

УДК 611.018.2

## БИОХИМИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ РЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ ФАКТОРАМИ РОСТА И ЦИТОКИНАМИ: ОСНОВНЫЕ МЕХАНИЗМЫ И ЗНАЧИМОСТЬ ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ\*

### Обзор

© 2020 П.И. Макаревич<sup>1,2\*\*</sup>, А.Ю. Ефименко<sup>1,2</sup>, В.А. Ткачук<sup>1,2,3\*\*\*</sup>

<sup>1</sup> *Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр, 119991 Москва, Россия; электронная почта: pmakarevich@mc.msu.ru*

<sup>2</sup> *Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, 119991 Москва, Россия*

<sup>3</sup> *Институт экспериментальной кардиологии, НМИЦ кардиологии Минздрава России, 121552 Москва, Россия*

Поступила в редакцию 15.06.2019

После доработки 30.09.2019

Принята к публикации 16.10.2019

Сформировавшаяся в конце XX века регенеративная медицина использует культивируемые клетки или тканеинженерные конструкции для трансплантации в организм человека с целью восстановления утраченных или поврежденных органов. Однако достигнутые в этом направлении практические успехи оказались далеки от многообещающих результатов, полученных в экспериментах. В поисках новых путей развития этой области стало очевидно, что успешное решение практических задач невозможно в отрыве от изучения фундаментальных принципов регуляции развития, обновления и восстановления тканей человека. Эти процессы успешно исследовались клеточными биологами, физиологами и биохимиками в рамках смежного направления, которое часто называют «регенеративной биологией». Было показано, что в ходе регенерации факторы роста, цитокины и гормоны регулируют не отдельные функции клеток, а, действуя через специфические системы рецепции, регулируют важные для восстановления ткани процессы – пролиферацию и дифференцировку клеток. Эти события требуют скоординированных стимулов и поэтому практически невозможны с помощью одиозных белков или низкомолекулярных соединений, т.е. плохо управляемы с помощью подходов классической фармакологии. Данный обзор суммирует актуальные представления о биохимических и клеточных механизмах регуляции обновления и регенерации тканей человека, обращая внимание на некоторые общебиологические и эволюционные аспекты в этой области. Особое внимание в нем уделяется биохимическим механизмам регуляции, в частности, роли факторов роста и цитокинов, а также механизмам рецепции этих молекул. В отдельном разделе затронуты перспективные практические подходы для активации регенерации с помощью малых молекул или секрета стволовых клеток, который содержит широкий репертуар факторов роста, цитокинов, пептидов, а также внеклеточные везикулы.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** регенеративная медицина, стволовая клетка, фактор роста, цитокин, внутриклеточная сигнализация, рецепторная тирозиназная киназа.

DOI: 10.31857/S0320972520010029

В живых системах регенерация идет на всех уровнях – синтезируются и разрушаются молекулы, обновляются и восстанавливаются после повреждения ткани, гибнут и появляются новые

клетки [1]. Постоянная регенерация обеспечивает физиологическое обновление, поддерживающее соответствие организма структуре, выработанной в ходе эволюции, а обновление на моле-

Принятые сокращения: ГТ – генная терапия; МСК – мезенхимные стромальные клетки; РТК – рецепторные тирозиназные киназы; СК – стволовые клетки; PDGF – тромбоцитарный фактор роста; ФР – факторы роста; FGF – фактор роста фибробластов; PDGF, VEGF, EGF, IGF-1 – тромбоцитарный, эндотелиальный, эпидермальный и инсулиноподобный факторы роста соответственно; HGF – фактор роста гепатоцитов.

\* Статья посвящается 80-летию кафедры биохимии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова (см. том 84, вып. 11, 2019).

\*\* Адресат для корреспонденции.

\*\*\* Автор является выпускником кафедры биохимии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

кулярном уровне необходимо для устойчивых взаимодействий внутри ткани и регуляции идущих в ней процессов.

Человек по своей способности к репаративной регенерации (т.е. регенерации после повреждения) значительно уступает другим многоклеточным организмам, однако процессы идущего в течение жизни обновления тканей имеют впечатляющие масштабы. Практически все клетки существуют определенный отрезок времени, по истечении которого происходит их программируемая гибель, после чего погибшая клетка ограниченное количество раз замещается вновь образованной клеткой такого же типа. Этот цикл является основой тканевого гомеостаза, т.е. постоянства клеточного состава ткани [2, 3]. Ежедневно у взрослого человека обновляется ~1% зрелых эритроцитов, т.е. за сутки разрушается  $10^{11}$  красных клеток крови и столько же появляется за счет того, что из костного мозга каждую секунду выходит 2–3 млн новых эритроцитов [4]. Постоянное обновление с разной скоростью идет в коже, жировой ткани, во всех паренхиматозных и полых органах, сердечно-сосудистой и нервной системах. Можно сказать, что гибель и появление новых клеток формируют подобие прямой и обратной реакций с константами, меняющимися в разные периоды жизни организма, а также при его повреждении или болезни [5].

В этом отношении читателю может оказаться интересен классический труд Richard J. Goss «Principles of regeneration» («Принципы регенерации»), в котором он удачно заметил: «Если бы не было регенерации, то не стало бы живого. Но если бы все живое регенерировало, то не было бы смерти. Все многоклеточные организмы постоянно “живут” и “умирают”, совмещая в себе эти две крайности» [1].

Не менее удачной является еще одна аналогия, приведенная David L. Stocum: «Регенерация позволяет живой системе ограниченное время противостоять разрушительному воздействию второго закона термодинамики, сохраняя свою целостность. В этой борьбе индивидуум обречен на поражение, но за время жизни он позволяет виду выйти из нее победителем, дав начало потомству» [6].

Выше мы упомянули, что млекопитающие по своим способностям к репаративной регенерации уступают другим позвоночным, например хвостатым амфибиям или рыбам, способным к многократному «отращиванию» конечностей и даже внутренних органов.

Глядя на эти примеры, исторически первым возникал вопрос: «Как они это делают?». Ответ на него дали фундаментальные работы по изучению регенерации у животных, которые прово-

дили с середины XIX века. Идея о том, что расшифровка механизмов регенерации у видов, которые к ней способны, поможет понять, как запустить аналогичный процесс у человека, выглядела совершенно логичной [7] и позволила, используя удачные объекты из животного мира, установить клеточные, молекулярные и, позднее, генетические основы этого феномена. При этом исследование позвоночных с выдающимися регенеративными возможностями позволило хорошо ответить на вопрос «как?», но не давало ответа на второй важный вопрос: «Почему некоторые виды лишены этих способностей?» [8].

Ответ на него может быть найден в сравнительных исследованиях двух близкородственных видов, один из которых способен регенерировать конечность или орган (вид А), а второй залечивает ранение с образованием культи или рубца (вид Б). Их сравнение позволило бы не только понять, что движет регенерацией вида А, но и разобраться в том, что блокирует ее у вида Б, например, какая регуляторная система или сигнальная ось была утрачена или кардинально изменилась в ходе расхождения этих таксонов.

Эта идея была частично реализована в работах по изучению заживления ран у млекопитающих на этапе эмбриона, которому присуща полная регенерация, притом что для взрослой особи этого же вида характерно рубцевание в зоне повреждения [9, 10]. Эти исследования внесли большой вклад в понимание возможностей регенерации у млекопитающих, однако их объединяет и общий изъян. На стадии эмбриона или плода организм характеризуется неполным развитием тканей и органов, специфическим геномным профилем и незрелой иммунной системой, а также находится в водной среде в гипоксическом состоянии [11, 12].

В утробе клетки и ДНК плода защищены от повреждающего действия активных форм кислорода и излучения, а рождение на свет по масштабам перестройки организма в какой-то степени можно сравнить с выходом первых животных из воды на сушу. С той разницей, что на адаптацию у новорожденного уходят не миллионы лет, а несколько первых дней жизни. В этот момент организм из-за контакта с атмосферным уровнем кислорода испытывает колоссальный стресс, адаптируясь к новому уровню оксигенации тканей [13, 14]. В первую неделю жизни это приводит к шквалу эпигенетических модификаций, влияющих на экспрессию сотен генов, кодирующих белки и регуляторные малые РНК [15, 16]. У человека и других сухопутных млекопитающих это считается одной из предпосылок резкого падения регенеративных способностей в первые несколько дней жизни [16]. По этим

причинам в настоящее время высказывают обоснованные сомнения в том, что сравнение регенерации эмбриона и взрослой особи релевантно и позволит достичь прорывных результатов в этой области.

### **РЕПАРАТИВНАЯ РЕГЕНЕРАЦИЯ У ЧЕЛОВЕКА, ЕЕ ПРИРОДА И ОСНОВНЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ**

Происхождение регенеративных способностей у вида всегда рассматривалось с двух эволюционных позиций. Первая предполагает, что регенерация конечностей и органов носит приспособительный характер, и отдельные виды выработали эту способность. Для закрепления способности к регенерации необходимо соответствующее давление отбора – атаки естественных врагов и повреждения, в которых в природе нет недостатка. Однако в дикой природе особь, потерявшая часть тела, выживает с очень низкой вероятностью. Даже если принять, что способности отращивать плавники у рыб или хвост у ящерицы сформировались как приспособление после нападений естественных врагов, то сложнее будет таким же образом утверждать о приспособительном происхождении регенерации сердца, поджелудочной железы или печени. Травма этих органов почти всегда фатальна для особи, что едва ли позволит закрепиться любому новому признаку [17]. Более реалистичной и принятой в настоящее время представляется точка зрения на регенерацию как на «остаточную» характеристику, т.е. своеобразную рефлексию внутриутробного развития, способность к которой в ходе эволюции была, например, утрачена млекопитающими, однако сохранилась у амфибий и пресмыкающихся [18].

В конце XX века многие открытия, сделанные в регенеративной биологии, заложили базу для формирования нового направления – регенеративной медицины. Однако затем ее формирование происходило в отрыве от классических направлений биологии, из-за чего произошел определенный сдвиг в сторону ускорения трансляционных исследований без достаточного внимания к фундаментальным основам регенерации и развития организма. Большая часть используемых методов запуска регенерации у человека основана на трансплантации культивированных клеток или тканеинженерных конструкций [19]. При этом акцент в последние десятилетия был сделан на прикладных и технологических решениях без должного внимания к базовым принципам функционирования систем, контролирующим регенерацию у человека.

У человека репаративная регенерация возможна за счет нескольких механизмов (рис. 1).

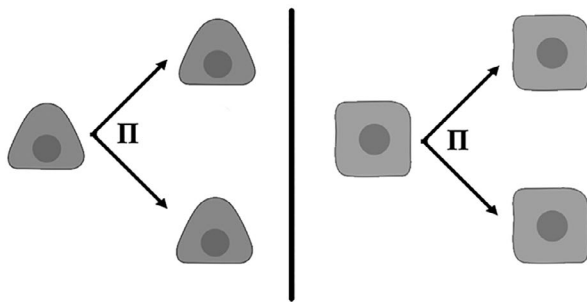
**Дифференцировка постнатальных стволовых клеток (СК).** После рождения в большинстве тканей сохраняется и поддерживается пул тканеспецифических (резидентных) СК. Они способны к самообновлению (делению без потери недифференцированного состояния), а также к дифференцировке в определенные типы клеток [20]. При физиологическом обновлении тканей они вместе с мезенхимными стромальными клетками (МСК) обеспечивают тканевую гомеостаз, а в случае повреждения становятся ключевым участником процесса регенерации [21]. Упомянутым выше МСК отводят роль клеток, которые отвечают за поддержание СК [22], участвуя в формировании микроокружения, называемого «нишей» [21].

**Пролиферация дифференцированных клеток.** Деление клеток организма считалось основным механизмом регенерации со времен формулировки положений классической клеточной теории [23]. Позднее выяснилось, что пролиферативный потенциал активно обновляющихся тканей (слизистых оболочек, печени, кожи) может быть недостаточен для поддержания постоянства структуры из-за предела Хейфлика и снижения пролиферативной способности клеток с возрастом [24, 25]. Более того, многократная пролиферация сопровождается накоплением «поломок» и сдвигами дифференцировочного состояния, которые лежат в основе развития дегенеративных заболеваний и опухолей [26]. Таким образом, пролиферация играет важную роль в регенерации, однако ее возможности на длительном промежутке времени выглядят ограниченными.

