

На правах рукописи

Лыков Александр Петрович

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕЗЕНХИМНЫХ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА И КРЫС ПРИ
АКТИВАЦИИ ЭРИТРОПОЭТИНОМ**

1.5.22. Клеточная биология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Новосибирск – 2023

Работа выполнена в Научно-исследовательском институте клинической и экспериментальной лимфологии – филиал федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»

Научный консультант:

доктор медицинских наук

Повещенко Ольга Владимировна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор

Морозов Виталий Валерьевич

(Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, лаборатория технологий управления здоровьем, заведующий, г. Новосибирск)

доктор медицинских наук

Селедцова Галина Викторовна

(Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», лаборатория клинической иммунопатологии, главный научный сотрудник, г. Новосибирск)

доктор медицинских наук

Чумакова Светлана Петровна

(Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации», кафедра патофизиологии, профессор кафедры, г. Томск)

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта» (г. Калининград)

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2023 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета 21.2.046.05, созданного на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (630091, г. Новосибирск, Красный проспект, 52)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Новосибирского государственного медицинского университета (630091, г. Новосибирск, Залесского, 4; тел. 8(383) 222-68-35; <https://new.ngmu.ru/dissers/dissertation/351>)

Автореферат разослан «_____» _____ 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

С. В. Залавина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность избранной темы. Мезенхимные стволовые/стромальные клетки (МСК) относятся к стволовым клеткам в силу способности к самообновлению и дифференциации в различные типы клеток соединительной ткани (Iwata T., 2023). 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 (Александрюшкина Н. А., 2019; Zhao A., 2022; 2023). Клеточные технологии рассматривают как альтернативу обычным методам лечения ишемии нижних конечностей и дегенеративно-дистрофических изменений позвоночника (Feng Y., 2022; Huerta C., 2023). Однако эффективность МСК-опосредованных клеточных технологий носит кратковременный характер в силу значительной гибели клеток в условиях неблагоприятного микроокружения. Требуется разработка способов 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). При неканоническом пути связывания ЭПО с рецептором к эритропоэтину (ЭПОР), ассоциированным с общей β -цепью цитокинов (CD131), отмечен цитопротективный эффект, включающий антиапоптотическое и противовоспалительное действие ЭПО при индукции стресс-реакции в ответ на TNF- α и/или липополисахарид (Bohr S., 2015).

Степень разработанности темы диссертации. Мезенхимные стволовые клетки используют для лечения ишемии нижних конечностей (Abdul Wahid S., 2018). Отмечено улучшение лодыжечно-плечевого индекса, удлинение периода безболезненной ходьбы, уменьшение размеров трофических язв и улучшение

качества жизни больных с критической ишемией нижних конечностей после внутримышечного введения моноклеаров костного мозга (Molavi B., 2016). Введение МСК больным с дискогенными болями способствует улучшению качества жизни (Zeckser J., 2016). В модели ишемии конечностей у крыс продемонстрировано увеличение заселения и выживаемости МСК, предобработанных ЭПО (Mizukami T., 2016). 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, ассоциированного 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 сочетание 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 изменений 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) уровнях 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. Изучение комплексной реакции мезенхимных стволовых клеток костного мозга человека и крыс позволяет теоретически обосновать использование эритропоэтина для надления стволовых клеток устойчивостью к неблагоприятным факторам микроокружения в очаге патологического процесса. Полученные результаты исследования позволяют 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 рецепторов к эритропоэтину и поверхностных кластеров дифференцировки клеток, вовлеченных в межклеточное взаимодействие, 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, гипогликемия, 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 (окислительный стресс, гипогликемия, гипергликемия, дефицит 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 обеспечены 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 12-й Международной конференции «Лимфология: от фундаментальных исследований к медицинским технологиям» (Новосибирск, 2016), на 3-м Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2017), на 11th International 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-м Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2019), на Всероссийской мультikonференции с международным участием «Биотехнология – медицине будущего» (Новосибирск, 2019), на 5-м Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2022).

Диссертационная работа апробирована на расширенном заседании ученого совета Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии – филиал 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 – филиал 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 ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России и в экспериментальную работу лаборатории физиологии протективной системы Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии – филиал 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 статьей 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,

заклучения, 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 кандидатом медицинских наук Д. В. Морозовым (НГМУ); определение аутофагии в МСК человека методом иммуноцитохимии – с кандидатом медицинских наук Ю. С. Таскаевой; трансмиссионная электронная микроскопия МСК человека – с доктором биологических наук Н. П. Бгатовой

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование одобрено комитетом по этике Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук».

Объекты исследований. Работа выполнена на 130 половозрелых крысах-самцах Wistar и 50 образцах костного мозга человека. Модель ишемии левой задней конечности и дегенерации межпозвонкового диска (ДМПД) поставлена в виварии ИЦиГ СО РАН на крысах. Ишемию моделировали перевязкой и перерезкой бедренной артерии в верхней трети, а ДМПД моделировали механическим разрушением пульпозного ядра межпозвонкового диска хвостового отдела позвоночника.

Методы исследования. Культуральные методы (выделение и экспансия первичных культур клеток костного мозга), трансдифференцировка МСК в

соединительнотканном направлении, иммунофенотипирование, апоптоз/некроз, клеточный цикл, колониеобразование, МТТ тест (пролиферация/жизнеспособность клеток), оценка клеточного импеданса в режиме реального времени, оценка миграционного потенциала, ИФА, стандартные методы гистологического анализа, иммуногистохимия, микроскопия, доплеровская флоуметрия, магнитно-резонансная томография, методы статистического анализа.

Микроскопия. Визуализацию первичных культур МСК, горизонтальную миграцию МСК *in vitro*, оценку апоптоза/некроза МСК при использовании витальных красителей (акридиновый оранжевый и пропидиум иодид), патоморфологический анализ гистологических препаратов проводили на инвертированном микроскопе Axio Observer Z1 (Zeiss, Германия), ультраструктурный анализ МСК оценивали с использованием трансмиссионной электронной микроскопии на микроскопе JEM 100CX-II (Jeol, Япония).

Статистический метод. 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 $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика первичных культур стволовых/прогениторных клеток костного мозга человека и крысы. Костный мозг является источником гемопоэтических стволовых клеток, мезенхимных стволовых клеткок и эндотелиальных прогениторных клеток (Herrmann M., 2019). Функциональный потенциал МСК зависит от источника их получения, например, МСК костного мозга лучше дифференцируются в остеогенном направлении, а МСК синовиальной оболочки – в хондрогенном и адипогенном направлении (Yang Y., 2018).

Ядросодержащие клетки костного мозга человека прикреплялись к пластику, имели гетерогенную структуру на ранних сроках культивирования и приобретали гомогенность к 14-м суткам роста *in vitro*. Мезенхимные стволовые клетки 4-го пассажа дифференцировались в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлении (Рисунок 1).

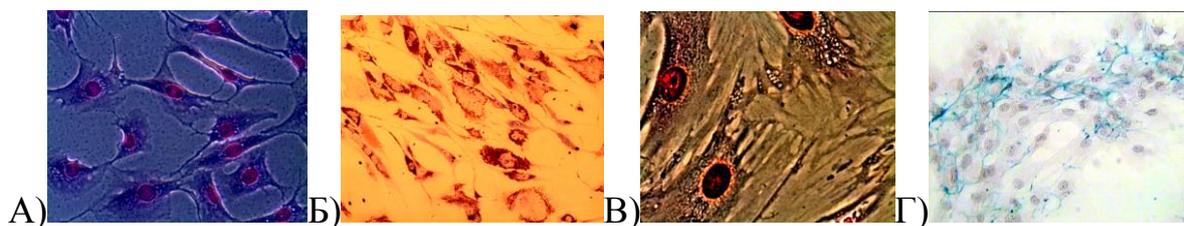


Рисунок 1 – Морфология мезенхимных стволовых клеток костного мозга человека на 4-м пассаже (А) и способность к дифференцировке в адипоциты (Б, масляный красный О и гематоксилин-эозин), остеобласты (В, по Ван Косса и гематоксилин-эозин) и хондроциты (Г, толуидиновый синий), ув. $\times 40$

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 $(97,33 \pm 2,25) \%$, CD90 в $(94,67 \pm 5,01) \%$, CD105 в $(95,33 \pm 2,66) \%$ и не экспрессировали маркеры гемопоэтических стволовых клеток CD45 в $(0,35 \pm 0,04) \%$ и CD34 в $(0,23 \pm 0,03) \%$. В кондиционной среде МСК 4-го пассажа человека выявлено наличие широкого спектра биологически активных молекул. Отмечен высокий

уровень провоспалительных цитокинов (IL-6, IL-8, IFN- γ) и ростовых факторов (VEGF, PDGF-AB, CXCL12/SDF-1a). 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 с гетерогенной морфологией. На 10–14-е сутки прилипшие клетки костного мозга крыс-самцов Wistar достигали конфлуэнтности 80–90 % и представляли собой монослой гомогенных веретенообразных клеток, т. е. имели морфологию, характерную для МСК. Мезенхимные стволовые клетки 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, α -гладкомышечный актин и фактор Виллебранда (Рисунок 2).

