассажа и МСК–ЭПО человека ( $2 \times 10^6$  клеток в 5 мл питательной среды, состоящей из DMEM (25 мМ D-глюкозы) с 10 % FCS, 2 мМ

L-глутамина, 5 мМ НЕРЕС-буфер, 80 мкг/мл гентамицина культивировали в течение 48 часов при 37°C/5 % CO<sub>2</sub> в культуральных флаконах T25 определяли уровень продукции TNF- $\alpha$ , VEGF, ЭПО, SDF-1 $\alpha$  (CXCL 12 A), IGF-1, free BDNF, ICAM-1, Vimentin, Fibronectin, total Collagen.

Уровень продукции стойких метаболитов оксида азота (NO)-нитритов (NO<sub>2</sub>) в культурах МСК крыс и человека (4-й и 8-й пассаж) и МСК-ЭПО определяли спектрофотометрически ( $\lambda$ =492) нм с использованием реактива Грисса [231]. Для определения уровней стойких метаболитов оксида азота (NO)-нитритов (NO<sub>2</sub>) в кондиционированных средах строили калибровочную кривую с использованием 1 мМ нитрита натрия (Merck, США), выражали в мкМ/мл.

Кроме этого, уровень биологически активных молекул исследовали в биологических образцах крыс с ишемией конечностей. Забор биологического материала (кровь, мышцы голени) проводили на 7-е, 14-е, 21-е и 28-е сутки эксперимента под наркозом.

После регистрации параметров микроциркуляции животных декапитировали, вставляли катетер в сонную артерию и собирали периферическую кровь в чистые в центрифужные пробирки, инкубировали при комнатной температуре 30 минут, затем при 37° С в термостате в течение 30 минут и 30 минут при 4°С в холодильнике. Отслаивали образовавшийся сгусток крови от стенок пробирки стеклянной палочкой и центрифугировали при 3000 оборотов в минуту в течение 15 минут. Далее сыворотку разливали по аликвотам и хранили при минус 70°С до использования.

Мышцы голени отделяли от костей и срезали, взвешивали 1 г мышц голени, помещали его в стеклянный гомогенизатор, вносили 1 мл DMSO (диметилсульфоксид) и разминали мышцы до образования кашицы, осаждали при 1 500 оборотов в минуту в течение 5 минут, собирали и разливали по аликвотам надосадочную жидкость, хранили при минус 70°С до использования.

В сыворотке крови и экстракте мышц голени крыс-самцов Wistar с ишемией на спектрофотометре определяли уровень IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ ,

ЭПО спектрофотометрически с использованием ИФА наборов, согласно протоколу производителей, и NO с использованием реактива Грисса.

### **2.11 Оценка параметров микроциркуляции в нижних конечностях крыс**

Показатели микроциркуляции в области стоп крыс оценивали с использованием лазерного анализатора капиллярного кровотока ЛААКК-01 (ООО НПП ЛАЗМА, Россия) на основе инфракрасного лазера с помощью трехканального светового зонда, сделанного из кварцевых моноволоконных светодиодов, в течение 1 минуты. Показатели микроциркуляции измеряли до моделирования КИНК, через 1, 7, 14, 21 и 28 суток под наркозом (кетонал и ксилазин). Состояние микроциркуляции в области стоп оценивали по следующим параметрам: показатель микроциркуляции (ПМ), представляющий собой функцию от усредненной скорости эритроцитов и концентрации эритроцитов в исследуемой точке стопы, зависящей от показателя гематокрита и количества функционирующих сосудов; амплитуда медленных колебаний (LF), отражающей активность собственных компонентов микроциркуляторного русла; амплитуда быстрых колебаний (HF), совпадающих с дыхательным ритмом и зависящих от колебаний венозного кровотока в связи с изменением давления в грудной клетке в фазы вдоха и выдоха; амплитуда пульсовых колебаний (CF), совпадающих с пульсовым колебанием кровотока. Кроме этого, высчитывали соотношение амплитуды быстрых и медленных колебаний ( $A_{\max HF}/A_{\max LF}$ ), соотношение амплитуды кардиоритма и медленных колебаний ( $A_{\max CF}/A_{\max LF}$ ), а также индекс эффективности микроциркуляции (ИЭМ).

### **2.12 Патоморфологическое исследование мышц голени крыс**

После отделения мышц голени от костей их фиксировали в 10 % растворе формалина (рН 7,4) в течение 24 часов, далее выполняли проводку, заливку в

парафин. Срезы толщиной 3–5 мкм окрашивали гематоксилин-эозином. Микрофотографии срезов мышц голени делали на инвертированном микроскопе Axio Observer Z1. Оценивали: наличие некроза, истощения мышечных волокон, наличия волокнистой соединительной ткани, количество сосудов с использованием закрытой квадратной тестовой системы, вмонтированной в окуляр микроскопа. Подсчитывали абсолютное количество кровеносных сосудов при помощи окулярной сетки площадью 2 025 мкм<sup>2</sup>.

### **2.13 Магнитно-резонансная томография хвостового отдела позвоночника крыс**

До моделирования (0-е сутки) и после моделирования ДМПД в Соб-7 (7-е, 14-е и 21-е сутки) под наркозом проводили МРТ на сверхвысокопольном томографе (Bruker BioSpec 117/16 USR, США) с использованием специальной катушки для мелких животных. Хвост был вставлен в трубку, содержащую 0,1 молярный раствор CuSO<sub>4</sub> для улучшения качества изображения. Использовали 2-D спиновое Эхо-двойную Эхо-последовательность со следующими параметрами: время повторения 3 000 мс, время Эха 16 и 80 мс, угол поворота 90, количество срезов 2, толщина среза 0,6 мм, поле зрения 40 × 40 мм, разрешение в плоскости 0,1 мм и 30 сагиттальных срезов. Интенсивность сигнала диска была рассчитана с использованием T2-взвешенного изображения (время Эха 80 мс) для лучшей визуализации в качестве косвенной меры гидратации диска, поскольку хорошо известно, что снижение содержания воды является распространенным явлением при дегенерации межпозвонковых дисков. Средняя интенсивность сигнала (яркость) на контрольном диске была установлена в качестве эталона для интенсивности сигнала поврежденных дисков у каждого животного. Обработку полученных данных проводили с использованием программы RadiAntDICOM Viewer (США). Делали замеры межпозвонкового расстояния.

## **2.14 Патоморфологическое исследование дегенерации межпозвонкового диска крыс**

На 7-е, 14-е и 28-е сутки после индукции ДМПД хвоста на уровне С6-7 животных выводили из эксперимента под наркозом, извлекали комплекс 6–9 хвостового позвонков, фиксировали в 4 % растворе формалина в течение 24 часов. Далее перемещали в 10 % растворе ЭДТА на 30 суток для декальцификации, заливали в парафин и готовили тонкие срезы толщиной 3–5 мкм, красили гематоксилин-эозином, микрофотографии делали на микроскопе Olympus. Оценивали сохранность пульпозного ядра, структуру фиброзного кольца, состояние ламелл, наличие соединительной ткани.

## **2.15 Статистический анализ**

Полученные результаты обрабатывали на персональном компьютере с помощью пакета прикладных программ Statistica 10.0 for Windows. Применялись методы описательной статистики. Полученные данные проверяли на нормальность распределения с использованием  $w$  критерия Шапиро-Уилкса, меры центральной тенденции и рассеяния описаны средней и стандартным отклонением в случае соответствия распределения признаков закону Гаусса-Пуассона ( $M \pm SD$ ), при распределении признаков отличном от нормального – медианой, нижним и верхним квартилями ( $Me$ ;  $Q1-Q3$ ). Статистическая значимость различий сравниваемых признаков в группах проводилась с помощью непараметрического критерия Краскела-Уоллиса. При сравнении одного количественного признака в двух независимых группах использовался непараметрический критерий Манна-Уитни. С целью выявления корреляционных взаимосвязей между исследуемыми параметрами использовали коэффициент корреляции Спирмена ( $R$ ). Различия считались статически значимыми при уровне ( $p < 0,05$ ) [16].

## ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 3.1 Характеристика мезенхимных стволовых клеток костного мозга человека и крыс

#### 3.1.1 Характеристика мезенхимных стволовых клеток костного мозга человека

Известно, что костный мозг, помимо гемопоэтических стволовых клеток и эндотелиальных прогениторных клеток, содержит МСК, которые осуществляют поддержание процесса кроветворения *in situ* и могут быть выделены и размножены *in vitro* [393]. На функциональные свойства МСК существенное влияние оказывает источник получения клеток, например, МСК, выделенные из костного мозга, проявляют повышенную способность к дифференцировке в остеогенном направлении, в то время как МСК, выделенные из синовиальной оболочки – в хондрогенном и адипогенном направлении [130].

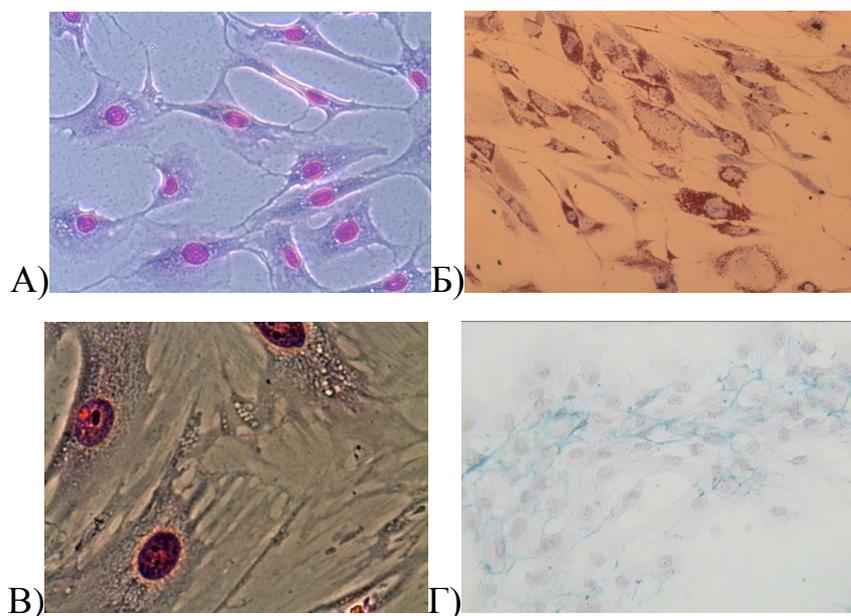


Рисунок 7 – Морфология мезенхимных стволовых клеток костного

мозга человека на 4-ом пассаже (А) и способность к дифференцировке в адипоциты (Б, масляный красный О и гематоксилин-эозин), остеобласты (В, по Ван Косса и гематоксилин-эозин) и хондроциты (Г, толуидиновый синий), ув.  $\times 40$

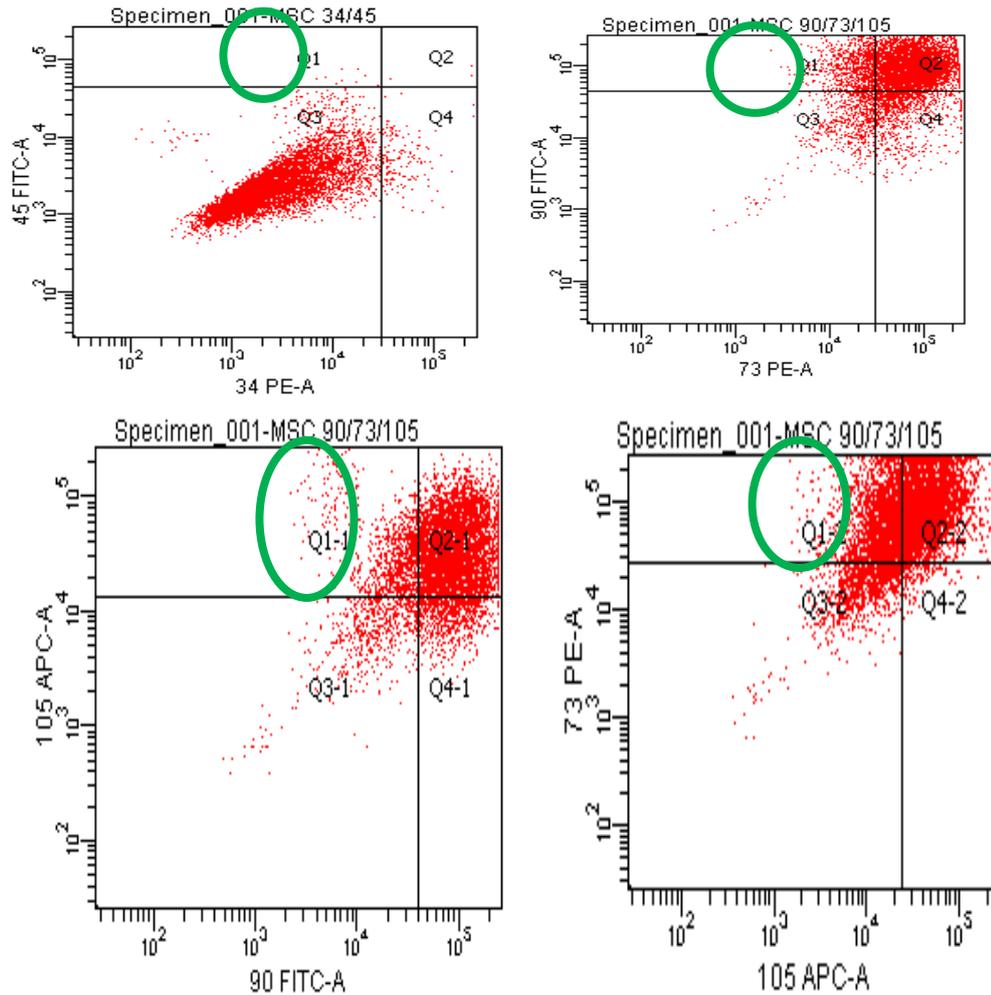


Рисунок 8 – Фенотип первичной культуры мезенхимных стволовых клеток костного мозга человека (4-й пассаж)

Ядродержащие клетки костного мозга человека прикреплялись к пластику, имели гетерогенную структуру на ранних сроках культивирования и приобретали гомогенность к 14-м суткам роста *in vitro*. МСК от 4-го пассажа

дифференцировались в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлении (см. рисунок 7).

Таблица 1 – Уровень биологически активных веществ в кондиционированных средах мезенхимных стволовых клеток костного мозга человека ( $M \pm SD$ ); ( $n = 50$ )

Параметры	Уровень
Провоспалительные цитокины	
IL-2, пг/мл	11,11 ± 5,66
IL-6, пг/мл	6115,92 ± 2475,31
IL-8, пг/мл	2486,76 ± 512,39
TNF-α, пг/мл	10,59 ± 2,5
IFN-γ, пг/мл	625,3 ± 62,73
Противовоспалительные цитокины	
IL-4, пг/мл	5,08 ± 2,97
IL-10, пг/мл	9,85 ± 0,21
Ростовые факторы	
EPO, мМЕ/мл	245,3 ± 48,51
GM-CSF, пг/мл	52,37 ± 5,5
VEGF, пг/мл	143,0 ± 18,97
hFGF basic, пг/мл	99,0 ± 33,94
PDGF-AB, пг/мл	1260,0 ± 113,14
CXCL12/SDF-1a, пг/мл	9065,0 ± 2679,93
Матриксные металлопротеазы и ингибиторы	
MMP9, нг/мл	12,0 ± 1,41
TIMP1, нг/мл	37,5 ± 2,12
Другие биологически активные молекулы	
NO, мкМ/мл	1,05 ± 0,07

Удвоение количества посаженных клеток происходило за 7–8 суток роста *in vitro*. Клетки несли на своей поверхности классические маркеры принадлежности к мезенхимным стволовым клетками: CD73 в (97,33 ± 2,25) %,

CD90 в  $(94,67 \pm 5,01) \%$ , CD105 в  $(95,33 \pm 2,66) \%$  и не экспрессировали маркеры гемопоэтических стволовых клеток CD45  $(0,35 \pm 0,04) \%$  и CD34  $(0,23 \pm 0,03) \%$  (см. рисунок 8).

Способность к продукции биологически активных молекул является одной из функциональных характеристик клеток организма, включая и клетки костного мозга [8; 51]. В кондиционной среде МСК человека (4-й пассаж) выявлено наличие широкого спектра биологически активных молекул (см. таблицу 1). Отмечен высокий уровень провоспалительных цитокинов (IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$ ) и ростовых факторов (VEGF, PDGF-AB, CXCL12/SDF-1a). Учитывая источник получения, адгезию к пластику, пролиферативный потенциал и наличие специфических маркеров, клетки, полученные из ядродержащих клеток костного мозга человека, можно отнести к «истинным» МСК.

### **3.1.2 Характеристика мезенхимных стволовых клеток костного мозга крыс**

В ходе исследования нами была получена первичная культура МСК крыс из прилипших к пластику ядродержащих клеток костного мозга. Через 72 часа после удаления неприлипших к пластику мононуклеарных клеток костного мозга выявлены как единичные прилипшие клетки, так и небольшие скопления до 50 клеток, гетерогенной морфологии (рисунок 9А).

Через 10–14 дней культивирования прилипшие клетки костного мозга крыс-самцов Wistar достигали конfluenceности 80–90 % и представляли собой монослой гомогенных, веретенообразных клеток, т.е. имели морфологию, характерную для МСК (рисунок 9Б, 9В).

В работе использованы клетки 4-го пассажа, что обусловлено необходимостью получения однородной популяции клеток, так как на ранних пассажах в культурах выявляется примесь гемопоэтических стволовых клеток и эндотелиальных прогениторных клеток, которые к 4-му пассажиру исчезают, поскольку используемая питательная среда не способствует их экспансии.

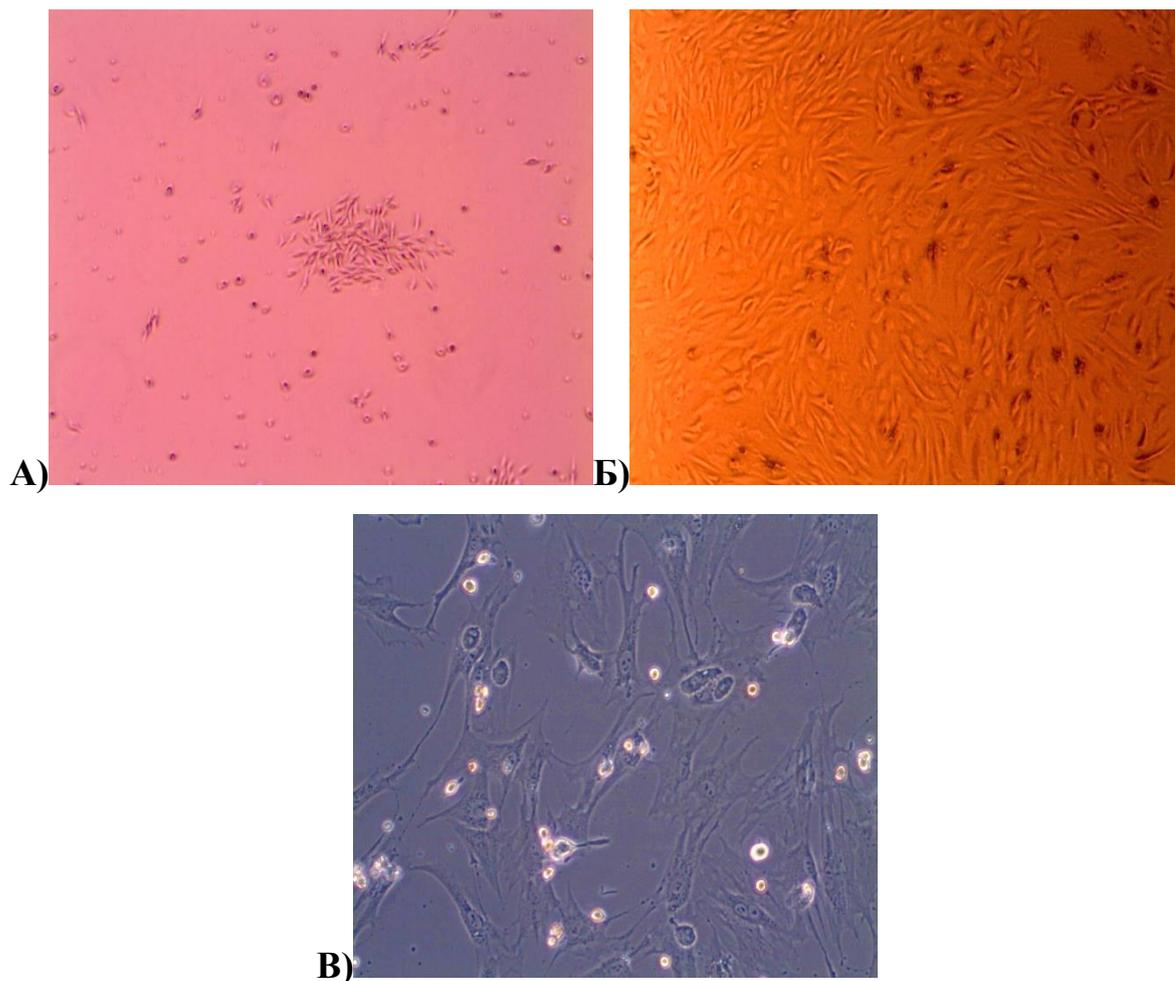


Рисунок 9 – Морфология прилипшей фракции ядросодержащих клеток костного мозга крыс-самцов Wistar. А – прилипшая к пластику фракция клеток костного мозга через 72 часа (колониеобразующая единица клеток, клетки веретенообразной формы и единичные клетки с овальной формой), ув.  $\times 10$ ; Б – монослой из в фибробластоподобных клеток на 13–17-е сутки, ув.  $\times 10$ ; В – фибробластоподобные клеток с одним и двумя ядрами (делящиеся клетки), ув.  $\times 40$

С целью верификации, принадлежности полученных клеток костного мозга крыс к «истинным» МСК проведено иммунофенотипирование клеток. МСК костного мозга крыс экспрессировали характерные для «истинных» МСК кластеры дифференцировки CD29 ( $99,4 \pm 0,13$ ) %, CD73 ( $86,6 \pm 4,6$ ) %,

CD90 ( $97,4 \pm 0,25$ ) %, CD105 ( $76,4 \pm 6,6$ ) % и не несли на мембране CD34 ( $0,23 \pm 0,03$ ) % и CD45 ( $0,35 \pm 0,04$ ) %.

Методами иммуногистохимии показано, что МСК крыс экспрессируют CD90, коллаген 1 типа, фибронектин, виментин,  $\alpha$ -гладкомышечный актин и фактор Виллебранда (рисунок 10). Показана способность МСК крыс формировать колониеобразующие единицы при росте в культуральных матрацах при плотности посева менее 20 клеток/см<sup>2</sup> (рисунок 11А).

По данным МТТ-теста, отражающего способность НАДФ-Н-зависимых оксидоредуктазных ферментов восстанавливать тетразолиевый краситель 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид в нерастворимый формазан, свидетельствующего о жизнеспособности клеток и их пролиферативном потенциале, восстанавливающая активность МСК костного мозга 4-го пассажа крыс составила ( $1,14 \pm 0,03$ ) ед. опт. плот. (рисунок 11Б).

Согласно требованиям международного общества по клеточной терапии (ISCT) [340], предъявляемым к «истинным» МСК, нами исследована способность МСК костного мозга крыс 4-го пассажа к дифференцировке в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлении.

Спустя 3 недели роста МСК крыс в специальных культуральных средах дифференцировались в адипоциты, остеоциты и хондроциты *in vitro* (рисунок 12). Таким образом, с учетом адгезии клеток к пластику, пролиферативного потенциала, иммунофенотипической характеристики и способности дифференцироваться в различные клетки соединительной ткани, выделенные нами клетки из костного мозга от крыс-самцов Wistar, соответствуют истинным МСК.

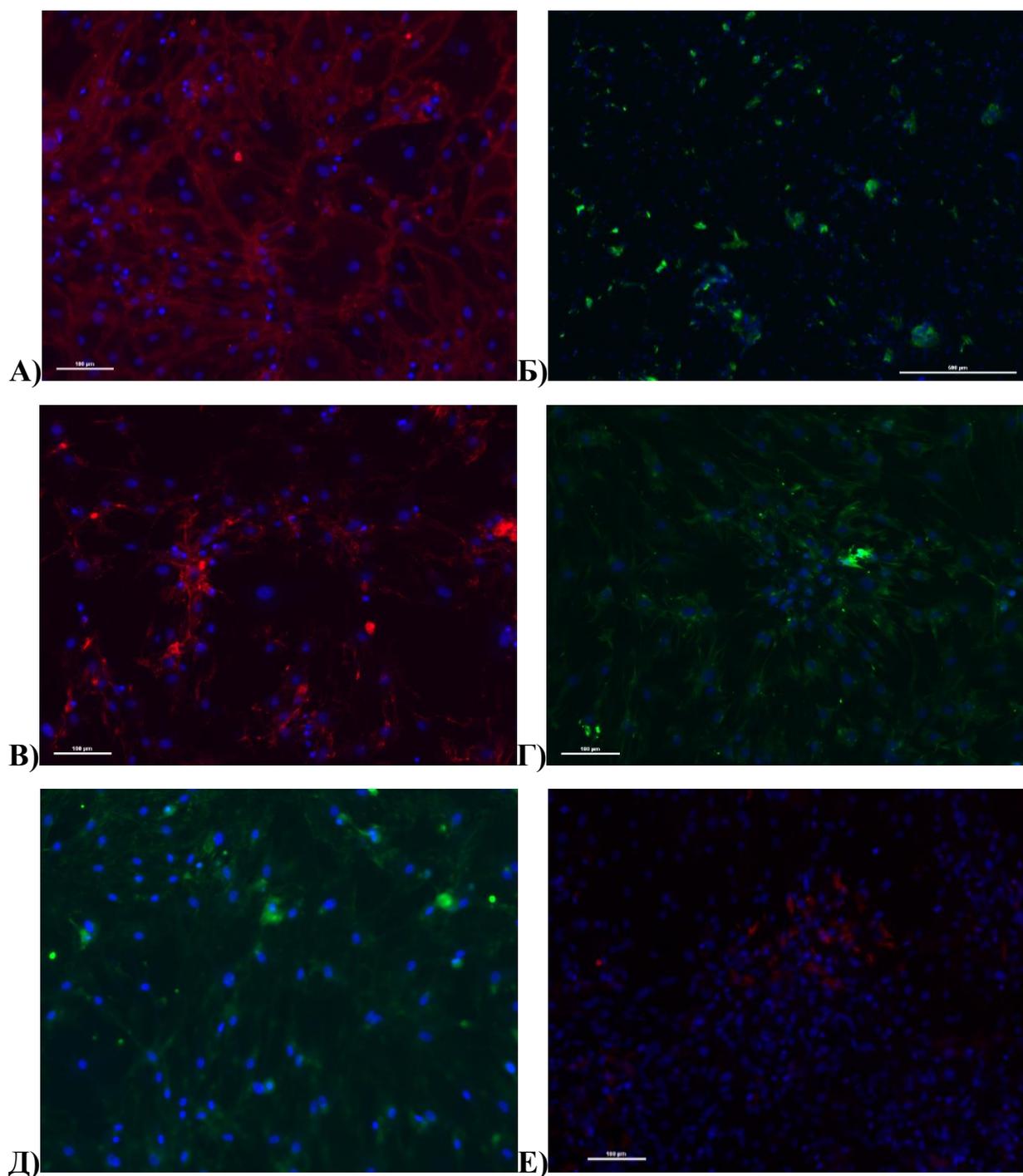


Рисунок 10 – Экспрессия в мезенхимных стволовых клетках костного мозга крыс CD90 (А, клетки красного цвета), Collagen I (Б, клетки зеленого цвета), Fibronectin (В, клетки красного цвета), Vimentin (Г, клетки зеленого цвета),  $\alpha$ -SMA (Д, клетки зеленого цвета), von Willebrand factor (Е, клетки красного цвета) по данным иммуногистохимического исследования, ув.  $\times 20$ . Ядра клеток окрашены DAPI (синий цвет)

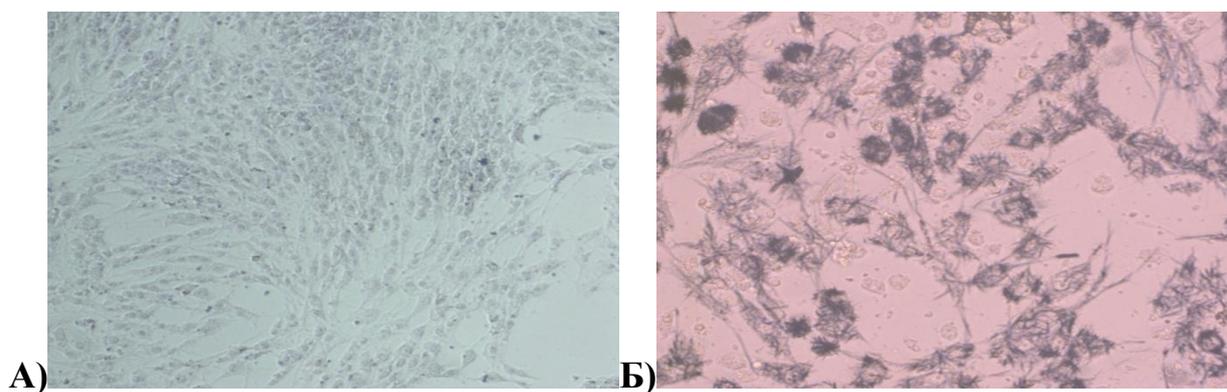


Рисунок 11 – Проллиферативный потенциал мезенхимных стволовых клеток костного мозга крыс. А – колониеобразующие единицы (метиленовый синий);  
 Б – внутриклеточная активность НАДФ-Н-зависимых оксидоредуктаз (происходит преобразование МТТ в формазан), ув.  $\times 40$

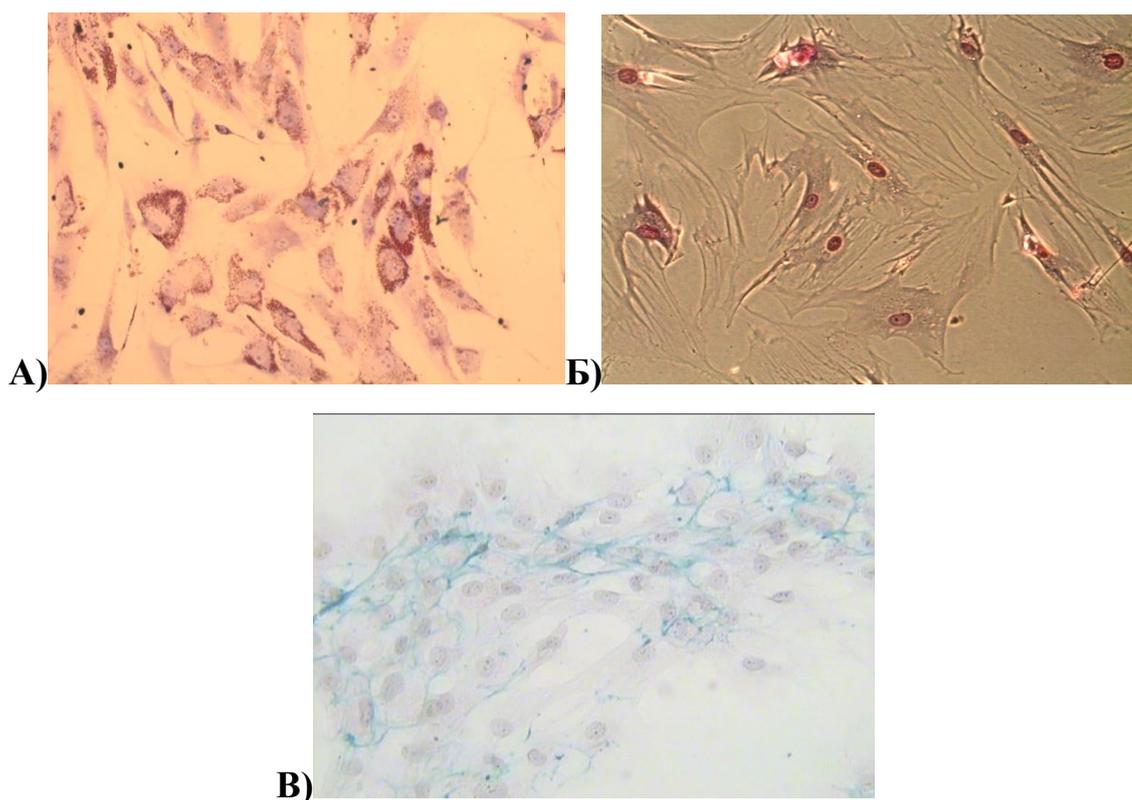


Рисунок 12 – Адипогенная (А, масляный красный О и гематоксилин-эозин),  
 остеогенная (Б, по Ван Косса и гематоксилин-эозин) и хондрогенная  
 (В, тулоидиновый синий) дифференцировка мезенхимных стволовых клеток  
 костного мозга крыс, ув.  $\times 40$

Таблица 2 – Уровень продукции цитокинов мезенхимными стволовыми клетками костного мозга крыс ( $M \pm SD$ ); ( $n = 12$ )

Параметры	Уровень
Провоспалительные цитокины	
IL-1 $\beta$ , пг/мл	237,83 $\pm$ 15,28
IL-2, пг/мл	1,59 $\pm$ 0,09
IL-6, пг/мл	2,27 $\pm$ 0,08
IL-8, пг/мл	5,23 $\pm$ 3,92
TNF- $\alpha$ , пг/мл	527,67 $\pm$ 61,07
IFN- $\gamma$ , пг/мл	99,18 $\pm$ 0,2
Противовоспалительные цитокины	
IL-4, пг/мл	0,37 $\pm$ 0,04
IL-10, пг/мл	1,51 $\pm$ 0,09
Факторы роста	
TGF- $\beta$ 1, пг/мл	6720,0 $\pm$ 584,19
Колонистимулирующие факторы	
GM-CSF, пг/мл	0,73 $\pm$ 0,03
Другие биологически активные молекулы	
NO, мкМ/мл	12,01 $\pm$ 3,85

Показано, что МСК крыс секретируют биологически активные вещества, оказывающие как аутокринное, так и паракринное влияние.

В таблице 2 суммированы наши данные по базальному уровню продукции МСК костного мозга крыс провоспалительных (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) и противовоспалительных (IL-4 и IL-10) цитокинов, факторов роста (TGF- $\beta$ 1), колониестимулирующих факторов (GM-CSF) и медиаторов межклеточного взаимодействия (NO). Показана высокая продукция IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$ , что указывает на преобладание провоспалительных цитокинов, а также повышенная продукция TGF- $\beta$ 1.

## **Заключение**

В ходе культивирования моноклеарных клеток костного мозга получены первичные культуры МСК человека и крыс. Которые соответствуют критериям, предъявляемым к «истинным» МСК: адгезируют к пластику; пролиферируют; несут на своей мембране CD73, CD90 и CD105 маркеры; дифференцируются в адипоциты, остециты и хондроциты. Кроме этого, МСК крыс экспрессируют компоненты внеклеточного матрикса (коллаген 1 типа, фибронектин, виментин),  $\alpha$ -SMA и vW. Таким образом, полученные первичные культуры клеток являются «истинными» МСК.

### **3.2 Влияние эритропоэтина на экспрессию кластеров дифференцировки на мезенхимных стволовых клетках костного мозга человека**

ЭПО взаимодействует с различными клетками организма человека опосредованно через специфический рецептор, тем самым запуская через сигнальные пути созревание клеток эритроидного ряда в направлении эритроцитов, а в негемопоэтических клетках анти-апоптотический эффект [13; 210].

В таблице 3 суммированы результаты оценки эффекта экспозиции МСК человека с ЭПО *in vitro* на экспрессию ЭПОР (канонический сигнальный путь ЭПО) и ко-экспрессию ЭПОР/CD131 (неканонический сигнальный путь ЭПО). Установлено, что кратковременная экспозиция МСК человека с ЭПО значительно увеличивает экспрессию рецепторов для реализации эффектов ЭПО по каноническому и неканоническому сигнальному пути ( $p < 0,05$ ). В то же время увеличение срока экспозиции клеток с ЭПО ведет к большей активации неканонического сигнального пути для ЭПО.

Таблица 3 – Уровни экспрессии ЭПОР и ко-экспрессию ЭПОР/CD131 на мезенхимных стволовых клетках костного мозга человека до и после экспозиции с эритропоэтином ( $M \pm SD$ ), %

Фенотип	Исходно	Время экспозиции	
		1 час	72 часа
ЭПОР+	7,27 ± 0,83	<b>11,8 ± 1,71*</b>	10,87 ± 4,37
ЭПОР+/CD131+	0,5 ± 0,3	<b>1,1 ± 0,17*</b>	<b>2,03 ± 0,06*†</b>
CD131+	41,83 ± 0,74	41,9 ± 1,85	<b>44,47 ± 2,04*</b>

Примечание: \* – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с исходным показателем; † – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с 1-часовой экспозицией с ЭПО.

### Заключение

Таким образом, под влиянием эритропоэтина в мезенхимных стволовых клетках костного мозга человека активируется канонический и неканонический сигнальный путь ЭПО.

### 3.3 Влияние экспозиции мезенхимных стволовых клеток костного мозга человека с эритропоэтином на экспрессию рецепторов для канонического и неканонического сигнального пути для эритропоэтина

Как видно из таблицы 4, экспозиция МСК костного мозга человека (4-й пассаж) с ЭПО в течение 1 часа значительно снижала уровень экспрессии на мембране клеток CD18 в сравнении с исходным показателем ( $p < 0,05$ ).

Таблица 4 – Уровни экспрессии молекул адгезии на мезенхимных стволовых клетках костного мозга человека до и после экспозиции с эритропоэтином ( $M \pm SD$ ), %; (n = 50)

Фенотип	Исходно	Время экспозиции	
		1 час	72 часа
CD18+	0,93 ± 0,4	0,43 ± 0,15*	1,43 ± 0,21*†
CD18+/CD54+	0,23 ± 0,12	0,7 ± 0,2*	0,4 ± 0,1*†
CD54+	2,8 ± 0,69	15,2 ± 0,82*	3,1 ± 0,1†
CD29+	91,3 ± 0,36	95,0 ± 1,0*	91,1 ± 1,05†
CD44+	92,93 ± 0,7	95,13 ± 1,03*	90,9 ± 0,26*†
CD49a+	9,8 ± 2,61	81,37 ± 12,45*	26,7 ± 6,23*†
CD146+	41,67 ± 1,53	50,6 ± 1,04*	40,17 ± 0,21†

Примечание: \* – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с исходным показателем; † – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с 1-часовой экспозицией с ЭПО.

В то же время экспозиция МСК с ЭПО в течение 1 часа *in vitro* способствовала увеличению количества клеток, несущих на мембране молекулы адгезии: CD18/CD54, CD54, CD29, CD44, CD49a и маркер стволовости – CD146 ( $p < 0,05$ ).

Увеличение срока экспозиции МСК костного мозга человека с ЭПО значительно уменьшало количество клеток, экспрессирующих CD18/CD54, CD54, CD29, CD44, CD49a, CD146 в сравнении с аналогичным количеством МСК после 1-часовой экспозиции с ЭПО (см. таблица 4); ( $p < 0,05$ ).

### Заключение

Предобработка МСК костного мозга человека ЭПО способствует приросту экспрессии молекул адгезии на мембране клеток при кратковременной экспозиции (60 минут), а при увеличении срока экспозиции до 72 часов выявлено снижение экспрессии молекул адгезии.

### **3.4 Антиапоптотическое действие эритропоэтина на мезенхимные стволовые клетки**

#### **3.4.1 Антиапоптотическое действие эритропоэтина на мезенхимные стволовые клетки костного мозга человека**

Одним из эффектов эритропоэтина на клетки организма, опосредуемого через взаимодействие эритропоэтина с рецептором к нему, является усиление выживаемости клеток в неблагоприятном микроокружении [22]. Обработка МСК ЭПО способствует увеличению пролиферации клеток, реаранжировке цитоскелета и миграционной активности *in vitro*, а *in vivo* уменьшает лимфоцитарную инфильтрацию, альтерацию, некроз и фиброзирование почек при нефротоксическом поражении [119]. Однако влияние ЭПО на морфофункциональные свойства МСК исследовано недостаточно.

Нами исследовано влияние ЭПО в дозе 33,4 МЕ/мл на апоптоз/некроз и распределение клеток в фазах клеточного цикла при стандартных условиях культивирования, дефиците ростовых факторов и окислительном стрессе (таблица 5). Показано, что количество МСК в «ранней» фазе апоптоза, сразу после снятия с матраца, существенно больше, чем при индукции окислительного стресса (без и с наличием ЭПО) ( $p < 0,05$ ).

Кроме этого, доля МСК в «раннем» апоптозе для обработанных ЭПО в течение 24 часов значимо меньше, чем в контроле ( $p < 0,05$ ). Однако, при дефиците ростовых факторов их количество существенно больше ( $p < 0,05$ ). Дефицит ростовых факторов в меньшей степени усиливал апоптоз МСК, нежели окислительный стресс (независимо от присутствия ЭПО) ( $p < 0,05$ ).

Необходимо отметить, что предварительная экспозиция МСК с ЭПО или внесение его в питательную среду при окислительном стрессе усиливали апоптоз ( $p < 0,05$ ). Дефицит ростовых факторов усиливал «ранний» апоптоз в большей степени, чем другие условия неблагоприятного микроокружения ( $p < 0,05$ ).

Таблица 5 – Апоптоз/некроз и клеточный цикл мезенхимных стволовых клеток костного мозга человека ( $M \pm SD$ ), %)

Параметры	Контроль	0 % FCS	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +ЭПО	ЭПО24+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Уровень апоптоза/некроза					
Ранний апоптоз	5,35 ± 0,25	11,25 ± 1,25*	0,9 ± 0,3*†	0,6 ± 0,2*†	0,2 ± 0,1*†‡
Апоптоз	9,74 ± 1,85	21,0 ± 1,0*	8,98 ± 1,2†	9,55 ± 1,0*†	9,55 ± 0,5†
Некроз	0,7 ± 0,3	2,5 ± 0,5*	0,5 ± 0,3†	0,5 ± 0,2	0,6 ± 0,1†
Распределение по фазам клеточного цикла					
subG <sub>0</sub> G <sub>1</sub>	2,25 ± 0,05	3,05 ± 0,15*	не исследовали		
G <sub>0</sub> G <sub>1</sub>	84,4 ± 1,5	80,95 ± 0,95*	не исследовали		
S	6,35 ± 0,15	2,7 ± 0,3*	не исследовали		
G <sub>2</sub> /M	3,85 ± 1,45	1,8 ± 0,2*	не исследовали		
Примечание: ЭПО24 – предварительна инкубация клеток с ЭПО в течение 24 часов; * – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем; † – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с 0 % FCS; ‡ – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .					

Не выявлено значимого влияния ЭПО или же обработки клеток ЭПО в течение 24 часов на уровень «раннего» апоптоза при окислительном стрессе ( $p > 0,05$ ). В то же время количество апоптотических МСК при стандартных условиях культивирования было значимо меньше, чем при индукции неблагоприятного микроокружения ( $p < 0,05$ ). В отношении количества некротических МСК показано, что дефицит ростовых факторов более выражено инициирует некроз клеток по сравнению с другими условиями культивирования МСК ( $p < 0,05$ ). Дефицит ростовых факторов увеличивает апоптоз МСК человека, снижает долю клеток в фазе покоя, синтеза и митоза.

Жизнеспособность МСК также подтверждается и другим способом выявления апоптоза в клетках с использованием акридинового оранжевого и этидиума бромиды (рисунок 13).

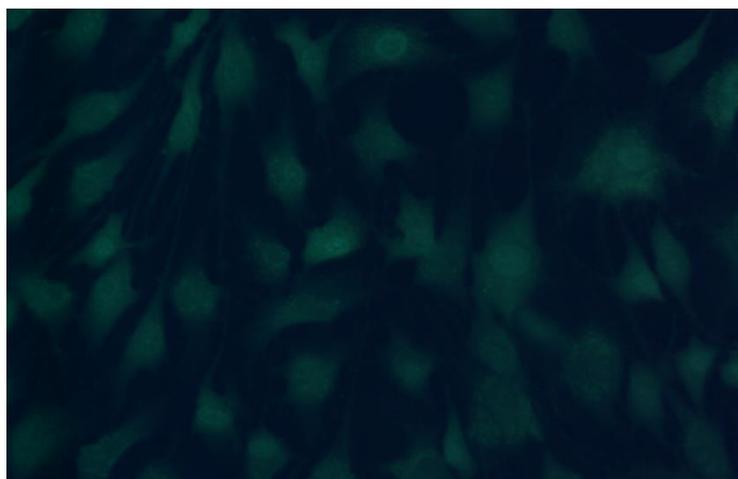


Рисунок 13 – Визуализация апоптоза мезенхимных стволовых клеток костного мозга человека (4-й пассаж) витальными красителями (акридиновым оранжевым и этидиум бромидом 1:1), ув.  $\times 40$ .

Живые клетки – ядро и цитоплазма зеленого цвета, апоптоз/некроз – ядро желто/красного цвета, цитоплазма зеленого цвета.

В данном случае все клетки без признаков апоптоза/некроза

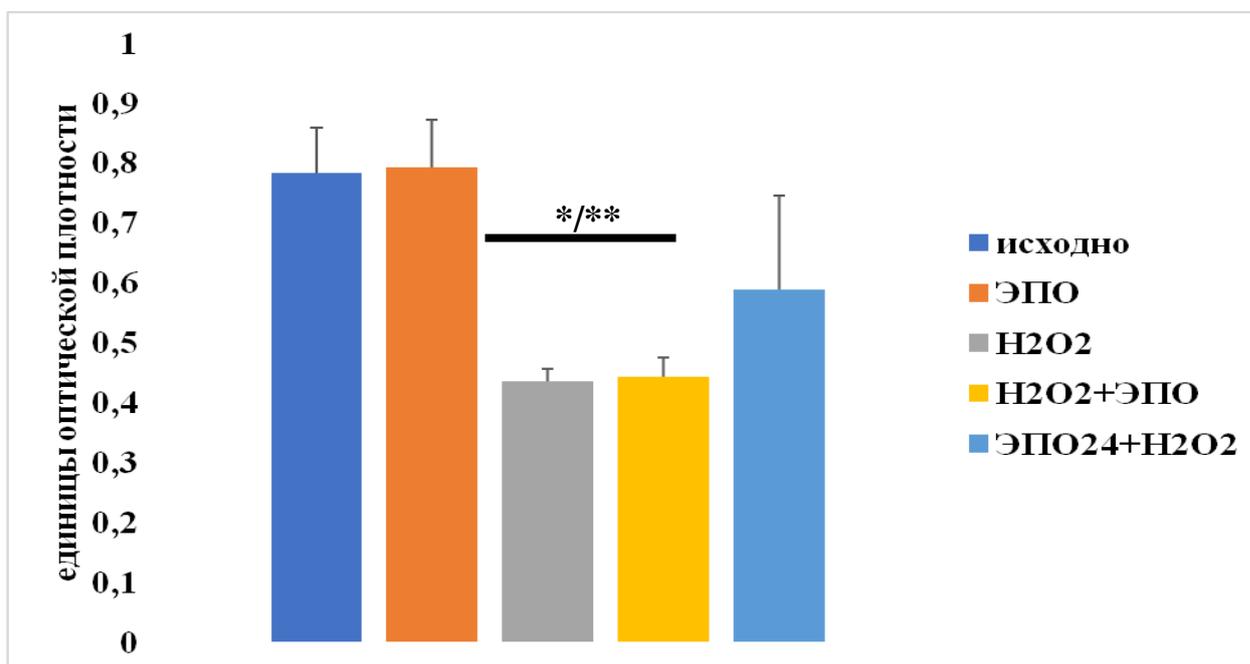
Анализ влияния ЭПО на апоптоз/некроз МСК человека с учетом длительности воздействия на клетки показал, что при кратковременной экспозиции отмечается протективное действие ЭПО (антиапоптотическое), а при удлинении срока экспозиции клеток с ЭПО выявлен обратный эффект (таблица 6); ( $p < 0,05$ ).

Таблица 6 – Апоптоза/некроза мезенхимных стволовых клеток костного мозга человека до и после экспозиции с ЭПО ( $M \pm SD$ ), %)

Фенотип	Исходно	Время экспозиции	
		1 час	72 часа
Ранний апоптоз	$5,57 \pm 0,5$	$0,6 \pm 0,1^*$	$7,0 \pm 1,0^{*\dagger}$
Апоптоз	$6,3 \pm 1,77$	$8,53 \pm 0,55^*$	$6,17 \pm 0,29^\dagger$
Некроз	$14,93 \pm 0,5$	$8,03 \pm 1,05^*$	$23,13 \pm 2,14^{*\dagger}$

Примечание: \* – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с исходным показателем; † – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с 1-часовой экспозицией с ЭПО.

Далее нами исследовано влияние ЭПО на пролиферативный потенциал МСК человека (рисунок 14), (см. приложение В.1).



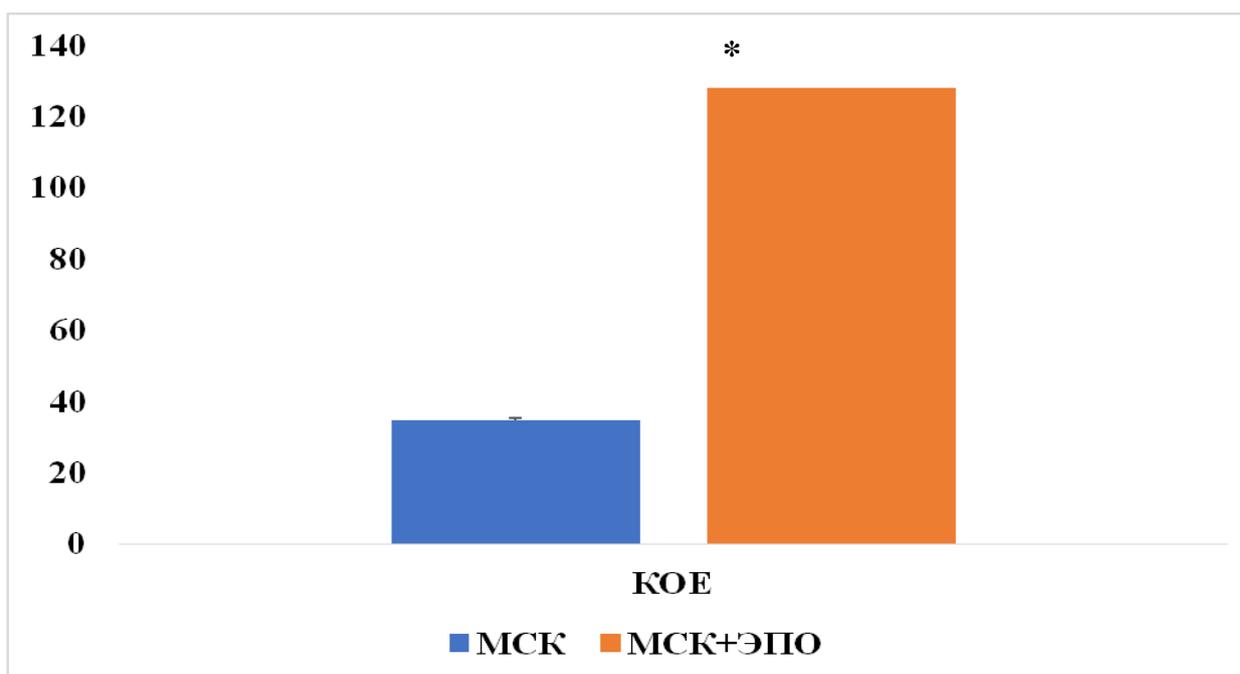
Примечание: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+ЭПО – пролиферация при индукции окислительного стресса и добавления ЭПО в питательную среду; ЭПО24+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – пролиферация клеток после экспозиции с ЭПО в течение 24 часов в условии окислительного стресса, индуцированного внесением перекиси водорода в питательную среду; \* – (p < 0,05) по сравнению с контролем; \*\* – (p < 0,05) по сравнению с ЭПО.

Рисунок 14 – Пролиферация мезенхимных стволовых костного мозга клеток человека (4-й пассаж) в норме, при индукции окислительного стресса и добавлении ЭПО в питательную среду

Показано, что ЭПО существенно не влиял на пролиферацию МСК человека по данным МТТ-теста (p > 0,05). В то же время создание неблагоприятного микроокружения для МСК внесением в среду перекиси водорода значительно снижает пролиферативную активность клеток (p < 0,05), а добавление ЭПО не отменяет ингибирующего влияния перекиси водорода на пролиферацию МСК. Однако предварительная экспозиция МСК с ЭПО в течение 24 часов

способствовала существенному снижению негативного влияния окислительного стресса на пролиферативный потенциал.

Кроме этого, нами исследовано влияние ЭПО на способность МСК к колониообразованию (рисунок 15), (см. приложение В.2). Показано значимое увеличение образования очагов роста МСК в присутствии ЭПО ( $p < 0,001$ ).



Примечание: \* – ( $p < 0,001$ ) по сравнению с МСК+ЭПО.

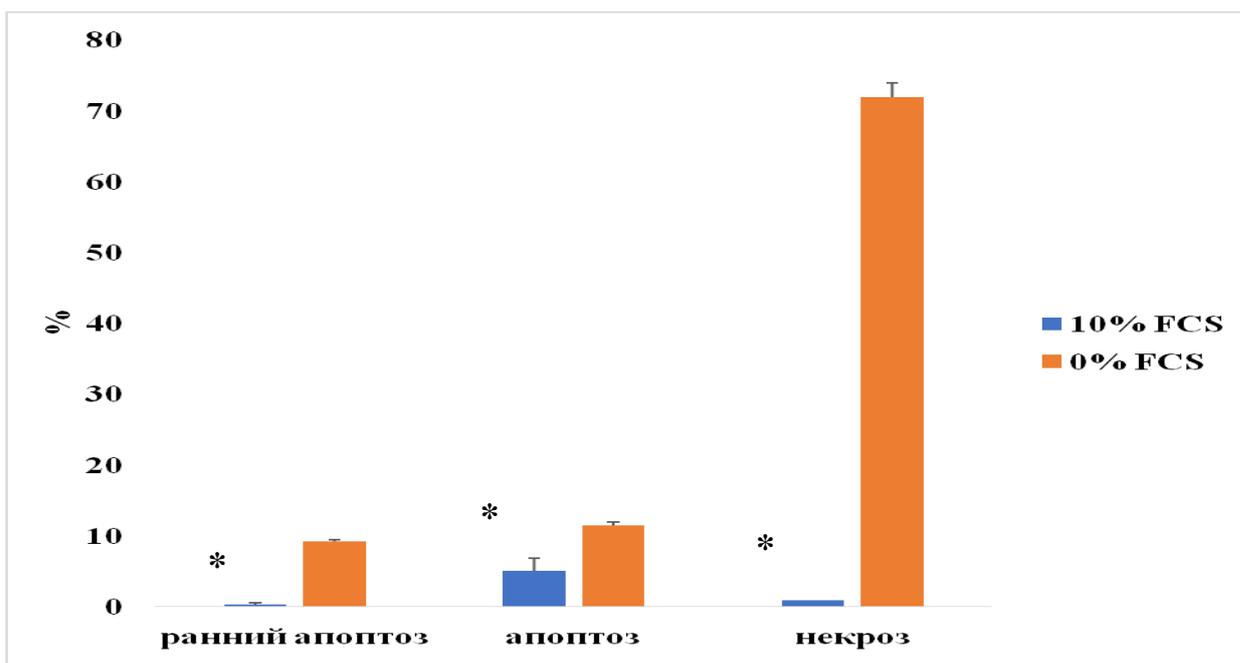
Рисунок 15 – Показатели колониообразования мезенхимных стволовых клеток костного мозга человека (4-й пассаж) без ЭПО и с добавлением в питательную среду ЭПО

### 3.4.2 Антиапоптотическое действие эритропоэтина на мезенхимные стволовые клетки крыс

Известно, что функциональная активность клеток зависит от условий микроокружения, оказывающих либо подавляющее, либо стимулирующее влияние на пролиферацию, миграцию и секрецию клеток [385; 424].

Нами исследован эффект дефицита ростовых факторов (0 % FCS) в питательной среде на показатели апоптоза/некроза (одной из форм гибели клеток, называемой «аноиксис» [17]) и распределение клеток в фазах клеточного цикла.

Дефицит ростовых факторов существенно увеличивал долю клеток, как в «раннем», так и «позднем» апоптозе, а также долю некротических клеток (рисунок 16), (см. приложение В.3).



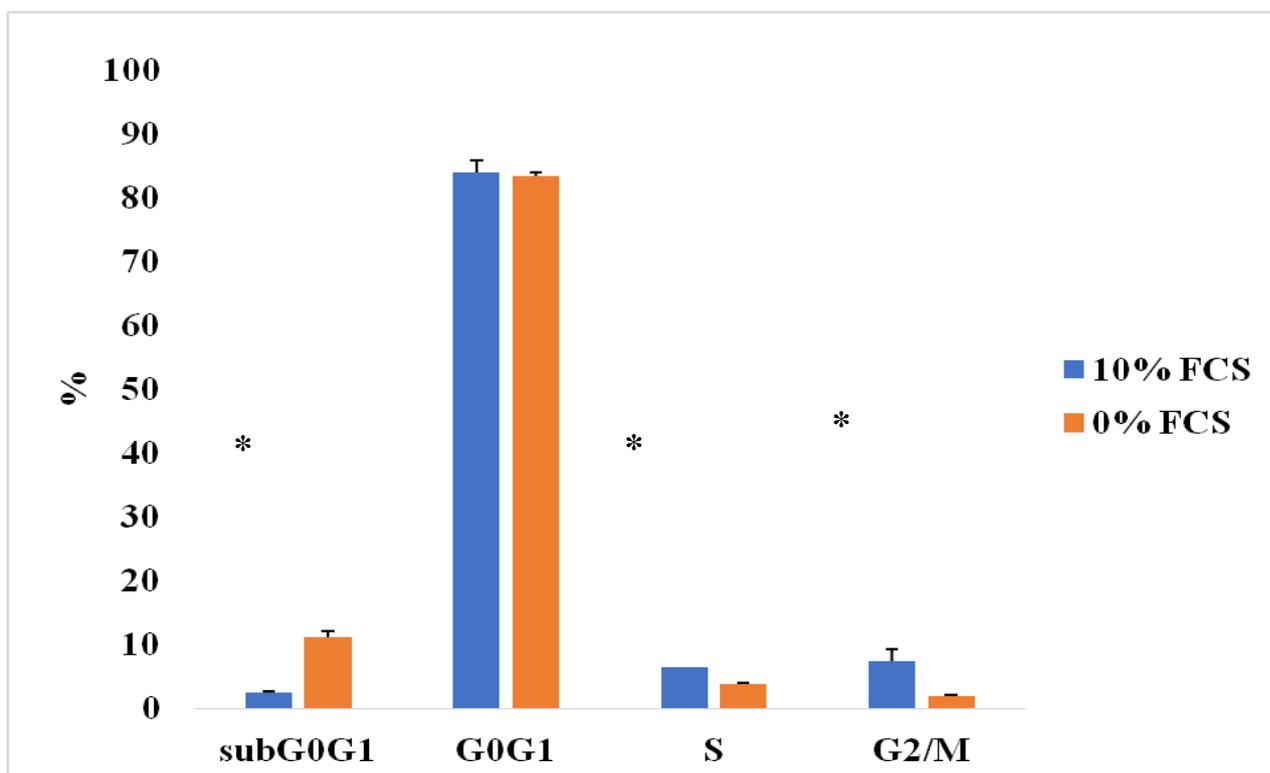
Примечание: \* – ( $p < 0,001$ ) по сравнению с 0 % FCS.

Рисунок 16 – Апоптоз/некроз мезенхимных стволовых клеток костного мозга крыс в норме и при дефиците ростовых факторов (0 % FCS)

Кроме этого, дефицит ростовых факторов значимо увеличивал долю МСК, содержащих количество хромосом менее  $2n$  (некроз) и существенно снижал долю клеток в фазе синтеза и митоза (рисунок 17), (см. приложение В.4).

С учетом влияния факторов микроокружения на МСК, включая цитокины и ростовые факторы [221; 360], нами исследован эффект различных доз ЭПО на пролиферативный потенциал МСК костного мозга крысы при дефиците ростовых

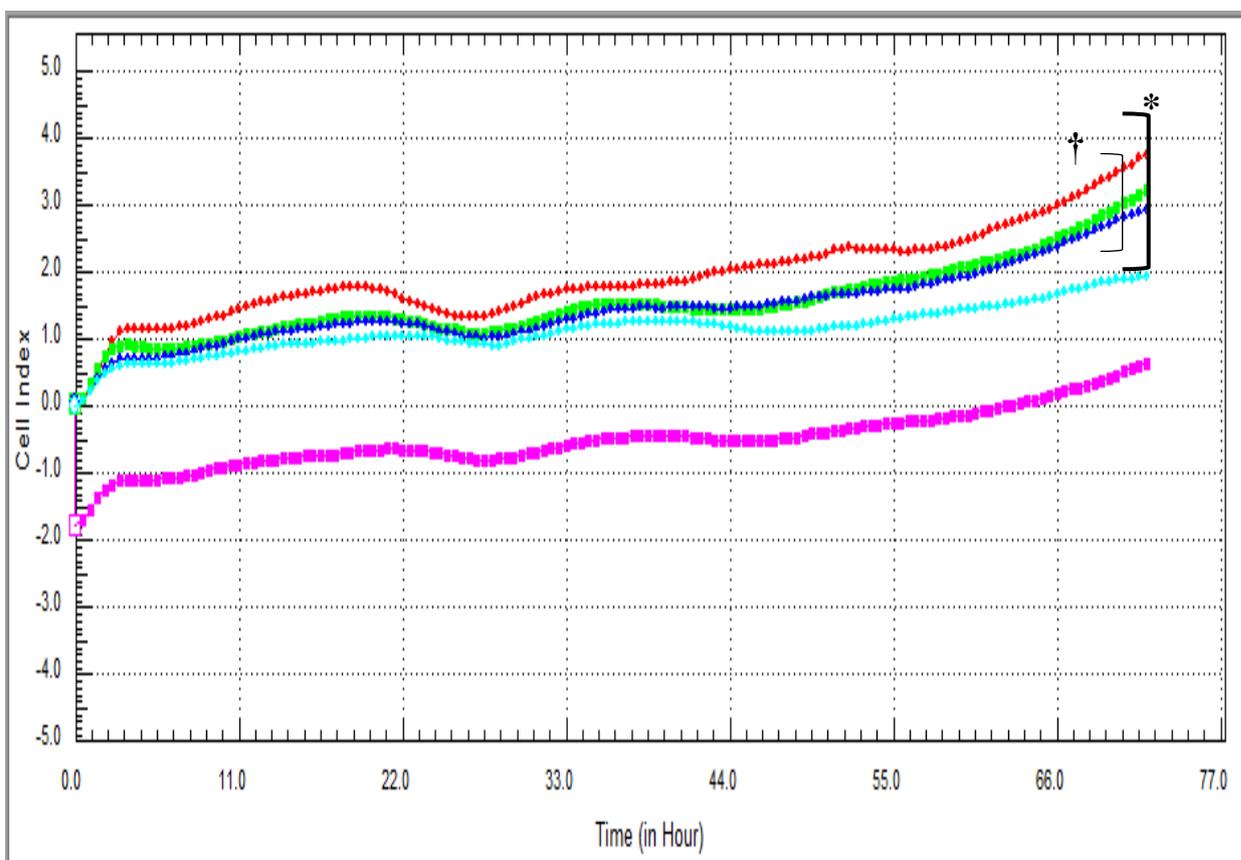
факторов (FCS) в питательной среде по данным изменения клеточного импеданса в режиме реального времени (рисунок 18).



Примечание: \* – ( $p < 0,001$ ) по сравнению с 0 % FCS.

Рисунок 17 – Клеточный цикл мезенхимных стволовых клеток костного мозга крыс в норме и при дефиците ростовых факторов (0 % FCS)

Так, наличие 33,4 МЕ/мл ЭПО в питательной приводило к более выраженному усилению пролиферативной активности МСК крыс в сравнении с дозой 66,8 и 100 МЕ/мл ЭПО (КИ =  $2,86 \pm 0,16$ ), (КИ =  $2,23 \pm 0,13$ ) и (КИ =  $1,88 \pm 0,08$ ) соответственно; ( $p < 0,05$ ) и было близко к эффекту 3 % FCS в питательной среде (КИ =  $3,14 \pm 0,11$ ), но существенно меньше по сравнению с 5 % FCS в питательной среде (КИ =  $3,67 \pm 0,31$ ); ( $p < 0,05$ ).



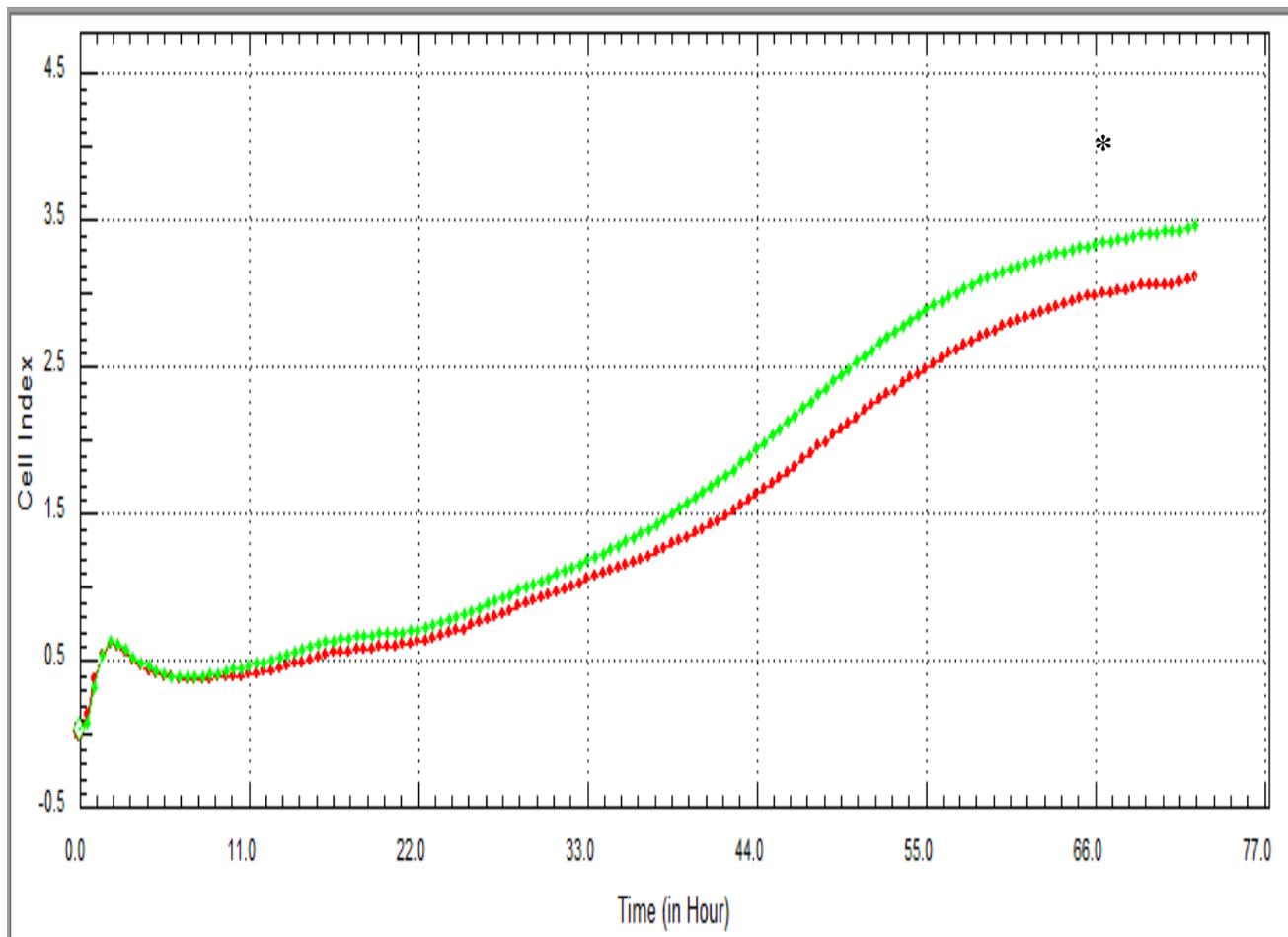
Примечание: \* – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с 100 МЕ/мл ЭПО; † – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с 66,8 МЕ/мл ЭПО.