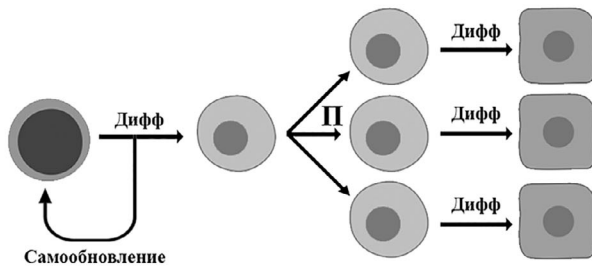
**Транзитная дедифференцировка.** В тканях с низкой пластичностью при регенерации часть новых клеток появляется по механизму транзитной дедифференцировки. В ходе этого процесса зрелая материнская клетка дает начало дочерним клеткам с такими же фенотипом и функцией, проходя через стадию дедифференцированной формы, обладающей пластичностью. При повреждении клетка подвергается эпигенетическим модификациям, в результате которых возможен ее временный возврат в менее специализированное состояние, в котором она способна к делению с последующей редифференцировкой для замещения утраченных клеток [27]. В организме человека так идет регенерация некоторых экзокринных желез, например, слюнной и поджелудочной [28, 29].

**Прямая трансдифференцировка.** Данный механизм заключается в конверсии зрелой клетки одного типа в другой без возвращения в низко-

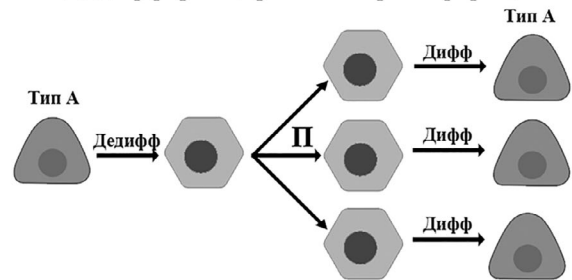
## 1. Пролiferация дифференцированных клеток



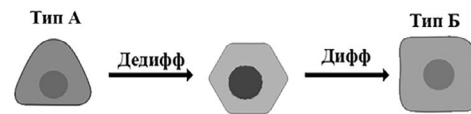
## 2. Дифференцировка стволовых клеток



## 3. Дедифференцировка и пролиферация



## 4. Трансдифференцировка



## Условные обозначения



Рис. 1. Основные механизмы репаративной регенерации у человека. Пояснения к рисунку даны в тексте. Условные обозначения: П – пролиферация; Дедифф – дедифференцировка; Дифф – дифференцировка

дифференцированные состояния, сопровождающиеся сильными изменениями потенциальности. Перепрограммирование осуществляется при активации специфических факторов транскрипции, как правило, экспрессирующихся в ходе эмбриогенеза (Oct-4, Klf-4, Nanog и др.), а также под контролем регуляторных (микро- и длинных некодирующих) РНК [30]. Это позволяет клетке миновать опасное с точки зрения канцерогенеза состояние плюрипотентности и превратиться в другую специализированную клетку [31]. Показано, что в организме человека регенерация с прямой трансдифференцировкой идет после повреждения островков Лангерганса [32, 33] и желчных протоков печени [34, 35].

Процессы регенерации и репарации идут длительно и регулируются гормонами, факторами роста (ФР), цитокинами, РНК различных классов и др. [36–38]. Рассмотрим подробнее регуляторные системы, влияющие на процессы регенерации и обновления ткани, а также ряд их особенностей важных с точки зрения биохимии и медицины.

## РЕГУЛЯЦИЯ ОБНОВЛЕНИЯ И РЕГЕНЕРАЦИИ У ЧЕЛОВЕКА

**Нейроэндокринная регуляция обновления и регенерации.** Управление функциями всех клеток организма осуществляется интегральной нейроэндокринной системой, объединяющей регуляцию за счет нейромедиаторов и гормонов, которые различаются скоростью ответа на стимулы и его продолжительностью. Нервная система характеризуется быстрым, почти молниеносным, ответом, следующим за выбросом в синаптическую щель нейромедиаторов (ацетилхолина, серотонина, норадреналина и др.). Их рецепторы получили название ионотропных и представляют собой лиганд-зависимые трансмембранные ионные каналы [39, 40]. Активация таких каналов приводит к изменению поляризации мембраны, а эффекты запускаются и гасятся за доли секунды, что создает оперативный способ регуляции, лежащий в основе многих рефлекторных реакций (в том числе необходимых для выживания в критических ситуациях) [41].

Более длительными отрезками времени (минуты, часы) измеряются эффекты гормонов. Их рецепторами являются белки, расположенные как на мембране клетки, так и внутриклеточно: в цитоплазме, на мембранах органелл и в ядре. Гормональная регуляция не является системой «включения/выключения»: ее принцип работы скорее напоминает реостат. Регуляция обеспечивается наличием на мембране клетки нескольких типов рецептора к одному и тому же гормону (рис. 2, а). Примером является адренергическая рецепция, когда на одной клетке одновременно имеются трансмембранные  $\beta$ - и  $\alpha$ -адренорецепторы, сопряженные с  $G_s$ - и  $G_i$ -белками, разнонаправленно регулируемыми активностью аденилатциклазы и содержание внутриклеточного  $Ca^{2+}$  [42].

Известно, что процессы миграции, синтез и распад жирных кислот, полисахаридов и др. являются  $Ca^{2+}$ -зависимыми. Эти процессы не могут идти по принципу «все или ничего», и механизм их регуляции зависит не от перепада концентрации  $Ca^{2+}$  в цитоплазме, который имеет достаточно узкий интервал, а от частоты осцилляции  $Ca^{2+}$ , которая варьирует в широком диапазоне. Такая система обеспечивает плавную, ступенчатую регуляцию  $Ca^{2+}$ -зависимых процессов в клетке [43].

Таким образом, гормоны, в отличие от нейромедиаторов, действуют не на поляризацию мембраны, а через свои рецепторы активируют систему внутриклеточных вторичных посредников (цАМФ, цГМФ, ДАГ,  $Ca^{2+}$  и др.). Вторичные посредники передают сигнал внутрь клетки, запуская каскад химических модификаций белков (фосфорилирование, рибозилирование, ацетилирование и др.) [44], и управляют метаболическими процессами, что служит поводом отнести сами рецепторы гормонов к метаболитным.

Особенностью такой рецепции является феномен десенситизации, направленный на защиту клетки от слишком продолжительного действия гормона. Если гормон находится на рецепторе длительное время (более 8–10 мин), то происходит фосфорилирование рецептора лиганд-зависимой протеинкиназой, что приводит к снижению сродства рецептора к гормону [45]. При очень длительной (часами) стимуляции рецептора запускается процесс эндоцитоза, приводящий к даунрегуляции, вплоть до деградации рецептора в лизосоме [46]. Это ограничивает период влияния гормонов на клетку минутами, реже часами.

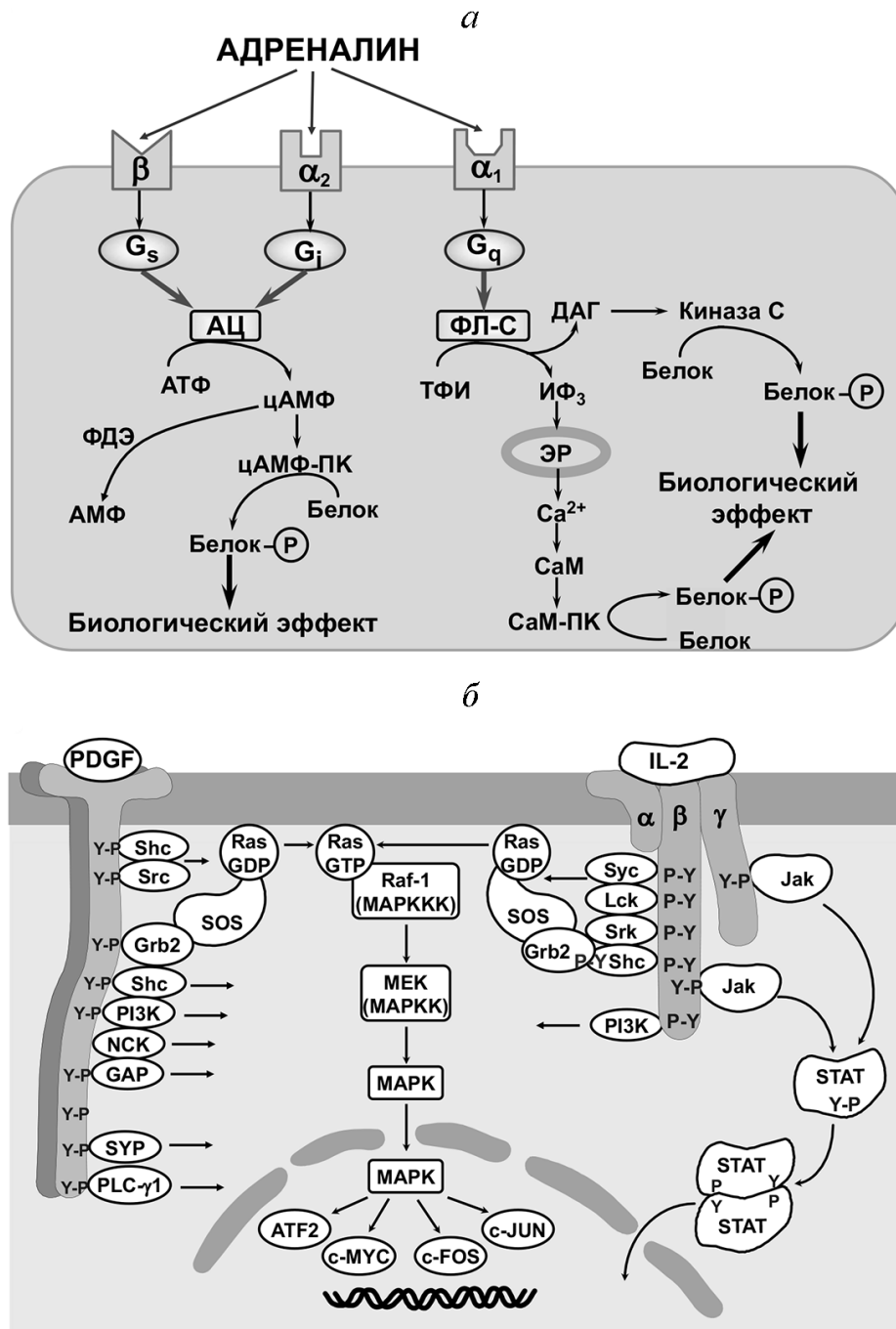
Более продолжительными могут быть эффекты липофильных стероидных и тиреоидных гормонов, которые проникают в цитоплазму и взаимодействуют с внутриклеточным рецепто-

ром, в комплексе с которым транслоцируются в ядро. Там комплекс «гормон–рецептор» способен связываться с хроматином и регулировать экспрессию генов, приводя к масштабным изменениям фенотипа клетки, которые сохраняются длительное время [47, 48].

При изучении механизмов гормональной регуляции на уровне одиночных клеток нами было показано, что гормональные сигналы критически важны для функционирования МСК, контролирующих тканевой гомеостаз и регенерацию при повреждении [49–51]. Мы обнаружили, что большинство МСК экспрессируют широкий репертуар рецепторов к гормонам и нейромедиаторам. При этом среди общей популяции только небольшая доля клеток (~5–7%) способна отвечать на тот или иной гормон активацией  $Ca^{2+}$  сигнализации, т.е. содержит необходимые компоненты внутриклеточной системы проведения сигнала. Более того, как стало известно, однократное воздействие гормона приводит к резкому росту доли клеток, способных к ответу на него же при повторном действии [51]. Это послужило основанием для предположения о «триггерной роли» популяции МСК, имеющих функционирующую систему рецепции гормона. Вероятно, в ответ на действие гормона чувствительные к нему клетки продуцируют факторы, действующие на окружающие МСК и увеличивающие их чувствительность к этому агонисту. В клетках-мишенях это может обеспечиваться как увеличением плотности рецептора на мембране, так и ростом экспрессии генов, кодирующих белки внутриклеточной сигнальной системы.

Мы также обнаружили, что однократная стимуляция  $\beta$ -адренорецепторов вызывает в МСК переключение с цАМФ-зависимого на  $Ca^{2+}$ -зависимый путь передачи сигнала, т.е. происходит не десенситизация из-за избыточной активации рецептора, а отложенное во времени переключение сигнализации на каскад, исходно связанный с активацией  $\alpha_1$ -адренорецептора. Это явление представляет собой т.н. гетерологическую сенситизацию – уникальный механизм регуляции гормональной чувствительности, присущий МСК [50, 52].

