Стволовые клетки
и регенеративная медицина

Под ред. академика РАН и РАМН В.А. Ткачука

Составители: А.Ю. Ефименко, П.И. Макаревич

Выполнено в рамках гранта Российского фонда фундаментальных исследований 11-04-13454 офи-г

4. НАПРАВЛЕННАЯ МИГРАЦИЯ И МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ ПРОГЕНИТОРНЫЕ КЛЕТКИ: УЧАСТИЕ В ВОСПАЛЕНИИ, РЕПАРАЦИИ И РЕГЕНЕРАЦИИ ТКАНИ

Воротников А. В., Суздальцева Ю. Г., Рубцов Ю. П., Аниол Н. В., Горюнов К. В., Кудряшова Т. В., Тюрин-Кузьмин П. А., Ткачук В. А.

Резюме

В настоящее время стволовые и прогениторные клетки рассматриваются как многообещающий инструмент восстановительной терапии. В обзоре кратко рассматривается динамика регенеративного процесса и его возможные патофизиологические исходы. Обсуждаются вероятные источники прогениторных клеток в участках повреждения и как эти клетки могут способствовать регенерации и противодействовать хроническому воспалению и фиброзу. Основное внимание уделяется направленной миграции клеток и мезенхимальным стромальным клеткам как ключевым участникам всех основных этапов восстановления ткани, включая воспаление, репарацию и регенерацию.

Введение

Под репарацией и регенерацией в настоящее время понимается вполне четкая цепь событий. В идеале она приводит к восстановлению на месте повреждения новой ткани, которая по составу и структуре внеклеточного матрикса (стромы) и клеточных компонентов данной ткани (паренхимы) соответствует исходной, приобретая ее функциональную активность. Этот процесс наиболее подробно описан для заживления кожных ран [Singer & Clark, 1999, Shaw & Martin, 2009], но принципиально тот же и при регенерации других тканей [Gurtner et al., 2008, Kumar et al., 2003]. Его нарушения на разных стадиях приводят к развитию значимых для здоровья человека патологий, таких как атеросклероз, инфаркт миокарда, цирроз печени, диабетические язвы, фиброз легких, болезнь Крона и многие другие. На рис. 4.1 приведена классическая схема процесса регенерации и его примерная временная развертка в случае заживления кожных ран. Эта схема является основой при разработке экспериментальных моделей для выяснения клеточных и молекулярных механизмов большинства регенеративных процессов и патологий, связанных с их нарушением [Gurtner et al., 2007, 2008].

Регенеративный процесс включает три последовательных фазы: воспаления, тканеобразования и восстановления функции, тради-

ционно именуемых как воспалительная, пролиферативная и фаза ремоделирования. В сущности, они соответствуют анти-инфекционной реакции воспаления на повреждения различной этиологии, репарации путем быстрого закрытия поврежденного участка и восстановления его исходной формы, и собственно регенерации — замещения временного каркаса постоянной тканью, в идеале соответствующей исходной, с такой же физиологической активностью. Эта терминология будет в основном использована ниже. Каждая последующая фаза функционально связана с предыдущей так, что нарушение этой взаимосвязи приводит к остановке всего процесса на промежуточной стадии, но завершению предшествующей фазы. Поскольку завершение третьей фазы означает успешную регенерацию, то незаконченных промежуточных стадий остаются две и связанные с ними нарушения ведут к хроническому воспалению или фиброзу (рис. 4.2).

Во всех случаях ключевым действующим элементом регенеративного процесса являются живые клетки. Они привлекаются в очаг повреждения из прилежащей ткани или из отдаленных источников (рис. 4.3). Направленная миграция клеток является ключевым событием на разных этапах регенерации и определяет ее конечный успех. Чем выше антивоспалительный и тканезаместительный потенциал клеток, тем эффективнее и скоординированнее протекает весь процесс. В последнее время появляется все больше экспериментальных данных, подтверждаемых клиническими испытаниями, что такими клетками являются клетки-предшественники мезенхимального происхождения. Они обладают выраженными иммуносупрессивными свойствами, значительным дифференцировочным потенциалом, способностью к направленной миграции в очаг повреждения, и множественными паракринными эффектами. Использование этих клеток в регенеративной медицине представляется крайне выгодным и перспективным, особенно заболеваний, для лечения которых не подходят стандартные методы. В данном обзоре преимущественно проанализированы аспекты регенерации, которые связаны с направленной миграцией клеток и действием мезенхимальных предшественников.

Классическая динамика заживления ран

Поскольку любое повреждение связано с нарушением целостности сосудов, немедленной реакцией является агрегация тромбоцитов и формирование фибринового тромба. Он создает барьер, который останавливает кровотечение и предохраняет рану от ин-

фекции. Помимо этого, фибриновый сгусток выступает как временный матрикс, необходимый для миграции клеток и связывания многочисленных провоспалительных факторов. К числу последних относятся молекулы, выделяемые поврежденными и погибающими клетками, в совокупности именуемые DAMP (damage-associated molecullar pattern). Это трудно переводимое название возникло по аналогии с PAMP (pathogen-associated molecular patterns) — набором молекул, выделяемых в процессе инфекции патогенными микроорганизмами [Bianchi, 2007]. Третью группу таких молекул составляют стресс-зависимые молекулы SAMP (stress-associated molecular pattern), выделяемые клетками в условиях стресса, в том числе окислительного [Rubartelli & Sitia, 2009]. Все эти молекулы узнаются и связываются специальными рецепторами PRR (pattern recognition receptors) преимущественно воспалительных клеток, в которых они быстро активируют сигнальные каскады, приводящие к развитию воспалительного ответа [Bianchi, 2007].

Кроме того, дегрануляция тромбоцитов приводит к освобождению факторов роста и некоторых цитокинов, которые активируют окружающие клетки и могут выступать в роли хемоаттрактантов. К ним относятся тромбоцитарный (PDGF), эпидермальный (EGF) и трансформирующие факторы роста (TGF-α и TGF–β), факторы роста фибробластов (bFGF) и сосудистого эндотелия (VEGF), цитокины CXCL4 и RANTES. Приблизительно в это время или несколько позже в очаге воспаления начинает накапливаться стромальный фактор SDF-1, известный также как CXCL12 лиганд. Он является мощным хемоаттрактантом, избирательно действующим на гематопоэтические клетки, которые, в отличие от мезенхимальных, экспрессируют много CXCR4 — основного рецептора SDF-1. Система SDF-1/CXCR4 играет важную роль в привлечении нейтрофилов, моноцитов и лимфоцитов в очаг воспаления и рассматривается сейчас как имеющая терапевтический потенциал [Lau & Wang, 2011]. Важно также, что тромбоциты секретируют фибронектин и тромбоспондин, которые создают физическую основу для внедрения клеток.

Воспалительная фаза начинается с приходом нейтрофилов и гематопоэтические клетки играют в ней ключевую роль (рис. 4.1). Нейтрофилы очищают рану от обломков внеклеточного матрикса и патогенов в ходе респираторного взрыва [Nathan, 2006]. Они секретируют хемоаттрактанты (TGF-β, MCP-1) и образуют пероксид водорода, которые привлекают и активируют моноциты, вызывая

их дифференцировку в макрофаги. Макрофаги фагоцитируют отработавшие нейтрофилы, берут на себя их функцию и привлекают в очаг лимфоциты, фибробласты и МСК. Лимфоциты осуществляют иммунный ответ, а фибробласты и МСК вместе с макрофагами создают грануляционную ткань — временный матрикс, который выполняет механическую и регуляторную функции. Помимо этого, МСК влияют на интенсивность воспалительной реакции, а также на ре-эпителизацию, действуя на кератиноциты. Однако их роль и механизмы участия в этих процессах остаются пока неясными.

Воспаление является неотъемлемой частью регенеративного процесса и практически всегда наблюдается при тканевых повреждениях. Поэтому до сих пор не совсем ясно, обязательно ли оно провоцирует наступление последующих событий, или выполняет чисто защитные и стерилизующие функции. Более того, последние исследования показывают, что ни один из типов воспалительных клеток не является необходимым для эффективной регенерации, а вклад воспаления может быть даже отрицательным, замедляя последующую регенерацию или вызывая избыточный фиброз [Martin & Leibovich, 2005]. Однако в любом случае следующие за воспалением физиологические реакции должны быть адаптированы к его результату и, скорее всего, функционально с ним тесно связаны.

Макрофаги являются ключевыми клетками, определяющими эффективность воспалительного процесса и переход к последующей фазе репарации. Помимо фагоцитирующей активности они выделяют колониестимулирующий фактор (GM-CSF) — цитокин, который диффундирует в кровь и действует как мощный мобилизующий агент для гематопоэтических клеток-предшественников костного мозга. Привлечение последних важно в случае сильного или затянутого воспаления. Кроме того, макрофаги секретируют другие цитокины, такие как фактор некроза опухолей альфа (TNF-α) и интерлейкины 1 и 6 (IL-1/6); они вызывают миграцию в очаг воспаления и активацию там иммунных лимфоцитов.

Не менее важно, что макрофаги секретируют также факторы роста PDGF, TGF-β, EGF, SDF-1, VEGF и инсулиноподобный фактор роста (IGF-1). Это позволяет резко повысить концентрацию этих молекул, ранее уже образованных тромбоцитами. В результате формируется их крутой градиент от очага воспаления к окружающим тканям и сосудам, который задает направление и стимулирует хемотаксис клеток мезенхимальной природы.

Репаративная фаза связана с приходом фибробластов и МСК, которые принимают эстафету и осуществляют ремоделирование матрикса. Во времени эта фаза сильно перекрывается с предыдущей фазой воспаления. Поскольку в результате воспаления происходит значительная деструкция участка повреждения, эта зона подвергается быстрому закрытию и восстановлению формы. Фибробласты и МСК обладают высокой синтетической активностью и секретируют в межклеточное пространство фибронектин, коллаген, гликозаминогликаны (гиалуроновая кислота — наиболее важный компонент) и протеогликаны. Они также экспрессируют внеклеточные протеазы, с помощью которых изменяют (ремоделируют) структуру первичного фибринового матрикса с образованием грануляционной ткани, которая создает каркас для вновь возникающих структур.

