

DOI: 10.15690/vramn882

А.П. Лыков^{1,2}, О.В. Повещенко^{1,2}, Н.А. Бондаренко^{1,2}, М.А. Суровцева^{1,2}, И.И. Ким^{1,2}

¹ Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Российская Федерация

² Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина, Новосибирск, Российская Федерация

Усиление адгезии стволовых прогениторных клеток к синтетическим материалам внеклеточным матриксом

Обоснование. Тканеинженерные сосудистые протезы малого диаметра нашли свое широкое применение при операциях шунтирования. Однако скорость заселения протезов эндотелиоцитами недостаточна. **Цель исследования** — изучение адгезии эндотелиальных прогениторных клеток и мезенхимных стволовых клеток к синтетическим материалам (полистерол, политетрафторэтилен), преобразованным внеклеточным матриксом (желатин, фибронектин, коллаген) *in vitro*. **Методы.** Для проведения исследования эндотелиальные прогениторные клетки (ЭПК) выделяли из периферической крови больных ишемической болезнью сердца, мезенхимные стволовые клетки (МСК) — из костного мозга крыс линии Wistar. Для определения фенотипа ЭПК использовали коммерческие моноклональные антитела для проточной цитофлуориметрии. Для получения ранних и поздних ЭПК из мононуклеаров периферической крови клетки растили в течение 8 и 16 сут на подложке из желатина или фибронектина. Для оценки уровней продукции цитокинов и оксида азота ранними и поздними ЭПК на 8-е и 16-е сут роста при кондиционировании с желатином или фибронектином использовали коммерческие наборы для твердофазного иммуноферментного анализа. Для проведения исследования МСК выделяли из костного мозга крыс. Для определения принадлежности прилипшей фракции ядродержащих клеток костного мозга оценивали морфологию клеток, дифференцировку в адипогенном и остеогенном направлении. Для проведения оценки миграции МСК в режиме реального времени в течение 24 ч на приборе Cell-IQ использовали тест закрытия/заживления раны. Для оценки уровней продукции цитокинов и оксида азота МСК использовали коммерческие наборы для твердофазного иммуноферментного анализа; для оценки усиления адгезии МСК к сосудистым протезам из политетрафторэтилена — компоненты внеклеточного матрикса (фибронектин, коллаген I и IV типа). **Результаты.** Показано, что эндотелиальные прогениторные клетки, адгезируют как к желатину, так и к фибронектину, продемонстрировано также влияние данных компонентов внеклеточного матрикса на уровни продукции цитокинов ранними и поздними эндотелиальными клетками. Сочетание фибронектина с коллагеном I или IV типа или их комбинацией способствует адгезии к политетрафторэтилену и заселению графта. **Заключение.** Преобработка синтетического материала (полистирол, политетрафторэтилен) усиливает адгезию и рост ЭПК и МСК, что может быть использовано для создания тканеинженерных сосудистых протезов малого диаметра для аортокоронарного шунтирования с заданными условиями заселения их клетками, вовлеченными в формирование неоинтимы.

Ключевые слова: желатин, фибронектин, коллаген I и IV типа, стволовые/прогениторные клетки, адгезия.

(Для цитирования: Лыков А.П., Повещенко О.В., Бондаренко Н.А., Суровцева М.А., Ким И.И. Усиление адгезии стволовых прогениторных клеток к синтетическим материалам внеклеточным матриксом. *Вестник РАМН.* 2017;72 (5):336–345. doi: 10.15690/vramn882)

Обоснование

Согласно статистике Всемирной организации здравоохранения, смертность от заболеваний сердечно-сосудистой системы занимает первое место во всем мире (данные 2013 г.). Одним из способов лечения патологии сердца, вызванной окклюзией сосудов, в частности при атеросклерозе коронарных артерий, является аортокоронарное шунтирование [1]. Одно из осложнений операции в отдаленном периоде — тромбирование просвета синтетического протеза (кондуита) [2]. Риск тромбирования кондуитов тем выше, чем меньше их диаметр [2, 3]. Другой проблемой при проведении операции аортокоронарного шунтирования является наличие аутологичного сосудистого материала соответствующего диаметра, длины и надлежащего качества. Использование сосудистых ксенопротезов также имеет недостатки — риск внесения инфекций, аллергия и развитие острой иммунной реакции организма реципиента на чужеродные антигены [4]. В последнее время широкое применение при операциях шунтирования сосудов получили сосудистые протезы синтетического происхождения. В то же время сохраняется высокий риск тромбирования таких сосудистых

протезов, что диктует постоянный прием пациентами антикоагулянтов [5]. Кроме этого, возникает проблема заселения синтетического протеза клеточными элементами сосудистой стенки: зачастую наблюдаются чрезмерная гиперплазия неоинтимы, ускоренная пролиферация и дифференцировка соединительной ткани, а также отставание в росте эндотелиоцитов; адгезия тромбоцитов к незаселенным участкам синтетических сосудистых протезов способствует реокклюзии [6]. Это диктует создание искусственных тканеинженерных сосудистых протезов малого диаметра с последующим заселением их внутренней поверхности аутологичными эндотелиальными клетками, а внешней поверхности — мезенхимными стволовыми клетками [3]. Существенным недостатком таких тканеинженерных сосудистых протезов является проблема заселения их аутологичными клетками. В качестве источника эндотелиальных прогениторных клеток (ЭПК) и мезенхимных стволовых клеток (МСК) могут быть использованы аутологичный костный мозг или обогащенная стволовыми/прогениторными клетками периферическая кровь после проведения процедуры мобилизации этих клеток из костного мозга в периферическое русло гранулоцитарным колониестимулирующим

фактором (Granulocyte-colony stimulating factor, G-CSF). ЭПК через последовательную дифференцировку (ранние и поздние ЭПК) созревают в эндотелиоциты и могут использоваться для заселения сосудистых протезов, а МСК в силу способности к цитодифференцировке в различные ткани соединительной системы могут использоваться для формирования адвентиции.

Наиболее часто используемым синтетическим материалом для формирования сосудистых протезов является политетрафторэтилен, в силу гидрофобности к нему плохо адгезируют клетки, в частности МСК, и не формируют сплошное заселение поверхности протеза. В то же время обработка протезов компонентами внеклеточного матрикса может усилить прикрепление клеток к поверхности сосудистых протезов.

Цель исследования — изучение адгезии эндотелиальных прогениторных и мезенхимных стволовых клеток к синтетическим материалам (полистерол, политетрафторэтилен), предобработанным внеклеточным матриксом (желатин, фибронектин, коллаген) *in vitro*.

Методы

Дизайн исследования

Проведено экспериментальное моноцентровое нерандомизированное одномоментное исследование.

Критерии соответствия

Критерии включения

Больные ишемической болезнью сердца, которые находились на обследовании и плановом хирургическом лечении в ФГБУ «НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России в 2016–2017 гг.

Больные дали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

В работе также использованы крысы-самки линии Wistar массой 250–300 г в возрасте 10–12 нед.

Критерии исключения

Наличие в анамнезе заболеваний вирусным гепатитом В, С.

Условия проведения

Исследование проводилось на базе лаборатории клеточных технологий НИИКЭЛ — филиал ИЦиГ СО РАН (Новосибирск). Забор периферической крови и процедуру программного цитофереза проводили на базе НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина Минздрава России (Новосибирск). Образцы крови доставляли в лабораторию клеточных технологий НИИКЭЛ — филиал ИЦиГ СО РАН в герметичных стерильных контейнерах. Дальнейшие манипуляции с образцами проводили с соблюдением всех правил асептики. Всем пациентам проведено общеклиническое обследование, в том числе исследование общего анализа крови до введения G-CSF и начиная со вторых суток после первого введения препарата по 6-е сут включительно.

