

TISSUE AND ORGAN REGENERATION

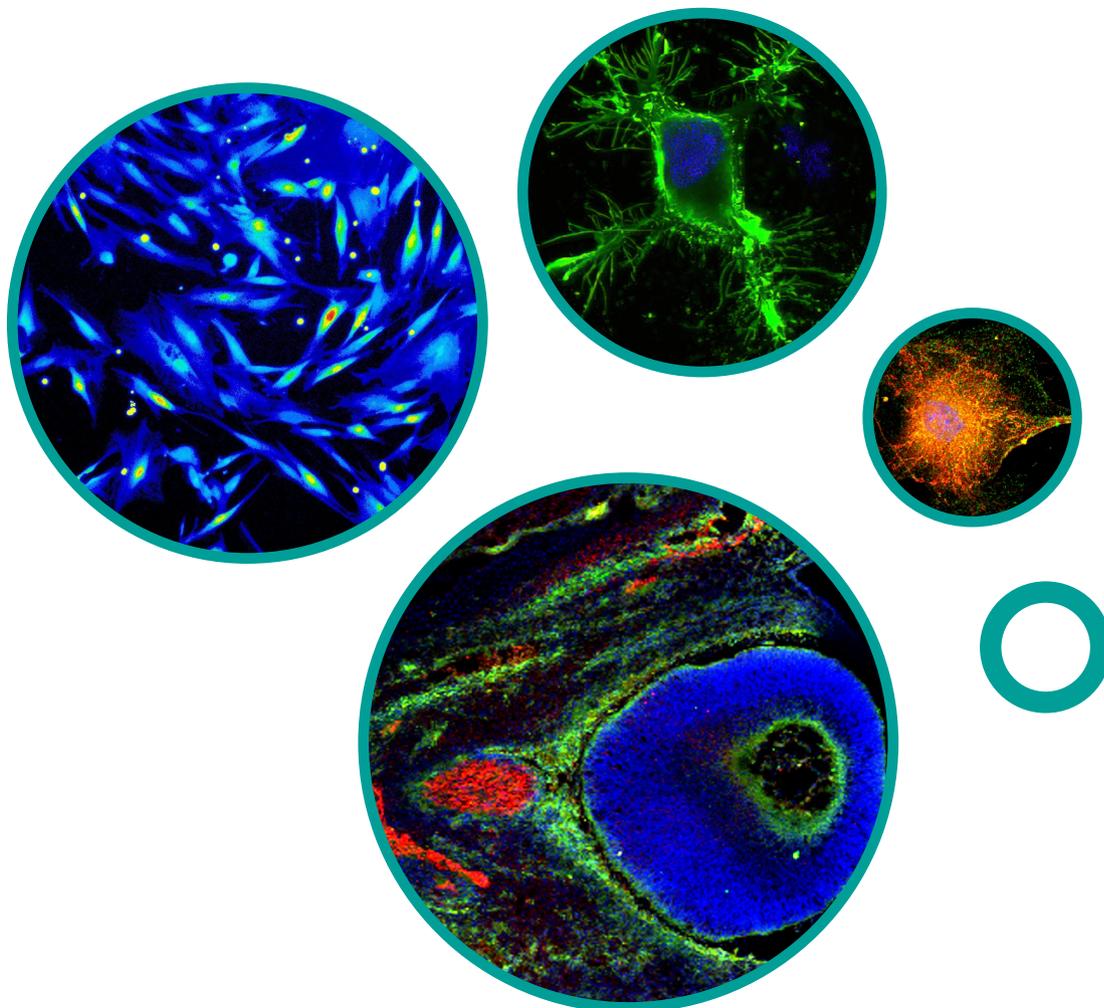
РЕГЕНЕРАЦИЯ

органов и тканей

Регенеративная биомедицина Евразии

1

Том (Vol.) 1
2023



ОБЩЕСТВО
РЕГЕНЕРАТИВНОЙ
МЕДИЦИНЫ

ISSN 2949-5938

Цели и задачи

Ключевой задачей журнала является создание площадки для освещения и диалога об основных достижениях, проблемах и задачах регенеративной биомедицины, а также обобщение современных представлений о фундаментальных механизмах регенерации тканей и органов.

Концепция журнала предусматривает всестороннее освещение вопросов, связанных с выяснением механизмов регенерации и обновления тканей, а также с возможностью разработки и практического применения подходов регенеративной биомедицины. Важным аспектом также является формирование и развитие этой отрасли науки как самостоятельного направления на стыке физиологии, клеточной биологии, биологии развития, биохимии и наук о материалах.

Главный редактор

В.А. Ткачук, д-р биол. наук, профессор, академик РАН, декан Факультета фундаментальной медицины, директор Института регенеративной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 5515-4266

Заместитель главного редактора

П.И. Макаревич, канд. мед. наук, заведующий лабораторией генно-клеточной терапии Института регенеративной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 7259-9180

Редактор выпуска

В.А. Ткачук, д-р биол. наук, профессор, академик РАН, декан Факультета фундаментальной медицины, директор Института регенеративной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 5515-4266

Редакционная коллегия

В.В. Белоусов, д-р биол. наук, чл.-корр. РАН, генеральный директор ФБГУ «Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России» (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 6517-8373

Л.Б. Буравкова, д-р мед. наук, профессор, чл.-корр. РАН, заместитель директора по научной работе ФГБУ «ГНЦ РФ — Институт медико-биологических проблем РАН» (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 8594-2532

Д.В. Бутнару, канд. мед. наук, доцент, проректор по международной деятельности, заместитель директора по научной работе ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет) (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 2408-5133

М.В. Воронцова, канд. мед. наук, заместитель декана по науке Факультета фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 4168-6851

Е.А. Воротеяк, д-р биол. наук, чл.-корр. РАН, руководитель лаборатории клеточной биологии ФГБУН «Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН» (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 2310-9118

М.М. Галагудза, д-р мед. наук, профессор, чл.-корр. РАН, директор Института экспериментальной медицины ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия) eLibrary SPIN: 2485-4176

И.И. Еремин, канд. мед. наук, заместитель директора по научной работе ФГБУН «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского» (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 6098-7226

А.Ю. Ефименко, канд. мед. наук, заведующий лабораторией репарации и регенерации тканей Института регенеративной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 5110-5998

М.Н. Карагяур, канд. биол. наук, доцент кафедры биохимии и регенеративной биомедицины Факультета фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 9504-4257

М.А. Лагарькова, д-р биол. наук, чл.-корр. РАН, генеральный директор ФГБУ «ФНКЦ физико-химической медицины им. акад. Ю.М. Лопухина ФМБА России» (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 4315-1701

М.А. Масчан, д-р мед. наук, профессор, заместитель генерального директора-директор Института молекулярной и экспериментальной медицины ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Минздрава России (Москва, Россия) Scopus Author ID: 562880

К.А. Рубина, д-р биол. наук, профессор РАН, руководитель лаборатории морфогенеза и репарации тканей Факультета фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 9471-2511

Е.В. Семина, д-р биол. наук, заместитель руководителя по развитию и проектной деятельности ОНК «Институт медицины и наук о жизни» ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта» (Калининград, Россия) eLibrary SPIN: 4586-4001

В.И. Севастьянов, д-р мед. наук, профессор, директор АНО «Институт медико-биологических исследований и технологий» (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 2895-1090

Н.С. Сергеева, д-р биол. наук, профессор, заведующая отделением прогноза эффективности консервативного лечения МНИОИ имени П.А. Герцена — филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 1805-8141

О.В. Степанова, канд. биол. наук, руководитель лаборатории клеточной биологии и регенеративной медицины отдела фундаментальной и прикладной нейробиологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Минздрава России (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 8229-8935

А.Н. Томилин, д-р биол. наук, чл.-корр. РАН, директор ФГБУН Институт цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия) eLibrary SPIN: 8079-5581

Редакционный совет

А.В. Васильев, д-р биол. наук, профессор, чл.-корр. РАН, директор ФГБУН «Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН» (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 7050-9087

В.В. Власов, д-р хим. наук, профессор, академик РАН, научный руководитель ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН» (Новосибирск, Россия) eLibrary SPIN: 6416-3640

С.В. Готье, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, директор ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 5969-5749

Н.И. Дризе, д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией физиологии кроветворения ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 1705-2900

С.М. Закиян, д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией эпигенетики развития ФИЦ «Институт цитологии и генетики СО РАН» (Новосибирск, Россия) eLibrary SPIN: 7274-2622

А.Д. Каприн, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, генеральный директор ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 1759-8101

С.А. Лукьянов, д-р биол. наук, профессор, академик РАН, Ректор ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 2920-8861

Е.В. Парфенова, д-р мед. наук, профессор, чл.-корр. РАН, Заместитель генерального директора — директор НИИ экспериментальной кардиологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова» Минздрава России (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 9042-7848

Г.Т. Сухих, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, директор ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 9374-5710

В.П. Чехонин, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, заведующий отделом медицинских нанобиотехнологий НИИ трансляционной медицины ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 8292-2807

Е.Л. Чойнзонов, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, директор НИИ онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН» (Томск, Россия) eLibrary SPIN: 2240-8730

Е.В. Шляхто, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, генеральный директор ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова» Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия) eLibrary SPIN: 6679-7621

К.Н. Ярыгин, д-р биол. наук, профессор, чл.-корр. РАН, заведующий лабораторией клеточной биологии ФГБНУ «НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича» (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 7567-1230

Периодичность	выходит 4 раза в год
Префикс	DOI https://doi.org/10.60043
ISSN	2949-5938
Свидетельство о регистрации средства массовой информации	Серия Эл № ФС77-83582 от 13 июля 2022 г. выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)
Учредитель, издатель, редакция	Региональная общественная организация «Общество регенеративной медицины» (ОГРН 1187700008165)
Адрес	119991, г. Москва, Ломоносовский пр-т, д. 27, к. 1
Телефон редакции	+7(999) 922-41-19
Сайт	https://regmed-journal.ru/
e-mail	journal@regmedru.com
Выход в свет	20 сентября 2023
Копирайт	© Региональная общественная организация «Общество регенеративной медицины», оформление
Журнал открыт для ознакомления на сайте	https://regmed-journal.ru
Цена	распространяется бесплатно
Условия распространения материалов:	Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0 License.
Редакторы-корректоры	И.С. Пигулевская, Л.А. Зелексон
Верстка	О. Храмова

Aims and scope

The key objective of the journal is to create a platform for coverage and dialogue about the main achievements, problems and tasks of regenerative biomedicine, as well as to summarize modern ideas about the fundamental mechanisms of tissue and organ regeneration.

The concept of the journal provides comprehensive coverage of issues related to elucidating the mechanisms of tissue regeneration and renewal, as well as the possibility of developing and practical application of regenerative biomedicine approaches. An important aspect is also the formation and development of this branch of science as an independent direction at the intersection of physiology, cell biology, developmental biology, biochemistry and materials sciences.

Editor-in-Chief

Vsevolod A. Tkachuk, D.Sc., Professor, Full Member of RAS, Dean of Faculty of medicine, Director of Institute for Regenerative Medicine, Moscow State University named after M.V. Lomonosov (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 5515-4266

Deputy Editor-in-Chief

Pavel I. Makarevich, MD, PhD, Head of the Laboratory of Gene and Cell Therapy, Institute for Regenerative Medicine, Moscow State University named after M.V. Lomonosov (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 7259-9180

Editor of the Issue

Vsevolod A. Tkachuk, D.Sc., Professor, Full Member of RAS, Dean of Faculty of medicine, Director of Institute for Regenerative Medicine, Moscow State University named after M.V. Lomonosov (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 5515-4266

Editorial board

Vsevolod V. Belousov, D.Sc., Corresponding Member of RAS, General Director of the Federal Center for Brain and Neurotechnologies FMBA of Russia (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 6517-8373

Lyudmila B. Buravkova, D.Sc., Professor, Corresponding Member of RAS, Deputy Director, Institute of Medical and Biological Problems of RAS (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 8594-2532

Denis V. Butnaru, MD, PhD, Associate Professor, Vice-Rector for International Affairs, Deputy Director for Scientific Work of the Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education First Moscow State Medical University named after I.M. Sechenov, Ministry of Health of Russia (Sechenov University), (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 2408-5133

Maria V. Vorontsova, MD, PhD, Deputy Dean for Science, Faculty of Medicine, Moscow State University named after M.V. Lomonosov (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 4168-6851

Ekaterina A. Vorotelyak, D.Sc., Corresponding Member of RAS, Head of the laboratory of cell biology of the Federal State Budgetary Institution Institute of Developmental Biology named after N.K. Koltsov of RAS (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 2310-9118

Mikhail M. Galagudza, D.Sc., Professor, Corresponding Member of RAS, Director of the Institute of Experimental Medicine of the Federal State Budgetary Institution National Medical Research Center named after V. A. Almazov, Ministry of Health of Russia (St. Petersburg, Russia) eLibrary SPIN: 2485-4176

Ilya I. Eremin, MD, PhD, Deputy Director for Scientific Work of the Federal State Budgetary Institution Russian Scientific Center for Chemistry named after Academician B.V. Petrovsky (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 6098-7226

Anastasia Yu. Efimenko, MD, PhD, Head of the Laboratory of Tissue Repair and Regeneration, Institute for Regenerative Medicine, Moscow State University named after M.V. Lomonosov (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 5110-5998

Maxim N. Karagyaur, MD, PhD, Associate Professor of the Department of Biochemistry and Regenerative Medicine, Faculty of Medicine, Moscow State University named after M.V. Lomonosov (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 9504-4257

Maria A. Lagarkova, D.Sc., Corresponding Member of RAS, Director General of the Federal State Budgetary Institution Federal Research Center for Physical and Chemical Medicine, Federal Medical and Biological Agency (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 4315-1701

Mikhail A. Maschan, MD, D.Sc., Professor, Deputy Director General, Director of the Institute of Molecular and Experimental Medicine of the Federal State Budgetary Institution National Medical Research Center for Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia) Scopus Author ID: 562880

Ksenia A. Rubina, D.Sc., Professor of RAS, Head of the Laboratory of Morphogenesis and Tissue Reparation, Faculty of Medicine, Moscow State University named after M.V. Lomonosov (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 9471-2511

Ekaterina V. Semina, D.Sc., Deputy Head for Development and Project Activities at the Institute of Medicine and Life Sciences, Immanuel Kant Baltic Federal University (Kaliningrad, Russia) eLibrary SPIN: 4586-4001

Viktor I. Sevastyanov, D.Sc., Professor, Director of the Institute of Biomedical Research and Technology (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 2895-1090

Natalya S. Sergeeva, D.Sc., Professor, Head of the Department of Prediction of the Effectiveness of Conservative Treatment, Moscow Research Institute named after P.A. Herzen — branch of the Federal State Budgetary Institution National Medical Research Center of Radiology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 1805-8141

Olga V. Stepanova, PhD, Head of the Laboratory of Cell Biology and Regenerative Medicine, Department of Fundamental and Applied Neurobiology Federal State Budgetary Institution National Medical Research Center for Psychiatry and Narcology named after V.P. Serbsky, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 8229-8935

Alexei N. Tomilin, D.Sc., Corresponding Member of RAS, Director of the Federal State Budgetary Institution of Science Institute of Cytology RAS (Saint Petersburg, Russia) eLibrary SPIN: 8079-5581

Editorial Council

Andrey V. Vasiliev, D.Sc., Professor, Corresponding Member of RAS, Director of the Federal State Budgetary Institution Institute of Developmental Biology named after N.K. Koltsov RAS (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 7050-9087

Valentin V. Vlasov, D.Sc., Professor, Full Member of RAS, Scientific Director of the Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of SB RAS (Novosibirsk, Russia) eLibrary SPIN: 6416-3640

Sergey V. Gauthier, MD, D.Sc., Professor, Full Member of RAS, Director of the National Medical Research Center for Transplantation and Artificial Organs named after Academician V.I. Shumakov, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 5969-5749

Nina I. Drize, D.Sc., Professor, Head of the Laboratory of Physiology of Hematopoiesis, National Medical Research Center of Hematology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 1705-2900

Suren M. Zakiyan, D.Sc., Professor, Head of the Laboratory of Developmental Epigenetics, Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of SB RAS (Novosibirsk, Russia) eLibrary SPIN: 7274-2622

Andrey D. Kaprin, D.Sc., Professor, Full Member of RAS, Director General of the Federal State Budgetary Institution National Medical Research Center of Radiology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 1759-8101

Sergey A. Lukyanov, D.Sc., Professor, Full Member of RAS, Rector of the Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 2920-8861

Yelena V. Parfyonova, D.Sc., Professor, Corresponding Member of RAS, Deputy General Director – Director of the Research Institute of Experimental Cardiology, Federal State Budgetary Institution National Medical Research Center for Cardiology named after Academician E.I. Chazov of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 9042-7848

Gennady T. Sukhikh, D.Sc., Professor, Full Member of RAS, Director of the Federal State Budgetary Institution National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 9374-5710

Vladimir P. Chekhonin, D.Sc., Professor, Full Member of RAS, Head of the Department of Medical Nanobiotechnologies, Research Institute of Translational Medicine, Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 8292-2807

Evgeny L. Choinzonov, D.Sc., Professor, Full Member of RAS, Director of the Oncology Research Institute of the Tomsk National Research Medical Center (Tomsk, Russia) eLibrary SPIN: 2240-8730

Evgeny V. Shlyakhto, D.Sc., Professor, Full Member of RAS, Director General of the Federal State Budgetary Institution National Medical Research Center named after V.A. Almazov, Ministry of Health of Russia (St. Petersburg, Russia) eLibrary SPIN: 6679-7621

Konstantin N. Yarygin, D.Sc., Professor, Corresponding Member of RAS, Head of the Laboratory of Cell Biology, Research Institute of Biomedical Chemistry named after V.N. Orekhovich (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 7567-1230

Frequency	quarterly
DOI Prefix	DOI https://doi.org/10.60043
ISSN	2949-5938
Certificate and Registry	Certificate of mass media registration series EI No. FS77-83582 dated July 13, 2022 issued by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technologies and Mass Communications (Roskomnadzor)
Founder, publisher, editorial office	Regional public organization “Society of Regenerative Medicine” (OGRN 1187700008165)
Address	119991, Moscow, Lomonosovsky Prospekt, 27, building 1
Editorial phone	+7(999) 922-41-19
Website	https://regmedjournal.ru/
e-mail	journal@regmedru.com
The publication	September 20, 2023
Copyright	© Regional public organization “Society of Regenerative Medicine”, layout, 2023
Online open access:	https://regmed-journal.ru
Price	free
Distribution	The content is distributed under the Creative Common License CC BY
Editors and proofreaders	Irina S. Pigulevskaya, Lev A. Zelexon
Layout	Olga Khranova

6	ОТ РЕДАКЦИИ Обращение главного редактора В.А. Ткачук	EDITORIAL Message from the Editor-in-Chief Vsevolod A. Tkachuk
7	ОБЗОРЫ И КОММЕНТАРИИ Регенеративная биомедицина в биологии и медицине В.А. Ткачук	REVIEWS AND COMMENTS Regenerative biomedicine in biology and medicine Vsevolod A. Tkachuk
16	Три десятилетия развития генной терапии: вехи и перспективы П.И. Макаревич	Three decades of gene therapy development: milestones and prospects Pavel I. Makarevich
25	ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫЙ ЛАНДШАФТ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ Александр Максимов в зеркале учеников Р.В. Деев	EDUCATIONAL LANDSCAPE IN REGENERATIVE MEDICINE Alexander Maximow's reflection in his followers scientific works Roman V. Deev
42	ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ Увеличение экспрессии генов <i>HOXA10</i> и <i>HOXA11</i> в стромальных клетках эндометрия при гипоксии зависит от активности системы деметилирования ДНК М.А. Кулебякина, А.С. Смирнова, В.С. Попов, Р.Ю. Еремичев, П.И. Макаревич	ORIGINAL ARTICLES Increased expression of <i>HOXA10</i> и <i>HOXA11</i> in endometrial stroma cells under hypoxia depends on activity of the DNA demethylation system Maria A. Kulebyakina, Anastasia S. Smirnova, Vladimir S. Popov, Roman Yu. Eremichev, Pavel I. Makarevich
53	Изменение остеодифференцировочного потенциала культуры МСК-ЖТ при <i>in vitro</i> сокультивировании с гепарином К.А. Юрова, О.Г. Хазиахматова, В.В. Малащенко, О.Б. Мелащенко, И.А. Хлусов, Д.Д. Лигатюк, П.А. Иванов, Л.С. Литвинова	Changes of osteodifferentiation potential of MSC-AT during <i>in vitro</i> co-cultivation with heparin Kristina A. Yurova, Olga G. Khaziahmatova, Vladimir V. Malashchenko, Olga B. Melashchenko, Igor A. Khlusov, Denis D. Ligatyuk, Pavel A. Ivanov, Larisa S. Litvinova

Обращение главного редактора

Глубокоуважаемые коллеги!

Регенеративная биомедицина — наука, сформировавшаяся относительно недавно, однако ее фундаментом являются несколько веков исследований в области клеточной биологии, физиологии, эмбриологии, биохимии, фундаментальной медицины. Она не могла бы состояться без выяснения механизмов двух важнейших процессов, обеспечивающих поддержание структуры организма и его восстановление после болезней и травм: физиологического обновления и регенерации. Клеточный и молекулярный состав всех органов и тканей человека находится в динамическом состоянии, и за последние десятилетия у нас впервые появилась возможность прицельно на него воздействовать, что открыло возможность управления регенеративными процессами для лечения заболеваний и восстановления здоровья человека. Регенеративная биомедицина стала наиболее сложным и в то же время перспективным направлением, в котором остается огромное число задач, решение которых сопряжено с повышением безопасности ее методов, применяемых в клинике. Крайне важными остаются и вопросы регуляции дифференцировки, баланса обновления и гибели клеток, управления морфогенезом и восстановлением тканей после повреждения, в которых, несмотря на долгую историю изучения, все еще есть пробелы в фундаментальных знаниях. Ценные данные в этой области требуют быстрой публикации в профильных изданиях, что обеспечит авторам научный приоритет и распространение их открытий среди коллег.

«Общество регенеративной медицины», объединяя специалистов как фундаментального, так и практического профиля, радо представить вам первый выпуск журнала «Регенерация органов и тканей», посвященного актуальным вопросам этой науки. Журнал со временем станет площадкой для постоянного диалога и освещения последних достижений в регенеративной биомедицине и физиологии, поэтому наш первый шаг в данном направлении представляется важной вехой в развитии этой науки в России. Мы благодарны всем авторам, которые направили замечательные материалы для публикации, рецензентам и членам редакционной коллегии. Приглашаем всех коллег поучаствовать в формировании следующих выпусков журнала, который будет выходить ежеквартально.

Со своей стороны желаю вам успехов в работе, новых открытий и практических достижений, о которых мы будем рады сообщить научному и медицинскому сообществу со страниц нашего издания.

С уважением,
главный редактор
президент «Общества регенеративной медицины»
академик

В.А. Ткачук

<https://doi.org/10.60043/2949-5938-2023-1-7-15>



Регенеративная биомедицина в биологии и медицине

В.А. Ткачук

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»,
119234, г. Москва, Ломоносовский пр-т, 27, 1, Россия

Адрес для корреспонденции: tkachuk@fbm.msu.ru

Аннотация

В статье рассматриваются фундаментальные и прикладные проблемы регенеративной биомедицины. Как наука она возникла в конце XX в. и сегодня стремительно развивается: выясняются механизмы обновления клеток, регенерации и репарации тканей, разрабатываются принципиально новые методы борьбы с тяжелыми патологиями, вызванными повреждением и утратой жизненно важных клеток и тканей. Человеческий организм — это «самообновляющаяся машина». В течение жизни он производит десятки тонн клеток, то есть обладает могучим регенеративным потенциалом, который можно использовать в современной медицине. В Институте регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного центра МГУ имени М.В. Ломоносова проводятся доклинические исследования и клинические испытания ряда препаратов, которые стимулируют прорастание нервных волокон после трансплантации пальцев и кистей рук, устраняют неврологические дисфункции после геморрагического инсульта. Для лечения мужского бесплодия разрабатывается препарат, стимулирующий сперматогенез и возвращающий фертильность. С целью создания антифиброзного препарата ведется идентификация растворимого в плазме крови человека вещества, секретируемого клетками эндометрия и предотвращающего фиброз тканей матки и других органов. Изучается роль навигационных рецепторов (прежде всего Т-кадгерина и урокиназного рецептора) в выборе направления роста тканей.

Ключевые слова: регенеративная биомедицина, стволовые клетки, обновление, дифференцировка, фиброз

Конфликт интересов: автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Ткачук В.А. Регенеративная биомедицина в биологии и медицине. *Регенерация органов и тканей.* 2023;1(1):7–15. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2023-1-7-15>

Поступила: 01.03.2023
Обработана: 12.05.2023
Принята: 31.05.2023

Regenerative biomedicine in biology and medicine

Vsevolod A. Tkachuk

Lomonosov Moscow State University, 119234, Moscow, Lomonosovsky ave., 27, 1, Russia

Correspondence address: tkachuk@fbm.msu.ru

Abstract

The article covers the fundamental and applied problems of regenerative biomedicine. As a scientific field, it arose at the end of the XX century and today it is rapidly growing: the mechanisms of cell renewal, tissue regeneration and repair are being elucidated, fundamentally new methods are being developed to combat severe disease caused by damage and loss of vital cells and tissues. The human body is a “self-renewing machine” and during whole life, it produces of tons of cells, thus, demonstrating its strong regenerative potential that can be used in modern medicine. At the Institute of Regenerative Medicine of the Medical Research and Educational Center of Lomonosov Moscow State University preclinical studies and clinical trials of several novel drugs are being carried. Including ones that stimulate the growth of nerve fibers after re-implantation of upper limb parts (finger and palm), and eliminate neurological dysfunctions after hemorrhagic stroke. For the treatment of male infertility, a drug is being developed that stimulates spermatogenesis and restores spermatogenesis. In order to create an antifibrotic drug, a substance secreted by endometrial cells and preventing fibrosis of the tissues of the uterus and other organs, is being identified. The role of navigational receptors (primarily T-cadherin and urokinase receptor) in choosing the direction of tissue growth is being studied.

Keywords: regenerative biomedicine, stem cells, renewal, differentiation, fibrosis

Conflict of interest: the author declares no conflict of interest.

For citation: Tkachuk V.A. Regenerative biomedicine in biology and medicine. *Tissue and organ regeneration*. 2023;1(1):7–15. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2023-1-7-15>

Received: 01.03.2023

Revised 23.05.2023

Accepted: 31.05.2023

Регенеративная медицина — это не новая технология, а новая отрасль медицины, сформировавшаяся в последние десятилетия. Она нацелена на создание препаратов, вызывающих образование и гибель клеток, формирование тканей и органов. В настоящее время в мире ведется более 1500 клинических исследований в области регенеративной медицины, несколько десятков из них успешно завершились, и их результаты уже внедряются в практику. Патологии, на борьбу с которыми направлены эти исследования, включают онкологию, наследственные заболевания, болезни ЦНС, фиброз миокарда и сердечную недостаточность, цирроз печени, диабет 1-го типа, повреждение хрящевой и костной ткани, тяжелые ожоги кожи. Успешно развивается также тканевая инженерия. Уже научились выращивать из клеток

пациента хрящевую и костную ткань, уретру, мочеточник, мочевой пузырь. Эти структуры успешно трансплантируются и приживаются в теле пациента, не требуя применения иммуносупрессоров [1].

Используя клеточные технологии, можно также создавать некоторые железы внутренней секреции. Для этого, например, в капсулу помещают стволовые клетки поджелудочной железы, и в ней они дифференцируются в альфа- и бета-клетки островков Лангерганса, которые продуцируют инсулин и глюкагон. Железа функционирует, не отторгается, в нее прорастают кровеносные сосуды и нервные волокна [2]. Подобным образом можно выращивать зубы, челюсти, ушные раковины и другие морфологически простые структуры.

Очевидно, что с увеличением продолжительности жизни человека мы все чаще будем нуждаться в замене патологически измененных тканей и органов. Сегодня развитие трансплантологии тормозится доступностью донорских органов. Выращивание различных биологических структур вне тела человека из его же клеток — реальная перспектива заместительной медицины, трансплантологии и медицины катастроф.

Перейдем к фундаментальной науке и научным проблемам, стоящим перед регенеративной биомедициной.

Согласно основной догме клеточной биологии, мельчайшая единица живого — это клетка. Она образуется из материнской клетки в результате деления. Как утверждали основатели клеточной теории, всякая патология есть патология клеток. На протяжении всей жизни многоклеточного организма не прерывается обновление его клеток. За это время (с учетом средней продолжительности жизни) в теле человека образуются и погибают тонны клеток: они разрушаются до ами-

нокислот, липидов и нуклеотидов, из которых образуются новые клетки тех же тканей и органов. За счет деления дифференцированных клеток, дифференцировки стволовых клеток и, возможно, также транsdифференцировки зрелых клеток в другие типы зрелых клеток [22] идет постоянное обновление организма животных.

Научные основы регенеративной биомедицины были заложены в XX столетии. основополагающие открытия сделаны нашими выдающимися соотечественниками: Александром Александровичем Максимовым, в 1909 г. открывшим в костном мозге гематопоэтическую клетку, из которой образуются все клетки крови, а также Александром Яковлевичем Фриденштейном, в 60-х годах прошлого века открывшим мультипотентные мезенхимные стромальные/стволовые клетки (МСК) [3, 4].

За время жизни человека из гематопоэтических клеток костного мозга, общий вес которого составляет примерно 1,5 кг, образуется три тонны клеток крови (рис. 1).

Гематопоэтическая стволовая клетка

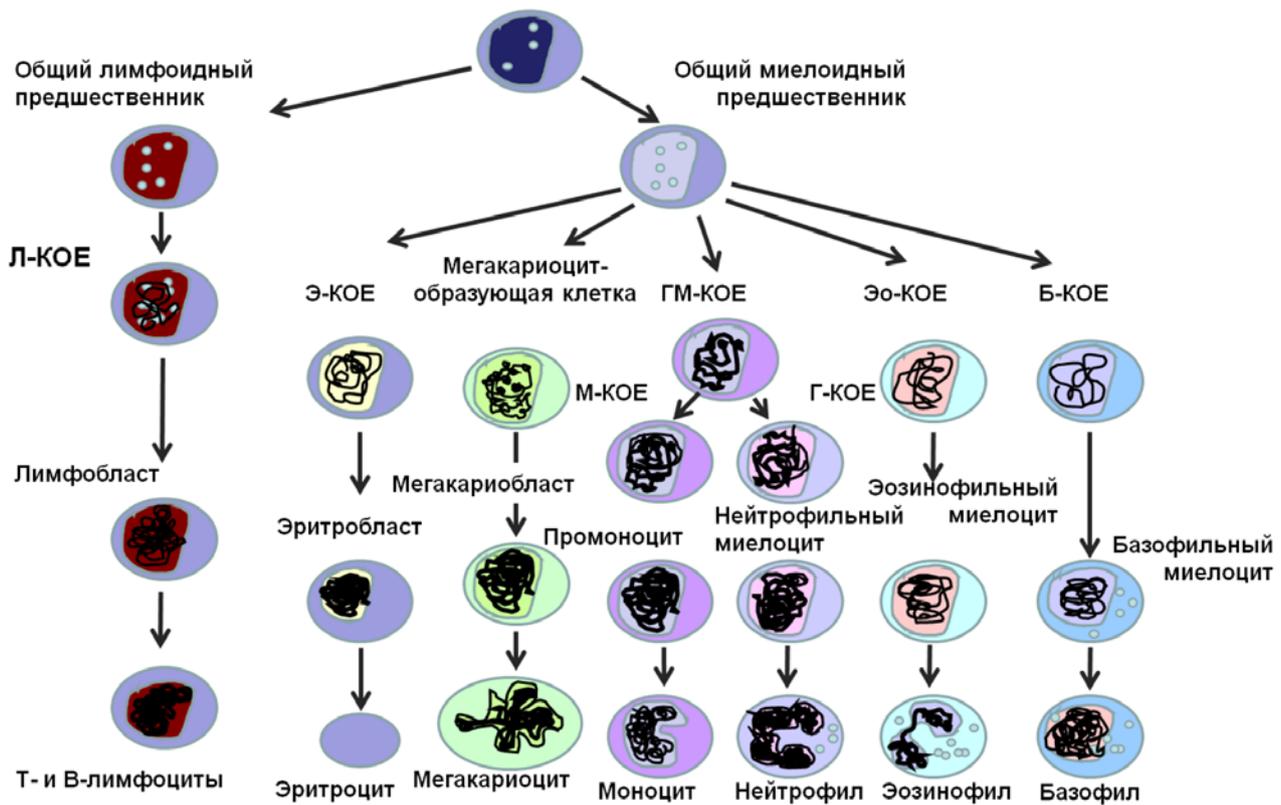


Рис. 1. Схематическое изображение гемопоэза

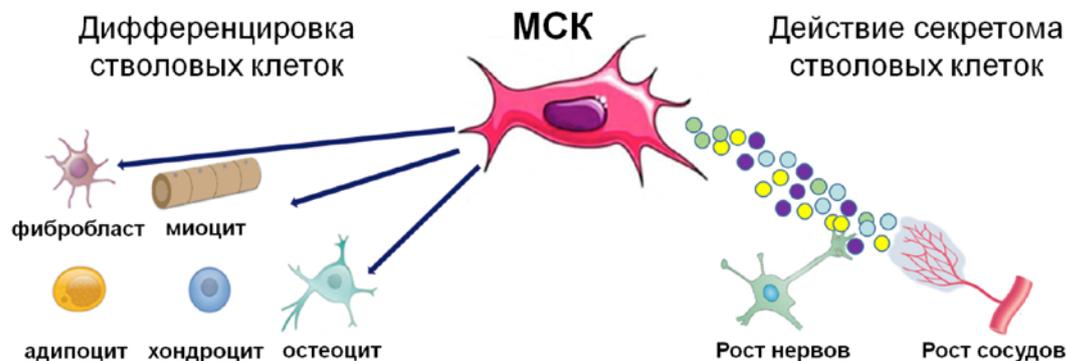


Рис. 2. Мультипотентные стромальные клетки участвуют в формировании стромы тканей и стимулируют их кровоснабжение и иннервацию

Из МСК формируется основная масса нашего тела: кости, мышцы, жировая ткань, хрящи. Строя новые структуры, эти клетки секретируют ангиогенные и нейротрофные факторы, стимулирующие рост сосудов и нервных волокон (рис. 2).