Наконец, мы установили, что чувствительность стволовых клеток к некоторым гормонам сопряжена с гетерогенностью их дифференцировочного потенциала. В частности, у МСК из жировой ткани была обнаружена экспрессия всех компонентов ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (РААС), причем экспрессия рецепторов 2-го типа (AT2) к ангиотензину-II характеризовала субпопуляцию МСК с повышенной способностью к дифференцировке в адипоциты.



**Рис. 2.** Примеры сигнальных каскадов, запускаемых при активации рецепторов гормонов, факторов роста и интерлейкинов. *a* – Гормон может активировать различные сигнальные системы в зависимости от типа рецептора. Агонист (адреналин) может активировать один из трех типов рецепторов и передавать сигнал внутрь клетки с помощью разных G-белков, аденилатциклазной системы и фосфоинозитидного обмена. Условные обозначения: АЦ – аденилатциклаза; ФЛ-С – фосфолипаза С; ТФИ – трифосфоинозитид; цАМФ – циклический аденозинмонофосфат; ИФ<sub>3</sub> – инозитол-1,4,5-трифосфат; ЭР – эндоплазматический ретикулум; ДАГ – диацилглицерин; СаМ – кальмодулин; ПК – протеинкиназа; ФДЭ – фосфодиэстераза. *b* – Активация рецепторов факторов роста и цитокинов приводит к лиганд-зависимой олигомеризации и аутофосфорилированию по остаткам тирозина. Фосфотирозины являются сайтами связывания адаптерных белков и сигнальных молекул, в результате чего собирается сигнальный комплекс, осуществляющий передачу сигнала без участия вторичных посредников. Условные обозначения: Y-P – фосфотирозин; ATF-2, C-MYC, c-FOS, c-JUN – факторы транскрипции; MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа; STAT – активатор транскрипции челночного типа; Jak – Янус-киназа;  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  – субъединицы рецептора цитокина; IL-2 – интерлейкин-2; PDGF – тромбоцитарный фактор роста. Адаптировано из учебника В.А. Ткачука и соавт. «Основы молекулярной эндокринологии: рецепция и внутриклеточная сигнализация» [41]

Эти же клетки способны продуцировать ангиотензин-II, который действует, вероятно, по аутокринному механизму, что приводит к мобилизации внутриклеточного  $Ca^{2+}$ . При этом мы наблюдали рост экспрессии мастер-генов адипогенеза – PPAR- $\gamma$  и адипонектина [49] с последующей адипогенной дифференцировкой МСК.

Приведенные примеры иллюстрируют механизмы участия нейроэндокринной системы и убедительно показывают ее важность для оперативной регуляции миграции и чувствительности одиночной клетки в момент времени. Однако продолжительность эффектов нейромедиаторов и гормонов намного короче периода, необходимого для воссоздания структуры при репаративной регенерации, занимающей несколько суток или недель. Еще одним фактором, ограничивающим роль гормональной регуляции на всем протяжении регенеративного процесса, является динамичное изменение чувствительности клеток: это касается как десенситизации под влиянием агонистов рецепторов, так и упомянутых выше переключений сигнализации.

**Факторы роста и цитокины – регуляторы обновления и регенерации с уникальным механизмом рецепции.** Еще в 70-х годах XX века было показано, что после воздействия ФР и цитокинов их эффекты на миграцию и дифференцировку клеток сохраняются очень долгое время – часы и даже дни. Это позволило предположить, что после однократной стимуляции этими белками клетки секретируют другие аутокринные факторы, стимулирующие подвижность и дифференцировку [53, 54]. Также для ФР и цитокинов был описан мощный митогенный эффект, которым не обладали известные гормоны и который не блокировали существующие антагонисты метаболитных рецепторов, что позволило предположить наличие иных сигнальных путей, активируемых этими лигандами [55].

Чувствительность клетки к ФР и цитокинам обеспечивается особой группой трансмембранных белков, одновременно обладающих функциями рецептора и фермента. Всего известно ~60 таких белков, получивших название рецепторных тирозинкиназ (РТК). Среди них выделяют несколько семейств: рецепторы факторов роста фибробластов (FGFR), рецепторы тромбоцитарного (PDGFR), эндотелиального (VEGFR) и эпидермального факторов роста (EGFR), а также инсулина и инсулиноподобного ФР (IR и IGF-1R) [56].

Несмотря на некоторые различия в структуре для большинства из них характерен общий принцип лиганд-зависимой димеризации с последующим аутофосфорилированием остатков тирозина в составе внутриклеточной части РТК

[56, 57], которое дает начало сигнальному каскаду (рис. 2, б).

Следует отметить, что некоторые РТК способны к спонтанной димеризации в отсутствие связывания с ФР. Например, IR и IGF-1R экспрессируются на поверхность клетки уже в виде  $(\alpha\beta)_2$  димеров, связанных дисульфидными связями, однако тирозинкиназную активность они проявляют только после активации своими лигандами. Аналогично ведут себя EGFR, Tie-2 (рецептор ангиопоэтинов) и ряд рецепторов эфринных, причем для них описано формирование очень крупных олигомеров из нескольких десятков РТК [58]. Некоторые авторы предполагают, что такая олигомеризация необходима для регуляции передачи сигнала после связывания с соответствующим лигандом [59].

При активации РТК ответ отличается специфичностью в зависимости от фосфорилируемого остатка тирозина, а также многочисленными точками амплификации сигнала, обеспечивающими кооперативность действия нескольких ФР и цитокинов или «перехват» сигнала [56, 60]. Специфичность эффектов, вызываемых фосфорилированием конкретного остатка тирозина, обеспечивает плеотропный характер рецепции, т.е. возможность запуска разных сигнальных путей от одного рецептора (рис. 2, б). Остаток тирозина, фосфорилируемого в составе внутриклеточной части рецептора, определяет связывание с конкретной сигнальной молекулой и активацию сигнального пути. При этом РТК может как напрямую запускать определенный каскад, так и выступать в роли адаптерного белка, необходимого для сборки сигнальных комплексов. Сигнал через каскад внутриклеточных киназ достигает ядра, где активирует факторы транскрипции и контролирует экспрессию генов, клеточный цикл, выживаемость и дифференцировку клетки [61].

Длительное действие ФР обеспечивается возможностью многократного запуска сигнализации при повторной лиганд-зависимой сборке олигомерного комплекса РТК. Существующие механизмы эндоцитоза РТК могут уменьшать чувствительность клетки к ФР и цитокинам [62], однако здесь на первый план выходят упомянутые точки амплификации сигнала, на которых сходятся несколько путей, активируемых разными рецепторами.

Например, митоген-активируемая протеинкиназа (MAP-киназа) ERK является посредником сигнальных путей рецепторов EGF, PDGF и FGF [63]. По этой причине даунрегуляция одного из этих рецепторов не приведет к выключению пролиферации клетки, регулируемой ERK-зависимыми ядерными факторами Jun, Fos и Myc.

Таким образом, в отличие от гормонов и нейромедиаторов ФР и цитокины являются высокоспецифичными регуляторами клеточной программы. Они влияют на решение клетки о входе в клеточный цикл, подталкивают ее к миграции и дифференцировке в ходе развития или регенерации, т.е. к масштабным в плане структуры тканевым событиям. Именно по этой причине логичным становится «дублирование» сигнальных путей от различных РТК и наличие точек амплификации, на которых сходятся сигнальные каскады от рецепторов разных ФР и цитокинов. Дифференцировка клетки, ее выживание, пролиферация, а главное – формирование новых тканевых структур, должны быть защищены от случайных воздействий, поэтому их запуск требует скоординированных сигналов от нескольких рецепторов и, соответственно, коктейля лигандов. Организованная таким образом система рецепции работает подобно фильтру, исключаяющему сигнальный «шум»: неспецифические или случайные воздействия [64].

Аналогично можно отметить дублирование функций и у самих ФР и цитокинов. Данная особенность является защитой от временных локальных условий, которые могут разрушать молекулы или менять их сродство к рецептору [65]. Например, при сопровождающей тяжелой гипоксии и ацидозе некоторые ФР (IGF, bFGF) теряют способность связываться с рецептором из-за снижения pH в ткани [66]. Однако другие ФР (VEGF165, TGF- $\beta$ 1) устойчивы к ацидозу и продолжают выполнять свои функции в этой области, стимулируя пролиферацию фибробластов и ангиогенез, сопровождающие заживление ран.

Еще одним примером может быть потеря активности фактором роста гепатоцитов (HGF), который нуждается в протеолитической активации для перехода в двухцепочечную форму, способную связываться с его рецептором – c-met [67]. При повреждении почек экспрессия про-HGF увеличивается в несколько раз, однако снижение продукции его активаторов (HGF-A, матриптаз, урокиназы и др.) делает этот ответ неэффективным из-за снижения активации HGF. Компенсаторным в этой ситуации является рост продукции IL-10, обладающего, как и HGF, противовоспалительным и противифибротическим действием, защищающим жизненно важный орган.

Чтобы проиллюстрировать важность плеотропии ФР в регуляции регенеративных процессов, приведем еще один пример. При восстановлении ткани VEGF и HGF обладают кооперативным действием на пролиферацию и миграцию эндотелия за счет усиления фосфорилирования ERK1/2 [68], однако эти ФР разнонаправ-

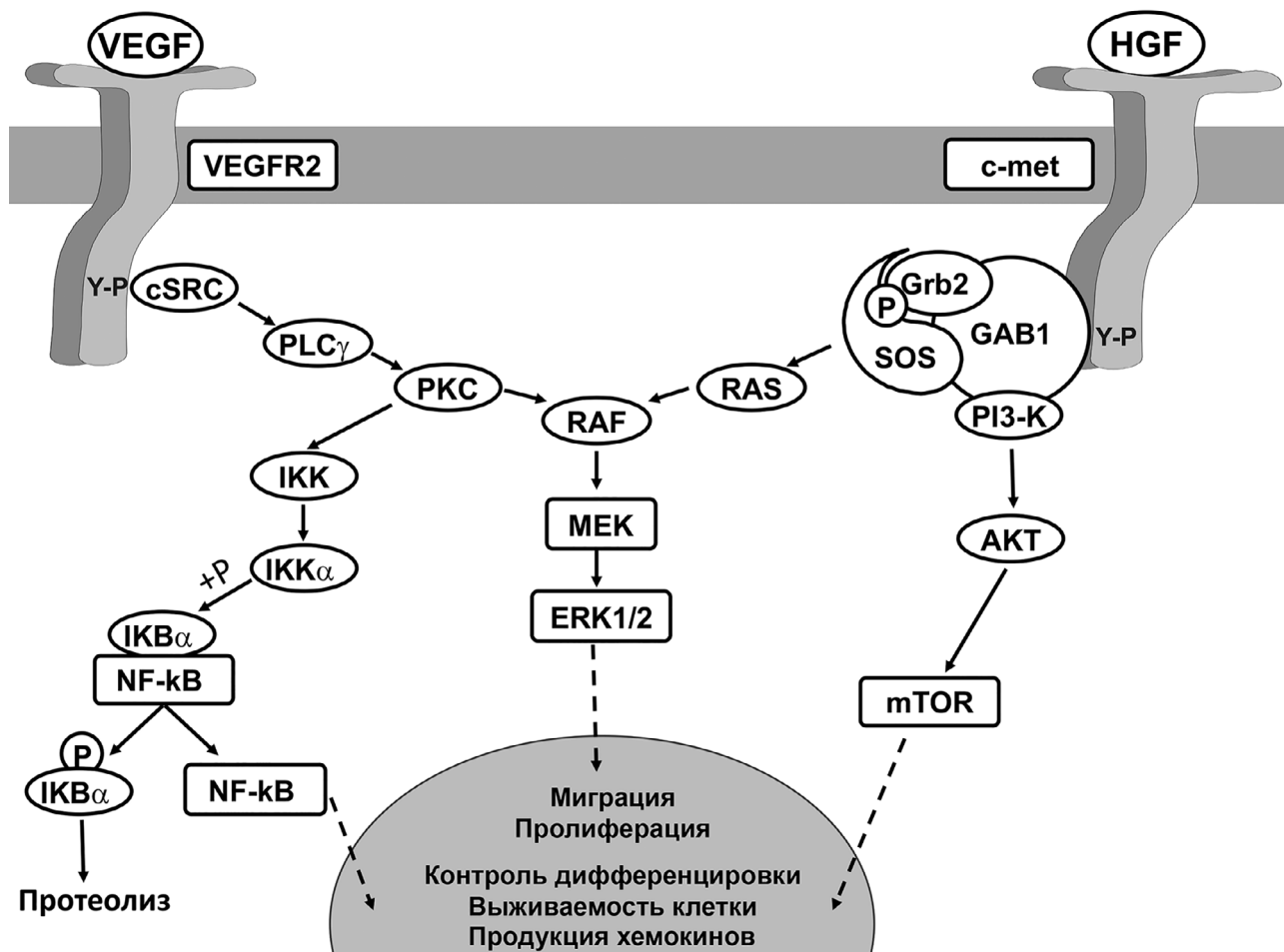
ленно регулируют в эндотелиоцитах активацию транскрипционного фактора NF $\kappa$ B (VEGF его активирует, а HGF подавляет, см рис. 3). Одной из мишеней NF $\kappa$ B является хемокин MCP-1 – эффективный хемоаттрактант моноцитов, являющихся ключевыми участниками ангио- и ангиогенеза в сердце. Таким образом, несмотря на кооперативное действие VEGF и HGF на пролиферацию эндотелия, эти факторы разнонаправленно влияли на инвазию моноцитов, без которых затрудняется стабилизация вновь образованных в ткани сосудов [69].

