

УДК 57.085.2/576.08

DOI: <https://doi.org/10.17816/rmmar624871>

Имунофенотипирование популяции культивируемых клеток слизистой соединительной ткани (вартонова студня) пуповины человека

В.Е. Чернов¹, М.О. Соколова¹, А.А. Кокорина¹, Г.И. Пендинен²¹ Военно-медицинская академия, Санкт-Петербург, Россия;² Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия

АННОТАЦИЯ

Актуальность. На фоне множества способов замещения дефектов при посттравматических повреждениях все более широкое распространение в медицинской практике получают приемы репарации поврежденных тканей, основанные на методах, использующих продукты тканевой инженерии и культур искусственно культивируемых клеток человека. В литературе сообщается о слабой иммуногенной активности тканей пуповины человека, что делает эти клетки перспективными компонентами продуктов регенеративной медицины. В связи с возможной спонтанной трансформацией клеток в процессе культивирования и ошибками при отборе экспланта необходимо достоверное определение фенотипа клеток, полученных в результате эксплантации ткани и дальнейшего их культивирования. Таким образом, специфика получения мультипотентных мезенхимальных клеток из слизистой соединительной ткани пуповины человека, называемой также вартонов студень, требует достоверной идентификации типа полученных клеток.

Цель. Выявление наличия мезенхимальных стволовых клеток в клеточной популяции, полученной из слизистой соединительной ткани пуповины человека с использованием иммуноферментного маркирования.

Материал и методы. В исследовании использовали методы культивирования клеток, проточной цитофлуориметрии, иммуноцитохимии для определения поверхностных и внутриклеточных маркеров мезенхимальных стволовых клеток.

Результаты. При проведении работы по идентификации клеток популяции, полученной при культивировании эксплантов из слизистой соединительной ткани пуповины человека, установлена неоднородность типа клеток, составляющих популяцию. Большинство из них несут флуоресцентные метки CD45, CD73, CD34, CD29, CD90, CD44, CD105, что согласуется с иммунофенотипом мезенхимальных стволовых клеток, определенным Международным обществом по клеточной терапии. Соотношение примененных маркеров позволяет отнести популяцию клеток, полученную методом прямой эксплантации фрагментов слизистой соединительной ткани, к мезенхимальным стволовым клеткам. Визуальный контроль подтвердил локализацию меченных антител на поверхности культивируемых клеток. Также показано, что в полученной культуре отсутствуют мышечные клетки кровеносных сосудов.

Заключение. В результате экспериментов по идентификации клеток, полученных при эксплантации фрагментов слизистой соединительной ткани, и дальнейшего их культивирования, методом иммунофлуоресцентной цитометрии установлена их принадлежность к мезенхимальным стволовым клеткам.

Ключевые слова: вартонов студень; иммунофлуоресценция; культивирование; мезенхимальные стволовые клетки; пуповина человека; слизистая соединительная ткань пуповины; цитометрия; эксплант.

Как цитировать

Чернов В.Е., Соколова М.О., Кокорина А.А., Пендинен Г.И. Иммунофенотипирование популяции культивируемых клеток слизистой соединительной ткани (вартонова студня) пуповины человека // Известия Российской военно-медицинской академии. 2024. Т. 43. № 2. С. 167–174. DOI: <https://doi.org/10.17816/rmmar624871>

DOI: <https://doi.org/10.17816/rmmar624871>

Immunophenotyping of a population of cultured human umbilical cord cells from Wharton's jelly

Vladimir E. Chernov¹, Margarita O. Sokolova¹, Arina A. Kokorina¹, Galina I. Pendinen²¹ Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia;² Federal Research Center N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, Saint Petersburg, Russia

ABSTRACT

BACKGROUND: Against the background of many existing methods of defect replacement in post-traumatic injuries the methods of repair of damaged tissues based on methods using products of tissue engineering and cultures of artificially cultured human cells are becoming more and more widespread in medical practice. The literature reports weak immunogenic activity of human umbilical cord tissues, which makes these cells promising components of regenerative medicine products. Due to possible errors in explant selection and cell transformation in the process of cultivation, it is necessary to reliably determine the phenotype of cells obtained as a result of tissue explantation and their further cultivation. Thus, the specificity of obtaining multipotent mesenchymal cells from human umbilical cord Wharton's stool tissues requires reliable identification of the type of the obtained cells.

AIM: To obtain reliable features of mesenchymal stem cells in the cell population obtained from human umbilical cord stool tissue.

MATERIAL AND METHODS: Methods of cell cultivation, flow cytometry, immunocytochemistry for determination of surface and intracellular markers of mesenchymal stem cells were used in the study.