Кровеносные сосуды и аксоны растут параллельно друг другу, а направление определяется навигационными рецепторами, локализованными на конусе роста аксона и на лидирующем полюсе роста сосуда [5]. Нам удалось обнаружить два типа таких рецепторов: один с отрицательным действием, Т-кадгерин, позволяющий обходить некоторые ткани и реализующий отрицательный хемотаксис, и второй — урокиназный рецептор, который осуществляет положительный хемотаксис. Рост этих структур осуществляется по градиенту концентрации хемоаттрактанта или репеллента [6]. По этому принципу формируются структуры нашего тела, в том числе и головного мозга [7, 8].

Важнейшую роль в морфогенезе соматических тканей и органов играет секретом мезенхимных клеток. Оказалось, что он состоит из 500–600 белков, условно подразделяемых на пять функциональных кластеров, в их числе те, которые стимулируют ангиогенез, то есть рост сосудов, нейротрофные, стимулирующие рост нервов, а также такие, которые локально подавляют воспаление [9, 10].

Как можно применить эти знания в медицинской практике? В секретоме МСК присутствуют нейротрофный фактор BDNF и урокиназа (uPA) [9, 11]. Если инъектировать эти белки, они будут действовать в течение лишь нескольких часов. Поскольку рост структур человеческого тела занимает недели и месяцы, прихо-

дится применять «эндогенный шприц» с этими веществами. Для этого мы конструируем плазмиды, которые несут гены BDNF или урокиназы (рис. 3). Такая генетическая конструкция вводится в зону, в которую мы хотим прорастить сосуды или нервные окончания [12]. Плазида проникает в клетки ткани-мишени, транскрибируется там, и клетки секретируют образующиеся молекулы BDNF и uPA. По градиенту концентрации этих белков растут сосуды и аксоны. Так, на переднем крае этих структур расположены соответствующие рецепторы. Мы провели доклинические и клинические испытания плазмид BDNF и урокиназы, а затем провели их слияние в одной плазмиде. Совместно секретируемые нейротрофный и ангиогенный факторы (BDNF и урокиназа) оказались эффективнее [13]. В итоге появился оптимистичный прогноз на создание препарата для лечения неврологических заболеваний. Коктейль факторов, которые выбрасывают в среду МСК, то есть секретом мезенхимных клеток, оказался наиболее эффективным для восстановления функций головного мозга после инсульта. BDNF и uPA так же, как и секретом МСК, уменьшают размеры зоны повреждения головного мозга, частично восстанавливают неврологический статус животного. Эти препараты не токсичны и весьма перспективны в лечении неврологических и ишемических заболеваний.

Мы знаем, что любое повреждение ткани может заканчиваться формированием рубца. Если поврежден спинной мозг, это трагедия, так как через рубец не прорастет ни сосуд, ни нерв. Но есть ткани, где после повреждения возникает не фиброз, а происходит полноценная регенерация. Так восстанавливаются костная ткань и эндометрий. У молодых женщин за время

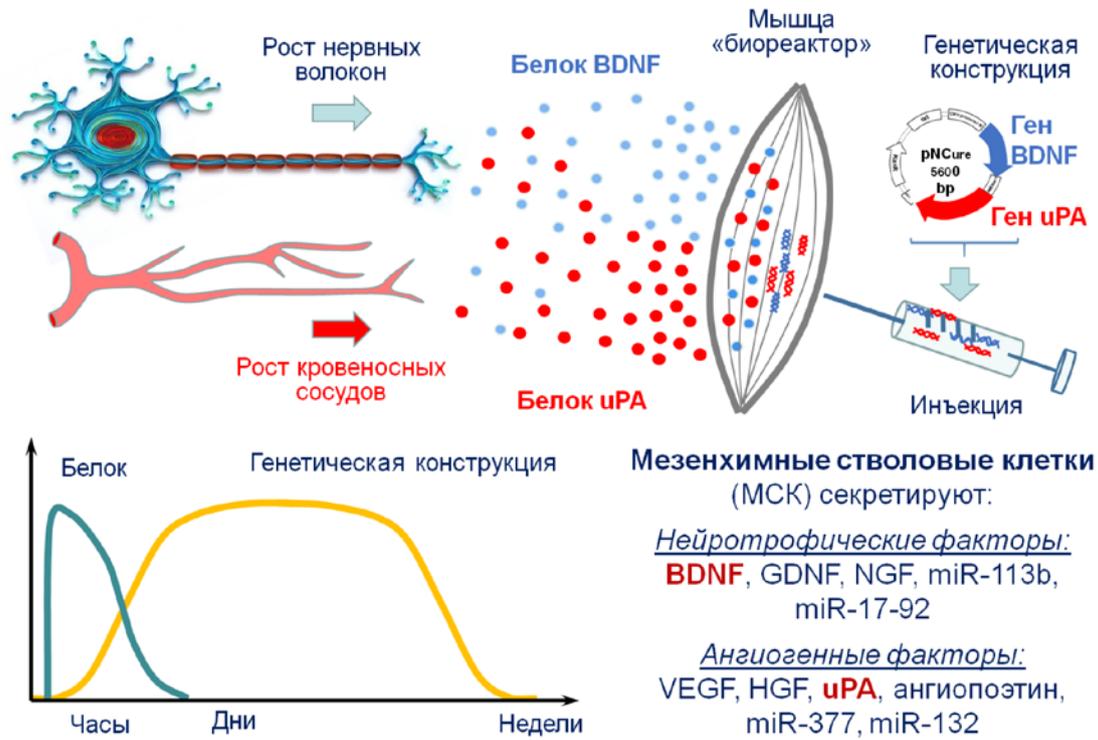


Рис. 3. Генные препараты и секретом стволовых клеток стимулируют процессы регенерации

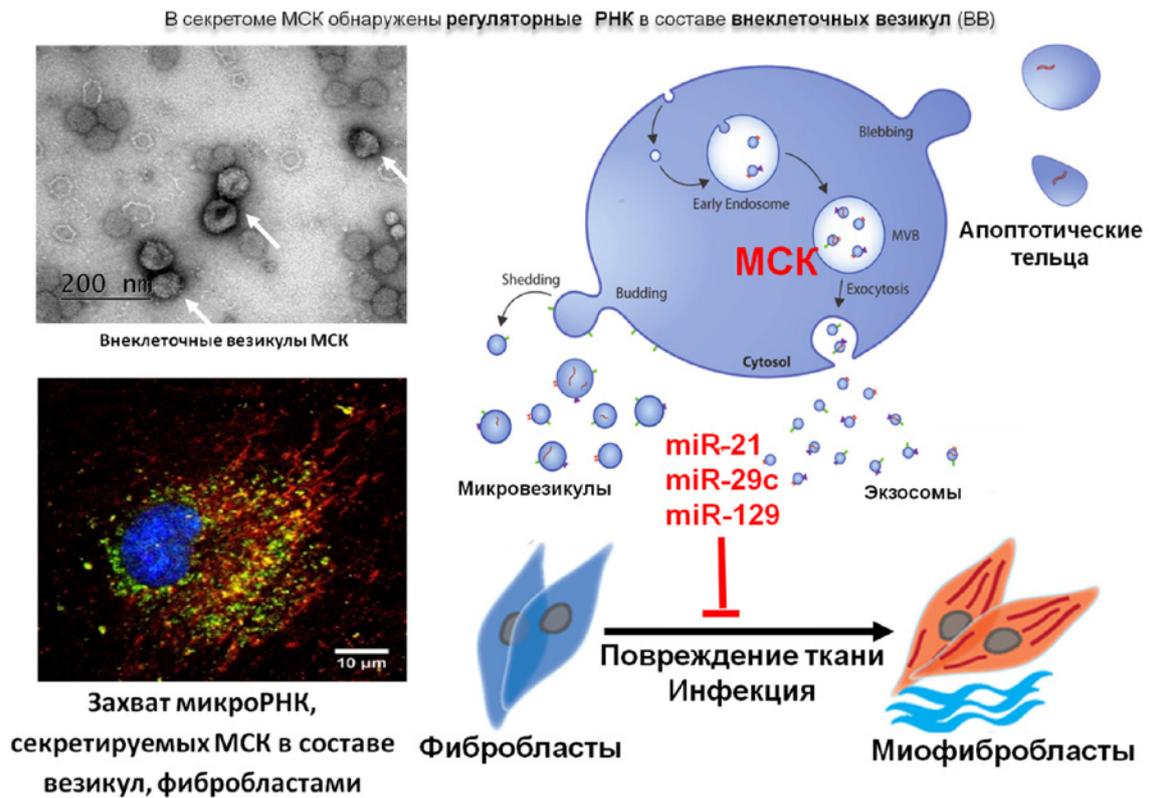


Рис. 4. МСК могут подавлять развитие фиброза за счет секретируемых микроРНК в составе внеклеточных везикул



Рис. 5. Эволюционные механизмы старения клеток и накопления изменений в организме



Рис. 6. Некодирующая часть генома контролирует процессы обновления клеток

жизни сотни раз погибает и восстанавливается эндометрий, но этот процесс не сопровождается фиброзом. Оказалось, что клетки эндометрия секретируют некий фактор, тормозящий фиброз как в эндометрии, так и на других моделях. Этот образующийся эндогенно растворимый фактор мы пытаемся идентифицировать [14]. Мы обнаружили также, что антифиброзные эффекты вызывают некоторые микроРНК, секретируемые МСК (рис. 4). В перспективе такие микроРНК могут стать лекарственными препаратами [15].

С возрастом и при некоторых заболеваниях у человека истощаются стволовые клетки, уменьшается как их число, так и регенеративный потенциал [16]. На протяжении последних десятилетий не прекращаются попытки замедления негативных физиологических процессов с использованием так называемой клеточной терапии. Появились методы, позволяющие выделять стволовые клетки, преумножать их число вне организма и возвращать обратно. Но оказалось, что после этих процедур они погибают, не встраиваются в ткани. Если и наблюдался терапевтический эффект, то лишь за счет секретируемых веществ, до момента гибели клеток. С повышением возраста человека, а также при развитии некоторых заболеваний происходит старение ниши стволовых клеток. Десятки лабораторий и клиник, ведущих рабо-

ты в этой области, объясняют неудачи клеточной терапии именно этим удручающим фактором.

Три важных процесса в течение всей нашей жизни фиксируют ход времени. Во-первых, при каждом делении клетки в ней происходят 1–2 мутации. И это не дефект системы, а свойство живой материи, потому что мутация — инструмент эволюции. Мы состоим из мозаики клеток, среди них нет двух одинаковых. Онкологи не без основания утверждают, что раковые опухоли — своего рода плата за многоклеточность, плата за деление клеток, это проявление сбоя при их обновлении, «пародия на регенерацию». Во-вторых, не будем сбрасывать со счетов и то, что в течение жизни накапливаются эпигенетические модификации генома клеток. В-третьих, с возрастом значительно изменяется клеточное микроокружение (рис. 5).

В нашем геноме закодирована структура регуляторных молекул РНК, которые регулируют экспрессию генов, перепрограммирование клеток, их дифференцировку. При старении клеток происходят эпигенетические изменения хроматина. Изменяется степень ацетилирования белков и метилирования ДНК. С этими же процессами может быть связано и старение ниши стволовых клеток (рис. 6).

Поскольку практически во всех исследованных нишах обнаруживаются МСК, мы исследовали, как секретом мезенхимных клеток действует на нишу. В качестве модели использовали семенники, «мужскую репродуктивную нишу», которая производит сперматозоиды. При некоторых дефектах семенников сперматогенез снижается, а способность производить потомство исчезает. Но оказалось, что при внесении в семенники секрета мезенхимных клеток восстанавливается не только морфология органа, но и сперматогенез, а фертильность восстанавливается [17]. Это свидетельствует о возможности стимуляции процессов обновления клеток и регенеративных процессов путем воздействия на нишу стволовых клеток. Ведутся опыты по предотвращению старения ниши или даже обращению процесса старения ниши вспять [18].

Помимо регуляторов эпигенетики, к этим факторам могут относиться и компоненты микроокружения клеток. Например, мы обнаружили, что клеточная терапия с помощью МСК приносит значительно лучший результат, если эти клетки применяются в виде клеточных пластов, в которых сами они оказываются в окружении секретируемого ими матрикса [19, 20]. Эта находка перспективна для разработки новых типов клеточных препаратов для регенеративной медицины.

Фундаментальные основы регенеративной биомедицины важны для всех отраслей медицины, так как обновление и старение клеток происходят во всех тканях и органах. Эволюция сформировала десятки механизмов гибели клеток. Стимуляция гибели клеток запускается специальными рецепторами, специфическими сигнальными механизмами, специфическими мишенями [21]. Существует также несколько механизмов образования клеток. Здоровье и долголетие зависят от баланса между этими процессами, которые взаимосвязаны, имеют прямые и обратные связи. Баланс между процессами гибели и образования клеток регулируется голодом, холодом и гипоксией. Голод запускает аутофагию, холод влияет на фолдинг белков, а гипоксия через рецептор кислорода стимулирует апоптоз клеток. Через обратные связи эти внешние факторы стимулируют образование новых молодых клеток, их обновление, что продлевает время и эффективность работы разных функциональных систем, тканей и органов, а следовательно, и продолжительность жизни организма (рис. 7).



Рис. 7. Обновление клеток зависит от внешних факторов и происходит благодаря взаимосвязи между процессами гибели клеток и их образования

Организм человека является «самообновляющейся машиной», обладающей мощным потенциалом регенерации и репарации. Эти процессы идут в течение всей жизни, причем регенерация идет как при обновлении, так и при повреждении тканей, а репаративный ответ активируется исключительно в ответ на повреждение и зачастую завершается с фиброзированием в зоне повреждения. Это замечательное свойство регенеративная медицина использует для разработки методов лечения заболеваний, вызываемых утратой клеток и тканей. В последние десятилетия обнаружены и идентифицированы специфические эндогенные регуляторы гибели и образования клеток, регенерации и репарации тканей. Их число может быть сравнимо с количеством гормонов, вырабатываемых всей эндокринной системой. Некоторые гормоны, цитокины, хемокины и факторы роста также регулируют процессы образования и гибели клеток. На динамику этих процессов влияют многие факторы внешней среды через механизмы, которые целесообразно изучать. Более глубокое понимание всех этих сложных взаимосвязей открывает перед исследователями перспективы создания нового типа терапии, направленной не только на излечение возможных болезней, но и на более продолжительное функционирование тканей и органов, на продление жизни человека.

Финансирование исследования: Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова.

Funding: Study performed under state assignment of Lomonosov Moscow State University

Литература

1. *Ntege E.H., Sunami H., Shimizu Y.* Advances in regenerative therapy: A review of the literature and future directions. *Regen. Ther.* 2020;14:136–153.
2. *Agulnick A.D., et al.* Insulin-producing endocrine cells differentiated in vitro from human embryonic stem cells function in macroencapsulation devices in vivo. *Stem Cell Translational Medicine.* 2015;4(10):1214–1222.
3. *Friedenstein A.J., Petrakova K.V., Kurolesova A.I., Frolova G.P.* Heterotopic of Bone Marrow. Analysis of Precursor Cells for Osteogenic and Hematopoietic Tissues. *Transplantation.* 1968;6(2):230–247.
4. *Friedenstein A.* Stromal-Hematopoietic Interrelationships: Maximov's Ideas and Modern Models. *Cellular Therapy and Transplantation.* 1989;1:159–167.
5. *Weinstein B.M.* Vessels and Nerves: Marching to the Same Tune. *Cell.* 2005;120(3):299–302.
6. *Rubina K.A., Semina E.V., Balatskaya M.N., et al.* Mechanisms of regulation of the targeted grown of nerves and vessels by components of the fibrinolytic system and GPI-anchored navigation receptors. *Neuroscience and Behavioral Physiology.* 2020;50(2):217–230.
7. *Shmakova A.A., Balatskiy A.V., Kulebyakina M.A., et al.* Urokinase Receptor uPAR Overexpression in Mouse Brain Stimulates the Migration of Neurons into the Cortex during Embryogenesis. *Russian Journal of Developmental Biology.* 2021;52(1):53–63.
8. *Campbell D.B., Li Ch., Sutcliffe J.S., et al.* Genetic evidence implicating multiple genes in the MET receptor tyrosine kinase pathway in autism spectrum disorder. *Autism Research.* 2008;1(159–168).
9. *Kalinina N., Kharlampieva D., Loguinova M., et al.* I. Characterization of secretomes provides evidence for adipose-derived mesenchymal stromal cells subtypes. *Stem Cell Res Ther.* 2015;6:221–230.
10. *Sagaradze G., Grigorieva O., Nimiritsky P., et al.* Conditioned medium from human mesenchymal stromal cells: Towards the clinical translation. *International Journal of Molecular Sciences.* 2019;20(7):e1656.
11. *Lopatina T., Kalinina N., Karagyaur M., et al.* Adipose-derived stem cells stimulate regeneration of peripheral nerves: BDNF secreted by these cells promotes nerve healing and axon growth de novo. *PLoS One.* 2011;6(3):e17899.
12. *Karagyaur M., Dyikanov D., Makarevich P., et al.* Non-viral transfer of BDNF and uPA stimulates peripheral nerve regeneration. *Biomed Pharmacother.* 2015;74:63–70.
13. *Karagyaur M., Rostovtseva A., Semina E., et al.* A Bicistronic Plasmid Encoding Brain-Derived Neurotrophic Factor and Urokinase Plasminogen Activator Stimulates Peripheral Nerve Regeneration After Injury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2020;372(3):248–255.
14. *Eremichev R., Kulebyakina M., Alexandrushkina N., et al.* Scar-free healing of endometrium: tissue-specific program of stromal cells and its induction by soluble factors produced after damage. *Front. Cell Dev. Biol.* 2021;9:616893.
15. *Basalova N., Sagaradze G., Arbatskiy M., et al.* Secretome of Mesenchymal Stromal Cells Prevents Myofibroblasts Differentiation by Transferring Fibrosis-Associated microRNAs within Extracellular Vesicles. *Cells.* 2020;9(5):1272.
16. *Efimenko A.Yu., Kochegura T.N., Akopyan Zh.A., Parfyonova Y.V.* Autologous Stem Cell Therapy: How Aging and Chronic Diseases Affect Stem and Progenitor Cells. *BioResearch Open Access.* 2015;4(1):26–38.
17. *Sagaradze G., Basalova N., Kirpatovsky V., et al.* A magic kick for regeneration: role of mesenchymal stromal cell secretome in spermatogonial stem cell niche recovery. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10:342.
18. *Sagaradze G.D., Basalova N.A., Efimenko A.Yu., Tkachuk V.A.* Mesenchymal Stromal Cells as Critical Contributors to Tissue Regeneration. *Frontiers in Cell and Developmental Biology.* 2020;8:576176.
19. *Nimiritsky P.P., Eremichev R.Y., Alexandrushkina N.A., et al.* Unveiling mesenchymal stromal cells' organizing function in regeneration. *International Journal of Molecular Sciences.* 2019;20(4):823.

20. Alexandrushkina N., Nimiritsky P., Eremichev R., et al. 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;21(15):1-21.
21. Makarevich P.I., Efimenko A.Yu., Tkachuk V.A. Biochemical Regulation of Regenerative Processes by Growth Factors and Cytokines: Basic Mechanisms and Relevance for Regenerative Medicine. *Biochemistry (Moscow)*. 2020;85(11):11-26.
22. Merrell A., Stanger B. Adult cell plasticity in vivo: de-differentiation and transdifferentiation are back in style. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016;17(7):413-425

Об авторе

Ткачук Всеволод Арсеньевич — академик РАН, академик-секретарь Отделения физиологических наук РАН, декан факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, директор Института регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного центра МГУ имени М.В. Ломоносова.

Author

Vsevolod A. Tkachuk — Full Member of RAS, Secretary-Academician of Physiology section, RAS, Dean of the Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University, Director of the Institute for Regenerative medicine, Education and Research Medical Center, Lomonosov Moscow State University.

<https://doi.org/10.60043/2949-5938-2023-1-16-24>



Три десятилетия развития генной терапии: вехи и перспективы

П.И. Макаревич

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»,
119192, г. Москва, Ленинские горы, 1, Россия

Адрес для корреспонденции: makarevichpi@my.msu.ru

Аннотация

За тридцать лет развития с момента первого применения в клинике генная терапия (ГТ) прошла путь от экспериментального направления до наиболее активно развивающейся области современной биомедицины. Значительные успехи чередовались в течение этого периода с резкими спадами, и именно они вкуче с новыми идеями сформировали основные вехи, которым посвящено данное сообщение. Анализ накопленного опыта формирует направления, лежит в основе открывающихся перспектив развития ГТ и задает вектор для их реализации. При этом нельзя не забывать и о важных вопросах этичности и безопасности, которые являются краеугольными камнями, поддерживающими возможность применения методов ГТ у человека. Настоящее сообщение кратко суммирует наиболее важные события и фундаментальные положения, которые сформировали современный облик ГТ, излагает ее перспективы и проблемные вопросы, которые стоят перед областью в настоящее время.

Ключевые слова: генная терапия, вектор, наследственные заболевания, плазида, вирусный вектор

Конфликт интересов: автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Макаревич П.И. Три десятилетия развития генной терапии: вехи и перспективы. *Регенерация органов и тканей*. 2023;1(1):16–24. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2023-1-16-24>

Поступила 09.08.2022

Обработана 23.05.2023

Принята к публикации 20.06.2023

Three decades of gene therapy development: milestones and prospects

Pavel I. Makarevich

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, 119192, Moscow, Leninskiye Gory, 1, Russia

Correspondence address: makarevichpi@my.msu.ru

Abstract

Within past 30 years of progress since its first clinical use, gene therapy (GT) has gone from an experimental field to the most actively developing area of modern biomedicine. Significant advances during this period were mixed with sharp declines, and this pathway taken together with new ideas and concepts has formed the main milestones which this short review addresses. Analysis of accumulated experience provides directions, makes up for emerging prospects for the development of GT and sets the vector for their implementation. At the same time, we should not forget about the crucial issues of ethics and safety, which are the cornerstones supporting the use of GT in human. This report briefly summarizes the most important events and fundamental provisions that have shaped the modern landscape of GT, outlines its prospects and problematic issues in the field.

Keywords: gene therapy, vector, hereditary diseases, plasmid, viral vector

Conflict of interest: the author declares no conflict of interest.

For citation: Makarevich P.I. Three decades of gene therapy development: milestones and prospects. *Tissue and organ regeneration*. 2023;1(1):16–24. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2023-1-16-24>

Received 09.08.2022

Revised 23.05.2023

Accepted 20.06.2023

Генная терапия как направление в биомедицине

Генную терапию (ГТ) в настоящее время определяют как модификацию или перенос генетического материала в организм пациента с целью лечения или профилактики [1]. Развитие данного направления насчитывает более 30 лет, в которых чередовались успехи и крайне болезненные провалы, однако в настоящий момент именно ГТ является одной из наиболее динамично развивающихся отраслей в биомедицине.

Подробнейшим образом классификация векторов, подходов ГТ и ее инструментарий описаны в целом ряде исчерпывающих обзорных статей [2, 3], поэтому в настоящем сообщении мы сосредоточимся на ключевых моментах, определяющих ход развития области, и ее возможных перспективах.

Особенно важны для актуального понимания ГТ 3 положения, на которых необходимо сфокусировать внимание:

- 1) ГТ и ее методы являются ярким примером биомиметического подхода к созданию новых технологий — ее принципы скопированы у живой природы, и прототипами всех ее инструментов, начиная от векторов и заканчивая способами доставки, стали созданные эволюцией механизмы переноса, модификации и регуляции экспрессии информации, закодированной в последовательностях нуклеиновых кислот;
- 2) ГТ неразрывно связана с развитием биоинженерии и биотехнологий, т.к. возможность копирования у природы и конструирования инструментов для переноса генетической информации сама по себе не гарантирует нам их эффективного масштабирования и возможности получать в достаточном количестве

препараты на основе вирусов, мРНК, плазмид и других векторов;

3) ГТ представляет собой очень сложную область для классической фармакологии, в которой действующими веществами в большинстве случаев являются малые молекулы и реже — макромолекулы, но не сложные макромолекулярные комплексы, которыми, например, являются вирусные частицы.

Эти положения, и в особенности п. 3, в значительной степени определили риски и также опасения, с которыми столкнулась ГТ на старте своего развития и которые по-прежнему необходимо учитывать при создании и внедрении новых препаратов данной категории. В значительной степени в настоящее время ход разработки и внедрения препаратов для ГТ схож с тем, который принят для лекарственных средств на основе малых молекул. Проведение доклинических и клинических исследований стало стандартным порядком, одобренным всеми ведущими регуляторами, и без исключений требуется для всех продуктов данной категории. Всего по данным последнего квартального отчета Американского общества генной и клеточной терапии за 2022 год в мире разрабатывается более 2000 препаратов для ГТ, что говорит о высокой активности разработчиков, фармацевтических и биотехнологических компаний в данной области биомедицины.

От исследований генома к генной терапии

В историческом плане переход от расшифровки генома человека к идее ГТ значительно опередил развитие ее методов и практическое применение в клинике. Идея о возможности переноса генетической информации в клетки человека с целью лечения или профилактики, которая так и осталась незыблемой основой всех существующих вариантов ГТ, высказывалась еще в конце 1960-х годов. Прогресс в области молекулярной биологии, вирусологии, а также прорывы в изучении регуляции экспрессии генов у самых простых эукариот (дрожжей, водорослей, примитивных многоклеточных) подстегивали интерес к генетическим манипуляциям, которые могли бы скорректировать или излечить тяжелейшие наследственные заболевания, известные медицине в течение многих столетий. Тем не менее уже в 1972 году впервые были опубликованы научно обоснованные предостережения от чересчур быстрого перехода от экспериментальных работ к исследованиям на че-

ловеке [4]. В своей статье Т. Фридман и Р. Роблин сформулировали целый ряд важнейших положений, которые в дальнейшем заложили основу для многих методов современной ГТ. Начиная от четкого фокуса на ферментах, мутации в которых вызывают многие орфанные и более часто встречающиеся наследственные заболевания, и заканчивая возможностью использования фибробластов кожи от пациентов с ними для моделирования «болезни в чашке». Заканчивалась данная статья призывом с крайней осторожностью переходить от самых впечатляющих экспериментов к клиническим исследованиям, и в пользу этого авторами приводились доводы, сохранившие актуальность и в наше время:

- 1) недостаточно глубокое понимание принципов регуляции экспрессии генов и процессов рекомбинации у человека;
- 2) не всегда очевидная и четко установленная связь между дефектом на молекулярном уровне и развитием конкретного заболевания;
- 3) отсутствие достаточной информации о кратко- и долгосрочных эффектах использования тех или иных методов ГТ.

В конечном счете, именно с этими проблемами в дальнейшем и пришлось сталкиваться разработчикам препаратов для ГТ и клиницистам, пытавшимся внедрить в практику доселе не изученные способы помощи самым сложным пациентам.

В этом и заключался, вероятно, все еще сохраняющийся парадокс этого прорыва, который дал бесконечно ценную структурную и описательную информацию для фундаментального понимания причин наследственных заболеваний, но при этом поднял и множество вопросов о безопасности способов их коррекции. Таким образом, хотя расшифровка структуры и последовательности генома позволила установить этиологию многих наследственных заболеваний, она сама по себе не дала в руки врача инструмента для его устранения, который мог бы применяться без существенных ограничений.

Оправданные ограничения и кризис на рубеже веков

Переход от экспериментальных методов ГТ к лекарственным препаратам был важным шагом на пути формирования этой отрасли, так как стандартизация состава и, следовательно, эффективности и безопасности любых приме-

няемых для лечения веществ стала приоритетом в современной фармацевтике. Не менее важным стало и появление во многих странах регуляторных норм, вводимых на правительственном уровне в США, Японии, странах Европы, которые установили правила обращения и внедрения новых препаратов для ГТ. Следует сразу же оговориться, что во всех случаях они были сразу же отнесены к категории препаратов передовой терапии (advanced therapy по терминологии ЕМА) [5]. Это весьма удачное название с точки зрения сдержанного указания на недостаточно длительную историю изучения их безопасности, в особенности отсроченной. В ряде случаев открыто обсуждалось, что ГТ, как и клеточная терапия, и продукты для ее осуществления являются препаратами высокого риска, что налагало на разработчиков существенные дополнительные обязательства по подтверждению безопасности созданного лекарственного средства. Несмотря на это, в конце XX века многие страны активно начали развивать это направление, вкладывая существенные ресурсы в разработку, доклинические и клинические исследования ГТ по самым тяжелым показаниям, в основном из числа наследственных заболеваний, этиология которых наиболее соответствовала специфике данного подхода.

Значительным ударом по развивающейся области ГТ стала гибель в 1999 году Джесси Гелсингера, вызванная введением аденовирусного препарата, несущего ген орнитилтранскарбамилазы (ОТС), в ходе клинического исследования, проводившегося Университетом штата Пенсильвания [6]. Данный эпизод многократно анализировался и цитировался в литературе, однако главным последствием (помимо приостановки клинической разработки целого ряда препаратов) стало значительное и оправданное усиление мер доклинической оценки безопасности препаратов для ГТ и в особенности на основе рекомбинантных вирусных векторов. Как результат — за последующие 20 лет лишь 2 случая гибели пациентов в ходе клинических исследований препаратов для ГТ были напрямую связаны с токсическими или побочными эффектами введенного вектора. Более того, в 2011–2018 годах наблюдался почти экспоненциальный рост количества разрешений на проведение клинических исследований и регистраций препаратов для ГТ, что указывало на действенность введенных мер по доклинической оценке эффективности и безопасности.

Таким образом, преодолев сложившийся по объективным причинам кризис на рубеже веков, область ГТ значительно усилила свои позиции и даже ускорила свое развитие, в связи с чем данный печальный эпизод можно расценить как важную веху в становлении этого направления биомедицины.

Вирусные векторы и терапия *ex vivo* — основные инструменты ГТ

Сложность биотехнологических процессов и очевидная иммуногенность вирусных векторов в течение длительного времени являлись факторами, ограничивающими их применение в клинике, однако накопленный массив данных по безопасности в конечном счете привел к тому, что в профессиональном сообществе сформировалась достаточная мера доверия к этим, несомненно, эффективным инструментам для доставки генетического материала в клетки человека. Важнейшими инструментами вирусной ГТ остаются аденоассоциированные вирусы (ААВ), чья гибкость в качестве платформы для таргетного и безопасного введения целевых последовательностей в ткани и органы человека, сделала их своего рода «блокбастером» в этой области биомедицины [7]. На их основе были созданы показавшие высочайшую эффективность и безопасность препараты для ГТ гемофилии, ряда тяжелейших и летальных миодистрофий и ферментопатий.

Не менее важными для целого ряда продуктов, опирающихся на генетическую модификацию *ex vivo*, т.е. вне организма, стали ретровирусные векторы, которые способны вызывать перманентную модификацию клетки-мишени за счет интеграции доставляемой генетической информации в ее геном [8]. Наиболее активно развивающимися в этой области стали методы получения клеточных продуктов для иммунотерапии в онкологии, например Т-клетки с химерным антигенным рецептором (CAR-T). Ряд важнейших достижений с использованием ретровирусов связан с ГТ в гематологии, лечением наследственных иммунодефицитов и гемоглобинопатий. Наконец, нелишним будет и упоминание того факта, что именно ретровирусная модификация была основой первого метода ГТ, который был применен в клинике Уильямом Андерсоном и коллегами для успешного излечения тяжелого комбинированного иммунодефицита, вызванного мутацией гена *ADA*, кодирующего фермент аденозиндезаминазу [9].