**Роль факторов роста и цитокинов в межклеточной коммуникации, развитии и регенерации.** В чем же уникальность ФР и цитокинов и почему механизмы их рецепции являются важными для понимания регуляции регенеративного процесса? Эволюционно система РТК – одна из самых поздних, и долгое время считалось, что она является уникальной особенностью многоклеточных организмов. За 1,5 миллиарда лет эволюции, разделивших одноклеточные эукариоты и первые многоклеточные организмы, именно появление тирозинкиназной системы рецепции считают ключевым шагом для перехода к многоклеточному строению организмов. Ее роль заключается в установлении высшего уровня организации – межклеточных коммуникаций и организации клеток в ткани и органы [70]. Наличие выстроенной системы межклеточных взаимодействий отличает организмы с облигатно многоклеточным строением от колоний одноклеточных, формируемых по принципу временных сообществ. Вне такой колонии каждый отдельный организм в отсутствие партнеров довольствуется собственной системой рецепции внешних стимулов и может поддерживать вид за счет регулярного удвоения, что невозможно для многоклеточного организма.

РТК были обнаружены у Choanoflagellata – жгутиковых простейших, способных к формированию колоний и представляющих собой сохранившееся переходное звено от одноклеточных к многоклеточным организмам [71]. В 2001 году Kind и Carroll впервые показали наличие у *Monosiga brevicollis* мембранного белка MBRTK1, обладающего тирозинкиназной активностью [72]. Далее было показано, что первые гены РТК появились у *M. brevicollis* ~600 млн лет назад, причем в удивительно большом количестве. Всего у этого вида было идентифицировано 128 (!) генов, кодирующих РТК, что отражает первичную избыточность, возникшую в ходе приспособительной реакции, движущая сила которой остается нам неизвестной [73, 74].

Существующая за счет ФР, цитокинов и РТК система коммуникации критична для всех эта-





**Рис. 3.** При активации рецепторов VEGFR и c-met усиление митогенного сигнала и разнонаправленное действие на дифференцировку и выживаемость клетки обусловлено сигнализацией от тирозинкиназных рецепторов факторов роста. Усиление сигнала, активирующего пролиферацию и миграцию, происходит за счет кооперативного фосфорилирования RAF-киназы и активации сигнального пути киназы ERK1/2. При этом разнонаправленное влияние активации VEGFR2 и c-met на дифференцировку, продукцию воспалительных белков и выживаемость клеток также обусловлено активацией специфических сигнальных путей, регулирующих транскрипционные факторы и сигнальные комплексы, которые переключают экспрессию генов. Таким образом, тирозинкиназный путь рецепции может обеспечивать как усиление, так и различную направленность влияния ФР на одни и те же процессы в клетке

пов, требующих взаимодействия между клетками — от развития до обновления и регенерации в постнатальном периоде. Важную роль, начиная с ранних этапов эмбриогенеза, играют IGF, TGF-β1 и -β3, HGF, PDGF-A и -B и появление спектра РТК, опосредующих чувствительность к перечисленным ФР [75]. Репертуар экспрессируемых ФР формирует сеть взаимных влияний между элементами, определяющими судьбу каждого из них и ход развития организма [56, 76]. Например, после первых дроблений зиготы между четырьмя бластомерами имеются существенные различия, хотя визуально они обладают совершенно неотличимой сферической формой. Каждый бластомер обладает уникальными признаками, а также спектром ФР и цитокинов, действующих ауто- и паракринно в крошечной,

но уже неоднородной системе. В опытах с разделением клеток из состава 4-х и 8-клеточных стадий развития мыши было показано, что одиночные бластомеры различаются по экспрессии β-катенина — важного участника канонического пути Wnt-сигналинга — каскада, задействованного в регуляции дифференцировочного статуса СК [77, 78]. Дальнейшие стадии эмбриогенеза характеризуются расширением репертуара продуцируемых ФР и чувствительности к ним. В результате этого начинается процесс специализации клеточных типов, зависящий от миграционной активности и дифференцировки плюри-, а затем мультипотентных СК в составе зародышевых листков [79].

С точки зрения организации ткани регенеративный процесс также характеризуется делени-

ем, специализацией клеток и усложнением структуры под контролем ФР и цитокинов. После повреждения на месте разрушенной ткани формируется временная структура, основой которой, как правило, является сгусток крови [80]. В зависимости от вида этой структурой может быть васкуляризованная, но не специализированная грануляционная ткань или бластема, состоящая из дедифференцированных соматических клеток. В дальнейшем для полноценной регенерации она должна быть в состоянии обеспечить условия для дифференцировки, правильной организации ткани и функционирования клеток, т.е. усложнения структуры [27]. Этот процесс зачастую подчиняется закономерностям, аналогичным тем, которые действовали на этапе эмбрионального развития затронутой части тела [81].

**Стадийность и своевременное переключение стимулов необходимы для регенерации ткани.** Все фазы репаративной регенерации — от гемостаза после повреждения до регенерации или фиброза — характеризуются активностью специализированных типов клеток, обладающих особенностями регуляции и, следовательно, требующих специфического набора стимулирующих и ингибирующих молекул [41, 82].

Самые ранние стадии (образование тромба и воспаление) высоко консервативны у позвоночных и обладают критическим значением для выживания особи и борьбы с инфекцией, которая попадает в зону повреждения. Активация тромбоцитов, помимо остановки кровотечения, сопровождается их дегрануляцией и выбросом хемоаттрактантов (IL-8, IL-6, IFN- $\gamma$  и др.), привлекающих в зону повреждения нейтрофилы. Их защитная функция реализуется за счет выброса токсических молекул и активной продукции свободных радикалов, уничтожающих в зоне повреждения как микробы, так и клетки макроорганизма. Массовая гибель нейтрофилов очищает рану и создает новый градиент цитокинов (MCP-1, MIP-1, TNF- $\alpha$ ), привлекающих моноциты и запускающих их дифференцировку в макрофаги. Фагоцитирующие макрофаги поглощают клеточный дебрис, оставшийся после погибших нейтрофилов, и активно вырабатывают цитокины и ФР (IL-6, SDF-1 $\alpha$ , FGF, PDGF, VEGF), которые привлекают в рану ключевых участников дальнейших событий — МСК, фибробласты и миофибробласты [21, 41]. Этими же ФР стимулируется пролиферация и дифференцировка клеток, их организация в упорядоченные структуры, необходимые для регенерации. Уже на примере первых этапов репаративной регенерации видно, что каждый тип клеток, активируемый специфическими стимулами,

выполняет свою функцию и формирует набор стимулов, необходимых для запуска и регуляции следующего этапа [83].

Хорошей иллюстрацией жестко закрепленной стадийности регуляции, осуществляемой ФР, является опыт с эктопическим отрастанием конечности или хвоста у аксолотля. Оба этих процесса требуют последовательного переключения стимулов и кооперативного действия белков из семейств костных морфогенетических белков (BMP) и FGF [84]. Ни FGF2, ни FGF8, ни пара BMP2/BMP7 по одиночке не способны запустить полную регенерацию конечности [85]. Действие любого из перечисленных факторов вызывает появление на раневой поверхности временных структур, напоминающих бластему — группу дедифференцированных клеток, дающих начало отрастающей конечности. Однако только их кооперативное действие в определенной последовательности (во многом совпадающей с переключениями экспрессии генов в процессе эмбрионального развития) [68] позволяет добиться отрастания дополнительной части тела [86].

В недавно опубликованной работе Yu et al. [87] именно последовательным воздействием BMP2 и BMP9 удалось добиться регенерации ампутированной дистальной фаланги у млекопитающего (мышь), что, несомненно, стало выдающимся результатом. Однако следует отметить, что в ходе эволюции базовый принцип регенерации — последовательное образование и усложнение структуры — не изменился, что всегда будет требовать определенных стимулов в определенной последовательности. Отступление от этого принципа объясняет результаты клинических исследований, в которых не показала эффективности ни одна из молекул, активирующих СК. Предпринимались попытки применения ФР (VEGF, bFGF, HGF, PDGF и др.) и колониестимулирующих факторов (G-CSF), однако результаты их использования были очень скромными, несмотря на попытки подобрать приемлемые показания — начиная от лечения ожогов до сахарного диабета I типа [88].

Таким образом, регенеративный процесс не является функцией отдельно взятой клетки или результатом воздействия одиночных молекул на идущие в ней процессы. Он требует последовательной активации и регуляции различных типов клеток, участвующих в восстановлении структуры. Именно поэтому попытки стимулировать регенерацию лучше основывать не на активности важных для регенерации лигандов и рецепторов, а на воспроизведении стадийности с учетом особенностей процессов, происходящих при органогенезе или восстановлении ткани.

## МЕТОДОЛОГИЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ С ТОЧКИ ЗРЕНИЯ РЕГУЛЯЦИИ ПРОЦЕССОВ ОБНОВЛЕНИЯ И РЕГЕНЕРАЦИИ

### Генная терапия в регенеративной медицине.

Под генной терапией (ГТ) понимают группу методов, направленных на модификацию последовательности генов или управление их экспрессией, а также изменение биологических свойств живых клеток для их терапевтического использования. Концепция гена как фармакологической мишени не нова – многие низкомолекулярные препараты и гормоны способны действовать на ДНК напрямую или опосредованно, влияя на метаболизм и жизнеспособность клетки. Однако концепция гена как активного начала лекарства впервые была сформулирована в начале 70-х годов XX века, дав начало этому направлению [89].

С точки зрения регуляции процессов регенерации ГТ позволила решить задачу продолжительной экспрессии ФР и цитокинов, активирующих процессы формирования новых структур, которые идут длительно – сутками и даже неделями. Добиться продолжительного действия этих белков локальным введением в ткань оказалось невозможно, так как время их жизни после локальной или системной инъекции было мизерным из-за деградации под влиянием протеаз и большого объема распределения. При этом их концентрация быстро снижалась ниже порога связывания с рецептором и, следовательно, прекращалось влияние на клетки-мишени. Генная терапия позволила превратить часть клеток органа в клетки-продуценты, которые нарабатывают белок, запускающий пролиферацию, миграцию и активирующий резидентные СК [90]. С помощью плазмидных и вирусных векторов в ткани были доставлены гены ФР (VEGF, HGF, ангиопоэтин-1, PDGF и др.), регулирующие регенерацию и ее отдельные звенья: рост нервов и кровеносных сосудов, миграцию эпителия, защиту от фиброза и др. [69, 91–94].

В клинических исследованиях ГТ с помощью одного гена ФР (VEGF, HGF, FGF и др.) оказалась малоэффективной для стимуляции регенеративных процессов [92]. Биологических эффектов одного ФР или цитокина было достаточно для того, чтобы индуцировать рост отдельных структур (сосудов, аксонов), но не формирование ткани, которое требует каскада последовательно переключающихся стимулов. В этой области, как стало известно, возможны определенные улучшения с помощью комбинированной генной терапии несколькими ФР с до-

полняющими друг друга эффектами. Примером такой физиологически обоснованной комбинации может служить сочетание VEGF165 и ангиопоэтин-1. В этой паре VEGF165 играет роль активатора ангиогенеза, а ангиопоэтин-1 – аттрактанта перицитов и гладкомышечных клеток. Под влиянием VEGF165 происходит активный капиллярогенез, однако многие сформированные сосуды обладают повышенной проницаемостью или быстро разрушаются. Ангиопоэтин-1, сам по себе обладая очень скромным ангиогенным потенциалом, в комбинации с VEGF165 сыграл роль стабилизатора сосудов и оказался способен уменьшать побочные эффекты монотерапии VEGF. Более того, комбинирование этих генов значительно усилило васкуляризацию регенерирующей ткани по сравнению с каждым из них по отдельности [95]. Однако для запуска полноценной регенерации ткани или органа ГТ имеет ограниченный потенциал [90, 92, 96].