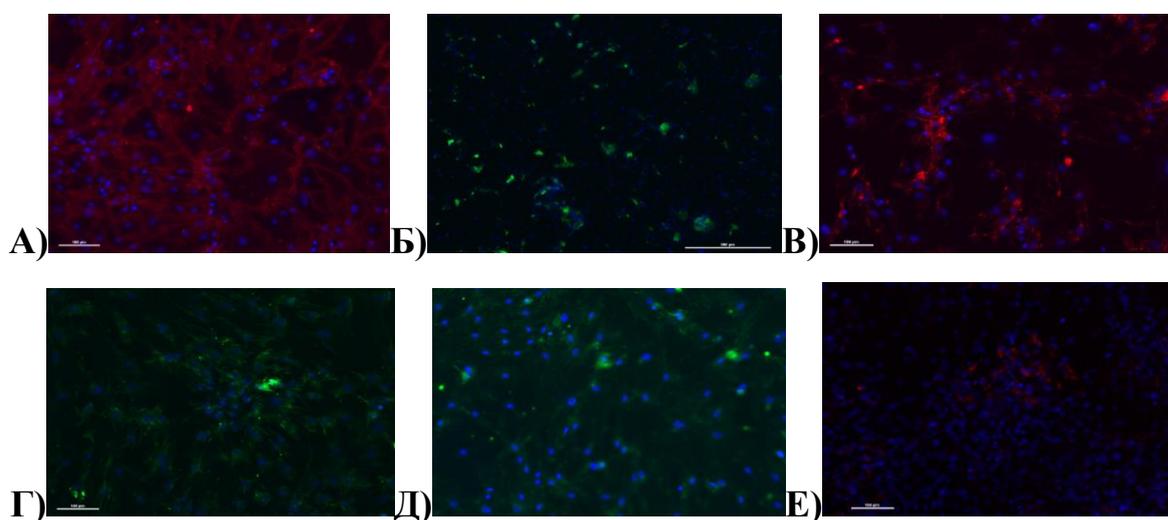


Рисунок 2 – Экспрессия в мезенхимных стволовых клетках CD90 (А, клетки красного цвета), Collagen I (Б, клетки зеленого цвета), Fibronectin (В, клетки красного цвета), Vimentin (Г, клетки зеленого цвета), α -SMA (Д, клетки зеленого цвета), von Willebrand factor (Е, клетки красного цвета) по данным иммуногистохимического исследования, ув. $\times 20$. Ядра клеток окрашены DAPI (синий цвет)

Спустя 3 недели роста МСК в специальных культуральных средах дифференцировались в адипоциты, остеоциты и хондроциты *in vitro*. Мезенхимные стволовые клетки крыс продуцируют широкий спектр биологически активных молекул.

Влияние эритропоэтина на экспрессию кластеров дифференцировки на мезенхимных стволовых клетках костного мозга человека. Как видно из таблицы 1, экспозиция МСК костного мозга человека (4-й пассаж) с ЭПО в течение 1 часа значительно снижала уровень экспрессии на мембране клеток CD18 ($p < 0,05$). 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 ($p < 0,05$).

Таблица 1 – Уровень 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† |

Примечания:

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

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 ($p < 0,05$).

Влияние экспозиции мезенхимных стволовых клеток костного мозга человека с эритропоэтином на экспрессию рецепторов для канонического и неканонического сигнального пути для эритропоэтина. Эритропоэтин 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 инициирует анти-апоптотический эффект (Bohr S., 2015). В таблице 2 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 ($p < 0,05$).

Таблица 2 – Уровень экспрессии ЭПОР и ко-экспрессии ЭПОР/CD131 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 |
| ЭПОР+ | $7,27 \pm 0,83$ | $11,8 \pm 1,71^*$ | $10,87 \pm 4,37$ |
| ЭПОР+/CD131+ | $0,5 \pm 0,3$ | $1,1 \pm 0,17^*$ | $2,03 \pm 0,06^{*\dagger}$ |
| CD131+ | $41,83 \pm 0,74$ | $41,9 \pm 1,85$ | $44,47 \pm 2,04^*$ |

Примечания:

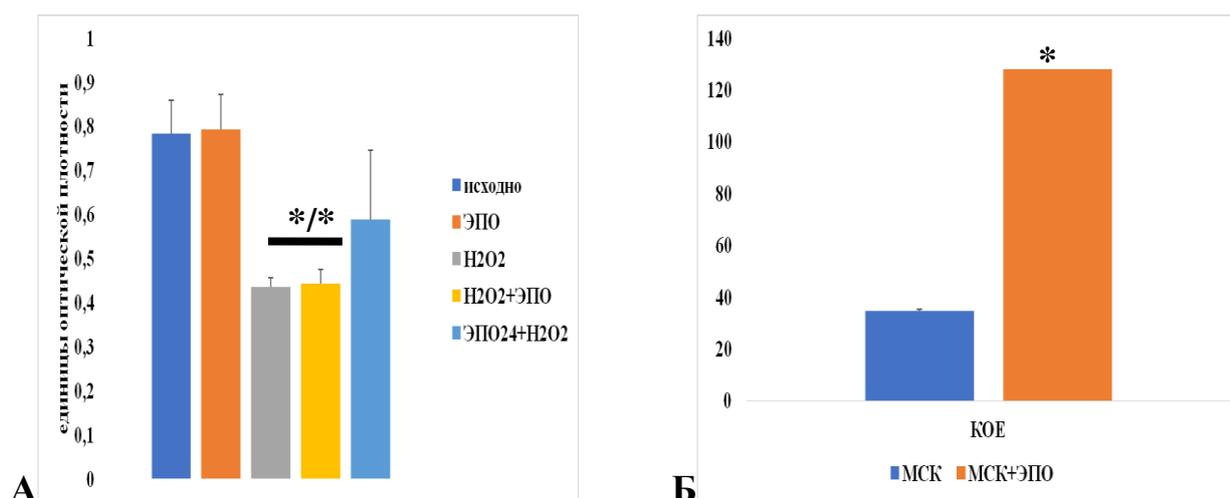
- * – $p < 0,05$ по сравнению с исходным показателем;
- † – $p < 0,05$ по сравнению с 1-часовой экспозицией с ЭПО.

В то же время увеличение срока экспозиции клеток с ЭПО ведет к большей активации неканонического сигнального пути для ЭПО.

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 (Cui J., 2019). 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 (Zhou S., 2018). Нами исследовано влияние ЭПО в дозе 33,4 МЕ/мл на апоптоз/некроз и распределение клеток в фазах клеточного цикла при стандартных условиях культивирования, а также при дефиците ростовых факторов и окислительном стрессе. Дефицит ростовых факторов существенно усиливал апоптоз/некроз МСК ($32,25 \pm 2,25$) % и ($15,09 \pm 2,1$) % апоптоза, ($2,5 \pm 0,5$) % и ($0,7 \pm 0,3$) % некроза при 0 % FCS и в контроле соответственно ($p < 0,05$). При окислительном стрессе доля клеток в апоптозе ($9,88 \pm 1,5$) % была меньше, чем в контроле, что может быть следствием утраты клеток при снятии их с подложки ($p < 0,05$). Наличие в тест-системе ЭПО (33,4 МЕ/мл) или предобработка ЭПО в течение 24 часов МСК также способствовало уменьшению доли клеток в апоптозе ($10,15 \pm 1,2$) % и ($9,75 \pm 0,6$) % соответственно в сравнение с контролем. Кроме этого, показано, что дефицит ростовых факторов увеличивает долю клеток в subG₀G₁ фазе клеточного цикла ($3,05 \pm 0,15$ % и $2,255 \pm 0,05$ %), но уменьшает количество клеток в фазе покоя ($80,95 \pm 0,95$ % и $84,4 \pm 1,5$ %), синтеза ($2,7 \pm 0,3$ % и $6,35 \pm 0,15$ %), митоза ($1,8 \pm 0,2$ % и $3,85 \pm 1,45$ %) в сравнении с контролем ($p < 0,05$). С другой стороны, выраженность апоптоза/некроза МСК человека зависит от длительности экспозиции с эритропоэтином. Так, доля МСК в апоптозе/некрозе значительно снижалась после 1-часовой инкубации клеток с ЭПО ($9,137 \pm 0,65$ % и $8,03 \pm 1,05$ %), но увеличивалась после 72-часовой экспозиции с ЭПО ($13,177 \pm 1,29$ % и $23,137 \pm 2,14$ %) в сравнении с контролем ($11,877 \pm 2,23$ % и $14,937 \pm 0,5$ %; апоптоз и некроз соответственно) ($p > 0,05$).