Рисунок 18 – Пролиферация мезенхимных стволовых клеток костного мозга крыс по данным клеточного импеданса (режим реального времени) в ответ на ЭПО. 5 % FCS – красная линия; 3 % FCS – зеленая линия; 33,4 МЕ/мл ЭПО – синяя линия; 66,8 МЕ/мл ЭПО – голубая линия; 100 МЕ/мл ЭПО – розовая линия

Более того, повышенный уровень ЭПО способствовал снижению пролиферативной активности МСК крыс, особенно доза в 100 МЕ/мл ЭПО.

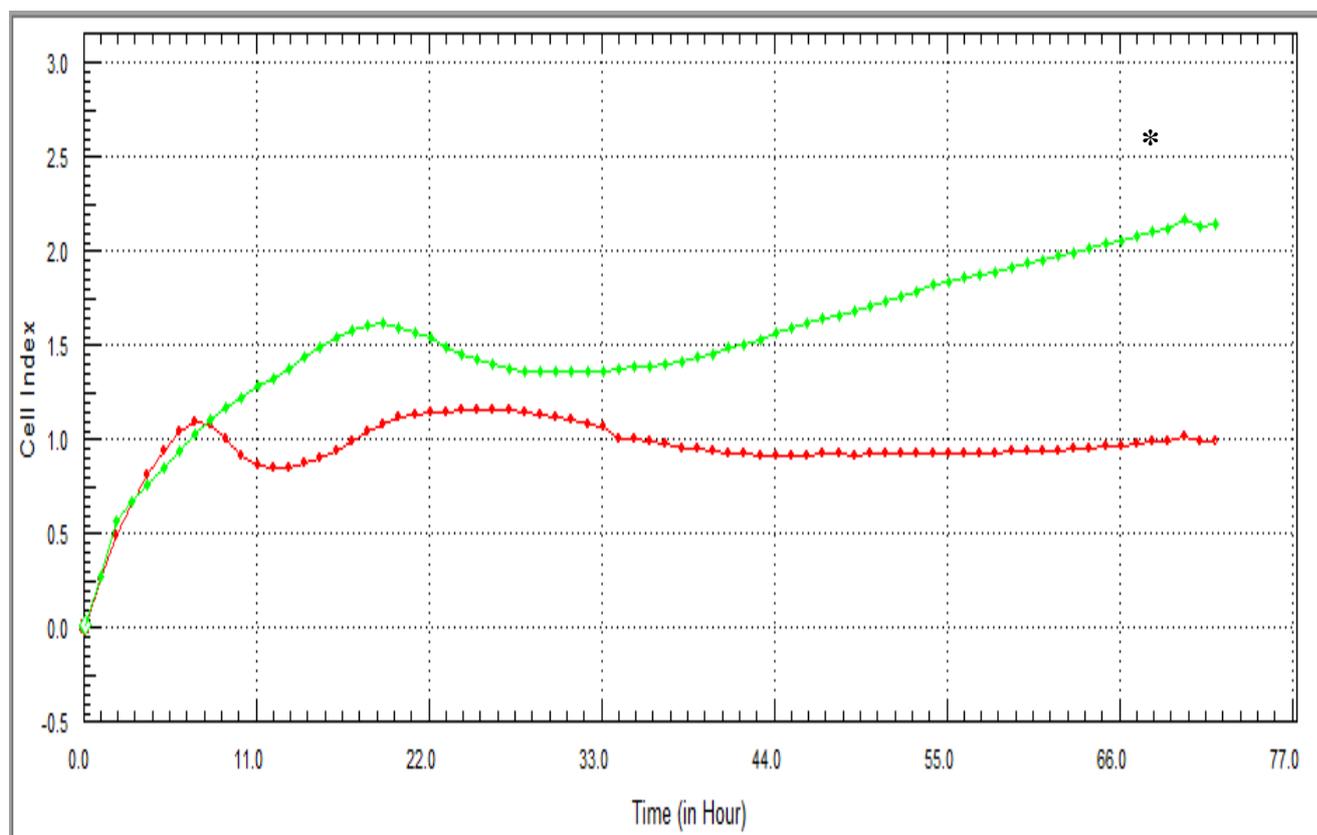
Далее было сопоставлено влияние 33,4 МЕ/мл ЭПО в культуральной среде с эффектом ростовых факторов в минимальной концентрации (1 % FCS) и показано, что ЭПО эффективнее стимулирует пролиферацию МСК крыс по сравнению с 1 % FCS (рисунок 19), (КИ =  $3,18 \pm 0,16$ ) и (КИ =  $2,56 \pm 0,3$ ); ( $p < 0,05$ ).

Нами исследован эффект ЭПО на пролиферативный и миграционный потенциал МСК костного мозга крыс в присутствии 10 % FCS по данным клеточного импеданса в режиме реального времени.



Примечание: \* – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с 1 % FCS.

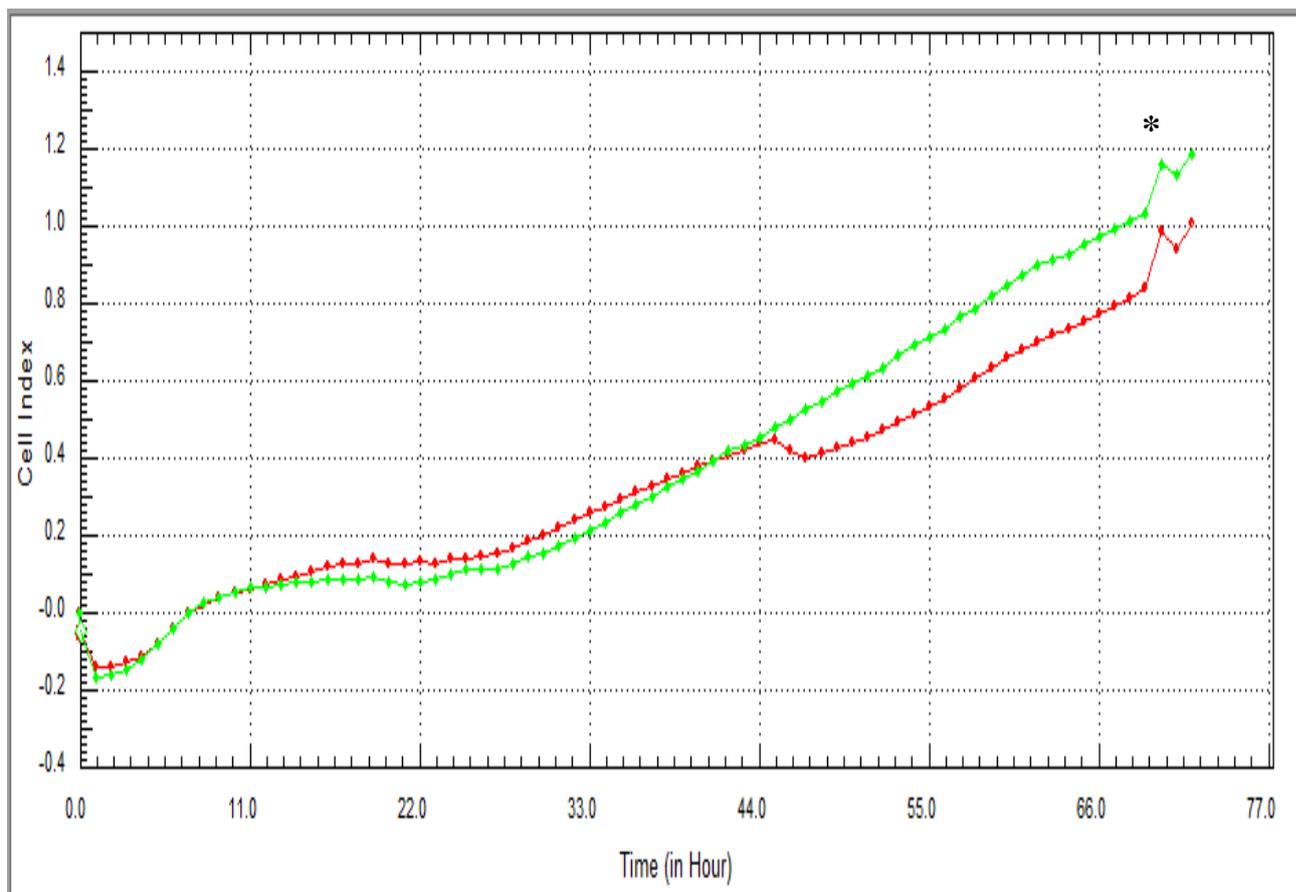
Рисунок 19 – Пролиферация мезенхимных стволовых клеток костного мозга крыс по данным клеточного импеданса в режиме реального времени в ответ на 33,4 МЕ/ мл ЭПО (зеленая линия) и минимальное содержание ростовых факторов в питательной среде (красная линия, 1 % FCS)



Примечание: \* – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с 10 % FCS.

Рисунок 20 – Пролиферация мезенхимных стволовых клеток костного мозга крыс по данным клеточного импеданса в режиме реального времени при культивировании в питательной среде с 10 % FCS (красная линия) и с добавлением 33,4 МЕ/мл ЭПО (зеленая линия)

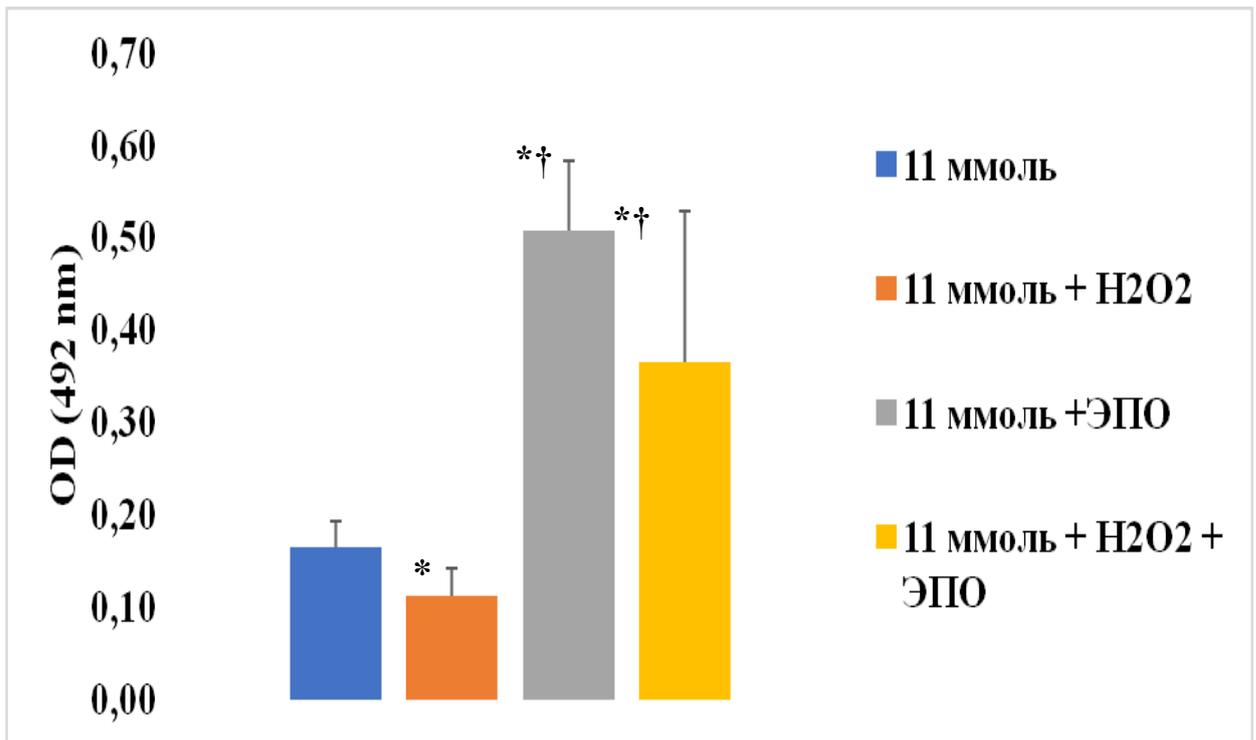
Показано, что добавление в питательную среду ЭПО усиливает функциональные свойства МС крыс. Так, отмечено двукратное увеличение пролиферативного потенциала МСК крыс в присутствии ЭПО (КИ =  $2,15 \pm 0,49$ ) и (КИ =  $1,0 \pm 0,09$ ) соответственно, для 10 % FCS+ЭПО и только 10 % FCS; ( $p < 0,05$ ) (рисунок 20). В отношении миграционного потенциала МСК крыс показано, что внесение в питательную среду ЭПО увеличивает его на 18 % (КИ =  $1,17 \pm 0,1$ ) и (КИ =  $0,99 \pm 0,1$ ) соответственно, для 10 % FCS+ЭПО и только 10 % FCS; ( $p < 0,05$ ) (рисунок 21).



Примечание: \* – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с 10 % FCS.

Рисунок 21 – Миграция мезенхимных стволовых клеток костного мозга крыс по данным клеточного импеданса в режиме реального времени при культивировании в питательной среде с 10 % FCS (красная линия) и с добавлением 33,4 МЕ/мл ЭПО (зеленая линия)

Известно, что функциональная активность МСК зависит от таких факторов микроокружения, как уровень глюкозы, наличие активных форм кислорода [424]. Исходя из этого, нами был исследован эффект различных уровней глюкозы в питательной среде, перекиси водорода (100 мкМ) и ЭПО (33,4 МЕ/мл) на пролиферацию, миграцию и продукцию NO МСК костного мозга крыс *in vitro*.



Примечание: \* – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с 11 ммоль; † – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с 11 ммоль+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Рисунок 22 – Пролиферация низким уровнем D-глюкозы (11 мМ) в питательной среде, окислительном стрессе и добавлении 33,4 МЕ/мл ЭПО

Как видно из рисунка 22 (см. приложение В.5), окислительный стресс существенно снижал пролиферацию МСК крыс по сравнению с контролем при культивировании клеток в среде с 11 мМ D-глюкозы («гипогликемия» – низкое содержание глюкозы в питательной среде;  $(0,11 \pm 0,01)$  и  $(0,16 \pm 0,03)$  ед. опт. плот. соответственно;  $p < 0,05$ ). В то же время наличие в питательной среде ЭПО при «гипогликемии» способствовало более чем двукратному возрастанию пролиферации в сравнении с базальным параметром пролиферативного потенциала клеток  $(0,51 \pm 0,08)$  и  $(0,16 \pm 0,03)$  ед. опт. плот. соответственно, в присутствии ЭПО и базальный уровень пролиферации;  $(p < 0,01)$ . Более того, наличие ЭПО в тест-системе при индукции окислительного стресса способствовало меньшей ингибции пролиферации по сравнению с МСК

крыс в условии «гипогликемии» и наличии ЭПО ( $0,37 \pm 0,16$ ) и ( $0,51 \pm 0,08$ ) ед. опт. плот. соответственно; ( $p < 0,01$ ).

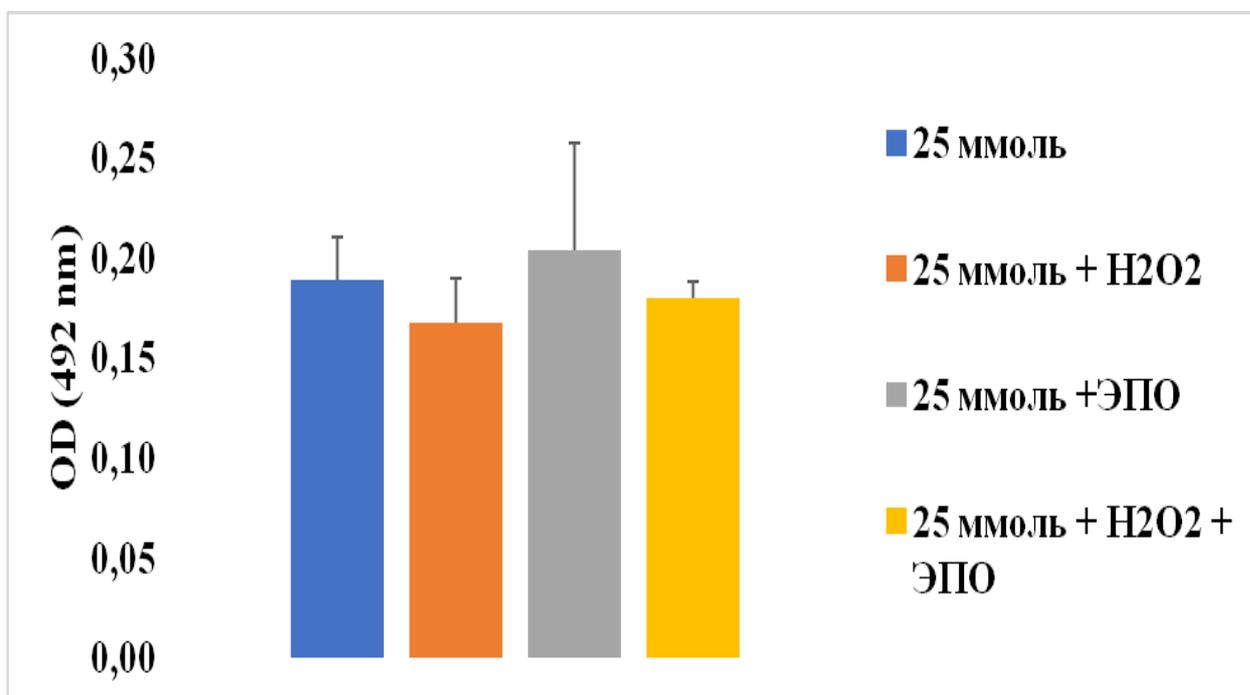


Рисунок 23 – Пролиферация мезенхимных стволовых клеток костного мозга крыс *in vitro* в условиях с более высоким уровнем D-глюкозы (25 мМ) в питательной среде, окислительном стрессе и добавлении 33,4 МЕ/мл ЭПО

Нами не выявлено существенных различий в исходной пролиферативной активности МСК крыс при культивировании в условии содержания 4,5 г/л (25 мМ) D-глюкозы – условно нормогликемии ( $0,19 \pm 0,2$ ) ед. опт. плот. в сравнении с тем же параметром при индукции окислительного стресса без ЭПО и с ЭПО ( $0,19 \pm 0,2$ ) ед. опт. плот. и ( $0,18 \pm 0,01$ ) ед. опт. плот. соответственно, а также при наличие в питательной среде только ЭПО ( $0,2 \pm 0,05$ ) ед. опт. плот. (рисунок 23); ( $p > 0,05$ ) (см. приложение В.6).

Показано, что сочетание «гипогликемии» с окислительным стрессом существенно снижает пролиферацию МСК костного мозга крыс ( $0,11 \pm 0,01$ ) ед. опт. плот.) *in vitro* по сравнению с пролиферативным

потенциалом клеток при нормогликемии и индукции оксидативного стресса ( $0,17 \pm 0,02$ ) ед. опт. плот.; ( $p < 0,05$ ).

Установлено, что при сравнении пролиферации МСК костного мозга крыс *in vitro* при «гипогликемии», но в присутствии ЭПО, клетки более выражено пролиферируют ( $0,51 \pm 0,08$ ) ед. опт. плот. по сравнению с аналогичным параметром клеток, росших в условии нормогликемии и наличия ЭПО ( $0,2 \pm 0,05$ ) ед. опт. плот.; ( $p < 0,01$ ).

В таблице 7 суммированы данные влияния различных уровней глюкозы в питательной среде в присутствии/отсутствии перекиси водорода и ЭПО на миграцию, продукцию оксида азота и распределение клеток по фазам клеточного цикла. Так, показано снижение миграционного потенциала МСК костного мозга крыс в направлении градиента концентрации перекиси водорода и ЭПО по сравнению с миграцией клеток в сторону градиента концентрации только перекиси водорода ( $p < 0,05$ ) при «гипогликемии».

Кроме этого, показано, что миграция МСК крыс меньше при нормогликемии в направлении градиента концентрации перекиси водорода, чем при «гипогликемии» ( $p < 0,05$ ).

При оценке влияния глюкозы на уровень продукции оксида азота МСК костного мозга крыс было показано, что нормогликемия стимулирует продукцию NO ( $p < 0,05$ ). Показано, что при культивировании МСК в присутствии ЭПО – «гипогликемия» и окислительный стресс увеличивают долю апоптотических/некротических клеток ( $p < 0,05$ ). Отмечено, что в условии нормогликемии ЭПО усиливал апоптоз/некроз МСК при индукции окислительного стресса ( $p < 0,05$ ).

В то же время при окислительном стрессе в присутствии ЭПО, нормогликемия уменьшала количество гибнущих клеток ( $p < 0,05$ ). Наличие ЭПО в питательной среде, независимо от содержания глюкозы и наличия окислительного стресса, увеличивало долю МСК костного мозга крыс в фазе покоя ( $G_0G_1$ ) ( $p < 0,05$ ).

Таблица 7 – Показатели миграции, продукции оксида азота (NO), клеточного цикла мезенхимных стволовых клеток костного мозга крыс *in vitro* при различном уровне глюкозы, окислительном стрессе и добавлении в питательную среду эритропоэтина ( $M \pm SD$ ); ( $n = 12$ )

Условия кондиционирования							
11 мМ	11 мМ+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	11 мМ+ЭП О	11 мМ+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +ЭПО	25 мМ	25 мМ+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	25 мМ+ЭП О	25 мМ+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +ЭПО
Миграция, количество клеток							
99,25±18,68	112,25±25,53	87,5±12,58	77,5±5,0	89,0±24,52	63,5±12,79	89,0±6,63	67,5±27,54
Уровень продукции NO, мкМ/мл							
23,96±3,98	30,29±4,54	23,27±3,11	30,01±8,95	25,07±3,97	26,16±5,62	22,5±2,49	32,07±3,96†
Фазы клеточного цикла							
subG <sub>0</sub> G <sub>1</sub>							
0,3±0,08	0,3±0,08	0,7±0,08*	1,3±0,08*	0,2±0,08	0,2±0,08	0,6±0,08†	0,8±0,08†□‡
G <sub>0</sub> G <sub>1</sub>							
93,87±0,84	95,47±1,23	96,73±1,27*	97,13±0,84*	96,13±0,84	96,6±1,23	98,1±0,83†	98,07±0,82†
S							
4,47±0,41	3,0±0,82*	1,73±0,12*	1,2±0,16*°	2,2±0,16*	2,2±0,16	0,8±0,16†	1,0±0,16†□•
G <sub>2</sub> /M							
1,36±0,16	1,23±0,1	0,84±0,0*	0,37±0,08*	1,47±0,08	1,0±0,08†	0,5±0,08†	0,13±0,08†
Примечание: * – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с 11 мМ; † – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с 25 мМ; ° – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с 11 мМ+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ; □ – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с 25 мМ+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ; ‡ – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с 11 мМ+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +ЭПО; • – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с 11 мМ+ЭПО.							

«Гипогликемия» в сочетании с окислительным стрессом независимо от наличия/отсутствия ЭПО и «гипогликемия» в сочетании с ЭПО снижали долю МСК крыс в фазе синтеза клеточного цикла ( $p < 0,05$ ).

Более того, ЭПО снижал долю клеток в синтетической фазе клеточного цикла при окислительном стрессе по сравнению с тем же показателем, но без ЭПО ( $p < 0,05$ ). Аналогично ЭПО снижал долю клеток в S-фазе, в условиях нормогликемии как при окислительном стрессе, так и без него ( $p < 0,05$ ). Также при окислительном стрессе ЭПО усиливал снижение доли клеток в S-фазе ( $p < 0,05$ ). «Гипогликемический» стресс также снижал долю клеток в S-фазе (без ЭПО и с ЭПО) ( $p < 0,05$ ). ЭПО значительно уменьшал долю МСК костного мозга крыс в фазе G<sub>2</sub>/M при «гипогликемии» и окислительном стрессе ( $p < 0,05$ ). Причем в условиях окислительного стресса ЭПО значительно уменьшал долю клеток в фазе G<sub>2</sub>/M ( $p < 0,05$ ). Что касается, нормогликемии, то наличие в питательной среде как ЭПО, так и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> или их сочетания значительно уменьшало долю таких клеток по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ). Следует заметить, что окислительный стресс на фоне нормогликемии в питательной среде существенно снижал долю делящихся клеток ( $p < 0,05$ ).

### **Заключение**

Предобработка МСК человека в течение 60 минут снижает апоптоз/некроз, а при 72 часах ведет к увеличению апоптоза/некроза. ЭПО способствует колониеобразованию МСК человека, пролиферативной активности в дозах до 66,8 МЕ/мл, миграции. Наличие ЭПО в питательной среде с низким содержанием глюкозы способствует пролиферации МСК крыс в норме и при окислительном стрессе, задержке клеток в фазе покоя независимо от дозы глюкозы (2 г/л и 4,5 г/л).

### **3.5 Характеристика функционального потенциала мезенхимных стволовых клеток человека на разные сроки экспансии *in vitro***

Морфофункциональные свойства МСК зависят от количества пассажей (*in vitro* старение клеток, репликативное старение), возраста донора (чем старше, тем более выраженные изменения в дифференцировочном потенциале клеток)

[130]. У старых крыс введение ЭПО инициировало антивозрастные изменения [92].

Нами проведено исследование влияния ЭПО на морфофункциональные свойства первичной культуры МСК костного мозга человека (4-й пассаж) при увеличении номера пассажа клеток *in vitro*. Для этого часть клеток культивировали в стандартных условиях до 8-го пассажа, а часть МСК человека росли в присутствии ЭПО (МСК–ЭПО) вплоть до 3-го пассажа, что сопоставимо со сроками культивирования МСК без эритропоэтина, с учетом 0-го пассажа для МСК–ЭПО (обе культуры МСК пересеивались 4 раза).

В первую очередь мы сравнили уровень экспрессии молекул адгезии, количество рецепторов к ЭПО и ко-экспрессию ЭПОР/CD131 при старении МСК *in vitro* (таблица 8).

Так, при репликативном старении МСК костного мозга человека в стандартных условиях культивирования *in vitro* отмечено значимое увеличение уровней экспрессии CD18, CD18/CD54 и ЭПОР/CD131 в сравнении с аналогичными показателями для МСК 4-го пассажа ( $p < 0,05$ ). В то же время выявлено значимое снижение уровней экспрессии CD54, CD49a, CD146 и CD131 в сравнении с МСК 4-го пассажа ( $p < 0,05$ ). Не выявлено существенного изменения уровней экспрессии CD29, CD44 и ЭПОР по сравнению с МСК 4-го пассажа ( $p > 0,05$ ). Следует отметить тот факт, что на МСК 8-го пассажа значимо снижена экспрессия маркера стволовости клеток – CD146 и одной из единиц неканонического сигнального пути для ЭПО – CD131 ( $p > 0,05$ ).

Для МСК–ЭПО на поздних сроках культивирования (3-й пассаж) выявлено значимое увеличение уровней экспрессии CD18, CD18/CD54, CD54, CD29, CD44, ЭПОР/CD131 в сравнении с МСК 4-го пассажа ( $p < 0,05$ ).

Таблица 8 – Уровень экспрессии молекул адгезии, ЭПОР, ко-экспрессию ЭПОР/CD131 в на МСК и МСК–ЭПО человека (3-й пассаж) ( $M \pm SD$ ), %; (n = 20)

Фенотип	МСК 4-й пассаж	Номер пассажа клеток		
		МСК 8-й пассаж	МСК–ЭПО 0-й пассаж	МСК–ЭПО 3-й пассаж
CD18+	0,93 ± 0,4	1,83 ± 0,36*	5,83 ± 4,09	1,56 ± 0,36*
CD18+/CD54+	0,23 ± 0,12	0,92 ± 0,05*	1,01 ± 0,16*	0,82 ± 0,05*†
CD54+	2,8 ± 0,69	2,08 ± 0,34*	7,9 ± 0,78*†	7,48 ± 1,51*†
CD29+	91,3 ± 0,36	91,87 ± 0,85	96,2 ± 0,45*†	97,45 ± 0,44*†
CD44+	92,93 ± 0,7	91,96 ± 0,93	92,93 ± 0,4	94,37 ± 1,25†
CD49a+	9,8 ± 2,61	4,18 ± 0,7*	13,97 ± 0,81†	15,08 ± 1,67*†
CD146+	41,67 ± 1,53	14,5 ± 1,29*	10,13 ± 0,05*†	16,12 ± 5,36*
ЭПОР+	7,27 ± 0,83	7,16 ± 2,16	10,37 ± 1,94	8,04 ± 1,53
ЭПОР+/CD131+	0,5 ± 0,3	1,52 ± 0,05*	2,77 ± 0,56*†	0,92 ± 0,05*†
CD131+	41,83 ± 0,74	23,0 ± 7,61*	5,7 ± 2,74†	8,88 ± 1,51*†
Примечание: * – (p < 0,05) по сравнению с МСК 4-го пассажа; † – (p < 0,05) по сравнению с МСК 8-го пассажа.				

Также показано, что уровень экспрессии CD146 и CD131 значимо снижен по сравнению с аналогичными показателями для МСК 4-го пассажа (p < 0,05). Не выявлено существенных различий по уровню экспрессии ЭПОР на МСК–ЭПО в сравнении с МСК 4-го пассажа (p < 0,05). МСК–ЭПО на 0-ом пассаже не отличались по уровню экспрессии CD18, CD44, CD49a и ЭПОР от МСК 4-го пассажа (p < 0,05). Кроме этого, для МСК–ЭПО на 0-ом пассаже показано увеличение уровня экспрессии CD54, CD29, CD49a, ЭПОР/CD131 и снижение CD146, CD131 по сравнению с МСК 8-го пассажа.

Установлено, что культивирование МСК с ЭПО до 3-го пассажа приводило к увеличению экспрессии на мембране клеток следующих молекул адгезии:

CD54; CD29; CD44; CD49a, а также доли апоптотических/некротических клеток и клеток в фазе митоза клеточного цикла в сравнении с МСК (8-й пассаж), которые растили в аналогичной питательной среде и при тех же условиях культивирования, но без ЭПО ( $p < 0,05$ ). ЭПО способствовал снижению количества МСК, экспрессирующих общую бета цепь для цитокинов и ко-экспрессию ЭПОР/CD131 ( $p < 0,05$ ).

Нами проведено исследование влияния срока и условий культивирования МСК костного мозга человека на клеточный цикл и апоптоз/некроз (таблица 9). Для МСК–ЭПО на раннем и позднем сроке культивирования с ЭПО характерно существенно снижение как «раннего», так и «позднего» апоптоза, и, в меньшей степени, некроза по сравнению с аналогичными параметрами для МСК 4-го пассажа ( $p < 0,05$ ). Кроме этого, доля МСК костного мозга человека на 8-м пассаже в  $subG_0G_1$  (апоптотические/некротические клетки) и в S (клетки с усилением синтеза) фазах клеточного цикла меньше в сравнении с МСК 4-го пассажа ( $p < 0,05$ ).

С другой стороны, доля МСК костного мозга человека на 8-м пассаже в  $G_0G_1$  и  $G_2/M$  (фаза покоя и деления соответственно) значимо выше, чем для МСК 4-го пассажа ( $p < 0,05$ ). Доля МСК–ЭПО на позднем сроке культивирования с ЭПО в фазе клеточного цикла  $subG_0G_1$  и S значимо меньше, чем для МСК 4-го пассажа ( $p < 0,05$ ). В то же время МСК–ЭПО на раннем сроке культивирования с ЭПО проявляли большую митотическую активность по сравнению с МСК 4-го, 8-го и МСК–ЭПО на поздних сроках культивирования с ЭПО ( $p < 0,05$ ).

Не выявлено значимого влияния длительной экспозиции МСК с ЭПО на долю клеток в фазе покоя и митоза по сравнению с аналогичными показателями для МСК 4-го пассажа ( $p > 0,05$ ).

Таблица 9 – Клеточный цикл и апоптоз/некроз МСК и МСК–ЭПО человека (M ± SD), %; (n = 20)

Фенотип	МСК 4-й пассаж	Номер пассажа		
		МСК 8-й пассаж	МСК–ЭПО 0-й пассаж	МСК–ЭПО 3-й пассаж
Ранний апоптоз	14,93 ± 0,41	12,47 ± 4,62	6,03 ± 3,7*†	11,3 ± 2,27*
Апоптоз	5,57 ± 0,41	1,17 ± 0,46*	6,57 ± 2,36*	0,4 ± 0,08*†
Некроз	6,3 ± 1,44	3,33 ± 1,25*	5,0 ± 0,49	4,43 ± 0,25*
subG <sub>0</sub> G <sub>1</sub>	3,7 ± 0,16	1,83 ± 0,17*	2,03 ± 0,78	3,18 ± 0,17*†
G <sub>0</sub> G <sub>1</sub>	84,0 ± 1,63	91,45 ± 0,57*	80,03 ± 9,89	86,04 ± 0,86†
S	10,2 ± 0,16	4,99 ± 0,09*	10,0 ± 0,82†	9,26 ± 0,56*†
G <sub>2</sub> /M	0,9 ± 0,16	1,69 ± 0,3*	5,0 ± 0,49*†	1,3 ± 0,53
Примечание: * – (p < 0,05) по сравнению с МСК 4-й пассаж; † – (p < 0,05) по сравнению с МСК 8-й пассаж.				

Длительное культивирование МСК с ЭПО способствовало значимому снижению доли МСК–ЭПО в поздней фазе апоптоза, в subG<sub>0</sub>G<sub>1</sub> и G<sub>0</sub>G<sub>1</sub> фазах клеточного цикла и увеличению доли клеток в S фазе клеточного цикла по сравнению с МСК 8-го пассажа (p < 0,05).

По данным прижизненной окраски МСК костного мозга человека (8-й пассаж) количество клеток в апоптозе/некрозе в стандартных условиях роста больше, чем для МСК–ЭПО, а при индукции окислительного стресса сохраняется меньше жизнеспособных клеток (рисунок 24).

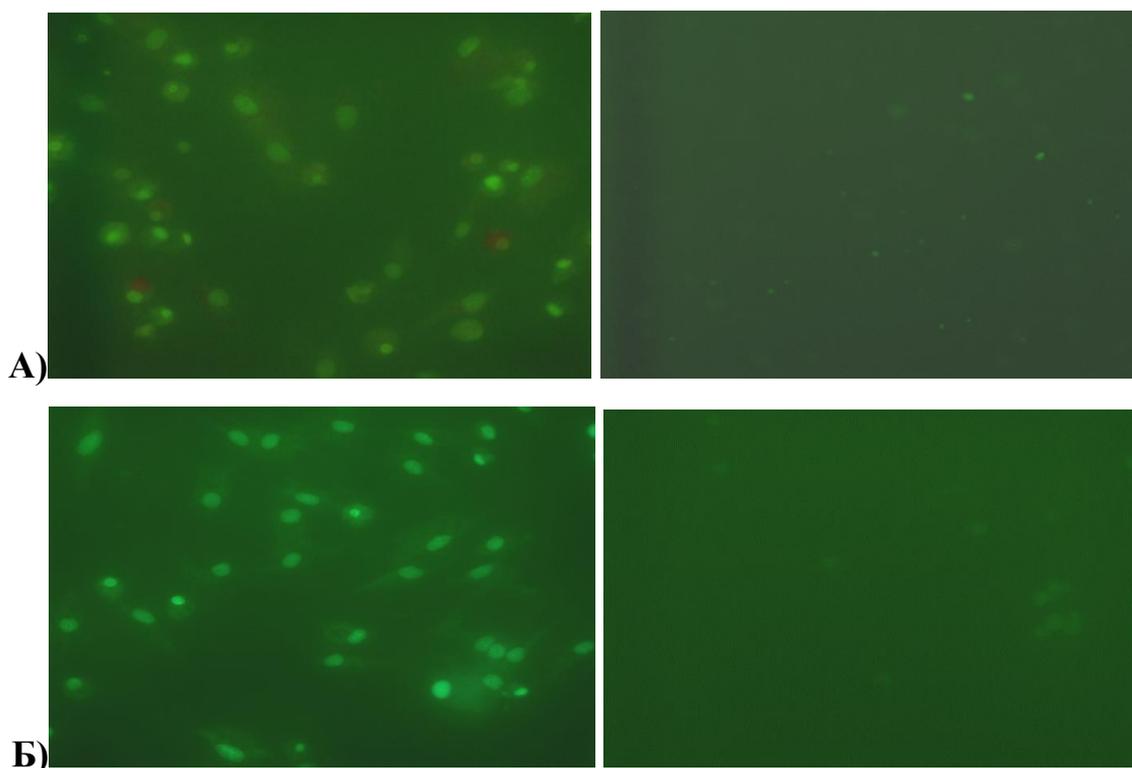


Рисунок 24 – Апоптоз/некроз МСК (А, 8-й пассаж) и МСК–ЭПО (Б, 3-й пассаж) костного мозга человека по данным витальной окраски акридиновым оранжевым и этидиум бромидом, ув.  $\times 20$ .

Слева – стандартное условие культивирования, справа – при окислительном стрессе. Живые клетки ядро и цитоплазма зеленого цвета.

Апоптоз/некроз – ядро желто/красного цвета

Таблица 10 – КОЕ МСК и МСК–ЭПО костного мозга человека ( $M \pm SD$ ), количество КОЕ %; ( $n = 20$ )

Условия культивирования МСК	МСК 4-й пассаж	Номер пассажа		
		МСК 8-й пассаж	МСК–ЭПО 0-й пассаж	МСК–ЭПО 3-й пассаж
10 % FCS (контроль)	$12,5 \pm 2,0$	$27,2 \pm 3,03^*$	$35,0 \pm 4,08^*$	$61,67 \pm 20,66^{*\dagger}$
10 % FCS+ЭПО	Не исследовали	$29,8 \pm 2,68$	не исследовали	$65,0 \pm 19,27^\dagger$
0 % FCS	Не исследовали	$3,8 \pm 0,45^{**}$	не исследовали	$3,83 \pm 0,41^{**}$
0 % FCS+ЭПО	Не исследовали	$9,0 \pm 1,0^{**}$	не исследовали	$10,67 \pm 1,03^{**}$

Условия культивирования МСК	МСК 4-й пассаж	Номер пассажира		
		МСК 8-й пассаж	МСК–ЭПО 0-й пассаж	МСК–ЭПО 3-й пассаж
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,0 ± 0,0*	0,6 ± 0,55*	0,0 ± 0,0*	0,5 ± 0,55*
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +ЭПО	не исследовали	2,0 ± 1,22*	не исследовали	4,0 ± 1,55*
64 мМ D- глюкозы	4,0 ± 0,82*	10,0 ± 1,0*	17,5 ± 2,04*†	10,17 ± 1,72*
64 мМ D- глюкозы+ ЭПО	не исследовали	18,0 ± 0,71*	не исследовали	30,33 ± 1,51*†
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +64 мМ D- глюкозы	0,0 ± 0,0*	не исследовали	0,0 ± 0,0*	не исследовали
Примечание: * – (p < 0,05) по сравнению с МСК 4-й пассаж; ** – (p < 0,05) по сравнению с контролем; † – (p < 0,05) по сравнению с МСК 8-й пассаж.				

Далее мы сосредоточили свое исследование на выявлении возможных различий морфофункциональных особенностей первичных культур МСК человека с учетом условий культивирования (дефицит ростовых факторов, окислительный стресс, гипергликемия) на поздних сроках пассажира.

Депривация ростовых факторов (0 % FCS), индукция окислительного стресса (100 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) и гипергликемия (64 мМ D-глюкозы) значительно снижали способность к образованию колоний МСК в сравнении с контролем (таблица 10); (p < 0,05).

Добавление ЭПО к клеткам, росшим при депривации ростовых факторов, в условии окислительного стресса и при гипергликемии значительно увеличивало количество КОЕ клетками по сравнению с количеством КОЕ в аналогичных условиях без ЭПО в питательной среде (p < 0,05). Более того, МСК–ЭПО на ранних и поздних сроках культивирования с ЭПО обладали большей способностью формировать КОЕ по сравнению с МСК 4-го и 8-го пассажей (p < 0,05).

Кроме этого нами проведено сравнительное исследование пролиферативной активности клеток на поздних пассажах – МСК (8-й пассаж) и МСК–ЭПО (3-й пассаж) – по данным МТТ-теста (таблица 11, рисунок 25).

Показано, что МСК–ЭПО обладают повышенной пролиферативной способностью в сравнении с МСК 8-го пассажа ( $p < 0,05$ ). Дефицит ростовых факторов (0 % FCS), окислительный стресс (100 мкМ  $H_2O_2$ ) и гипергликемия (64 ммоль D-глюкозы) существенно угнетают пролиферацию МСК и МСК–ЭПО по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ).

В то же время, добавление ЭПО в питательную среду при индукции депривации ростовых факторов, окислительного стресса и гипергликемии частично отменяет негативный эффект условий кондиционирования МСК и МСК–ЭПО ( $p < 0,05$ ).

Более того, МСК–ЭПО в меньшей степени снижали свою пролиферативную активность в условиях неблагоприятного микроокружения (депривация ростовых факторов, окислительный стресс и гипергликемия) и лучше отвечали приростом пролиферативной активности на ЭПО, чем МСК 8-го пассажа (за исключением условия индукции гипергликемии) ( $p < 0,05$ ).

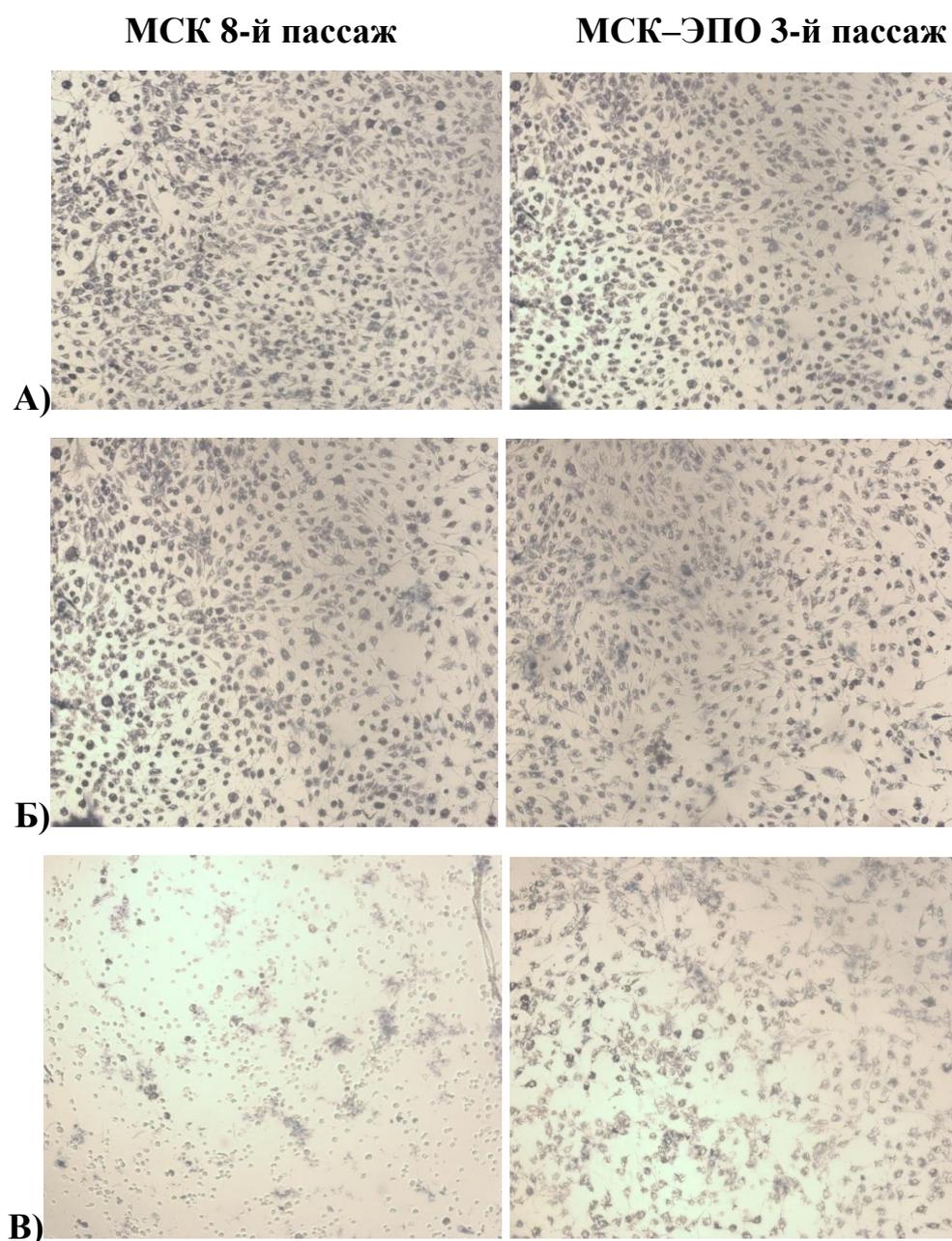
Таблица 11 – Пролиферация МСК и МСК–ЭПО костного мозга человека ( $M \pm SD$ ), ед. опт. плот.; ( $n = 20$ )

Условия культивирования МСК	МСК 8-й пассаж	МСК–ЭПО 3-й пассаж
10 % FCS (контроль)	0,272 ± 0,04	0,581 ± 0,127†
10 % FCS+ЭПО	0,24 ± 0,016*	0,551 ± 0,042*†
0 % FCS	0,009 ± 0,008*	0,033 ± 0,019*
0 % FCS+ЭПО	0,029 ± 0,005*	0,154 ± 0,033*†
$H_2O_2$	0,016 ± 0,005*	0,021 ± 0,01*
$H_2O_2$ +ЭПО	0,028 ± 0,007*	0,033 ± 0,018*
64 мМ D-глюкозы	0,108 ± 0,043*	0,046 ± 0,041*†
64 мМ D-глюкозы+ ЭПО	0,145 ± 0,022*	0,123 ± 0,052*

Примечание: \* – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем; † – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с МСК 8-й пассаж.

МСК и МСК–ЭПО значительно снижали свою пролиферацию при наличии в питательной среде ЭПО в сравнении с контрольными показателями пролиферации клеток ( $p < 0,05$ ).

По данным микрофотографий клеток по окончании МТТ-теста отмечено существенное уменьшение количества МСК 8-го пассажа и МСК–ЭПО, включивших и восстановивших тетразолиевый краситель до формазана, при индукции окислительного стресса и гипергликемии; внесение ЭПО в культуру клеток способствует увеличению количества клеток, позитивных по формазану.



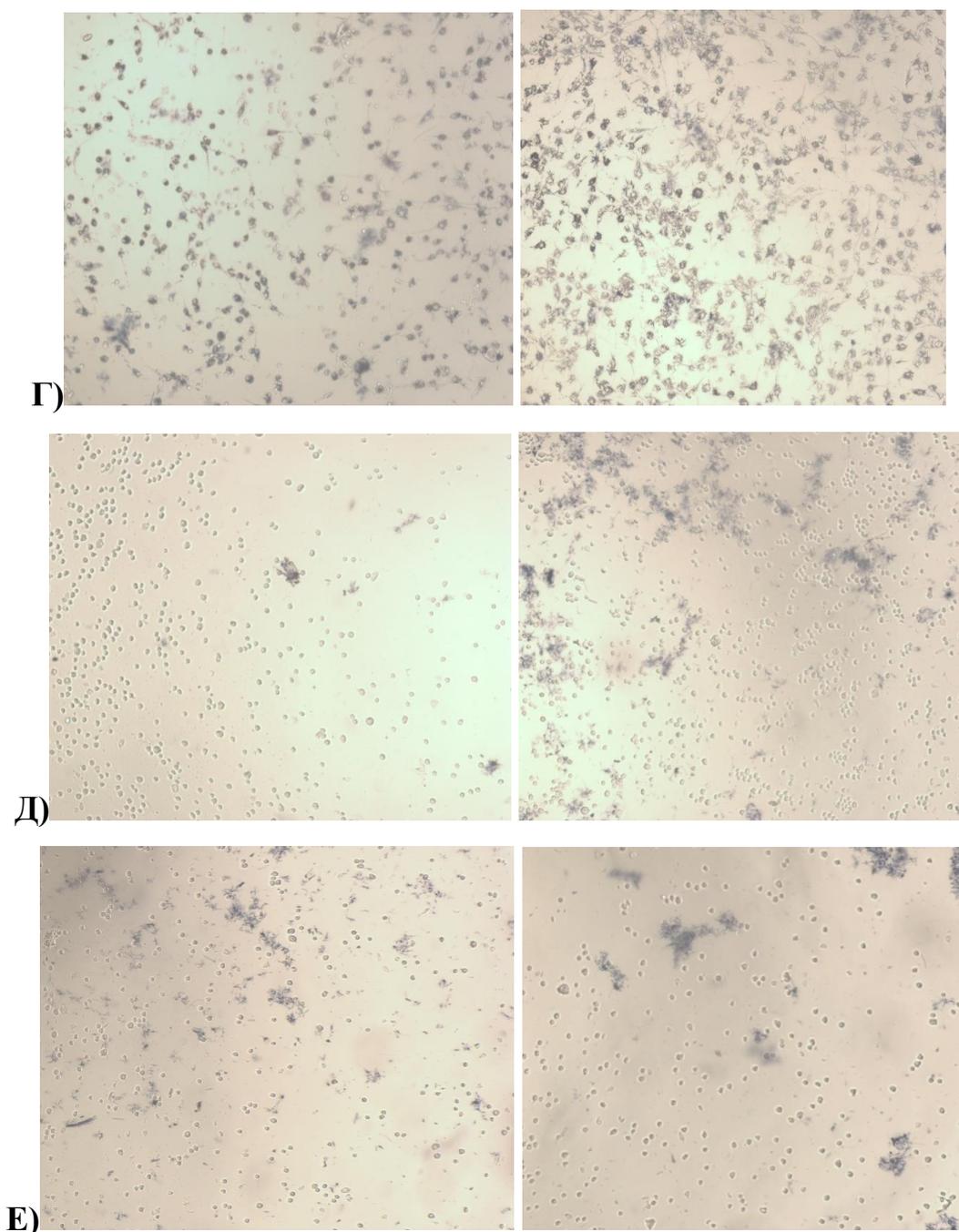


Рисунок 25 – Микрофотографии пролиферативной активности МСК (8-й пассаж) и МСК–ЭПО (3-й пассаж) костного мозга человека по данным МТТ-теста (клетки фиолетового цвета, ув.  $\times 10$ ).

А – спонтанная; Б - ЭПО (33,4 МЕ/мл); В – окислительный стресс (100 мкМ перекиси водорода); Г – окислительный стресс+ЭПО;  
 Д – 64 мМ D-глюкозы; Е – 64 мМ D-глюкозы +ЭПО

Пролиферацию МСК 8-го пассажа и МСК–ЭПО также оценивали в режиме «реального времени» по изменению клеточного импеданса (рисунок 26). По данным исследования клеточного импеданса МСК и МСК–ЭПО, депривация ростовых факторов, индукция окислительного стресса и гипергликемии значительно снижают пролиферативный потенциал клеток по сравнению со спонтанной пролиферацией и пролиферацией в присутствии ЭПО ( $p < 0,05$ ).

Также нами проведена оценка влияния ЭПО при репликативном старении МСК на миграционный потенциал клеток от краев раневого дефекта монослоя клеток в сторону бесклеточного пространства (рисунок 27, 28; таблица 12). Показано значимое снижение миграционного потенциала МСК–ЭПО в присутствии ЭПО в сравнении с аналогичным параметром для МСК 8-го пассажа ( $p < 0,05$ ).

В то же время отмечена большая миграционная активность МСК–ЭПО в условиях дефицита ростовых факторов без ЭПО и при добавлении в питательную среду ЭПО по сравнению с МСК 8-го пассажа ( $p < 0,05$ ). Существенных различий миграционной активности МСК–ЭПО и МСК 8-го пассажа при индукции окислительного стресса и гипергликемии без ЭПО и с добавлением ЭПО в питательную среду не выявлено. Однако, миграция МСК 8-го пассажа и МСК–ЭПО при дефиците ростовых факторов, окислительном стрессе и гипергликемии снижена по сравнению с контролем для МСК 8-го пассажа и МСК–ЭПО ( $p < 0,05$ ).

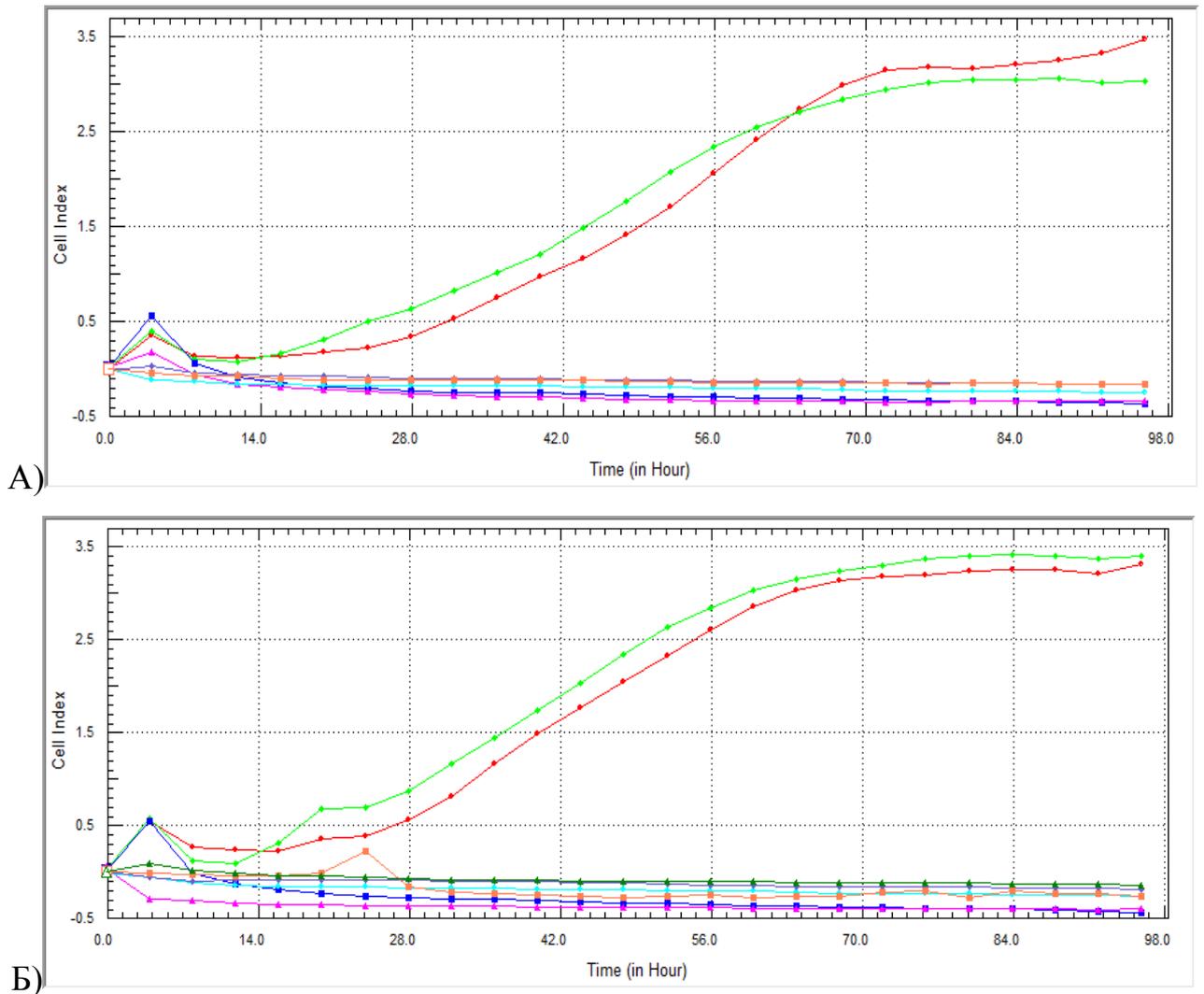
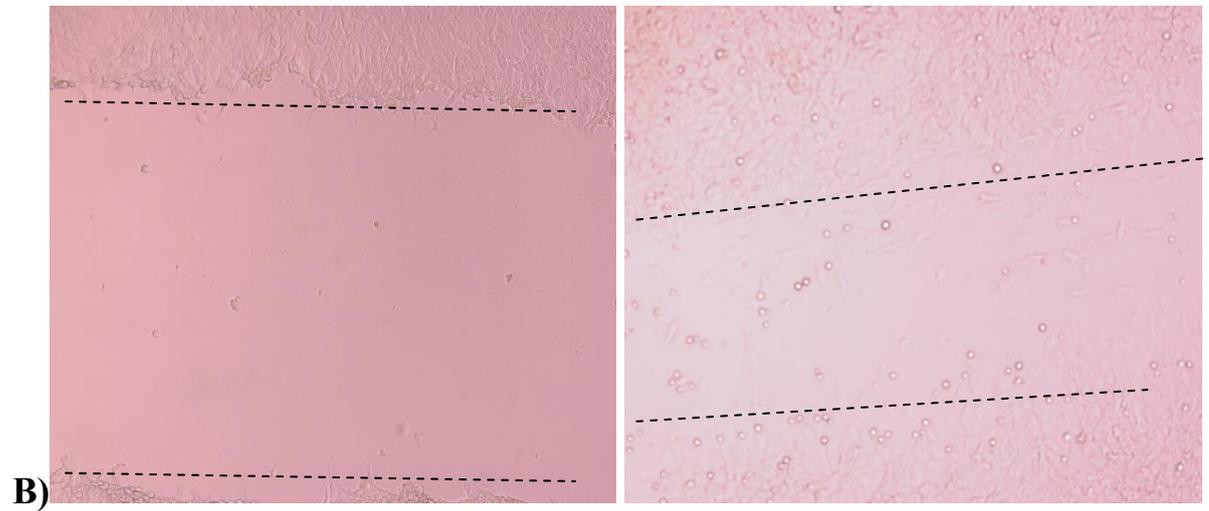
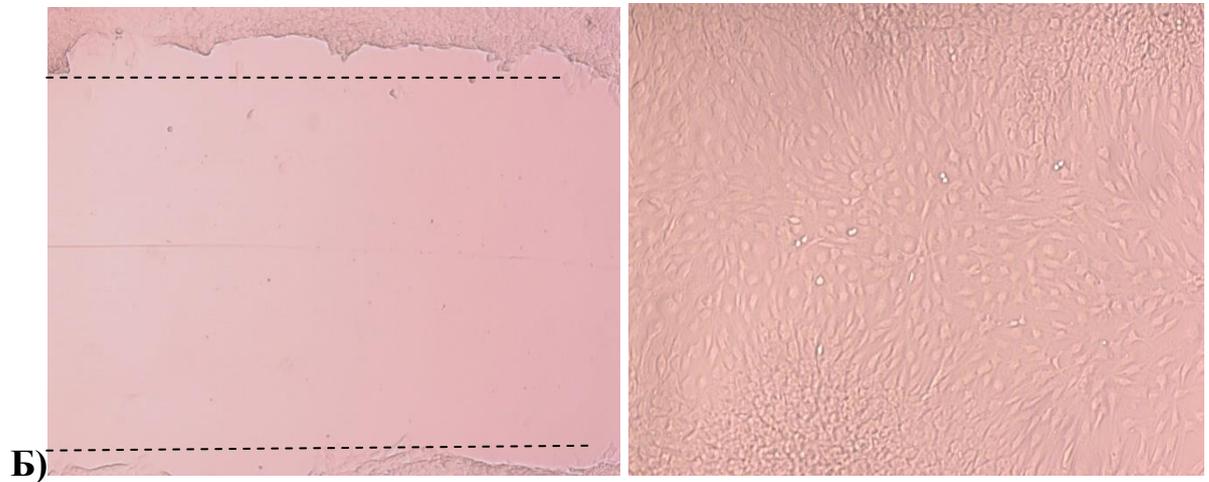
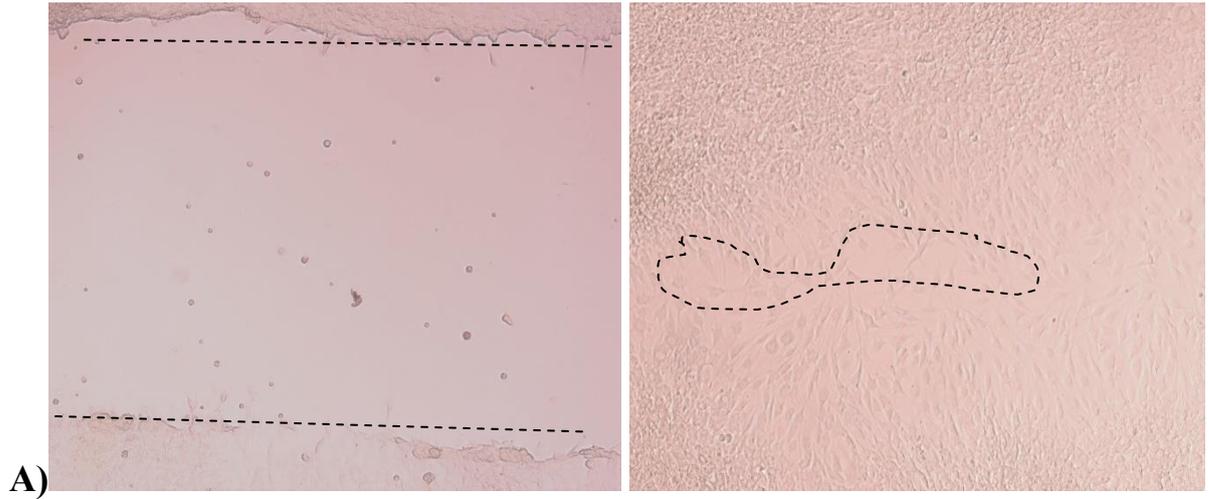


Рисунок 26 – Пролиферативный потенциал МСК

(А, 8-й пассаж) и МСК–ЭПО (Б, 3-й пассаж) костного мозга человека по данным клеточного импеданса в «режиме реального» времени. Красная линия – МСК и МСК–ЭПО базальная пролиферация; зеленая линия – МСК и МСК–ЭПО пролиферация при наличии ЭПО; синяя линия – МСК и МСК–ЭПО при 0 % FCS; розовая линия – МСК и МСК–ЭПО при 0 % FCS+ЭПО; голубая линия – МСК и МСК–ЭПО при окислительном стрессе; фиолетовая линия – МСК и МСК–ЭПО при окислительном стрессе+ЭПО; оранжевая линия – МСК и МСК–ЭПО при 64 мМ D-глюкозы; темно-зеленая линия – МСК и МСК–ЭПО при 64 мМ D-глюкозы+ЭПО

**0 часов**

**24 часа**



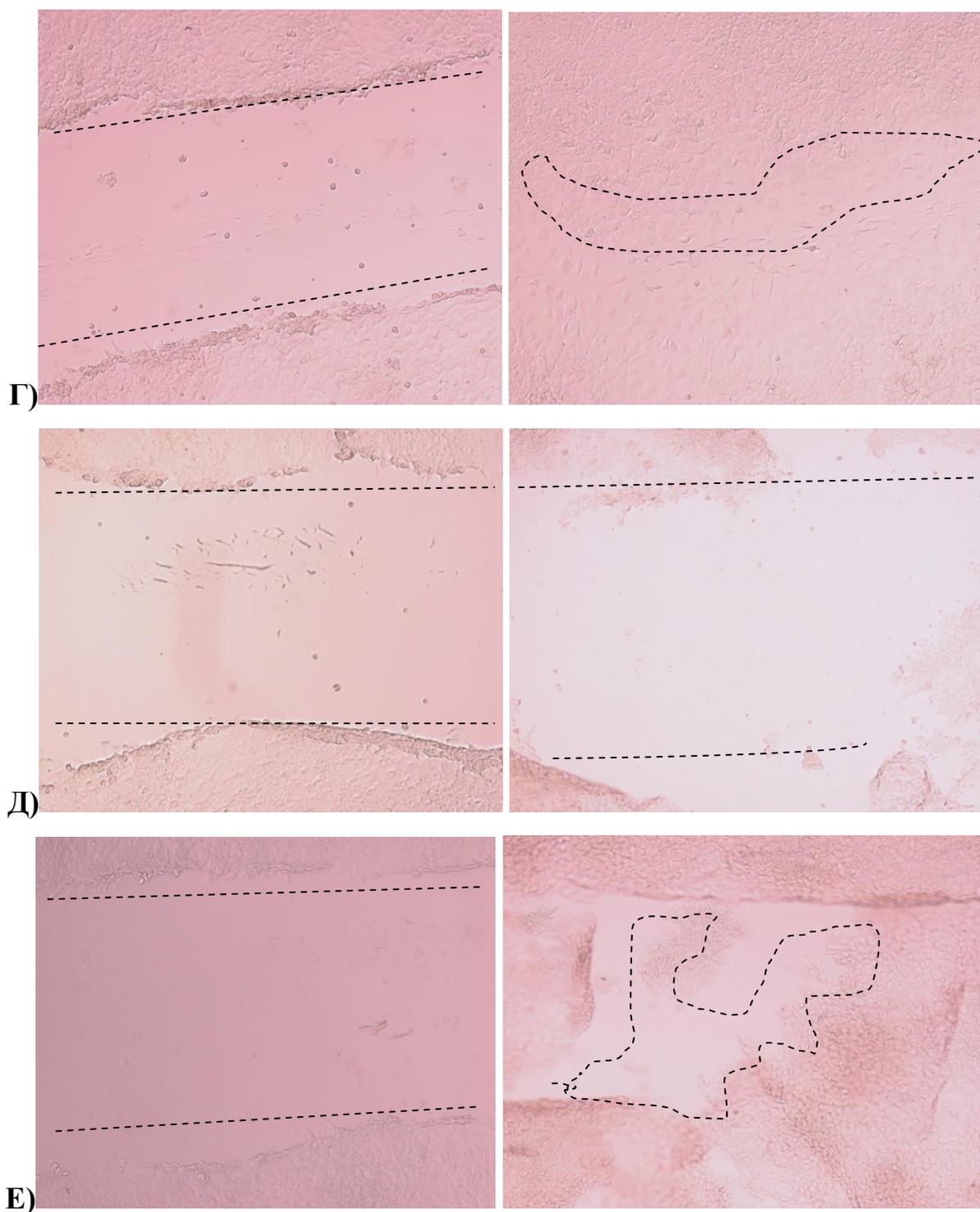
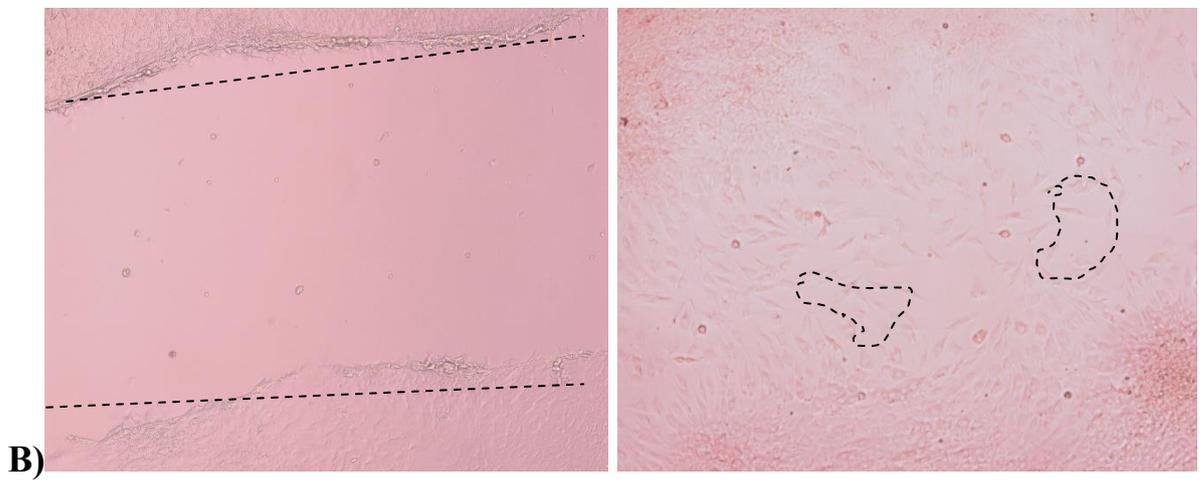
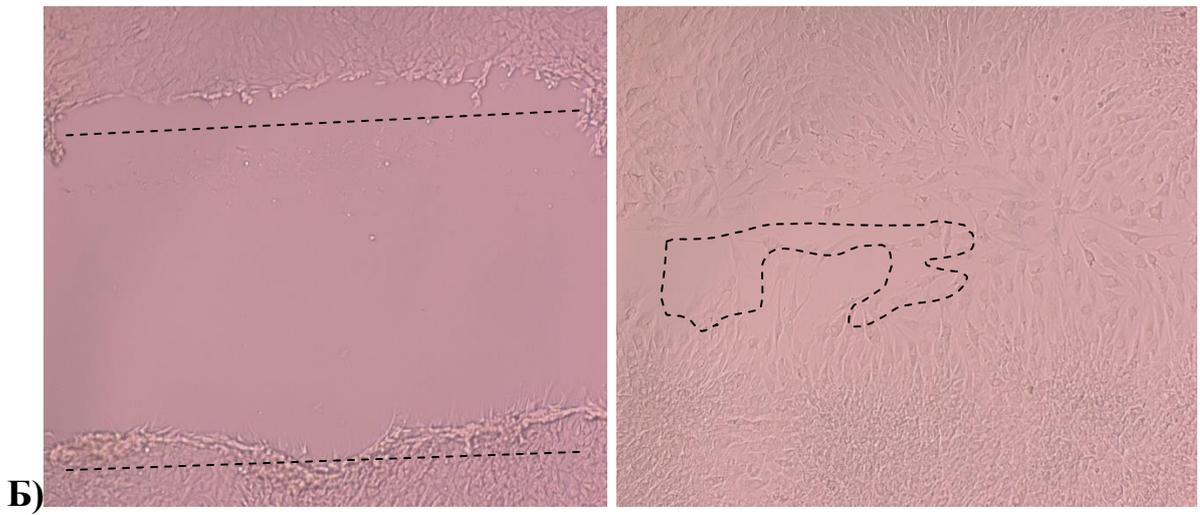
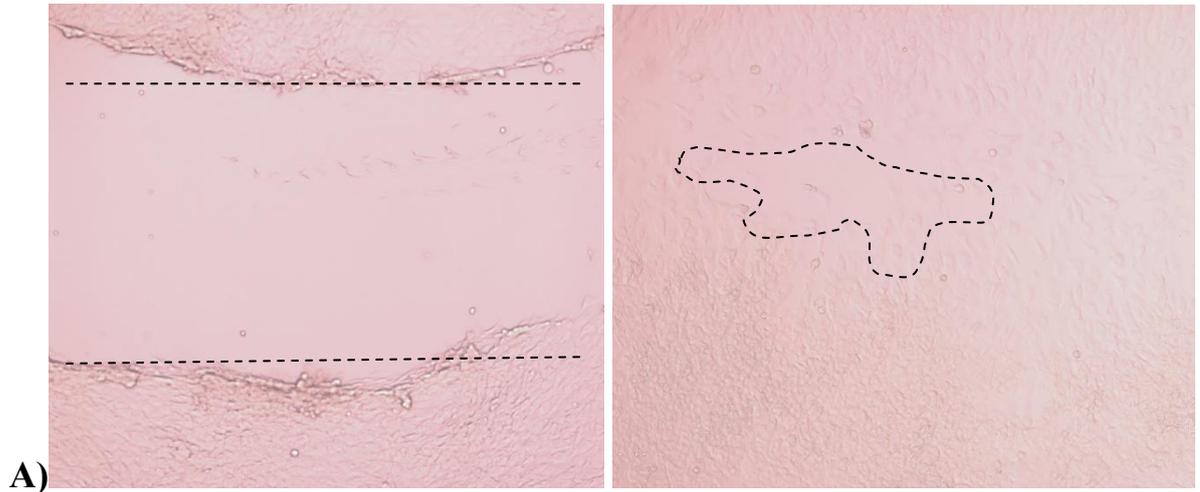


Рисунок 27 – Миграционный потенциал МСК (8-й пассаж) костного мозга человека в тесте «заживления раны», ув.  $\times 10$ .  
 А - стандартные условия культивирования клеток; Б – с ЭПО;  
 В – 64 мМ D-глюкозы; Г – 64 мМ D-глюкозы +ЭПО;  
 Д – при окислительном стрессе; Е – окислительный стресс+ЭПО

**0 часов** **24 часа**



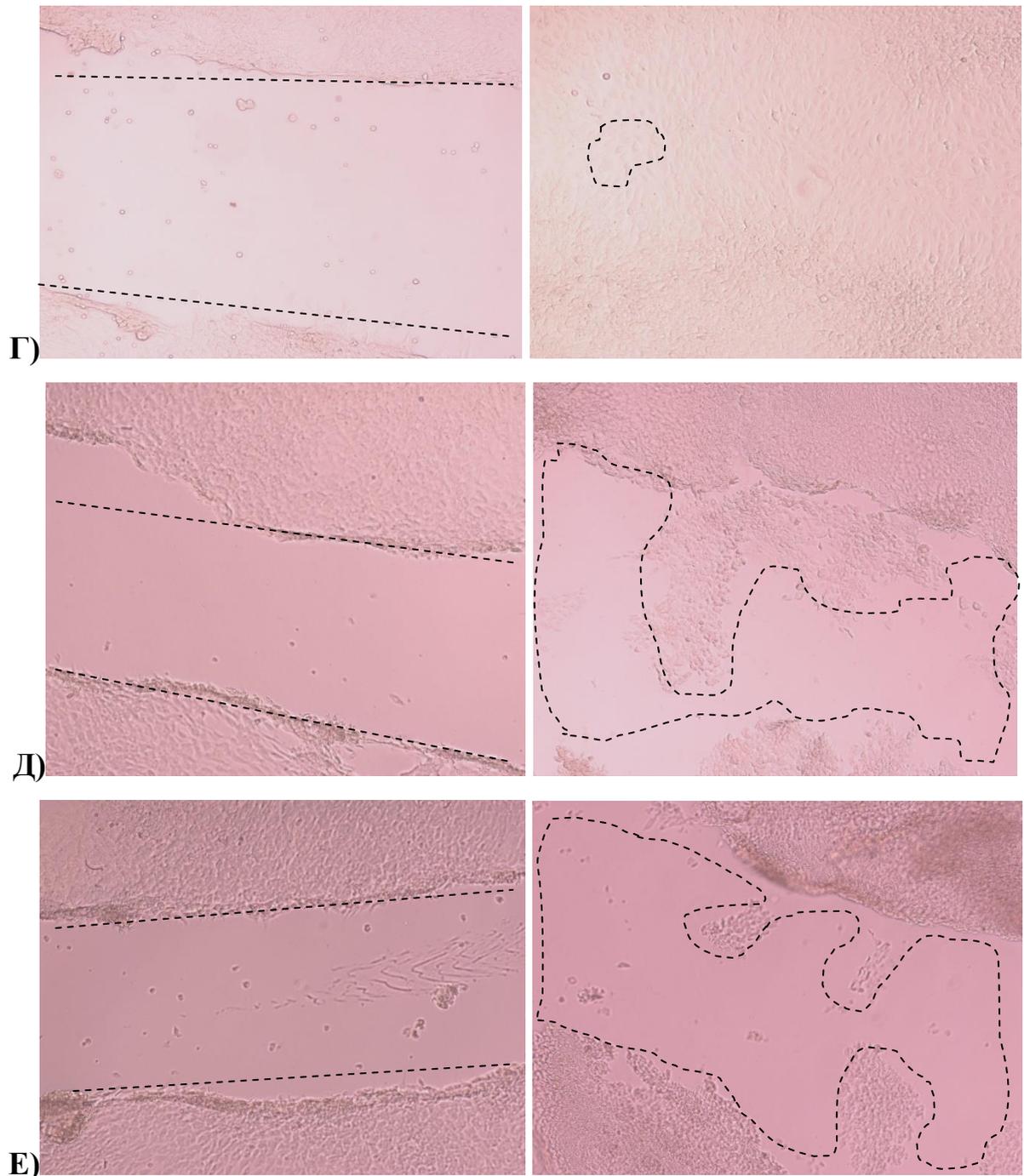


Рисунок 28 – Миграционный потенциал МСК–ЭПО (3-й пассаж)

костного мозга человека в тесте «заживления раны», ув.  $\times 10$ .