RESULTS: In the course of work on the identification of cells of the population obtained by culturing explants from human umbilical cord Wharton's stool, the heterogeneity of the type of cells constituting the cell population was established. Most of them are mesenchymal stem cells carrying fluorescent markers CD45, CD73, CD34, CD29, CD90, CD44, CD105, which agrees with the immunophenotype of mesenchymal stem cells defined by the International Society for Cell Therapy. The ratio of the applied markers allows us to refer the population of cells obtained by direct explantation of Wharton's gelatin tissue fragments to mesenchymal stem cells. Visual control confirmed the localisation of labelled antibodies on the surface of cultured cells. And also it was shown that there were no vascular muscle cells in the obtained culture.

CONCLUSION: As a result of experiments on identification of the cells obtained during explantation of Wharton's jelly tissue fragments and their further cultivation, their belonging to mesenchymal stem cells was established by immunofluorescence cytophotometry.

Keywords: culturing; cytophotometry; explant; human bud; immunofluorescence; mesenchymal stem cells; mucous connective tissue of the umbilical cord; Wharton's jelly.

To cite this article

Chernov VE, Sokolova MO, Kokorina AA, Pendinen GI. Immunophenotyping of a population of cultured human umbilical cord cells from Wharton's jelly. *Russian Military Medical Academy Reports*. 2024;43(2):167–174. DOI: <https://doi.org/10.17816/rmmar624871>

Received: 21.12.2023

Accepted: 09.04.2024

Published: 28.06.2024

DOI: <https://doi.org/10.17816/rmmar624871>

培养的人脐带粘膜结缔组织（Vartonov）细胞群的免疫表型

Vladimir E. Chernov¹, Margarita O. Sokolova¹, Arina A. Kokorina¹, Galina I. Pendinen²

¹ Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia;

² Federal Research Center N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, Saint Petersburg, Russia

摘要

论证。在创伤后缺损替代方法层出不穷的背景下，利用组织工程产品和人工培养的人体细胞修复受损组织的方法在医疗实践中越来越广泛。文献报道，人类脐带组织的免疫原性很弱，这使得这些细胞成为再生医学产品中很有前途的成分。由于细胞在培养过程中可能发生自发转化，以及外植体选择过程中的误差，因此有必要对组织外植体及其进一步培养过程中获得的细胞表型进行可靠的鉴定。因此，从人体脐带粘膜结缔组织（也称为Vartons果冻）中获得多能间充质细胞的特异性需要对获得的细胞类型进行可靠的鉴定。

目的 利用免疫酶标记法检测从人类脐带粘膜结缔组织中获取的细胞群中是否存在间充质干细胞。

材料和方法。该研究采用细胞培养、流式细胞荧光测定法和免疫细胞化学法来确定间充质干细胞的表面和细胞内标志物。

结果。在鉴定从人体脐带粘膜结缔组织培养中获得的群体细胞的工作中，确定了构成群体的细胞类型的异质性。它们中的大多数都带有荧光标记 CD45、CD73、CD34、CD29、CD90、CD44、CD105，这与国际细胞治疗学会（International Society for Cell Therapy）定义的间充质干细胞的免疫表型一致。根据应用标记物的比例，我们可以将粘膜结缔组织片段直接外植获得的细胞群归属于间充质干细胞。肉眼观察证实了标记抗体在培养细胞表面的定位。结果还表明，培养物中没有血管肌肉细胞。

结论。通过对粘膜结缔组织碎片外植并进一步培养获得的细胞进行鉴定实验，通过免疫荧光细胞光度法确定其属于间充质干细胞。

关键词：Vartonov果冻；免疫荧光；培养；间充质干细胞；人脐带；脐带粘膜结缔组织；细胞光度法；外植体。

To cite this article

Chernov VE, Sokolova MO, Kokorina AA, Pendinen GI. 培养的人脐带粘膜结缔组织（Vartonov）细胞群的免疫表型. *Russian Military Medical Academy Reports*. 2024;43(2):167–174. DOI: <https://doi.org/10.17816/rmmar624871>

