

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ**

ІРОДОВ Дмитро Михайлович



УДК.576.533+57.084.1+616.411-008.6-092.4:615.361:611.018.1

**ДОСЛІДЖЕННЯ ТЕРАПЕВТИЧНОГО ПОТЕНЦІАЛУ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ
СТОВБУРОВИХ КЛІТИН В УМОВАХ СИНДРОМУ ПОЛІОРГАННОЇ
ДИСФУНКЦІЇ НА ТЛІ ТРИВАЛОГО ТОКСИЧНОГО УРАЖЕННЯ
ОРГАНІЗМУ**

03.00.20 – біотехнологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Київ – 2021

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано у відділі регуляторних механізмів клітини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

Науковий керівник:

доктор біологічних наук, професор,
член-кореспондент НАН України,
академік НАМН України
Кордюм Віталій Арнольдович,
Інститут молекулярної біології і генетики
НАН України, завідувач відділу
регуляторних механізмів клітини.

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, професор,
Курдиш Іван Кирилович,
завідувач відділу мікробіологічних
процесів на твердих поверхнях
Інституту мікробіології і вірусології
ім. Д.К.Заболотного;

доктор біологічних наук, професор,
Мінченко Жанна Миколаївна,
завідувачка лабораторії імуногенетики
відділу гематології та трансплантології,
ДУ «ННЦ радіаційної медицини НАМН
України.

Захист відбудеться 21 грудня 2021 року о 10³⁰ на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.237.01 Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150.

З дисертацією можна ознайомитися у науковій бібліотеці Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150.

Автореферат розіслано «21» листопада 2021 року.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
кандидат біологічних наук, с.н.с.



I.V. Крупська

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Поліорганна дисфункція є найважчим станом, що виникає при неможливості численних захисних і компенсаторних механізмів самостійно забезпечити нормальні фізіологічні функції декількох органів. Синдром поліорганної дисфункції може супроводжувати як важкі стадії хронічних захворювань, так і обширні політравми, опіки і сепсис. Для всіх названих станів притаманна множинна загибель/руйнування клітин та неспроможність захисних систем ліквідувати ураження внаслідок перевантаження або виснаження цих систем. При гострому розвитку численні руйнування клітин призводять до посиленого вивільнення цитокінів запалення, що в свою чергу ініціює посилений синтез антагоністів – протизапальних цитокінів. На тлі масового руйнування клітин починаються цитокінові гойдалки, які призводять до розвитку дистрес-синдрому. В результаті порушена регуляція самостійно не в змозі утримати гомеостаз і вже сама є ініціатором вторинного ураження. При хронічних ураженнях організму відбуваються з одного боку – виснаження механізмів детоксикації, з іншого – знижується реактивність імунної системи і механізмів відновлення.

Одним з перспективних підходів до нормалізації стану вважається використання аlogenних мезенхімальних стовбурових/стромальних клітин (МСК), або аутологічних МСК, які на деякий час були позбавлені впливу ураженого оточення при розмноженні *in vitro*.

Попри наявний доробок у галузі застосування різноманітних МСК з терапевтичною метою, регенеруючий потенціал екзогенних МСК в умовах критичних станів при системному ураженні та виснажених системах детоксикації залишається відкритим.

Розробка підходів виведення організму із стану саморуйнування і переведу його в стан ефективного самовідновлення з використанням екзогенних МСК потребує по-перше визначення принципової можливості такої дії.

Дисертаційне дослідження присвячене актуальній задачі клітинної біології та біотехнології, а саме – визначенню можливості ефективного безпечного використання мезенхімальних стовбурових клітин для досягнення терапевтичного ефекту при синдромі поліорганної дисфункції, що виник в результаті хронічного токсичного ураження організму.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами і темами. Дослідження проведені в рамках науково-дослідних робіт відділу регуляторних механізмів клітини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за темами «Перетворювальний потенціал нативних та модифікованих стовбурових клітин (СК) і його реалізація *in vitro* і *in vivo*» (реєстраційний номер 0112U007302, 2009-2013 р.р.) та «Вивчення сигнальних міжклітинних взаємодій в культурі та організмі мишей» (реєстраційний номер 0112U004218, 2013-2017 р.р.).

Мета і завдання дослідження. Метою даної роботи є дослідження принципової можливості застосування відновлювального потенціалу мезенхімальних стовбурових клітин для отримання терапевтичного ефекту в умовах важкого пошкодження органів.

Відповідно до мети було поставлено такі завдання:

1. Створити і охарактеризувати тваринну модель системного токсичного ураження із експериментальним синдромом поліорганної дисфункції (єСПОД), що відповідає умові мінімального впливу первинного токсичного чинника на трансплантовані клітини.
2. Дослідити наявність терапевтичного ефекту у модельних тварин із єСПОД під впливом трансплантації МСК.
3. Дослідити особливості дії різних за походженням МСК в умовах єСПОД.
4. Дослідити залежність терапевтичного ефекту від дози і кратності застосування трансплантованих клітин.
5. Дослідити можливості впливу трансплантованих МСК на реалізацію схильності до пухлиноутворення у генетично-детермінованих до канцерогенезу модельних тварин.

Об'єкт дослідження – миші у стані системного токсичного ураження з синдромом поліорганної дисфункції, трансплантовані МСК.

Предмет дослідження – особливості впливу трансплантованих МСК тваринам з генетично-детермінованим пухлиноутворенням в стані системного ураження з синдромом поліорганної дисфункції.

Методи дослідження – в роботі використовували біотехнологічні методи (отримання первинних культур, культивування клітин), цитологічні методи (підрахунок кількості клітин, поточна цитофлюориметрія, мікроскопія, фіксація та забарвлення культур специфічними барвниками, методи роботи з дослідними тваринами (ін'єкції, відбір крові, лабораторні дослідження біохімічних показників, гістологічні (приготування та забарвлення зразків).

Наукова новизна одержаних результатів. У результаті проведеної роботи із застосуванням методів клітинної біології та біотехнології вперше було розроблено модель синдрому поліорганної дисфункції, що виникла в результаті тривалого ураження токсичним ксенобіотиком на тваринах із спадковою схильністю до канцерогенезу і вперше показана можливість потенціальної терапевтичної дії трансплантованих мезенхімальних стовбурових клітин при зазначеному стані.

Практичне значення одержаних результатів. Створена та охарактеризована модель може використовуватися при вивченні перебігу системних уражень та пошуку терапевтичних засобів. Отримані дані свідчать про потенціал використання МСК для терапії системних уражень і мають практичну цінність для подальших розробок терапії синдрому поліорганної дисфункції.

Особистий внесок здобувача. Результати досліджень, викладені в дисертації, отримані автором самостійно, або за його безпосередньої участі. Автором проведено планування основних напрямків роботи, аналіз і обговорення результатів із співробітниками, підготовка публікацій за результатами досліджень. Роботи з тваринами та підготовка стовбурових клітин миші були проведені за допомогою співробітниць відділу генетики людини Л.І.Мацевич і Т.А.Рубан, стовбурові клітини з драглів Вартона пуповини людини виділялися та культивувалися спільно з співробітницею відділу регуляторних механізмів клітини Н.В.Шуваловою. Гістологічні препарати було виготовлено у співробітництві з кафедрою гістології та

ембріології Національного медичного університету ім. О.О.Богомольця під керівництвом Ю.Б. Чайковського та за участю А.В. Корсак і А.В. Неверовського.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень доповідались на конгресі World Conference on Regenerative Medicine 2015 Congress Center Leipzig, Germany, October 21-23 2015, а також на наукових семінарах відділу регуляторних механізмів клітини ІМБГ НАН України.

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 8 праць, з яких 5 статей у наукових фахових журналах, тези 2 доповідей у збірниках матеріалів з'їздів та конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається із вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, результатів досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел, який охоплює 103 найменування. Дисертацію викладено на 134 сторінках друкованого тексту та проілюстровано 44 рисунками і 7 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали і методи дослідження

В дослідженні були задіяні ембріональні фібробластоподібні клітини миші (FM) ліній ICR, BALB, FVB-Cg-Tg (GFPU)5Nagy/J і мезенхімальні стовбурові клітини з драглів Вартона людини, які були позитивними за маркерами CD73, CD90, CD105.

Вибір реципієнта для відтворення синдрому поліорганної дисфункції проводили з урахуванням необхідності оцінки потенційної небезпеки індукції чи активації канцерогенезу. В роботі були використані миші лінії ICR із спадковою схильністю до пухлиноутворення. Майже у всіх самок цієї лінії у віці 1 року розвивається гепатокарцинома. В наших дослідах були задіяні самці, у яких в нормальному стані автоіндукції канцерогенезу не спостерігається. Експерименти з тваринами проводили з дотриманням норм біоетики.

Уражуючим чинником для відтворення стану хронічного токсичного ураження був обраний тетрахлорметан (CCl_4) – відомий ксенобіотик, дія якого пов'язана не з ним самим, а із вторинним порушенням проникливості мембран і утворенням небезпечних реакційно-активних продуктів. Тривале навантаження CCl_4 і пов'язані з цим процеси призводять до виснаження систем детоксикації клітин, що в свою чергу послідовно призводить до оксидативного стресу, дисфункції печінки і інших органів.

Для відтворення модельного стану 2-місячним тваринам протягом 12 тижнів 2 рази на тиждень інтраперітонеально проводили ін'єкції 30% розчину CCl_4 на оливковій олії. Через 4 доби після останньої ін'єкції (у мишей CCl_4 метаболізує за добу) тварин рандомно поділяли на експериментальні і контрольну групи. Експериментальним групам трансплантували стовбурові клітини того типу і в тієї кількості, що визначались умовами експерименту. Контрольна група залишалась для спостереження процесів самовідновлення без трансплантації стовбурових клітин. По закінченню терміну дослідження всі тварини виводились з експерименту. Проводилась фіксація об'єктивних параметрів, куди входили макро-

патоморфологічний опис, фіксація ваги органів, визначення активності аланіл- і аспарагін- амінотрансфераз, відносної кількості клітин білої крові, метаболічної активності клітин білої крові, швидкості осадження еритроцитів, а також мікропатоморфологічне дослідження гістологічних препаратів окремих варіантів.