А – стандартные условия культивирования клеток; Б – с ЭПО;

В – 64 мМ D-глюкозы; Г – 64 мМ D-глюкозы+ЭПО;

Д – при окислительном стрессе; Е - окислительный стресс+ЭПО

Таблица 12 – Миграционный потенциал МСК и МСК–ЭПО человека в тесте «закрытия раны», горизонтальная миграция ( $M \pm SD$ ), %; ( $n = 20$ )

Условия культивирования МСК	МСК 8-й пассаж	МСК–ЭПО 3-й пассаж
10 % FCS (контроль)	87,98 ± 4,43	85,91 ± 2,4
10 % FCS + ЭПО	93,51 ± 0,97	88,72 ± 3,66†
0 % FCS	52,84 ± 2,96*	65,18 ± 7,15*†
0 % FCS+ ЭПО	63,16 ± 3,05*	82,11 ± 5,87†
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	11,72 ± 13,94*	15,49 ± 9,07*
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + ЭПО	39,05 ± 8,7*	32,51 ± 2,44*
64 mM D-глюкозы	63,14 ± 12,43*	59,45 ± 4,24*
64 mM D-глюкозы + ЭПО	76,58 ± 4,68*	71,84 ± 3,32*
Примечание: * – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем; † – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с МСК 8-го пассажа.		

Кроме этого, исследована трансмембранная миграция МСК 8-го пассажа и МСК–ЭПО 3-го пассажа при стандартных условиях культивирования клеток и индукции неблагоприятного микроокружения (таблица 13).

Дефицит ростовых факторов (0 % FCS), окислительный стресс (100 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) и гипергликемия (64 mM D-глюкозы) значительно снижают трансмембранную миграцию старых МСК 8-го пассажа и МСК–ЭПО в сравнении с миграцией для стандартных условий культивирования клеток (10 % FCS) ( $p < 0,05$ ).

В то же время существенных различий трансмембранной миграции между МСК 8-го пассажа и МСК–ЭПО в стандартных условиях культивирования клеток, при депривации ростовых факторов без ЭПО и с добавлением в питательную среду ЭПО не выявлено ( $p > 0,05$ ).

Таблица 13 – Трансмембранная миграция (камеры Бойдена) МСК и МСК–ЭПО человека ( $M \pm SD$ ), %; ( $n = 20$ )

Условия культивирования МСК	МСК 8-й пассаж	МСК–ЭПО 3-й пассаж
10 % FCS (контроль)	15,4 ± 4,51	15,0 ± 5,0
10 % FCS + ЭПО	10,2 ± 1,1	10,6 ± 0,89
0 % FCS	1,8 ± 1,64*	0,6 ± 0,55*
0 % FCS+ ЭПО	6,6 ± 1,52*	2,8 ± 1,1*
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,4 ± 0,55*	0,2 ± 0,45*
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + ЭПО	0,8 ± 0,45*	2,2 ± 0,45*†
64 mM D-глюкозы	1,6 ± 1,14*	2,0 ± 1,0*
64 mM D-глюкозы+ ЭПО	2,4 ± 0,89*	4,4 ± 0,55*†
Примечание: * – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем; † – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с МСК 8-го пассажира.		

Трансмембранная миграция МСК–ЭПО при окислительном стрессе и гипергликемии в присутствии ЭПО значимо выше по сравнению с МСК 8-го пассажира ( $p < 0,05$ ).

Нами проведено сравнительное исследование влияния неблагоприятного микроокружения на секреторный потенциал МСК 8-го пассажира и МСК–ЭПО по уровню продукции NO (таблица 14).

Не выявлено существенного снижения уровня продукции NO МСК 8-го пассажира при дефиците ростовых факторов ( $p > 0,05$ ), но значимо возрастает продукция при окислительном стрессе и гипергликемии в сравнении с контролем ( $p < 0,05$ ). Показано, что внесение в питательную среду ЭПО при стандартных условиях культивирования, при дефиците ростовых факторов и гипергликемии увеличивают или же снижают уровень продукции NO по сравнению с уровнем продукции клетками оксида азота без ЭПО ( $p < 0,05$ ).

В отношении МСК–ЭПО показано, что только при индукции окислительного стресса без ЭПО или с внесением ЭПО, значимо увеличивается продукция NO в сравнении с контролем ( $p < 0,05$ ). При дефиците ростовых факторов МСК–ЭПО снижают уровень продукции NO ( $p < 0,05$ ).

Таблица 14 – Уровень продукции NO МСК и МСК–ЭПО человека ( $M \pm SD$ ), мкМ/мл; ( $n = 20$ )

Условия культивирования МСК	МСК 8-й пассаж	МСК–ЭПО 3-й пассаж
10 % FCS (контроль)	20,57 ± 0,48	32,35 ± 11,34
10 % FCS+ЭПО	22,69 ± 1,11*	21,05 ± 1,06
0 % FCS	20,81 ± 0,7	20,48 ± 0,22*
0 % FCS+ЭПО	22,06 ± 0,36*	20,71 ± 1,43
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	68,88 ± 3,38*	66,42 ± 5,96*
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +ЭПО	61,69 ± 14,98*	70,16 ± 2,92*
64 мМ D-глюкозы	21,8 ± 0,97*	24,08 ± 1,04†
64 мМ D-глюкозы+ ЭПО	29,06 ± 4,8*	26,57 ± 5,25
Примечание: * – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем; † – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с МСК 8-го пассажа.		

Далее мы сопоставили уровень продукции биологически активных молекул МСК 8-го пассажа и МСК–ЭПО (таблица 15). Не выявлено значимых различий по уровню продукции МСК 8-го пассажа и МСК–ЭПО TNF- $\alpha$ , виментина, фибронектина, BDNF, ICAM-1, VEGF, IGF-1, коллагена, SDF-1 $\alpha$  (CXCL12A) и NO ( $p > 0,05$ ). В то же время показано значимое увеличение уровней продукции МСК–ЭПО эритропоэтина в сравнении с уровнями продукции МСК ( $p < 0,05$ ).

Таблица 15 – Уровень продукции цитокинов МСК и МСК–ЭПО костного мозга человека ( $M \pm SD$ ); ( $n = 20$ )

Параметры	МСК 8-й пассаж	МСК–ЭПО 3-й пассаж
TNF- $\alpha$ , пг/мл	146,22 $\pm$ 13,04	144,1 $\pm$ 11,34
ЭПО, мМЕ/мл	224,67 $\pm$ 128,74	388,69 $\pm$ 51,49*
Vimentin, нг/мл	33,39 $\pm$ 37,07	18,94 $\pm$ 2,83
Fibronectin, пг/мл	1889,88 $\pm$ 686,02	1442,3 $\pm$ 405,84
BDNF, пг/мл	484,34 $\pm$ 146,43	537,46 $\pm$ 143,34
ICAM-1, нг/мл	184,9 $\pm$ 17,6	183,49 $\pm$ 8,35
VEGF, пг/мл	574,59 $\pm$ 38,66	592,7 $\pm$ 36,48
IGF-1, нг/мл	2,85 $\pm$ 0,77	3,04 $\pm$ 1,14
Collagen, мкг/10 мкл	3,3 $\pm$ 1,95	4,94 $\pm$ 2,8
SDF-1a (CXCL12A), пг/мл	1685,52 $\pm$ 255,6	1680,72 $\pm$ 156,32
NO, мкМ/мл	10,64 $\pm$ 3,09	10,68 $\pm$ 2,09
Примечание: * – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с МСК 8-го пассажа.		

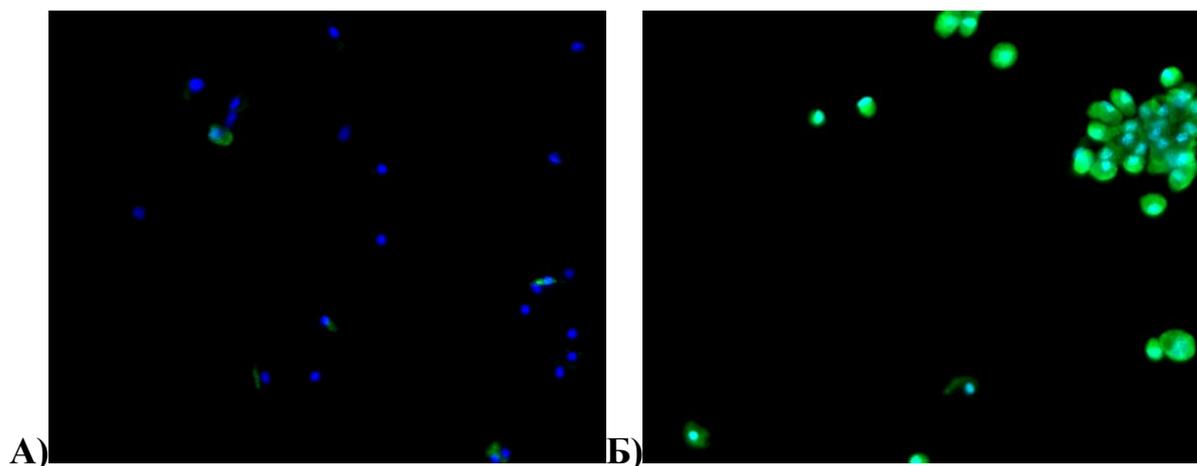
### Заключение

Сравнение МСК костного мозга человека на позднем пассаже культивированных в стандартных условиях и в присутствии ЭПО выявило, что ЭПО в большей степени увеличивает экспрессию молекул адгезии (CD54, CD29, CD44, CD49a) и в большей степени снижает уровень ко-экспрессии ЭПОР/CD131, CD131 в сравнении с МСК 8-го пассажа, росших без ЭПО. Кроме этого, ЭПО способствовал снижению доли МСК–ЭПО в фазе раннего апоптоза, но увеличивал долю некротических МСК–ЭПО, в меньшей степени задерживал клетки в фазе покоя клеточного цикла и увеличивал количество клеток в фазе синтеза клеточного цикла в сравнении с МСК 8-го пассажа, культивированных без ЭПО. Культивирование клеток с ЭПО повышало КОЕ МСК, а наличие ЭПО в

питательной среде при индукции дефицита ростовых факторов, окислительного стресса и гипергликемии уменьшало неблагоприятное влияние указанных факторов на КОЕ МСК–ЭПО по сравнению с МСК 8-го пассажа, росших без ЭПО. Также МСК–ЭПО характеризовались более высокой пролиферативной способностью и резистентностью к дефициту ростовых факторов в питательной среде. Для МСК–ЭПО показана большая сохранность миграции в тесте «закрытия раны» при дефиците ростовых факторов, а также большая трансмембранная миграция при индукции окислительного стресса и гипергликемии в условии наличия ЭПО в питательной среде. МСК–ЭПО больше продуцируют оксид азота при гипергликемии, чем МСК 8-го пассажа. Анализ уровней продукции цитокинов, ростовых факторов, растворимых протеинов (коллаген, виментин), компонента внеклеточного матрикса (фибронектин) и растворимой формы молекул адгезии (ICAM-1) выявил, что для МСК–ЭПО характерна более высокая продукция ЭПО в сравнении с МСК 8-го пассажа. Таким образом, в целом можно думать, что ЭПО усиливает пролиферацию и дифференцировку МСК, их выживание и резистентность к факторам стресса, стимулирует функции МСК, обеспечивающие защиту организма.

### **3.6 Влияние эритропоэтина на аутофагию и ультраструктуру мезенхимных стволовых клеток человека**

Нами исследованы параметры аутофагии МСК и МСК–ЭПО на позднем пассаже. Длительное культивирование МСК с ЭПО способствует увеличению аутофагии в клетках по сравнению с МСК 8-го пассажа, росших без ЭПО (рисунок 29) ( $p < 0,05$ ).



Аутофагия мезенхимных стволовых клеток костного мозга человека на позднем пассаже, росших без ЭПО и в присутствии 33,4 МЕ/мл ЭПО ( $M \pm SD$ ), %)

Параметры	МСК	МСК–ЭПО
LC3В	$24,9 \pm 2,12$	$68,37 \pm 11,18^*$
Примечание: * – ( $p < 0,01$ ) по сравнению с МСК.		

Рисунок 29 – Показатель аутофагии МСК (8-й пассаж) и МСК–ЭПО (3-й пассаж) костного мозга человека.

А – аутофагия МСК на 8-м пассаже, ув.  $\times 20$ ;

Б – аутофагия МСК–ЭПО на 3-м пассаже, ув.  $\times 20$ .

Ядра клеток синего цвета (DAPI), аутофагосомы зеленого цвета (LC3В)

При анализе полутонких срезов МСК, росших в стандартных условиях культивирования клеток, отмечено рыхлое расположение клеток, в части клеток выявлены фигуры митоза (пролиферирующие клетки) (рисунок 30А), а в части клеток признаки апоптоза (округлые клетки с фрагментами ядра) (рисунок 30Б). В то же время МСК–ЭПО имели более плотное расположение, в части клеток фигуры митоза и не выявлено морфологических признаков апоптоза (рисунок 30В). При электронной микроскопии тонких срезов МСК и МСК–ЭПО исследовали объемную плотность мембран «гранулярного» эндоплазматического ретикулума и наличие полисом.

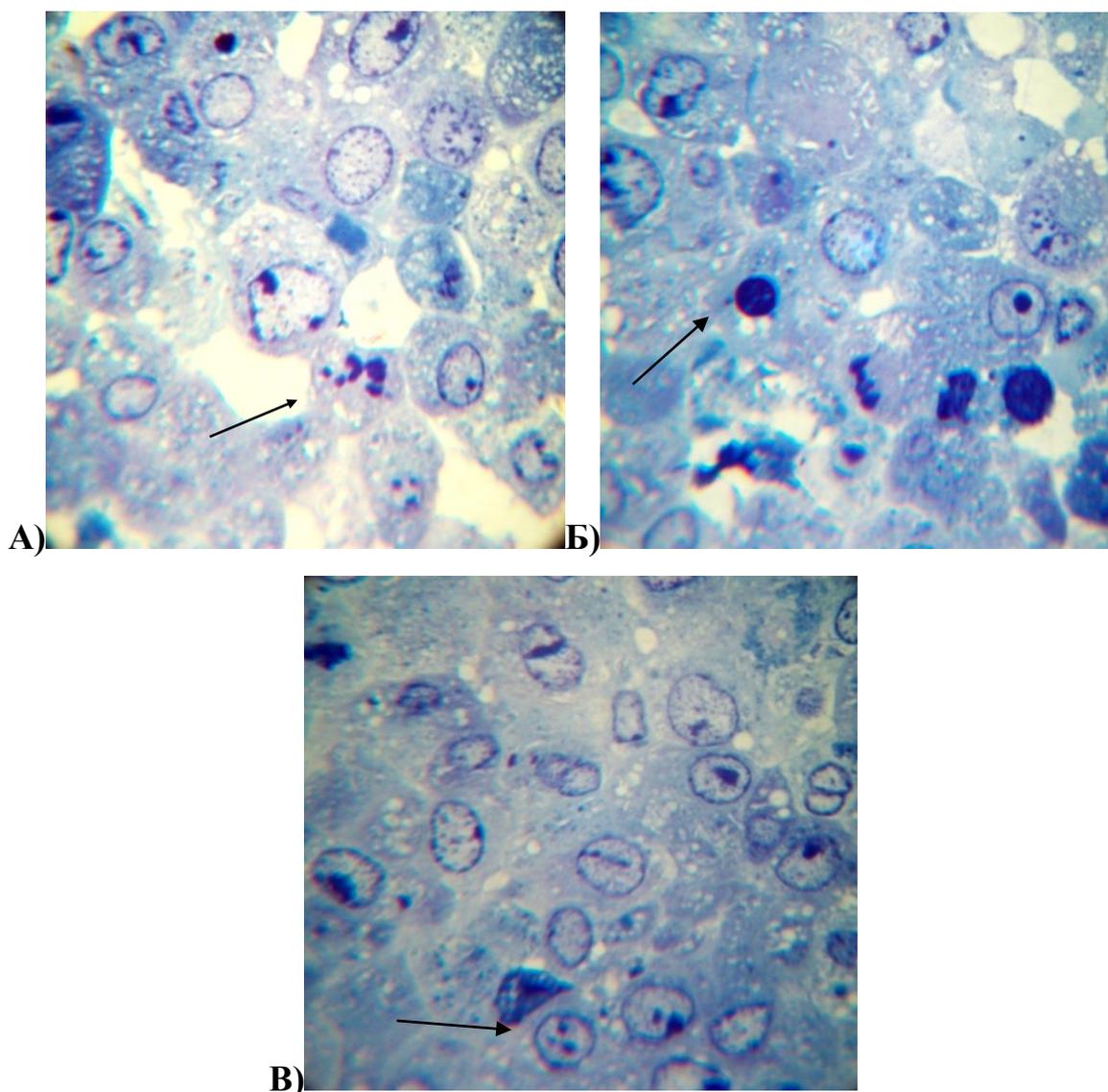
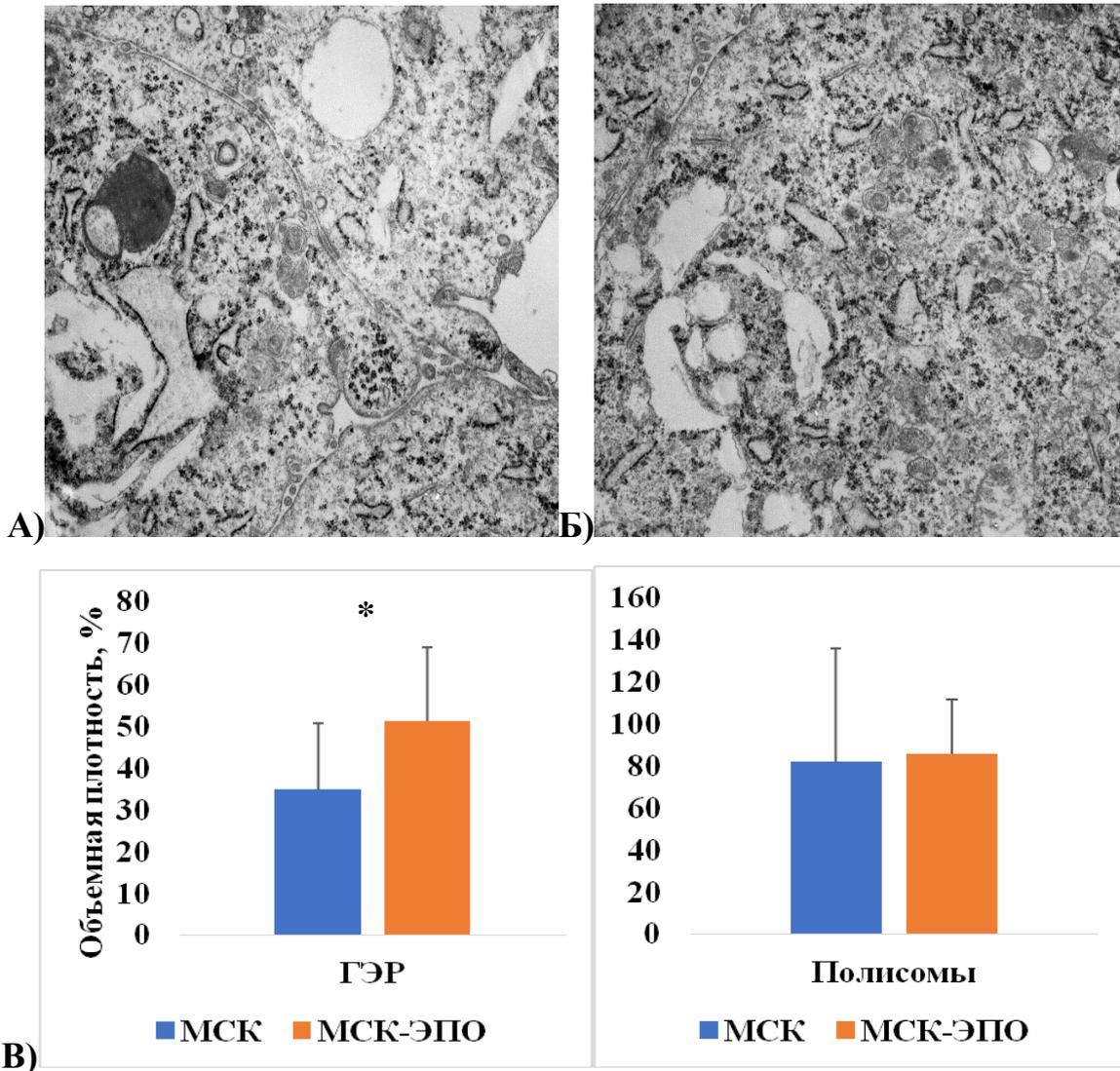


Рисунок 30 – Морфология МСК (8-й пассаж) и МСК–ЭПО (3-й пассаж) костного мозга человека на полутонких срезах, световая микроскопия (ув.  $\times 1\ 000$ , толуидиновый синий). А – микрофотография полутонкого среза МСК, стрелкой выделена клетка с фигурой митоза; Б – микрофотография полутонкого среза МСК, стрелкой выделена клетка с морфологическими признаками апоптоза (округлая клетка с фрагмента ядра); В – микрофотография полутонкого среза МСК–ЭПО, стрелкой выделена клетка с фигурой митоза



Примечание: \* – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с МСК.

Рисунок 31 – Морфология МСК (8-й пассаж) и МСК–ЭПО (3-й пассаж) костного мозга человека на ультратонких срезах, электронная микроскопия (ацетат уранила и цитрат свинца, ув.  $\times 16000$ ).  
 А – микрофотография фрагмента МСК; Б – микрофотография фрагмента МСК–ЭПО; В – показатели объемной плотности гранулярного эндоплазматического ретикулума (ГЭР) и количества полисом

Так, для МСК–ЭПО характерно увеличение объемной плотности мембран «гранулярного» эндоплазматического ретикулума на 47 % в сравнении с МСК на 8-м пассаже (рисунок 31), (см. приложение В.7). По количеству полисом между МСК 8-го пассажа и МСК–ЭПО не выявлено значимых различий ( $p > 0,05$ ).

Между экспрессией CD18, CD54, CD29, CD44, CD49a, CD146, CD131 и экспрессией LC3B в МСК 8-го пассажа выявлена сильная обратная взаимосвязь ( $r = -0,81$ ); ( $p = 0,02$ ); ( $n = 10$ ), что может отражать наличие взаимного влияния молекул адгезии и аутофагосом друг на друга. Кроме этого показана прямая и высокая сопряженность доли клеток в апоптозе/некрозе ( $subG_0G_1$ ), митозе ( $G_2/M$ ) с экспрессией LC3B ( $r = 0,81$ ); ( $p = 0,015$ ); ( $n = 10$ ) и обратная сильная сопряженность доли клеток в фазе покоя ( $G_0G_1$ ) с уровнем экспрессии LC3B в МСК 8-го пассажа ( $r = -0,91$ ); ( $p = 0,015$ ); ( $n = 10$ ). Относительная плотность гранулярного эндоплазматического ретикулама МСК 8-го пассажа сопряжена с уровнем продукции клетками TNF- $\alpha$ , VEGF, NO ( $r = 0,83$ ); ( $p = 0,03$ ); ( $r = -0,8$ ); ( $p = 0,03$ ) и ( $r = 0,74$ ); ( $p = 0,04$ ); ( $n = 10$ ) соответственно. Уровень коллагена в кондиционированных средах МСК 8-го пассажа взаимосвязан с уровнем экспрессии ЭПОР и синтетической фазой клеточного цикла ( $r = -0,76$ ); ( $p = 0,035$ ) и ( $r = 0,76$ ); ( $p = 0,035$ ); ( $n = 10$ ) соответственно. Также установлена сопряженность количества КОЕ МСК 8-го пассажа при индукции гипергликемии с количеством полисом и количества КОЕ при гипергликемии и наличие ЭПО в питательной среде с относительной плотностью гранулярного эндоплазматического ретикулама ( $r = 0,89$ ); ( $p = 0,045$ ); ( $n = 10$ ).

### **Заключение**

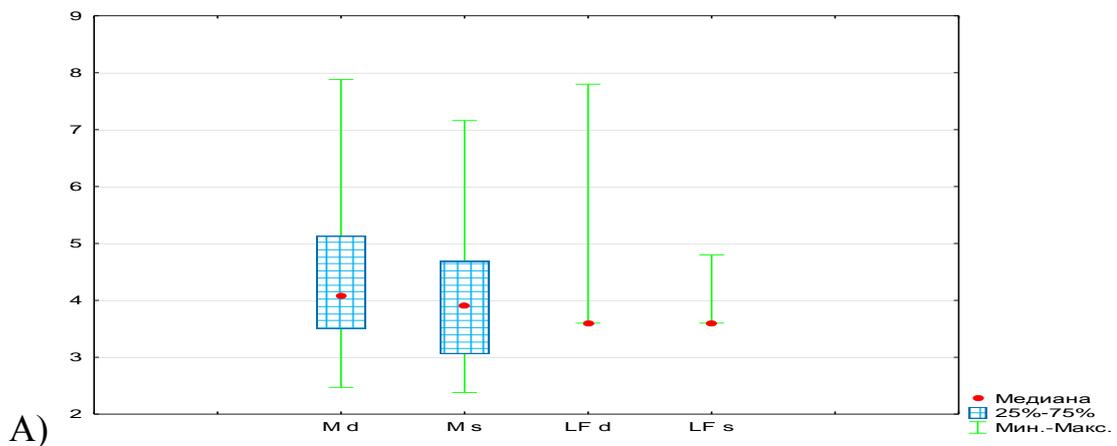
Таким образом, ЭПО способствует усилению аутофагии и ультраструктурным изменениям в МСК костного мозга человека при длительном культивировании *in vitro*, что имеет значение для предотвращения изменений в клетках, возникающих по мере увеличения их пассажа, способных снижать терапевтический потенциал.

### 3.7 Изучение терапевтического потенциала комбинации мезенхимных стволовых клеток и эритропоэтина *in vivo*

#### 3.7.1 Эффективность биомедицинского клеточного продукта при ишемии конечности

Частота встречаемости заболеваний периферических артерий в мире достигает 10 %, при этом отмечено увеличение заболеваемости КИНК и сохранение низкой эффективности традиционных методов лечения [15]. Использование МСК костного мозга, является альтернативным методом лечения КИНК [308]. Так, введение мононуклеарных клеток костного мозга при экспериментальной модели КИНК способствовало восстановлению функций мышц и стимуляции ангиогенеза [2273].

Исходя из этого, представлялось важным изучить терапевтический потенциал биомедицинского клеточного продукта в экспериментальной модели ишемии задней конечности у крыс. Перед моделированием ишемии у всех животных исследовали параметры капиллярного кровотока в области задних стоп конечностей с обеих сторон, и существенных различий не было выявлено (рисунок 32).



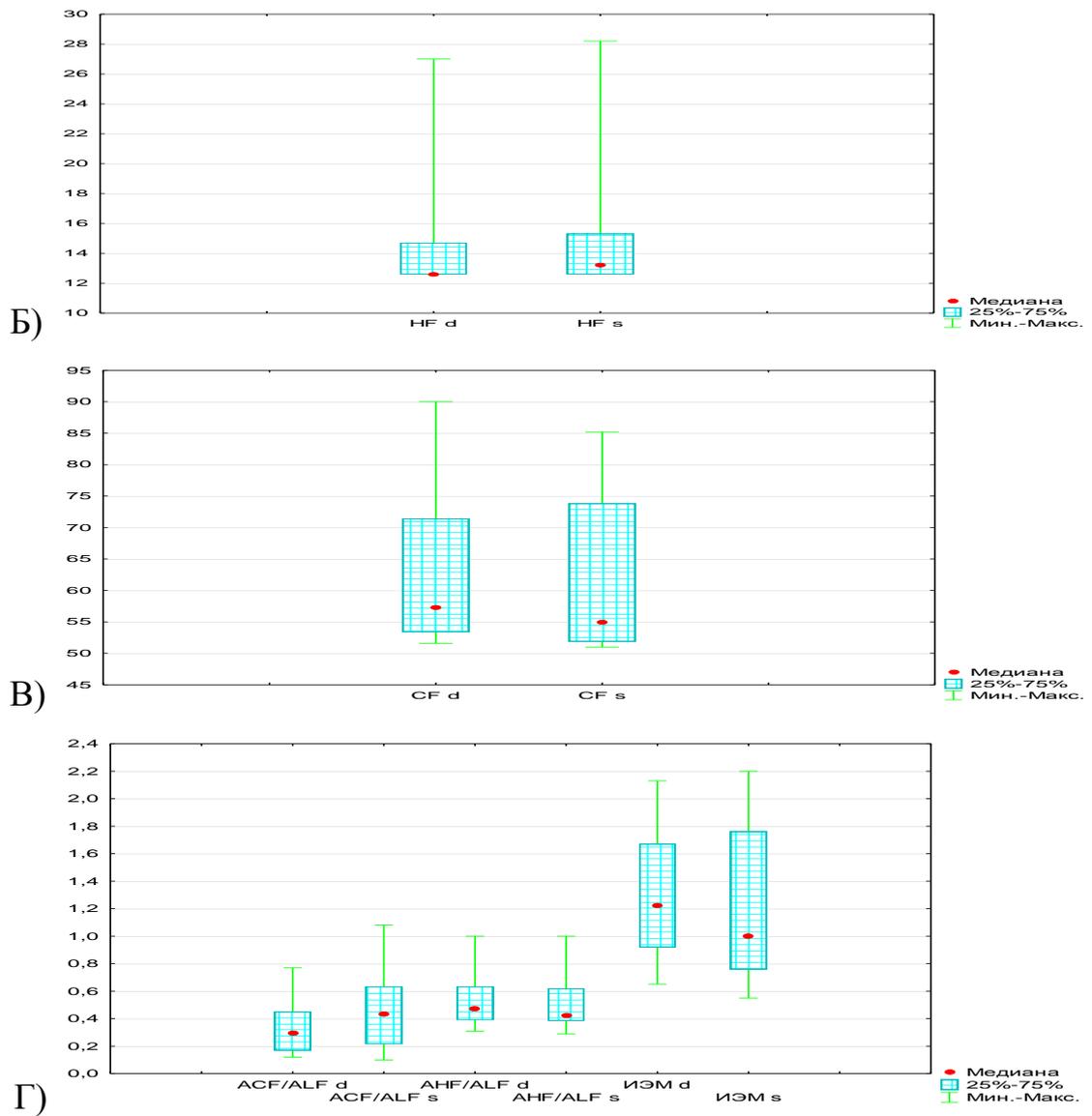


Рисунок 32 – Параметры микроциркуляции в левой задней стопе крыс до моделирования ишемии конечности. А) М – показатель микроциркуляции, LF – амплитуда медленных колебаний, отражающих активность собственных компонентов микроциркуляторного русла; Б) HF – амплитуда быстрых колебаний, совпадающих с дыхательным ритмом и зависящих от колебаний венозного кровотока в связи с изменением давления в грудной клетке в фазы вдоха и выдоха; В) CF – амплитуда пульсовых колебаний, совпадающих с пульсовым колебанием кровотока; Г) ACF/ALF – соотношение амплитуды

кардиоритма и медленных колебаний, АНФ/АЛФ – соотношение амплитуды быстрых и медленных колебаний, ИЭМ – индекс эффективности микроциркуляции; d – справа (dexter), s – слева (sinister)

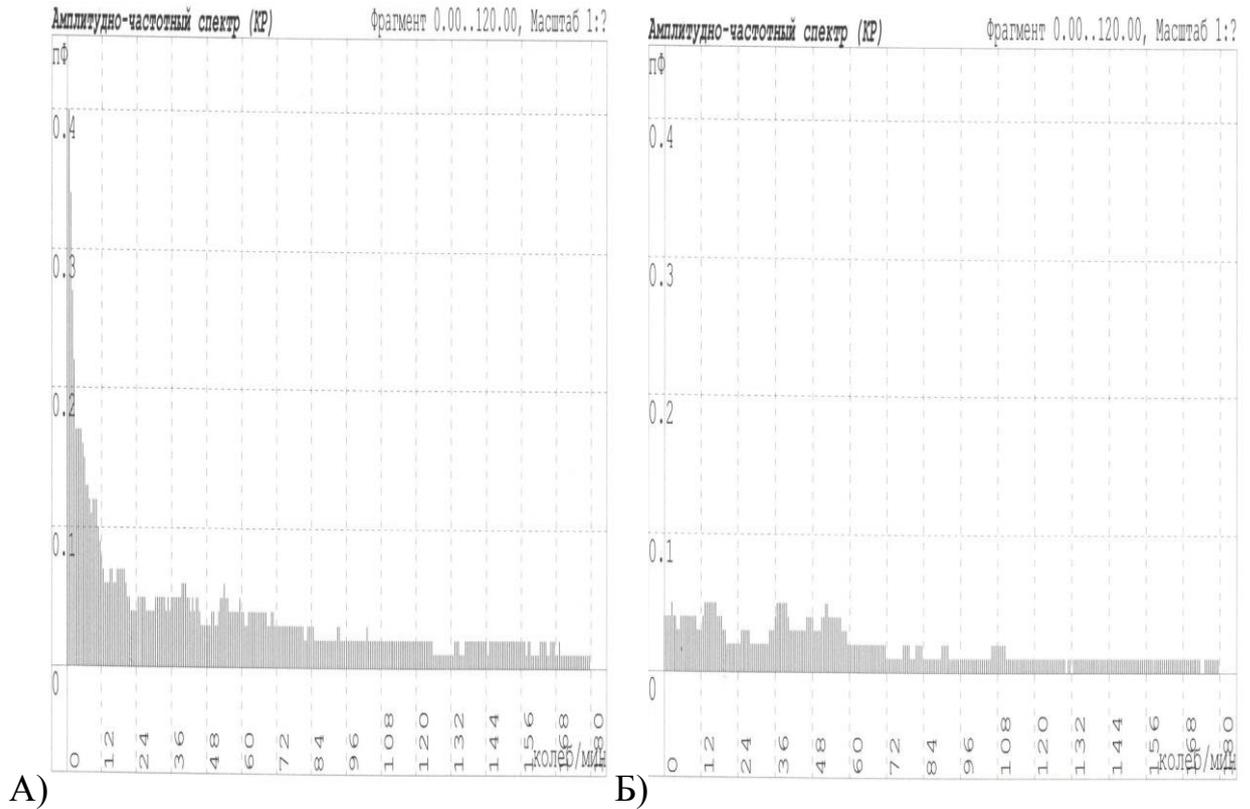


Рисунок 33 – Графическое изображение параметров микроциркуляции в области стопы у крыс до (А) и через 24 часа после моделирования ишемии конечности (Б)

В таблице 16 суммированы результаты исследования микроциркуляции в нижних конечностях животных опытных групп с учетом вида проведенной терапии. Так, спустя 24 часа после моделирования ишемии отмечено существенное снижение параметров микроциркуляции в стопе на 70–80 % от исходного уровня (рисунок 33) ( $p < 0,05$ ). В группе животных, получивших лечение физиологическим раствором хлорида натрия, отмечено постепенное увеличение параметров микроциркуляции в области стопы, которое до 21-х суток эксперимента существенно не отличалось от группы ишемии, а на 21-е сутки

значимо снизилось, но к концу эксперимента превысило аналогичный параметр ( $p < 0,05$ ).

Нами не выявлено существенных различий в группе ФР по амплитуде медленных колебаний с группой ишемии, а амплитуда быстрых колебаний значимо снизилась к концу эксперимента ( $p < 0,05$ ). Также в группе ФР отмечены скачки амплитуды вверх и вниз в сравнении с группой ишемии на 21-е и 28-е сутки эксперимента ( $p < 0,05$ ). В группе ФР выявлено постепенное увеличение интегрального показателя ИЭМ к 14 суткам эксперимента с последующим его снижением в сравнении с группой ишемии ( $p < 0,05$ ). В группе МСК отмечен неуклонный рост показателя микроциркуляции в области стопы в сравнении с группой ишемии с 7-х по 28-е сутки включительно и в сравнении с группой ФР за исключением 28-х суток эксперимента ( $p < 0,05$ ). В отношении амплитуды медленных колебаний в группе МСК отмечено значимое снижение на 28-е сутки эксперимента в сравнении с группой ишемии и возрастание амплитуды быстрых колебаний в эти же сроки наблюдения ( $p < 0,05$ ). На 21-е сутки выявлено увеличение вклада сердечного ритма в микроциркуляцию в области стопы в сравнении с группой ишемии ( $p < 0,05$ ). В группе МСК+ЭПО только на 21-е сутки эксперимента отмечено снижение показателя микроциркуляции в области стопы по сравнению с опытными группами ( $p < 0,05$ ). Кроме этого на 14-е сутки эксперимента снижается вклад амплитуды медленных и быстрых колебаний, сердечного ритма в микроциркуляцию в области стопы по сравнению с остальными опытными группами животных ( $p < 0,05$ ).

Инъекция МСК и МСК+ЭПО в мышцы голени после моделирования ишемии конечности способствовала сохранности параметра микроциркуляции в области стопы на уровне 30 % от исходного показателя, что существенно выше по сравнению с группой ишемии (рисунок 34) ( $p < 0,05$ ), (см. приложение В.8).

Таблица 16 – Показатели микроциркуляции в задних стопах крыс при ишемии конечности (Me, Q1–Q3); (n = 53)

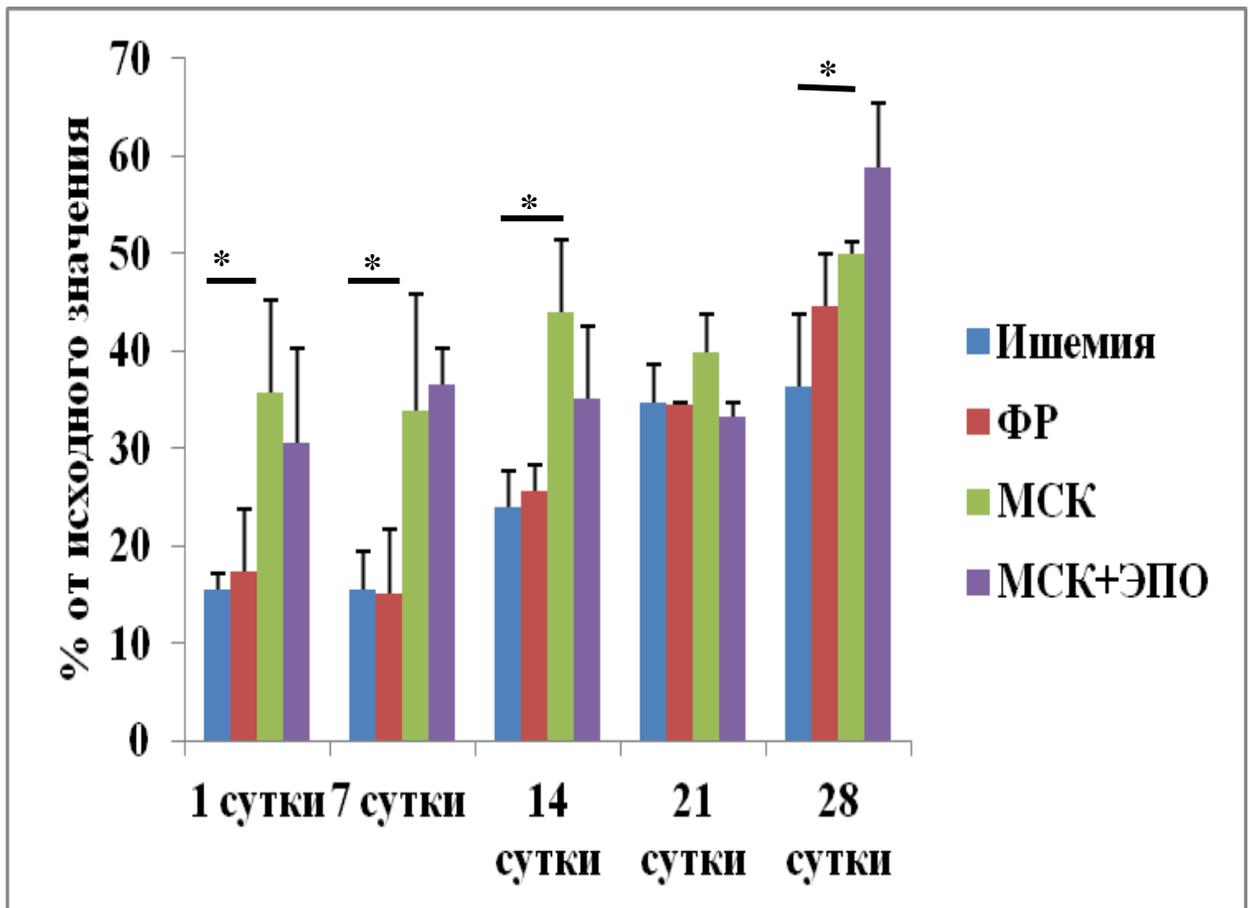
Параметры	Контрольная стопа (правая задняя конечность)						Стопа с ишемией (левая задняя конечность)					
	0-е сутки	1-е сутки	7-е сутки	14-е сутки	21-е сутки	28-е сутки	0-е сутки	1-е сутки	7-е сутки	14-е сутки	21-е сутки	28-е сутки
Ишемия конечности без лечения (контроль)												
ПМ	4,06; 3,4-5,04	5,87; 5,23-6,98	2,05; 1,81-3,91	3,7; 3,7-4,78	5,68; 5,68-5,68	6,41; 6,41-6,41	3,82; 3,1-4,65	0,48; 0,48-0,5	0,48; 0,48-0,77	0,8 0,8-0,85	2,07; 2,07-2,07	1,08; 1,08-1,08
LF	3,6; 3,6-3,6	3,6; 3,6-3,6	3,6; 3,6-3,6	3,6; 3,6-3,6	3,6; 3,6-3,6	3,6; 3,6-3,6	3,6; 3,6-3,6	3,6; 0,48-3,6	3,6; 3,6-4,2	3,6; 3,6-12	3,6; 3,6-3,6	4,2 4,2-4,2
HF	12,6; 12,6-14,4	13,2; 12,6-16,8	13,2; 13,2-16,8	12,6; 12,6-13,8	12,6; 12,6-12,6	13,8; 13,8-13,8	13,2; 12,6-15,6	13,2; 0,48-27	13,2; 12,6-15	12,6; 12,6-12,6	12,6; 12,6-12,6	20,4; 20,4-20,4
CF	58,2; 54-69,6	52,8; 52,2-55,2	53,4; 53,4-69	99,0; 52,8-99,0	58,8; 58,8-58,8	59,4; 59,4-59,4	55,2; 52,2-74,4	52,2; 0,48-52,2	63,6; 52,2-71,4	72,6; 51,6-72,6	51,6; 51,6-51,6	57,0; 57,0-57,0
A <sub>max</sub> CF	0,29; 0,17-0,45	0,26; 0,26-0,46	0,18; 0,18-0,41	0,13; 0,13-0,33	0,27; 0,27-0,27	0,46; 0,46-0,46	0,5; 0,22-0,62	1,25; 0,48-1,4	0,6; 0,43-0,8	0,69; 0,33-0,73	0,24; 0,24-0,24	0,64; 0,64-0,64
A <sub>max</sub> HF	0,47; 0,4-0,63	0,72; 0,61-0,76	0,39; 0,32-0,53	0,39; 0,39-0,44	0,68; 0,68-0,68	0,43; 0,43-0,43	0,44; 0,39-0,62	1,25; 0,48-2,4	0,4; 0,4-0,79	0,46; 0,33-1	0,33; 0,33-0,33	0,55; 0,55-0,55
ИЭМ	1,2; 0,92-1,63	0,97; 0,84-0,97	1,97; 1,06-2	1,92; 1,3-1,92	1,05; 1,05-1,05	1,12; 1,12-1,12	1,0; 0,79-1,73	0,4; 0,26-0,48	0,83; 0,82-0,83	0,87; 0,58-1,5	1,75; 1,75-1,75	0,85; 0,85-0,85
Группа ФР												
ПМ	4,06; 3,4-5,04	4,39; 4,35-4,9	3,6; 2,24-3,6	2,98; 1,79-2,98	3,57; 3,57-3,57	3,56; 3,56-3,56	3,82; 3,1-4,65	0,86*; 0,53-0,99	0,64; 0,6-0,64	0,73; 0,73-0,94	1,48*; 1,48-1,48	1,83*; 1,83-1,83
LF	3,6; 3,6	3,6; 3,6	3,6; 3,6	7,8; 7,8	3,6; 3,6	3,6; 3,6	3,6; 3,6	6,6; 6,6	3,6; 3,6	3,6; 3,6	3,6; 3,6	7,8; 7,8

Параметры	Контрольная стопа (правая задняя конечность)						Стопа с ишемией (левая задняя конечность)					
	0-е сутки	1-е сутки	7-е сутки	14-е сутки	21-е сутки	28-е сутки	0-е сутки	1-е сутки	7-е сутки	14-е сутки	21-е сутки	28-е сутки
	3,6-3,6	3,6-3,6	3,6-3,6	3,6-7,8	3,6-3,6	3,6-3,6	3,6-3,6	3,6-6,6	3,6-10,2	3,6-3,6	3,6-3,6	3,6-7,8
HF	12,6; 12,6-14,4	18,0; 15,0-19,8	12,6; 12,6-12,6	12,6; 12,6-17,4	12,6; 12,6-12,6	12,6; 12,6-12,6	13,2; 12,6-15,6	23,4; 17,4-27,6	12,6; 2,6-18,6	12,6; 12,6-15	12,6; 12,6-12,6	13,2*; 12,6-13,2
CF	58,2; 54-69,6	54,6; 52,2-58,2	66,0; 66,0-82,8	55,8; 55,8-70,8	62,4; 62,4-62,4	61,8; 61,8-61,8	55,2; 52,2-74,4	51,6; 51,6-74,4	55,2; 51,6-55,8	51,6; 51,6-73,2	59,4*; 59,4-59,4	51,6*; 51,6-51,6
A <sub>max</sub> CF	0,29;	0,44;	0,14;	0,6;	0,23;	0,08;	0,5;	1,0;	0,33;	0,11*;	0,64*;	0,46*;
A <sub>max</sub> LF	0,17-0,45	0,35-0,83	0,08-0,16	0,43-0,6	0,23-0,23	0,08-0,08	0,22-0,62	0,86-1,2	0,25-0,45	0,11-0,18	0,64-0,64	0,46-0,5
A <sub>max</sub> HF	0,47;	0,82;	0,39;	0,8;	0,47;	0,28;	0,44;	1,0;	0,91;	0,39;	0,36*;	0,85*;
A <sub>max</sub> LF	0,4-0,63	0,67-0,83	0,35-0,42	0,71-0,8	0,47-0,47	0,28-0,28	0,39-0,62	0,4-1,86	0,67-0,91	0,35-0,39	0,36-0,36	0,62-0,85
ИЭМ	1,2; 0,92-1,63	0,72; 0,67-0,85	1,87; 1,72-2,31	0,71; 0,71-0,88	1,43; 1,43-1,43	2,74; 2,74-2,74	1,0; 0,79-1,73	0,3; 0,37-0,71	1,0; 0,73-1	2,0*; 1,89-2	1,0*; 1,0-1,0	0,76; 0,76-0,89
Группа МСК												
ПМ	4,06; 3,4-5,04	6,2; 2,33-6,69	4,05; 3,91-5,65	2,95; 2,92-3,04	4,01; 3,9-4,12	2,62; 2,53-2,7	3,82; 3,1-4,65	1,18; 0,55-1,65	1,4*†; 1,17-1,65	1,43*†; 1,05-1,7	1,77*†; 1,72-1,82	2,24*; 2,24-2,24
LF	3,6; 3,6-3,6	3,6; 3,6-3,6	3,6; 3,6-3,6	3,6; 3,6-4,2	7,2; 3,6-10,8	4,8; 3,6-6	3,6; 3,6-3,6	3,6; 3,6-3,6	3,6; 3,6-3,6	4,2; 3,6-8,4	3,6; 3,6-3,6	3,6*; 3,6-3,6
HF	12,6; 12,6-14,4	12,6; 12,6-13,2	12,6; 12,6-22,8	12,6; 12,6-28,2	12,6; 12,6-12,6	14,7; 12,6-16,8	13,2; 12,6-15,6	12,9; 12,6-13,2	12,6; 12,6-12,6	15,0 12,6-17,4	12,6; 12,6-12,6	22,8*; 22,8-22,8
CF	58,2; 54,0-69,6	51,6; 51,6-51,6	66,6; 51,6-78,6	70,2; 63,6-88,2	62,4; 55,8-69,0	55,8; 53,4-58,2	55,2; 52,2-74,4	59,4; 59,2-67,2	64,2; 54,0-84,0	65,4; 51,6-86,4	56,1; 54,6-57,6	57,0; 57,0-57,0

Параметры	Контрольная стопа (правая задняя конечность)						Стопа с ишемией (левая задняя конечность)						
	0-е сутки	1-е сутки	7-е сутки	14-е сутки	21-е сутки	28-е сутки	0-е сутки	1-е сутки	7-е сутки	14-е сутки	21-е сутки	28-е сутки	
$A_{\max}CF$	0,29;	0,21;	0,26;	0,38;	0,6;	0,44;	0,5;	0,15*;	0,33;	0,36;	0,28*†;	0,29*†;	
$A_{\max}LF$	0,17-0,45	0,16-0,33	0,21-0,29	0,27-0,38	0,31-0,89	0,2-0,67	0,22-0,62	0,12-0,36	0,19-0,8	0,12-0,5	0,27-0,29	0,29-0,29	
$A_{\max}HF$	0,47;	0,4;	0,45;	0,5;	0,66;	0,6;	0,44;	0,44*;	0,45;	0,64;	0,42*;	0,52*†;	
$A_{\max}LF$	0,4-0,63	0,33-0,67	0,29-0,53	0,38-0,75	0,54-0,78	0,36-0,83	0,39-0,62	0,42-0,57	0,33-0,8	0,32-0,92	0,38-0,45	0,52-0,52	
ИЭМ	1,2; 0,92-1,63	1,66; 1,0-2,05	1,58; 1,27-1,71	1,14; 0,89-1,53	0,89; 0,6-1,18	1,22; 0,67-1,77	1,0; 0,79-1,73	1,71*; 1,08-1,86	1,41; 0,62-1,91	1,0; 0,71-2,28	1,44*†; 1,38-1,5	1,24*†; 1,24-1,24	
Группа МСК+ЭПО													
ПМ	4,06; 3,4-5,04	3,68; 3,18-3,79	3,03; 2,19-4,29	4,64; 4,37-5,1	1,95; 1,95-1,95	4,13; 3,36-4,89	3,82; 3,1-4,65	0,94 0,72-1,31	1,5*†; 1,13-1,86	1,25*†; 1,01-1,25	1,04*†°; 1,04-1,04	2,71*†°; 2,26-3,16	
LF	3,6; 3,6-3,6	3,6; 3,6-5,4	3,6; 3,6-3,6	3,6; 3,6-3,6	7,2; 7,2-7,2	3,6; 3,6-3,6	3,6; 3,6-3,6	3,6; 3,6-3,6	3,6; 3,6-3,6	3,6; 3,6-3,6	1,25*†; 1,25-3,6	3,6; 3,6-3,6	7,2; 3,6-10,8
HF	12,6; 12,6-14,4	14,4; 12,6-17,4	13,2; 12,6-13,8	12,6; 12,6-19,2	13,2; 13,2-13,2	14,1; 12,6-15,6	13,2; 12,6-15,6	12,6; 12,6-13,2	13,2; 12,6-15,6	1,25*°; 1,25-12,6	12,6; 12,6-12,6	15,6*†°; 12,6-18,6	
CF	58,2; 54,0-69,6	52,4; 61,6-63	51,6; 51,6-61,8	53,4; 52,2-57,6	54,0; 54,0-54,0	56,1; 51,6-60,6	55,2; 52,2-74,4	78,3*†° 66,0-82,8	51,6*°; 51,6-52,8	1,25; 1,25-74,4	55,2*†°; 55,2-55,2	51,6*†°; 51,6-51,6	
$A_{\max}CF$	0,29;	0,36;	0,22;	0,15;	0,82;	0,28;	0,5;	0,34;	0,09*†°;	1,25;	0,4*3†°;	0,21*;	
$A_{\max}LF$	0,17-0,45	0,19-0,59	0,1-0,23	0,14-0,43	0,82-0,82	0,12-0,43	0,22-0,62	0,3-0,67	0,08-0,15	0,6-1,25	0,43-0,43	0,08-0,33	
$A_{\max}HF$	0,47;	0,44;	0,45;	0,42;	0,91;	0,6;1	0,44;	0,45;	0,31*†°;	1,25*;	0,29*°;	0,61;	
$A_{\max}LF$	0,4-0,63	0,35-0,64	0,39-0,46	0,36-0,71	0,91-0,91	0,35-0,86	0,39-0,62	0,35-0,83	0,27-0,32	0,6-1,25	0,29-0,29	0,38-0,83	
ИЭМ	1,2;	1,06;	1,64;	1,74;	0,58;	1,47;	1,0;	1,34*†;	2,58*†°;	1,25;	1,4*†;	1,52*†;	

Параметры	Контрольная стопа (правая задняя конечность)						Стопа с ишемией (левая задняя конечность)					
	0-е сутки	1-е сутки	7-е сутки	14-е сутки	21-е сутки	28-е сутки	0-е сутки	1-е сутки	7-е сутки	14-е сутки	21-е сутки	28-е сутки
	0,92-1,63	1,0-1,4	1,44-1,82	0,88-2	0,58-0,58	0,78-2,15	0,79-1,73	0,67-1,44	2,16-2,75	0,83-1,25	1,4-1,4	0,86-2,17

Примечание: ФР – физиологический раствор; МСК – мезенхимные стволовые клетки костного мозга крыс; МСК+ЭПО – комбинация мезенхимных стволовых клеток костного мозга крыс с эритропоэтином; М – показатель микроциркуляции; LF – амплитуда медленных колебаний, отражающих активность собственных компонентов микроциркуляторного русла; HF – амплитуда быстрых колебаний, совпадающих с дыхательным ритмом и зависящих от колебаний венозного кровотока в связи с изменением давления в грудной клетке в фазы вдоха и выдоха; CF – амплитуда пульсовых колебаний, совпадающих с пульсовым колебанием кровотока; ACF/ALF – соотношение амплитуды кардиоритма и медленных колебаний; AHF/ALF – соотношение амплитуды быстрых и медленных колебаний; ИЭМ – индекс эффективности микроциркуляции; \* – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с группой «ишемия конечности без лечения»; † – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с Ф; ° – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с МСК.



Примечание: \* – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с ишемией.

Рисунок 34 – Динамика восстановления микроциркуляции в области стопы крыс при ишемии конечности с учетом способа лечения.

ФР – введение физиологического раствора хлорида натрия в мышцы голени; МСК – введение мезенхимных стволовых клеток в мышцы голени; МСК+ЭПО – введение МСК в сочетании с эритропоэтином в мышцы голени

На 7-е сутки также отмечена сохранность микроциркуляции в области стопы в группе МСК и МСК+ЭПО на уровне 30 % от исходного, в то время как в группе ишемии и ФР – достигает только 15 %. На 14-е сутки показатели микроциркуляции в группе МСК достигают 40 %, а в группе МСК+ЭПО – 35 % от исходного значения, что существенно выше, чем в группе ишемии и ФР. К 28-м суткам эксперимента в группе МСК и МСК+ЭПО показатель

микроциркуляции в области стопы достигает 60 % и 68 % от исходного уровня, тогда как в группе ишемии – 36 %, а в группе ФР – 44 %.

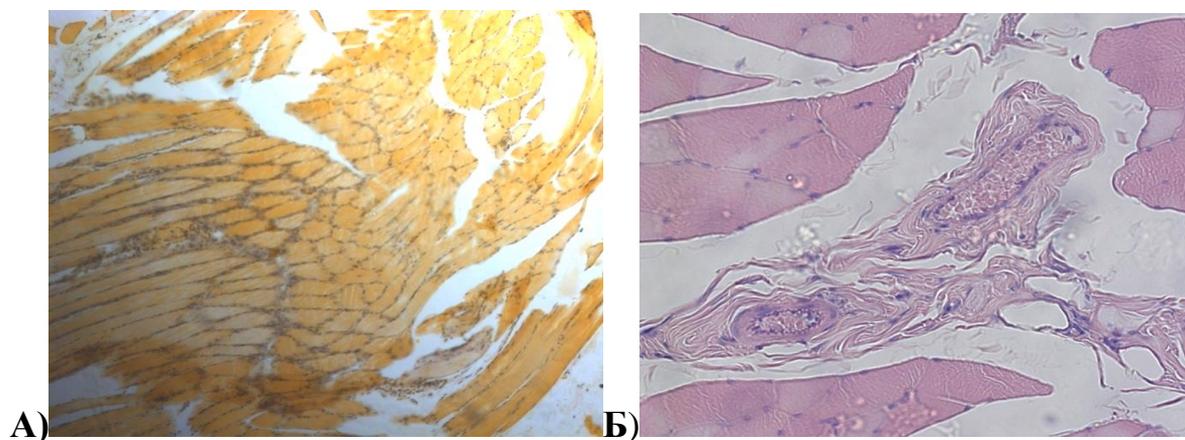


Рисунок 35 – Микрофотография мышц голени крыс без ишемии.