收到: 21.12.2023

接受: 09.04.2024

发布日期: 28.06.2024

В настоящее время в литературе приводятся различные методы выделения и культивирования мезенхимальных стволовых клеток (МСК), а также их использования в клинике [1]. Установлено, что трансплантация МСК стимулирует регенерацию костной ткани, кожи, миокарда, периферической нервной системы, скелетной мускулатуры, тканей печени, а также МСК служат источником факторов роста и цитокинов [2]. Определяющим аспектом, играющим важную роль при выборе искусственного биомедицинского материала, является влияние имплантата на процессы регенерации поврежденных тканей реципиента, его иммуномодулирующие свойства [3]. На фоне множества существующих способов замещения дефектов при посттравматических повреждениях все более широкое распространение в медицинской практике получают методы репарации поврежденных тканей, основанные на способах, предполагающих использование продуктов тканевой инженерии и культур искусственно культивируемых клеток человека [4]. В этом случае преимущество в использовании имеют собственные ткани пациента либо ткани, обладающие слабой иммуногенностью. В ряде публикаций сообщается о слабой иммуногенной активности тканей пуповины человека [5]. В связи с этим перспективной для получения МСК является слизистая соединительная ткань пуповины человека (ССТПЧ, альтернативное название — вартонов студень, Wharton's jelly). Существует большое количество литературных данных о подобном способе применения ССТПЧ и других тканей пуповины, в связи с чем существует необходимость в их систематизации и выборе оптимальных вариантов лабораторных и технологических решений для воспроизводимого культивирования МСК [6, 7]. Слизистая соединительная ткань пуповины человека предложена рядом исследователей в качестве альтернативного источника МСК. Поскольку ССТПЧ является тканью провизорного органа — пуповины, работа с этим объектом регламентирована минимальными этическими ограничениями, а получение эксплантов из ССТПЧ производится неинвазивным методом [8]. Получение таких эксплантов связано с диссекцией ткани, окружающей вену и артерию пуповины, и это может быть причиной эксплантации, наряду с ССТПЧ, фрагментов тканей другого типа и получения клеток, имеющих иной, чем МСК, статус. В связи с возможными ошибками при отборе эксплантата и трансформации клеток в процессе культивирования, необходимо достоверное определение фенотипа клеток, полученных в результате эксплантации ткани и при дальнейшем их культивировании. Международным обществом по клеточной терапии определен иммунофенотип МСК, определяемый как CD90+; CD105+; CD44+; CD29+; CD105+; CD73+; CD166+; CD45–; CD34– [9]. Наиболее эффективным является флуоресцентный метод определения характеристичных белков поверхности клетки [10]. В нашей работе проведено определение

поверхностных маркеров CD45, CD73, CD34, CD29, CD90, CD44, CD105 и оценка наличия клеток мышечной ткани сосудов по присутствию специфического маркера цитоскелета альфа-актина в популяции клеток, полученных из ССТПЧ.

Цель исследования — выявление мезенхимальных стволовых клеток в клеточной популяции, полученной из слизистой соединительной ткани пуповины человека с использованием иммуноферментного маркирования.

Задачи исследования:

1) для доказательства отсутствия гладкомышечных клеток сосудов в полученной культуре провести иммуногистохимическое окрашивание на наличие гладкомышечного актина (α -Smooth muscle actin) в цитоскелете клеток изучаемой популяции;

2) методом проточной цитофотометрии и прямым наблюдением флуоресценции на поверхности клеток при микроскопировании протестировать полученную клеточную популяцию на наличие мезенхимальных стволовых клеток с использованием поверхностных маркеров CD45, CD73, CD34, CD29, CD90, CD44, CD105.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение популяции клеток ССТПЧ

Получение первичного материала пуповины человека обеспечивалось сотрудниками кафедры акушерства и гинекологии Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова. Материал нативной пуповины человека получали, как правило, в процессе операции планового кесарева сечения. Анамнез доноров первичного материала фиксировался и хранился сотрудниками кафедры. От донора материала получали информированное согласие. Отбор первичного материала для дальнейшей обработки и получения фрагментов ткани для эксплантации проводили непосредственно в родовом зале с соблюдением правил асептики. Материал пуповины без обескровливания помещали в транспортную среду сразу после отделения от плаценты. В качестве транспортной среды использовали стандартный стерильный 0,9 % раствор хлористого натрия, помещенный в стерильный контейнер [11]. Транспортировка материала осуществлялась при температуре окружающей среды. Материал пуповины транспортировался в стерильное помещение Научно-исследовательской лаборатории клеточных технологий Научно-исследовательского отдела медико-биологических исследований Научно-исследовательского центра, где в стерильных условиях проводилось извлечение ССТПЧ и получение первичных эксплантов.

Для культивирования эксплантов использовали среду DMEM F/12, которая успешно применялась в наших предыдущих исследованиях для получения культуры клеток из ткани пуповины человека [11].

Иммунофенотипирование полученной популяции клеток и иммуногистохимическая детекция гладкомышечного актина

Для выявления гладкомышечных клеток сосудов в полученной культуре провели иммуногистохимическое окрашивание на наличие в цитоскелете гладкомышечного актина α -Smooth muscle actin (SMA). Использовали первичные антитела Monoclonal Mouse Anti-Human Smooth Muscle Actin (Dako, Дания), вторичные антитела, конъюгированные с флуорохромом AlexaFluor 488 (Abcam, Англия), докрасивание ядер производили средой для заключения препаратов SlowFade Glass Soft-set Antifade Mountant с DAPI-Nuclear (Invitrogen, США). Исследование проводили на конфокальном микроскопе LSM 880 (Carl Zeiss, Германия). Флуоресценцию возбуждали лазером с длиной волны 405 нм, с детекцией 410–495 нм и аргонным лазером с длиной волны 488 нм, с детекцией 495–605 нм. В качестве положительного контроля антител использовали клетки миомерия крысы, полученные методом эксплантации из биоптатов матки крысы.