Досліди проводились серіями по 3-5 дослідних варіантів по 5 тварин на кожний. Для забезпечення відтворюваності результатів при плануванні серій враховували необхідність повторення в новій серії одного з варіантів попередньої серії. Для врахування впливу неврахованих факторів результати кожної серії експериментів порівнялись спочатку з контролем тієї ж самої серії.

Загальний аналіз консолідованих із різних серій даних проводили по визначених питомих показниках.

Результати досліджень та їх обговорення

Розробка тваринної експериментальної моделі поліорганної дисфункції та її характеристика. Для створення моделі відновлення системного токсичного ураження із експериментальним синдромом поліорганної дисфункції (еСПОД) була модифікована тваринна модель експериментального фіброзу печінки під впливом CCl_4 . Наша модифікація використовувала більш потужне навантаження ксенобіотиком, більш тривалий термін інтоксикації і використовувала мишей лінії ICR із спадковою схильністю до канцорогенезу.

В ході відпрацювання доз, періодичності і термінів інтоксикації для досягнення необхідного стану були проведена серія експериментів, за результатами яких було встановлено, що необхідний стан організму досягається після 12 тижнів 2 разових на тиждень інтраперітонеальних ін'єкцій 30% розчину CCl_4 у оливковій олії. Початок змін кровообігу спостерігався вже на 8-мому тижні (рис. 1).

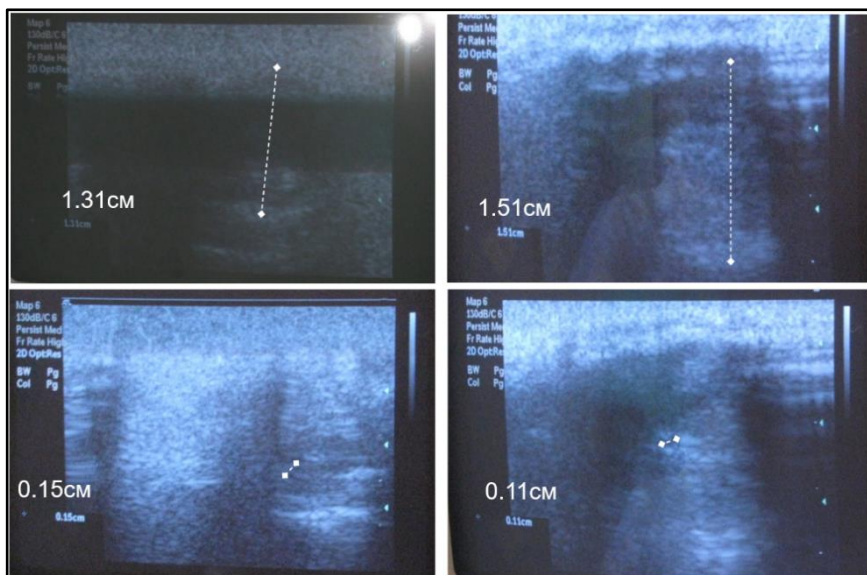
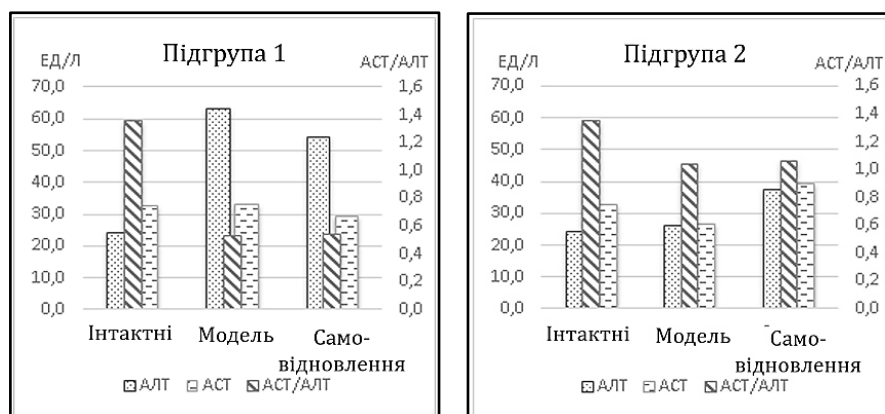


Рис. 1. УЗД печінки: а) розмір печінки та діаметр воротної вени миши, якій протягом 8 тижнів вводили токсин; б) розмір печінки та діаметр воротної вени миши, якій після 8 тижнів припинили вводити токсин (на момент забою 3 тижні, як припинили вводити CCl_4)

Також вже на 8-му тижні лінійні тварини під впливом токсичного ураження поділялись на групи за рівнем реакції на ураження. Для однієї групи однаковий для всіх тварин рівень інтоксикації виявився занадто великим. Вони гинули ще під час

формування модельного стану. Ті, що залишались живі також ділились на групи за реакціями, що теж є особливістю системного ураження (рис 2).

Рис 2 Варіабельність відповіді тварин в рамках одного дослідження за АЛТ/АСТ-тестами. В підгрупі 1 вже тестується домінантне руйнування клітин печінки, в той час в підгрупі 2 воно ще не розпочалося



Гістологічна картина печінки модельних мишей (ін'єкції CCl_4 мишам протягом 12 тижнів) характеризується вираженими змінами загальної структури з наявністю дрібновузлової перебудови тканини і незначними фіброзними змінами строми у вигляді збільшеної кількості колагенових волокон в області портальних трактів. Визначається діскомплектація печінкових балок з наявністю зон альтерації, гепатоцити втрачають полігональну форму, збільшені в розмірі за рахунок набряку. Цитоплазма гепатоцитів незначно просвітлена за рахунок дрібних вакуолей, переважно в центральних ділянках печінкових часточок, що свідчить про помірну вакуольну і жирову дистрофію. Ядра печінкових клітин збільшені за рахунок набряку, виглядають просвітленими, загальна кількість ядер зменшена. Центральні вени, судини тріад розширені, повнокровні, міжбалочні синусоїди нерівномірні з зонами звуження і розширення, є гіперплазія клітин Купфера. Місцями спостерігається виражена дифузна розсіяна сегментоядерна лейкоцитарна інфільтрація паренхіми печінки (рис. 3)

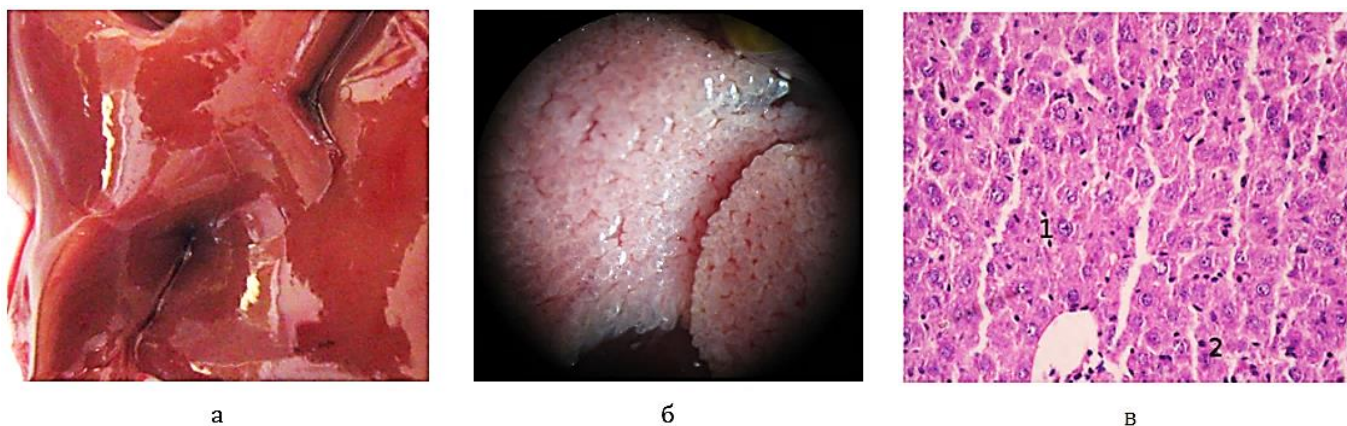


Рис. 3. Патоморфологічні зміни печінки в результаті 12-ти тижневого хронічного ураження CCl_4 (б) в порівнянні із здоровою (а) печінкою. Мікрофотографія патоморфологічного дослідження ураженої печінки. При ураженні спостерігаються альтеративно-дегенеративні зміни; діскомплектація печінкових балок (1); набряк, втрата полігональної форми гепатоцитів. Набряк ядер гепатоцитів (2)

Ураження печінки обумовлюють ураження в легенях, які характеризуються втратою нормальної альвеолярної гістоархітекτονіки з дегенеративними змінами альвеолярних перегородок і бронхіол. Спостерігається спадання альвеол із зменшенням їх просвіту, міжальвеолярні септи потовщуються за рахунок клітинної інфільтрації і склерозу (рис. 4). Альвеолоцити I і II типу чітко не диференціюються. Епітелій термінальних бронхіол дезорганізований, місцями з розривами, клітини Клара неправильної форми, кількість їх зменшено. Просвіт термінальних бронхіол скорочений. Визначаються осередки агрегації фібробластів з підвищеним колагеноутворенням. Кровонаповнення судин нерівномірне, в просвіті кровоносних судин спостерігаються агрегати формених елементів крові. Визначається розсіяна сегментоядерна лейкоцитарна інфільтрація.