Крысы-самки линии Wistar содержались по 5 голов в клетке при температуре воздуха 20–25°C, влажности воздуха 70–80%, 12-часовом режиме дня (день/ночь), имели свободный доступ к еде и воде.

Клетки крови человека и клетки костного мозга крыс культивировали при температуре 37°C в CO₂-инкубаторе (5% CO₂, 95% воздуха) (Sanyo, Япония).

Образцы кондиционных сред от ранних и поздних эндотелиальных/прогениторных клеток человека собирали на 8-е и 16-е сут кондиционирования с желатином или

A.P. Lykov^{1, 2}, O.V. Poveshchenko^{1, 2}, A.N. Bondarenko^{1, 2}, M.A. Surovtseva^{1, 2}, I.I. Kim^{1, 2}

¹ Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology — Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

² Research Institute of Circulation Pathology, Novosibirsk, Russian Federation

Stem/Progenitor Cells Adhesion Strengthening to Synthetic Material Using Extracellular Matrix

Background: Tissue-engineered vascular grafts of small diameter have being widely used in coronary artery bypass grafting. However, the rate of settling of these grafts with endothelial cells is insufficient. **Aims:** The aim of the study was to selucidate the adhesion of endothelial progenitor cells and mesenchymal stem cells to synthetic materials (polystyrol, polytetrafluoroethylene) preprocessed with extracellular matrix (gelatin, fibronectin, collagen) *in vitro*. **Materials and methods:** For the study, the endothelial progenitor cells (EPC) were isolated from the peripheral blood of patients with ischemic heart disease, and mesenchymal stem cells (MSC) — from bone marrow of Wistar rats. Commercial monoclonal antibodies for flow-cytometry were used to determine the phenotype of EPC. To isolate the early and late EPC from mononuclear cells of peripheral blood, cells were raised for 8 and 16 days on a gelatin or fibronectin based substrate. The commercial kits for enzyme linked immunoassay were applied to assess levels of cytokine production and nitric oxide by early and late EPC conditioned by gelatin or fibronectin on the 8th and 16th days of growth. To conduct the study the MSC were isolated from bone marrow of rats. To determine the attachment of adherent fraction of nucleated bone marrow cells, cell morphology, the adipogenic and osteogenic differentiation were evaluated. To assess migration of MSC in real time within 24 hours on the device Cell-IQ, we used «closure/wound healing» test. The commercial kits for enzyme linked immunoassay were applied to assess levels of cytokine production and nitric oxide by MSC; and components of the extracellular matrix (fibronectin, collagen I and type IV) — to assess the increased adhesion of MSC to the polytetrafluoroethylene. **Results:** The results demonstrated that endothelial progenitor cells adhere to both gelatin and fibronectin and confirmed the influence of these extracellular matrix components on the cytokine levels produced by early and late endothelial cells. The combination of fibronectin with type I or IV collagen or the combination of thereof promotes the adhesion to polytetrafluoroethylene and colonization of the graft. **Conclusions:** Preprocessing of synthetic material (polystyrene, polytetrafluoroethylene) enhances adhesion and growth of EPC and MSC which can be implemented when creating tissue-engineered vascular grafts for small diameter coronary artery bypass grafting with specified conditions of settlement by the cells involved in neointima formation.

Key words: gelatin, fibronectin, collagen I and IV type, stem progenitor cells, adhesion.

(For citation) Lykov AP, Poveshchenko OV, Bondarenko AN, Surovtseva MA, Kim II. Stem/Progenitor Cells Adhesion Strengthening to Synthetic Material Using Extracellular Matrix. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2017;72 (5):336–345. doi: 10.15690/vramn882)

фибронектином; образцы мезенхимных стволовых клеток крыс от 4-го пассажа собирали и хранили при -70°C до одномоментного проведения твердофазного иммуноферментного анализа.

Продолжительность исследования

Исследования выполняли в день получения биологического материала: после выделения мононуклеарных клеток из периферической крови больных до и после мобилизации стволовых/прогениторных клеток G-CSF, а также после выделения ядродержащих клеток из бедренных костей крыс. Культивирование ранних (незрелых) и поздних (зрелых) ЭПК проводили в течение 19 дней. Культивирование МСК крыс осуществляли в течение 4 нед. Заселение фрагментов сосудистых протезов из политетрафторэтилена проводили в течение 6 нед. Все исследования проводили в первой половине дня (с 8.00 до 13.00 ч).

Описание медицинского вмешательства

Мобилизацию из костного мозга в периферическое русло стволовых/прогениторных клеток у больных ишемической болезнью сердца осуществляли на базе НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина путем подкожного введения G-CSF (Grasvalva, Израиль) в дозировке 350 мкг однократно в сутки общим количеством 5 инъекций [7]. Побочных эффектов от введения G-CSF у больных не выявлено.

Забор крови из локтевой вены осуществляли до проведения процедуры мобилизации стволовых/прогениторных клеток (с 8.00 до 9.00) натощак. Контроль уровня лейкоцитов и тромбоцитов в периферической крови осуществляли ежедневно, начиная с последующего дня после первого введения G-CSF. На 6-е сут от момента мобилизации стволовых/прогениторных клеток G-CSF больным проводили процедуру аппаратного цитафереза на сепараторе клеток крови MCS+ (Haemonetics, США) [7]. Использовалась программа PBSC — получение периферических стволовых клеток (параметры циркуляции и рециркуляции: recirculation № 2, recirc ratio 1:3). У больных ишемической болезнью сердца взятие образцов крови производили в стандартные вакуумные пробирки с коагулянтом в количестве 5 мл, а аферезный продукт — в пакеты с коагулянтом в количестве 50–70 мл.

Исходы исследования

Основной исход исследования

Процент прироста стволовых/прогениторных клеток в периферической крови после процедуры мобилизации G-CSF, колонии ранних и поздних ЭПК, степень заселения фрагментов сосудистых протезов МСК.

Дополнительные исходы исследования

Определен фенотип ЭПК человека, мобилизованных в периферическое русло G-CSF, МСК крыс на основании цитодифференцировки в соединительнотканном направлении; изучен миграционный потенциал МСК; определены уровни продукции цитокинов ЭПК и МСК, характеризующие морфофункциональные свойства клеток.

Анализ в подгруппах

При формировании группы больных ишемической болезнью сердца использовали такие показатели, как функциональный класс сердечной недостаточности (III–IV по Нью-Йоркской классификации, NYHA), возраст 50–70 лет, пол. Участники на группы не подразделялись. Поскольку объектом исследования являлись мононуклеарные клетки периферической крови и мобилизованные

путем введения G-CSF в периферическое русло стволовые/прогениторные клетки костного мозга, деление данной группы по половому признаку не осуществляли.

При формировании группы животных использовали такие показатели, как пол, масса тела, возраст, порода.