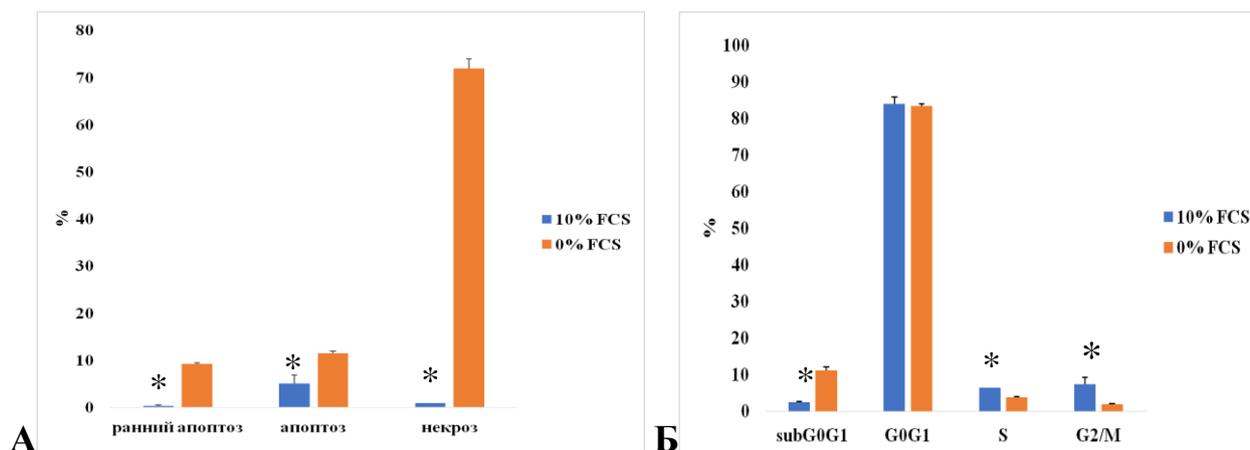
Далее нами исследовано влияние ЭПО на пролиферативный потенциал МСК человека (Рисунок 3А). Эритропоэтин существенно не влиял на пролиферацию МСК человека по данным МТТ-теста ($p > 0,05$). В то же время создание неблагоприятного микроокружения для МСК внесением в среду перекиси водорода значительно снижает 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 колониобразованию (Рисунок 3Б). Показано значимое увеличение образования очагов роста МСК в присутствии ЭПО.



Примечания: H₂O₂ + ЭПО – пролиферация при индукции окислительного стресса и добавлении ЭПО в питательную среду; ЭПО24 + H₂O₂ – 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 3 – Пролиферация (А) и колониобразующая способность (Б) мезенхимных стволовых костного мозга клеток человека (4-й пассаж) в норме, при индукции окислительного стресса и добавлении ЭПО в питательную среду

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 (Widowati W., 2019). Нами исследован эффект дефицита ростовых факторов (0 % FCS) в питательной среде на показатели клеточного цикла и апоптоза/некроза – одной из форм гибели клеток, называемой «аноикис» (Деев Р. В., 2018). Дефицит ростовых факторов существенно увеличивал долю клеток как в «раннем», так и «позднем» апоптозе, а также долю некротических клеток (Рисунок 4А). Кроме этого, дефицит ростовых факторов значимо увеличивал долю МСК, содержащих количество хромосом менее 2n (некроз) и существенно снижал долю клеток в фазе синтеза (2n–4n) и митоза (4n) (Рисунок 4Б).

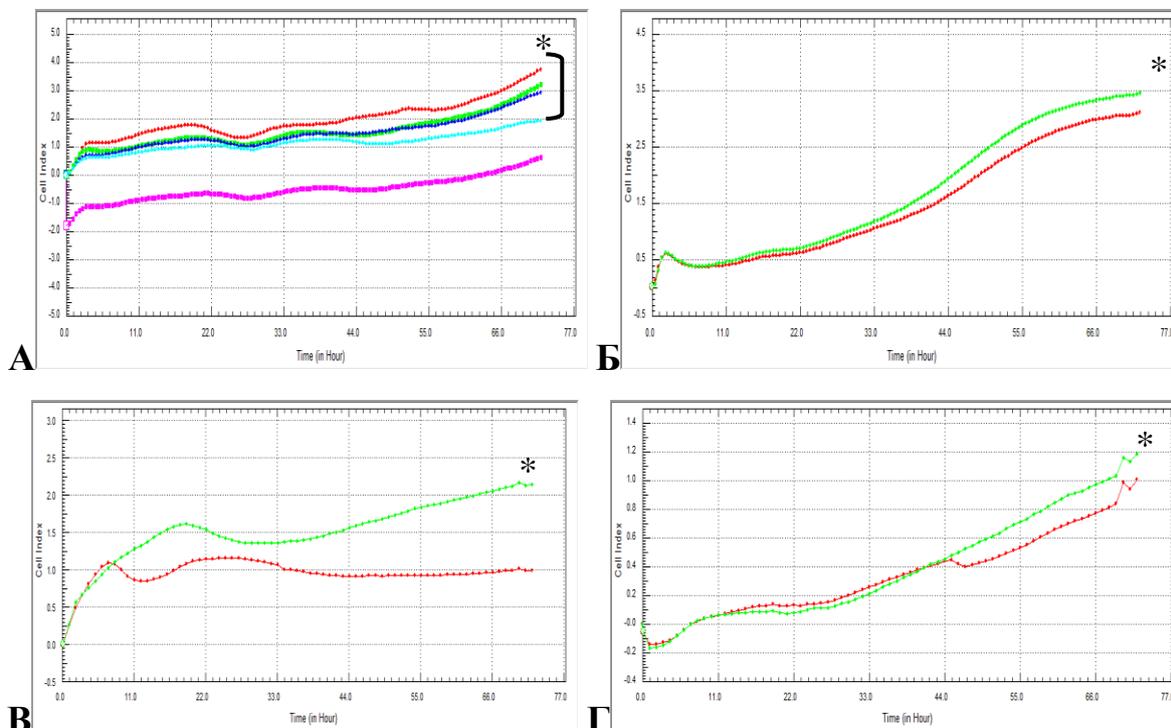


Примечание. * – $p < 0,001$ по сравнению с 0 % FCS.

Рисунок 4 – Апоптоз/некроз (А) и клеточный цикл (Б) мезенхимных стволовых клеток костного мозга крыс в норме и при дефиците ростовых факторов (0 % FCS)

С учетом влияния факторов микроокружения на МСК, включая цитокины и ростовые факторы (Hong T., 2019), 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. Эритропоэтин

(33,4 МЕ/мл) усиливал пролиферацию МСК крыс (КИ = $2,86 \pm 0,16$) в сравнении с дозой 66,8 (КИ = $2,23 \pm 0,13$) и 100 МЕ/мл ЭПО (КИ = $1,88 \pm 0,08$), что было близко к эффекту 3 % FCS в питательной среде (КИ = $3,14 \pm 0,11$), но меньше по сравнению с 5 % FCS (КИ = $3,67 \pm 0,31$; $p < 0,05$; Рисунок 5А).

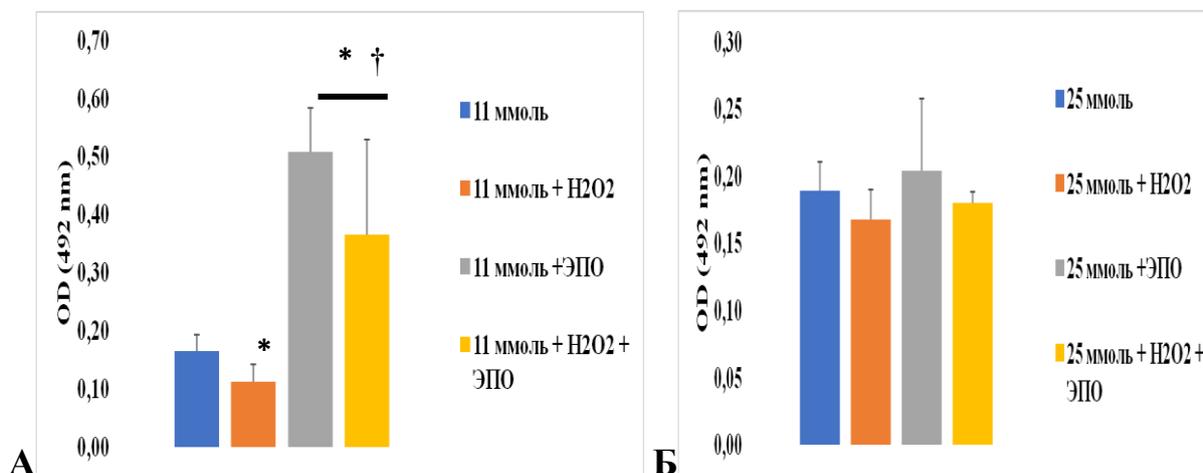


Примечания: А) Пролиферация мезенхимных стволовых клеток костного мозга крыс по данным клеточного импеданса в режиме реального времени в ответ на разные дозы ЭПО: 5 % FCS – красная линия; 3 % FCS – зеленая линия; 33,4 МЕ/мл ЭПО – синяя линия; 66,8 МЕ/мл ЭПО – голубая линия; 100 МЕ/мл ЭПО – розовая линия. Б) 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). В) 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). Г) 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).

