

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи



Александровская Наталья Андреевна

**Стимуляция регенерации кожи с помощью клеточных пластов
из мезенхимных стромальных клеток жировой ткани**

03.01.08 - Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2022

Работа выполнена на кафедре биохимии и молекулярной медицины факультета
фундаментальной медицины Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения
«Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова»

Научный

руководитель:

Макаревич Павел Игоревич, кандидат медицинских наук

Официальные

оппоненты:

Михайлова Наталья Аркадьевна - доктор биологических наук, доцент, главный научный сотрудник, заведующая Центром клеточных технологий Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт цитологии Российской академии наук» (ИНЦ РАН)

Сергеева Наталья Сергеевна - доктор биологических наук, профессор, руководитель отделения прогноза эффективности консервативной терапии опухолей Московского научно-исследовательского онкологического института имени П.А. Герцена – филиала Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Захарова Ирина Сергеевна - кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории эпигенетики развития Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦИГ СО РАН)

Защита диссертации состоится «13» апреля 2022 года в 15 ч 00 мин на заседании диссертационного совета МГУ 03.04 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 73, Факультет биоинженерии и биоинформатики, ауд. 221

E-mail: dissovet@belozersky.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций Научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский проспект, д. 27) и на сайте ИАС «Истина»: <https://istina.msu.ru/dissertations/428880330/>

Автореферат разослан «__» _____ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук



Шаповалова И. В.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

БСА – бычий сывороточный альбумин
ВКМ – внеклеточный матрикс
ГТ – грануляционная ткань
ДКИ – доклинические исследования
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
ЖТ – жировая ткань
ИФА – иммуноферментный анализ
КИ – клинические исследования
КП – клеточный пласт
МСК – мультипотентные мезенхимные стромальные клетки
РНК – рибонуклеиновая кислота
ФБС - фетальная бычья сыворотка
ФР – факторы роста
ФСБ – фосфатно-солевой буфер
 α -ГМА – альфа-гладкомышечный актин
DMEM - среда Игла, модифицированная Дульбекко (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
FGF2 – фактор роста фибробластов 2 (fibroblast growth factor)
G-CSF – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор
HGF – фактор роста гепатоцитов (hepatocyte growth factor)
PDGF – тромбоцитарный фактор роста (platelet-derived growth factor)
TGF- β – трансформирующий фактор роста β (transforming growth factor β)
VEGF – фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor)

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и степень разработанности темы исследования.

Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК), впервые выделенные А.Я. Фриденштейном в 1968 г. (Friedenstein A.J. et al., 1968), к началу XXI века стали одним из наиболее активно исследуемых и перспективных источников клеток для терапевтического применения. Благоприятные эффекты клеточной терапии с использованием МСК были показаны в экспериментальных и клинических исследованиях (КИ) при широком спектре заболеваний. Исходно регенераторный потенциал МСК связывали с их мультипотентностью, т.е. способностью к дифференцировке в несколько типов клеток (адипоциты, хондроциты и остеобласты). В настоящее время большинство исследователей объясняют физиологические и терапевтические эффекты МСК их способностью паракринно, т.е. за счет секретируемых растворимых факторов, активировать или ускорять заживление поврежденной ткани. Продуцируемые МСК растворимые факторы, упоминаемые под общим названием «*секретом*», включают, в том числе, факторы роста (ФР) и цитокины, обладающие иммуномодулирующим, ангиогенным, нейропротекторным, а также антиапоптотическим действием (Caplan A.I., Correa D., 2011; Kalinina N.I. et al., 2011). Несмотря на успешные доклинические исследования (ДКИ), во многих завершенных КИ клеточная терапия с использованием МСК показала эффективность значительно ниже ожиданий (Pittenger, M.F. et al., 2019). Большинство из

них опиралось на введение МСК в виде суспензии, получаемой после ферментативной обработки с целью снятия их с культуральной посуды или носителя. Оказалось, что открепление МСК с последующим инъекционным введением через шприц или катетер приводило к гибели >50% введенных клеток. Выжившие МСК оказывались не способны интегрироваться в ткань и в течение 2-3 недель в зоне введения практически не наблюдалось трансплантированных клеток (Savukinas, U.B. et al., 2016; Arseniev L. et al., 2005).

Альтернативой суспензионному введению стало использование тканеинженерных конструкций, которые, как правило, содержат биосовместимую полимерную матрицу или заселяемый клетками носитель. Конструкции такого рода могут быть трансплантированы на участки пораженной ткани или использованы для замещения части органа, обеспечивая длительное удержание жизнеспособных клеток и способствуя их интеграции *in situ*. Более близкими к нативной ткани по строению и составу являются так называемые *клеточные пласты* (КП) (англ. cell sheets) (Yamada N., Okano T., 1993, 2005), которые представляют собой тканеинженерные конструкции из одного или нескольких типов клеток, объединенных наработанным ими внеклеточным матриксом (ВКМ). В отличие от конструкций на основе скаффолдов из биополимерных или синтетических компонентов, КП содержат ВКМ, депонируемый клетками, в том числе МСК, при долгом (7-14 суток) культивировании. В составе пластов из МСК могут удерживаться компоненты их секретома, в частности, заякоренные ФР и цитокины, а также внеклеточные везикулы, благодаря которым их терапевтический эффект усиливается не только за счет роста выживаемости трансплантированных клеток. Важно отметить, что в составе КП клетки формируют межклеточные контакты и получают широкий репертуар регуляторных сигналов, имитирующих окружение, необходимое для поддержания тонко настроенных физиологических функций МСК, в особенности, их паракринной активности, играющей ключевую роль при терапевтическом использовании.

На сегодняшний день эффективность КП продемонстрирована во многих экспериментальных и ДКИ. Наиболее часто используемыми (в том числе в виде зарегистрированных клеточных продуктов) являются КП из эпителиальных клеток для лечения поражений роговицы, пищевода и пародонта (Li M. et al., 2018). Применение КП из МСК, в свою очередь, только находит свою нишу для восстановления структуры поврежденных тканей, в основном, для реконструкции костных и хрящевых дефектов (Kondo M. et al., 2020). Нашим коллективом ранее было показано, что трансплантация КП из МСК на ишемизированные скелетные мышцы приводит к восстановлению их васкуляризации (Макаревич П.И. и др., 2015; Makarevich P.I. et al., 2015). В связи с этим, восстановление с помощью пластов из МСК поврежденных покровных тканей, например, глубоких ран кожи или хронических дефектов (пролежней и язв), представляется актуальной задачей биомедицины. Использование КП из МСК может повысить эффективность существующих протоколов лечения перечисленных состояний, относящихся к неудовлетворенным медицинским потребностям. Несмотря на очевидную применимость при упомянутых выше заболеваниях, в настоящий момент данные по использованию КП из МСК для лечения кожных дефектов ограничены небольшим количеством исследований (Kato Y. et al., 2015; Y.-C. Lin et al., 2013). Единичные работы посвящены установлению механизма, опосредующего эффекты КП из МСК, а также характеристике функционального статуса самих клеток в составе конструкций.

Полученные в данной работе результаты расширяют представление об эффективности использования КП из МСК для восстановления повреждений кожи, а также вносят вклад в расшифровку механизма действия тканеинженерных конструкций на основе МСК взрослого организма.

Цель исследования. Оценить эффективность и изучить механизм, лежащий в основе регенераторного действия тканеинженерных конструкций в виде клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток жировой ткани (МСК ЖТ) при их использовании для стимуляции заживления дефектов кожи различной этиологии.

Задачи исследования.

1. Отработать способ получения клеточных пластов (КП) из МСК жировой ткани (МСК ЖТ) и охарактеризовать структуру полученных тканеинженерных конструкций.
2. Оценить эффективность трансплантации КП из МСК ЖТ для стимуляции ранозаживления на модели глубокого шинированного дефекта кожи у крысы.
3. Сравнить терапевтическую эффективность трансплантации МСК ЖТ в виде суспензии и в составе КП для стимуляции заживления пролежневых дефектов кожи у мыши.
4. Провести гистологическую оценку роста и ремоделирования грануляционной ткани, а также ее васкуляризации после трансплантации МСК ЖТ в виде КП или суспензии.
5. Проанализировать секреторный и транскриптомный профили МСК ЖТ в составе КП и определить возможные механизмы, лежащие в основе терапевтической эффективности данного класса тканеинженерных конструкций.

Объект и предмет исследования. Объектом исследования данной диссертационной работы являются тканеинженерные конструкции из МСК жировой ткани (клеточные пласты) и их влияние на процессы заживления повреждений кожи различной этиологии. Предметом исследования в диссертации является экспериментальная оценка эффективности КП из МСК при дефектах кожи и мягких тканей и выяснение механизмов, за счет которых реализуется регенеративное действие КП из МСК при их трансплантации в очаг повреждения.

Научная новизна. Впервые выявлена способность КП из МСК ЖТ полностью восстанавливать пролежневые дефекты кожи с минимальным фиброзом или его отсутствием. Впервые предложена гипотеза, что МСК ЖТ в составе КП реализуют эффекты за счет действия паракринных факторов, способствующих стабилизации сосудистого русла и созреванию грануляционной ткани. Результаты работы открывают новые возможности для использования КП из МСК ЖТ при разработке эффективных методов стимуляции заживления при повреждениях кожи различного генеза.

Теоретическая и практическая значимость исследования. Полученные результаты расширяют понимание механизмов регенераторных эффектов МСК ЖТ в составе КП. Исследование дает комплексную оценку эффективности КП из МСК ЖТ при восстановлении повреждений кожи. Важным аспектом настоящего исследования является выяснение секреторной активности МСК в составе пласта и ее вклада в модуляцию хода ранозаживления по сравнению с суспензией клеток. Данный вопрос ранее не исследовался применительно к использованию КП из МСК для лечения глубоких травм кожи или длительно заживающих дефектов (пролежней). В работе проведено прямое сравнение эффективности тканеинженерных конструкций в виде пластов из МСК с их введением в виде суспензии, которое широко используется в клинике по сходным показаниям.

Полученные данные могут способствовать созданию новых терапевтических подходов, а разработанные модели могут быть использованы на этапе ДКИ клеточных и тканеинженерных продуктов.