В случае кожных повреждений, кератиноциты активно мигрируют под струпом по поверхности поврежденного дермиса и грануляционной ткани, пролиферируют и дифференцируются, восстанавливая барьерную функцию эпителия. Параллельно, запускается локальный ангиогенез и формируется сеть новых сосудов, обеспечивающих окружающие клетки кислородом и питательными веществами.

На следующих этапах макрофаги активируют фибробласты и МСК, которые дифференцируются в миофибробласты. Эти клетки имеют развитый сократительный цитоскелет и обеспечивают локальное сокращение и сведение краев раны [Tomasek et al., 2002]. Совместно, мезенхимальные клетки — МСК, фибробласты и миофибробласты — синтезируют коллаген, как правило, III-го типа, и таким образом ремоделируют грануляционную ткань, постепенно замещая ее коллагеновым матриксом.

Фаза регенерации также значительно перекрывается с предыдущей. Она включает дальнейшее ремоделирование внеклеточного матрикса и восстановление структуры и функции ткани — двух связанных, но функционально различных этапов единого процесса. Клетки, в основном фибробласты, секретируют коллаген I типа и матриксные металлопротеиназы (ММП). ММП деградируют фибронектин, гиалуроновую кислоту и коллаген III типа, а более плотный и структурированный коллаген I типа, содержащий большее число поперечных сшивок, встраивается на их место. По мере того как синтетическая активность фибробластов снижается, они удаляются из зоны повреждения путем апоптоза или дифференцируются в миофибробласты, которые обеспечивают сократительную

активность. Края раны сближаются, а область раны замещается практически бесклеточным рубцом.

Дальнейшая регенерация и полное восстановление функций ткани происходит в исключительных случаях. У взрослого человека регенерация завершается обычно на стадии ремоделирования. МСК и фибробласты синтезируют избыточное количество коллагена, что приводит к формированию келоидного рубца или гипертрофического шрама. Полная регенерация происходит только в случае фетальной ткани и на ранних стадиях утробного развития [Colwell et al., 2003, Gurtner et al., 2007]. Напротив, у некоторых животных регенерация происходит эффективно в любом возрасте.

В настоящее время физиологические, клеточные и молекулярные механизмы так называемой «фетальной регенерации» остаются практически неизвестными. Несмотря на это выявлены важные закономерности. Во-первых, замечено, что восстановление фетальных тканей происходит практически в отсутствие воспаления, а воспаление ведет к появлению коллагена и формированию шрама там, где обычно его не образуется [см. Colwell et al., 2003, и ссылки в этой работе]. Во-вторых, анализ экспрессионных профилей на разных стадиях репаративного процесса [см. Shaw & Martin, 2009] и регенерирующих тканей низших животных [см. Gurtner et al., 2008], а также использование трансгенных моделей [см. Grose & Werner, 2004] показали, что нет одного или нескольких факторов, которые определяют эффективность регенерации. Регенерация достигается в результате комбинации природных факторов, изначально характерных для ткани, и воздействий внешней среды. В-третьих, все более очевидно участие в этом процессе стволовых и/или прогениторных клеток [см. Gurtner et al., 2007, Kumar et al., 2009]. Резидентные, или мобилизованные из других ниш, эти клетки, скорее всего, и являются тем необходимым фактором, который под действием внешних сигналов определяет восстановление морфологии и функций живой ткани.

Прочность регенерированной ткани крайне вариабельна. В норме ее устойчивость к нагрузкам восстанавливается на 50–70%, а в случае патологий — всего на 10–20 %. Возможны три основных исхода при нарушениях на какой-либо стадии регенерации [Kumar et al., 2009]. Во-первых, дефект образования грануляционной ткани или дальнейшего ремоделирования снижает устойчивость рубца к нагрузкам, повышая вероятность его разрыва, или ведет к затянутому воспалению и трофическим язвам, таким

как диабетические. Во-вторых, дефекты ремоделирования часто связаны с чрезмерным накоплением коллагена и образованием гипертрофического шрама или келоидного рубца. Гиперактивация МСК и фибробластов, выполняющих ключевую функцию на этом этапе, может также стимулировать образование опухолей и развитие фиброматозов. В-третьих, дефект сокращения может вызывать контрактуру и деформации в области раны и прилежащих тканей, что снижает свободу движений и подвижность сочленений. Это особенно характерно для обширных ожоговых ран кистей рук и предплечий, стоп, и верхней части туловища. Во всех случаях клеточная терапия с использованием клеток-предшественников рассматривается как многообещающий инструмент восстановительной терапии.

Регенеративные нарушения: хроническое воспаление и фиброз

При нормальном завершении воспалительной фазы повреждающие факторы нейтрализуются и запускаются процессы репарации и регенерации. Однако в некоторых случаях, в том числе связанных с расстройствами кровообращения, облучением, атеросклерозом, диабетом и другими, воспаление не купируется. В таких ситуациях оно продолжается в хроническом виде и репарация не наступает (рис. 4.2). Хронические воспаления могут быть местного или системного характера. Примеры первых — это персистирующие раны при синдроме диабетической стопы или хронические язвы кишечника при хроническом язвенном колите (болезни Крона); вторых — аутоиммунные заболевания, устранение повреждающих факторов при которых на современном этапе является проблематичным, или хронический сепсис. При хронических воспалениях нарушен процесс миграции клеток в очаг повреждения, изменен нормальный уровень и баланс провоспалительных цитокинов и временный внеклеточный матрикс не образуется. Достижение фиброза поврежденных участков считается хорошим результатом при терапии хронических воспалений [Rieder et al., 2007].

В норме, за фазой воспаления следует репарация. При этом создается временный внеклеточный матрикс — грануляционная ткань, которая далее замещается постоянной. Именно последний переход определяет, будет ли прежде поврежденный участок заполнен рубцовой тканью (тогда развивается фиброз), или полноценно регенерирует с восстановлением паренхимы и функциональной активности ткани (рис. 4.2). Только в случае некоторых патологий (связанных с функционированием жизненно важных органов) быстрое образование рубцовой ткани является необходимым

условием для выживания. Так, замедление репаративных процессов при инфаркте миокарда создает большой риск летального исхода. В остальных случаях, образование шрама или рубца является нежелательным, так как приводит к снижению функциональной активности ткани. Например, при кожных повреждениях восстановление происходит лишь на 20—50 %, кроме того возникает вероятность развития контрактур и келоидных образований.

В малоконтролируемых условиях образование рубца (или шрама) является наиболее естественной реакцией, связанной с физическим закрытием участка повреждения и восстановлением его прежней формы. Напротив, в регенерации задействованы специфические молекулы и механизмы. Вместе с тем, их нарушение и, как следствие, неспособность ткани регенерировать не связаны с генетическими аномалиями наполняющих ее клеток, а вызваны эпигенетическими изменениями, затрагивающими экспрессию и активность внутриклеточных и матриксных белков. Как обсуждается в последнем разделе, у человека эти изменения наступают с возрастом и типичны для взрослого организма. В такой ситуации предотвращение фиброза и смещение баланса в пользу регенерации требует принудительного вмешательства, что представляет собой основную задачу практической регенеративной медицины.

В настоящее время предполагается, что стромальные клетки-предшественники мезенхимального направления дифференцировки представляют собой удобный инструмент для таких воздействий. Геном этих клеток более доступен для прочтения, этот процесс регулируется динамичнее, и более адаптивен, чем в дифференцированных клетках. Как следствие, эти клетки могут выполнять в очаге воспаления регуляторную функцию по отношению к другим клеткам, экспрессируя и секретируя необходимые факторы. Будучи восприимчивы к внешним сигналам, они могут динамично менять свой экспрессионно-секреторный профиль в зависимости от текущих условий. Наконец, введенные извне, эти клетки могут также служить средством адресной доставки этих факторов и/или генетического материала. Решение вопросов, связанных с выяснением функциональных особенностей этих клеток, повышением эффективности их попадания в зону воспаления и выполнением в ней своих задач является основной задачей экспериментальной регенеративной медицины.

Воспаление

Воспаление необходимо для эффективного устранения причины

повреждения ткани (инфекции), ограничения вредного воздействия на ткань, а также развития системного ответа при обширных поражениях. Распознавание причины повреждения (инфекции или травмы) достигается за счет связывания рецепторами PRR чужеродных молекул, которые попадают в организм при инфекции, либо продуктов гибели поврежденных клеток. Совокупность молекулярных сигналов стрессовых воздействий принято называть DAMP, SAMP и PAMP. Ранний ответ на стрессовое воздействие в большой степени перекрывается с иммунным ответом на инфекцию или заражение паразитами, поэтому за распознавание сигнала о повреждении отвечает эволюционно древняя система врожденного иммунитета. Соответственно, рецепторы PRR расположены на поверхности клеток врожденного иммунитета (тучных клеток, макрофагов, базофилов, нейтрофилов, натуральных киллеров, эозинофилов, дендритных клеток), а также на клетках ткани [Bianchi, 2007; Crosby & Waters, 2010]. И в случае инфекции, и в случае повреждения система врожденного иммунитета предотвращает быстрое распространение инфекционного агента, а также устраняет/ограничивает вредные токсические воздействия путем поглощения и переваривания токсинов, мертвых и зараженных клеток, и бактерий. Еще одна важнейшая функция клеток врожденного иммунитета заключается в передаче молекулярных сигналов стресса клеткам системы приобретенного (адаптивного) иммунитета (Т- и В-клеткам) [Barron & Wynn, 2011] и создании оптимальных условий для их активации и размножения. Клетки приобретенного иммунитета путем секреции растворимых факторов (цитокинов и иммуноглобулинов) обеспечивают поддержание воспалительных условий в течение продолжительного времени, способствуют созреванию специализированных эффекторных популяций (таких как цитотоксические Т-клетки, плазматические клетки и клетки памяти), и увеличивают фагоцитирующую и миграционную активность клеток врожденного иммунитета (в особенности макрофагов).