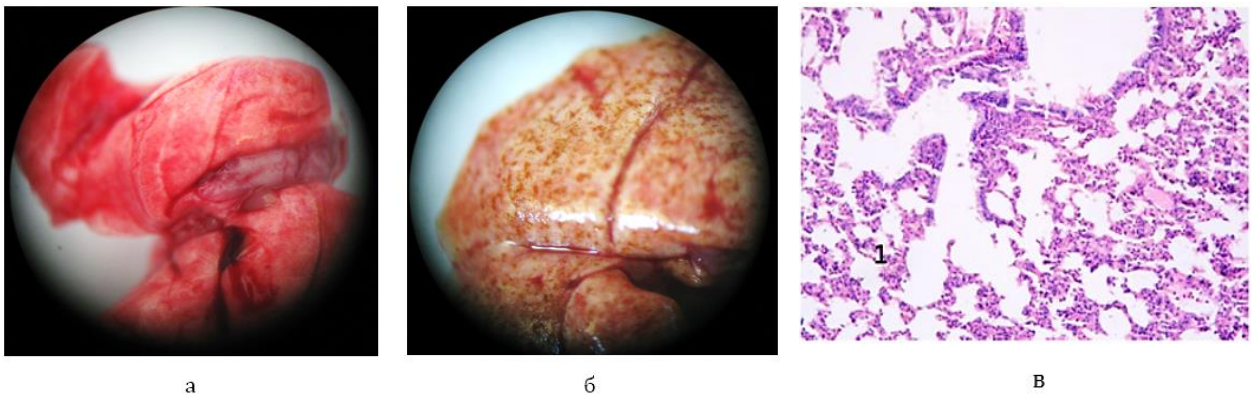


Рис.4. Патоморфологічні зміни легень в результаті 12-ти тижневого хронічного ураження CCl_4 (б) в порівнянні із здоровими (а) легеньми. Мікрофотографія патоморфологічного дослідження уражених легень. Альтеративно-дегенеративні зміни. Втрата нормальної альвеолярної гістоархітектоніки з дегенеративними змінами альвеолярних перегородок і бронхіол. Спадання альвеол із зменшенням їх просвіту (1)

Морфологічна картина селезінки цієї групи тварин свідчить про наявність ознак атрофії. У наявності порушення нормальних співвідношень червоної і білої пульпи у сторону зменшення кількості білої. Фолікули зменшені в розмірах, в них є незначні ділянки фіброзу. Відсутня чітка диференціація між зонами фолікула, лімфатичні вузлики виглядають просвітленими за рахунок зменшення клітинних елементів (рис.5).

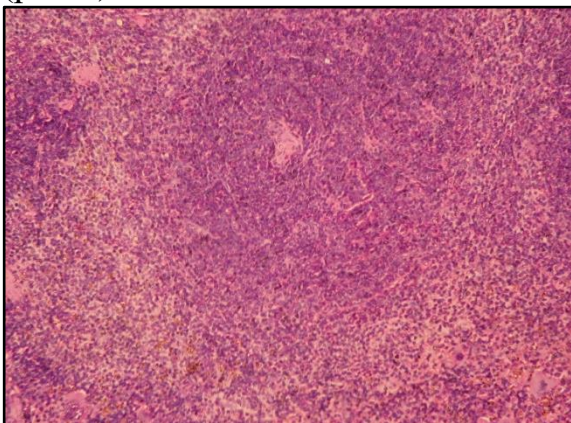


Рис.5. Патоморфологічні зміни селезінки в результаті 12-ти тижневого хронічного ураження CCl_4 Червона пульпа, яка заповнює простір між трабекулами має ознаки фіброзу у вигляді поширення сполучної тканини. Порушено співвідношення червоної і білої пульпи в бік зменшення білої пульпи. Фолікули зморщені. Кількість клітинних елементів знижена

При самовідновленні протягом 2-3 тижнів спостерігається подальший розвиток

руйнування гепатоцитів в печінці з руйнуванням балочної структури. Посилюються запальні процеси, Збільшується кількість лімфоцитів та зменшується (за МТТ-тестом) їх фізіологічна активність (рис.6).

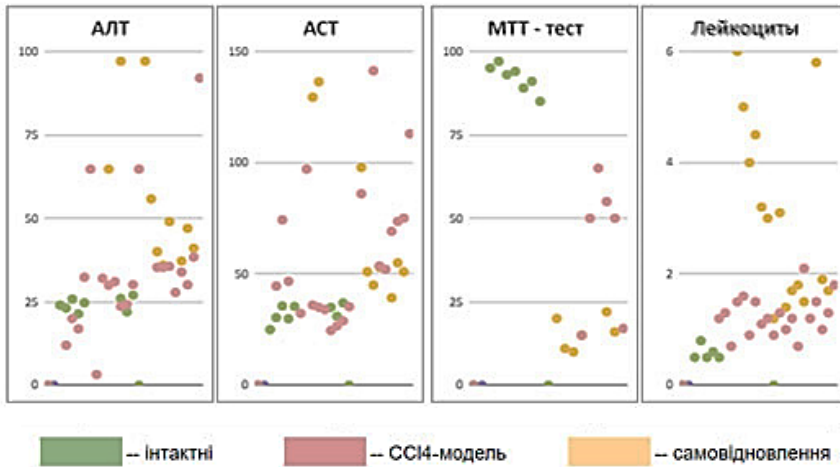
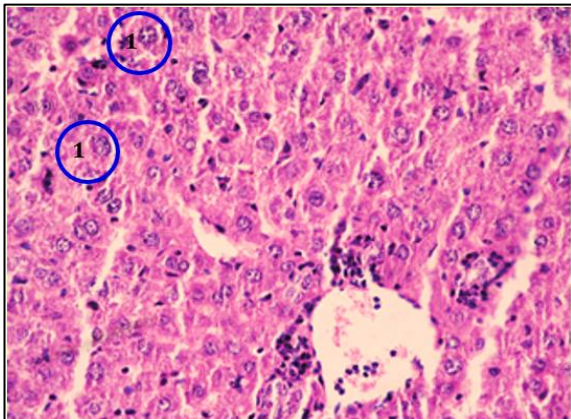


Рис.6. Діаграма розподілу контрольованих параметрів для консолідованих груп здорових мишей (зелений), мишей із еСПОД через 3-4 доби після закінчення навантаження на момент закінчення CCl₄ (рожевий) і груп самовідновлення протягом 3-4 тижнів після закінчення навантаження CCl₄ (жовтий)

Тут і далі по осі X для зручності візуалізації рознесені окремі тварини, по осі Y – відкладені відповідні одиниці виміру. Кожна відмітка на діаграмі відповідає показнику однієї тварини.

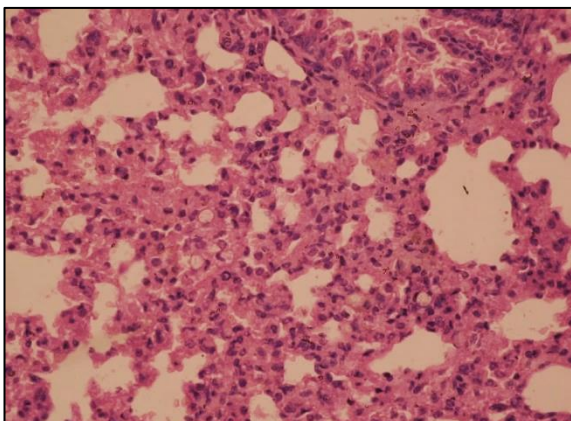
Ядра клітин печінки збільшуються за рахунок набряків, виглядають просвітленими (див помітку на рис 7), загальна кількість ядерць зменшується. Центральні вени, судини тріад розширені, повнокровні. Міжбалочні пазухи нерівномірні із зонами звуження і розширення.



Спостерігається гіперплазія клітин Купфера. Наявна виражена дифузна розсіяна сегментована лейкоцитарна інфільтрація паренхіми печінки.

Рис.7. Мікрофотографія печінки миші після 3-х тижнів самовідновлення після ураження CCl₄ Фарбування гематоксилін-еозин. x400

При 3 тижневому самовідновленні альтеративні зміни в легенях посилюються. (рис.8). Термінальні бронхіоли, альвеолярні ходи і мішечки втрачають чітку диференціацію. Просвіт альвеол, які проявляються, в основному звужений за рахунок спадання або інфільтрації стінок.



Міжальвеолярні перегородки потовщені за рахунок збільшення клітинних елементів, волокнистих структур (фіброзу) і набряку, кількість капілярів зменшена.

Рис.8. Мікрофотографія легенів миші після 3-х тижнів самовідновлення після ураження CCl₄ Фарбування гематоксилін-еозин. x400

В бронхах малого і середнього діаметру виявлені зміни епітеліальних пластинок і потовщення стінок. Епітелій дезорганізований. Стінка таких бронхів виглядає більше потовщеною за рахунок фіброзних змін і лейкоцитарної інфільтрації.

Таким чином шляхом систематичного введення мишам лінії ICR CCl_4 у дозі 30% розчину очищеного CCl_4 на оливковій олії з розрахунку 1,5 мкл на грам ваги тварини, два рази на тиждень, інтраперітонеально протягом 12 тижнів відтворюється стан системного ураження із синдромом поліорганної дисфункції. При зазначеному стані у близько 20% мишей розвивались видимі новоутворення.