Аденовирусные векторы, которые после спада популярности из-за гибели Джесси Гелсингера, в настоящий момент прошли очень существенный путь и представлены уже вирусными частицами III поколения с уникальной емкостью до 30 тыс. пар оснований, стали основой гибких платформ, в том числе для вакцин [10]. Однако векторы на основе наиболее распространенных серотипов все еще уступают по распространенности другим системам для ГТ из-за высокой иммуногенности и высокой встречаемости приобретенного иммунитета к ним в популяции после банальных простудных заболеваний [11].

Таким образом, в настоящее время мы становимся свидетелями бурного успеха вирусных систем, используемых для ГТ, причем в значительной степени это определяется активной позицией регуляторов, которые, не ослабляя требований к оценке безопасности и этической стороне их применения, тем не менее создают возможности для клинических исследований и регистрации таких продуктов. Более того, в ряде случаев (особенно касающихся тяжелых заболеваний, относящихся к неудовлетворенным медицинским потребностям) лекарственные препараты на основе вирусных векторов или модифицированных с их использованием клеток регистрируются по ускоренному сценарию или с применением процедуры условной регистрации. Под последней понимают регистрацию до завершения полного цикла клинических исследований для обеспечения пациентов передовыми методами терапии на условиях предоставления в установленный срок полного досье для окончательной оценки эффективности и безопасности разработанного препарата [12].

Отдельного внимания заслуживает использование вирусных векторов для доставки компонентов систем редактирования генома, однако данная область является еще крайне дискуссионной с позиции трансляционных перспектив. Рассуждать о ее развитии и промежуточных итогах представляется более целесообразным после достижения глобального консенсуса в этических и правовых аспектах данного направления [13].

Невирусные векторы для ГТ и новые возможности

На фоне активного развития и успешной клинической трансляции препаратов на основе вирусных векторов произошло значительное снижение интереса к невирусным системам на основе

плазмидных ДНК (пДНК) [14]. Причинами этого стали многочисленные клинические исследования, в т.ч. поздних фаз, в которых не удавалось достичь целевых конечных точек при лечении ишемии конечности, инфаркта миокарда, незаживающих дефектов кожи [15, 16]. Большие надежды возлагались на препараты, направленные на стимуляцию роста кровеносных сосудов и нервов для лечения соответствующих заболеваний, однако ни одного по-настоящему успешного метода ГТ в этой области создать не удалось.

Несмотря на значительные усилия, направленные на усиление эффективности, в том числе с помощью комбинированной ГТ на основе бистронных пДНК, несущих несколько «терапевтических генов», в настоящее время новых регистраций препаратов на основе невирусных систем доставки не произошло [17, 18]. Тем не менее данная группа препаратов сохраняет свою перспективность по целому ряду показаний, связанных с нарушением трофики тканей. Например, при диабетической нейропатии, в которой активное развитие получил препарат VM202 с двумя изоформами фактора роста гепатоцитов (HGF), успешно прошедший несколько фаз клинических исследований вплоть до III [19].

В значительной степени это связано с тем, что в настоящий момент данная область драматически изменяет свой ландшафт и в ней идет поиск новых показаний, при которых краткосрочная (до 7–12 суток) экспрессия и прямой путь введения вектора приемлемы и могут обеспечить необходимый уровень терапевтической эффективности ГТ. Примером удачного показания является, например, неинфекционный увеит, при котором электропорация пДНК в ресничную мышцу позволяет создать локальную концентрацию фьюжн-белка, связывающего фактор некроза опухоли альфа (TNF- α), что приводит к снижению воспаления. Такого рода препарат под названием rEYS606 уже прошел доклинические и I/II фазы клинических исследований у пациентов, страдающих от рецидивирующих неинфекционных (преимущественно, аутоиммунных) увеитов [20].

Таким образом, в данной области, несмотря на невысокие темпы развития в последнее десятилетие, остается открытым окно возможностей для создания новых препаратов при условии ухода от ряда устоявшихся парадигм и смены

показаний. В пользу векторов на основе пДНК говорят относительная дешевизна и стандартизация процессов производства, а также очень высокая безопасность, в т.ч. отдаленная, подтвержденная многолетними клиническими исследованиями в этой области [21].

Развитие ГТ в отечественной практике

Значительные успехи зарубежных групп в области ГТ стали стимулом для отечественных разработчиков, в особенности при создании невирусных векторов на основе пДНК. Нельзя не отметить, что единственным зарегистрированным к настоящему времени препаратом на основе пДНК с геном *VEGF165* является российский «Неоваскулген» (ПАО «Институт стволовых клеток человека»). Его активно применяли для лечения критической ишемии нижних конечностей, и в дальнейшем он стал основой для функционализированного остеоиндуктивного медицинского изделия «Гистографт» (ООО «Гистографт») [22]. Среди разработок в области терапии ишемических заболеваний заслуживают также упоминания препараты разработки НМИЦ кардиологии им. Е.И. Чазова «Юпикор» с геном урокиназного активатора плазминогена и «Корвиан» с геном *VEGF165*, которые показали эффективность и безопасность в клинических исследованиях I/II фаз [23].

В области терапевтического ангиогенеза в РФ также активно разрабатывались комбинированные подходы к ГТ — были созданы и проходили доклинические исследования препараты, несущие несколько генов факторов роста, которые убедительно показали преимущество такого метода над монотерапией [18, 24–26].

Нельзя оставить за пределами данного обзора и целый ряд перспективных разработок в области лечения неврологических заболеваний [27–29], в частности, препарат «Иннервин», который показал свою эффективность в клиническом исследовании у пациентов с травмами периферических нервов верхней конечности.

В значительной степени эти результаты заложили основу для дальнейшего развития отрасли и сдвига акцента в сторону препаратов для лечения моногенных и орфанных заболеваний. Их основой стали вирусные векторы различной природы, и к настоящему времени отечественными группами и компаниями готовится к клиническим исследованиям целый

перечень перспективных препаратов. К ним относятся препараты на базе рекомбинантных ААВ для лечения гемофилии В (АО «Биокад») и миодистрофии Дюшенна (ООО «Марлин Биотех»). Также нельзя не отметить разработку Казанского федерального университета совместно с ГК «Р-Фарм», направленную на лечение спинальной мышечной атрофии с помощью ААВ с геном *SMN1*. Такого рода терапия позволит снизить стоимость лечения этого тяжелого заболевания, для которого в настоящее время в РФ зарегистрирован единственный препарат на основе ААВ — «Золгенсма» (АО «Новартис», Швейцария).

В области генно-клеточной терапии с использованием модифицированных клеток иммунной системы, где мировым трендом давно стало применение CAR-T для борьбы с онкологическими заболеваниями, также имеется существенный прогресс. В РФ благодаря изменениям нормативной базы в ближайшее время станут доступны перспективные и доказавшие эффективность при солидных опухолях и гемобластозах персонифицированные продукты на базе технологии CAR-T, производимые на базе профильной клиники по принципу «госпитального исключения», т.е. без формальной регистрации. Среди лидеров в этой области, несомненно, следует отметить ДГОИ им. Д. Рогачева и профильные центры ФМБА России.

Таким образом, в области ГТ российская наука в значительной степени перешла из категории «догоняющих» в «конкурирующих», а все основные мировые тренды были успешно в той или иной степени имплементированы в российскую практику. Путь отечественной ГТ в большой степени повторял траекторию развития глобальной отрасли. Через успехи, перемежавшиеся кризисами и разочарованиями, в настоящее время отечественная ГТ пришла в точку, где вирусные векторы стали лидирующими и наиболее перспективными подходами, а доверие сообщества и уникальные возможности в плане лечения орфанных и онкологических заболеваний продолжают стимулировать новые разработки в этой области.

Заключение и будущие направления

В настоящее время, несмотря на целый ряд неудач в прошлом, ГТ как отрасль биомедицины переживает несомненный подъем, и значительный интерес к ней поддерживается

постоянным появлением новых результатов, которые убедительно свидетельствуют о достижении новых горизонтов в лечении и излечении тяжелейших заболеваний: наследственных, аутоиммунных, нейродегенеративных и онкологических. Среди наиболее важных будущих направлений следует отметить стимуляцию регенеративных процессов и контроль обновления клеток тканей и органов человека. Фокус при выборе мишени значительно смещается от факторов роста, цитокинов и молекул, регулирующих те или иные процессы (воспаление, ангиогенез, пролиферацию клеток), в сторону факторов транскрипции, рецепторов и белков, контролирующих судьбу клетки. Их использование позволяет не только регулировать судьбу клетки, но и вызывать перепрограммирование из одного типа в другой, что позволит достичь уникальных результатов в области замещения утраченных функциональных элементов ткани, например центральной нервной системы или органа зрения [30, 31]. Несомненно, эти подходы в ближайшие годы останутся на уровне удивительных по силе экспериментальных работ, однако в перспективе именно они позволят предпринять попытки по направленной стимуляции регенерации и управлению процессами обновления тканей, идущими в течение всей жизни.

Вторым важным и пока что слабо изученным аспектом является использование ГТ для стимуляции процессов морфогенеза и развертывания структуры ткани, аналогичных тем, что идут в эмбриогенезе [32]. Расшифровка молекулярных механизмов этих событий все чаще позволяет выбирать мишени, которые могут в будущем использоваться для запуска формирования тканевых структур для восстановления утраченных тканей и даже органов. Возможно, это выведет на новый уровень подходы тканевой инженерии, опирающейся на формирование структур организма *ex vivo*, однако конечной и очень желанной точкой развития этой области является дости-

жение с помощью методов ГТ контроля над морфогенетическими процессами непосредственно в организме *in vivo*. Значительный риск при движении в этом направлении кроется в «перекрытии» многих механизмов формирования ткани и зарождения, а также роста опухолей, которые часто управляются одними и теми же молекулярными эффекторами [33]. Преодоление этого барьера, вероятно, будет связано с использованием регулируемых или индуцибельных систем экспрессии или же с методами на основе биоинформатики и анализа «больших данных», которые позволят с достаточной степенью точности предсказывать целые молекулярные сети и прогнозировать сдвиги, вызываемые доставкой с помощью методов ГТ так называемых мастер-регуляторов того или иного морфогенетического процесса.

В любом случае, опыт развития ГТ позволяет с уверенностью говорить о том, что приоритетом в этой области была и остается безопасность пациента, поэтому мы можем закончить данное сообщение мыслью о том, что любые, даже самые перспективные и фантастические достижения в этой области не получают одобрения профессионального сообщества и регуляторов без достаточного количества научных данных, подтверждающих, что польза от применения ГТ перевешивает возможные риски для здоровья и жизни пациента и его потомков.

Финансирование исследования: Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова и по перспективному направлению научно-образовательного развития Московского университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология».

Funding: The work was carried under state assignment of M.V. Lomonosov Moscow State University and the prospective direction of scientific and educational development of M.V. Lomonosov Moscow State University “Molecular technologies of living systems and synthetic biology”.

Литература

1. Anguela XM, High KA. Entering the Modern Era of Gene Therapy. *Annu Rev Med.* 2019;70:273–288.
2. Bulaklak K, Gersbach CA. The once and future gene therapy. *Nat Commun.* 2020;11(1):5820.
3. Papanikolaou E, Bosio A. The Promise and the Hope of Gene Therapy. *Front Genome Ed.* 2021;3:618346.

4. Friedmann T, Roblin R. Gene therapy for human genetic disease? *Science*. 1972;175(4025):949–955.
5. Salmikangas P, Schuessler-Lenz M, Ruiz S, Celis P, Reischl I, Menezes-Ferreira M, et al. Marketing Regulatory Oversight of Advanced Therapy Medicinal Products (ATMPs) in Europe: The EMA/CAT Perspective. *Adv Exp Med Biol*. 2015;871:103–130.
6. Somia N, Verma IM. Gene therapy: trials and tribulations. *Nat Rev Genet*. 2000;1(2):91–99.
7. Naso MF, Tomkowicz B, Perry WL, 3rd, Strohl WR. Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs*. 2017;31(4):317–334.
8. Lukashev AN, Zamyatnin AA, Jr. Viral Vectors for Gene Therapy: Current State and Clinical Perspectives. *Biochemistry (Mosc)*. 2016;81(7):700–708.
9. Anderson WF. Human gene therapy. *Science*. 1992;256(5058):808–813.
10. Bulcha JT, Wang Y, Ma H, Tai PWL, Gao G. Viral vector platforms within the gene therapy landscape. *Signal Transduct Target Ther*. 2021;6(1):53.
11. Viral Vector Systems for Gene Therapy: A Comprehensive Literature Review of Progress and Biosafety Challenges. *Applied Biosafety*. 2020;25(1):7–18.
12. Shahryari A, Saghaeian Jazi M, Mohammadi S, Razavi Nikoo H, Nazari Z, Hosseini ES, et al. Development and Clinical Translation of Approved Gene Therapy Products for Genetic Disorders. *Front Genet*. 2019;10:868.
13. Karagyaur M, Efimenko A, Makarevich P, Akopyan Z, Bryzgalina E, Tkachuk V. Ethical and Legal Aspects of Using Genome Editing Technologies in Medicine (Review). *Sovremennye tehnologii v medicine*. 2019;11.
14. Arabi F, Mansouri V, Ahmadbeigi N. Gene therapy clinical trials, where do we go? An overview. *Biomed Pharmacother*. 2022;153:113324.
15. De Haro J, Acin F, Lopez-Quintana A, Florez A, Martinez-Aguilar E, Varela C. Meta-analysis of randomized, controlled clinical trials in angiogenesis: gene and cell therapy in peripheral arterial disease. *Heart Vessels*. 2009;24(5):321–328.
16. Ilieva K, Borissov B, Toumi M. Gene therapy randomised clinical trials in Europe — a review paper of methodology and design. *J Mark Access Health Policy*. 2020;8(1):1847808.
17. Karagyaur M, Rostovtseva A, Semina E, Klimovich P, Balabanyan V, Makarevich P, et al. A Bicistronic Plasmid Encoding Brain-Derived Neurotrophic Factor and Urokinase Plasminogen Activator Stimulates Peripheral Nerve Regeneration After Injury. *J Pharmacol Exp Ther*. 2020;372(3):248–255.
18. Slobodkina E, Boldyreva M, Karagyaur M, Eremichev R, Alexandrushkina N, Balabanyan V, et al. Therapeutic Angiogenesis by a “Dynamic Duo”: Simultaneous Expression of HGF and VEGF165 by Novel Bicistronic Plasmid Restores Blood Flow in Ischemic Skeletal Muscle. *Pharmaceutics*. 2020;12(12):1231.
19. Kessler JA, Shaibani A, Sang CN, Christiansen M, Kudrow D, Vinik A, et al. Gene therapy for diabetic peripheral neuropathy: A randomized, placebo-controlled phase III study of VM202, a plasmid DNA encoding human hepatocyte growth factor. *Clin Transl Sci*. 2021;14(3):1176–1184.
20. Touchard E, Benard R, Bigot K, Laffitte JD, Buggage R, Bordet T, et al. Non-viral ocular gene therapy, pEYS606, for the treatment of non-infectious uveitis: Preclinical evaluation of the medicinal product. *J Control Release*. 2018;285:244–251.
21. Stenler S, Blomberg P, Smith CI. Safety and efficacy of DNA vaccines: plasmids vs. minicircles. *Hum Vaccin Immunother*. 2014;10(5):1306–1308.
22. Bozo IY, Drobyshev AY, Redko NA, Komlev VS, Isaev AA, Deev RV. Bringing a Gene-Activated Bone Substitute Into Clinical Practice: From Bench to Bedside. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021;9:599300.
23. Астапова О.В., Берчатова А.А. Генотерапевтические препараты: аспекты доклинического изучения безопасности. Безопасность и риск фармакотерапии. 2023;11(1):73–96. [Astopova O.V., Berchatova A.A. Gene Therapy Medicinal Products: Non-clinical Safety Studies. Safety and Risk of Pharmacotherapy. 2023;11(1):73–96. (In Russ.)]
24. Makarevich P, Tsokolaeva Z, Shevelev A, Rybalkin I, Shevchenko E, Beloglazova I, et al. Combined transfer of human VEGF165 and HGF genes renders potent angiogenic effect in ischemic skeletal muscle. *PLoS One*. 2012;7(6):e38776.

25. Makarevich PI, Dergilev KV, Tsokolaeva ZI, Boldyreva MA, Shevchenko EK, Gluhanyuk EV, et al. Angiogenic and pleiotropic effects of VEGF165 and HGF combined gene therapy in a rat model of myocardial infarction. *PLoS One*. 2018;13(5):e0197566.
26. Masgutov R, Zeinalova A, Bogov A, Masgutova G, Salafutdinov I, Garanina E, et al. Angiogenesis and nerve regeneration induced by local administration of plasmid pBud-coV-EGF165-coFGF2 into the intact rat sciatic nerve. *Neural Regen Res*. 2021;16(9):1882–1889.
27. Boldyreva Mcapital A C, Bondar IV, Stafeev IS, Makarevich PI, Beloglazova IB, Zubkova ES, et al. Plasmid-based gene therapy with hepatocyte growth factor stimulates peripheral nerve regeneration after traumatic injury. *Biomed Pharmacother*. 2018;101:682–690.
28. Idrisova KF, Zeinalova AK, Masgutova GA, Bogov AA, Allegrucci C, Syromiatnikova VY, et al. Application of neurotrophic and proangiogenic factors as therapy after peripheral nervous system injury. *Neural Regen Res*. 2022;17(6):1240–1247.
29. Karagyaur M, Dyikanov D, Makarevich P, Semina E, Stambolsky D, Plekhanova O, et al. Non-viral transfer of BDNF and uPA stimulates peripheral nerve regeneration. *Biomed Pharmacother*. 2015;74:63–70.
30. Iyer AA, Groves AK. Transcription Factor Reprogramming in the Inner Ear: Turning on Cell Fate Switches to Regenerate Sensory Hair Cells. *Front Cell Neurosci*. 2021;15:660748.
31. Todd L, Hooper MJ, Haugan AK, Finkbeiner C, Jorstad N, Radulovich N, et al. Efficient stimulation of retinal regeneration from Muller glia in adult mice using combinations of proneural bHLH transcription factors. *Cell Rep*. 2021;37(3):109857.
32. Tung A, Levin M. Extra-genomic instructive influences in morphogenesis: A review of external signals that regulate growth and form. *Dev Biol*. 2020;461(1):1–12.
33. Reichert M, Takano S, von Burstin J, Kim SB, Lee JS, Ihida-Stansbury K, et al. The Prrx1 homeodomain transcription factor plays a central role in pancreatic regeneration and carcinogenesis. *Genes Dev*. 2013;27(3):288–300.

Об авторе

Макаревич Павел Игоревич — к.м.н., зав. лабораторией генно-клеточной терапии, Институт регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного центра МГУ имени М.В. Ломоносова; доцент кафедры биохимии и молекулярной медицины Факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Author

Pavel. I. Makarevich — MD, PhD, Head of Gene and Cell Therapy Laboratory, Institute for Regenerative Medicine, Medical Research and Education Center, Lomonosov Moscow State University; assistant professor at Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University.

<https://doi.org/10.60043/2949-5938-2023-1-25-41>



Александр Максимов в зеркале учеников

Р.В. Деев

ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 191015, г. Санкт-Петербург, Кирочная ул., д. 41, Россия

Адрес для корреспонденции: Roman.Deev@szgmu.ru

Аннотация

Вклад русского гистолога и патолога Александра Александровича Максимова (1874–1928) в отечественную и мировую науку и практику несомненен и признан. Его работы по патологии воспаления, филогенезу кроветворения, цито- и гистофизиологии соединительной ткани, полученные экспериментально-гистологическими и культуральными методами, позволили более 110 лет назад утвердить доминирование монофилетической модели гемопоэза, разработать значимый фрагмент будущего учения о ретикулоэндотелиальной системе, получить ценные данные в рамках концепции мезенхимного резерва в тканях взрослого организма.

А.А. Максимов прожил короткую, но чрезвычайно насыщенную работой жизнь. Многие прорывные результаты этой деятельности стали отправной точкой для развития его непосредственными сотрудниками и идейными продолжателями; среди них выдающиеся имена: Н.Н. Аничков, А.А. Заварзин, Н.Г. Хлопин, В.М. Данчакова и другие знаковые исследователи.

Ключевые достижения А.А. Максимова находятся в фундаменте основных подходов к разработке терапевтических клеточных технологий современности.

Ключевые слова: А.А. Максимов, воспаление, соединительная ткань, кроветворение, стволовая клетка, мезенхимный резерв, регенерация

Конфликт интересов: автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Деев Р.В. Александр Максимов в зеркале учеников. *Регенерация органов и тканей*. 2023;1(1):25–41. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2023-1-25-41>

Получена 22.02.2023

Доработана 26.04.2023

Принято 10.05.2023

Alexander Maximow's reflection in his followers scientific works

Roman V. Deev

Mechnikov North-Western State Medical University, 191015, St. Petersburg, Kirochnaya str, 41, Russia

Correspondence address: Roman.Deev@szgmu.ru

Abstract

The contribution of the Russian histologist and pathologist Alexander Alexandrovich Maximow (1874–1928) to domestic and world science and practice is undoubted and recognized in the world. His research on the pathology of inflammation, the phylogeny of hematopoiesis, and the cyto- and histophysiology of connective tissue, he performed by experimental-histological and cultural methods more than 110 years ago. Their results made it possible to approve the dominance of the monophyletic model of hematopoiesis, to develop the doctrine of the reticuloendothelial system, and to obtain valuable data on the concept of mesenchymal reserve in the tissues of an adult organism.

A.A. Maximow lived a short but extremely busy life. Many of his breakthrough results became the starting point for development by his immediate employees and ideological successors; among them are outstanding names: N.N. Anichkov, N.G. Khlopin, A.A. Zavarzin, V.M. Dan-chakova and other prominent researchers.

Key achievements of A.A. Maximow are in the foundation of basic approaches to the development of therapeutic cellular technologies of our time.

Keywords: A.A. Maximow, inflammation, connective tissue, hematopoiesis, stem cell, mesenchymal reserve, regeneration

Conflict of interests: author declares no conflict of interests.

For citation: Deev R.V. Alexander Maximow's reflection in his followers scientific works. *Tissue and organ regeneration*. 2023;1(1):25–41. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2023-1-25-41>

Received 22.02.2023

Revised 26.04.2023

Accepted 10.05.2023

Выдающийся вклад русского гистолога и патолога Александра Александровича Максимова (1874–1928) в несколько ключевых областей науки о тканях простирается в диапазоне от разработки методик и лабораторных устройств (метод окрашивания по Максимова, камера Максимова для культивирования *in vitro* и др.), создания непревзойденного русскоязычного и американского учебников (а значит, и вклад в обучение сотен тысяч врачей по всему земному шару) до концептуальных теоретических обобщений, утвердивших монофилетическую (унитарную) модель кроветворения, развивших теорию о ретикулоэндотелиальной системе и формирование представлений о мезенхимном резерве в тка-

нях взрослого организма. В разные годы эти гипотезы послужили основой для прорывных работ по экспериментальным пересадкам кроветворной ткани и, впоследствии, трансплантации костного мозга, выполненные Д. Тиллом и Э. Маккалохом, а в дальнейшем Э.Д. Томасом [1–3]. Открытие Р.К. Чайлахяном и А.Я. Фриденштейном детерминированных и индуцибельных стромальных клеток кроветворных органов сделало возможным разработку теории «стволовой мезенхимальной (стромальной) клетки» и последующую трансляцию этого достижения в клиническую практику с целью восстановления скелетных тканей [4–7]. Эти и другие результаты А.А. Максимова (рис. 1) «подхватывали» его

ученики, единомышленники и последователи. Трудам некоторых из них будут посвящены параграфы настоящего краткого очерка.

За последние 30 лет было снято идеологическое табу на биографию А.А. Максимова, и она достаточно широко раскрыта в трудах наших учителей и современников [1–3, 8–17]. Напомним, что А.А. Максимов родился в Санкт-Петербурге, был крещен в Екатерининской церкви Академии художеств на Васильевском острове. Он с отличными оценками окончил немецкую гимназию Карла Мая и поступил в Императорскую Военно-медицинскую академию 17-летним подростком. Природные качества и немецкая школа обусловили очень тщательное и упорядоченное отношение юноши к себе и к обучению. Блестящий хирург и однокашник А.А. Максимова Владимир Андреевич Оппель вспоминал первые годы учебы: *«Среди новых товарищей некоторые бросались в глаза. ...На первом месте по своей оригинальности стоял А.А. Максимов. Его быстро узнала вся академия.»*

...Совсем мальчишка — он был самый молодой студент в академии — он был всегда с иголки одет, всегда носил шапку. Он с уважением относился к форме, таким он остался до сих пор. Насмешки его не трогали. Он был слишком убежден в своей правоте, чтобы изменять своим привычкам и взглядам. В противоположность “белоподкладочникам”, Максимов был лучшим студентом на курсе по учению. Гимназию он кончил с золотой медалью. Академию кончил первым. Так с первого курса и было видно, что он кончит первым. Всегда на первой скамейке, всегда с тетрадками для записывания, чуть ли не самый аккуратный посетитель всех лекций» [18].

Еще во время обучения он выполнил ряд научных работ по патологической анатомии, две из которых получили очень высокую оценку: «Об ангиомах гортани» (1895) — удостоена премии профессора Т.С. Иллинского; «Гистогенез экспериментально вызванного амилоидного перерождения печени у животных» (1896) — золотой медали Конференции¹ Академии. А.А. Максимов окончил обучение в 1896 году и после прикомандирования к одному из военных госпиталей был назначен преподавателем на кафедру патологической анатомии, где помимо освоения специальности им выполнена дис-

¹ Ученого совета.



Рис. 1. Профессор Александр Александрович Максимов, 1910-е годы

сертация на степень доктора медицины «К вопросу о патологической регенерации семенной железы» (1898). «Патологическая регенерация» в терминах тех лет — это развитие рубца на месте повреждения. А.А. Максимов пишет, что его гипотеза состояла в том, что орган, включающий половые клетки с потенциальными возможностями развиваться в целый организм (стволовые клетки — в терминах немецких эмбриологов конца XIX века), должен обладать особыми потенциальными возможностями к восстановлению. Однако результат работы показал, что механическая и термическая травма органа не приводит к гисто- и органотипическому восстановлению; на месте травмы развивается рубцовая ткань [19].

Последовавшая после этого стажировка в Германии, особенно работа во Фрайбурге у Э. Циглера, наметила дальнейшие пути к анализу тканевых преобразований в случае повреждения: модель асептического воспаления и подкожная имплантация инородного тела — камер Циглера позволили в контролируемом эксперименте по часам откалибровать реакцию тканей (впоследствии он это назовет «мезенхимная реакция», 1927) — миграцию сегментоядерных лейкоцитов и выпадение фибрина, появление крупных клеток с бобовидным или овальным ядром, способных к миграции и фагоцитозу, начальные явления формирования соединительнотканых волокон, сосудов и, наконец,

рубцевание [20, 21]. Каждый из этапов этой тканевой динамики представлял собой фактически новую главу гистологии и патологии: откуда и как приходят крупные блуждающие клетки? Откуда появляются фибробласты и не являются ли они следствием дифференцировки блуждающих клеток — полибластов? Каким образом в межклеточном пространстве формируемой ткани появляются волокна? Расшифровке этих вопросов А.А. Максимов и посвятил последующие четверть века своей научной карьеры; и увлек вместе с собой талантливых учеников.

Унитарная модель кроветворения

Первые впечатления о серии экспериментов по асептическому воспалению при подкожной имплантации целлоидиновых тел и камер Циглера были им изложены в объемной статье монографического свойства «О воспалительном новообразовании соединительной ткани» (1902), которая, по сути, открыла молодому исследователю новую дорогу в гистологии, экспериментальной и эволюционной патологии, в изучении гистогенеза соединительной ткани и кроветворения [21].

Вопреки устоявшемуся мнению о том, что А.А. Максимов предложил термин «стволовая клетка» и огласил свою концепцию об этом в 1909 году, впервые в работах Александра Александровича Stanzelle — стволовая клетка — появляется именно в статье о тканевых проявлениях воспаления 1902 года. Тогда он еще не наделил это понятие особым смыслом и скорее просто пользовался термином, который несколько раз уже упоминали старшие немецкие коллеги. Более того, указывается, что впервые гистологи и эмбриологи воспользовались образной аналогией со стволом дерева и кроной деревьев еще в 60-е годы XIX века [22]. А.А. Максимов же в 1902 году пишет: «...закономерная внутренняя архитектура только что описанных молодых более мелких гигантских клеток и структурное своеобразие их составных частей, которые еще полностью представляют во всех подробностях типы исходных полибластов, теряются, соотв., изменяются, и так основательно, что в окончательных гигантских клетках практически больше ничего не остается от описанных, за исключением общей заметной схожести со стволовыми клетками — полибластами» — так им описывалось формирование гигантских многоядерных клеток инородных тел вокруг имплантированных фрагментов целлоидина и камер Циглера.

Менее чем через год после возвращения из командировки в Германию его избирают приват-доцентом по кафедре патологической анатомии alma mater (1902). Еще через год в связи с безвременной смертью соавтора первого в России оригинального руководства по гистологии профессора М.Д. Лавдовского А.А. Максимов в возрасте 29 лет становится заведующим кафедрой гистологии (1903).

Получив возможность самостоятельно формировать научную повестку и привлекать к исследованиям сотрудников, он ставит перед собой невиданную по масштабу задачу: расшифровать природу «полибластов», источник миграции гемопозитических клеток в ткани, оценить процесс кроветворения, как казалось, от менее сложного у низших позвоночных до млекопитающих. Через два десятилетия уже профессор Н.Н. Аничков¹ (1885–1964) скажет об этом периоде: «...он задался целью проследить вообще происхождение и судьбу в организме различных клеток крови и соединительной ткани. Для этого пришлось предпринять поистине колоссальную работу. Пришлось точно описать и расклассифицировать различные клетки нормальной соединительной ткани. Это было им блестяще исполнено. Затем шаг за шагом в течение многих лет изучать развитие у эмбриона различных элементов крови и соединительной ткани, а также кроветворных органов. Одну за одной выпускает Александр Александрович блестящие работы в этом направлении, собирая драгоценные материалы на морских станциях, накопляя горы стекол со своими изумительными сериями срезов, трудился не покладая рук, создавал заново одну из труднейших глав эмбриологии. Здесь все пришлось переделывать. ...Упорным многолетним трудом это все было создано, все препятствия преодолены» [23].

В 1909 году выходит его знаменитая работа, в которой постулируется внешний вид единой клетки — источника всего многообразия форменных элементов крови, которые можно видеть как в соединительной ткани в норме и при воспалении, так и в циркулирующей крови.

¹ Доктор медицинских наук (1912), профессор (1920), академик АН СССР (1939) и АМН СССР (1944), генерал-лейтенант медицинской службы (1944), президент АМН СССР (1946–1953), член девяти зарубежных научных академий и научных обществ; депутат Верховного Совета СССР 2-го созыва, лауреат Сталинской премии 1-й степени (1942).

Ее название говорит само за себя: «Лимфоцит как общая стволовая клетка разнообразных элементов крови в эмбриональном развитии и постфетальной жизни млекопитающих» [24]. Цикл последующих статей «Исследования над кровью и соединительной тканью» (*Untersuchungen über Blut und Bindegewebe*), публикация которого растянулась до 1925 года, как раз и включал анализ филогении и онтогенеза кроветворения. Процесс образования клеток крови и гистогенеза элементов соединительной ткани был рассмотрен у хрящевых рыб, аксолотля, амфибий, млекопитающих различного возраста — плодов и взрослых особей (рис. 2). Однако, несмотря на удивительную работоспособность, охватить все звенья эволюции не удавалось, да и оценить кроветворение не только в норме, но и при ряде патологических состояний без участия в исследованиях учеников и сотрудников было бы невозможно.

