

Інститут молекулярної біології і генетики
Національної академії наук України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ІРОДОВ ДМИТРО МИХАЙЛОВИЧ

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

ДИСЕРТАЦІЯ

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

03.00.20 біотехнологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело _____ Іродов Д.М.

Науковий керівник: Кордюм Віталій Арнольдович, доктор біологічних наук, професор, член-кореспондент НАН України

Київ - 2021

АНОТАЦІЯ

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

Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

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.

В якості чинника, що запускає ланцюг руйнівних реакцій створеної експериментальної тваринної моделі був обраний тетрахлорметан (CCl_4), метаболізм якого в клітині викликає появу низки реакційно-активних молекул, і впливає на проникливість мембран. При тривалому навантаженні відбувається виснаження наявних механізмів детоксикації

клітин, що послідовно призводить до їх загибелі, розвитку хронічних запальних реакцій і дисфункції органів. Важкість стану моделі підтверджується патоморфологічними змінами життєво-важливих органів і індексом смертності на етапі формування необхідного рівню патології, який складав 18-22% від загальної кількості експериментальних тварин.

На тлі розробленої моделі за допомогою патоморфологічного аналізу і аналізу показників крові досліджено терапевтичні ефекти алогенних і ксеногенних до реципієнта МСК в різних діапазонах концентрацій, схем введення і строків розвитку терапевтичної дії.

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.

За результатами досліджень було встановлено, що в цілому терапевтичні ефекти алогенних МСК, що походили з різних ліній мишей схожі за багатьма показниками, але мають відмінності рівню загальної терапевтичної дії. Відмінності терапевтичних ефектів відносились до ступеню викликаної активації проліферативної активності в органах, що відновлювались. Так через 3 тижні після трансплантації МСК з мишей лінії FVB проліферативна активність клітин печінки миші-реципієнта була менша в порівнянні із застосуванням МСК мишей лінії BALB. Ксеногенні МСК викликали більш виражену запальну реакцію, ніж алогенні, попри те позитивні фізіологічні ефекти і індекс виживаності находився на рівні застосування алогенних МСК більшої концентрації. Тобто однократна трансплантація ксеногенних МСК викликала той же самий рівень реакції, що і трикратна трансплантація алогенних МСК.

При дослідженні концентраційних ефектів було встановлено залежність терапевтичних ефектів від концентрацій трансплантованих

МСК. Досліджувались дози і кількість трансплантації екзогенних клітин: 1×10^4 , 1×10^5 і 3×10^5 клітин на мишу. Причому «доза» 3×10^5 була розділена на 3 трансплантації з 7-ми денною перервою між ними. Доза 1×10^5 була розрахована виходячи з терапевтичних доз МСК тривалих на той час клінічних випробувань МСК на людині. Для цієї дози було показано, часткове відновлення гістоархітектоніки легень, часткове відновлення балансу білої і червоної пульпи селезінки з ознаками активації імунної відповіді і регенерацію гепатоцитів поблизу судин в печінці. Менша доза МСК – 1×10^4 клітин на мишу також призводила до компенсаторно-адаптивних реакцій і відсутності альтеративно-некротичних змін, але кількість регенеруючих гепатоцитів в печінці була меншою і при більш важкому початковому стані її бракувало для збільшення індексу виживаності піддослідних тварин.

Показано, що трансплантовані МСК, в умовах системного ураження організму, за умов виснажених механізмів детоксикації не активують і не прискорюють розвиток пухлин у тварин з наявною спадковою схильністю до канцерогенезу. Системне ураження реалізує генетичну схильність до канцерогенезу, але навіть за цих умов трансплантація МСК не призводила до посилення цього процесу.

За результатами аналізу отриманих результатів сформульовано і висунуто гіпотезу можливого механізму дії терапевтичних МСК, що пояснює феномен пускового ефекту. Цей феномен проявляється в тому, що досить незначна кількість мезенхімальних стовбурових клітин, що трансплантується в організм зумовлює терапевтичний ефект, котрий продовжує розвиватись вже після того, як більшість введених клітин була знищена макрофагами та елімінувало. На користь нашої гіпотези свідчать і результати досліджень із застосуванням кондиціонованого МСК середовища. Згідно висунутої гіпотези, резидентні (“сторожові”) мезенхімальні клітини при хронічному ураженні/запаленні знаходяться

у пригніченому стані, що зумовлено клітинним аналогом захисної фізіологічної реакції – зниження збудливості при довготривалій дії подразників. В якості таких подразників для мезенхімальних клітин є сигнальні молекули і маркери оксидативного стресу, що з'являються при клітинних пошкодженнях, і в нормі повинні МСК активувати, але за умов надпорогової активації ефект може змінюватись на протилежний. Враховуючи регуляторну роль МСК у реакціях запалення та відновлення, доцільно припустити, що саме їх супресія гальмує весь каскад подальших процесів відновлення. Продуктів трансплантованих МСК, які при розмноженні не знаходились під впливом пригнічуючих чинників, може виявитися достатньо для запуску потрібних каскадів реакції активацій резидентних МСК. Саме ж відновлення відбувається не за рахунок трансплантованих МСК, а за рахунок власних резидентних МСК та прогеніторних клітин, котрих з'являється достатньо для отримання терапевтичного ефекту.

Таким чином показано що трансплантовані МСК за умов важкого системного ураження організму не втрачають свої відновлювальні регуляторні властивості 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.

Список публікацій здобувача за темою дисертації

Статті у наукових фахових виданнях:

1. VV Likhodiievskyi, 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
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.205

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.

List of scientific publications published on the topic of the dissertation:

Papers:

1. Likhodiievskiy, V. V., Korsak, A. V., Irodov, D. M., Chaikovskiy, Y. B., Kordium, V. A., Olefir, S. S., Zabala, A. O., Kovalchuk, M. V., Ruban, T. A., & Shuvalova, N. S. Spleen Morphological Features Under Experimental Model of Multiple Organ Failure and Stem Cell Application. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine* 2018;28(1):64-68
2. VA Kordium, DM Irodov, YB Chaikovskiy Triggering effect of “therapeutic MSC”. *Biopolym. Cell.* 2017;33(6):463-472.
3. Kordium V.A., Irodov D.M. Amazing MSC – phenomenology, problems, solutions and opportunities. *Biopolym. Cell.* 2017;33(1):64-76.
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.
5. VA Kordium, DM Irodov, MV Drahulian, TP Gulko, PV Buchek Systemic disease as a model for development of the genetic and cell therapy

technologies. Visnik ukrains' kogo tovaristva genetikiv i selekcioneriv 2016;14(1):16-26

6. V. A. Kordium,, T. P. Gulko , E. G. Deriabina , M. V. Dragulian, D. M. Irodov, M. V. Kovalchuk, L. I. Lihacheva, O. B. Okunev, Ya. A. Poholenko, T. A. Ruban2, E.K. Toporova, S.P. Shpilevaia, N. S. Shuvalova Transforming potential of mesenchymal stem cells. Journal of NAMN of Ukraine, 2014; 20(1):143-152

Conference abstracts:

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 Leipcig, Germany, October 21-23 2015 in Regenerative Medicine 2015;10(07s):220
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 Leipcig, Germany, October 21-23 2015 in Regenerative Medicine 2015;10(07s):205

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКРОЧЕНЬ.....	14
ВСТУП.....	15
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	20
1.1 Хронічні патологічні стани є результатом системних порушень в організмі	20
1.2 Поліорганна недостатність та її наслідки	21
1.3 Відновлювальний потенціал МСК і можливі ризики їх застосування.....	27
1.4 Модель системного ураження.....	32
1.5 Особливості впливу CCl ₄ на організм	33
1.6 Механізми дії CCl ₄ у клітині.....	35
1.7 Використання моделі CCl ₄ для вивчення уражень інших органів.	39
2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ.....	40
2.1 Матеріали.....	40
2.2 Опис основних методів, що використовувались у роботі.....	42
2.3 Особливості дизайну експериментів.....	47
3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	55
3.1 Розробка тваринної експериментальної моделі поліорганної дисфункції та її характеристика	55
3.1.1 Підбір параметрів інтоксикації	55
3.1.2 Дослідження патоморфологічних змін у мишей під впливом тривалого навантаження CCl ₄	56
3.1.3 Опис змін показників крові мишей із відтвореним еСПОД	57
3.1.4 Опис патологічно-морфологічних змін мишей із відтвореним еСПОД.....	65
3.1.5 Дослідження патоморфологічних змін в печінці.....	67
3.1.6 Дослідження патоморфологічних змін в селезінці.....	71
3.1.7 Дослідження патоморфологічних змін в легенях.....	74
3.1.8 Дослідження патоморфологічних змін в нирках.	80
3.2 Дослідження терапевтичного потенціалу МСК на тлі відтвореного еСПОД у мишей.....	82
3.2.1 Дослідження наявності терапевтичного ефекту після трансплантації МСК в умовах хронічного токсичного ураження організму із еСПОД	82
3.2.2 Дослідження особливостей дії різних за походженням МСК в умовах	

еСПОД.....	87
3.2.3 Дослідження залежності терапевтичного ефекту від дози і кратності застосування трансплантованих клітин	90
3.2.4 Дослідження можливості впливу трансплантованих МСК на реалізацію схильності до пухлиноутворення у генетично-детермінованих до канцерогенезу модельних тварин.....	106
4. УЗАГАЛЬНЕННЯ ТА АНАЛІЗ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	112
4.1 Аналіз результатів досліджень	112
4.2 Висновки	120
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	120
ДОДАТОК А ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ.....	134

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКРОЧЕНЬ

eСПОД – експериментальний синдром поліорганної дисфункції

МСК – мезенхімальні стовбурові клітини

СЗ – системне запалення

СК – стовбурові клітини

СПОД – синдром поліорганної дисфункції

хрСЗ – хронічне системне запалення

CCl₄ – тетрахлорметан, або тетрахлорид вуглецю

СУР – цитохром Р

IL – інтерлейкін

IL-1 β – інтерлейкін 1бета

TGF – трансформуючий фактор росту

TNF- α – фактор некрозу пухлин альфа

ВСТУП

Актуальність теми.

Поліорганна дисфункція є найважчим станом, що виникає при неможливості численних захисних і компенсаторних механізмів самотійно 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 самотійно не в змозі утримати гомеостаз і вже сама є ініціатором вторинного ураження. Організм переходить у стан саморуйнування. При хронічних ураженнях організму відбуваються з одного боку – виснаження механізмів детоксикації, з іншого – знижується реактивність імунної системи і механізмів відновлення.

Одним з перспективним 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 нових підходів виведення організму із стану саморуйнування і переводу його в стан ефективного самовідновлення з використанням екзогенних МСК починається з 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, 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 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 роботи було дослідити принципову можливість застосування відновлювального потенціалу мезенхімальних стовбурових клітин для отримання терапевтичного ефекту в умовах важкого пошкодження органів.

Для досягнення поставленої мети було визначено наступні **завдання:**

1. Створити і охарактеризувати тваринну модель системного токсичного ураження із експериментальним синдромом поліорганної дисфункції (еСПОД) що відповідає умові мінімального

впливу первинного токсичного чинника на трансплантовані клітини.

2. Дослідити наявність терапевтичного ефекту у модельних тварин із еСПОД під впливом трансплантації МСК.
3. Дослідити особливості дії різних за походженням МСК в умовах еСПОД.
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 і предмет дослідження.

Об'єкт дослідження: стан системного токсичного ураження з синдромом поліорганної дисфункції.

Предмет дослідження: терапевтичний потенціал трансплантованих МСК на тлі синдрому поліорганної дисфункції.

Методи дослідження.

В роботі були використані культуральні методи (отримання первинних культур, культивування клітин ссавців), біохімічні, гістолочні та цитологічні методи, метод поточної цитофлюориметрії, колориметричний МТТ-тест, світлова мікроскопія, фіксація та забарвлення культур специфічними барвниками, моделювання синдрому поліорганної дисфункції у мишей, методи роботи з лабораторними тваринами (ін'єкції, збір крові), статистичний аналіз.

Наукова новизна одержаних результатів.

У результаті проведеної роботи із застосуванням методів клітинної біології та біотехнології вперше було розроблено модель синдрому поліорганної дисфункції, що виникає в результаті тривалого ураження

токсичним ксенобіотиком на тваринах із спадковою схильністю до канцерогенезу і вперше показана можливість терапевтичної дії трансплантованих мезенхімальних стовбурових клітин при зазначеному стані.

Теоретичне значення отриманих результатів.

В результаті проведеної роботи сформульовано та висловлено гіпотезу, що пояснює феномен прояву пускового ефекту одноразового введення відносно невеликої кількості стовбурових клітин на відновлення за рахунок власних прогеніторних та мезенхімальних стовбурових клітин організму.

Практичне значення отриманих результатів.

Створена та охарактеризована модель може бути використана 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 СПОД.

Особистий внесок здобувача.

Результати досліджень, викладені в дисертації, отримані автором самостійно, або за його безпосередньої участі. Автором проведено планування основних напрямків роботи, проведення досліджень, узагальнення та аналіз отриманих результатів, підготовка публікацій за результатами досліджень. Роботи з тваринами та підготовка стовбурових клітин миші були проведені за участю 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.

Усі зазначені вище колеги є співавторами опублікованих робіт. При написанні дисертації ідеї та розробки співавторів публікацій не були використані. Автор висловлює подяку за обговорення отриманих результатів, цінні поради при проведенні роботи науковому керівнику член-кореспонденту НАН України Кордюму Віталію Арнольдовичу. Автор висловлює безмежну подяку к.м.н Діброві В.А. і рецензентам д.б.н. Півень О.О., д.б.н. Телегєєву Г.Д. без участі і порад яких закінчення цієї роботи було б неможливим. Автор безмежно вдячний всім названим і не названим колегам за допомогу, поради та підтримку.

Публікації.

Матеріали дисертації опубліковано у 5 наукових статтях у фахових наукових журналах.

Структура та обсяг дисертації.

Дисертація викладена українською мовою на 134 сторінках комп'ютерного набору. Робота складається з чотирьох розділів (огляд літератури, матеріали та методи, результати, обговорення і узагальнення результатів). Дисертація ілюстрована 44 рисунками, 7 таблицями. Список літератури містить 103 джерела.

1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Хронічні патологічні стани є результатом системних порушень в організмі

Дисфункція органів продовжує бути серйозним ускладненням різних патологічних станів і причиною більшості несприятливих наслідків реанімаційних заходів. Розвиток гострої і хронічної дисфункції органів може призвести до багатьох загальних патологічних процесів, а точніше до їх різних комбінацій. Лідируючі позиції серед них займають системні запалення (СЗ) – процеси, що пов'язані не тільки з сепсисом, але і з розвитком критичних станів неінфекційного характеру. У деяких випадках саме механізми СЗ виконують роль основних руйнівних факторів [1].

Існує кілька типів запальних реакцій – гостре запалення, паразапалення і хронічне запалення. Кожен тип має свої особливості регулювання, в яких можуть бути задіяні дещо різні механізми. Порушення регуляції запальної реакції значною мірою сприяє розвитку багатьох хронічних патологій. При хронічному запаленні порушується регуляція імунних процесів [2, 3, 4]. Ланцюжок взаємозв'язків між органами і системами, замикаючи позитивний зворотний зв'язок, призводить до закономірного ускладнення ситуації. Хронічне запалення, сприяє загальному розбалансуванню систем організму та появі і прогресу багатьох захворювань людини, включаючи ожиріння, діабет 2 типу, атеросклероз і нейродегенеративні захворювання [5]. Гусев О.Ю. з співавторами прямо вказують, що основними характеристиками СЗ є феномен системного пошкодження, генералізація базисних механізмів запалення і втрата цими механізмами своєї протективної ролі (локалізації чинників ушкодження). В останньому випадку запальні

механізми самі перетворюються в основну рушійну силу патологічного процесу. Хронічне СЗ тривалий час розвивається латентно, визначаючи поступові зміни як в системі мезенхімальних тканин, так і в паренхімі життєво-важливих внутрішніх органів. Складність нормальних і патологічних процесів при запаленнях приваблює багатьох дослідників [6]. Різні стадії запальної реакції зумовлюють і різні види участі і взаємодії різноманітних регуляторів, серед яких виступають і стовбурові клітини. Вивчення ефектів взаємодії між клітинами-учасниками процесів запалення проводять в порівнянні на експериментальних моделях відповідних патологій [7]. Системне ураження часто розглядають, як поєднання імунологічної аномалії і оксидативного стресу [8], що призводить до гіперактивності сигнальних шляхів чинників зростання, таких як інсулін / IGF-1 і mTOR, і подальшого накопичення токсичних агрегатів і клітинного сміття, що в кінцевому підсумку веде до апоптозу, некрозу або автофагії [9]. Стан, при якому кілька пошкоджених органів стають нездатними в достатньому обсязі виконувати свої функції виражається синдромом поліорганної недостатності. У даній роботі він розглядається, як важка стадія загального ураження організму. І саме такі патофізіологічні умови дають змогу якомога краще дослідити увесь спектр терапевтичного потенціалу терапевтичних стовбурових клітин.