Рисунок 5 – Пролиферация и миграция мезенхимных стволовых клеток костного мозга крыс по данным клеточного импеданса (режим реального времени) в ответ на эритропоэтин

Кроме этого, ЭПО стимулировал пролиферацию МСК крыс по сравнению с 1 % FCS в питательной среде (КИ = $3,18 \pm 0,16$ и КИ = $2,56 \pm 0,3$ соответственно; $p < 0,05$; Рисунок 5Б). Наличие в питательной среде 10 % FCS и ЭПО (33,4 МЕ/мл) увеличивало пролиферацию МСК крыс в сравнении с питательной средой без ЭПО КИ = $2,15 \pm 0,49$ и КИ = $1,0 \pm 0,09$ соответственно ($p < 0,05$; Рисунок 5В) и миграцию на 18 % КИ = $1,17 \pm 0,1$ и КИ = $0,99 \pm 0,1$ соответственно ($p < 0,05$; Рисунок 5Г).

Как видно из рисунка 6А, окислительный стресс существенно снижал пролиферацию МСК крыс по сравнению с контролем при культивировании клеток в среде с 11 мМ D-глюкозы («гипогликемия») в питательной среде ($0,11 \pm 0,01$) ед. опт. плот. и ($0,16 \pm 0,03$) ед. опт. плот. соответственно ($p < 0,05$), а ЭПО увеличивал пролиферацию клеток ($0,51 \pm 0,08$) ед. опт. плот и ($0,16 \pm 0,03$) ед. опт. плот. соответственно в присутствии ЭПО и базальный уровень пролиферации ($p < 0,01$) и ($0,37 \pm 0,16$) ед. опт. плот. в тест-системе индукции окислительного стресса ($p < 0,01$).



Примечания: * – $p < 0,05$ по сравнению с 11 ммоль; † – $p < 0,05$ по сравнению с 11 ммоль + H2O2.

Рисунок 6 – Влияние уровня глюкозы на пролиферацию мезенхимных стволовых клеток крыс при окислительном стрессе (100мкМ H2O2) и добавлении эритропоэтина (33,4 МЕ/мл). Уровень D-глюкозы 11 мМ (А) и 25 мМ (Б) в питательной среде

В то же время при культивировании клеток в питательной среде с 4,5 г/л (25 мМ) D-глюкозы (условно «нормогликемия») не выявлено существенного влияния окислительного стресса и ЭПО на пролиферацию МСК крыс (Рисунок 6Б; $p > 0,05$).

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 (Yang K., 2018). У старых крыс введение ЭПО инициировало антивозрастные изменения (Wu H., 2017). 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 сроком 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 3).

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

| 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*† |

Продолжение таблицы 3

| Фенотип | МСК 4-й пассаж | Номер пассажира клеток | | |
|--|-------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|
| | | МСК 8-й пассаж | МСК-ЭПО 0-й пассаж | МСК-ЭПО 3-й пассаж |
| 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*† |
| Примечания: | | | | |
| 1. * – p < 0,05 по сравнению с МСК 4-го пассажира; | | | | |
| 2. † – p < 0,05 по сравнению с МСК 8-го пассажира. | | | | |

Так, при репликативном старении МСК костного мозга человека в стандартных условиях культивирования *in vitro* отмечено значимое увеличение уровней экспрессии CD18, CD18/CD54, ЭПОР/CD131 и снижение экспрессии CD54, CD49а, CD146 и CD131 в сравнении с МСК 4-го пассажира (p < 0,05). Показано существенное снижение экспрессии маркера стволовости CD146 и одной из единиц неканонического сигнального пути для ЭПО – CD131 (p > 0,05) – на МСК 8-го пассажира. Мезенхимные стволовые клетки, росшие в присутствии ЭПО, (3-й пассаж) повышали экспрессию CD18, CD18/CD54, CD54, CD29, CD44, ЭПОР/CD131 в сравнении с МСК 4-го пассажира (p < 0,05). Сопоставление экспрессии маркеров адгезии и рецепторов к ЭПО на МСК-ЭПО 3-го пассажира и МСК 8-го пассажира выявило возрастание на мембране CD54, CD29, CD44, CD49а (p < 0,05). Культивирование МСК человека с ЭПО (33.4 МЕ/мл) способствует уменьшению апоптоза (11,7 % ± 2,35 % и 13,64 % ± 5,08 %), задержке клеток в фазе G₀G₁ клеточного цикла (86,04 % ± 0,85% и 91,45 % ± 0,57 %) в сравнении с МСК 8-го пассажира (p < 0,05). Экспансия МСК человека с ЭПО способствует увеличению спонтанной пролиферативной активности клеток (0,581 ед. опт. плот. ± 0,127 ед. опт. плот. и 0,272 ед. опт. плот. ± 0,04 ед. опт. плот.) в условиях дефицита ростовых факторов (0,154 ед. опт. плот. ± 0,033 ед. опт. плот. и 0,029 ед. опт. плот. ± 0,005 ед. опт. плот.)

в условии окислительного стресса ($0,033$ ед. опт. плот. $\pm 0,018$ ед. опт. плот. и $0,028$ ед. опт. плот. $\pm 0,007$ ед. опт. плот.) в сравнении с МСК 8-го пассажа ($p < 0,05$). Кроме этого, показано, что МСК-ЭПО 3-го пассажа при добавлении ЭПО снижают миграционную активность в тест-системе «горизонтальной миграции» по сравнению с МСК 8-го пассажа ($88,72\% \pm 3,66\%$ и $93,51\% \pm 0,97\%$ соответственно; $p < 0,05$), но в условии дефицита ростовых факторов ($82,11\% \pm 5,87\%$ и $63,16\% \pm 3,05\%$ соответственно; $p < 0,05$) наличие ЭПО способствует миграции МСК-ЭПО. Особенностью МСК-ЭПО 3-го пассажа является увеличение продукции ЭПО в сравнении с МСК 8-го пассажа ($388,69$ мМЕ/мл $\pm 51,49$ мМЕ/мл и $224,67$ мМЕ/мл $\pm 128,74$ мМЕ/мл соответственно; $p < 0,05$).

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 ($p < 0,05$) (Рисунок 7, Таблица 4).

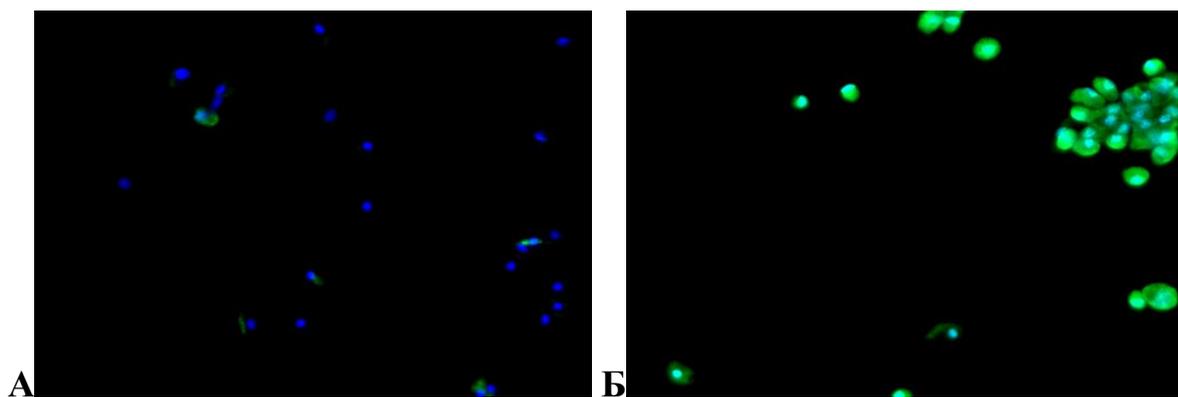


Рисунок 7 – Показатель аутофагии МСК (8-й пассаж) и МСК-ЭПО (3-й пассаж) костного мозга человека. А – аутофагия МСК на 8-м пассаже, ув. $\times 20$; Б – аутофагия МСК-ЭПО на 3-м пассаже, ув. $\times 20$. Ядра клеток синего цвета (DAPI), аутофагосомы зеленого цвета (LC3B)