Методология и методы исследования. Методология диссертационного исследования основана на анализе данных литературы, постановке цели и задач с дальнейшей экспериментальной оценкой выдвинутого предположения в сравнительном эксперименте на двух животных моделях, релевантно воспроизводящих патологические состояния у человека. В работе использованы цитологические (выделение и культивирование МСК, сборка тканеинженерных конструкций, клеточные модели оценки биологической активности секрета МСК); биохимические (иммуноферментный анализ); гистологические (окрашивание гематоксилином и эозином, иммуногистохимический анализ с флуоресцентной меткой); молекулярно-биологические (РНК-секвенирование, биоинформатический анализ); физиологические (две модели повреждений кожи на двух видах животных) и статистические методы научного исследования.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Трансплантация МСК жировой ткани в виде клеточных пластов превосходит суспензионное введение по динамике закрытия глубоких ран и пролежней кожи.
2. Заживление шинированной раны кожи под влиянием клеточных пластов из МСК жировой ткани характеризуется быстрым закрытием дефекта, а также активным созреванием грануляционной ткани и формированием рубца.
3. Трансплантация клеточных пластов из МСК жировой ткани с целью заживления пролежня приводит к регенерации кожи и ее придатков без рубца, которой предшествует образование грануляционной ткани с низкой плотностью капилляров и формированием стабильных сосудов с просветом и выраженной муральной компонентой.
4. Регенераторные эффекты клеточных пластов из МСК жировой ткани, вероятно, связаны с их паракринной активностью и составом секрета, который значительно обогащен белковыми факторами, участвующими в регуляции ангиогенеза и стабилизации образованных сосудов.

Степень достоверности данных. Статистическая обработка данных проводилась с использованием программ GraphPad Prism (GraphPad, США) и RStudio (США). Результаты исследования доложены на российских и зарубежных конференциях и опубликованы в рецензируемых журналах.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 15 печатных работ, в том числе, 4 статьи в журналах Scopus и Web of Science, в т.ч. 2 статьи в журналах Q1.

Апробация диссертации. Результаты работы были представлены на III и IV Национальных конгрессах по регенеративной медицине в Москве (15-18 ноября 2017 г.; 20-23 ноября 2019 г.); Всероссийской конференции с международным участием "Актуальные проблемы клеточной биологии и клеточных технологий", Санкт-Петербург (8-11 октября 2019 г.); VII Молодёжной школе-конференции по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН, Санкт-Петербург (12-15 октября 2020 г.); 25-м и 27-м Конгрессах Европейского общества генной и клеточной терапии ESGCT (17-20 октября 2017 г., Берлин, Германия; 22-25 октября 2019 г., Барселона, Испания); 21-м ежегодном Конгрессе Американского общества генной и клеточной терапии ASGCT, США (16-19 мая 2018 г.).

Апробация работы проведена на заседании Кафедры биохимии и молекулярной медицины Факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, состоявшемся 19 ноября 2021 г. по адресу Ломоносовский проспект 27 к.10, протокол № 19/11.

Личный вклад автора. Автору принадлежит ключевая роль в постановке целей и задач диссертационного исследования. Вся работа по выделению и наращиванию клеточных культур, а также выполнению экспериментов *in vitro* была выполнена автором. Работы по планированию и проведению экспериментов *in vivo* также были выполнены лично автором работы. Стоит отметить, что отработка и валидация использованной модели пролежневого дефекта была проведена в данной лаборатории впервые. Необходимо отметить весомый вклад автора в части проведения гистологических и биохимических работ, а также при подготовке публикаций по теме исследования.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, списка сокращений, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы. Работа изложена на 102 страницах, содержит 21 рисунок. Список литературы включает 181 источник, из них 2 отечественных и 179 зарубежных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

Материалы и методы исследований *in vitro*

Выделение и культивирование клеток. Для проведения экспериментов *in vivo* и *in vitro* использовали МСК, выделенные из образцов жировой ткани грызунов (крысы линии Wistar или мыши линии C57Bl/6). Образцы жировой ткани измельчали и подвергали ферментативной обработке с использованием смеси коллагеназы I типа (200 ед/мл, Worthington, США) и диспазы (30 ед/мл, Corning, США) в течение 60 минут при 37°C при периодическом интенсивном встряхивании. После завершения инкубации для инактивации ферментов к полученной смеси добавляли равный объем ростовой среды DMEM с 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС) и центрифугировали при 10 мин 200g. Осадок ресуспендировали в полной среде роста и высаживали в чашки Петри из расчета 5 тыс.кл./см². Клетки культивировали в условиях CO₂ инкубатора при 37°C и 5% CO₂. По достижении 80-90% конфлюэнтности клетки пассировали после обработки 0,05% раствором трипсина-ЭДТА. Все эксперименты проводили на 2-4 пассажах. Кроме первично выделенных клеток в части экспериментов использовали immortalized линию МСК ЖТ человека ASC52telo (ATCC® SCRC-4000™).

Сборка тканеинженерных конструкций (клеточных пластов) из МСК ЖТ. Для сборки КП МСК ЖТ высаживали на непокрытый культуральный пластик необходимого размера в количестве 50 тыс.кл./см² (для МСК ЖТ человека и крысы) или 80 тыс.кл./см² (для МСК ЖТ мыши) в полной среде роста с добавлением аскорбиновой кислоты (50 мкг/мл) и культивировали в течение 7 дней со сменой среды каждые 2 дня.

Для открепления КП ростовую среду удаляли и промывали пласт раствором теплого фосфатно-солевого буфера (ФСБ). После этого края КП осторожно открепляли от пластика с помощью наконечника микропипетки.

Для гистологической характеристики КП после открепления замораживали в жидком азоте в среде Tissue-Tek® O.C.T. Compound (Sakura, США) и затем получали поперечные срезы толщиной 7-8 мкм. Срезы, а также интактные КП на культуральном пластике фиксировали в 4% формальдегиде в течение 10 мин при комнатной температуре, отмывали в ФСБ и затем инкубировали в течение 1 часа во влажной камере в растворе ФСБ+10% сыворотки осла с добавлением 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА). Затем к образцам добавляли раствор первичных антител на ФСБ/1% БСА в течение 14 часов при температуре +4°C. В качестве первичных антител использовали кроличьи поликлональные антитела (Abcam, США) к коллагену I и IV типа, фибронектину и ламинину. В качестве вторичных антител использовали антитела осла против антигенов кролика Alexa Fluor 594 или Alexa Fluor 488 (ThermoFisher, США); ядра метили DAPI (Sigma, США), 20 мкг/мл 5 минут при комнатной температуре.

Получение образцов секрета МСК ЖТ. Для получения образцов секрета (кондиционированной среды) МСК ЖТ чашки Петри с монослоем клеток или КП отмывали раствором Хэнкса 3 раза по 10 минут и затем добавляли бессывороточную среду DMEM (для мультиплексного ИФА, а также для экспериментов *in vivo*) в расчете 250 мкл/см². Клетки инкубировали 7 дней в условиях CO₂ инкубатора при 37°C. На 7 день среду собирали, центрифугировали для удаления клеточного дебриса при 1500 g в течение 10 мин и использовали для анализа. Для нормировки по концентрации ДНК клетки, оставшиеся в чашке после сбора среды, лизировали в реагенте TRIzol (Thermo Fisher Scientific, США). В полученных образцах измеряли концентрацию ДНК с помощью набора для анализа dsDNA Quant-iT PicoGreen (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с руководством производителя.

Определение концентраций ангиогенных факторов в секрете МСК. Концентрации ангиопоэтина-2, G-CSF, HGF, PDGF-BB и VEGF оценивали с помощью набора для сэндвич-иммуноанализа на основе мультиплексных частиц (Human Angiogenesis assay, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) с использованием системы Bio-Plex® 200 (Bio-Rad, США). Анализ проводили в соответствии с инструкциями производителя, все полученные значения были нормализованы относительно концентрации ДНК.

Выделение РНК, РНК-секвенирование и анализ данных. Для РНК-секвенирования МСК в монослое или в виде КП лизировали в реагенте TRIzol (Thermo Fisher Scientific, США) и экстрагировали общую РНК. РНК PolyA очищали с помощью набора для очистки мРНК Dynabeads® (Ambion, США), а библиотеку Illumina изготавливали из РНК polyA с NEBNext® Ultra™ II RNALibrary Prep (NEB, США) в соответствии с протоколом производителя. Концентрации нуклеиновых кислот в полученных библиотеках анализировали с помощью набора для анализа dsDNA HS Qubit (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием оборудования Qbit 2.0. РНК-секвенирование проводили на HiSeq1500 в соответствии с протоколами производителя. Для анализа данных RNA-seq использовали следующий алгоритм: Cutadapt — удаление адаптерных последовательностей, FastQC — контроль качества, Kallisto — выравнивание и картирование, featureCounts — преобразования результатов выравнивания в профиль экспрессии генов, DESeq2 - R-пакет проекта Bioconductor для анализа дифференциальной экспрессии. GO кластеризацию генов проводили с использованием веб-сервисов David 6.8, Enrichr и g:Profiler.

Модели на животных и исследования *in vivo*

Модель глубокой шинированной раны с дефицитом мягких тканей у крысы. Манипуляции с животными были одобрены этическим комитетом МГУ им. М.В. Ломоносова (протокол комиссии по биоэтике МГУ им. М.В.Ломоносова №77-о от 09.02.2017). В данной модели использовали самцов крыс линии Wistar весом 300-400 г. Перед проведением хирургической процедуры животных наркотизировали в/м инъекцией смеси Золетила100 и Ксила из расчета на массу тела животного. Наркотизированным животным сбривали шерсть в области холки, иссекали кожно-фасциальный лоскут округлой формы площадью 5,7 см², подкожный жир и создавали дефект трапециевидных мышц спины. С целью предотвращения естественной раневой контракции края раны по периферии фиксировали узловыми швами к внутреннему краю предварительно простерилизованного латексного кольца (внутренний диаметр 2,7 см). После этого рану укрывали стерильной марлевой салфеткой, смоченной раствором повидон-йода. Животных перевязывали и помещали для восстановления в индивидуальные клетки. Перевязку животных осуществлялась 2 раза в неделю под изофлюрановым наркозом. Латексное кольцо убирали на 14 сутки после операции.

Сравнительное исследование эффективности МСК ЖТ в виде суспензии и в составе КП на модели острой шинированной раны. Для эксперимента *in vivo* животные были поделены на следующие группы: (1) «Контроль» (n=5) – животные без лечения; (2) «Суспензия МСК» (n=4) – инъекционное ведение суспензии МСК ЖТ в края и дно раны; (3) «Клеточный пласт» (n=5) – аппликация КП из МСК ЖТ на поверхность раны.