1.2 Поліорганна недостатність та її наслідки

У клінічній практиці стан, відомий як синдром поліорганної дисфункції (СПОД), є найбільш частою причиною смерті пацієнтів відділень інтенсивної терапії [10]. (У деяких роботах замість “дисфункція” використовується термін “недостатність”. Під дисфункцією розуміють стан при якому хворий потребує інтенсивної медичної допомоги штучного компенсування втрачених функцій. Термін

“дисфункція” використовувався для позначення станів, коли функція органів може бути відновлена. Оскільки межа між двома станами розмита, зараз запропоновано використовувати термін дисфункція, як більш загальний, а стан недостатності вважати за ступінь тяжкості стану.) Цей патологічний стан становить небезпеку й через супутні вторинні ефекти серед яких і гострий респіраторний дистрес-синдром і дисеміноване внутрішньосудинне згортання, що особливо актуально в світі останньої епідеміологічної ситуації. СПОД включає в себе збій не тільки багатьох органів, а також впливає на взаємозалежні фізіологічні системи, які класично не вважають органами, включаючи гематологічну, імунну та ендокринну системи. Термін синдром відразу вказує на різноманітність провокуючої етіології, що призводять до одного і того ж результату. Клінічне ведення таких хворих ускладнюється змінами функції органів і прогалинами в знаннях з інших важливих питань, таких як оптимальне дозування ліків і нутритивна підтримка.

Патофізіологія СПОД складна, багатофакторна і погано вивчена. Запропоновано [11] три моделі, які пояснюють виникнення СПОД. Перша - це модель «одного удару», в якій відмова органу розвивається як прямий результат масивного початкового ураження, такого як сепсис, політравма або опікова травма. Друга модель або модель «подвійного удару» описує первинне ураження, за яким прямує подальше ураження. Причому подальше ураження може здаватися незначним, наприклад, інфекцією, але воно може викликати посилене запалення і імунну дисфункцію. Така модель була описана та охарактеризована при моделюванні СПОД у собак із застосуванням у якості двох послідовних вражаючих факторів геморагічного шоку та ендотоксину *Escherichia coli* (внутрішньовенно). Третя модель відома як «модель зі стійким попаданням» (постійної дії). Ця модель описує тривале пошкодження, таке як пневмонія, яка викликає як початкове пошкодження, так і

підтримує дисфункцію [12].

Сучасне розуміння патофізіології, що веде до СПОД, об'єднує складні перехресні взаємодії між безліччю клітинних популяцій, гормональних систем, метаболітів і нейронної передачі сигналів поряд зі змінами в доставці кисню, порушеннями у використанні кисню і модифікаціями клітинних фенотипів. Існує кілька запропонованих механізмів ініціації розвитку СПОД: гіпоксія клітин та/або тканин, масова індукція клітинного апоптозу, транслокація мікроорганізмів і їх компонентів з шлунково-кишкового тракту, порушення регуляції імунної системи і мітохондріальна дисфункція. Найімовірніше, СПОД є результатом складної комбінації цих і інших ще не ідентифікованих факторів. Деякі дослідники вважають, що лідером у цьому процесі виступає дисрегуляція імунної системи і подальша дисфункція мітохондрій [13].

Стійкість і реактивність імунної системи багато в чому забезпечується балансом між прозапальними і протизапальними механізмами протидії [14]. Молекулярні шаблони, що асоціюються з патогенами або продуктами розпаду власних клітин, ідентифікуються вродженою і адаптивною імунними системами, найчастіше через Toll-подібні рецептори, які потім активують сигнальні шляхи, щоб викликати запалення. Активовані клітини первинної відповіді вродженої імунної системи (макрофаги) продукують прозапальні цитокіни (наприклад, фактор некрозу пухлини (TNF- α), інтерлейкін 1бета (IL-1 β), які, в свою чергу, стимулюють синтез інших медіаторів запалення і призводять до активації інших лейкоцитів. Медіатори пізнього запалення (наприклад, IL-6), забезпечують передачу сигналів для хронічного запалення [15].

У відповідь на продукцію прозапальних цитокінів виробляються протизапальні цитокіни (наприклад, IL-10), що допомагають підтримувати баланс імунної системи.

Цитокін ранньої відповіді TNF- α активує нейтрофіли, які активно

проникають в тканини, де виробляють у великій кількості супероксиди для боротьби з патогенами, але які також викликають пошкодження тканин. Нейтрофіли роблять внесок в відносну клітинну дисфункцію, активуючи шляхи мітохондріальної дисфункції. Відкриті під впливом оксидативного стресу пори у внутрішній мембрані мітохондрій порушують баланс процесів окислення і фосфорилування, що в свою чергу призводить до стану недостатнього засвоєння кисню на тканинному рівні при достатньому його надходженні до клітин. Це отримало назву цитопатичної гіпоксії. Останній, деякими дослідниками, приділяється мало не ключова роль у розвитку СПОД. У всякому разі, фармакологічне інгібування мітохондріальних порушень запобігало розвитку СПОД при експериментальному бактеріальному сепсисі, що вказує на те, що мітохондріальні ушкодження можуть бути першопричиною розвитку СПОД [16, 17].

З іншого боку цей же механізм може розглядатися як адаптивна функція організму на тривале запалення. На користь цієї гіпотези свідчить той факт, що поява вогнищ некрозу не таке часте явище при ранніх СПОД. Дисфункція мітохондрій викликає тимчасове зниження клітинної активності, яка може відновитися після одужання. Це явище отримало назву клітинної гіпернації. Однак, коли цей стан триває надто довго, він може перерости в необоротне ушкодження органу [18].

Системи органів, що беруть участь в СПОД, залежать від основного ураженого органу. Переважаючими є печінкова, дихальна, шлунково-кишкова, серцево-судинна, коагуляційна, ниркова, центральна нервова та ендокринна системи [19]. Первинні порушення одного з вищевказаних викликають розлади інших систем. Але порушення в печінці є найбільш «впливовими», як на початкових стадіях розвитку СПОД, так і на термінальних стадіях. Вторинна стадія печінкової дисфункції є результатом активації клітин Купфера і подальшого вироблення

прозапальних цитокінів, хемокінів, реактивних видів кисню і NO, що призводить до подальшого пошкодження і дисфункції печінки [20]. Другою за важливістю системою, дисфункція якої значно підвищує ризик несприятливого результату – дихальна. Надмірна інфільтрація легенів нейтрофілами призводить до пошкодження альвеолярно-капілярного бар'єру, витоку легеневих судин, а також альвеолярним і системним вивільненням прозапальних цитокінів. Пошкодження альвеолярно-капілярного бар'єру і підвищена проникність судин призводять до набряків легенів, в той час як вироблення цитокінів збільшує запалення і викликає структурні пошкодження альвеолярних пневмоцитів I типу [21].

Навантаження на захисні системи організму збільшують розлади шлунково-кишкового тракту, які починаються зі загибелі коменсальної мікрофлори, і призводять, зокрема, до транслокації в брижові лімфовузли патогенних бактерій і грибків, проникнення ендотоксинів. Разом з деякими прозапальними цитокінами (TNF- α) ендотоксини є ініціаторами апоптозу [22].

Серйозним фактором несприятливого прогнозу в лікуванні пацієнтів з SARS-COV2 була коагуляційна дисфункція, що давно була описана у зв'язку з СПОД. Розвивається вона в результаті виникнення позитивного зворотного зв'язку, при якому дисемінована внутрішньосудинна коагуляція відбувається при перебільшенні відповідної фізіологічної реакції, що викликана збільшеною наявністю прозапальних цитокінів, таких як IL-1 β , IL-6 і TNF- α . Ця прозапальна реакція призводить до утворення фібрину і мікросудинного тромбозу через активацію шляхів прокоагуляції і гальмування антикоагулянтних шляхів і фібринолізу. Генерація надлишкового тромбіну призводить до вироблення додаткових прозапальних цитокінів, які підтримують каскад коагуляції [23].

Останнє, що хотілося б згадати у зв'язку з актуальністю наслідків СПОД, що спостерігаються і при захворюванні COVID19 – це ураження центральної нервової системи. У нормальному стані вона захищена гематоенцефалічним бар'єром, і цей захист є ефективним навіть при системних запаленнях. Але при розвиненому СПОД відбуваються процеси, які порушують його цілісність. Медіатори запалення (наприклад, IL-1 β , TNF- α) стимулюють аферентні волокна блукаючого нерва. В результаті активуються церебральні ендотеліальні клітини, що призводить до руйнування гематоенцефалічного бар'єру [24]. Крім того, розвивається дисфункція мікроциркуляції і коагулопатія, що призводить до геморагічних і ішемічних уражень, що в кінцевому підсумку призводить до порушення ауторегуляції мозкового кровотоку [25]. Гістопатологія мозку хворих на септичний шок характеризується багатьма ураженнями, включаючи набряк головного мозку, серцеві напади, мікроабсцеси, внутрішньосудинний тромбоз і загибель нейрональних клітин [26].

Описані згубні енцефалопатії у людей, що є наслідком сепсису, включаючи неврологічні порушення, зниження когнітивних здібностей [27, 28] які дуже схожі на неврологічний синдром (PCNS), описаний зараз для тих, хто важко пережив COVID-19 [29, 30, 31].

Різноманітні хронічні ушкодження, які здатні провокувати СПОД, складають і основне місце серед факторів, провокуючих канцерогенез, особливо у осіб, що мають спадкову чи набуту схильність до нього. Само пошкодження викликає ланцюг реакцій відновлення, частиною якого є проліферація клітин для відновлення тканини. Саме цей етап, з точки зору канцерогенезу, є найбільш небезпечним, якщо проліферація відбувається на тлі хронічного запалення або дії іншого вражаючого фактору. Сама по собі проліферація клітин не викликає рак, але середовище, багате на запальні клітини, фактори росту та агенти, які сприяють пошкодженню

ДНК, безумовно, посилює і / або сприяє ризику неоплазії. Запальне оточення підтримує проліферацію блокуючи його припинення, а вплив мутагенної атаки підвищує вірогідність пошкодження ДНК. В деякому сенсі пухлини схожі на рани, які не загоюються. Вони рекрутують багато факторів і клітин, зазвичай потрібних для процесів запалення і відновлення, але модифікують їх для своїх потреб [32, 33]. Реакцією на сигнали мутагенного оточуючого середовища стають епігенетичні зміни, які переключають сигнальні шляхи. В наслідок чого проліферація і метаболізм вже не реагують на звичайні регуляторні сигнали [34, 35]. Хронічне запалення є основною причиною раку людини [36]. Тривале запалення ускладнює потрапляння поживних речовин до клітин. Голодування, включаючи кисневе, є одним із чинників, що індукує подальше переродження пухлин [37].

Важливою задачею є прибрати фактор тривалого ураження, зупинити процеси хронічного запалення і вивести організм із стану саморуйнування. Одним з інструментів, який вважається досить перспективним для цього, є стовбурові клітини. Завдяки своїм унікальним властивостям, участі у всіх етапах запалення та відновлення і здатності мігрувати в вогнище ураження і до пухлин, на основі наївних (немодифікованих) і генно-модифікованих МСК вже розроблено і продовжує активно розроблятися багато протоколів лікування різноманітних патологій, що потребують відновлення тканин, модуляції імунної відповіді, чи пригнічення розвитку пухлин.

1.3 Відновлювальний потенціал МСК і можливі ризики їх застосування.

Більше двадцяти років прискіпливих наукових досліджень підтверджують високий терапевтичний потенціал мезенхімальних

стовбурових клітин. Спочатку його пов'язували тільки із ембріональними стовбуровими клітинами і МСК кісткового мозку [38]. Вони є мультипатентними і можуть диференціюватись в декілька типів тканин. Але згодом почали накопичуватись дані про те, що значну роль у відновленні тканин відіграють регіональні стовбурові клітини та клітини-прогенітори [39]. Починаючи з кісткового мозку за цей час МСК навчилися отримувати з різних тканин, включаючи жирову тканину [40], легені [41], синовіальну рідину [42], м'язи [43], периферичну кров [44, 45], ендометрій [46, 47], плаценту [48, 49], пуповину [50], пуповинну кров [51, 52], перидонт [53], пульпу зуба [54, 55], підшлункову залозу, внутрішньошлункову тканину [56]. Нещодавно ми отримали повідомлення про велике джерело первинних мезенхімальних стовбурових клітин, щільно прикріплених до кісткових поверхонь кістковомозкових порожнин тіла хребців. Причому кількість клітин від одного донора може перекрити потреби одразу декількох реципієнтів [57].

МСК, різного походження, мають різні характеристики та потенціал диференціювання [58, 59]. При такому різноманітті МСК не дивно, що іноді результати різних досліджень бувають досить суперечливими. На перших порах всі отримані стовбурові клітини позначали однаково – МСК. Для їхньої ідентифікації у 2006 році Міжнародним товариством клітинної терапії (ISCT) були визначені три критерія: (1) МСК повинні бути пластично адгезивними в стандартних умовах культивування; (2) МСК повинні експресувати CD105, CD73 і CD90 і не мають експресії CD45, CD34, CD14 або CD11b, CD79alpha або CD19 і поверхневих молекул лейкоцитарного антигену DR людини; і (3) МСК повинні диференціюватися на остеобласти, адипоцити та хондробласти *in vitro* [60]. Але згодом, по мірі накопичення даних, заради того, щоб відокремити ефекти, що появляють різні за походженням МСК, з'явилась

необхідність в аббревіатуру МСК ввести ще й позначку джерела отримання стовбурових клітин. Це зняло частину суперечок при аналізі отриманих в різних лабораторіях даних. Але потім, з'ясувалось, що МСК отримані в межах однієї процедури, з одного джерела, являють собою цілий пул субпопуляцій клітин, які мають відмінності, наприклад, на рівні відносної кількості одних і тих самих поверхневих маркерів CD34/CD45 [61, 62]. Крім того, МСК з різних джерел демонструють значні відмінності в рівнях різних паракринних факторів [63, 64]. Суперечки, які ще й досі тривають щодо питань ідентифікації різних типів МСК говорять про складність проблеми [65–67] і суттєвих відмінностях між різними клітинами і протоколами.

Дослідження стовбурових клітин довгий час базувалось на парадигмі їх автономної дії. Тобто стовбурові клітини вивчались в розрізі їх впливу на клітини чи тканини організму. Однак більш поглиблені дослідження протизапальної дії МСК довели, що як мінімум частина ефектів є результатом ко-взаємодії МСК з клітинами імунної системи. Так ще в 2009 році були отримані дані про захисний ефект від сепсису інтерлейкіну 10 (IL-10), який продукували ендогенні макрофаги після активації екзогенними МСК [67]. Пізніше, двобічна взаємодія між ендогенними моноцитами, макрофагами, Т-клітинами і екзогенними МСК, як частина протизапальної дії МСК була неодноразово підтверджена різними дослідниками [68].

Ще один аспект, що потребує узгодження, стосується дисонансу між результатами доклінічних випробувань МСК на мишах і клінічних випробувань аллогених МСК на людині. Основна частина механізмів дії МСК отримана дослідженнями МСК людини *in vitro*, або *in vivo* на мишах. Як правило в дослідження потрапляє поліклональна суміш МСК людини після їх розмноження *ex vivo*. Не завжди перенос отриманих на мишах позитивних клінічних ефектів, на клінічні дослідження на людях

проходить однозначно. Фіксуються розбіжності, що стосуються імунної сумісності, дозування та придатності МСК, адаптованих до культури. Всі до-клінічні дані отримані на мишах, що підтверджують позитивні ефекти використання МСК, досліджували з використанням сингенних клітин, що мають з реципієнтом однаковий комплекс гістосумісності. Але було продемонстровано, що МСК, як і всі соматичні тканини, конститутивно експресують молекули головного комплексу гістосумісності першого типу (МНС I) і мають здатність експресувати МНС II при впливі запальних сигналів, таких як інтерферон- γ [69]. Таким чином взаємодія з імунними клітинами реципієнта сингенних МСК на тлі запалення може відрізнитись від взаємодії з алогенними клітинами. Із ксеногенним походженням трансплантованих МСК зв'язують і деякі незвичайні ефекти, як наприклад, однакова фізіологічна відповідь в легенях миші, до якої призводили ксенотрансплантації живих і мертвих МСК людини мишам [34]. Імуносупресивний ефект не залежав від життєздатності МСК.