Факторы, участвующие в развитии воспаления, включают механизмы, которые контролируют избыточную активацию клеток иммунитета и устраняют воспаление. Активированные клетки отличает повышенная чувствительность к апоптозу, высокий уровень провоспалительных цитокинов приводит к десенситизации их рецепторов на поверхности клеток, происходит увеличение секреции белковых и липидных факторов, которые подавляют деление и активацию клеток (особенно важен вклад анти-воспалительных

цитокинов TGF-β и IL-10). Необходимо отметить, что в условиях острого воспаления происходит увеличение числа иммуносупрессорных клеток, в частности, альтернативно-активированных макрофагов и регуляторных Т-клеток, которые контролируют воспаление. Все эти механизмы отвечают за быстрое и продуктивное устранение воспалительного стимула и предотвращение избыточного повреждения ткани цитотоксическими факторами, вырабатываемыми в ходе воспаления.

Воспаление в значительной степени определяет характер микроокружения, в котором происходит репарация и последующее заживление ткани. Именно поэтому продолжительность воспаления, соотношение уровней различных факторов воспаления определяет скорость, эффективность и результат репарации и заживления [Whitby & Ferguson, 1991; Martin, 1997]. На клеточном уровне это означает, что факторы, участвующие в развитии воспаления и его устранении динамическим образом влияют на привлечение в область повреждения мультипотентных клеток и клеток-предшественников, а также на мезенхимные клетки, в первую очередь фибробласты, которые обеспечивают первичную репарацию ткани. Эти же факторы (в первую очередь речь идет о растворимых молекулах цитокинов, хемокинов и факторов роста) определяют протекание процесса эпителиально-мезенхимного перехода, который увеличивает число клеток, вовлеченных в репарацию [Kalluri, 2009]. С другой стороны, факторы, позитивно влияющие на репаративный статус, стимулируют выработку фибрина и ремоделирование внеклеточного матрикса, накоплению в области повреждения фибробластов и миофибробластов. В случае патологических вариантов развития сценария, например чрезмерного воспалительного повреждения ткани или хронического воспаления, полноценное восстановление нарушенной ткани оказывается невозможным из-за замещения больших участков ткани фибрином или соединительной тканью [Ferguson & O'Kane, 2004]. Альтернативный вариант заключается в том, что протекание репарации в неадекватных условиях может закончиться трансформацией клеток, попавших в микроокружение, поддерживающее состояние клеточной пластичности. Крайним случаем этого является развитие злокачественных опухолей [Occleston et al., 2008].

Является ли воспаление обязательным для репарации ткани? Этот вопрос остается открытым. В реальных условиях репарация и регенерация тканей сопровождается воспалением. Установлено,

что отсутствие, например, макрофагов, которые играют ключевую роль в развитии воспаления (и других клеток иммунной системы), не приводит к полному подавлению репарации ткани. Однако результат такой репарации и последующей регенерации, безусловно, отличается от такового в нормальных условиях. Репарация ткани в случае иммунодефицитных животных или подавление иммунологического ответа в ходе заживления ран негативно влияет на образование шрамов и фибротические изменения в ткани [Ashcroft et al., 1999; Gawronska-Kozak et al., 2006; Martin et al., 2003]. Полное восстановление тканей человека после повреждения удается обнаружить только в случае тканей плода. К сожалению, такое развитие событий невозможно в условиях взрослого организма. Это различие можно объяснить относительно большей пропорцией стволовых и прогениторных клеток в тканях плода по сравнению с тканями взрослого, и тем более, стареющего организма. Ткани плода еще не до конца сформированы, что возможно упрощает миграцию клеток и ремоделирование молодой ткани. Регенеративный потенциал стволовых и стромальных клеток плода выше, чем у клеток взрослого. Это обусловлено участием клеток во множественных раундах репарации и регенерации, число которых растет с возрастом организма. Повторяющиеся повреждения и инфекции постепенно приводят к истощению запасов клеток с повышенным репаративным и пролиферативным потенциалом. С другой стороны, у плода не полностью развита иммунная система, отсутствует кишечная флора и другие микроорганизмы. Иммунная система плода не «видела» пищевых антигенов, контакт с которыми после рождения необходим для установления нормального иммунологического равновесия и физиологического уровня воспаления. Таким образом, возможность полной регенерации тканей плода невозможно объяснить только необычным стерильным псевдо-иммунодефицитным состоянием и отсутствием воспалительной реакции.

Следует подчеркнуть, что контроль воспаления, который заключается в изменении уровня про- и противо-воспалительных молекул, а также блокирования сигнала через рецепторы этих молекул на поверхности клеток-мишеней, может рассматриваться как способ управления репаративными и отчасти регенеративными процессами в поврежденных тканях. В данном случае речь идет не столько о системном подавлении активации клеток иммунной системы, а о контроле развития воспаления на локальном уровне за счет поиска новых ингибиторов про-воспалительных молекул

(таких как цитокины) и их рецепторов [Occleston et al., 2008; Ferguson & O'Kane, 2004]. Такой подход, особенно с использованием малых молекул позволит в будущем контролировать процесс репарации регенерации ткани на локальном уровне, не вызывая индуцированных иммунодефицитных состояний.

Направленная миграция клеток

Направленное движение клеток является ключевым событием, без которого завершение воспаления и успешная регенерации становятся абсолютно невозможными. В заживлении ран участвует множество разных клеток: тромбоциты, нейтрофилы, моноциты/макрофаги, лимфоциты, фибробласты, эндотелиальные и, в случае кожных ран, эпителиальные клетки (рис. 4.3). Их источником является непосредственно окружающая рану ткань, а также прилегающие к ней сосуды. Кроме того, отдаленные компартменты обеспечивают дополнительный приток клеток, обладающих повышенным регенеративным потенциалом. Прежде всего, это мультипотентные гематопоэтические клетки-предшественники — потомки эмбриональных стволовых клеток костного мозга, которые способны дифференцироваться в различные лейкоциты [Spangrude et al., 1988]. С большой вероятностью, к их числу также относятся эндотелиальные клетки-предшественники [Khakoo & Finkel, 2005]. Эти клетки мобилизуются в кровь и попадают в участок воспаления из сосудов.

Все клетки активно перемещаются на значительные расстояния во время первой (воспалительной) и второй (репаративной) стадий; от этого зависит успешность завершающей (регенеративной) стадии. Интуитивно понятно, что для того, чтобы клетки могли успешно и своевременно выполнить весь физиологически необходимый каскад событий, их действия должны быть четко согласованы в пространстве и времени. Подобно тому, как дирижер управляет действиями оркестра, такая координация включает управление движением клеток, его направление и регуляцию как внутри клеток, так и извне. В то время как внутриклеточные механизмы рецептор-зависимого контроля движения клеток интенсивно исследуются и недавно подробно описаны [Воротников, 2011], механизмы межклеточных взаимодействий и координации направленного движения клеток в рану остаются во многом неясны.

Четкая последовательность появления клеток разных типов в очаге повреждения, показанная на рис. 4.1, дает основания предполагать, что она связана как с изменением профиля цитокинов в этом участке, так и с преимущественной экспрессией на поверх-

ности разных клеток определенных цитокиновых рецепторов, обеспечивающих хемотаксис. Действительно, лейкоциты используют для хемотаксиса рецепторы, сопряженные с тримерными G-белками плазматической мембраны. Их лигандами выступают классические цитокины CXCL-ряда. Эти небольшие по размеру клетки слабо адгезируют и движутся с большими скоростями, до 10 микрон в минуту. Они легко меняют форму и проникают в узкие промежутки между окружающими клетками или компонентами внеклеточного матрикса за счет амебоидного движения [Even-Ram & Yamada, 2005, Friedl & Wolf, 2010]. Их отличает высокая чувствительность к хемотактическим лигандам, за счет которой они эффективно определяют их низкие концентрации и направление пологих градиентов [Воротников, 2011].

Напротив, мезенхимальные фибробласты и МСК, эпителиальные и эндотелиальные клетки имеют гораздо более крупные размеры, значительно больше используют интегриновую систему для прикрепления к матриксу и поэтому движутся на порядок медленнее. Кроме того, такие размеры и развитый цитоскелет не позволяют им легко изменять геометрию и использовать амебоидный тип движения [Friedl & Wolf, 2010]. Эти клетки движутся внутри тканей, преимущественно расщепляя внеклеточный матрикс, и задействуют для этого внеклеточные протеазы, главным образом, ММП. Для хемотаксиса фибробласты и МСК используют в основном рецепторы ростовых факторов; эти клетки менее чувствительны к хемоаттрактантам и поддерживают направление только в крутых градиентах.

Несмотря на механистичность, такая картина может в общих чертах объяснить последовательность появления разных клеток в области повреждения. Воспаление является важным начальным фактором. Оно возникает немедленно при воздействии на ткань повреждающих факторов и никак не зависит от классического иммунного ответа, т. е. иммунной памяти и механизмов специфического иммунного ответа. Первыми в участке воспаления появляются нейтрофилы, которые издалека чувствуют пологие градиенты молекул, ассоциированных с патогенами (PAMP) и/или выбрасываемых из поврежденных клеток (DAMP). Недавние исследования также показали, что первые нейтрофилы движутся в рану по градиенту пероксида водорода, который образуется там в результате окислительного стресса как стабильный метаболит активных форм кислорода [Niethammer et al., 2009]. В зоне воспаления эти клетки

обеспечивают окислительный взрыв, генерируя еще больше активных форм кислорода, а также секретируют набор цитокинов и факторов роста.