Трансплантацию клеточного материала проводили на 7 сутки после хирургического вмешательства. Введение суспензии МСК осуществляли путем нескольких микроинъекций в область раневой поверхности (1,5 млн.клеток/мл ФСБ, 5 инъекций по 200 мкл). КП открепляли от пластика (6-луночный планшет, площадь лунки составляла 9 см²) непосредственно перед трансплантацией, переносили на рану в капле ФСБ и расправляли с помощью пинцета. Для предотвращения высыхания трансплантированного материала рану укрывали гидроколлоидной повязкой «Granuflex» (Convatec, США), которая взаимодействуя с раневым экссудатом, образует увлажняющую среду. Повязку удаляли при следующей перевязке животного, а дальнейшие смены повязок осуществляли через равные промежутки времени одинаково во всех группах.

На рис. 1 схематически представлен дизайн эксперимента.

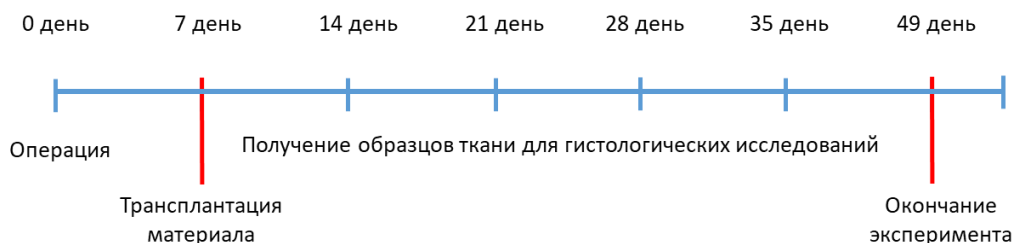


Рисунок.1. Дизайн сравнительного эксперимента по оценке эффективности МСК ЖТ в виде суспензии и в составе КП на модели глубокой шинированной раны.

В контрольных точках (Рис.1) получали образцы ткани для последующего гистологического анализа. Образец делили на 2 части, после чего одну часть помещали в 4% раствор формальдегида и затем заливали в парафин для рутинных гистологических

исследований (окрашивание гематоксилином и эозином, окрашивание по Ван Гизону). Вторую часть образца помещали в среду для гистологических препаратов Tissue-Tek® O.C.T. Compound (Sakura, США), замораживали в парах азота и хранили в холодильнике при температуре -80°C для последующего проведения иммуногистологического анализа с флуоресцентной меткой.

Модель пролежневого дефекта кожи у мыши. Манипуляции с животными и эвтаназию проводили в соответствии с национальными правилами и нормами Европейского Союза. Протокол исследования был одобрен Комитетом по уходу и использованию животных МГУ им. М.В. Ломоносова (разрешение № 67; 15 марта 2018 г.). Трофический дефект кожи (пролежень) у мыши моделировали согласно протоколу, описанному Stadler et al. в 2004 г. на самцах мышей C57Bl/6 12–14 недель. Животных наркотизировали, шерсть на спине сбривали, после чего кожу аккуратно оттягивали и сформированную складку помещали между двумя круглыми магнитами диаметром 12 мм (Master Magnetics, США). Магниты удаляли через 12 часов и оставляли складку кожи свободной на 12 часов, чтобы сформировать цикл ишемии/реперфузии продолжительностью 24 часа. Дефект, соответствующий 2-3 стадии пролежня (некроз кожи, затрагивающий подкожно-жировую клетчатку и мышечный слой) и требующий не менее 14 дней для заживления без терапии, потребовал 3 циклов ишемии/реперфузии. В результате у одного животного получали 2 симметричных одинаковых дефекта на сторонах кожной складки, которую помещали между магнитами.

Сравнительное исследование эффективности МСК ЖТ в виде суспензии и в составе КП на модели пролежневого дефекта кожи. По окончании формирования пролежня введение исследуемого материала животным (день 0) осуществляли под ингаляционным наркозом. Животные были разделены на следующие группы (по 12-16 животных в каждой): (1) «Контроль» - животные без терапии (2) «Суспензия МСК» - 4-5 инъекций в края и дно раны суспензии МСК в дозе 1 млн. клеток в 150 мкл ФСБ на один дефект; (3) «Секретом МСК» - 4-5 инъекций 150мкл кондиционированной среды МСК ЖТ в края и дно дефекта (см. раздел «Получение образцов секрета МСК ЖТ»); (4) «Клеточный пласт» - аппликация одного клеточного пласта из МСК ЖТ на раневую поверхность.

Для сохранности клеточного материала (в первую очередь, КП на поверхности дефекта) поверхность пролежня укрывали коммерческим материалом Tegaderm Film (3М, США), представляющим собой стерильные, прозрачные и водонепроницаемые наклейки для закрытия ран. Tegaderm удаляли через 3 суток после трансплантации.

На рис. 2 схематически представлена схема эксперимента, описанного выше.

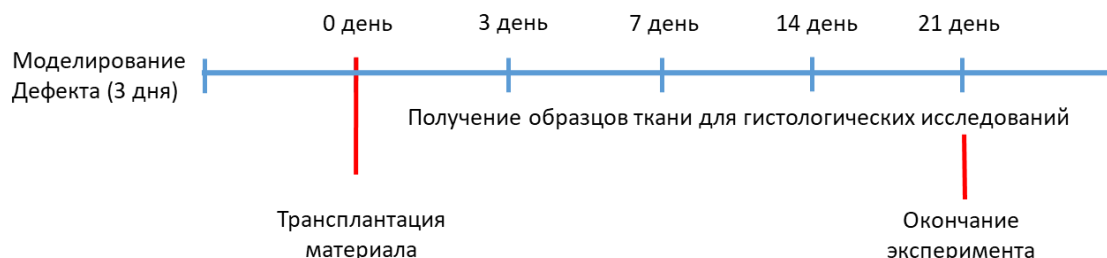


Рисунок 2. Дизайн сравнительного эксперимента по оценке эффективности МСК ЖТ в виде суспензии и в составе КП на модели пролежневого дефекта кожи.

В контрольных точках (Рис.2) для последующего гистологического анализа получали образцы ткани аналогичным способом, описанным для модели шинированной раны кожи.

Методы оценки процесса ранозаживления в экспериментах *in vivo*.

Макроскопическая оценка скорости заживления кожного дефекта. Динамическую фотосъемку раневой поверхности с использованием стандартного мерного отрезка производили в каждой контрольной точке. Подсчет площади дефекта осуществляли в программе для анализа и обработки изображений ImageJ (NIH, США). По результатам обсчета строили график зависимости уменьшения площади дефекта от времени. Для кривой Каплана-Майера критерием успешного закрытия дефекта являлось достижение значения площади дефекта менее 10% от первоначального.

Оценка процессов роста и созревания грануляционной ткани. Срезы тканей толщиной 7-8 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, после чего получали коллекцию изображений для морфометрического анализа. Для оценки роста грануляционной ткани (ГТ) в модели пролежневого дефекта использовали толщину ГТ. Для анализа ремоделирования ГТ подсчитывали площади ГТ и областей депозитов коллагена на срезе. На модели острой раны образцы ткани не давали полной картины заживления дефекта, поэтому в данном случае осуществляли подсчет относительной площади ГТ по методу Автандилова. В данном методе непосредственное измерение площадей структур в поле зрения заменяется дифференцированным подсчетом числа ячеек сетки, занятых изучаемыми структурами, что позволяет избежать ошибок, связанных с субъективной оценкой границ структур. Относительную площадь ГТ ткани рассчитывали, как отношение числа квадратов, занятых ГТ более чем наполовину, к общему числу квадратов, занятых тканью, на срезе.

Дополнительно проводили окрашивание срезов по Ван Гизону. Входящий в состав красителя фуксин окрашивает коллагеновые волокна в пурпурный цвет, а пикриновая кислота придает прочим структурам желтую окраску. С помощью пакета программ обработки изображений ImageJ (NIH, США) подсчитывали долю пурпурно окрашенной ткани по отношению к площади среза. Для образцов пролежневого дефекта использовали окрашивание по Массону. Анилиновый синий в составе красителя окрашивает соединительную ткань окрашивает в ярко-синий цвет, что повышает точность определения волокон коллагена в зоне повреждения. Ядра клеток при этом окрашиваются в багрово-красный цвет, а цитоплазма - в розовый.

Оценка плотности кровеносных сосудов. Интенсивность ангиогенеза оценивали путем подсчета сосудов на поперечных срезах, подвергнутых иммуногистохимическому анализу с флуоресцентной меткой против CD31 (маркер эндотелиоцитов) и альфа-гладкомышечного актина (α ГМА) (для визуализации крупных сосудов с гладкомышечными клетками). Иммуногистохимический анализ проводили на срезах толщиной 7-8 мкм согласно протоколу, аналогичному анализу белков ВКМ КП (см. раздел «Сборка тканеинженерных конструкций (клеточных пластов) из МСК ЖТ»). В качестве первичных антител использовали крысиные антитела против мышинового CD31 (Biolegend, Cat#102401) и антитела кролика против α -ГМА (Abcam, Cat#ab32575). Для подсчета сосудов анализировали 6-8 срезов каждого образца. Подсчет сосудов осуществляли вручную в

программе ImageJ (NIH). В результате обсчета получали усредненное значение сосудов на см^2 площади.

Визуализация трансплантированных МСК ЖТ в составе КП и при введении в виде суспензии. Для визуализации трансплантированных МСК ЖТ клетки метили перед трансплантацией (а МСК в составе КП – перед его сборкой) с помощью прижизненного мембранного красителя PKH26 (Sigma, США) по протоколу производителя. Для детекции клеток замороженные срезы отмывали 3-5 минут в ФСБ, фиксировали в 4% формальдегиде (10 мин) и ядра метили DAPI (Sigma, США) 20 мкг/мл 5 минут при комнатной температуре. Заключенные под покровные стекла срезы в среде Aqua-Poly/Mount (Polysciences, США) сушили на воздухе в течение часа, после чего сигнал (PKH26) детектировали с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DM6000B.