Експерименти по трансплантації МСК, що культивувались *in vitro*, довели, що терапевтичні ефекти МСК неможливо пояснити тільки диференціацією в тканино-специфічні клітини [70–75]. Було встановлено, що ключову роль у відновлювальному ефекті грають секреторні біологічно-активні фактори [76–78]. Тобто основним ефективним паракринним компонентом МСК, що має біологічну дію, майже еквівалентну дії цілих МСК є МСК-екзосоми. У порівнянні з цілими клітинами, МСК-екзосоми мають декілька переваг: по-перше, МСК-екзосоми мають досить інтенсивний біологічний вплив, оскільки безпосередньо зливаються з клітинами-мішенями. По-друге, МСК-екзосоми можна зберігати та транспортувати при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом тривалого часу, оскільки їх ефективні компоненти захищені плазматичною мембраною самої екзосоми, яку нелегко знищити. По-третє, немає ризику імунного відторгнення та пухлиноутворення,

викликаного терапією трансплантації клітин [79]. Але на відміну від МСК екзосоми самостійно не пересуваються організмом, не володіють пластичністю і не адаптують свій набір регуляторних і інших молекул в залежності від оточення. Отже використання екзосом і використання МСК – два схожих, але не однакових процеси, які слід досліджувати окремо, оскільки за різних умов можуть виявитись ефективнішим або один, або другий.

Саме МСК, а не МСК-екзосоми, завдяки унікальній властивості мігрувати до місць пошкоджень і до пухлин розглядаються в якості перспективного інструменту в протоколах цитотерапії раку. Можливі варіанти з використанням або наївних (не модифікованих), або генетично-модифікованих МСК, створених для перенесення генів з протипухлинними властивостями. Але цей напрям потребує вирішення питань безпечності, оскільки на фоні більшості результатів введення МСК *in vivo*, які підтвердили свою безпеку та показали багатообіцяючі позитивні результати, залишаються роботи, що сповіщають про можливу активацію пухлиноутворення чи ініціалізацію метастазування [80, 81]. Ці данні потребують детального вивчення умов, за яких відбуваються небажані процеси. Теж саме стосується станів важких хронічних уражень, які самі вже є небезпечними в плані потенційної індукції канцерогенезу, особливо в умовах детермінованої схильності до нього.

Вивчення терапевтичного ефекту трансплантованих МСК і можливих потенційних ризиків їх застосування при важких станах, що супроводжуються СПОД, потребує створення адекватної моделі, яка б не тільки відтворила стан важкого ураження багатьох систем організму, а й загострила вірогідність розвитку небажаних ефектів, що дозволить оцінити наявність зв'язку їх посилення з досліджуваним терапевтичним агентом. Крім того чинник, за допомогою якого було досягнуто зазначеного стану, повинен бути виключеним з моделі і не впливати а ні

на подальший розвиток змін в самому організмі, а ні впливати на трансплантовані клітини.

1.4 Модель системного ураження

Синдром поліорганної дисфункції (СПОД) є показником крайньої стадії системного ураження з виснаженими функціями детоксикації і відновлення, при якій легко проявляються небажані ефекти і організм переходить до стану, коли вже самовідновлення майже неможливе, а починається процес саморуйнування. Існує кілька моделей поліорганної дисфункції. Найбільш поширеною є великий опік або політравма, при якій за короткий проміжок часу в кров надходить величезна кількість продуктів розпаду відмерлих клітин. З одного боку, це викликає перевантаження всіх систем детоксикації, а з іншого – викликає отруєння клітин по всьому організму, блокуючи функції відновлення. Існує і інший підхід: використання у якості моделі не гострого і раптового ураження, як при масивному опіку, а модулювання плавного перебігу розвитку СПОД за рахунок хронічного впливу несприятливих (токсичних) факторів, коли заданий стан розвивається протягом деякого часу на тлі виснажених функцій детоксикації та відновлення. Тим більше, що фіброз і цироз печінки є практично невід'ємною частиною початку розвитку системного ураження. Відомо досить багато способів отримати модель фіброзу. Їх можна умовно розділити на холестатичні, починаючи від перев'язування жовчних протоків [82] і закінчуючи аутоімунними, при яких ушкоджуються жовчний епітелій і жовчні протоки; токсичні, такі як вплив тіоацетамідом (ТАА) [83], диметилнітрозамін [84], тетрахлорметаном [85]; дієтичні з використанням препаратів, включених в дієту і також ведуть до холестатичні пошкодження печінки, [86, 87] та інших [88]. На тлі перерахованих препаратів Тетрахлорметан має цікаву

особливість: що виник при нетривалій навантаженні CCl_4 , фіброз має тенденцію регресу через короткий час, після її скасування [89]. Це узгоджується із сучасним уявленням про механізм його дії і свідчить на користь того, що токсична дія CCl_4 є більш опосередкованою, ніж самотійною.

У контексті нашої роботи, цінність має модель яка відображає саме наслідки спричинені каскадом взаємозалежних та пов'язаних змін активностей сигнально-регуляторних, імунних та інших систем, що розвиваються самотійно під тривалим впливом тетрахлорметану. Ефекти його тривалого впливу в основному пов'язані з виснаженням каскаду захисних механізмів клітини, а не прямим блокуванням якогось одного клітинного продукту або сигналу. В результаті страждають всі взаємозалежні органи. Саме тому, експериментальна модель СПОД, поміж іншого, характеризується і високою різноманітністю ефектів за рахунок посиленого вкладу "індивідуальних особливостей".

1.5 Особливості впливу CCl_4 на організм

В якості чинника, за допомогою якого можна отримати модель системного ураження з проявою синдрому поліорганної дисфункції був обраний тетрахлорид вуглецю (він же – тетрахлорметан, або CCl_4). Головною перевагою цього ксенобіотику є швидке виведення CCl_4 з організму, що виключає його прямий вплив на досліджувальні ефекти. Застосування багатьох галогенованих алканів, таких як тетрахлориду вуглецю (CCl_4), хлороформу (CHCl_3) або йодоформу (CHI_3), обмежено через їх токсичність. CCl_4 використовується в промисловості як розчинник при виготовленні напівпровідникових пристроїв і для хімічних і аналітичних вимірювань. Крім того, його можна використовувати як модельну речовину для з'ясування механізмів дії гепатотоксичних ефектів, таких

як жирова дегенерація, фіброз, гепатоцелюлярна смерть і канцерогенність. Залежно від дози, часу впливу, наявності потенціюючих засобів або віку ураженого організму, можлива регенерація може призвести до повного одужання від ураження печінки. CCl_4 активується цитохромом (CYP) 2E1, CYP2B1 або CYP2B2 і, можливо, CYP3A, щоб сформувати трихлорметильовий радикал CCl_3^* . Цей радикал може зв'язуватися з молекулами клітини (нуклеїновими кислотами, білками, ліпідами), порушуючи важливі клітинні процеси, такі як ліпідний обмін, з потенційним результатом жирової дегенерації (стеатоз). Вважається, що утворення аддукту між CCl_3^* і ДНК виступає ініціатором раку печінки. Цей радикал також може реагувати з киснем, утворюючи високореактивну речовину трихлOMETИЛпероксирадикала CCl_3OO^* , яка ініціює ланцюгову реакцію перекисного окислення ліпідів, атакуючи і знищуючи поліненасичені жирні кислоти, зокрема ті, що пов'язані з фосфоліпідами. Це впливає на проникність мітохондрій, ендоплазматичного ретикулула і плазматичних мембран, що призводить до втрати зв'язування клітинного кальцію і гомеостазу, що може значною мірою сприяти подальшому пошкодженню клітин. Серед продуктів розкладання жирних кислот є реактивні альдегіди, особливо 4-гідроксиноненаль, який легко зв'язується з функціональними групами білків і пригнічує важливі активності ферментів. Інтоксикація CCl_4 також призводить до гіпометилування клітинних компонентів; у випадку РНК результатом вважається інгібування синтезу білка, а у випадку фосфоліпідів він відіграє роль у гальмуванні секреції ліпопротеїнів. Жоден з цих процесів сам по собі не вважається кінцевою причиною CCl_4 -індукованої загибелі клітин; тільки завдяки синергізму вони досягають летальності за умови, що токсикант діє у високій разовій концентрації або протягом більш тривалих періодів часу в низьких концентраціях. На молекулярному рівні CCl_4 активує фактор некрозу пухлини альфа ($\text{TNF}\alpha$), оксид азоту (NO) і

трансформує фактори росту (TGF) -альфа і -бета в клітині – процеси, які, як видається, спрямовують в першу чергу клітину на самознищення, а орган – до фіброзу. TNF α підштовхує до апоптозу, тоді як TGF, здається, стимулює розвиток фіброзу. Інтерлейкін-6 (IL-6), що індукується TNF α , має очевидну антапоптотичну дію. Водночас IL-10 протидіє дії TNF α . Таким чином, обидва інтерлейкіни можуть ініціювати відновлення гепатоцита, пошкодженого CCl₄. Деякі з перерахованих вище процесів отруєння можуть бути спеціально перервані антиоксидантами і мітогенами, відповідно, шляхом відновлення клітинного метилювання або підтримки секвестру кальцію. Хімічні речовини, які індукують цитохроми (CYP), що метаболізують CCl₄ або затримують регенерацію тканин при спільному застосуванні з CCl₄, підвищують його токсичність, тоді як відповідні інгібітори CYP450 їх токсичність знижують. Парціальний тиск кисню також може впливати на перебіг гепатотоксичності CCl₄. Тиск від 5 до 35 мм рт. ст. сприяє перекисному окисленню ліпідів. В той же час нестача кисню, а також парціальний тиск вище 100 мм рт. обидва повністю запобігають перекисному окисленню ліпідів. Отже, локалізація CCl₄-індукованого пошкодження відображає градієнт кисню в печінковій частці. Змішані галогеновані метани і етани, виявлені як так звані побічні продукти дезінфекції при низьких концентраціях в питній воді, викликають симптоми токсичності, дуже схожі на тетрахлорид вуглецю, включаючи канцерогенність [90].

1.6 Механізми дії CCl₄ у клітині

Тетрахлорметан виводиться з організму протягом перших 24 годин в результаті фазової реакції кон'югації. Різними дослідниками були запропоновані три механізми як можливі пояснення прогресування уражень: внесок запальних клітин, утворення вільних радикалів і витік

деградуючих ферментів від вмираючих і пошкоджених клітин. Активовані резидентні клітини Купфера і нейтрофіли, рекрутовані в місце травми паренхіми печінки, вважаються основною причиною пошкодження навколишніх здорових клітин в результаті неспецифічної дії. Однак існують дані, що вказують на те, що внесок запальних клітин не є достатнім для прогресування пошкоджень.

Другим орієнтовним механізмом пошкоджуючої дії тетрахлорметану є утворення вільних радикалів і оксидативний стрес, а також подальше перекисне окислення ліпідів. Хоча антиоксиданти частково запобігають або затримують пошкодження тканин, все одно відбувається прогресуюче ураження органів. Цікаво, що пригнічення перекисного окислення ліпідів антиоксидантами тільки зменшує початкове пошкодження CCl_4 . Однак, як було показано, блокування перекисного окислення ліпідів не запобігало прогресуванню пошкодження і подальшій летальності модельних тварин [91]. При тривалому введенні CCl_4 до 8-го тижня все одно розвивався мікронодулярний цироз печінки.

Згідно з третім механізмом, токсична дія CCl_4 створюється самим організмом [92, 93]. Першою лінією захисту організму від дії ксенобіотиків вважається цитохроми P450 – ферменти, які переводять органічні сполуки в енергетично нестабільну форму, для подальшого знешкодження. На першому етапі при взаємодії з CYP2E1 (основний цитохром P450, що взаємодіє з тетрахлоридом вуглецю), взаємодії з CYP2B1, CYP2B2 і, можливо, CYP3A [94] все ще можливе утворення трихлорметилових радикалів, ферментативне окислення яких перетворює його в ще більш енергетично напружений трихлорметилперексидний радикал, який має особливо високий руйнівний потенціал [95]. Первинні метаболіти, трихлорметил і трихлорметил-пероксилові вільні радикали, мають високу реактивність і здатні ковалентно зв'язуватися з локальними клітинними

макромолекулами, віддаючи перевагу жирним кислотам з мембранних фосфоліпідів. Вільні радикали ініціюють перекис ліпідів, впливаючи на поліненасичені жирні кислоти в мембранах. Так з'являється другий, вже яскраво виражений рівень ушкодження, що викликаний вторинним токсичним ефектом – вільними радикалами, які утворилися з первинного агента – CCl_4 .

Порушення мембран призводить до подвійного ефекту. З внутрішньоклітинних компартментів, що оточені мембранами, – відсіками під загальною назвою «мікросоми» (лізосоми, пероксисоми, ендосоми і т.д.) вивільняється купа ферментів (оксидази, пероксидази, гідролази і т.д.), утворюючи високо реакційні центри в різних молекулах клітини. Крім того, з мікросом вивільняються ферменти, що призначені для деградації макромолекул - нуклеази і протеази. При цьому, через порушення цитоплазматичної мембрани, ззовні починають неконтрольовано надходити у клітину йони Ca^{2+} , надлишок яких активує Ca^{2+} -залежні протеази, фосфатази, ендонуклеази і т.д. Все це разом спричиняє безперервне утворення різних високореактивних сполук, які хаотично руйнують макромолекули і клітинні структури. Отже третій рівень пошкодження виникає внаслідок токсичної дії ферментів, які у нормі повинні локалізуватися в мікросомах. Перекис ліпідів викликає руйнування мембрани, що призводить до втрати цілісності мембрани і витоку мікросомальних ферментів. Побічними продуктами перекисного окислення ліпідів є реактивні альдегіди, які можуть утворювати аддукти білків і ДНК і можуть сприяти гепатотоксичності і канцерогенності відповідно.

Для інактивації реактивних форм різних молекул клітина має «багаторівневий» захист в вигляді декількох антиоксидантних систем. Найбільш ефективною з яких є глутатіонна система. Однак при тривалому постійному впливі CCl_4 система деактивації виснажується [96,

97]. Пошкодження, що розвиваються внаслідок виснаження системи глутатіону можна вважати четвертим рівнем пошкоджень у клітині, що виникли під впливом CCl_4 . З ростом ступеня загибелі гепатоцитів знижується ефективність функції детоксикації всієї крові, що тягне за собою отруєння і руйнування клітин інших органів. У той же час, через активацію прозапальних цитокінів, підвищується рівень прозапальних простагландинів, посилюється «системне запалення»(Рисунок 1.1).

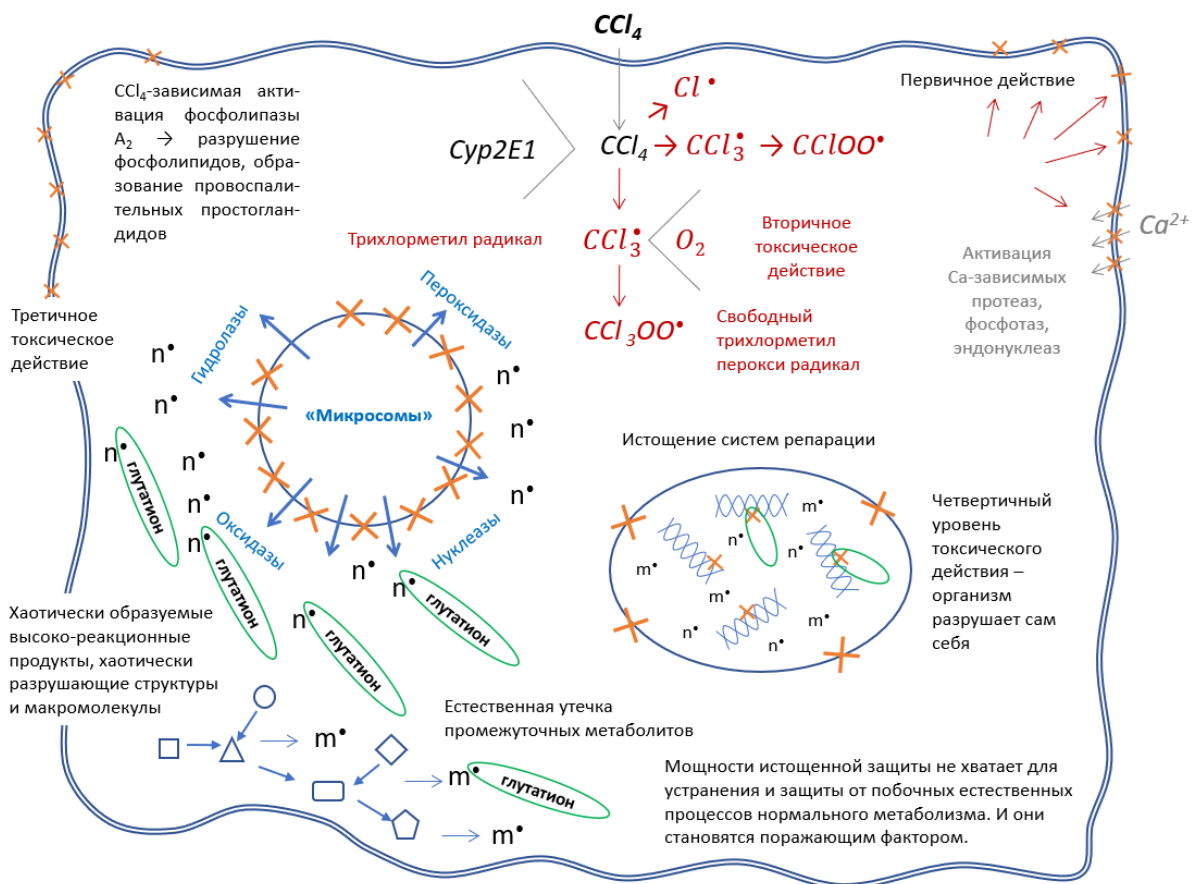


Рисунок 1.1 Схема багаторівневого ураження під впливом CCl_4

(Розроблено автором в співавторстві з В.А.Кордюм) [98].