CXCL-цитокины служат хемоаттрактантами для самих нейтрофилов и приходящих вслед за ними моноцитов и лимфоцитов. Этих клетки направленно мигрируют из отдаленных участков и, в наибольшем количестве, из окружающих рану сосудов. Амебоидный тип движения (без деградации матрикса) и высокая чувствительность к хемоаттрактантам обеспечивают им быстрый ответ и эффективную навигацию. Помимо этого, нейтрофилы и, видимо, большинство лейкоцитов, обладают уникальной способностью к детекции сразу нескольких хемотактических градиентов и так называемой «эстафетной навигации» в таких градиентах на дальние расстояния [Foxman et al., 1999]. Ее смысл состоит в том, что клетки реагируют преимущественно на градиент «целевого» фактора, даже если он менее выражен, чем градиент «промежуточного фактора». Таким образом, миграция этих клеток может переключаться с одного фактора на другой. Насколько эффективно такое переключение и «эстафетная навигация» работают в очаге воспаления до конца неизвестно, но логично предположить, что миграция может быть обеспечена сменяющимся на разных стадиях набором цитокинов.

Факторы роста секретируются лейкоцитами и освобождаются из образующих тромб тромбоцитов, поврежденных клеток и внеклеточного матрикса с которым они связаны. PDGF и bFGF являются главными хемоаттрактантами для мезенхимальных клеток. Эти молекулы в избытке диффундируют из раны и наполняют всю область вокруг. Как следствие, они не образуют достаточно крутого градиента, который фибробласты могли бы однозначно интерпретировать. Считается, что фибробласты создают такой градиент сами себе с помощью эндоцитоза [Schneider & Haugh, 2006]. Связываясь с фронтальными рецепторами, факторы роста запускают эндоцитоз и десенситизацию активированных рецепторов на лидирующем крае клетки. В эндосомах лиганды диссоциируют и деградируют, а рецепторы возвращаются на клеточную мембрану. Продвигаясь вперед, клетка, таким образом, формирует локальный градиент ростовых факторов между своей передней и задней частью. Математический расчет, моделирование и эксперимент подтверждают возможность этого механизма [Schneider & Haugh, 2005]. Привлечение резидентных МСК из прилегающих зон, вероятно, происходит сходным

образом. Вместе с тем, мезенхимальные клетки движутся медленно и часто спонтанно меняют направление, поэтому создаваемый клетками градиент не всегда направлен обязательно в сторону раны. Их движение также замедляется из-за необходимости экспрессировать внеклеточные протеазы и деградировать матрикс. В силу этих причин хемоаттрактанты, по-видимому, в основном ускоряют миграцию этих клеток, но не делают ее строго прямолинейной. Это может быть причиной того, что основная доля мезенхимальных клеток появляется в очаге воспаления гораздо позже лейкоцитов, ближе к концу первой фазы воспаления при его нормальном течении.

Главной задачей фибробластов и МСК в очаге повреждения является ремоделирование временной ткани и ее витализация. Для этого необходимо переключение миграции на пролиферацию и секрецию белков матрикса. Хотя внутриклеточный механизм такого переключения не ясен, но оно происходит при повышении концентрации PDGF до уровня, который характерен для зоны воспаления [De Donatis et al., 2008]. Другой сигнал, регулирующий одновременно миграцию и пролиферацию у фибробластов, — это пероксид водорода [Тюрин-Кузьмин и др., 2010, Loo et al., 2011]. Может ли он переключать миграцию на пролиферацию, пока неясно.

Направленная миграция эпителиальных клеток необходима для реэпителизации, а эндотелиальных клеток — для ангиогенеза (рис 4.3). Подробнее эти процессы рассмотрены ниже. Здесь нужно отметить, что эти клетки тоже используют рецепторы факторов роста в качестве основных хемотактических, но узнают другие лиганды. Если PDGF и bFGF регулируют миграцию мезенхимальных клеток, то EGF является основным хемоаттрактантом для эпителиальных клеток, а VEGF — для эндотелиальных. Локальная продукция этих молекул дает возможность для избирательной активации миграции указанных клеток.

Мезенхимальные стромальные клетки

В настоящее время не вызывает сомнения, что мезенхимальные клетки-предшественники принимают участие в регенеративном процессе и привлекаются в очаг воспаления. Однако до сих пор неясно, мобилизуются ли они из костного мозга или окружающих тканей. Мезенхимальные клетки стромы костного мозгаявляются потомками эмбриональных стволовых клеток, тогда как резидентные мезенхимальные стромальные клетки (МСК, называемые также «взрослыми стволовыми клетками»), присутствуют во многих тканях, включая мышечную, жировую, нервную,

и другие [Singer & Caplan, 2011]. Они дают начало специализированным клеткам — гладкомышечным клеткам сосудов, кардиомиоцитам, соединительнотканным, мышечным и др. Морфологически и функционально разнородные стромальные фибробласты являются производными МСК. В этой связи правомерность использования термина «фибробласт» для определения этих клеток в последнее время дискутируется в пользу более общего их названия как МСК. Резидентные МСК и фибробласты рассматриваются в данном обзоре как крайне близкородственные клетки.

Классические представления о роли МСК в регенерации ограничивают их участие фазами репарации и ремоделирования (синтез и фибриллогенез коллагена, создание грануляционной ткани, участие в ангиогенезе за счет паракринных эффектов). Однако последние исследования показывают, что МСК участвуют и в фазе воспаления, оказывая провоспалительное действие. Анализ имеющихся к настоящему времени данных, представленный ниже, свидетельствует о том, что МСК наравне с другими клетками принимают участие в регуляции практически всех физиологических процессов, происходящих при регенерации ткани. Их действие часто позволяет избежать развития хронического воспаления и вносит критический вклад в полноценность регенерации поврежденной ткани. И наоборот, неспособность тканей к полноценному завершению воспалительной реакции, развитие хронического воспаления и нарушение процесса репарации связывают на современном этапе именно с недостаточностью функциональной активности МСК в очаге воспаления и/или недостаточным привлечением МСК из других тканей.

На сегодняшний день известно, что на поверхности МСК экспрессирован набор Toll-подобных рецепторов, отвечающих за узнавание молекул, ассоциированных с патогенами и выбрасываемых из поврежденных клеток (PAMP и DAMP). Активация этих рецепторов в самом начале воспаления вызывает миграцию МСК в очаг поражения [Ren et al., 2008, Singer & Caplan, 2011] и секрецию ими провоспалительных цитокинов, включая IL-1, IL-6, IL-8, TNF-α, IFN-γ, и таких хемокинов, как CCL2, CXCL9, CXCL10 и CXCL11 [Tomchuck et al., 2008, Honczarenko et al., 2006]. Эти молекулы действуют паракринно на клетки иммунной системы, несущие специфические рецепторы для этих лигандов, и стимулируют направленную миграцию нейтрофилов, моноцитов, Т-клеток и натуральных киллеров в очаг воспаления. Таким образом, на первой стадии

воспаления МСК создают провоспалительное микроокружение и привлекают в очаг последующих участников этого процесса.

Мигрирующие в очаг воспаления лейкоциты выделяют спектр провоспалительных факторов, в том числе цитокины TNF-α, IFN-γ и IL-1. В ответ на действие этих цитокинов, МСК секретируют факторы, вызывающие подавление воспалительной реакции и, в частности, супрессию активации иммунных клеток [English et al., 2007, Ryan et al., 2007]. Несмотря на то, что вопрос о реципрокной регуляции МСК и иммунных клеток весьма актуален, молекулярные механизмы этого взаимодействия до сих пор остаются во многом неясными.

Описаны различные по проявлениям и механизмам иммуносупрессивные свойства МСК in vitro. Отмечено, что МСК подавляют пролиферацию периферических Т-лимфоцитов, активированных аллоантигенами, митогенами или антителами к Т-клеточному рецептору [Rasmusson, 2006]. Обнаружена способность МСК подавлять дифференцировку и созревание дендритных клеток. Последние вносят критический вклад в активацию Т-лимфоцитов, так как при созревании на поверхности дендритных клеток появляются ко-стимуляторные молекулы CD80 и CD86, необходимые для эффективной стимуляции Т-клеток. Таким способом МСК могут способствовать накоплению незрелых антиген-презентирующих клеток, обладающих супрессивным или ингибиторным фенотипом. Кроме того, при со-культивировании МСК и дендритных клеток снижается продукция провоспалительных цитокинов и увеличивается секреция противовоспалительных [Jiang et al., 2005, Nauta et al., 2006]. При этом у дендритных клеток снижена экспрессия хемокиновых рецепторов и способность к хемотаксису. Это означает, что МСК могут опосредованно подавлять пролиферацию активированных Т-лимфоцитов, действуя на дендритные клетки.

Другой механизм иммуносупрессорного действия МСК может заключаться в активации регуляторных Т-клеток, которые подавляют пролиферацию и функцию активированных Т- и В-клеток [English et al., 2009, Maccario et al., 2005]. МСК подавляют дифференцировку В-клеток в плазматические клетки in vitro, а также пролиферацию и секрецию ими иммуноглобулинов IgM и IgG1. В присутствии МСК у В-клетки понижают экспрессию хемокиновых рецепторов, что негативно отражается на их способности к хемотаксису [Asari et al., 2009, English et al., 2008].

Секреторная активность МСК и спектр секретируемых ими супрессорных факторов, по-видимому, не постоянны, а определяются динамическим взаимодействием МСК с активированными лимфоцитами [Rasmusson, 2006]. Взаимная регуляция включает как воздействие на МСК клеток иммунной системы и медиаторов иммунного ответа (цитокинов, хемокинов, простагландинов и др.), так и ответное воздействие МСК на клетки иммунной системы.