У клеток пуповины популяции МСК изучали экспрессию поверхностных маркеров стволовых клеток. Иммунофенотипирование проводили на проточном цитофлуориметре CytoFlex (Beckman Coulter, США). В качестве меток использовали антитела, меченные фикоэритрином (PE) или флуоресцеином (FITC): CD45-FITC, CD73-PE, CD34-PE, CD29-FITC, CD90-FITC, CD44-FITC, CD105-FITC (Bio Rad, США). Для этого клетки с поверхности культурального пластика снимали общепринятым способом (раствором трипсина–версена в соотношении 1 : 3), трижды отмывали фосфатным буферным раствором (pH 7,2–7,4), затем смешивали с разведенным ($\times 20$) раствором для разбавления

антител, состоящим из 20 мкл фетальной бычьей сыворотки (Gibco), 10 мг NaN_3 и 50 мл фосфатного буфера. Полученная суспензия клеток вводилась в измерительные пробирки цитофлуориметра, пробирки размещались в автосемплере цитофлуориметра, далее измерения флуоресценции и обработка полученных сигналов производились автоматически. Для прямого наблюдения флуоресценции на поверхности клеток использовали флуоресцентный микроскоп Axiolmager M2 (Carl Zeiss, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При иммуноцитохимическом исследовании наличия в цитоплазме специфического маркера цитоскелета альфа-актина не выявлено, отмечалось появление автофлуоресценции. Специфического окрашивания цитоскелета, характерного для гладкомышечных клеток, в исследуемых популяциях клеток из ССТПЧ получено не было (рис. 1, *В*). В качестве положительного контроля SMA была окрашена популяция клеток миомерия крысы (рис. 1, *Г*).

Экспрессия поверхностных маркеров мезенхимальных клеток изучена путем иммунофенотипирования на проточном цитофлуориметре CytoFlex (Beckman Coulter, США). Для проверки эффективности конъюгации использованных антител, меченных фикоэритрином CD73-PE, CD34-PE и флуоресцеином CD45-FITC, CD29-FITC, CD90-FITC, CD105-FITC, снятые с поверхности культурального пластика и конъюгированные с антителами клетки помещали на предметные стекла и просматривали в эпифлуоресцентный микроскоп с использованием светофильтров FITC (зеленая область спектра — для антител, меченных

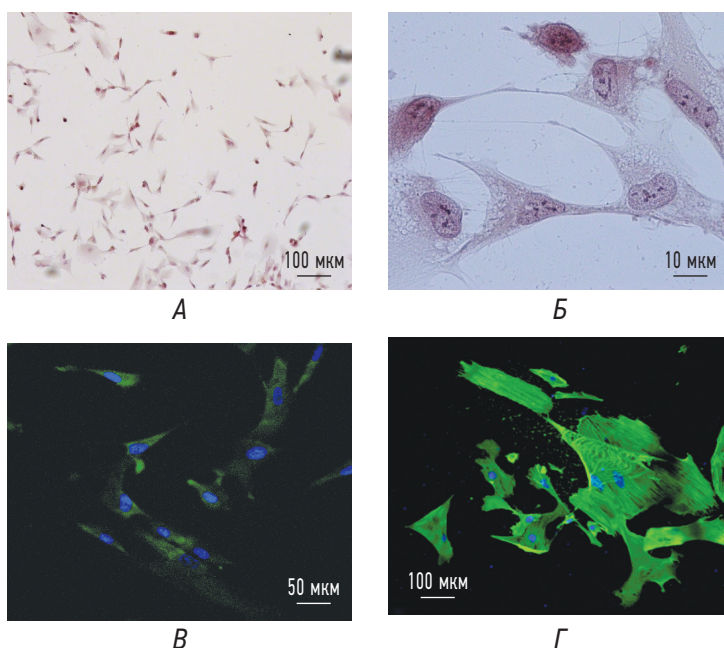


Рис. 1. Культура МСК: *А, Б* — окрашивание гематоксилином и эозином; *В* — иммуноцитохимическое окрашивание на наличие гладкомышечного альфа-актина в цитоскелете клеток, полученных из пуповины; *Г* — окрашенные клетки миомерия крысы

Fig. 1. MSC culture: *A, B* — staining with haematoxylin and eosin; *B* — immunocytochemical staining for the presence of smooth muscle α -actin in the cytoskeleton of cells obtained from umbilical cord, *Г* — stained rat myometrial cells