Дослідження наявності терапевтичного ефекту після трансплантації МСК в умовах хронічного токсичного ураження організму із еСПОД. Для з'ясування можливості реалізації терапевтичного потенціалу трансплантованих МСК за умов еСПОД при виснажених системах детоксикації було поставлено ряд експериментів із застосуванням МСК різного походження, доз і тривалістю післядії. Схема експериментів описана в розділі матеріали і методи. В загальному виді через 3-4 доби після закінчення навантаження тварин CCl_4 , коли був досягнутий потрібний рівень патології, тваринам інтраперітонеально або у хвостову вену трансплантували МСК. Через певний час (від 3 до 10 тижнів в залежності від мети досліджу) тварин виводили з експерименту і фіксували показники крові і патоморфологічний стан печінки, селезінки, легенів, нирки і серця. В окремих випадках проводили гістологічний аналіз.

За критерієм виживаності експериментальних груп в порівнянні з групою самовідновлення, який оцінювався в рамках кожного окремого експерименту в більшості дослідів ми спостерігали позитивний результат (табл. 1).

Патоморфологічний аналіз гістологічних змін в печінці, (першого органу у ланцюгу взаємозалежного саморуйнування) показав, що трансплантація МСК призводить до часткового відновлення її гістоархітектоніки (рис. 9), а підвищення загальної виживаності опосередковано свідчить про часткове функціональне відновлення.

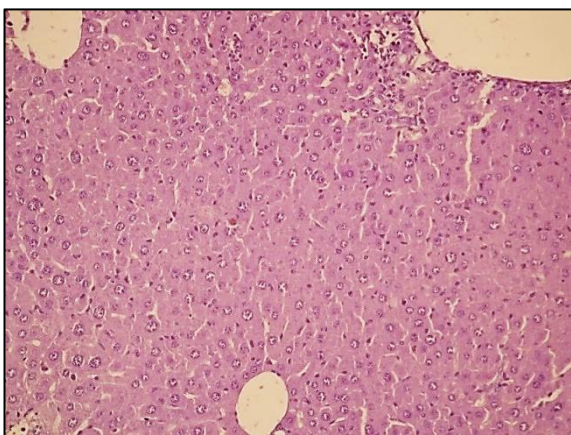


Рис 9 Мікрофотографія печінки миші з еСПОД через 3 тижні після трансплантації 10^5 МСК з драглів Вартона пуповини людини. Забарвлення гематоксиліном і еозином, x 200.

Стан стінок центральних вен у нормі. Балочно-радіальна будова печінкових часточок збережена і чітко простежується. Спостерігається утворення несправжніх часточок. Портальні тракти не розширені, без ознак склерозу та запалення. У стромі органу осередкова помірна лімфогістоцитарна інфільтрація з одиничними лімфоцитами. Спостерігається наявність ділянки тканини печінки з вираженим відкладенням гомогенної аморфної блідо-рожевої речовини між

печінковими балками. Схожа картина спостерігається після трансплантації алогенних стовбурових клітин миші (рис.10).

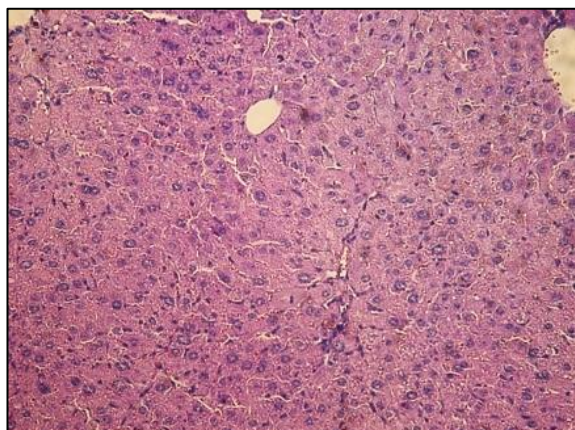


Рис.10 Мікрофотографія печінки миші з еСПОД через 3 тижні після трансплантації 10^5 FM. Забарвлення гематоксилином і еозином, x 200

Стан стінок центральних вен у нормі. Візуалізується розширення просторів Дісе. Балочно-радіальна будова печінкових часточок частково стерта. Незначно розростається сполучна тканина. Утворюються хибні часточки. Гепатоцити з ознаками зернистої дистрофії. Візуалізується помірна кількість двоядерних гепатоцитів.

Таблиця 1

Вживаність тварин тварин з еСПОД окремих експериментів.

Досліди	Шифр групи	Тривалість, тижні	загинуло /загальна кількість	% тварин, що вижили	Питомий коефіцієнт виживаності
Дослід 11	Формування еСПОД	12	5/26	81	
11	самовідновлення 9 тиж	9	3/5	40	1*
11	FM 10 тис	7	2/5	60	1,5
11	FM 100 тис	7	1/5	80	2
Дослід 016	Формування еСПОД	12	11/30	63	
13 (16)	самовідновлення 4 нед	4	2/5	60	1
13 (16)	FM 100 тис 1 раз	4	2/5	60	1
13 (16)	FM 100 тис 3 рази	4	0/5	100	1,7
13 (16)	МСК 100 тис 1 раз	4	2/5	60	1
Дослід 14/19	Формування еСПОД	12	7/28	75	
14	самовідновлення 5 нед	5	2/5	60	1,0
14	FM 100 тис 1 раз	5	2/5	60	1,0
14	FM 100 тис 3 рази	5	0/5	100	1,7
Дослід 15	Формування еСПОД	12	3/20	85	
15	самовідновлення 5 нед	5	5/7	29	1
15	МСК 100 тис 1 раз	5	0/5	100	3,5
15	МСК 100 тис 3 рази	5	0/5	100	3,5

*Примітка.*Коефіцієнт виживаності обрахований по відношенню до варіанту самовідновлення кожного дослідю окремо.*

У більшості тварин кількість лімфоцитів має тенденцію до нормалізації, хоча і залишається підвищеною. При цьому значно збільшується кількість фізіологічно

активних клітин імунної системи (МТТ-тест). Спостерігається тенденція до зниження рівня апоптичних явищ гепатоцитів і кардіоміоцитів (АЛТ і АСТ) (рис. 11).

Встановлено, що МСК не втрачають свого відновлювального потенціалу за умов оксидативного стресу і виснаження механізмів детоксикації клітин, після виникнення стану еСПОД. Гістологічна картина змін показує наявність позитивної тенденції, яка може бути оптимізована за умов вибору параметрів системи реципієнт-трансплантовані клітини.

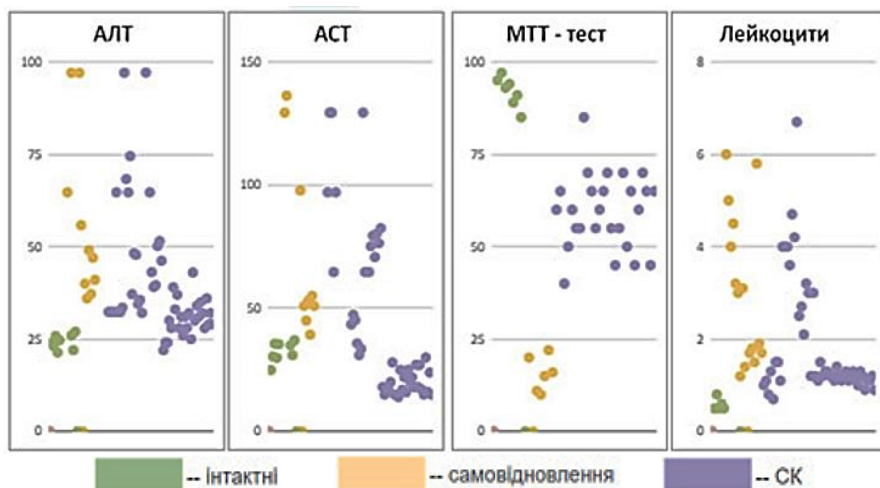


Рис.11. Діаграма розподілу контрольованих параметрів для консолідованих груп здорових мишей (зелений), груп самовідновлення протягом 2-4 тижнів після закінчення навантаження CCl_4 (жовтий) і груп із застосуванням різних МСК (фіолетовий) за умови одноразової трансплантації.

Дослідження особливостей дії різних за походженням МСК в умовах еСПОД.

В ході досліджень було відзначено вагому роль якості призначених для трансплантації МСК. Попри суворого дотримання уніфікованого протоколу отримання МСК, на якість клітин впливає фізіологічний стан донора. Так в одному експерименті був отриманий несподіваний результат, який більш не повторювався: через 3 тижні після ін'єкцій ембріональних фібробластоподібних клітин миші, незалежно від концентрації, 33% тварин загинули, в той час як при контролі виживаність становила 100% (таблиця 2).

Таблиця 2.

Вплив МСК різних донорів на виживаність тварин з еСПОД.

Досліди	Шифр групи	Трива лість, тижні	загинуло /загальна кількість	% тварин, що вижили	Питомий коефіцієнт вижива- ності.
Дослід 11-3	Формування еСПОД	12	3/18	83	
11	самовідновлення 3 тижні	2	0/5	100	1
11	FM 10 тис	3	2/6	67	0,7
11	FM 100 тис	3	2/6	67	0,7
Дослід 11-9	Формування еСПОД	12	5/26	81	
11	самовідновлення 9 тижнів	9	3/5	40	1
11	FM 10 тис	7	2/5	60	1,5
11	FM 100 тис	7	1/5	80	2

Однією з відмінностей цих досліджень були саме різні донори МСК. Отриманий результат свідчить, що в залежності від якості МСК ефект їх використання може змінитись на протилежний. Цей факт ще раз підтверджує необхідність стандартизації терапевтичних МСК саме за фізіологічними критеріями.

Відмінності, пов'язані із ступенем спорідненості трансплантованих МСК з реципієнтом. МСК людини значно знижали рівень АЛТ у крові к бму тижню після їх трансплантації в умовах експерименту, на відміну від тієї ж кількості стовбурових клітин миші (рис.12).