А) микрофотография мышечных волокон, окраска гематоксилин-эозин, ув.  $\times 10$ ;

Б) сосудистый пучок, окраска гематоксилин-эозин, ув.  $\times 20$

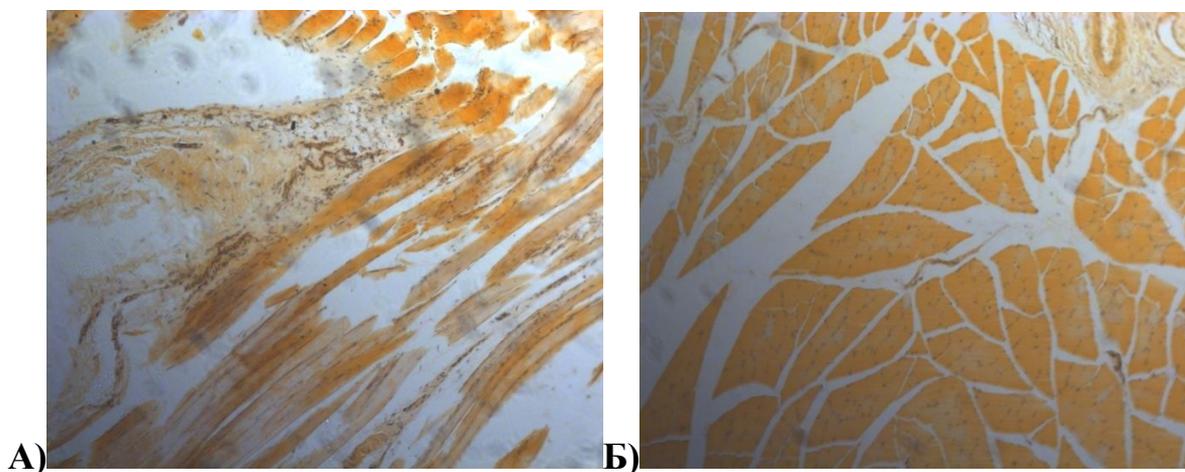


Рисунок 36 – Микрофотография препарата мышц голени крыс при ишемии.

А) микрофотография мышечных волокон, окраска гематоксилин-эозин, ув.  $\times 10$ ;

Б) сосудистый пучок, окраска гематоксилин-эозин, ув.  $\times 20$

Гистологическое исследование мышц голени в группе ишемии конечности на 28 сутки эксперимента выявило истощение и фрагментацию мышечных

волокон, наличие рыхлой волокнистой соединительной ткани, уменьшение количества питающих мышцы сосудов по сравнению с мышцами голени интактных крыс (рисунок 35, 36).

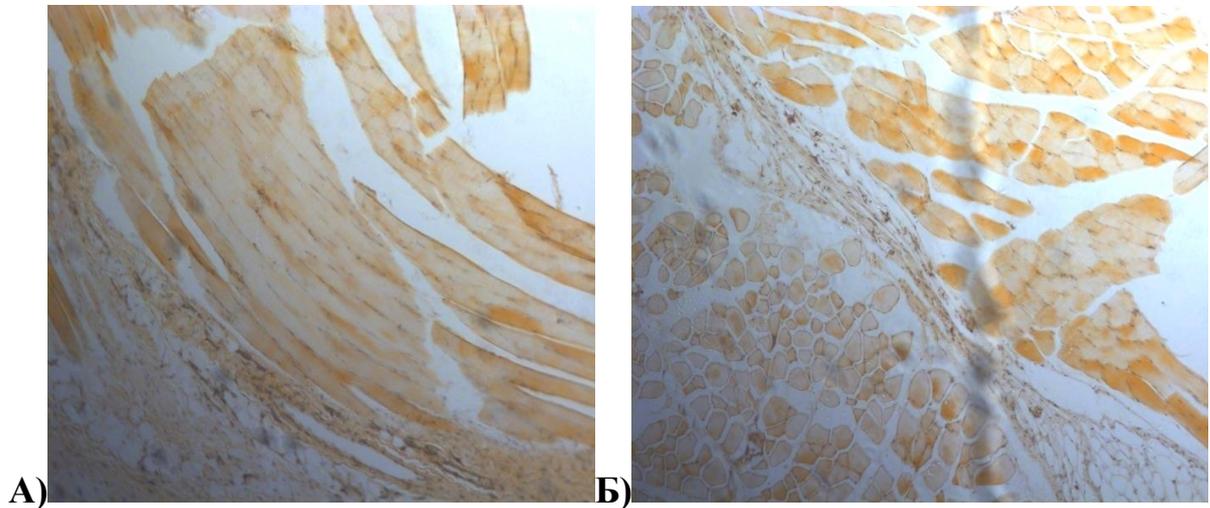


Рисунок 37 – Микрофотография препарата мышц голени крыс при ишемии, получивших инъекции физиологического раствора хлорида натрия в толщу мышц голени. А) микрофотография мышечных волокон, окраска гематоксилин-эозин, ув.  $\times 10$ ; Б) единичные сосуды в межмышечном пространстве соединительной ткани, окраска гематоксилин-эозин, ув.  $\times 10$

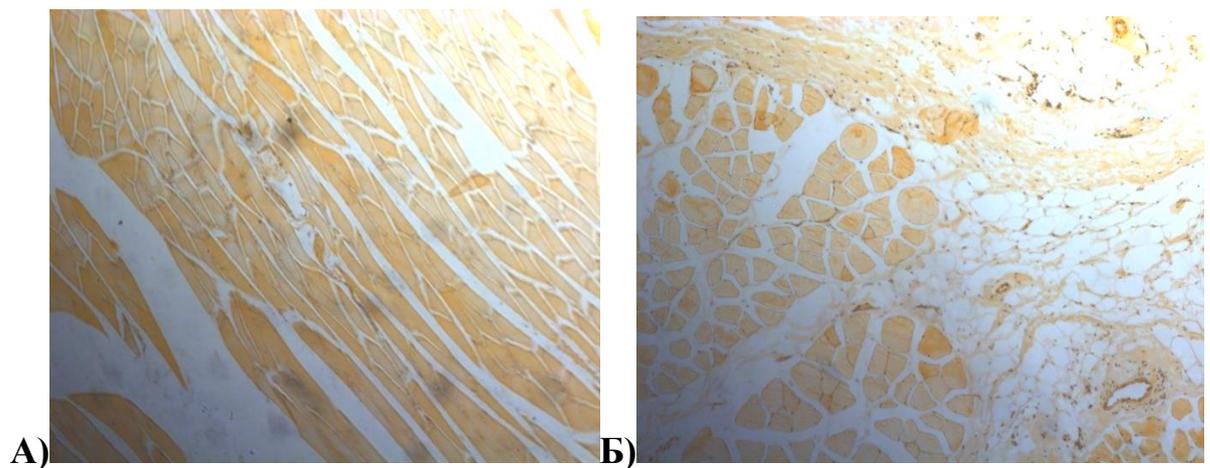


Рисунок 38 – Микрофотография препарата мышц голени крыс при ишемии, получивших инъекции МСК в толщу мышц голени.

А) микрофотография мышечных волокон, окраска гематоксилин-эозин, ув.  $\times 10$ ;

Б) сосудистый пучок, окраска гематоксилин-эозин, ув.  $\times 20$

В группе ФР, также отмечено истощение и фрагментация мышечных волокон, разрастание рыхлой соединительной ткани и снижение количества питающих мышцы сосудов (рисунок 37).

В группе МСК регистрировалось менее выраженное истощение и фрагментация мышечных волокон, незначительные разрастания рыхлой соединительной ткани и большее количество сосудов, питающих мышцы голени (рисунок 38).

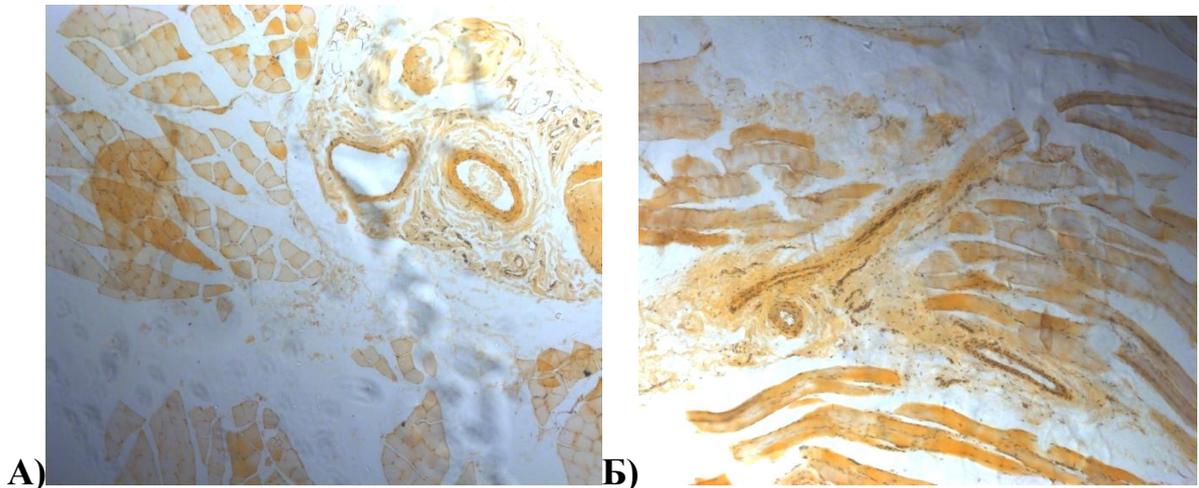


Рисунок 39 – Микрофотография препарата мышц голени крыс с ишемией, получивших инъекции МСК и ЭПО в толщу мышц голени.

А и Б) микрофотография мышечных волокон и сосудистого пучка, окраска гематоксилин-эозин, ув.  $\times 20$

В группе МСК+ЭПО отмечена сохранность мышечных волокон, незначительное разрастание рыхлой соединительной ткани и большее количество сосудов, питающих мышцы голени (рисунок 39).

Показано, что однократное введение в толщу мышц голени крыс сразу после моделирования ишемии в конечности МСК и МСК+ЭПО значительно

увеличивало количество сосудов, питающих мышцы, по сравнению с группой ишемия и ФР (таблица 17); ( $p < 0,05$ ). В то же время количество сосудов, питающих мышцы голени в группе МСК+ЭПО существенно больше по сравнению с остальными опытными группами ( $p < 0,05$ ). Необходимо отметить тот факт, что даже при использовании биомедицинского клеточного продукта количество сосудов, питающих мышцы голени, не достигает значений в группе интактных животных ( $p < 0,05$ ).

Таблица 17 – Количество сосудов, питающих мышцы голени при ишемии у крыс с учетом вида лечения ( $M \pm SD$ ); ( $n = 20$ )

Группы	Количество питающих мышцы сосудов
Интактные животные	$12,8 \pm 1,1$
Ишемия (контроль)	$1,6 \pm 0,89^*$
ФР	$2,6 \pm 0,55^*$
МСК	$7,2 \pm 1,3^{*\dagger^\circ}$
МСК+ЭПО	$8,8 \pm 0,84^{*\dagger^\circ\boxtimes}$
Примечание: * – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с интактными животными; † – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с группой ишемии; ° – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с группой ФР; $\boxtimes$ – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с группой МСК.	

Известно, что цитокины и ростовые факторы вовлечены в патогенез КИНК [442]. В то же время остается открытым вопрос о том, как меняется уровень цитокинов, ростовых факторов и оксида азота в динамике патологического процесса в сыворотке крови и в мышцах голени - на системном и локальном уровне.

Таблица 18 – Уровень провоспалительных цитокинов в сыворотке крови крыс при ишемии конечности (Ме, Q1–Q3); (n = 53)

Цитокины	Группы животных			
	ишемия	ФР	МСК	МСК+ЭПО
7-е сутки				
IL-1 $\beta$ , пг/мл	0,5; 0,5-1,0	<b>4,8*</b> ; 4,8-5,0	<b>2,5*†</b> ; 2,5-3,0	<b>0,5°</b> ; 0,5-1,0
IL-6, пг/мл	1,0; 1,0-1,5	1,0; 1,0-1,2	1,0; 1,0-1,6	<b>12,2*†°</b> ; 12,0-13,0
IL-8, пг/мл	2,0; 2,0-2,4	2,0; 2,0-2,2	2,0; 2,0-2,4	2,0; 2,0-2,4
TNF- $\alpha$ , пг/мл	4,4; 4,0-4,8	4,3; 4,0-4,3	<b>82,0*†</b> ; 82,0-84,0	<b>5,2†°</b> ; 5,0-5,4
14-е сутки				
IL-1 $\beta$ , пг/мл	30,6; 30,0-32,0	<b>0,5*</b> ; 0,5-1,0	<b>2,5†</b> ; 2,0-3,0	<b>0,5*°</b> ; 0,5-1,0
IL-6, пг/мл	1,0; 1,0-1,4	1,0; 1,0-1,2	1,0; 1,0-1,4	1,0; 1,0-1,4
IL-8, пг/мл	2,0; 2,0-2,4	2,0; 2,0-2,4	2,5†; 2,5-3,0	7,1; 6,0-8,0
TNF- $\alpha$ , пг/мл	9,5; 9,0-10,0	<b>2,0*</b> ; 2,0-2,6	<b>8,1†</b> ; 8,0-9,0	<b>16,1*†°</b> ; 15,0-17,0
28-е сутки				
IL-1 $\beta$ , пг/мл	2,1; 0,8-3,2	3,0; 2,9-3,5	<b>0,5*†</b> ; 0,5-1,0	<b>5,2*†°</b> ; 5,0-6,0
IL-6, пг/мл	1,0; 1,0-1,4	1,1; 1,0-1,9	1,0; 1,0-1,2	1,0; 1,0-1,2
IL-8, пг/мл	2,0; 2,0-2,4	2,2; 2,0-2,4	2,0; 2,0-2,4	2,0; 2,0-2,2
TNF- $\alpha$ , пг/мл	145,1; 7,2-282,3	<b>3,6*</b> ; 3,5-3,7	<b>4,0*</b> ; 2,6-4,1	<b>3,0*</b> ; 2,4-3,7
Примечание: * – (p < 0,05) по сравнению с ишемией; † – (p < 0,05) по сравнению с группой ФР; ° – (p < 0,05) по сравнению с группой МСК.				

Уровень провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 и TNF- $\alpha$ ) в сыворотке крови крыс с ишемией имел существенные колебания (таблица 18). Так, на 7-е сутки после моделирования ишемии у крыс в сыворотке крови группы ФР и МСК уровень IL-1 $\beta$  был значимо выше, чем в группе ишемия и МСК+ЭПО, а также в сравнении с интактными животными (IL-1 $\beta$  = 2; 2,2–2,4 пг/мл) (p < 0,05). На 14 сутки эксперимента в контроле уровень IL-1 $\beta$  существенно превышал таковой в остальных опытных группах (p < 0,05).

Кроме этого, в группе МСК также отмечен более высокий уровень IL-1 $\beta$  по сравнению с группой ФР и МСК+ЭПО ( $p < 0,05$ ). На 28-е сутки эксперимента уровень IL-1 $\beta$  в группе МСК были значимо снижен в сравнении с остальными опытными группами ( $p < 0,05$ ).

Только в группе МСК+ЭПО на 7-е сутки эксперимента в сыворотке крови крыс выявлен повышенный уровень IL-6 в сравнении с остальными опытными группами и интактными животными (IL-6 = 1,0; 1,0–1,1 пг/мл) ( $p < 0,05$ ). В остальные сроки эксперимента между группами не выявлено значимых различий по уровню IL-6 в сыворотке крови.

Что касается уровней в сыворотке крови IL-8, то только в группе МСК+ЭПО на 14-е сутки эксперимента выявлено повышение уровня цитокина в сравнении с остальными группами животных (IL-8 = 2,0; 2,0–2,2 пг/мл) ( $p < 0,05$ ).

Концентрация TNF- $\alpha$  в сыворотке крови на 7-е сутки эксперимента была значимо повышена в группе МСК и МСК+ЭПО, особенно в группе МСК, в сравнении с группой ишемии и ФР ( $p < 0,05$ ). Необходимо отметить тот факт, что в группе ишемии, ФР и МСК+ЭПО уровень TNF- $\alpha$  в сыворотке крови был существенно ниже, чем у интактных животных (TNF- $\alpha$  = 34,7; 34,7–34,9 пг/мл). На 14-е сутки эксперимента в сыворотке крови группы ишемии, МСК и МСК+ЭПО (особенно МСК+ЭПО), выявлен значимо более высокий уровень TNF- $\alpha$  в сравнении с группой ФР ( $p < 0,05$ ). На 28-е сутки эксперимента в группе ишемии выявлен всплеск уровня TNF- $\alpha$  в сыворотке крови в сравнении с остальными опытными группами ( $p < 0,05$ ).

В отношении уровней противовоспалительных цитокинов (IL-4 и IL-10), эритропоэтина и стойких метаболитов оксида азота, в сыворотке крови крыс с ишемией выявлены колебания в динамике наблюдения (таблица 19). Уровень IL-4 в сыворотке крови группы МСК+ЭПО на 7, 14 и 28 сутки эксперимента был существенно снижен в сравнении с аналогичным параметром в группе ишемии ( $p < 0,05$ ), но сопоставим с уровнем интактных животных (IL-4 = 5,3; 5,0–5,3 пг/мл).

В группе МСК уровень IL-4 в сыворотке крови на 28-е сутки эксперимента был значимо снижен по сравнению с группой ФР ( $p < 0,05$ ). Существенных различий по уровню IL-4 в сыворотке крови в группе ишемии и ФР на 7-е, 14-е и 28-е сутки не выявлено. На фоне введения физиологического раствора хлорида натрия и МСК в сыворотке крови этих групп отмечено существенное снижение уровней IL-10 в сравнении с группой ишемии и МСК+ЭПО ( $p < 0,05$ ), и сопоставимость их с уровнями у интактных животных (IL-10 = 2,1; 2,0–2,2 пг/мл). Необходимо отметить тот факт, что наибольший уровень IL-10 в сыворотке крови выявлен в группе МСК+ЭПО.

В то же время на 14-е сутки эксперимента в сыворотке крови групп МСК и МСК+ЭПО, особенно МСК+ЭПО, выявлен существенно повышенный уровень IL-10 по сравнению с группой ишемии и ФР ( $p < 0,05$ ).

Обратная динамика уровня IL-10 в сыворотке крови групп ишемии и ФР отмечена на 28-е сутки эксперимента, в то время как в группе МСК и МСК+ЭПО уровень IL-10 в сыворотке крови существенно снижен ( $p < 0,05$ ).

Что касается уровня ЭПО в сыворотке крови крыс с ишемией конечности, он был существенно снижен в группе ФР и МСК+ЭПО по сравнению с группой ишемии и МСК ( $p < 0,05$ ), а также с показателями у интактных животных (ЭПО = 708,0; 700,0–709,0 мМЕ/мл).

Таблица 19 – Уровень противовоспалительных цитокинов, ЭПО и NO в сыворотке крови крыс при ишемии конечности (Me, Q1–Q3); (n = 53)

Цитокины	Группы животных			
	ишемия	ФР	МСК	МСК+ЭПО
7-е сутки				
IL-4, пг/мл	5,3; 5,3-5,8	5,5; 5,0-5,7	5,4; 5,4-6,0	<b>4,9*</b> <sup>o</sup> ; 4,9-5,0
IL-10, пг/мл	14,1; 14,0-15,0	<b>2,0*</b> ; 2,9-2,4	<b>2,2*</b> ; 2,2-2,6	<b>16,6*</b> <sup>†o</sup> ; 16,0-17,0
ЭПО, МЕ/мл	199,2; 199,0-200,0	<b>22,4*</b> ; 22,0-23,0	<b>916,0*</b> <sup>†</sup> ; 915,0-920,0	<b>112,0*</b> <sup>†o</sup> ; 100,0-113,0
NO, мкМ/мл	20,2; 19,7-30,2	<b>44,0*</b> ; 43,3-44,3	28,5; 27,5-40,3	22,0; 20,7-65,4

Цитокины	Группы животных			
	ишемия	ФР	МСК	МСК+ЭПО
14-е сутки				
IL-4, пг/мл	5,1; 5,0-6,0	5,0; 5,0-6,0	5,3; 5,0-6,0	4,9; 4,9-5,0
IL-10, пг/мл	4,5; 4,5-5,0	<b>2,0*</b> ; 2,0-2,4	<b>14,1*†</b> ; 14,0-15,0	<b>24,3*†°</b> ; 23,0-25,0
ЭПО, МЕ/мл	480,8; 480,0-482,0	<b>5,6*</b> ; 5,0-6,0	<b>1800,0*†</b> ; 1800,0-2000,0	<b>105,6*†°</b> ; 100,0-106,0
NO, мкМ/мл	38,0; 16,9-55,3	<b>98,5*</b> ; 96,8-118,0	<b>45,1†</b> ; 40,9-57,0	<b>73,9*†°</b> ; 70,3-88,4
28-е сутки				
IL-4, пг/мл	8,6; 5,0-11,2	9,4; 8,8-9,7	<b>6,6†</b> ; 6,1-7,0	<b>5,1†</b> ; 5,1-5,3
IL-10, пг/мл	10,8; 2,0-19,2	<b>26,9*</b> ; 23,5-27,5	<b>2,2*†</b> ; 2,0-11,7	<b>2,0*†</b> ; 2,0-2,9
ЭПО, МЕ/мл	1692,0; 1364,0-1984,0	<b>4230,0*</b> ; 3089,2-4231,0	<b>1027,0*†</b> ; 296,0-1100,0	<b>92,8*†°</b> ; 90,0-93,0
NO, мкМ/мл	37,7; 20,3-43,9	42,4; 20,4-49,6	40,2; 33,6-46,0	53,6; 34,6-73,5
Примечание: * – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с группой ишемии; † – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с группой ФР; ° – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с группой МСК.				

Только на фоне введения МСК отмечено значимое увеличение в сыворотке крови ЭПО в сравнении с остальными опытными группами и интактными животными ( $p < 0,05$ ).

Аналогичная картина сохраняется и на 14-е сутки эксперимента. В то же время на 28-е сутки эксперимента в сыворотке крови группы ишемии и ФР, особенно ФР, выявлено существенное увеличение уровней ЭПО по сравнению с группой МСК и МСК+ЭПО ( $p < 0,05$ ).

Уровни стойких метаболитов NO в сыворотке крови группы ФР на 7-е сутки эксперимента были значимо выше, чем в остальных опытных группах ( $p < 0,05$ ) и по сравнению с уровнями у интактных животных (NO = 29,45; 22,5–30,6 мкМ/мл). На 14-е сутки эксперимента в группе ФР и МСК+ЭПО отмечен существенно повышенный уровень в сыворотке крови стойких метаболитов NO в сравнении с группой ишемии и МСК ( $p < 0,05$ ). В то же время к 28-м суткам эксперимента

группы существенно не различались по уровням стойких метаболитов NO в сыворотке крови.

Известно, что при гипоперфузии скелетных мышц в них повышена экспрессия генов *IL-1 $\beta$*  и *IL-6* [453]. Представлялось важным оценить уровень цитокинов в мышцах при ишемии конечности и влияние биомедицинского клеточного продукта на их уровень.

Так, уровень *IL-1 $\beta$*  в мышцах голени крыс с ишемией конечности из группы МСК и МСК+ЭПО, особенно МСК+ЭПО, существенно ниже, чем в группе ишемии и ФР на 7-е сутки эксперимента (таблица 20); ( $p < 0,05$ ), а также в сравнении с интактными животными (*IL-1 $\beta$*  = 13,5; 13,0–14,0 пг/мл). На 14-е сутки эксперимента картина кардинально меняется – уровень *IL-1 $\beta$*  в мышцах голени группы МСК и МСК+ЭПО значительно возрастает, а в группе ишемии и ФР снижается ( $p < 0,05$ ).

Таблица 20 – Уровень провоспалительных цитокинов в мышцах голени крыс при ишемии конечности (Me, Q1–Q3); (n = 53)

Цитокины	Группы животных			
	ишемия	ФР	МСК	МСК+ЭПО
7-е сутки				
<i>IL-1<math>\beta</math></i> , пг/мл	19,4; 19,0-20,0	<b>15,5*</b> ; 15,0-17,0	<b>7,2*†</b> ; 0,7-7,2	<b>0,5*†°</b> ; 0,5-1,0
<i>IL-6</i> , пг/мл	1,0; 1,0-1,6	1,0; 1,0-1,2	<b>16,8*†</b> ; 16,8-17,0	1,0; 1,0-1,2
<i>IL-8</i> , пг/мл	2,0; 2,0-2,2	2,0; 2,0-2,2	<b>6,5*†</b> ; 6,5-7,0	2,0; 2,0-2,4
TNF- $\alpha$ , пг/мл	6,9; 6,0-7,0	7,5; 7,0-7,5	<b>15,8*†</b> ; 15,8-17,0	<b>8,4*†°</b> ; 8,0-8,5
14-е сутки				
<i>IL-1<math>\beta</math></i> , пг/мл	2,5; 2,0-3,0	<b>4,4*</b> ; 4,0-5,9	<b>15,5*†</b> ; 15,5-16,0	<b>10,7*†°</b> ; 10,0-12,0
<i>IL-6</i> , пг/мл	1,0; 1,0-1,8	1,0; 1,0-1,4	1,0; 1,0-1,6	1,0; 1,0-1,2
<i>IL-8</i> , пг/мл	2,0; 2,0-2,2	<b>3,4*</b> ; 3,0-3,6	2,0; 2,0-2,4	2,0; 2,0-2,4
TNF- $\alpha$ , пг/мл	2,6; 2,0-3,0	<b>56,6*</b> ; 56,0-59,0	<b>6,7*†</b> ; 6,7-7,0	<b>76,2*†°</b> ; 76,0-77,0

28-е сутки				
IL-1 $\beta$ , пг/мл	25,7; 25,0-27,0	<b>0,5*</b> ; 0,5-1,0	<b>1,6*</b> ; 0,5-2,2	<b>6,0*<math>\dagger</math><math>^\circ</math></b> ; 5,0-6,0
IL-6, пг/мл	1,0; 1,0-1,4	1,6; 1,0-1,6	<b>5,8*<math>\dagger</math></b> ; 1,0-10,3	1,0; 1,0-1,2
IL-8, пг/мл	2,0; 2,0-2,4	2,0; 2,0-2,1	2,0; 2,0-2,4	<b>3,4*<math>\dagger</math><math>^\circ</math></b> ; 3,0-4,0
TNF- $\alpha$ , пг/мл	18,0; 18,0-20,0	15,1; 15,0-15,5	<b>26,6*</b> ; 4,9-48,1	<b>61,6*<math>\dagger</math><math>^\circ</math></b> ; 61,0-62,0
Примечание: * – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с группой ишемии; $\dagger$ – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с группой ФР; $^\circ$ – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с группой МСК.				

В то же время, на 28-е сутки эксперимента в группе ишемии вновь выявлен увеличенный уровень IL-1 $\beta$  в мышцах голени, а в остальных опытных группах – сниженный ( $p < 0,05$ ).

На ранних сроках эксперимента только в группе МСК в мышцах голени выявлен повышенный уровень IL-6 ( $p < 0,05$ ), а в остальных группах он существенно не отличался (IL-6 = 1,0; 1,0–1,1 пг/мл).

На 14-е сутки эксперимента не выявлено существенных различий между группами по уровню IL-6 в мышцах голени, а на 28-е сутки подъем отмечен в группе МСК.

Уровень IL-8 в мышцах голени группы МСК значимо выше, чем в остальных опытных группах ( $p < 0,05$ ), но ниже, чем у интактных животных (IL-8 = 10,8; 10,8–11,0 пг/мл). Только в группе ФР на 14-е сутки выявлен повышенный уровень IL-8 в мышцах голени по сравнению с другими опытными группами ( $p < 0,05$ ). В то же время на 28-е сутки отмечен увеличенный уровень IL-8 в мышцах голени в группе МСК+ЭПО ( $p < 0,05$ ).

В группе МСК и МСК+ЭПО, особенно МСК, на 7-е сутки эксперимента выявлен существенно повышенный уровень TNF- $\alpha$  в мышцах голени по сравнению с остальными опытными группами ( $p < 0,05$ ). В то же время в опытных группах, за исключением группы МСК, уровень TNF- $\alpha$  в мышцах голени был ниже, чем у интактных животных (TNF- $\alpha$  = 16,1; 16,0–16,2 пг/мл); ( $p < 0,05$ ). Повышенный уровень TNF- $\alpha$  в мышцах голени в группе ФР, МСК и МСК+ЭПО,

особенно в группе МСК+ЭПО, выявлен на 14 сутки эксперимента в сравнении с контролем ( $p < 0,05$ ).

В то же время к 28-м суткам эксперимента отмечено сохранение более высокого уровня TNF- $\alpha$  в мышцах голени в группе МСК и МСК+ЭПО, особенно в группе МСК+ЭПО, по сравнению с другими опытными группами ( $p < 0,05$ ).

В таблице 21 суммированы данные изменения уровня противовоспалительных цитокинов (IL-4, IL-10), эритропоэтина и NO в мышцах голени. Так, уровень IL-4 в мышцах голени в группе ФР и МСК+ЭПО значительно меньше, чем в группе МСК на 7 сутки эксперимента ( $p < 0,05$ ), но сопоставим с интактными животными (IL-4 = 5,4; 5,0–5,5 пг/мл).

На 14-е сутки эксперимента уровень IL-4 в мышцах голени в группе ФР, МСК и МСК+ЭПО существенно выше, чем в группе ишемии ( $p < 0,05$ ). В то же время на 28-е сутки эксперимента только в группе ФР отмечено нарастание уровня IL-4 по сравнению с остальными опытными группами ( $p < 0,05$ ).

Что касается уровней IL-10 в мышцах голени группы ФР и МСК+ЭПО, особенно в группе ФР, уровни цитокина значительно повышены по сравнению с остальными опытными группами ( $p < 0,05$ ), а также в сравнении с интактными животными (IL-10 = 4,5; 4,0–4,6 пг/мл). На 14-е и 28-е сутки эксперимента в группе МСК и МСК+ЭПО значительно выше уровень IL-10 в мышцах голени ( $p < 0,05$ ). В группе ишемии на 28-е сутки также отмечен подъем уровня IL-10 в мышцах голени.

Только в группе ФР на 7-е сутки эксперимента выявлено значимое снижение уровней ЭПО в мышцах голени по сравнению с остальными опытными группами ( $p < 0,05$ ) и интактными (ЭПО = 68,8; 68,0–69,0 мМЕ/мл).

На 14-е и 28-е сутки эксперимента отмечен прирост ЭПО в мышцах голени в группе ФР по сравнению с группой ишемии ( $p < 0,05$ ). ЭПО в мышцах голени группы МСК и МСК+ЭПО были существенно выше, чем в группе ишемии только на 14-е сутки эксперимента ( $p < 0,05$ ), а к 28-м суткам существенных различий не выявлено.

В отношении стойких метаболитов NO в мышцах голени при ишемии конечности выявлено значимое их снижение в группе ФР по сравнению с группой ишемии и МСК+ЭПО ( $p < 0,05$ ) и более высокими уровнями во всех опытных группах в сравнении с интактными животными (NO = 61,5; 60,0–62,0 мкМ/мл).

Таблица 21 – Уровень противовоспалительных цитокинов, ЭПО и оксида азота в мышцах голени крыс при ишемии конечности (Me, Q1–Q3); (n = 53)

Цитокины	Группы животных			
	ишемия	ФР	МСК	МСК+ЭПО
7-е сутки				
IL-4, пг/мл	5,4; 5,0-5,6	5,1; 5,0-5,1	<b>5,5†</b> ; 5,5-6,0	<b>5,2°</b> ; 5,0-5,2
IL-10, пг/мл	2,0; 2,0-2,4	<b>21,7*</b> ; 21,0-23,0	2,0; 2,0-2,4	<b>9,2*†°</b> ; 9,0-9,3
ЭПО, мМЕ/мл	1871,2; 1871,0-1900,0	<b>55,3*</b> ; 55,0-56,0	<b>1040,0*†</b> ; 1040,0-1100,0	<b>1576,0*†°</b> ; 1500,0-1580,0
NO, мкМ/мл	71,3; 69,8-123,4	<b>67,7*</b> ; 64,4-69,5	41,8; 39,5-117,5	<b>114,7†</b> ; 111,4-215,4
14-е сутки				
IL-4, пг/мл	4,7; 4,0-5,0	5,6; 5,0-6,0	<b>5,5*</b> ; 5,5-6,0	<b>5,9*</b> ; 5,0-6,0
IL-10, пг/мл	2,0; 2,0-2,4	2,2; 2,0-2,6	<b>6,8*†</b> ; 6,8-7,0	<b>21,7*†°</b> ; 21,0-22,0
ЭПО, мМЕ/мл	308,0; 308,0-320,0	<b>454,9*</b> ; 454,0-460,0	<b>3428,0*†</b> ; 3428,0-3500,0	<b>2188,0*†°</b> ; 2000,0-2188,0
NO, мкМ/мл	108,7; 101,1-144,2	130,1; 109,0-131,1	119,9; 119,8-160,0	<b>66,7*†°</b> ; 64,8-71,2
28-е сутки				
IL-4, пг/мл	5,2; 5,0-6,0	<b>9,9*</b> ; 9,0-10,0	<b>5,5†</b> ; 5,2-6,0	<b>5,5†</b> ; 5,0-6,0
IL-10, пг/мл	19,2; 19,0-20,0	<b>2,0*</b> ; 2,0-2,1	<b>33,5*†</b> ; 4,5-62,4	<b>37,5*†</b> ; 28,0-38,0
ЭПО, мМЕ/мл	1376,0; 1376,0-1400,0	<b>19672,0*</b> ; 19762,0-20000,0	<b>1330,0*†</b> ; 411,0-2240,0	<b>1304,8*†</b> ; 1200,0-1305,0
NO, мкМ/мл	90,3; 78,5-124,4	<b>17,5*</b> ; 17,1-28,4	<b>65,0†</b> ; 50,0-118,8	<b>63,5†</b> ; 56,5-123,3
Примечание: * – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с группой ишемии; † – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с группой ФР; ° – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с группой МСК.				

На 14 сутки эксперимента отмечено существенное снижение уровней NO в мышцах голени в группе МСК+ЭПО по сравнению с остальными опытными группами ( $p < 0,05$ ).

К 28 суткам эксперимента в группе ФР вновь отмечено наименьшее содержание NO в мышцах голени по сравнению с остальными группами ( $p < 0,05$ ).

Данные корреляционного анализа представлены в таблице 22 и таблице 23. В группе ФР выявлена сопряженность уровней IL-8 в сыворотке крови с показателем микроциркуляции, соотношением амплитуды кардиоритма и медленных колебаний, и индексом эффективности микроциркуляции. Уровень IL-8 в сыворотке крови крыс группы ФР находился в обратной и сильной взаимосвязи с амплитудой медленных и быстрых колебаний, и соотношением амплитуды быстрых и медленных колебаний. Выявленные корреляционные связи могут отражать IL-8 на тонус сосудистой стенки кровеносного русла не только в области ишемии, но и на уровне системного кровообращения.

ЭПО и TNF- $\alpha$  в группе МСК напрямую взаимосвязаны с количеством сосудов в мышцах голени, что является следствием ангиогенного потенциала у данных фактора.

Кроме этого, в группе МСК амплитуда пульсовых колебаний также находилась в обратной связи с уровнем IL-8, IL-6, IL-1 $\beta$  и с IL-10 в сыворотке крови крыс, что может указывать на вовлеченность данных биологически активных молекул в процесс ангиогенеза и поддержания кровообращения на системном уровне.

В группе МСК установлена сопряженность соотношения амплитуды кардиоритма и медленных колебаний с уровнем в сыворотке крови IL-8, IL-6, IL-1 $\beta$  и IL-10, что указывает на влияние данных цитокинов на сократительную активность сердца. В группе МСК показана сопряженность уровней NO в мышцах голени с показателем микроциркуляции, с амплитудой быстрых колебаний и соотношением амплитуды быстрых и медленных колебаний, что объясняется прямым вазодилатирующим действием оксида азота.

Таблица 22 – Взаимосвязи параметров микроциркуляции в стопе с уровнем цитокинов в сыворотке крови при ишемии конечности (n = 24)

Параметры	IL-1 $\beta$	IL-6	IL-8	TNF- $\alpha$	IL-10
В группе ФР					
ПМ	—	—	r = 0,97; p = 0,005	—	—
LF	—	—	r = -0,97; p = 0,005	—	—
HF	—	—	r = -0,97; p = 0,005	—	—
CF	—	—		—	—
A <sub>max</sub> CF A <sub>max</sub> LF	—	—	r = 0,97; p = 0,005	—	—
A <sub>max</sub> HF A <sub>max</sub> LF	—	—	r = -0,97; p = 0,005	—	—
ИЭМ	—	—	r = 0,97; p = 0,005	—	—
В группе МСК					
CF	r = -0,89; p = 0,04	r = -0,89; p = 0,04	r = -0,89; p = 0,04	—	r = -0,89; p = 0,06
A <sub>max</sub> CF A <sub>max</sub> LF	r = -0,92; p = 0,028	r = -0,92; p = 0,028	r = -0,92; p = 0,028	—	r = -0,92; p = 0,028
Кол-во сосудов в мышцах	—	—	—	r = 0,89; p = 0,04	r = 0,89; p = 0,04

Таблица 23 – Взаимосвязи параметров микроциркуляции в стопе с уровнями цитокинов в тканях мышц голени при ишемии конечности (n = 24)

Параметры	IL-1 $\beta$	IL-6	IL-8	TNF- $\alpha$	IL-4	IL-10	EPO	NO
В группе МСК								
ПМ	—	—	—	—	—	—	—	r = 0,9; p = 0,037
HF	—	—	—	—	—	—	—	r = 0,97; p = 0,005
CF	r = -0,97; p = 0,005	—						
A <sub>max</sub> HF A <sub>max</sub> LF	—	—	—	—	—	—	—	r = 0,97; p = 0,005
В группе МСК+ЭПО								
LF	—	—	—	—	—	—	—	r = 0,97; p = 0,005
HF	—	—	—	—	—	—	—	r = 0,97; p = 0,005
A <sub>max</sub> CF A <sub>max</sub> LF	r = 0,97; p = 0,005	r = -0,97; p = 0,005	r = -0,97; p = 0,005	r = -0,97; p = 0,005	r = -0,97; p = 0,005	—	r = 0,97; p = 0,005	—
ИЭМ	r = -0,97; p = 0,005	r = 0,97; p = 0,005	r = 0,97; p = 0,005	r = -0,97; p = 0,005	r = -0,97; p = 0,005	—	r = -0,97; p = 0,005	—

В то же время уровень EPO в мышцах голени в группе МСК находился в обратной взаимосвязи с амплитудой пульсовых колебаний.

Необходимо отметить тот факт, что амплитуда пульсовых колебаний также находилась в обратной связи с уровнем IL-4, IL-8, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и с IL-10 в мышцах голени, что может указывать на значимость данных биологически активных молекул в процесс ангиогенеза и поддержания кровообращения на локальном уровне в месте патологического процесса.

Показана взаимосвязь уровня NO в мышцах голени с амплитудой медленных и быстрых колебаний в группе МСК+ЭПО.

Уровень EPO, IL-4, IL-8, IL-6, TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  в мышцах голени взаимосвязаны с соотношением амплитуды кардиоритма и медленных колебаний, что косвенно указывает на влияние данных факторов на параметры микроциркуляции и ангиогенез при ишемии конечности. Кроме этого, уровни EPO, IL-4, IL-8, IL-6, TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  в мышцах сопряжены с индексом эффективности микроциркуляции в области стопы: что также отражает вовлеченность данных молекул в функционирование кровоснабжения конечностей.

### **Заключение**

Таким образом, при перерезке бедренной артерии левой задней конечности у крыс Wistar регистрируется падение параметра микроциркуляции по данным лазерной доплеровской флоуметрии на 59–71 % от исходного значения, менее выраженное в группах, получивших однократное введение в толщу мышц голени на стороне ишемии биомедицинского клеточного продукта (МСК или МСК+ЭПО). Показано, что МСК и МСК+ЭПО существенно усиливали показатели микроциркуляции в области стопы на стороне ишемии конечности в динамике наблюдения по сравнению с животными, не получавшими инъекций биомедицинского клеточного продукта. Иммуноферментный анализ показал, что в сыворотке крови групп МСК и МСК+ЭПО уровень IL-10, TNF- $\alpha$  и ЭПО выше на ранних сроках эксперимента и снижается к концу наблюдения. Кроме этого, показано, что биомедицинский клеточный продукт способствовал снижению уровней провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$  и возрастанию уровней TNF- $\alpha$  и ЭПО в мышцах голени. Между параметрами микроциркуляции в области стопы на стороне ишемии конечности и уровнями цитокинов в сыворотке крови и мышцах голени выявлены взаимосвязи. Кроме этого, количество сосудов, питающих мышцы голени при ишемии конечности сопряжено с уровнями TNF- $\alpha$  ЭПО в группе МСК.

### 3.7.2 Терапевтический потенциал биомедицинского клеточного продукта при дегенерации межпозвонкового диска

Одной из причин болей в спине в 20–40 % случаев является дегенерация межпозвонкового диска [290]. Клеточные технологии, в том числе и стволовые клетки, на сегодняшний день являются одним из перспективных способов лечения ДМПД [76; 418].

Нами исследован терапевтический потенциал биомедицинского клеточного продукта (МСК и МСК+ЭПО) при экспериментальной модели ДМПД у крыс, вызванного пункцией межпозвонкового диска хвостового отдела позвоночника. Так, нами не выявлено значимых различий по высоте межпозвонкового диска хвостового отдела позвоночника у крыс на уровне Соб-7 до момента индукции ДМПД (таблица 24); ( $p > 0,05$ ).

Через 7 суток от момента пункции МПД хвостового отдела позвоночника крыс выявлено значимое снижение высоты МПД у всех опытных животных, которые существенно не различались между собой (рисунок 40).

На 14-е сутки эксперимента по данным МРТ в группе МСК и МСК+ЭПО значимо увеличилось расстояние между соседними позвонками в сравнении с контрольной группой (рисунок 40); ( $p < 0,05$ ).

Таблица 24 – Показатели расстояния между запирающими пластинами позвонков при механическом разрушении пульпозного ядра межпозвонкового диска по данным магнитно-резонансной томографии (Me, Q1–Q3), в мм%; ( $n = 35$ )

Группы	Сроки проведения МРТ			
	0-е сутки	7-е сутки	14-е сутки	21-е сутки
Контроль	1,6; 1,5–1,6	0,9; 0,9–0,9	0,8; 0,7–0,9	0,6; 0,6–0,7
МСК	1,55; 1,45–1,6	0,85; 0,8–0,9	1,15* ; 1,1–1,25	1,20* ; 1,2–1,25
МСК+ЭПО	1,5; 1,4–1,6	0,8; 0,7–0,9	1,3* ; 1,1–1,3	1,4*† ; 1,3–1,5

Примечание: \* – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем; † – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с МСК.

В то же время между группой МСК и МСК+ЭПО существенных различий не выявлено. На 21-е сутки эксперимента группа МСК и МСК+ЭПО значительно отличалась от контрольной группы по высоте МПД в области индукции дегенерации (таблица 24, рисунок 40); ( $p < 0,05$ ).

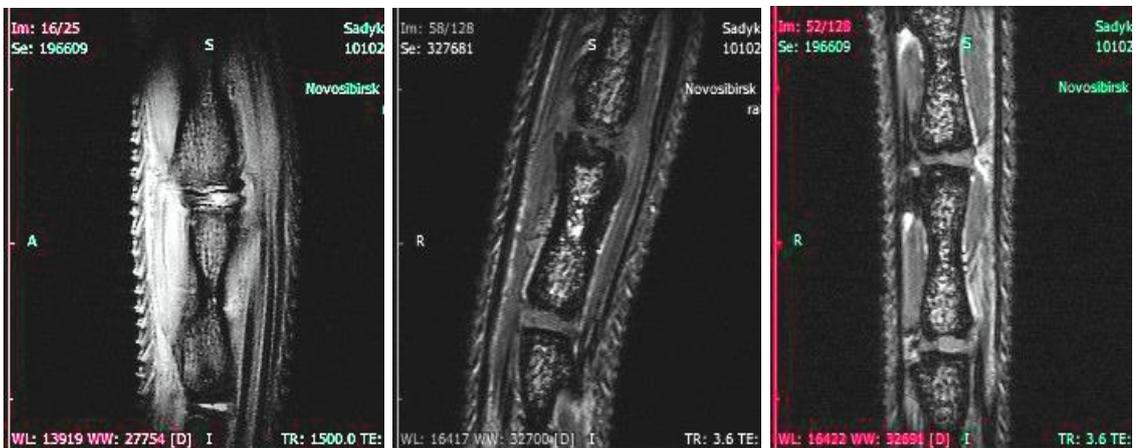
Более того, в группе МСК+ЭПО выявлено существенное увеличение расстояния между позвонками по сравнению с аналогичным показателем в группе МСК (таблица 24, рисунок 40); ( $p < 0,05$ ).

**Контроль**

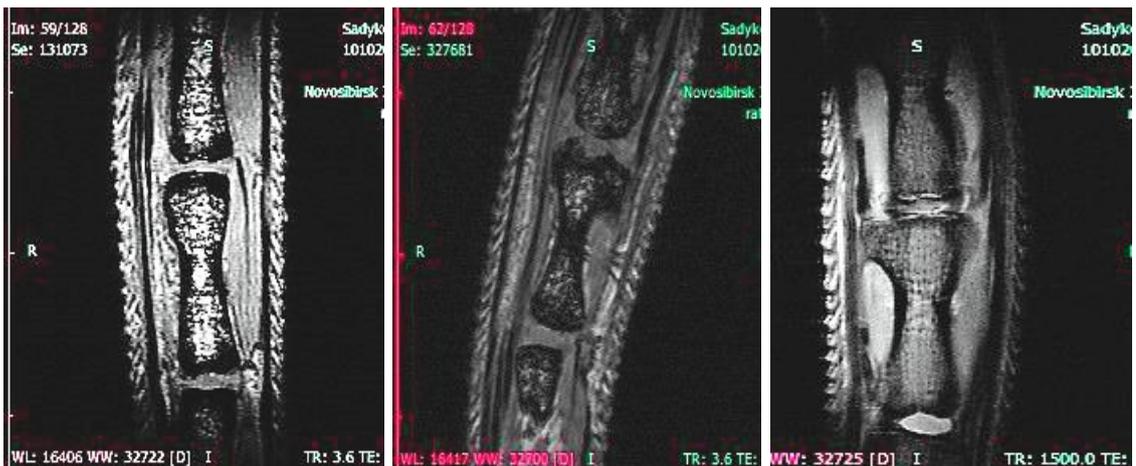
**МСК**

**МСК+ЭПО**

**7 сутки**



**14 сутки**



## 21 сутки

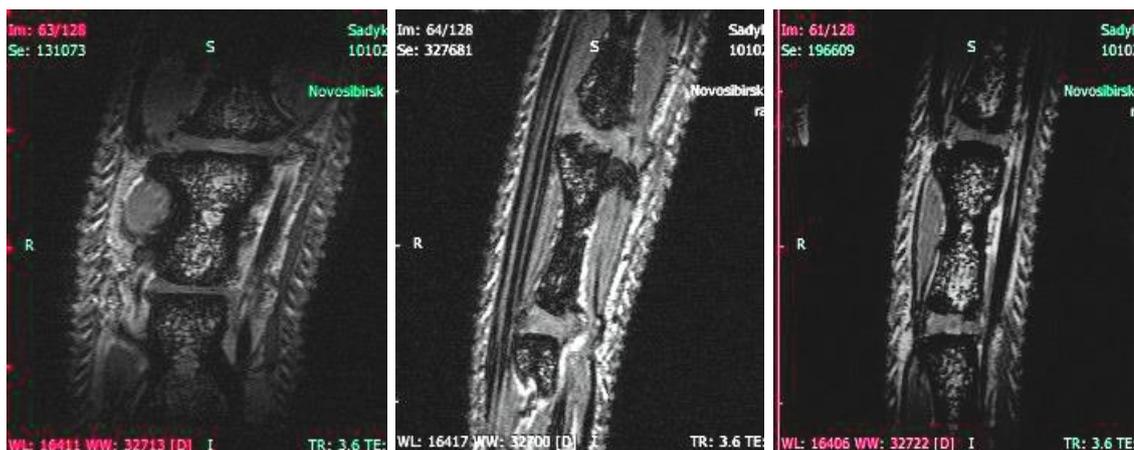


Рисунок 40 – Снимки магнитно-резонансной томографии дегенерации межпозвонкового диск хвостового отдела позвоночника на уровне Соб-7 в динамике наблюдения терапевтического потенциала биомедицинского клеточного продукта

О клинической эффективности терапии дегенеративного процесса в межпозвонковом диске свидетельствуют и результаты гистологического исследования (рисунок 41). Так, на 7-е сутки во всех группах животных отмечены следы пульпозного ядра, фиброзное кольцо резко разрыхлено, ламеллы истончены и разрыхлены. На 14-е сутки в контроле – следы пульпозного ядра, увеличение плотности фиброзного кольца. К 21-м суткам в контроле вместо пульпозного ядра отмечены элементы соединительной ткани, разрыхленность фиброзного кольца.

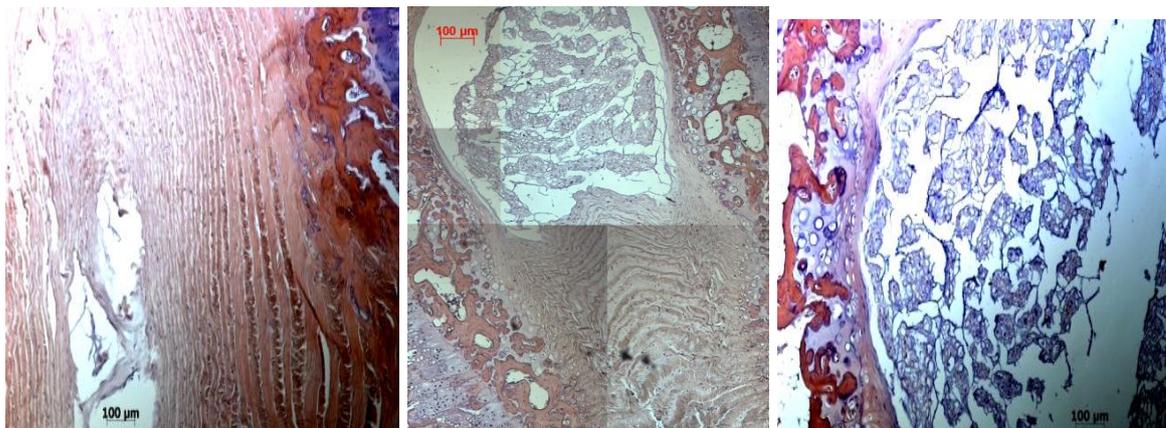
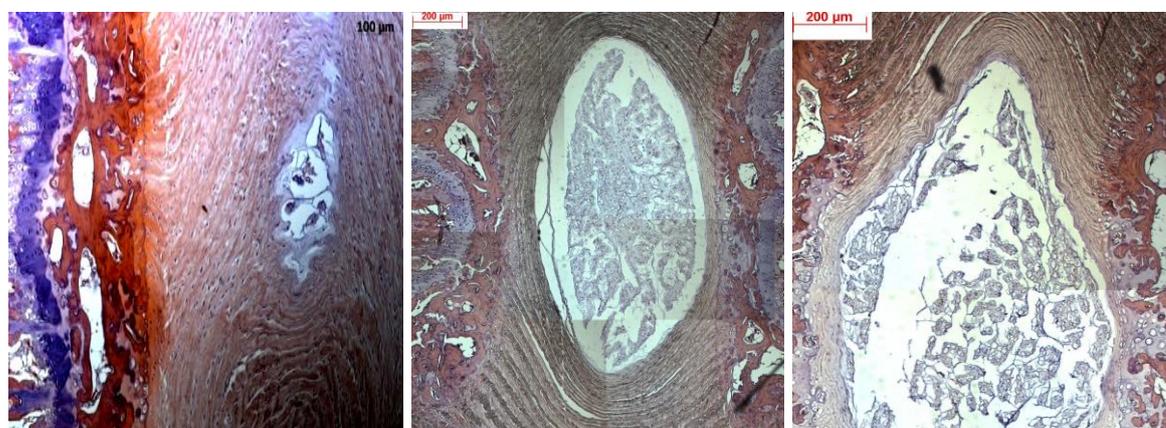
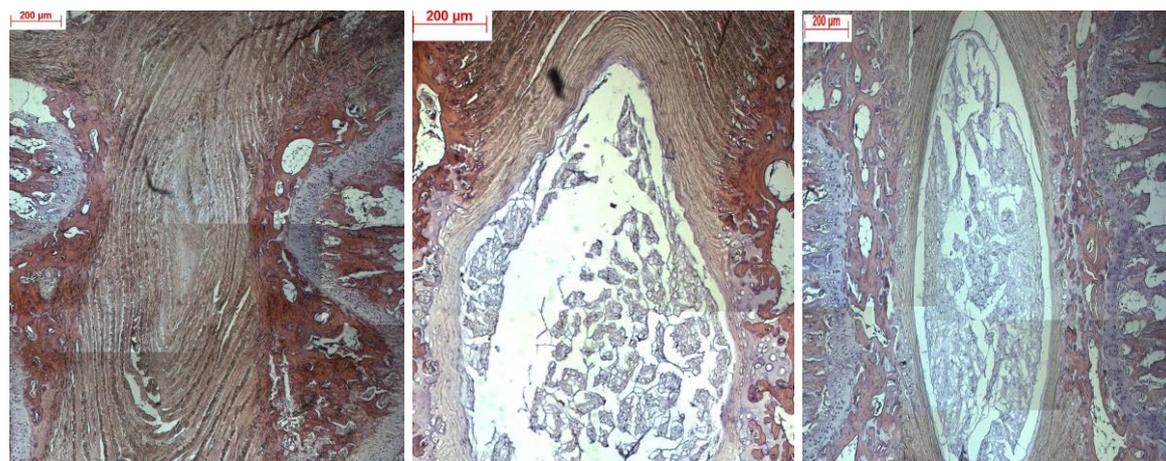
**Контроль****МСК****МСК+ЭПО****7 сутки****14 сутки****21 сутки**

Рисунок 41 – Гистология межпозвонкового диска крысы при дегенеративном процессе в хвостовом отделе позвоночника с учетом способа лечения, гематоксилин-эозин, ув.  $\times 40$

В группе МСК к 14-м суткам в области пульпозного ядра выявлены скопления клеток, сохраняется разрыхленность фиброзного кольца. На 21-е сутки в группе МСК пульпозное ядро содержит активные клеточные элементы, фиброзное кольцо состоит из регулярных ориентированных пластинок.

В группе МСК+ЭПО на 14-е сутки, отмечена разрыхленность фиброзного кольца, в области пульпозного ядра единичные клеточные элементы и скопление соединительной ткани. На 21-е сутки в группе МСК+ЭПО увеличена доля клеточных элементов и соединительной ткани в области пульпозного ядра, снижена разрыхленность фиброзного кольца.

### **Заключение**

Пункцией межпозвонкового диска хвостового отдела позвоночника на уровне Соб-7 у крысы по данным магнитно-резонансной томографии вызвано снижение расстояния между запирающими пластинами прилегающих позвонковых тел и разрушение пульпозного ядра межпозвонкового диска, что указывает на развитие дегенеративного процесса в межпозвонковом диске. Однократное введение в область поврежденного межпозвонкового диска МСК и МСК+ЭПО через 7 дней от индукции дегенеративного процесса в межпозвонковом диске хвостового отдела позвоночника крысы способствовало увеличению расстояния между прилегающими позвонками и активации пролиферации оставшихся клеток пульпозного ядра и упорядочению структурных элементов фиброзного кольца, особенно при сочетании МСК с ЭПО.

## ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ СОБСТВЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ

На сегодняшний день накоплено значительное количество данных о терапевтической эффективности стволовых клеток на экспериментальных моделях заболеваний, а также в клинических исследованиях у человека [3; 4; 12; 23; 25; 35; 45; 102; 129; 298; 325; 341; 402; 417; 420]. По данным метаанализа рандомизированного клинического исследования эффективности интрамиокардиального введения моноклеарных клеток костного мозга больным с ишемической болезнью сердца – отмечено увеличение фракции выброса левого желудочка на 2,8–6,9 %. Клеточные технологии при критической ишемии нижних конечностей способствуют ускорению неоангиогенеза и снижению частоту ампутаций [139; 294; 308; 366; 397; 466; 487; 492]. Терапия стволовыми клетками дефектов кожных покровов различной этиологии способствует ускоренной эпителизации раневой поверхности [74; 109; 129; 155; 180; 229; 454; 475]. Кроме этого, стволовые клетки нашли свое применение и в терапии заболеваний кишечника. Отмечена эффективность клеточной терапии энтеритов [84; 100], фистул [312; 479], хронического воспаления слизистой кишечника, индуцированного декстраном сульфата натрия [117; 236; 473]. Показан терапевтический потенциал стволовых клеток и при патологии опорно-двигательного аппарата [333].

В последнее время объектом исследования терапевтического потенциала, при экспериментальных моделях заболеваний и в клинических исследованиях у людей стали МСК [14; 33; 64; 68; 86; 90; 124; 148; 149; 232; 254; 318; 349; 369; 451; 472; 473; 474].

В то же время морфофункциональные свойства МСК зависят от источника выделения клеток. Показано влияние типа жировой ткани (белый или бурый жир) на жизнеспособность и дифференцировочный потенциал МСК [132; 222; 461; 493]. Для МСК пуповинной крови характерна повышенная пролиферативная активность в сравнении с МСК из костного мозга и МСК жировой ткани [69; 140].

В нашем исследовании в качестве источника МСК был использован костный мозг человека и крыс. В ходе культивирования ядросодержащих клеток костного мозга человека и крыс Wistar *in vitro* получены первичные культуры МСК.

Верификация принадлежности к «истинным» МСК полученных культур костного мозга человека и животных проведена: а) по способности прикрепляться к пластику; б) по пролиферативному потенциалу; в) по экспрессии на мембране CD73, CD90, CD105 и отсутствию CD34, CD45; г) по дифференцировке в адипоциты, остециты и хондроциты [344]. Нами отмечено значимое различие экспрессии на мембране МСК из костного мозга человека и крыс CD73 –  $(97,33 \pm 2,25) \%$  и  $(86,6 \pm 4,6) \%$  соответственно и CD105 –  $(95,33 \pm 2,66) \%$  и  $(76,4 \pm 6,6) \%$  соответственно и отсутствие существенных различий по экспрессии CD90 –  $(94,67 \pm 5,01) \%$  и  $(97,4 \pm 0,25) \%$  соответственно.

Сопоставляя МСК, выделенные из костного мозга, жировой ткани, скелетных мышц и кожи, авторы показали схожесть для всех типов МСК по фенотипу. В то же время по уровню экспрессии CD146, маркера, ассоциированного со стволовостью и проангиогенным действием клеток, МСК жировой ткани и скелетных мышц экспрессировали его в меньшей степени, чем МСК костного мозга, а для МСК из кожи отмечено возрастание экспрессии данного маркера по мере увеличения числа пассажей. Все МСК, за исключением МСК из костного мозга, экспрессировали PW1 маркер, ассоциированный с дифференциацией и апоптозом. МСК костного мозга и жировой ткани экспрессируют маркер стволовости *Sox2* и *Oct4*. Кроме этого, для всех типов МСК характерна экспрессия *p53* и *c-Myc*. Способность к цитодифференцировке в различные типы клеток сохраняется для МСК из костного мозга и жировой ткани, а МСК из скелетных мышц и кожи имеют ограниченный период дифференцировки в адипогенном направлении [185].

В нашем исследовании как МСК человека, так и МСК крыс дифференцировались в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлении *in vitro*. МСК человека и крыс продуцировали широкий спектр биологически

активных молекул, включая про- и противовоспалительные цитокины (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  и IL-4, IL-10 соответственно), ростовые факторы (TGF- $\beta$ 1, ЭПО, GM-CSF, VEGF, hFGF basic, PDGF-AB, CXCL12/SDF-1a), матриксные металлопротеазы (MMP-9), ингибиторы матриксных металлопротеаз (TIMP-1) и молекулы межклеточного взаимодействия (NO). Кроме этого, на примере МСК крыс Wistar показана экспрессия коллагена 1 типа, фибронектина, виментина,  $\alpha$ -гладкомышечного актина и фактора Виллебранда, а на примере МСК человека – продукция коллагена, фибронектина и виментина.

Полученные данные о наличии на мембране первичной культуры МСК человека и крыс CD73, CD90 и CD105 не противоречат литературным данным, в которых отмечено, что начиная с 3-го пассажа МСК экспрессируют CD29, CD90 более чем в 90 % [108; 214; 378; 392]. В отношении экспрессии в МСК крыс коллагена 1 типа, фибронектина, виментина,  $\alpha$ -SMA и фактора Виллебранда показано, что МСК кроликов экспрессируют  $\alpha$ -SMA и виментин [146]. Установлено, что МСК крыс экспрессируют CD44, CD54, фибронектин и коллаген 1 типа [156; 300]. Более того, подавление экспрессии на МСК CD44 способствует снижению экспрессии фибронектина в клетках [445].

Также не противоречат литературным данным и факты выявления продукции первичной культурой МСК человека и крыс биологически активных веществ, включая различные цитокины, ростовые факторы, матриксные металлопротеазы [79; 114; 144; 170; 290; 349].

Функциональная активность МСК зависит от источника выделения клеток [132; 222]. Так, для МСК пуповинной крови характерна большая пролиферация по сравнению с МСК костного мозга [69]. Источник получения МСК влияет и на уровень экспрессии поверхностных маркеров, в частности, на уровень экспрессии молекул, вовлеченных в процесс адгезии клеток [64]. Более того, на экспрессию маркеров, характерных для истинных МСК, влияет и состояние здоровья доноров костного мозга. Так, у больных остеоартритом выявлено снижение уровней экспрессии CD73 на МСК, выделенных из костного мозга пациентов [149].

На функциональный потенциал МСК влияет и возраст, так по мере старения снижается пролиферативная активность клеток [352].

Таким образом, полученные первичные культуры клеток костного мозга человека и крыс являются «истинными» МСК.

В кооперации межклеточного взаимодействия играют существенную роль молекулы адгезии, экспрессируемые на поверхности различных типов клеток, в том числе и МСК. Нами впервые исследовано влияние длительности инкубации МСК человека с ЭПО на экспрессию поверхностных молекул межклеточного взаимодействия. Отмечено, что ЭПО разнонаправлено влияет на количество МСК экспрессирующих интегрины (CD29, CD49a), молекул адгезии (CD54, CD146), рецепторов для гиалуроновой кислоты (CD44) – увеличивая при краткосрочной экспозиции (1 час) и уменьшая при удлинении срока экспозиции (72 часа).

Показано, что экспрессия ICAM-1 (CD54) на МСК возрастает при со-культивировании с эндотелиальными прогениторными клетками, тем самым, увеличивая адгезию между клетками [171]. Увеличение уровня экспрессии VLA-4 (интегрин  $\alpha 4\beta 1$ )/VCAM-1 на МСК способствовало трансэндотелиальной миграции [280]. Показано, что МСК овцы активирует мембранный протеин аквапорин-1 (AQP1) и СХС хемокиновый рецептор 4 типа (CXCR4, CD184), способных стимулировать внутриклеточные сигнальные пути Akt и Erk, вовлеченных в выживание, пролиферацию и миграцию клеток [99]. Установлено, что ядросодержащие клетки пуповинной крови усиливают экспрессию на МСК молекул межклеточного взаимодействия CD54 (ICAM-1) и CD106 (VCAM-1), вовлеченных в обеспечение адгезии с лейкоцитами [64]. Интегрины опосредуют «приживаемость» МСК в толще миокарда больных с инфарктом. Так, блокада интегрин- $\beta 1$  значительно снижает количество «прижившихся» МСК в толще миокарда [452].

Кроме этого нами исследован эффект ЭПО на экспрессию рецепторов к нему. Отмечено увеличение количества МСК экспрессирующих как ЭПОР, так и ЭПОР/CD131. Известно, что свое влияние ЭПО осуществляет через связывание с ЭПОР (канонический сигнальный путь) в основном только на гемопоэтических

стволовых клетках, а при кооперации ЭПОР с CD131 (неканонический сигнальный путь) на другие клетки организма, запуская программу выживания или пролиферации [348; 377].

Функциональный потенциал МСК зависит и от факторов микроокружения, в том числе от активных форм кислорода, которые снижают дифференцировочный потенциал, миграцию и колониобразование МСК [240]. Нами показано, что депривация ростовых факторов (0 % FCS), окислительный стресс и уровень глюкозы в питательной среде оказывают существенное влияние на апоптоз/некроз, нахождение в фазах клеточного цикла, пролиферацию, миграцию МСК человека и крыс.

Полученные нами данные о влиянии дефицита ростовых факторов и окислительного стресса на функциональный потенциал МСК не противоречат литературным данным. Показано, что пролиферация МСК усиливается в диапазоне от 5,5 до 25 мМ и подавляется при уровнях глюкозы более 40 мМ [176]. В присутствии высоких доз глюкозы в питательной среде снижается пролиферативный и миграционный потенциал МСК, как результат активации гликоген синтаза-киназа-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) и подавления экспрессии *CXCR4*,  $\beta$ -катенина, *LEF-1* и *циклина-D1*, которые легко восстанавливаются при внесении к клеткам хлористого лития [244]. О неблагоприятном влиянии сыворотки крови больных сахарным диабетом на функциональные свойства МСК человека сообщается в работе Ali F. [et al.] [81]. В то же время МСК плаценты устойчивы к высоким уровням глюкозы в питательной среде [169; 378]. С другой стороны, при дефиците глюкозы в питательной среде отмечено снижение выживания МСК [251].

ЭПО способен защищать клетки организма от неблагоприятных факторов микроокружения, включая окислительный стресс, токсическое влияние цитостатиков [119; 246; 287]. Нами установлен стимулирующий пролиферацию МСК эффект ЭПО в диапазоне доз 30–60 МЕ/мл сопоставимый с эффектом FCS в питательной среде и ее потенцирования.

Полученные нами данные о стимулировании функциональной активности МСК не противоречат имеющимся в литературе сведениям об активации пролиферации, миграции и продукции цитокинов клетками в ответ на ЭПО стимул [189]. По данным МТТ-теста показано стимуляция пролиферации клеток рчЭПО в дозе 50 Ед/мл [212]. А по данным нахождения клеток в фазах клеточного цикла отмечено уменьшение доли МСК в фазе  $G_0G_1$  и увеличение доли МСК в фазе S,  $G_2/M$  по сравнению с контролем. Показано дозозависимое увеличение миграционного потенциала МСК в присутствии ЭПО [134], что не совпадает с нашими результатами исследований на МСК человека, что, вероятно, связано с различными источниками получения МСК (человек и крыса). Активные формы кислорода могут оказывать существенное влияние на нахождение МСК в покое, поддержку самообновления и дифференцировки опосредованно через протеинкиназы и факторы транскрипции, а также через непосредственное повреждение липидов, белков и нуклеиновых кислот [429]. Нами не установлено отмены ингибирующего влияния окислительного стресса на пролиферативный потенциал МСК крыс при внесении ЭПО в тест-систему, но предобработка клеток ЭПО до индукции окислительного стресса способствовала устойчивости клеток к неблагоприятным факторам микроокружения. В то же время наличие ЭПО в тест-системе при низком содержании D-глюкозы и индукции окислительного стресса усиливает пролиферацию МСК крыс. Что касается эффекта ЭПО на МСК человека, то выявлена такая же закономерность, так и для МСК крыс.

Авторами показан цитопротективный эффект ЭПО на клетки микроглии и астроциты мышей при окислительном стрессе – отмечено уменьшение продукции стойких метаболитов оксида азота и снижение продукции активных форм кислорода [363]. ЭПО повышал пролиферацию и активность супероксиддисмутазы, снижал уровень активных форм кислорода и малонового альдегида стволовых клеток периодонтальной связки в ответ на окислительный стресс, индуцированный 30 мМ глюкозы [197]. Кроме этого, показано, что ЭПО существенно снижает апоптоз МСК при индукции окислительного стресса перекисью водорода [272].