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

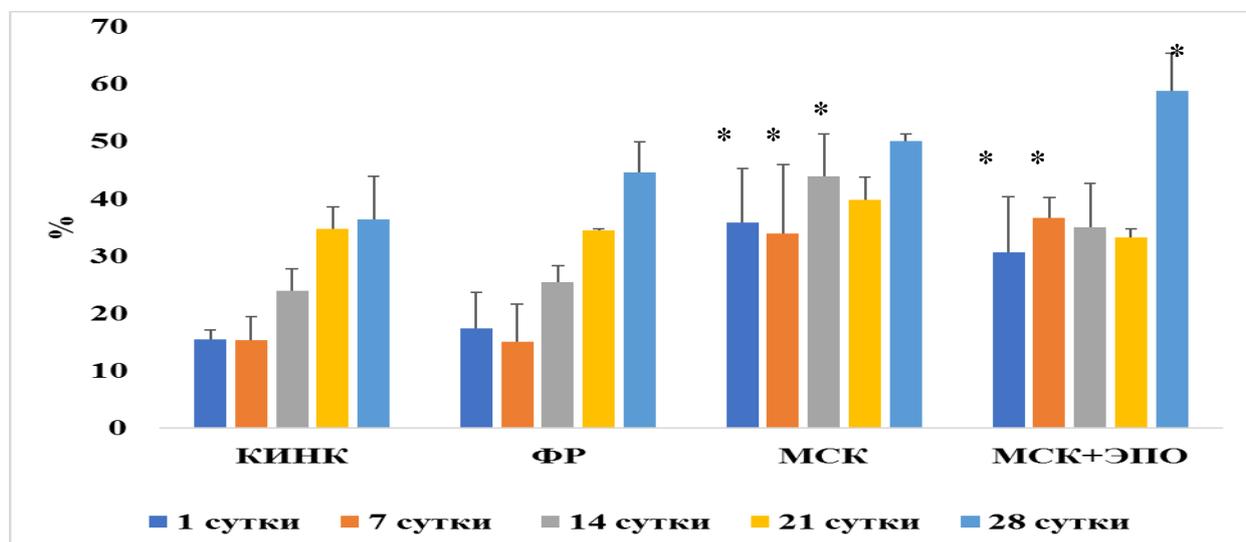
Таблица 4 – Аутофагия мезенхимных стволовых клеток костного мозга человека на позднем пассаже, росших без ЭПО и в присутствии 33,4 МЕ/мл ЭПО (M ± SD, %)

| Параметры | МСК | МСК-ЭПО |
|--|-------------|----------------|
| LC3В | 24,9 ± 2,12 | 68,37 ± 11,18* |
| Примечание. * – p < 0,01 по сравнению с МСК. | | |

Так, для МСК-ЭПО характерно увеличение объемной плотности мембран «гранулярного» эндоплазматического ретикулула на 47 % в сравнении с МСК на 8-м пассаже (51,11 ± 17,54 и 34,78 ± 5,82 соответственно) (p < 0,05). По количеству полисом между МСК 8-го пассажа и МСК-ЭПО не выявлено значимых различий (81,78 ± 53,5 и 85,11 ± 25,87 соответственно) (p > 0,05).

Эффективность биомедицинского клеточного продукта при ишемии конечности. Частота встречаемости заболеваний периферических артерий в мире достигает 10 %, при этом отмечено увеличение заболеваемости критической ишемией нижних конечностей и сохранение низкой эффективности традиционных методов лечения (Лебедев С. В., 2013). Использование МНК-КМ, в том числе МСК костного мозга, является альтернативным методом лечения ишемии (Liew A., 2012). Клетки костного мозга при ишемии восстанавливают функционирование мышц и усиливают

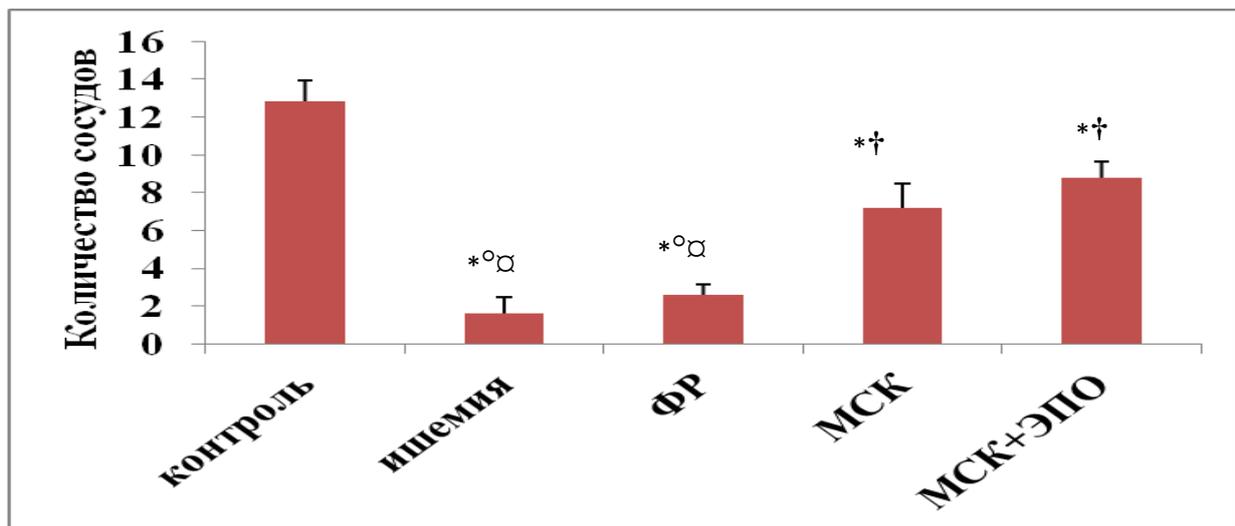
ангиогенез (Brenes R., 2012). Исходя из этого, представлялось важным изучить терапевтический потенциал биомедицинского клеточного продукта в экспериментальной модели ишемии задней левой лапы у крыс (Рисунок 8).



Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с ишемией

Рисунок 8 – Динамика восстановления микроциркуляции в области стопы при ишемии левой задней лапы 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

Так, спустя 24 часа после моделирования ишемии отмечено существенное снижение параметров микроциркуляции в стопе 70–80 % от исходного уровня. Инъекция МСК и МСК + ЭПО в мышцы голени после моделирования ишемии (0 сутки) способствовала сохранности параметра микроциркуляции в области стопы на уровне 30 % от исходного показателя, что существенно выше по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$). Показано, что однократное введение в толщу мышц голени крыс сразу после ишемии МСК и МСК + ЭПО значительно увеличивало количество сосудов, питающих мышцы ($p < 0,05$) (Рисунок 9).

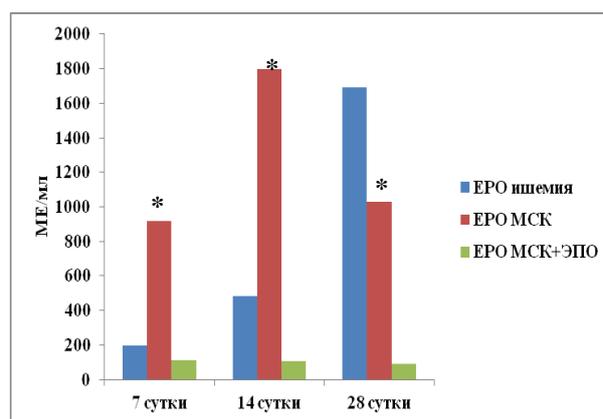
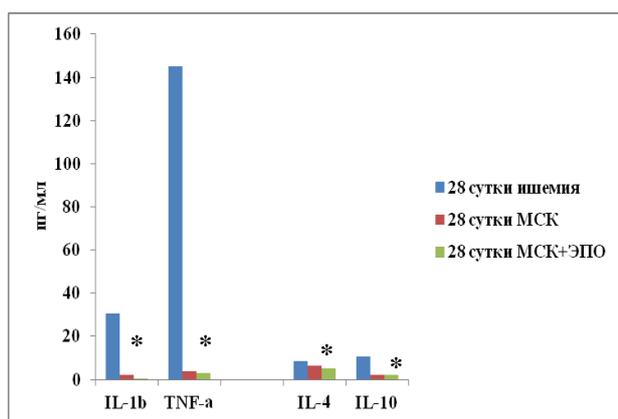
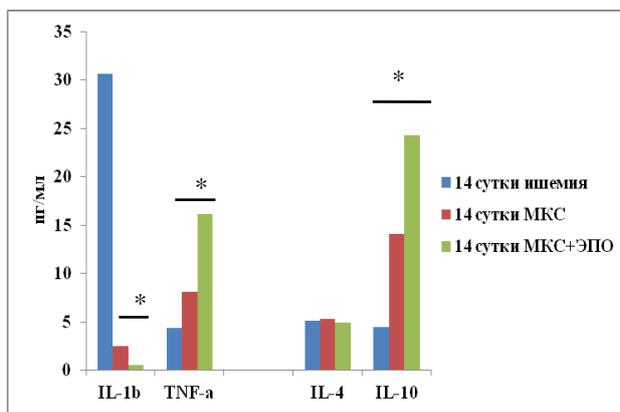
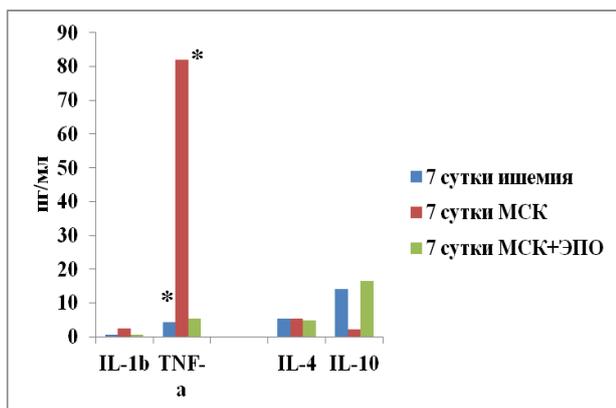


Примечания: * – $p < 0,05$ по сравнению с интактными животными; † – $p < 0,05$ по сравнению с группой ишемии; ° – $p < 0,05$ по сравнению с группой ФР; α – $p < 0,05$ по сравнению с группой МСК.