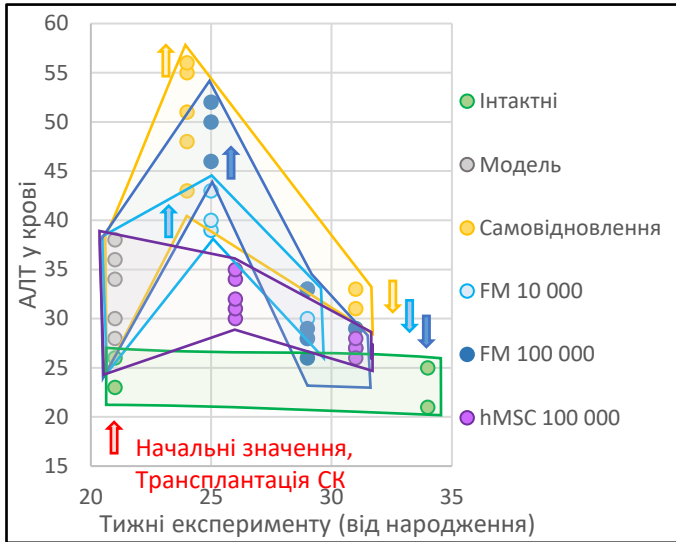


Рис.12 Оцінка динаміки змін АЛТ в крові мишей протягом 3-9 тижнів після трансплантації аlogenних (FM) ембріональних фібробластоподібних мезенхімальних клітин миші і ксеногенних (hMSC) стовбурових клітин з драглів Вартона пуповини людини в різних концентраціях

Можливості впливу трансплантованих МСК на реалізацію схильності до пухлиноутворення у гене-тично-детермінованих до канцерогенезу модельних тварин. Як вже було зазначено, в результаті тривалого ураження CCl_4 у 22% тварин при макроскопічному дослідженні фіксувались новоутворення. Після трансплантації аlogenних МСК цей показник дещо збільшувався. При трансплантації ксеногенних МСК людини цей показник значно зменшувався до 9% з достовірністю 0,95 (рис. 13)

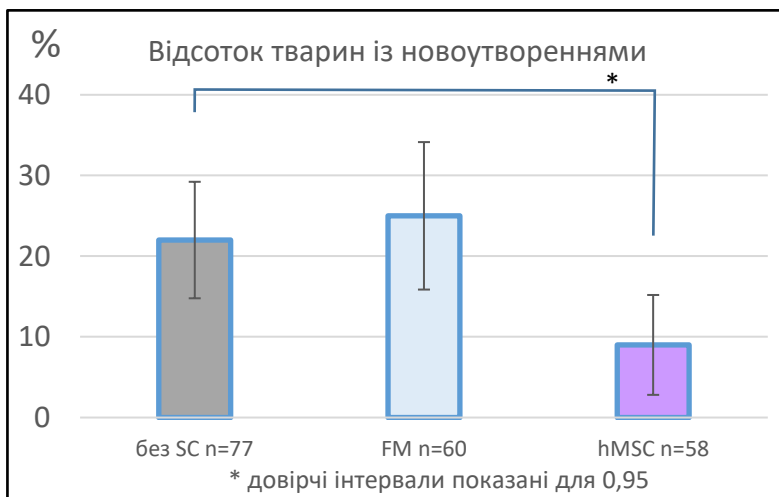


Рис.13. Відмінності індексу видимих новоутворень у тварин з ураженням CCl_4 в залежності від типу трансплантованих клітин. Скорочення на діаграмі: без SC – без трансплантації стовбурових клітин; FM – трансплантація фібробластоподібних стовбурових клітин миші; hMSC – трансплантація стовбурових клітин з драглів Вартона пуповини людини.

В даному випадку дизайн дослідження дозволяє лише зазначити факт супресії розвитку новоутворень. Ксеногенні стовбурові клітини мають досить відмінностей

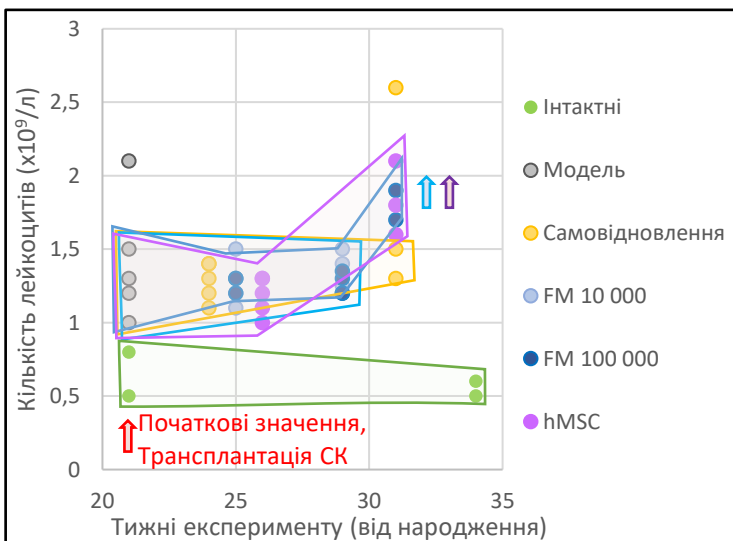
структурних і маркерних білків, які можуть активувати імунну відповідь, паралельно активуючи протипухлинну активність імунітету.

Дослідження залежності терапевтичного ефекту від дози і кратності застосування трансплантованих клітин. Для визначення ефективної дози трансплантованих клітин основною дозою рахували таку, яка відповідала відомим на той час клінічним випробуванням МСК при монопатологіях людини. Вона становила 10^5 клітин на мишу вагою 30 г. Для зменшення кількості трансплантованих клітин використовували дозу в 10 разів меншу – 10^4 клітин на мишу. Для збільшення трансплантованих клітин використали потрійну трансплантацію клітин в дозі 10^5 клітин на мишу з інтервалом 7 діб між трансплантаціями.

Дослідження динаміки змін кількості лейкоцитів у крові протягом періоду відновлення встановило, що для концентрації 10^5 незалежно від спорідненості МСК (тобто алогенні чи ксеногенні) к 9-му тижню відбувалося їх збільшення, що свідчить про активацію імунної системи. Для зменшеної дози в 10^4 клітин на мишу та варіанту

самовідновлення в основному кількість лейкоцитів залишалася на рівні сформованої моделі еСПОД (рис. 14).

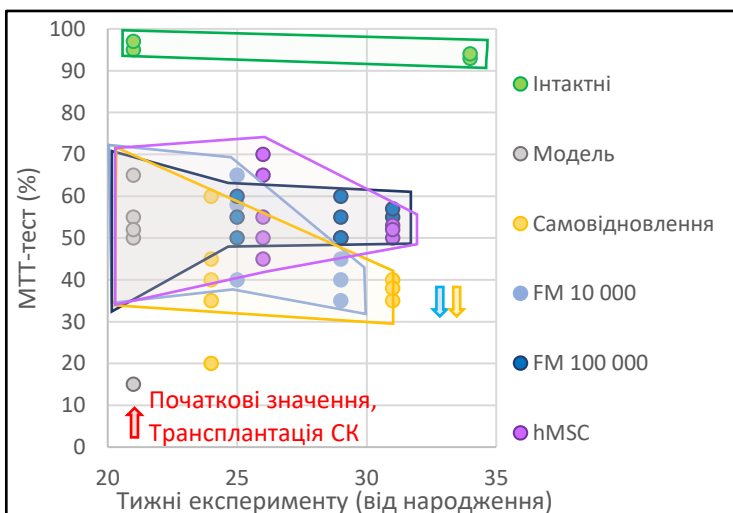
Рис.14 Динаміка змін кількості лейкоцитів в крові мишей протягом 3-9 тижнів після трансплантації алогенних (FM) ембріональних фібробластоподібних мезенхімальних клітин миші і ксеногенних (hMSC) стовбурових клітин з драглів Вартона пуповини людини в різних концентраціях.



У випадках відсутності стовбурових клітин або недостатньої їх концентрації до 9-ої тижня метаболічна активність клітин імунної системи починає згасати, що

свідчить про пригнічення статусу імунної системи (рис 15).

Рис.15 Динаміка змін фізіологічної активності клітин білої крові (МТТ-тест) протягом 3-9 тижнів після трансплантації алогенних (FM) ембріональних фібробластоподібних мезенхімальних клітин миші і ксеногенних (hMSC) стовбурових клітин з драглів Вартона пуповини людини в різних концентраціях.



Оскільки в більшості експериментів показники крові вимірювались тільки одноразово після виведення тварини з експерименту, було важливо отримати підтвердження змін, які відбуваються у тієї ж тварини. Для цього ми поставили окремий експеримент, в якому взяли кров у мишей на початок і наприкінці досліду. Отримані результати підтвердили тенденції, що спостерігались, в інших експериментах. Важливими показниками припинення руйнування і початку відновлення служили активність АЛТ в крові і частка метаболічно-активних клітин білої крові, що вказує на відновлення потенціалу імунної системи. В обох випадках спостерігалась тенденція до нормалізації (рис 16). Отримані дані підтвердили і дозозалежний ефект і відмінності дії ксеногенних і алогенних клітин, а саме: збільшення частки метаболічно-активних клітин імунної системи під впливом стовбурових клітин залежало не тільки від кратності трансплантації клітин, але і від спорідненості МСК до реципієнту (алогенні чи ксеногенні). Трансплантація ксеногенних МСК з пуповини людини викликало той же ефект, що і триразова трансплантація алогенних ембріональних клітин миші (рис. 17).

Рис.16 Динаміка змін активності АЛТ у крові. Кожна лінія відповідає окремій тварині і показує зміну показника через 4 тижні після першої ін'єкції. Негативний нахил лінії відповідає зниженню рівня активності АЛТ в крові. Кут нахилу вказує на швидкість зміни показників

Примітка: Лінії розташовані в три стовпчика для полегшення візуалізації, аби уникнути значного перекривання.