Механизм иммунносупрессивного действия МСК на данный момент малопонятен. По-видимому, он основан на паракринных эффектах. Так, в модели сокультивирования МСК с активированными лимфоцитами было показано, что повышена экспрессия циклооксигеназы COX-2 и синтез простагландина PGE-2 МСК. Последний действует плейотропно, влияя одновременно на активацию В-клеток и индукцию регуляторных Т-клеток. Во-вторых, культивирование МСК в присутствии провоспалительных цитокинов, таких как IFN-γ, TNF-α и IL-6, ведет к значительному увеличению экспрессии индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), которая катализирует преобразование триптофана в кинуренин. Истощение по триптофану индуцирует появление Т-клеток с регуляторным фенотипом. Вместе эти события ведут к повышению продукции провоспалительных цитокинов и хемокинов, которые, стимулируют иммунносупрессорную активность МСК [Meisel et al., 2004, Chen et al., 2010]. Помимо вышеуказанных цитокинов, МСК секретируют TGF-β [Di Nicola et al., 2002] и образуют оксид азота индуцируемой NO синтазой (iNOS) [Ren et al., 2008]. Эти молекулы также рассматриваются как потенциальные иммунносупрессоры.

Эффект супрессии активированных иммунных клеток мезенхимальными клетками in vitro является дозозависимым. Он усиливается с увеличением пропорции МСК при сокультивировании этих клеток с активированными лимфоцитами [Le Blanc et al., 2003, Jiang et al., 2005, Corcione et al., 2006]. Этим можно отчасти объяснить противоречивость ряда экспериментальных данных относительно супрессорных свойств МСК, полученных в условиях разного провоспалительного микроокружения. Так, в некоторых условиях in vitro стимуляция МСК патоген-ассоциированными молекулами проиводила к увеличению секреции провоспалительных факторов, но не супрессорной реакции [Le Blanc et al., 2003]. Можно предположить, что иммунносупрессорные свойства МСК изменяются в условиях in vivo, проявляясь и усиливаясь с увеличением доли этих клеток в участке воспаления. Это может происходить за счет

миграции МСК из прилегающих или отдаленных тканей (например, костного мозга) и/или их пролиферации в очаге воспаления.

Помимо вышеперечисленных молекул, рассматриваемых как потенциальные иммунносупрессоры, МСК секретируют набор ростовых факторов, включая VEGF, HGF, IGF, bFGF, GM-CSF, SCF, SDF-1. Они могут опосредовать антиапоптозные, ангиогенные и антифиброзные эффекты МСК, а также поддерживать миграцию, пролиферацию и дифференцировку фибробластов, резидентных и рекрутированных в очаг воспаления прогениторных клеток [Singer & Caplan, 2011]. Эти факторы играют значительную роль в регуляции начальных этапов репарации.

Мигрирующие в очаг воспаления и пролиферирующие фибробласты и МСК ответственны за создание нового внеклеточного матрикса взамен утраченного. Как уже отмечалось выше, эти клетки секретируют фибронектин, коллаген, гиалуроновую кислоту и протеогликаны. Синтезируемые этими клетками внеклеточные протеазы участвуют в замещении первичного матрикса грануляционной тканью, которая образует трехмерный каркас для дальнейшего восстановления паренхимы.

Регенеративный и терапевтический потенциал МСК был также исследован в нескольких экспериментальных животных моделях in vivo. Результаты этих исследований, полученные при системном введении культивированных МСК животным с экспериментальным диабетом [Lee et al., 2006], аутоиммунным энцефаломиелитом (рассеянным склерозом) [Constantin et al., 2009, Rafei et al., 2009], ревматоидным артритом [Gonzalez et al., 2009], системной красной волчанкой [Sun et al., 2009] и другими важными заболеваниями, подтверждают обнаруженную in vitro иммунносупрессорную функцию МСК и их регенеративный потенциал.

Позитивное действие МСК было впервые показано при стрептозоцин-индуцированном диабете у иммунодефицитных мышей [Lee et al., 2006]. Введение МСК человека этим животным привело к увеличению островков Лангерганса и числа вырабатывающих инсулин бета-клеток при сниженной инфильтрации пораженных панкреатических островков макрофагами, в сравнении с животными без введения МСК.

В модели рассеянного склероза внутривенное введение МСК подавляло развитие неврологических симптомов экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (параличей) [Zappia et al., 2005]. Интересно, что терапевтическая схема была

эффективна только при трансплантации МСК до появления признаков заболевания и на пике болезни, но не в период стабилизации. Это косвенно согласуется с нелинейной динамикой действия МСК in vitro. У таких животных снижалась воспалительная инфильтрация и уменьшалась демиелинизация нервных волокон. Трансплантация МСК оказывала положительное действие на мышей с ревматоидным артритом, вызванным введением коллагена. Терапевтический эффект проявлялся в уменьшении симптомов локального воспаления суставов [Gonzalez et al., 2009]. В модели системной красной волчанки (эритроматозе) у мышей введение МСК приводило к существенным улучшениям, проявляющимся в реконструкции ниш остеобластов и восстановлении иммунного гомеостаза [Sun et al., 2009]. В модели заживления кожных ран внесение МСК из костного мозга или кондиционированной ими среды также оказывало положительный эффект [Smith et al., 2010]. При этом ускорялась миграция в рану макрофагов и эндотелиальных предшественников.

Терапевтический потенциал МСК в настоящее время проходит проверку более чем в 100 клинических испытаниях, частично завершенных, или находящихся на I/II и III фазах реализации. Их целью является проверка эффективности использования МСК в терапии хронического язвенного колита (Болезни Крона), циррозах печени, реакции трансплантата против хозяина, ишемической болезни сердца и инфаркте миокарда, диабете, хронической обструктивной болезни легких, ишемии нижних конечностей, рассеянном склерозе, синдроме диабетической стопы, остеоартрите, боковом амиотрофическом склерозе, болезни Паркинсона и др. [Salem & Thiemermann, 2010; Singer & Caplan, 2011].

Таким образом, многочисленные экспериментальные данные, полученные in vitro и in vivo, указывают на значительную роль МСК в регуляции процессов регенерации. В очаге воспаления МСК оказывают множественные паракринные эффекты, проявляющиеся практически на каждой стадии процесса регенерации. Однако пространственно-временная динамика этих эффектов, а также детальные молекулярные механизмы взаимодействия различных клеток на разных этапах процесса регенерации остаются спорными и малоизученными.

Ремоделирование матрикса, ангиогенез и реэпителизация

Состав, структура, и механические свойства внеклеточного матрикса определяют эффективность регенерации. Непрерывное изменение (ремоделирование) матрикса вносит критический вклад

в функциональное восстановление ткани. Выключение ферментов, изменяющих матрикс, блокирует заживление ран в мышиных моделях [Lund et al., 2006]. Особенно отчетливо роль внеклеточного матрикса проявляется при регенерации ткани печени. В случае если погибают только гепатоциты (паренхима) и строма не нарушена, то поврежденная ткань регенерирует почти полностью; но если повреждение затрагивает внеклеточный матрикс (строму), то регенерация не происходит или идет очень незначительно [подробнее см. Krafts, 2010].

Внеклеточный матрикс содержит множество компонентов [см. Eckes et al., 2010]. Часть из них составляют структурные белки, преимущественно коллагены, эластины, которые образуют фибриллярные и сетчатые структуры. Адгезивные белки (фибронектин, ламинин, фибулин) соединяют структурные белки матрикса с трансмембранными белками на поверхности клеток. Протеогликаны (гепаран-, дерматан-, хондроитин-, кератансульфаты, гиалуроновые кислоты) обеспечивают тургор тканей.

Внеклеточный матрикс выполняет много функций, придавая упругость, эластичность и прочность ткани. Во внеклеточном пространстве с белками матрикса взаимодействуют различные факторы роста и цитокины. Наряду с растворимыми факторами, элементы матрикса и связанные с ними молекулы формируют пространственные градиенты, которые направляют движение клеток. Матрикс создает трехмерный каркас, с которым клетки взаимодействуют всей поверхностью. Это существенно изменяет реакции и поведение клеток по сравнению с таковыми, наблюдаемыми в экспериментальных двумерных системах [Even-Ram & Yamada, 2005, Friedl & Wolf, 2010]. Кроме того, состав и жесткость матрикса влияют на способность резидентных прогениторных клеток дифференцироваться в определенном направлении [Tse & Engler, 2010].

За синтез и ремоделирование внеклеточного матрикса отвечают в основном фибробластоподобные клетки. Они мигрируют в участок повреждения и внутри него по градиентам жесткости матрикса (дуротаксис), матриксных белков (гаптотаксис) и растворимых факторов (хемотаксис). Однако точное происхождение этих клеток в участках повреждения до настоящего времени однозначно не установлено. Считается, что часть фибробластов происходит из исходно присутствующих в ткани резидентных прогениторных клеток. Другая часть клеток, по-видимому, рекрутируется в рану из стромы костного мозга в виде мезенхимальных предшественников (МСК),

которые позже дифференцируются в фибробласты [подробнее см. Eckes et al., 2010, Fathke et al., 2004].

Фибробласты и МСК производят компоненты внеклеточного матрикса и модифицирующие их ферменты [см. Eckes et al., 2010]. Матриксные белки секретируются преимущественно в незрелой форме и созревают вне клетки. Созревание включает частичный протеолиз, гидроксилирование, образование ковалентных сшивок и формирование фибриллярных и сетчатых структур. Его осуществляют протеазы, пролин-гидроксилазы, лизил-оксидазы и другие внеклеточные ферменты.

Интегрины разных типов на поверхности фибробластов и МСК играют важную роль в узнавании разных компонентов внеклеточного матрикса и проведении в клетку сигналов, запускающих ремоделирование [Geiger & Yamada, 2011]. Интегрины представляют собой белковые гетеродимеры, образующиеся путем комбинации многочисленных α-субъединиц и более консервативных β-субъединиц. Обе субъединицы нужны для узнавания матриксных белков и проведения сигнала в клетку. Селективность интегринов во многом определяют связанные с ними белки, которых на данный момент идентифицировано около двух сотен [Geiger & Yamada, 2011].