Статистическая обработка результатов. Для статистического анализа использовали программу GraphPad Prism 6 (GraphPad, США). Описательная статистика включала этапы проверки на нормальность, определение среднего значения и стандартного отклонения. Проверку значимости отличий между 2 группами проводили с помощью t-критерия Стьюдента или критерия Манна-Уитни в случае непараметрического распределения значений выборки. Для сравнения 3 групп между собой использовали методы однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и критерий Тьюки для множественных сравнений, либо критерий Краскела-Уоллиса (как непараметрический аналог ANOVA) совместно с критерием Данна. Анализ выживаемости животных выполняли с помощью построения кривых Каплана-Мейера. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение и характеристика тканеинженерных конструкций в виде клеточных пластов из МСК жировой ткани

Оптимизация методики получения клеточных пластов из МСК жировой ткани. Для экспериментов *in vitro* и *in vivo* нами был отработан протокол формирования КП из МСК ЖТ, позволяющий в короткие сроки получать манипулируемые конструкции требуемой площади. Для сборки КП использовали первичные МСК ЖТ человека 2-3 пассажа или иммортализованную линию МСК ЖТ человека ASC52telo, которые высаживали на дно многолуночных планшетов и культивировали в условиях инкубатора (37°C, 5% CO₂) в течение 7-14 дней со сменой ростовой среды DMEM/10% ФБС каждые 2 дня. Для экспериментов *in vivo* аналогичный протокол был отработан на МСК ЖТ модельных организмов – мыши и крысы. Оценка результатов формирования КП показала, что при начальной плотности суспензии 50 тыс. клеток/ см^2 (МСК человека и крысы) и 80 тыс. клеток/ см^2 (МСК мыши) уже через 7 дней культивирования удавалось получить легко снимаемые с культурального пластика конструкции (Рис.3). Разработанный протокол был оптимизирован за счет добавления к среде роста L-аскорбиновой кислоты (50 мкг/мл). Добавление L-аскорбиновой кислоты позволяет увеличить продукцию и сшивку белков ВКМ, а также способствует пролиферации клеток (Wei F. et al., 2012).

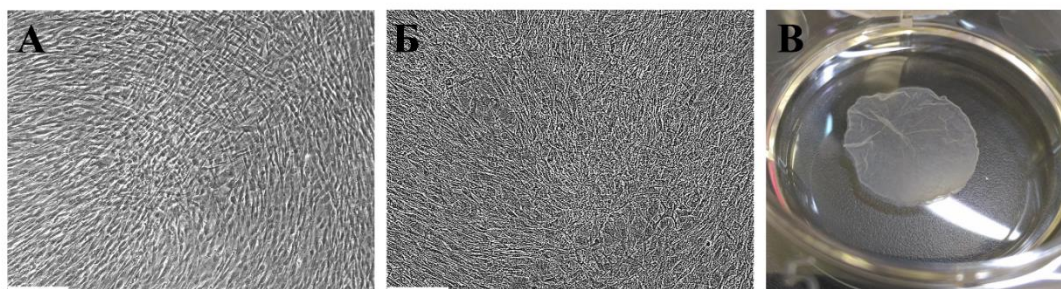


Рисунок 3. Микрофотографии КП из МСК ЖТ человека (А) и крысы (Б) (фазовый контраст, увеличение $\times 100$). Масштабный отрезок соответствует 200 мкм. В. Макрофотография КП из МСК после открепления с культурального пластика.

Гистологическая характеристика клеточных пластов из МСК ЖТ. Анализ поперечных срезов КП из МСК ЖТ мыши, крысы и человека показал, что они представляют собой многослойную (3-5 слоев клеток) конструкцию толщиной до 45 мкм. Иммунофлуоресцентный анализ белков ВКМ (Рис.4) продемонстрировал в составе пластов высокое содержание коллагена I типа и фибронектина, а также присутствие основных белков базальной мембраны – ламинина и коллагена IV типа. Очевидно, что наличие упорядоченного депонированием широкого спектра белков ВКМ обеспечивает не только физическую поддержку МСК, но и наличие специфических сигналов, являющихся критически важными для поддержания функциональной активности МСК (Theocharis A.D. et al., 2016; Hynes R.O., 2009). Известно, что функции клеток могут регулироваться специфическим микроокружением ВКМ, а пространственная ориентация его белков (Рис.4 В-Г) может определять их поведение и секреторную активность (Scadden, 2014). Например, обнаруженные в составе КП белки базальной мембраны могут способствовать миграции эндотелиальных клеток и формированию стабильного сосудистого русла (Schlie-Wolter S. et al., 2013).

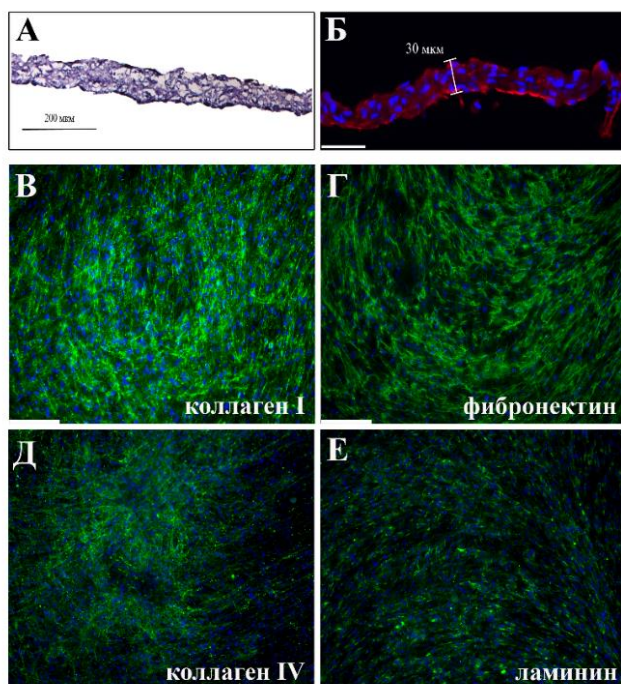


Рисунок 4. Гистологическая характеристика КП из МСК ЖТ А. Окрашивание гематоксилином (поперечный срез, фазовый контраст). Б. Иммунофлуоресцентное мечение белков ВКМ в поперечных срезах КП (фибронектин, масштабный отрезок соответствует 50 мкм). В-Е. Иммунофлуоресцентное мечение коллагена I типа (В), фибронектина (Г), коллагена IV типа (Д), ламинина (Е) в составе КП. Масштабный отрезок соответствует 100 мкм. Ядра помечены DAPI.

Подсчет количества МСК в составе КП. Прямой подсчет клеток в составе КП сложен и требует длительной ферментативной обработки, сопряженной с гибелью клеток, поэтому мы использовали анализ с окрашиванием красителем PicoGreen (Thermo Fisher Scientific, США), который связывается с ДНК. Измеренное в лизате КП из МСК количество ДНК нормировали на данные от лизата суспензии МСК с известным количеством клеток (из расчета 1 ядро/клетку). Такая процедура позволила построить калибровочный график и количественно оценить содержание клеток в составе КП. Было установлено, что КП из МСК содержат в среднем в 4 раза больше клеток по сравнению с монослоем эквивалентной площади.

Исследование эффективности КП из МСК жировой ткани на модели восстановления глубокой шинированной раны кожи с дефицитом мягких тканей у крысы. Для оценки регенеративного потенциала МСК в составе КП была нами выбрана модель острой шинированной раны кожи с дефицитом мягких тканей. Глубокое повреждение подлежащей жировой клетчатки, фасций и мышц позволило смоделировать клиническую ситуацию с потерей большого объема ткани, при которой для ускорения процесса ранозаживления целесообразно использование клеточной терапии и тканевой инженерии. Трансплантацию клеточного материала в виде КП или суспензии МСК проводили на 7 сутки после создания дефекта, т.е. по истечении времени, достаточного для гемостаза, разрешения первичной воспалительной реакции, отека и начала формирования ГТ.

Важным экспериментальным аспектом является подбор количества вводимых МСК для выполнения условия эквивалентности доз при использовании МСК в суспензии и в составе КП. Учитывая полученные результаты *in vitro*, для трансплантации животным были выбраны сопоставимые дозы МСК (1,5 млн. МСК в суспензии и КП из МСК площадью 9,4 см²; см. раздел «Модель глубокой шинированной раны с дефицитом мягких тканей у крысы»).

Трансплантация МСК ЖТ ускоряет заживление глубокого шинированного дефекта кожи и подлежащих мягких тканей. Было установлено, что аппликация (т.е. трансплантация на поверхность сформированного дефекта) КП из МСК ЖТ на 7 день после создания дефекта приводила к ускорению его закрытия по сравнению с отрицательным контролем (Рис.5А). На 14 сутки площадь дефекта в группе с КП составила 1,9±0,7 см² по сравнению с 5,3±0,2 см² в группе контроля ($p<0,05$). Введение суспензии МСК ЖТ также способствовало уменьшению размера раны (в этот же срок площадь раны составила 3,4±1,3 см²), однако статистически значимой разницы с остальными группами обнаружено не было. Медиана срока закрытия раны после аппликации КП составила 28 суток, а после введения суспензии МСК – 35 суток, в то время как в группе отрицательного контроля медиана составила 49 суток (Рис.5Б). В группе КП к 28-ым суткам полное закрытие дефекта наблюдалось у 100% животных, в то время как в группе контроля этот показатель составил всего 20%. Таким образом, трансплантация КП из МСК ЖТ ускорила закрытие раневого дефекта, вероятно, за счет усиленной контракции краев раны. Весьма показательным являлось наличие в группе контроля животных с незажившим дефектом даже на 49-ые сутки эксперимента, что говорит о тяжести повреждения и невозможности самостоятельного восстановления даже в столь отдаленные сроки.

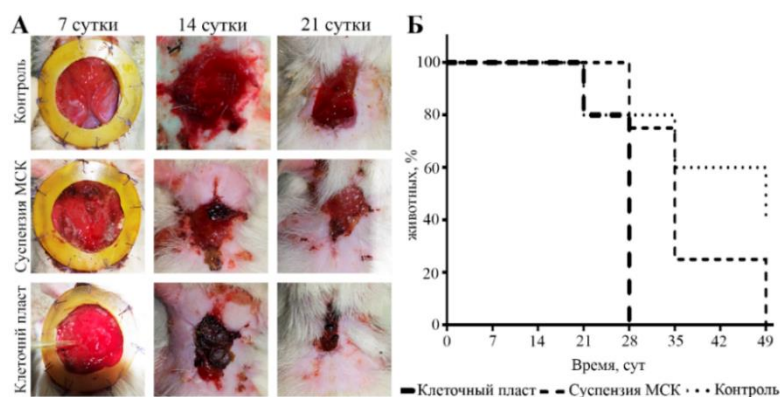


Рисунок 5. Динамика уменьшения площади кожного дефекта в эксперименте.

А. Макрофотографии раневого дефекта в группах исследования. **Б.** Кривая Каплана-Майера, отражающая сроки полного закрытия кожного дефекта. Значимые отличия ($p < 0,05$) выявлены между парами групп «Клеточный пласт» - «Контроль» и «Клеточный пласт» - «Суспензия МСК».

Визуализация трансплантированных МСК ЖТ в образцах ткани. Выявление меченых МСК на гистологических препаратах позволило оценить выживаемость клеток в условиях раны. Для отслеживания распределения введенных МСК целесообразной является детекция *in situ* трансплантированных клеток, меченных прижизненным красителем (например, PKH26). Флуоресцентная микроскопия образцов ткани выявила меченные PKH26 МСК, трансплантированные в виде суспензии и в виде КП на 14 суток после доставки клеточного материала (Рис.6). При этом на 21 сутки PKH-меченные клетки в ткани визуализировались только в группе КП из МСК ЖТ. То обстоятельство, что меченые клетки были обнаружены на 21 сутки только в группе КП, может говорить в пользу того, что конструкция и состав КП способствует выживаемости клеток не только при снятии с культурального пластика и трансплантации, но и непосредственно в условиях раневого микроокружения.