Рисунок 9 – Количество сосудов, питающих мышцы голени при ишемии у крыс с учетом вида лечения ($M \pm SD$, $n = 20$). 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

Необходимо отметить тот факт, что даже при использовании биомедицинского клеточного продукта количество сосудов, питающих мышцы голени, не достигает значений в группе интактных животных ($p < 0,05$).

Известно, что цитокины и ростовые факторы вовлечены в патогенез КИНК (Jalkanen J., 2016). 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. Уровень провоспалительных цитокинов ($IL-1\beta$ и $TNF-\alpha$) в сыворотке крови крыс с ишемией конечностей имел существенные колебания (Рисунок 10).



Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с ишемией.

Рисунок 10 – Уровень цитокинов и ростовых факторов в сыворотке крови у крыс с ишемией конечностей (Me, n = 53). МСК – введение мезенхимных стволовых клеток в мышцы голени; МСК + ЭПО – введение МСК в сочетании с эритропоэтином в мышцы голени

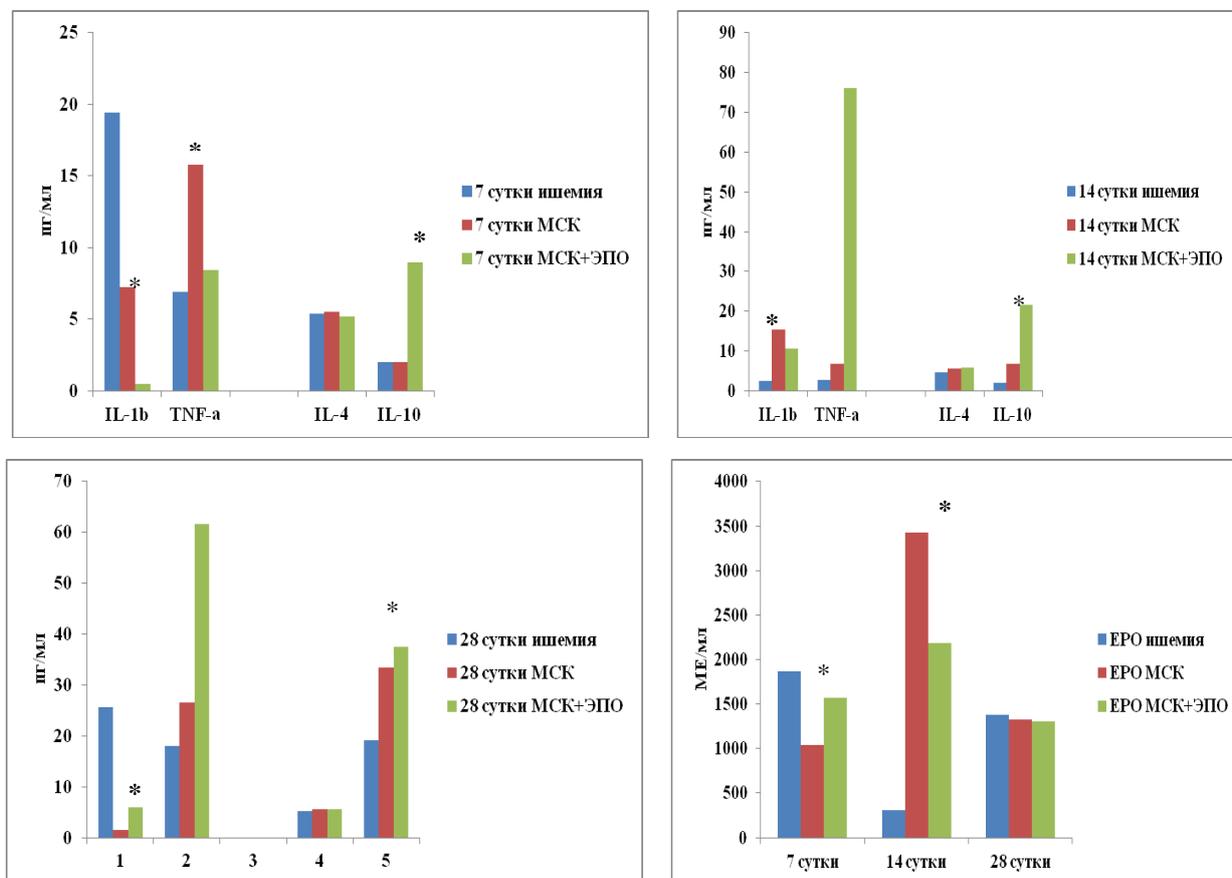
Так, на 7-е сутки после моделирования ишемии у крыс в сыворотке крови группы МСК уровень IL-1 β был значимо выше, чем в контроле и в группе МСК + ЭПО ($p < 0,05$). На 14-е сутки эксперимента в группе МСК также отмечен более высокий уровень IL-1 β по сравнению с группой МСК + ЭПО ($p < 0,05$). На 28-е сутки эксперимента уровень IL-1 β в группе МСК был значимо снижен в сравнении с остальными опытными группами ($p < 0,05$). Концентрация TNF- α в сыворотке крови на 7-е сутки эксперимента была значимо повышена в группе МСК и группе МСК + ЭПО, особенно – в группе МСК в сравнении с контролем и группой ФР ($p < 0,05$). На 14-е сутки

эксперимента в сыворотке крови животных группы МСК + ЭПО выявлен значимо более высокий уровень TNF- α ($p < 0,05$). На 28-е сутки эксперимента в группе контроля выявлен всплеск уровня TNF- α в сыворотке крови в сравнение с остальными опытными группами ($p < 0,05$).

Уровень IL-4 в сыворотке крови группы МСК + ЭПО на 7-е, 14-е и 28-е сутки эксперимента был существенно снижен в сравнение с аналогичным параметром в группе контроля ($p < 0,05$). 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 контроля на 7-е и 14-е сутки ($p < 0,05$). Следует отметить тот факт, что уровень ЭПО в сыворотке крови группы МСК + ЭПО значимо меньше, чем в контроле и группе МСК ($p < 0,05$).

Известно, что при гипоперфузии скелетных мышц в них повышена экспрессия генов *IL-1 β* и *IL-6* (Testa M., 2000). Представлялось важным оценить уровень цитокинов в мышцах при ишемии конечностей и влияние биомедицинского клеточного продукта на их уровень. Так, уровень IL-1 β в мышцах голени крыс с ишемией из группы МСК и МСК + ЭПО, особенно – МСК + ЭПО, существенно ниже, чем в группе контроля на 7-е сутки эксперимента ($p < 0,05$) (Рисунок 11). На 14-е сутки эксперимента картина кардинально меняется: уровень IL-1 β в мышцах голени группы МСК и МСК + ЭПО значительно возрастает, а в группе контроля снижается ($p < 0,05$). В то же время на 28-е сутки эксперимента в группе контроля вновь выявлен увеличенный уровень IL-1 β в мышцах голени, а в остальных опытных группах – сниженный ($p < 0,05$). В группе МСК и МСК + ЭПО, особенно – МСК, на 7-е сутки эксперимента выявлен существенно повышенный уровень TNF- α в мышцах голени по сравнению с остальными опытными группами ($p < 0,05$). Повышенный уровень TNF- α в мышцах голени в группе ФР, МСК и МСК + ЭПО, особенно в группе МСК+ЭПО, выявлен на 14-е сутки эксперимента в сравнении с контролем ($p < 0,05$). К 28-м суткам эксперимента

отмечено сохранение более высокого уровня TNF- α в мышцах голени в группе МСК и МСК + ЭПО, особенно в группе МСК + ЭПО ($p < 0,05$).



Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с ишемией.

Рисунок 11 – Уровень цитокинов и ростовых факторов в мышцах голени у крыс с ишемией конечностей (Me, n = 53). МСК – введение мезенхимных стволовых клеток в мышцы голени; МСК + ЭПО – введение МСК в сочетании с эритропоэтином в мышцы голени

Уровень IL-4 в мышцах голени в группе МСК + ЭПО значительно меньше, чем в группе МСК на 7-е сутки эксперимента ($p < 0,05$). На 14-е сутки эксперимента уровень IL-4 в мышцах голени в группе МСК и МСК + ЭПО существенно выше, чем в контрольной группе ($p < 0,05$). Уровень IL-10 в мышцах голени группы МСК + ЭПО был значительно выше, чем в остальных группах на протяжении всего срока наблюдения ($p < 0,05$). В контроле только на 28-е сутки отмечен подъем уровня IL-10 в мышцах голени. Уровень ЭПО в мышцах голени группы МСК был

значимо снижен на 7-е сутки и повышен на 14-е сутки эксперимента ($p < 0,05$). В то же время уровень ЭПО в мышцах голени группы МСК + ЭПО только на 14-е сутки увеличивался по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Терапевтический потенциал биомедицинского клеточного продукта при дегенерации межпозвонкового диска. Одной из причин болей в спине в 20–40 % случаев является дегенерация межпозвонкового диска (Dowdell J., 2018). Клеточные технологии, в том числе и стволовые клетки, на сегодняшний день являются одним из перспективных способов лечения ДМПД (Urtis I., 2019). 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, не выявлено значимых различий по высоте межпозвонкового диска хвостового отдела позвоночника у крыс на уровне С6–7 до момента индукции ДМПД (1,5–1,6 мм в контроле; 1,45–1,6 мм в группе МСК и 1,4–1,6 мм в группе МСК + ЭПО; $p > 0,05$). 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 (0,9–0,9 мм в контроле; 0,8–0,9 мм в группе МСК и 0,7–0,9 мм в группе МСК + ЭПО; $p > 0,05$).