Внеклеточные сериновые протеазы играют основную роль в ремоделировании матрикса. К ним относятся прежде всего плазмин и матриксные металлопротеиназы (ММП). Кожные раны мышей, нокаутированных по плазминогену, практически не заживают, а одновременное ингибирование плазмина и ММП полностью блокирует заживление ран [Lund et al., 2006, Moali & Hulmes, 2009]. Неактивный плазминоген конвертируется в активный плазмин преимущественно под действием двух активаторов плазминогена — тканевого и урокиназного (урокиназы). У мышей, дефицитных по обоим белкам, заживление ран существенно замедляется [Lund et al., 2006]. В отличие от тканевого активатора, урокиназа имеет на поверхности многих клеток специальный рецептор, который представляет собой GPI-заякоренный белок без трансмембранного домена и цитоплазматической части [Tkachuk et al., 2009]. С помощью этого крайне мобильного рецептора мигрирующие мезенхимальные клетки локализуют урокиназу на лидирующем крае. Таким способом они обеспечивают локальную деградацию матрикса и освобождают себе пространство для движения.

К матриксным металлопротеиназам относятся Zn^{2+}-зависимые эндопептидазы [Visse & Nagase, 2003]. Они отличаются от секретируемых лейкоцитами протеаз, таких как эластаза, катепсины, плазмин, и играют основную роль в деградации внеклеточного матрикса на стадии ремоделирования. В группу этих белков входят интерстициальные коллагеназы (ММП-1, 8 и 13), желатиназы (ММП-2 и 9), стромелизины (ММП-3, 10, и 11), матрилизины (ММП-7 и 26), а также мембранные ММП, известные как ADAM-белки (ММП-14-17, 24 и 25). Белки суперсемейства ADAM включают около 40 представителей [Blobel, 2005]. К ним относятся закрепленные на поверхности клеток ММП и более десятка родственных адгезивных белков, утративших протеолитическую активность. Они важны для миграции мезенхимальных клеток и ремоделирования внеклеточного матрикса. Эти протеиназы осуществляют протеолиз (шеддинг) 2–4% белков с поверхности клетки, отщепляя их растворимые эктодомены от остающихся на мембране про-последовательностей. Так происходит активация EGF и TNFα, а также шеддинг их рецепторов с мембраны. Дезинтегриновый домен этих белков связывает интегрины, не давая последним взаимодействовать с внеклеточными мишенями.

Эффективная регенерация не происходит в условиях гипоксии и требует восстановления кровоснабжения поврежденного участка. Ангиогенез — это процесс формирования новых сосудов из уже существующих. Он начинается на поздних этапах фазы воспаления и активно продолжается в ходе репарации. Основным стимулом к ангиогенезу служит снижение парциального давления кислорода при гипоксии и ишемии, а мишенью — эндотелиальные клетки. В этих условиях активируется индуцируемый гипоксией транскрипционный фактор-1 (HIF-1). В свою очередь, он индуцирует экспрессию многих других ангиогенных факторов. В дополнение к гипоксии, воспаление и механическое растяжение также активируют HIF-1 и стимулируют ангиогенез.

Ангиогенез обязательно включает миграцию и пролиферацию эндотелиальных клеток [Carmeliet & Jain, 2011]. Локальное расширение сосуда (вазодилатация) в ответ на повышение уровня оксида азота приводит к увеличению проницаемости сосудистого эндотелия и выходу из сосудистого русла белков плазмы крови. Ангиогенные факторы (главным образом, VEGF-A) диффундируют навстречу из очага воспаления и действуют на эндотелий, приводя к обособлению так называемых «концевых» клеток (tip cells)

[Jakobsson et al., 2010]. Эти клетки секретируют протеолитические ферменты, разрушающие окружающий матрикс. Они также секретируют ангиопоэтин 2, который ингибирует рецептор Tie2, что приводит к ослаблению межклеточных контактов [Yuan et al., 2009]. В результате «концевые» клетки направленно мигрируют в зону воспаления по градиенту VEGF и других факторов. За ними следуют эндотелиальные клетки, которые создают ствол (stalk) образующегося капилляра. Они обладают меньшей подвижностью, чем «концевые», но активно пролиферируют и удерживают межклеточные контакты, обеспечивая формирование трубкообразного ответвления и его связь с материнским сосудом [Iruela-Arispe & Davis, 2009; Herbert & Stainier, 2011].

ММП и активаторы плазминогена играют важную роль в деградации внеклеточного матрикса, освобождении связанных с ним цитокинов и активации миграции клеток. В частности, урокиназа участвует в активации локального протеолиза [Carmeliet & Jain, 2011]. Взаимодействуя с рецептором на поверхности эндотелиальных клеток, урокиназа стимулирует их миграцию и образование капилляроподобных структур. Связывание урокиназы с рецептором приводит к активации внутриклеточных сигнальных систем независимо от протеолитической активности урокиназы [Lansink et al., 1998]. Аналогичным образом урокиназа стимулирует миграцию гладкомышечных клеток [Mukhina et al., 2000, Goncharova et al., 2002], которые образуют внутренний слой стенки будущего сосуда. Вместе с перицитами эти клетки обеспечивают стабилизацию и созревание сосуда. В регуляции активности этих клеток важную роль играют тромбоцитарный (PDGF-BB) и трансформирующий (TGFβ) факторы роста [Gaengel et al., 2009]. Наконец, при участии тканевых ингибиторов матриксных металлопротеиназ (TIMP) и ингибиторов активации плазминогена (PAI) эндотелиальные клетки формируют базальную мембрану образующегося сосуда [Carmeliet & Jain, 2011].

Васкулогенез, в отличие от ангиогенеза, представляет собой процесс формирования кровеносных сосудов из прогениторных эндотелиальных клеток; он вносит существенный вклад в формирование новых сосудов и тесно связан с ангиогенезом [Dong & Goldschmidt-Clermont, 2007]. Источником эндотелиальных клеток-предшественников считается костный мозг, из которого они рекрутируются в кровоток под влиянием факторов роста и цитокинов, образующихся в зоне ишемии и воспаления [Khakoo & Finkel,

2005]. Направленная миграция циркулирующих эндотелиальных предшественников является важным этапом в формировании новых сосудов в зоне повреждения [Urbich & Dimmeler, 2004; Dong & Goldschmidt-Clermont, 2007].

В случае поверхностных ран, ключевым элементом репарации является ре-эпителизация — закрытие поврежденного участка новым эпителиальным пластом. Этот процесс обеспечивают кератиноциты. Они активируются накапливающимися в участке воспаления факторами роста и цитокинами, а также нарушением межклеточных контактов [Singer & Clark, 1999]. Кроме того, заполняющие пространство и грануляционную ткань фибробласты секретируют фактор роста кератиноцитов (также известный как FGF-7), который стимулирует миграцию и пролиферацию этих клеток [Santoro & Gaudino, 2005].

В отличие от фибробластоподобных клеток, мигрирующих поодиночке, эпителиальные клетки сохраняют связь друг с другом, слабо поляризованы и мигрируют коллективно как единый клеточный пласт [Ilina & Friedl, 2009]. Они движутся по грануляционной ткани от периферии к центру раны. Лидирующие клетки формируют на переднем крае протрузии и секретируют ММП, разрушающие матрикс и освобождающие пространство для движения. Перемещаясь, кератиноциты ремоделируют внеклеточный матрикс, что способствует образованию базальной мембраны и, кроме того, направляет движение следующих за ними клеток. Клетки, располагающиеся в глубине пласта, активно делятся, увеличивая покрываемую пластом площадь [Santoro & Gaudino, 2005]. На завершающих этапах ре-эпителизации клеточные пласты смыкаются, движение и пролиферация замедляются, и клетки возвращаются к своему нормальному эпидермальному фенотипу, прикрепляясь к новообразованной базальной мембране.

Кератиноциты, участвующие в ре-эпителизации, образуются за счет деления и миграции клеток из близлежащих неповрежденных участков ткани. В случае, когда количество этих клеток оказывается недостаточным для восстановления, активируются эпителиальные мультипотентные клетки, располагающиеся в волосяном фолликуле [Gurtner et al., 2008]. Они мигрируют из фолликула в сторону раны и дают начало новой популяции эпидермальных клеток. Через несколько недель, когда эпидермис восстанавливается, они в этой области не детектируются.

Перспективы: поиск ключевых молекул

В норме процесс регенерации от воспалительной реакции до восстановления полноценной ткани является сложнорегулируемым процессом. На каждом его временном отрезке происходят вполне определенные события, главными участниками которых являются клетки и биологически активные молекулы. Изменение провоспалительного микроокружения приводит к различным проявлениям эффектов иммунносупрессии и инициации различных программ репарации со стороны клеток-участников. Под влиянием провоспалительных факторов в клетках инициируются различные сигнальные каскады. Нарушение функциональной активности любых клеток-участников изменяет нормальный процесс восстановления тканей. С возрастом и вследствие патологий вероятность таких нарушений увеличивается, следствием чего и является снижение способности тканей к полноценному восстановлению.