Морфофункциональные свойства МСК подвержены влиянию длительности культивирования *in vitro* [130; 141].

Репликативное старение МСК человека (8-й пассаж) *in vitro* в нашем случае способствовал возрастанию клеток экспрессирующих (CD18, CD18/CD54) и ЭПОР, но снижению экспрессии CD54, CD49a, CD146 (снижение стволовости и проангиогенных свойств клеток), ко-экспрессии ЭПОР/CD131. В то же время для МСК на позднем сроке пассажа нами отмечено снижение апоптоза/некроза, задержка клеток в фазе покоя ( $G_0G_1$ ), увеличение доли клеток в фазе митоза ( $G_2/M$ ) и уменьшение доли клеток в фазе синтеза (S) по сравнению с МСК на 4-м пассаже.

Полученные нами данные не противоречат исследованиям других авторов, отметившим влияние количества пассажей на функциональные свойства МСК. При репликативном старении МСК увеличиваются в размерах, становятся зернистыми и утрачивают высокую пролиферативную активность – вплоть до полной утраты деления. Важная роль в репликативном старении отводится теломерам, а при стрессе другим сигнальным путями, включая цитокины, онкогены. Сопоставление МСК 4-го и 40-го пассажа в ходе трансформации в допамин-продуцирующие клетки (допаминэргические нейроны и клетки нейрональной линии) показало наличие маркеров нейрональной принадлежности и продукцию допамина – более выраженное на ранних сроках роста *in vitro* [179]. В то же время показана утрата фибробластоподобной структуры МСК на поздних пассажах (8-й) и снижение экспрессии CD146 [130]. Также показано, что экспрессия маркера принадлежности клеток к МСК *STRO-1* снижается и увеличивается экспрессия факторов транскрипции *OCT-4*, *NANOG* и *NESTIN* по мере увеличения номера пассажа МСК [391].

Оценка уровня экспрессии генов *POU5F1*, *NANOG*, *KLF4* и генов, ответственных за дифференцировку (*RUNX2*, *COL1a1*, *SOX9*, *COL2A1* и *PPARG*), показала, что экспрессия генов стволовости и генов, ответственных за остеогенную и хондрогенную дифференцировку, повышена при культивировании МСК из жировой ткани в условии нормоксии. Однако она снижается по мере

увеличения номера пассажа, за исключением гена *PPARG* и маркеров адипогенной дифференцировки [161].

Для МСК из жировой ткани кошек отмечено увеличение пролиферативной активности на 5-м пассаже, экспрессия генов маркеров плюрипотентности (*Sox2*, *Nanog* и *Klf4*), маркеров стволовых клеток (CD9, CD44, CD90 CD105) снижается по мере увеличения номера пассажа [83]. Сопоставление МСК, выделенных из зуба, на 4-м и 20-м пассаже показало снижение пролиферативного и миграционного потенциала, снижение трансдифференцировки, нарастание количества  $\beta$ -галактозидаза ассоциированных и апоптотических МСК, а также возрастания экспрессии *p53*, *p21* и *p16Ink4a* [138]. В работе авторов показано, что по мере старения МСК, выделенных из жировой ткани, в питательной среде с добавлением свежемороженой плазмы или незамороженной свежей плазмы период удвоения клеток возрастала к 15-му пассажу – ( $22,67 \pm 7,01$ ) и ( $19,65 \pm 2,27$ ) сутки соответственно. МСК с 4-го по 15-й пассаж были позитивными по CD90, CD44, CD105, и CD73, а также не экспрессировали CD11b, CD19, CD34, CD45 и HLA- DR и на 5-м, 10-м, 15-м пассаже сохраняли способность к дифференцировке в соединительнотканном направлении [385].

Репликативное старение МСК является основной причиной ограничения потенциала клеточной пролиферации [464]. На МСК костного мозга вьетнамских мини-свиней показано, что уровень TZAP (теломерный цинковый палец-ассоциированный белок, новый специфический теломер-связывающий белок, стимулирует обрезку теломер и предотвращает чрезмерное удлинение теломер) выше в МСК на поздних пассажах в сравнении с аналогичным параметром на ранних пассажах МСК. Кроме этого, увеличивался уровень маркеров старения клеток *p16INK4A* и *p21*. Высокий уровень экспрессии TZAP снижает дифференцировочный потенциал МСК и ускоряет преждевременное старение «ранних» МСК, а нокаут по TZAP в «поздних» МСК стимулировал дифференцировочный потенциал. Высокий уровень экспрессии TZAP способствовал активации сигнального пути *p53* (ARF-MDM2-P53-

P21WAF/CDKN1A) *in vitro* и снижал уровень экспрессии *PPAR $\gamma$*  и *Cebpa*, генов вовлеченных в адипогенез [470].

На поздних сроках культивирования МСК из жира (13-й пассаж), при модулировании клеточной-ниши – на основе термодинамического изменения адгезивных свойств термопластика отмечены изменения морфологии клеток, снижение отложений фибронектина, а при дифференцировке в остеогенном направлении на 4-м и 13-м пассаже меняется активность щелочной фосфатазы и накопление депозитов кальция [113]. Сравнительный анализ старения МСК из остеоцитов и костного мозга выявил, что МСК из костного мозга быстрее стареют, нежели МСК из остеоцитов (по длине теломер, короче в первом случае и длиннее во втором) на 9-м пассаже, но длина теломер на 4-м схожа. Кроме этого, в МСК из остеоцитов активность теломераз сохранялась на раннем пассаже, а в МСК из костного мозга нет, что может объяснить большую продолжительность жизни МСК из остеоцитов, предотвращением репликативного старения клеток [235]. Культивирование МСК на денатурированном матриксе из коллагена 1 типа *in vitro* удлиняет способность клеток к адипогенной дифференцировке до 21 суток (сохранность экспрессии маркеров адипоцитов – жирнокислот-связывающий белок-4, липопротеинлипаза, ацил-Коа-синтетаза, адипсин, стимулирующий транспортер глюкозы-4 и накопление липидов – характерная для клеток на ранних пассажах и отсутствующая у клеток на поздних пассажах) [248].

Показано стимулирующее влияние ЭПО на функциональные свойства МСК, в частности, предобработка МСК ЭПО в дозе 500 МЕ/мл в течение 48 часов существенно увеличивает пролиферацию, реаранжировку цитоскелета клеток, миграцию [119]. Этот факт побудил нас изучить влияние ЭПО при длительном культивировании с ним МСК на морфофункциональные свойства «состарившихся» МСК *in vitro*. Так по нашим данным, под влиянием ЭПО меняется уровень экспрессии молекул адгезии, доля клеток в апоптозе/некрозе и фазах клеточного цикла.

На экспериментальной модели болезни Паркинсона *in vitro* с использованием клеток SH-SY5Y, подвергшихся токсическому влиянию ротенона

(изофлавоноид), подавляющего активность митохондриальной НАДН-дегидрогеназы, что способствует накоплению активных форм кислорода, подавлению экспрессии *Beclin-1* и активации апоптоза, внесение ЭПО в питательную среду приводило к существенному снижению токсического действия ротенона [446].

Полученные нами данные о влиянии ЭПО на рецепторный репертуар МСК, согласуются с данными других исследователей. Показано, что под влиянием ЭПО возрастает экспрессия рецептора к эритропоэтину на клетках почек и клеточной линии эпителия клубочков почек NRK и активации в них фосфорилирования Jak2, Erk, Akt и Stat5, что способствует увеличению резистентности клеток к действию окислительного стресса [439]. Кроме этого, показано, что под влиянием ЭПО в опухолевых клеточных линиях, полученных из рака шейки матки, активируется фактор транскрипции STAT3, который запускает экспрессию и активацию антиапоптотического белка сурвивина (survivin), что снижает цитотоксичность цисплатина, которое частично отменяется при внесении в тест-систему ингибитора сурвивина MY155 [213].

На экспериментальной модели нейровоспаления у мышей, индуцированного введением липополисахарида в дозе 0,8 мг/кг внутривенно, лечение ЭПО в дозе 40 мкг/мл трижды в неделю в течение 5 недель способствовало появлению в головном мозге большого количества CD44+ клеток вокруг сосудов и повышению внутримозговой экспрессии и продукции нейротрофического фактора BDNF [76].

Дефицит ростовых факторов, окислительный стресс, гипергликемия оказывают неблагоприятное влияние на морфофункциональные свойства МСК [176; 424].

В нашем исследовании показано, что первичная культура МСК–ЭПО исходно имеет повышенную пролиферативную, миграционную и секреторную активность и в меньшей степени снижает ее при индукции неблагоприятного микроокружения в присутствии ЭПО в сравнении с МСК 8-го пассажа.

Показано, что ЭПО усиливает пролиферацию, подавляет старение и высвобождение провоспалительных факторов, увеличивает секрецию проангиогенных цитокинов, и повышает стимулирующее влияние МСК крыс на способность HUVEC формировать сосудисто-подобные структуры при индукции гипергликемии, что обусловлено активированием Akt/FoxO3a сигнального пути [189].

При сравнительном анализе спектра продукции фибробластами кожи и МСК костного мозга цитокинов было показано, что МСК в большем количестве продуцируют VEGF, EGF, IGF, KGF, CXCL10, ЭПО, G-CSF, SDF1, MCP-1, MIG, MIP-1a, MIP-1b, Ang1, Ang2 и в меньшем количестве продуцируют HB-EGF, FGF, TGF- $\beta$ 1, TPO и SCF [335]. Спектр конститутивной, спонтанной и ЛПС-индуцированной продукции провоспалительных (IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-17) и противовоспалительных (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13) цитокинов, хемокинов (IL-8, MCP-1, MIP-1 $\beta$ ), ростовых факторов (IL-7, G-CSF, GM-CSF, ЭПО, VEGF, EGF, IGF-1, FGF), матриксных металлопротеаз (MMP9) и ингибиторов матриксных металлопротеаз (TIMP1) зависит от источника выделения МСК [38].

Сохранность продукции широкого спектра биологически активных молекул при старении *in vitro* является существенным, так как это позволяет даже старым МСК сохранять свой терапевтический потенциал, реализуемый через паракринный механизм. В работе авторов, показано, что уровень продукции компонентов внеклеточного матрикса МСК подвержен физическому воздействию [3]. Так, под влиянием микрогравитации снижается продукция коллагена, уровень экспрессии TIMP1, TIMP3 и MMP1, и возрастает уровень экспрессии тенасцина и ламинина, что отражает активацию протеолиза компонентов внеклеточного матрикса и как следствие снижение адгезии клеток. Белок цитоскелета виментин способствует сближению краев раны и тем самым ускоряет процесс закрытия раневого дефекта [114; 276]. Показана роль фибронектина в формировании и регенерации различных тканей организма человека и животных. Так, на модели «дефицитных» МСК из жировой ткани человека по фибронектину-1 (FN1-KO),

индуцированного CRISPR/Cas9, исследована пролиферация, трансдифференцировка в хондрогенном и адипогенном направлении [263]. Отмечено увеличение пролиферативного потенциала, нахождения клеток в фазе синтеза и митоза, повышения уровней экспрессии CD105 и CD146, но снижение уровней экспрессии маркеров стволовости клеток (CD73, CD90, SSEA4) FN1-KO МСК. Кроме этого авторы отметили снижение дифференцировки FN1-KO МСК в хондрогенном и адипогенном направлении, а культивирование клеток на децеллюляризованном по компонентам внеклеточного матрикса депозите, способствовало существенному снижению пролиферативного потенциала и трансдифференцировке клеток, что указывает на важность фибронектина для дифференциации МСК в соединительнотканном направлении. Внеклеточный матрикс влияет на дифференцировочный потенциал МСК. Показано, что 62-68 kPa внеклеточный матрикс усиливает остеогенную дифференцировку МСК, что подтверждается экспрессией коллагеном *альфа-1 первого* типа, *BGLAP* и *RUNX2*, наличием кальциевых депозитов [230]. В процессе дифференцировки выявлено увеличение экспрессии гена и белка интегрин- $\alpha 5/\beta 1$ , а также белков сигнальных молекул FAK, p-ERK, p-Akt, GSK-3 $\beta$ , p-GSK-3 $\beta$  и  $\beta$ -катенина.

Отмечена важность фибронектина для поддержания роста МСК дифференцирующихся в нейрональном направлении [98]. Так, блокировка фибронектина способствует снижению экспрессии интегрин- $\beta 1$  и отслоению нейронально-подобных клеток от скафолдов, покрытых фибронектином. Известен терапевтический потенциал МСК при нейродегенеративной патологии [387], а включение в генетический аппарат клеток генов, ответственных за продукцию нейротрофического фактора BDNF, выявило стимуляцию пролиферации эндогенных нейрональных стволовых клеток [330]. Показано, что МСК и эндотелиальных прогениторных клеток адгезируют друг к другу в костном мозге и при культивировании *in vitro*, что является критичным для самообновления и дифференцировки МСК в соединительно тканом направлении [478]. Более того, при со-культивировании МСК и эндотелиальных прогениторных клеток отмечено увеличение экспрессии CD31 и фактора Виллебранда, что отражает влияние

продуцируемых МСК факторов на ЭПК, в частности VEGF. Для поддержания жизнедеятельности эндотелиальных прогениторных клеток важная роль отводится IGF-1, продуцируемого МСК [220]. Микроокружение оказывает влияние на морфофункциональные свойства МСК, так экспозиция МСК с коллагеном 1 типа (Coll I) и остеогенным морфогенетическим белком 2 (BMP2) способствовало остеогенной дифференциации МСК [420]. Обработка МСК костного мозга ЭПО в дозе 4 МЕ/мл в течение 6, 24 и 48 часов, способствовала увеличению продукции HGF [203].

По мере старения МСК (15-й пассаж) пуповинной крови, уплощаются и удлиняются, и проявляют иммуносупрессию [92]. Кроме этого, в «стареющих» МСК отмечено повышение экспрессии *HMOX-1*, *IL-10*, *IL-6* и *iNOS*, а уровень экспрессии *индолеамин-2,3-диоксигеназа-1 (IDO)* и *TGF-β1* не менялся. Отмечено снижение уровней экспрессии генов *IL-1α*, *IL-1β* и *IFN-γ* в МСК 15-го пассажа по сравнению с МСК 3-го пассажа. Также для МСК 15-го пассажа характерная высокая продукция IL-6. Авторы на примере длительного культивирования МСК человека из пуповинной крови и костного мозга (3–18-й пассаж) на полиакриламидном геле показали, что МСК сохраняют стволовость [422].

Аутофагия (микроаутофагия, макроаутофагия и шапероновая аутофагия) является одним из процессов в клетках, направленным на удаление поврежденных компонентов клетки в лизосомах для повторного использования их как субстрат для поддержания целостности клетки [30; 34; 107; 190; 317]. Показано, что в «старых» МСК костного мозга аутофагия меньше по сравнению с «молодыми» МСК, но при внесении к «молодым» МСК ингибитора аутофагии 3-метиладенина отмечено ускорение старения с утратой остеогенной дифференцировки и пролиферативного потенциала, и увеличения адипогенеза этих клеток [105].

Длительное культивирование МСК человека с ЭПО по нашим данным существенно усиливает экспрессию одного из маркеров аутофагии, а также увеличивает объемную плотность мембран гранулярного эндоплазматического

ретикулума, свидетельствующего об усилении синтеза белков, в сравнении с МСК, росших без ЭПО.

Близким к нашим результатам (показано впервые в мире) является работа авторов, показавшим активацию аутофагии в дендритных клетках костного мозга бактериями (лактобациллы и бифидобактерии) [104]. Отмечена роль аутофагии, как проявления терапевтического потенциала МСК при лечении дефектов кожных покровов, способствующего ангиогенезу. Показано, что аутофагия усиливает секрецию VEGF МСК, опосредованно через фосфорилирование ERK сигнального пути [108]. Показано, что воспалительное микроокружение способствует активации аутофагии, экспрессии *bFGF* и *Ang* в стволовых клетках периодонтальной связки при ее воспалении в сравнении с аналогичными параметрами в стволовых клетках периодонтальной связки здоровых доноров [75]. Что касается эффекта ЭПО на аутофагию, то при моделировании нейротоксичности ротеноном в SH-SY5Y клетках, как модели болезни Паркинсона *in vitro*, показано увеличение уровня mTOR-независимых/восходящих маркеров аутофагии, в том числе Beclin1, AMPK и ULK-1 под влиянием монотерапии ЭПО [447].

При эндоплазматическом стрессе в гепатоцитах при неалкогольном жировом гепатозе ЭПО подавляет стресс эндоплазматического ретикулума и стеатоз *in vivo* и *in vitro* в клетках печени [221]. Этот эффект ЭПО отменялся на нокаутных по сиртуину-1 мышах (SIRT1-KO), также показано, что ЭПО увеличивает экспрессию в гепатоцитах фактора роста фибробластов-21 (*FGF21*) и секрецию, зависящую от SIRT1-манере; кроме того отмечено восстановление чувствительности к FGF21 у мышей с ожирением на лечение ЭПО. Показано, что стресс-индуцированный апоптоз эндоплазматического ретикулума способствует кальцификации сосудов. На модели кальцификации сосудов почек (субтотальная нефрэктомия или высокие дозы фосфатов) отмечен высокий уровень белка ЭПОР в кальцинированной аорте крыс, а ЭПО сохранял экспрессию фенотипических маркеров гладкомышечных клеток сосудов и отменял повышенное содержание кальция и отложение солей кальция в аорте крыс и в кальцифицированных

гладкомышечных клетках сосудов [198]. Кроме этого, ЭПО приводил к снижению повышенных уровней белка активирующего транскрипционного фактора-4 (ATF4) и глюкозорегулируемого белка-94 (GRP94) – индикаторов повышенного стресса эндоплазматического ретикулума, и отменял стресс-индуцированный апоптоз, снижая уровень белка ССАТ/enhancer-binding protein-homologous protein (ССАТ/усилитель-связывающий белок-гомологичный белок) и расщепленной каспазы-12 в гладкомышечных клетках сосудов, обработанных туникамицином или кальцифицирующими средами.

Стволовые/прогениторные клетки используют в клеточной терапии как альтернативу традиционным способам лечения заболеваний сердечно-сосудистой и опорно-двигательной систем [3; 4; 12; 17; 23; 25; 53; 79; 101; 127; 128; 155; 227; 297; 320; 352; 370; 420; 451; 473]. Накапливаются данные о кратковременности терапевтического потенциала стволовых клеток [151; 166; 313; 360]. Поэтому представлялось важным сопоставить терапевтический потенциал мезенхимных стволовых клеток в сочетании с эритропоэтином или при предобработке эритропоэтином *in vitro* на экспериментальной модели патологии сосудов нижних конечностей и патологии межпозвонкового диска у крыс.

Нами показано усиление ангиогенеза на модели ишемии нижних конечностей у крыс, индуцированной перевязкой и перерезанием задней левой бедренной артерии в верхней трети, под влиянием внутримышечного введения МСК и МСК с ЭПО в сравнении с контрольной группой по данным доплерографии в области стопы и гистологического исследования мышц голени. Биомедицинский клеточный продукт (МСК, МСК и ЭПО) инициируют изменения уровня провоспалительных и противовоспалительных цитокинов и ростовых факторов как на системном (в сыворотке крови), так и на локальном (в мышцах голени) уровне.

Эффективность мононуклеаров костного мозга при ишемической патологии не вызывает сомнений [259; 452]. Показано, что мононуклеары костного мозга не только способствует неоваскуляризации в ишемизированных тканях и внедряются в новообразованные сосуды, но и секретируют проангиогенные

факторы [452]. У больных с КИНК с высокой вероятностью ампутации конечности, лечение стволовыми клетками ведет к увеличению уровня проангиогенных факторов в сыворотке крови, в том числе и  $IL-1\beta$ . Введение стволовых клеток мышам нокаутных по  $IL-1\beta$  стимулирует экспрессию  $IL-1\beta$  при экспериментальной модели КИНК. Неспособность миоцитов секретировать  $IL-1\beta$  существенно снижает индукцию ангиогенных факторов и терапевтический потенциал клеточной терапии. Активация синтеза ангиогенных факторов миоцитами под воздействием секретируемых имплантированными в ишемизированные мышцы стволовых/прогениторных клеток лежит в основе паракринного эффекта стволовых клеток.

МСК рассматриваются как альтернативный способ реваскуляризации при ишемии конечностей [227; 271]. Для улучшения терапевтического потенциала МСК разрабатываются различные методы воздействия, в том числе и механотрансдукция импульсно-сфокусированным ультразвуком с целью активации местных хемоаттрактантов для привлечения в данную зону введенных МСК. На экспериментальной модели критической ишемии у мышей, индуцированной прижиганием подвздошных артерий, сочетание воздействия ультразвука с последующим введением МСК отмечено существенное усиление перфузии в нижних конечностях и экспрессии  $CD31$ , уменьшение выраженности фиброза. Кроме этого, в МСК отмечено увеличение экспрессии  $VEGF$  и  $IL-10$ .

Перспективным способом лечения ишемии конечностей, без использования реваскуляризации, рассматривается назначение ЭПО [377]. На икроножных мышцах больных, подвергшихся ампутации по поводу КИНК и больных без КИНК показано сверхэкспрессия ЭПО и  $CD131$ , ко-локализация ЭПОР и  $CD131$  в сарколемме мышц обеих групп больных. В модели ишемической миотрубки обработка негемопоетическим пептидом спирали в ЭПО (ARA 290) способствовало снижению количества апоптотических клеток, уровней расщепленной каспазы-3, секреции лактатдегидрогеназы и  $IL-6$ .

Эффективность использования МСК, предобработанных ЭПО, исследована при экспериментальной модели ожога у крыс [265]. Внутрикожное введение

обработанных эритропоэтином МСК увеличивало экспрессию *виментина* и *IL-10*, и снижению уровней экспрессии *IL-1* и *COX2*. Кроме этого, показано усиление ангиогенеза по результатам экспрессии *VEGF*, *PDGF*. Другим стимулятором ангиогенеза рассматривается основной фактор роста фибробластов, хотя только  $\text{TNF-}\alpha$  усиливает экспрессию *VCAM-1* в эндотелиальных клетках [246]. При гипоперфузии мышц конечностей при ишемии, обусловленной атеросклерозом сосудов, уровень экспрессии  $\text{IL-1}\beta$  и  $\text{IL-6}$  повышается, что указывает на локальную стимуляцию воспалительного каскада цитокинов при ишемии мышц [278].

Эффективность сочетания МСК и ЭПО, как терапевтического агента нами продемонстрирована и на экспериментальной модели дегенеративного процесса в межпозвонковом диске. Так, комбинация МСК и ЭПО способствовала репарации/регенерации межпозвонкового диска при дегенеративной модели патологии межпозвонкового диска по данным МРТ (изменение высоты межпозвонкового диска) и гистологического исследования (возрастание доли клеточных элементов пульпозного ядра и соединительной ткани, уменьшение разрыхления фиброзного кольца межпозвонкового диска) в сравнении с контролем.

С возрастом также происходит естественное старение межпозвонкового диска (дегенерация), но оно протекает более медленно и с меньшими клиническими проявлениями, нежели при дегенеративных болезнях диска (генетической, механической или экспозиционной этиологии), ведущих к нарушению баланса анаболизма и катаболизма внеклеточного матрикса в сторону преобладания катаболизма [291]. С учетом сложности и травматизма оперативных вмешательств на позвоночнике, разрабатываются альтернативные способы лечения, включая и клеточные технологии [295]. Метаанализ терапевтического потенциала МСК при повреждении спинного мозга, восстановлении межпозвонкового диска и артродезе позвонков, как монотерапии, так и в комбинации с другими типами клеток не всегда выявлял превосходство их над традиционными способами хирургического лечения.

В основе терапевтического потенциала МСК при лечении дегенерации межпозвонкового диска лежит ослабление первичной ноцицептивной боли в области пораженного диска, замедление и развитие катаболического метаболизма и восстановление ткани диска [418].

Анализ эффективности использования МСК костного мозга при дегенеративном поражении межпозвонкового диска у 33 больных спустя 12 месяцев после введения клеток в область патологического очага по данным МРТ в 85 % случаев выявил уменьшение выпячивания межпозвонкового диска [468].

Результат 1-й фазы клинического исследования спустя 12 месяцев после однократного введения комбинации МСК из жировой ткани (20 миллионов или 40 миллионов клеток в области 5 дисков) и гиалуроновой кислоты не выявил побочных эффектов лечения, отмечено улучшение качества жизни [441].

Введение в область диска у больных с хронической болью в пояснице аллогенных МСК спустя 12 месяцев отмечено улучшение альгофункциональных показателей (оценка болевых ощущений) и дегенерации по шкале Pfirman [292].

Показана способность МСК приобретать фенотип клеток пульпозного ядра межпозвонкового диска и синтезировать компоненты внеклеточного матрикса и другие молекулы, способные поддерживать резидентные клетки пульпозного ядра [283].

На экспериментальной модели дегенерации фиброзного кольца межпозвонкового диска у кроликов лечение МСК в сочетании с дексаметазоном способствовало увеличению высоты межпозвонкового диска и уровню коллагена 2 типа в пульпозном ядре по сравнению с контрольной группой, получавшей только гормональную терапию [228].

Наиболее близкой работой к нашему исследованию, является исследование эффекта введения ЭПО и МСК костного мозга при повреждении спинного мозга. Показана миграция МСК в зону повреждения, подавление уровня TNF- $\alpha$  и возрастанию уровня SDF-1 в месте повреждения спинного мозга, увеличение уровня экспрессии CXCR-4 на МСК [175].

Отмечена эффективность предобработанных эритропоэтином моноуклеаров костного мозга как результат стимуляции миграции в зону головного мозга данных клеток, улучшается динамика заживления одоговых ран кожных покровов, возрастает процесс ангиогенеза [73; 211; 216; 265].

В основе терапевтического эффекта МСК предобработанных ЭПО (в дозе 1, 10, 100 и 500 МЕ/мл) может лежать образование микровезикул [485]. Показано, что экспозиция МСК пуповинной крови с ЭПО в дозе 1 МЕ/мл и/или PDGF-BB в дозе 50 нг/мл в течение 72 часов стимулирует образование микрочастиц, экспрессирующих CD9, CD63 и CD81, относящихся к маркерам экзосом, которые существенно стимулировали пролиферацию и формирование сосудисто-подобных структур HUVEC [111]. В эксперименте на крысах с модуляцией инфаркта миокарда перевязкой левой нисходящей коронарной артерии лечение комбинацией: МСК+ЭПО+VEGF, МСК+ЭПО, МСК+VEGF, ЭПО и VEGF, по данным Эхо-КГ во всех опытных группах выявлено увеличения фракции выброса левого желудочка по сравнению с контрольной группой [360]. Кроме этого, отмечено снижение гибели миокардиоцитов в периинфарктной зоне и увеличение плотности сосудов. Выявлен терапевтический потенциал комбинации МСК и ЭПО на модели инфаркта миокарда [138]. Отмечено возрастание плотности капилляров, уменьшении зоны инфаркта и фиброза, уменьшения диастолического размера левого желудочка и увеличение фракции выброса. Показано, что введение одного ЭПО (в дозе 300 ЕД/кг<sup>-1</sup>) эпикардially крысам с инфарктом миокарда способствовало повышению уровня индикаторов регенерации (SDF-1, CXCR4, CD34, Vcl-2, cyclin D1, Cdc2 и MMP2), инициируемых через TGF- $\beta$ /WNT сигнальный путь в интрамиокардиальных нишах МСК как следствие прямой активации АКТ и сверхэкспрессии сигналов FOS и Fzd7, а также активации пролиферации сердечных МСК через 24 часа после индукции инфаркта миокарда [295].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Большое количество экспериментальных исследований на моделях патологических состояний человека и клинических исследований при различных патологиях у человека внесли существенный вклад в понимание перспектив клеточной терапии, в том числе и перспектив терапевтического потенциала мезенхимных стволовых клеток. МСК представляют собой существенную часть общей популяции стромальных клеток органов и тканей человека и животных. МСК из разных органов и тканей человека и животных характеризуются общими фенотипическими, морфологическими и функциональными свойствами, и в то же время выявлены существенные различия как по уровню экспрессии фенотипических маркеров принадлежности к «истинным» МСК, так и по функциональным показателям. Несмотря на активно проводимые экспериментальные и клинические исследования, вопрос о терапевтическом потенциале МСК и эффективности лечения с использованием МСК в целом остается недостаточно исследованным [18; 77; 109; 151; 166; 167; 269; 299; 306; 313; 341; 498; 4503; 504]. В данной работе, используя МСК костного мозга человека и крыс, мы показали общность морфофункциональных параметров для МСК 4-го пассажа, соответствующие существующим представлениям об «истинных» МСК. В обоих случаях, выделенные адгезией к пластику клетки костного мозга, экспрессировали характерные маркеры для «истинных» МСК CD73, CD90 и CD105, и не несли на своей мембране маркеры гемопоэтических стволовых клеток - CD34, CD45 и эндотелиальных/прогениторных клеток – CD34, а также экспрессировали коллаген 1 типа, фибронектин, виментин,  $\alpha$ -гладкомышечный актин и фактор Виллебранда как нами показано для МСК крыс, продуцировали коллаген, фибронектин и виментин как нами показано для МСК человека. Выделенные из костного мозга человека и крыс клетки способны дифференцироваться в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлении при культивировании в соответствующих условиях, что указывает на их мультипотентные свойства. Кроме этого, МСК человека и крыс, проявляли

повышенную пролиферативную активность, продуцировали широкий спектр цитокинов, включая провоспалительные (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ), противовоспалительные (IL-4, IL-10), и ростовые факторы (TGF- $\beta$ 1, ЭПО, GM-CSF, VEGF, hFGF, PDGF-AB, CXCL12/SDF-1a), матриксные металлопротеазы (MMP9), ингибиторы матриксных металлопротеаз (TIMP1) и NO. Таким образом, выделенные из костного мозга человека и крыс клетки принадлежали к «истинным» МСК. В то же время выявлены существенные различия по уровню экспрессии кластеров дифференцировки на МСК человека в сравнении с МСК крыс для CD73 – (97,33  $\pm$  2,25) % и (86,6  $\pm$  4,6) % соответственно, CD105 – (95,33  $\pm$  2,66) % и (76,4  $\pm$  6,6) % соответственно и отсутствие различий по экспрессии CD90 – (94,67  $\pm$  5,01) % и (97,4  $\pm$  0,25) % соответственно. МСК человека экспрессировали на мембране ЭПОР и ЭПОР/CD131. На функциональные свойства МСК, существенное влияние оказывает микроокружение, источник получения клеток и возраст донора [251; 281; 399]. В работе показано, что дефицит ростовых факторов приводит к снижению пролиферативной активности МСК крыс, увеличению количества апоптотических клеток и уменьшению доли клеток, находящихся в фазе синтеза (S) и митоза (G<sub>2</sub>/M). Показано существенное влияние концентрации D-глюкозы, окислительного стресса и их сочетания на пролиферативный потенциал МСК крыс. МСК человека реагируют аналогично: дефицит ростовых факторов увеличивает долю апоптотических и некротических клеток, и снижает долю клеток, находящихся в фазе покоя, синтеза и митоза клеточного цикла; аналогично окислительный стресс значительно подавляет пролиферацию этих клеток. Полученные результаты указывают, что при неблагоприятных факторах микроокружения изменяется функциональная активность МСК как человека, так и крыс.

Наши данные свидетельствуют о способности ЭПО влиять не только на клетки эритрона, но и на такие клетки организма человека и крыс, как МСК, которые, как мы показали, могут быть вовлечены в механизмы формирования

резистентности к воздействию неблагоприятных факторов микроокружения, включая окислительный стресс и гипергликемию [189; 212; 291; 348; 382].

Внесение ЭПО в питательную среду при дефиците ростовых факторов, окислительном стрессе, различных уровнях глюкозы в питательной среде усиливает пролиферативную активность МСК крыс и не оказывает существенного влияния на пролиферативный потенциал МСК человека. В то же время наличие ЭПО в питательной среде при индукции окислительного стресса задерживает МСК крыс в фазе покоя ( $G_0G_1$ ), что расценивается как проявление цитопротекторного действия ЭПО, способствующее сохранению пула клеток, способных при благоприятных условиях формировать колониеобразующие единицы.

В литературе очень мало исследований, посвященных изучению влияния факторов внешней среды и микроокружения на экспрессию молекул адгезии, пролиферацию и миграцию МСК, особенно под влиянием ЭПО.

Проведенный в данной работе комплексный анализ влияния длительности экспозиции МСК человека с ЭПО на уровень экспрессии маркеров стволовости, а также молекул адгезии на мембране клеток, выявил ряд особенностей, которые могут существенно влиять на вовлечение клеток в процесс репарации/регенерации при их использовании в клеточной терапии. Длительность экспозиции МСК человека с ЭПО в течение 60 минут или 72 часов по-разному влияет на уровень экспрессии молекул адгезии. Уменьшая экспрессию CD18 при кратковременной экспозиции и повышая при 72-часовой, увеличивая уровень экспрессии CD18/CD54, CD54, CD29, CD44, CD146, CD146, ЭПОР и снижая уровень экспрессии ЭПОР/CD131 после кратковременной экспозиции. Очевидно, что в реализации межклеточного взаимодействия и миграции МСК с эндотелиальной выстилкой сосудов, компонентами внеклеточного матрикса в органах и тканях, заселения в очаге поражения, уровень экспрессии молекул адгезии играет существенную роль [281; 408]. Репликативное старение существенно влияет на морфофункциональные свойства МСК [409]. В настоящее время нет единого представления о механизмах, активирующихся при старении

МСК, не известны гены и сигнальные пути, вовлеченные в процесс старения МСК. Поиск факторов, способных влиять на процесс старения МСК, необходим для моделирования возрастной дисфункции МСК. Вопреки распространенному представлению о существенном снижении функционального потенциала стареющих МСК, при стандартных условиях культивирования к 8-му пассажу МСК характеризовались меньшей долей апоптотических/некротических клеток, увеличением доли клеток в фазе покоя и митоза по сравнению с аналогичными параметрами клеточного цикла более молодых МСК (4-й пассаж). В то же время наличие ЭПО в питательной среде стареющих МСК способствовало сохранению спектра распределения клеток по фазам клеточного цикла для МСК ранних пассажей (4-й пассаж). Анализ пролиферативного потенциала стареющих МСК выявил существенное увеличение уровня колониеобразующих единиц под действие ЭПО; удалось продемонстрировать стимулирующее действие ЭПО на пролиферацию/жизнеспособность клеток (по данным МТТ-теста), на увеличение горизонтальной миграции (тест «заживления раны») при дефиците ростовых факторов в питательной среде; большего уровня продукции ЕРО в сравнении со «старыми» МСК. Полученные данные свидетельствуют о сохранности морфофункциональных свойств «состарившихся» МСК в присутствии ЭПО, приближенной к таковым у более «молодых» МСК человека. Анализ экспрессии молекул адгезии на мембране старых МСК выявил увеличение пула «состарившихся» МСК, культивированных в присутствии ЭПО, несущих CD54, CD29, CD44, CD49a, а также снижения экспрессии CD18/CD54, ЭПОР/CD131 и CD131 по сравнению с МСК 8-го пассажа не подвергшихся действию ЭПО. Повышение экспрессии большинства исследуемых молекул адгезии на старых МСК человека, культивированных в присутствии ЭПО, свидетельствует о большем коммуникативном потенциале и функциональной активности этих клеток. Можно думать об использовании ЭПО для торможения механизмов старения организма, обусловленных возрастным дефицитом функционально полноценных МСК. Логично предположить, что такой эффект может быть выявлен и для других агентов. Действительно, такой эффект показан для

глутатиона и мелатонина, которые усиливали функциональный потенциал МСК жировой ткани снижая клеточное старение, что способствовало увеличению миграции, сохранности стволовости и трансдифференцировке в другие типы соединительной ткани, как результат подавления генерации активных форм кислорода при длительном культивировании клеток [93]. Старение клеток и аутофагия являются реакцией на стресс и имеют общие стимулы, в том числе, окислительный стресс, поломки в ДНК и укорочение теломер, а повышение уровня аутофагии в стареющих клетках может затормозить процесс старения клеток [106]. Анализ экспрессии одного из маркеров аутофагии LC3В в «стареющих» МСК выявил увеличение его в МСК–ЭПО в 2,5 раза. По данным электронной микроскопии, в МСК, культивированных с ЭПО, отмечено увеличение объемной плотности гранулярного эндоплазматического ретикулама на 47 %. В ряде работ сообщается о возможности замедлить старение сочетанием 5-аминоимдазол-4-карбоксамидного рибонуклеотида (активатор АМПК) и никотинамидом (активатор SIRT1), а также холестерином [135; 305].

Таким образом, впервые показано, что экспозиция МСК с ЭПО способствует изменению экспрессии молекул межклеточного взаимодействия и рецепторов к ЭПО, функционального потенциала МСК (пролиферация, миграция и секреция), аутофагии в конечном итоге – приобретению клетками черт характерных для клеток на 4-ом пассаже *in vitro*, что можно расценивать как «про-регенеративную» модуляцию функционального потенциала клеток. На основании наших результатов можно сделать заключение, что влияние ЭПО на изучаемые в данной работе функциональные свойства МСК человека зависит от условий воздействия на клетки. В целом, полученные данные представляют как фундаментальный интерес с точки зрения клеточных и паракринных механизмов реализации потенциала МСК человека, так и практический в связи с использованием МНМСК как альтернативного способа лечения при многих патологических процессах у человека, определяя оптимальное сочетание времени экспозиции с ЭПО, когда морфофункциональные свойства клеток максимальны.

В основе терапевтического потенциала МСК, в основном, лежит паракринный эффект, обусловленный влиянием на клетки микроокружения продуцируемых ими цитокинов и ростовых факторов, тем самым, наблюдается стимуляция в микроокружении пролиферации, миграции резидентных стволовых клеток, что способствует процессам репарации/регенерации [264; 478]. Так, обработка фрагментов жировой ткани мышей ЭПО в дозе 20 МЕ/мл в течение 24 часов способствовала увеличению экспрессии проангиогенных и антиангиогенных факторов, снижению уровня апоптоза при культивировании фрагментов жировой ткани и возрастанию количества пролиферирующих эндотелиальных клеток во фрагментах жировой ткани. Более того, подсадка таких обработанных ЭПО фрагментов жировой ткани увеличивало формирование новых сосудов [215].

В данном исследовании мы поставили задачу сопоставить терапевтический потенциал биомедицинского клеточного продукта крыс (МСК, МСК и ЭПО) при патологических процессах в сердечно-сосудистой и опорно-двигательной системе. Нарушение ангиогенеза выявляется при различных патологических состояниях, включая синдром диабетической стопы, критическую ишемию нижних конечностей и инфаркт миокарда [188; 319]. С учетом проангиогенного потенциала МСК данные клетки используют как альтернативу традиционным способам лечения при критической ишемии нижних конечностей. По данным оценки микроциркуляции у крыс с ишемией конечности, внутримышечное однократное введение МСК и МСК+ЭПО способствовало существенному увеличению показателей микроциркуляции, особенно в группе МСК+ЭПО, достигающее к 28 суткам эксперимента 60–70 % от исходного уровня. При этом по данным гистологического исследования отмечена большая сохранность мышечных волокон, менее выраженное разрастание рыхлой соединительной ткани и существенное увеличение количества сосудов, питающих мышцы. На ранних сроках наблюдения сочетание МСК с ЭПО при ишемии конечности у крыс снижало уровень IL-1 $\beta$  и повышало уровень IL-6, и только к концу эксперимента отмечено увеличение IL-1 $\beta$  в сыворотке крови, а в группе МСК на

ранних сроках повышен уровень IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$ , которые к концу эксперимента существенно снижаются. В то же время в группе МСК+ЭПО в сыворотке крови на ранних сроках после инициации ишемии конечности высокий уровень IL-10 и меньший уровень ЭПО, нежели в группе МСК. Анализ уровня провоспалительных цитокинов в экстракте мышц голени на стороне индукции ишемии конечности в группе МСК+ЭПО выявил снижение IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$  на ранних сроках эксперимента и увеличения к концу эксперимента в сравнении с группой МСК. В экстракте мышц голени группы МСК+ЭПО на ранних сроках эксперимента уровень IL-10 и ЭПО, также были выше в сравнении с группой МСК. Полученные данные указывают на то, что наличие ЭПО способствует меньшей активации воспалительного процесса в мышцах голени, испытывающих дефицит кровоснабжения, а повышение уровней ЭПО расценивается как защитная реакция в тканях голени, направленной на повышение устойчивости к гипоксии и окислительному стрессу. Эффективность использования МСК для лечения дегенерации межпозвонковых дисков может быть следствием подавления апоптоза клеток пульпозного кольца и снижения дегенеративных процессов [325; 342]. Анализ высоты межпозвонкового расстояния и патогистологической картины в диске с дегенерацией, иницированной пункцией и механическим разрушением целостности пульпозного ядра в хвостовом отделе позвоночника крыс выявил, что сочетание МСК с ЭПО ускоряет репарацию/регенерацию и, тем самым, способствует улучшению прочности соединения позвонков, амортизацию при нагрузке, гибкости и подвижности позвоночника. Таким образом, ЭПО усиливает терапевтический потенциал МСК в неблагоприятном микроокружении. Аутологичные костномозговые мононуклеарные клетки или же обогащенные субпопуляции костного мозга, включая CD133+ и CD271+ клетки, прошли II/III фазу клинических испытаний при ишемии миокарда и показали свою безопасность и обнадеживающий терапевтический потенциал [91, 352].

Таким образом, вышеизложенное свидетельствует о том, что понимание фундаментальных механизмов участия МСК в репарации/регенерации при патологическом процессе невозможно без учета роли цитокинов и факторов

роста, в том числе и ЭПО, и представляет как фундаментальный, так и практический аспект в плане внедрения клеточной терапии в регенеративной медицине. Предобработка МСК костного мозга модулирует изменения в уровне экспрессии молекул адгезии и рецепторов; канонического и неканонического сигнального пути ЭПО; антиапоптотические и паракринные эффекты; аутофагию и ультраструктурную перестройку клеток, что придает им новые свойства устойчивости к неблагоприятным факторам микроокружения и усиливает терапевтический потенциал.

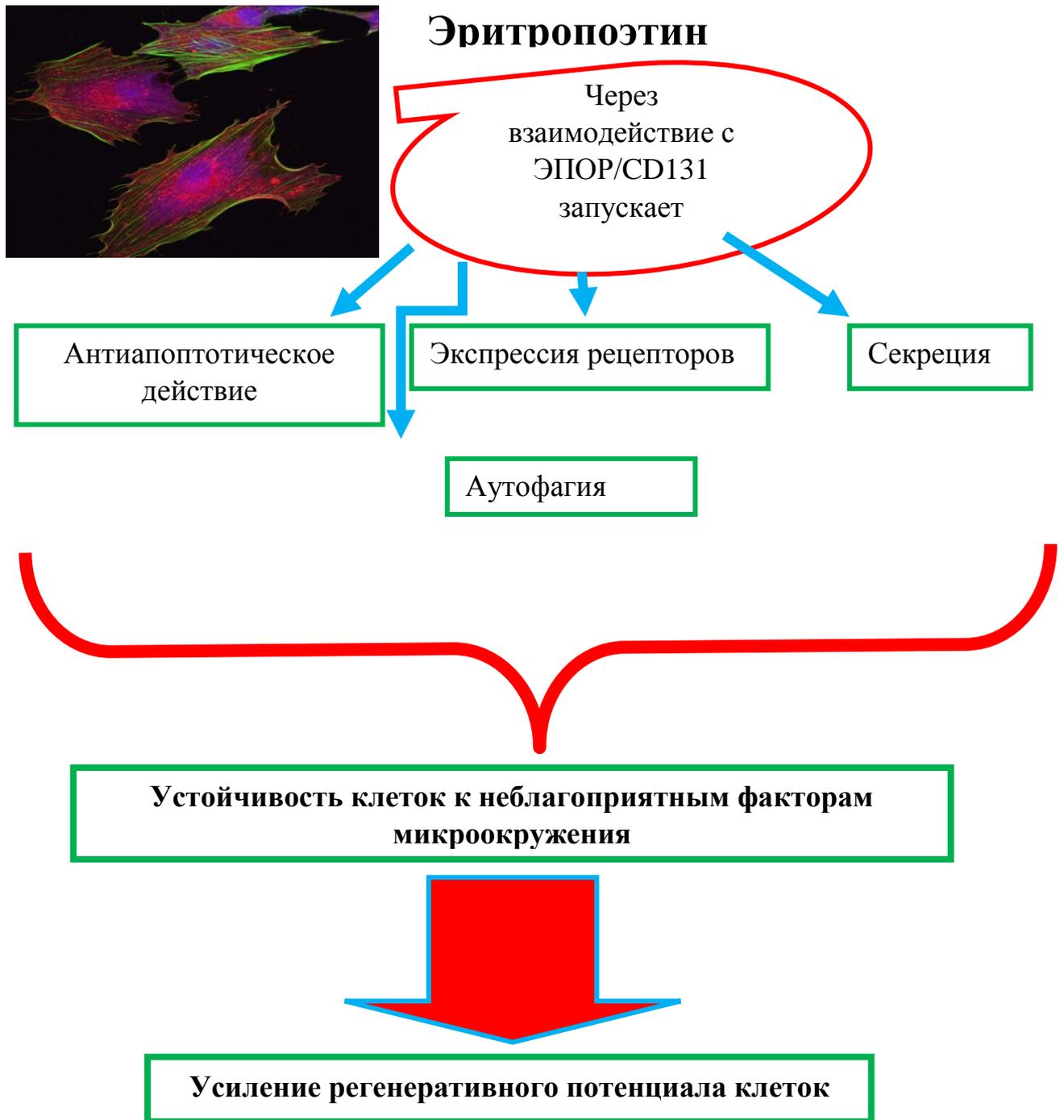


Рисунок 42 – Схема влияния эритропоэтина на мезенхимные стволовые клетки

## ВЫВОДЫ

1. Активация мезенхимных стволовых клеток костного мозга человека эритропоэтином реализуется через канонический и неканонический сигнальный путь эритропоэтина. Увеличивается доля клеток, несущих рецепторы к эритропоэтину (канонический сигнальный путь эритропоэтина, ЭПОР) на 80 % и клеток, несущих рецептор к эритропоэтину, ассоциированным с общей бета цепью цитокинов (неканонический сигнальный путь эритропоэтина, ЭПОР/CD131) – на 120 %.

2. Эритропоэтин инициирует изменения экспрессии молекул межклеточного взаимодействия (CD18, CD29, CD44, CD49a, CD54) и молекулы ассоциированной со стволовостью и проангиогенным действие (CD146) на стволовых мезенхимных клетках человека. Экспрессия молекул межклеточного взаимодействия зависит от времени активации мезенхимных стволовых клеток костного мозга человека эритропоэтином.

3. Активация мезенхимных стволовых клеток костного мозга человека и крыс эритропоэтином повышает устойчивость клеток к неблагоприятным условиям (окислительный стресс, различным уровням глюкозы, дефициту ростовых факторов). В основе изменения функциональной активности мезенхимных стволовых клеток лежит задержка в фазе покоя клеточного цикла ( $G_0G_1$ ), уменьшение доли клеток в апоптозе/некрозе, активация пролиферации, миграции и секреции биологически активных веществ.

4. Эритропоэтин проявляет антивозрастное действие на мезенхимные стволовые клетки человека. Так отмечено увеличение доли клеток экспрессирующих маркер аутофагии LC3B на 175 % (ассоциируется с «омоложением» клеток) и возрастание относительной плотности «гранулярного эндоплазматического ретикулума» на 47 % (свидетельствует об усилении синтеза в клетке).

5. Однократное введение биомедицинского клеточного продукта (мезенхимные стволовые клетки, мезенхимные стволовые клетки и эритропоэтин)

в толщу мышц голени с ишемией усиливает параметры микроциркуляции в дистальном отделе конечности (стопа). Отмечено возрастание микроциркуляции в стопе в группе крыс, получивших лечение только мезенхимными стволовыми клетками на 90 %, а в группе, получивших лечение сочетанием мезенхимных стволовых клеток с эритропоэтином – на 188 % от уровня после инициации ишемии конечности, что соответствует уровню восстановления микроциркуляции в стопе до моделирования ишемии – на 59 % и 71 % соответственно.

6. Экспериментальное исследование выявило, что организм крыс с ишемией конечности по-разному реагирует на системном (сыворотка крови) и локальном (мышцы голени) уровне содержанием цитокинов и ростовых факторов в ответ на лечение мезенхимными стволовыми клетками с эритропоэтином. Так, на системном уровне отвечает снижение содержания IL-1 $\beta$  на 7-е и 14-е сутки и увеличение на 28-е сутки эксперимента, увеличение содержания TNF $\alpha$  только на 14-е сутки эксперимента, а IL-10 и ЭПО – на 7-е и 14-е сутки эксперимента в сыворотке крови. В мышцах голени содержание IL-1 $\beta$  повышается только на 14-е сутки эксперимента, TNF $\alpha$  и TNF $\alpha$  – на 14-е и 28-е сутки эксперимента, а содержание ЭПО повышено только на 14-е сутки эксперимента, что может свидетельствовать о повышении устойчивости мышц голени к кислородному голоданию.

7. Введение биомедицинского клеточного продукта (мезенхимные стволовые клетки, мезенхимные стволовые клетки с эритропоэтином) ускоряют регенерацию в пульпозном ядре межпозвонкового диска у крыс. Отмечено увеличение количества клеток в пульпозном ядре по данным гистологического исследования и расстоянию между прилегающими пластинами позвонков (по данным магнитно-резонансной томографии).

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для наделения стволовых клеток *in vitro* устойчивостью к влиянию неблагоприятного микроокружения рекомендовано использовать эритропоэтин в диапазоне 30–60 МЕ/мл (2–4 % от начальной суточной дозы эритропоэтина альфа для лечения анемии).

2. Рекомендуется длительное культивирование стволовых клеток костного мозга с эритропоэтином (до 3 пассажей) для получения клеток с новыми функциональными свойствами.

3. Для оценки терапевтического потенциала стволовых клеток рекомендуется использовать экспериментальные модели, воспроизводящие патологические процессы у человека.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВЗСК	– воспалительные заболевания слизистой оболочки кишечника
ГСК	– гемопоэтические стволовые клетки
ДМПД	– дегенерация межпозвонкового диска
ЗФР	– забуференный физиологический раствор
КИ	– клеточный индекс
КИ – КИНК	– критическая ишемия нижних конечностей
КОЕ	– колониеобразующая единица
КС	– кондиционированная среда
МСК	– мезенхимные стволовые клетки
МТТ	– 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2 Н-тетразолиум бромид
ФВЛЖ	– фракция выброса левого желудочка
ЭПО	– эритропоэтин
ЭПОР	– рецептор к эритропоэтину
CD	– кластер дифференцировки
Collagen I	– коллаген 1-го типа
EpoR	– рецептор к эритропоэтину
FCS	– эмбриональная телячья сыворотка
GM-CSF	– гранулоцитарно/макрофагальный колониестимулирующий фактор
LC3B	– маркер аутофагии
CXCL-12/SDF-1a	– стромальный фактор-1a
FGF basic	– основной фактор роста фибробластов
Fibronectin	– фибронектин
Free BDNF	– свободный нейротрофический фактор
ICAM-1	– межклеточная молекула адгезии-1

IDO	– индолеамин-2,3-диоксигеназа-1
IGF-1	– инсулиноподобный фактор роста-1
IL	– интерлейкин
IFN- $\gamma$	– интерферон гамма
P	– матриксная металлопротеаза
MMNO	– стойкие метаболиты оксида азота (NO)-нитритов (NO <sub>2</sub> )
PDGF-AB	– тромбоцитарный фактор роста-AB
$\alpha$ -SMA	– $\alpha$ -гладкомышечный актин
TIMP1	– тканевой ингибитор матриксных металлопротеаз-1
Total Collagen	– общий коллаген
TNF- $\alpha$	– фактор некроза опухоли альфа
MHC	– антигенов главного комплекса гистосовместимости
VEGF	– фактор роста эндотелия сосудов
Vimentin	– виментин
Von Willebrand factor	– фактор Виллебранда

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. А. А. Максимов и его революционное учение о мезенхимных стволовых клетках / О. Д. Мяделец, Т. Н. Кичигина, В. Н. Грушин [и др.] // Вестник ВГМУ. – 2007. – Т. 6, № 3. – С. 139–147.
2. Ангиогенный потенциал кардиальных стволовых и мезенхимальных стромальных клеток костного мозга крысы / С. В. Павлова, И. А. Розанова, Е. В. Чепелева [и др.] // Патология кровообращения и кардиохирургия. – 2015. – Т. 19, № 4 (2). – С. 77–84.
3. Бывальцев, В. А. Использование стволовых клеток в терапии дегенерации межпозвонкового диска / В. А. Бывальцев, И. А. Степанов, Л. А. Бардонова // Вестник РАМН. – 2016. – Т. 71, № 5. – С. 359–366.
4. Влияние естественного и круглосуточного светового режима на мезенхимные стволовые клетки / А. П. Лыков, Н. А. Бондаренко, М. А. Суровцева [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2016. – № 3. – С. 168–171.
5. Влияние компонентов экстрацеллюлярного матрикса на адгезию костномозговых мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток к политетрафторэтилену / А. А. Карпенко, И. А. Розанова, О. В. Повещенко [и др.] // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2015. – Т. 21, № 4. – С. 178–184.
6. Влияние костномозговых мультипотентных мезенхимных стромальных клеток и продуктов их секреции на микроциркуляцию в широкой связке матки крыс Вистар при экспериментальном хроническом воспалении гениталий / В. И. Коненков, Ю. И. Бородин, Т. И. Дергачева [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2017. – Т. 163, № 1. – С. 93–97.
7. Влияние морфофункциональных свойств мобилизованных прогениторных клеток пациентов с хронической сердечной недостаточностью на эффективность аутологичной интрамиокардиальной клеточной трансплантации / И. И. Ким, О. В. Повещенко, Н. А. Бондаренко [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2014. – № 2. – С. 117–122.

8. Влияние полиэтилентерефталата и политетрафторэтилена на функциональные свойства эндотелиальных и мезенхимных клеток / А. П. Лыков, О. В. Повещенко, М. А. Суровцева [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2018. – № 4. – С. 269–274.

9. Влияние провоспалительных факторов на нейропротективную эффективность мультипотентных мезенхимных стромальных клеток при черепно-мозговой травме / Т. И. Данилина, Д. Н. Силачев, И. Б. Певзнер [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2017. – № 2. – С. 77–84.

10. Влияние ростовых факторов TGF- $\beta$ 1, IGF-I, BMP-2 и BMP-4 на хондрогенную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток, выделенных из синовиальной оболочки человека / А. Д. Далина, А. Е. Мухамбетова, Н. Д. Батпенев [и др.] // Биотехнология. Теория и практика. – 2013. – № 1. – С. 12–15.

11. Влияние трансплантации аллогенных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга на регенерацию печени после обширной резекции в эксперименте / В. С. Рудаков, Р. В. Деев, К. К. Губарев [и др.] // Гены и клетки. – 2018. – Т. 13. – № 2. – С. 83–88.

12. Влияние фактора роста эндотелия сосудов и эритропоэтина на функциональную активность фибробластов и мультипотентных мезенхимных стромальных клеток / Н. А. Бондаренко, Ю. В. Никонорова, М. А. Суровцева [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2015. – Т. 60, № 10. – С. 505–509.

13. Восстановительный потенциал суспензии и сфероидов мультипотентных мезенхимных стромальных клеток пупочного канатика человека на модели инфаркта миокарда крыс / М. Е. Красина, Н. В. Кошелева, Т. В. Липина [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2020. – № 2. – С. 89–97.

14. Выживаемость при выполнении первичных и вторичных ампутаций у больных с критической ишемией нижних конечностей / М. Н. Кудыкин,

Р. А. Дерябин, А. Н. Васягин [и др.] // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2017. – Т. 23, № 2. – С. 126–129.

15. Гипоксическое прекондиционирование стволовых клеток как новый подход к повышению эффективности клеточной терапии инфаркта миокарда / Л. Н. Маслов, Ю. К. Подоксенов, А. Г. Портниченко [и др.] // Вестник РАМН. – 2013. – № 12. – С. 16–25.

16. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. – Москва : Практика, 1998. – 459 с. – ISBN 5-89816-009-4.

17. Деев, Р. В. Современные представления о клеточной гибели / Р. В. Деев, А. И. Билялов, Т. М. Жампеисов // Гены и клетки. – 2018. – Т. 13, № 1. – С. 6–19.

18. Живодерников, И. В. Белки внеклеточного матрикса и транскрипция матрикс-ассоциированных генов в мезенхимных стромальных клетках при моделировании эффектов микрогравитации / И. В. Живодерников, А. Ю. Ратушный, Д. К. Матвеева // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2020. – Т. 170, № 8. – С. 201–204.

19. Захаров, Ю. М. Цитопротекторные функции эритропоэтина / Ю. М. Захаров // Клиническая нефрология. – 2009. – № 1. – С. 16–21.

20. Иванюк, Д. И. Механизмы иммуномодулирующего действия мезенхимных стволовых клеток / Д. И. Иванюк, В. В. Турчин, А. Г. Попандопуло // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2011. – Т. 6, № 2. – С. 27–31.

21. Инъекция мультипотентных мезенхимных стромальных клеток в эксперименте как причина кровоизлияний в региональных лимфатических узлах / И. В. Майборodin, В. В. Морозов, А. А. Аникеев [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2017. – Т. 164, № 12. – С. 759–765.

22. Капутин, М. Ю. Применение стволовых клеток для лечения больных с критической ишемией нижних конечностей / М. Ю. Капутин, С. Н. Бурнос // Вестник хирургии. – 2015. – Т. 174, № 1. – С. 103–108.

23. Клеточный состав центральных и периферических лимфоидных органов крыс Вистар при введении биомедицинского клеточного продукта / В. И. Коненков, Ю. И. Бородин, Т. И. Дергачева [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2016. – № 1. – С. 13–17.

24. Клеточные пласты из мезенхимных стромальных клеток эффективно стимулируют заживление глубоких дефектов мягких тканей / Н. А. Александрюшкина, Н. В. Данилова, О. А. Григорьева [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2019. – № 1. – С. 42–47.

25. Клеточная терапия при травмах спинного мозга / А. Д. Воронова, О. В. Степанова, А. В. Чадин [и др.] // Вестник РАМН. – 2016. – Т. 71, № 6. – С. 420–426.

26. Клеточная терапия несовершенного остеогенеза / В. С. Сергеев, Т. И. Тихоненко, Д. С. Буклаев [и др.] // Гены и клетки. – 2016. – Т. 11, № 4. – С. 22–33.

27. Климович, В. Б. Иммуномодулирующая активность мезенхимальных стромальных (стволовых) клеток / В. Б. Климович // Медицинская иммунология. – 2014. – Т. 16, № 2. – С. 107–126.

28. Ковалева, О. В. Аутофагия: клеточная гибель или способ выживания? / О. В. Ковалева, М. С. Шитова, И. Б. Зборовская // Клиническая онкогематология. – 2014. – Т. 7, № 2. – С. 103–113.

29. Межевикина, Л. М. Влияние регуляторных белков LIF, FGF и IL-2 на пролиферацию мезенхимных стволовых клеток костного мозга крупного рогатого скота *in vitro* / Л. М. Межевикина, И. С. Кашапова // Ветеринария, зоотехния и биотехнологии. – 2017. – № 5. – С. 92–99.

30. Мезен, Н. И. Стволовые клетки: учеб.-метод. пособие / Н. И. Мезен, З. Б. Квачева, Л. М. Сычик. – Минск : Изд-во БГМУ, 2014. – 62 с.

31. Мезенхимные стволовые клетки из жировой ткани мышцы стимулируют рост опухолей / Е. Ю. Москалева, Ю. П. Семочкина, В. Г. Шуватова [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2019. – № 1. – С. 28–32.

32. Методические подходы к детекции процесса аутофагии в мышечных клетках / К. С. Сухарева, Н. А. Смолина, А. С. Головкин [и др.] // Трансляционная медицина. – 2016. – Т. 3, № 5. – С. 129–137.

33. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки в регенерации ожоговой раны кожи в норме и при гипергликемии у мышей / А. П. Лыков, Н. А. Бондаренко, Ю. В. Никонорова [и др.] // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2014. – № 3 (49). – С. 141–142.

34. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки для терапии дисфункции лимбального эпителия / О. В. Повещенко, А. Ф. Повещенко, А. П. Лыков [и др.] // Бюллетень СО РАМН. – 2014. – Т. 34, № 3. – С. 48–55.

35. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки пупочного канатика человека проявляют наивысшую секреторную активность при культивировании в присутствии сыворотки пуповинной крови / Ю. А. Романов, В. В. Вторушина, Т. Н. Дугина [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2020. – № 2. – С. 84–88.

36. Опухоль-ассоциированные мезенхимные стволовые клетки при химически индуцированном раке молочной железы у крыс Wistar / А. П. Лыков, А. В. Кабаков, Н. А. Бондаренко [и др.] // Сибирский онкологический журнал. – 2019. – Т. 18, № 1. – С. 56–64.

37. Останин, А. А. Мультиплексный анализ цитокинов, хемокинов, ростовых факторов, MMP-9 И TIMP-1, продуцируемых мезенхимальными стромальными клетками костного мозга, жировой ткани и плаценты человека / А. А. Останин, Я. Л. Петровский, Е. Я. Шевела, Е. Р. Черных // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2011. – № 1. – С. 29–37.

38. Остеогенный потенциал мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток из пульпы молочных зубов до и после криоконсервации / Т. Б. Бухарова, Г. Е. Леонов, Е. В. Галицына [и др.] // Гены и клетки. – 2016. – № 4. – С. 43–47.

39. Оценка возможности создания фибриновых скаффолдов, заселенных стволовыми клетками пульпы зуба, для замещения костных дефектов челюсти /

Ю. А. Домбровская, Н. И. Енукашвили, А. В. Котова [и др.] // Трансляционная медицина. – 2020. – Т. 7, № 1. – С. 59–69.

40. Параметры микроциркуляции в широкой связке матки крыс Вистар при введении аутологичного биомедицинского клеточного продукта / Т. И. Дергачева, А. П. Лыков, А. В. Шурлыгина [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2015. – Т. 159, № 6. – С. 765–768.

41. Паюшина, О. В. Локализация и функции мезенхимных стромальных клеток *in vivo* / О. В. Паюшина // Журнал общей биологии. – 2015. – Т. 76, № 2. – С. 161–172.

42. Паюшина, О. В. Мезенхимные стволовые клетки: источники, фенотип и потенции к дифференцировке / О. В. Паюшина, Е. И. Домарацкая, В. И. Старостин // Известия РАМН. Серия Биологическая. – 2006. – № 1. – С. 6–25.

43. Паюшина, О. В. Участие мезенхимных стромальных клеток в регенерации мышечной ткани / О. В. Паюшина, Е. И. Домарацкая, О. Н. Шевелева // Журнал общей биологии. – 2019. – Т. 80, № 1. – С. 3–13.

44. Перспективность использования клеточного продукта для терапии кожных дефектов при сахарном диабете / А. П. Лыков, Н. А. Бондаренко, О. В. Повещенко [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2017. – № 3. – С. 175–177.

45. Перспективы применения клеточных технологий в реабилитации больных сердечно-сосудистыми заболеваниями / Е. В. Тицкая, И. Н. Смирнова, И. И. Антипова [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 6. – С. 159–168.

46. Пролиферативный и дифференцировочный потенциал мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани в условиях культивирования / В. М. Семенова, Н. И. Лисяный, Л. П. Стаино [и др.] // Укр. нейрохірург. журн. – 2014. – № 3. – С. 24–29.

47. Пустовалова, М. В. Мезенхимальные стволовые клетки: эффекты воздействия ионизирующего излучения в малых дозах / М. В. Пустовалова,

А. К. Грехова, А. Н. Осипов // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2018. – Т. 58, № 4. – С. 352–362.

48. Разработка и изучение *in vitro* тканеинженерной конструкции на основе политетрафторэтилена и мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток (сообщение № 1) / И. А. Розанова, О. В. Повещенко, А. А. Карпенко [и др.] // Патология кровообращения и кардиохирургия. – 2015. – Т. 19, № 4 (2). – С. 20–27.

49. Результаты использования клеточных технологий при лигировании магистральной вены в эксперименте / И. В. Майборodin, В. В. Морозов, В. А. Матвеева [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2017. – Т. 164, № 7. – С. 73–80.

50. Розанова, О. Е. Способность мононуклеаров периферической крови и костного мозга больных апластической анемией к продукции мультиколониестимулирующего фактора интерлейкина-3 / О. Е. Розанова // Медицинская иммунология. – 2005. – Т. 7, № 4. – С. 421–424.

51. Сравнительное исследование процесса хондрогенной дифференцировки мезенхимальных стромальных клеток, выделенных из разных источников / Ю. Б. Басок, А. М. Григорьев, Л. А. Кирсанова [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2019. – Т. 21, № 1. – С. 101–112.

52. Сравнительное исследование эффективности трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга, культивированных в условиях нормоксии и гипоксии, и их кондиционированных сред на модели острого повреждения легких / Р. Л. Чайлахян, А. В. Аверьянов, Ф. Г. Забозлаев [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2014. – № 1. – С. 25–30.

53. Сравнительный эффект обогащенной тромбоцитами плазмы, лизата тромбоцитов и эмбриональной телячьей сыворотки на мезенхимные стволовые клетки / А. П. Лыков, Н. А. Бондаренко, М. А. Суровцева [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2017. – Т. 163, № 6. – С. 722–725.

54. Стромально-васкулярная фракция жировой ткани как альтернативный источник клеточного материала для регенеративной медицины / А. В. Веремеев, Р. Н. Болгарин, М. А. Петкова [и др.] // Гены и клетки. – 2016. – Т. 11, № 1. – С. 35–42.

55. Суковатых, Б. С. Эффективность лечения критической ишемией нижних конечностей методами непрямой реваскуляризации / Б. С. Суковатых, А. Ю. Орлова, Е. Б. Артюшкова // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2020. – Т. 26, № 2. – С. 34–39.

56. Терапевтический потенциал биомедицинского клеточного продукта при DSS-индуцированном воспалении в тонкой кишке мышей линии C57Bl/6 / А. П. Лыков, О. В. Повещенко, Н. А. Бондаренко [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2018. – № 2. – С. 121–125.

57. Токсический эффект наноструктурированных частиц диоксида кремния на костномозговые мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки / А. П. Лыков, Ю. А. Лыкова, Н. А. Бондаренко [и др.] // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2015. – № 5 (2). – С. 251–255.

58. Токсическое влияние наноструктурированных частиц диоксида кремния на мультипотентные мезенхимные стволовые клетки / А. П. Лыков, Ю. А. Лыкова, О. В. Повещенко [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2017. – № 1. – С. 51–54.

59. Трансплантация клеточных пластов из мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани эффективно индуцирует ангиогенез в ишемизированных скелетных мышцах / П. И. Макаревич, М. А. Болдырева, К. В. Дергилёв [и др.] // Гены и клетки. – 2015. – Т. 10, № 3. – С. 68–77.

60. Участие JAK1, JAK2 и JAK3 в стимуляции функций мезенхимных клеток–предшественников фактором роста фибробластов / Г. Н. Зюзьков, В. В. Жданов, Е. В. Удут [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2016. – Т. 162, № 8. – С. 206–209.

61. Функциональные свойства мезенхимных стволовых клеток жировой ткани больных сердечной недостаточностью и коморбидностями /

И. Р. Мизулина, Р. И. Дмитриева, С. В. Анисимов [и др.] // Бюллетень Федерального Центра сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова. – 2012. – № 5. – С. 68–76.