Ступінь сприйнятливості і реакції з боку різних тканин і органів різний. Відповідно, характер і ступінь уражень у них будуть різними, що спостерігається - при будь-якому системному ураженні органи і тканини пошкоджуються всі, але різною мірою. У зв'язку з цим описана модель адекватна умовам, викликаним виснаженням системи детоксикації.

1.7 Використання моделі CCl₄ для вивчення уражень інших органів.

Незважаючи на те, що експериментальний фіброз печінки індукований CCl₄, є класичною моделлю для вивчення перш за все гепатопатологій, її використовують і для моделювання системних запалень чи патологій. Так у роботі групи американських дослідників [99] модель CCl₄-опосередкованого цирозу печінки застосовували для досліджень впливу такого запалення на легеневу судинну мережу у мишей. Однак у своїх експериментах автори в якості активатора активності цитохрому P450 застосовували фенобарбітал, тобто експериментальна патологія розвивалася завдяки активації інших молекулярно-сигнальних каскадів і механізмів. В іншій роботі [100], вивчали антиоксидантні властивості одного з рослинних екстрактів за біохімічними параметрами в тканинах нирок і легенів на схожій моделі CCl₄ ураження. Їх дослідження свідчить що основним уражуючим фактором дії CCl₄ є саме утворення радикалів і опосередкована ними дія.

2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1 Матеріали

Біологічні матеріали

Зразки пуповини (n=20) були надані пологовим будинком №5 після інформування породіль та отримання їх письмової згоди та отримані в рамках договору про науково-технічне співробітництво між відділом регуляторних механізмів клітини з ТОВ "БІОТЕХКОМ".. В роботі використовували ембріональну телячу сироватку (ЕТС) (РАА, Австрія, та HyClone), первинні антитіла проти білків CD90, CD73, CD105, CD34 та CD45 (UsBiological, США) та CD34 та 45 (UsBiological, США), ліофілізований порошок трипсину (ПанЕко, РФ), FGF2 (ліофілізований порошок, препарат «Рефіброл» ("Інтерфармбіотек", Україна), гепарин ("Фармекс", Україна).

Хімічні агенти

В роботі використовували наступні хімічні агенти: мінімальне середовище Ігла в альфа-модифікації (РАА, Австрія; Sigma; BioWest), L-глютамін порошок сухий (Sigma-Aldrich, США), PBS, 10x розчин (BioWest), ЕДТА (порошок та 0,02% розчин), гематоксилін (квасцовий гематоксилін за Бемером) (Sigma-Aldrich), гематоксилін Караччі (Sigma-Aldrich), еозин (водний розчин, 1%) (Sigma-Aldrich), 3-4,5-диметилтіазол-2,5-діфенілтетразоліум бромід (МТТ-реагент), ДМСО (диметилсульфоксид) (США), розчин формаліну 10% (4% розчину формальдегіду) (RAL Diagnostics, Франція), бензилпеніцилін (порошок для приготування розчину для інекцій, 500 000 ОД або 1 000 000 ОД) (Артеріум, Україна), стрептоміцин (порошок для приготування розчину для ін'єкцій, у перерахуванні на стрептоміцин 0,5 або 1 г) ("Артеріум", Україна), трипановий синій (водний розчин 0,4%), метиленовий синій

(водно-спиртовий розчин, 0,1 %) (ВАТ “Монфарм”, Україна), етанол (70% та 96%), ксилол, парафін, Crystal mount (Sigma-Aldrich, США).

Обладнання

Було використано наступне обладнання: мікроскоп Leica DM IL (Leica, Федеративна Республіка Німеччина), камера (Cannon PowerShot 640A), центрифуга (Liston C 2204 Classic, Російська Федерація), міні-центрифуга, CO₂-інкубатор New Brunswick Galaxy 170s (Eppendorf, Федеративна Республіка Німеччина), мікро-фотоколориметр (Epsilon Research Limited MCC/340), автоматичні піпетки (2-20, 20-200 та 100-1000 мкл) (Eppendorf), ваги (OHAUS Adventurer), одноразові мікроцентрифужні пробірки об'ємом 2 і 1,5 мл (Eppendorf), пробірки центрифужні 15 та 50 мл (Bioswisstec, Швейцарія), одноразові наконечники для автоматичних піпеток (TRP),

Матеріали для культуральної роботи

В ході експериментів використовувались одноразові мікроцентрифужні пробірки об'ємом 2 і 1,5 мл (Eppendorf), центрифужні пробірки 15 мл та 50 мл (Bioswisstec, Швейцарія), одноразові наконечники для автоматичних піпеток (TRP), пластикові планшети на 12 та 96 лунок (Cellstar), пластикові флакони на 25 і 75 см² (Sarstedt, Федеративна Республіка Німеччина; TRP, Швейцарія; SPL, Республіка Корея), пластикові чашки Петрі, d=35 мм (TRP, Швейцарія), Cellstar, 50 мм (Cellstar), пластикові піпетки 10 мл (LP Italiana, Італія), пластикові піпетки 5 та 2 мл (Jet Biofil, Китайська Народна Республіка), скляні чашки Петрі (d=35 мм, 10 см) (Anumbra), ножиці хірургічні тупокінцеві, пінцет анатомічний, пінцет хірургічний, гемоцитометр (камера Горяєва).

Обладнання

Було використано наступне обладнання: мікроскоп Leica DM IL (Leica, Федеративна Республіка Німеччина), камера (Cannon PowerShot 640A), центрифуга (Liston C 2204 Classic, Російська Федерація), міні-центрифуга,

CO2-інкубатор New Brunswick Galaxy 170s (Eppendorf, Федеративна Республіка Німеччина), мікро-фотоколориметр (Epsilon Research Limited MCC/340), автоматичні піпетки (2-20, 20-200 та 100-1000 мкл) (Eppendorf), ваги (OHAUS Adventurer),

Також, було використано програмне забезпечення Image J, Microsoft Excel та “BD FACSDiva” у відділі клітинних та тканинних технологій Інституту генетичної та регенеративної медицини НАМН України.

Лабораторні тварини

Дослідження проводили на половозрілих самцях мишей лінії ICR розведення віварію Інституту молекулярної біології і генетики НАН України. Тварин утримували в стандартних умовах віварію при фіксованому світловому режимі 12:12. Усі експериментальні дослідження проводили з дотриманням «Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, що використовуються з експериментальною та іншою науковою метою» (Страсбург, 1986).

Клітини що використовувалися у дослідженнях.

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 пуповини людини, які були позитивними за маркерами CD73, CD90, CD105.

2.2 Опис основних методів, що використовувались у роботі

Визначення показників крові

Для дослідження активності ензимів (АлАТ, АсАТ) у сироватці крові було використано стандартні набори НВП «Філісіт-Діагностика» (Дніпро). Активність ферментів АлАТ і АсАТ у сироватці крові визначали методом Райтмана-Френкеля [101] за допомогою стандартних біохімічних наборів. Швидкість осадження еритроцитів визначали за

стандартною методикою за допомогою стандартних капілярів для ШОЕ.

Для визначення кількості лейкоцитів зразок розводили розчином PBS 1:1 і наносили у центрифужну пробірку на 2 об'єми Ficoll-Paque. Після центрифугування 30 хвилин при 400g (1000 об/хв). До відібраної інтерфази додавали розчин PBS і двічі відмивали клітини за допомогою центрифугування по 5 хвилин при 180g. Підрахунок проводили у камері Горяєва. Фізіологічну активність лейкоцитів визначали за МТТ-тестом. Отримані лейкоцити розсівали у 96-луночний планшет по 100 тис. (100 мкл поживного середовища) в кожну лунку у трьох повторях. У лунку з клітинами додавали 15 мкл стокового розчину МТТ (5мг/мл) і інкубували 4 години для утворення кристалів формазану. Після чого додавали по 200 мкл ДМСО. Після розчинення кристалів виміряли оптичну густину, при довжині хвилі 540 нм визначали за допомогою аналізатора Epsilon Research Limited MCC/ 340 використовуючи у якості контролю ДМСО. Оптична густина розчину прямо корелює з кількістю метаболічно-активних клітин. Для підрахунку виводили середнє значення з трьох повторів.

Для приготування гістологічних препаратів органи мишей вирізали, промивали в фізіологічному розчині від залишків крові та фіксували у 10% водному розчині нейтрального формаліну. Після фіксації відібраний матеріал промивали водопровідною водою та зневоднювали у водних розчинах етилового спирту зростаючої концентрації. Після зневоднення шматочки матеріалу спочатку переносили у суміш абсолютного спирту і ксилолу (1:1) на 1 год, а згодом — у чистий ксилол. Отриманий матеріал ущільнювали парафіном і виготовляли гістологічні зрізи завтовшки 4 μm , які забарвлювали гематоксиліном-еозином. Зафарбовані та імпрегновані зрізи оцінювали на наявність запальної інфільтрації, дистрофічних змін, некрозу, поліморфізму ядер за допомогою світлового мікроскопа. Зрізи розглядали при $\times 200$ та $\times 400$ збільшенні.

Отримання первинної культури МСК з тканини пуповини людини

Первинні культури МСК отримували з драглів тканини пуповини людини методом експлантів. Фрагмент пупкового канатику (5-10 см) відмивали у розчині PBS, після чого механічно видаляли судини. Тканину розділяли на фрагменти розміром приблизно 5x5 мм, переносили в культуральний флакон для адгезивних клітин, 75 см², з поживним середовищем DMEM з низьким вмістом глюкози, із додаванням бензилпеніциліна (2 ед/мл), стрептоміцина (2 мкг/мл), 2 mM L-глютаміна, FGF2 (0,005 мкг на 100 мл середовища), та 10 % ембріональної телячої сироватки. Експланти культивували в CO₂-інкубаторі ("ThermoScientific", США) при температурі +37°C та 5% CO₂. Культуральне середовище змінювали кожні 3 дні. Перші мігруючі клітини із експлантів спостерігали вже на 5-7 добу, через 14 днів культивування отримували кількість клітин, достатню для пасування.

Отримання первинної культури фібробластоподібних мезенхімальних клітин мишей з м'яких тканин 15-17 денних ембріонів

Ембріональні фібробластоподібні мезенхімальні клітини мишей отримували з м'яких тканин 15-17 денних ембріонів. Шматочки тканин занурювали на 20 хвилин в 10-кратний розчин антибіотика (стрептоміцин + пеніцилін) в сольовому розчині. Через 20 хвилин препарат промивали і залишали в 0,25% розчині трипсину на 10 годин в холодильнику при +8°C. Після цього клітини промивали трипсином і ресуспендували в пробірці з середовищем DMEM з додаванням 10% ембріональної сироватки теляти в присутності 1-кратного розчину антибіотика. Ресуспендовані клітини висівали на чашки і поміщали в інкубатор CO₂ при 37°C. До вечора на чашках утворювався моношар. Рутинний пересів здійснювали при досягненні 80-90% конфлюентності.

Для трансплантації у тварин клітини були зібрані з чашок за допомогою 0,25% трипсин-Версен 1:1 і зібрані центрифугуванням протягом 10 хвилин при 1000 об/хв. Концентрація, необхідна для ін'єкцій, приготувалася шляхом розведення в фізіологічному розчині. Початкова концентрація клітин визначалась за допомогою камери Горяєва.

Імунофенотипування популяції МСК

Клітини оцінювали за експресією поверхневих маркерів CD90, CD73, CD105, CD34, CD45 методом проточної імуноцитофлуориметрії на лазерному проточному цитофлуориметрі - сортері BD FACSAria («Becton Dickinson», США). Для цього суспензію клітин переносили у мікропробірку у крижаний PBS (2x10⁵ клітин в 0,5 мл) з додаванням 1% азиду натрію. Додавали 0,1–10 мкг/мл первинних мічених антитіл (UsBiological, США), розчинених у 3% BSA/PBS та інкубували протягом 30 хв при кімнатній температурі, після чого клітини тричі відмивали PBS, центрифугували при 400 g протягом 5 хв та ресуспендували у 500 мкл крижаного PBS і аналізували у проточному цитометрі. Популяція отриманих МСК характеризувалася імунофенотипом CD73+/CD90+/CD105+/CD45-/CD34- з рівнем експресії позитивних маркерів більше 98%.

Кількісний аналіз даних проводили із застосуванням програмного забезпечення «BD FACSDiva». Цю серію досліджень проводили на базі відділу клітинних та тканинних технологій «ДУ Інституту генетичної та регенеративної медицини НАМН України».

Аналіз здатності до диференціації

Після першого пасування культури проводили аналіз диференціального потенціалу отриманих клітин, а саме, досліджували їхню диференціацію у остеогенному, адипогенному та хондрогенному напрямках. Для індукції диференціації клітин застосовували комерційне середовище StemPro (R) differentiation kits (Gibco). Для оцінки

ефективності диференціювання у хондрогенному напрямку або у хонреогенну лінію використовували забарвлення альціановим синім (1% в glacial acid solution) (Sigma-Aldrich). Для оцінки остеогенної диференціації, клітини були забарвлені Alizarin red S (Sigma-Aldrich), що специфічно забарвлює позаклітинний кальцій у жовто – червоний колір. Для оцінки адипогенної диференціації, клітини були забарвлені Oil Red O (Sigma-Aldrich) котрий реагує із нейтральними жирами, та забарвлює їх у червоний колір. Результати дослідження первинних культур МСК пуповини людини, одержаних методом експлантів, виявили здатність диференціюватися у мультилінійному напрямку *in vitro* (остеобласти, хондроцити, адипоцити), що, разом з результатами імунофенотипування, свідчить про відповідність цих клітин мінімальним критеріям МСК людини.

Оцінка метаболічної активності культури МСК

У чашку Петрі (d=35mm) з клонами первинної культури МСК у середовище об'ємом 2,5 мл додавали 375 мкл розчину МТТ (концентрація 5 мг/мл) і інкубували 4 години. Після чого середовище аспірували, додавали 1 мл ДМСО до розчинення кристалів. ДМСО з розчиненими кристалами переносили в 96-лунковий планшет, по 100 мкл в лунку. Оптичну густина, при довжині хвилі 540 нм визначали за допомогою аналізатора Epsilon Research Limited MCC/ 340 використовуючи у якості контролю ДМСО. Оптична густина розчину прямо корелює з кількістю метаболічно-активних клітин.

Статистична обробка даних

Для оцінки даних малих вибірок був застосований критерій Бейлі, який був розроблений для дослідження малих вибірок, якщо повністю невідома структура генеральної сукупності [102].

Дані експериментів, де це було можливо, подано у вигляді середнього арифметичного \pm стандартне відхилення, якщо не вказане

інше. Кількість повторів незалежних експериментів вказана в тексті та під рисунками.

Для аналізу статистичної достовірності відмінності у кількості клітин між різними експериментальними групами в аналізах зростання культури використовували критерій Манна - Уїтні (при $p < 0,05$). Для аналізу морфометрії розраховували дисперсію та коефіцієнт варіації. Достовірність різниці по цих показниках визначали за допомогою критерію Манна-Уїтні (при $p < 0,05$). Статистичний аналіз даних виконували за стандартними формулами та за допомогою програми Microsoft Excel.

2.3 Особливості дизайну експериментів

Визначення напрямів досліджень

Для визначення можливих напрямків досліджень в області використання терапевтичних МСК на тлі виснажених систем детоксикації ми розглянули вплив терапевтичної дози, спосіб трансплантації клітин, кількість процедур трансплантацій МСК, відмінності між алогенними і ксеногенними МСК, відокремлювання екзогенних МСК і застосування тільки їх екзовезикул за допомогою альгінатного гелю; рекрутинг власних МСК за допомогою ін'єкції цитокіну SDF1 α , відмінності впливу МСК і кондиційованого середовища; відмінності у відповіді самців і самок, розвиток терапевтичних ефектів у тривалому часі.