Работы было настолько много, что А.А. Максимов щедро делился научными темами с сотрудниками и учениками. На протяжении всей его работы в России, вплоть до 1922 года, рядом с выдающимся ученым трудились высокопрофессиональные помощники и яркие ученики, прославившие отечественную науку в дальнейшем: В.Я. Рубашкин, Н.П. Тишуткин, С.С. Чашин, Ф.Ф. Сысоев, С.П. Алфеева, Н.Н. Аничков, Н.Г. Хлопин, В.М. Данчакова и др., а в США — В. Блюм. Блестящие врачи выполняли свои диссертации в лаборатории А.А. Максимова, среди них и будущий академик и генерал-лейтенант медицинской службы Е.Н. Павловский¹ (1884–1965), который в 1915–1916 гг. даже преподавал гистологию и был представлен А.А. Максимовым на должность приват-доцента; основоположник советской гематологии М.И. Аринкин² (1876–1948), не чуравшийся микроскопа и введший метод стерильной пункции в каче-

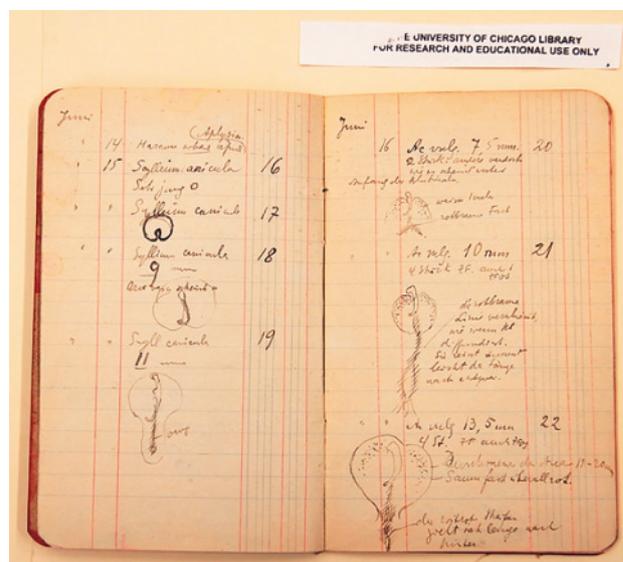


Рис. 2. Записная книжка А.А. Максимова с протоколами эмбриологических наблюдений. Библиотека Чикагского университета

стве рутинного для диагностики онкогематологических заболеваний в повседневную клиническую практику (1927) [25].

Непосредственной расшифровкой некоторых аспектов кроветворения занялась Вера Михайловна Данчакова (1877–1950) — женщина-ученый головокружительной судьбы, работавшая и в России, и в Европе, и в США, и в СССР (рис. 3); первая женщина-профессор, которую зарубежные авторы иногда называют «матерью стволовых клеток» [26], что свидетельствует о том, под каким влиянием А.А. Максимова находилась молодая и темпераментная исследовательница, планируя научную карьеру. В своей диссертации (1907), которая напрямую не связана с гемопоэзом, она, тем не менее, отмечает роль лимфоцитов как исходных клеток для всего кроветворения; А.А. Максимов оппонировал на этой защите [27].

В дальнейшем ей удалось выполнить ряд работ, развивающих унитарную теорию кроветворения. Большая часть из них реализована в филогенетическом ключе и посвящена кроветворению у птиц и рептилий, т.е. тех животных, данных по которым так не хватало Александру Александровичу. По-видимому, ей впервые удалось убедительно продемонстрировать интраваскулярный гемопоэз в мезенхиме стенки желточного мешка у зародышей кур, что закрепило представления о внеэмбриональном

¹ Заслуженный деятель науки РСФСР (1935), академик АН СССР (1939) и АМН СССР (1944), директор Зоологического института АН СССР (1942–1962), генерал-лейтенант медицинской службы (1943), президент Всесоюзного энтомологического общества (1931–1965), президент Географического общества СССР (1952–1964); Герой Социалистического Труда; депутат Верховного Совета СССР 2–4-го созывов.

² Генерал-лейтенант медицинской службы, заслуженный деятель науки РСФСР (1940), академик АМН СССР (1945), лауреат Сталинской премии 2-й степени (1947).

начале кроветворения [28, 29]. Ее библиография свидетельствует, что во втором десятилетии XX века она шла в фарватере исследований своего Учителя: Вера Михайловна получает доказательства унитарного гемоцитопоза у указанных животных [28–31]; одной из первых ставит вопрос о факторах дифференцировки кроветворных клеток, в частности при эритропозе, и приходит к выводу о воздействии внешних по отношению к клетке факторов, регулирующих этот процесс [32]. Значимая часть этих исследований была выполнена за рубежом.

Свои работы она снабжала собственноручно выполненными иллюстрациями, которые по достоверности и качеству приближались к эталонным рисункам А.А. Максимова. Они были столь хороши, что Александр Александрович использовал некоторые из них для иллюстрирования собственной фундаментальной монографии «Соединительная и кроветворная

ткань», изданной фон Меллендорфом (*Bindegewebe und blutbildende Gewebe*, 1927) [33], американского учебника по гистологии.

Однако у современников далеко не всегда ее научная деятельность вызывала благосклонность. В 1930-е годы коммуникационные сложности в Тимирязевском институте, где она трудилась, привели к ее двукратному обращению к И.В. Сталину и вовлечению политбюро ЦК ВКП(б) в решение проблем ее работы в СССР. Вера Михайловна была гражданкой США, что обуславливало особое отношение к ее письмам. И если Н.К. Кольцов дал положительный отзыв о ее работе, то профессор Л.С. Штерн сообщила буквально следующее: «В мировой науке — это не есть имя. Она не человек, который открыл новую страницу в науке. У нее, бесспорно, есть довольно хорошая школа, поскольку она работала с Максимовым, который действительно является в этой области человеком с большим именем. Ее работы были всегда по-

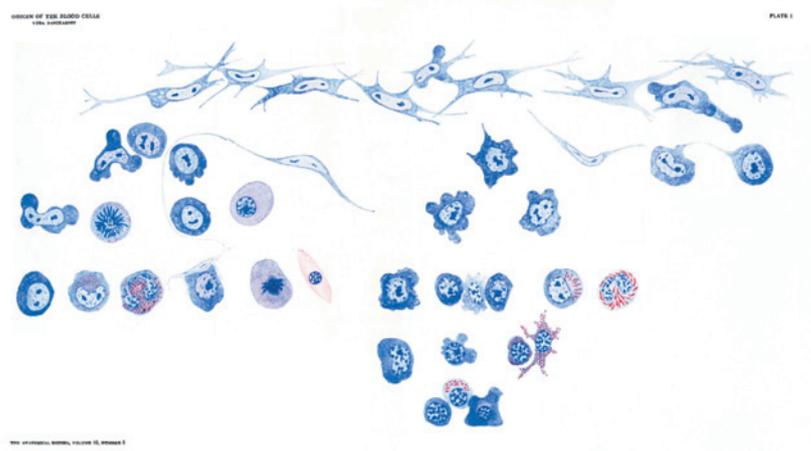
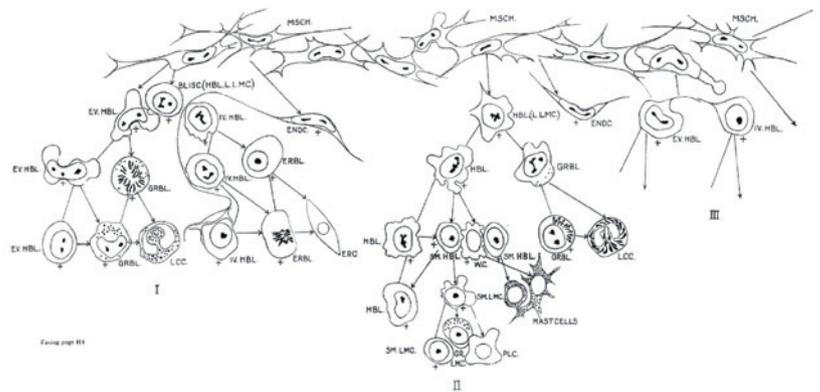


Рис. 3. Вера Михайловна Данчакова, 1908 г. Схема дифференцировки гранулоцитов и агранулоцитов из мезенхимы; иллюстрация к статье *Origin of the Blood Cells. Development of the Haematopoetic Organs and Regeneration of the Blood Cells from the Standpoint of the monophyletic School*, 1915 [31]



Рис. 4. Сергей Владимирович Мясоедов

вторением того, что давал Максимов. Скажем, Максимов открывает новую область. Через полгода-год появляется работа Д., где она повторяет то же самое. Ее работы, я бы сказала, есть работы ученические. Но она работает неплохо. У нее есть техника, есть методика» [34]. Похожую точку зрения высказывали и другие сотрудники: «Научная деятельность самой Данчаковой, по существу, ограничивается 1914 г., когда она работала под руководством видного гистолога проф. Максимова. После 1914 г., то есть за последние 18 лет, ею не было опубликовано крупных работ, хотя и строились широковещательные планы, которые я позволил себе по глубокому убеждению назвать фантастическими». Л.Я. Бляхер [34].

В России важные факты о гемопоэзе добывал еще один ученик А.А. Максимова с университетским биологическим образованием — Сергей Владимирович Мясоедов (рис. 4). Под руководством А.А. Максимова он преподавал на кафедре в Военно-медицинской академии с 1916 по 1924 г. (последние два года уже под началом нового начальника кафедры, также выходца из университета — А.А. Заварзина¹). Важным направлением его исследований был анализ кроветворения и соединительной ткани у хлад-

¹ Директор БионИИ Пермского университета (1921–1922), генерал-майор медицинской службы (1944), директор Института цитологии, гистологии и эмбриологии АН СССР (1944–1945), академик АН СССР (1943) и АМН СССР (1944); лауреат Сталинской премии 2-й степени (1942).

нокровных животных — рыб и птиц, что логично продолжало и дополняло несколько работ максимовского цикла «Untersuchungen über Blut und Bindegewebe». С.В. Мясоедов усложнил, как сейчас бы сказали, дизайн своих исследований и изучил вопрос кроветворения при экспериментальной анемии. Это научное направление, наряду с другими, он развивал и в Томске, после того как в 1924 году по конкурсу был выбран заведовать кафедрой гистологии и эмбриологии в местном университете.

Удивительно, но в это время все еще сохранялись возможности переписки с наставником. В семейном архиве потомков С.В. Мясоедова сохранились письма А.А. Максимова, где он рассказывает об условиях своей работы в Чикаго (рис. 5), обсуждает с учеником дискуссионные вопросы строения кроветворных органов и их функций [35].

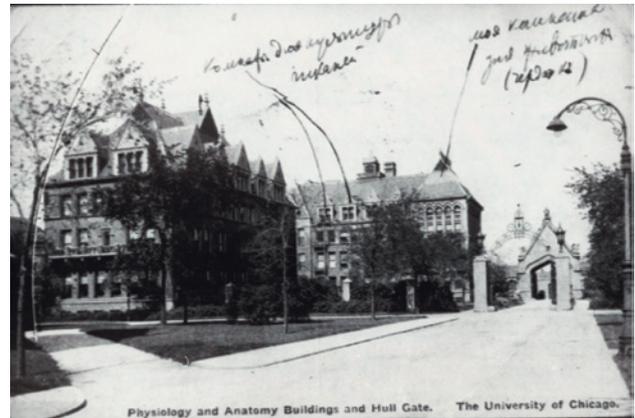


Рис. 5. Открытка А.А. Максимова в адрес С.В. Мясоедова — вид из кампуса Чикагского университета; рукой А.А. Максимова подписано: «Комната для культуры тканей», «моя комната для животных (чердак)». 1923 г. [35]; современное фото — вид на кампус Чикагского университета

Однако сибирская удаленность от столиц не позволила оказаться в безопасности от роковых событий. *«Особенно меня поразила в Томске дешевизна пищевых продуктов и их обилие по сравнению с Ленинградом, откуда я приехал... Это я объяснял тем, что мертвящая рука большевиков не успела еще сюда как следует добраться. Академическая среда была настроена весьма реакционно, приблизительно так же, как и я»* — это выдержка из дела, хранящегося среди архивных документов [36, 37]. В 1936 году С.В. Мясоедов был арестован, а в 1937-м — расстрелян как участник «контрреволюционной фашистско-террористической организации». Реабилитирован в 1956 г.

Важные работы по унитарному кроветворению в лаборатории А.А. Максимова в 1910-е годы успели выполнить гистолог С.С. Чашин, который исследовал взаимоотношения лимфоцитов и «блуждающих клеток в покое» — гистиоцитов (1913), и патологоанатом Ф.Ф. Сысоев. Причем последним и его сотрудниками *«при экспериментальных и патологических условиях было обращено особое внимание на кроветворную роль малодифференцированных оседлых мезенхимных клеток взрослого организма»* [38], что расширяло представления о кроветворении до концепции «мезенхимного резерва» (экстрamedулярное кроветворение).

Общей тенденцией в работе формирующейся научной школы стало то, что идеи ее лидера резко опережали технологические возможности гистологии тех лет. Нередко авторы применяли методы, не способные по современным воззрениям дать объективные ответы. И тем не менее, обгоняя время, ученые сформулировали очень близкие к истине и прошедшие проверку десятилетиями положения. В этой связи методика использования витальных красителей в виде взвесей, давшая начало представлениям о т.н. ретикулоэндотелиальной системе, и метод тканевых культур, разрабатываемый А.А. Максимовым с 1914 года, открыли новые возможности изучения унитарной модели гемоцитопоза. Значимые исследования в отношении культур гемопоэтических тканей развил еще один ученик А.А. Максимова — Н.Г. Хлопин¹ (рис. 6), работавший на кафедре



Рис. 6. Профессор Николай Григорьевич Хлопин, 1930-е годы

в Военно-медицинской академии с 1919 года в качестве препаратора и «выросший в дальнейшем в крупного советского ученого». Путем эксплантации Николай Григорьевич изучал клетки крови и кроветворных органов амфибий и костистых рыб.

Концепция полибласта и ретикулоэндотелиальной системы

«Ваша работа о лимфоцитах, продолженная вашим учеником Блюмом, очень воодушевила меня. Эти работы показали мне, что я задолжал вам публичное признание. Вы наверняка помните, что в 1925 году я говорил, что если вы сможете показать лимфоцитарное происхождение “полибласта”, тогда никакого другого более подходящего названия не может быть придумано. Теперь Вы полностью все это доказали. И теперь мне ничего не остается, как забраться в нору и спрятать там свою заклеенную голову. Однако Вы знаете, что я был в своей критике чистосердечен и открыт, поэтому я чрезвычайно рад признать свою ошибку перед вами и перед научным сообществом», — писал А.А. Максимову крупный ученый Ч. Фут в 1927 году [39]. Современными доказательными методами концепция «полибласта» не получила убедительного под-

¹ Генерал-майор медицинской службы (1944), академик Академии медицинских наук СССР (1945); лауреат Сталинской премии 2-й степени (1947).

тверждения, но она послужила тем мостиком, который связал клеточные преобразования в соединительной ткани при воспалении с костно-мозговым кроветворением.

Полибластом А.А. Максимов называл клетку, напомиравшую малый лимфоцит и высеивающуюся в очаг воспаления из кровеносного русла, а следовательно, образовавшуюся в костном мозге и преобразующуюся в тканях в гистиоцит-макрофаг, лимфоцит, а в ранних работах было предположено, что и в фибробласты; в некоторых источниках — еще и в эозинофилы. Таким образом, «полибласт» — это промежуточный (транзиторный) фенотип полипотентной мезенхимальной клетки [13, 16]. В более осовремененном понимании под полибластом чаще всего подразумевают тканевые макрофаги, осуществляющие свои либо фагоцитарную, либо регуляторную функции. Заметная роль в исследовании значения этих клеток принадлежит одному из самых видных последователей А.А. Максимова — Николаю Николаевичу Аничкову.

Н.Н. Аничков (рис. 7), видя в себе ученика А.А. Максимова (его первая научная работа, выполненная под руководством профессора, — «О применении ацетона в гистологической технике», 1907), не просто увлекся морфологией со студенческой скамьи, но и продолжил изучение клеток гистиоцитарного звена в условиях асептического воспаления при внедрении в миокард инородных тел, что легло в основу его диссертации на степень доктора медицины. Он считал, что тканевые реакции асептического воспаления в начале века были уже в значительной степени изучены, чего нельзя сказать о соединительнотканной строке внутренних органов, в частности сердца [40]. Проблема разветвления в этой структуре воспалительных изменений весьма значима, особенно в доантибиотиковые годы, когда ревматический миокардит становился причиной инвалидизации и смерти большого числа пациентов. Имплантация в миокард инородных тел была своеобразной моделью этого состояния, которая позволила проследить динамику клеточных реакций, в том числе и клеток моноцитарного ростка («активная мезенхима»). Уже после защиты диссертации, в 1912–1914 гг., он отправился на стажировку в ту же лабораторию города Фрайбурга, которой теперь руководил ученик Э. Циглера и товарищ А.А. Максимова — Людвиг

Ашофф. Работа в этом коллективе приблизила Н.Н. Аничкова к принятию и развитию концепции т.н. ретикулоэндотелиальной системы, которую после ревизии второй половины XX века принято называть системой мононуклеарных фагоцитов [40]. Проработка участия клеток этой системы в метаболизме в целом и в тканевых преобразованиях липидов в частности стала важным звеном в понимании патоморфогенеза атеросклероза [41].

Развивая максимовскую концепцию «полибластов» и учение Л. Ашоффа о гистогенетическом и гистофизиологическом единстве фагоцитирующих тканевых элементов, Н.Н. Аничков пишет монографию «Ретикуло-эндотелиальная система» (1930) [41].

В послевоенное время Н.Н. Аничков с коллегами В.Г. Гаршиным и К.Г. Волковой подверг дополнительному изучению заживление травматических повреждений и формирование провизорной структуры — «грануляционной



Рис. 7. Николай Николаевич Аничков, 1910-е гг. [40]

ткани» с последующим образованием рубца. Монография «Морфология заживления ран» (1951), таким образом, стала не только важным рубежным подведением итогов в понимании раневого процесса, но и продолжила традицию экспериментально-гистологического исследования заживления ран, заложенного в отечественной научной практике А.А. Максимовым монографией «О воспалительном новообразовании соединительной ткани» (1902).

Именно Н.Н. Аничков обратился в немецкий «Архив микроскопической анатомии» в 1921 году с идеей издать Festschrift — юбилейный сборник материалов к 25-летию научно-исследовательской работы А.А. Максимова, наглядно демонстрирующий развитие научной гистологической мысли тех лет. Это было сделано спустя 2 года, в том числе идя навстречу желанию «российских коллег опубликовать их исследования, что в России при полном отсутствии возможностей (разрухе) делается почти нереализуемым» [42].



Рис. 8. Американский ученик А.А. Максимова — В. Блюм, 1950-е гг.

Важную часть своих научных работ посвятил анализу происхождения полибластов американский ученик А.А. Максимова, четыре года проработавший с ним вместе, Вильям Блюм (1899–1972). Биографы свидетельствуют, что В. Блюм (рис. 8) описывал первую встречу с А.А. Максимовым как самую вдохновляющую из всего своего опыта общения с учеными. А.А. Максимов потратил 4 часа на анализ препаратов начинающего гистолога, «пропустив свою обязательную полуденную прогулку». Удивившись такому отношению, В. Блюм сам попросил А.А. Максимова быть его наставником в будущих исследованиях, несмотря на то что за русским ученым уже закрепилась слава «невероятно тяжелого руководителя» [43]. А.А. Максимов выделил любознательному американцу свое лабораторное пространство с новым микротомом и возможностью пользоваться микроскопом.

В. Блюму представлялась несомненной связь полибластов и моноцитов, но дифференцировочные потенции и генез последних были не столь очевидными. По результатам своих исследований он заключал, что монобласты, наблюдаемые им при выселении из крови в соединительную ткань, неотличимы от лимфоцитов, что подтверждает концепцию полибласта [44, 45]. Вместе с тем генез моноцитов непосредственно из клеток т.н. ретикулоэндотелия — малодифференцированных стромальных соединительнотканых элементов, выявляемых окраской витальными красителями (элемент ретикулоэндотелиальной системы), оставался предметом дискуссии до тех пор, пока современные экспериментально-гистологические методы не исключили такой возможности.

После ухода А.А. Максимова из жизни именно В. Блюм подготовил мемориальный сборник трудов А.А. Максимова, изданных после 1922 года, и подарил его в 1960 г. Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова [46].

Концепция мезенхимного резерва

Обнаружение мезенхимного происхождения стволовой клетки крови и допущение существования полибласта, составленное на основании данных, полученных методом изучения переходных клеточных форм, привело А.А. Максимова к пониманию того, что стволовые клетки могут мигрировать с током крови, находиться, как бы сейчас сказали, в сосудистых тканевых нишах и выходить за их пределы

в периферические ткани в виде полибластов. Кульминация этой идеи изложена в основополагающей статье «О недифференцированных элементах крови и мезенхимном резерве во взрослом организме» (*Über undifferenzierte Blutzellen und mesenchymale Keimlager im erwachsenen Organismus*, 1926) [47]. Он постулирует не только представительство эмбриональной мезенхимы во взрослом организме, хотя и оговаривается, что этот термин не вполне удачный [21], но и пишет о том, что следует выделять две категории таких клеток: циркулирующий базофильный лимфоцит, дающий начало всем клеткам крови, и клетки, фиксированные в соединительной ткани, преимущественно в периваскулярных нишах, не являющиеся при этом ни гистиоцитом, ни эндотелиоцитом, ни фибробластом и способные к прогрессивным превращениям в тканях, например в ходе воспалительной реакции.

Вопросами морфологии воспаления у беспозвоночных в России активно занимался выдающийся гистолог, будущий академик АМН СССР Алексей Алексеевич Заварзин (рис. 9); несмотря на сложные личные отношения между учеными, на ниве научных разработок они не могли не взаимодополнять данные друг друга, тем более что после отъезда А.А. Максимова в Чикаго в 1922 г. Алексей Алексеевич был назначен начальником кафедры гистологии Военно-медицинской академии [17].

В целом, подвергая ревизии концепцию А.А. Максимова о мезенхимном резерве, А.А. Заварзин наделяет фибробластические клетки, находящиеся в соединительной ткани, иерархией — от наименее дифференцированной к терминально дифференцированной форме [48]. Он разделяет все клетки соединительной ткани (внутренней среды) на два типа: продуценты основного вещества (фибробласты) и клетки гемопоэтического ряда, при этом сосредотачиваясь на первых. А.А. Заварзин уточняет, что концепция мезенхимного резерва не может ограничиваться только тем, что среди фибробластов взрослой соединительной ткани встречаются единичные клетки с потенциями мезенхимы, правда, несколько отличными от истинного эмбрионального зачатка (не Mes0, а Mes1... Mesn). Он идет дальше и предлагает концепцию существования трех выстроенных по линии дифференцировки категорий клеток: камбиальные (рассредоточенный камбий) клетки соединительной ткани — способ-



Рис. 9. Профессор Алексей Алексеевич Заварзин, конец 1920-х гг.

ные к размножению, но не способные к синтезу основного вещества; фибробласты — постепенно утрачивающие возможности митотического деления, но сохраняющие возможности амитоза и характеризующиеся максимально развитым синтезом; наконец, -циты — терминально развитые клеточные элементы. Предложенная концепция во второй половине века получит название «дифферон» или «гистогенетический ряд». Он заключает, что «при таком подходе ...наличие камбиального, т.е. мезенхимного в смысле Максимова, резерва во взрослом организме становится несомненным фактом» [48]. Принимая эту идею, Н.Г. Хлопин, изучая методом тканевых культур соединительную ткань представителей разных классов позвоночных, включая человека, обосновал наличие в соединительной ткани клеток фибробластического ряда, отличающихся друг от друга разным уровнем дифференцировки: в начале этого ряда стоят малодифференцированные клетки (ретикулярные — в терминах тех лет), в конце — высокоспециализированные, «утрачивающие свою жизнеспособность».

Николай Григорьевич Хлопин, близкий ученик А.А. Максимова, в большей степени сосредоточившийся на освоении метода тканевых культур и получивший за эти работы золотую медаль

Конференции Академии, позднее предостерегал от путаницы понятий при использовании термина «мезенхима взрослого организма», или «мезенхимный резерв», и истинной мезенхимы [38]. Аналогичная критика звучала и в более позднее время, однако она не опровергала суть самой концепции, а относилась исключительно к не вполне удачному словообразованию [49].

По современным представлениям «мезенхимный резерв» А.А. Максимова не равнозначен понятию совокупности мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК), и с их отождествлением [15] сложно согласиться. По сути, современная трактовка ММСК ближе к модели, предложенной и обсужденной А.А. Заварзинным. Несмотря на это, следует подчеркнуть, что в начале прошлого века А.А. Максимов в гистологическом эксперименте, применив метод переходных форм на серийных срезах, увидел фундаментальные закономерности, что позволило сформулировать положения, которые удалось доказательно подтвердить лишь во второй половине века. Полученные данные послужили важным элементом наших представлений о цитофизиологии тканей внутренней среды и стали базой для разработки широкого ряда клеточных технологий.

Заключение

Безусловно, в кратком очерке невозможно перечислить всех учеников А.А. Максимова, плодотворно развивавших его идеи как в рамках биологии развития и нормальной гистологии, так и естественным образом применяя выявленные закономерности для оценки патолого-анатомических изменений. Экспериментально-гистологический метод позволил вскрыть целый ряд важных закономерностей, легших в основу нескольких плодотворных концепций биологии

крови и соединительной ткани: «...по почину Максимова, широко и планомерно применялся экспериментальный метод, имеющий выдающееся значение для решения основных общебиологических вопросов гистологии и одновременно связывающий теснейшим образом гистологию с патологией» [50].

Отрыв от Родины в 1922 г. тяжело сказался на исторической памяти об А.А. Максимова. И если до Великой Отечественной войны его ученики относительно свободно цитировали Учителя и развивали его мысли, то затем ситуация изменилась. Культивировались фантазии об обстоятельствах безвременной кончины Александра Александровича: «...Максимов не нашел условий работы ни в США, ни в Германии и покончил с собою, впрыснув себе морфий» (1974) [51].

В статье 1984 года [9] А.А. Клишов аргументированно опровергнул привносимое мнение о «бесплодности» А.А. Максимова как ученого [52]; ученики А.А. Клишова, в свою очередь, восстанавливали справедливость в отношении солидного чикагского наследия выдающегося русско-го исследователя и врача [10, 12].

Яркая научная жизнь Александра Александровича Максимова не оборвалась глухо в декабре 1928 году в Чикаго; она продолжилась в научных работах и открытиях его, может быть, менее знаменитых учеников, составивших вместе с ним золотой фонд отечественной морфологии: «Современное учение о соединительной ткани и крови представляет собой чрезвычайно стройное и цельное здание, возведенное руками бесчисленного количества исследователей и принявшее свой законченный вид в значительной степени благодаря экспериментальным работам Максимова и его статьям обобщающего характера» [53].

Литература

1. Деев Р.В. Научное наследие Александра Максимова и современность. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2005;1(1):4–8.
2. Новик А.А., Ионова Т.И., Городокин Г. и др. Научное наследие А.А. Максимова: сто лет спустя. Клеточная терапия и трансплантология. 2009;1(3)/1(4):31–34.
3. Деев Р.В. Профессор Александр Александрович Максимов: эволюция идей. Гены и клетки. 2014;9(2):6–14.
4. Чайлахян Р.К., Лалыкина К.С. Спонтанная и индуцированная дифференцировка костной ткани в популяции фибробластоподобных клеток, полученных из длительных монослойных культур костного мозга и селезенки. Доклады АН СССР. 1969;187(2):473–479.

5. Афанасьев Б.В., Эльстнер Е., Цандер А.Р. А.Я. Фриденштейн, основатель концепции мезенхимальной стволовой клетки. Клеточная терапия и трансплантология. 2009;1(3)/1(4):35–38.
6. Zander A.R. Mesenchymal stroma cells (MSCs) in Regenerative Medicine: an update. Cell therapy and Transplantology. 2019;8(43):15–18.
7. Triffitt J.T. A brief history of the development of stromal stem cells (stem cells of the skeleton). Biomater. Transpl. 2021;2(4):287–293.
8. Мирский М.Б. А.А. Максимов (к 100-летию со дня рождения). Пробл. гематол. 1975;20(6):53–56.
9. Клишов А.А. Научная деятельность профессора А.А. Максимова в Военно-медицинской академии. Арх. анат. 1988;95(12):86–89.
10. Данилов Р.К., Деев Р.В., Гололобов В.Г. Творческое наследие профессора А.А. Максимова (из чикагского периода научной деятельности). Морфология. 2000;117(2):96–99.
11. Konstantinov I.E. In Search of Alexander A. Maximow: The man Behind the Unitarian theory of hematopoiesis. Persp. in Biol. and Med. 2000;43(2):269–276.
12. Данилов Р.К., Гололобов В.Г., Деев Р.В. Александр Александрович Максимов — выдающийся отечественный гистолог (жизни и научное наследие). Вестник Российской Военно-медицинской академии. 2001;2(6):54–60.
13. Шубич М.Г. На пути к открытию стволовых клеток костного мозга. Морфология. 2001;119(1):94–95.
14. Аничков Н.М., Константинов И.Э. А.А. Максимов: К 100-летию унитарной теории кроветворения. Архив патологии. 2007;69(5):3–7.
15. Мяделец О.Д., Кичигина Т.Н., Грушин В.Н. и др. А.А. Максимов и его революционное учение о мезенхимных стволовых клетках. Вестник Витебского государственного медицинского университета. 2007;6(3):1–12.
16. Шубич М.Г., Ломтатидзе Л.В. Александр Максимов: от трудов по патологии к созданию учения о стволовых клетках. Архив патологии. 2010;2:43–47.
17. История кафедры гистологии с курсом эмбриологии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова (1868-2018). Под ред. И.А. Одинцовой. СПб.: ВМедА; 2018. 232 с.
18. Оппель В.А. Мое жизнеописание. СПб.: Издательский дом САБМАПО; 2002. 448 с.
19. Максимов А.А. К вопросу о патологической регенерации семенной железы. Диссертация на степень доктора медицины. СПб.: Типография кн. В.П. Мещерского; 1898.
20. Maximow A.A. Experimentelle untersuchungen uber die entzündliche Neubildung von Bindegewebe. Beitr. path. Anat. 1902;33(Suppl.5):1–262.
21. Maximow A.A. Morphology of the mesenchymal reactions. Arch. Pathol. Lab. Med. 1927;4(4):557–606.
22. Ramalho-Santos M., Willenbring H. On the origin of the term «stem cell». Cell Stem Cell. 2007;7(1):35–38.
23. Аничков Н.Н. Стенограмма выступления на заседании Ученого совета Военно-медицинской академии. 4.03.1922 г.
24. Maximow A.A. Der Lymphozyt als gemeinsame Stammzelle der verschiedenen Blutelemente in der embryonalen Entwicklung und im postfetalen Leben der Säugetiere. Folia Haematologica. 1909;8:125–134.
25. Бондарчук С.В., Ковалев А.В., Богданов А.Н. Михаил Иннокентьевич Аринкин — основоположник методики прижизненного исследования клеточного состава костного мозга: к 90-летию стеральной пункции. Гены и клетки. 2016;11(3):8–13.
26. Staff R.S. Vera Danchakoff, Stem Cell Biologist. Rediscover STEAM. 19.12.2020; <https://medium.com/rediscover-steam/vera-danchakoff-stem-cell-biologist-a19c57470a1d>
27. Русакова С.Э., Одинцова И.А., Слуцкая Д.Р. Эволюционно-гистологические исследования доктора медицины Веры Михайловны Данчаковой. Гены и клетки. 2020;15(3):8–13.
28. Danchakoff V. Untersuchungen ber die Entwicklung des Blutes und Bindegewebes bei den Vogeln. I. Die erste Entstehung der Blutzellen beim Huchnembryo und der Dottersack als blutbildendes Organ. Anat. Hefte. 1908;37:471–589.