Влияние возраста вполне очевидно, поскольку заживление поверхностных ран у взрослых людей приводит к образованию шрамов, тогда как у младенцев рубец менее выражен и с годами может исчезнуть. В отличие от взрослых, фетальные ткани способны к полной регенерации. До третьего триместра у плода шрамы вообще не образуются, после чего способность к полной регенерации исчезает [Colwell et al., 2003]. Таким образом, существует естественная модель для поиска тех различий, которые определяют возможность полной и эффективной регенерации. В упрощенном виде она представлена на рисунке 4.4. Следует отметить три важных особенности этой модели. Во-первых, она не предполагает обязательное наличие патологии: в случае механических повреждений патология отсутствует. Поэтому выявленные в такой модели факторы, определяющие возможность полноценной регенерации, должны с большой вероятностью иметь универсальный характер. Во-вторых, различный исход регенерации (восстановление ткани или фиброз) может быть обусловлен не только различиями на конечной стадии ремоделирования и витализации. Вполне вероятно, что различия воспалительных реакций, которые с очевидностью по-разному регулируются и протекают в фетальной и взрослой ткани, могут вносить существенный вклад. Аналогично можно ожидать различий и на ранней репаративной стадии, связанной с миграцией и пролиферацией клеток, синтезом и секрецией компонентов внеклеточного матрикса. В-третьих, эти различия, скорее всего, не определяются одним или несколькими белками, а включают

целый спектр молекул, активность которых зависит как от уровня экспрессии/синтеза, так и от их посттрансляционных изменений. Кроме того, различия могут быть связаны с динамикой развития и смены событий, что особенно заметно при анализе профиля экспрессии цитокинов на отдельных этапах воспаления.

Сравнительный геномный и протеомный анализ могли бы помочь определить критичные для регенерации биомолекулы, однако доступность исходного материала крайне ограничена и такие исследования сложны или почти невозможны в отношении человека. Тем не менее, искомый ответ потенциально доступен с использованием животных моделей. У низших животных происходит успешная регенерация целых органов. Некоторые из них, такие как амфибии и пресмыкающиеся, способны полностью восстанавливать хвост и конечности, челюсть и сетчатку глаза, а саламандры — весь набор дифференцированных тканей из одной точки отсечения содержащего их придатка. Планарии одинаково эффективно восстанавливают исходную структуру как из головной части, так фрагмента хвоста. Примеры регенерации у высших позвоночных, такие как рост пантов у оленей, значительно более редкие, но возможно они более информативны в плане сравнения с механизмами регенерации у человеком.

Регенерация конечностей у взрослых животных включает образование бластомы — скопления плюрипотентных мезенхимальных клеток, которые дедифференцируются из клеток соседних тканей, пролиферируют, распределяются и снова дифференцируются в специализированные клетки новой ткани [Kragl et al., 2009]. Механизмы, отвечающие за ре-дифференцировку, остаются в большой степени неизвестными; в качестве основных регуляторов обозначены лишь немногие молекулы-кандидаты [Gurtner et al., 2007, Gurtner et al., 2008]. Кроме них этот процесс регулируется на клеточном и системном уровне, что иллюстрирует, например, необходимость иннервации для полноценной регенерации [Endo et al., 2004].

У человека регенерационный потенциал ограничен. Считается, что это во многом связано с быстрым образованием фибриллярного матрикса, который препятствует реализации функций клеток-предшественников [Gurtner et al., 2008]. Но и в этом случае в регуляции задействованы как отдельные молекулы в клетках (TGF-β, протеинкиназа Akt), так и общеклеточные реакции (выживание и апоптоз), а также физические процессы на тканевом уровне,

такие как механическая нагрузка [Aarabi et al., 2007, Beanes et al., 2003].

Суммируя, следует заключить, что фундаментальные исследования необходимы для выяснения как внутриклеточных, так и межклеточных механизмов, определяющих взаимодействие разных клеток в условиях воспалительных реакций и в ходе последующей репарации и регенерации в норме и при патологии. Понимание роли каждого из участников процесса, от молекул до клеток, позволит установить конкретные причины, приводящие к нарушению восстановления тканей. Определение критических факторов (молекул), влияющих на течение воспалительного процесса, участвующих в инициации и регуляции внутриклеточных сигнальных каскадов и управляющих поведением клеток, является необходимым этапом для разработки и создания новых лекарственных препаратов. Развитие клеточных технологий позволит создание принципиально новых подходов к направленной доставке этих соединений и терапии регенеративных заболеваний, для которых на современном этапе не существует адекватных и специфических методов лечения.

Работа поддержана грантами РФФИ № 11-04-01519-а, № 10-04-90461-Укр-а, № 11-04-01868-а.

Список литературы

1. *Воротников А.В.* Хемотаксис: движение, направление, управление. Усп. Биол. Химии. 2011. Т. 51. С. 335–400.
2. *Тюрин-Кузьмин П.А., Агаронян К.М., Морозов Я.И. и др.* НАД(Ф)Н оксидаза регулирует EGF-зависимую пролиферацию клеток по механизму, отличному от активации ERK1/2 MAP-киназ. Биофизика. 2010. Т. 55(6). С. 1048–1056.
3. *Aarabi S., Bhatt K.A., Shi Y., Paterno J. et al.* Mechanical load initiates hypertrophic scar formation through decreased cellular apoptosis. Faseb. J. 2007. Vol. 21. P. 3250–3261.
4. *Asari S., Itakura S., Ferreri K. et al.* Mesenchymal stem cells suppress B-cell terminal differentiation. Exp. Hematol. 2009. Vol. 37. P. 604–615.
5. *Ashcroft G.S., Yang X., Glick A.B. et al.* Mice lacking Smad3 show accelerated wound healing and an impaired local inflammatory response. Nat. Cell. Biol. 1999. Vol. 1. P. 260–266.

6. *Barron L., Wynn T.A.* Fibrosis is regulated by Th2 and Th17 responses and by dynamic interactions between fibroblasts and macrophages. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 2011. Vol. 300. P. G723–728.
7. *Bartholomew A., Sturgeon C., Siatskas M. et al.* Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. Exp. Hematol. 2002. Vol. 30. P. 42–48.
8. *Beanes S.R., Dang C., Soo C. et al.* Skin repair and scar formation: the central role of TGF-beta. Expert. Rev. Mol. Med. 2003. Vol. 5. P. 1–22.
9. *Bianchi M.E.* DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. J. Leukoc. Biol. 2007. Vol. 81. P. 1–5.
10. *Blobel C.P.* ADAMs: key components in EGFR signalling and development. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2005. Vol. 6. P. 32–43.
11. *Carmeliet P., Jain R.K.* Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. Nature. 2011. Vol. 473. P. 298–307.
12. *Chen K., Wang D., Du W.T. et al.* Human umbilical cord mesenchymal stem cells hUC-MSCs exert immunosuppressive activities through a PGE2-dependent mechanism. Clin. Immunol. 2010. Vol. 135. P. 448–458.
13. *Colwell A.S., Longaker M.T., Lorenz H.P.* Fetal wound healing. Front. Biosci. 2003. Vol. 8. P. s1240–1248.
14. *Constantin G., Marconi S., Rossi B. et al.* Adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. Stem Cells. 2009. Vol. 27. P. 2624–2635.
15. *Corcione A., Benvenuto F., Ferretti E. et al.* Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. Blood. 2006. Vol. 107. P. 367–372.
16. *Crosby L.M., Waters C.M.* Epithelial repair mechanisms in the lung. Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 2010. Vol. 298. P. L715–731.
17. *De Donatis A., Comito G., Buricchi F. et al.* Proliferation versus migration in platelet-derived growth factor signaling: the key role of endocytosis. J. Biol. Chem. 2008. Vol. 283. P. 19948–19956.
18. *Di Nicola M., Carlo-Stella C., Magni M. et al.* Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. Blood. 2002. Vol. 99. P. 3838–3843.

19. *Dong C., Goldschmidt-Clermont P.J.* Endothelial progenitor cells: a promising therapeutic alternative for cardiovascular disease. J. Interv. Cardiol. 2007. Vol. 20. P. 93–99.
20. *Eckes B., Nischt R., Krieg T.* Cell-matrix interactions in dermal repair and scarring. Fibrogenesis. Tissue. Repair. 2010. Vol. 3. P. 4.
21. *Endo T., Bryant S.V., Gardiner D.M.* A stepwise model system for limb regeneration. Dev. Biol. 2004. Vol. 270. P. 135–145.
22. *English K., Barry F.P., Field-Corbett C.P. et al.* IFN-gamma and TNF-alpha differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells. Immunol. Lett. 2007. Vol. 110. P. 91–100.
23. *English K., Barry F.P., Mahon B.P.* Murine mesenchymal stem cells suppress dendritic cell migration, maturation and antigen presentation. Immunol. Lett. 2008. Vol. 115. P. 50–58.
24. *English K., Ryan J.M., Tobin L. et al.* Cell contact, prostaglandin E(2) and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4+CD25(High) forkhead box P3+ regulatory T cells. Clin. Exp. Immunol. 2009. Vol. 156. P.149–160.
25. *Even-Ram S., Yamada K.M.* Cell migration in 3D matrix. Curr. Opin. Cell. Biol. 2005. Vol. 17. P. 524–532.
26. *Fathke C., Wilson L., Hutter J. et al.* Contribution of bone marrow-derived cells to skin: collagen deposition and wound repair. Stem Cells. 2004. Vol. 22. P. 812–822.
27. *Ferguson M.W., O'Kane S.* Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 2004. Vol. 359. P. 839–850.
28. *Foxman E.F., Kunkel E.J., Butcher E.C.* Integrating conflicting chemotactic signals. The role of memory in leukocyte navigation. J. Cell. Biol. 1999. Vol. 147. P. 577–588.
29. *Friedl P., Wolf K.* Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. J. Cell. Biol. 2010. Vol. 188. P. 11–19.
30. *Gaengel K., Genove G., Armulik A. et al.* Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2009. Vol. 29. P. 630–638.
31. *Gawronska-Kozak B., Bogacki M., Rim J.S. et al.* Scarless skin repair in immunodeficient mice Wound Repair Regen. 2006. Vol. 14. P. 265–276.
32. *Geiger B., Yamada K.M.* Molecular architecture and function of matrix adhesions. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2011. Vol. 3.