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 (0,7–0,9 мм в контроле; 1,1–1,25 мм в группе МСК и 1,1–1,3 мм в группе МСК + ЭПО; $p < 0,05$). На 21-е сутки эксперимента группа МСК и МСК + ЭПО значимо отличалась от контрольной группы по высоте МПД в области индукции дегенерации (0,6–0,7 мм в контроле; 1,2–1,25 мм в группе МСК и 1,3–1,5 мм в группе МСК + ЭПО; $p < 0,05$).

О клинической эффективности терапии дегенеративного процесса в межпозвонковом диске свидетельствуют и результаты гистологического исследования (Рисунок 12). 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.

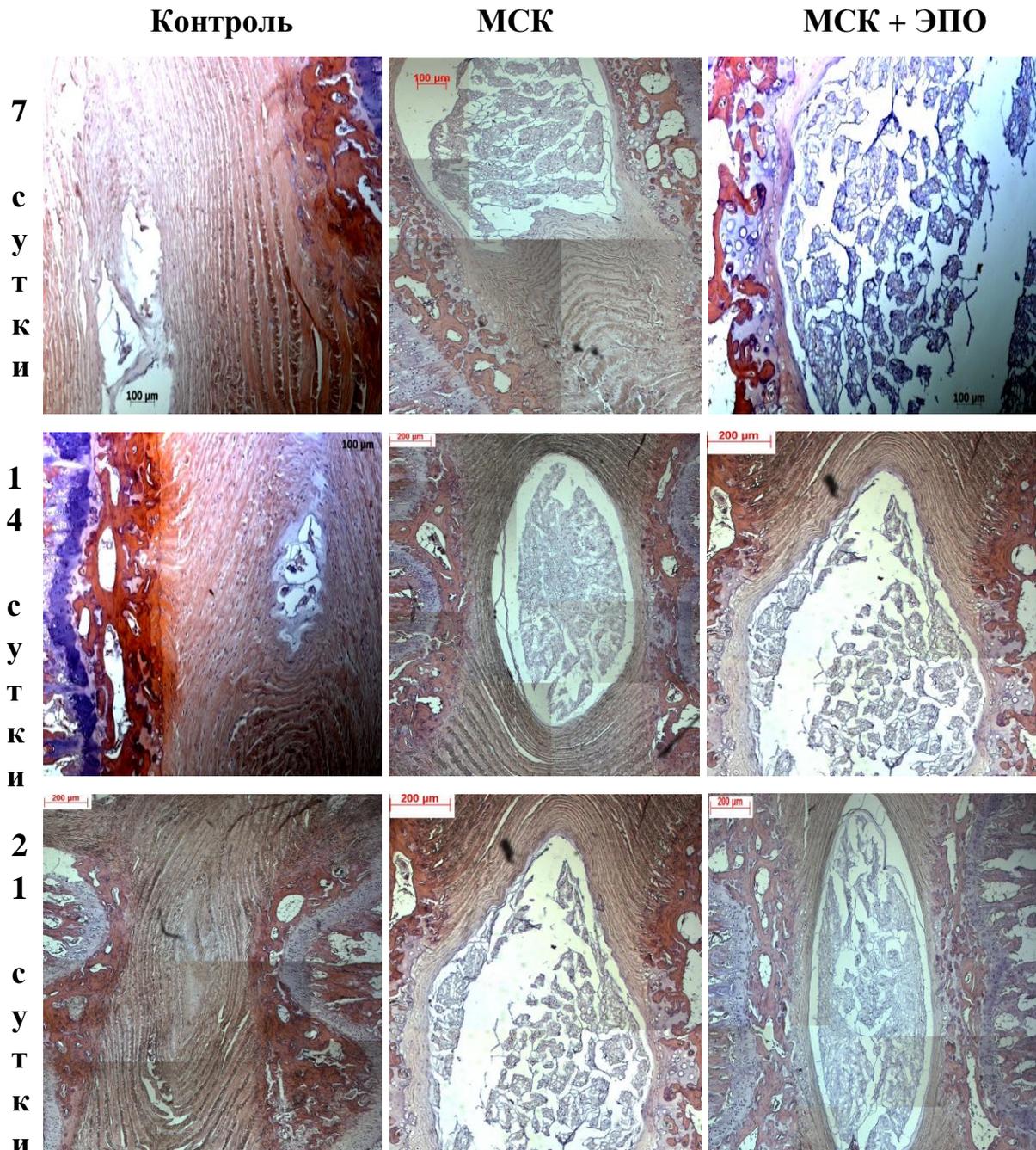


Рисунок 12 – Гистология межпозвонкового диска крысы при дегенеративном процессе в хвостовом отделе позвоночника с учетом способа лечения, гематоксилин-эозин, ув. ×40

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 регулярно ориентированных пластинок.

В группе МСК + ЭПО на 14-е сутки отмечена разрыхленность фиброзного кольца, в области пульпозного ядра имеются 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

Мезенхимные стволовые клетки представляют собой существенную часть общей популяции стромальных клеток органов и тканей человека и животных. 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_2/M). Показано существенное влияние концентрации D-глюкозы, окислительного стресса и их сочетания на пролиферативный потенциал МСК крыс. Мезенхимные стволовые клетки 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. 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. Длительность экспозиции МСК человека с ЭПО в течение 60 минут или 72 часов по-разному влияет на уровень экспрессии молекул адгезии. Снижается экспрессия CD18, но возрастает экспрессия CD54, CD29, CD44, CD49a и CD146 по сравнению с контролем при кратковременной экспозиции, а при 72-часовой экспозиции МСК с ЭПО – возрастает экспрессия CD18, но снижается экспрессия CD54, CD29, CD44, CD 49a и CD146 по сравнению с кратковременной экспозицией клеток с ЭПО. Репликативное старение существенно влияет на морфофункциональные свойства 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. Анализ экспрессии молекул адгезии на мембране старых МСК выявил увеличение пула «состарившихся» МСК, культивированных в присутствии ЭПО, несущих CD54, CD29, CD44, CD49a, а также снижение 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. Анализ экспрессии одного из маркеров аутофагии LC3B в «стареющих» МСК

выявил увеличение его в МСК-ЭПО в 2,5 раза. По данным электронной микроскопии отмечено увеличение объемной плотности гранулярного эндоплазматического ретикулума на 47 % в МСК, культивированных с ЭПО. 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 и в конечном итоге – приобретению клетками черт, характерных для клеток на 4-м 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 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. 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, достигающему к 28-м суткам эксперимента 60 % от исходного уровня. Анализ уровня провоспалительных цитокинов в экстракте мышц голени на стороне индукции ишемии конечности в группе МСК + ЭПО выявил снижение IL-1 β и TNF- α на ранних сроках эксперимента и увеличение к концу эксперимента в сравнении с группой МСК. В мышцах голени группы МСК + ЭПО уровень IL-10 и ЭПО на ранних сроках эксперимента был повышен по сравнению 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, направленная на повышение устойчивости к гипоксии и окислительному стрессу. Анализ высоты межпозвонкового расстояния и патогистологической картины в диске с

дегенерацией, инициированной 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, амортизации при нагрузке, гибкости и подвижности позвоночника. 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.

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, ассоциированный 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 действием (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 эритропоезином повышает устойчивость клеток к неблагоприятным условиям (окислительному стрессу, 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. Эритропоезин 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 о повышении синтеза в клетке).

5. Однократное введение мезенхимных стволовых клеток, мезенхимных стволовых клеток и эритропоезина в толщу мышц голени с ишемией усиливает параметры микроциркуляции в дистальном отделе конечности (стопы). Отмечено возрастание микроциркуляции в стопе в группе крыс, получивших лечение только мезенхимными стволовыми клетками, на 90 %, а в группе крыс, получивших лечение сочетанием мезенхимных стволовых клеток с эритропоезином, – 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 эритропоезином. Так, на системном уровне организм отвечает снижением содержания IL-1 β на 7-е и 14-е сутки и увеличением – на 28-е сутки эксперимента, увеличением содержания TNF α 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 β повышается только на 14-е сутки эксперимента, TNF α – 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 мезенхимных стволовых клеток, мезенхимных стволовых клеток с эритропоэтином ускоряет 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-го пассажа) для получения клеток с новыми функциональными свойствами.