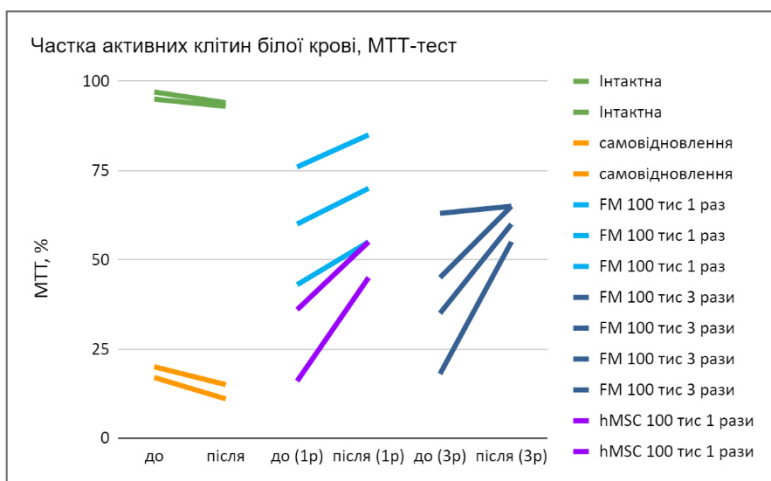
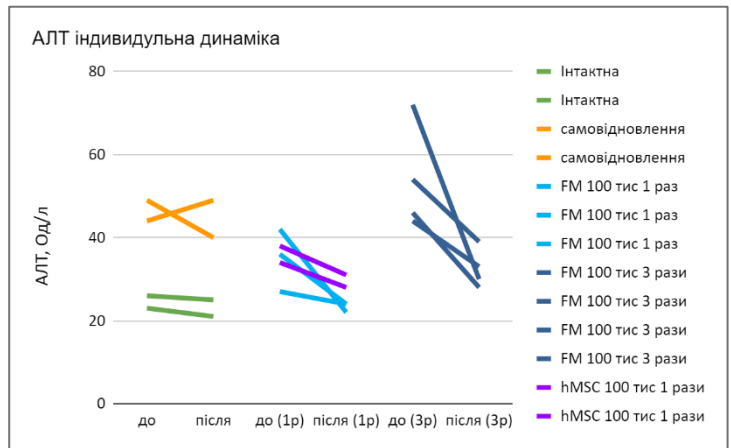


Рис.17 Тенденції змін метаболічної активності білих клітин крові окремих тварин різних експериментальних груп, за МТТ-тестом. Кожна лінія відповідає окремій тварині і показує зміну показника через 4 тижні після першої ін'єкції. Позитивний нахил лінії свідчить про збільшення частки фізіологічно активних клітин

Загалом, для цієї моделі еСПОД незалежно від спорідненості МСК (алогенні чи ксеногенні) спостерігається покращення терапевтичного ефекту при застосуванні трьохразового повторення трансплантації МСК (таблиця 1).

У разі потрібної трансплантації клітин з інтервалом в 7 днів нормалізація стану стає більш помітною практично за всіма показниками (рис.18). Тобто для отримання більш вираженого ефекту треба збільшувати кількість трансплантованих МСК.

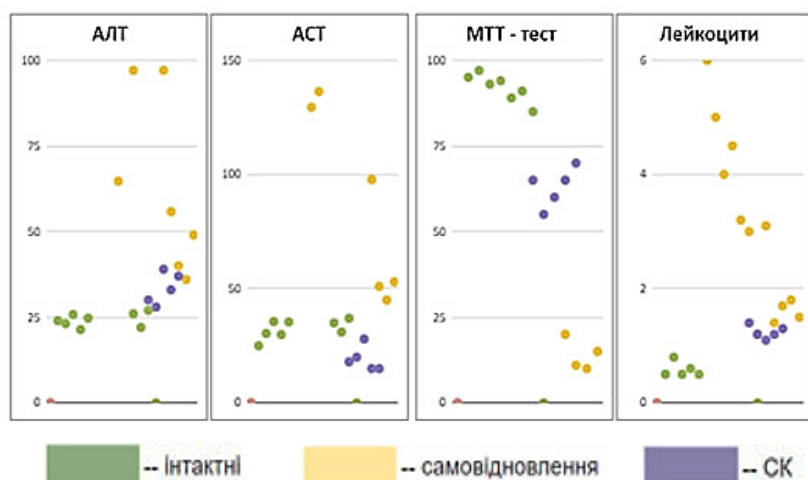


Рис.18. *Діаграма розподілу контрольованих параметрів для консолідованих груп здорових мишей (зелений), груп самовідновлення протягом 2-4 тижнів після закінчення навантаження CCl_4 (жовтий) і груп із застосуванням різних МСК (фіолетовий) за умови трикратної трансплантації. За всіма показниками варіанти із трикратною трансплантацією СК прямують до нормалізації*

Гістологічна картина печінки миші з моделлю системних уражень через 3 тижні після інтраперитонеальної трансплантації 10^4 FM характеризується менш вираженими змінами в порівнянні з тваринами групи самовідновлення: загальна будова зберігається, тенденції до утворення вузлів (хибних часточек) не спостерігаються. Печінкові балки збережені, некротичні і альтеративні зони практично не визначаються. Гепатоцити полігональної форми, цитоплазма оксифільна, з одним або двома ядрами з декількома ядришками. Спостерігаються розширення і повнокровність центральних вен і судин печінкових триад, але

розширення синусоїдальних капілярів не спостерігається, клітини Купфера присутні в помірних кількостях. Спостерігається незначна лейкоцитарна інфільтрація паренхіми печінки переважно навколо центральних вен (рис. 19).

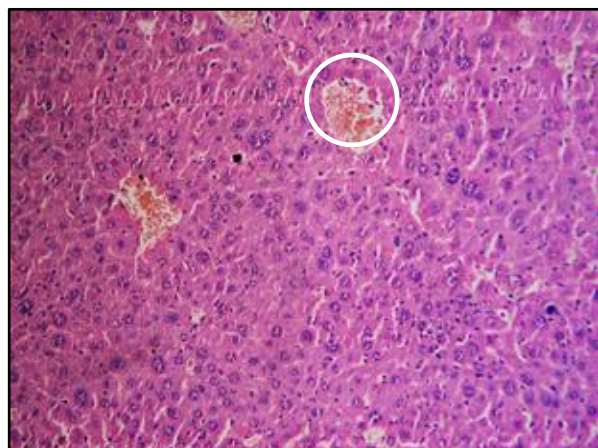


Рис.19. *Мікрофотографія печінки миші з моделлю системних уражень через 3 тижні після трансплантації 10^4 FM інтраперитонеально. Позначено: розширені і повнокровні судини. Фарбування гематоксилін-еозин. x200*

При гістологічному дослідженні печінки після трансплантації 10^5 FM інтраперитонеально, в порівнянні з тваринами контролю самовідновлення, зберігається загальна структура тканини. Дрібновузлова перебудова тканин печінки не спостерігається. Альтеративно-некротичні зміни в печінкових пучках відсутні. Гепатоцити полігональної форми, цитоплазма оксифільна, з одним або двома ядрами з декількома ядришками. Збільшена кількість біноклеарних гепатоцитів, що є морфологічним проявом регенерації тканин печінки, центральні вени, судини

печінкових триад і синусоїдальних капілярів не розширені і не повнокровні. Клітини Купфера в помірних кількостях. Спостерігається невелика інфільтрація лейкоцитів (рис. 20).

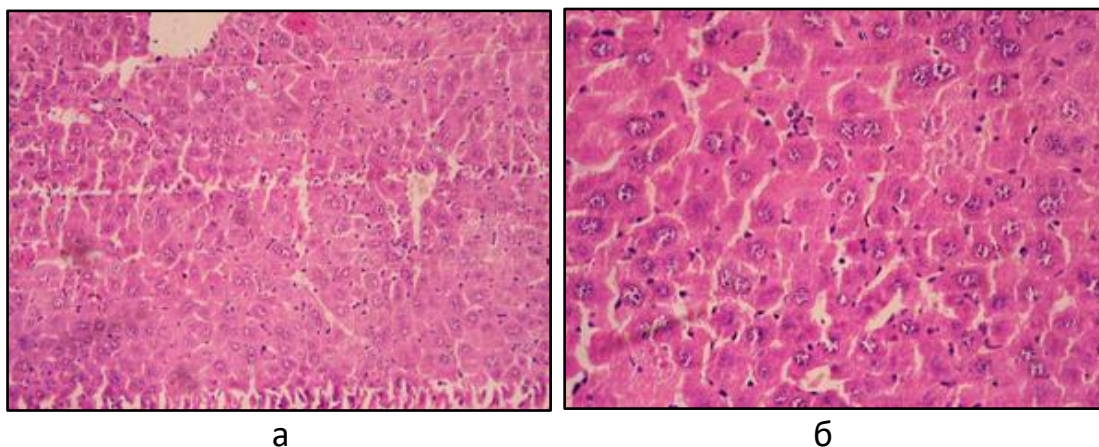


Рис.20. Мікрофотографія печінки миші з еСПОД після трансплантації 10^5 FM інтраперитонеально. Фарбування гематоксилін-еозин. $\times 200$ (a), $\times 400$ (b)

Після однократної трансплантації 10^5 FM в респіраторному відділі легень мишей з еСПОД виявляються ознаки відновлення. На відміну з групою тварин із самовідновленням фіксується збільшення кількості альвеол і відтворення їх нормальної гістоархітектоніки. На препаратах можна диференціювати термінальні бронхіоли, альвеолярні ходи і мішечки. Просвіти альвеол розправлені. Міжальвеолярні перегородки соковиті, кількість клітинних елементів і волокнистих структур помірне, є більша кількість капілярів ніж в попередній групі. В бронхах малого і середнього діаметру виявлено відновлення епітеліальних пластинок. Є відновлення цілісності епітелію і підвищення кількості клітин (рис. 21a).