33. *Goncharova E.A., Vorotnikov A.V., Gracheva E.O. et al.* Activation of p38 MAP-kinase and caldesmon phosphorylation are essential for urokinase-induced human smooth muscle cell migration. Biol. Chem. 2002. Vol. 383. P. 115–126.
34. *Gonzalez M.A., Gonzalez-Rey E., Rico L. et al.* Treatment of experimental arthritis by inducing immune tolerance with human adipose-derived mesenchymal stem cells. Arthritis. Rheum. 2009. Vol. 60. P. 1006–1019.
35. *Grose R., Werner S.* Wound-healing studies in transgenic and knockout mice. Mol. Biotechnol. 2004. Vol. 28. P. 147–166.
36. *Gurtner G.C., Callaghan M.J., Longaker M.T.* Progress and potential for regenerative medicine. Annu. Rev. Med. 2007. Vol. 58. P. 299–312.
37. *Gurtner G.C., Werner S., Barrandon Y. et al.* Wound repair and regeneration. Nature. 2008. Vol. 453. P. 314–321.
38. *Herbert S.P., Stainier D.Y.* Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2011. Vol. 12. P. 551–564.
39. *Honczarenko M., Le Y., Swierkowski M. et al.* Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. Stem Cells. 2006. Vol. 24. P. 1030–1041.
40. *Ilina O., Friedl P.* Mechanisms of collective cell migration at a glance. J. Cell. Sci. 2009. Vol. 122. P. 3203–3208.
41. *Iruela-Arispe M.L., Davis G.E.* Cellular and molecular mechanisms of vascular lumen formation. Dev. Cell. 2009. Vol. 16. P. 222–231.
42. *Jakobsson L., Franco C.A., Bentley K. et al.* Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting. Nat. Cell. Biol. 2010. Vol. 12. P. 943–953.
43. *Jiang X.X., Zhang Y., Liu B. et al.* Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. Blood. 2005. Vol. 105. P. 4120–4126.
44. *Kalluri R.* EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. J. Clin. Invest. 2009. Vol. 119. P. 1417–1419.
45. *Khakoo A.Y., Finkel T.* Endothelial progenitor cells. Annu. Rev. Med. 2005. Vol. 56. P. 79–101.
46. *Krafts K.P.* Tissue repair: The hidden drama. Organogenesis. 2010. Vol. 6. P. 225–233.
47. *Kragl M., Knapp D., Nacu E. et al.* Cells keep a memory of their tissue origin during axolotl limb regeneration. Nature. 2009. Vol. 460. P. 60–65.

48. *Kumar V., Abbas A.K., Fausto N. et al.* Tissue Renewal, Regeneration, and Repair. In: Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease, Saunders Elsevier. 2009. P. 79–110.
49. *Lansink M., Koolwijk P., van Hinsbergh V. et al.* Effect of steroid hormones and retinoids on the formation of capillary-like tubular structures of human microvascular endothelial cells in fibrin matrices is related to urokinase expression. Blood. 1998. Vol. 92. P. 927–938.
50. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) homing factor for engineered regenerative medicine. Expert. Opin. Biol. Ther. 2011. Vol. 11. P. 189–197.
51. *Le Blanc K., Tammik L., Sundberg B. et al.* Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. Scand. J. Immunol. 2003. Vol. 57. P. 11–20.
52. *Lee R.H., Seo M.J., Reger R.L. et al.* Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2006. Vol. 103. P. 17438–17443.
53. *Loo A.E., Ho R., Halliwell B.* Mechanism of hydrogen peroxide-induced keratinocyte migration in a scratch-wound model. Free. Radic. Biol. Med. 2011. Vol. 51. P. 884–892.
54. *Lund L.R., Green K.A., Stoop A.A. et al.* Plasminogen activation independent of uPA and tPA maintains wound healing in gene-deficient mice. EMBO J. 2006. Vol. 25. P. 2686–2697.
55. *Maccario R., Podesta M., Moretta A. et al.* Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. Haematologica. 2005. Vol. 90. P. 516–525.
56. *Martin P.* Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. Science. 1997. Vol. 276. P. 75–81.
57. *Martin P., D'Souza D., Martin J. et al.* Wound healing in the PU.1 null mouse--tissue repair is not dependent on inflammatory cells. Curr. Biol. 2003. Vol. 13. P. 1122–1128.
58. *Martin P., Leibovich S.J.* Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. Trends. Cell. Biol. 2005. Vol. 15. P. 599–607.
59. *Meisel R., Zibert A., Laryea M. et al.* Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine

2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. Blood. 2004. Vol. 103. P. 4619–4621.
60. *Moali C., Hulmes D.J.* Extracellular and cell surface proteases in wound healing: new players are still emerging. Eur. J. Dermatol. 2009. Vol. 19. P. 552–564.
61. *Mukhina S., Stepanova V., Traktouev D. et al.* The chemotactic action of urokinase on smooth muscle cells is dependent on its kringle domain. Characterization of interactions and contribution to chemotaxis. J. Biol. Chem. 2000. Vol. 275. P. 16450–16458.
62. *Nathan C.* Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. Nat. Rev. Immunol. 2006. Vol. 6. P. 173–182.
63. *Nauta A.J., Kruisselbrink A.B., Lurvink E. et al.* Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. J. Immunol. 2006. Vol. 177. P. 2080–2087.
64. *Niethammer P., Grabher C., Look A.T. et al.* A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. Nature. 2009. Vol. 459. P. 996–999.
65. *Occleston N.L., Laverty H.G., O'Kane S. et al.* Prevention and reduction of scarring in the skin by Transforming Growth Factor beta 3 (TGFbeta3): from laboratory discovery to clinical pharmaceutical. J. Biomater. Sci. Polym. Ed. 2008. Vol. 19. P. 1047–1063.
66. *Rafei M., Birman E., Forner K. et al.* Allogeneic mesenchymal stem cells for treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. Mol. Ther. 2009; 17: 1799–1803.
67. *Rasmusson I.* Immune modulation by mesenchymal stem cells. Exp. Cell. Res. 2006. Vol. 312. P. 2169–2179.
68. *Ren G., Zhang L., Zhao X. et al.* Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. Cell. Stem Cell. 2008. Vol. 2. P. 141–150.
69. *Rieder F., Brenmoehl J., Leeb S. et al.* Wound healing and fibrosis in intestinal disease. Gut. 2007. Vol. 56. P. 130–139.
70. *Rubartelli A., Sitia R.* Stress as an intercellular signal: the emergence of stress-associated molecular patterns (SAMP). Antioxid. Redox. Signal. 2009. Vol. 11. P. 2621–2629.
71. *Ryan J.M., Barry F., Murphy J.M. et al.* Interferon-gamma does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. Clin. Exp. Immunol. 2007. Vol. 149. P. 353–363.

72. *Salem H.K., Thiemermann C.* Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. Stem Cells. 2010. Vol. 28. P. 585–596.
73. *Santoro M.M., Gaudino G.* Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. Exp. Cell. Res. 2005. Vol. 304. P. 274–286.
74. *Schneider I.C., Haugh J.M.* Quantitative elucidation of a distinct spatial gradient-sensing mechanism in fibroblasts. J. Cell. Biol. 2005. Vol. 171. P. 883–892.
75. *Schneider I.C., Haugh J.M.* Mechanisms of gradient sensing and chemotaxis: conserved pathways, diverse regulation. Cell Cycle. 2006. Vol. 5. P. 1130–1134.
76. *Shaw T.J., Martin P.* Wound repair at a glance. J. Cell. Sci. 2009. Vol. 122. P. 3209–3213.
77. *Singer A.J., Clark R.A.* Cutaneous wound healing. N. Engl. J. Med. 1999. Vol. 341. P. 738–746.
78. *Singer N.G., Caplan A.I.* Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. Annu. Rev. Pathol. 2011. Vol. 6. P. 457–478.
79. *Smith A.N., Willis E., Chan V.T et al.* Mesenchymal stem cells induce dermal fibroblast responses to injury. Exp. Cell. Res. 2010. Vol. 316(1). P. 48–54.
80. *Spangrude G.J., Heimfeld S., Weissman I.L.* Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. Science. 1988. Vol. 241. P. 58–62.
81. *Sun L., Akiyama K., Zhang H. et al.* Mesenchymal stem cell transplantation reverses multiorgan dysfunction in systemic lupus erythematosus mice and humans. Stem Cells. 2009. Vol. 27. P. 1421–1432.
82. *Tkachuk V.A., Plekhanova O.S., Parfyonova Y.V.* Regulation of arterial remodeling and angiogenesis by urokinase-type plasminogen activator. Can. J. Physiol. Pharmacol. 2009. Vol. 87. P. 231–251.
83. *Tomasek J.J., Gabbiani G., Hinz B. et al.* Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodeling. Nat. Rev. Mol. Cel. Biol. 2002. Vol. 3. P. 349–363.
84. *Tomchuck S.L., Zwezdaryk K.J., Coffelt S.B. et al.* Toll-like receptors on human mesenchymal stem cells drive their migration and immunomodulating responses. Stem Cells. 2008. Vol. 26. P. 99–107.

85. *Tse J.R., Engler A.J.* Stiffness gradients mimicking in vivo tissue variation regulate mesenchymal stem cell fate. PLoS One. 2011. Vol. 6. P. e15978.
86. *Urbich C., Dimmeler S.* Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. Circ. Res. 2004. Vol. 95. P. 343–353.
87. *Visse R., Nagase H.* Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. Circ. Res. 2003. Vol. 92. P. 827–839.
88. *Whitby D.J., Ferguson M.W.* The extracellular matrix of lip wounds in fetal, neonatal and adult mice. Development. 1991. Vol. 112. P. 651–668.
89. *Yuan H.T., Khankin E.V., Karumanchi S.A. et al.* Angiopoietin 2 is a partial agonist/antagonist of Tie2 signaling in the endothelium. Mol. Cell. Biol. 2009. Vol. 29. P. 2011–2022.
90. *Zappia E., Casazza S., Pedemonte E. et al.* Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. Blood. 2005. Vol. 106. P. 1755–1761.