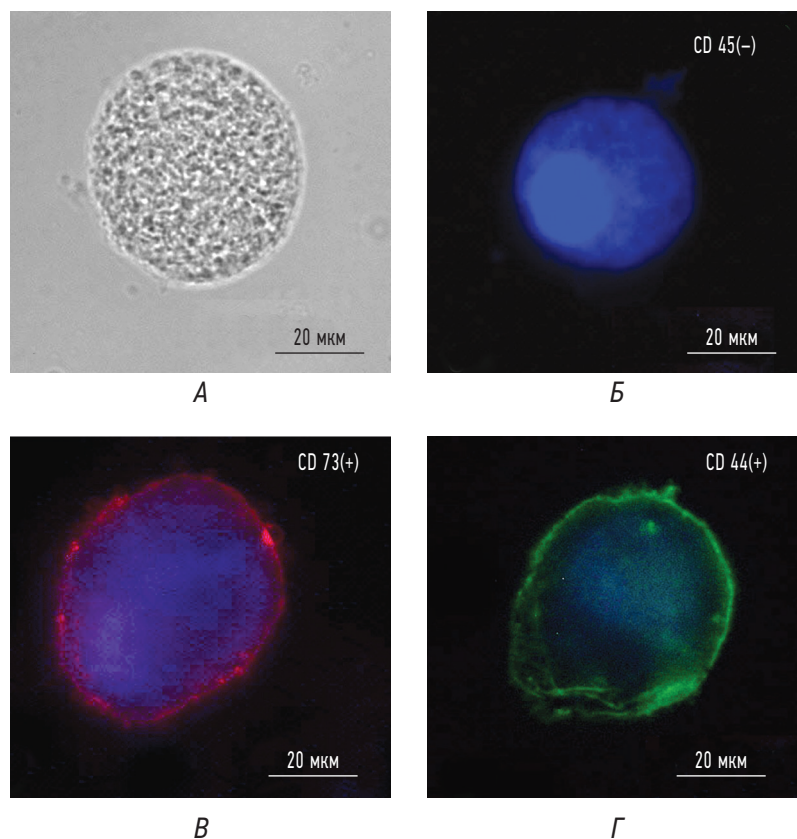


Рис. 2. Результаты иммунофлуоресцентного мечения поверхностных антигенов (CD) мезенхимных клеток слизистой соединительной ткани пуповины человека. *А* — мезенхимальная клетка до мечения; *Б, В, Г* — имиджи клеток, меченых различными антителами: *Б* — отсутствие конъюгации с антителом (контрастирование DAPI); *В, Г* — наличие конъюгации с меченым антителом
Fig. 2. Results of immunofluorescence labelling of surface antigens (SD) of mesenchymal cells of human umbilical cord Warton's stool tissue. *A* — mesenchymal cell before labelling; *Б, В, Г* — images of cells labelled with different antibodies: *Б* — absence of conjugation with antibody (DAPI contrasting); *В, Г* — presence of conjugation with labelled antibody

флуоресцеином) и TRITC (красная область спектра — для антител, меченых фикоэритрином) при увеличении $\times 400$, проводя фотофиксацию в аддитивном режиме. Результаты приведены на рис. 2.

Нахождение клеток в растворах для снятия клеток с поверхности культивирования, конъюгация клеток с мечеными антителами и получение препаратов для микроскопии не приводят к разрушению большинства исследуемых мезенхимальных клеток пуповины человека. На рис. 2, *А* приведены имиджи исходной немеченой клетки в состоянии суспензии и клетки, позитивно конъюгирующие с флуоресцентно-мечеными антителами (рис. 2, *В, 2, Г*) и негативно конъюгирующие (неконъюгирующие) с мечеными антителами (рис. 2, *Б*). Локализацию флуоресцентно-меченых антител наблюдали на поверхности исследуемых клеток. Для получения изображения клеток, негативно конъюгирующих с мечеными антителами, их контрастировали DAPI после конъюгации с антителами.

Далее суспензия меченых клеток помещалась в пробирки диспенсера цитофлуориметра, и производился учет распределений поверхностных маркеров в оцениваемой популяции клеток. Результаты распределения

поверхностных маркеров полученной культуры МСК представлены на рис. 3.

Положительная реакция выявлена на маркер 5-нуклеотидазы CD73 (55,61 %), маркер белков-интегринов CD29 (41,11 %), маркеры стволовых клеток и аксональных процессов в зрелых нейронах CD90 (6,45 %), маркер рецептора гиалуроновой кислоты CD44 (55,62 %), эндоглина CD105 (0,52 %). Негативная реакция выявлена на маркер общего лейкоцитарного антигена CD45 (24,59 %).

В литературе сообщается, что проточная цитометрия, иммунофлуоресценция и qRT-PCR-анализ показывают преобладающую экспрессию поверхностных маркеров CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 и CD166 в МСК пуповины, в то время как маркеры эндотелиальных клеток и клеток кроветворения отсутствуют [9, 10]. Экспрессия CD29, CD90, CD105 и CD166 сохраняется в МСК даже после адипогенной, остеогенной и хондрогенной индукции [9]. Сообщается также о снижении экспрессии CD44 и CD73 в ответ на индукцию трехлинейной дифференцировки [10]. Это позволяет предположить, что они являются наиболее надежными маркерами стволовых клеток, наблюдающихся только в недифференцированных МСК пуповины [8, 9]. Обнаруженная положительная реакция на поверхностные