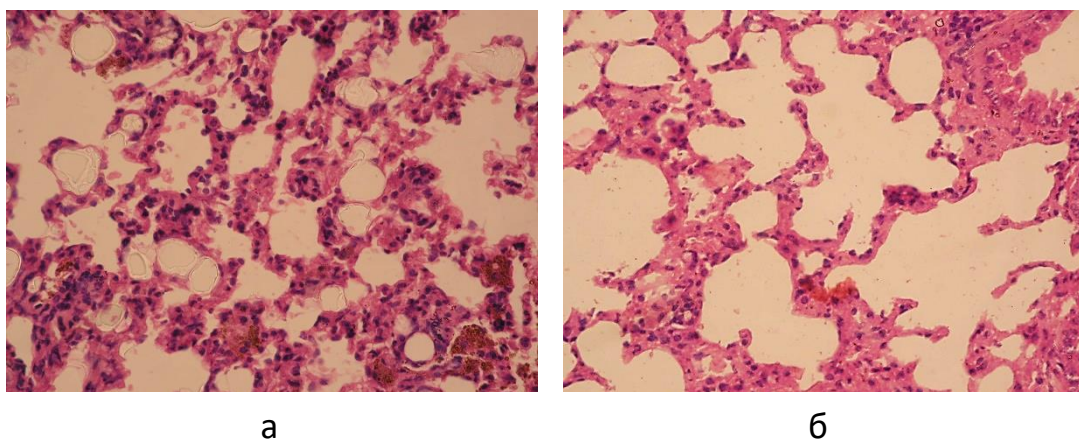


Рис.21. Мікрофотографія легень миші з еСПОД через 3 тижні після одноразової (a) і триразової (б) трансплантації 10^5 FM інтраперитонеально. Збільшення $\times 400$

У тварин з еСПОД, після триразової трансплантації 10^5 FM спостерігається збільшення кількості альвеол і відтворення їх нормальної гістоархітектоніки. На препаратах можна диференціювати термінальні бронхіоли, альвеолярні ходи і мішечки. Просвіти альвеол розправлені, але вони за діаметром ще менше, ніж в

контролі. Міжальвеолярні перегородки тонкі, кількість клітинних елементів і волокнистих структур помірно, наочно відновлення кількості капілярів. В бронхах малого і середнього діаметру виявлено відновлення епітеліальних пластинок. Є відновлення цілісності епітелію і збільшення кількості клітин (рис. 21б). Стінка таких бронхів не має фіброзних змін і лейкоцитарної інфільтрації.

Після одноразової трансплантації FM виявлені структурні перебудови селезінки, що свідчать про наявність реактивних змін і ознак антигенної стимуляції. Є зміщення нормальних співвідношень червоної і білої пульпи в бік збільшення кількості білої пульпи, але спостерігається велика щільність клітин білої пульпи на відміну від групи варіанту триразової трансплантації тих самих клітин (рис 22б), тому фолікули в селезінці цієї групи тварин великі і значно темніше рахунок проліферації значної кількості клітин. У лімфатичних вузликах визначається світлий гермінативний центр, є також збільшена щільність клітин білої пульпи (рис 22а). Червона пульпа, яка представлена селезінковими тяжами Більтот і венозними синусами, рясно заповнена клітинними елементами. Ознаки активації імунної відповіді присутні в обох експериментальних групах, і більш виражені в групі з триразовою трансплантацією стовбурових клітин.

Отже за показниками виживаності, активації імунної системи, патоморфологічному аналізу трансплантація стовбурових клітин на тлі виснажених систем детоксикації і розпочатого руйнування органів призводить до позитивних змін активації процесів відновлення.

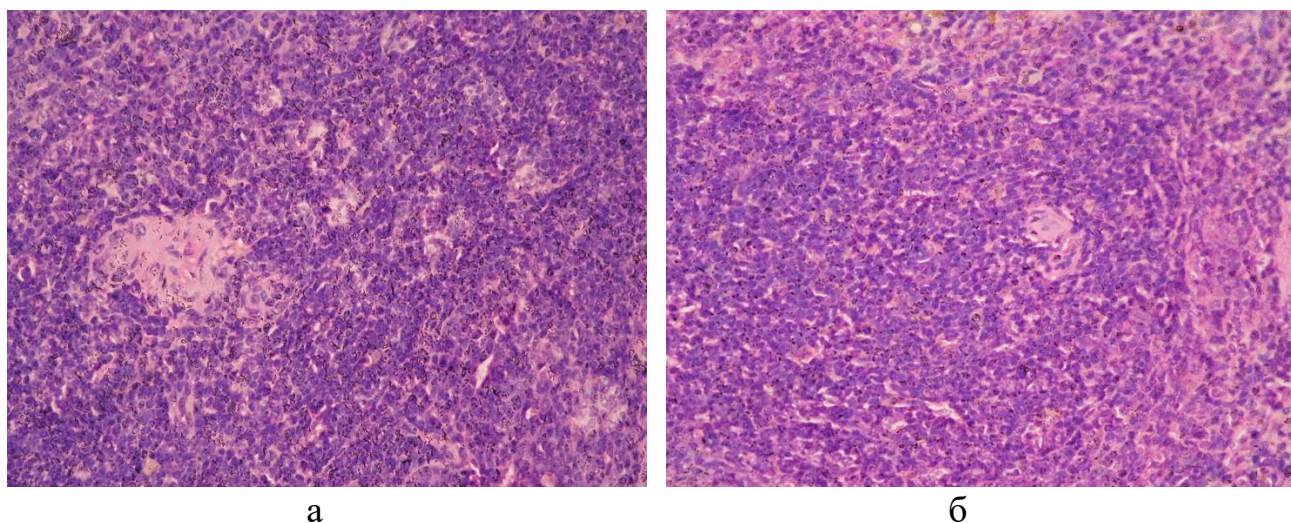


Рис.22. Мікрофотографія селезінки миші з eСПОД через 3 тижні після одноразової (а) і триразової (б) трансплантації 10^5 FM інтраперитонеально. Збільш. x 400

ВИСНОВКИ

В результаті виконання дисертаційної роботи було досліджено та охарактеризовано терапевтичний вплив МСК на моделі експериментального хронічного токсичного ураження із синдромом поліорганної дисфункції.

1. Вперше створено та охарактеризовано тварину модель системного ураження з синдромом поліорганної дисфункції у тварин із спадковою схильністю до канцерогенезу шляхом тривалого систематичного введення мишам лінії ICR 30%-го розчину тетрахлорметана протягом 12 тижнів. Проведено фізіологічні, біохімічні та гістопатоморфологічні дослідження систем органів у тварин із експериментальним СПОД. Модель характеризується індексом смертності близько 20% у строк 12 тижнів під час навантаження CCl_4 і у близько 20% тварин відмічаються новоутворення після сформування модельного стану.

2. Показано, що значний вплив на якість терапевтичного ефекту впливає якість самих МСК, яка може відрізнитись попри стандартизовану методику їх отримання, що підтверджує необхідність стандартизації терапевтичних МСК за функціональними критеріями. Показано, що між варіантами із застосуванням аlogenних і ксеногенних МСК також існують певні відмінності, пов'язані з активацією імунної системи і ефективністю терапевтичного ефекту. Доведено, що за даних умов трансплантація ксеногенних МСК людини мала більш виражений терапевтичний ефект аніж МСК миші.

3. Вперше показано, що МСК не втрачають свого відновлювального потенціалу за умов оксидативного стресу і виснаження механізмів детоксикації клітин, що був викликаний тривалим навантаженням CCl_4 . Гістологічна картина змін показує наявність позитивної тенденції відновлення, яка може бути посилена за рахунок індивідуалізації умов лікування.

4. Показано залежність терапевтичного ефекту трансплантованих МСК від дози введених клітин. Отримані дані свідчать про наявність порогового ефекту, при якому допорогові дози МСК викликають покращення патоморфологічної картини, але при важких ураженнях цього буває недостатньо для значного підвищення рівня виживаності. Трикратна трансплантація МСК раз на тиждень впродовж трьох тижнів, показала кращий терапевтичний ефект, ніж одноразова трансплантація.

5. Вперше показано, що трансплантовані МСК, в умовах активації реалізації спадкової схильності до канцерогенезу, яка викликана токсичним системним ураженням і виснаженими механізмами самовідновлення додатково не активують і не прискорюють розвиток пухлин.