Методы регистрации исходов

Для получения ЭПК из венозной крови и аферезного продукта образцы выделяли на градиенте плотности фикоколл-верографин ($\rho=1,077$ г/л, Пан-Эко, Россия) центрифугированием при 3000 об./мин в течение 20 мин, в течение 5 мин дважды отмывали при 1000 об./мин, в течение 5 мин — в забуференном физиологическом растворе, осадок ресуспендировали в забуференном физиологическом растворе. Фенотип циркулирующих в периферической крови и в аферезном продукте ЭПК исследовали в 1-й день получения биологического материала и определяли на основании экспрессии поверхностных маркеров, характерных для ранних (CD45, CD34, CD133) и поздних (KDR) ЭПК [8], с использованием коммерческих моноклональных антител на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (BD, США). Ранние и поздние ЭПК растили в культуральных флаконах, преобработанных желатином или фибронектином [9]. Для этого предварительно мононуклеарные клетки крови пациентов в концентрации 1×10^6 кл./см² растили в питательной среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Дульбекко двойная модификация среды Игла) с добавлением 80 мкМ/мл гентамицина сульфата, 2 мМ L-глутамин и 10% фетальной телячьей сыворотки (FCS; Hyclone, США) при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 3 сут. Неприлипшую фракцию мононуклеаров удаляли, а прилипшую фракцию клеток снимали 0,25% раствором трипсина / 0,02% раствором ЭДТА (динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты), далее клетки осаждали центрифугированием при 1000 об./мин в течение 5 мин в забуференном физиологическом растворе, ресуспендировали в среде DMEM и рассеивали в концентрации 1×10^6 кл./см² во флаконы, преобработанные 0,2% раствором желатина или 0,01% раствором фибронектина (Sigma, США). Каждые 3–4 дня меняли среду. О росте ранних и поздних ЭПК судили на 8-е и 16-е сут. Для оценки функционального потенциала ранних и поздних ЭПК и влияния на него условий кондиционирования клеток были выбраны уровни продукции цитокинов и оксида азота на 8-е (рост ранних ЭПК в культуре клеток) и 16-е (рост поздних ЭПК в культуре клеток) сутки. Цитокинпродуцирующую активность ранних и поздних ЭПК исследовали твердофазным иммуноферментным анализом с использованием коммерческих наборов для фактора некроза опухоли альфа (Tumor necrosis factor, TNF α), интерлейкинов (Interleukin, IL) 10, 18, 8, эритропоэтина (Erythropoietin, Epo), G-CSF, фактора роста эндотелия сосудов (Vascular endothelial growth factor, VEGF) (Вектор-Бест, Россия) на спектрофотометре Stat Fax 2100 (США). Уровни стойких метаболитов оксида азота (NO) в кондиционных средах ранних и поздних ЭПК исследовали спектрофотометрически с использованием реактива Грисса.

Для получения МСК ядродержащие клетки из бедренных костей крыс ресуспендировали в забуференном физиологическом растворе и осаждали центрифугированием при 1000 об./мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость сливали, осадок ресуспендировали в среде DMEM (Биолот, Россия) с добавлением 80 мкМ/мл гентамицина сульфата (Дальхимфарм, Россия), 2 мМ L-глутамин (ICN, США) и 10% FCS, далее пересевали во флаконы в концентрации 1×10^6 ядродержащих кл./см²

и растили в течение 3 сут при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Неприлипшую фракцию ядросодержащих клеток удаляли, а к оставшимся клеткам вносили среду и растили до получения конфлюэнтного монослоя в 80–90%. Смену среды осуществляли каждые 3–4 дня. Пересев МСК осуществляли снятием клеток 0,25% раствором трипсина / 0,02% раствором ЭДТА, далее клетки осаждали центрифугированием при 1000 об./мин в течение 5 мин в забуференном физиологическом растворе, ресуспендировали в среде DMEM и рассеивали по флаконам в концентрации 1×10⁶ кл./см². Такую процедуру осуществляли трижды, в работе использовали МСК от 4-го пассажа.

Верификацию принадлежности прилипшей фракции ядросодержащих клеток к МСК оценивали на основании дифференцировки в соединительнотканном направлении (жировая ткань, костная ткань). Для этого 1×10⁶ МСК на см² растили в DMEM с добавлением 80 мкМ/мл гентамицина сульфата, 2 мМ L-глутамина и 10% FCS в присутствии факторов адипогенной дифференцировки 5×10⁻⁶ М дексаметазона, 10 мкг/мл инсулина и 0,5 мМ изобутилметилксантина (Sigma, США) и факторов остеогенной дифференцировки 5×10⁻⁷ М дексаметазона, 10 мМ β-глицерофосфата натрия и 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты (Sigma, США) при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в чашках Петри. Клетки культивировали 14 дней, замену среды осуществляли каждые 3–4 дня. Далее клетки красили Oil Red-O (масляный красный O) для выявления жиров и AgNO₃ (азотнокислое серебро) для выявления депозитов кальция в клетках (все красители производства Sigma, США).

О функциональной активности МСК судили по уровню миграционной активности в тесте заживления/закрытия раневого дефекта в режиме реального времени в течение 24 ч. Для этого 1×10⁴ МСК на лунку вносили в 96-луночные плоскодонные планшеты на 24 ч в культуральной среде для адгезии к пластику. Через 24 ч в центре лунки наносили на рану кончиком наконечника 200 мкл, слущенные клетки удаляли двукратным промыванием лунки забуференным физиологическим раствором, вносили среду DMEM с добавлением 80 мкМ/мл гентамицина сульфата, 2 мМ L-глутамина и 10% FCS. Планшет помещали в аппарат Cell-IQ (CM Technologies, Финляндия), в котором подается газовая смесь (95% кислорода и 5% CO₂), задавали условия съемки параметров в лунке (количество полей просмотра — 16, интервал между съемками — 15 мин), в результате чего аппарат в автоматическом режиме производил сканирование выбранных областей лунки и сохранял результаты в виде изображений. Оценка результатов исследований производилась с использованием пакета программ Cell-IQ analyzer (Roche Applied Science, Германия).

О функциональном потенциале МСК судили также по уровням продукции клетками цитокинов и оксида азота. Уровни в кондиционной среде от МСК TNFα, IL10, IL8, IL6, IL4, IL4, гранулоцитарно-макрофагального колоние-стимулирующего фактора (GM-CSF), интерферона-гамма (Interferon-gamma, IFNγ) определяли с использованием коммерческих наборов производства «Вектор-БЕСТ» (Новосибирск, Россия). Уровень продукции NO исследовали с использованием реактива Грисса.

О равномерности заселения фрагментов сосудистого протеза из политетрафторэтилена (Gore-Tex, США) судили по данным гистологического исследования срезов, фиксированных в 10% нейтральном формалине, и окраске гематоксилин-эозином. Для этого на фрагменты сосудистого протеза предварительно наносили 2 мкг/мл фибронектина и 20 мкг/мл коллагена I типа (Sigma, США),

или фибронектин (2 мкг/мл) и коллаген IV типа (20 мкг/мл) на 60 мин. Далее наплаивали на предобработанные фрагменты сосудистого протеза МСК в дозе 10⁶ кл./см². В контроле использовали фрагменты сосудистого протеза без обработки компонентами внеклеточного матрикса.

Этическая экспертиза

Все работы с животными проводили в соответствии с положениями «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Исследование среди больных проводилось на добровольной основе с соблюдением всех принципов биомедицинской этики. Этическим комитетом НИИ-КЭЛ — филиал ИЦиГ СО РАН, согласно протоколам клинических исследований № 7 и № 4 заседаний Комитета от 10.10.2007 г. и 19.12.2016 г., постановлено, что планируемая научная работа соответствует этическим стандартам добросовестной клинической практики и экспериментального исследования и может быть проведена на базе лаборатории клеточных технологий НИИ-КЭЛ — филиал ИЦиГ СО РАН.