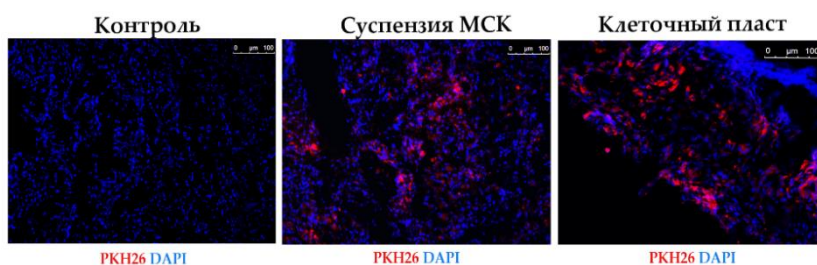


Рисунок 6. Детекция трансплантированных МСК ЖТ, меченных PKH26 (красный), в зоне заживления острой раны кожи на 14 сутки. Ядра помечены DAPI. Масштабный отрезок соответствует 100 мкм.

Трансплантация МСК ЖТ приводит к ускорению созревания грануляционной ткани и формирования рубца. Для того чтобы проанализировать влияние трансплантации МСК ЖТ на процессы восстановления поврежденных тканей был проведен морфометрический анализ срезов, окрашенных гематоксилином и эозином. Формирование ГТ – ключевой этап в ходе заживления раневого дефекта. По мере ее созревания синтез стромальными клетками коллагена и его депонирование приводят к постепенному вытеснению остальных тканевых элементов и формированию рубца. Мы обнаружили, что вне зависимости от способа введения (суспензия или КП) трансплантация МСК ЖТ приводила к значимому уменьшению площади ГТ в период с 14 по 21 сутки, при этом в группе отрицательного контроля на 21 день площадь ГТ также уменьшалась, но это изменение не было статистически значимым (Рис.7А). Для уточнения полученных результатов было проведено

окрашивание срезов по Ван Гизону, позволяющее визуализировать коллагеновые волокна. Морфометрия окрашенных по Ван Гизону срезов показала, что площадь, занятая коллагеновыми депозитами увеличивалась в период 14-21 сутки эксперимента в группах трансплантации МСК, причем максимальный прирост наблюдался в группе КП (Рис.7Б), что свидетельствует о быстром переходе от стадии грануляций к формированию депозитов коллагена и фиброзированию.

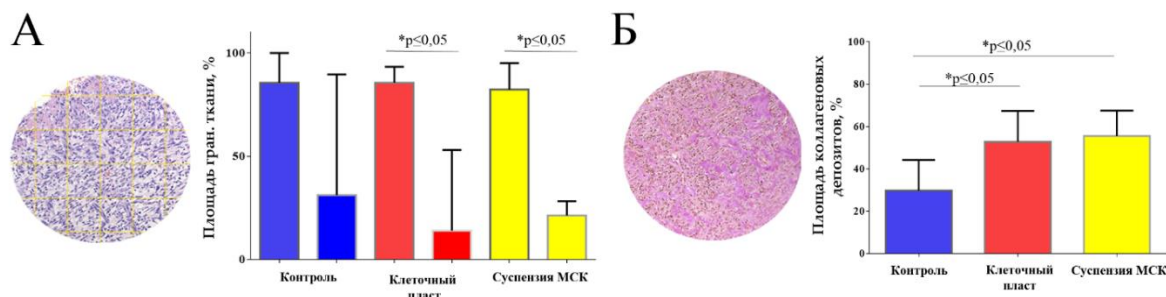


Рисунок 7. Морфометрическая оценка репаративных процессов в коже на модели шинированной раны. **А.** Оценка относительной площади грануляционной ткани на 14 и 21 день (в % от площади среза). Окрашивание гематоксилином и эозином, увеличение $\times 100$. **Б.** Подсчет относительной площади коллагеновых депозитов 21 день после операции. Окрашивание по Ван Гизону, увеличение $\times 100$.

Наблюдавшееся нами ускорение закрытия и активная контракция краев раны могло быть связаны со стимулирующим действием МСК ЖТ на созревание ГТ, сопряженное с появлением в ее составе миофибробластов, способных стягивать края дефекта за счет богатого актином цитоскелета. По данным макроскопического наблюдения трансплантация КП из МСК показала в этом эксперименте большую эффективность по сравнению с МСК в суспензии, однако гистологический анализ не выявил статистически значимых отличий между этими группами. Несмотря на схожие показатели морфометрии, МСК ЖТ в составе КП смогли реализовать свой терапевтический потенциал, что привело к значительному сокращению сроков заживления. Это может быть связано как с наличием в составе КП белков матрикса (что важно при объемной потере ткани), так и с паракринными эффектами жизнеспособных МСК, которые были апплицированы на поверхность раны, а не введены в толщу ткани инъекционно.

Сравнительное исследование терапевтической эффективности МСК жировой ткани, клеточных пластов и секретома МСК на модели пролежневого дефекта кожи у мыши. Травмы мягких тканей в результате сдавления (пролежни) представляют собой особый тип поражения, отличающийся хроническим течением вследствие постоянного механического воздействия в сочетании с трением и влажностью. По сравнению с острыми ранами при формировании пролежня имеют место регулярные циклы ишемии/реперфузии, нарушающие локальное кровообращение и нервную трофику, что приводит не только к некрозу, но и к ишемии окружающих тканей. Учитывая высокую эффективность МСК при ишемических состояниях, обусловленную их способностью секретировать широкий спектр проангиогенных и противовоспалительных молекул, использование КП из МСК может быть эффективной мерой для лечения пролежней кожи. Сравнительное исследование эффективности суспензии и КП из МСК ЖТ было проведено с использованием модели пролежневого дефекта 2-3 стадии, при которой происходит повреждение подкожной

жировой клетчатки и мышц. В качестве дополнительной группы сравнения мы использовали кондиционированную среду от МСК ЖТ (секретом МСК), содержащую продуцируемые МСК растворимые факторы.

Трансплантация КП из МСК ускоряет заживление пролежневого дефекта и приводит к полной регенерации кожи. Макроскопическая оценка скорости заживления по фотографиям раневой поверхности с подсчетом изменения площади пролежня (Рис.8) показала, что к 21 дню в группе КП из МСК ЖТ у всех животных наблюдалось полное закрытие дефекта. Более того, у 3 из 4 животных этой группы не было видимых рубцов на коже и возобновился рост волосяного покрова, чего не было отмечено ни в одной другой экспериментальной группе.

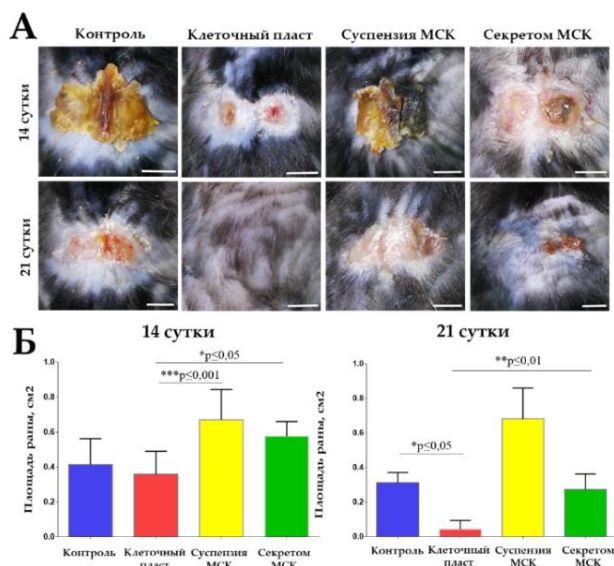


Рисунок 8. Макроскопическая оценка закрытия пролежневого дефекта в экспериментальных группах. **А.** На 21-й день после трансплантации КП обнаруживается полное закрытие дефекта и отсутствие рубцов в месте повреждения. Масштабная отрезок соответствует 5 мм.

Б. Результаты измерения площади дефекта на 14 и 21 сутки.

Результаты морфометрического анализа гистологических препаратов представлены на Рис.9. К 14 дню во всех экспериментальных группах пролежневые дефекты были полностью эпителизированы, а в группе КП было отмечено также активное созревание ГТ (Рис. 9В), аналогичное наблюдавшемуся после аппликации КП из МСК ЖТ в модели шинированной раны у крысы (Рис.7). К 21 дню по данным гистологического исследования все экспериментальные группы соответствовали поздним стадиям регенерации кожи или формирования рубца. При этом в группе КП мы наблюдали микроскопическую картину полного заживления дефекта, что подтвердило данные макроскопической оценки (Рис.8). Важным гистологическим критерием успешности использования КП из МСК было появление у животных из этой группы признаков регенерации придатков кожи (желез и волосяных луковиц) на месте пролежня. Их мы обнаружили только на препаратах кожи животных, которым были трансплантированы КП из МСК. При этом регенерация подкожного жира и мышц к 21 дню была неполной даже в этой группе (Рис.9А).

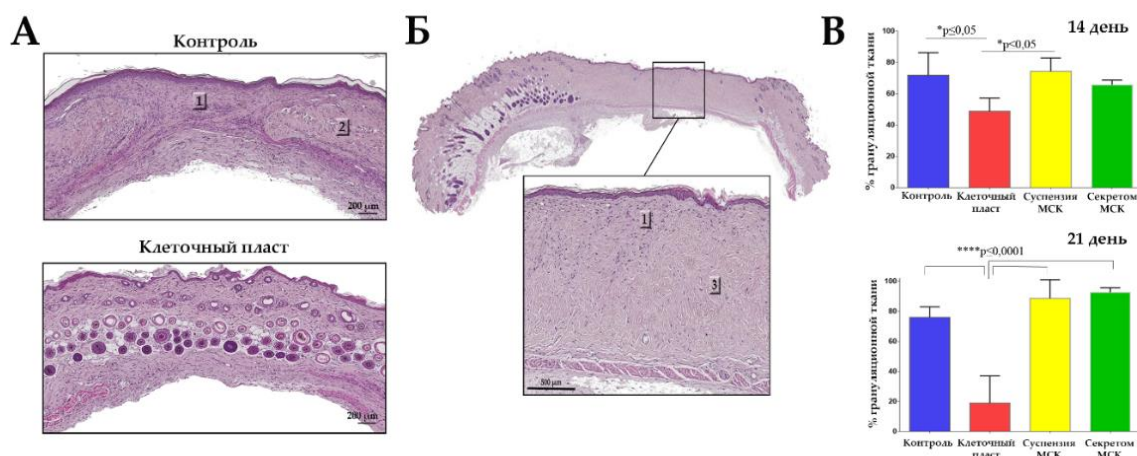


Рисунок 9. Гистологическая оценка ремоделирования грануляционной ткани (ГТ) в экспериментальных группах. **А.** Поперечные срезы кожи в области сформированного пролежня на 21 день эксперимента. В контрольной группе наблюдаются процессы ремоделирования ГТ (1) и появления коллагеновых депозитов (2). У животных из группы КП визуализируется восстановление нормальной структуры кожи на месте дефекта, который можно распознать по не восстановившимся мышечным волокнам. Окрашивание гематоксилином и эозином. **Б.** Поперечный срез кожи из контрольной группы эксперимента на 35 сутки. Без лечения у животных не происходит спонтанного восстановления структуры кожи. На месте дефекта формируется обширный рубец (2) с участками зрелой ГТ (1). **В.** Морфометрическая оценка площади ГТ на 14 и 21 день эксперимента.