6. Таким чином показано що трансплантовані МСК за умов важкого системного ураження організму можуть бути використані для детальної розробки протоколів терапевтичного застосування при зазначених станах.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. VV Likhodiievskiy, AV Korsak, **DM Irodov**, YB Chaikovskiy, VA Kordium, Spleen Morphological Features Under Experimental Model of Multiple Organ Failure and Stem Cell Application. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2018;28(1):64-68 (Особистий внесок здобувача: планування та проведення експерименту, обговорення та аналіз результатів)
2. VA Kordium, **DM Irodov**, YB Chaikovskiy Triggering effect of “therapeutic MSC”. *Biopolym. Cell*. 2017;33(6):463-472. (Особистий внесок здобувача: планування та проведення експерименту, обговорення та аналіз результатів)
3. Kordium V.A., **Irodov D.M.** Amazing MSC – phenomenology, problems, solutions and opportunities. *Biopolym. Cell*. 2017;33(1):64-76. (Особистий внесок здобувача: аналіз літератури, участь в обговоренні та формулюванні гіпотез)
4. Kordium V. A., Chaikovskiy Yu. B., **Irodov D.M.**, Drahulian M. V., Gulko T. P., Buchek P. V., Korsak A. V., Neverovskiy A. V. Modelling of systemic lesion of organism for development of multitarget cellular and cytokine therapy. *Biopolym. Cell*. 2016; 32(5): 381-394. (Особистий внесок здобувача: планування та проведення експерименту, обговорення та аналіз результатів)
5. VA Kordium, **DM Irodov**, MV Drahulian, TP Gulko, PV Buchek Системное поражение как модель для отработки технологий генно-клеточной терапии. *Visnik ukrains' kogo tovaristva genetikiv i selekcioneriv*, 2016; 14 (1): 16-26 (Особистий внесок здобувача: участь в плануванні та проведенні експерименту, обговорення та аналіз результатів)
6. В.А. Кордюм, Т.П. Гулько, Е.Г. Дерябина, М.В. Драгулян, **Д.М. Иродов**, М.В. Ковальчук, Л.И. Лихачева, О.В. Окунев, Т.А. Рубан, Е.К. Топорова, С.П. Шпилевая, Н.С. Шувалова Преобразующий потенциал мезенхимальных стволовых. *Журнал НАМН України*, 2014 том 20 №2 стр 143-152 (Особистий внесок здобувача: планування та проведення експерименту, обговорення та аналіз результатів)

Тези наукових доповідей на конференціях:

7. Toporova O., Pokholenko I., Shuvalova N., Kyryk V., Deriabina O., Morgunov P., **Irodov D.**, Kordium V. Genetic engineering of mesenchymal stem cells from umbilical cord Wharton’s jelly. *World Conference on Regenerative Medicine 2015 Congress Center Leipzig, Germany, October 21-23 2015 in Regenerative Medicine 2015, v.10 No.07s p.220* (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, аналіз отриманих результатів, підготування постера до друку)
8. Kordium V., Gulko T., Dragulyan M., **Irodov D.**, Shpylova S. Systemic disease in laboratory animals as a model for cell therapy. *World Conference on Regenerative*

Medicine 2015 Congress Center Leipzig, Germany, October 21-23 2015 in Regenerative Medicine 2015, v.10 No.07s p.VV Likhodiievskiy, AV Korsak, **DM Irodov**, YB Chaikovskiy, VA Kordium, Spleen Morphological Features Under Experimental Model of Multiple Organ Failure and Stem Cell Application. Problems of Cryobiology and Cryomedicine. 2018;28(1):64-68 (*Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, аналіз отриманих результатів, підготування постера до друку*)

АНОТАЦІЯ

Іродов Д.М. Дослідження терапевтичного потенціалу мезенхімальних стовбурових клітин в умовах синдрому поліорганної дисфункції на тлі тривалого токсичного ураження організму.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.20 «Біотехнологія». - Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, 2021.

Дисертаційне дослідження присвячене вивченню терапевтичного ефекту МСК при терапії синдрому поліорганної дисфункції та з'ясуванню можливих молекулярних механізмів такої дії. Дослідження проводились із застосуванням лабораторних мишей лінії ICR та відтвореної моделі системного ураження організму з синдромом поліорганної дисфункції.

Для дослідження терапевтичної дії мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) було відтворено та охарактеризовано тваринну модель, яка відповідає важкому стану поліорганної патології при якому дисфункція одного органу зумовлює розвиток вторинної дисфункції інших, що в свою чергу підсилює порушення в першому. Принциповою особливістю розробленої моделі є генетично-обумовлена схильність піддослідних тварин до пухлиноутворення, що відтворює зростаючу схильність до канцерогенезу людини, а на моделі забезпечує прояв можливих канцерогенних властивостей досліджуваних МСК.

Показано, що в умовах активації канцерогенезу трансплантовані МСК додатково не прискорюють процеси пухлиноутворення, а в деяких випадках можуть їх і гальмувати.

На підставі отриманих даних було сформульовано гіпотезу, що пояснює явище Пускового ефекту, який призводить до активації резидентних МСК і прогеніторів.

Показано, що трансплантовані МСК за умов важкого системного ураження організму не втрачають свої відновлювальні регуляторні властивості, активують процеси відновлення органів і можуть бути запропоновані для детальної розробки протоколів терапевтичного застосування при зазначених станах.

Ключові слова: Системне ураження, тетрахлорметан (CCl_4), синдром поліорганної дисфункції, мезенхімальні стовбурові клітини, трансплантація стовбурових клітин.

SUMMARY

Irodov DM Study of the mesenchymal stem cells therapeutic potential in the conditions of multiorgan dysfunction syndrome against the background of long-term toxic damage to the body.

Thesis for obtaining the Doctor of Philosophy (PhD) degree in Biology, specialty 03.00.20 – Biotechnology. – Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2021.

Present Ph.D. thesis is devoted to the study of MSCs therapeutic effect in the treatment of multiorgan dysfunction syndrome and to the elucidation of possible molecular mechanisms of such action. The studies were performed on laboratory ICR mice and a reproduced model of systemic organism lesions with multiorgan dysfunction syndrome.

To study the therapeutic effect of mesenchymal stem cells (MSCs), an animal model was developed and characterized, which corresponds to the severe condition of multiorgan pathology. In such pathology, dysfunction of one organ causes the development of secondary dysfunction of others, which in turn exacerbates disorders in the first. The important feature of the created model is the genetically determined predisposition of experimental animals to tumor formation, which reproduces the growing predisposition to human carcinogenesis. So, such model provides a manifestation of possible carcinogenic properties of the studied MSCs.

Tetrachloromethane (CCl₄), whose metabolism in the cell causes the appearance of great number of reactive molecules and affects the permeability of membranes, was chosen as the factor that triggers the chain of destructive reactions in the created experimental animal model. With prolonged loading, the existing mechanisms of cell detoxification are depleted, which consistently leads to their death, the development of chronic inflammatory reactions and organ dysfunction. The severity of the model is confirmed by pathomorphological changes in vital organs and the mortality index at the stage of formation of the required level of pathology, which was 18-22% of the total amount of experimental animals.

Therapeutic effects of allogeneic and xenogeneic MSCs in different concentrations, schemes of introduction and terms of therapeutic effect development are studied. This was performed against the background of the developed model by means of pathomorphological analysis and analysis of blood parameters.

The study involved mouse embryonic fibroblast-like cells of mice ICR, BALB, FVB-Cg-Tg (GFPU) 5Nagy / J lines (FM), and mesenchymal stem cells from human Wharton jelly, which were positive for markers CD73, CD90, CD105.

It has been shown that in general the therapeutic effects of allogeneic MSCs derived from different lines of mice are similar in many aspects. Differences in therapeutic effects related to the degree of induced proliferative activation in the regenerating organs. Thus, 3 weeks after MSCs transplantation from FVB mice, the proliferative activity of the liver cells of the recipient mouse was lower compared to the use of MSCs of BALB mice. Xenogeneic

MSCs caused more pronounced inflammatory response than allogeneic, although the positive physiological effects and survival index were at the level of allogeneic MSCs of higher concentration use. That is, a single transplant of xenogeneic MSCs caused the same level of response as a triple transplant of allogeneic MSCs.

The dependence of therapeutic effects on the concentrations of transplanted MSCs was established. Following doses and amount of exogenous cell transplants were studied: 1×10^4 , 1×10^5 and 3×10^5 cells per mouse. Moreover, the "dose" 3×10^5 was divided into 3 transplants with 7-days break between them. The dose of 1×10^5 was calculated based on therapeutic doses of MSCs long-lasting clinical trials of MSCs in humans at that time. For this dose, partial restoration of pulmonary histoarchitectonics, partial restoration of white and red spleen pulp with signs of immune response activation, and regeneration of hepatocytes near vessels in the liver were shown. A lower dose of MSC - 1×10^4 cells per mouse also led to compensatory-adaptive responses and to the absence of alternative-necrotic changes, but the number of regenerating hepatocytes in the liver was smaller. In the more severe initial state, it was low to increase the survival index of experimental animals.

It is shown that transplanted MSCs, in the conditions of systemic lesion of the organism, under the terms of exhausted detoxification mechanisms do not additionally activate and accelerate the development of tumors in animals with a hereditary predisposition to carcinogenesis. Systemic lesions realize a genetic predisposition to carcinogenesis, but even under these conditions, MSC transplantation did not lead to an intensification of this process.

Based on the results of the analysis of the results obtained, a hypothesis of the possible mechanism of action of therapeutic MSCs was formulated. It explains the phenomenon of the starting effect, which is manifested in the fact that relatively small number of mesenchymal stem cells transplanted into the body causes therapeutic effect, which continues to develop after most of the transplanted cells have been destroyed by macrophages and eliminated. In favor of our hypothesis are the results of studies using conditioned MSC medium. According to the hypothesis, resident ("watchdog") mesenchymal cells in chronic lesions / inflammation are in a depressed state, due to the cellular analogue of the protective physiological response – a decrease in excitability with prolonged exposure to stimuli. Such stimuli for mesenchymal cells are signaling molecules and markers of oxidative stress that appear in cell damage, and should normally activate MSCs. But under conditions of above-threshold activation, the effect may change to the opposite. Taking into account the regulatory role of MSCs in inflammatory and recovery reactions, it is reasonable to assume that their suppression inhibits the entire cascade of further recovery processes. The products of transplanted MSCs, which were not under the influence of inhibitory factors during multiplication, can be sufficient to trigger the required activation response stages of resident MSCs. Recovery itself occurs not due to the transplanted MSCs, but due to own resident MSCs and progenitor cells, which appear enough to obtain the therapeutic effect.

Thus, it is shown that transplanted MSCs under conditions of severe systemic damage of the body do not lose their restorative regulatory properties and can be proposed for detailed development of protocols for therapeutic use in these conditions.

Key words: Systemic lesion, carbon tetrachloride (CCl₄), multiorgan dysfunction syndrome, mesenchymal stem cells, stem cell transplantation.

ДЛЯ НОТАТОК