Статистический анализ

Принципы расчета размера выборки

Размер выборки предварительно не рассчитывался.

Методы статистического анализа данных

Количественные показатели были распределены в соответствии с законом нормального распределения (W-критерий Шапиро–Уилка). Данные представлены как среднее значение (M) и стандартное отклонение (±SD). В исследуемых выборках гипотезу о равенстве средних выборочных величин проверяли с помощью t-критерия Стьюдента. Различия считались статистически достоверными при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Результаты

Объекты (участники) исследования

В экспериментальном нерандомизированном контролируемом исследовании в качестве добровольцев принимали участие 5 мужчин и 3 женщины с ишемической болезнью сердца. Участники были сопоставимы по возрасту (62,4±7,83 и 63,66±7,77 года — мужчины и женщины соответственно) и классу сердечной недостаточности (3,40±0,54 и 3,33±0,57 — мужчины и женщины соответственно).

Основные результаты исследования

При фенотипической характеристике было показано, что циркулирующие в крови ЭПК — это неоднородная популяция клеток, которые находятся на разных стадиях дифференцировки в эндотелиальные клетки. Так, ранние ЭПК *in vitro* могут быть выращены в течение первых 2 нед, а поздние ЭПК при культивировании клеток — на 3-й нед роста. G-CSF мобилизует на периферию из костного мозга как ранние, так и поздние ЭПК (CD34+/CD133+ и CD34+/KDR+ соответственно), а также ЭПК с фенотипом CD34+/CD45. Так, количество CD34+/CD133+ ЭПК увеличивается с 0,004±0,001 до 0,099±0,011%, CD34+/KDR+ — с 0,048±0,009 до 0,140±0,052%, CD34+/CD45 — с 0,098±0,064 до 0,620±0,491% ($p \leq 0,05$).

Для получения ранних и поздних ЭПК мононуклеарные клетки крови из обогащенной фракции стволовых прогениторных клеток растили на желатине или фибронектине в течение 8 и 16 сут. В 1-е сут ЭПК имели округлую

форму и еще не сформировали очаги роста (рис. 1, А). На 8-е сут роста ЭПК формировали колонии из округлых клеток в ее центре и типичными веретенообразными клетками на периферии (рис. 1, Б, В). На 16-е сут культивирования клетки (поздние ЭПК) становились однородными и морфологически напоминали булыжную мостовую (рис. 1, Г). Выделенные из костного мозга ЭПК формировали сосудистоподобные структуры на матрикеле (рис. 1, Д).

Необходимо отметить тот факт, что нам не удалось получить ЭПК из периферической крови больных: к пластику прикреплялись единичные клетки, имевшие округлую форму и не давшие начало формированию роста колоний ЭПК (данные не приводятся).

Таким образом, только ЭПК из аферезного продукта больных дали начало росту ранних и поздних ЭПК на подложке из желатина или фибронектина.

Выделенные ядродержащие клетки из костного мозга крыс-самок линии Wistar имели гетерогенную структуру на ранних сроках культивирования после прикрепления к пластику. К 14-му дню культивирования клетки имели вид веретенообразных клеток (рис. 2, А) и были однородными по составу (рис. 2, В). Кроме этого, МСК формировали колонии (рис. 2, Б) и дифференцировались в адипогенном (рис. 2, Г) и остеогенном (рис. 2, Д) направлении.

Таким образом, на основании морфологической характеристики клеток и способности их к дифференцировке в адипогенном и остеогенном направлении, даже без исследования экспрессии маркеров мезенхимных клеток, можно говорить о том, что мы имеем дело с МСК.

Плотность заселения МСК фрагментов протезов из политетрафторэтилена зависела от того, каким внекле-

точным матриксом был предобработан политетрафторэтилен. Так, на фрагментах сосудистого протеза из политетрафторэтилена, предобработанного фибронектином и коллагеном I типа, фибронектином и коллагеном I типа и IV типа, показано более равномерное заселение протезов в сравнении с политетрафторэтиленом без обработки внеклеточным матриксом, или обработанного фибронектином и коллагеном IV типа (рис. 3, А–Г).

Таким образом, наличие на поверхности фрагментов сосудистого протеза из политетрафторэтилена компонентов внеклеточного матрикса способствует большей адгезии и разрастанию МСК, что подтверждается площадью покрытия поверхности фрагментов сосудистого протеза из политетрафторэтилена МСК: в частности, без наличия компонентов внеклеточного матрикса площадь покрытия не превышает 5%, при обработке фибронектином и коллагеном I типа достигает 35%, при обработке фибронектином и коллагеном IV типа — 8%, а при сочетании фибронектина, коллагена I и IV типа достигает 58% ($p \leq 0,05$).

Дополнительные результаты исследования

Условия культивирования ЭПК (предобработка культуральных флаконов желатином или фибронектином, а также сроки культивирования — 8-е или 16-е сут) могут сказаться на спектре продукции клетками цитокинов, ростовых факторов и мессенджеров межклеточного взаимодействия: в кондиционных средах ранних ЭПК, выросших на желатине, выше уровня IL8 в сравнении с аналогичным показателем в кондиционных средах ранних ЭПК, выросших на фибронектине (табл. 1).

В то же время в кондиционных средах ЭПК, выросших на подложке из фибронектина, выше уровня IL10, IL18,