Для визуализации ВКМ, депонированного в ходе ремоделирования ГТ, нами было проведено трехцветное окрашивание срезов по Массону (Рис.10). На 14 день в группе КП мы обнаружили увеличение количества коллагена, что коррелировало с уменьшением площади ГТ на срезах (Рис.9В). Следует отметить, что на 21 день образцы кожи из группы КП также активно окрашивались анилиновым синим, что говорило о наличии большого объема соединительной ткани, однако характер укладки ВКМ был характерным для здоровой кожи, в особенности с учетом наличия придатков кожи на месте зажившего дефекта. Спонтанное восстановление в данной модели невозможно, о чем свидетельствовала дополнительная гистологическая оценка кожи и ее придатков у животных без лечения на 35 день. Было установлено, что к 35 дню у животных без терапии на месте дефекта формировались типичные рубцы (Рис.9Б). Таким образом, трансплантация КП из МСК не просто ускоряла процесс ранозаживления, а способствовала модификации его гистологического исхода и предотвращала фиброзирование ткани.

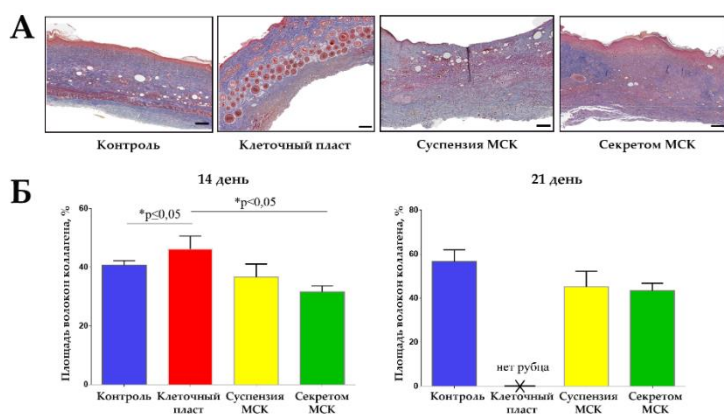


Рисунок 10. Гистологическая оценка ремоделирования ГТ в экспериментальных группах. **А.** Поперечные срезы кожи в области сформированного пролежня на 21 день эксперимента. Окрашивание по Массону. Масштабный отрезок соответствует 200 мкм. **Б.** Подсчет относительного содержания коллагена и ретикулярных волокон в поперечных срезах кожи на 21 день после операции.

Трансплантация КП из МСК активирует рост ГТ на ранних сроках раневого процесса. Трансплантация КП из МСК ЖТ привела к активному ремоделированию ГТ в обеих моделях повреждения кожи (Рис.7, 9 и 10), однако в случае пролежневого дефекта мы наблюдали полную регенерацию кожи, в то время как после острой раны процесс ее заживления заканчивалось формированием рубца. Данный феномен заставил нас обратить внимание на ранние этапы процесса, а также на время внесения клеточного материала. При восстановлении поврежденной ткани после разрешения острого воспаления начинается фаза пролиферации, для которой характерно формирование ГТ, богатой кровеносными сосудами и стромальными клетками. Для оценки образования и роста ГТ нами была измерена ее толщина на 3-ий и 7-ой дни эксперимента (Рис.11). На 3-ий день значимое увеличение толщины ГТ наблюдалось только в группе КП (в 1,5 раза выше по сравнению с контролем). К 7 дню данная тенденция становилась более выраженной, причем именно в группе КП ГТ имела максимальную толщину среди всех экспериментальных групп (Рис. 11Б). Изменения организации ГТ также были отмечены в группах суспензии и секретома МСК: толщина ГТ в этих группах была значимо выше, чем в контрольной ($p < 0.05$).

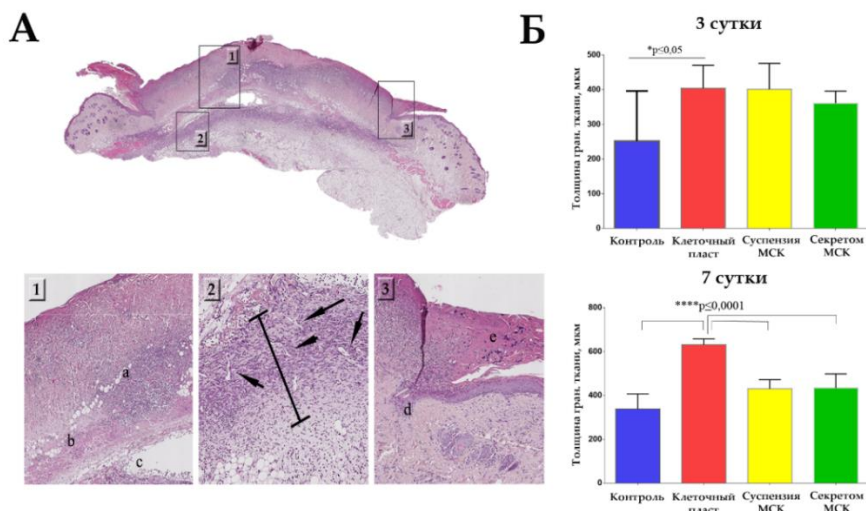


Рисунок 11. Морфометрический анализ процесса формирования ГТ в экспериментальных группах. **А.** Поперечный срез поврежденной кожи на 3-й день; 1 - зона поврежденной ткани вплоть до (б) мышечного слоя с инфильтрацией (а) клетками, происходящими из моноцитов, и (с) отеком подлежащей ткани; 2 - зона образования ГТ и линия, обозначающая измеренную толщину, кровеносные сосуды указаны стрелками; 3 – поверхность дефекта со (е) струпом и (д) мигрирующим слоем эпителия. Окрашивание гематоксилином и эозином. **Б.** Результаты морфометрии толщины ГТ на 3 и 7 суток.

Васкуляризация ГТ при заживлении пролежня изменяется под действием секрета и КП из МСК. Помимо увеличения толщины ГТ мы обнаружили изменение ее васкуляризации, которая является ключевым параметром, отражающим ее состояние и стадию созревания. Срезы заживающего пролежневого дефекта были использованы для иммуногистохимической визуализации кровеносных сосудов с помощью антител против CD31 и α -ГМА (Рис.12). Плотность капилляров в ГТ на 3 и 7 сутки была значимо снижена в группе КП по сравнению с остальными группами. Кроме того, в группах КП и секрета МСК в составе ГТ была обнаружена высокая плотность крупных (до 50 мкм) стабилизированных сосудов с четким просветом и слоем эндотелия, окруженным α -ГМА+ муральными клетками (Рис.12А).

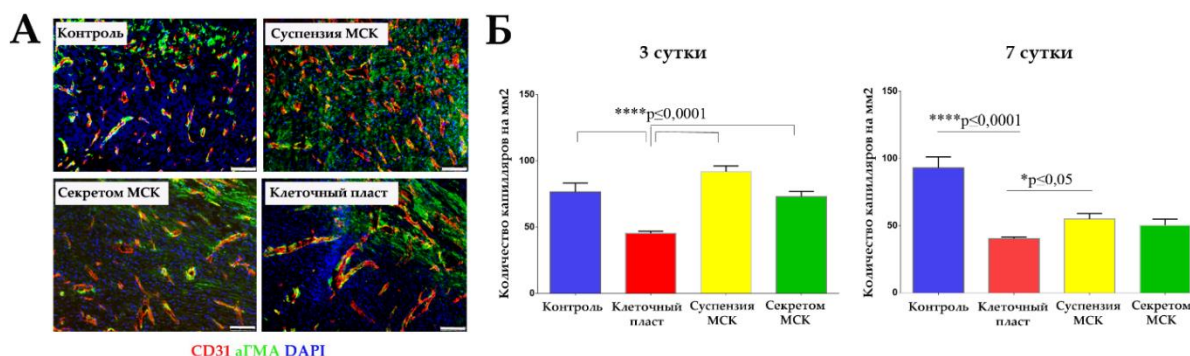


Рисунок 12. Оценка васкуляризации ГТ в зоне пролежневого дефекта. **А.** Микрофотографии поперечных срезов ткани с визуализацией кровеносных сосудов (CD31) в ГТ на 7 день. Дополнительно в срезах для визуализации сосудов, стабилизированных муральными клетками, был помечен α -ГМА. Масштабный отрезок соответствует 75 мкм. **Б.** На графиках представлены результаты количественной оценки плотности кровеносных сосудов.

Таким образом, использование МСК ЖТ (в суспензии и в виде КП) и их секрета для стимуляции заживления пролежневых дефектов способствовало на ранних сроках активному образованию ГТ с увеличением ее толщины. В то же время только КП из МСК ЖТ поддерживали рост ГТ после 3х суток (Рис.11Б). Данный эффект может быть связан с сохранением жизнеспособных МСК при аппликации в составе конструкции, а также с паракринным действием КП, расположенного на поверхности дефекта, где им создается градиент растворимых факторов, способствующих направленному росту ГТ. Кроме того, под влиянием КП из МСК изменялся характер васкуляризации ГТ. В этой группе сосудистое русло было представлено, в основном, крупными сосудами, стабилизированными муральными клетками, а плотность мелких капилляров была значительно снижена. Несмотря на общепризнанную важность ангиогенного ответа для успешного ранозаживления, показано, что подавление роста сосудов ингибиторами ангиогенных факторов роста снижает распространенность фиброза и объем рубца после повреждения кожи (DiPietro L.A., 2013). Большинство сосудов, образующихся в ГТ, имеют слабо сформированную базальную мембрану, что приводит к неэффективной перфузии и утечке белков плазмы в межклеточное пространство. Стабилизация сосудов муральными клетками приводит к продукции белков базальной мембраны и нормализации их проницаемости с восстановлением перфузии ткани (Hellstrom M. et al., 2001).