Визначення моделі

Виявилося, що широко відома в літературі модель фіброзу печінки, опосередкованого дією чотирихлористого вуглецю, насправді лише початкова стадія каскаду розвиваються патологій. При тривалому навантаженні цим ксенобіотиком виснажуються захисні механізми

клітини, одним з яких є система глутатіону. В результаті в клітині накопичуються реактивні форми молекул, які і руйнують її. На тлі тривалого навантаження відбувається перевантаження і пошкодження систем внутріклітинної детоксикації, що призводить до порушення діяльності в першу чергу печінки, а згодом і інших органів, що, в свою чергу, призводить до розсинхронувannya і розбалансування їх спільної роботи. У якийсь момент відбувається якісний перехід, за яким вже неможливо самостійне повернення "до вихідного стану". Отже при певному збільшенні навантаження її можна розглядати, як модель усередненого хронічного системного ураження організму. Згодом це було викладено в нашій статті [98].

Вибір реципієнта

Численні успіхи використання різних стовбурових клітин натикаються на обмеження, пов'язані з небезпекою індукції пухлинного процесу у випадках наявної для цього схильності. Для досліджень тонких механізмів дії МСК, така схильність буде безумовно перешкодою. Але для вивчення самої можливості терапевтичної дії це буде додатковою можливістю швидше виявити можливі небажані індукції. З одного боку, на сучасному етапі не завжди можна передбачити "наявну схильність", з іншого боку кількість пацієнтів зі схильністю до розвитку онкології досить велике і постійно росте. При системних ураженнях в першу чергу реалізуються генетично детерміновані «спадкові схильності». У людини найбільш широко поширені судинні та онкологічні схильності, які обумовлюють перші дві причини смертності. Судинні ушкодження при введенні CCl_4 раніше були описані в літературі [103]. Що ж стосується пухлинних схильностей, то в описаних до цього часу дослідженнях з ураженням CCl_4 , таких досліджень не описано. При виборі реципієнта ми виходили з актуальності досліджень в умовах підвищеного ризику розвитку канцерогенезу. Наявна в нашому розпорядженні лінія ICR має

спадкову схильність до розвитку онкології: практично у всіх самок цієї лінії в кінці першого року життя (11-13 місяців) розвиваються карциноми. У певному сенсі це моделює той досить високий відсоток людей, також володіє спадковою схильністю до виникнення пухлин, яка реалізуються під впливом певних зовнішніх чинників. Ми свої дослідження проводили на самцях цієї ж лінії, у яких в нормі наявна схильність до пухлиноутворювання не реалізується.

Визначення параметрів об'єктивного контролю

Реалізуючи практичну модель, ми виходили з того, що явище «системного ураження» вже само по-собі є узагальнюючим і має на увазі гетерогенність станів. Порушення стосуються занадто великої кількості взаємопов'язаних процесів і механізмів, отже висока гетерогенність окремих параметрів була очікуваною. Тяжкість і характер порушень окремих органів при однаковому впливі у експериментальних тварин, як і у людей, носить індивідуальний характер навіть всередині однієї лінії, оскільки залежить від дуже багатьох чинників, включаючи сезонність. Попри все згадане залишається можливість оцінки загальних тенденцій.

Описувану тут модель ми використовували для попереднього вивчення інтегрального дії терапевтичних клітин. Особливістю системи реципієнт – трансплантовані клітини полягає в суперпозиції варіабельності станів обох компонентів системи. З одного боку тяжкість досліджуваної патології характеризується гетерогенним ступенем пошкодження різних органів у різних особин навіть в межах однієї лінії тварин, причому ця варіабельність підвищується в залежності від ступеню тяжкості загального ураження. З другого боку стовбурові клітини, що були застосовані для трансплантації є гетерогенною популяцією різних стовбурових клітин, склад і стан клітин якої змінюється в залежності від стану особини донора і ще низки неврахованих факторів.

При постановці даної моделі ми не ставили собі за мету детальне вивчення механізмів і характеру порушень, а лише отримання явно реєстрованого системного ураження. Для об'єктивного контролю були обрані загальна патоморфологічна оцінка, зміна відносної ваги окремих органів по відношенню до загальної маси, а також такі показники крові, як активність аланілтрансферази (АЛТ), що опосередковано свідчить про руйнування гепатоцитів; активність аспарагінтрансферази в крові (АСТ), що опосередковано свідчить про руйнування кардіоміоцитів; баланс АЛТ/АСТ, що уточнює саме які клітини більш руйнуються; швидкість осаду еритроцитів (ШОЕ), що опосередковано свідчить про запалення; кількість лімфоцитів у крові, що є опосередкованим показником активності імунної системи і МТТ-тест клітин білої крові, який свідчить про їх метаболічну активність. Зміни кожного з цих параметрів не може однозначно свідчити на користь тієї чи іншої патології, проте їх зміна по відношенню до контролю свідчать на користь наявності певних реакцій організму на трансплантацію МСК. Крім того досліджувалась гістологічна характеристика органів, як найбільш об'єктивний і наочний контроль руйнівних і відновлювальних процесів в тканинах. В якості інтегральної оцінки був використаний індекс виживаності, зменшення якого свідчить про збільшення ступеню патології, а його збільшення попри всього подовжує час і підвищує шанси на одужання.

Особливості планування експериментів

План експериментів був складений таким чином, щоб була можливість перевірити найбільшу кількість варіантів, задіявши при цьому розумно-мінімальну кількість лабораторних тварин. Після формування моделі, в процесі чого частина тварин гинула, тварин що залишилися випадковим чином ділили на групи в середньому від 3 до 6 особин в групі в залежності від стадії дослідження. Для нівелювання змін, пов'язаних з погодою, годуванням, сезоном і т. п., кожен рознесений за

часом експеримент містив свою групу контрольних тварин. Крім цього експерименти планувалися з таким розрахунком, щоб кожний наступний експеримент по можливості містив варіант аналогічний попередньому.

На кожен експеримент з урахуванням тривалості самого експерименту (0-12 тижнів) і формування моделі патології (8-9 тижнів) йшло до 21 тижня. Експерименти проводилися послідовно з частковим перекриттям у часі. Не дивлячись на те, що одночасно проводилося 2-3 експерименту, на всі серії пішло 3,5 року. Для контролю сезонних змін на різних стадіях експериментів в різні періоди року в контрольні групи включалися і здорові тварини.

Визначення набору стовбурових клітин

Перенесення на людину випробувань, проведених на тваринах з використанням МСК людини, стикається з обмеженнями, пов'язаними з тим, що клітини людини для всіх тварин є ксеногенними. У той час МСК людини для самої людини є алогенними або в разі власних клітин – аутологічними. Тому вивчення відмінностей дії ксеногенних, алогенних і аутологічних МСК буде актуальною для всіх випробувань на тваринах, проведених з метою оцінки перспективності використання нових технологій для різних галузей медицини. У разі терапевтичного використання, МСК різного походження, включаючи МСК з драглів Вартона пуповини людини по відношенню до людини будуть алогенними, що не зберігається при різних випробуваннях цих клітин на тварин. У наших дослідженнях ми оцінювали всі три форми генетичного споріднення. В якості максимально наближених до аутологічних виступали сингенні фетальні МСК мишей (лінії ICR) від вагітних самиць того ж виводку. В якості алогенних ми використовували доступні нам клітини мишей ліній BALB і FVB. В якості ксеногенних були використані МСК з драглів Вартона пуповини людини.

Визначення способу трансплантації клітин

Для трансплантації клітин зазвичай вибирають внутрішньовенний, інтраназальний, інтраперитонеальний шляхи і введення безпосередньо в уражений орган. У наших дослідженнях ми порівнювали все, крім інтраназального. В результаті наших експериментів, в якості основного способу трансплантації конкретно для нашої моделі, був обраний інтраперитонеальний, оскільки давав можливість введення більшої кількості клітин в більшому обсязі, був технічно зручний у виконанні, і при наших обсягах матеріалу, що вводиться, мав меншу травматичність і інвазивність. Як і описано у інших дослідників, при будь-якому шляху введення клітин в нашій лабораторії основна їх частина практично відразу накопичувалась у легенях. В інших органах за даними мікроскопічного аналізу з використанням клітин з маркерним GFP білком спостерігалися лише поодинокі клітини і то нетривалий час. Одночасно при інтраперитонеальним введенні ризик розвитку легеневої або судинної емболії значно нижче, ніж при інших видах введення великої кількості клітин.

Підготовка моделі

Піддослідних тварин тримали на стандартному харчуванні. У віці одного місяця молодих самців мишей лінії ICR відсаджували в окремі клітини. Для уніфікації раціону тварин тримали тільки на комбікормах. В віці 8 тижнів, коли молодняк набирив вагу 27-29 гр. починали моделювати хронічне ушкодження печінки. Вводили 30 мкл 30% CCl_4 2 рази в тиждень протягом 12 тижнів. Після закінчення навантаження перед початком експерименту давали кілька днів на реабілітацію для гарантованого виведення CCl_4 з організму.

Процедури трансплантації

Підготовлені клітини в фізіологічному сольовому розчині вводили внутрішньовенно або інтраперитонеально в обсязі 100 мкл без будь-якої

додаткової підготовки тварин. Тварини були помічені на кінцівках, і кожній тварині присвоювали свій номер в рамках експерименту або варіанту. Після трансплантації клітин тварин тримали без обмеження доступу до води і їжі в тих же умовах, що і контрольних тварин.

Завершення експерименту

Після закінчення часу експерименту мишей декапітували. Кров збирали в пробірку для визначення біохімічних показників. При розтині органи фотографувалися, зважувалися і містилися в розчин формаліну. Все ретельно документувалось. При необхідності проводились мікроскопічні дослідження.

Обробка результатів

Як вже зазначалось, виживаність є важливим інтегральним показником при важких станах, оскільки в деяких випадках саме вона дає надію на відновлення. Щоб оцінити виживаність, експериментальні дані були об'єднані в загальну таблицю. Була розрахована виживаність у кожній окремої групи тварин. Оскільки в окремих експериментах, розділених часом, початковий рівень виживання був різним, до розрахунку бралась питома виживаність відносно контролю самовідновлення кожного експерименту окремо (Рис 2.1). Через невелику кількість тварин в кожній групі висновки можуть бути тільки оціночні.

Для адекватності моделі повино становить 75-85%

Дослід 11 9 нед	Формування ураження CCl ₄	12	5/26	81		
11	самовідновлення 9 нед	9	3/5	40	1	
11	FM 10 тис	7	2/5	60	1,5	
11	FM 100 тис	7	1/5	80	2	

100% = 60/40 %

Рис 2.1 Визначення питомої виживаності для кожного окремого досліді. За 100% приймається виживаність контролю самовідновлення.

Особливістю даного дослідження було те, що на кожен варіант експерименту було виділено всього від 3 до 5 тварин, проте були варіанти, які повторювалися в різних експериментах. Дані, отримані в усіх експериментах були об'єднані в загальний масив даних, який оброблявся із застосуванням техніки окремих вибірок з попеременною консолідацією даних. В якості простого інструменту для реалізації цього методу можуть бути використані останні версії електронних таблиць Microsoft або Google. Ми використовували останні. В результаті ми могли об'єднувати і фільтрувати дані за різними критеріями і бачити результат відразу з усіма додатковими параметрами в зручному для аналізу вигляді на заздалегідь підготовленій сторінці діаграм. Для візуалізації та аналізу був вибрано подання до вигляді хмари значень, де кожен елемент (точка на діаграмі) відповідає параметру однієї тварини. По осі Y відкладено значення у відповідних досліджуваного параметру величиною. Ось X ніякого значення не має, а дані по цій осі рознесені тільки для зручності візуалізації. Крім чисельних значень осі не підписувалися, оскільки для проведеного порівняння одного і того ж параметра це значення не має. Кожна діаграма відповідає одному контрольованому параметру (Рис 2.2).

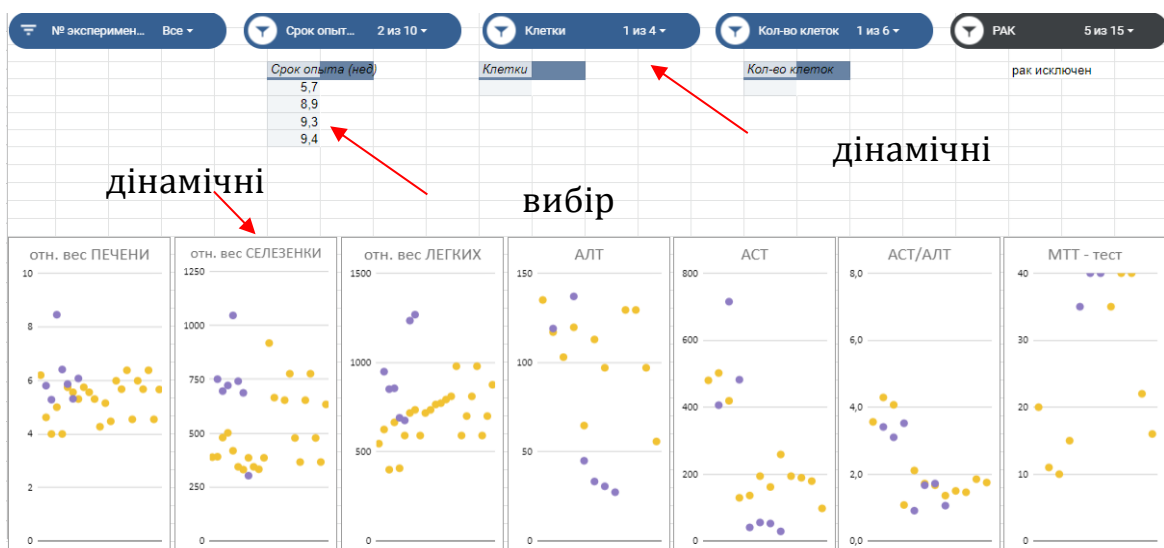


Рис 2.2 Схема сторінки аналізу консолідованих даних.

3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1 Розробка тваринної експериментальної моделі поліорганної дисфункції та її характеристика

3.1.1 Підбір параметрів інтоксикації

Для створення тваринної моделі еСПОД були використані миші лінії ICR з спадковою схильністю до канцерогенезу, як вказано в розділі матеріали і методи. На рисунку Рис 3.1 представлена схема еволюції перевірених варіантів.

10 мкл X 1 раз на тижень	2 тиж	4 тиж	6 тиж	8 тиж		15 тиж
15 мкл X 1 раз на тижень		4 тиж				
20 мкл X 1 раз на тижень	2 тиж	4 тиж	6 тиж	8 тиж	10 тиж	12 тиж 15 тиж
30 мкл X 1 раз на тижень		4 тиж	6 тиж	8 тиж		
20 мкл X 2 рази на тижень				8 тиж	10 тиж	
30 мкл X 2 рази на тижень				8 тиж		
35 мкл X 2 рази на тижень				8 тиж		
40 мкл X 2 рази на тижень				8 тиж		
35 мкл X 2 рази на тижень із збільшенням дози з урахуванням росту миші				8 тиж	10 тиж	12 тиж

Рис 3.1 Перевірені схеми і дози введення CCl_4 для отримання патологічного стану, відповідного системному ураженню із синдромом поліорганної дисфункції у мишей лінії ICR.