29. Danchakoff V. The position of the respiratory vascular net in the allantois of the chick. *Am. J. Anat.* 1917;21(3):407–419.
30. Danchakoff V. Die Entwicklung der embryonalen Blutbildung bei Reptilien. *Verhandl. Anat. Ges., Anat. Anz.* 1910;37:70.
31. Danchakoff V. Origin of the blood cell. Development of the hematopoietic organs and regeneration of the blood cell from the standpoint of the monophyletic school. *Anat. Rec.* 1916;10(5):397–416.
32. Danchakoff V. Cellpotentialities and differential factors, considered in relation to erythropoiesis. *Am. J. Anat.* 1918;24(1):1–31.
33. Maximow A.A. Bindegewebe und blutbildendes Gewebe. *Handb. d. mikr. Anat. d. Menschen.* Herausgegeben von W. v. Mollendorf. Bd. I/II, Berlin; 1927.
34. Фандо Р.А. «Дело профессора В. М. Данчаковой», или Непростые годы русской американки в Стране Советов. *Вопросы естествознания и техники.* 2020;41(2):244–279.
35. Рыжов А.И., Мендрин Г.И., Логвинов С.В. Сергей Владимирович Мясоедов. *Бюллетень сибирской медицины.* 2006;3:132–135.
36. Антонова В. В правде нет страха. *Красная звезда.* 28–29.07.1990.
37. Некрылов С.А., Фоминых С.Ф., Логвинов С.В. В горниле репрессий: жизнь и судьба профессора Сергея Владимировича Мясоедова (1889–1937). *Сибирский медицинский журнал.* 2012;27(4):93–95.
38. Хлопин Н.Г. Мезенхима. В: *Большая медицинская энциклопедия.* Изд-е 2-е (1960). Т. 17. С. 882–887.
39. Scientific papers and drawings of Alexander A. Maximow. Department of Special Collections. The Joseph Library, The University of Chicago.
40. Иванов Д.О., Насыров Р.А., Аничков Н.М., Калинина Е.Ю. Выдающийся патолог России Н.Н. Аничков. СПб.: ФГБОУ ВО СПбГПМУ Минздрава России; 2022. 256 с.
41. Аничков Н.Н. Учение о ретикуло-эндотелиальной системе. М.–Л.; 1930. 336 с.
42. Festschrift Alexander Maximow zur Feier seines 25jährigen Dienstjubiläums an der Medizinischen Akademie zu St. Petersburg gewidmet. *Archiv für mikroskopische Anatomie,* 1923; 97.
43. Singer R. William Bloom. *Biographical Memoirs.* 62; 17–29.
44. Bloom W. Origin of the Blood Monocyte. *Proceedings of the Society for Experimental Biol. Med.* 1928;25(4):244–246.
45. Bloom W. Über die Monocytenfrage. *Klin. Wochenschrift.* 1929;11:481–483.
46. Bloom W. Memorial volume to Alexander Maximow. 1934.
47. Maximow A.A. Über undifferenzierte Blutzellen und mesenchymale Keimlager im erwachsenen Organismus. *Klin. Wochensch.* 1926;47:2193–2228.
48. Заварзин А.А. О номенклатуре клеточных форм фибробластического ряда в связи с вопросом о ревизии теории мезенхимного резерва. В: *Сборник посвященный 25-летию научной деятельности профессора Николая Николаевича Аничкова.* Москва–Ленинград: Издательство ВИЭМ; 1935. С. 101–111.
49. Кнорре А.Г., Михайлов В.П. Мезенхима. В: *Большая медицинская энциклопедия,* Изд-е 3-е. (1980). Т. 14. стр. 477–478.
50. Хлопин Н.Г. Тридцать лет советской гистологии. *Успехи современной биологии.* 1947;25,2(5):229–246.
51. Чистович А.Н. Рукопись записок Алексея Николаевича Чистовича. Архив кафедры гистологии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова.
52. Шавлаев З.Ф. Развитие сравнительного и экспериментального методов на кафедре гистологии Военно-медицинской академии. Л.: Изд-во ВМА; 1972. 100 с.
53. Khlopin N.G. *Общебиологические и экспериментальные основы гистологии.* Изд-во АН СССР; 1946. 492 с.

References

1. Deev R.V. The scientific heritage of Alexander Maksimov and modernity. *Cell transplantology and tissue engineering*. 2005;1(1):4–8.
2. Novik A.A., Ionova T.I., Gorodokin G. et al. Scientific heritage of A.A. Maksimova: a hundred years later. *Cellular therapy and transplantology*. 2009;1(3)/1(4):31–34
3. Deev R.V. Professor Alexander Aleksandrovich Maksimov: evolution of ideas. *Genes and cells*. 2014;9(2):6–14.
4. Chailakhyan R.K., Lalykina K.S. Spontaneous and induced differentiation of bone tissue in a population of fibroblast-like cells obtained from long-term monolayer cultures of bone marrow and spleen. *Doklady AN USSR*. 1969;187(2):473–479.
5. Afanasyev B.V., Elstner E., Zander A.R. A. J. Friedenstein, founder of the mesenchymal stem cell concept. *Cellular therapy and transplantology*. 2009;1(3)/1(4):35–38.
6. Zander A.R. Mesenchymal stroma cells (MSCs) in Regenerative Medicine: an update. *Cellular therapy and Transplantology*. 2019;8(43):15–18.
7. Triffitt J.T. A brief history of the development of stromal stem cells (stem cells of the skeleton). *Biomater. Transpl.* 2021;2(4):287–293.
8. Mirsky M.B. A.A. Maksimov (on the 100th anniversary of birth). *Problemy gematologii*. 1975;20(6):53–56.
9. Klishov A.A. Scientific activity of Professor A.A. Maksimov at the Military Medical Academy. *Arkhiv anatomii*. 1988;95(12):86–89.
10. Danilov R.K., Deev R.V., Gololobov V.G. The creative heritage of Professor A.A. Maksimov (from the Chicago period of scientific activity). *Morphologiya*. 2000;117(2):96–99.
11. Konstantinov I.E. In Search of Alexander A. Maximow: The man Behind the Unitarian theory of hematopoiesis. *Persp. in Biol. and Med.* 2000;43(2):269–276.
12. Danilov R.K., Gololobov V.G., Deev R.V. Alexander Alexandrovich Maksimov is an outstanding Russian histologist (life and scientific heritage). *Bulletin of the Russian Military Medical Academy*. 2001;2(6):54–60.
13. Shubich M.G. Towards the discovery of bone marrow stem cells. *Morphologiya*. 2001;119(1):94–95.
14. Anichkov N.M., Konstantinov I.E. A.A. Maksimov: To the 100th anniversary of the unitary theory of hematopoiesis. *Arkhiv patologii*. 2007;69(5):3–7.
15. Myadelets O.D., Kichigina T.N., Grushin V.N. and others A.A. Maksimov and his revolutionary doctrine of mesenchymal stem cells. *Bulletin of Vitebsk State Medical University*. 2007;6(3):1–12.
16. Shubich M.G., Lomtatidze L.V. Alexander Maksimov: from works on pathology to the creation of the doctrine of stem cells. *Arkhiv patologii*. 2010;2:43–47.
17. History of the Department of Histology with the Course of Embryology of the Military Medical Academy named after S.M. Kirov (1868–2018). Ed. I.A. Odintsova. St. Petersburg: VMedA; 2018. 232 s.
18. Oppel V.A. My biography. SPb.: Publishing house SABMAPO; 2002. 448 s.
19. Maksimov A.A. On the issue of pathological regeneration of the seminal gland. Dissertation for the degree of Doctor of Medicine. SPb.: Printing house book. V.P. Meshchersky; 1898.
20. Maximow A.A. Experimentelle untersuchungen uber die entzündliche Neubildung von Bindegewebe. *Beitr. path. Anat.* 1902;33(Suppl.5):1–262.
21. Maximow A.A. Morphology of the mesenchymal reactions. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1927;4(4):557–606.
22. Ramalho-Santos M., Willenbring H. On the origin of the term «stem cell». *Cell Stem Cell*. 2007;7(1):35–38.
23. Anichkov N.N. Transcript of speech at a meeting of the Academic Council of the Military Medical Academy. 4.03.1922.
24. Maximow A.A. Der Lymphozyt als gemeinsame Stammzelle der verschiedenen Blutelemente in der embryonalen Entwicklung und im postfetalen Leben der Säugetiere. *Folia Haematologica*. 1909;8:125–134.

25. Bondarchuk S.V., Kovalev A.V., Bogdanov A.N. Mikhail Innokentyevich Arinkin is the founder of the method of intravital study of the cellular composition of the bone marrow: on the 90th anniversary of sternal puncture. *Genes and cells*. 2016;11(3):8–13.
26. Staff R.S. Vera Danchakoff, Stem Cell Biologist. *Rediscover STEAM*. 19.12.2020; <https://medium.com/rediscover-steam/vera-danchakoff-stem-cell-biologist-a19c57470a1d>
27. Rusakova S.E., Odintsova I.A., Slutskaya D.R. Evolutionary-histological studies of doctor of medicine Vera Danchakoff. *Genes and cells*. 2020;15(3):8–13.
28. Danchakoff V. Untersuchungen ber die Entwicklung des Blutes und Bindegewebes bei den Vogeln. I. Die erste Entstehung der Blutzellen beim Huchnembryo und der Dottersack als blutbildendes Organ. *Anat. Hefte*. 1908;37:471–589.
29. Danchakoff V. The position of the respiratory vascular net in the allantois of the chick. *Am. J. Anat.* 1917;21(3):407–419.
30. Danchakoff V. Die Entwicklung der embryonalen Blutbildung bei Reptilien. *Verhandl. Anat. Ges., Anat. Anz.* 1910;37:70.
31. Danchakoff V. Origin of the blood cell. Development of the hematopoietic organs and regeneration of the blood cell from the standpoint of the monophyletic school. *Anat. Rec.* 1916;10(5):397–416.
32. Danchakoff V. Cellpotentialities and differential factors, considered in relation to erythropoiesis. *Am. J. Anat.* 1918;24(1):1–31.
33. Maximow A.A. Bindegewebe und blutbildendes Gewebe. *Handb. d. mikr. Anat. d. Menschen*. Herausgegeben von W. v. Mollendorf. Bd. I/II, Berlin; 1927.
34. Fando R.A. “The Case of Professor V.M. Danchakova,” or the difficult years of a Russian American in the Land of the Soviets. *Questions of natural science and technology*. 2020;41(2): 244–279.
35. Ryzhov A.I., Mendrina G.I., Logvinov S.V. Sergey Vladimirovich Myasoedov. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2006;3:132–135.
36. Antonova V. There is no fear in truth. The red star. 28-29.07.1990.
37. Nekrylov S.A., Fominykh S.F., Logvinov S.V. In the crucible of repression: the life and fate of Professor Sergei Vladimirovich Myasoedov (1889-1937). *Siberian Medical Journal*. 2012;27(4):93–95.
38. Khlopin N.G. Mesenchyme. In: *Big Medical Encyclopedia*. 2nd edition. (1960). V. 17. pp. 882–887.
39. Scientific papers and drawings of Alexander A. Maximow. Department of Special Collections. The Joseph Library, The University of Chicago.
40. Ivanov D.O., Nasyrov R.A., Anichkov N.M., Kalinina E.Yu. Outstanding pathologist of Russia N.N. Anichkov. St. Petersburg: Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education St. Petersburg State Pediatric Medical University of the Ministry of Health of Russia; 2022. 256 p.
41. Anichkov N.N. The doctrine of the reticuloendothelial system. Moscow–Leningrad; 1930. 336 p.
42. Festschrift Alexander Maximow zur Feier seines 25jährigen Dienstjubiläums an der Medizinischen Akademie zu St. Petersburg gewidmet. *Archiv für mikroskopische Anatomie*, 1923; 97.
43. Singer R. William Bloom. *Biographical Memoirs*. 62; 17–29.
44. Bloom W. Origin of the Blood Monocyte. *Proceedings of the Society for Experimental Biol. Med.* 1928;25(4):244–246.
45. Bloom W. Über die Monocytenfrage. *Klin. Wochenschrift*. 1929;11:481–483.
46. Bloom W. Memorial volume to Alexander Maximow. 1934.
47. Maximow A.A. Über undifferenzierte Blutzellen und mesenchymale Keimlager im erwachsenen Organismus. *Klin. Wochensch.* 1926;47:2193–2228.
48. Zavarzin A.A. On the nomenclature of cellular forms of the fibroblastic series in connection with the question of revising the theory of mesenchymal reserve. In: *Collection dedicated to the 25th anniversary of the scientific activity of Professor Nikolai Nikolaevich Anichkov*. Moscow–Leningrad: Publishing house VIEM; 1935. Pp. 101–111.

49. Knorre A.G., Mikhailov V.P. Mesenchyme. In: Great Medical Encyclopedia, 3rd edition. (1980). Т. 14. pp. 477–478.
50. Khlopin N.G. Thirty years of Soviet histology. *Advances in modern biology*. 1947;25.2(5): 229–246.
51. Chistovich A.N. Manuscript of notes by Alexei Nikolaevich Chistovich. Archive of the Department of Histology of the Military Medical Academy named after S.M. Kirov.
52. Shavlaev Z.F. Development of comparative and experimental methods at the Department of Histology of the Military Medical Academy. L.: VMA Publishing House; 1972. 100 s.
53. Khlopin N.G. General biological and experimental foundations of histology. Publishing House of the USSR Academy of Sciences; 1946. 492 s.

Об авторе

Деев Роман Вадимович — к.м.н., доцент, заведующий кафедрой патологической анатомии ФГБОУ ВО «СЗГМУ им. И.И. Мечникова» Минздрава России.

Author

Roman V. Deev — MD, PhD, Associate Professor, Head of the Department of Pathological Anatomy of Mechnikov North-Western State Medical University, S.-Petersburg.

Увеличение экспрессии генов *HOXA10* и *HOXA11* в стромальных клетках эндометрия при гипоксии зависит от активности системы деметилирования ДНК

М.А. Кулебякина¹, А.С. Смирнова¹, В.С. Попов^{1,2}, Р.Ю. Еремичев², П.И. Макаревич^{1,2}

¹ Факультет фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», 119192, г. Москва, Ленинские горы, 1, Россия

² Институт регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного центра ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», 119192, г. Москва, Ленинские горы, 1, Россия

Адрес для корреспонденции: coolebyakina@gmail.com

Аннотация

Целью работы было проверить, изменяется ли уровень экспрессии генов *Hoxa10* и *Hoxa11*, специфичных для эндометрия, в матке мыши после родового повреждения эндометрия, а также предположить механизм, по которому экспрессия данных генов может возрастать в стромальных клетках эндометрия в результате повреждения.

Методы. В исследовании использовали молодых (возрастом 8–10 недель) мышей дикого типа инбредной линии C57BL/6; экспрессию генов *Hoxa10* и *Hoxa11* в тканях матки оценивали до родов, а также спустя 4 и 24 ч после родов. Гипоксию моделировали *in vitro* в первичных культурах стромальных клеток эндометрия человека добавлением 200 мМ CoCl_2 . Ингибирование системы активного деметилирования ДНК проводили с использованием ингибитора Vobcat339. Оценку уровня экспрессии генов *Hoxa10* (*HOXA10*) и *Hoxa11* (*HOXA11*) проводили методом ПЦР в реальном времени, сопряженной с обратной транскрипцией, а также методом вестерн-блоттинга.

Результаты. В течение первых суток после родов в тканях матки мыши возрастает экспрессия генов *Hoxa10* и *Hoxa11*. В стромальных клетках человеческого эндометрия при моделировании гипоксии возрастает экспрессия генов *HOXA10* и *HOXA11*, а ингибирование системы активного деметилирования ДНК препятствует возрастанию экспрессии данных генов в модели гипоксии.

Заключение. Впервые получены данные о том, что экспрессия генов *Hoxa10* и *Hoxa11* возрастает в матке мыши после повреждения эндометрия в модели *in vivo*. Кроме того, в экспериментах *in vitro* показано, что апрегуляция данных генов в результате повреждения может обуславливаться изменением их экспрессии в стромальных клетках эндометрия, которая, в свою очередь, может быть вызвана гипоксией и вызываемыми ей эпигенетическими изменениями, связанными с работой системы активного деметилирования ДНК.

Ключевые слова: эндометрий, гомеозисные гены, эпигенетика, регенерация, гипоксия

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Кулебякина М.А., Смирнова А.С., Попов В.С., Еремичев Р.Ю., Макаревич П.И. Увеличение экспрессии генов *HOXA10* и *HOXA11* в стромальных клетках эндометрия при гипоксии зависит от активности системы деметилирования ДНК. *Регенерация органов и тканей*. 2023;1(1):42–52. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2023-1-42-52>

Поступила 20.04.2023

Обработана 29.06.2023

Принята к публикации 25.07.2023

Increased expression of *HOXA10* u *HOXA11* in endometrial stroma cells under hypoxia depends on activity of the DNA demethylation system

Maria A. Kulebyakina¹, Anastasia S. Smirnova¹, Vladimir S. Popov^{1,2}, Roman Yu. Eremichev², Pavel I. Makarevich^{1,2}

¹ Faculty of Medicine, M.V. Lomonosov Moscow State University, 119192, Moscow, Leninskiye Gory, 1, Russia

² Institute for Regenerative Medicine, M.V. Lomonosov Moscow State University, 119192, Moscow, Leninskiye Gory, 1, Russia

Correspondence address: coolebyakina@gmail.com

Abstract

Aim. The work was aimed to test whether the expression levels of endometrial-specific *Hoxa10* and *Hoxa11* genes in the mouse uterus change after endometrial injury caused by giving birth, and to suggest a mechanism by which these genes can be upregulated in endometrial stromal cells after injury.

Methods. The study was performed using young (8–10 weeks old) wild-type mice of the C57BL6 line; *Hoxa10* and *Hoxa11* gene expression in uterine tissues was assessed before delivery, as well as 4 hours and 24 hours after delivery were also used in the work. Hypoxia was modeled *in vitro* using human endometrial stromal cells by adding 200 mM CoCl₂. Inhibition of DNA active demethylation system was performed using the Bobcat339 inhibitor. The level of expression of the *Hoxa10* (*HOXA10*) and *Hoxa11* (*HOXA11*) genes was assessed by real-time PCR coupled with reverse transcription, as well as by Western blotting.

Results. During the first day after birth, both *Hoxa10* and *Hoxa11* gene expression increases in mouse uterine tissues. In the stromal cells of the human endometrium, during hypoxia modeling, *HOXA10* and *HOXA11* gene expression increases, and inhibition of the active DNA demethylation system prevents noted increase in the hypoxia model.

Conclusion. We have shown for the first time that the *Hoxa10* and *Hoxa11* gene expression increases *in vivo* in the mouse uterus after endometrial damage, and also demonstrated in *in vitro* experiments that upregulation of these genes in endometrial stromal cells after damage can be caused by hypoxia-induced epigenetic changes associated with the operation of the active DNA demethylation system.

Keywords: endometrium, homeotic genes, epigenetics, regeneration, hypoxia

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Kulebyakina M.A., Smirnova A.S., Popov V.S., Eremichev R.Yu., Makarevich P.I. Increased expression of *HOXA10* u *HOXA11* in endometrial stroma cells under hypoxia depends on activity of the DNA demethylation system. *Tissue and organ regeneration*. 2023;1(1):42–52. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2023-1-42-52>

Received 20.04.2023

Revised 29.06.2023

Accepted 25.07.2023

Список сокращений:

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота

ДСН — додецилсульфат натрия

ОТ-ПЦР — полимеразная цепная реакция в реальном времени, совмещенная с обратной транскрипцией

СК — стромальные клетки

ТБСТ — трис-буферный раствор с добавлением детергента Твин 20 (tris-buffered saline tween-20)

Трис (TRIS) — трис(гидрохсиметил)аминометан (tris(hydroxymethyl)aminomethane)

ПВДФ — поливинилиденфторид

ПМСФ — фенилметилсульфонилфторид

BSA (БСА) — бычий сывороточный альбумин (bovine serum albumin)

DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium) — культуральная среда Игла, модифицированная Дульбекко

HIF — фактор, индуцируемый гипоксией (hypoxia inducible factor)

HOX — *HOX*-гены человека*Hox* — *Hox*-гены мыши β -МЭ — β -меркаптоэтанол**Введение**

Эндометрий — ткань, обладающая способностью к многократной регенерации после повреждения в ходе менструального цикла, родов или хирургических вмешательств. Заживление эндометрия требует строгой последовательности таких событий, как дифференцировка стромальных и эпителиальных прогениторов, миграция клеток, прорастание и стабилизация сосудистых структур, накопление межклеточного матрикса и его ремоделирование. Все перечисленные процессы регулируются и координируются стромальными клетками, которые, таким образом, являются ключевыми участниками процесса регенерации эндометрия.

Ранее нами была выдвинута гипотеза о том, что для успешной регенерации важна активность тканеспецифичных генов *Hox*, а конкретно в эндометрии — *Hoxa10* и *Hoxa11* [1]. Семейство *Hox* — группа транскрипционных факторов, регулирующих в эмбриогенезе формирование паттерна тела многоклеточных животных. В ходе эмбрионального развития экспрессия генов *Hox* активируется при сегментации мезодермы и строго соответствует пространственному расположению данной части тела [2–4]. Аналогичные эмбриональным тканеспецифические паттерны экспрессии генов *Hox* сохраняются на протяжении всей жизни в клетках взрослого организма [5–7], однако функциональная роль постнатальной экспрессии генов *Hox* в стро-

мальных клетках пока остается неясной. Долгое время считалось, что роль ее сводится к сохранению «позиционной» информации в клетках той или иной ткани или части тела. Тем не менее в последние годы накапливаются данные о важности тканеспецифичной экспрессии генов *Hox* в постнатальный период для успешного заживления и регенерации тканей [8–11].

Известно, что у человека и мыши экспрессия генов *HOXA10* и *HOXA11* (*Hoxa10* и *Hoxa11* у мыши) сохраняется в стромальных клетках эндометрия и регулируется стероидными гормонами (эстрадиолом и прогестероном) в течение менструального/эстрального цикла [12]. Тем не менее данных относительно изменения экспрессии генов *Hox* в эндометрии, вызванного повреждением, на данный момент нет. В настоящей работе было проверено, изменяется ли экспрессия генов *Hoxa10* и *Hoxa11* в матке мыши *in vivo* (на модели родового повреждения эндометрия) и *in vitro* в стромальных клетках эндометрия человека в модели гипоксии, а также показано существование эпигенетического механизма, регулирующего экспрессию генов *HOX* в стромальных клетках эндометрия при повреждении.

Материалы и методы исследования**Работа с животными**

В работе использованы мыши дикого типа инбредной линии C57BL6. При проведении экспериментов соблюдали «Правила проведения работ

с использованием экспериментальных животных», приказ Министерства среднего и высшего специального образования СССР № 742 от 13.11.1984 и нормы, утвержденные Комиссией по биоэтике факультета фундаментальной медицины МГУ им. М. В. Ломоносова. В работе использовали самок в возрасте 8–10 недель. Датируемую беременность получали, ссаживая двух самок с одним самцом на трое суток; самок, имеющих вагинальные пробки, отсаживали и судили о развитии беременности у них по прибавке в весе в течение недели. Далее на разных сроках после родов, а также до родов самок умерщвляли введением летальной дозы анестезии и забирали у них матки. Экспериментальной точке «до родов» соответствует начало 19 суток с момента обнаружения у самки вагинальной пробки (предполагаемая дата родов).

Ведение клеточных культур

Стромальные клетки (СК) эндометрия выделяли из менструального отделяемого молодых (20–35 лет) здоровых доноров методом центрифугирования в градиенте плотности (пример протокола приведен в работе [13]). В работе использовали клетки первичной культуры стромальных клеток эндометрия человека не позднее пятого пассажа. Клетки культивировали в CO₂-инкубаторе при 37 °C и 7% CO₂, в качестве среды культивирования использовали DMEM Low glucose (Thermo Fisher Scientific, США) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (Cytiva, США), 1% раствора глутамина (GlutaMax, Thermo Fischer Scientific, США) и 1% коммерческого раствора пенициллина и стрептомицина (PenStrep, Thermo Fisher Scientific, США). Каждые 2–3 дня среду культивирования полностью заменяли на свежую. При пересеве оценивали ко-

личество клеток и их выживаемость методом подсчета в камере Горяева с окрашиванием трипановым синим (Sigma-Aldrich, США). Для проведения экспериментов клетки растили до 80% конfluence.

Моделирование гипоксии *in vitro*

Для моделирования гипоксии *in vitro* использовали хлорид кобальта (II) (CoCl₂). CoCl₂ стабилизирует транскрипционные факторы HIF-1α и HIF-2α, индуцируемые при гипоксии и активирующие экспрессию генов, отвечающих за выживание клеток, их пролиферацию, контроль метаболических процессов [14]. К клеткам добавляли CoCl₂ до концентрации 200 мкМ, после чего клетки культивировали в течение 12, 16, 20 либо 24 ч. Об успешности активации HIF судили на основании вестерн-блоттинга с использованием антител, специфичных к HIF-1α (рис. 1А).

Ингибирование ферментов семейства Tet

В работе использовали селективный ингибитор ферментов семейства TET — Bobcat339 (SML2611, Sigma-Aldrich, США) [15, 16]. К культуре клеток добавляли Bobcat339 до концентрации 80 мкМ, после чего клетки культивировали в течение 12, 16, 20 либо 24 ч. Для оценки эффективности ингибирования TET проводили дот-блоттинг клеточных лизатов с использованием антител (Abcam, Великобритания), специфичных к продукту реакции, катализируемой ферментами семейства TET, — 5-гидрокси метилцитозину (рис. 1Б).

Иммуноблоттинг

Вестерн-блоттинг проводили по методу Тоубина [17]. Электроперенос белков на нитроцеллюлозную мембрану проводили в течение часа

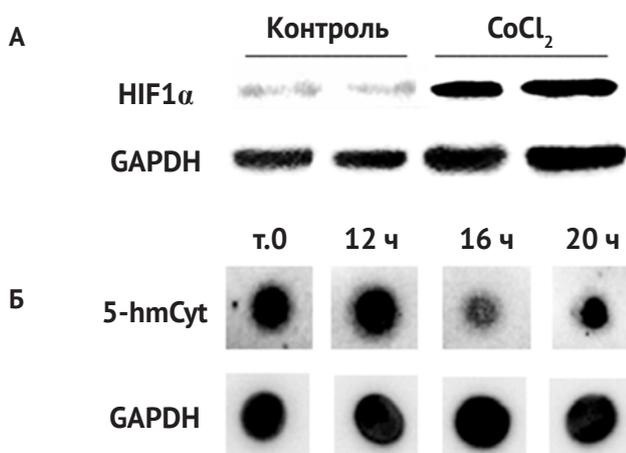


Рис. 1. Результаты иммуноблоттинга образцов СК эндометрия. А — оценка эффективности стабилизации HIF1α в стромальных клетках эндометрия человека под действием CoCl₂. Иммуноблоттинг. Контроль — образцы СК эндометрия, культивированных без добавления CoCl₂; CoCl₂ — образцы СК эндометрия, культивированных в присутствии CoCl₂ в течение суток; Б — оценка успешности ингибирования ферментов TET под действием Bobcat339. Дот-блоттинг. 5-hmCyt — 5-гидрокси метилцитозин; т.0 — начальная точка эксперимента (клетки без добавления ингибитора); 12 ч, 16 ч и 20 ч — клетки после инкубирования с Bobcat339 в течение 12, 16 и 20 часов соответственно

при постоянном напряжении 100 В в 25 мМ Трис-НСI буфере, рН 8,3, содержащем 192 мМ глицина и 20% этанола (по объему). Перед проведением иммунохимического окрашивания осуществляли блокировку мест неспецифического связывания белков на мембране в 5% растворе сухого обезжиренного молока на ТБСТ (20 мМ Трис-НСI, рН 7,6, содержащий 150 мМ NaCl и 0,1% Tween 20) при комнатной температуре в течение 30 минут, постоянно перемешивая. Затем мембрану инкубировали при +4 °С в течение ночи в растворе антител, специфичных к *Ноха10* (sc-271428, Santa Cruz Biotech, США; разведение антител 1:500), к *Ноха11* (ab72591, Abcam, Великобритания; разведение 1:1000), к *Hif1a* (ab2185, Abcam, Великобритания; разведение 1:2000), а также к *Gapdh* (2118, Cell Signaling Technology, США; разведение 1:1000). Далее мембрану отмывали в растворе ТБСТ и инкубировали в растворе антимишиных либо антикроличьих поликлональных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена (анти-мышинные антитела — A9044, Sigma-Aldrich, США; разведение 1:20 000; антикроличьи антитела — A16096, Invitrogen, США; разведение 1:5000), на 5% молоке в ТБСТ в течение 1 часа при комнатной температуре. От несвязавшихся вторичных антител мембраны также отмывали раствором ТБСТ. Для детекции сигнала использовали хемилюминесцентный субстрат Clarity либо Clarity Max (Bio-Rad, США), измеряли хемилюминесценцию мембраны на приборе Chemidoc Touch (Bio-Rad, США). При проявке мембран ориентировались на положение белковых полос относительно маркеров и убеждались, что они соответствуют ожидаемым (*Gapdh* — 37 кДа, *Hif1a* — 120 кДа, *Ноха10* — 38 кДа, *Ноха11* — 40 кДа, по данным производителей антител).

ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР)

Выделение РНК из образцов маток мышей проводили с использованием реагента Extract RNA («Евроген», РФ). Выход и чистоту препарата РНК оценивали спектрофотометрически на приборе NanoDrop (Thermo Scientific, США). Обратную транскрипцию проводили с использованием коммерческого набора MMLV RT Kit (Евроген, РФ) на амплификаторе Mastercycler nexus gradient (Eppendorf, Германия). Анализ экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени проводили с использованием коммерческого реактива qPCRmix-HS SYBR+LowROX («Евроген», РФ) на амплификаторе Bio-Rad Real-Time

CFX96 Touch (BioRad, США). Последовательно праймеров, использованные в работе:

- для гена *36b4* мыши прямой праймер 5'-GCTC-CAAGCAGATGCAGCA-3', обратный праймер 5'-CCGGATGTGAGGCAGCAG-3';
- для гена *Ноха10* мыши прямой праймер 5'-СТ-GCCGCGAACTCCTTTTTG-3', обратный праймер 5'-GCTTCATTACGCTTGCTGCC-3';
- для гена *Ноха11* мыши прямой праймер 5'-AATGGCTGTGGAGTGTGG-3', обратный праймер 5'-СТCTCAGGCTCTTGAAGG-3';
- для гена *36B4* человека прямой праймер 5'-CGACCTGGAAGTCCAACAC-3', обратный праймер 5'-ATCTGCTGCATCTGCTTG-3';
- для гена *НОХА10* человека прямой праймер 5'-GGTTTGTCTGACTTTTTGTTTCT-3', обратный праймер 5'-TGACACTTAGGACAATATCTATCTCTA-3';
- для гена *НОХА11* человека прямой праймер 5'-AGTTCTTTCTTCAGCGTCTACATT-3', обратный праймер 5'-TTTTTCCTTCATTCTCCTGTTCTG-3'.

Статистическая обработка данных

В статье приведены репрезентативные результаты, воспроизводящиеся в трех независимых экспериментах ($n = 3$). Для проверки значимости различий нормированной экспрессии генов, измеренной методом ПЦР в реальном времени, использовали критерий Манна — Уитни. Различия результатов считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Экспрессия генов *Ноха10* и *Ноха11* возрастает в матке мыши после родов

Впервые получены данные о том, что в течение первых суток после родов в тканях матки мыши возрастает экспрессия генов *Ноха10* и *Ноха11* (рис. 2). Согласно полученным результатам, уровень транскрипции гена *Ноха10* возрастает в течение первых четырех часов после родов, а накопление белкового продукта *Ноха10* в тканях матки мыши происходит позднее — к 24 часам после родов. Сравнительно высокое содержание белка *Ноха10* в матке в предродовой период объясняется присутствием в лизате матки до родов значительного количества плаценты, для которой характерна высокая экспрессия *Ноха10* [18].

В случае *Ноха11* уже к первым четырем часам после родов в тканях матки возрастает содержание как транскриптов, так и белкового продукта.