Оценка судьбы МСК после трансплантации в виде суспензии или клеточных пластов. Для оценки удержания и выживаемости трансплантированных МСК части животных были введены клетки, предварительно меченные с помощью флуоресцентного красителя РКН26. Меченые МСК, введенные в виде суспензии, визуализировались вплоть до 21 дня эксперимента в дерме и подлежащих к ней слоях (Рис.13). В то же время МСК, трансплантированные в составе КП, к нашему удивлению, были обнаружены только в самой ранней точке (на 3-и сутки). На ряде микрофотографий сигнал РКН26 не был локализован с DAPI-позитивными ядрами, что может указывать на остаточную природу обнаруженного красителя. Во временных точках после 3-го дня мы не смогли обнаружить КП, меченый РКН26, что может указывать на его резорбцию или отторжение с поверхности дефекта вместе со струпом.

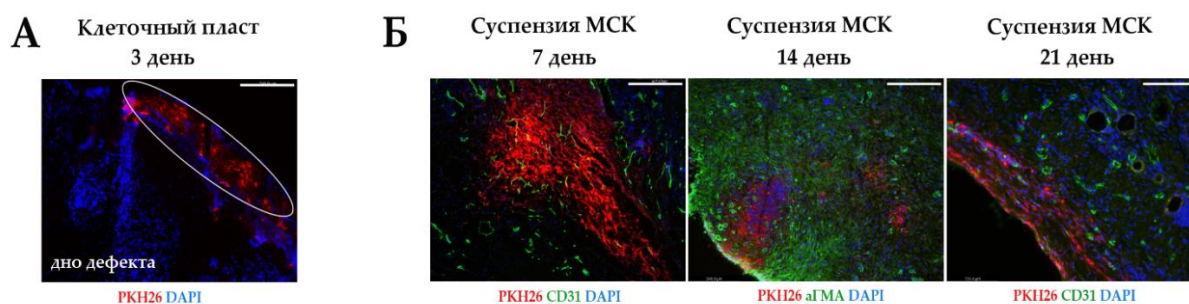


Рисунок 13. Выживаемость МСК ЖТ в области пролежневого дефекта после трансплантации. Клеточный пласт обнаруживался на поверхности раны только до 3 дня; МСК ЖТ, введенные в виде суспензии, сохраняются в ткани до 21 дня. Масштабный отрезок соответствует 250 мкм.

Обобщая полученные данные, можно заключить, что трансплантированный КП из МСК ЖТ сохраняется в зоне дефекта от 3 до 7 дней, после чего, вероятно, удаляется с его поверхности. Тем не менее за этот промежуток времени формировался мощный регенераторный импульс, которого хватало для запуска полной регенерации кожи без формирования рубца к 21-му дню. В то же время МСК, введенные в виде суспензии, оставались в ткани значительно дольше, однако при этом в зоне зажившего дефекта отмечался фиброз кожи. По результатам гистологического анализа срезов из группы суспензии МСК, РКН26-позитивные клетки детектировались отдельно от αГМА-позитивных миофибробластов (Рис.13, 14 сутки) и CD31-позитивных капилляров (Рис.13, 21 сутки). Вероятно, МСК сохраняют после введения жизнеспособность, однако принимают участие в стимуляции ранозаживления с помощью секретируемых ими растворимых факторов только на начальных сроках после трансплантации и (Verma R.S. et al., 2019; Sagaradze G.D. et al., 2019). В последнее время принято считать, что регенераторный потенциал МСК основан на их паракринном действии и использование «бесклеточной терапии» с введением их секрета может быть сопоставимо по эффективности с доставкой самих МСК. В нашей работе результаты введения секрета МСК, в целом, оказались сходными с эффектом трансплантации суспензии МСК.

Это навело нас на предположение, что действие КП из МСК может быть опосредовано паракринными механизмами, особенно в свете данных о том, что КП находится в зоне дефекта непродолжительное время (3-7 дней). Важно отметить, что в составе КП содержится в 4 раза больше клеток, чем в монослое такой же площади, а также присутствует ВКМ, способствующий удержанию продуцируемых факторов роста и

цитокинов. Все это может значительно увеличивать удельную концентрацию доставляемых в зону повреждения белков, а способ аппликации на поверхность дефекта (раны или пролежня) может способствовать эффективному действию секрета во всей зоне повреждения, а не локально в месте инъекции суспензии МСК или их секрета.

Наиболее значимые различия в действии КП и суспензии МСК наблюдались при оценке процессов роста и ремоделирования ГТ. На обеих моделях трансплантация КП из МСК приводила к активному ремоделированию ГТ, но из-за разных сроков доставки клеточного материала только в случае пролежневого дефекта мы могли оценить ранние этапы ее формирования. Данный факт поставил еще один вопрос о механизме действия вводимых МСК при ранозаживлении. В модели шинированной раны КП из МСК трансплантировали на формирующуюся ГТ (7-ой день после повреждения), причем мы наблюдали ускорение ранозаживления, но не изменение его принципиального исхода. В то же время на модели пролежня введение клеток или секрета осуществляли непосредственно на сформированный дефект, что приводило к активному росту ГТ, сопровождавшемуся снижением васкуляризации. На поздних сроках (14-21-ый дни) после доставки КП мы наблюдали ремоделирование ГТ, схожее с результатами на модели шинированной раны, однако заживление пролежня завершалось без формирования рубца. Таким образом, можно полагать, что введение КП из МСК на ранних этапах восстановления поврежденной ткани может способствовать изменению состава ГТ и ее ремоделирование на поздних сроках может приводить к регенерации кожи с полным восстановлением структуры ткани.

Выяснение молекулярного механизма регенераторных эффектов КП из МСК ЖТ. Полученные на моделях *in vivo* данные подтолкнули нас к исследованию секреторной активности МСК в составе КП. Данные о снижении васкуляризации ГТ после трансплантации КП из МСК и литературные данные о корреляции интенсивности ангиогенеза с объемом фиброза обратили наше внимание на продукцию ангиогенных ФР МСК в составе КП. С помощью мультиплексного ИФА нами было установлено, что в составе КП МСК продуцируют больше ФР и цитокинов, участвующих в регуляции роста сосудов, однако это увеличение было неравномерным для разных молекул (Рис.14). Например, содержание ангиопоэтина-2 в секрете КП изменялось в 5,1 раза по сравнению с МСК в монослое, однако изменение нормализованной концентрации ключевого ангиогенного фактора VEGF165 не достигало статистической значимости. Стоит отметить, что содержание в секрете КП PDGF-BB – важнейшего фактора таксиса перидитов и созревания сосудов, увеличивалось в 2,45 раза по сравнению с МСК в монослое.

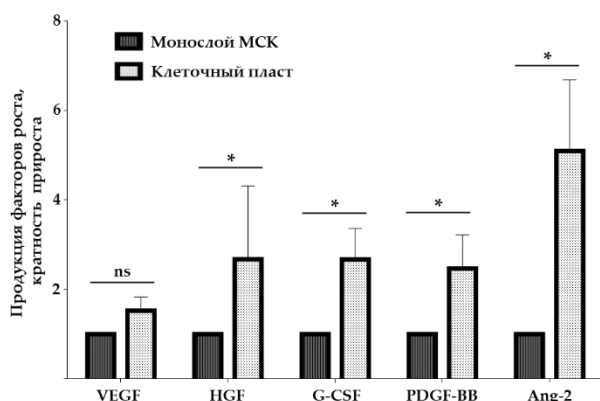


Рисунок 14. Секреция МСК ЖТ ангиогенных факторов роста в составе КП и в монослое. График показывает кратность прироста по сравнению с показателями для образцов секрета МСК в монослое.

При этом на модели пролежня после аппликации КП мы наблюдали снижение васкуляризации ГТ. Принимая во внимание, что процесс формирования сосудов в организме зависит не только от миграции и пролиферации ЭК, но и от их взаимодействия с муральными клетками, и учитывая результаты ИФА, нами была выдвинута гипотеза о возможном сдвиге секреторного профиля МСК ЖТ в составе КП в сторону процесса «стабилизации», но не «активации» роста сосудов. В пользу этого предположения говорит и результат анализа библиотек, полученных РНК-секвенированием образцов, выделенных из МСК в составе монослоя или КП. Используя биоинформатические модули GeneOnthology и Enrichr (<https://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>), мы кластеризовали транскрипты с максимально выраженным изменением (в 2 раза и более) по сравнению с монослоем МСК. Данные по обогащению кластеров биологических процессов (BP) и молекулярных функций (MF) представлены на Рис. 15. Результаты анализа MF показывают, что в КП гены с повышенной экспрессией кодируют белки, регулирующие процессы ремоделирования сосудов (продукция и регуляция чувствительности к TGF β и PDGF-BB) и взаимодействие клеток и ВКМ (связывание коллагена). Кластер, обозначенный как GO: 0045540 с наивысшим комбинированным показателем BP, был обогащен транскриптами генов, продукты которых участвуют в биосинтезе холестерина. Подробный анализ показал, что наиболее представленными из них являются ферменты метаболизма жирных кислот, которые описаны как отрицательные регуляторы ангиогенного ответа в нормальной ткани и опухоли (Rose D.P. et al., 2000; Matesanz, N. et al., 2009). Одновременно с этим анализ генов с пониженной экспрессией показал значительное обогащение ими кластеров белков, которые стимулируют ангиогенез и активную пролиферацию эндотелия. Наиболее яркой иллюстрацией этого является BP анализ транскриптов, показавший снижение экспрессии факторов, стимулирующих прорастание эндотелия (включая FGFs, WNT5A, SERPINE1 и NOTCH1).