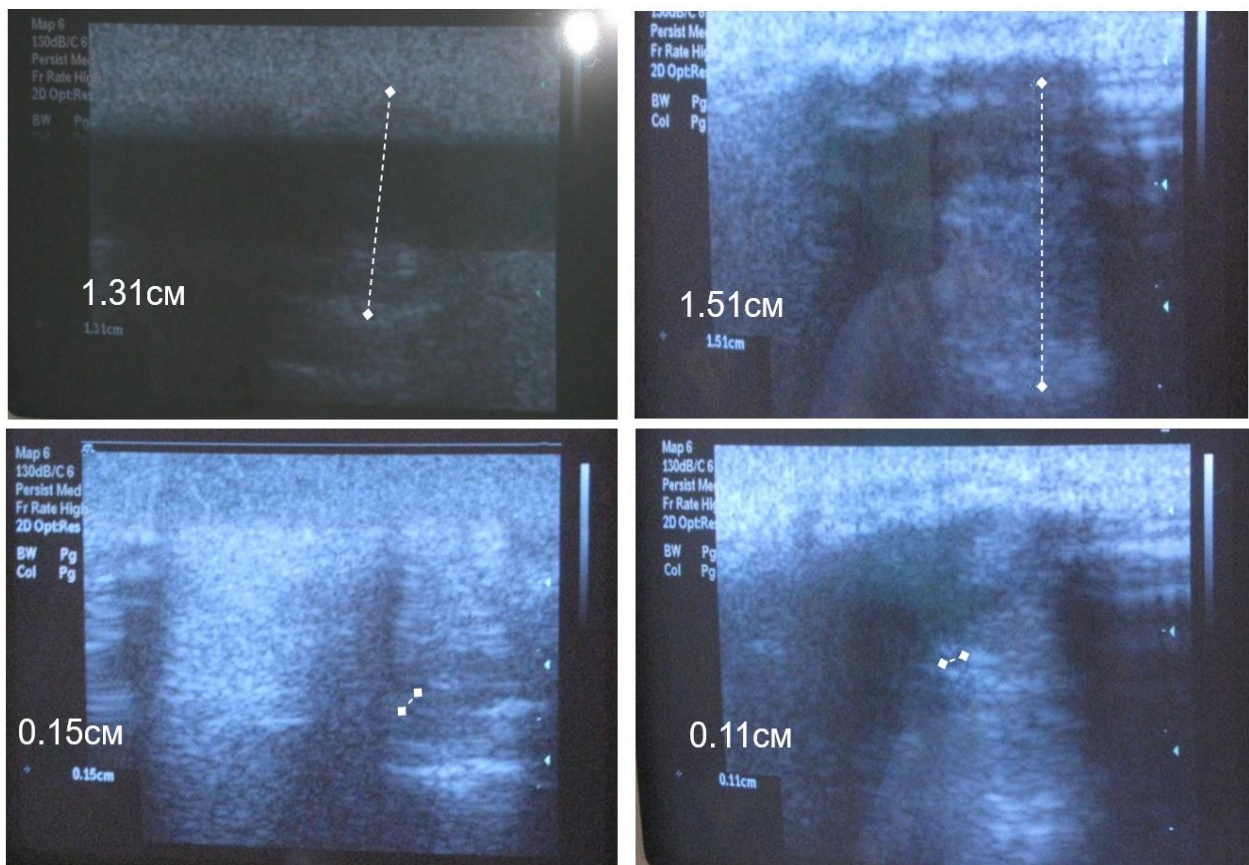
Спираючись на випробувану в відділі модель фіброзу печінки у щурів із застосуванням токсичного ураження, опосередкованого CCl_4 , були розроблені і перевірені початкові умови аналогічного ураження мишей для досягнення потрібної патології. Для пошуку оптимальної схеми

отримання системного ураження ми досліджували широке коло доз CCl_4 , частот його введення і тривалості експерименту.

3.1.2 Дослідження патоморфологічних змін у мишей під впливом тривалого навантаження CCl_4 .

За допомогою ультразвукового дослідження було показано, що в результаті токсичної дії CCl_4 , крім дисфункції печінки відбувається звуження *vena portae hepatis*, що ускладнює відтік венозної крові від непарних органів і, в свою чергу, може ускладнювати стан інших органів.

(Рис. 3.2)



а

б

Рис. 3.2 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).

Оцінку показників крові проводили в обраних умовах відтворенні еСПОД

Аналіз відмінностей дії системного ураження самиць в порівнянні із самцями по критерію виживаності показав, що самиці були більш чутливі до руйнівних ефектів, викликаних CCl_4 . (А, скоріш за все, і інших ксенобіотиків, що призводять до виснаженню систем детоксикації і оксидативному стресу) Під час формування системного ураження 20-ти самкам, 11 з них пали, що становило 55% на відмінність 20% для самців в тих же умовах (Таблиця 3.1).

Таблиця 3.1

Порівняна виживаність самців і самок мишей лінії ICR в умовах навантаження CCl_4

Досліди	Шифр групи	Тривалість, тижні	пало із всього тварин	% тварин, що вижили
Дослід 10	Формування ураження CCl_4 (САМЦІ)	12	2/10	80
Дослід 10	Формування ураження CCl_4 (САМИЦІ)	12	11/20	55

Було поставлено більше десяти незалежних експериментів. Найбільш результативною було визначено дозу 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.

3.1.3 Опис змін показників крові мишей із відтвореним еСПОД

Визначені параметри отримання моделі еСПОД були використані для

дослідження показників крові, як зазначено у матеріалах і методах. Для цього були сформовані дві групи мишей. В обидві групи входили 8-тижневі самці лінії ICR вагою 20 - 24 г, яким протягом 12 тижнів, два рази на тиждень інтраперітонеально вводили 30% масляний розчин CCl_4 з розрахунку 1 мкл на 1 г ваги тварини. Перша група виводилася з експерименту через 3 дні після останнього введення тетрахлорметана. У нас вона отримала шифр «Модель». Поява другої контрольної групи обумовлено характером планованих експериментів з вивчення дії різних агентів. У цю групу входили тварини, яким після закінчення введення тетрахлорметана вже більше нічого не вводилося. Цей варіант отримав шифр «Самовідновлення». На етапі розробки моделі ці тварини виводилися з експерименту через 8 тижнів після закінчення навантаження CCl_4 .

При аналізі моніторингових показників виявилось, що експериментальні тварини (хоча це були лінійні тварини, лінійність яких підтверджувалася фенотипическими проявами особливостей даної лінії), проявляли досить значну варіабельність за реакцією на CCl_4 . Одна група не витримувала навантаження CCl_4 і не доживала до запланованих 12 тижнів – терміну, при якій у більшості тварин розвивалося добре виражене ураження основних органів. Станом на 12 тижнів навантаження CCl_4 , в силу особливостей лінії, у деяких тварин індукувався канцерогенез. Включати в загальний аналіз біохімічних показників цю групу ми врахували недоцільним, оскільки наявність розвиненої пухлини істотно зрушує фізіологічний профіль всіх систем організму. Ще одна група тварин характеризувалася недостатніми резервами для самовідновлення, щоб дожити до кінця виділених 8-10 тижнів після закінчення навантаження CCl_4 . Решта тварин мала приблизно однаковий ступінь ураження різних органів. Але і серед них теж можна було умовно

виділити ще дві підгрупи за ступенем ураження і можливостям самовідновлення. Це добре помітно при аналізі рівнів АСТ і АЛТ (Рис 3.3).

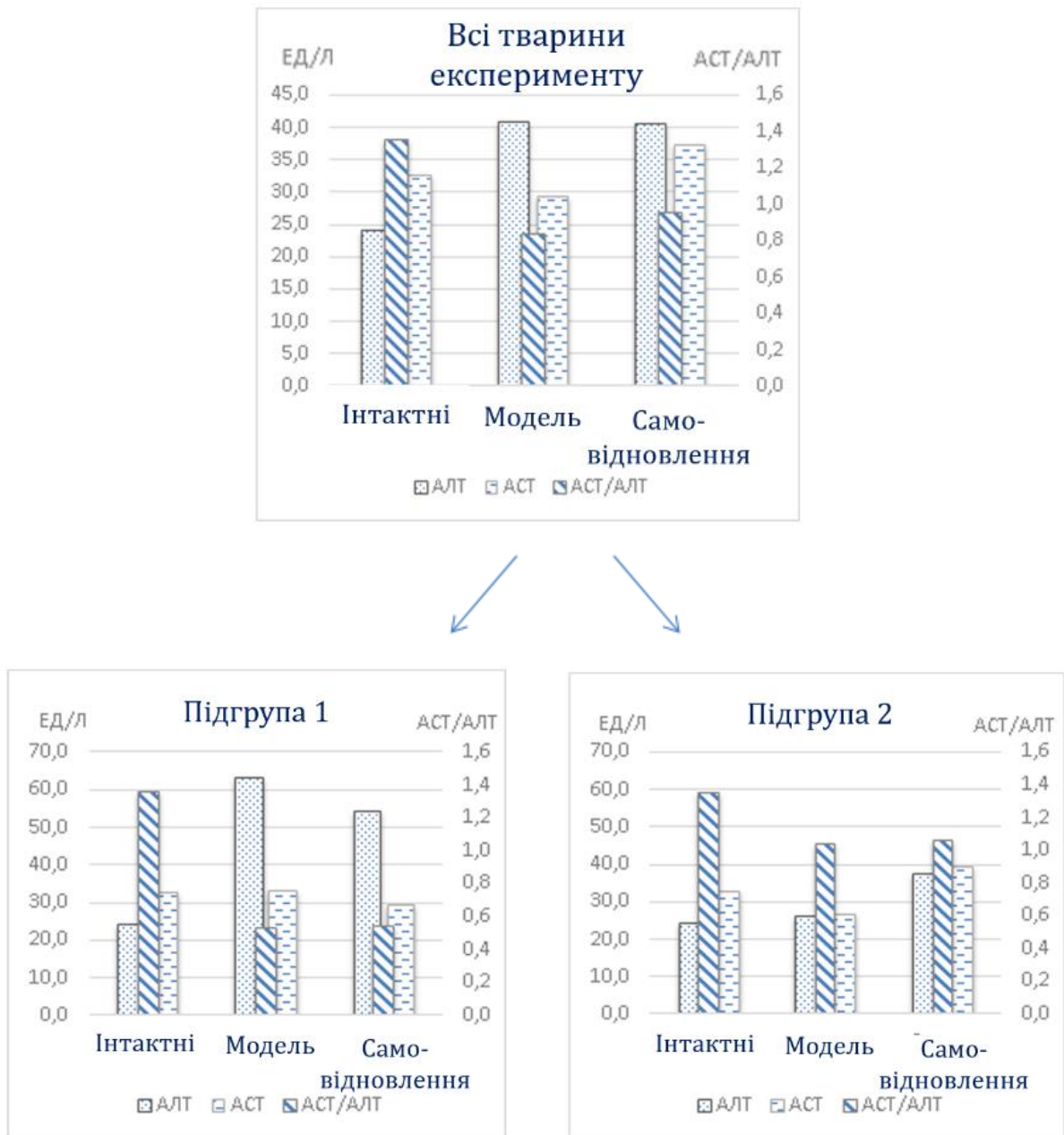


Рис 3.3 За вмістом діагностичних амінотрансфераз в крові тварин в рамках одного експерименту можна виділити два види реакції – при доміантному ураженні печінки (Підгрупа 1) і при більш рівномірному ураженні різних органів (Підгрупа 2)

У першій підгрупі було відзначено сильне ураження печінки, яке практично не змінилося після 8 тижнів самовідновлення. Друга група складалася з тварин, які також мали дистрофічні зміни в печінці, але масового руйнування клітин печінки не було.

Загальна картина змін внутрішніх органів шляхом оцінки їх маси також демонструє індивідуальні істотні відмінності в чутливості до тетраклориду вуглецю. Так за розміром селезінки - первинного органу імунної системи і частіше за інших, що реагують за розмірами, це можна розглядати як високу неоднорідність розміру селезінки при самовідновленні. (Рис 3.4).

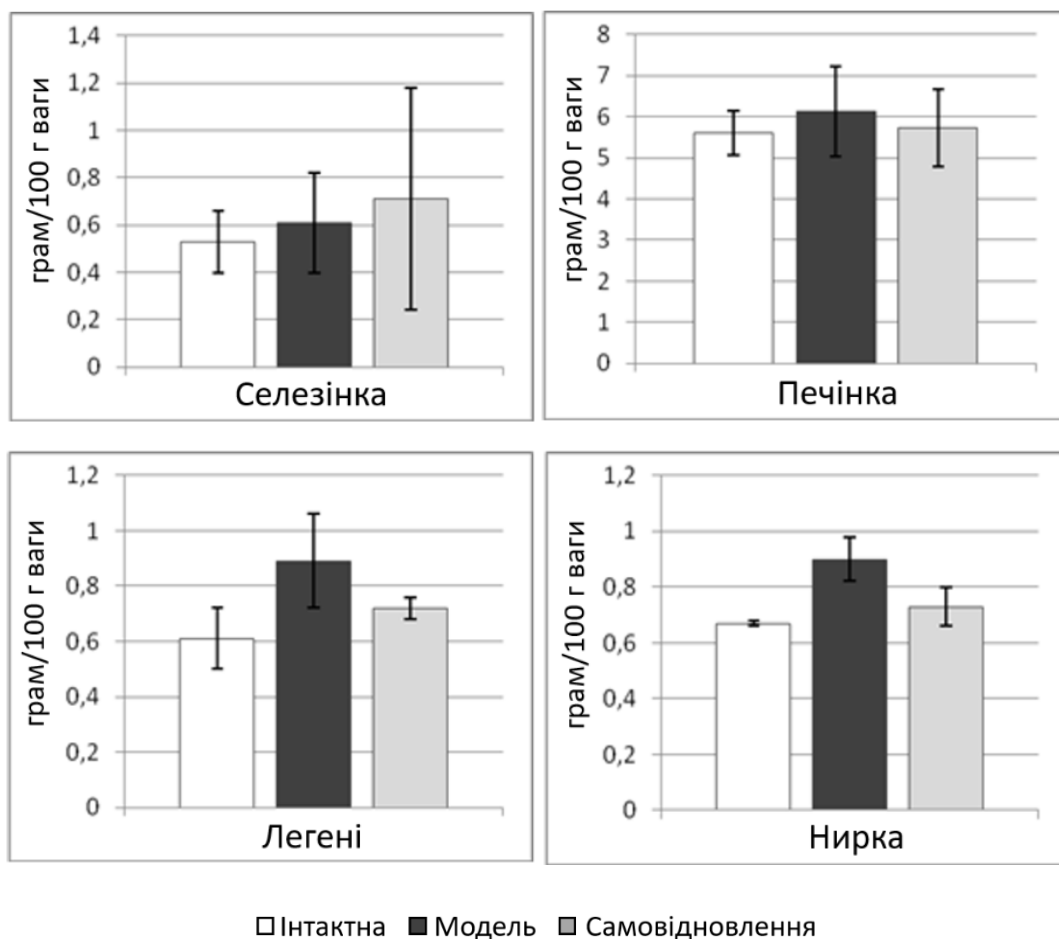


Рис 3.4 Зміна відносної ваги органів (грам/100г ваги) у мишей контрольних і експериментальних груп.

Аналіз показника триваючого запалення – швидкості осадження еритроцитів (ШОЕ) (Рис 3.5) вказує на запальну реакцію, яка триває і через 8 тижнів після закінчення введення тетрахлориду вуглецю. Процес пошкодження органів може бути доведений до будь-якого рівня, продовжуючи вводити CCl_4 або припинивши навантаження. Але тільки після 10-12 тижнів введення CCl_4 , процес системного ураження розвивається до критичної стадії – своєї незворотності.

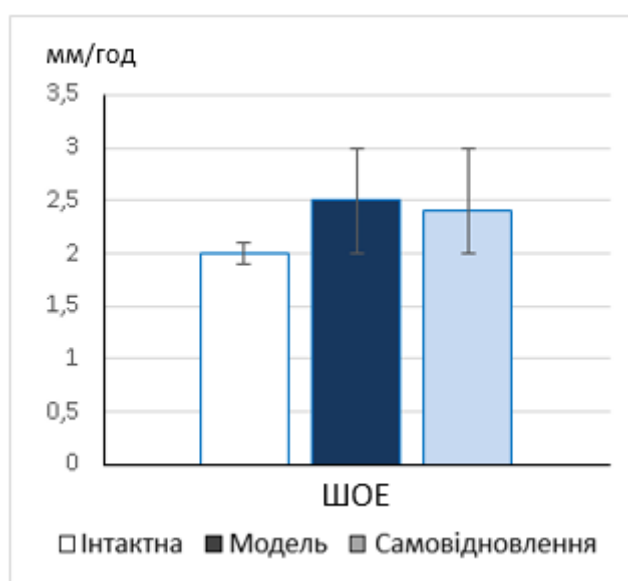


Рис 3.5 Зміна швидкості осідання еритроцитів (ШОЕ) у мишей контрольних і експериментальних груп.

Показники окремих складових фракцій білої крові при такому важкому ураженні з'явилися занадто гетерогенними і тому неінформативними, але інтегральний показник – абсолютна кількість лейкоцитів, демонструє, що патологічний процес триває і після припинення введення CCl_4 . При спостережуваних змінах в органах можна було б очікувати високий рівень лейкоцитів вже на стадії формування моделі. Однак невелика зміна їх кількості до 12-го тижня CCl_4 -навантаження, і різке збільшення їх кількості після закінчення

навантаження CCl_4 свідчить про пригнічення захисної реакції організму під впливом CCl_4 (Рис 3.6). Після припинення ін'єкцій CCl_4 спостерігається часткове відновлення захисної реакції організму, що супроводжується значним збільшенням кількості білих кров'яних клітин.