62. Шахов, В. П. Представление о системе мезенхимопоэза и мезенхимальных стволовых клетках / В. П. Шахов, Я. В. Латюшин // Вестник Чувашского гос. пед. ун-та им. И. Я. Яковлева. ЧГПУ. – 2008. – № 8. – С. 267–284.

63. Экспрессия поверхностных молекул мезенхимальными стромальными клетками человека при сокультивировании с ядродержащими клетками пуповинной крови / Ю. А. Романов, Е. Е. Балашов, Н. Е. Волгина [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2016. – № 4. – С. 270–274.

64. Экспрессия RUNX2 и Osterix в мезенхимных стволовых клетках крыс при культивировании в остеогенно-кондиционированной среде / Л. А. Покровская, С. В. Надеждин, Е. В. Зубарева [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2020. – № 2. – С. 112–117.

65. Эритропоэтин улучшает эффекты мезенхимальных стволовых клеток в экспериментальной модели сепсиса / А. В. Аверьянов, А. Г. Коноплянников, Ф. Г. Забозлаев [и др.] // Клиническая практика. – 2012. – № 2. – С. 4–12.

66. Эффективность внутримышечного введения стволовых/прогениторных клеток в эксперименте на модели ишемии нижней конечности / О. В. Повещенко, А. П. Лыков, Н. А. Бондаренко [и др.] // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2016. – Т. 22, № 4. – С. 51–54.

67. Эффективность применения рекомбинантного человеческого эритропоэтина у детей, родившихся с очень низкой и экстремально низкой массой тела / Д. Р. Шарафутдинов, Е. Н. Балашов, С. В. Павлович [и др.] // Неонатология. – 2018. – Т. 6, № 3. – С. 41–53.

68. Эффективность терапии клеточным продуктом острого инфаркта миокарда у крыс линии Wistar по данным биоэлектрической активности миокарда / А. П. Лыков, А. В. Кабаков, О. В. Повещенко [и др.] // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2014. – № 8 (4). – С. 78–84.

69. A comprehensive characterisation of large-scale expanded human bone marrow and umbilical cord mesenchymal stem cells / C. Mennan, J. Garcia, S. Roberts [et al.]. – DOI: 10.1186/s13287-019-1202-4. – Text : electronic // Stem Cell Res. Ther. – 2019. – Vol. 10, N 1. – P. 99. – URL : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30885254/> (date of access: 14.10.2022).

70. A glycovariant of human CD44 is characteristically expressed on human mesenchymal stem cells / G. Pachon-Pena, C. Donnelly, C. Ruiz-Canada [et al.]. – DOI: 10.1002/stem.2549. – Text : electronic // Stem Cells. – 2017. – Vol. 35, N 4. – P. 1080–1092. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27888602/> (date of access: 14.10.2022).

71. A novel Sprouty4-ERK1/2-Wnt/ $\beta$ -catenin regulatory loop in marrow stromal progenitor cells controls osteogenic and adipogenic differentiation / L. Tian, H. Xiao, M. Li [et al.]. – DOI: 10.1016/j.metabol.2020.154189. – Text : electronic // Metabolism. – 2020. – Vol. 105. – P. 154189. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32105664/> (date of access: 14.10.2022).

72. A review of stem cell therapy: An emerging treatment for dementia in Alzheimer's and Parkinson's disease / A. U. Pradhan, O. Uwishema, H. Onyeaka [et al.]. – DOI: 10.1002/brb3.2740. – Text : electronic // Brain Behav. – 2022. – Vol. 12, N 9. – P. e2740. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35971625/> (date of access: 14.10.2022).

73. Abdelnasser Imam, R. Efficacy of erythropoietin pretreated mesenchymal stem cells in murine burn wound healing: possible in vivo transdifferentiation into keratinocytes / R. Abdelnasser Imam, A. Abu-Elenein Rizk. – DOI: 10.5603/FM.a2019.0038. – Text : electronic // Folia Morphol. (Warsz). – 2019. – Vol. 78, N 4. – P. 798–808. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30949996/> (date of access: 14.10.2022).

74. Acceleration of diabetic wound healing with adipose-derived stem cells, endothelial-differentiated stem cells, and topical conditioned medium therapy in a swine model / R. F. Irons, K. W. Cahill, D. A. Rattigan [et al.]. – DOI: 10.1016/j.jvs.2018.01.065. – Text : electronic // J. Vasc. Surg. – 2018. – Vol. 68,

N 6S. – P. 115S–125S. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29753580/> (date of access: 14.10.2022).

75. Activation of autophagy in periodontal ligament mesenchymal stem cells promotes angiogenesis in periodontitis / W. Wei, Y. An, Y. An [et al.]. – DOI: 10.1002/JPER.17–0341. – Text : electronic // J. Periodontol. – 2018. – Vol. 89, N 6. – P. 718–727. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29607508/> (date of access: 14.10.2022).

76. Activation of migration of endogenous stem cells by erythropoietin as potential rescue for neurodegenerative diseases / M. I. Khairallah, L. A. Kassem, N. A. Yassin [et al.]. – DOI: 10.1016/j.brainresbull.2016.01.007. – Text : electronic // Brain Res. Bull. – 2016. – Vol. 121. – P. 148–157. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26802509/> (date of access: 14.10.2022).

77. Adipose-derived mesenchymal stem cells: a promising tool in the treatment of musculoskeletal diseases / M. Torres-Torrillas, M. Rubio, E. Damia [et al.]. – DOI: 10.3390/ijms20123105. – Text : electronic // Int. J. Mol. Sci. – 2019. – Vol. 20, N 12. – P. 3105. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31242644/> (date of access: 21.11.2022).

78. Adipose-derived mesenchymal stem cells from the elderly exhibit decreased migration and differentiation abilities with senescent properties / M. Liu, H. Lei, P. Dong [et al.]. – DOI: 10.1177/0963689717721221. – Text : electronic // Cell Transplant. – 2017. – Vol. 26, N 9. – P. 1505–1519. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29113467/> (date of access: 21.11.2022).

79. Adipose derived mesenchymal stem cell therapy in the treatment of isolated knee chondral lesions: design of a randomised controlled pilot study comparing arthroscopic microfracture versus arthroscopic microfracture combined with postoperative mesenchymal stem cell injections / J. Freitag, J. Ford, D. Bates [et al.]. – DOI: 10.1136/bmjopen-2015-009332. – Text : electronic // BMJ Open. – 2015. – Vol. 5, N 12. – P. e009332. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26685030/> (date of access: 21.11.2022).

80. AICAR and nicotinamide treatment synergistically augment the proliferation and attenuate senescence-associated changes in mesenchymal stromal cells / M. Khorraminejad-Shirazi, M. Sani, T. Talaei-Khozani [et al.]. – DOI: 10.1186/s13287-020-1565-6. – Text : electronic // Stem Cell Res. Ther. – 2020. – Vol. 11, N 1. – P. 45. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32014016/> (date of access: 21.11.2022).

81. Ali, F. Effect of type 2 diabetic serum on the behavior of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in vitro / F. Ali, F. Aziz, N. Wajid. – DOI: 10.1016/j.cdtm.2017.02.006. – Text : electronic // Chronic Dis. Transl. Med. – 2017. – Vol. 3, N 2. – P. 105–111. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29063063/> (date of access: 21.11.2022).

82. Almalki, S. G. Effects of matrix metalloproteinases on the fate of mesenchymal stem cells / S. G. Almalki, D. K. Agrawal. – DOI: 10.1186/s13287-016-0393-1. – Text : electronic // Stem Cell Res. Ther. – 2016. – Vol. 7, N 1. – P. 129. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27612636/> (date of access: 21.11.2022).

83. Altered properties of feline adipose-derived mesenchymal stem cells during continuous in vitro cultivation / B. Y. Lee, Q. Li, W. J. Song [et al.]. – DOI: 10.1292/jvms.17–0563. – Text : electronic // J. Vet. Med. Sci. – 2018. – Vol. 80, N 6. – P. 930–938. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29669964/> (date of access: 21.11.2022).

84. An experimental study of preventing and treating acute radioactive enteritis with human umbilical cord mesenchymal stem cells / R. Wang, W. Yuan, Q. Zhao [et al.]. – DOI: 10.1016/S1995-7645(13)60173-X. – Text : electronic // Asian Pac. J. Trop. Med. – 2013. – Vol. 6, N 12. – P. 968–971. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24144029/> (date of access: 21.11.2022).

85. An investigation of equine mesenchymal stem cell characteristics from different harvest sites: more similar than not / K. G. Lombana, L. R. Goodrich, J. N. Phillips [et al.]. – DOI: 10.3389/fvets.2015.00067. – Text : electronic // Front. Vet. Sci. – 2015. – Vol. 2. – P. 67–75. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26664993/> (date of access: 21.11.2022).

86. An update on the progress of isolation, culture, storage, and clinical application of human bone marrow mesenchymal stem/stromal cells / D. T. Chu, T. N. T. Pham, N. L. B. Tien [et al.]. – DOI: 10.3390/ijms21030708. – Text : electronic // Int. J. Mol. Sci. – 2020. – Vol. 21, N 3. – P. 70. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31973182/> (date of access: 21.11.2022).

87. Analysis of mesenchymal cells (MSCs) from bone marrow, synovial fluid and mesenteric, neck and tail adipose tissue sources from equines / M. Arevalo-Turrubiarte, C. Olmeo, P. Accornero [et al.]. – DOI: 10.1016/j.scr.2019.101442. – Text : electronic // Stem Cell Res. – 2019. – Vol. 37. – P. 101442. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31026685/> (date of access: 21.11.2022).

88. Analysis of the safety and efficacy of the endovascular treatment for acute limb ischemia with percutaneous pharmacomechanical thrombectomy compared with catheter-directed thrombolysis / R. de Athayde Soares, M. F. Matiello, F. C. Brochado Neto [et al.]. – DOI: 10.1016/j.avsg.2019.11.038. – Text : electronic // Ann. Vasc. Surg. – 2020. – Vol. 66. – P. 470–478. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31863953/> (date of access: 21.11.2022).

89. Anam, K. Comparative analysis of gene transcripts for cell signaling receptors in bone marrow-derived hematopoietic stem/progenitor cell and mesenchymal stromal cell populations / K. Anam, T. A. Davis. – DOI: 10.1186/scrt323. – Text : electronic // Stem Cell Res. Ther. – 2013. – Vol. 4, N 5. – P. 112. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24405801/> (date of access: 21.11.2022).

90. Angiogenic effects of human dental pulp and bone marrow-derived mesenchymal stromal cells and their extracellular vesicles / G. Merckx, B. Hosseinkhani, S. Kuypers [et al.]. – DOI: 10.2290/cells9020312. – Text : electronic // Cells. – 2020. – Vol. 9, N 2. – P. 312. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32012900/> (date of access: 21.11.2022).

91. Angiogenic potential of bone marrow derived CD133<sup>+</sup> and CD271<sup>+</sup> intramyocardial stem cell transplantation post MI / S. Sasse, A. Skorska, C. A. Lux [et al.]. – DOI: 10.3390/cells9010078. – Text : electronic // Cells. – 2019. – Vol. 9, N 1.

– P. 78. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31892273/> (date of access: 21.11.2022).

92. Anti-aging effect of erythropoietin via the ERK/Nrf-2-ARE pathway in aging rats / H. Wu, J. Zhao, M. Chen [et al.]. – DOI: 10.1007/s12031-017-0885-1. – Text : electronic // J. Mol. Neurosci. – 2017. – Vol. 61, N 3. – P. 449–458. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28168414/> (date of access: 21.11.2022).

93. Antioxidants inhibit cell senescence and preserve stemness of adipose tissue-derived stem cells by reducing ROS generation during long-term in vitro expansion / N. Liao, Y. Shi, C. Zhang [et al.]. – DOI: 10.1186/s13287-019-1404-9. – Text : electronic // Stem Cell Res. Ther. – 2019. – Vol. 10, N 1. – P. 306. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31623678/> (date of access: 21.11.2022).

94. Antioxidant properties of mesenchymal stem cells against oxidative stress in a murine model of colitis / F. Da Costa Goncalves, M. Grings, N. S. Nunes [et al.]. – DOI: 10.1007/s10529-016-2272-3. – Text : electronic // Biotechnol. Lett. – 2017. – Vol. 39, N 4. – P. 613–622. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28032203/> (date of access: 21.11.2022).

95. ARA290, a specific agonist of erythropoietin/CD131 heteroreceptor, improves circulating endothelial progenitors' angiogenic potential and homing ability / G. Hache, P. Garrigue, Y. Bennis [et al.]. – DOI: 10.1097/SHK.0000000000000606. – Text : electronic // Shock. – 2016. – Vol. 46, N 4. – P. 390–397. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27172159/> (date of access: 21.11.2022).

96. Are there any cardioprotective effects or safety concerns of erythropoietin in patients with myocardial infarction? A systematic review / W. Jean-Baptiste, A. Yusuf Ali, B. Inyang [et al.]. – DOI: 10.7759/cureus.25671. – Text : electronic // Cureus. – 2022. – Vol. 14, N 6. – P. e25671. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25704158/> (date of access: 21.11.2022).

97. Assessment of angiogenic potential of mesenchymal stem cells derived conditioned medium from various oral sources / M. R. Shekatkar, S. M. Kheur, A. H. Kharat [et al.] // J. Clin. Transl. Res. – 2022. – Vol. 8, N 4. – P. 323–338.

98. Autocrine fibronectin from differentiating mesenchymal stem cells induces the neurite elongation in vitro and promotes nerve fiber regeneration in transected spinal cord injury / X. Zeng, Y. H. Ma, Y. F. Chen [et al.]. – DOI: 10.1002/jbm.a.35720. – Text : electronic // J. Biomed. Mater. Res. A. – 2016. – Vol. 104, N 8. – P. 1902–1911. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26991461/> (date of access: 21.11.2022).

99. Autocrine signals increase ovine mesenchymal stem cells migration through Aquaporin-1 and CXCR4 overexpression / A. Pelagalli, A. Nardelli, E. Lucarelli [et al.]. – DOI: 10.1002/jcp.26493. – Text : electronic // J. Cell Physiol. – 2018. – Vol. 233, N 8. – P. 6241–6249. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29345324/> (date of access: 21.11.2022).

100. Autologous bone marrow stromal cell transplantation as a treatment for acute radiation enteritis induced by a moderate dose of radiation in dogs / W. Xu, J. Chen, X. Liu [et al.]. – DOI: 10.1016/j.trsl.2015.12.010. – Text : electronic // Transl. Res. – 2016. – Vol. 171. – P. 38–51. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26763584/> (date of access: 21.11.2022).

101. Autologous cells derived from different sources and administered using different regimens for 'no-option' critical lower limb ischaemia patients / S. F. Abdul Wahid, N. A. Ismail, W. F. Wan Jamaludin [et al.]. – DOI: 10.1002/14651858.CD010747.pub2. – Text : electronic // Cochrane Database Syst. Rev. – 2018. – Vol. 8, N 8. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30155883/> (date of access: 21.11.2022).

102. Autologous mesenchymal stromal cells embedded in tricalcium phosphate for posterolateral spinal fusion: results of a prospective phase I/II clinical trial with long-term follow-up / J. F. Blanco, E. M. Villaron, D. Pescador [et al.]. – DOI: 10.1186/s13287-019-1166-4. – Text : electronic // Stem Cell Res. Ther. – 2019. – Vol. 10, N 1. – P. 63. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30795797/> (date of access: 21.11.2022).

103. Autonomous and intercellular chemokine signaling elicited from mesenchymal stem cells regulates migration of undifferentiated gastric cancer cells / D. Okamoto, N. Yamauchi, G. Takiguchi [et al.]. – DOI: 10.1111/gtc.12933. – Text :

electronic // *Genes Cells.* – 2022. – Vol. 27, N 5. – P. 368–375. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35261108/> (date of access: 21.11.2022).

104. Autophagy: a novel mechanism involved in the anti-inflammatory abilities of probiotics / M. Zaylaa, J. Alard, I. Al Kassaa [et al.]. – DOI: 10.33594/000000172. – Text : electronic // *Cell Physiol. Biochem.* – 2019. – Vol. 53, N 5. – P. 774–793. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31647207/> (date of access: 21.11.2022).

105. Autophagy controls mesenchymal stem cell properties and senescence during bone aging / Y. Ma, M. Qi, Y. An [et al.]. – DOI: 10.1111/accel.12709. – Text : electronic // *Aging Cell.* – 2018. – Vol. 17, N 1. – P. e12709. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29210174/> (date of access: 21.11.2022).

106. Autophagy inhibits the mesenchymal stem cell aging induced by D-galactose through ROS/JNK/p38 signalling / D. Zhang, Y. Chen, X. Xu [et al.]. – DOI: 10.1111/1440–1681.13207. – Text : electronic // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* – 2020. – Vol. 47, N 3. – P. 466–477. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31675454/> (date of access: 21.11.2022).

107. Autophagy inhibition via *Becn1* downregulation improves the mesenchymal stem cells antifibrotic potential in experimental liver fibrosis / H. Y. Wang, C. Li, W. H. Liu [et al.]. – DOI: 10.1002/jcp.29176. – Text : electronic // *J. Cell Physiol.* – 2020. – Vol. 235, N 3. – P. 2722–2737. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31508820/> (date of access: 21.11.2022).

108. Autophagy promotes MSC-mediated vascularization in cutaneous wound healing via regulation of VEGF secretion / Y. An, W. J. Liu, P. Xue [et al.]. – DOI: 10.1038/s41419-017-0082-8. – Text : electronic // *Cell Death Dis.* – 2018. – Vol. 9, N 2. – P. 58. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29352190/> (date of access: 21.11.2022).

109. Atalay, S. Stromal vascular fraction improves deep partial thickness burn wound healing / S. Atalay, A. Coruh, K. Deniz. – DOI: 10.1016/j.burns.2014.01.023. – Text : electronic // *Burns.* – 2014. – Vol. 40, N 7. – P. 1375–1383. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24572074/> (date of access: 21.11.2022).

110. Ayala-Cuellar, A. P. Roles of mesenchymal stem cells in tissue regeneration and immunomodulation / A. P. Ayala-Cuellar, J. H. Kang, E. B. Jeung. – DOI: 10.4062/biomolther.2017.260. – Text : electronic // *Biomol. Ther.* (Seoul). – 2019. – Vol. 27, N 1. – P. 25–33. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29902862/> (date of access: 21.11.2022).

111. Barakat, A. H. Stem cell therapy in discogenic back pain / A. H. Barakat, V. A. Elwel, K. S. Lam. – DOI: 10.21037/jss.2019.09.22. – Text : electronic // *J. Spine Surg.* – 2019. – Vol. 5, N 4. – P. 561–583. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32043007/> (date of access: 21.11.2022).

112. Bian, S. Y. Mesenchymal stem cells stimulated by growth factors release exosomes with potent proangiogenic activity / S. Y. Bian, H. B. Liu, H. W. Liu. – DOI: 10.7534/j.issn.1009-2137.2018.05.046. – Text : electronic // *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* – 2018. – Vol. 26, N 5. – P. 1538–1542. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30295280/> (date of access: 21.11.2022).

113. Bianchi, M. V. Dynamic adhesive environment alters the differentiation potential of young and ageing mesenchymal stem cells / M. V. Bianchi, F. Awaja, G. Altankov. – DOI: 10.1016/j.msec.2017.04.110. – Text : electronic // *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* – 2017. – Vol. 78. – P. 467–474. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28576010/> (date of access: 21.11.2022).

114. Biodistribution and efficacy of human adipose-derived mesenchymal stem cells following intranodal administration in experimental colitis / M. Lopez-Santalla, P. Mancheno-Corvo, A. Escolano [et al.]. – DOI: 10.3389/fimmu.2017.00638. – Text : electronic // *Front. Immunol.* – 2017. – Vol. 8. – P. 638. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28642759/> (date of access: 21.11.2022).

115. Biomedical cellular product for wound healing / A. P. Lykov, N. A. Bondarenko, O. V. Poveschenko [et al.]. – DOI: 10.15761/IOD.1000139. – Text : electronic // *Integ. Obesity Diabetes.* – 2016. – Vol. 2, N 1. – P. 176–179. – URL: <https://www.oatext.com/Biomedical-cellular-product-for-wound-healing.php> (date of access: 21.11.2022).

116. Bone marrow derived mesenchymal stem cells pretreated with erythropoietin accelerate the repair of acute kidney injury / S. Zhou, Y. M. Qiao, Y. G. Liu [et al.]. – DOI: 10.1186/s13578-020-00492-2. – Text : electronic // Cell Biosc. – 2020. – Vol. 10, N 1. – P. 130. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33292452/> (date of access: 21.11.2022).

117. Bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation ameliorates oxidative stress and restores intestinal mucosal permeability in chemically induced colitis in mice / T. Sun, G. Z. Gao, R. F. Li [et al.] // Am. J. Transl. Res. – 2015. – Vol. 7, N 5. – P. 891–901.

118. Bone marrow mononuclear cells activate angiogenesis via gap junction-mediated cell-cell interaction / A. Kikuchi-Taura, Y. Okinaka, Y. Takeuchi [et al.]. – DOI: 10.1161/STROKEAHA.119.028072. – Text : electronic // Stroke. – 2020. – Vol. 51, N 4. – P. 1279–1289. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32075549/> (date of access: 21.11.2022).

119. 116a. Bone mesenchymal stem cells pretreated with erythropoietin enhance the effect to ameliorate cyclosporine A-induced nephrotoxicity in rats / S. Zhou, Y. G. Liu, Y. Zhang [et al.]. – DOI: 10.1002/jcb.26833. – Text : electronic // J. Cell Biochem. – 2018. – Vol. 119, N 10. – P. 8220–8232. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29932236/> (date of access: 21.11.2022).

120. Brooke, G. Molecular trafficking mechanisms of multipotent mesenchymal stem cells derived from human bone marrow and placenta / G. Brooke, H. Tong, J. P. Levesque. – DOI: 10.1089/scd.2007.0156. – Text : electronic // Stem Cells Dev. – 2008. – Vol. 17, N 5. – P. 929–940. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18564033/> (date of access: 23.11.2022).

121. Borow, K. M. Phase 3 DREAM-HF trial of mesenchymal precursor cells in chronic heart failure / K. M. Borow, A. Yaroshinsky, B. Greenberg. – DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.119.314951. – Text : electronic // Circ. Res. – 2019. – Vol. 125, N 3. – P. 265–281. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31318648/> (date of access: 23.11.2022).

122. Calloni, R. Reviewing and updating the major molecular markers for stem cells / R. Calloni, E. A. Cordero, J. A. Henriques. – DOI: 10.1089/scd.2012.0637. – Text : electronic // *Stem Cells Dev.* – 2013. – Vol. 22, N 9. – P. 1455–1476. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23336433/> (date of access: 23.11.2022).

123. Case report: directional infusion of peripheral blood stem cells into the necrotic zone in femoral heads through the medial circumflex femoral artery: a tracing study / Q. Mao, W. Shao, S. Lv [et al.]. – DOI: 10.3389/fmed.2022.945268. – Text : electronic // *Front. Med. (Lausanne)*. – 2022. – Vol. 9. – P. 945268. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36059815/> (date of access: 23.11.2022).

124. CD13 promotes mesenchymal stem cell-mediated regeneration of ischemic muscle / M. M. Rahman, J. Subramani, M. Ghosh [et al.]. – DOI: 10.3389/fphys.2013.00402. – Text : electronic // *Front. Physiol.* – 2013. – Vol. 4. – P. 402. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24409152/> (date of access: 23.11.2022).

125. Cell origin of human mesenchymal stem cells determines a different healing performance in cardiac regeneration / R. Gaebel, D. Furlani, H. Sorg [et al.]. – DOI: 10.1371/journal.pone.0015652. – Text : electronic // *PLoS ONE*. – 2011. – Vol. 6, N 2. – P. e15652. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21347366/> (date of access: 23.11.2022).

126. Cell therapy for treatment of intervertebral disc degeneration: a systematic review / H. J. Meisel, N. Agarwal, P. C. Hsieh [et al.]. – DOI: 10.1177/2192568219829024. – Text : electronic // *Global Spine J.* – 2019. – Vol. 9, Suppl. 1. – P. 39S–52S. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31157145/> (date of access: 23.11.2022).

127. Cell therapy for type 1 diabetes / C. Loretelli, E. Assi, A. J. Seelam [et al.]. – DOI: 10.1080/14712598.2020.1748596. – Text : electronic // *Expert Opin. Biol. Ther.* – 2020. – Vol. 20, N 8. – P. 887–897. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32299257/> (date of access: 23.11.2022).

128. Challenges and controversies in human mesenchymal stem cell therapy / B. Lukomska, L. Stanaszek, E. Zuba-Surma [et al.]. – DOI: 10.1155/2019/9628536. –

Text : electronic // Stem Cells Int. – 2019. – Vol. 2019. – N 9628536. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31093291/> (date of access: 23.11.2022).

129. Chang, Y. W. Autologous and not allogeneic adipose-derived stem cells improve acute burn wound healing / Y. W. Chang, Y. C. Wu, S. H. Huang. – DOI: /10.1371/journal.pone.0197744. – Text : electronic // PLoS ONE. – 2018. – Vol. 13, N 5. – P. e0197744. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29787581/> (date of access: 23.11.2022).

130. Changes in phenotype and differentiation potential of human mesenchymal stem cells aging in vitro / Y. K. Yang, C. R. Ogando, C. W. See [et al.]. – DOI: 10.1186/s13287-018-0876-3. – Text : electronic // Stem Cell Res. Ther. – 2018. – Vol. 9, N 1. – P. 113. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29751774/> (date of access: 23.11.2022).

131. Characterization and classification of mesenchymal stem cells in several species using surface markers for cell therapy purpose / H. Ghanejalvar, L. Soltani, H. Reza Rahmani [et al.]. – DOI: 10.1007/s12291-017-0641-x. – Text : electronic // Indian J. Clin. Biochem. – 2018. – Vol. 33, N 1. – P. 6–52. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29371769/> (date of access: 23.11.2022).

132. Characterization and differentiation potential of mesenchymal stem cells isolated from multiple canine adipose tissue sources / U. Rashid, A. Yousaf, M. Yaqoob [et al.]. – DOI: 10.1186/s12917-021-03100-8. – Text : electronic // BMC Vet Res. – 2021. – Vol. 17, N 1. – P. 388. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34922529/> (date of access: 23.11.2022).

133. Characterizing the impact of 2D and 3D culture conditions on the therapeutic effects of human mesenchymal stem cell secretome on corneal wound healing in vitro and ex vivo / K. Carter, H. J. Lee, K. S. Na [et al.]. – DOI: 10.1016/j.actbio.2019.09.022. – Text : electronic // Acta Biomater. – 2019. – Vol. 99. – P. 247–257. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31539656/> (date of access: 23.11.2022).

134. Chen, L. The effect of recombinant human erythropoietin on the migration of bone marrow derived mesenchymal stem cells in vitro / L. Chen, F. J. Cheng, J. M. Tang // *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*. – 2008. – Vol. 29, N 12. – P. 811–814.

135. Cholesterol retards senescence in bone marrow mesenchymal stem cells by modulating autophagy and ROS/p53/p21<sup>Cip1/Waf1</sup> pathway / M. Zhang, Y. Du, R. Lu [et al.]. – DOI: 10.1155/2016/7524308. – Text : electronic // *Oxid. Med. Cell Longev*. – 2016. – VOL. 206, N 7524308. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27703600/> (date of access: 23.11.2022).

136. Chondrogenic differentiation of synovial fluid mesenchymal stem cells on human meniscus-derived decellularized matrix requires exogenous growth factors / Y. Liang, E. Idrees, A. R. A. Szojka [et al.]. – DOI: 10.1016/j.actbio.2018.09.038. – Text : electronic // *Acta Biomater*. – 2018. – Vol. 80. – P. 131–134. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30267878/> (date of access: 23.11.2022).

137. Cicek, G. Mesenchymal stem cell signaling pathway and interaction factors / G. Cicek, S. Duman, T. M. Aktan. – DOI: 10.26650/experimed.2019.19022. – Text : electronic // *Experimed*. – 2019. – Vol. 9, N 3. – P. 120–129. – URL: <https://www.researchgate.net/publication/338446234> (date of access: 23.11.2022).

138. Combining erythropoietin infusion with intramyocardial delivery of bone marrow cells is more effective for cardiac repair / D. Zhang, F. Zhang, Y. Zhang [et al.]. – DOI: 10.1111/j.1432-2277.2006.00407.x. – Text : electronic // *Transpl. Int*. – 2007. – Vol. 20, N 2. – P. 174–183. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17239026/> (date of access: 23.11.2022).

139. Compare CPM-RMI Trial: intramyocardial transplantation of autologous bone marrow-derived CD133+ cells and MNCs during CABG in patients with recent MI: a phase II/III, multicenter, placebo-controlled, randomized, double-blind clinical trial / M. H. Naseri, H. Madani, S. H. Ahmadi Tafti [et al.]. – DOI: 10.22074/cellj.2018.5197. – Text : electronic // *Cell J*. – 2018. – Vol. 20, N 2. – P. 267–277. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29633605/> (date of access: 23.11.2022).

140. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood as sources of cell therapy / H. J. Jin, Y. K. Bae, M. Kim [et al.]. – DOI: 10.1080/21645515.2015.1030549. – Text : electronic // *Int. J. Mol. Sci.* – 2013. – Vol. 14, N 9. – P. 7986–8001. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24005862/> (date of access: 23.11.2022).

141. Comparative characterization of SHED and DPSCs during extended cultivation in vitro / H. Wang, Q. Zhong, T. Yang [et al.]. – DOI: 10.3892/mmr.2018.8725. – Text : electronic // *Mol. Med. Rep.* – 2018. – Vol. 17, N 5. – P. 6551–6559. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29532869/> (date of access: 23.11.2022).

142. Compared to intermittent claudication critical limb ischemia is associated with elevated levels of cytokines / J. Jalkanen, M. Maksimow, M. Hollmen [et al.]. – DOI: 10.1371/journal.pone.0162353. – Text : electronic // *PLoS ONE.* – 2016. – Vol. 11, N 9, – P. e0162353. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27611073/> (date of access: 23.11.2022).

143. Comparison of biological properties of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells from early and late passages: immunomodulatory ability is enhanced in aged cells / Y. Zhuang, D. Li, J. Fu [et al.]. – DOI: 10.3892/mmr.2014.2755. – Text : electronic // *Mol. Med. Rep.* – 2015. – Vol. 11, N 1. – P. 166–174. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25339265/> (date of access: 23.11.2022).

144. Comparison of chemokine and receptor gene expression between Wharton's jelly and bone marrow-derived mesenchymal stromal cells / S. Balasubramanian, P. Venugopal, S. Sundarraj [et al.]. – DOI: 10.3109/14653249.2011.605119. – Text : electronic // *Cytherapy.* – 2012. – Vol. 14, N 1. – P. 26–33. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22091833/> (date of access: 23.11.2022).

145. Comparison of properties of stem cells isolated from adipose tissue and lipomas in dogs / T. Teshima, A. Matsuoka, M. Shiba [et al.]. – DOI: 10.1155/2019/1609876. – Text : electronic // *Stem Cells Int.* – 2019. – 2019. –

N 1609876. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31827523/> (date of access: 23.11.2022).

146. /143. Comparison of surface markers between human and rabbit mesenchymal stem cells / T. C. Lee, T. H. Lee, Y. H. Huang [et al.]. – DOI: 10.1371/journal.pone.0111390. – Text : electronic // PLoS ONE. – 2014. – Vol. 9, N 11. – P. e111389. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25380245/> (date of access: 23.11.2022).

147. Comparison of the characteristics of breast milk-derived stem cells with the stem cells derived from the other sources: a comparative review / E. Rahmani-Moghadam, V. Zarrin, A. Mahmoodzadeh [et al.]. – DOI: 10.2174/1574888X16666210622125309. – Text : electronic // Curr. Stem Cell Res. Ther. – 2022. – Vol. 17, N 1. – P. 71–90. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34161214/> (date of access: 23.11.2022).

148. Comparison of the paracrine activity of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord, amniotic membrane and adipose tissue / F. A. Dabrowski, A. Burdzinska, A. Kulesza [et al.]. – DOI: 10.1111/jog.13432. – Text : electronic // J. Obstet. Gynaecol. Res. – 2017. – Vol. 43, N 11. – P. 1758–1768. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28707770/> (date of access: 23.11.2022).

149. Comprehensive analysis of skeletal muscle- and bone-derived mesenchymal stem/stromal cells in patients with osteoarthritis and femoral neck fracture / K. Camernik, A. Mihelic, R. Mihalic [et al.]. – DOI: 10.1186/s13287-020-01657-z. – Text : electronic // Stem Cell Res. Ther. – 2020. – Vol. 11, N 1. – P. 146. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32245507/> (date of access: 23.11.2022).

150. Conditioned medium from induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells accelerates cutaneous wound healing through enhanced angiogenesis / X. Liang, F. Lin, Y. Ding [et al.]. – DOI: 10.1186/s13287-021-02366-x. – Text : electronic // Stem Cell Re. Ther. – 2021. – Vol. 12, N 1. – P. 295. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34016178/> (date of access: 23.11.2022).

151. Cost-effective, safe, and personalized cell therapy for critical ischemia in type 2 diabetes mellitus / B. Soria-Juan, N. Escacena, V. Capilla-Gonzalez [et al.]. –

DOI: 10.3389/fimmu.2019.01151. – Text : electronic // *Front. Immunol.* – 2019. – Vol. 10. – P. 1151. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31231366/> (date of access: 23.11.2022).

152. Cultivation and identification of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells / K. Song, M. Huang, Q. Shi [et al.]. – DOI: 10.3892/mmr.2014.2264. – Text : electronic // *Mol. Med. Rep.* – 2014. – Vol. 10, N 2. – P. 755–760. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24859847/> (date of access: 23.11.2022).

153. Dayan, V. Human mesenchymal stromal cells improve scar thickness without enhancing cardiac function in a chronic ischaemic heart failure model / V. Dayan, G. Yannarelli, P. Filomeno. – DOI: 10.1093/icvts/ivs048. – Text : electronic // *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.* – 2012. – Vol. 14. – P. 516–520. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22361124/> (date of access: 23.11.2022).

154. De Araujo Farias, V. TGF- $\beta$  and mesenchymal stromal cells in regenerative medicine, autoimmunity and cancer / V. de Araujo Farias, A. B. Carrillo-Galvez, F. Martin. – DOI: 10.1016/j.cytogfr.2018.06.002. – Text : electronic // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2018. – Vol. 43. – P. 25–37. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29954665/> (date of access: 23.11.2022).

155. De Mayo, T. The role of bone marrow mesenchymal stromal cell derivatives in skin wound healing in diabetic mice / T. De Mayo, P. Conget, S. Becerra-Bayona. – DOI: 10.1371/journal.pone.0177533. – Text : electronic // *PLoS ONE.* – 2017. – Vol. 12, N 6. – P. e0177533. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28594903/> (date of access: 23.11.2022).

156. Deformability of human mesenchymal stem cells is dependent on vimentin intermediate filaments / P. Sharma, Z. T. Bolten, D. R. Wagner [et al.]. – DOI: 10.1007/s10439-016-1787-z. – Text : electronic // *Ann. Biomed. Eng.* – 2017. – Vol. 45, N 4. – P. 1365–1374. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28091965/> (date of access: 23.11.2022).

157. Demidova-Rice, T. N. Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 2: role of growth factors in normal and pathological wound healing: therapeutic potential and methods of delivery /

T. N. Demidova-Rice, M. R. Hamblin, I. M. Herman. –  
 DOI: 10.1097/01.ASW.0000418541.31366.a3. – Text : electronic // Adv. Skin Wound  
 Care. – 2012. – Vol. 25. – P. 349–370. –  
 URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22820962/> (date of access: 23.11.2022).

158. Demographic and epidemiologic drivers of global cardiovascular mortality / G. A. Roth, M.H. Forouzanfar, A. E. Moran [et al.]. – DOI: 10.1056/NEJMoa1406656. – Text : electronic // N. Engl. J. Med. – 2015. – Vol. 372, N 14. – P. 1333–1341. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25830423/> (date of access: 23.11.2022).

159. Dermal mesenchymal stem cells from psoriatic lesions stimulate HaCaT cell proliferation, differentiation, and migration via activating the PI3K/AKT signaling pathway / N. Liang, W. Chang, A. Pen [et al.]. – DOI: 10.1159/000515767. – Text : electronic // Dermatology. – 2022. – Vol. 238, N 2. – P. 283–291. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34175855/> (date of access: 23.11.2022).

160. Dermal mesenchymal stem cells promoted adhesion and migration of endothelial cells by integrin in psoriasis / Q. Han, X. Niu, R. Hou [et al.]. – DOI: 10.1002/cbin.11492. – Text : electronic // Cell Biol. Int. – 2021. – Vol. 45, N 2. – P. 358–367. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33079476/> (date of access: 23.11.2022).

161. Differentiation potential of early- and late-passage adipose-derived mesenchymal stem cells cultured under hypoxia and normoxia / A. G. Zhao, K. Shah, J. Freitag [et al.]. – DOI: 10.1155/2020/8898221. – Text : electronic // Stem Cells Int. – 2020. – 20220. – N 889221. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33014073/> (date of access: 23.11.2022).

162. Direct implantations of erythropoietin and autologous EPCs in critical limb ischemia (CLI) area restored CLI area blood flow and rescued remote AMI-induced LV dysfunction / F. Y. Lee, C. W. Luo, C. G. Wallace [et al.]. – DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109296. – Text : electronic // Biomed. Pharmacother. – 2019. – Vol. 188. – P. 109296. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31545254/> (date of access: 23.11.2022).

163. Distinct immunoregulatory mechanisms in mesenchymal stem cells: role of the cytokine environment / V. Holan, B. Hermankova, P. Bohacova [et al.]. – DOI: 10.1007/s12015-016-9688-y. – Text : electronic // Stem Cell Rev. Rep. – 2016. – Vol. 12, N 6. – P. 654–663. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27665290/> (date of access: 23.11.2022).

164. Doyle, E. C. Intraarticular injection of bone marrow–derived mesenchymal stem cells enhances regeneration in knee osteoarthritis / E. C. Doyle, N. M. Wragg, S. L. Wilson. – DOI: 10.1007/s00167-020-05859-z. – Text : electronic // Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc. – 2020. – Vol. 28, N 12. – P. 3827–3842. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32006075/> (date of access: 23.11.2022).

165. Dual isotope simultaneous imaging to evaluate the effects of intracoronary bone marrow-derived mesenchymal stem cells on perfusion and metabolism in canines with acute myocardial infarction / L. Hao, J. Hao, W. Fang [et al.]. – DOI: 10.3892/br.2015.474. – Text : electronic // Biomed. Rep. – 2015. – Vol. 3, N 4. – P. 447–452. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26171146/> (date of access: 23.11.2022).

166. Efficacy and long-term longitudinal follow-up of bone marrow mesenchymal cell transplantation therapy in a diabetic patient with recurrent lower limb bullosis diabeticorum / Y. Chen, Y. Ma, N. Li [et al.]. – DOI: 10.1186/s13287-018-0854-9. – Text : electronic // Stem Cell Res. Ther. – 2018. – Vol. 9, N 1. – P. 99. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29631615/> (date of access: 10.01.2023).

167. Efficacy of intravenous mesenchymal stem cells for motor recovery after ischemic stroke: a neuroimaging study / J. Lee, W. H. Chang, J. W. Chung [et al.]. – DOI: 10.1161/STROKEAHA.121.034505. – Text : electronic // Stroke. – 2022. – Vol. 53, N 1. – P. 20–28. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34583525/> (date of access: 10.01.2023).

168. Effect of erythropoietin on Fas/FasL expression in brain tissues of neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage / R. Huang, J. Zhang, C. Ren [et al.]. – DOI: 10.1097/WNR.0000000000001194. – Text : electronic // Neuroreport. – 2019. –

Vol. 30, N 4. – P. 262–268. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30672890/> (date of access: 10.01.2023).

169. Effect of high glucose on migration of BMSCs through inhibiting CXCR-4 / B. Zhang, N. Liu, B. Gu [et al.] // *Shanghai Kou Qiang Yi Xue*. – 2014. – Vol. 23, N 6. – P. 646–650.

170. Effect of human follicle-stimulating hormone on immunomodulatory function of decidual mesenchymal stem cells by reducing interleukin-6 levels / Y. B. He, L. Zhang, L. L. Zhou [et al.]. – DOI: 10.1186/s13048-022-00993-3. – Text : electronic // *J. Ovarian Res.* – 2022. – Vol. 15, N 1. – P. 60. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35562770/> (date of access: 10.01.2023).

171. Effect of intercellular adhesion molecule-1 on adherence between mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells / J. Guo, J. Xia, H. W. Zhang [et al.]. – DOI: 10.7534/j.issn.1009-2137.2016.01.039. – Text : electronic // *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. – 2016. – Vol. 24, N 1. – P. 211–216. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26913422/> (date of access: 10.01.2023).

172. Effect of intercellular adhesion molecule-1 on the migration in vitro of murine mesenchymal stem cells and its related mechanism / Y. G. Wang, Y. Zhao, X. M. Li [et al.]. – DOI: 10.7534/j.issn.1009-2137.2014.02.039. – Text : electronic // *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. – 2014. – Vol. 22, N 2. – P. 479–84. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24763027/> (date of access: 10.01.2023).

173. Effects of leukaemia inhibitory factor receptor on the early stage of osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal cells / T. Wang, R. Q. Yan, X. Y. Xu [et al.] // *Folia Biol. (Praha)*. – 2018. – Vol. 64, N 5–6. – P. 186–194.

174. Effects of leukemia inhibitory factor receptor on the adipogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells / T. Wang, R. Yan, X. Xu [et al.]. – DOI: 10.3892/mmr.2019.10140. – Text : electronic // *Mol. Med. Rep.* – 2019. – Vol. 19, N 6. – P. 4719–4726. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31059010/> (date of access: 10.01.2023).

175. Effect of SDF-1/CXCR4 axis on the migration of transplanted bone mesenchymal stem cells mobilized by erythropoietin toward lesion sites following spinal cord injury / J. Li, W. Guo, M. Xiong [et al.]. – DOI: 10.3892/ijmm.2015.2344. – Text : electronic // Int. J. Mol. Med. – 2015. – Vol. 36, N 5. – P. 1205–1214. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26398409/> (date of access: 10.01.2023).

176. Effects of different concentrations of glucose on the osteogenic differentiation of orofacial bone mesenchymal stem cells / Y. Chen, Y. Hu, L. Yang [et al.] // Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. – 2016. – Vol. 47, N 5. – P. 679–584.

177. Effects of mesenchymal stem cell derivatives on hematopoiesis and hematopoietic stem cells / S. Agmasheh, K. Shamsasanjan, P. Akbarzadehlaleh [et al.]. – DOI: 10.15171/apb.2017.021. – Text : electronic // Adv. Pharm. Bull. – 2017. – Vol. 7, N 2. – P. 165–177. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28761818/> (date of access: 10.01.2023).

178. Effects of oxygen and glucose on bone marrow mesenchymal stem cell culture / F. Lau, B. Dalisson, Y. L. Zhang [et al.]. – DOI: 10.1002/adbi.202000094. – Text : electronic // Adv. Biosyst. – 2020. – Vol. 4, N 11. – P. e202000094. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33124179/> (date of access: 10.01.2023).

179. Effects of passage number and differentiation protocol on the generation of dopaminergic neurons from rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells / G. Shall, M. Menosky, S. Decker [et al.]. – DOI: 10.3390/ijms19030720. – Text : electronic // Int. J. Mol. Sci. – 2018. – Vol. 19, N 3. – P. 720. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29498713/> (date of access: 10.01.2023).

180. Eleuteri, S. Insights into the secretome of mesenchymal stem cells and its potential applications / S. Eleuteri, A. Fierabracci. – DOI: 10.3390/ijms20184597. – Text : electronic // Int. J. Mol. Sci. – 2019. – Vol. 20, N 18. – P. 4597. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31533317/> (date of access: 10.01.2023).

181. El Sadik, A. O. The effect of mesenchymal stem cells and chitosan gel on full thickness skin wound healing in albino rats: histological, immunohistochemical and fluorescent study / A. O. El Sadik, T. A. El Ghamrawy, T. I. Abd El-Galil. – DOI: 10.1371/journal.pone.0137544. – Text : electronic // PLoS ONE. – 2015. – Vol. 10,

N 9. – P. e0137544. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26402454/> (date of access: 10.01.2023).

182. Emerging trends in mesenchymal stem cells applications for cardiac regenerative therapy: current status and advances / A. Sharma, S. Gupta, S. Archana [et al.]. – DOI: 10.1007/s12015-021-10314-8. – Text : electronic // Stem Cell Rev. Rep. – 2022. – Vol. 18, N 5. – P. 1546–1602. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35122226/> (date of access: 10.01.2023).

183. Endo, K. Comparison of the effect of growth factors on chondrogenesis of canine mesenchymal stem cells / K. Endo, N. Fujita, T. Nakagawa. – DOI: 10.1292/jvms.18-0551. – Text : electronic // J. Vet. Med. Sci. – 2019. – Vol. 81, N 8. – P. 1211–1218. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31167981/> (date of access: 10.01.2023).

184. Endoscopic submucosal injection of adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorates TNBS-induced colitis in rats and prevents stenosis / E. Martin Arranz, M. D. Martin Arranz, T. Robredo [et al.]. – DOI: 10.1186/s13287-018-0837-x. – Text : electronic // Stem Cell Res. Ther. – 2018. – Vol. 9, N 11. – P. 95. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29631607/> (date of access: 10.01.2023).

185. Enhanced immunosuppressive properties of human mesenchymal stem cells primed by interferon- $\gamma$  / D. S. Kim, I. K. Jang, M. W. Lee [et al.]. – DOI: 10.1016/j.ebiom.2018.01.002. – Text : electronic // EBioMedicine. – 2018. – Vol. 28. – P. 261–273. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29366627/> (date of access: 10.01.2023).

186. Enhancing the ability of autophagy and proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells by interleukin-8 through Akt-STAT3 pathway in hypoxic environment / L. Shen, S. Zhang, X. Zhang [et al.]. – DOI: 10.13345/j.cjb.160035. – Text : electronic // Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao. – 2016. – Vol. 32, N 10. – P. 1422–1432. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29027451/> (date of access: 10.01.2023).

187. Enrichment of CD146<sup>+</sup> adipose-derived stem cells in combination with articular cartilage extracellular matrix scaffold promotes cartilage regeneration / X. Li,

W. Guo, K. Zha [et al.]. – DOI: 10.7150/thno.33904. – Text : electronic // *Theranostics*. – 2019. – Vol. 9, N 17. – P. 5105–5121. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31410204/> (date of access: 10.01.2023).

188. Enrichment of vascular endothelial growth factor secreting mesenchymal stromal cells enhances therapeutic angiogenesis in a mouse model of hind limb ischemia / J. S. Park, S. H. Bae, S. Jung [et al.]. – DOI: 10.1016/j.jcyt.2018.12.007. – Text : electronic // *Cytotherapy*. – 2019. – Vol. 21, N 4. – P. 433–443. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30879964/> (date of access: 10.01.2023).

189. EPO protects mesenchymal stem cells from hyperglycaemic injury via activation of the Akt/FOXO3a pathway / J. Cui, X. Liu, Z. Zhang [et al.]. – DOI: 10.1016/j.lfs.2018.12.045. – Text : electronic // *Life Sci*. – 2019. – Vol. 222. – P. 158–167. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30597174/> (date of access: 10.01.2023).

190. Equine metabolic syndrome impairs adipose stem cells osteogenic differentiation by predominance of autophagy over selective mitophagy / K. Marycz, K. Kornicka, M. Maredziak [et al.]. – DOI: 10.1111/jcmm.12932. – Text : electronic // *J. Cell. Mol. Med*. – 2016. – Vol. 20, N 12. – P. 2384–2404. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27629697/> (date of access: 10.01.2023).

191. Erythropoietin, a hypoxia-regulated factor, elicits a pro-angiogenic program in human mesenchymal stem cells / K. J. Zvezdaryk, S. B. Coffelt, Y. G. Figueroa [et al.]. – DOI: 10.1016/j.exphem.2007.01.044. – Text : electronic // *Exp. Hematol*. – 2007. – Vol. 35, N 7. – P. 1153–1161. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17379074/> (date of access: 10.01.2023).

192. Erythropoietin and its angiogenic activity / P. Kimakova, P. Solar, Z. Solarova [et al.]. – DOI: 10.3390/ijms18071519. – Text : electronic // *Int. J. Mol. Sci*. – 2017. – Vol. 18, N 7. – P. 1519. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28703764/> (date of access: 10.01.2023).

193. Erythropoietin-activated mesenchymal stem cells promote healing ulcers by improving microenvironment / H. Lu, X. Wu, Z. Wang [et al.]. – DOI: 10.1016/j.jss.2016.06.086. – Text : electronic // *J. Surg. Res*. – 2016. – Vol. 205,

N 2. – P. 464–473. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27664897/> (date of access: 10.01.2023).

194. Erythropoietin as candidate for supportive treatment of severe COVID-19 / H. Ehrenreich, K. Weissenborn, M. Begemann [et al.]. – DOI: 1186/s10020-020-00186-y. – Text : electronic // Mol. Med. – 2020. – Vol. 26, N 1. – P. 58. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32546125/> (date of access: 10.01.2023)

195. Erythropoietin ameliorates ischemia/reperfusion–induced acute kidney injury via inflammasome suppression in mice / J. Kwak, J. H. Kim, H. N. Jang [et al.]. – DOI: 10.3390/ijms21103453. – Text : electronic // Int. J. Mol. Sci. – 2020. – Vol. 21, N 10. – P. 3453. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32414157/> (date of access: 10.01.2023).

196. Erythropoietin attenuates motor neuron programmed cell death in a burn animal model / S. H. Wu, I. C. Lu, S. S. Lee [et al.]. – DOI: 10.1371/journal.pone.0190039. – Text : electronic // PLoS ONE. – 2018. – Vol. 13, N 1. – P. e0190039. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29385149/> (date of access: 10.01.2023).

197. Erythropoietin attenuates high glucose–induced oxidative stress and inhibition of osteogenic differentiation in periodontal ligament stem cell (PDLSCs) / D. H. Zheng, Z. Q. Han, X. X. Wang [et al.]. – DOI: 10.1016/j.cbi.2019.03.007. – Text : electronic // Chem. Biol. Interact. – 2019. – Vol. 305. – P. 40–47. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30894315/> (date of access: 10.01.2023).

198. Erythropoietin attenuates vascular calcification by inhibiting endoplasmic reticulum stress in rats with chronic kidney disease / J. R. Chang, N. Sun, Y. Liu [et al.]. – DOI: 10.1016/j.peptides.2019.170181. – Text : electronic // Peptides. – 2020. – Vol. 123. – P. 170181. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31689455/> (date of access: 10.01.2023).

199. Erythropoietin enhances endogenous haem oxygenase-1 and represses immune responses to ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis / S. J. Chen, Y. L. Wang, W. T. Lo [et al.]. – DOI: 10.1111/j.1365–2249.2010.04238.x. –

Text : electronic // Clin. Exp. Immunol. – 2010. – Vol. 162, N 2. – P. 210–223. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21069936/> (date of access: 10.01.2023).

200. Erythropoietin-enhanced endothelial progenitor cell recruitment in peripheral blood and renal vessels during experimental acute kidney injury in rats / F. Cakiroglu, S. M. Enders-Comberg, H. Pagel [et al.]. – DOI: 10.1002/cbin.10566. – Text : electronic // Cell Biol. Int. – 2016. – Vol. 40, N 3. – P. 298–307. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26616141/> (date of access: 10.01.2023).

201. Erythropoietin enhances osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells via Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway / D. H. Zheng, X. X. Wang, D. Ma [et al.]. – DOI: 10.2147/DDDT.S212116. – Text : electronic // Drug Des. Devel. Ther. – 2019. – Vol. 13. – P. 2543–2552. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31440036/> (date of access: 10.01.2023).

202. Erythropoietin facilitates the recruitment of bone marrow mesenchymal stem cells to sites of spinal cord injury / J. Li, W. Guo, M. Xiong [et al.]. – DOI: 10.3892/etm.2017.4182. – DOI: 10.3892/etm.2017.4182. – Text : electronic // Exp. Ther. Med. – 2017. – Vol. 13, N 5. – P. 1806–1812. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28565771/> (date of access: 10.01.2023).

203. Erythropoietin helix B surface peptide modulates miR-21/Atg12 axis to alleviate cardiomyocyte hypoxia-reoxygenation injury / S. Huang, Y. Lin, Z. Liang [et al.] // Am. J. Transl. Res. – 2019. – Vol. 11, N 4. – P. 2422–2430.

204. Erythropoietin improves cardiovascular function in adult rats after acute hemorrhage / M. B. Puchulu, N. Arreche, E. Zotta [et al.]. – DOI: 10.1097/FJC.0000000000000666. – Text : electronic // J. Cardiovasc. Pharmacol. – 2019. – Vol. 73, N 5. – P. 290–300. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31082960/> (date of access: 10.01.2023).

205. Erythropoietin improves long-term neurological outcome in acute ischemic stroke patients: a randomized, prospective, placebo-controlled clinical trial / T. H. Tsai, C. H. Lu, C. G. Wallace [et al.]. – DOI: 10.1186/s13054-015-0761-8. – Text : electronic // Crit. Care. – 2015. – Vol. 19, N 1. – P. 49. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25888250/> (date of access: 10.01.2023).

206. Erythropoietin-induced autophagy protects against spinal cord injury and improves neurological function via the extracellular-regulated protein kinase signaling pathway / L. Zhong, H. Zhang, Z. F. Ding [et al.]. – DOI: 10.1007/s12035-020-01997-0. – Text : electronic // Mol. Neurobiol. – 2020. – Vol. 57, N 10. – P. 3993–4006. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32647973/> (date of access: 10.01.2023).

207. Erythropoietin induces production of hepatocyte growth factor from bone marrow mesenchymal stem cells in vitro / K. Tari, A. Atashi, S. Kaviani [et al.]. – DOI: 10.1016/j.biologicals.2016.10.010. – Text : electronic // Biologicals. – 2017. – Vol. 45. – P. 15–19. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27865586/> (date of access: 10.01.2023).

208. Erythropoietin induces the osteogenesis of periodontal mesenchymal stem cells from healthy and periodontitis sources via activation of the p38 MAPK pathway / L. Wang, F. Wu, Y. Song [et al.]. – DOI: 10.3892/ijmm.2017.3294. – Text : electronic // Int. J. Mol. Med. – 2018. – Vol. 41, N 2. – P. 829–835. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29207066/> (date of access: 10.01.2023).

209. Erythropoietin-modified mesenchymal stem cells enhance anti-fibrosis efficacy in mouse liver fibrosis model / X. Wang, H. Wang, J. Lu [et al.]. – DOI: 10.1007/s13770-020-00276-2. – Text : electronic // Tiss. Engine. Regen. Med. – 2020. – Vol. 17, N 5. – P. 683–693. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32621283/> (date of access: 10.01.2023).

210. Erythropoietin modulates autophagy signaling in the developing rat brain in an in vivo model of oxygen-toxicity / I. Bendix, C. Schulze, C. von Haefen [et al.]. – DOI: 10.3390/ijms131012939. – Text : electronic // Int. J. Mol. Sci. – 2012. – Vol. 13, N 10. – P. 12939–12951. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23202931/> (date of access: 10.01.2023).

211. Erythropoietin priming improves the vasculogenic potential of G-CSF mobilized human peripheral blood mononuclear cells / J. Kang, J. Y. Yun, J. Hur [et al.]. – DOI: 10.1093/cvr/cvu180. – Text : electronic // Cardiovasc. Res. – 2014. – Vol. 104, N 1. – P. 171–182. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25082847/> (date of access: 10.01.2023).

212. Erythropoietin promotes proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells in vitro / Q. B. Zeng, F. J. Cheng, W. G. Zhang [et al.] // *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. – 2008. – Vol. 16, N 6. – P. 1392–1397.

213. Erythropoietin promotes expression of survivin via STAT3 activation and reduces sensitivity to cisplatin in cervical cancer cells / M. J. Vazquez-Mellado, L. G. Cortes-Ballinas, I. C. Blanco-Flores [et al.]. – DOI: 10.3892/or.2018.6890. – Text : electronic // *Oncol. Rep.* – 2019. – Vol. 41, N 2. – P. 1333–1341. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30483799/> (date of access: 10.01.2023).

214. Erythropoietin protects neurons from apoptosis via activating PI3K/AKT and inhibiting Erk1/2 signaling pathway / W. Si, J. Wang, M. Li [et al.]. – DOI: 10.1007/s13205-019-1667-y. – Text : electronic // *3 Biotech.* – 2019. – Vol. 9, N 4. – P. 131. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30863710/> (date of access: 10.01.2023).

215. Erythropoietin promotes network formation of transplanted adipose tissue–derived microvascular fragments / P. Karschnia, C. Scheuer, A. Hess [et al.]. – DOI: 10.22203/eCM.v035a19. – Text : electronic // *Eur. Cell Mater.* – 2018. – Vol. 45. – P. 268–280. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29761823/> (date of access: 10.01.2023).

216. Erythropoietin pretreatment of transplanted endothelial colony–forming cells enhances recovery in a cerebral ischemia model by increasing their homing ability: a SPECT/CT study / P. Garrigue, G. Hache, Y. Bennis [et al.]. – DOI: 10.2967/jnumed.115.170308. – Text : electronic // *J. Nucl. Med.* – 2016. – Vol. 57, N 11. – P. 1798–1804. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27609786/> (date of access: 10.01.2023).

217. Erythropoietin responsive cardiomyogenic cells contribute to heart repair post myocardial infarction / M. P. Zafiriou, C. Noack, B. Unsold [et al.]. – DOI: 10.1002/stem.1741. – Text : electronic // *Stem Cells.* – 2014. – Vol. 32, N 9. – P. 2480–2491. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24806289/> (date of access: 10.01.2023).

218. Erythropoietin signal protected human umbilical vein endothelial cells from high glucose-induced injury / H. Yasuda, Y. Iwata, S. Nakajima [et al.]. – DOI: 10.1111/nep.13518. – Text : electronic // *Nephrology (Carlton)*. – 2019. – Vol. 24, N 7. – P. 767–774. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30346085/> (date of access: 10.01.2023).

219. Erythropoietin signaling increases neurogenesis and oligodendrogenesis of endogenous neural stem cells followings spinal cord injury both in vivo and in vitro / H. Zhang, X. Fang, D. Huang [et al.]. – DOI: 10.3892/mmr.2017.7873. – Text : electronic // *Mol. Med. Rep.* – 2018. – Vol. 17, N 1. – P. 264–272. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29115443/> (date of access: 10.01.2023).

220. Erythropoietin stimulates endothelial progenitor cells to induce endothelialization in an aneurysm neck after coil embolization by modulating vascular endothelial growth factor / P. Liu, Y. Zhou, Q. An [et al.]. – DOI: 10.5966/sctm.2015-0264. – Text : electronic // *Stem Cells Transl. Med.* – 2016. – Vol. 5, N 9. – P. 1182–1189. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27352930/> (date of access: 10.01.2023).

221. Erythropoietin suppresses hepatic steatosis and obesity by inhibiting endoplasmic reticulum stress and upregulating fibroblast growth factor 21 / T. Hong, Z. Ge, B. Zhang [et al.]. – DOI: 10.3892/ijmm.2019.4210. – Text : electronic // *Int. J. Mol. Med.* – 2019. – Vol. 44, N 2. – P. 469–478. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31173165/> (date of access: 10.01.2023).

222. Evaluation of adipose-derived stromal vascular fraction from the lateral tailhead, inguinal region, and mesentery of horses / G. L. Metcalf, S. R. McClure, J. M. Hostetter [et al.] // *Can. J. Vet. Res.* – 2016. – Vol. 80, N 4. – P. 294–301.

223. Ex vivo evaluation of intravitreal mesenchymal stromal cell viability using bioluminescence imaging / C. A. P. Vilela, L. E. B. Souza, R. C. Siqueira [et al.]. – DOI: 10.1186/s13287-018-0909-y. – Text : electronic // *Stem Cell Res. Ther.* – 2018. – Vol. 9, N 1. – P. 155. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29895334/> (date of access: 10.01.2023).

224. Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells accelerates cutaneous wound healing via optimizing the characteristics of fibroblasts /

L. Hu, J. Wang, X. Zhou [et al.]. – DOI: 10.1038/srep32993. – Text : electronic // Sci. Rep. – 2016. – Vol. 6. – P. 32993. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27615560/> (date of access: 10.01.2023).

225. Exosomes from bone marrow mesenchymal stem cells enhance fracture healing through the promotion of osteogenesis and angiogenesis in a rat model of nonunion / L. Zhang, G. Jiao, S. Ren [et al.]. – DOI: 10.1186/s13287-020-1562-9. – Text : electronic // Stem Cell Res. Ther. – 2020. – Vol. 11, N 1. – P. 38. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31992369/> (date of access: 10.01.2023).

226. Exosomes secreted by human adipose mesenchymal stem cells promotes scarless cutaneous repair by regulating extracellular matrix remodelling / L. Wang, L. Hu, X. Zhou [et al.]. – DOI: 10.1038/s41598-017-12919-x. – Text : electronic // Sci. Rep. – 2017. – Vol. 7, N 1. – P. 13321. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29042658/> (date of access: 10.01.2023).

227. Expansion and angiogenic potential of mesenchymal stem cells from patients with critical limb ischemia / L. Brewster, S. Robinson, R. Wang [et al.]. – DOI: 10.1016/j.jvs.2015.02.061. – Text : electronic // J. Vasc. Surg. – 2017. – Vol. 65, N 3. – P. 826–838.e1. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26921003/> (date of access: 10.01.2023).

228. Experimental application of bone marrow mesenchymal stem cells for the repair of intervertebral disc annulus fibrosus / X. Li, Y. Zhang, B. Song [et al.]. – DOI: 10.12659/msm.898062. – Text : electronic // Med. Sci. Monit. – 2016. – Vol. 22. – P. 4426–4430. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27857031/> (date of access: 10.01.2023).

229. Experimental study on effects of adipose-derived stem cell-seeded silk fibroin chitosan film on wound healing of a diabetic rat model / Y. Y. Wu, Y. P. Jiao, L. L. Xiao [et al.]. – DOI: 10.1097/SAP.0000000000001355. – Text : electronic // Ann. Plast. Surg. – 2018. – Vol. 80, N 5. – P. 572–580. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29443833/> (date of access: 10.01.2023).

230. Extracellular matrix stiffness controls osteogenic stiffness of mesenchymal stem cells mediated by integrin  $\alpha 5$  / M. Sun, G. Chi, J. Xu [et al.]. –

DOI: 10.1186/s13287-018-0798-0. – Text : electronic // Stem Cell Res. Ther. – 2018. – Vol. 9, N 1. – P. 52. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29490668/> (date of access: 10.01.2023).

231. Ezquer, F. E. Two complementary strategies to improve cell engraftment in mesenchymal stem cell-based therapy: increasing transplanted cell resistance and increasing tissue receptivity / F. E. Ezquer, M. E. Ezquer, J. M. Vicencio. – DOI: 10.1080/19336918.2016.1197480. – Text : electronic // Cell Adh. Migr. – 2017. – Vol. 11, N 1. – P. 110–119. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27294313/> (date of access: 10.01.2023).

232. Fouad, H. Therapeutic efficacy of amniotic membrane stem cells and adipose tissue stem cells in rat with chemically induced ovarian failure / H. Fouad, D. Sabry, K. Elsetohy. – DOI: 10.1016/j.jare.2015.05.002. – Text : electronic // J. Adv. Res. – 2016. – Vol. 7, N 2. – P. 233–241. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26966564/> (date of access: 10.01.2023).

233. Frailty and postoperative outcomes in patients undergoing surgery for degenerative spine disease / A. M. Flexman, R. Charest-Morin, L. Stobart [et al.]. – DOI: 10.1016/j.spinee.2016.06.017. – Text : electronic // Spine J. – 2016. – Vol. 16, N 11. – P. 1315–1323. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27374110/> (date of access: 10.01.2023).

234. Functional beta-cells derived from umbilical cord blood mesenchymal stem cells for curing rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus / M. El-Sherbiny, M. A. Eladl, A. V. Ranade [et al.]. – DOI: 10.11622/smedj.2019120. – Text : electronic // Singapore Med. J. – 2020. – Vol. 61, N 1. – P. 39–45. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31535156/> (date of access: 24.01.2023).

235. Functional regulatory mechanisms underlying bone marrow mesenchymal stem cell senescence during cell passages / T. Iwata, N. Mizuno, S. Ishida [et al.]. – DOI: 10.1007/s12013-021-00969-y. – Text : electronic // Cell Biochem. Biophys. – 2021. – Vol. 78, N 2. – P. 321–336. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33559812/> (date of access: 24.01.2023).

236. Futrega, K. Spheroid coculture of hematopoietic stem/progenitor cells and monolayer expanded mesenchymal stem/stromal cells in polydimethylsiloxane microwells modestly improves in vitro hematopoietic stem/progenitor cell expansion / K. Futrega, K. Atkinson, W. B. Lott. – DOI: 10.1089/ten.tec.2016.0329. – Text : electronic // *Tissue Eng. Part C Methods*. – 2017. – Vol. 23, N 4. – P. 200–218. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28406754/> (date of access: 24.01.2023).

237. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin 4 induce the malignant transformation of the bone marrow-derived human adult mesenchymal stem cells / X. G. Zhou, Y. Yang, J. S. Yang [et al.] // *Chin. Med. J. (Engl)*. – 2011. – Vol. 124, N 5. – P. 729–733.

238. Gugjoo, M. B. Equine mesenchymal stem cells: properties, sources, characterization, and potential therapeutic application / M. B. Gugjoo, F. Amarpal, D. M. Makhdoom. – DOI: 10.1016/j.jevs.2018.10.007. – Text : electronic // *J. Equine Vet. Sci.* – 2019. – Vol. 72. – P. 16–27. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30929778/> (date of access: 24.01.2023).

239. Guo, Y. C. Interleukin-1 $\beta$  induces CXCR3-mediated chemotaxis to promote umbilical cord mesenchymal stem cell transendothelial migration / Y. C. Guo, Y. H. Chiu, C. P. Chen. – DOI: 10.1186/s13287-018-1032-9. – Text : electronic // *Stem Cell Res. Ther.* – 2018. – Vol. 9, N 1. – P. 281. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30359318/> (date of access: 24.01.2023).

240. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> damages the stemness of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells: developing a «stemness loss» model / X. Deng, D. Jing, H. Liang [et al.]. – DOI: 10.12659/MSM.914011. – Text : electronic // *Med. Sci. Monit.* – 2019. – Vol. 25. – P. 5613–5620. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31353362/> (date of access: 24.01.2023).

241. Haller, C. The role of regenerative therapy in the treatment of right ventricular failure: a literature review / C. Haller, M. K. Friedberg, M. A. Laflamme. – DOI: 10.1186/s13287-020-02022-w. – Text : electronic // *Stem Cell Res. Ther.* – 2020. – Vol. 11, N 1. – P. 502. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33239066/> (date of access: 24.01.2023).

242. Heat shock protein 90 stimulates rat mesenchymal stem cell migration via PI3K/Akt and ERK1/2 pathway / F. Gao, X. Hu, X. Xie [et al.]. – DOI: 10.1007/s12013-014-0228-6. – Text : electronic // Cell Biochem. Biophys. – 2015. – Vol. 71, N 1. – P. 481–489. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25287672/> (date of access: 24.01.2023).