Таким образом, трансплантация МСК ЖТ в составе КП при повреждениях кожи стимулирует процессы ранозаживления, ускоряя ремоделирование ГТ. Имеются основания предполагать, что эффекты КП из МСК ЖТ опосредованы выделяемыми ими растворимыми факторами, влияющими на ранние фазы ранозаживления. Действие этих факторов приводит к быстрому росту ГТ и стабилизации сосудистой сети, определяя дальнейший ход ее ремоделирования. Можно предположить, что в этом случае важным фактором становится время трансплантации клеточного материала: доставка МСК на ранних сроках (в первые дни) способствовала изменению состава ГТ и уменьшению объема рубца. В то же время трансплантация МСК на более поздних сроках, когда фаза пролиферации уже началась, а ГТ сформирована, скорее всего будет приводить к сокращению сроков заживления, но не изменению его исхода. Репертуар ФР и цитокинов, продуцируемых МСК в составе КП, может быть описан как направленный на стабилизацию кровеносных сосудов (PDGF-BB, HGF, G-SCF, Ang-2), но не их ветвление и прорастание (VEGF165), что в итоге поддерживает в составе формируемой ГТ необходимую функциональность сосудов. Хотя КП из МСК принято рассматривать в качестве способа доставки живых клеток в очаг поражения, наши данные говорят о том, что МСК в их составе могут обладать отличным от МСК в суспензии паракринным действием, вследствие чего дальнейшее исследование механизмов, лежащих в основе реализации эффектов МСК в составе КП, является важным для фундаментального понимания участия МСК в регенерации и для разработки методов тканевой инженерии.

RNA Sequencing/Biological Process

Upregulated

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

Downregulated

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

RNA Sequencing/Molecular Function

Upregulated

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

Downregulated

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

Рисунок 15. Представление результатов РНК-секвенирования, картированных с использованием инструментов Biological Process и Molecular Function Gene Ontology. Библиотеки «МСК-монослой» и «МСК-пласт» были нормализованы и подвергнуты скринингу на повышенную (красный) и пониженную (зеленый) транскрипты. Отображение гистограмм с комбинированным подсчетом баллов и ранжированием кластеров поддерживалось значением *p*.

ВЫВОДЫ

1. Мезенхимные стромальные клетки жировой ткани (МСК ЖТ) при длительном культивировании (14 дней) формируют тканеинженерную конструкцию в виде клеточного пласта толщиной до 45 мкм, обогащенную белками внеклеточного матрикса: коллагеном I и IV типов, фибронектином и ламинином.

2. Трансплантация клеточных пластов из МСК ЖТ ускоряет заживление шинированной раны кожи у крысы, однако процесс завершается формированием рубца. Медиана срока полного закрытия раны после трансплантации в группе КП составила 28 суток по сравнению с группой введения суспензии МСК ЖТ (35 суток) и нелеченым контролем (49 суток).

3. Установлено, что трансплантация клеточных пластов из МСК ЖТ не только ускоряет заживление пролежневого дефекта, но и приводит к регенерации кожи. У 3 из 4 животных в этой группе не было обнаружено видимых рубцов и наблюдалось восстановление волосяного покрова, чего не было отмечено ни в одной другой экспериментальной группе.

4. Трансплантация клеточных пластов из МСК ЖТ приводит к увеличению толщины формирующейся в зоне пролежня грануляционной ткани с ее последующим интенсивным ремоделированием, завершающимся к 21 дню регенерацией кожи и ее придатков. При этом на ранних сроках (3-7 сутки) трансплантация клеточных пластов из МСК ЖТ вызывает снижение васкуляризации ГТ с уменьшением плотности капилляров.

5. Показано, что по сравнению с монослойной культурой секретом МСК ЖТ, находящихся в составе клеточного пласта, обогащен факторами роста, способствующих стабилизации кровеносных сосудов (HGF, PDGF-BB), но не активации ангиогенеза. Содержание VEGF - ключевого активатора миграции эндотелия и роста капилляров не различалось в исследованных группах. Данная находка согласуется с результатами РНК-секвенирования, которые указывают на повышенную экспрессию генов, связанных с созревaniem сосудистого русла и пониженную экспрессию генов, ассоциированных с ранними этапами ангиогенеза и формированием незрелых капилляров.

6. С учетом краткосрочной выживаемости клеточных пластов из МСК ЖТ, трансплантированных на поверхность пролежня, механизмом их регенераторных эффектов представляется паракринное действие, способствующее регенерации за счет специфического состава секретома, который ускоряет созревание грануляционной ткани и вызывает стабилизацию кровеносных сосудов в ее составе.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах Scopus, WoS, RSCI и в изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ.03.04. по специальности 03.01.08 – «Биоинженерия»

1. **Aleksandrushkina N.A.**, Danilova N.V., Grigorieva O.A., Mal'kov P.G., Popov V.S., Efimenko A.Yu, Makarevich P.I. Cell sheets of mesenchymal stromal cells effectively stimulate healing of deep soft tissue defects // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. — 2019. — Vol. 167, no. 1. — P. 159–163; IF=0.622, квартиль Q3, (0.31/0.21)¹
2. Nimiritsky P.P., Eremichev R. Yu., **Aleksandrushkina N.A.**, Efimenko A.Yu, Tkachuk V.A., Makarevich P.I. Unveiling mesenchymal stromal cells' organizing function in regeneration // International Journal of Molecular Sciences. — 2019. — Vol. 20, no. 4. — P. 823; IF=4.556, квартиль Q1, (0.93/0.23)
3. **Alexandrushkina N.A.**, Nimiritsky P.P., Eremichev R.Yu., Popov V.S., Arbatskiy M., Danilova N.V., Mal'kov P.G., Akopyan Zh. A., Tkachuk V.A., Makarevich P.I. Cell sheets from adipose tissue msc induce healing of pressure ulcer and prevent fibrosis via trigger effects on granulation tissue growth and vascularization // International Journal of Molecular Sciences. — 2020. — Vol. 21, no. 15. — P. 5567; IF=4.556, квартиль Q1, (1.31/0.91)
4. **Александрюшкина Н.А.**, Тарасова Е.В., Макаревич П.И., Габбасова Л.А., Акопян Ж.А., Камалов А.А., Ткачук В.А. Вопросы нормативно-правового регулирования реализации биомедицинских клеточных продуктов в международной практике // Гены и клетки. — 2017. — Т. 12, № 4. — С. 97–108; IF=0.914, квартиль Q4, (0.75/0.37)

Тезисы докладов на конференциях и статьи в сборниках:

1. **Александрюшкина Н.А.**, Макаревич О.А., Нимирицкий П.П., Данилова Н.В., Ефименко А.Ю., Еремичев Р.Ю., Макаревич П.И., Парфенова Е.В., Ткачук В.А. Клеточные пласты из мезенхимных стромальных клеток вызывают заживление глубокого дефекта мягких тканей у крысы // Гены и Клетки - Материалы III Национального Конгресса по Регенеративной Медицине. Москва, 15–18 ноября 2017 года. — Т. 12 из 3. — Институт Стволовых Клеток Человека, Москва, Россия, 2017. — С. 27–28.
2. Makarevich P.I., Boldyreva M.A., Dergilev K.V., Nimiritskiy P.P., Shevchenko E.K., Makarevich O.A., Efimenko E.Yu, **Alexandrushkina N.A.**, Tkachuk V.A., Yu-Chen Hu, Parfyonova E.V. Application of cell sheet technology for regenerative medicine: therapeutic angiogenesis and beyond // Molecular Therapy. — Vol. 25 of Supplement 1. — USA, 2017. — P. 74–75.
3. **Alexandrushkina N.A.**, Makarevich O.A., Nimiritskiy P.P., Efimenko A.Yu, Danilova N.V., Parfyonova Ye V., Makarevich P.I., Tkachuk V.A. Adipose mesenchymal stromal cell sheets accelerate healing in rat model of deep wound // Human Gene Therapy. — Vol. 28 of 10. — New Rochelle, USA, NY, 2017. — P. A86–A86.
4. Nimiritsky P.P., **Alexandrushkina N.A.**, Sagaradze G.D., Tyurin-Kuzmin P.A., Efimenko A.Y., Makarevich P.I. MSC self-organization in vitro is concordant with elevation of regenerative potential and characteristics related to stem cell niche function // Human Gene Therapy. — Vol. 27. — Mary Ann Liebert Inc United States, 2018. — P. A62–A62.

¹ В скобках приведен объем публикации в печатных листах и вклад автора в печатных листах.

5. Makarevich P.I., **Alexandrushkina N.A.**, Nimiritsky P.P., Dergilev K.V., Parfyonova Y.V., Tkachuk V.A. Cell sheets as a platform for therapeutic delivery and tissue modelling // Human Gene Therapy. — Vol. 27. — Mary Ann Liebert Inc United States, 2018. — P. A60–A61.
6. Makarevich P.I., **Alexandrushkina N.A.**, Dergilev K.V., Shevchenko E.K., Boldyreva M.A., Nimiritsky P.P., Grigorieva O.A., Efimenko A.Yu., Yu-Chen Hu, Parfyonova Y.V., Tkachuk V.A. Cell sheets from adipose-derived mesenchymal stromal accelerate healing and angiogenesis // ASGCT 21st Annual Meeting Abstracts. — Vol. 26. — Molecular Therapy, 2018. — P. 219–219.
7. Нимирицкий П.П., Еремичев Р.Ю., **Александрюшкина Н.А.**, Новоселецкая Е.С., Сагарадзе Г.Д., Арбатский М.С., Ефименко А.Ю., Ткачук В.А., Макаревич П.И. Стромальные клетки способны к самоорганизации in vitro с образованием различающихся локальных микроокружений // Материалы IV национального конгресса по регенеративной медицине. — Т. 14 из ISSN 2313-1829. — Москва, 2019. — С. 168–168.
8. **Александрюшкина Н.А.**, Еремичев Р.Ю., Григорьева О.А., Нимирицкий П.П., Ткачук В.А., Макаревич П.И. Изучение механизма стабилизации сосудистого русла в ходе восстановления поврежденной ткани in vitro // Материалы Всероссийской конференции с международным участием Актуальные проблемы клеточной биологии и клеточных технологий. — Т. 14. — Москва, 2019. — С. 95–96.
9. **Александрюшкина Н.А.**, Попов В.С., Данилова Н.В., Лобода А.В., Мальков П.Г., Макаревич П.И. Доклиническая оценка эффективности клеточных пластов из мезенхимных стволовых клеток для заживления пролежневого дефекта // Материалы IV национального конгресса по регенеративной медицине. — Т. 14. — Москва: Москва, 2019. — С. 19–20.
10. **Alexandrushkina N.A.**, Grigorieva O.A., Eremichev R.E., Makarevich P.I. Tissue-specific interaction of stromal cells and endothelium in vitro leads to a distinct pattern of angiogenic response // ESGCT 27th Annual Meetings Abctracts. — Barcelona, 2019.
11. **Alexandrushkina N.A.**, Danilova N.V., Popov V.S., Eremichev R.Y., Nimiritsky P.P., Malkov P.G., Efimenko A.Yu, Tkachuk V.A., Makarevich P.I. Antifibrotic effect of mesenchymal stromal cell sheets is mediated by interaction of stromal and endothelium cells // ESGCT 27th Annual Meetings Abstracts. — Barcelona, 2019. — P. 539–539.