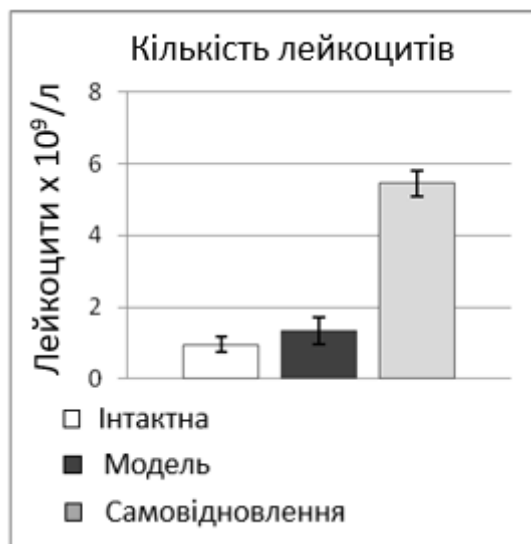


Рис 3.6 Зміна кількості лейкоцитів у мишей контрольних і експериментальних груп.

При короткостроковому (2-4 тижні) самовідновленні (жовтий маркер) підшлункова залоза збільшена. Імунна система перевантажена. Триває розвал гепатоцитів (АЛТ) а в деяких випадках і кардіоміоцитів (АСТ / АЛТ). У крові спостерігається підвищений вміст лейкоцитів, при цьому рівень неактивних з них надто високий (МТТ-тест) (Рис 3.7).

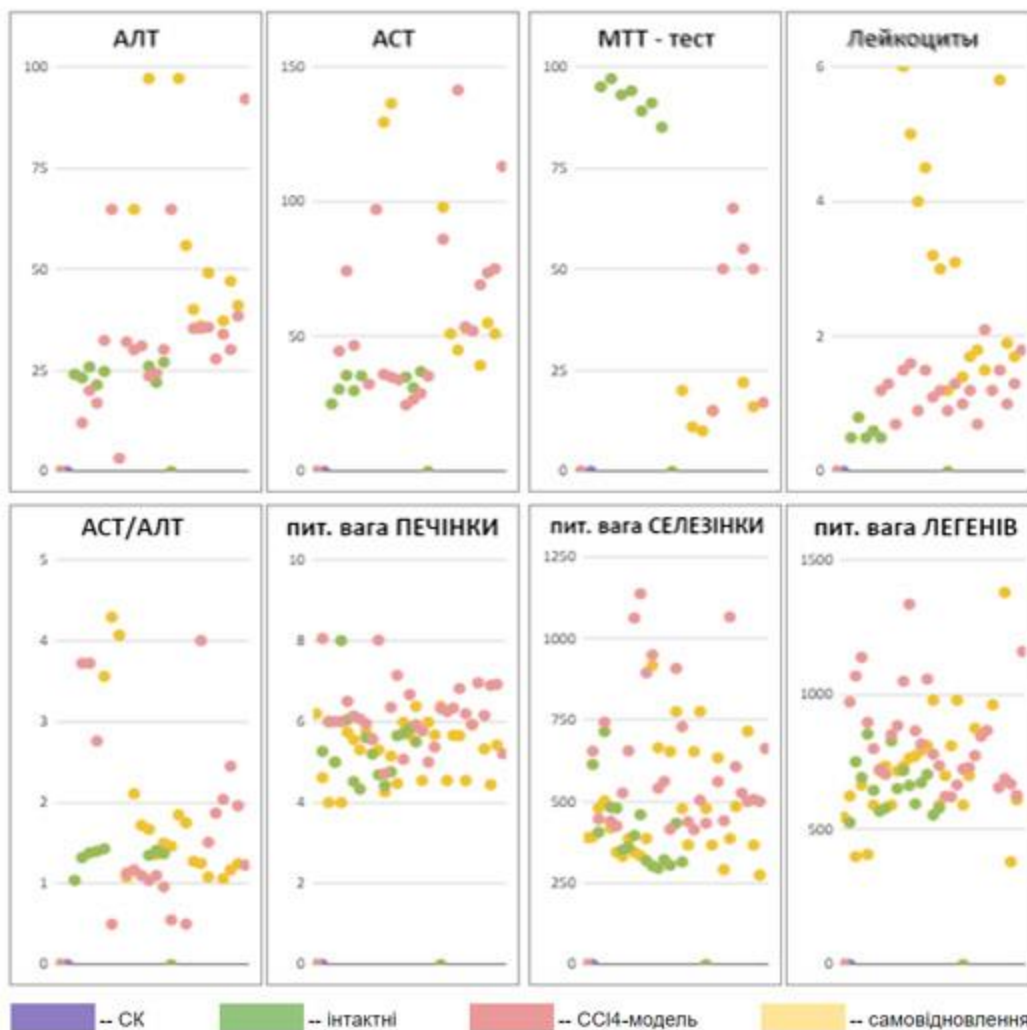


Рис 3.7 Діаграма розподілу контрольованих параметрів для консолідованих груп здорових мишів (зелений) мишей із еСПОД через 3-4 доби після закінчення навантаження на момент закінчення ССl₄ (рожевий) і груп самовідновлення на протязі 3-4 тижні після закінчення навантаження ССl₄ (жовтий).

Тут і далі по осі Х для зручності візуалізації рознесені окремі тварини, по осі Y – відкладені відповідні одиниці виміру. Кожна точка відповідає показнику однієї тварини.

При тривалому (7-9 тижнів) самовідновленні (жовтий маркер) тварин з еСПОД можна розділити на дві підгрупи - ті у яких розміри

органів нормалізуються, і ті, у яких вони залишаються збільшеними. Помірно завищений рівень АЛТ і АСТ свідчить, що апоптичні явища ще тривають, але не носять вибуховий характер. Підвищена кількість лейкоцитів в крові свідчить на користь триваючого системного запалення. Виходячи із МТТ-тесту, серед виявлених лейкоцитів спостерігається високий рівень фізіологічно неактивних, що свідчить на користь виснаженості імунної системи (Рис 3.8).

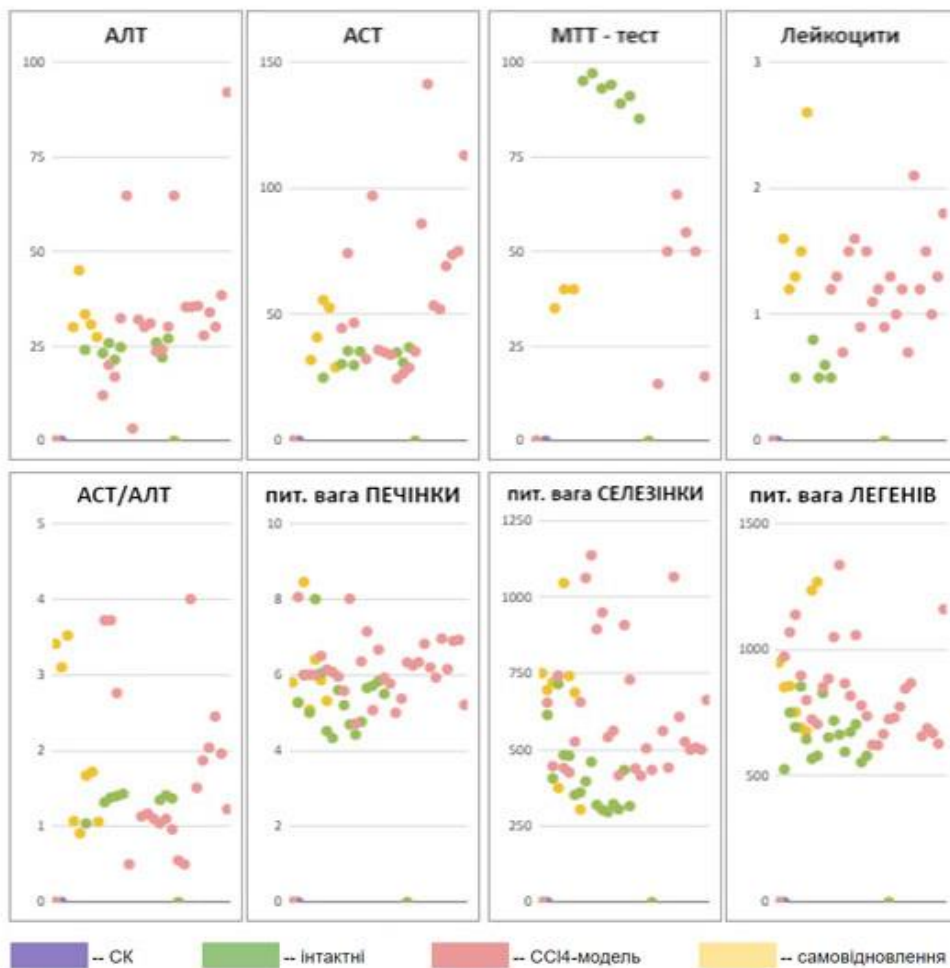


Рис 3.8 Діаграма розподілу контрольованих параметрів для консолідованих груп здорових мишей (зелений) мишей із еСПОД через 3-4 доби після закінчення навантаження на момент закінчення CCl_4 (рожевий) і груп самовідновлення на протязі 7-9 тижнів після закінчення навантаження CCl_4 (жовтий).

3.1.4 Опис патологічно-морфологічних змін мишей із відтвореним еСПОД

Патологічно-морфологічний опис підтверджує серйозні ураження більшості органів і систем життєзабезпечення. Найбільш разючі зміни стосуються печінки, легенів і підшлункової залози. Остання росте і часто приростає до шлунку. У печінці спостерігаються ознаки зернистості, жирової дистрофії гепатоцитів, гострої венозної гіперемії, ущільнення і наявності тупих країв. Відзначається ущільнення і наявність гострої гіперемії селезінки; збільшення щільності нирок, явно виражена гіперемія і збільшення легких. У групі самовідновлення тварин протягом 8 тижнів були відзначені ті ж зміни органів, характерні для моделі, але іноді з меншим ступенем розвитку змін (Таблиця 3.2), що говорить про часткове самовідновлення. Тут слід мати на увазі, що до закінчення експерименту в групі самовідновлення дожили найміцніші особини.

Без видимих змін залишився тільки серцевий м'яз. Стан мозку не оцінювався.

Таблиця 3.2

Усереднений опис стану деяких внутрішніх органів мишей, що були використані в роботі (контрольний і експериментальний).

Група	Контроль – здорові тварини	«Модель» – системні поразки (після 12-тижневого циклу ін'єкцій CCl ₄)	Самовідновлення (через 3 тижні після припинення циклу ін'єкцій CCl ₄)
Печінка	У нормі печінка коричнева, однорідна, гладка, середньої щільності, краї гострі.	Візуально печінка блідо-коричнева, збільшена, структура зерниста, щільна, краї тупі.	Візуально печінка блідо-коричнева, збільшена, будова грубозерниста, щільна, краї тьмяніють, ознаки жирової дегенерації.
Селезінка	У нормі селезінка темна бордового кольору, правильної форми, середньої консистенції, гладка.	Візуально селезінка бордового кольору, збільшена, щільна, шорстка, з крововиливами.	Візуально селезінка бордового кольору, збільшена, щільна, з крововиливами.
Легені	Зазвичай світло-рожевий, повітряний, правильної форми.	Візуально світло-сірувато-коричневий колір, нормального розміру, зернисто-пухкий.	Візуально світло-сіро-коричневий колір, збільшений, пухкий, м'який за консистенцією, деформований.
Шлунок, підшлункова залоза, брижові лімфовузли	У нормі шлунок не деформується, підшлункова залоза нормального розміру, брижові лімфовузли не збільшуються.	Шлунок деформується зарослою підшлунковою залозою, брині лімфовузли збільшені.	Шлунок деформується зарослою і часто зарослою підшлунковою залозою, брині лімфовузли збільшені.

3.1.5 Дослідження патоморфологічних змін в печінці

Гістологічна картина печінки модельних мишей (ін'єкції CCl_4 мишам протягом 12 тижнів) характеризується вираженими змінами загальної структури з наявністю дрібновузлового перебудови тканини і незначними фіброзними змінами строми у вигляді збільшеної кількості колагенових волокон в області порталних трактів. Визначається дисконплектація 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 помірною вакуольної і жирової дистрофії. Ядра печінкових клітин збільшені за рахунок набряку, виглядають просвітленими, загальна кількість ядер зменшено. 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 3.9, Рис 3.10)

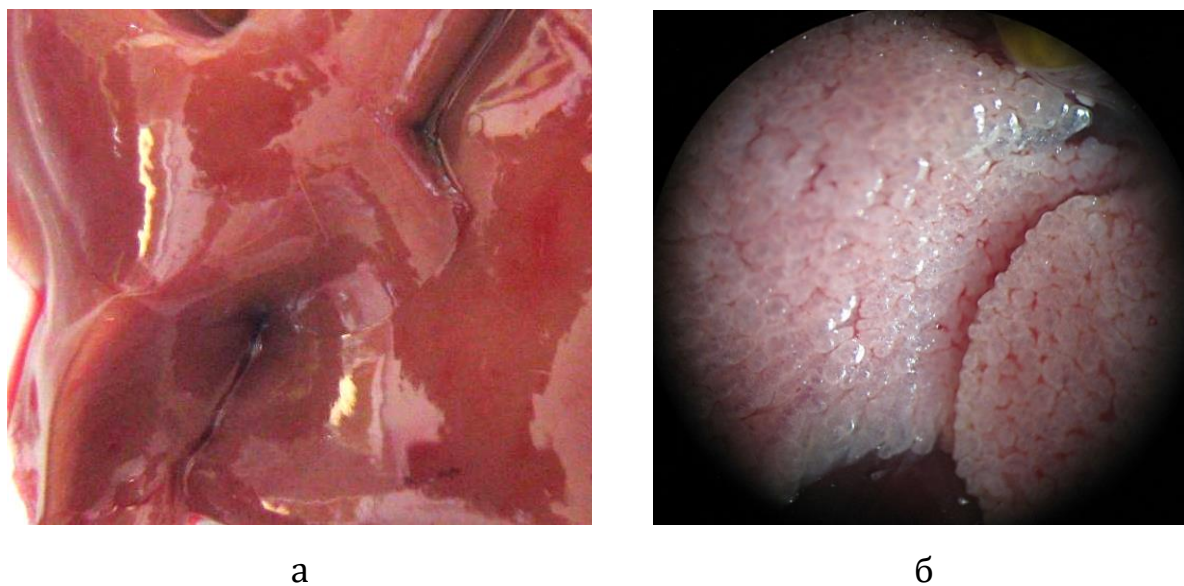


Рис 3.9 Макрофотографія порівняння загального вигляду поверхні печінки здорової миші (а) і миші після 12 тижнів навантаження CCl_4 (b).

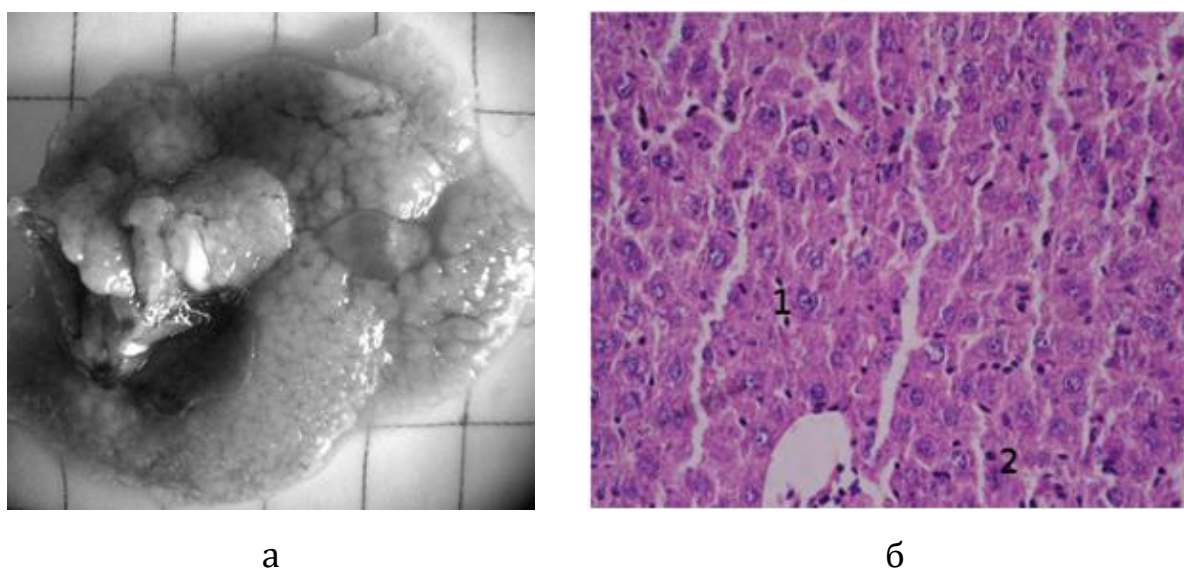


Рис 3.10 Загальний вигляд (ліворуч) і мікрофотографія (праворуч, фарбування гематоксиліном і еозином, $\times 400$) ураженої печінки в результаті ін'єкцій мишам CCl_4 протягом 12 тижнів. Альтеративно-дегенеративні зміни. Дисконплектація печінкових балок (1). набряк, втрата полігональної форми гепатоцитів. Ядра гепатоцитів набрякли (2).