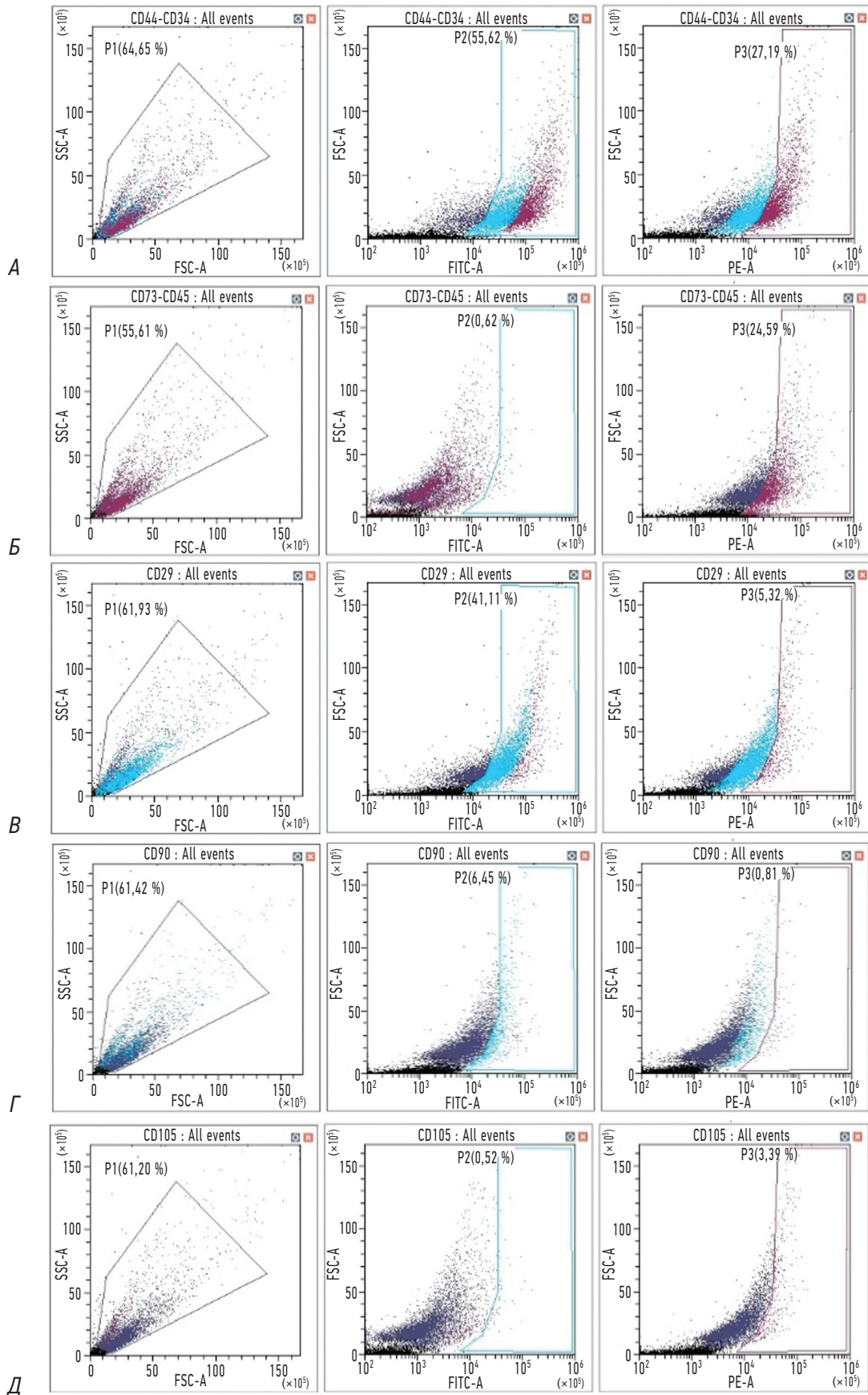


Рис. 3. Распределение поверхностных маркеров в полученной популяции МСК пуповины человека: А — CD34, CD44; Б — CD45, CD73; В — CD29, Г — CD90; Д — CD105

Fig. 3. Distribution of surface markers in the obtained population of human umbilical cord MSCs: A — CD34, CD44; Б — CD45, CD73; В — CD29, Г — CD90; Д — CD105

маркеры CD73 и CD44 свидетельствует о том, что в культуре, полученной нами методом экспланта, преобладали стволовые клетки. Кроме того, выявленная экспрессия маркера белков адгезии клеток системы кроветворения CD34 (27,19 %) указывает на наличие в составе полученной популяции гемопоэтических клеток.

ВЫВОДЫ

1. Соотношение примененных маркеров позволяет отнести популяцию клеток, полученную методом прямой эксплантации фрагментов ССТПЧ, к популяции мезенхимальных стволовых клеток.

2. Визуальный контроль и проточная цитофотометрия подтвердили локализацию меченых антител на поверхности культивируемых клеток.