Следует отметить, что «моногенная» терапия оказалась эффективной для терапии наследственных заболеваний. Метод доставки «здоровой» копии гена стал примером этиотропной ГТ, направленной на устранение единственной причины заболевания, не корректируемой иными способами. Благодаря этому в настоящее время мы приблизились к возможности излечения ряда наследственных иммунодефицитов, энзимопатий, гемофилии А [97–99].

**Стимуляция регенеративных процессов с помощью секрета стволовых клеток.** Клеточную терапию длительное время рассматривали как способ получения «лекарства на основе стволовых клеток», причем в последние годы для этого активно использовали МСК из различных источников. Являясь удобным объектом и источником материала для клеточной терапии, они долгие годы считались одним из наиболее перспективных и безопасных инструментов для клеточной терапии. В пользу этого говорят положительные результаты применения МСК, однако в начале 2000-х годов все чаще стали появляться данные о невозможности интеграции клеток, введенных в ткань [100]. Ряд исследователей с разочарованием констатировали, что МСК оказались неспособны к включению в состав ткани, а их эффекты связаны с активностью продуцируемого ими секрета [100].

Протеомные исследования секрета МСК, в том числе проведенные нами [101], показали, что он содержит большое количество пептидных и белковых компонентов, многие из которых были идентифицированы как ФР, регуляторы метаболизма, компоненты внеклеточного матрикса и др. (рис. 4) [102, 103]. Все это состав-

ляет комплекс стимулов, упомянутый во вводящей части, который, как оказалось, невозможно воспроизвести с помощью фармакологических препаратов или методов ГТ. Эти данные стали отражением биологической роли МСК – регуляторных клеток, имеющих базальный уровень секреторной активности, обеспечивающий тканевой гомеостаз, и при этом способных многократно ее повышать при повреждении для обеспечения ее регенерации. В пользу этого говорит их преимущественно периваскулярная локализация, где МСК одновременно экспонированы к воздействию системных стимулов (уровня глюкозы, кислорода, инсулина, гормонов крови) и локальных сигналов, возникающих в ткани. Такое положение обеспечивает рецепцию ими сигналов от организма в целом и от клеток *in situ* [102, 103]. Продуцируемый МСК секретом оказался очень удачным объектом для создания «регенеративного лекарства», которое отвечает ключевым требованиям с точки зрения регуляции регенерации. При этом комбинированное действие ФР приводит к усилению сигнала в точках амплификации, общих для сигнальных каскадов молекулах, воссоздавая картину кооперативной регуляции клетки суммой стимулов, а не одиночными молекулами.

Это стало основой для создания регенеративных препаратов, содержащих продуцируемые МСК белки и предназначенных для стимуляции восстановления ткани. Полученные нами

данные *in vivo* говорят о том, что секретом МСК обладает мощным ангиогенным и нейротрофным действием, стимулирует заживление после ожогов кожи, способен восстанавливать сперматогенез [101, 104].

Среди разрабатываемых в мире препаратов такого класса заслуживает упоминания Thero-101 (ранее известный, как NeuroFX) – инфузионный препарат для лечения последствий ишемического инсульта, основой которого является очищенная белковая фракция секрета МСК человека. В настоящее время разрабатывающая его компания готовится к первым клиническим исследованиям, которые позволят оценить эффективность этого подхода.

В отношении секрета МСК следует также отметить, что многие фармакологические эффекты основаны на продукции не только белков и пептидов, но и фракции внеклеточных везикул, включающей микровезикулы и экзосомы [105]. Долгое время их рассматривали как результат удаления из клеток отживших органелл, неправильно уложенных белков и др., однако сейчас мы можем с уверенностью говорить о том, что внеклеточные везикулы являются способом передачи информации между клетками. Более того, за счет присутствия в их составе нуклеиновых кислот (мРНК, микроРНК и др.), данный вид транспорта может являться способом горизонтального переноса генетической информации в организме человека, в т.ч. и при

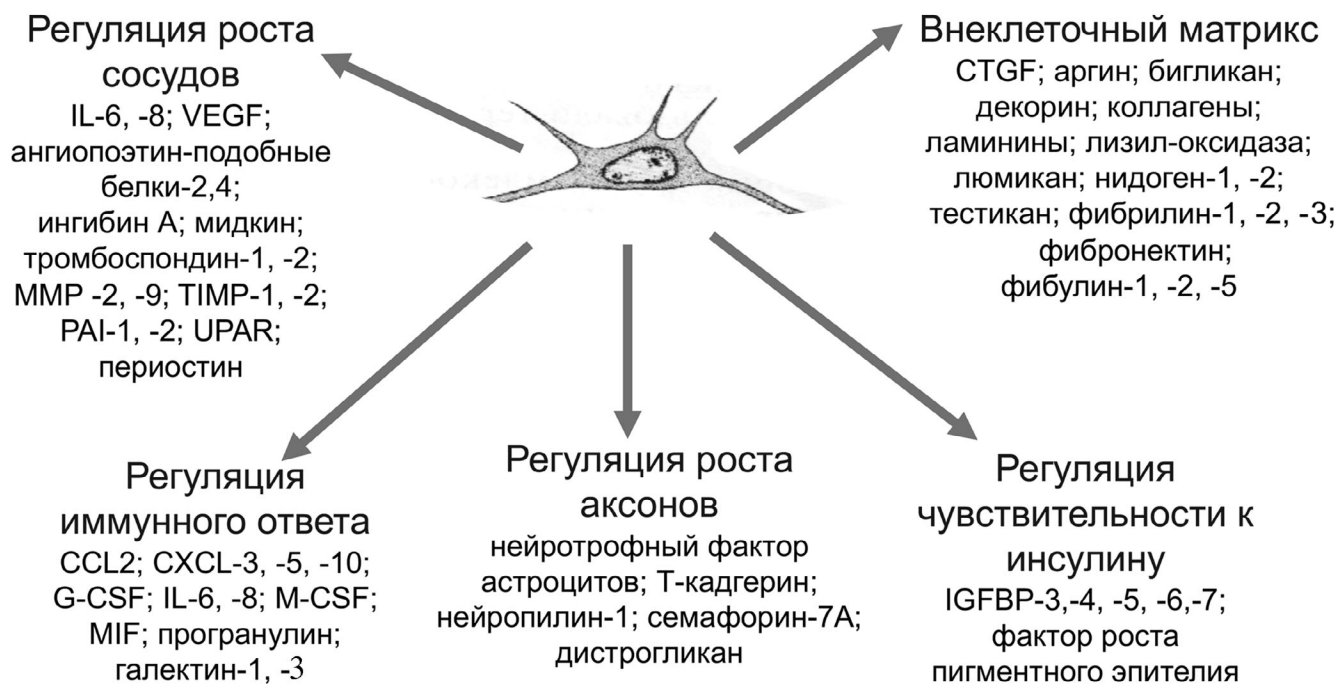


Рис. 4. Секретом МСК человека и основные функциональные группы идентифицированных в его составе молекул

стимуляции дедифференцировки и трансдифференцировки клеток в организме [106].

Таким образом, с точки зрения регенеративного процесса вводимые МСК действительно не способны интегрироваться в ткань, однако их секреторная активность позволяет влиять на большинство стадий восстановления после повреждения [104].

Введенные в поврежденную ткань МСК способны к рецепции условий микроокружения. При гипоксии или наличии высокого содержания воспалительных цитокинов IL-8 или TNF- $\alpha$  они способны в определенном диапазоне менять состав секрета, т.е. обладают адаптивностью [107, 108]. За счет этого МСК могут ускорять разрешение воспаления в его острой и острейшей фазах, а на более поздних этапах — способствовать росту капилляров и нервных окончаний, необходимых для регенерации и восстановления ткани. Следует отметить, что МСК также могут под влиянием тканевого окружения приобретать фенотип миофибробластов, способных усиливать фиброз в зоне повреждения и рубцевание ткани [109, 110].

Таким образом, секреторная активность МСК может быть использована для создания препаратов на основе секрета, однако они представляют собой коктейль факторов, полученных в культуре и, соответственно, не могут воспроизвести стадийность регенерации, о важности которой было сказано выше. Вводимые в ткань МСК способны адаптивно менять свою секреторную активность в зависимости от условий окружения, однако есть данные об их участии в фиброзировании поврежденных органов. Оба этих пути имеют свои перспективы и, вероятно, найдут свои показания. В настоящее время существуют возможности для управления состоянием МСК и других типов клеток *in vitro*. Имитация напряжения сдвига, внесение различных активирующих молекул или гипоксия позволяют эффективно менять состав секрета. Эти приемы могут быть использованы для получения эффективных бесклеточных препаратов различной «модальности», пригодных для использования при широком спектре заболеваний.

**Тканеспецифичные стволовые клетки и их ниша как терапевтическая мишень.** Длительное время одними из самых перспективных объектов с точки зрения регенеративной медицины являлись тканеспецифичные СК. Они были обнаружены во всех паренхиматозных органах человека, в легких, коже, криптах кишки и др. Эти постнатальные СК существуют в виде ограниченной популяции недифференцированных клеток, сохраняющихся в ходе эмбрионального

развития и участвующих в обновлении и регенерации ткани [111].

Однако раз за разом исследователи обнаруживали, что выделенные из тканей тканеспецифичные СК не были способны дать начало ткани или сформировать ее эквивалент с полноценной функцией. В ряде случаев ситуацию удавалось частично улучшить с помощью тканевой инженерии и использования скаффолдов (синтетических матричных каркасов или децеллюляризованных органов) [112]. Более того, некоторые тканеспецифичные СК по-прежнему не удается запустить даже в ранние стадии органогенеза вне организма. Например, известные несколько десятилетий сателлитные клетки скелетных мышц хорошо активируются *in vitro*, экспрессируя транскрипционные факторы, отвечающие за миогенез и формируя структуры, аналогичные миофибриллам [113]. При этом добиться от них полноценной и регулируемой сократительной активности с возможностью интеграции в ткань не удалось [114].

Эти результаты можно объяснить двумя причинами: 1) СК, утрачивая контакт со своим специфическим окружением, теряет свою способность к полноценной дифференцировке; 2) запущенная в дифференцировку СК, дойдя до стадии коммитированных клеток-предшественников, требует полноценного окружения, чтобы созреть до терминально дифференцированного состояния и встроиться в ткань морфологически и функционально [21, 22].

В итоге мы приходим к выводу о том, что функциональной единицей регенерации является не сама по себе СК с ее внутренними свойствами, а комплекс, состоящий из СК и ее специфического окружения, играющего регуляторную роль. Это окружение получило название «ниша», и в современном представлении о регуляции регенеративного процесса именно ему отводится роль в рецепции активирующих стимулов и контроле «судьбы» СК на ранних этапах дифференцировки [115]. Вопросам анатомии ниш различных типов и механизмам их регуляции посвящено множество замечательных обзорных публикаций, поэтому мы лишь позволим себе уточнить, что в состав ниши, помимо самой СК, входят растворимые факторы, белки матрикса и поддерживающие клетки. При этом в отношении других типов клеток мы вновь обращаем внимание на МСК, которые во многих нишах играют роль как в поддержании покоящегося состояния СК, так и в ее активации. Наконец, свой ключевой вклад МСК вносят при завершении регенерации на этапе формирования специфического для ткани матричного, сосудистого и нейрального компонентов [116].

Возвращаясь к предмету обзора, мы можем предположить, что в регенеративной медицине будущего на первый план выйдет понимание механизмов функционирования ниши СК и разработка способов ее контролируемой активации или восстановления после повреждения. Многие подходы, вероятно, будут основаны на описанных в первой части принципах регуляции, базирующихся на последовательном переключении факторов и стимулов, вначале активирующих СК, а затем поддерживающих создание СК в ходе регенерации.