Maria A. Kulebyakina, Anastasia S. Smirnova, Vladimir S. Popov, Roman Yu. Eremichev, Pavel I. Makarevich
Expression of HOXA genes in endometrial stromal cells

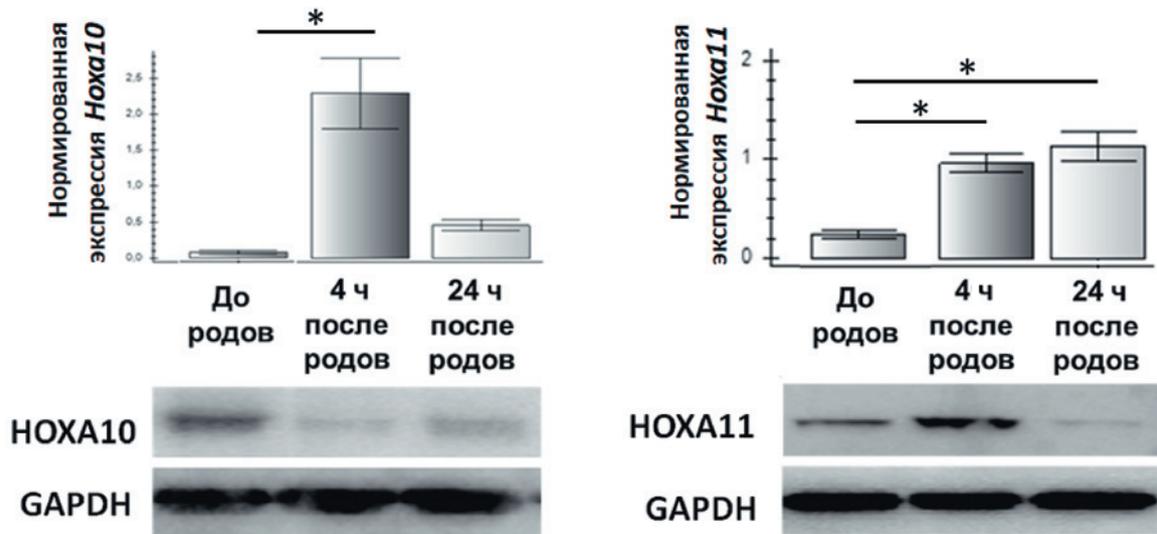


Рис. 2. Экспрессия Ноха10 и Ноха11 на уровне мРНК и белка в тканях матки мыши в день предполагаемой даты родов, а также спустя 4 ч и спустя 24 ч после родов. Результаты ОТ-ПЦР (гистограммы) и иммуноблоттинга. * $p < 0,05$

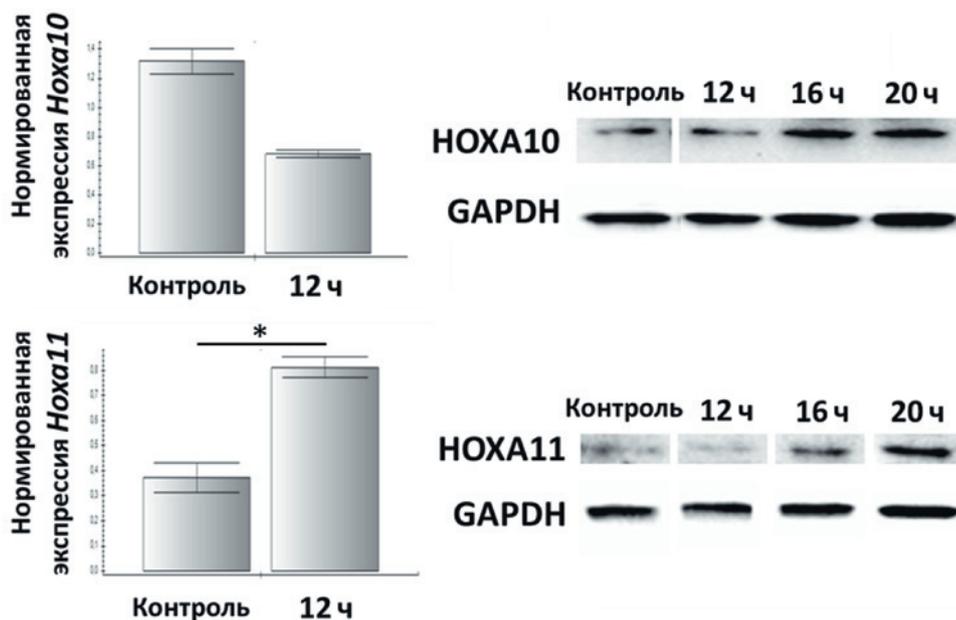


Рис. 3. Влияние активации HIF с использованием CoCl_2 на экспрессию HOXA10 и HOXA11 на уровне мРНК и белка в СК эндометрия. Результаты ОТ-ПЦР (гистограммы) и иммуноблоттинга. * $p < 0,05$

Экспрессия генов *HOXA10* и *HOXA11* возрастает в стромальных клетках эндометрия в модели гипоксии

Гипоксию моделировали *in vitro*, взяв за основу широко распространенную методику с использованием хлорида кобальта (II) (CoCl_2). К клеткам добавляли CoCl_2 до концентрации 200 мкМ и спустя 12 часов измеряли в них экспрессию генов *HOXA10* и *HOXA11* методом ОТ-ПЦР. Кроме того, спустя 12, 16 либо 20 ч после

добавления CoCl_2 оценивали содержание белков HOXA10 и HOXA11 в клеточных лизатах. Результаты приведены на рисунке 3.

По полученным данным можно заключить, что влияние CoCl_2 на экспрессию генов HOXA10 и HOXA11 различается. Так, для HOXA10 через 12 часов после добавления CoCl_2 количество белкового продукта оставалось практически неизменным и увеличивалось спустя 16 часов

(рис. 3, верхний ряд). В случае с *НОХА11* по истечении 12 часов после добавления CoCl_2 уровень мРНК возрастал, а спустя 16 и 20 часов в клетках возрастало и содержание белка *НОХА11* (рис. 3, нижний ряд).

Активность ферментов семейства ТЕТ необходима для возрастания экспрессии генов *НОХА10* и *НОХА11* в стромальных клетках эндометрия в модели гипоксии

Чтобы проверить, участвуют ли ферменты семейства ТЕТ в процессе возрастания экспрессии *НОХА10* и *НОХА11* в *in vitro* модели гипоксии, одновременно с моделированием гипоксии добавляли к клеткам эндометрия селективный ингибитор ферментативной активности белков Tet (*Bobcat339*). Экспрессию генов *НОХА10* и *НОХА11* в клетках оценивали по накоплению белковых продуктов, которое измеряли методом иммуноблоттинга аналогично описанному ранее. Полученные результаты приведены на рисунке 4. По результатам иммуноблоттинга видно, что само по себе добавление *Bobcat339* к стромальным клеткам эндометрия приводит к увеличению количества белков *НОХА10* (на 12 часов) и *НОХА11* (на 16 и 20 часов). Однако при добавлении *Bobcat339* одновремен-

но с CoCl_2 наблюдается снижение экспрессии *НОХА10* и *НОХА11*, вызываемое CoCl_2 .

Обсуждение

Эндометрий человека и мыши — уникальный пример ткани, обладающей способностью к многократной регенерации. Изучение механизмов регенерации эндометрия необходимо для установления способов управлять заживлением других тканей и органов.

Данная работа посвящена вопросам заживления эндометрия после повреждения, а конкретно — возможной роли в этих процессах генов *Нох10* и *Нох11*, специфичных для эндометрия. Для понимания, изменяется ли экспрессия этих генов в тканях матки по механизмам, не связанным с действием половых гормонов, нами было предложено использовать модель родового повреждения эндометрия у мыши. Известно, что у мыши в течение первых суток после родов, когда идет активное заживление эндометрия, уровень прогестерона и эстрадиола остается стабильно низким [19], а следовательно, они мало влияют на экспрессию изучаемых генов *Нох*. Поэтому данная модель позволяет исключить влияние меняющегося гормонального фона и, та-

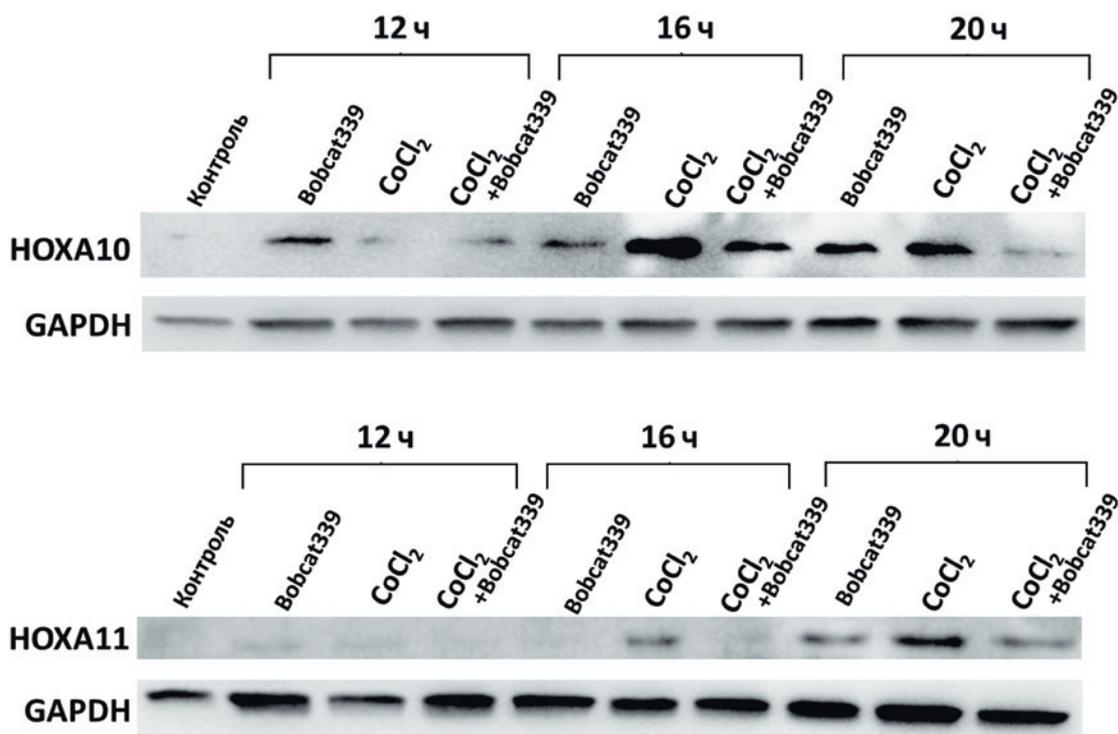


Рис. 4. Влияние добавления ингибитора ТЕТ на возрастание экспрессии белков *НОХА10* и *НОХА11*, вызванное добавлением CoCl_2 , в стромальных клетках эндометрия человека. Иммуноблоттинг

ким образом, сосредоточиться на изменениях экспрессии генов *Hoxa10* и *Hoxa11*, вызванных именно повреждением эндометрия.

В работе впервые получены данные о том, что экспрессия специфических для эндометрия генов *Hoxa10* и *Hoxa11* активируется в тканях матки мыши в ответ на повреждение. Следует отметить, что накопление белка *Hoxa11* происходило раньше, чем *Hoxa10*. Это расхо­дится с хорошо известными данными о том, что при экспрессии смежных генов *Hox* одного локуса в первую очередь происходит экспрессия генов с меньшим номером [2]. В данной модели, по всей видимости, активация экспрессии генов *Hoxa10* и *Hoxa11* в матке происходит по различным механизмам. К 24 часам после родов в тканях матки мыши содержание белкового продукта *Hoxa11* снижается несмотря на то, что уровень транскрипции гена *Hoxa11* остается повышенным. Это можно объяснить вкладом механизмов регуляции экспрессии *Hoxa11* на уровне мРНК (например, микроРНК), или повышением уровня протеасомной деградации белка *Hoxa11*.

Какие стимулы способны активировать экспрессию *Hoxa10* и *Hoxa11* в тканях матки при ее повреждении? Из литературы известно, что родовое повреждение эндометрия сопровождается локальной гипоксией [20], которая приводит к значительному изменению экспрессионного профиля в клетках по механизму, связанному с активацией транскрипционного фактора *Hif1 α* . Rytkonen и его коллеги в 2020 году методом транскриптомного анализа установили, что в иммортализованных стромальных клетках человеческого эндометрия при гипоксии наблюдается повышение экспрессии генов *HOXA10* и *HOXA11* [21]. На основе анализа литературы нами был предположен механизм, за счет которого активация транскрипционного фактора *HIF1 α* может приводить к обнаруженному нами возрастанию экспрессии генов *HOXA10* и *HOXA11* (рис. 5). Известно, что в постнатальный период экспрессия генов семейства *Hox* в стромальных клетках в значительной степени подавлена за счет работы комплекса *Polcomb* [22]. Данный комплекс способствует метилированию остатков цитозина в промоторных участках большого набора генов, что приводит к снижению экспрессии данных генов. Следовательно, для возрастания экспрессии генов семейства *Hox* в постнатальный период требуется работа системы деметилирования,



Рис. 5. Предполагаемый механизм возрастания экспрессии генов *Hoxa10* и *Hoxa11* при гипоксии, вызванной повреждением эндометрия

которая приводит к удалению метильных групп с остатков цитозина в ДНК. Ключевыми ферментами системы деметилирования являются белки семейства TET. Показано, что возможна активация экспрессии ферментов семейства TET под действием фактора *HIF* [23, 24]. Исходя из этого, нами было выдвинуто предположение, что повышение уровня экспрессии генов *HOXA10* и *HOXA11* при гипоксии может быть обусловлено влиянием ферментов TET, экспрессия которых, в свою очередь, активируется транскрипционными факторами *HIF*. Данная гипотеза была проверена нами в модели гипоксии *in vitro* на культуре стромальных клеток человеческого эндометрия.

Результаты, полученные в модели гипоксии *in vitro*, позволяют заключить, что возрастание экспрессии генов *HOXA10* и *HOXA11* в ответ на стабилизацию *HIF* под действием CoCl_2 в стромальных клетках эндометрия опосредуется активацией ферментов TET. Следует отметить, что само по себе добавление *Bobcat339* к культуре стромальных клеток эндометрия приводит к противоположному эффекту — к возрастанию экспрессии генов *HOXA10* (на 12 часов; рис. 4, верхняя панель) и *HOXA11* (на 16 и 20 часов; рис. 4, нижняя панель). Это свидетельствует о том, что наблюдаемое снижение накопления *Hoxa10* и *Hoxa11* в клетках при одновременном добавлении CoCl_2 и *Bobcat339* не является результатом двух независимых механизмов действия *Bobcat339* и CoCl_2 на экспрессию данных генов.

Результаты, полученные в данной работе в *in vitro* модели гипоксии, во многом согласуются с нашими данными, полученными *in vivo*, относительно существования механизмов, приводящих к возрастанию экспрессии генов *Hoxa10* и *Hoxa11* в эндометрии в ответ на повреждение. Однако в случае моделирования гипоксии в культуре стромальных клеток человеческого эндометрия сначала наблюдалось возрастание

экспрессии *HOXA10*, а позднее — *HOXA11*. После родового повреждения, напротив, в тканях матки сначала повышается содержание белка *Hoxa11*. Это можно объяснить тем, что на экспрессию генов *Hoxa10* и *Hoxa11* в тканях матки наряду с гипоксией могут влиять и другие вызванные повреждением стимулы, такие как воспаление, которые в нашей *in vitro* модели не были учтены. Кроме того, поскольку в работе были использованы гомогенизированные образцы мышиных маток, полученные данные позволяют судить лишь об изменении усредненных значений экспрессии генов *Hoxa10* и *Hoxa11* в тканях матки, что является несомненным ограничением настоящей работы. В дальнейших исследованиях планируется изучить динамику изменения экспрессии генов *Hoxa10* и *Hoxa11* в разных слоях матки, а также в разных типах клеток, составляющих матку (в частности, в стромальных клетках эндометрия и в эпителии).

Стоит также отметить, что полученные результаты указывают на различие в регуляции генов *Hoxa10* и *Hoxa11*. Говоря об эндометрии, данные гены, как правило, рассматривают как функционально дублирующие друг друга. Обнаруженные нами различия в регуляции данных генов свидетельствуют в пользу того, что гены *Hoxa10* и *Hoxa11* существенно различаются по свойствам и роли в процессах регенерации эндометрия.

Результаты настоящего исследования открывают возможность изучения новых механизмов регуляции экспрессии генов *Hoxa10* и *Hoxa11* в эндометрии, связанных с действием стероидных гормонов, а с ответом ткани на повреждения, а также позволяют предположить, что данные гены могут участвовать в регуляции процессов заживления эндометрия после повреждения по различающимся механизмам.

Литература

1. Kulebyakina M, Makarevich P. Hox-Positive Adult Mesenchymal Stromal Cells: Beyond Positional Identity. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:624. DOI: 10.3389/fcell.2020.00624
2. Kmita M, Duboule D. Organizing axes in time and space; 25 years of colinear tinkering. *Science.* 2003;301:331–333. DOI: 10.1126/science.1085753
3. Lappin T, Grier D, Thompson A, Halliday H. HOX genes: seductive science, mysterious mechanisms. *Ulster Med J.* 2006 Jan;75(1):23–31. Erratum in: *Ulster Med J.* 2006 May;75(2):135. PMID: 16457401; PMID: PMC1891803
4. Svengen T, Tonissen K. Hox transcription factors and their elusive mammalian gene targets. *Heredity.* 2006;97:88–96. DOI: 10.1038/sj.hdy.6800847
5. Chang H, Chi J-T, Dudoit S, Bondre C, van de Rijn M, Botstein D, et al. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99: 2877–12882. DOI: 10.1073/pnas.162488599
6. Ackema K, Charité J. Mesenchymal stem cells from different organs are characterized by distinct topographic Hox codes. *Stem Cells Dev.* 2008;17:979–1091. DOI: 10.1089/scd.2007.0220
7. Picchi J, Trombi L, Spugnese L, Barachini S, Maroni G, Brodano G, et al. HOX and TALE signatures specify human stromal stem cell populations from different sources. *J Cell Physiol.* 2013;228:879–889. DOI: 10.1002/jcp.24239
8. Uyeno L, Newman-Keagle J, Cheung I., Hunt T, Young D, Boudreau N. Hox D3 expression in normal and impaired wound healing. *J Surg Res.* 2001;100:46–56. DOI: 10.1006/jsre.2001.6174
9. Hansen S, Myers C, Charboneau A, Young D, Boudreau N. HoxD3 accelerates wound healing in diabetic mice. *Am J Pathol.* 2003;163:2421–2431. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63597-3
10. Rux D, Song J, Pineault K, Mandair G, Swinehart I, Schlientz A et al. (2017). Hox11 function is required for region-specific fracture repair. *J Bone Miner Res.* 2017;32:1750–1760. DOI: 10.1002/jbmr.3166
11. Qu F, Palte I, Gontarz P, Zhang B, Guilak F. Transcriptomic analysis of bone and fibrous tissue morphogenesis during digit tip regeneration in the adult mouse. *FASEB J.* 2020; 34(7):9740–9754. DOI: 10.1096/fj.202000330R
12. Taylor H. The role of HOX genes in the development and function of the female reproductive tract. *Semin Reprod Med.* 2000;18:81–89. DOI: 10.1055/s-2000-13478

13. Eremichev R, Kulebyakina M, Alexandrushkina N, Nimiritsky P, Basalova N, Grigorieva O, et al. Scar-free healing of endometrium: tissue-specific program of stromal cells and its induction by soluble factors produced after damage. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:212. DOI: 10.3389/fcell.2021.616893
14. Munoz-Sanchez J, Chanez-Cardenas M. The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model. *J App Toxicol.* 2019;39(4):556–570. DOI: 10.1002/jat.3749
15. Chua G, Wassarman K, Sun H, Alp J, Jarczyk E, Kuzio N, et al. Cytosine-Based TET Enzyme Inhibitors. *ACS Med Chem Lett.* 2019;10(2):180–185. DOI: 10.1021/acsmchemlett.8b00474
16. Zhang X, Yang J, Shi D, Cao Z. TET2 suppresses nasopharyngeal carcinoma progression by inhibiting glycolysis metabolism. *Canc Cell Int.* 2020;20(1):1–14. DOI: 10.1186/s12935-020-01456-9
17. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979;76(9):4350–4354. DOI: 10.1073/pnas.76.9.4350
18. Satokata I, Benson G, Maas R. Sexually dimorphic sterility phenotypes in Hoxa10-deficient mice. *Nature.* 1995;374(6521):460–463. DOI: 10.1038/374460a0. PMID: 7700356
19. Decatanzaro D, Muir C, Beaton E, Jetha M. Non-invasive repeated measurement of urinary progesterone, 17 β -estradiol, and testosterone in developing, cycling, pregnant, and postpartum female mice. *Steroids.* 2004;69(10):687–696.
20. Yoshii A, Kitahara S, Ueta H, Matsuno K, Ezaki T. Role of uterine contraction in regeneration of the murine postpartum endometrium. *Biol Reprod.* 2014;91:32. DOI: 10.1095/biol-reprod.114.117929
21. Rytönen K, Heinosaari T, Mahmoudian M, Ma X, Perheentupa A, Elo L, et al. Transcriptional responses to hypoxia in endometrial and decidual stromal cells. *Soc Reprod Fert.* 2020;160(1):39–51. DOI: 10.1530/REP-19-0615
22. Schumacher A, Magnuson T. Murine Polycomb- and trithorax-group genes regulate homeotic pathways and beyond. *Trends Genet.* 1997;13(5):167–170. DOI: 10.1016/s0168-9525(97)01133-5
23. Zhu J, Wang K, Li T, Chen J, Xie D, Chang X, et al. Hypoxia-induced TET1 facilitates trophoblast cell migration and invasion through HIF1 α signaling pathway. *Sci Rep.* 2017;7:8077. DOI: 10.1038/s41598-017-07560-7
24. Tsai Y, Chen H, Chen S-Y, Cheng W-C, Wang H-W, Shen Z-J, et al. TET1 regulates hypoxia-induced epithelial–mesenchymal transition by acting as a co-activator. *Genome Biol.* 2014;15:513. DOI: 10.1186/s13059-014-0513-0

Об авторах

Кулебякина Мария Александровна — м.н.с. НИЛ генных и клеточных технологий кафедры биохимии Факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Смирнова Анастасия Сергеевна — студентка 2-го курса магистратуры по регенеративной биомедицине Факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Попов Владимир Сергеевич — к.б.н., заведующий лабораторией НИЛ трансляционной медицины Факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова; в.н.с. Института регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного центра МГУ имени М. В. Ломоносова.

Еремичев Роман Юрьевич — к.м.н., м.н.с. лаб. генно-клеточной терапии Института регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного центра МГУ имени М. В. Ломоносова.

Макаревич Павел Игоревич — к.м.н., зав. лаб. генно-клеточной терапии Института регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного центра МГУ имени М. В. Ломоносова; доцент кафедры биохимии Факультета фундаментальной медицины МГУ имени М. В. Ломоносова.

М.А. Кулебякина, А.С. Смирнова, В.С. Попов, Р.Ю. Еремичев, П.И. Макаревич
Экспрессия генов *HOXA* в стромальных клетках эндометрия

Authors

Maria A. Kulebyakina — junior researcher at Gene and cellular technology research laboratory at Faculty of Medicine, M.V. Lomonosov Moscow State University.

Anastasia S. Smirnova — Master's student in Regenerative Biomedicine at Faculty of Medicine, M.V. Lomonosov Moscow State University.

Vladimir S. Popov — PhD, head of Translation medicine research laboratory at Faculty of Medicine, M.V. Lomonosov Moscow State University.; lead researcher at Institute for regenerative medicine, M.V. Lomonosov Moscow State University.

Roman Y. Eremichev — PhD, junior researcher at Gene and cell therapy laboratory, Institute for regenerative medicine, M.V. Lomonosov Moscow State University.

Pavel I. Makarevich — MD, PhD, head of Gene and cell therapy laboratory, Institute for regenerative medicine, M.V. Lomonosov Moscow State University; assistant professor at Biochemistry and Regenerative Medicine department at Faculty of Medicine, M.V. Lomonosov Moscow State University.

<https://doi.org/10.60043/2949-5938-2023-1-53-71>



Изменение остеодифференцировочного потенциала культуры МСК-ЖТ при *in vitro* сокультивировании с гепарином

К.А. Юрова, О.Г. Хазиахматова, В.В. Малащенко, О.Б. Мелашенко, И.А. Хлусов, Д.Д. Лигатюк, П.А. Иванов, Л.С. Литвинова

Центр иммунологии и клеточных биотехнологий Балтийского федерального университета им. И. Канта, 236001, г. Калининград, ул. Гайдара, 6, Россия

Адрес для корреспонденции: larisalitvinova@yandex.ru

Аннотация

Цель данного исследования — изучение влияния гепарина в концентрации 1 МЕ/мл на изменение остеодифференцировочного потенциала культуры МСК жировой ткани человека в условиях сокультивирования *in vitro*.

Материалы и методы. Оценка фенотипического профиля культуры МСК жировой ткани человека при культивировании в присутствии/отсутствии гепарина проводилась с помощью метода проточной цитометрии с использованием соответствующих красителей согласно протоколу фирмы-производителя на проточном цитофлуориметре MACS Quant после 14-суточного культивирования. Для оценки миграционного и пролиферативного потенциала МСК в присутствии гепарина использовалась электродная система непрерывного наблюдения — xCELLigence® RTCA DP. После 14-суточного культивирования МСК с гепарином производилась оценка внутриклеточной экспрессии генов остеодифференцировки методом ПЦР в реальном времени; кроме того, производилась оценка дифференцировочного профиля МСК жировой ткани человека при сокультивировании с гепарином методом цитологического окрашивания ализариновым красным с целью обнаружения островков минерализации спустя 21 сутки культивирования. Также в супернатантах 14-дневных культур оценивалось количество ростовых факторов, хемокинов, молекул с про- и противовоспалительной активностью.

Результаты. Выявлено достоверное снижение (относительно контрольной группы исследования) количества клеток, несущих на клеточной поверхности маркеры МСК (CD73, CD90, CD105) культуры в модели МСК + гепарин; повышение пролиферативной и снижение миграционной активности МСК при сокультивировании с гепарином; повышение уровней относительной экспрессии мРНК генов остеодифференцировки (*ALPL*, *RUNX2*, *BMP2*, *BMP6*) и клеточной адгезии (*CD49d*); увеличение площади минерализации в модели исследования в присутствии гепарина после 21-суточного культивирования. Отмечена тенденция к увеличению секреции ростового фактора VEGF и провоспалительного фактора IL-6 в модели МСК + гепарин.

Заключение. Полученные результаты могут служить базисом для разработки новых терапевтических тактик ведения пациентов хирургического профиля при операциях остеосинтеза с высоким риском тромбообразования.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, гепарин, миграция, стволовость, остеодифференцировка, имплантат, *in vitro*

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Малащенко В.В., Мелашенко О.Б., Хлусов И.А., Лигатюк Д.Д., Иванов П.А., Литвинова Л.С. Изменение остеодифференцировочного потенциала культуры МСК-ЖТ при *in vitro* сокультивировании с гепарином. *Регенерация органов и тканей*. 2023;1(1):53–71. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2023-1-53-71>

Поступила: 30.05.2023

Обработана: 18.07.2023

Принята: 21.08.2023

Changes of osteodifferentiation potential of MSC-AT during *in vitro* co-cultivation with heparin

Kristina A. Yurova, Olga G. Khaziahmatova, Vladimir V. Malashchenko, Olga B. Melashchenko, Igor A. Khlusov, Denis D. Ligatyuk, Pavel A. Ivanov, Larisa S. Litvinova

Center of Immunology and Cellular Biotechnology of I. Kant Baltic Federal University, 236001, Kaliningrad, str. Gaidara, 6, Russia

Correspondence address: larisalitvinova@yandex.ru

Abstract

The **aim** of this study was to investigate the effect of heparin at a concentration of 1 IU/mL on changes in the osteodifferentiation potential of MSC from human adipose tissue under *in vitro* cocultivation.

Materials and methods. Assessment of the phenotypic profile of MSC from human adipose tissue during cultivation in the presence/absence of heparin was performed by the flow cytometry method using the appropriate dyes according to the manufacturer's protocol on a MACS Quant flow cytometer after 14 days of cultivation. To evaluate the migration and proliferation potential of MSCs in the presence of heparin, we were using a continuous monitoring electrode system, xCELLigence® RTCA DP. After cultivation MSCs with heparin for 14 days, the intracellular expression of osteodifferentiation genes was evaluated by real-time PCR. In addition, the differentiation profile of MSCs from human adipose tissue cultured with heparin was evaluated by cytological staining with alizarin red to detect islands of mineralization after 21 days of cultivation. In addition, the amount of growth factors, chemokines, molecules with pro- and antiinflammatory activity was estimated in the supernatants of the 14-day cultures.

Results. There was a significant decrease (compared with the control group of the study) in the number of cells with stem markers (CD73, CD90, CD105) on the cell surface of the culture in the MSC + heparin model; increase in proliferative and decrease in migratory activity of MSCs during co-cultivation with heparin; increased levels of relative mRNA expression of genes for osteodifferentiation (ALPL, RUNX2, BMP2, BMP6) and cell adhesion (CD49d); increase in mineralization area in the study model in the presence of heparin after 21 days of cultivation. There was a tendency to increase secretion of growth factor VEGF and pro-inflammatory factor IL -6 in the MSC + heparin model.

Conclusion. The obtained results may serve as a basis for the development of new therapeutic tactics for the treatment of surgical patients undergoing osteosynthesis operations with a high risk of thrombosis.

Keywords: mesenchymal stem cells, heparin, migration, stemness, osteodifferentiation, implant, *in vitro*

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Yurova K.A., Khaziahmatova O.G., Malashchenko V.V., Melashchenko O.B., Khlusov I.A., Ligatyuk D.D., Ivanov P.A. 1, Litvinova L.S. Changes of osteodifferentiation potential of MSC-AT during *in vitro* co-cultivation with heparin. *Tissue and organ regeneration*. 2023;1(1):53–71. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2023-1-53-71>

Received 30.05.2023

Revised 18.07.2023

Accepted 21.08.2023

Список сокращений:

ЖТ — жировая ткань

ИКМ — индекс клеточной миграции

ИКП — индекс клеточной пролиферации

МСК — мезенхимальные стволовые клетки

ППС — полная питательная среда

ALPL (от англ. alkaline phosphatase) — щелочная фосфатаза

BMP (от англ. bone morphogenetic protein) — костный морфогенетический белок

CD (англ. cluster of differentiation) — кластер дифференцировки

HGF (от англ. hepatocyte growth factor) — фактор роста гепатоцитов

IL (от англ. interleukin) — интерлейкин

LIF (от англ. leukemia inhibitory factor) — лейкемия-ингибирующий фактор

MCP-1 (от англ. monocyte chemoattractant protein 1) — моноцитарный хемотаксический фактор-1

M-CSF (от англ. macrophage colony-stimulating factor) — макрофагальный колониестимулирующий фактор

RUNX2 (от англ. runt-related transcription factor 2) — связанный с Runt транскрипционный фактор 2

SCF (от англ. stem cell factor) — фактор стволовых клеток

SDF-1 α (от англ. stromal cell-derived factor-1) — фактор стромальных клеток 1 альфа

TNF (от англ. tumor necrosis factor) — фактор некроза опухоли

TRAIL (от англ. tumor necrosis factor ligand superfamily member 10) — цитокин семейства факторов некроза опухоли

VEGF (от англ. vascular endothelial growth factor) — фактор роста эндотелия сосудов

Введение

В регенеративной медицине репарация костных дефектов зачастую осуществляется посредством имплантации искусственных материалов, имитирующих топографию поверхности костной ткани. Контакт костнозамещающего имплантата и тканей реципиента индуцирует развитие воспалительной реакции после проведения хирургических операций остеосинтеза или ремоделирования костей. Развитие локального острого неинфекционного воспалительного процесса — необходимый этап для более эффективного ремоделирования повреждений костных тканей [1].

Имплантация материала при контакте с тканями реципиента сопровождается осаждением на поверхности имплантата слоя белков крови и интерстициальной жидкости. Адсорбированные белки, в свою очередь, активируют систему комплемента, компоненты врожденного иммунитета, что способствует инициации коагуляционного гемостаза, приводящее к образованию сгустка фибрина на поверхности материала [2]. Внеклеточный матрикс, обра-

зовавшийся на поверхности материала, состоит из молекул фибрина, коллагена и эластина, что служит базисом для формирования новой тканевой структуры посредством миграции и адгезии к образованному сгустку стволовых клеток, что, в конечном счете, приводит к формированию костного регенерата. Таким образом, происходит образование стабильной связи между костной тканью реципиента и поверхностью имплантата с его дальнейшей остеоинтеграцией [3].

Однако существуют патологические состояния, характеризующиеся нарушением системы гемостаза и гиперкоагуляцией, которые часто наблюдаются у пациентов хирургического профиля. Для предотвращения развития послеоперационных патологических состояний, вызванных гиперкоагуляционным синдромом (например, тромбообразование, тромбоэмболии крупных артерий, инфаркт и т.п.), используют терапевтические стратегии с применением антитромботических или антикоагулянтных лекарственных препаратов (например, аспирин, клопидогрель, гепарин, варфарин и другие) [1].

Тем не менее использование прямых антикоагулянтов, в частности гепарина, способствует ограничению нормального формирования фибринового сгустка *in situ* на поверхности имплантата, тем самым ингибируя миграцию и адгезию мезенхимальных стволовых клеток (МСК) к образовавшейся костной мозоли, что, в целом, нарушает процессы остеointеграции имплантатов и ремоделирования костной ткани. Также весьма противоречивы современные данные о влиянии гепарина на остеодифференцировочный профиль культуры МСК. L. Ling и коллеги (2010) продемонстрировали, что гепарин активирует Wnt-сигнальный путь за счет взаимодействия с Wnt3a, увеличивая тем самым остеодифференцировку МСК [4]. В другом исследовании было показано ингибирование гепарином BMP6-индуцированного образования новых костей и хрящей на модели крыс [5].

Таким образом, **целью** данного исследования стало изучение влияния гепарина в концентрации 1 МЕ/мл на изменение остеодифференцировочного потенциала культуры МСК жировой ткани человека в условиях сокультивирования *in vitro*.

Материалы и методы

МСК получали из липоаспирата жировой ткани человека (Разрешение № 1 от 28.02.2019 локального этического комитета Инновационного парка БФУ имени И. Канта). Выделенная культура соответствовала всем минимальным критериям, предъявляемым к этой культуре: способность клеток к адгезии на поверхности культурального пластика; положительная экспрессия поверхностных маркеров CD105, CD73 и CD90 в сочетании с минимальной (до 2%) экспрессией маркеров CD45/CD34; способность к дифференцировке в мезодермальном направлении (остео-, хондро- и адипогенное) [6].