340

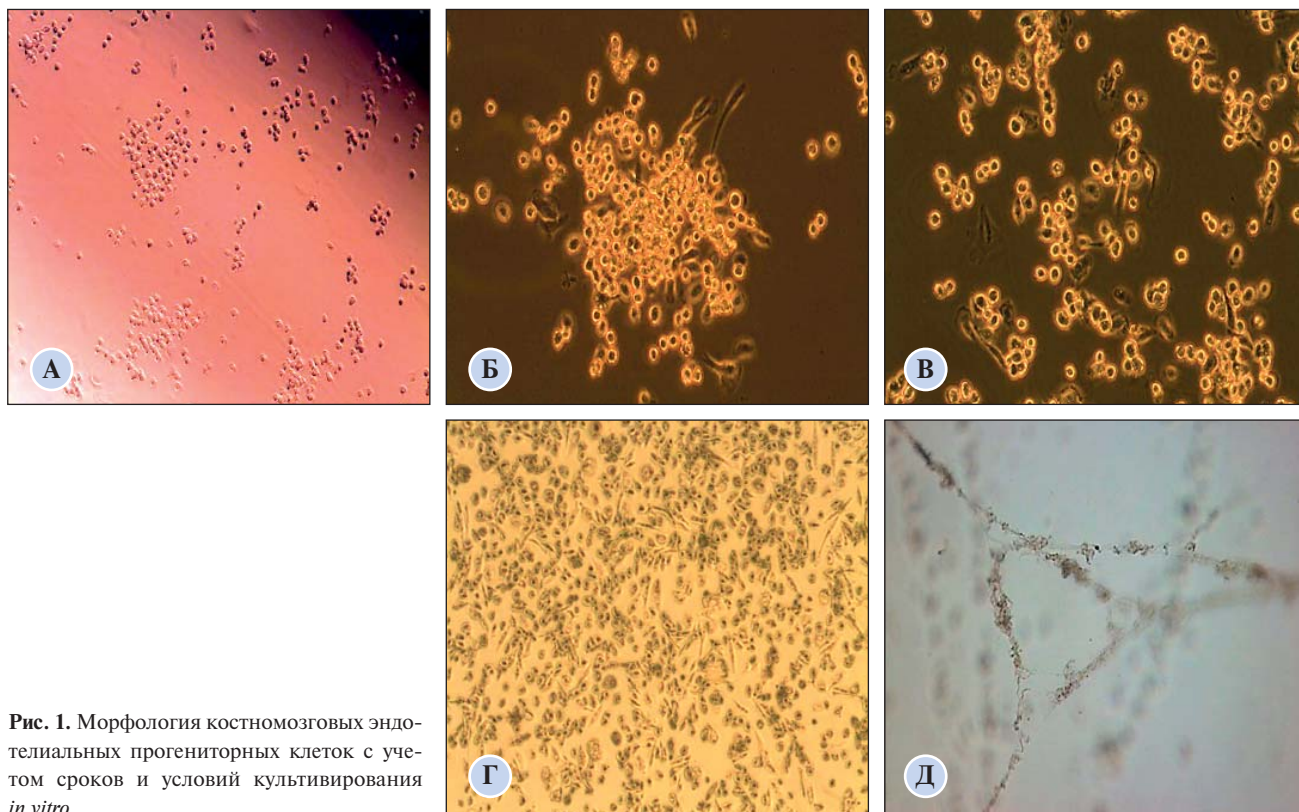


Рис. 1. Морфология костномозговых эндотелиальных прогениторных клеток с учетом сроков и условий культивирования *in vitro*

Примечание. А — через 24 ч после адгезии к пластику (округлые единичные клетки; $\times 40$). Б — типичные ранние колонии эндотелиальных прогениторных клеток (ЭПК) на 8-е сут роста *in vitro* на подложке из желатина (в центре — округлые, на периферии — веретенообразные клетки; $\times 100$). В — типичные ранние колонии ЭПК на 8-е сут роста *in vitro* на подложке из фибронектина (в центре — округлые, на периферии — веретенообразные клетки; $\times 100$). Г — морфология поздних/зрелых ЭПК на 16-е сут (однородные клетки, напоминающие булыжную мостовую; $\times 40$). Д — формирование сосудистоподобных структур ЭПК на матрикеле ($\times 40$).

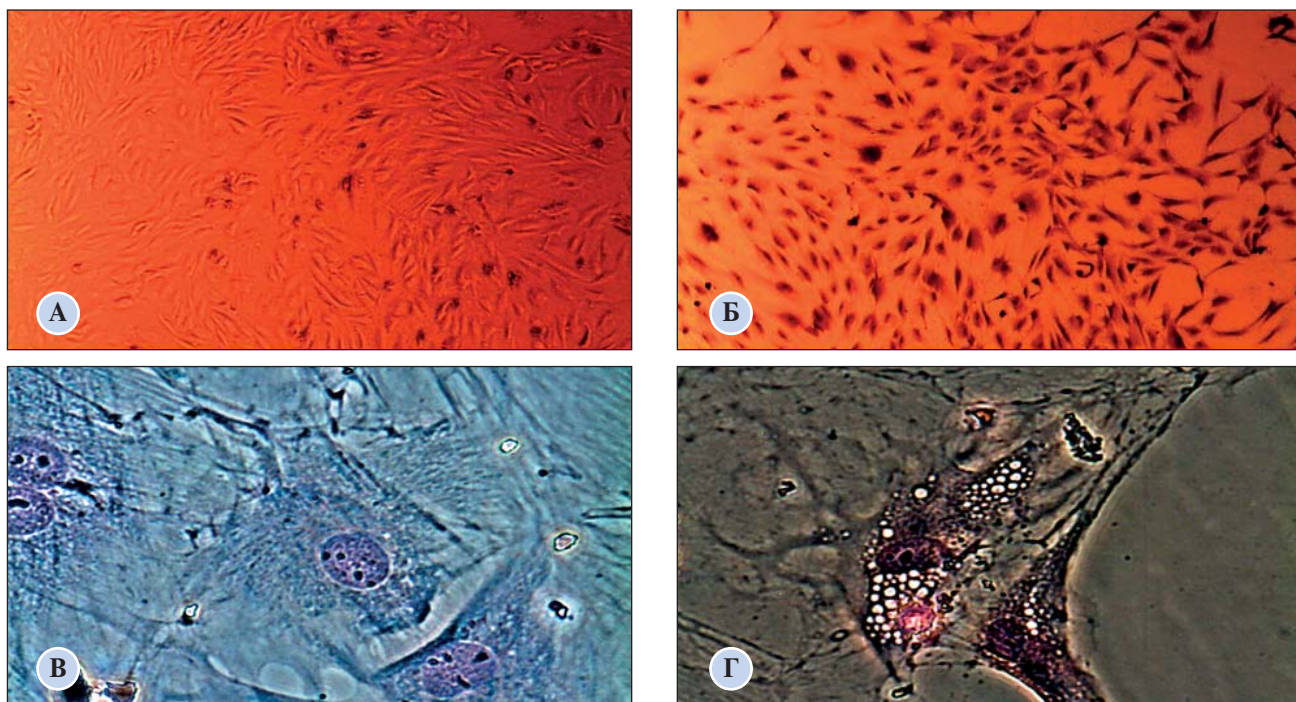


Рис. 2. Морфологическая картина мультипотентных мезенхимных стромальных клеток костного мозга

Примечание. А — веретенообразная морфология мезенхимных стромальных клеток костного мозга (КМ-МСК) на 14-й день ($\times 40$). Б — колониеобразующая способность КМ-МСК ($\times 40$). В — КМ-МСК, окраска по Романовскому-Гимзе ($\times 400$). Г — адипогенная дифференцировка КМ-МСК, окраска Oil Red-O и по Романовскому-Гимзе ($\times 400$). Д — остеогенная дифференцировка КМ-МСК, окраска AgNO_3 и по Романовскому-Гимзе ($\times 400$).