Таким образом, в дальнейшем мы сможем уйти от этапа культивирования СК *ex vivo*, так как это несет в себе риски (контаминация микробами, хромосомные aberrации и генетические перестройки) и приводит к потере СК их регенеративных свойств, определяемых условиями ниши. Конечно, в ряде случаев СК и клетки их окружения исходно имеют сниженный регенеративный потенциал: существует понятие об истощении пула СК по мере старения, а также показаны неблагоприятные эффекты метаболических и сердечно-сосудистых заболеваний на их основные физиологические функции [117]. В данной ситуации перед нами встает задача более глубокого понимания процессов, которые протекают в нише и как именно действуют на нее повреждающие факторы. В перспективе это создаст основы для управления нишей СК, а в дальнейшем и подходы к блокировке или подавлению формирования патологических ниш, например, ниш опухолевых СК [118].

**Использование «малых молекул» для регенеративной медицины.** В ходе изложения мы подошли к важному направлению в регенеративной медицине – регуляции обновления и регенерации ткани *in situ*. В этом плане было бы несправедливо обделить вниманием ряд «малых молекул», например, специфических ингибиторов белков и регуляторных каскадов, контролирующих статус СК. В США сейчас готовится к клиническим исследованиям комбинированный препарат FX-322, включающий два низкомолекулярных ингибитора. Мишень первого ингибитора – киназа-3 гликогенсинтазы (GSK-3), ингибирование которой приводит к активации пути Wnt – ключевого регулятора многих прогениторных клеток. Второй ингибитор блокирует активность гистоновой деацетилазы (HDAC1), уменьшая ее скручивающее действие на цепочку ДНК. Суммой этих эффектов оказалась активация Lgr5<sup>+</sup> прогениторных клеток, которые являются предшественниками волосяного сенсорного эпителия, чье отмирание в раннем возрасте стало встречаться все чаще из-за распространенности наушников и персональных аудиосистем.

При локальном введении в среднее ухо FX-322 активирует Lgr5<sup>+</sup> прогениторные клетки, вызывая восстановление сенсорного эпителия и слуховой чувствительности. Аналогичным образом данный «коктейль» ингибиторов может быть эффективным в нише крипты кишки, регенерация эпителия которой тоже зависит от Lgr5<sup>+</sup> клеток. Наконец, Lgr5<sup>+</sup> клетки содержатся в волосяной луковице, поэтому одним из перспективных показаний для FX-322 является и алоpecia различного генеза.

Таким образом, на этом примере мы видим, что удачно подобранная комбинация фармакологических ингибиторов оказывается эффективным стимулятором регенерации за счет действия на тканеспецифичные СК и позволяет избежать этапа их культивирования. К слову, возвращаясь к самой первой части обзора, следует отметить, что и здесь механизмом действия препарата является ингибирование мишеней, а не их активация, как это происходит под действием, например, секрета МСК или белка, продуцирующегося после доставки гена в ткань.

Ограничением описанной стратегии может стать истощение пула тканеспецифичных СК, однако в такой ситуации могут быть использованы методы, направленные на активацию пролиферации с помощью вирусной доставки генов, кодирующих положительные регуляторы клеточного цикла или регуляторные РНК, вызывающие ограниченную дедифференцировку зрелых клеток и их пролиферацию с последующей редифференцировкой. Более того, данный подход может быть совмещен с описанной выше стратегией, как, например, это было сделано в опыте по активации пролиферации зрелых кардиомиоцитов мыши [119]. В этом эксперименте было установлено, что введение в миокард генов 4-х регуляторов клеточного цикла (CDK1, циклина В, CDK4 и CCND) вызывает пролиферацию кардиомиоцитов. При этом оказалось, что использование двух низкомолекулярных ингибиторов, подавляющих активность TGF-β1 и киназы Wee-1, позволяет добиться того же эффекта введением только двух факторов (CDK4 и CCND).

Еще одним перспективным подходом является трансдифференцировка клеток *in situ* путем доставки факторов транскрипции или регуляторных РНК с помощью вирусов или экзосом. В ряде экспериментов было показано прямое перепрограммирование фибробластов в гепатоциты, кардиомиоциты и клетки дермы, минуя стадию плюрипотентности [34, 35, 120].

Таким образом, в настоящее время мы вплотную приблизились к созданию подходов, основанных на комбинации генной терапии и

фармакологической регуляции дифференцировки, которые можно использовать для активации обновления и регенерации ткани после повреждения.

Изучение регуляции регенеративных процессов, сколь ни сложным может показаться этот предмет, все чаще дает прорывные результаты. В XXI веке за неполные 20 лет удалось добиться регенерации сердца и частей конечности у млекопитающих, установить закономерности, описывающие падение способности к репаративной регенерации после рождения и, наконец, установить ~20 новых мишеней, отвечающих за функционирование СК в постнатальном периоде. Расширившаяся методическая база — от релевантных животных моделей до РНК-секвенирования одиночных клеток — дала уникальные возможности для фундаментальных исследований в области регенеративной биологии и медицины.

В данном обзоре мы постарались дать читателю представление о расшифрованных регуляторных системах, которые являются объектами для регенеративной медицины настоящего.

Это направление, пройдя солидную историю развития, сейчас подошло к точке, когда конвергенция с регенеративной биологией (от которой она заимствовала многие базовые понятия и частично методологию) является наиболее разумным путем развития. Изучение молекулярных механизмов регуляции СК долгое время было флагманским направлением в этой науке и дало множество перспективных технологий. Однако сейчас на первый план выходят задачи, связанные с пониманием того, как после повреждения в постнатальном периоде клетки могут воспроизвести процессы организации ткани, которые шли в эмбриогенезе.

Оптимизм исследователям внушает тот факт, что в организме человека не оказалось эволюционно выработанной блокировки регенерации, все клеточные механизмы, присущие животным, эффективно восстанавливающим свои части тела, могут в ответ на повреждение идти в тканях *Homo sapiens*. Помимо пролиферации

зрелых клеток и дифференцировки СК, идут процессы дедифференцировки и прямой конверсии одного типа клеток в другой в ответ на повреждение. Таким образом, в регенеративной биологии и медицине ближайших десятилетий станет важным изучение регенерирующей ткани как созревающей (по аналогии с эмбриогенозом) системы межклеточных взаимодействий, опосредованных ФР и цитокинами. Реализация корректной программы этого процесса долгое время ассоциировалась с активацией резидентных СК, однако сейчас все большее внимание уделяется нише — ее специфическому регуляторному окружению. Результатами этих исследований уже стали практические успехи — созданные методы запуска регенерации без культивирования клеток вне организма, т.е. *in situ*, с помощью малых молекул, методов ГТ и секрета постнатальных СК.

Несомненно, важным с точки зрения биохимической регуляции этих процессов останется изучение метаболической регуляции регенерации и сигнальных механизмов, отвечающих за передачу стимула, и контроль судьбы клетки. Обнаружение новых мишеней в ближайшем будущем останется за классическими подходами клеточной биологии и биохимии, однако расширяющееся применение методов геномной инженерии и биоинформатики значительно увеличит эффективность их поиска с быстрой проверкой на релевантных модельных объектах.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-75-30007) (подготовка рукописи и обеспечение доступа к первоисточникам) и гранта Президента РФ для государственной поддержки молодых российских ученых № МК-1068.2019.7 (подготовка иллюстраций).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Goss, R.J. (1969) *Principles of regeneration*, Academic Press, New York.
2. Wyllie, A.H. (1987) Apoptosis: cell death in tissue regulation, *J. Pathol.*, **153**, 313–316.
3. Guillot, C., and Lecuit, T. (2013) Mechanics of epithelial tissue homeostasis and morphogenesis, *Science*, **340**, 1185–1189.
4. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002) *Molecular Biology of the Cell*, 4th Edition, Garland Science, New York, pp. 1616.
5. Iismaa, S.E., Kaidonis, X., Nicks, A.M., Bogush, N., Kikuchi, K., Naqvi, N., Harvey, R.P., Husain, A., and Graham, R.M. (2018) Comparative regenerative mechanisms across different mammalian tissues, *NPJ Regen. Med.*, **3**, 6.
6. Stocum, D.L. (2012) An Overview of Regenerative Biology, in *Regenerative Biology and Medicine (Second Edition)*, Academic Press, San Diego. pp 3–20.
7. Goss, R.J. (1980) Prospects of regeneration in man, *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 270–282.

8. Seifert, A.W., and Muneoka, K. (2018) The blastema and epimorphic regeneration in mammals, *Dev. Biol.*, **433**, 190–199.
9. Bleacher, J.C., Adolph, V.R., Dillon, P.W., and Krummel, T.M. (1993) Fetal tissue repair and wound healing, *Dermatol. Clin.*, **11**, 677–683.
10. Dostal, G.H., and Gamelli, R.L. (1993) Fetal wound healing, *Surg. Gynecol. Obstet.*, **176**, 299–306.
11. Burrington, J.D. (1971) Wound healing in the fetal lamb, *J. Pediatr. Surg.*, **6**, 523–528.
12. Frantz, F.W., Diegelmann, R.F., Mast, B.A., and Cohen, I.K. (1992) Biology of fetal wound healing: collagen biosynthesis during dermal repair, *J. Pediatr. Surg.*, **27**, 945–948; discussion 949.
13. Buonocore, G., Perrone, S., and Tataranno, M.L. (2017) Oxidative stress in the newborn, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2017**, 1094247.
14. Torres-Cuevas, I., Parra-Llorca, A., Sanchez-Illana, A., Nunez-Ramiro, A., Kuligowski, J., Chafer-Pericas, C., Cernada, M., Escobar, J., and Vento, M. (2017) Oxygen and oxidative stress in the perinatal period, *Redox. Biol.*, **12**, 674–681.
15. Yun, M.H. (2015) Changes in regenerative capacity through lifespan, *Int. J. Mol. Sci.*, **16**, 25392–25432.
16. Nakada, Y., Canseco, D.C., Thet, S., Abdisalaam, S., Asaithamby, A., Santos, C.X., Shah, A.M., Zhang, H., Faber, J.E., Kinter, M.T., Szveda, L.I., Xing, C., Hu, Z., Deberardinis, R.J., Schiattarella, G., Hill, J.A., Oz, O., Lu, Z., Zhang, C.C., Kimura, W., and Sadek, H.A. (2017) Hypoxia induces heart regeneration in adult mice, *Nature*, **541**, 222–227.
17. Simkin, J., and Seifert, A.W. (2018) Concise review: translating regenerative biology into clinically relevant therapies: are we on the right path? *Stem Cells Transl. Med.*, **7**, 220–231.
18. Gawriluk, T.R., Simkin, J., Thompson, K.L., Biswas, S.K., Clare-Salzler, Z., Kimani, J.M., Kiama, S.G., Smith, J.J., Ezenwa, V.O., and Seifert, A.W. (2016) Comparative analysis of ear-hole closure identifies epimorphic regeneration as a discrete trait in mammals, *Nat. Commun.*, **7**, 11164.
19. Christ, G.J., Saul, J.M., Furth, M.E., and Andersson, K.E. (2013) The pharmacology of regenerative medicine, *Pharmacol. Rev.*, **65**, 1091–1133.
20. Tanaka, E.M., and Reddien, P.W. (2011) The cellular basis for animal regeneration, *Dev. Cell*, **21**, 172–185.
21. Nimiritsky, P.P., Eremichev, R.Y., Alexandrushkina, N.A., Efimenko, A.Y., Tkachuk, V.A., and Makarevich, P.I. (2019) Unveiling mesenchymal stromal cells' organizing function in regeneration, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, pii: E823, doi: 10.3390/ijms20040823.
22. Nimiritsky, P.P., Sagaradze, G.D., Efimenko, A.Y., Makarevich, P.I., and Tkachuk, V.A. (2018) The stem cell niche, *Tsitologiya*, **60**, 575–586.
23. Mazzarello, P. (1999) A unifying concept: the history of cell theory, *Nat. Cell Biol.*, **1**, E13–E15.
24. Shay, J.W., and Wright, W.E. (2000) Hayflick, his limit, and cellular ageing, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **1**, 72–76.
25. Munoz-Espin, D., and Serrano, M. (2014) Cellular senescence: from physiology to pathology, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **15**, 482–496.
26. Klochendler, A., Weinberg-Corem, N., Moran, M., Swisa, A., Pochet, N., Savova, V., Vikesa, J., Van de Peer, Y., Brandeis, M., Regev, A., Nielsen, F.C., Dor, Y., and Eden, A. (2012) A transgenic mouse marking live replicating cells reveals *in vivo* transcriptional program of proliferation, *Dev. Cell*, **23**, 681–690.
27. Brockes, J.P., and Kumar, A. (2008) Comparative aspects of animal regeneration, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **24**, 525–549.
28. Wang, W.E., Li, L., Xia, X., Fu, W., Liao, Q., Lan, C., Yang, D., Chen, H., Yue, R., Zeng, C., Zhou, L., Zhou, B., Duan, D.D., Chen, X., Houser, S.R., and Zeng, C. (2017) Dedifferentiation, proliferation, and redifferentiation of adult mammalian cardiomyocytes after ischemic injury, *Circulation*, **136**, 834–848.
29. Jopling, C., Sleep, E., Raya, M., Marti, M., Raya, A., and Izpisua Belmonte, J.C. (2010) Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation, *Nature*, **464**, 606–609.
30. Takahashi, K. (2014) Cellular reprogramming, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **6**, pii: a018606, doi: 10.1101/cshperspect.a018606.
31. Kelaini, S., Cochrane, A., and Margariti, A. (2014) Direct reprogramming of adult cells: avoiding the pluripotent state, *Stem Cells Cloning*, **7**, 19–29.
32. Criscimanna, A., Speicher, J.A., Houshmand, G., Shiota, C., Prasad, K., Ji, B., Logsdon, C.D., Gittes, G.K., and Esni, F. (2011) Duct cells contribute to regeneration of endocrine and acinar cells following pancreatic damage in adult mice, *Gastroenterology*, **141**, 1451–1462, doi: 10.1053/j.gastro.2011.07.003.
33. Beer, R.L., Parsons, M.J., and Rovira, M. (2016) Centroacinar cells: at the center of pancreas regeneration, *Dev. Biol.*, **413**, 8–15.
34. Raven, A., Lu, W.Y., Man, T.Y., Ferreira-Gonzalez, S., O'Duibhir, E., Dwyer, B.J., Thomson, J.P., Meehan, R.R., Bogorad, R., Koteliansky, V., Kotelevtsev, Y., French-Constant, C., Boulter, L., and Forbes, S.J. (2017) Cholangiocytes act as facultative liver stem cells during impaired hepatocyte regeneration, *Nature*, **547**, 350–354.
35. Malato, Y., Naqvi, S., Schurmann, N., Ng, R., Wang, B., Zape, J., Kay, M.A., Grimm, D., and Willenbring, H. (2011) Fate tracing of mature hepatocytes in mouse liver homeostasis and regeneration, *J. Clin. Invest.*, **121**, 4850–4860.
36. Discher, D.E., Mooney, D.J., and Zandstra, P.W. (2009) Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells, *Science*, **324**, 1673–1677.
37. Michalopoulos, G.K. (1990) Liver regeneration: molecular mechanisms of growth control, *FASEB J.*, **4**, 176–187.
38. Michalopoulos, G.K., and DeFrances, M.C. (1997) Liver regeneration, *Science*, **276**, 60–66.
39. Ткачук В.А. (1994) Физиология эндокринной системы, *Успехи физиологических наук*, **25**, 47–54.
40. Ткачук В.А. (1987) Роль и место циклических нуклеотидов в нейронэндокринной регуляции клеток и тканей, *Научные доклады высшей школы. Биологические науки*, 5–17.
41. Ткачук В.А., Воротников А.В., Тюрин-Кузьмин П.А. (2017) *Основы молекулярной эндокринологии: рецепция и внутриклеточная сигнализация*, ГЭОТАР-Медиа, Москва.
42. Grigorian, G.Y., Mirzapoyazova, T.Y., Resink, T.J., Danilov, S.M., and Tkachuk, V.A. (1989) Regulation of phosphoinositide turnover in endothelium from human pulmonary artery, aorta and umbilical vein. Antagonistic action on the beta-adrenoceptor coupled adenylate cyclase system, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **21**, Suppl. 1, 119–123.
43. Tkachuk, V.A. (2000) Membrane receptors and intracellular calcium, *Membr. Cell Biol.*, **13**, 263–285.
44. Ткачук В.А., Авакян А.Е. (2003) Молекулярные механизмы сопряжения G-белков с мембранными рецепторами и системами вторичных посредников, *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*, **89**, 1478–1490.
45. Tkachuk, V.A. (1982) Regulation of adenylate cyclase by hormones and guanine nucleotides in normal, desensitized, and resensitized rabbit heart, *Adv. Myocardiol.*, **3**, 305–316.