Нами было предварительно протестировано воздействие на морфофункциональное состояние МСК жировой ткани человека следующих концентраций гепарина: 0,5–0,75–1 МЕ/мл, достоверные изменения (при условии сохранения высокой жизнеспособности клеточной культуры) изучаемых нами параметров были выявлены только при действии на МСК 1 МЕ/мл (8 мкг/мл) гепарина; данная концентрация была в дальнейшем использована в настоящем *in vitro* исследовании.

Двумерная (2D) модель культивирования на пластике без гепарина служила контролем для оценки морфофункционального состояния клеток, сокультивируемых с гепарином («Белмедпрепараты», Беларусь) в концентрации 1 МЕ/мл — «МСК + гепарин».

Для оценки морфофункциональных реакций клеток в присутствии гепарина МСК культивировали в 12-луночных стерильных пластиковых культуральных плоскодонных планшетах («Orange Scientific», Бельгия). МСК культивировали (1×10^5 кл/мл) в 2 мл полной питательной среды (ППС) следующего состава: 90% DMEM/F12 (1:1) («Gibco Life Technologies», США), 10% FBS («Sigma Aldrich», США), 50 мг/л гентамицина («Invitrogen», Великобритания), 280 мг/л L-глутамина («Sigma Aldrich», США). Сроки культивирования составили 92 часа, 14 дней и 21 день при температуре 37 °С, 100% влажности в атмосфере 5% CO₂. Смена питательной среды производилась каждые 3–4 суток.

Оценка жизнеспособности исследуемых клеточных культур и подсчет общего числа клеток до и после культивирования производились с использованием слайдов на автоматическом счетчике клеток Countess TM Automated Cell Counter (Invitrogen, США). 5 мкл клеточной суспензии смешивали с 5 мкл раствора 0,4% трипанового синего. В исследовании использовали культуры МСК жировой ткани человека с жизнеспособностью не менее 90%.

Определение фенотипического профиля МСК проводили методом проточной цитометрии с использованием MSC Phenotyping Kit human — 130-095-198 («MiltenyiBiotec», США) согласно протоколу фирмы-производителя на проточном цитофлуориметре MACS Quant («Miltenyi Biotec», Германия). Полученные данные обрабатывали с помощью программного обеспечения «KALUZA Analysis Software» («Beckman Coulter», США).

Миграционную и пролиферативную активности МСК оценивали с использованием электродной системы для непрерывного наблюдения (real-time cell analysis) — xCELLigence® RTCA DP («ACEA Biosciences Inc.», США), сравнивая результаты исследования контрольной группы клеток без гепарина с экспериментальной группой исследования клеточной культуры с добавлением гепарина в концентрации

1 МЕ/мл. СИМ-планшет — 16-луночный планшет, представляющий систему из 2 полостей, разделенных мембраной. В верхние микролунки планшета (максимальный объем 180 мкл) помещали МСК (2×10^4 кл/мл) с гепарином/без гепарина. Обратная сторона мембраны, разделяющая микролунки, на 80% покрыта ячейками из золотых электродов. Данные, основанные на полученном импедансе, снятом с электродов, демонстрируют площадь, занятую клетками в указанный промежуток времени. Площадь, занятая клетками, напрямую зависит от скорости их миграции (инвазии) через микропоры СИМ-планшета диаметром 8 мкм. Это позволяет отслеживать миграционную активность в определенный промежуток времени. Результаты измерений представлены в виде индекса клеточной миграции (ИКМ). Сигналы для определения ИКМ с помощью программного обеспечения RTCA Software фиксировали каждые 15 минут в течение 92 часов.

Для оценки пролиферативной активности МСК использовали 16-луночный Е-планшет. За счет контакта исследуемых клеточных культур с электродами, расположенными на дне лунки планшета, осуществляется детекция клеточного импеданса (индекса клеточной пролиферации — ИКП). Величина ИКП зависит от количества клеток, их формы и размера, а также от качества прикрепления клеток к субстрату Е-планшета.

Оценка уровня относительной экспрессии мРНК генов остеодифференцировки (*ALPL*, *RUNX2*, *BMP2*, *BMP6*) и гена-субъединицы интегрина *VLA-4* (*CD49d*) проводилась методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени после 14 суток культивирования. Из полученных нами образцов выделяли тотальную РНК с использованием реагента Extract RNA kit («Евроген», Россия) согласно протоколу фирмы-производителя. Далее проводилась реакция обратной транскрипции с целью получения ДНК-матриц с использованием реакционной смеси, содержащей фермент ревертазу, РНК-матрицу и праймеры oligo(dT)23-primer («Beagle», Россия). Определение уровня относительной экспрессии генов проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), используя реагенты qPCRmixHS («Евроген», Россия) и специфические зонды TaqMan и праймеры (10 пМ) («Beagle», Россия). Уровни относительной экспрессии мРНК для каждого исследуемого гена рассчитывали с использованием модифицированной формулы Пфаффа.

Оценку концентрации исследуемых ростовых факторов (HGF, LIF, M-CSF, SCF, IL-3, VEGF), хемокинов (SDF-1 α , MCP-1, IL-8) и молекул с про- и противовоспалительной активностью (TNF- α , IL-6, TRAIL) осуществляли в супернатантах 14-дневных клеточных культур МСК. Анализ проводился методом проточной флуориметрии с применением коммерческих тест-систем (Bio-Plex Pro Human Cytokine 48-plex Assay, «Bio-Rad», США) и программного обеспечения BioPlex-Manager («Bio-Rad», США) на двухлучевом лазерном автоматическом анализаторе (Bio-Plex® 200 Systems, «Bio-Rad», США) согласно протоколу фирмы-производителя. Отобранные супернатанты центрифугировали при 500 об/мин в течение 10 минут (при 4 °С) для получения фракции биологически активных молекул. Далее определяли концентрацию биологически активных молекул по стандартной кривой применяемого набора (определяемый диапазон составлял 2–32 000 пг/мл) согласно инструкции производителя. Нижняя граница чувствительности метода составила <2 пг/мл. Концентрация исследуемых факторов, значения которых было ниже порога чувствительности методики, приравнивалась к 1 пг/мл.

Оценка остеодифференцировочного потенциала под влиянием гепарина проводилась методом цитологического окрашивания ализариновым красным после 21-суточного культивирования культур МСК в присутствии/отсутствии гепарина. По истечении 21 дня культивирования исследуемые культуры дважды отмывали фосфатным солевым буфером. Адгезированные клетки оставляли сушиться на воздухе, затем фиксировали в парах формалина и окрашивали 2% водным раствором ализаринового красного S (Sigma-Aldrich, США) для оценки минерализации межклеточного матрикса согласно инструкции фирмы-производителя. Негативным контролем дифференцировки служила двумерная 2D контрольная культура МСК в стандартной ППС, не контактировавшая с гепарином в течение всего срока культивирования (21 сутки). Фотографии окрашенных ализариновым красным культур получали с использованием программного обеспечения («Olympus Corporation», Филиппины) на лабораторном биологическом микроскопе для фазового контраста и документирования IX 51 S8F. Морфометрическое исследование окрашенных культур МСК проводили с использованием программного обеспечения Image-J Software (National Institutes of Health, США) согласно

алгоритму, представленному в руководстве [7]. Очаги минерализации межклеточного матрикса на микрофотографиях выделяли с помощью инструмента «Treshold». Для каждой микрофотографии индивидуально подбирался допуск инструмента согласно цветовой характеристике минерализата. После проведения измерений площадь общей минерализации всех микрофотографий ($\text{мм}^2/\text{см}^2$) заносили в таблицу для проведения дальнейшего статистического анализа.

Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью методов статистического описания, методов проверки гипотез. Проверка выборки на нормальность распределения проводили с использованием критерия Колмогорова — Смирнова. Данные не подчинялись нормальному закону распределения, в связи с чем для описательной статистики определяли медиану (M), 25%-ный (Q_1) и 75%-ный (Q_3) квартили. Статистическую значимость различий между исследуемыми группами проверяли с помощью непараметрического критерия Манна — Уитни для независимых выборок. Различия считались статистически достоверными при $p < 0,05$. Статистический анализ результатов был проведен с использованием пакета программ Graph Pad Prism version 8.0.1 (Graph Pad Software Inc, США).

Результаты

Оценка жизнеспособности МСК

Оценка жизнеспособности клеточных культур была произведена по истечении 14 суток культивирования во всех группах исследования (табл. 1).

Количество живых клеток в контрольной группе составило 94,93 (93,76–95,07)%; доля апоптотических форм и мертвых клеток — 3,17 (3,01–4,95) и 1,81 (1,29–1,96)% соответственно. Статистический анализ полученных данных не выявил достоверных различий между исследуемыми группами. Все исследуемые параметры (количество живых, апоптотических и мертвых клеток) были сопоставимы со значениями контрольной группы (табл. 1).

Анализ фенотипического профиля МСК

По истечении срока культивирования (14 суток) доля клеток, экспрессирующих маркеры кроветворных клеток [CD45, 34, 14, 20]+ в контрольной группе составила 0,41 (0,17–0,52)% (табл. 2). Значимых различий по изменению числа клеток с фенотипом гемопоэтических среди исследуемых групп обнаружено не было. В экспериментальной модели с гепарином регистрировалось достоверное умень-

Таблица 1. Процентное содержание живых и мертвых форм мезенхимальных стволовых клеток при *in vitro* культивировании в присутствии/отсутствии гепарина (1 МЕ/мл), Me (Q_1 – Q_3)

Группы исследования	Количество живых клеток, %	Количество апоптотических клеток, %	Количество мертвых клеток, %
Контрольная группа $n = 6$	94,93 (93,76–95,07)	3,17 (3,01–4,95)	1,81 (1,29–1,96)
МСК + гепарин $n = 6$	92,69 (92,13–94,29)	5,53 (4,65–5,85)	1,79 (1,07–2,03)

Примечание: $p_0 < 0,05$ — достоверные различия с контрольной группой; n — кол-во наблюдений в каждой группе исследования.

Таблица 2. Анализ фенотипического состава культур мезенхимальных стволовых клеток при *in vitro* культивировании в присутствии/отсутствии гепарина, Me (Q_1 – Q_3) (срок культивирования — 14 дней)

Группы исследования	[CD90]*	[CD105]*	[CD73]*	[CD45, 34, 14, 20]*
Контрольная группа $n = 6$	92,83 (92,02–93,94)	91,52 (91,21 – 92,42)	84,89 (83,84–85,99)	0,41 (0,17–0,52)
МСК + гепарин $n = 6$	81,26 (79,64–85,62) $p_0 < 0,05$	80,31 (80,11–82,73) $p_0 < 0,05$	71,51 (68,74–72,81) $p_0 < 0,05$	0,45 (0,28–0,67)

Примечание: $p_0 < 0,05$ — достоверные различия с контрольной группой; n — кол-во наблюдений в каждой группе исследования.

шение доли клеток, экспрессирующих на своей поверхности маркеры МСК CD90, CD105 и CD73, относительно значений, полученных в контрольной группе ($p < 0,05$).

Оценка миграционной активности МСК

Результаты миграционной активности МСК в присутствии/отсутствии гепарина представлены на рисунке 1 и в таблице 3. График представляет собой логарифмическую кривую, которая демонстрирует динамику миграционной (инвазивной) активности культуры МСК через пористую мембрану двухуровневого СИМ-планшета. Кривые, отражающие динамику миграционной (инвазивной) активности клеточной культуры через пористую мембрану СИМ-планшета, были автоматически построены с помощью системы xCELLigence и могут быть разделены на две фазы: Фаза 1 (0–8 часов) — фаза линейного роста; Фаза 2 (8–92 часа) — фаза логарифмического роста с постепенным увеличением показателя ИКМ. Выход логарифмической кривой на плато произошел через 8 часов после начала эксперимента. Резкое повышение ИКМ первой фазы может быть объяснено инвазией клеточных культур МСК из верхней камеры СИМ-планшета в его нижнюю камеру через микропоры мембраны, что является имитацией миграции подвижных клеток из кровеносного русла в ткани живого организма. Изменение показателей ИКМ во второй фазе может быть вызвано расплыванием клеток МСК на поверхности электродов.

Таблица 3. Индекс клеточной миграции мезенхимальных стволовых клеток при *in vitro* культивировании в присутствии/отсутствии гепарина (срок культивирования – 92 часа), Me (Q1–Q3)

Группы исследования	Индекс клеточной миграции, усл. ед.
Контрольная группа $n = 4$	2,16 (1,54–2,95)
МСК + гепарин $n = 4$	1,76 (1,64–1,79) $p_0 < 0,05$

Примечание: $p_0 < 0,05$ – достоверные различия с контрольной группой; n – кол-во наблюдений в каждой группе исследования.

Данные на рисунке 1, полученные с помощью системы RTCA, демонстрируют первоначальное резкое увеличение индекса клеточной миграции клеточных культур МСК во всех исследуемых группах в связи с высокой миграционной активностью клеток в течение первых 8 часов. По истечении 8 часов *in vitro* культивирования клеточность в нижней камере СИМ-планшета переходила в фазу логарифмического роста, что напрямую связано со снижением скорости прироста индекса клеточной миграции. ИКМ резко увеличился во всех группах исследования после добавления гепарина (1 МЕ/мл) в лунки планшета согласно дизайну эксперимента (спустя 22 часа от его начала). Затем происходило снижение ИКМ клеточных культур во всех

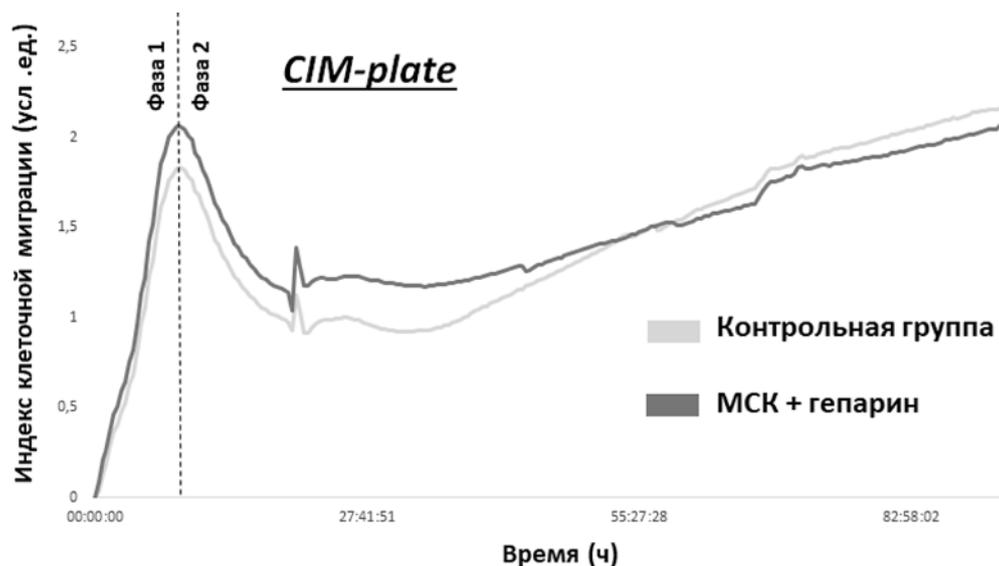


Рис. 1. Кривые миграционной (инвазивной) активности мезенхимальных стволовых клеток при *in vitro* культивировании в присутствии/отсутствии гепарина в электродной системе RTCA (92-часовое наблюдение). Фаза 1 — фаза линейного роста; Фаза 2 — фаза логарифмического роста. * — статистически значимые различия между группами.

исследуемых группах, после чего наступала фаза логарифмического роста ИКМ (по истечении 30 часов от начала эксперимента).

Моделирование миграции и инвазии МСК с помощью системы RTCA при *in vitro* сокультивировании с гепарином позволило получить значимые результаты по прошествии 92 часов эксперимента (рис. 1). Присутствие гепарина статистически значимо снижало миграционную активность МСК относительно контрольной группы ($p < 0,05$) (табл. 3).

Анализ пролиферативной активности МСК

Результаты пролиферативной активности МСК в присутствии/отсутствии гепарина представлены на рисунке 2 и в таблице 4. На графике представлена логарифмическая кривая, описывающая динамику индекса клеточной пролиферации (ИКП) МСК, величина которого зависит от количества клеток, формы и размера клеток, а также от качества прикрепления клеток к субстрату 16-луночного E-планшета. Кривые, характеризующие динамику ИКП, автоматически построены системой xCELLigence, основываясь на полученных в указанный промежуток времени данных, и визуально разделяются на две фазы: Фаза 1 (0–8 часов) — фаза линейного роста; Фаза 2 (8–92 часа) — фаза логарифмического роста с постепенным увеличением показателя ИКП.

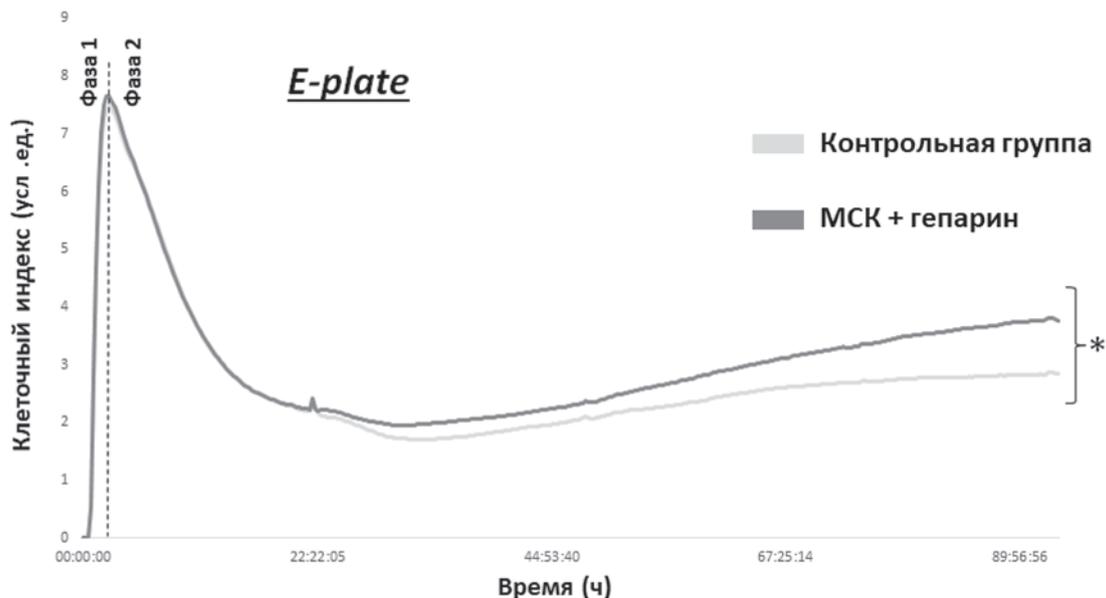


Рис. 2. Кривые клеточной пролиферации мезенхимальных стволовых клеток при *in vitro* культивировании в присутствии/отсутствии гепарина в электродной системе RTCA (92-часовое наблюдение). Фаза 1 — фаза линейного роста; Фаза 2 — фаза логарифмического роста. * — статистически значимые различия между группами.

Таблица 4. Изменение индекса клеточной пролиферации (ИКП, усл. ед.) мезенхимальных стволовых клеток при *in vitro* культивировании в присутствии/отсутствии гепарина (срок культивирования — 92 часа), Ме (Q1–Q3)

Группы исследования	Индекс клеточной пролиферации, усл. ед.
Контрольная группа $n = 4$	2,85 (2,67–3,02)
МСК + гепарин $n = 4$	3,95 (3,92–3,98) $p_0 < 0,05$

Примечание: $p_0 < 0,05$ — достоверные различия с контрольной группой; n — кол-во наблюдений в каждой группе исследования.

Согласно полученным данным наивысший показатель индекса клеточной пролиферации во всех группах исследования наблюдался на третий час от начала эксперимента, что подтверждает успешную адгезию клеток к субстрату E-планшета (рис. 2). Затем, в период от 3 до 22 часов эксперимента, наблюдалось резкое снижение числа клеток в процессе активной пролиферации во всех исследуемых группах. Далее клетки начинали входить в фазу логарифмического роста.

В соответствии с дизайном эксперимента в лунки был добавлен гепарин в концентрации 1 МЕ/мл спустя 22 часа культивирования

от начала эксперимента. На момент окончания эксперимента (спустя 92 часа) ИКП культуры МСК в модели культивирования в присутствии гепарина оказался значимо выше в сравнении с контрольной моделью ($p < 0,05$) (рис. 2, табл. 4). Исходя из полученных данных добавление гепарина в культуру МСК оказывало модулирующее влияние на их способность к рас-пластыванию.

Оценка уровня относительной экспрессии мРНК генов остеодифференцировки и клеточной адгезии

По истечении 14 суток культивирования было выявлено, что добавление в среду культивирования МСК гепарина способствовало достоверному увеличению уровня относительной экспрессии мРНК генов остеодифференцировки (*RUNX2*, *ALPL*, *BMP2* и *BMP6*) и гена α -субъединицы интегрин VLA-4 (*CD49d*) (табл. 5).

Оценка уровня относительной экспрессии мРНК гена *RUNX2* выявила статистически значимое увеличение экспрессии данного гена в модели культивирования с гепарином (МСК + гепарин) относительно контрольной группы ($p < 0,05$) (табл. 5, рис. 3). Также нами получено статистически значимое повышение экспрессии мРНК гена *ALPL* в группе «МСК + гепарин» относительно контрольной группы исследования ($p < 0,05$) (табл. 5, рис. 3).

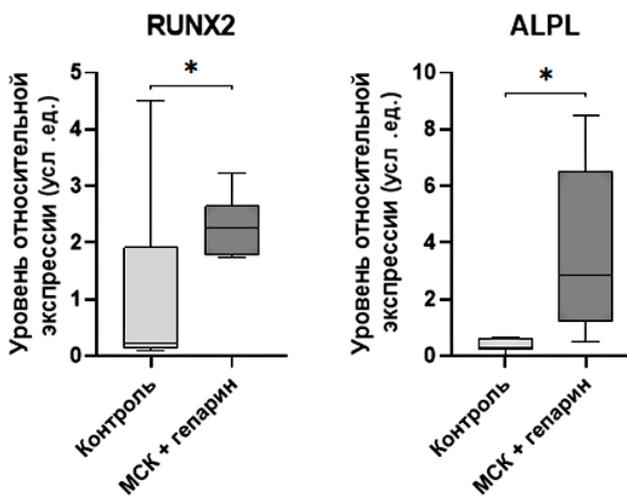


Рис. 3. Уровни относительной экспрессии (усл. ед.) мРНК генов *RUNX2* и *ALPL* в мезенхимальных стволовых клетках при *in vitro* сокультивировании в присутствии/отсутствии гепарина, срок культивирования – 14 суток. * – статистически значимые различия между группами

Таблица 5. Уровни относительной экспрессии мРНК генов остеодифференцировки и клеточной адгезии в мезенхимальных стволовых клетках при сокультивировании *in vitro* в присутствии/отсутствии гепарина (срок культивирования – 14 суток), Ме (Q1–Q3)

Определяемый ген, усл. ед.	Группы исследования	
	Контрольная группа $n = 6$	МСК + гепарин $n = 6$
<i>RUNX2</i>	1,09 (0,57–1,52)	2,41 (1,73–3,23) $p_0 < 0,05$
<i>ALPL</i>	0,37 (0,26–0,66)	6,23 (5,29–8,51) $p_0 < 0,05$
<i>BMP2</i>	0,94 (0,52–1,25)	4,05 (3,21–5,71) $p_0 < 0,05$
<i>BMP6</i>	0,37 (0,26–0,64)	2,08 (0,98–3,59) $p_0 < 0,05$
<i>CD49d</i>	0,43 (0,29–0,46)	4,89 (3,29–6,86) $p_0 < 0,05$

Примечание: $p_0 < 0,05$ – достоверные различия с контрольной группой; n – кол-во наблюдений в каждой группе исследования.

В группе «МСК + гепарин» был зарегистрирован достоверный рост относительного уровня экспрессии мРНК гена *BMP2* относительно значений, полученных при оценке контрольной группы ($p < 0,05$) (табл. 5, рис. 4). Похожие результаты

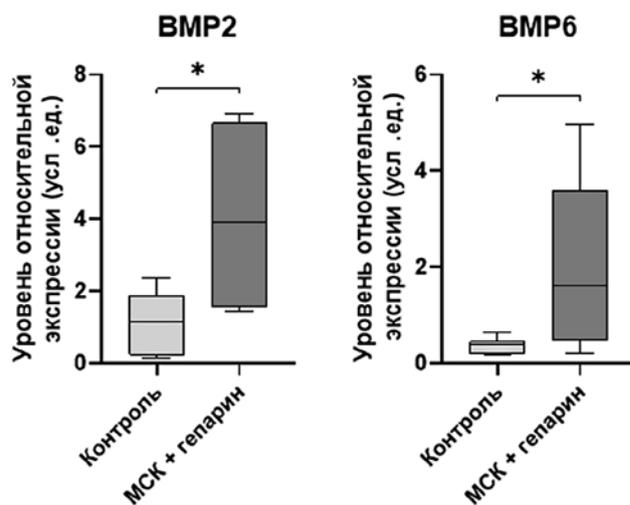


Рис. 4. Уровни относительной экспрессии (усл. ед.) мРНК генов *BMP2* и *BMP6* в мезенхимальных стволовых клетках при *in vitro* сокультивировании в присутствии/отсутствии гепарина, срок культивирования – 14 суток. * – статистически значимые различия между группами

были получены при анализе уровня относительной экспрессии мРНК гена *VMP6* (табл. 5, рис. 4).

Уровень экспрессии мРНК гена *CD49d* в группе «МСК + гепарин» превышал значения, полученные при оценке контрольной группы ($p < 0,05$) (табл. 5, рис. 5).

Анализ продукции ростовых факторов, хемокинов, провоспалительных цитокинов культурой МСК

Результаты, полученные методом мультиплексного анализа, представлены в таблицах 6 и 7. Согласно полученным данным в супернатантах 14-дневных культур МСК контрольной группы исследования нами было зафиксирована секреция культурой МСК не менее 40 факторов роста, хемокинов, про- и противовоспалительных цитокинов в данной модели исследования. Для более детального анализа из всего спектра продуцируемых цитокинов нами были выбраны ростовые факторы (HGF, LIF, M-CSF, SCF, IL-3,

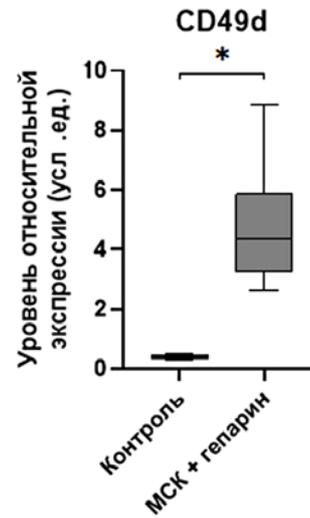


Рис. 5. Уровни относительной экспрессии гена *CD49d* в мезенхимальных стволовых клетках при *in vitro* сокультивировании в присутствии/отсутствии гепарина, срок культивирования – 14 суток. * – статистически значимые различия между группами

Таблица 6. Концентрация (пг/мл) ростовых факторов (HGF, LIF, M-CSF, SCF, IL-3, VEGF) в супернатантах культур мезенхимальных стволовых клеток в условиях культивирования *in vitro* в присутствии/отсутствии гепарина (срок культивирования – 14 дней), Ме (Q1–Q3)

Исследуемые факторы, пг/мл		HGF	LIF	M-CSF	SCF	IL-3	VEGF
Группы исследования	Контрольная группа $n = 6$	35,62 (32,63–38,6)	19,05 (18,79–19,31)	5,04 (4,55–5,67)	5,94 (5,45–6,21)	0,21 (0,19–0,22)	120,04 (115,32–128,09)
	МСК + гепарин $n = 6$	8,59 (6,37–10,81) $p_0 < 0,05$	1,02 (0,92–1,29) $p_0 < 0,05$	1,23 (0,98–1,92) $p_0 < 0,05$	1,09 (1,05–1,21) $p_0 < 0,05$	0,00 (0,00–0,00) $p_0 < 0,05$	165,66 (154,21–172,23) $p_0 < 0,05$

Примечание: $p_0 < 0,05$ – достоверные различия с контрольной группой; n – кол-во наблюдений в каждой группе исследования.

Таблица 7. Концентрация (пг/мл) хемокинов (*SDF-1 α* , *MCP-1*, *IL-8*) и молекул с про- и противовоспалительной активностью (*TNF- α* , *IL-6*, *TRAIL*) в супернатантах культур мезенхимальных стволовых клеток в условиях культивирования *in vitro* в присутствии/отсутствии гепарина (срок культивирования – 14 дней), Ме (Q1–Q3)

Исследуемые факторы, пг/мл		<i>SDF-1α</i>	<i>MCP-1</i>	<i>IL-8</i>	<i>TNF-α</i>	<i>IL-6</i>	<i>TRAIL</i>
Группы исследования	Контрольная группа $n = 6$	105,9 (103,8–118,1)	198,98 (182,13–201,11)	103,15 (69,23–115,23)	2,06 (1,80–3,31)	44,81 (38,15–47,23)	17,01 (15,04–19,02)
	МСК + гепарин $n = 6$	5,34 (3,28–6,40) $p_0 < 0,05$	23,82 (19,12–26,21) $p_0 < 0,05$	15,65 (14,11–25,34) $p_0 < 0,05$	0,94 (0,79–1,02) $p_0 < 0,05$	92,79 (87,13–98,22) $p_0 < 0,05$	2,42 (1,81–3,21) $p_0 < 0,05$

Примечание: $p_0 < 0,05$ – достоверные различия с контрольной группой; n – кол-во наблюдений в каждой группе исследования.

VEGF), хемокины (SDF-1 α , MCP-1, IL-8) и молекулы с про- и противовоспалительной активностью (TNF- α , TRAIL, IL-6).

Согласно полученным данным продукция ростового фактора HGF культурой МСК в группе «МСК + гепарин» была статистически значимо ниже значений, полученных при анализе контрольной группы ($p < 0,05$) (табл. 6). В присутствии гепарина в 2D-культуре наблюдалось снижение уровня ростового фактора LIF и M-CSF относительно контроля ($p < 0,05$). Похожие результаты были получены при анализе уровней ростового фактора SCF и IL-3: значимое снижение в группе «МСК + гепарин» относительно контрольной группы исследования ($p < 0,05$). Также нами были получены результаты, согласно которым в модели «МСК + гепарин» было задетектировано повышение концентрации VEGF относительно контрольной группы исследования ($p < 0,05$).

При сокультивировании МСК с гепарином наблюдалось статистически значимое уменьшение продукции хемокинового фактора SDF-1 α относительно контроля ($p < 0,05$) (табл. 7). Аналогичные результаты были получены при анализе хемокинового фактора MCP-1, цитокина IL-8, провоспалительного фактора TNF- α и провоспалительного/проапоптотического фактора TRAIL ($p < 0,05$) (табл. 7). Интересно, что в модели «МСК + гепарин» концентрация провоспалительного цитокина IL-6 превышала уровень значений в контрольной модели ($p < 0,05$).

Таблица 8. Суммарная площадь островков минерализации на дне лунки культурального пластика при окраске ализариновым красным в культурах мезенхимальных стволовых клеток, культивируемых *in vitro* в присутствии/отсутствии гепарина (срок культивирования – 21 день), Me (Q1–Q3)

Группы исследования	Площадь островков минерализации, мм ² /см ²
Контрольная группа $n = 6$ $n_1 = 55$	0,0 (0,00–0,01)
МСК + гепарин $n = 6$ $n_1 = 100$	1,29 (0,92–1,35) $p_0 < 0,05$

Примечание: $p_0 < 0,05$ – достоверные различия с контрольной группой; n – кол-во наблюдений в каждой группе исследования; n_1 – число снимков для группы исследования.

Дифференцировочный потенциал культуры МСК

Для выявления способности культур МСК к остеоинтеграции в разных условиях культивирования *in vitro* на 21 сутки культивирования была проведена цифровая съемка клеточных культур на инвертированном микроскопе после фиксации культуры формалином и предварительного окрашивания ализариновым красным (рис. 6).

Анализ результатов, полученных по истечении 21-суточного культивирования методом цитологического окрашивания, показал достоверное увеличение (в сравнении контрольной моделью) площади минерализации межклеточного вещества в группе «МСК + гепарин» ($p < 0,05$) (табл. 8).