243. Hedgehog signaling inhibition by smoothed antagonist BMS–833923 reduces osteoblast differentiation and ectopic bone marrow formation of human skeletal (mesenchymal) stem cells / N. Al Muraikhi, N. Almasoud, S. Binhamdan [et al.]. – DOI: 10.1155/2019/3435901. – Text : electronic // Stem Cell Int. – 2019. – VOL. 2019. – N 435901. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31871467/> (date of access: 24.01.2023).

244. High glucose microenvironments inhibit the proliferation and migration of bone mesenchymal stem cells by activating GSK3 $\beta$  / B. Zhang, N. Liu, H. Shi [et al.]. – DOI: 10.1007/s00774-015-0662-6. – Text : electronic // J. Bone Miner. Metab. – 2016. – Vol. 34, N 2. – P. 140–150. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25840567/> (date of access: 24.01.2023).

245. Hong, S. J. Intramyocardial transplantation of human adipose-derived stromal cell and endothelial progenitor cell mixture was not superior to individual cell type transplantation in improving left ventricular function in rats with myocardial infarction / S. J. Hong, J. Kihlken, S. C. Choi. – DOI: 10.1016/j.ijcard.2011.06.128. – Text : electronic // Int. J. Cardiol. – 2013. – Vol. 164. – P. 205–211. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21794931/> (date of access: 24.01.2023).

246. How safe is minimally invasive transforaminal lumbar interbody fusion for octogenarians?: A perioperative complication analysis / I. Vasilikos, P. Fistouris, M. T. Kruger [et al.]. – DOI: 10.1016/j.wneu.2020.04.128. – Text : electronic // World Neurosurg. – 2020. – Vol. 139. – P. e754–e760. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32344141/> (date of access: 24.01.2023).

247. Hu, R. Erythropoietin promotes the protective properties of transplanted endothelial progenitor cells against acute lung injury via PI3K/Akt pathway / R. Hu, Y. Cheng, H. Jing. – DOI: 10.1097/SHK.0000000000000216. – Text : electronic //

Shock. – 2014. – Vol. 42, N 4. – P. 327–336. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25051281/> (date of access: 24.01.2023).

248. Human adipose tissue derivatives as a potent native biomaterial for tissue regenerative therapies / S. S. Sharath, J. Ramu, S. V. Nair [et al.]. – DOI: 10.1007/s13770-019-00230-x. – Text : electronic // Tissue Eng. Regen. Med. – 2020. – Vol. 17, N 2. – P. 123–140. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31953618/> (date of access: 24.01.2023).

249. Human adult stem cells derived from adipose tissue and bone marrow attenuate enteric neuropathy in the guinea-pig model of acute colitis / R. Stavely, A. M. Robinson, S. Miller [et al.]. – DOI: 10.1186/s13287-015-0231-x. – Text : electronic // Stem Cell Res. Ther. – 2015. – Vol. 6. – P. 244. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26652292/> (date of access: 24.01.2023).

250. Human mesenchymal stem cells partially reverse ifnertility in chemotherapy-induced ovarian failure / S. A. Mohamed, S. M. Shalaby, M. Abdelaziz [et al.]. – DOI: 10.1177/1933719117699705. – Text : electronic // Reprod. Sci. – 2018. – Vol. 5, N 1. – P. 51–63. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28460567/> (date of access: 24.01.2023).

251. Human mesenchymal stem cell failure to adapt to glucose shortage and rapidly use intracellular energy reserves through glycolysis explains poor cell survival after implantation / A. Moya, J. Paquet, M. Deschepper [et al.]. – DOI: 10.1002/stem.2763. – Text : electronic // Stem Cells. – 2018. – Vol. 36, N 3. – P. 363–376. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29266629/> (date of access: 24.01.2023).

252. Human mesenchymal stem cells-conditioned medium improves diabetic wound healing mainly through modulating fibroblast behaviors / M. Saheli, M. Bayat, R. Ganji [et al.]. – DOI: 10.1007/s00403-019-02016-6. – Text : electronic // Arch. Dermatol. Res. – 2020. Vol. 312, N 5. – P. 325–336. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31786709/> (date of access: 24.01.2023).

253. Human mesenchymal stem cells seeded on then membrane to neurospheres for cholinergic-like neurons / P. E. F. Stricker, D. De Souza Dobuchak, A. C. Irioda

[et al.]. – DOI: 10.3390/membranes11080598. – Text : electronic // Membranes (Basel). – 2021. – Vol. 11, N 8. – P. 598. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34436361/> (date of access: 24.01.2023).

254. Human placenta-derived mesenchymal stem cells ameliorate GVHD by modulating Th17/Tr1 balance via expression of PD-2 / Y. Ma, Z. Wang, A. Zhang [et al.]. – DOI: 10.3390/membranes11080598. – Text : electronic // Life Sci. – 2018. – Vol. 214. – P. 98–105. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30393022/> (date of access: 24.01.2023).

255. Human platelet lysate as xeno free alternative of fetal bovine serum for the in vitro expansion of human mesenchymal stem cells / S. Mohammadi, M. Nikbakhi, A. M. Mohammadi [et al.] // Int. J. Hematol. Oncol. Stem Cell Res. – 2016. – Vol. 10, N 3. – P. 161–171.

256. Human predecidual stromal cells are mesenchymal stromal/stem cells and have a therapeutic effect in an immune-based mouse model of recurrent spontaneous abortion / R. Munoz-Fernandez, C. De La Mata, F. Requena [et al.]. – DOI: 10.1186/s13287-019-1284-z. – Text : electronic // Stem Cell Res. Ther. – 2019. – Vol. 10, N 1. – P. 177. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31200769/> (date of access: 24.01.2023).

257. Human umbilical cord mesenchymal stem cells therapy in cyclophosphamide-induced premature ovarian / D. Song, Y. Zhong, C. Qian [et al.]. – DOI: 10.1155/2016/2517514. – Text : electronic // Biomed. Res. Int. – 2016. – Vol. 2016. – N 2517514. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27047962/> (date of access: 24.01.2023).

258. Human versus porcine mesenchymal stromal cells: phenotype, differentiation potential, immunomodulation and cardiac improvement after transplantation / W. A. Noort, M. I. Oerlemans, H. Rozemuller [et al.]. – DOI: 10.1111/j.1582-4934.2011.01455.x. – Text : electronic // J. Cell. Mol. Med. – 2012. – Vol. 16, N 8. – P. 1827–1839. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21973026/> (date of access: 24.01.2023).

259. Hypolipidemic effect of mannans from *C. albicans* serotype A and B in acute hyperlipidemia in mice / T. A. Korolenko, T. P. Johnston, E. Machova [et al.]. – DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.10.111. – Text : electronic // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2017. – Vol. 107, Pt. B. – P. 2385–2394. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29074085/> (date of access: 24.01.2023).

260. Identification of Gli1-interacting proteins during simvastatin-stimulated osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells / B. Chi, X. Fan, Z. Li [et al.]. – DOI: 10.1002/jcb.29221. – Text : electronic // *J. Cell Biochem.* – 2019. – Vol. 120, N 11. – P. 18979–18994. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31245876/> (date of access: 24.01.2023).

261. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow / C. Campagnoli, I. A. Roberts, S. Kumar [et al.]. – DOI: 10.1182/blood.v98.8.2396. – Text : electronic // *Blood.* – 2001. – Vol. 98, N 8. – P. 2396–2402. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11588036/> (date of access: 24.01.2023).

262. IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  synergistically induce apoptosis of mesenchymal stem/stromal cells via the induction of nitric oxide / X. Li, B. Shang, Y. N. Li [et al.]. – DOI: 10.1186/s13287-018-1102-z. – Text : electronic // *Stem Cell Res. Ther.* – 2019. – Vol. 10, N 1. – P. 18. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30635041/> (date of access: 24.01.2023).

263. IL-6 counteracts the inhibitory effect of IL-4 on osteogenic differentiation of human adipose stem cells / A. P. Bastidas-Coral, J. M. A. Hogervorst, T. Forouzanfar [et al.]. – DOI: 10.1002/jcp.28652. – Text : electronic // *J. Cell Physiol.* – 2019. – Vol. 234, N 11. – P. 20520–20532. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31016754/> (date of access: 24.01.2023).

264. IL-8 enhances the angiogenic potential of human bone marrow mesenchymal stem cells by increasing vascular endothelial growth factor / Y. Hou, C. H. Ryu, J. A. Jun [et al.]. – DOI: 10.1002/cbin.10294. – Text : electronic // *Cell Biol. Int.* – 2014. – Vol. 38, N 9. – P. 1050–1059. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24797366/> (date of access: 24.01.2023).

265. Imam, R. A. Efficacy of erythropoietin-pretreated mesenchymal stem cells in murine burn wound healing: Possible in vivo transdifferentiation into keratinocytes / R. A. Imam, A. A. E. Rizk. – DOI: 10.5603/FM.a2019.0038. – Text : electronic // *Folia Morphol.* (Warsz). – 2019. – Vol. 78, N 4. – P. 798–808. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30949996/> (date of access: 24.01.2023).

266. Immunomodulation of human mesenchymal stem/stromal cells in intervertebral disc degeneration: insights from a proinflammatory/degenerative ex vivo model / G. Q. Teixeira, C. L. Pereira, J. R. Ferreira [et al.]. – DOI: 10.1097/BRS.0000000000002494. – Text : electronic // *Spine (Phila Pa 1976)*. – 2018. – Vol. 43, N 12. – P. E673–E682. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29189572/> (date of access: 24.01.2023).

267. Impact of fibronectin knockout on proliferation and differentiation of human infrapatellar fat pad-derived stem cells / Y. Wang, Y. Fu, Z. Yan [et al.]. – DOI: 10.3389/fbioe.2019.00321. – Text : electronic // *Front. Bioeng. Biotechnol.* – 2019. – Vol. 7. – P. 321. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31803729/> (date of access: 24.01.2023).

268. Implantation of placenta-derived mesenchymal stem cells accelerates murine dermal wound closure through immunomodulation / H. Wang, L. Chen, Y. Liu [et al.] // *Am. J. Transl. Res.* – 2016. – Vol. 8, N 11. – P. 4912–4921.

269. Improved therapeutics of modified mesenchymal stem cells: an update / D. K. W. Ocansey, B. Pei, Y. Yan [et al.]. – DOI: 10.1186/s12967-020-02234-x. – Text : electronic // *J. Transl. Med.* – 2020. – Vol. 18, N 1. – P. 42. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32000804/> (date of access: 24.01.2023).

270. Improvement of the chondrocyte-specific phenotype upon equine bone marrow mesenchymal stem cell differentiation: influence of culture time, transforming growth factors and type I collagen siRNAs on the differentiation index / T. Branly, R. Contentin, M. Desance [et al.]. – DOI: 10.3390/ijms19020435. – Text : electronic // *Int. J. Mol. Sci.* – 2018. – Vol. 19, N 2. – P. 435. – <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29389887/> (date of access: 24.01.2023).

271. Improving the therapeutic efficacy of mesenchymal stromal cells to restore perfusion in critical limb ischemia through pulsed focused ultrasound / P. A. Tebebi, S. J. Kim, R. A. Williams [et al.]. – DOI: 10.1038/srep41550. – Text : electronic // Sci. Rep. – 2017. – Vol. 7. – P. 41550. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28169278/> (date of access: 24.01.2023).

272. In vitro protection of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells by erythropoietin / E. Ercan, A. G. Bagla, A. Aksoy [et al.]. – DOI: 10.1016/j.acthis.2013.06.007. – Text : electronic // Acta Histochem. – 2014. – Vol. 116, N 1. – P. 117–125. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24011510/> (date of access: 24.01.2023).

273. In vivo imaging to monitor differentiation and therapeutic effects of transplanted mesenchymal stem cells in myocardial infarction / Z. Pei, J. Zeng, Y. Song [et al.]. – DOI: /10.1038/s41598-017-06571-8. – Text : electronic // Sci. Rep. – 2017. – Vol. 7, N 1. – P. 6296. – <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28740146/> (date of access: 24.01.2023).

274. In vivo migration of mesenchymal stem cells to burn injury sites and their therapeutic effects in a living mouse model / E. J. Oh, H. W. Lee, S. Kalimuthu [et al.]. – DOI: 10.1016/j.jconrel.2018.04.020. – Text : electronic // J. Control Release. – 2018. – Vol. 279. – P. 79–88. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29655989/> (date of access: 24.01.2023).

275. In vivo monitoring of dynamic interaction between neutrophil and human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell in mouse liver during sepsis / S. Y. Ahn, Y. S. Maeng, Y. R. Choe [et al.]. – DOI: 10.1186/s13287-020-1559-4. – Text : electronic // Stem Cell Res. Ther. – 2020. – Vol. 11, N 1. – P. 44. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32014040/> (date of access: 24.01.2023).

276. In wound repair vimentin mediates the transition of mesenchymal leader cells to a myofibroblast phenotype / J. L. Walker, B. M. Bleaken, A. R. Romisher [et al.]. – DOI: 10.1091/mbc.E17-06-0364. – Text : electronic // Mol. Biol. Cell. – 2018. – Vol. 29, N 13. – P. 1555–1570. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29718762/> (date of access: 24.01.2023).

277. Indian Hedgehog regulates senescence in bone marrow-derived mesenchymal stem cell through modulation of ROS/mTOR/4EBP1, p70S6K1/2 pathway / M. Al-Azab, B. Wang, A. Elkhider [et al.]. – DOI: 10.18632/aging.102958. – Text : electronic // *Aging* (Albany NY). – 2020. – Vol. 12, N 7. – P. 5693–5715. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32235006/> (date of access: 24.01.2023).

278. Induction of interleukin-1 beta and interleukin-6 gene expression in hypoperfused skeletal muscle of patients with peripheral arterial disease / M. Testa, E. De Ruvo, A. Russo [et al.] // *Ital. Heart J.* – 2000. – Vol. 1, N 1. – P. 64–67.

279. Inhibition of adipogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells by erythropoietin via activating ERK and P38 MAPK / G. X. Liu, J. C. Zhu, X. Y. Chen [et al.]. – DOI: 10.4238/2015.June.26.5. – Text : electronic // *Genet. Mol. Res.* – 2015. – Vol. 14, N 2. – P. 6968–6977. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26125905/> (date of access: 24.01.2023).

280. Integrin  $\alpha 4$  overexpression on rat mesenchymal stem cells enhances transmigration and reduces cerebral embolism after intracarotid injection / L. L. Ciu, F. Nitzsche, E. Pryazhnikov [et al.]. – DOI: 10.1161/STROKEAHA.117.017809. – Text : electronic // *Stroke*. – 2017. – Vol. 48, N 10. – P. 2895–2900. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28916665/> (date of access: 24.01.2023).

281. Integrin-specific hydrogels modulate transplanted human bone marrow-derived mesenchymal stem cell survival, engraftment, and reparative activities / A. Y. Clark, K. E. Martin, J. R. Garcia [et al.]. – DOI: 10.1038/s41467-019-14000-9. – Text : electronic // *Nat. Commun.* – 2020. – Vol. 11, N 1. – P. 144. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31913286/> (date of access: 24.01.2023).

282. Integrins in the regulation of mesenchymal stem cell differentiation by mechanical signals / L. Wang, F. Zheng, R. Song [et al.]. – DOI: 10.1007/s12015-021-10260-5. – Text : electronic // *Stem Cell Rev. Rep.* – 2022. – Vol. 18, N 1. – P. 126–141. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34536203/> (date of access: 24.01.2023).

283. Interaction between mesenchymal stem cells and intervertebral disc microenvironment: from cell therapy to tissue engineering / G. Vadala, L. Ambrosio, F. Russo [et al.]. – DOI: 10.1155/2019/2376172. – Text : electronic // *Stem Cells Int.* –

2019. – VOL. 2019. – N 2376172. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32587618/> (date of access: 24.01.2023).

284. Interleukin-1 primes human mesenchymal stem cells towards an anti-inflammatory and pro-trophic phenotype in vitro / E. Redondo-Castro, C. Cunningham, J. Miller [et al.]. – DOI: 10.1186/s13287-017-0531-4. – Text : electronic // Stem Cell Res. Ther. – 2017. – Vol. 8, N 1. – P. 79. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28412968/> (date of access: 24.01.2023).

285. Interleukin-1 $\beta$  induces intercellular adhesion molecule-1 expression, thus enhancing the adhesion between mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells via the p38 MAPK signaling pathway / J. Guo, H. Zhang, J. Xia [et al.]. – DOI: 10.3892/ijmm.2018.3424. – Text : electronic // Int. J. Mol. Med. – 2018. – Vol. 41, N 4. – P. 1976–1982. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29393395/> (date of access: 24.01.2023).

286. Interleukin-6/interleukin-6 receptor complex promotes osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells / Z. Xie, S. Tang, G. Ye [et al.]. – DOI: 10.1186/s13287-017-0766-0. – Text : electronic // Stem Cell Res. Ther. – 2018. – Vol. 9, N 1. – P. 13. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29357923/> (date of access: 24.01.2023).

287. Interleukin-6, -8, and TGF- $\beta$  secreted from mesenchymal stem cells show functional role in reduction of telomerase activity of leukemia cell via Wnt5a/ $\beta$ -Catenin and P53 pathways / E. Fathi, B. Valipour, Z. Sanaat [et al.]. – DOI: 10.34172/apb.2020.037. – Text : electronic // Adv. Pharm. Bull. – 2020. – Vol. 10, N 2. – P. 307–314. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32373501/> (date of access: 24.01.2023).

288. Interleukin-17 promotes nitric oxide-dependent expression of PDL1 in mesenchymal stem cells / S. Wang, G. Wang, L. Zhang [et al.]. – DOI: 10.1186/s13578-020-00431-1. – Text : electronic // Cell Biosci. – 2020. – Vol. 10. – P. 73. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32509271/> (date of access: 24.01.2023).

289. Interleukin-22 drives the proliferation, migration and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells: a novel cytokine that could contribute to new

bone formation in spondyloarthropathies / A. A. El-Zayadi, E. A. Jones, S. M. Churchman [et al.]. – DOI: 10.1093/rheumatology/kew384. – Text : electronic // Rheumatology (Oxford). – 2017. – Vol. 56, N 3. – P. 488–493. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27940584/> (date of access: 24.01.2023).

290. Intervertebral disk degeneration and repair / J. Dowdell, M. Erwin, T. Choma [et al.]. – DOI: 10.1093/neuros/nyy437. – Text : electronic // Neurosurgery. – 2018. – Vol. 83, N 5. – P. 1084. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28350945/> (date of access: 24.01.2023).

291. Intervertebral disk degeneration and repair / J. D. M. Erwin, T. Choma, A. Vaccaro [et al.]. – DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.03.013. – Text : electronic // Neurosurgery. – 2017. – Vol. 80, N 3S. – P. S46–S54. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28350945/> (date of access: 24.01.2023).

292. Intervertebral disc repair by allogeneic mesenchymal bone marrow cells: A randomized controlled trial / D. C. Noriega, F. Ardura, R. Hernandez-Ramajo [et al.]. – DOI: 10.1097/TP.0000000000001484. – Text : electronic // Transplantation. – 2017. – Vol. 101, N 8. – P. 1945–1951. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27661661/> (date of access: 24.01.2023).

293. Intracoronary administration of allogeneic adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improves myocardial perfusion but not left ventricle function, in a translational model of acute myocardial infarction / J. Bobi, M. Solanes, R. Fernandez-Jimenez [et al.]. – DOI: 10.1161/JAHA.117.005771. – Text : electronic // J. Am. Heart Assoc. – 2017. – Vol. 6, N 5. – P. e005771. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28468789/> (date of access: 24.01.2023).

294. Intracutaneously injected human adipose tissue-derived stem cells in a mouse model stay at the site of injection / E. Koellensperger, K. Lampe, A. Beierfuss [et al.]. – DOI: 10.1016/j.bjps.2014.02.021. – Text : electronic // J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg. – 2014. – Vol. 67, N 6. – P. 844–850. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24703751/> (date of access: 24.01.2023).

295. Intramyocardial angiogenetic stem cells and epicardial erythropoietin save the acute ischemic heart / C. Klopsch, A. Skorska, M. Ludwig [et al.]. –

DOI: 10.1242/dmm.033282. – Text : electronic // Dis. Model Mech. – 2018. – Vol. 11, N 6. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29752300/> (date of access: 24.01.2023).

296. Intraperitoneal administration of mesenchymal stem cells ameliorates acute dextran sulfate sodium-induced colitis by suppressing dendritic cells / A. Nikolic, B. Simovic Markovic, M. Gazdic [et al.]. – DOI: 10.1016/j.biopha.2018.02.060. – Text : electronic // Biomed. Pharmacother. – 2018. – Vol. 100. – P. 426–432. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29471245/> (date of access: 12.02.2023).

297. Intramyocardial injection of mesenchymal precursor cells and successful temporary weaning from left ventricular assist device support in patients with advanced heart failure: a randomized clinical trial / T. M. Yau, F. D. Pagani, D. M. Mancini [et al.]. – DOI: 10.1001/jama.2019.2341. – Text : electronic // JAMA. – 2019. – Vol. 321, N 12. – P. 1176–1186. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30912838/> (date of access: 12.02.2023).

298. Intravenous mesenchymal stromal cell therapy for inflammatory bowel disease: lessons from the acute graft versus host disease experience / L. S. Conklin, P. J. Hanley, J. Galipeau [et al.]. – DOI: 10.1016/j.jcyt.2017.03.006. – Text : electronic // Cytotherapy. – 2017. – Vol. 19, N 6. – P. 655–667. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28433516/> (date of access: 12.02.2023).

299. Ise, H. Improved isolation of mesenchymal stem cells based on interactions between N-acetylglucosamine-bearing polymers and cell-surface vimentin / H. Ise, K. Matsunaga, M. Shinohara. – DOI: 10.1155/2019/4341286. – Text : electronic // Stem Cells Int. – 2019. – Vol. 2019. – N 4341286. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31814834/> (date of access: 12.02.2023).

300. Isolating and culturing rat marrow mesenchymal stem cells and studying their phenotypical and functional properties / B. Zang, F. Wang, L. Deng [et al.] // Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. – 2003. – Vol. 34, N 4. – P. 738.

301. Jelkmann, W. Erythropoietin / W. Jelkmann. – DOI: 10.1159/000445174. – Text : electronic // Front. Horm. Res. – 2016. – Vol. 47. – P. 115–127. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27348128/> (date of access: 12.02.2023).

302. Khan, S. A systematic review of mesenchymal stem cells in spinal cord injury, intervertebral disc repair and spinal fusion / S. Khan, P. Mafi, R. Mafi. – DOI: 10.2174/1574888X11666170907120030. – Text : electronic // *Curr. Stem Cell Res. Ther.* – 2018. – Vol. 13, N 4. – P. 316–323. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28891440/> (date of access: 12.02.2023).

303. Kim, M. J. Conditioned medium derived from umbilical cord mesenchymal stem cells regenerates atrophied muscles / M. J. Kim, Z. H. Kim, S. M. Kim. – DOI: 10.1016/j.tice.2016.06.010. – Text : electronic // *Tissue Cell.* – 2016. – Vol. 48, N 5. – P. 533–543. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27457384/> (date of access: 12.02.2023).

304. Knockdown of IL-8 provoked premature senescence of placenta-derived mesenchymal stem cells / J. J. Li, F. X. Ma, Y. W. Wang [et al.]. – DOI: 10.1089/scd.2016.0324. – Text : electronic // *Stem Cells Dev.* – 2017. – Vol. 26, N 12. – P. 912–931. – <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28418782/> (date of access: 12.02.2023).

305. Ko, S. H. Therapeutic angiogenesis for critical limb ischemia / S. H. Ko, D. F. Bandyk. – DOI: 10.1053/j.semvascsurg.2014.10.001. – Text : electronic // *Semin. Vasc. Surg.* – 2014. – Vol. 27, N 1. – P. 23–31. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25812756/> (date of access: 12.02.2023).

306. Kusuma, G. D. Effect of the microenvironment on mesenchymal stem cell paracrine signaling: opportunities to engineer the therapeutic effect / G. D. Kusuma, J. Carthew, R. Lim. – DOI: 10.1089/scd.2016.0349. – Text : electronic // *Stem Cells Dev.* – 2017. – Vol. 26, N 9. – P. 617–631. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28186467/> (date of access: 12.02.2023).

307. Li, J. P. Transplantation of erythropoietin gene-transfected umbilical cord mesenchymal stem cells as a treatment for limb ischemia in rats / J. P. Li, D. W. Wang, Q. H. Song. – DOI: 10.4238/2015. – Text : electronic // *Genet. Mol. Res.* – 2015. – Vol. 14, N 4. – P. 19005–19015. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26782551/> (date of access: 12.02.2023).

308. Liang, L. Transplantation of human placenta-derived mesenchymal stem cells alleviates critical limb ischemia in diabetic nude rats / L. Liang, Z. Li, T. Ma. – DOI: 10.3727/096368916X692726. – Text : electronic // Cell Transplant. – 2017. – Vol. 26, N 1. – P. 45–61. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27501782/> (date of access: 12.02.2023).

309. Limoli, P. G. Antioxidant and biological properties of mesenchymal cells used for therapy in retinitis pigmentosa / P. G. Limoli, E. M. Vingolo, C. Limoli. – DOI: 10.3390/antiox9100983. – Text : electronic // Antioxidants. – 2020. – Vol. 9, N 10. – P. 983. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33066211/> (date of access: 12.02.2023).

310. Lin, H. Therapeutic effects of erythropoietin expressed in mesenchymal stem cells for dilated cardiomyopathy in rat / H. Lin, Y. Ling, J. Pan. – DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.07.053. – Text : electronic // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2019. – Vol. 517, N 4. – P. 575–580. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31400858/> (date of access: 12.02.2023).

311. Liu, H. Inflammation, mesenchymal stem cells and bone regeneration / H. Liu, D. Li, Y. Zhang. – DOI: 10.1007/s00418-018-1643-3. – Text : electronic // Histochem. Cell Biol. – 2018. – Vol. 149, N 4. – P. 393–404. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29435765/> (date of access: 12.02.2023).

312. Local application of adipose-derived mesenchymal stem cells supports the healing of fistula: prospective randomised study on rat model of fistulising Crohn's disease / O. Ryska, Z. Serclova, O. Mestak [et al.]. – DOI: 10.1080/00365521.2017.1281434. – Text : electronic // Scand. J. Gastroenterol. – 2017. – Vol. 52, N 5. – P. 543–550. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28116942/> (date of access: 12.02.2023).

313. Long-term outcomes of BMMSC compared with BMMNC for treatment of critical limb ischemia and foot ulcer in patients with diabetes / D. Lu, Y. Jiang, W. Deng [et al.]. – DOI: 10.1177/0963689719835177. – Text : electronic // Cell Transplant. – 2019. – Vol. 28, N 4. – P. 645–652. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30917698/> (date of access: 12.02.2023).

314. López-García, L. TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  participate in improving the immunoregulatory capacity of mesenchymal stem/stromal cells: importance of cell-cell contact and extracellular vesicles // L. López-García. – DOI: 10.3390/ijms22179531. – Text : electronic // Int. J. Mol. Sci. – 2021. – Vol. 22, N 17. – P. 9531. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34502453/> (date of access: 12.02.2023).

315. Lv, C. Bone marrow mesenchymal stem cells improve spinal function of spinal cord injury in rats via TGF- $\beta$ /Smads signaling pathway / C. Lv, T. Zhang, K. Li. – DOI: 10.3892/etm.2020.8640. – Text : electronic // Exp. Ther. Med. – 2020. – Vol. 19, N 6. – P. 3657–3663. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32346429/> (date of access: 12.02.2023).

316. Ma, C. Effect of TGF- $\beta$ 1 and IL-10 on the immunoregulatory function of extracellular vesicles derived from mesenchymal stem cells / C. Ma, Q. Y. Zang, Z. K. Guo. – DOI: 10.7534/j.issn.1009–2137.2018.06.034. – Text : electronic // Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi. – 2018. – Vol. 26, N 6. – P. 1785–1792. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30501721/> (date of access: 12.02.2023).

317. Macroautophagy and selective mitophagy ameliorate chondrogenic differentiation potential in adipose stem cells of equine metabolic syndrome: new findings in the field of progenitor cells differentiation / K. Marycz, K. Kornicka, J. Grzesiak [et al.]. – DOI: 10.1155/2016/3718468. – Text : electronic // Oxid. Med. Cell Longev. – 2016. – Vol. 2016. – N 3718468. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28053691/> (date of access: 12.02.2023).

318. Manley, H. Menstrual blood-derived mesenchymal stem cells: women's attitudes, willingness, and barriers to donation of menstrual blood / H. Manley, J. Sprinks, P. Breedon. – DOI: 10.1089/jwh.2019.7745. – Text : electronic // J. Womens Health (Larchmt). – 2019. – Vol. 28, N 12. – P. 1688–1697. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31397634/> (date of access: 12.02.2023).

319. Mathew, S. A. Placental mesenchymal stromal cells as an alternative tool for therapeutic angiogenesis / S. A. Mathew, C. Naik, P. A. Cahill. – DOI: 10.1007/s00018-019-03268-1. – Text : electronic // Cell Mol. Life Sci. – 2020. –

Vol. 77, N 2. – P. 253–265. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31468060/> (date of access: 12.02.2023).

320. Measurement of revascularization in the hind limb after experimental ischemia in mice / S. R. Bhalla, F. Riu, M. J. C. Machado [et al.]. – DOI: 10.1007/978-1-0716-2059-5-9. – Text : electronic // *Methods Mol. Biol.* – 2022. – Vol. 2441. – P. 105–113. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35099732/> (date of access: 12.02.2023).

321. Mechanical stretch promotes the osteogenic differentiation of bone mesenchymal stem cells induced by erythropoietin / Y. B. He, S. Y. Liu, S. Y. Deng [et al.]. – DOI: 10.1155/2019/1839627. – Text : electronic // *Stem Cells Int.* – 2019. – Vol. 2019. – N 1839627. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31360172/> (date of access: 12.02.2023).

322. Melatonin rescued interleukin 1 $\beta$ -impaired chondrogenesis of human mesenchymal stem cells / B. Gao, W. Gao, Z. Wu [et al.]. – DOI: 10.1186/s13287-018-0892-3. – Text : electronic // *Stem Cell Res. Ther.* – 2018. – Vol. 9, N 1. – P. 162. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29898779/> (date of access: 12.02.2023).

323. Mesenchymal stem cells and adaptive immune responses / W. Cao, K. Cao, J. Cao [et al.]. – DOI: 10.1016/j.imlet.2015.06.003. – Text : electronic // *Immunol. Lett.* – 2015. – Vol. 168, N 2. – P. 147–153. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26073566/> (date of access: 12.02.2023).

324. Mesenchymal stem cells and IL-37: a powerful combination / A. Gugliandolo, A. L. Caraffa, C. E. Gallenga [et al.] // *Biol. Regul. Homeost. Agents.* – 2019. – Vol. 33, N 4. – P. 1019–1022.

325. Mesenchymal stem cells and their conditioned medium can enhance the repair of uterine defects in a rat model / C. H. Ho, C. W. Lan, C. Y. Liao [et al.]. – DOI: 10.1016/j.jcma.2017.03.013. – Text : electronic // *J. Chin. Med. Assoc.* – 2018. – Vol. 81, N 3. – P. 268–276. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28882732/> (date of access: 12.02.2023).

326. Mesenchymal stem cells and their microenvironment / J. Liu, J. Gao, Z. Liang [et al.]. – DOI: 10.1186/s13287-022-02985-y. – Text : electronic // *Stem Cell*

Res. Ther. – 2022. – Vol. 13, N 1. – P. 429. –  
URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35987711/> (date of access: 12.02.2023).

327. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles affect disease outcomes via transfer of microRNAs / G. Qiu, G. Zheng, M. Ge [et al.]. – DOI: 10.1186/s13287-018-1069-9. – Text : electronic // Stem Cell Res. Ther. – 2018. – Vol. 9, N 1. – P. 320. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30463593/> (date of access: 12.02.2023).

328. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles alone or in conjunction with a SDKP-conjugated self-assembling peptide improve a rat model of myocardial infarction / S. Firoozi, S. Pahlavan, M. H. Ghanian [et al.]. – DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.02.009. – Text : electronic // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2020. – Vol. 524, N 4. – P. 903–909. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32057366/> (date of access: 12.02.2023).

329. Mesenchymal stem cells deliver exogenous miR–21 via exosomes to inhibit nucleus pulposus cell apoptosis and reduce intervertebral disc degeneration / X. Cheng, G. Zhang, L. Zhang [et al.]. – DOI: 10.1111/jcmm.13316. – Text : electronic // J. Cell Mol. Med. – 2018. – Vol. 22, N 1. – P. 261–276. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28805297/> (date of access: 12.02.2023).

330. Mesenchymal stem cells expressing brain-derived neurotrophic factor enhance endogenous neurogenesis in an ischemic stroke model / C. H. Jeong, S. M. Kim, J. Y. Lim [et al.]. – DOI: 10.1155/2014/129145. – Text : electronic // Biomed. Res. Int. – 2014. – Vol. 2014. – N 129145. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24672780/> (date of access: 12.02.2023).

331. Mesenchymal stem cells for regenerative medicine / Y. Han, X. Li, Y. Zhang [et al.]. – DOI: 10.3390/cells8080886. – Text : electronic // Cells. – 2019. – Vol. 8, N 8. – P. 886. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31412678/> (date of access: 12.02.2023).

332. Mesenchymal stem cells in combination with erythropoietin repair hyperoxia-induced alveoli dysplasia injury in neonatal mice via inhibition of TGF- $\beta$ 1 signaling / Y. Luan, L. Zhang, S. Chao [et al.]. – DOI: 10.18632/oncotarget.9314. –

Text : electronic // *Oncotarget*. – 2016. – Vol. 7, N 30. – P. 47082–47094. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27191651/> (date of access: 12.02.2023).

333. Mesenchymal stem cells in regenerative medicine: focus on articular cartilage and intervertebral disc regeneration / S. M. Richardson, G. Kalamegam, P. N. Pushparaj [et al.]. – DOI: 10.1016/j.ymeth.2015.09.015. – Text : electronic // *Methods*. – 2016. – Vol. 99. – P. 69–80. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26384579/> (date of access: 12.02.2023).

334. Mesenchymal stem cells induced regulatory dendritic cells from hemopoietic progenitor cells through Notch pathway and TGF- $\beta$  synergistically / X. Li, Y. Dong, H. Yin [et al.]. – DOI: 10.1016/j.imlet.2020.03.005. – Text : electronic // *Immunol. Lett.* – 2020. – Vol. 222. – P. 49–57. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32199868/> (date of access: 12.02.2023).

335. Mesenchymal stem cell-macrophage crosstalk and bone healing / J. Pajarinen, T. Lin, E. Gibon [et al.]. – DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.12.025. – Text : electronic // *Biomaterials*. – 2019. – Vol. 196. – P. 80–89. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29329642/> (date of access: 12.02.2023).

336. Mesenchymal stem cells promote endothelial progenitor cell proliferation by secreting insulin-like growth factor-1 / J. Hou, X. Peng, J. Wang [et al.]. – DOI: 10.3892/mmr.2017.6741. – Text : electronic // *Mol. Med. Rep.* – 2017. – Vol. 16, N 2. – P. 1502–1508. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28627605/> (date of access: 12.02.2023).

337. Mesenchymal stem cells promote macrophage polarization toward M2b-like cells / G. Kudlik, B. Hegyi, A. Czibula [et al.]. – DOI: 10.1016/j.yexcr.2016.08.022. – Text : electronic // *Exp. Cell Res.* – 2016. – Vol. 348, N 1. – P. 36–45. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27578361/> (date of access: 12.02.2023).

338. Mesenchymal stem cells protect against ferroptosis via exosome-mediated stabilization of SLC7A11 in acute liver injury / F. Lin, W. Chen, J. Zhou [et al.]. – DOI: 10.1038/s41419-022-04708-w. – Text : electronic // *Cell Death Dis.* – 2022. –

Vol. 13, N 3. – P. 271. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35347117/> (date of access: 12.02.2023).

339. Mesenchymal stromal/stem cells markers in the human bone marrow / V. Rasini, M. Dominici, T. Kluba [et al.]. – DOI: 10.1016/j.jcyt.2012.11.009. – Text : electronic // *Cytotherapy*. – 2013. – Vol. 15, N 3. – P. 292–306. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23312449/> (date of access: 12.02.2023).

340. Mesenchymal stromal cell therapy in ischemia/reperfusion injury / P. Rowart, P. Erpicum, O. Detry [et al.]. – DOI: 10.1155/2015/602597. – Text : electronic // *J. Immunol. Res.* – 2015. – Vol. 2015. – N 602597. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26258151/> (date of access: 12.02.2023).

341. Mesenchymal stem cell therapy for ischemic tissues / K. W. Yong, J. R. Choi, M. Mohammadi [et al.]. – DOI: 10.1155/2018/8179075. – Text : electronic // *Stem Cells Int.* – 2018. – Vol. 2018. – N 8179075. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30402112/> (date of access: 12.02.2023).

342. Mesenchymal stem cell therapies for intervertebral disc degeneration: Consideration of the degenerate niche / L. Vickers, A. A. Thorpe, J. Snuggs [et al.]. – DOI: 10.1002/jsp2.1055. – Text : electronic // *JOR Spine*. – 2019. – Vol. 2, N 2. – P. e1055. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31463465/> (date of access: 12.02.2023).

343. Mesenchymal stem cell therapy for liver disease: full of chance and challenges / X. Yang, Y. Meng, Z. Han [et al.]. – DOI: 10.1186/s13578-020-00480-6. – Text : electronic // *Cell Biosci.* – 2020. – Vol. 10. – P. 123. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33117520/> (date of access: 12.02.2023).

344. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement / M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller [et al.]. – DOI: 10.1080/14653240600855905. – Text : electronic // *Cytotherapy*. – 2006. – Vol. 8, N 4. – P. 315–317. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16923606/> (date of access: 12.02.2023).

345. Mobilization of transplanted bone marrow mesenchymal stem cells by erythropoietin facilitates the reconstruction of segmental bone defect / J. Li, Z. Huang,

B. Li [et al.]. – DOI: 10.1155/2019/5750967. – Text : electronic // Stem Cells Int. – 2019. – Vol. 2019. – N 5750967. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31065275/> (date of access: 12.02.2023).

346. Modification of erythropoietin structure by N-homocysteinylation affects its antiapoptotic and proliferative functions / A. Schiappacasse, R. E. Maltaner, M. E. Chamorro [et al.]. – DOI: 10.1111/febs.14632. – Text : electronic // FEBS J. – 2018. – Vol. 285, N 20. – P. 3801–3814. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30103295/> (date of access: 12.02.2023).

347. Modification of mesenchymal stem cells by HMGB1 promotes the activity of Cav3.2 T-type calcium channel via PKA/ $\beta$ -catenin/ $\gamma$ -cystathionase pathway / H. Wu, X. Xie, M. Sun [et al.]. – DOI: 10.1186/s13287-021-02677-z. – Text : electronic // Stem Cell Res. Ther. – 2022. – Vol. 13, N 1. – P. 4. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35012644/> (date of access: 12.02.2023).

348. Modulation of cellular stress response via the erythropoietin/CD131 heteroreceptor complex in mouse mesenchymal-derived cells / S. Bohr, S. J. Patel, R. Vasko [et al.]. – DOI: 10.1007/s00109-014-1218-2. – Text : electronic // J. Mol. Med. (Berl). – 2015. – Vol. 93, N 2. – P. 199–210. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25373867/> (date of access: 12.02.2023).

349. Modulation of proliferation and differentiation of gingiva-derived mesenchymal stem cells by concentrated growth factors: potential implications in tissue engineering for dental regeneration and repair / X. Chen, Y. Chen, Y. Hou [et al.]. – DOI: 10.3892/ijmm.2019.4172. – Text : electronic // Int. J. Mol. Med. – 2019. – Vol. 44, N 1. – P. 37–46. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31017269/> (date of access: 12.02.2023).

350. Morbidity and mortality associated with atherosclerotic peripheral artery disease: A systematic review / G. Agnelli, J. J. F. Belch, I. Baumgartner [et al.]. – DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2019.09.012. – Text : electronic // Atherosclerosis. – 2020. – Vol. 293. – P. 94–100. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31606132/> (date of access: 12.02.2023).

351. MRI in pelvic inflammatory disease: a pictorial review / F. Czdeva-Pommersheim, B. Kalb, J. Costello [et al.]. – DOI: 10.1007/s00261-016-1004-4. – Text : electronic // *Abdom. Radiol. (NY)*. – 2017. – Vol. 42, N 3. – P. 935–950. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27933478/> (date of access: 12.02.2023).

352. Multipotency of equine mesenchymal stem cells derived from synovial fluid / D. Murata, D. Miyakoshi, T. Hatazoe [et al.]. – DOI: 10.1016/j.tvjl.2014.07.029. – Text : electronic // *Vet. J.* – 2014. – Vol. 202, N 1. – P. 53–61. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25151209/> (date of access: 12.02.2023).

353. Multipotent mesenchymal stem cells in lung fibrosis / K. E. Hostettler, A. Gazdhar, P. Khan [et al.]. – DOI: 10.1371/journal.pone.0181946. – Text : electronic // *PLoS ONE*. – 2017. – Vol. 12, N 8. – P. e0181946. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28827799/> (date of access: 12.02.2023).

354. Murine model: maternal administration of stem cells for prevention of prematurity / J. Lei, W. Firdaus, J. M. Rosenzweig [et al.]. – DOI: 10.1016/j.ajog.2014.12.032. – Text : electronic // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2015. – Vol. 212, N 5. – P. 639.e1–10. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25555657/> (date of access: 12.02.2023).

355. Myogenic differentiation and reparative activity stromal cells derived from pericardial adipose in comparison to subcutaneous origin / X. Wang, H. Zhang, L. Nie [et al.]. – DOI: 10.1186.scrt48.1. – Text : electronic // *Stem Cell Res. Ther.* – 2014. – Vol. 5, N 4. – P. 92. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25084810/> (date of access: 12.02.2023).

356. Notch signaling regulates CXCR4 expression and the migration of mesenchymal stem cells / J. Xie, W. Wang, J. W. Si [et al.]. – DOI: 10.1016/j.cellimm.2013.02.001. – Text : electronic // *Cell Immunol.* – 2013. – Vol. 281, N 1. – P. 68–75. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23474530/> (date of access: 12.02.2023).

357. Nuschke, A. Activity of mesenchymal stem cells in therapies for chronic skin wound healing / A. Nuschke. – DOI: 10.4161/org.27405. – Text : electronic //

Organogenesis. – 2014. – Vol. 10. – P. 29–37. –  
URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24322872/> (date of access: 12.02.2023).

358. Oliva, J. Therapeutic properties of mesenchymal stem cell on organ ischemia-reperfusion in jury / J. Oliva. – DOI: 10.3390/ijms20215511. – Text : electronic // Int. J. Mol. Sci. – 2019. – Vol. 20, N 21. – P. 5511. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31694240/> (date of access: 12.02.2023).

359. Ornaghi, S. Upcoming drugs for the treatment of preeclampsia in pregnant women / S. Ornaghi, M. J. Paidas. – DOI: 10.1586/17512433.2014.944501. – Text : electronic // Expert. Rev. Clin. Pharmacol. – 2014. – Vol. 7, N 5. – P. 599–603. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25068820/> (date of access: 12.02.2023).

360. Outcome improvement of cellular cardiomyoplasty using triple therapy: mesenchymal stem cell+erythropoietin+vascular endothelial growth factor / F. Tavakoli, S. N. Ostad, V. Khorri [et al.]. – DOI: 10.1016/j.ejphar.2013.07.001. – Text : electronic // Eur. J. Pharmacol. – 2013. – Vol. 714, N 1–3. – P. 456–463. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23850947/> (date of access: 12.02.2023).

361. P53 mutation and epigenetic imprinted IGF2/H19 gene analysis in mesenchymal stem cells derived from amniotic fluid, amnion, endometrium, and Wharton's jelly / T. Phermthai, P. Pokathikorn, S. Wichitwiengrat [et al.]. – DOI: 10.1089/scd.2016.0356. – Text : electronic // Stem Cells Dev. – 2017. – Vol. 26, N 18. – P. 1344–1354. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28629288/> (date of access: 12.02.2023).

362. Park, Y. T. The role of interleukin 6 in osteogenic and neurogenic differentiation potentials of dental pulp stem cells / Y. T. Park, S. M. Lee, X. Kou. – DOI: 10.1016/j.joen.2019.08.002. – Text : electronic // J. Endod. – 2019. – Vol. 45, N 11. – P. 1342–1348. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31540748/> (date of access: 12.02.2023).

363. Pathipati, P. The differential effect of erythropoietin exposure to oxidative stress on microglia and astrocytes in vitro / P. Pathipati, D. M. Ferriero. – DOI: 10.1016/j.joen.2019.08.002. – Text : electronic // Dev. Neurosci. – 2017. –

Vol. 39, N 1–4. – P. 310–322. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28511187/> (date of access: 12.02.2023).

364. Päch, G. Stem cells in the treatment of diabetes mellitus – Focus on mesenchymal stem cells / G. Päch, N. Perakakis, C. S. Mantzoros. – DOI: 10.1016/j.metabol.2018.10.005. – Text : electronic // *Metabolism* – 2019. – Vol. 90. – P. 1–15. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30342065/> (date of access: 12.02.2023).

365. Peng, B. Erythropoietin and its derivatives: from tissue protection to immunoregulation / B. Peng, G. Kong, C. Yang. – DOI: 10.1038/s41419-020-2276-8. – Text : electronic // *Cell Death Dis.* – 2020. – Vol. 11, N 2. – P. 79. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32015330/> (date of access: 12.02.2023).

366. Pereira, A. R. Therapeutic angiogenesis induced by human umbilical cord tissue-derived mesenchymal stromal cells in a murine model of hindlimb ischemia / A.R. Pereira, T. F. Mendes, A. Ministro. – DOI: 10.1186/s13287-016-0410-4. – Text : electronic // *Stem Cell Res. Ther.* – 2016. – Vol. 7, N 1. – P. 145. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27680210/> (date of access: 12.02.2023).

367. Perse, M. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks / M. Perse, A. Cerar. – DOI: 10.1155/2012/718617. – Text : electronic // *J. Biomed. Biotechnol.* – 2012. – Vol. 2012. – P. 718617. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22665990/> (date of access: 12.02.2023).

368. Phase I trial: the use of autologous cultured adipose-derived stroma/stem cells to treat patients with non-revascularizable critical limb ischemia / A. Bura, V. Planat-Benard, P. Bourin [et al.]. – DOI: 10.1016/j.jcyt.2013.11.011. – Text : electronic // *Cytherapy.* – 2014. – Vol. 16, N 2. – P. 245–257. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24438903/> (date of access: 12.02.2023).

369. Phenotypic characterization of bone marrow mononuclear cells and derived stromal cell populations from human iliac crest, vertebral body and femoral head / M. Herrmann, M. Hildebrand, U. Menzel [et al.]. – DOI: 10.3390/ijms20143454. – Text : electronic // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – Vol. 20, N 14. – P. 3445. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31337109/> (date of access: 12.02.2023).

370. Peripheral blood-derived mesenchymal stem cells demonstrate immunomodulatory potential for therapeutic use in horse / A. L. F. Longhini, T. E. Salazar, C. Vieira [et al.]. – DOI: 10.1371/journal.pone.0212642. – Text : electronic // PLoS ONE. – 2019. – Vol. 14, N 3. – P. e0212542. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30870461/> (date of access: 12.02.2023).

371. Perivascular mesenchymal stem/stromal cells, an immune privileged niche for viruses? / G. Lebeau, F. Ah-Pine, M. Daniel [et al.]. – DOI: 10.3390/ijms23148038. – Text : electronic // Int. J. Mol. Sci. – 2022. – Vol. 23, N 14. – P. 8083. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35887383/> (date of access: 12.02.2023).

372. Platelet-rich plasma enhances the proliferation of human adipose stem cells through multiple signaling pathway / F. Lai, N. Kakudo, N. Morimoto [et al.]. – DOI: 10.1186/s13287-018-0851-z. – Text : electronic // Stem Cell Res. – 2018. – Vol. 9, N 1. – P. 107. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29661222/> (date of access: 12.02.2023).

373. Platelet-rich plasma enhances the repair capacity of muscle-derived mesenchymal stem cells to large humeral bone defect in rabbits / N. Yin, Y. Wang, L. Ding [et al.]. – DOI: 10.1038/x41598-020-63496-5. – Text : electronic // Sci. Rep. – 2020. – Vol. 10, N 1. – P. 6771. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32317711/> (date of access: 12.02.2023).

374. Platelet-rich plasma increases growth and motility of adipose-tissue-derived mesenchymal stem cells and controls adipocytes secretory function / V. D'Esposito, F. Passaretti, G. Perruolo [et al.]. – DOI: 10.1002/jcb.25235. – Text : electronic // J. Cellular Biochem. – 2018. – Vol. 116. – P. 2408–2418. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26012576/> (date of access: 12.02.2023).

375. Polysaccharide hydrogel combined with mesenchymal stem cells promotes the healing of corneal alkali burn in rats / Y. Ke, Y. Wu, X. Cui [et al.]. – DOI: 10.1371/journal.pone.0119725. – Text : electronic // PLoS ONE. – 2015. – Vol. 10, N 3. – P. e0118725. – URL: (date of access: 12.02.2023).

376. Potapova, I. A. Von Willebrand factor increases endothelial cell adhesiveness for human mesenchymal stem cells by activating p38 mitogen-activated

protein kinase / I. A. Potapova, I. S. Cohen, S. V. Doronin. – DOI: 10.1186/scrt35. – Text : electronic // Stem Cells Res. Ther. – 2010. – Vol. 1, N 5. – P. 35. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21083900/> (date of access: 12.02.2023).

377. Potential role of erythropoietin receptors and ligands in attenuating apoptosis and inflammation in critical limb ischemia / D. Joshi, D. Abraham, X. Shiwen [et al.]. – DOI: 10.1016/j.jvs.2013.06.054. – Text : electronic // J. Vasc. Surg. – 2014. – Vol. 60, N 1. – P. 191–201. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24055514/> (date of access: 12.02.2023).

378. Preconditioning of human decidua basalis mesenchymal stem/stromal cells with glucose increased their engraftment and anti-diabetic properties / Y. Basmakil, M. A. Rashid, T. Khatlani [et al.]. – DOI: 10.1007/s13770-020-00239-7. – Text : electronic // Tissue Eng. Regen. Med. – 2020. – Vol. 17, N 2. – P. 209–222. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32077075/> (date of access: 12.02.2023).

379. Preliminary study of bone marrow-derived mesenchymal stem cells pretreatment with erythropoietin in preventing acute rejection after rat renal transplantation / Y. Zhang, S. Zhou, J. M. Hu [et al.]. – DOI: 10.1016/j.transproceed.2018.04.063. – Text : electronic // Transplant. Proc. – 2018. – Vol. 50, N 10. – P. 3873–3880. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30577280/> (date of access: 12.02.2023).

380. Pretreatment with IL-1 $\beta$  enhances proliferation and chondrogenic potential of synovium-derived mesenchymal stem cells / E. Matsumura, K. Tsuji, K. Komori [et al.]. – DOI: 10.1016/j.jcyt.2016.11.004. – Text : electronic // Cytotherapy. – 2017. – Vol. 19, N 2. – P. 181–193. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27979606/> (date of access: 12.02.2023).

381. Priming of late endothelial progenitor cells with erythropoietin before transplantation requires the CD131 receptor subunit and enhances their angiogenic potential / Y. Bennis, G. Sarlon-Bartoli, B. Guillet [et al.]. – DOI: 10.1111/j.1538-7836.2012.04835.x. – Text : electronic // J. Thromb. Haemost. – 2012. – Vol. 10, N 9. – P. 1914–1928. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22738133/> (date of access: 12.02.2023).

382. Priming with erythropoietin enhances cell survival and angiogenic effect of mesenchymal stem cell implantation in rat limb ischemia / T. Mizukami, Y. Iso, C. Sato [et al.]. – DOI: 10.1016/j.reth.2016.01.004. – Text : electronic // *Regen. Ther.* – 2016. – Vol. 4. – P. 1–8. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31245482/> (date of access: 12.02.2023).

383. Proangiogenic and prosurvival functions of glucose in human mesenchymal stem cells upon transplantation / M. Deschepper, M. Manassero, K. Oudina [et al.]. – DOI: 10.1002/stem.1299. – Text : electronic // *Stem Cells.* – 2013. – Vol. 31, N 3. – P. 526–535. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23225732/> (date of access: 12.02.2023).

384. Proinflammatory interleukins production by adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells: the impact of cell culture conditions and cell-to-cell interaction / E. Andreeva, I. Andrianova, J. Rylova [et al.]. – DOI: 10.1002/cbf.3125. – Text : electronic // *Cell Biochem. Funct.* – 2015. – Vol. 33, N 6. – P. 386–93. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26179154/> (date of access: 12.02.2023).

385. Proliferation, characterization and differentiation potency of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (AT–MSCs) cultured in fresh frozen and non-fresh frozen plasma / W. Widowati, R. Noverina, W. Ayuningtyas [et al.]. – DOI: 10.22088/IJMCM.BUMS.8.4.283. – Text : electronic // *Int. J. Mol. Cell Med.* Fall. – 2019. – Vol. 8, N 4. – P. 283–294. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32587838/> (date of access: 12.02.2023).

386. Proliferation, differentiation and immunoregulatory capacities of brown and white adipose-derived stem cells from young and aged mice / Y. M. Yang, X. H. Dong, W. C. Ma [et al.]. – DOI: 10.15283/ijsc20019. – Text : electronic // *Int. J. Stem Cell.* – 2020. – Vol. 13, N 2. – P. 246–256. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32323515/> (date of access: 12.02.2023).

387. Promoting neuroregeneration after perinatal arterial ischemic stroke: neurotrophic factors and mesenchymal stem cells / N. Wagenaar, C. G. M. de Theije, L. S. de Vries [et al.]. – DOI: 10.1038/pr.2017.243. – Text : electronic // *Pediatr. Res.* –

2018. – Vol. 83, N 1–2. – P. 372–384. –  
 URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28949952/> (date of access: 12.02.2023).

388. Protective effects of mesenchymal stem cells with CXCR4 up-regulation in a rat renal transplantation model / Z. Cao, G. Zhang, F. Wang [et al.]. – DOI: 10.1371/journal.pone.0082949. – Text : electronic // PLoS ONE. – 2013. – Vol. 8, N 12. – P. e0082949. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24386129/> (date of access: 12.02.2023).

389. Purified human synovium mesenchymal stem cells as a good resource for cartilage regeneration / Y. Ogata, Y. Mabuchi, M. Yoshida [et al.]. – DOI: 10.1371/journal.pone.0129096. – Text : electronic // PLoS ONE. – 2015. – Vol. 10, N 6. – P. e0129096. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26053045/> (date of access: 12.02.2023).

390. Qin, D. Urine-derived stem cells for potential use in bladder repair / D. Qin, T. Long, J. Deng. – DOI: 10.1186/scrt458. – Text : electronic // Stem Cell Res. Ther. – 2014. – Vol. 5, N 3. – P. 69. –  
 URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25157812/> (date of access: 12.02.2023).

391. Ranjbaran, H. Wharton's jelly derived-mesenchymal stem cells: isolation and characterization / H. Ranjbaran, S. Abediankenari, M. Mohammadi [et al.] // Acta Med. Iran. – 2018. – Vol. 56, N 1. – P. 28–33.

392. Rao, S. R. Passage-dependent expression of STRO-1 in human gingival mesenchymal stem cells / S. R. Rao, R. Subbarayan. – DOI: 10.1002/jcb.27674. – Text : electronic // J. Cell Biochem. – 2019. – Vol. 120, N 3. – P. 2810–2815. –  
 URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30260000/> (date of access: 12.02.2023).

393. Ratajczak, M. Z. A novel view of the adult bone marrow stem cells hierarchy and stem cell trafficking / M. Z. Ratajczak. – DOI: 10.1038/leu.2014.346. – Text : electronic // Leukemia. – 2015. – Vol. 29, N 4. – P. 776–782. –  
 URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25486871/> (date of access: 12.02.2023).

394. Receptor activity-modifying protein 1 regulates the phenotypic expression of BMSCs via the Hippo/Yap pathway / Q. Zhang, Y. Guo, H. Yu [et al.]. – DOI: 10.1002/jcp.28082. – Text : electronic // J. Cell Physiol. – 2019. – Vol. 234, N 8.

– P. 13969–13976. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30618207/> (date of access: 12.02.2023).

395. Recombinant asialoerythropoietin protects HL-1 cardiomyocytes from injury via suppression of Mst1 activation / F. S. Kittur, Y. Lin, E. Arthur [et al.]. – DOI: 10.1016/j.bbrep.2019.01.004. – Text : electronic // *Biochem. Biophys. Rep.* – 2019. – Vol. 17. – P. 157–168. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30671548/> (date of access: 12.02.2023).

396. Regenerative medicine using stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED): a promising new treatment in pediatric surgery / T. Taguchi, Y. Yanagi, K. Yohimaru [et al.]. – DOI: 10.1007/s00595-019-01783-z. – Text : electronic // *Surg. Today.* – 2019. – Vol. 49, N 4. – P. 316–322. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30834983/> (date of access: 12.02.2023).

397. Regulation of mesenchymal stem cell differentiation by transforming growth factor beta superfamily / J. Krstic, D. Trivanovic, H. Obradovic [et al.]. – DOI: 10.2174/1389203718666171117103418. – Text : electronic // *Curr. Protein Pept. Sci.* – 2018. – Vol. 19, N 12. – P. 1138–1154. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29150917/> (date of access: 12.02.2023).

398. Regulation of osteogenic in bone marrow-derived mesenchymal stem cells via histone deacetylase 1 and 2 co-cultured with human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells / T. Iwata, E. Kaneda-Ikeda, K. Takahashi [et al.]. – DOI: 10.1111/jre.13070. – Text : electronic // *J. Periodontal Res.* – 2023. – Vol. 58, N 1. – P. 83–96. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36346011/> (date of access: 12.02.2023).

399. Resveratrol preincubation enhances the therapeutic efficacy of hUC-MSCs by improving cell migration and modulating neuroinflammation mediated by MAPK signaling in a mouse model of Alzheimer's disease / X. Wang, J. Wu, S. Ma [et al.]. – DOI: 10.3389/fncel.2020.00062. – Text : electronic // *Front. Cell. Neurosci.* – 2020. – Vol. 14. – P. 62. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32292331/> (date of access: 12.02.2023).

400. Review article: mesenchymal stromal cell therapy for inflammatory bowel diseases / C. Gregoire, C. Lechanteur, A. Briquet [et al.]. – DOI: 10.1111/apt.13864. – Text : electronic // *Aliment. Pharmacol. Ther.* – 2017. – Vol. 45, N 2. – P. 205–221. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27878827/> (date of access: 12.02.2023).

401. Richardson, S. M. Stem cell regeneration of degenerated intervertebral discs: current status / S. M. Richardson, J. A. Hoyland. – DOI: 10.1007/s11916-008-0016-3. – Text : electronic // *Curr. Pain Headache Rep.* – 2008. – Vol. 12, N 2. – P. 83–88. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18474185/> (date of access: 12.02.2023).

402. Safety and efficacy of stem cell therapy for treatment of neural damage in patients with multiple sclerosis / M. J. Bejargafshe, M. Hedayati, S. Zahabiasli [et al.]. – DOI: h10.21037/sci.2019.10.06. – Text : electronic // *Stem Cell Investig.* – 2019. – Vol. 6. – P. 44. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32039266/> (date of access: 12.02.2023).

403. Safety and efficacy of the intravenous infusion of umbilical cord mesenchymal stem cells in patients with heart failure: A phase 1/2 randomized controlled trial (RIMECARD trial [Randomized clinical trial of intravenous infusion umbilical cord mesenchymal stem cells on cardiopathy]) / J. Bartolucci, F. J. Verdugo, P. L. Gonzalez [et al.]. – DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.117.310712. – Text : electronic // *Circ. Res.* – 2017. – Vol. 121, N 10. – P. 1192–1204. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28974553/> (date of access: 12.02.2023).

404. Safety and efficacy of repeated bone marrow mononuclear cell therapy in patients with critical limb ischemia in a pilot randomized controlled trial / B. Molavi, M. R. Zafarghandi, E. Aminizadeh [et al.] // *Arch. Iran. Med.* – 2016. – Vol. 19, N 6. – P. 388–396.

405. Safety and tolerability of intradiscal implantation of combined autologous adipose-derived mesenchymal stem cells and hyaluronic acid in patients with chronic discogenic low back pain: 1-year follow-up of a phase I study / H. Kumar, D. H. Ha, E. J. Lee [et al.]. – DOI: 10.1186/s13287-017-0710-3. – Text : electronic // *Stem Cell Res. Ther.* – 2017. – Vol. 8, N 1. – P. 262. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29141662/> (date of access: 12.02.2023).

406. Sah, S. K. Insights into superoxide dismutase 3 in regulating biological and functional properties of mesenchymal stem cells / S. K. Sah, G. Agrahari, T. Y. Kim. – DOI: 10.1186/s13578-020-00386-3. – Text : electronic // Cell Biosci. – 2020. – Vol. 10. – P. 22. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32128111/> (date of access: 12.02.2023).

407. Saidova, A. A. Lineage commitment, signaling pathways, and the cytoskeleton systems in mesenchymal stem cells / A. A. Saidova, I. A. Vorobjev. – DOI: 10.1089/ten.TEB.2019.0250. – Text : electronic // Tissue Eng. Part B Rev. – 2020. – Vol. 26, N 1. – P. 13–25. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31663422/> (date of access: 12.02.2023).

408. Secretion, migration and adhesion as key processes in the therapeutic activity of mesenchymal stem cells / M. Kot, A. Musial-Wysocka, M. Lasota [et al.]. – DOI: 10.18388/abp.2019\_2895. – Text : electronic // Acta Biochim. Pol. – 2019. – Vol. 66, N 4. – P. 499–507. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31883363/> (date of access: 12.02.2023).

409. Senescence of mesenchymal stem cells (Review) / Y. Li, Q. Wu, Y. Wang [et al.]. – DOI: 10.3892/ijmm.2017.2912. – Text : electronic // Int. J. Mol. Med. – 2017. – Vol. 39, N 4. – P. 775–782. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28290609/> (date of access: 12.02.2023).

410. Serakinci, N. Modelling mesenchymal stem cells in cancer therapy / N. Serakinci, C. Erzik. – DOI: 10.1007/978-94-017-7273-0\_14. – Text : electronic // Stem Cell Res. – 2017. – Vol. 3, N 1. – P. 7–11. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34789315/> (date of access: 12.02.2023).

411. Sevak, K. K. Generation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord tissue and their differentiation into the skeletal muscle lineage / J. K. Sevak, S. D. Gopinath. – DOI: 10.3791/63725. – Text : electronic // J. Vis. Exp. – 2022. – Vol. 186. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36121265/> (date of access: 12.02.2023).

412. Shammaa, R. Mesenchymal stem cells beyond regenerative medicine / R. Shammaa, A. E-H. El-Kadiry, J. Abusarah. – DOI: 10.3389/fcell.2020.00072. –

Text : electronic // *Front. Cell Dev. Biol.* – 2020. – Vol. 8. – P. 72. –  
 URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32133358/> (date of access: 12.02.2023).

413. Sherman, A. B. Effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and stem cell supernatant on equine corneal wound healing in vitro / A. B. Sherman, B. C. Gilger, A. K. Berglund. – DOI: 10.1186/s13287-017-0577-3. – Text : electronic // *Stem Cell Res. Ther.* – 2017. – Vol. 8, N 1. – P. 120. –  
 URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28545510/> (date of access: 12.02.2023).

414. Shirley, D. S. L. Human mesenchymal stem cells expressing erythropoietin enhance survivability of retinal neurons against oxidative stress: an in vitro study / S. L. D. Shirley, S. Kumar, M. S. Ali Khan. – DOI: 10.3389/fncel.2018.00190. – Text : electronic // *Front. Cell Neurosci.* – 2018. – Vol. 12. – P. 190. –  
 URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30108483/> (date of access: 12.02.2023).

415. Stárka, L. Non-hematogenic activity of erythropoietin / L. Stárka, M. Dušková // *Vnitr. Lek.* – 2019. – Vol. 65, N 7–8. – P. 515–519.

416. Stavely, R. The emerging antioxidant paradigm of mesenchymal stem cell therapy / R. Stavely, K. Nurgali. – DOI: 10.1002/sctm.19-0446. – Text : electronic // *Stem Cells Transl. Med.* – 2020. – Vol. 9, N 9. – P. 985–1006. –  
 URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32497410/> (date of access: 12.02.2023).

417. Stem cell therapy for diabetic foot ulcers: a review of preclinical and clinical research / L. Lopes, O. Seita, A. Aurshina [et al.]. – DOI: 10.1186/s13287-018-0938-6. – Text : electronic // *Stem Cell Res. Ther.* – 2018. – Vol 9, N 1. – P. 188. –  
 URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29996912/> (date of access: 12.02.2023).

418. Stem cell therapies for treatment of discogenic low back pain: a comprehensive review / I. Urits, A. Capuco, M. Sharma [et al.]. – DOI: 10.1007/s11916-019-0804-y. – Text : electronic // *Curr. Pain Headache Rep.* – 2019. – Vol. 23, N 9. – P. 65. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31359164/> (date of access: 12.02.2023).

419. Stem cell therapy in limb ischemia: state-of-art, perspective, and possible impacts of endometrial-derived stem cells / S. Khodayari, H. Khodayari, S. Ebrahimi-Barough [et al.]. – DOI: 10.3389/fcell.2022.834754. – Text : electronic // *Front. Cell*

Dev. Biol. – 2022. – Vol. 10. – P. 834754. –  
 URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35676930/> (date of access: 12.02.2023).

420. Stem cell therapy to promote limb function recovery in peripheral nerve damage in a rat model – experimental research / J. R. Bingham, K. R. Kniery, N. L. Jorstad [et al.]. – DOI: 10.1016/j.amsu.2019.03.009. – Text : electronic // Ann. Med. Surg. (Lond). – 2019. – Vol. 41. – P. 20–28. –  
 URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31011420/> (date of access: 12.02.2023).

421. Similarities and differences between mesenchymal stem/progenitor cells derived from various human tissues / U. Kozłowska, A. Krawczenko, K. Futoma [et al.]. – DOI: 10.4252/wjsc.v11.i6.347. – Text : electronic // World J. Stem Cells. – 2019. – Vol. 11, N 6. – P. 347–374. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31293717/> (date of access: 12.02.2023).

422. Soft substrate maintains proliferative and adipogenic differentiation potential of human mesenchymal stem cells on long-term expansion by delaying senescence / S. K. Kureel, P. Mogha, A. Khadpekar [et al.]. – DOI: 10.1242/bio.039453. – Text : electronic // Biol. Open. – 2019. – Vol. 8, N 4. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31023646/> (date of access: 12.02.2023).

423. Study the effects of mesenchymal stem cell conditioned medium injection in mouse model of acute colitis / S. Pouya, M. Heidari, K. Baghaei [et al.]. – DOI: 10.1016/j.intimp.2017.11.001. – Text : electronic // Int. Immunopharmacol. – 2018. – Vol. 54. – P. 86–94. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29112894/> (date of access: 21.03.2023).

424. Survival and function of mesenchymal stem cells (MSCs) depend on glucose to overcome exposure to long-term, severe and continuous hypoxia / M. Deshepper, K. Oudina, B. David [et al.]. – DOI: 10.1111/j.1582–4934.2010.01138.x. – Text : electronic // J. Cell. Mol. Med. – 2011. – Vol. 15, N 7. – P. 1505–1514. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20716129/> (date of access: 21.03.2023).