3. Для оценки терапевтического потенциала стволовых клеток рекомендуется использовать экспериментальные модели, воспроизводящие патологические процессы у человека.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Изучение пролиферации, миграции и продукции оксида азота костномозговыми мультипотентными мезенхимными стромальными клетками крыс Вистар при гипоксии и гипергликемии / **А. П. Лыков**, Ю. В. Никонорова, Н. А. Бондаренко [и др.] // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.** – 2015. – Т. 159, № 4. – С. 432–434.

2. Изменения функциональных свойств мезенхимальных стволовых клеток под влиянием эритропоэтина / Н. А. Бондаренко, **А. П. Лыков**, О. В. Казаков [и др.] // **Современные проблемы науки и образования.** – 2017.

– № 6. – С. 88–91.

3. Антиоксидантный эффект эритропоэтина / **А. П. Лыков**, М. А. Суровцева, О. В. Повещенко [и др.] // **Современные проблемы науки и образования**. – 2018. – № 6. – С. 18–21.

4. Влияние внутримышечного введения мезенхимных стволовых клеток и эритропоэтина на ангиогенез при критической ишемии нижних конечностей / **А. П. Лыков**, Н. А. Бондаренко, О. В. Повещенко [и др.] // **Клеточные технологии в биологии и медицине**. – 2018. – № 1. – С. 10–14.

5. Лечение дегенеративного процесса в межпозвонковом диске у крыс Вистар мезенхимными стволовыми клетками / **А. П. Лыков**, Н. А. Бондаренко, О. В. Повещенко [и др.] // **Клеточные технологии в биологии и медицине**. – 2019. – № 4. – С. 267–272.

6. Цитокиновый профиль при экспериментальной модели критической ишемии конечностей у крыс / **А. П. Лыков**, Н. А. Бондаренко, О. В. Повещенко [и др.] // **Клеточные технологии в биологии и медицине**. – 2019. – № 3. – С. 185–190.

7. Влияние эритропоэтина на продукцию цитокинов стволовыми клетками / **А. П. Лыков**, М. А. Суровцева, О. В. Повещенко [и др.] // **Медицинская иммунология**. – 2019. – Т. 21, № 5. – С. 861–868.

8. Эффект эритропоэтина на стволовые клетки и EA.HY 926 при окислительном стрессе / **А. П. Лыков**, М. А. Суровцева, О. В. Повещенко [и др.] // **Биофармацевтический журнал**. – 2019. – Т. 11, № 4. – С. 67–73.

9. Erythropoietin and mesenchymal stem cells properties / **A. Lykov**, M. Surovtseva, N. Bondarenko [et al.] // **Biointerface research in applied chemistry**. – 2020. – Vol. 10, N. 5. – P. 6197–6207.

10. Влияние эритропоэтина на морфофункциональные свойства мезенхимных стволовых клеток / **А. П. Лыков**, М. А. Суровцева, И. И. Ким [и др.] // **Клеточные технологии в биологии и медицине**. – 2020. – № 3. – С. 209–216.

11. Терапевтический потенциал биомедицинского клеточного продукта

при ишемии нижних конечностей у крыс / **А. П. Лыков**, Н. А. Бондаренко, О. В. Повещенко [и др.] // **Ангиология и сосудистая хирургия**. – 2020. – Т. 26, № 3. – С. 37–43.

12. Влияние культивирования мезенхимных стволовых клеток с эритропоэтином на их морфофункциональные свойства / **А. П. Лыков**, М. Хевор, М. А. Суровцева [и др.] // **Сибирский научный медицинский журнал**. – 2021. – Т. 41, № 5. – С. 53–61.

13. **Лыков, А. П.** Мезенхимные стволовые клетки: свойства и клиническое применение / **А. П. Лыков** // **Сибирский научный медицинский журнал**. – 2023. – Т. 43, № 2. – С. 40–53.

14. **Лыков, А. П.** Эритропоэтин: функции и терапевтический потенциал / **А. П. Лыков** // **Сибирский научный медицинский журнал**. – 2023. – Т. 43, № 2. – С. 29–29.

15. **Свидетельство о государственной регистрации базы данных 2021621698** Российская Федерация. Морфофункциональные свойства мобилизованных моноклеаров костного мозга больных ишемической болезнью сердца (МКМ ИБС) : № 2021621568 : заявл. 28.07.2021 : опубл. 10.08.2021 / Повещенко О. В., Лыков А. П., Суровцева М. А., Бондаренко Н. А., Ким И. И. ; правообладатель: федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» // Бюллетень «Программы ЭВМ, базы данных и топологии интегративных микросхем». – 2021. – № 8. – 30 КБ.

16. Биомедицинский клеточный продукт в терапии воспалительно-дегенеративных заболеваний / **А. П. Лыков**, Н. А. Бондаренко, М. А. Суровцева [и др.] // Биомедицина-2016 : сборник материалов форума. – Новосибирск, 2016. – С. 43.

17. Функциональная активность мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток под влиянием эритропоэтина / Н. А. Бондаренко, **А. П. Лыков**, М. А. Суровцева [и др.] // Лимфология: от фундаментальных

исследований к медицинским технологиям : материалы 12-й Международной конференции, посвященной 25-летию Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии. – Новосибирск, 2016. – С. 38–40.

18. Терапевтический потенциал биомедицинского клеточного продукта / **А. П. Лыков**, Н. А. Бондаренко, М. А. Суровцева [и др.] // Лимфология: от фундаментальных исследований к медицинским технологиям : материалы 12-й Международной конференции, посвященной 25-летию Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии. – Новосибирск, 2016. – С. 137–140.

19. Эффективность мезенхимных стволовых клеток костного мозга совместно с эритропоэтином в лечении ишемии нижних конечностей у крыс / Н. А. Бондаренко, **А. П. Лыков**, А. В. Кабаков [и др.] // 3-й Национальный конгресс по регенеративной медицине : материалы конгресса // Гены и клетки. – 2017. – Т. 12, № 3. – С. 47–48.

20. Эффективность применения мезенхимных стволовых клеток и эритропоэтина в модели ишемии нижних конечностей / Н. А. Бондаренко, **А. П. Лыков**, О. В. Повещенко [и др.] // Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины : сборник материалов конгресса молодых ученых. – Томск, 2018. – С. 450–452.

21. Эритропоэтин как стимулятор терапевтического потенциала мезенхимных стволовых клеток / **А. П. Лыков**, М. А. Суровцева, О. В. Повещенко [и др.] // 4-й Национальный конгресс по регенеративной медицине : материалы конгресса // Гены и клетки. – 2019. – Т. 14, № 5. – С. 138.

22. Терапевтический потенциал биомедицинского клеточного продукта при ишемии нижних конечностей / О. В. Повещенко, **А. П. Лыков**, В. В. Нимаев [и др.] // Биотехнология – медицине будущего : материалы Всероссийской мультikonференции с международным участием. – Новосибирск, 2019. – С. 80.

23. Эритропоэтин как активатор аутофагии в мезенхимных стволовых

клетках / **А. П. Лыков**, М. А. Суровцева, Н. А. Бондаренко [и др.] // 5-й Национальный конгресс по регенеративной медицине : материалы конгресса // Гены и клетки. – 2022. – Т. 17, № 3. – С. 138–139.

24. Влияние эритропоэтина на функциональные свойства мезенхимных стволовых клеток *in vitro* / **А. П. Лыков**, М. А. Суровцева, Н. А. Бондаренко [и др.] // 5-й Национальный конгресс по регенеративной медицине : материалы конгресса // Гены и клетки. – 2022. – Т. 17, № 3. – С. 139.

25. The use of mesenchymal stem cells and erythropoietin in lower limb ischemia / N. Bondarenko, **A. Lykov**, M. Surovtseva [et al.] // Systems Biology and Biomedicine (SBioMed-2018) : the Eleventh International Conference. – Новосибирск, 2018. – P. 28.

26. Erythropoietin augment therapeutic potential of mesenchymal stem cells in rat with degenerate intervertebral disc / **A. P. Lykov**, N. A. Bondarenko, O. V. Poveshchenko [et al.] // Systems Biology and Biomedicine (SBioMed-2018) : the Eleventh International Conference. – Новосибирск, 2018. – P. 85.

27. Oxidative stress protection of the bone marrow-derived mesenchymal stem cells by erythropoietin / M. A. Surovtseva, I. I. Kim, **A. P. Lykov** [et al.] // Systems Biology and Biomedicine (SBioMed-2018) : the Eleventh International Conference. – Новосибирск, 2018. – P. 146.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

| | |
|------|---|
| ДМПД | – дегенерация межпозвонкового диска |
| ИФА | – иммуноферментный анализ |
| КИ | – клеточный индекс |
| КОЕ | – колониеобразующая единица |
| МРТ | – магниторезонансная томография |
| МСК | – мезенхимные стволовые клетки |
| МТТ | – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2 Н-тетразолиум бромид |
| ЭПО | – эритропоэтин |
| ЭПОР | – рецептор к эритропоэтину |
| CD | – кластер дифференцировки |
| LC3B | – маркер аутофагии |