341

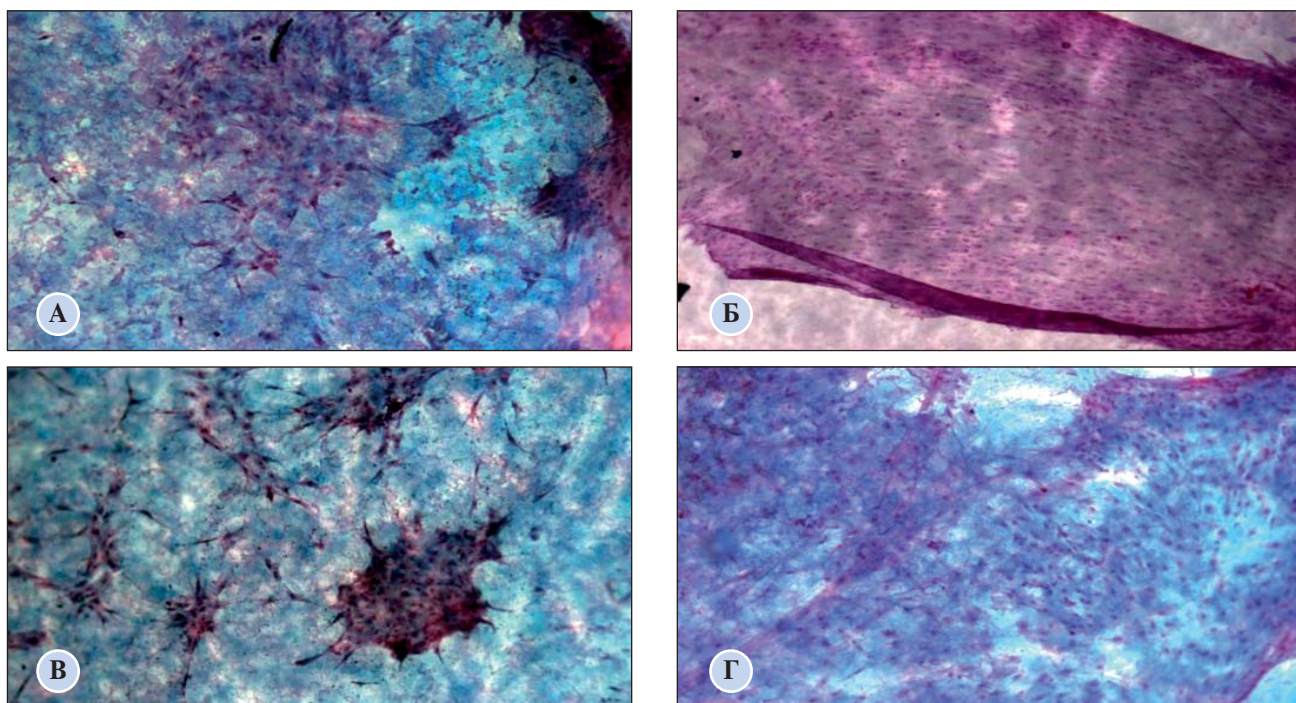


Рис. 3. Адгезия мезенхимных стромальных клеток костного мозга к политетрафторэтилену с учетом предобработки внеклеточным матриксом (окраска гематоксилином-эозином, $\times 100$)

Примечание. А — политетрафторэтилен без предварительной обработки внеклеточным матриксом (контроль). Б — политетрафторэтилен, обработанный фибронектином и коллагеном I типа, В — фибронектином и коллагеном IV типа, Г — фибронектином и коллагеном I типа и IV типа.

Таблица 1. Уровни продукции ранними и поздними эндотелиальными прогениторными клетками цитокинов и оксида азота с учетом сроков (8-е и 16-е сут) и условий (предобработка поверхности пластика желатином или фибронектином) культивирования *in vitro*, M±SD

Параметры	Условия культивирования			
	Желатин		Фибронектин	
	Сроки культивирования, сут			
	8-е (1)	16-е (2)	8-е (3)	16-е (4)
TNFα, пг/мл	15,25±6,29	12,10±2,14	10,14±0,42	10,19±0,48
IL10, пг/мл	356,77±214,33 <i>p</i> ₁₋₃ =0,023	580,77±163,23 <i>p</i> ₂₋₄ =0,0003	802,00±160,80	329,00±113,28
IL18, пг/мл	215,43±138,31 <i>p</i> ₁₋₃ =0,028	367,63±90,23	307,75±296,40	193,30±85,49
IL8, пг/мл	4249,05±1350,92 <i>p</i> ₁₋₃ =0,0002	305,70±140,68 <i>p</i> ₂₋₄ =0,0005	599,00±881,55	3234,70±1432,44
Еро, МЕ/мл	69,30±16,19 <i>p</i> ₁₋₃ =0,0002	203,50±53,48 <i>p</i> ₂₋₄ =0,0002	209,10±51,39	4,79±0,61
G-CSF, пг/мл	10,21±0,51	10,47±1,10	10,19±0,47	9,98±0,78
VEGF, пг/мл	403,20±192,67 <i>p</i> ₁₋₃ =0,0015	6416,35±2466,67	6171,55±2287,71	234,15±69,96
NO, мкМ/мл	3,65±0,90	4,64±0,68 <i>p</i> ₂₋₄ =0,0002	4,43±0,53	3,13±0,39

Примечание. Здесь и в табл. 2: TNFα — фактор некроза опухоли альфа, IL — интерлейкин, Еро — эритропоэтин, G-CSF — гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, VEGF — фактор роста эндотелия сосудов, NO — оксид азота, *p* — статистически значимое различие между параметрами по U-критерию Манна–Уитни.

Еро и VEGF по сравнению с аналогичными параметрами в кондиционных средах от ранних ЭПК, выросших на подложке из желатина. В кондиционных средах поздних ЭПК, выросших на желатине, выше уровни IL18, Еро и VEGF по сравнению с аналогичными показателями в кондиционной среде поздних ЭПК, выросших на фибронектине. Однако в кондиционной среде поздних ЭПК, выросших на подложке из фибронектина, выше уровни IL8 по сравнению с уровнями в кондиционной среде поздних ЭПК, выросших на подложке из желатина. Существенных различий по уровням продукции ЭПК NO с учетом сроков культивирования (8-е и 16-е сут) и условий культивирования (подложка из желатина или фибронектина) не выявлено.

Корреляционный анализ между фенотипом ЭПК и продуцируемыми ими цитокинами при культивировании *in vitro* с учетом сроков и условий роста выявил наличие взаимосвязи между клетками с фенотипом CD34+/KDR+ (зрелые ЭПК) и уровнем содержания в кондиционной среде IL18 в условиях роста клеток на желатине (*r*=0,64; *p*=0,046). Между количеством CD34+/KDR+ клеток и уровнями содержания в кондиционной среде

IL8 в условии роста на фибронектине показана высокая взаимосвязь (*r*=0,71; *p*=0,21).

Помимо пролиферации, МСК свойственна и миграционная способность. В режиме реального времени с использованием аппарата Cell-IQ показана горизонтальная миграция мезенхимных клеток от краев раневого дефекта монослоя МСК в область свободного от клеток пластика (рис. 4). Кроме этого, важным аспектом функциональной полноценности МСК является их способность продуцировать широкий спектр цитокинов (табл. 2), обеспечивающих условия для ускорения процессов заселения сосудистых протезов циркулирующими в крови ЭПК.

Нежелательные явления

Нежелательным явлением в ходе исследования стал тот факт, что нам не удалось нарастить ранние и поздние ЭПК из периферической крови больных ишемической болезнью сердца: скорее всего, это результат недостаточного количества данных клеток в образцах крови, что не позволяет им дать начало роста колоний ранних или поздних ЭПК.

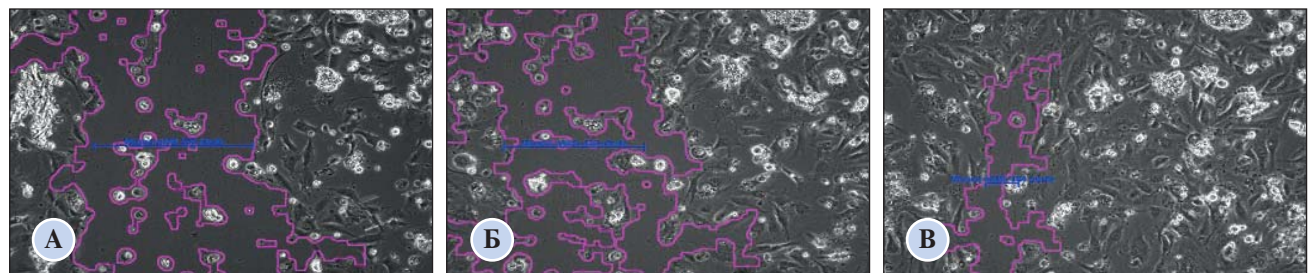


Рис. 4. Горизонтальная миграция мезенхимных стромальных клеток костного мозга по данным исследования на аппарате Cell-IQ в режиме реального времени в течение 24 ч наблюдения (×40)

Таблица 2. Уровни продукции мезенхимными стромальными клетками костного мозга цитокинов и оксида азота (M±SD)