46. Ткачук В.А. (1989) Развитие десенситизации и гиперчувствительности аденилатциклазной системы сердца под влиянием гормонов, *Кардиология*, **29**, 122–125.
47. Ткачук В.А., Рыбин В.О., Никашин А.В. (1994) Стероидные и тиреоидные гормоны в регуляции G-белков, связывающих мембранные рецепторы с системами вторичных посредников, *Доклады Российской академии медицинских наук*, 7–12.
48. Evans, R.M., and Mangelsdorf, D.J. (2014) Nuclear receptors, RXR, and the big bang, *Cell*, **157**, 255–266.
49. Sysoeva, V.Y., Ageeva, L.V., Tyurin-Kuzmin, P.A., Sharonov, G.V., Dyikanov, D.T., Kalinina, N.I., and Tkachuk, V.A. (2017) Local angiotensin II promotes adipogenic differentiation of human adipose tissue mesenchymal stem cells through type 2 angiotensin receptor, *Stem Cell Res.*, **25**, 115–122.
50. Tyurin-Kuzmin, P.A., Chechekhin, V.I., Ivanova, A.M., Dyikanov, D.T., Sysoeva, V.Y., Kalinina, N.I., and Tkachuk, V.A. (2018) Noradrenaline sensitivity is severely impaired in immortalized adipose-derived mesenchymal stem cell line, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, pii: E3712, doi: 10.3390/ijms19123712.
51. Tyurin-Kuzmin, P.A., Fadeeva, J.I., Kanareikina, M.A., Kalinina, N.I., Sysoeva, V.Y., Dyikanov, D.T., Stambolsky, D.V., and Tkachuk, V.A. (2016) Activation of beta-adrenergic receptors is required for elevated alpha1A-adrenoreceptors expression and signaling in mesenchymal stromal cells, *Sci. Rep.*, **6**, 32835.
52. Tyurin-Kuzmin, P.A., Dyikanov, D.T., Fadeeva, J.I., Sysoeva, V.Y., and Kalinina, N.I. (2018) Flow cytometry analysis of adrenoceptors expression in human adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells, *Sci. Data*, **5**, 180196.
53. Levi-Montalcini, R., and Booker, B. (1960) Excessive growth of the sympathetic ganglia evoked by a protein isolated from mouse salivary glands, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **46**, 373–384.
54. Cohen, S. (1962) Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal, *J. Biol. Chem.*, **237**, 1555–1562.
55. Cohen, S. (2008) Origins of growth factors: NGF and EGF, *J. Biol. Chem.*, **283**, 33793–33797.
56. Lemmon, M.A., and Schlessinger, J. (2010) Cell signaling by receptor tyrosine kinases, *Cell*, **141**, 1117–1134.
57. Hunter, T. (2015) Discovering the first tyrosine kinase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 7877–7882.
58. Clayton, A.H., Walker, F., Orchard, S.G., Henderson, C., Fuchs, D., Röthacker, J., Nice, E.C., and Burgess, A.W. (2005) Ligand-induced dimer-tetramer transition during the activation of the cell surface epidermal growth factor receptor-A multidimensional microscopy analysis, *J. Biol. Chem.*, **280**, 30392–30399.
59. Himanen, J.P., and Nikolov, D.B. (2003) Eph signaling: a structural view, *Trends Neurosci.*, **26**, 46–51.
60. Fambrough, D., McClure, K., Kazlauskas, A., and Lander, E.S. (1999) Diverse signaling pathways activated by growth factor receptors induce broadly overlapping, rather than independent, sets of genes, *Cell*, **97**, 727–741.
61. Katz, M., Amit, I., and Yarden, Y. (2007) Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases, *Biochim. Biophys. Acta*, **1773**, 1161–1176.
62. Goh, L.K., and Sorkin, A. (2013) Endocytosis of receptor tyrosine kinases, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **5**, a017459.
63. Roskoski, R., Jr. (2012) ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation, *Pharmacol. Res.*, **66**, 105–143.
64. Ihle, J.N. (1995) Cytokine receptor signalling, *Nature*, **377**, 591–594.
65. D'Arcangelo, D., Facchiano, F., Barlucchi, L.M., Melillo, G., Illi, B., Testolin, L., Gaetano, C., and Capogrossi, M.C. (2000) Acidosis inhibits endothelial cell apoptosis and function and induces basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor expression, *Circ. Res.*, **86**, 312–318.
66. Green, J., and Maor, G. (2000) Effect of metabolic acidosis on the growth hormone/IGF-I endocrine axis in skeletal growth centers, *Kidney Int.*, **57**, 2258–2267.
67. Conway, K., Price, P., Harding, K.G., and Jiang, W.G. (2006) The molecular and clinical impact of hepatocyte growth factor, its receptor, activators, and inhibitors in wound healing, *Wound Repair Regen.*, **14**, 2–10.
68. Satoh, A., and Makanae, A. (2014) Conservation of position-specific gene expression in axolotl limb skin, *Zool. Sci.*, **31**, 6–13.
69. Makarevich, P.I., Dergilev, K.V., Tsokolaeva, Z.I., Boldyreva, M.A., Shevchenko, E.K., Gluhanyuk, E.V., Gallinger, J.O., Menshikov, M.Y., and Parfyonova, Y.V. (2018) Angiogenic and pleiotropic effects of VEGF165 and HGF combined gene therapy in a rat model of myocardial infarction, *PLoS One*, **13**, e0197566.
70. Rokas, A. (2008) The molecular origins of multicellular transitions, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **18**, 472–478.
71. King, N. (2004) The unicellular ancestry of animal development, *Dev. Cell*, **7**, 313–325.
72. King, N., and Carroll, S.B. (2001) A receptor tyrosine kinase from choanoflagellates: molecular insights into early animal evolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 15032–15037.
73. Pincus, D., Letunic, I., Bork, P., and Lim, W.A. (2008) Evolution of the phospho-tyrosine signaling machinery in premetazoan lineages, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 9680–9684.
74. Manning, G., Young, S.L., Miller, W.T., and Zhai, Y. (2008) The protist, *Monosiga brevicollis*, has a tyrosine kinase signaling network more elaborate and diverse than found in any known metazoan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 9674–9679.
75. Mummery, C.L., van den Eijnden-van Raaij, A.J., Feijen, A., Freund, E., Hulskotte, E., Schoorlemmer, J., and Kruijer, W. (1990) Expression of growth factors during the differentiation of embryonic stem cells in monolayer, *Dev. Biol.*, **142**, 406–413.
76. Shilo, B.Z. (2005) Regulating the dynamics of EGF receptor signaling in space and time, *Development*, **132**, 4017–4027.
77. Piotrowska-Nitsche, K., Perea-Gomez, A., Haraguchi, S., and Zernicka-Goetz, M. (2005) Four-cell stage mouse blastomeres have different developmental properties, *Development*, **132**, 479–490.
78. Zdravkovic, T., Nazor, K.L., Larocque, N., Gormley, M., Donne, M., Hunkapillar, N., Giritharan, G., Bernstein, H.S., Wei, G., Hebrok, M., Zeng, X., Genbacev, O., Mattis, A., McMaster, M.T., Krtolica, A., Valbuena, D., Simon, C., Laurent, L.C., Loring, J.F., and Fisher, S.J. (2015) Human stem cells from single blastomeres reveal pathways of embryonic or trophoblast fate specification, *Development*, **142**, 4010–4025.
79. Manca, A., Capsoni, S., Di Luzio, A., Vignone, D., Malerba, F., Paoletti, F., Brandi, R., Arisi, I., Cattaneo, A., and Levi-Montalcini, R. (2012) Nerve growth factor regulates axial rotation during early stages of chick embryo development, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 2009–2014.
80. Ud-Din, S., Volk, S.W., and Bayat, A. (2014) Regenerative healing, scar-free healing and scar formation across the species: current concepts and future perspectives, *Exp. Dermatol.*, **23**, 615–619.
81. Bielefeld, K.A., Amini-Nik, S., and Alman, B.A. (2013) Cutaneous wound healing: recruiting developmental pathways for regeneration, *Cell. Mol. Life Sci.*, **70**, 2059–2081.