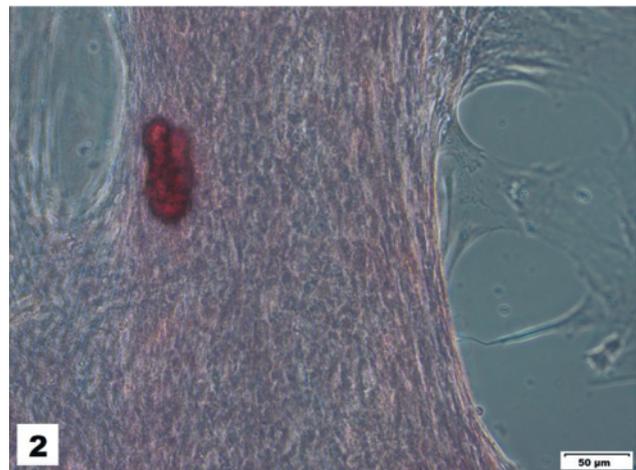
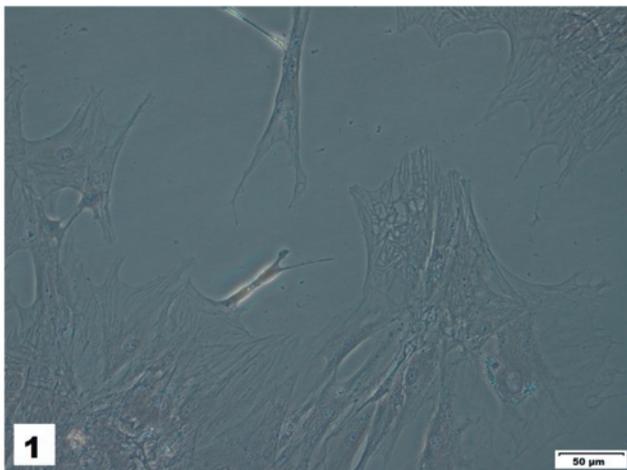


Рис. 6. Морфологическое состояние 21-суточной культуры МСК после сравнительного цитологического окрашивания ализариновым красным участков минерализации межклеточного вещества: 1 – контрольная группа, 2 – МСК + гепарин. Линейка в углу снимков соответствует 50 мкм

Таким образом, в условиях сокультивирования МСК с гепарином *in vitro* усиление минерализации межклеточного вещества может свидетельствовать о дифференцировке МСК в остеогенном направлении.

Обсуждение

Многочисленные исследования по влиянию гепарина на остеогенез *in vitro* и на животных моделях демонстрируют противоречивые результаты относительно остеогенного исхода в зависимости от вида животных или системы культивирования клеток, а также от концентраций, продолжительности и типов используемых фракций гепарина [8]. В исследовании M. Simann et al. (2015) при использовании 20 ЕД/мл нефракционированного гепарина на модели стромальных клеток костного мозга было выявлено повышение остеогенной и снижение их адипогенной дифференцировки [8]. В отличие от этих результатов, другие авторы показали, что длительное культивирование МСК, полученных из костного мозга, с гепарином (в концентрации 160 нг/мл) практически не влияло на их дифференцировку в остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлениях [9]. Как уже упоминалось ранее, гепарин за счет физического взаимодействия с лигандом Wnt3a усиливает передачу сигналов в каноническом Wnt-сигнальном пути через повышение уровней β-катенина, что в конечном итоге влияет на выработку щелочной фосфатазы, генерируя таким образом более мощный остеогенный сигнал линии преостеобластов [4].

Нами было выявлено, что *in vitro* сокультивирование (в течение 14 дней) МСК в разных условиях (с гепарином и без него) значимо не влияло на жизнеспособность клеточных культур — содержание живых клеток было сопоставимо с аналогичными значениями контрольной группы и варьировало в пределах 94% (табл. 1). Полученные нами результаты в отношении культур МСК, культивируемых с гепарином, в целом сопоставимы с данными исследования, проведенного Y. Li et al. (2016), демонстрирующего отсутствие влияния гепарина на жизнеспособность МСК жировой ткани *in vitro* [10].

Обнаруженное снижение экспрессии кластеров дифференцировки CD90, CD73 и CD105 на поверхности клеточной мембраны МСК в модели культивирования в присутствии гепарина может играть решающую роль в решение

судьбы клеточной культуры посредством модуляции дифференцировки в сторону остеобластов (табл. 2). Согласно данным литературы, CD90 высоко экспрессируется во всех типах МСК, что обусловлено недифференцированным статусом культуры [11]. В исследовании D.A. Moraes (2016) было показано, что снижение уровня экспрессии CD90 усиливает дифференцировку МСК в остеогенном и адипогенном направлениях [12].

Отсутствие/снижение экспрессии эндоглина (CD105) на поверхности МСК идентифицирует данную культуру клеток как более восприимчивую к остеогенной дифференцировке [13]. Сообщалось о прогрессирующей со временем потере экспрессии CD105 на поверхности клеток во время культивирования МСК, полученных как из мыши, так и из человека, что в очередной раз подтверждает участие данного рецептора в поддержании стволового состояния культуры МСК [14].

CD73, наряду с CD90 и CD105, является одним из классических маркеров, которые специфически определяют и подтверждают популяцию МСК [15]. K. Kimura et al. (2021) сообщают, что МСК с положительной экспрессией CD73 на своей поверхности демонстрируют повышенную стволовость и потенциал к остеогенной дифференцировке *in vitro* и *in vivo* [16].

Резюмируя вышесказанное: можно отметить, что полученные нами данные о снижении числа клеток, экспрессирующих поверхностные дифференцировочные маркеры МСК (CD90, CD105, CD73), могут свидетельствовать об утрате стволового состояния культуры МСК и приобретении ею состояния, более восприимчивого к дифференцировке в остеогенном направлении.

Использование системы RTCA в проведенном исследовании позволило получить и проанализировать данные относительно влияния гепарина (1 МЕ/мл) на способность МСК к инвазии и пролиферации в условиях сокультивирования *in vitro*. Согласно полученным результатам было выявлено, что гепарин в концентрации 1 МЕ/мл оказывает ингибирующее влияние на миграционную способность культуры МСК (в сравнении с данными, полученными при оценке контрольной группы), что продемонстрировано снижением уровня индекса клеточной миграции в модели «МСК + гепарин»

($p < 0,05$). Ранее в одной из наших работ было показано, что гепарин в высоких концентрациях (1,3; 13; 130; 260 МЕ/мл) проявлял индуцирующее влияние на миграционную активность МСК при их *in vitro* сокультивировании, тем самым повышая миграционную способность данной культуры [17]. F. Seeger et al. (2012) убедительно продемонстрировали, что гепарин блокирует сигнальную передачу между SDF1/CXCR4 посредством физического взаимодействия и связывания как с рецептором, так и с лигандом, таким образом нарушая процессы миграции и хоуминга моноклеарных клеток костного мозга [18]. Данные зарубежных исследователей соответствуют полученным нами результатам.

Кроме того, согласно полученным нами данным, можно сделать вывод о повышении пролиферативной способности МСК в 2D модели при сокультивировании с гепарином (1 МЕ/мл): индекс клеточной пролиферации (ИКП) в этой группе по истечении 92 часов культивирования вырос относительно контрольной модели исследования. Полученные результаты согласуются с данными, предполагающими индуцирующее влияние гепарина на пролиферативную и функциональную активность МСК, что было показано в исследовании S. Laner-Plamberger et al. (2015) [19].

Резюмируя вышесказанное, необходимо отметить, что *in vitro* культивирование МСК в течение 92 часов в присутствии гепарина в концентрации 1 МЕ/мл позволило наблюдать его ингибирующее действие на миграционную активность МСК наряду с индуцирующим влиянием на пролиферативную активность культуры МСК. Логичным представляется тот факт, что если культура МСК утрачивает способность к миграции (при сохранении жизнеспособности), значит происходит переключение процессов и активируются процессы дифференцировки и созревания, заложенные в программе клеток [20]. В данном случае, в контексте настоящего эксперимента, определяющими факторами клеточного поведения МСК могут быть молекулы гепарина.

Результаты по оценке экспрессии мРНК генов остеодифференцировки: *RUNX2*, *BMP2*, *BMP6*, *ALPL* и гена клеточной адгезии *CD49d* демонстрировали высокие уровни в модели «МСК + гепарин» (1 МЕ/мл) относительно контрольной группы.

Ранее было показано влияние гепарина на Wnt-сигнальные пути и другие факторы роста, которые могут регулировать Wnt-зависимую пролиферацию и дифференцировку остеобластов. Через активацию BMP2 гепарин опосредованно регулировал уровни *RUNX2* и, соответственно, продукцию и активность щелочной фосфатазы (*ALPL*), тем самым управляя ранней дифференцировкой в сторону остеобластов [4].

Известно, что *RUNX2* контролирует развитие скелета и дифференцировку остеобластов за счет увеличения экспрессии ряда остеодифференцировочных генов. Кроме того, *RUNX2* индуцирует активность щелочной фосфатазы (*ALPL*) и минерализацию матрикса в мезенхимальных и остеобластных клетках *in vitro* [21, 22].

Выявленный нами рост уровня экспрессии гена *ALPL* в 14-дневных культурах МСК в моделях культивирования в присутствии гепарина также может свидетельствовать в пользу дифференцировки МСК в остеогенном направлении. *ALPL* является маркером костной ткани, экспрессия которого стимулируется обработкой морфогенетическим белком-2 (*BMP2*), активацией рецепторов BMP, а также экспрессией *Dlx5* и *RUNX2* [23]. В целом внутриклеточная экспрессия гена щелочной фосфатазы (*ALPL*) проявляется на ранних этапах остеогенеза [24]. Присутствие данного белка в межклеточной среде необходимо для процесса минерализации внеклеточного матрикса [25]. W. Liu et al. (2018) показали, что мутация *ALPL* нарушает остеогенную дифференцировку МСК, полученных из костного мозга, из-за препятствия активации пути Wnt/ β -катенин [26].

Факт повышения экспрессии мРНК гена *BMP2* в модели «МСК + гепарин» может свидетельствовать в пользу инициации раннего этапа остеодифференцировки в данной модели исследования в связи с тем, что гепарин за счет физического взаимодействия с антагонистами белка *BMP2* способен увеличивать егоработку внутри клетки и активность, что, соответственно, положительно влияет на процесс остеодифференцировки. Гепарин проявляет множество типов биологической активности, связываясь с различными внеклеточными молекулами, тем самым играет ключевую роль в метаболизме различных тканей, в том числе костей. Также гепарин оказывает комплексное воздействие на остеогенную биологическую

активность BMP2. Так, продолжительное культивирование с гепарином стимулировало BMP2-индуцированную остеогенную активность посредством подавления антагонистов BMP2 и опосредуя дифференцировку культуры преостеобластов в сторону остеобластов [27].

BMP6 является костным морфогенетическим белком, проявляющим значительную остеогенную активность. У мышей с делецией гена *BMP6* размер длинных костей был уменьшен, а процесс окостенения грудины занимал больше времени [28]. Было показано, что BMP6 привлекает недифференцированные МСК из окружающих тканевых источников и может стимулировать их пролиферацию и дифференцировку (в остеогенном и хондрогенном направлениях) [29].

Параметры адгезии, включая плотность распределения клеток, межклеточные контакты и форму клеток, могут оказывать влияние на клеточную дифференцировку [30]. Например, в работе R. Peng et al. (2011) однозначно показано, что на дифференцировку отдельной клетки, как адипогенную, так и остеогенную, в значительной степени влияет ее форма [31]. В исследовании Dr. L. Zhang et al. (2019) описано использование потенциально чувствительных поверхностей для регуляции адгезии, а также влияние на управление дифференцировкой стволовых клеток через адгезивную активность [32]. Интересно, что G. Saux et al. (2020) показали, что остеогенная дифференцировка МСК человека ограничивается кадгерин-опосредованными межклеточными сигналами адгезии и стимулируется интегрин-опосредованными сигналами за счет усиления напряжения цитоскелета [33]. Так, интегрин VLA-4, экспрессирующийся на поверхности МСК, состоит из двух субъединиц — $\alpha 4$ и $\beta 1$ (CD49d и CD29 соответственно) и принимает непосредственное участие в процессах клеточной адгезии и миграции [34]. Это было убедительно показано в экспериментах по миграции клеток *ex vivo*, свидетельствующих об участии CD49d в миграции Т-лимфоцитов в мышечную ткань [35].

Интересно отметить, что уровень относительной экспрессии мРНК гена *CD49d* в модели «МСК + гепарин» (1 МЕ/мл) был выше значений, полученных при оценке контрольной модели исследования. Мы предполагаем, что высокая экспрессия *CD49d* может носить компенсаторный характер в связи со способностью молекулы

гепарина связываться с интегрином VLA-4 [36]. Известно, что чем меньше мономеров в составе молекулы гепарина (например, НМГ), тем менее выражен его ингибирующий эффект на адгезию клеток.

Согласно данным литературы, гепарин взаимодействует с большим количеством биологически активных молекул (в т.ч. цитокины, хемокины, факторы роста) [37], потенциально продлевая период их полужизни за счет защиты от протеолитической деградации или усиления их сигнальной способности, опосредованной взаимодействием с рецептором на клеточной поверхности [38].

Анализ уровня секреции ростовых факторов, хемокинов и молекул с про- и противовоспалительным действием в супернатантах клеточных культур на 14-е сутки позволил установить, что при сокультивировании МСК в присутствии гепарина их секреторная способность претерпела значительные изменения. Концентрация исследуемых нами факторов (HGF, LIF, M-CSF, SCF, IL-3, TNF α , TRAIL, SDF-1 α , MCP-1, IL-8, за исключением VEGF и IL-6), определяемых нами в супернатантах культур МСК в модели «МСК + гепарин» была ниже аналогичных значений контрольной группы. Таким образом, гепарин в группе «МСК + гепарин» оказывал ингибирующее влияние на цитокинпродуцирующую активность МСК, за исключением продукции этими клетками VEGF и IL-6, что требует дополнительного исследования.

Причиной выявленных нами изменений, а именно низкого содержания биологически активных молекул в группе «МСК + гепарин», может быть способность гепарина дестабилизировать мРНК цитокинов посредством конкуренции с этими транскриптами мРНК за РНК-связывающие белки [39]. Кроме того, также было показано, что основной сульфатированный гликозаминогликан стромы костного мозга мыши, гепарансульфат, обладает способностью адсорбировать как GM-CSF, так и IL-3.

Однако наши результаты в отношении продукции VEGF и IL-6 находят подтверждение в источниках современной литературы. Так, группой ученых выявлено, что в культуре клеток костного мозга (12 суток), обработанной 100 и 1000 ЕД/мл гепарина натрия, регистрировались высокие уровни продукции VEGF и IL-6,

что предполагает активную экспрессию этих факторов *in vitro* [40]. Эти же авторы предполагают, что гепарин влияет на ряд взаимодействий цитокинов и рецепторов, которые изменяют внутриклеточные сигнальные каскады и профили клеточной экспрессии, включая VEGF и IL-6.

VEGF является мощным ангиогенным фактором, усиливающим дифференцировку эндотелиальных клеток *in vitro* и потенцирующим неоваскуляризацию [41]. Косвенным эффектом VEGF является инициация клеточной судьбы МСК в сторону остеогенной линии, что индуцирует большее количество остеобластов в месте заживления, за счет чего проявляется двойной эффект фактора VEGF [42]. Если ориентироваться на данные литературы, то повышенная продукция VEGF в группе исследования с гепарином может быть связана с процессами ангиогенеза и остеогенным потенциалом воздействующих на МСК факторов [43].

Спустя 14 дней сокультивирования уровень ростового фактора HGF (Hepatocyte growth factor) в модели «МСК + гепарин» был значительно ниже относительно уровня в контрольной группе исследования. Ранее было продемонстрировано, что ростовой фактор HGF вносит решающий вклад в миграцию, пролиферацию, дифференцировку и выживаемость культуры МСК [44]. HGF инициирует клеточную передачу сигналов посредством связывания с рецептором тирозинкиназы MET (сMET), что может привести к усилению миграции, снижению пролиферации и потере стволовых маркеров через активацию сигнальных путей (PI3K-Akt, MEK-МАРК и STAT3) [45]. Таким образом, снижение продукции HGF может повышать миграционную активность и снижать пролиферативную активность МСК, что было продемонстрировано нами полученными результатами с помощью методики RTCA.

Далее нами было оценено влияние гепарина (1 МЕ/мл) в условиях сокультивирования с МСК на формирование культурой участков минерализации межклеточного матрикса на 21-е сутки. Полученные нами данные демонстрировали статистически значимое увеличение площади минерализованной области на пластике в моде-

лях, культивируемых с гепарином (относительно контрольной группы исследования).

Становится очевидным, что минерализация внеклеточного матрикса в культуре МСК, вызванная их созреванием и дифференцировкой в остеогенном направлении при сокультивировании с гепарином (1 МЕ/мл) протекает в условиях не только изменения иммунофенотипического профиля МСК и экспрессии генов остеодифференцировки и клеточной адгезии, но и секреции важных функциональных биомолекул (ростовых факторов, хемокинов, провоспалительных цитокинов и т.д.).

Заключение

Резюмируя вышесказанное, выявленное нами в модели «МСК + гепарин» повышение (в сравнении с контролем) уровней относительной экспрессии мРНК генов остеодифференцировки (*ALPL*, *RUNX2*, *BMP2*, *BMP6*) и адгезии (*CD49d*), увеличение пролиферативной и снижение миграционной активности, а также статистически значимое снижение количества клеток, несущих на себе маркеры МСК (*CD73*, *CD90*, *CD105*), наряду с увеличением площади минерализации в исследуемой клеточной культуре с добавлением гепарина (1 МЕ/мл), может свидетельствовать об участии гепарина в инициации процесса дифференцировки МСК в остеогенном направлении в условиях культивирования *in vitro*.

Полученные результаты интересны в области регенеративной медицины, связанной с системным введением МСК для коррекции хронических заболеваний. С другой стороны, их следует учитывать в послеоперационной тактике ведения пациентов при эндопротезировании крупных суставов. Данные могут послужить базисом для разработки новых стратегий и тактик ведения для пациентов хирургического профиля с высоким риском послеоперационного тромбообразования, в том числе при операциях остеосинтеза.

Финансирование исследования: Данное исследование выполнено при поддержке Государственного задания (FZWM-2020-0010).

Funding: Study performed under state assignment (FZWM-2020-0010).

Литература

1. Labarrere CA, Dabiri AE, Kassab GS. Thrombogenic and Inflammatory Reactions to Biomaterials in Medical Devices. *Front. Bioeng. Biotechnol*, 2020;8:123.
2. Han Q, Shea SM, Arleo T, Qian JY, Ku DN. Thrombogenicity of biomaterials depends on hemodynamic shear rate. *Artificial organs*. 2022;46(4):606–617.
3. Shah FA, Thomsen P, Palmquist A. Osseointegration and current interpretations of the bone-implant interface. *Acta Biomaterialia*. 2019;84:1–15.
4. da Costa FHB, Lewis MS, Truong A, Carson DD, Farach-Carson MC. SULF1 suppresses Wnt3A-driven growth of bone metastatic prostate cancer in perlecan-modified 3D cancer-stroma-macrophage triculture models. *Plos One*. 2020;15(5):e0230354.
5. Brkljacic J, Pauk M, Erjavec I, Cipic A, Grgurevic L, Zadro R., Inman GJ, Vukicevic S. Exogenous heparin binds and inhibits bone morphogenetic protein 6 biological activity. *International Orthopaedics*. 2013;37(3):529–541.
6. Moll G, Ankrum JA, Olson SD, Nolte JA. Improved MSC Minimal Criteria to Maximize Patient Safety: A Call to Embrace Tissue Factor and Hemocompatibility Assessment of MSC Products. *Stem Cells Translational Medicine*. 2022;11(1):2–13.
7. Broeke J, Pérez JMM, Pascau J. *Image Processing with Image J*. 2nd Edition. UK: Packt Publishing (2015). 256 p.
8. Simann M, Schneider V, Le Blanc S, Dotterweich J, Zehe V, Krug M, Jakob F, Schilling T, Schütze N. Heparin affects human bone marrow stromal cell fate: Promoting osteogenic and reducing adipogenic differentiation and conversion. *Bone*. 2015;78:102–113.
9. Ling L, Camilleri ET, Helledie T, Samsonraj RM, Titmarsh DM, Chua RJ, Dreesen O, Dombrowski C, Rider DA, Galindo M, Lee I, Hong W, Hui JH, Nurcombe V, van Wijnen AJ, Cool SM. Effect of heparin on the biological properties and molecular signature of human mesenchymal stem cells. *Gene*. 2016;576(1):292–303.
10. Li Y, Fung J, Lin F. Local Inhibition of Complement Improves Mesenchymal Stem Cell Viability and Function After Administration. *Molecular Therapy*. 2016; 24(9):1665–1674.
11. Jain M, Minocha E, Tripathy NK, Singh N, Chaturvedi CP, Nityanand S. Comparison of the Cardiomyogenic Potency of Human Amniotic Fluid and Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *International Journal of Stem Cells*. 2019;12:449–456.
12. Moraes DA, Sibov TT, Pavon LF, Alvim PQ, Bonadio RS, Da Silva JR, Pic-Taylor A, Toledo OA, Marti LC, Azevedo RB, Oliveira DM. A reduction in CD90 (THY-1) expression results in increased differentiation of mesenchymal stromal cell. *Stem Cell Research & Therapy*. 2016;7:97.
13. Qu C, Brohlin M, Kingham PJ, Kelk P. Evaluation of growth, stemness, and angiogenic properties of dental pulp stem cells cultured in cGMP xeno-/serum-free medium. *Cell and Tissue Research*. 2020;380:93–105.
14. Pham LH, Vu NB, Pham PV. The subpopulation of CD105 negative mesenchymal stem cells show strong immunomodulation capacity compared to CD105 positive mesenchymal stem cells. *Biomedical Research and Therapy*. 2019;6(4):3131–3140.
15. Tan K, Zhu H, Zhang J, Ouyang W, Tang J, Zhang Y, Qiu L, Liu X, Ding Z, Deng X. CD73 Expression on Mesenchymal Stem Cells Dictates the Reparative Properties via Its Anti-Inflammatory Activity. *Stem Cells International*. 2019;2019:12.
16. Kimura K, Breitbach M, Schildberg FA, Hesse M, Fleischmann BK. Bone marrow CD73+ mesenchymal stem cells display increased stemness *in vitro* and promote fracture healing *in vivo*. *Bone Reports*. 2021;15:101–133.
17. Норкин ИК, Юрова КА, Хазиахматова ОГ, Мелашченко ЕС, Мелашченко ВВ, Шунькин ЕО и др. Стимулирующее влияние высоких доз гепарина на миграционную активность и сохранение стволовости МСК в присутствии остеозамещающих материалов. *Медицинская иммунология*. 2021;23(4):831–838. DOI: 10.15789/1563-0625-SEO-228
Norkin IK, Yurova KA, Khaziakhmatova OG, Melashchenko ES, Malashchenko VV, Shunkin EO, Khlusov IA, Litvinova LS. Stimulating effect of high dose heparin on migration activity and MSC stemness preservation in the presence of bone-substituting materials. *Medical Immunology/Meditsinskaya Immunologiya*, 2021, Vol. 23, no. 4, pp. 831–838. DOI: 10.15789/1563-0625-SEO-228

18. Seeger FH, Rasper T, Fischer A, Muhly-Reinholz M, Hergenreider E, Leistner DM, Sommer K, Manavski Y, Henschler R, Chavakis E, Assmus B, Zeiher AM, Dimmeler S. Heparin disrupts the CXCR4/SDF-1 axis and impairs the functional capacity of bone marrow-derived mononuclear cells used for cardiovascular repair. *Circulation Research*. 2012;111(7):854–862.
19. Laner-Plamberger S, Lener T, Schmid D, Streif DA, Salzer T, Öller M, Hauser-Kronberger C, Fischer T, Jacobs VR, Schallmoser K, Gimona M, Rohde E. Mechanical fibrinogen-depletion supports heparin-free mesenchymal stem cell propagation in human platelet lysate. *Journal of Translational Medicine*. 2015;13:354.
20. Fu X, Liu G, Halim A, Ju Y, Luo Q, Song G. Mesenchymal Stem Cell Migration and Tissue Repair. *Cells*. 2019;8(8):784.
21. Kim J, Yang Y, Park KH, Ge X, Xu R, Li N, et al. A RUNX2 stabilization pathway mediates physiologic and pathologic bone formation. *Nature Communications*. 2020;11:2289.
22. Iyyanara PPR, Thangaraja MP, Eames BF, Nazarali AJ. Htra1 is a Novel Transcriptional Target of RUNX2 That Promotes Osteogenic Differentiation. *Cell Physiol Biochem*. 2019;53(5):832–850.
23. Yu S, Guo J, Sun Z, Lin C, Tao H, Zhang Q, et al. BMP2-dependent gene regulatory network analysis reveals Klf4 as a novel transcription factor of osteoblast differentiation. *Cell Death & Disease*. 2021;12:197.
24. Vimalraj S. Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization. *Gene*. 2020;754:144855.
25. Zheng J, Zhao F, Zhang W, Mo Y, Zeng L, Li X, Chen X. Sequentially-crosslinked biomimetic bioactive glass/gelatin methacryloyl composites hydrogels for bone regeneration. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 2018; 89:119–127.
26. Liu W, Zhang L, Xuan K, Hu C, Li L, Zhang Y, Jin F, Jin Y. Alkaline Phosphatase Controls Lineage Switching of Mesenchymal Stem Cells by Regulating the LRP6/GSK3 β Complex in Hypophosphatasia. *Theranostics*. 2018;8(20):5575–5592.
27. Smith RAA, Murali S, Rai B, Lu X, Lim ZXH, Lee JLL, et al. Minimum structural requirements for BMP-2-binding of heparin oligosaccharides. *Biomaterials*. 2018;184:41–55.
28. Perry MJ, McDougall KE, Hou S, Tobias JH. Impaired growth plate function in *bmp-6* null mice. *Bone*. 2008;42(1):216–225.
29. Jeon H, Yoon K, An ES, Kang T-W, Sim Y-B, Ahn J, et al. Therapeutic Effects of Human Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells Combined with Cartilage Acellular Matrix Mediated Via Bone Morphogenic Protein 6 in a Rabbit Model of Articular Cruciate Ligament Transection. *Stem Cell Reviews and Reports*. 2020;16:596–611.
30. Wang X, Ye K, Li Z, Yan C, Ding J. Adhesion, proliferation, and differentiation of mesenchymal stem cells on RGD nanopatterns of varied nanopacings. *Organogenesis*. 2013;9(4):280–286.
31. Vasilevich AS, Vermeulen S, Kamphuis M, Roumans N, Eroumé S, Hebels DGJ, et al. On the correlation between material-induced cell shape and phenotypical response of human mesenchymal stem cells. *Scientific Reports*. 2020;10:18988.
32. Zhang L, Wang Z, Das J., Labib M, Ahmed S, Sargent EH, Kelley SO. Potential-Responsive Surfaces for Manipulation of Cell Adhesion, Release, and Differentiation. *Angewandte Chemie International Edition*. 2019;58(41):14519–14523.
33. Le Saux G, Wu MC, Toledo E, Chen Y-Q, Fan Y-J, Kuo J-C, Schwartzman M. Cell–Cell Adhesion-Driven Contact Guidance and Its Effect on Human Mesenchymal Stem Cell Differentiation. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2020;12(20):22399–22409.
34. Chigaev A, Smagley Y, Sklar LA. Carbon monoxide down-regulates $\alpha 4\beta 1$ integrin-specific ligand binding and cell adhesion: a possible mechanism for cell mobilization. *BMC Immunology*. 2014;15:52.
35. Pinto-Mariz F, Carvalho LR, Araujo APDQC, Mello WD, Ribeiro MG, Cunha MDCSA, et al. CD49d is a disease progression biomarker and a potential target for immunotherapy in Duchenne muscular dystrophy. *Skeletal Muscle*. 2015;5:45.
36. Gockel LM, Heyes M, Li H, Nahain AA, Gorzelanny C, Schlesinger M, et al. Inhibition of Tumor–Host Cell Interactions Using Synthetic Heparin Mimetics. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2021;13(6):7080–7093.

К.А. Юрова и др.

Изменение остеодифференцировочного потенциала культуры МСК-ЖТ при *in vitro* сокультивировании с гепарином

37. Le Gall J, Dehainault C, Benoist C, Matet A, Lumbroso-Le Rouic L, et al. Highly Sensitive Detection Method of Retinoblastoma Genetic Predisposition and Biomarkers. *The Journal of molecular diagnostics: JMD*. 2021;23(12):1714–1721.
38. Chiodelli P, Bugatti A, Urbinati C, Rusnati M. Heparin/Heparan Sulfate Proteoglycans Glycomic Interactome in Angiogenesis: Biological Implications and Therapeutical Use. *Molecules*. 2015;20(4):6342–6388.
39. Abbadi A, Loftis J, Wang A, Yu M, Wang Y, Shakya S, et al. Heparin inhibits proinflammatory and promotes anti-inflammatory macrophage polarization under hyperglycemic stress. *Journal of biological chemistry*. 2020;295(15):4849–4857.
40. Dregalla RC, Herrera JA, Koldewyn LS, Donner EJ. The Choice of Anticoagulant Influences the Characteristics of Bone Marrow Aspirate Concentrate and Mesenchymal Stem Cell Bioactivity In Vitro. *Stem Cells International*. 2022;2022:1–12.
41. Ge Q, Zhang H, Hou J, Wan L, Cheng W, Wang X, et al. VEGF secreted by mesenchymal stem cells mediates the differentiation of endothelial progenitor cells into endothelial cells via paracrine mechanisms. *Molecular Medicine Reports*. 2018;17(1):1667–1675.
42. Berendsen AD, Olsen BR. How vascular endothelial growth factor-A (VEGF) regulates differentiation of mesenchymal stem cells. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*. 2014;62(2):103–108.
43. Hu K, Olsen BR. The roles of vascular endothelial growth factor in bone repair and regeneration. *Bone*. 2016;91:30–38.
44. Witt R, Weigand A, Boos AM, Cai A, Dippold D, Boccaccini AR, et al. Mesenchymal stem cells and myoblast differentiation under HGF and IGF-1 stimulation for 3D skeletal muscle tissue engineering. *BMC Cell Biology*. 2017;18:15.
45. Frisch RN, Curtis KM, Aenlle KK, Howard GA. Hepatocyte Growth Factor and Alternative Splice Variants — Expression, Regulation and Implications in Osteogenesis and Bone Health and Repair. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2016;20(9):1087–1098.

Об авторах

Юрова Кристина Алексеевна — к.м.н., с.н.с. Центра иммунологии и клеточных биотехнологий Балтийского федерального университета им. Иммануила Канта.

Хазиахматова Ольга Геннадьевна — к.б.н., с.н.с. Центра иммунологии и клеточных биотехнологий Балтийского федерального университета им. Иммануила Канта.

Малашенко Владимир Владимирович — к.б.н., н.с. Центра иммунологии и клеточных биотехнологий Балтийского федерального университета им. Иммануила Канта.

Мелашенко Ольга Борисовна — н.с. Центра иммунологии и клеточных биотехнологий Балтийского федерального университета им. Иммануила Канта.

Хлусов Игорь Альбертович — профессор, д.м.н., г.н.с. Центра иммунологии и клеточных биотехнологий Балтийского федерального университета им. Иммануила Канта.

Лигатюк Денис Дмитриевич — инженер Центра иммунологии и клеточных биотехнологий Балтийского федерального университета им. Иммануила Канта.

Иванов Павел Александрович — к.м.н., м.н.с. Центра иммунологии и клеточных биотехнологий Балтийского федерального университета им. Иммануила Канта.

Литвинова Лариса Сергеевна — д.м.н., директор Центра иммунологии и клеточных биотехнологий Балтийского федерального университета им. Иммануила Канта.

Authors

Kristina A. Yurova — PhD, Senior Researcher Center for Immunology and Cellular Biotechnologies of Immanuel Kant Baltic Federal University.

Olga G. Khaziakhmatova — PhD, senior researcher Center for Immunology and Cellular Biotechnologies of Immanuel Kant Baltic Federal University.

Vladimir V. Malashchenko — PhD, researcher Center for Immunology and Cellular Biotechnologies of Immanuel Kant Baltic Federal University.

Olga B. Melashchenko — researcher Center for Immunology and Cellular Biotechnologies of Immanuel Kant Baltic Federal University.

Igor A. Khlusov — Professor, Doctor of Medical Sciences, Senior Researcher, Center for Immunology and Cellular Biotechnologies of Immanuel Kant Baltic Federal University.

Denis D. Ligatyuk — Engineer, Center for Immunology and Cellular Biotechnology of Immanuel Kant Baltic Federal University.

Pavel A. Ivanov — PhD, Junior Researcher at the Center for Immunology and Cellular Biotechnologies of Immanuel Kant Baltic Federal University.

Larisa S. Litvinova — Doctor of Medical Sciences, Director of the Center for Immunology and Cellular Biotechnologies of Immanuel Kant Baltic Federal University.