3. Иммуногистохимическое окрашивание на наличие гладкомышечного актина (α -Smooth muscle actin) не выявило гладкомышечных клеток сосудов в полученной культуре клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате экспериментов по идентификации клеток, полученных при эксплантации фрагментов ССТПЧ и дальнейшего их культивирования, методом иммунофлуоресцентной цитофотометрии установлена их принадлежность к мезенхимальным стволовым клеткам. Показано, что в полученной культуре отсутствуют мышечные клетки сосудов. Установлено, что в составе полученной популяции находятся гемопоэтические клетки — клетки

системы кроветворения, но преобладают недифференцированные стволовые клетки. Получение культуры клеток человека с преобладанием идентифицируемых стволовых клеток при использовании ткани провизорного органа позволяет применять метод изъятия МСК и извлеченные этим методом клетки в широком спектре исследований физиологии и биохимии человека с минимальными этическими ограничениями.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Финансирование. Поисково-аналитическая работа выполнена в рамках научно-исследовательской работы VMA.02.06.2022/026 «Эксплант».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическая экспертиза. Проведение исследования одобрено локальным этическим комитетом ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» МО РФ (протокол № 230 от 17.12.2019).

Участие авторов. В.Е. Чернов — получение, поддержание культуры клеток, текст статьи; М.О. Соколова — получение результатов экспериментов по распределению поверхностных CD-маркеров популяции клеток, текст статьи; А.А. Кокорина — иммуноцитохимическая оценка наличия специфического маркера цитоскелета альфа-актина в популяции клеток методом конфокальной микроскопии; Г.И. Пендинен — визуальная оценка и фотофиксация иммунофлуоресцентного мечения поверхностных антигенов (CD) мезенхимных клеток ткани вартонова студня методом флуоресцентной микроскопии, редактирование текста статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пальцев М.А. Стволовые клетки и клеточные технологии: настоящее и будущее // Ремедиум. 2006. № 8. С. 6–13. EDN: HOCEWV
2. Tolar J., Le Blanc K., Keating A., Blazar B.R. Concise review: hitting the right spot with mesenchymal stromal cells (MSCs) // Stem Cells. 2010. Vol. 28, N 8. P. 1446–1455. doi: 10.1002/stem.459
3. Малешина А.В., Быстрова А.С., Роговая О.С., и др. Тканеинженерные конструкторы кожи и использование стволовых клеток для создания кожных эквивалентов (обзор) // Современные технологии в медицине. 2017. Т. 9, № 1. С. 198–202. EDN: YIZWKF doi: 10.17691/stm2017.9.1.24
4. Паюшина О.В., Домарацкая Е.И., Шевелева О.Н. Участие мезенхимных стромальных клеток в регенерации мышечной ткани // Журнал общей биологии. 2019. Т. 80, № 1. С. 3–13. EDN: YWYFRZ doi: 10.1134/S0044459619010044
5. Калюжная Л.И., Харкевич О.Н., Шмидт А.А., Протасов О.В. Регенераторные свойства внеэмбриональных органов человека в тканевой инженерии // Вестник Российской военно-медицинской академии. 2018. № 4 (64). С. 192–198. EDN: VMOCMF
6. Шаманская Т.В., Осипова Е.Ю., Румянцев С.А. Технологии культивирования мезенхимальных стволовых клеток ex vivo для клинического использования // Онкогематология. 2009. Т. 4, № 3. С. 69–76. EDN: MNICAJ doi: 10.17650/1818-8346-2009-0-3-69-76
7. Александров В.Н., Камилова Т.А., Мартынов Б.В., Калюжная Л.И. Клеточная терапия при ишемическом инсульте // Вестник российской военно-медицинской академии. 2013. № 3 (43). С. 199–205. EDN: RCLBMV
8. Aisenstadt A.A., Erukashvili N.I., Zolina T.L. et al. Comparison of proliferation and immunophenotype of MSC, obtained from bone marrow, adipose tissue and umbilical cord // Herald of North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov. 2015. Vol. 7, N 2. С. 14–22. EDN: UZAGDP
9. Ali H., Al-Yatama M.K., Abu-Farna M., et al. Multi-lineage differentiation of human umbilical cord Wharton's Jelly Mesenchymal Stromal Cells mediates changes in the expression profile of stemness markers // PLoS One. 2015. Vol. 10, N 4. Art. e0122465. doi: 10.1371/journal.pone.0122465
10. Ramos T.L., Sánchez-Abarca L.I., Muntión S., et al. MSC surface markers (CD44, CD73, and CD90) can identify human MSC-derived extracellular vesicles by conventional flow cytometry // Cell Commun. Signal. 2016. Vol. 14. P. 2. doi: 10.1186/s12964-015-0124-8
11. Чернов В.Е., Соколова М.О., Иванова А.К., и др. Получение и культивирование мультипотентных мезенхимальных клеток стромы пуповины человека в лабораторном эксперименте // Известия Российской военно-медицинской академии. 2022. Т. 41, № 3. С. 283–291. EDN: AEJEXW doi: 10.17816/rmmar104363