Параметры	Уровни содержания в кондиционной среде
IL1, пг/мл	237,8±6,2
IL2, пг/мл	1,6±0,1
IL4, пг/мл	0,4±0,1
IL6, пг/мл	2,3±0,1
IL8, пг/мл	5,2±1,6
IL10, пг/мл	1,5±0,1
TNFα, пг/мл	527,7±24,9
GM-CSF, пг/мл	0,7±0,1
IFNγ, пг/мл	99,2±0,1
NO, мкМ/мл	12,0±1,6

Обсуждение

Резюме основного результата исследования

Из полученных данных следует, что процедура мобилизации G-CSF способствует выходу из костного мозга на периферию разных популяций ЭПК. Из ядросодержащих клеток костного мозга крыс выделены МСК с высоким пролиферативным, миграционным, цитокинпродуцирующим потенциалом. Скорость роста *in vitro* популяций ЭПК и МСК зависит от условий кондиционирования (наличие компонентов внеклеточного матрикса). Скорее всего, это следствие взаимодействия компонентов внеклеточного матрикса с соответствующими лигандами на мембране ЭПК или МСК, которые, с одной стороны, позволяют расти определенным популяциям ЭПК, а с другой — закрепляться МСК на гидрофобном синтетическом материале, из которого сделан сосудистый протез.

Обсуждение основного результата исследования

Полученные нами результаты согласуются с литературными данными о роли компонентов внеклеточного матрикса в репарации поврежденного эндотелиального слоя сосудов [8]. Для взаимодействия ЭПК с интимой сосудов требуется взаимодействие α5β1-интегрин с фибронектином, что способствует прикреплению клеток к стенке сосудов и их встраиванию в области повреждения сосудистой стенки [8]. Фибронектин (неколлагеновый структурный гликопротеин) является одним из ключевых белков межклеточного матрикса, который способен реагировать и связывать коллаген, протеогликаны, гиалуроновую кислоту, углеводы плазматических мембран, гепарин, а также трансглутаминазу. Помимо этого, фибронектин также способствует адгезии и распространению эндотелиальных и мезенхимальных клеток, стимулирует пролиферацию и миграцию клеток, контролирует дифференцировку и поддержание цитоскелета клеток, активно участвует в воспалительных и репаративных процессах, опосредуемых наличием в его структуре последовательности аминокислот Арг-Гли-Асп (RGD), с помощью которой он может присоединяться к клеточным рецепторам (интегринам). Эти рецепторы опосредованно взаимодействуют с находящимися в цитозоле актиновыми микрофиламентами, в процессе участвуют белки прикрепления — талин, винкулин, α-актинин [10, 11]. С другой стороны, при дефиците рецептора CXCR2 отмечено снижение прикрепления эндотелиальных клеток к фибронектину [12]. Являясь активным белком внеклеточного матрикса, фибронектин не только поддерживает клеточную адгезию, но и усиливает влияние различных факторов роста и цитокинов на эндотелиальные клетки.

Известно, что ЭПК секретируют широкий спектр цитокинов, необходимых для собственной жизнедеятельности [13–17]. ЭПК стимулируют васкулогенез и/или улучшают процессы ангиогенеза [18]. Показано, что при росте ЭПК на культуральной посуде, преобработанной фибронектином, активируется ген с проангиогенным потенциалом (галектин-3) [19]. С учетом того факта, что компоненты внеклеточного матрикса влияют на миграцию ЭПК [13, 14, 20], мы изучили эффект культивирования ЭПК на культуральной посуде, преобработанной желатином и фибронектином, на цитокинпродуцирующую активность клеток. Полученные нами данные о продукции ЭПК широкого спектра цитокинов, способных стимулировать пролиферацию, миграцию и выживание ЭПК, не противоречат данным других авторов [13, 15, 18]. Ранее было показано, что ранние ЭПК больше продуцируют VEGF, G-CSF и IL8 по сравнению с поздними ЭПК [9, 13, 17, 19]. Эти цитокины способны усиливать прикрепление ЭПК к стенкам сосудов и тем самым ускорять репарацию и заселение поврежденных участков стенки сосуда. Большинство исследователей сосредоточивали свое внимание на оценке уровней продукции ранними или поздними ЭПК, но не отслеживали уровни продукции цитокинов клетками в динамике роста. Нами показано, что уровни и спектр продукции цитокинов, вовлеченных в процесс созревания, миграции и ангиогенеза, зависят от сроков и условий кондиционирования ЭПК.

Показатели функциональных свойств МСК (пролиферация, миграция, дифференцировка, продукция цитокинов) не противоречат данным других авторов, также указывающих на высокую пролиферативную, миграционную и цитокинпродуцирующую активность МСК [21].

Известно, что политетрафторэтилен обладает гидрофобными свойствами, что препятствует адгезии клеток к нему [22], однако ее можно усилить обработкой поверхности сосудистых протезов фибронектином, коллагеном или же их сочетанием [23–25].

Нами показано, что преобработка сосудистого протеза из политетрафторэтилена фибронектином, коллагеном I и IV типа, а также сочетанием фибронектина с коллагенами увеличивает площадь заселения поверхности сосудистого протеза МСК.

Ограничения исследования

Коллектив авторов допускает, что определенное влияние на полученные результаты оказал объем произведенной выборки для выделения эндотелиальных прогениторных клеток.

Заключение

Таким образом, адгезия ЭПК и МСК к синтетическим материалам (полистерол, политетрафторэтилен) может быть усилена преобработкой их поверхности внеклеточным матриксом (желатин, фибронектин, коллаген), что ускорит процессы заселения тканеинженерных сосудистых графтов.

Источник финансирования

Исследование проведено при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 17-75-30009.