82. Kalinina, N.I., Sysoeva, V.Y., Rubina, K.A., Parfenova, Y.V., and Tkachuk, V.A. (2011) Mesenchymal stem cells in tissue growth and repair, *Acta Naturae*, **3**, 30–37.
83. Takeo, M., Lee, W., and Ito, M. (2015) Wound healing and skin regeneration, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, **5**, a023267.
84. Makanae, A., Mitogawa, K., and Satoh, A. (2016) Cooperative inputs of Bmp and Fgf signaling induce tail regeneration in urodele amphibians, *Dev. Biol.*, **410**, 45–55.
85. Makanae, A., Hirata, A., Honjo, Y., Mitogawa, K., and Satoh, A. (2013) Nerve independent limb induction in axolotls, *Dev. Biol.*, **381**, 213–226.
86. Makanae, A., Mitogawa, K., and Satoh, A. (2014) Implication of two different regeneration systems in limb regeneration, *Regeneration (Oxf)*, **1**, 1–9.
87. Yu, L., Dawson, L.A., Yan, M., Zimmel, K., Lin, Y.L., Dolan, C.P., Han, M., and Muneoka, K. (2019) BMP9 stimulates joint regeneration at digit amputation wounds in mice, *Nat. Commun.*, **10**, 424.
88. Barrientos, S., Brem, H., Stojadinovic, O., and Tomic-Canic, M. (2014) Clinical application of growth factors and cytokines in wound healing, *Wound Repair Regen.*, **22**, 569–578.
89. Friedmann, T., and Roblin, R. (1972) Gene therapy for human genetic disease? *Science*, **175**, 949–955.
90. Makarevich, P.I., and Parfyonova, Ye.V. (2017) Therapeutic angiogenesis: foundations and practical application, in *Physiologic and Pathologic Angiogenesis – Signaling Mechanisms and Targeted Therapy*, Intech Open, London, pp. 343–364.
91. Boldyreva, M.A., Bondar, I.V., Stafeev, I.S., Makarevich, P.I., Beloglazova, I.B., Zubkova, E.S., Shevchenko, E.K., Molokotina, Y.D., Karagyaur, M.N., Ratner, E.I., and Parfyonova, Y.V. (2018) Plasmid-based gene therapy with hepatocyte growth factor stimulates peripheral nerve regeneration after traumatic injury, *Biomed. Pharmacother.*, **101**, 682–690.
92. Макаревич П.И., Рубкина К.А., Дыйканов Д.Т., Ткачук В.А., Парфенова Е.В. (2015) Терапевтический ангиогенез с применением факторов роста: современное состояние и перспективы развития, *Кардиология*, **55**, 59–71.
93. Karagyaur, M., Dyikanov, D., Makarevich, P., Semina, E., Stambolsky, D., Plekhanova, O., Kalinina, N., and Tkachuk, V. (2015) Non-viral transfer of BDNF and uPA stimulates peripheral nerve regeneration, *Biomed. Pharmacother.*, **74**, 63–70.
94. Makarevich, P., Tsokolaeva, Z., Shevelev, A., Rybalkin, I., Shevchenko, E., Beloglazova, I., Vlasik, T., Tkachuk, V., and Parfyonova, Y. (2012) Combined transfer of human VEGF165 and HGF genes renders potent angiogenic effect in ischemic skeletal muscle, *PLoS One*, **7**, e38776.
95. Shyu, K.G., Chang, H., and Isner, J.M. (2003) Synergistic effect of angiopoietin-1 and vascular endothelial growth factor on neoangiogenesis in hypercholesterolemic rabbit model with acute hindlimb ischemia, *Life Sci.*, **73**, 563–579.
96. Слободкина Е.А., Макаревич П.И., Долинкин А.О. (2018) Разработка генотерапевтических лекарственных препаратов, *Биофармацевтический журнал*, **10**, 3–14.
97. Badat, M., and Davies, J. (2017) Gene therapy in a patient with sickle cell disease, *N. Engl. J. Med.*, **376**, 2093–2094.
98. Rangarajan, S., Walsh, L., Lester, W., Perry, D., Madan, B., Laffan, M., Yu, H., Vettermann, C., Pierce, G.F., Wong, W.Y., and Pasi, K.J. (2017) AAV5-Factor VIII gene transfer in severe hemophilia A, *N. Engl. J. Med.*, **377**, 2519–2530.
99. Dunbar, C.E., High, K.A., Joung, J.K., Kohn, D.B., Ozawa, K., and Sadelain, M. (2018) Gene therapy comes of age, *Science*, **359**, pii: eaan4672, doi: 10.1126/science.aan4672.
100. Savukinas, U.B., Enes, S.R., Sjolund, A.A., and Westergren-Thorsson, G. (2016) Concise review: the bystander effect: mesenchymal stem cell-mediated lung repair, *Stem Cells*, **34**, 1437–1444.
101. Kalinina, N., Kharlampieva, D., Loguinova, M., Butenko, I., Pobeguts, O., Efimenko, A., Ageeva, L., Sharonov, G., Ischenko, D., Alekseev, D., Grigorieva, O., Sysoeva, V., Rubina, K., Lazarev, V., and Govorun, V. (2015) Characterization of secretomes provides evidence for adipose-derived mesenchymal stromal cells subtypes, *Stem Cell Res. Ther.*, **6**, 221.
102. Rolandsson Enes, S., Ahrman, E., Palani, A., Hallgren, O., Bjermer, L., Malmstrom, A., Scheduling, S., Malmstrom, J., and Westergren-Thorsson, G. (2017) Quantitative proteomic characterization of lung-MSC and bone marrow-MSC using DIA-mass spectrometry, *Sci. Rep.*, **7**, 9316.
103. Kim, H.S., Choi, D.Y., Yun, S.J., Choi, S.M., Kang, J.W., Jung, J.W., Hwang, D., Kim, K.P., and Kim, D.W. (2012) Proteomic analysis of microvesicles derived from human mesenchymal stem cells, *J. Proteome Res.*, **11**, 839–849.
104. Sagaradze, G., Grigorieva, O., Nimiritsky, P., Basalova, N., Kalinina, N., Akopyan, Z., and Efimenko, A. (2019) Conditioned medium from human mesenchymal stromal cells: towards the clinical translation, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, pii: E1656, doi: 10.3390/ijms20071656.
105. Phinney, D.G., and Pittenger, M.F. (2017) Concise review: MSC-derived exosomes for cell-free therapy, *Stem Cells*, **35**, 851–858.
106. Bang, O.Y., and Kim, E.H. (2019) Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicle therapy for stroke: challenges and progress, *Front. Neurol.*, **10**, 211.
107. Zubkova, E.S., Beloglazova, I.B., Makarevich, P.I., Boldyreva, M.A., Sukhareva, O.Y., Shestakova, M.V., Dergilev, K.V., Parfyonova, Y.V., and Menshikov, M.Y. (2016) Regulation of adipose tissue stem cells angiogenic potential by tumor necrosis factor-Alpha, *J. Cell. Biochem.*, **117**, 180–196.
108. Efimenko, A., Starostina, E., Kalinina, N., and Stolzing, A. (2011) Angiogenic properties of aged adipose derived mesenchymal stem cells after hypoxic conditioning, *J. Transl. Med.*, **9**, 10.
109. Aleksandrushkina, N.A., Danilova, N.V., Grigorieva, O.A., Mal'kov, P.G., Popov, V.S., Efimenko, A.Y., and Makarevich, P.I. (2019) Cell sheets of mesenchymal stromal cells effectively stimulate healing of deep soft tissue defects, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **167**, 159–163.
110. Baertschiger, R.M., Serre-Beinier, V., Morel, P., Bosco, D., Peyrou, M., Clement, S., Sgroi, A., Kaelin, A., Buhler, L.H., and Gonelle-Gispert, C. (2009) Fibrogenic potential of human multipotent mesenchymal stromal cells in injured liver, *PLoS One*, **4**, e6657.
111. Shi, S., and Gronthos, S. (2003) Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp, *J. Bone Miner. Res.*, **18**, 696–704.
112. Murphy, A.R., Laslett, A., O'Brien, C.M., and Cameron, N.R. (2017) Scaffolds for 3D *in vitro* culture of neural lineage cells, *Acta Biomater.*, **54**, 1–20.
113. Pourquie, O., Al Tanoury, Z., and Chal, J. (2018) The long road to making muscle *in vitro*, *Curr. Top. Dev. Biol.*, **129**, 123–142.
114. Syverud, B.C., VanDusen, K.W., and Larkin, L.M. (2016) Growth factors for skeletal muscle tissue engineering, *Cells Tissues Organs*, **202**, 169–179.
115. Cosson, S., Otte, E.A., Hezaveh, H., and Cooper-White, J.J. (2015) Concise review: tailoring bioengineered scaffolds for stem cell applications in tissue engineering and regenerative medicine, *Stem Cells Transl. Med.*, **4**, 156–164.

116. Lane, S.W., Williams, D.A., and Watt, F.M. (2014) Modulating the stem cell niche for tissue regeneration, *Nat. Biotechnol.*, **32**, 795–803.
117. Efimenko, A.Y., Kohegura, T.N., Akopyan, Z.A., and Parfyonova, Y.V. (2015) Autologous stem cell therapy: how aging and chronic diseases affect stem and progenitor cells, *Biores. Open Access*, **4**, 26–38.
118. Chacon-Martinez, C.A., Koester, J., and Wickstrom, S.A. (2018) Signaling in the stem cell niche: regulating cell fate, function and plasticity, *Development*, **145**.
119. Mohamed, T.M.A., Ang, Y.S., Radzinsky, E., Zhou, P., Huang, Y., Elfenbein, A., Foley, A., Magnitsky, S., and Srivastava, D. (2018) Regulation of cell cycle to stimulate adult cardiomyocyte proliferation and cardiac regeneration, *Cell*, **173**, 104–116, e112.
120. Huang, P., Zhang, L., Gao, Y., He, Z., Yao, D., Wu, Z., Cen, J., Chen, X., Liu, C., Hu, Y., Lai, D., Hu, Z., Chen, L., Zhang, Y., Cheng, X., Ma, X., Pan, G., Wang, X., and Hui, L. (2014) Direct reprogramming of human fibroblasts to functional and expandable hepatocytes, *Cell Stem Cell*, **14**, 370–384.

## BIOCHEMICAL REGULATION OF REGENERATIVE PROCESSES BY GROWTH FACTORS AND CYTOKINES: BASIC MECHANISMS AND RELEVANCE FOR REGENERATIVE MEDICINE\*

### Review

P. I. Makarevich<sup>1,2\*\*</sup>, A. Yu. Efimenko<sup>1,2</sup>, and V. A. Tkachuk<sup>1,2,3\*\*\*</sup>

<sup>1</sup> Lomonosov Moscow State University, Institute for Regenerative Medicine, Medical Research and Education Center, 119991 Moscow, Russia; E-mail: pmakarevich@mc.msu.ru

<sup>2</sup> Lomonosov Moscow State University, Faculty of Fundamental Medicine, 119991 Moscow, Russia

<sup>3</sup> Institute of Experimental Cardiology, National Medical Research Center of Cardiology, 121552 Moscow, Russia

Received June 15, 2019

Revised September 30, 2019

Accepted October 16, 2019

At the end of the 20th century regenerative medicine still uses cultured cells or tissue-engineered structures for transplantation into human body to restore lost or damaged organs. However, at the turn of the century, practical achievements in this field were far from the promising experimental results. It became apparent that successful resolution of practical problems is impossible without understanding fundamental regulation mechanisms of development, renewal and restoration of human tissues. These aspects have been successfully investigated by cell biologists, physiologists, and biochemists working in the field of “regenerative biology”. Their studies revealed that during regeneration, growth factors, cytokines and hormones act beyond regulation of cell individual functions, but activating specific receptor systems, they control key tissue repair processes including cell proliferation and differentiation. These events require numerous coordinated stimuli and therefore are practically irreproducible using single proteins or low molecular weight compounds, i.e., poorly managed using classical pharmacological approaches. This review summarizes current views on regulatory mechanisms of renewal and regeneration in human tissues with emphasis on certain general biological and evolutionary aspects in this area. A special attention is focused on biochemical mechanisms of regulation, in particular, the role of growth factors and cytokines, as well as on mechanisms of their reception. Promising practical approaches for activating regeneration using small molecules or stem cell secretome, which contains a wide repertoire of growth factors, cytokines, peptides, as well as extracellular vesicles, are discussed in a separate section.

**Keywords:** regenerative medicine, stem cell, growth factor, cytokine, intracellular signaling, receptor tyrosine kinase