REFERENCES

1. Pal'tsev MA. Stem cells and cell technologies: the present and the future. *Remedium*. 2006;(8):6–13. (In Russ.) EDN: HOCEWV
2. Tolar J, Le Blanc K, Keating A, Blazar BR. Concise review: hitting the right spot with mesenchymal stromal cells (MSCs). *Stem Cells*. 2010;28(8):1446–1455. doi: 10.1002/stem.459
3. Meleshina AV, Bystrova AS, Rogovaya OS, et al. Skin tissue-engineered constructs and stem cells application for the skin equivalents creation (review). *Modern technologies in medicine*. 2017;9(1):198–218. EDN: YIZWKF doi: 10.17691/stm2017.9.1.24
4. Payushina OV, Domarackaya EI, Sheveleva ON. Participation of mesenchymal stromal cells in muscle tissue regeneration. *Zhurnal obshchey biologii*. 2019;80(1):3–13. (In Russ.) EDN: YWYFRZ doi: 10.1134/S0044459619010044
5. Kalyuzhnaya LI, Kharkevich ON, Schmidt AA, Protasov OV. Regenerative properties of human extraembryonal organs in tissue engineering. *Bulletin of the Russian Military Medical Academy*. 2018;(4(64)):192–198. (In Russ.) EDN: VMOCMF
6. Shamanskaya TV, Osipova EYu, Rummyantsev SA. Mesenchymal stem cells ex vivo cultivation technologies for clinical use. *Onkogematologia*. 2009;4(3):69–76. (In Russ.) EDN: MNICAJ doi: 10.17650/1818–8346-2009-0-3-69-76
7. Aleksandrov VN, Kamilova TA, Martynov BV, Kalyuzhnaya LI. Cell therapy in ischemic stroke. *Bulletin of the Russian Military Medical Academy* 2013;(3(43)):199–205. (In Russ.) EDN: RCLBMV
8. Aisenstadt AA, Erukashvili NI, Zolina TL, et al. Comparison of proliferation and immunophenotype of MSC, obtained from bone marrow, adipose tissue and umbilical cord. *Herald of north-western state medical university named after I.I. Mechnikov*. 2015;7(2):14–22. EDN: UZAGDP
9. Ali H, Al-Yatama MK, Abu-Farna M, et al. Multi-lineage differentiation of human umbilical cord Wharton's Jelly Mesenchymal Stromal Cells mediates changes in the expression profile of stemness markers. *PLoS One*. 2015;10(4):e0122465. doi: 10.1371/journal.pone.0122465
10. Ramos TL, Sánchez-Abarca LI, Muntión S, et al. MSC surface markers (CD44, CD73, and CD90) can identify human MSC-derived extracellular vesicles by conventional flow cytometry. *Cell Commun Signal*. 2016;14:2. doi: 10.1186/s12964-015-0124-8
11. Chernov VE, Sokolova MO, Ivanova AK, et al. Initiation and cultivation of multipotent mesenchymal human umbilical stroma cells in a laboratory experiment. *Russian Military Medical Academy Reports*. 2022;41(3):283–291. (In Russ.) EDN: AEJEXW doi: 10.17816/rmmar104363

ОБ АВТОРАХ

***Владимир Евгеньевич Чернов**, канд. биол. наук; адрес: Россия, 194044, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6; ORCID: 0000-0002-2440-3782; eLibrary SPIN: 8315-1161; e-mail: vmeda-nio@mil.ru

Мargarita Олеговна Соколова; ORCID: 0000-0002-3457-4788; eLibrary SPIN: 3683-6054; e-mail: vmeda-nio@mil.ru

Арина Александровна Кокорина; ORCID: 0000-0002-6783-3088; eLibrary SPIN: 9371-3658; e-mail: arina.alexandrovna.vmeda-nio@mil.ru

Галина Ивановна Пендинен, канд. биол. наук; ORCID: 0000-0003-2814-7074; eLibrary SPIN: 2120-5925; e-mail: pendinen@mail.ru

AUTHORS' INFO

***Vladimir E. Chernov**, Cand. Sci. (Biology); address: 6, Akademika Lebedeva str., Saint Petersburg, 194044, Russia; ORCID: 0000-0002-2440-3782; eLibrary SPIN: 8315-1161; e-mail: vmeda-nio@mil.ru

Margarita O. Sokolova; ORCID: 0000-0002-3457-4788; eLibrary SPIN: 3683-6054; e-mail: vmeda-nio@mil.ru

Arina A. Kokorina; ORCID: 0000-0002-6783-3088; eLibrary SPIN: 9371-3658; e-mail: vmeda-nio@mil.ru

Galina I. Pendinen, Cand. Sci. (Biology); ORCID: 0000-0003-2814-7074; eLibrary SPIN: 2120-5925; e-mail: pendinen@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author