Конфликт интересов

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бокерия Л.А., Пурснов М.Г., Соболев А.В., и др. Анализ результатов интраоперационной шунтографии у 600 больных ишемической болезнью сердца после операции коронарного шунтирования // *Грудная и сердечно-сосудистая хирургия*. — 2016. — Т. 58. — №3 — С. 143–151. [Bockeria LA, Pursanov MG, Sobolev AV, et al. Analysis of the results of intraoperative angiography in 600 patients after coronary artery bypass surgery. *Grud Serdechnososudistaia Khir.* 2016;58(3):143–151. (In Russ).]
2. Шумков К.В., Лефтерова Н.П., Пак Н.Л., и др. Аортокоронарное шунтирование в условиях искусственного кровообращения и на работающем сердце: сравнительный анализ ближайших и отдаленных результатов и послеоперационных осложнений (нарушения ритма сердца, когнитивные и неврологические расстройства, реологические особенности и состояние системы гемостаза) // *Креативная кардиология*. — 2009. — №1 — С. 28–50. [Shumkov KV, Lefterova NP, Pak NL, et al. Coronary artery bypass grafting in conditions of artificial blood and a beating heart: a comparative analysis of immediate and long-term results and postoperative complications (arrhythmias, cognitive and neurological disorders, rheological characteristics and hemostasis). *Creative cardiology.* 2009;(1):28–50. (In Russ).]
3. Севостьянова В.В., Головкин А.С., Филипьев Д.Е., и др. Выбор оптимальных параметров электроспиннинга для изготовления сосудистого графта малого диаметра из поликапролактона // *Фундаментальные исследования*. — 2014. — №10–1 — С. 180–184. [Sevostyanova VV, Golovkin AS, Philipey DE, et al. Optimal parameters of electrospinning for small-diameter polycaprolactone vascular graft fabrication. *Fundamental'nye issledovaniya.* 2014;(10–1):180–184 (In Russ).]
4. Jantzen AE, Lane WO, Gage SM, et al. Autologous endothelial progenitor cell-seeding technology and biocompatibility testing for cardiovascular devices in large animal model. *J Vis Exp.* 2011;(55):e3197. doi: 10.3791/3197.
5. Laube HR, Duwe J, Rutsch W, Konertz W. Clinical experience with autologous endothelial cell-seeded polytetrafluoroethylene coronary artery bypass grafts. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2000;120(1):134–141. doi: 10.1067/mtc.2000.106327.
6. Scharner D, Rossig L, Carmona G, et al. Caspase-8 is involved in neovascularization-promoting progenitor cell functions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29(4):571–578. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.182006.
7. Смагин А.А., Кочеткова М.В., Хабаров Д.В., Повешенко О.В. Методика выделения из периферической крови мобилизованных клеток костного мозга с использованием процедуры цитафереза // *Международный журнал экспериментального образования*. — 2013. — №11–2 — С. 56–58. [Smagin AA, Kochetkova MV, Khabarov DV, Poveshchenko OV. Method of isolation mobilized bone marrow cells from peripheral blood by the procedure cytapheresis. *Mezhdunarodnyi zhurnal eksperimental'nogo obrazovaniya.* 2013;(11–2):56–58. (In Russ).]
8. Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(7):1185–1189. doi: 10.1161/01.Atv.0000073832.49290.B5.
9. Medina RJ, O'Neill CL, Sweeney M, et al. Molecular analysis of endothelial progenitor cell (EPC) subtypes reveals two distinct cell populations with different identities. *BMC Med Genomics.* 2010;3:18. doi: 10.1186/1755-8794-3-18.
10. Angelos MG, Brown MA, Satterwhite LL, et al. Dynamic adhesion of umbilical cord blood endothelial progenitor cells under laminar shear stress. *Biophys J.* 2010;99(11):3545–3554. doi: 10.1016/j.bpj.2010.10.004.
11. To WS, Midwood KS. Plasma and cellular fibronectin: distinct and independent functions during tissue repair. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2011;4:21. doi: 10.1186/1755-1536-4-21.
12. Hristov M, Zernecke A, Bidzhikov K, et al. Importance of CXC chemokine receptor 2 in the homing of human peripheral blood endothelial progenitor cells to sites of arterial injury. *Circ Res.* 2007;100(4):590–597. doi: 10.1161/01.RES.0000259043.42571.68.
13. Hur J, Yoon CH, Kim HS, et al. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(2):288–293. doi: 10.1161/01.ATV.0000114236.77009.06.
14. Lai Y, Shen Y, Liu XH, et al. Interleukin-8 induces the endothelial cell migration through the activation of phosphoinositide 3-kinase-Rac1/RhoA pathway. *Int J Biol Sci.* 2011;7(6):782–791.
15. Qiao W, Niu LY, Liu Z, et al. Endothelial nitric oxide synthase as a marker for human endothelial progenitor cells. *Tohoku J Exp Med.* 2010;221(1):19–27. doi: 10.1620/tjem.221.19.
16. Ribatti D, Presta M, Vacca A, et al. Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Blood.* 1999;93(8):2627–2636.
17. Wang QR, Wang BH, Zhu WB, et al. An in vitro study of differentiation of hematopoietic cells to endothelial cells. *Bone Marrow Res.* 2011;2011:846096. doi: 10.1155/2011/846096.
18. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res.* 1999;85(3):221–228. doi: 10.1161/01.res.85.3.221.
19. Ahrens I, Domeij H, Topcic D, et al. Successful in vitro expansion and differentiation of cord blood derived CD34+ cells into early endothelial progenitor cells reveals highly differential gene expression. *PLoS One.* 2011;6(8):e23210. doi: 10.1371/journal.pone.0023210.
20. Honold J, Lehmann R, Heeschen C, et al. Effects of granulocyte colony stimulating factor on functional activities of endothelial progenitor cells in patients with chronic ischemic heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(10):2238–2243. doi: 10.1161/01.ATV.0000240248.55172.dd.
21. Yamawaki-Ogata A, Fu XM, Hashizume R, et al. Therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in formed aortic aneurysms of a mouse model. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2014;45(5):e156–e165. doi: 10.1093/ejcts/ezu018.
22. Shoji M, Koba S, Kobayashi Y. Roles of bone-marrow-derived cells and inflammatory cytokines in neointimal hyperplasia after vascular injury. *Biomed Res Int.* 2014;2014:1–8. doi: 10.1155/2014/945127.
23. Rotmans JI. In vivo cell seeding with anti-CD34 antibodies successfully accelerates endothelialization but stimulates intimal hyperplasia in porcine arteriovenous expanded polytetrafluoroethylene grafts. *Circulation.* 2005;112(1):12–18. doi: 10.1161/circulationaha.104.504407.
24. Larsen CC, Kligman F, Kottke-Marchant K, Marchant RE. The effect of RGD fluorosurfactant polymer modification of ePTFE on endothelial cell adhesion, growth, and function. *Biomaterials.* 2006;27(28):4846–4855. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.05.009.
25. Dohmen PM, Pruss A, Koch C, et al. Six years of clinical follow-up with endothelial cell-seeded small-diameter vascular grafts during coronary bypass surgery. *J Tissue Eng.* 2013;4:204173141350477. doi: 10.1177/2041731413504777.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Лыков Александр Петрович, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточных технологий НИИКЭЛ — филиал ИЦиГ СО РАН, старший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий Центра новых технологий «НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России
Адрес: 630060, Новосибирск, ул. Тимакова, д. 2, **тел.:** +7 (383) 335-93-32, **e-mail:** aplykov2@mail.ru,
SPIN-код: 4883-0887, **ORCID:** <http://orcid.org/orcid.org/0000-0003-4897-8676>

Повещенко Ольга Владимировна, доктор медицинских наук, заведующая лабораторией клеточных технологий НИИКЭЛ — филиал ИЦиГ СО РАН, заведующая лабораторией клеточных технологий Центра новых технологий «НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России
Адрес: 630060, Новосибирск, ул. Тимакова, д. 2, **тел.:** +7 (383) 335-93-32, **e-mail:** poveshchenkoov@yandex.ru,
SPIN-код: 1451-4467, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-9956-0056>

Бондаренко Наталья Анатольевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории клеточных технологий НИИКЭЛ — филиал ИЦиГ СО РАН, старший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий Центра новых технологий «НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России
Адрес: 630060, Новосибирск, ул. Тимакова, д. 2, **тел.:** +7 (383) 335-93-32, **e-mail:** bond80288@yandex.ru,
SPIN-код: 5722-7157, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-8443-656X>

Суровцева Мария Александровна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий НИИКЭЛ — филиал ИЦиГ СО РАН, старший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий Центра новых технологий «НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России
Адрес: 630060, Новосибирск, ул. Тимакова, д. 2, **тел.:** +7 (383) 335-93-32, **e-mail:** mfelde@ngs.ru,
SPIN-код: 5597-4170, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-4752-988X>

Ким Ирина Иннокентьевна, кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории клеточных технологий НИИКЭЛ — филиал ИЦиГ СО РАН, младший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий Центра новых технологий «НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России
Адрес: 630060, Новосибирск, ул. Тимакова, д. 2, **тел.:** +7 (383) 335-93-32, **e-mail:** kii5@mail.ru, **SPIN-код:** 2887-2812,
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-7380-2763>