425. Synergistic influence of collagen I and BMP 2 drives osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells: a cell microarray analysis / S. R. Ghaemi, B. Delalat, X. Ceto [et al.]. – DOI: 10.1016/j.actbio.2015.07.027. – Text : electronic //

Acta Biomater. – 2016. – Vol. 34. – P. 41–52. –  
 URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26196081/> (date of access: 21.03.2023).

426. Systemic delivery of bone marrow mesenchymal stem cells for in situ intervertebral disc regeneration / C. Cunha, C. R. Almeida, M. I. Almeida [et al.]. – DOI: 10.5966/sctm.2016-0033. – Text : electronic // Stem Cells Transl. Med. – 2017. – Vol. 6. – P. 1029–1039. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28297581/> (date of access: 21.03.2023).

427. Tabatabaei Qomi, R. Adipose-derived stromal cell in regenerative medicine: a review / R. Tabatabaei Qomi, M. Sheykhhasan. – DOI: 10.4252/wjsc.v9.i8.107. – Text : electronic // World J. Stem Cells. – 2017. – Vol. 9, N 8. – P. 107–117. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28928907/> (date of access: 21.03.2023).

428. Taguchi, T. Influence of donor's age on immunomodulatory properties of canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells / T. Taguchi, D. L. Borjesson, C. Osmond. – DOI: 10.1089/scd.2019.0118. – Text : electronic // Stem Cells Dev. – 2019. – Vol. 28, N 23. – P. 1562–1571. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31588862/> (date of access: 21.03.2023).

429. Tan, D. Q. Reactive oxygen species and mitochondrial homeostasis as regulators of stem cell fate and function / D. Q. Tan, T. Suda. – DOI: 10.1089/ars.2017.7273. – Text : electronic // Antioxid. Redox. Signal. – 2018. – Vol. 29, N 2. – P. 149–168. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28708000/> (date of access: 21.03.2023).

430. Tanyong, D. I. Effect of tumor necrosis factor–alpha on erythropoietin and erythropoietin receptor-induced erythroid progenitor cell proliferation in  $\beta$ -thalassemia/hemoglobin patients / D. I. Tanyong, P. Panichob, W. Kheansaard. – DOI: 10.4274/tjh.2014.0079. – Text : electronic // Turk. J. Haematol. – 2015. – Vol. 32, N 4. – P. 304–310. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26376749/> (date of access: 21.03.2023).

431. TGF- $\beta$  secreted by human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells ameliorates atopic dermatitis by inhibiting secretion of TNF- $\alpha$  and IgE /

H. H. Park, S. Lee, Y. Yu [et al.]. – DOI: 10.1002/stem.3183. – Text : electronic // Stem Cells. – 2020. – Vol. 38, N 7. – P. 904–916. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32277785/> (date of access: 21.03.2023).

432. TGF- $\beta$  signaling plays an essential role in the lineage specification of mesenchymal stem/progenitor cells in fetal bone marrow / G. Abou-Ezzi, T. Supakorndej, J. Zhang [et al.]. – DOI: 10.1016/j.stemcr.2019.05.017. – Text : electronic // Stem Cell Reports. – 2019. – Vol. 13, N 1. – P. 48–60. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31204302/> (date of access: 21.03.2023).

433. TGF- $\beta$ 3 improves bone mesenchymal stem cells toward chondrogenic differentiation under hypoxia environment / Y. T. Lu, L. S. Wei, Z. Y. Wang [et al.]. – DOI: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2018.27.015. – Text : electronic // Zhonghua Yi Xue Za Zhi. – 2018. – Vol. 98, N 27. – P. 2198–2202. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30032526/> (date of access: 21.03.2023).

434. Testing the paracrine properties of human mesenchymal stem cells using conditioned medium / P. Danieli, G. Malpasso, M. C. Ciuffreda [et al.]. – DOI: 10.1007/978-1-4939-3584-0\_26. – Text : electronic // Methods Mol. Biol. – 2016. – Vol. 1416. – P. 445–456. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27236688/> (date of access: 21.03.2023).

435. The efficacy of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and/or erythropoietin in ameliorating kidney damage in gamma irradiated rats: Role of non-hematopoietic erythropoietin anti-apoptotic signaling / M. E. Asker, S. I. Ali, S. H. Mohamed [et al.]. – DOI: 10.1016/j.lfs.2021.119388. – Text : electronic // Life Sci. – 2021. – Vol. 275. – P. 119388. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33774028/> (date of access: 21.03.2023).

436. The chemokine receptors Ccr5 and Cxcr6 enhance migration of mesenchymal stem cells into the degenerating retina / M. Pesaresi, S. A. Bonilla-Pons, R. Sebastian-Perez [et al.]. – DOI: 10.1016/j.ymthe.2020.10.026. – Text : electronic // Mol. Ther. – 2021. – Vol. 29, N 2. – P. 804–821. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33264643/> (date of access: 21.03.2023).

437. The cytokine secretion profile of mesenchymal stromal cells is determined by surface structure of the microenvironment / D. G. Leuning, N. R. M. Beijer, N. A. du Fosse [et al.]. – DOI: 10.1038/s41598-018-25700-5. – Text : electronic // Sci. Rep. – 2018. – Vol. 8, N 1. – P. 7716. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29769543/> (date of access: 21.03.2023).

438. The effect of high glucose on the biological characteristics of nucleus pulposus-derived mesenchymal stem cells / Y. Liu, Y. Li, L. P. Nan [et al.]. – DOI: 10.1002/cbf.344.1. – Text : electronic // Cell Biochem. Funct. – 2020. – Vol. 38, N 2. – P. 130–140. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31957071/> (date of access: 21.03.2023).

439. The erythropoietin receptor is a downstream effector of Klotho-induced cytoprotection / M. C. Hu, M. Shi, H. J. Cho [et al.]. – DOI: 10.1038/ki.2013.149. – Text : electronic // Kidney Int. – 2013. – Vol. 84, N 3. – P. 468–81. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23636173/> (date of access: 21.03.2023).

440. The effect of erythropoietin on autologous stem cell-mediated bone regeneration / A. M. Nair, Y. T. Tsai, K. M. Shah [et al.]. – DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.06.031. – Text : electronic // Biomaterials. – 2013. – Vol. 34, N 30. – P. 7364–7371. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23831188/> (date of access: 21.03.2023).

441. The effect of erythropoietin and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on nerve regeneration in rats with sciatic nerve injury / M. Ülger, G. Sezer, İ. Özyazga [et al.]. – DOI: 10.1016/j.jchemneu.2021.101958. – Text : electronic // J. Chem. Neuroanat. – 2021. – Vol. 114. – P. 101958. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33864937/> (date of access: 21.03.2023).

442. The effects of IGF-1 and erythropoietin on apoptosis and telomerase activity in necrotizing enterocolitis model / M. Akisu, B. Durmaz, O. A. Koroglu [et al.]. – DOI: 10.1038/s41390-020-01195-7. – Text : electronic // Pediatr. Res. – 2021. – Vol. 90, N 3. – P. 559–564. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33096541/> (date of access: 21.03.2023).

443. The immunomodulatory effects of adipose-derived mesenchymal stem cells and mesenchymal stem cells-conditioned medium in chronic colitis / M. Heidari, S. Pouya, K. Baghaei [et al.]. – DOI: 10.1002/jcp.26765. – Text : electronic // *J. Cell Physiol.* – 2018. – Vol. 233, N 11. – P. 8754–8766. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29797577/> (date of access: 21.03.2023).

444. The influence of hypoxia and IFN- $\gamma$  on the proteome and metabolome of therapeutic mesenchymal stem cells / H. M. Wobma, M. A. Tamargo, S. Goeta [et al.]. – DOI: 10.1016/j.biomaterials.2018.03.027. – Text : electronic // *Biomaterials.* – 2018. – Vol. 167. – P. 226–234. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29574308/> (date of access: 21.03.2023).

445. The influence of rat mesenchymal stem cell CD44 surface markers on cell growth, fibronectin expression, and cardiomyogenic differentiation on silk fibroin-hyaluronic acid cardiac patches / M. C. Yang, N. H. Chi, N. K. Chou [et al.]. – DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.09.096. – Text : electronic // *Biomaterials.* – 2010. – Vol. 31, N 5. – P. 854–862. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19857893/> (date of access: 21.03.2023).

446. The neuroprotective effect of erythropoietin on rotenone-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells through the induction of autophagy / W. Jang, H. J. Kim, H. Li [et al.]. – DOI: 10.1007/s12035-015-9316-x. – Text : electronic // *Mol. Neurobiol.* – 2016. – Vol. 53, N 6. – P. 3812–3821. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26156288/> (date of access: 21.03.2023).

447. The neuroprotective effect of erythropoietin on rotenone-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells through the induction of autophagy / W. Jang, H. J. Kim, K. D. Jo [et al.]. – DOI: 10.1007/s12035-015-9316-x. – Text : electronic // *Mol. Neurobiol.* – 2015. – Vol. 53, N 6. – P. 3812–3821. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26156288/> (date of access: 21.03.2023).

448. The neuroprotective effects of human bone marrow mesenchymal stem cells are dose-dependent in TNBS colitis / A. M. Robinson, A. A. Rahman, S. Miller [et al.]. – DOI: 10.1186/s13287-017-0540-3. – Text : electronic // *Stem Cell Res. Ther.*

– 2017. – Vol. 8, N 1. – P. 87. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28420434/> (date of access: 21.03.2023).

449. The potential of menstrual blood-derived mesenchymal stem cells for cartilage repair and regeneration: novel aspects / I. Uzieliene, G. Urbonaite, Z. Tachtamisevaite [et al.]. – DOI: /10.1155/2018/5748126. – Text : electronic // *Stem Cells Int.* – 2018. – 2018. – N 5748126. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30627174/> (date of access: 21.03.2023).

450. The therapeutic efficacy of tonsil-derived mesenchymal stem cells in dextran sulfate sodium-induced acute murine colitis model / E. M. Song, S. A. Jung, K. E. Lee [et al.]. – DOI: 10.4166/kjg.2017.69.2.119. – Text : electronic // *Korean J. Gastroenterol.* – 2017. – Vol. 69, N 2. – P. 119–128. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28239080/> (date of access: 21.03.2023).

451. The use of peripheral blood-derived stem cells for cartilage repair and regeneration in vivo: a review / Y. R. Chen, X. Yan, F. Z. Yuan [et al.]. – DOI: 10.3389/fphar.2020.00404. – Text : electronic // *Front. Pharmacol.* – 2020. – Vol. 11. – P. 404. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32308625/> (date of access: 21.03.2023).

452. Therapeutic angiogenesis-based strategy for peripheral artery disease / J. Han, L. Luo, O. Marcelina [et al.]. – DOI: 10.7150/thno.74785. – Text : electronic // *Theranostics.* – 2022. – Vol. 12, N 11. – P. 5015–5033. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35836800/> (date of access: 21.03.2023).

453. Therapeutic effect of bone marrow mesenchymal stem cells on laser-induced retinal injury in mice / Y. Jiang, Y. Zhang, L. Zhang [et al.]. – DOI: 10.3390/ijms15069372. – Text : electronic // *Int. J. Mol. Sci.* – 2014. – Vol. 15. – P. 9372–9385. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24871366/> (date of access: 21.03.2023).

454. Therapeutic effects of human adipose-derived products on impaired wound healing in irradiated tissue / S. H. Wu, T. Shirado, T. Mashiko [et al.]. – DOI: 10.1097/PRS.0000000000004609. – Text : electronic // *Plast. Reconstr. Surg.* –

2018. – Vol. 142, N 2. – P. 383–391. –  
 URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29787514/> (date of access: 21.03.2023).

455. Therapeutic effects of human amnion-derived mesenchymal stem cell transplantation and conditioned medium enema in rats with trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis / S. Miyamoto, S. Ohnishi, R. Onishi [et al.] // *Am. J. Transl. Res.* – 2017. – Vol. 9, N 3. – P. 940–952.

456. Therapeutic effect of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on injured rat endometrium during its chronic phase / L. Zhang, Y. Li, C. Y. Guan [et al.]. – DOI: 10.1186/s13287-018-0777-5. – Text : electronic // *Stem Cell Res. Ther.* – 2018. – Vol. 9, N 1. – P. 36. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29433563/> (date of access: 21.03.2023).

457. Therapeutic effects of Wharton jelly-derived mesenchymal stem cells on rat abortion models / X. Chen, X. Yang, R. Wu [et al.]. – DOI: 10.1111/jog.12984. – Text : electronic // *J. Obst. Gynaecol. Res.* – 2016. – Vol. 42, N 8. – P. 972–982. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27147487/> (date of access: 21.03.2023).

458. Therapeutic potential of mesenchymal stem cell-secreted factors on delay in corneal wound healing by nitrogen mustard / S. An, X. Shen, K. Anwar [et al.]. – DOI: 10.3390/ijms231911510. – Text : electronic // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – Vol. 23, N 19. – P. 11610. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36232805/> (date of access: 21.03.2023).

459. Therapeutic potential of mesenchymal stromal cells for hypoxic ischemic encephalopathy: a systematic review and meta-analysis of preclinical studies / J. Archambault, A. Moreira, D. McDaniel [et al.]. – DOI: 10.1371/journal.pone.0189895. – Text : electronic // *PLoS ONE.* – 2017. – Vol. 12, N 12. – P. e0189895. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29261798/> (date of access: 21.03.2023).

460. Therapeutic potential of secreted molecules derived from human amniotic fluid mesenchymal stem/stromal cells in a mice model of colitis / E. Legaki, M. G. Roubelakis, G. E. Theodoropoulos [et al.]. – DOI: 10.1007/s12015-016-9677-1. –

Text : electronic // Stem Cell Rev. – 2016. – Vol. 12, N 5. – P. 604–612. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27503204/> (date of access: 21.03.2023).

461. Thy 1(CD90) controls adipogenesis by regulating activity of Src family kinase, Fyn / C. F. Woeller, C. W. O’Loughlin, S. J. Pollock [et al.]. – DOI: 10.1096/fj.14-257121. – Text : electronic // FASEB J. – 2015. – Vol. 29, N 3. – P. 920–931. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25416548/> (date of access: 21.03.2023).

462. Timing of erythropoietin modified mesenchymal stromal cell transplantation for the treatment of experimental bronchopulmonary dysplasia / Z. Zhang, C. Sun, J. Wang [et al.]. – DOI: 10.1111/jcmm.13843. – Text : electronic // J. Cell. Mol. Med. – 2018. – Vol. 22, N 11. – P. 5759–5763. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30160360/> (date of access: 21.03.2023).

463. TNF- $\alpha$  enhances vascular cell adhesion molecule-1 expression in human bone marrow mesenchymal stem cells via NF- $\kappa$ B, ERK and JNK signaling pathways / Z. Y. Lu, W. C. Chen, Y. H. Li [et al.]. – DOI: 10.3892/mmr.2016.5314. – Text : electronic // Mol. Med. Rep. – 2016. – Vol. 14, N 1. – P. 643–648. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27221006/> (date of access: 21.03.2023).

464. TNF- $\alpha$  promotes tumor lymph angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma through regulation of ERK3 / C. Zhang, M. Zhu, W. Wang [et al.]. – DOI: 10.21037/tcr.2019.09.60. – Text : electronic // Transl. Cancer Res. – 2019. – Vol. 8, N 6. – P. 2439–2448. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21670304/> (date of access: 21.03.2023).

465. Transplantation site affects the outcomes of adipose-derived stem cell-based therapy for retinal degeneration / C. Hu, H. La, X. Wei [et al.]. – DOI: 10.1155/2020/9625798. – Text : electronic // Stem Cells Int. – 2020. – Vol. 2020. – N 9625798. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32377204/> (date of access: 21.03.2023).

466. Transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells facilitates epithelial repair and relieves the impairment of gastrointestinal function in a rat model of enteritis / B. Qu, H. Y. Jiang, B. B. Wang [et al.]. –

DOI: 10.1016/j.clinre.2014.07.015. – Text : electronic // Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol. – 2015. – Vol. 39, N 1. – P. 114–120. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25511921/> (date of access: 21.03.2023).

467. Treatment of lumbar degenerative disc disease-associated radicular pain with culture-expanded autologous mesenchymal stem cells: a pilot study on safety and efficacy / C. Centeno, J. Markle, E. Dodson [et al.]. – DOI: 10.1186/s12967-017-1300-y. – Text : electronic // J. Transl. Med. – 2017. – Vol. 15, N 1. – P. 197. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28938891/> (date of access: 21.03.2023).

468. Tsiftoglou, A. S. Erythropoietin (EPO) as a key regulator of erythropoiesis, bone remodeling and endothelial of multipotent mesenchymal stem cells (MSCs): implications in regenerative medicine / A. S. Tsiftoglou. – DOI: 10.3390/cells10082140. – Text : electronic // Cells. – 2021. – Vol. 10, N 8. – P. 2140. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34440909/> (date of access: 21.03.2023).

469. Turinetti, V. Senescence in human mesenchymal stem cells: functional changes and implications in stem cell-based therapy / V. Turinetti, E. Vitale, C. Giachino. – DOI: 10.3390/ijms17071164. – Text : electronic // Int. J. Mol. Sci. – 2016. – Vol. 17, N 7. – P. 1164. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27447618/> (date of access: 21.03.2023).

470. TAZP plays an inhibitory role in the self-renewal of porcine mesenchymal stromal cells and is implicated the regulation of premature senescence via the p53 pathway / Y. N. Bie, P. Gu, Y. T. Chen [et al.]. – DOI: 10.1186/s12967-019-1820-8. – Text : electronic // J. Transl. Med. – 2019. – Vol. 17, N 1. – P. 72. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30845965/> (date of access: 21.03.2023).

471. Ullah, M. Mesenchymal stromal cell homing: mechanisms and strategies for improvement / M. Ullah, A. S. Thakor. – DOI: 10.1016/j.isci.2019.05.004. – Text : electronic // iScience. – 2019. – Vol. 15. – P. 421–438. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31121468/> (date of access: 21.03.2023).

472. Umbilical cord mesenchyme stem cell local intramuscular injection for treatment of uterine niche: protocol for a prospective, randomized, double-blinded,

placebo-controlled clinical trial / D. Fan, S. Wu, S. Ye [et al.]. – DOI: 10.1097/MD.00000000000008480. – Text : electronic // *Medicine (Baltimore)*. – 2017. – Vol. 96, N 44. – P. e08480. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29095305/> (date of access: 21.03.2023).

473. Umbilical cord mesenchymal stem cells modulate dextran sulfate sodium induced acute colitis in immunodeficient mice / A. Banerjee, D. Bizzaro, P. Burra [et al.]. – DOI: 10.1186/s13287-015-0073-6. – Text : electronic // *Stem Cell Res. Ther.* – 2015. – Vol. 6, N 1. – P. 79. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25890182/> (date of access: 21.03.2023).

474. Urine-derived stem cells: applications in regenerative and predictive medicine / G. Bento, A. K. Shafigullina, A. A. Rizvanov [et al.]. – DOI: 10.3390/cells9030573. – Text : electronic // *Cells*. – 2020. – Vol. 9, N 3. – P. 573. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32121221/> (date of access: 21.03.2023).

475. Use of adipose-derived stem cells to support topical skin adhesive for wound closure: a preliminary report from animal in vivo study / M. Nowacki, K. Pietkun, A. Jundzill [et al.]. – DOI: 10.1155/2016/2505601. – Text : electronic // *Biomed. Res. Int.* – 2016. – 2016. – N 2505601. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27803921/> (date of access: 21.03.2023).

476. Use of autologous human mesenchymal stromal cell/fibrin clot constructs in upper limb non-unions: long-term assessment / S. Giannotti, L. Trombi, V. Bottai [et al.]. – DOI: 10.1371/journal.pone.0073893. – Text : electronic // *PLoS ONE*. – 2013. – Vol. 8, N 8. – P. e73893. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24023694/> (date of access: 21.03.2023).

477. Uversky, V. N. Erythropoietin and Co.: Intrinsic structure and functional disorder / V. N. Uversky, E. M. Redwan. – DOI: 10.1039/c6mb00657d. – Text : electronic // *Mol. Biosyst.* – 2016. – Vol. 13, N 1. – P. 56–72. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27833947/> (date of access: 21.03.2023).

478. VEGF secreted by mesenchymal stem cells mediates the differentiation of endothelial progenitor cells into endothelial cells via paracrine mechanisms / Q. Ge, H. Zhang, J. Hou [et al.]. – DOI: 10.3892/mmr.2017.8059. – Text : electronic // *Mol.*

Med. Rep. – 2018. – Vol. 17, N 1. – P. 1667–1675. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29138837/> (date of access: 21.03.2023).

479. Verstock, B. New treatment options for inflammatory bowel diseases / B. Verstock, M. Ferrante, S. Vermeire. – DOI: 10.1007/s00535-018-1449-z. – Text : electronic // J. Gastroenterol. – 2018. – Vol. 53, N 5. – P. 585–590. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29556726/> (date of access: 21.03.2023).

480. Vimentin-induced cardiac mesenchymal stem cells proliferate in the acute ischemic myocardium / C. Klopsch, R. Gaebel, H. Lemcke [et al.]. – DOI: 10.1159/000495527. – Text : electronic // Cells Tissues Organs. – 2018. – Vol. 206, N 1–2. – P. 35–45. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30630170/> (date of access: 21.03.2023).

481. Wan, J. Effect of different transplantations with bone–marrow derived mesenchymal stem cells on diabetic foot ulcers in rats / J. Wan, Q. Cai, Y. Liu. – DOI: 10.3969/j.issn.1672–7347.2013.04.003. – Text : electronic // Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. – 2013. – Vol. 38. – P. 347–355. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23645234/> (date of access: 21.03.2023).

482. Wan, J. Transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells promotes delayed wound healing in diabetic rats / J. Wan, L. Xia, W. Lian. – DOI: 10.1155/2013/647107. – Text : electronic // J. Diabetes Res. – 2013. – Vol. 2013. – N 647107. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23671884/> (date of access: 21.03.2023).

483. Wang, C. TGF-beta signaling-dependent alleviation of dextran sulfate sodium-induced colitis by mesenchymal stem cell transplantation / C. Wang, J. Chen, Y. Liu. – DOI: 10.1007/s11033-014-3364-6. – Text : electronic // Mol. Biol. Rep. – 2014. – Vol. 41, N 8. – P. 4977–4983. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24737572/> (date of access: 21.03.2023).

484. Wang, Y. Human amnion-derived mesenchymal stem cells induced osteogenesis and angiogenesis in human adipose-derived stem cells via ERK1/2 MAPK signaling pathway / Y. Wang, X. Chen, Y. Yin. – DOI: 10.5483/bmbrep.2018.51.4.005.

– Text : electronic // BMB Rep. – 2018. – Vol. 51, N 4. – P. 194–199. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29429450/> (date of access: 21.03.2023).

485. Wang, Y. Influence of erythropoietin on microvesicles derived from mesenchymal stem cells protecting renal function of chronic kidney disease / Y. Wang, X. Lu, J. He. – DOI: 10.1186/s13287-015-0095-0. – Text : electronic // Stem Cell Res. Ther. – 2015. – Vol. 6, N 1. – P. 100. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25998259/> (date of access: 21.03.2023).

486. Wang, L. L. Effect of human umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation in a rat model of preeclampsia / L. L. Wang, Y. Yu, H. B. Guan. – DOI: 10.1177/1933719116630417. – Text : electronic // Reprod. Sci. – 2016. – Vol. 23, N 8. – P. 1058–1070. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26887428/> (date of access: 21.03.2023).

487. What's is the impact of human umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation on clinical treatment? / Q. Xie, R. Liu, J. Jing [et al.]. – DOI: 10.1186/s13287-020-02011-z. – Text : electronic // Stem Cell Res. Ther. – 2020. – Vol. 11, N 1. – P. 519. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33261658/> (date of access: 21.03.2023).

488. Wnt signaling regulates the proliferation potential and lineage commitment of human umbilical cord derived mesenchymal stem cells / G. Jothimani, R. Di Liddo, S. Pathak [et al.]. – DOI: 10.1007/s11033-019-05232-5. – Text : electronic // Mol. Biol. Rep. – 2020. – Vol. 47, N 2. – P. 1293–1308. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31853765/> (date of access: 21.03.2023).

489. Wnt7b-induced Sox11 functions enhance self-renewal and osteogenic commitment of bone marrow mesenchymal stem cells / F. Yu, F. Wu, F. Li [et al.]. – DOI: 10.1002/stem.3192. – Text : electronic // Stem Cells. – 2020. – Vol. 38, N 8. – P. 1020–1033. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32346881/> (date of access: 21.03.2023).

490. Wu, K. C. Transplanting human umbilical cord mesenchymal stem cells and hyaluronate hydrogel repairs cartilage of osteoarthritis in the minipig model / K. C. Wu, Y. H. Chang, H. W. Liu. – DOI: 10.4103/tcmj.tcmj\_87\_18. – Text :

electronic // *Ci Ji Yi Xue Za Zhi.* – 2019. – Vol. 31, N 1. – P. 11–19. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30692826/> (date of access: 21.03.2023).

491. Xenogeneic mesenchymal stromal cells improve wound healing and modulate the immune response in an extensive burn model / C. Caliari-Oliveira, J. N. Yaochite, L. N. Ramalho [et al.]. – DOI: 10.3727/096368915X688128. – Text : electronic // *Cell Transplant.* – 2016. – Vol. 25, N 2. – P. 201–215. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25955320/> (date of access: 21.03.2023).

492. Xie, N. Transplantation of placenta-derived mesenchymal stem cells enhances angiogenesis after ischemic limb injury in mice / N. Xie, Z. Li, T. M. Adesanya. – DOI: 10.1111/jcmm.12489. – Text : electronic // *J. Cell. Mol. Med.* – 2015. – Vol. 1. – P. 29–37. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26282458/> (date of access: 21.03.2023).

493. Xuan, Z. Sources, selection, and microenvironmental preconditioning of cells for urethral tissue engineering / Z. Xuan, V. Zachar, C. P. Pennisi. – DOI: 10.3390/ijms232214074. – Text : electronic // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – Vol. 23, N 22. – P. 14074. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36430557/> (date of access: 21.03.2023).

494. Yamada, Y. Diagnostic cytokines and comparative analysis secreted from exfoliated deciduous teeth, dental pulp, and bone marrow derived mesenchymal stem cells for functional cell-based therapy / Y. Yamada, S. Nakamura-Yamada, E. Umemura-Kubota. – DOI: 10.2290/ijms20235900. – Text : electronic // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – Vol. 20, N 35. – P. 5900. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31771293/> (date of access: 21.03.2023).

495. Yamazaki, K. Clinical trials of stem cell treatment for spinal cord injury / K. Yamazaki, M. Kawabor, T. Seki. – DOI: 10.3390/ijms21113994. – Text : electronic // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol. 21, N 11. – P. 3994. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32498423/> (date of access: 21.03.2023).

496. YAP as a key regulator of adipo-osteogenic differentiation in human MSCs / C. Lorthongpanich, K. Thumanu, K. Tangkiettrakul [et al.]. – DOI: 10.1186/s13287-

019-1494-4. – Text : electronic // Stem Cell Res. Ther. – 2019. – Vol. 10, N 1. – P. 402. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31852542/> (date of access: 21.03.2023).

497. Ye, Y. Notch-1 inhibition reduces proliferation and promotes osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells / Y. Ye, L. Zou. – DOI: 10.3892/etm.2019.7765. – Text : electronic // Exp. Ther. Med. – 2019. – Vol. 18, N 3. – P. 1884–1890. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31410150/> (date of access: 21.03.2023).

498. Zakrzewski, W. Stem cells: past, present, and future / W. Zakrzewski, M. Dobrzynski, M. Szymonowicz. – DOI: 10.1186/s13287-019-1165-5. – Text : electronic // Stem Cell Res. Ther. – 2019. – Vol. 10, N 1. – P. 69. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30808416/> (date of access: 21.03.2023).

499. Zeckser, J. Multipotent mesenchymal stem cell treatment for discogenic low back pain and disc degeneration / J. Zeckser, M. Wolff, J. Tucker. – DOI: /10.1155/2016/3908389. – Text : electronic // Stem Cells Int. – 2016. – Vol. 2016. – N 3908389. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26880958/> (date of access: 21.03.2023).

500. Zhang, J. Increased growth factors play a role in wound healing promoted by noninvasive oxygen-ozone therapy in diabetic patients with foot ulcers / J. Zhang, M. Guan, C. Xie. – DOI: 10.1155/2014/273475. – Text : electronic // Oxid. Med. Cell. Longev. – 2014. – Vol. 2014. – N 273475. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25089169/> (date of access: 21.03.2023).

501. Zhang, S. Effect of platelet-rich plasma on the activity of human menstrual blood-derived stromal cells in vitro / S. Zhang, P. Li, Z. Yuan. – DOI: 10.1186/s13287-018-0795-3. – Text : electronic // Stem Cell Res. Ther. – 2018. – Vol. 9, N 1. – P. 48. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29482651/> (date of access: 21.03.2023).

502. Zhang, S. Erythropoietin modification enhances the protection of mesenchymal stem cells on diabetic rat-derived Schwann cells: implications for diabetic neuropathy / S. Zhang, B. Shi. – DOI: 10.1155/2017/6352858. – Text : electronic // Biomed. Res. Int. – 2017. – Vol. 2017. – N 6352858. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28299330/> (date of access: 21.03.2023).

503. Zhao, A. G. Comparative analysis of extracellular vesicles isolated from human mesenchymal stem cells by different isolation methods and visualization of their uptake / A. G. Zhao, K. Shah, B. Cromer. – DOI: 10.1016/j.yexcr.2022.113097. – Text : electronic // *Exp. Cell Res.* – 2022. – Vol. 414, N 2. – P. 113097. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35276207/> (date of access: 21.03.2023).

504. Zhao, A. G. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles and their therapeutic potential / A. G. Zhao, K. Shah, B. Cromer. – DOI: 10.1155/2020/8825771. – Text : electronic // *Stem Cells Int.* – 2020. – Vol. 2020. – N 8825771. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32908543/> (date of access: 21.03.2023).

505. Zhou, J. Inhibiting PPAR $\gamma$  by erythropoietin while upregulating TAZ by IGF1 synergistically promote osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells / J. Zhou, F. Wei, Y. Ma. – DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.07.049. – Text : electronic // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2016. – Vol. 478, N 1. – P. 349–355. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27422606/> (date of access: 21.03.2023).

## СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

1. Рисунок 1 – Эффекты сигнальных путей на МСК. . . . . С. 37
2. Рисунок 2 – Канонический (ЭПО/ЭПОР) и неканонический (ЭПОР/CD131) пути реализации эффектов ЭПО на клетки. . . . . С. 64
3. Рисунок 3 – Дизайн исследования. . . . . С. 79
4. Рисунок 4 – Дизайн оценки морфофункциональных свойств клеток костного мозга человека и крыс. . . . . С. 801
5. Рисунок 5 – Дизайн исследований при ишемии задней левой конечности у крыс Wistar. . . . . С. 81
6. Рисунок 6 – Дизайн исследования при дегенерации межпозвонкового диска у крыс Wistar. . . . . С. 83
7. Рисунок 7 – Морфология мезенхимных стволовых клеток костного мозга человека на 4-ом пассаже (А) и способность к дифференцировке в адипоциты (Б, масляный красный О и гематоксилин-эозин), остеобласты (В, по Ван Косса и гематоксилин-эозин) и хондроциты (Г, толуидиновый синий), ув. × 40. . . . . С. 101
8. Рисунок 8 – Фенотип первичной культуры мезенхимных стволовых клеток костного мозга человека (4-й пассаж). . . . . С. 102
9. Рисунок 9 – Морфология прилипшей фракции ядродержащих клеток костного мозга крыс-самцов Wistar. А – прилипшая к пластику фракция клеток костного мозга через 72 часа (колониеобразующая единица клеток, клетки веретенообразной формы и единичные клетки с овальной формой), ув. × 10; Б – монослой из в фибробластоподобных клеток на 13–17-е сутки, ув. × 10; В – фибробластоподобные клеток с одним и двумя ядрами (делящиеся клетки с фигурами митоза), ув. × 40. . . . . С. 105
10. Рисунок 10 – Экспрессия в мезенхимных стволовых клетках костного мозга крыс CD90 (А, клетки красного цвета), Collagen I

- (Б, клетки зеленого цвета), Fibronectin (В, клетки красного цвета), Vimentin (Г, клетки зеленого цвета),  $\alpha$ -SMA (Д, клетки зеленого цвета), von Willebrand factor (Е, клетки красного цвета) по данным иммуногистохимического исследования, ув.  $\times 20$ . Ядра клеток окрашены DAPI (синий цвет) . . . . . С. 107
11. Рисунок 11 – Пролиферативный потенциал мезенхимных стволовых клеток костного мозга крыс. А – колониеобразующие единицы (метиленовый синий); Б – внутриклеточная активность НАДФ-Н-зависимых оксидоредуктаз (происходит преобразование МТТ в формазан), ув.  $\times 40$ . . . . . С. 108
12. Рисунок 12 – Адипогенная (А, масляный красный О и гематоксилин-эозин), остеогенная (Б, по Ван Косса и гематоксилин-эозин) и хондрогенная (В, тулоидиновый синий) дифференцировка мезенхимных стволовых клеток костного мозга крыс, ув.  $\times 40$ . . . . . С. 108
13. Рисунок 13 – Визуализация апоптоза мезенхимных стволовых клеток костного мозга человека (4-й пассаж) витальными красителями (акридиновым оранжевым и этидиум бромидом 1:1), ув.  $\times 40$ . Живые клетки – ядро и цитоплазма зеленого цвета, апоптоз/некроз – ядро желто/красного цвета, цитоплазма зеленого цвета. В данном случае все клетки без признаков апоптоза/некроза С. 115
14. Рисунок 14 – Пролиферация мезенхимных стволовых костного мозга клеток человека (4-й пассаж) в норме, при индукции окислительного стресса и добавлении ЭПО в питательную среду. . С. 116
15. Рисунок 15 – Показатели колониеобразования мезенхимных стволовых клеток костного мозга человека (4-й пассаж) без ЭПО и с добавлением в питательную среду ЭПО. . . . . С. 117
16. Рисунок 16 – Апоптоз/некроз мезенхимных стволовых клеток костного мозга крыс в норме и при дефиците ростовых факторов

- (0 % FCS) ..... С. 118
17. Рисунок 17 – Клеточный цикл мезенхимных стволовых клеток костного мозга крыс в норме и при дефиците ростовых факторов (0 % FCS) ..... С. 119
18. Рисунок 18 – Пролиферация мезенхимных стволовых клеток костного мозга крыс по данным клеточного импеданса (режим реального времени) в ответ на ЭПО. 5 % FCS – красная линия; 3 % FCS – зеленая линия; 33,4 МЕ/мл ЭПО – синяя линия; 66,8 МЕ/мл ЭПО – голубая линия; 100 МЕ/мл ЭПО – розовая линия. .... С. 120
19. Рисунок 19 – Пролиферация мезенхимных стволовых клеток костного мозга крыс по данным клеточного импеданса в режиме реального времени в ответ на 33,4 МЕ/ мл ЭПО (зеленая линия) и минимальное содержание ростовых факторов в питательной среде (красная линия, 1 % FCS) ..... С. 121
20. Рисунок 20 – Пролиферация мезенхимных стволовых клеток костного мозга крыс по данным клеточного импеданса в режиме реального времени при культивировании в питательной среде с 10 % FCS (красная линия) и с добавлением 33,4 МЕ/мл ЭПО (зеленая линия) ..... С. 122
21. Рисунок 21 – Миграция мезенхимных стволовых клеток костного мозга крыс по данным клеточного импеданса в режиме реального времени при культивировании в питательной среде с 10 % FCS (красная линия) и с добавлением 33,4 МЕ/мл ЭПО (зеленая линия) С. 123
22. Рисунок 22 – Пролиферация низким уровнем D – глюкозы (11 мМ) в питательной среде, окислительном стрессе и добавлении 33,4 МЕ/мл ЭПО. .... С. 124
23. Рисунок 23 – Пролиферация мезенхимных стволовых клеток костного мозга крыс *in vitro* в условиях с более высоким уровнем D-глюкозы (25 мМ) в питательной среде, окислительном стрессе и

- добавлении 33,4 МЕ/мл ЭПО. . . . . С. 125
24. Рисунок 24 – Апоптоз/некроз МСК (А, 8 –й пассаж) и МСК–ЭПО (Б, 3-й пассаж) костного мозга человека по данным витальной окраски акридиновым оранжевым и этидиум бромидом, ув.  $\times 20$ . Слева – стандартное условие культивирования, справа – при окислительном стрессе. Живые клетки ядро и цитоплазма зеленого цвета. Апоптоз/некроз – ядро желто/красного цвета. . . . . С. 133
25. Рисунок 25 – Микрофотографии пролиферативной активности МСК (8-й пассаж) и МСК–ЭПО (3-й пассаж) костного мозга человека по данным МТТ–теста (клетки фиолетового цвета, ув.  $\times 10$ ). А – спонтанная; Б – ЭПО (33,4 МЕ/мл); В – окислительный стресс (100 мкМ перекисью водорода); Г – окислительный стресс+ЭПО; Д – 64 мМ D-глюкозы; Е – 64 мМ D-глюкозы +ЭПО. . . . . С. 136
26. Рисунок 26 – Пролиферативный потенциал МСК (А, 8-й пассаж) и МСК–ЭПО (Б, 3-й пассаж) костного мозга человека по данным клеточного импеданса в «режиме реального» времени. Красная линия – МСК и МСК–ЭПО базальная пролиферация; зеленая линия – МСК и МСК–ЭПО пролиферация при наличии ЭПО; синяя линия – МСК и МСК–ЭПО при 0 % FCS; розовая линия – МСК и МСК–ЭПО при 0 % FCS+ЭПО; голубая линия – МСК и МСК–ЭПО при окислительном стрессе; фиолетовая линия – МСК и МСК–ЭПО при окислительном стрессе+ЭПО; оранжевая линия – МСК и МСК–ЭПО при 64 мМ D-глюкозы; темно-зеленая линия – МСК и МСК–ЭПО при 64 мМ D-глюкозы+ЭПО. . . . . С. 138
27. Рисунок 27 – Миграционный потенциал МСК (8-й пассаж) костного мозга человека в тесте «заживления раны», ув.  $\times 10$ . А – стандартные условия культивирования клеток; Б – с ЭПО, В – 64 мМ D-глюкозы; Г – 64 мМ D-глюкозы +ЭПО; Д – при

- окислительном стрессе; Е – окислительный стресс+ЭПО. . . . . С. 139
28. Рисунок 28 – Миграционный потенциал МСК–ЭПО (3-й пассаж) костного мозга человека в тесте «заживления раны», ув.  $\times 10$ . А – стандартные условия культивирования клеток; Б – с ЭПО; В – 64 мМ D-глюкозы; Г – 64 мМ D-глюкозы+ЭПО; Д – при окислительном стрессе; Е – окислительный стресс+ЭПО. . . . . С. 142
29. Рисунок 29 – Показатель аутофагии МСК (8-й пассаж) и МСК–ЭПО (3-й пассаж) костного мозга человека. А – аутофагия МСК на 8-ом пассаже, ув.  $\times 20$ ; Б – аутофагия МСК–ЭПО на 3-м пассаже, ув.  $\times 20$ . Ядра клеток синего цвета (DAPI), аутофагосомы зеленого цвета (LC3B). . . . . С. 149
30. Рисунок 30 – Морфология МСК (8-й пассаж) и МСК–ЭПО (3-й пассаж) костного мозга человека на полутонких срезах, световая микроскопия (ув.  $\times 1\,000$ , толуидиновый синий). А – микрофотография полутонкого среза МСК, стрелкой выделена клетка с фигурой митоза; Б – микрофотография полутонкого среза МСК, стрелкой выделена клетка с морфологическими признаками апоптоза (округлая клетка с фрагмента ядра); В – микрофотография полутонкого среза МСК–ЭПО, стрелкой выделена клетка с фигурой митоза. . . . . С. 150
31. Рисунок 31 – Морфология МСК (8-й пассаж) и МСК–ЭПО (3-й пассаж) костного мозга человека на ультратонких срезах, электронная микроскопия (ацетат уранила и цитрат свинца, ув.  $\times 16\,000$ ). А – микрофотография фрагмента МСК; Б – микрофотография фрагмента МСК–ЭПО; В – показатели объемной плотности гранулярного эндоплазматического ретикулума (ГЭР) и количества полисом. . . . . С. 151
32. Рисунок 32 – Параметры микроциркуляции в левой задней стопе крыс до моделирования ишемии конечности. А) М показатель

- микроциркуляции, LF амплитуда медленных колебаний, отражающих активность собственных компонентов микроциркуляторного русла; Б) HF амплитуда быстрых колебаний, совпадающих с дыхательным ритмом и зависящих от колебаний венозного кровотока в связи с изменением давления в грудной клетке в фазы вдоха и выдоха; В) CF – амплитуда пульсовых колебаний, совпадающих с пульсовым колебанием кровотока; Г) ACF/ALF – соотношение амплитуды кардиоритма и медленных колебаний, ANF/ALF – соотношение амплитуды быстрых и медленных колебаний, ИЭМ – индекс эффективности микроциркуляции; d – справа (dexter), s – слева (sinister). . . . . С. 153
33. Рисунок 33 – Графическое изображение параметров микроциркуляции в области стопы у крыс до (А) и через 24 часа после моделирования ишемии конечности (Б). . . . . С. 155
34. Рисунок 34 – Динамика восстановления микроциркуляции в области стопы крыс при ишемии конечности с учетом способа лечения. ФР – введение физиологического раствора хлорида натрия в мышцы голени; МСК – введение мезенхимных стволовых клеток в мышцы голени; МСК+ЭПО – введение МСК в сочетании с эритропоезином в мышцы голени. . . . . С. 161
35. Рисунок 35 – Микрофотография мышц голени крыс без ишемии. А) микрофотография мышечных волокон, окраска гематоксилин-эозин, ув.  $\times 10$ ; Б) сосудистый пучок, окраска гематоксилин-эозин, ув.  $\times 20$ . . . . . С. 162
36. Рисунок 36 – Микрофотография препарата мышц голени крыс при ишемии. А) микрофотография мышечных волокон, окраска гематоксилин-эозин, ув.  $\times 10$ ; Б) сосудистый пучок, окраска гематоксилин-эозин, ув.  $\times 20$ . . . . . С. 162
37. Рисунок 37 – Микрофотография препарата мышц голени крыс при

- ишемии, получивших инъекции физиологического раствора хлорида натрия в толщу мышц голени. А) микрофотография мышечных волокон, окраска гематоксилин-эозин, ув.  $\times 10$ ; Б) единичные сосуды в межмышечном пространстве соединительной ткани, окраска гематоксилин-эозин, ув.  $\times 10$ . . . . . С. 163
38. Рисунок 38 – Микрофотография препарата мышц голени крыс при ишемии, получивших инъекции МСК в толщу мышц голени. А) микрофотография мышечных волокон, окраска гематоксилин – эозин, ув.  $\times 10$ ; Б) сосудистый пучок, окраска гематоксилин – эозин, ув.  $\times 20$ . . . . . С. 163
39. Рисунок 39 – Микрофотография препарата мышц голени крыс с ишемией, получивших инъекции МСК и ЭПО в толщу мышц голени. А и Б) микрофотография мышечных волокон и сосудистого пучка, окраска гематоксилин-эозин, ув.  $\times 20$ . . . . . С. 164
40. Рисунок 40 – Снимки магнитно-резонансной томографии дегенерации межпозвонкового диск хвостового отдела позвоночника на уровне С6–7 в динамике наблюдения терапевтического потенциала биомедицинского клеточного продукта. . . . . С. 179
41. Рисунок 41 – Гистология межпозвонкового диска крысы при дегенеративном процессе в хвостовом отделе позвоночника с учетом способа лечения, гематоксилин-эозин, ув.  $\times 40$ . . . . . С. 180
42. Рисунок 42 – Схема влияния эритропоэтина на мезенхимные стволовые клетки. . . . . С. 210
43. Таблица 1 – Уровень биологически активных веществ в кондиционированных средах мезенхимных стволовых клеток костного мозга человека ( $M \pm SD$ ); ( $n = 50$ ) . . . . . С. 103
44. Таблица 2 – Уровень продукции цитокинов мезенхимными стволовыми клетками костного мозга крыс ( $M \pm SD$ ); ( $n = 12$ ). . . . . С. 109

45. Таблица 3 – Уровни экспрессии ЭПОР и ко-экспрессию ЭПОР/CD131 на мезенхимных стволовых клетках костного мозга человека до и после экспозиции с эритропоэтином ( $M \pm SD$ ), %... С. 111
47. Таблица 4 – Уровни экспрессии молекул адгезии на мезенхимных стволовых клетках костного мозга человека до и после экспозиции с эритропоэтином ( $M \pm SD$ ), %; (n = 50)... С. 112
48. Таблица 5 – Апоптоз/некроз и клеточный цикл мезенхимных стволовых клеток костного мозга человека ( $M \pm SD$ ), %... С. 114
49. Таблица 6 – Апоптоза/некроза мезенхимных стволовых клеток костного мозга человека до и после экспозиции с ЭПО ( $M \pm SD$ ), %... С. 115
50. Таблица 7 – Показатели миграции, продукции оксида азота (NO), клеточного цикла мезенхимных стволовых клеток костного мозга крыс *in vitro* при различном уровне глюкозы, окислительном стрессе и добавлении в питательную среду эритропоэтина ( $M \pm SD$ ); (n = 12) ... С. 127
51. Таблица 8 – Уровень экспрессии молекул адгезии, ЭПОР, ко-экспрессию ЭПОР/CD131 в на МСК и МСК-ЭПО человека (3-й пассаж) ( $M \pm SD$ , %; n = 20) ... С. 130
52. Таблица 9 – Клеточный цикл и апоптоз/некроз МСК и МСК-ЭПО человека ( $M \pm SD$ ), %; (n = 20) ... С. 132
53. Таблица 10 – КОЕ МСК и МСК-ЭПО костного мозга человека ( $M \pm SD$ ), количество КОЕ %; (n = 20) ... С. 133
54. Таблица 11 – Пролиферация МСК и МСК-ЭПО костного мозга человека ( $M \pm SD$ ), ед. опт. плот.; (n = 20) ... С. 135
55. Таблица 12 – Миграционный потенциал МСК и МСК-ЭПО человека в тесте «закрытия раны», горизонтальная миграция ( $M \pm SD$ ), %; (n = 20) ... С. 144
56. Таблица 13 – Трансмембранная миграция (камеры Бойдена) МСК

- и МСК-ЭПО человека ( $M \pm SD$ ), %; ( $n = 20$ ) . . . . . С. 145
57. Таблица 14 – Уровень продукции NO МСК и МСК-ЭПО человека ( $M \pm SD$ ), мкМ/мл; ( $n = 20$ ) . . . . . С. 146
58. Таблица 15 – Уровень продукции цитокинов МСК и МСК-ЭПО костного мозга человека ( $M \pm SD$ ); ( $n = 20$ ) . . . . . С. 147
59. Таблица 16 – Показатели микроциркуляции в задних стопах крыс при ишемии конечности (Me, Q1–Q3); ( $n = 53$ ) . . . . . С. 157
60. Таблица 17 – Количество сосудов, питающих мышцы голени при ишемии у крыс с учетом вида лечения ( $M \pm SD$ ); ( $n = 20$ ). . . . . С. 165
61. Таблица 18 – Уровень провоспалительных цитокинов в сыворотке крови крыс при ишемии конечности (Me, Q1–Q3); ( $n = 53$ ). . . . . С. 166
62. Таблица 19 – Уровень противовоспалительных цитокинов, ЭПО и NO в сыворотке крови крыс при ишемии конечности (Me, Q1–Q3); ( $n = 53$ ) . . . . . С. 168
63. Таблица 20 – Уровень провоспалительных цитокинов в мышцах голени крыс при ишемии конечности (Me, Q1–Q3); ( $n = 53$ ). . . . . С.170
64. Таблица 21 – Уровень противовоспалительных цитокинов, ЭПО и оксида азота в мышцах голени крыс при ишемии конечности (Me, Q1–Q3); ( $n = 53$ ) . . . . . С. 173
65. Таблица 22 – Взаимосвязи параметров микроциркуляции в стопе с уровнем цитокинов в сыворотке крови при ишемии конечности ( $n = 24$ ) . . . . . С. 175
66. Таблица 23 – Взаимосвязи параметров микроциркуляции в стопе с уровнями цитокинов в тканях мышц голени при ишемии конечности ( $n = 24$ ) . . . . . С. 176
67. Таблица 24 – Показатели расстояния между запирательными пластинами позвонков при механическом разрушении пульпозного ядра межпозвонкового диска по данным магнитно-резонансной томографии (Me, Q1–Q3), в мм; ( $n = 35$ ). . . . . С. 178

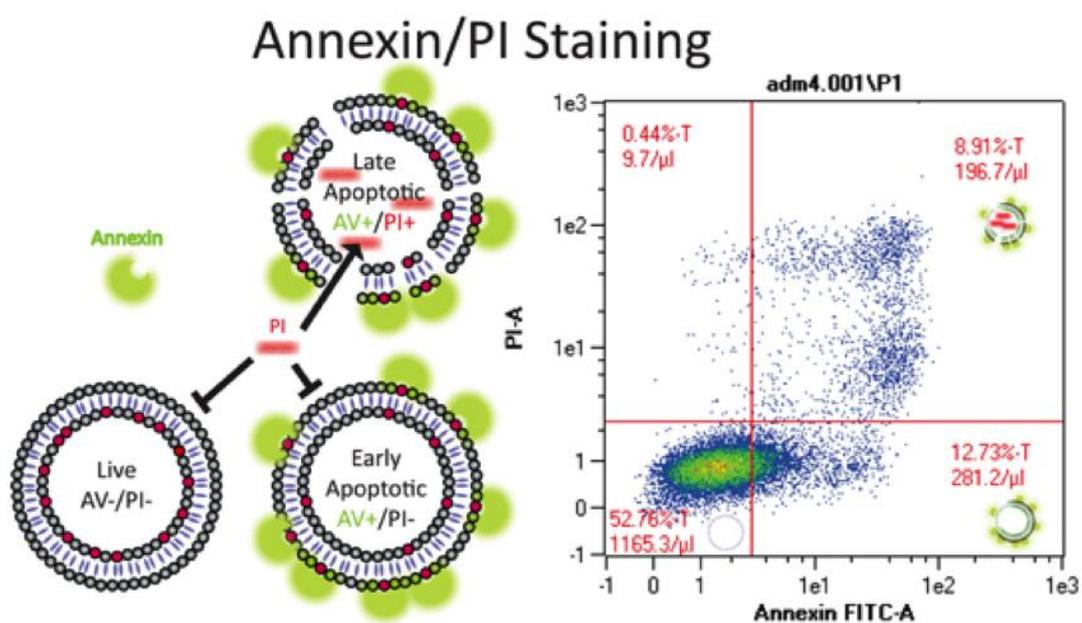


## ПРИЛОЖЕНИЕ А

(справочное)

## Методика определения апоптоза/некроза на проточном цитометре

Перед оценкой клеточной гибели их предварительно окрашивают аннексином 5 и пропидиумом иодидом в среде содержащей ионы кальция, далее отмывают от излишка меток и разбавляют фиксирующим/лизирующим раствором.



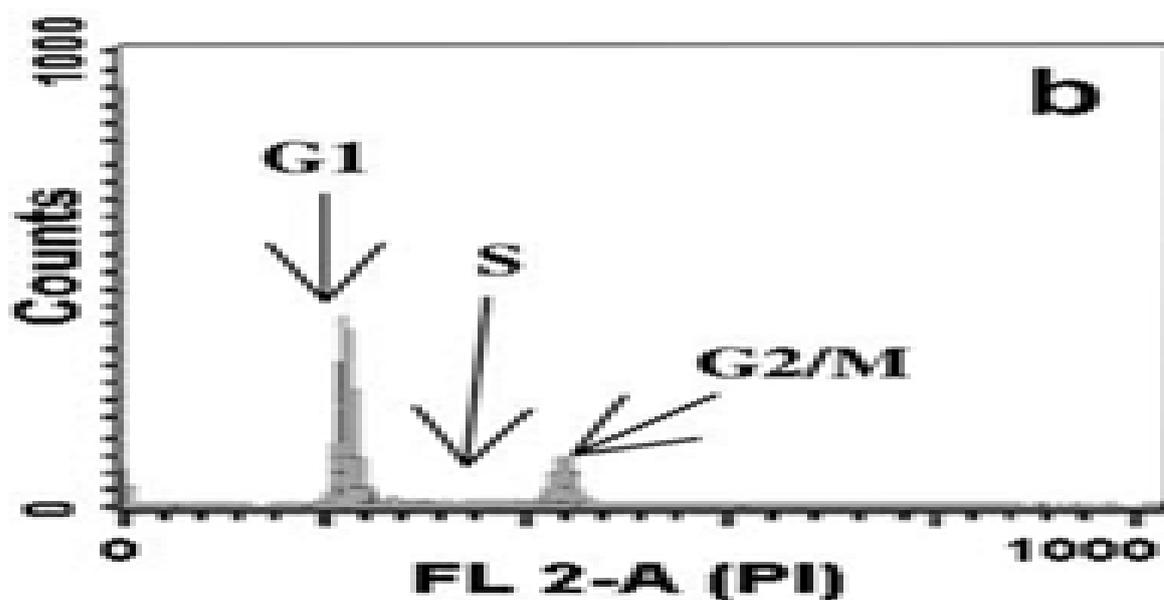
## Схема окрашивания клеток аннексином 5 (AV) и пропидиумом иодидом (PI)

На проточном цитометре анализируют 10 000 событий и программа автоматически строит скаттерграммы, распределяя клетки по гейтам (областям), в которых скапливаются живые (левый нижний квадрат - клетки не окрашиваются метками), клетки в раннем апоптозе (правый нижний квадрат - клетки окрашены аннексином 5, что указывает на выход на внешнюю сторону мембраны клеток фосфотидилсерина), клетки в позднем апоптозе (правый верхний квадрат - происходит двойное окрашивание аннексином 5 и пропидиумом иодидом, что

указывает на выход фосфотидилсерина на внешнюю оболочку мембраны клеток, формирование в них пор через которые проникает пропидиум иодид и связывается с фрагментами ДНК) и некротические клетки (верхний левый квадрат - целостность мембраны клеток нарушена и интеркалирующий агент свободно проходит в клетку и далее в ядро клетки, где связывается с ДНК).

### Принцип определения клеток в фазах клеточного цикла

Клетки подвергают премеабиллизации 70 °С холодным этиловым спиртом, отмывают от спирта, окрашивают пропидиумом иодидом в присутствии РНКазы, снова отмывают от метки и вносят фиксирующий/лизирующий раствор. Анализируют 10 000 событий на проточном цитометре и далее на скаттерграмме анализируют доли клеток в фазах клеточного цикла.

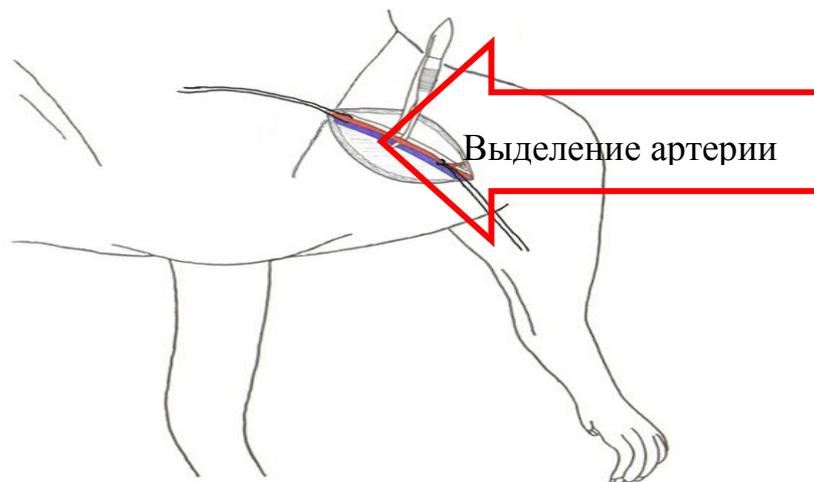
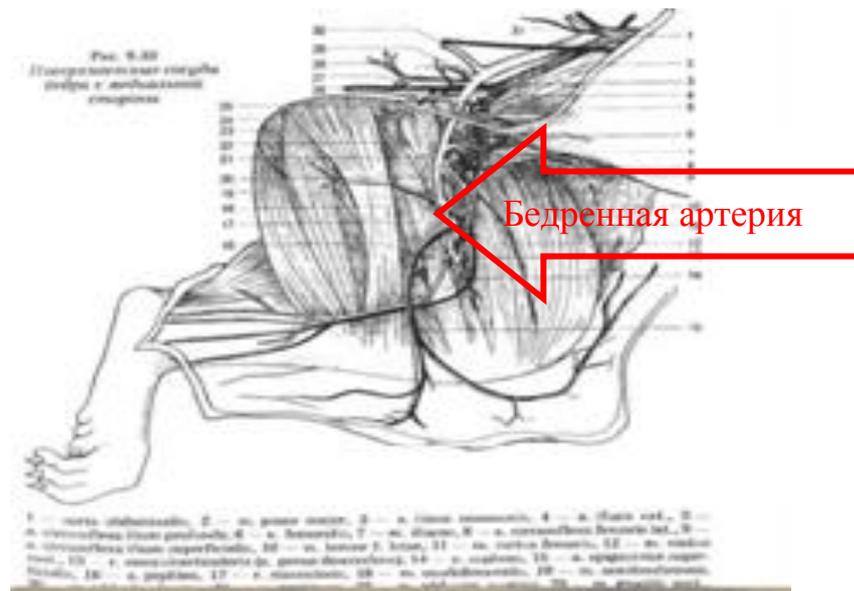


Скаттерграмма клеток в фазах клеточного цикла

## ПРИЛОЖЕНИЕ Б

(справочное)

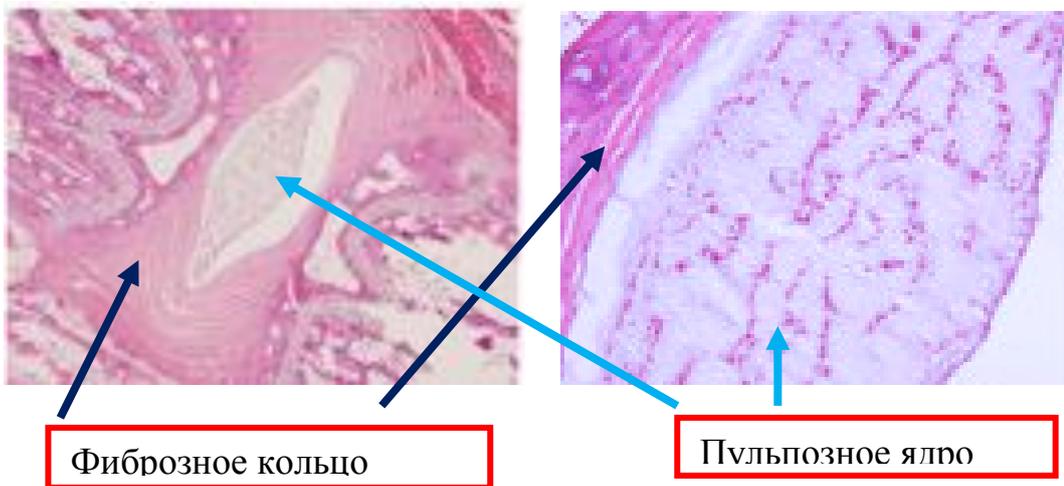
## Кровоснабжение задней нижней конечности и принцип моделирования ишемии конечности



Бедренная артерия выделяется в области верхней трети, накладываются две лигатуры и между ними артерию перерезают ножницами, убеждаются в отсутствии кровотечения. В нашем случае мы не удаляли отходящие выше места

перезки бедренной артерии коллатерали, а также не удаляли аналог глубокой бедренной артерии человека, то есть мы сохраняли частично кровоснабжение дистальных отделов задней конечности у крыс.

### Строение межпозвонкового диска



Межпозвонковый диск это фибро-хрящевое образование из кольцевидных соединительнотканых пластинок и пульпозного (студенистого) ядра в центре между телами двух соседних позвонков позвоночника. Гистологическое строение межпозвонкового диска, окраска гематоксилином-эозином, ув. 4 и 20.

## ПРИЛОЖЕНИЕ В

(обязательное)

## Таблицы данных

Таблица В.1 – Результаты оценки пролиферации мезенхимных стволовых костного мозга клеток человека (4-й пассаж) в норме, при индукции окислительного стресса и добавлении ЭПО в питательную среду ( $M \pm SD$ ); ( $n = 6$ )

Условие кондиционирования клеток	МТТ-тест, единицы оптической плотности (492 нм)
Контроль	$0,133 \pm 0,027$
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	$0,043 \pm 0,026^{*} **$
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +ЭПО	$0,052 \pm 0,039^{*} **$
ЭПО24	$0,17 \pm 0,041$
Примечания: 1. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +ЭПО – пролиферация при индукции окислительного стресса и добавления ЭПО в питательную среду; 2. ЭПО24+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> – пролиферация клеток после экспозиции с ЭПО в течение 24 часов в условии окислительного стресса, индуцированного внесением перекиси водорода в питательную среду; 3. * – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем; 4. ** – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с ЭПО.	

Таблица В.2 – Результаты исследования колониеобразующей способности мезенхимных стволовых клеток костного мозга человека (4-й пассаж) без эритропоэтина и с добавлением эритропоэтина (33,4 МЕ/мл) ( $M \pm SD$ ); ( $n = 5$ )

Тип клеток	Абсолютное количество КОЕ
МСК	$34,68 \pm 0,5$
МСК+ЭПО	$127,88 \pm 0,03$
Примечания: 1. МСК – мезенхимные стволовые клетки; 2. МСК+ЭПО – мезенхимные стволовые клетки, культивированные с эритропоэтином; 3. * – ( $p < 0,001$ ) по сравнению с МСК+ЭПО.	

Таблица В.3 – Результаты исследования доли апоптотических/некротических мезенхимных стволовых клеток костного мозга человека (4-й пассаж) в норме и при депривации ростовых факторов ( $M \pm SD$ ;  $n=5$ )

Условие культивирования клеток	Ранний апоптоз, %	Апоптоз, %	Некроз, %
10 % FCS	$0,1 \pm 0,1$	$6,9 \pm 1,5$	$0,1 \pm 0,1$
0 % FCS	$10,0 \pm 1,0^*$	$13,0 \pm 1,0^*$	$73,9 \pm 6,3^*$

Примечания:

1. Ранний апоптоз – клетки окрашиваются аннексином 5;
2. Апоптоз – клетки окрашиваются аннексином 5 и пропидиумом иодидом;
3. Некроз – клетки окрашиваются пропидиумом иодидом;
4. FCS – эмбриональная телячья сыворотка;
5. \* – ( $p < 0,001$ ) по сравнению с 10 % FCS.

Таблица В.4 – Результаты оценки нахождения мезенхимных стволовых клеток костного мозга крыс, в фазах клеточного цикла в норме и при дефиците ростовых факторов ( $M \pm SD$ ); ( $n = 5$ )

Параметры	10 % FCS	0 % FCS
subG <sub>0</sub> G <sub>1</sub>	$2,45 \pm 0,5$	$11,05 \pm 1,1^*$
G <sub>0</sub> G <sub>1</sub>	$83,9 \pm 1,1$	$83,4 \pm 0,5$
S	$6,5 \pm 0,1$	$3,7 \pm 0,2^*$
G <sub>2</sub> /M	$7,3 \pm 1,1$	$1,8 \pm 0,1^*$

Примечания:

1. FCS – эмбриональная телячья сыворотка;
2. subG<sub>0</sub>G<sub>1</sub> – апоптотические/некротические клетки;
3. G<sub>0</sub>G<sub>1</sub> – фаза покоя;
4. S – фаза синтеза;
5. G<sub>2</sub>/M – фаза деления;
6. \* – ( $p < 0,001$ ) по сравнению с 10 % FCS.

Таблица В.5 – Результаты оценки пролиферации мезенхимных стволовых клеток костного мозга крыс, в питательной среде с содержанием D-глюкозы 11 мМ в норме и при окислительном стрессе ( $M \pm SD$ ; ( $n = 5$ ))

Условие кондиционирования клеток	Пролиферация, единицы оптической плотности (492 нм)
11 мМ	$0,16 \pm 0,03$
11 мМ +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	$0,11 \pm 0,03^*$
11 мМ + ЭПО	$0,51 \pm 0,08^{*\dagger}$
11 мМ +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + ЭПО	$0,37 \pm 0,16^{*\dagger}$
Примечания: 1. 25 мМ – содержание глюкозы; 2. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> – перекись водорода 100 мкМ; 3. ЭПО – эритропоэтин 33,4 МЕ/мл; 4. * – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с 11 ммоль; 5. † – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с 11 ммоль+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	

Таблица В.6 – Результаты оценки пролиферативного потенциала мезенхимных стволовых клеток крыс при культивировании в питательной среде с содержанием D-глюкозы 25 мМ в норме и при индукции окислительного стресса ( $M \pm SD$ ); ( $n = 5$ )

Условие кондиционирования клеток	Пролиферация, единицы оптической плотности (492 нм)
25 мМ	$0,19 \pm 0,02$
25 мМ +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	$0,17 \pm 0,02$
25 мМ + ЭПО	$0,2 \pm 0,05$
25 мМ +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + ЭПО	$0,18 \pm 0,01$
Примечания: 1. 25 мМ – содержание глюкозы; 2. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> – перекись водорода 100 мкМ; 3. ЭПО – эритропоэтин 33,4 МЕ/мл.	

Таблица В.7 – Результаты оценки объемной плотности гранулярного эндоплазматического ретикулума и количества полисом в цитоплазме мезенхимных стволовых клеток костного мозга человека культивированных при наличии или отсутствии эритропоэтина по данным трансмиссионной электронной микроскопии ( $M \pm SD$ ); ( $n = 9$ )

Тип клеток	Объемная плотность гранулярного эндоплазматического ретикулума	Количество полисом
МСК (8-й пассаж)	$34,78 \pm 5,82$	$81,78 \pm 53,5$
МСК–ЭПО (3-й пассаж)	$51,11 \pm 17,54$	$85,11 \pm 25,87$
Примечания: 1. МСК - мезенхимные стволовые клетки на 8-ом пассаже; 2. МСК–ЭПО – мезенхимные стволовые клетки, культивированные с эритропоэтином (33,4 МЕ/мл) на 3-ем пассаже.		

Таблица В.8 – Результаты оценки восстановления микроциркуляции в области стопы в задней левой лапе крыс с ишемией (Me;  $n = 53$ )

Группы	Сутки				
	1	7	14	21	28
Ишемия	12,6	12,6	20,9	54,19	28,3
ФР	22,5*	9,4	19,1	38,74*	47,9*
МСК	30,9*†	36,65*†	37,43*†	46,33*†	59*
МСК+ЭПО	24,61*	39,3*†	32,7*†	27,2*†°	70,94*†°
Примечания: 1. ФР – физиологический раствор; 2. МСК – мезенхимные стволовые клетки костного мозга крыс; 3. МСК+ЭПО – комбинация мезенхимных стволовых клеток костного мозга крыс с эритропоэтином; 4. * – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с группой «ишемия конечности без лечения»; 5. † – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с ФР; 6. ° – ( $p < 0,05$ ) по сравнению с МСК.					