Морфологічна будова неушкодженої печінки

Гістологічне дослідження виявляє печінкові дольки, що складають паренхіму інтактної печінки. В центрі часточек розташована центральна вена, а на периферії - печінкові тріади. Від тріад до центральної вени в радіальному напрямку знаходяться печінкові балки, що складаються з гепатоцитів, які мають полігональну форму з оксифільною цитоплазмою, одним-двома ядрами з декількома ядришками, які добре сприймають основні барвники. Між балками розташовані синусоїдальні капіляри, що йдуть в напрямку центру дольки. У перисудинному просторі між синусоїдальними капілярами і печінковими балками (простір Діссе) визначаються зірчасті клітини Купфера (Рис 3.11).

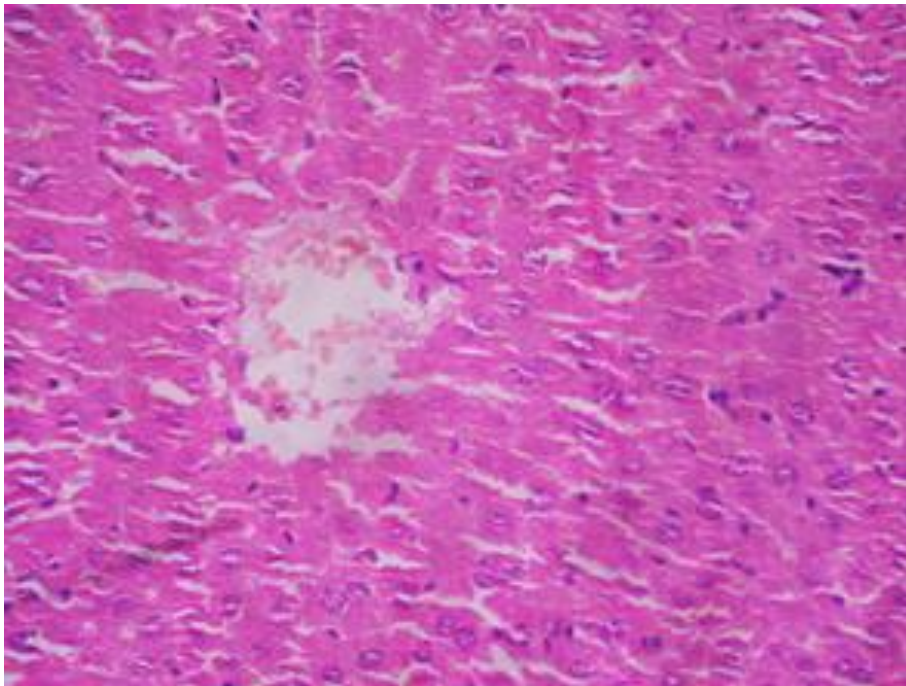


Рис 3.11 Мікрофотографія печінки здорової миші.

Фарбування гематоксиліном-еозином. x400

Морфологічна будова печінки після 3х тижнів самовідновлення після пошкодження печінки тетрахлоридом вуглецю

Гістологічна картина печінки характеризується вираженими

змінами загальної структури з наявністю дрібнодузлової перебудови тканини із злегка вираженими фіброзними змінами стромы у вигляді підвищеної кількості колагенових волокон в порталних трактах. Визначається дисконфлювання печінкових балок з наявністю змінних зон (зон альтерації), гепатоцити втрачають полігональну форму, збільшуються в розмірах через набряки. Цитопlasма гепатоцитів трохи просвітлена за рахунок невеликих вакуолів, в основному в центральних частинах печінкових часточек, що свідчить про помірно виражену вакуольну і жирову дистрофію. Ядра клітин печінки збільшуються за рахунок набряків, виглядають просвітленими (див помітку на рис), загальна кількість ядерць зменшується. Центральні вени, судини триад розширені, повнокровні. Міжбалочні пазухи нерівномірні із зонами звуження і розширення. Спостерігається гіперплазія клітин Купфера. Наявна виражена дифузна розсіяна сегментована лейкоцитарна інфільтрація паренхіми печінки (Рис 3.12).

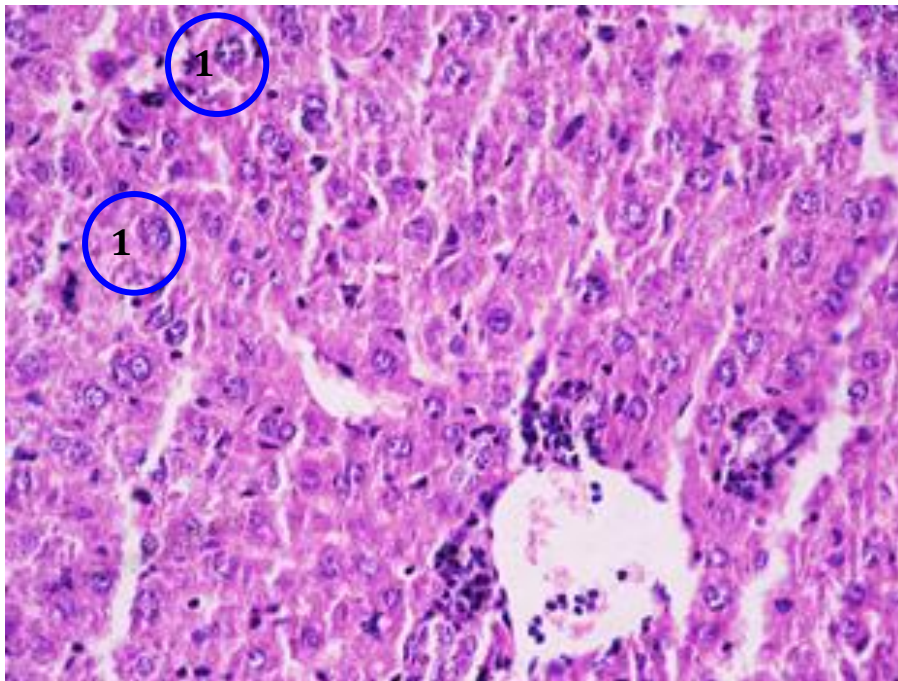


Рис 3.12 Мікрофотографія печінки миші після 3х тижнів самовідновлення після ураження CCl_4
Фарбування гематоксилін-еозин. $\times 400$

3.1.6 Дослідження патоморфологічних змін в селезінці

Морфологічна будова селезінки інтактної миші

У здорових тварин контрольної групи, на гістологічних препаратах забарвлених гематоксиліном і еозином, виявлено паренхіму селезінки, яка складається з червоної і білої пульпи, пронизана трабекулами. Трабекули схожі на тонкі тяжі, направляються від капсули. Трабекули утворені сполучною тканиною, яка містить переважно волокнисті структури між якими розташовані гладкі міоцити.

У здорових тварин контрольної групи є певне нормальне співвідношення білої і червоної пульпи, проявляється приблизно однакове їх співвідношення. Кількість сполучної тканини мінімально. (Рис 3.13 а)

Біла пульпа представлена середнього розміру фолікулами (лімфатичними вузлами) і періартеріальними піхвами. Фолікули – це округлої форми скупчення клітин, представлені переважно різними видами лімфоцитів. На периферії фолікулів розміщені пульпарні артерії, навколо яких - періартеріальні піхви. У фолікулах спростежується тонка щільна періартеріальна зона, що затемнена, та зі світлим гермінативний центром, темна мантийная зона (на периферії) і перехідна тонка маргінальна зона, яка містить кровоносні судини.

Загалом, для лімфатичних вузликів контрольної групи інтактних тварин характерна помірна кількість клітинних елементів. Менше клітин виявляється в гермінативному центрі і маргінальної зони, які виглядають просвітленими на препаратах (Рис 3.13 б).

Червона пульпа заповнює простір між трабекулами, формується селезінковими тяжами Більрот і венозними синусами, червоного кольору за рахунок депонування клітин крові, перш за все – еритроцитів.

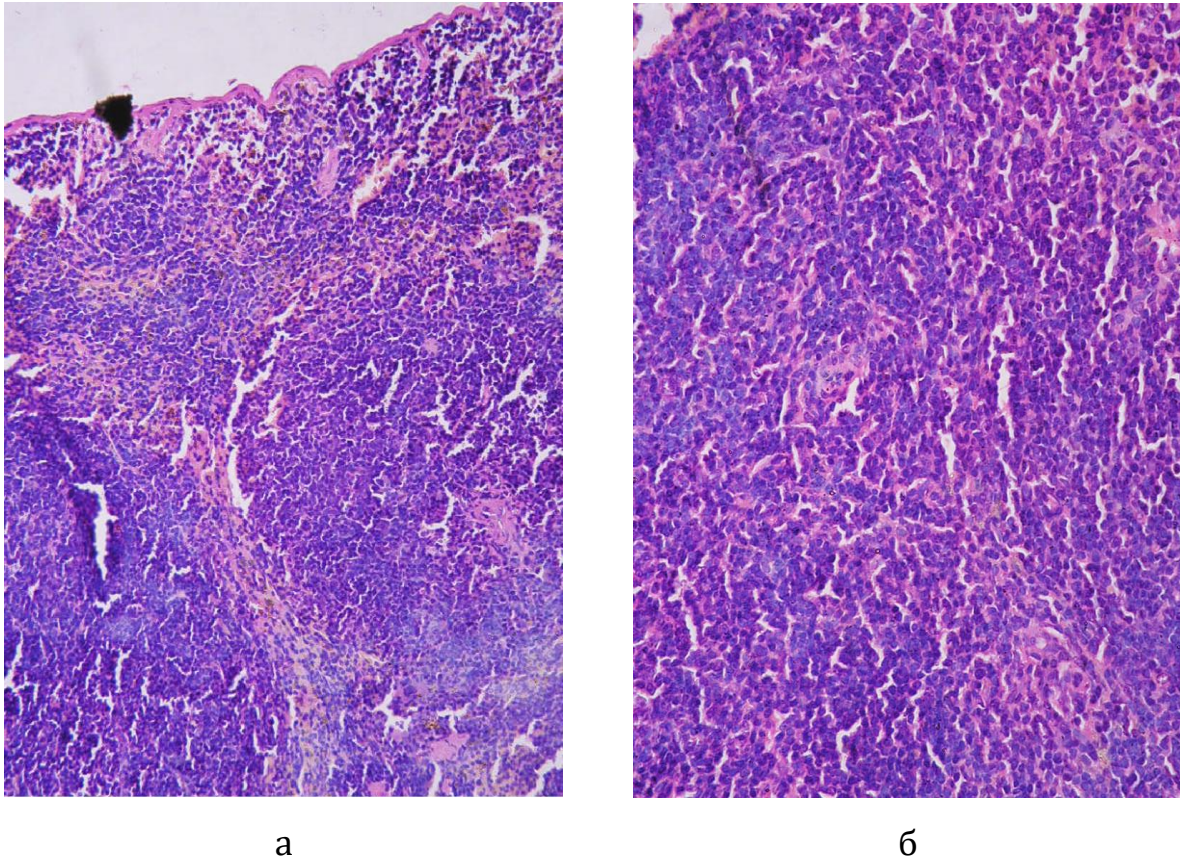
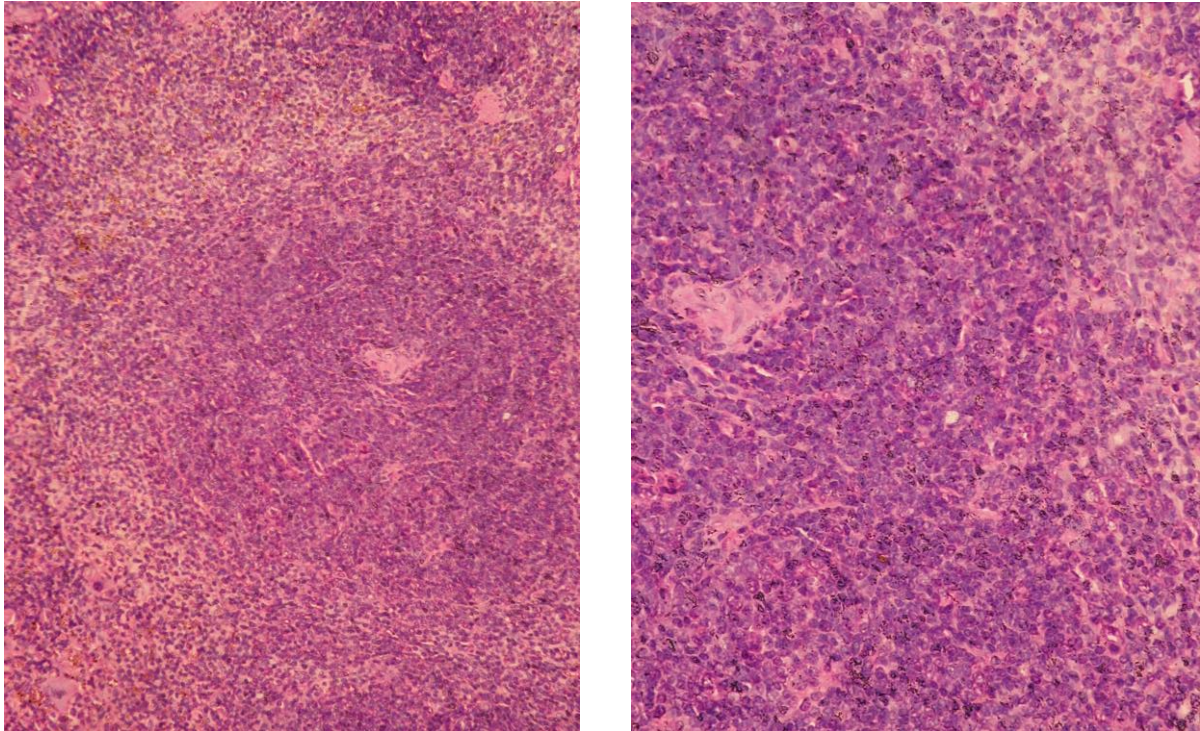


Рис 3.13 Мікрофотографія селезінки інтактної миші. Фолікул. Наявний світлий гермінативний центр і світла маргінальна зона. Нормальне співвідношення червоної і білої пульпи. Помірна кількість клітинних елементів. Забарвлення гематоксиліном і еозином, x200 (а), x 400 (б).

Морфологічна будова селезінки миші через 3 тижні самовідновлення після CCl_4 -ураження

У контрольних тварин залишених для самовідновлення після закінчення навантаження тетрахлорметаом на гістологічних препаратах забарвлених гематоксиліном і еозином, виявлено паренхіму селезінки, яка складається з червоної і білої пульпи, що пронизана трабекулами. Морфологічна картина селезінки цієї групи тварин свідчить про наявність ознак атрофії. У наявності порушення нормальних співвідношень червоної і білої пульпи в сторону зменшення кількості

білої. Фолікули зменшені в розмірах. (Рис 3.14 А) в них є незначні ділянки фіброзу. Відсутня чітка диференціація між зонами фолікула лімфатичні вузлики виглядають просвітленими за рахунок зменшення клітинних елементів. Червона пульпа, яка заповнює простір між трабекулами має ознаки фіброзу у вигляді поширення сполучної тканини (Рис 3.14Б).



А

Б

Рис 3.14 Мікрофотографія селезінки миші з моделлю системних уражень через 3 тижні після самовідновлення. Селезінка з ознаками атрофії. Відсутня чітка диференціація між зонами фолікула, незначні зони фіброзу. Лімфатичні вузлики виглядають просвітленими за рахунок зменшення клітинних. Гермінативний центр чітко не простежується. Порушено співвідношення червоної і білої пульпи в бік зменшення білої пульпи. Фолікули зморщені. Кількість клітинних елементів знижена.

Забарвлення гематоксиліном і еозином, x200 (а), x400 (б).

Таким чином у тварин залишених для самовідновлення після тривалого навантаження тетрахлорметаном тестується атрофія білої пульпи і зменшення кількості клітин лімфоцитарного ряду у тварин контрольної групи самовідновлення після тривалого навантаження тетрахлорметаном можливо вказує на виснаження імунної системи і міграцію клітинних елементів в уражені органи (печінку, легені, нирку)

3.1.7 Дослідження патоморфологічних змін в легенях

Паренхіма легені характеризується втратою нормальної альвеолярної гістоархітектоніки з дегенеративними змінами альвеолярних перегородок і бронхіол. Спостерігається спадання альвеол із зменшенням їх просвіту, міжальвеолярні септи потовщуються за рахунок клітинної інфільтрації і склерозу (Рис 3.15, Рис 3.16). 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.

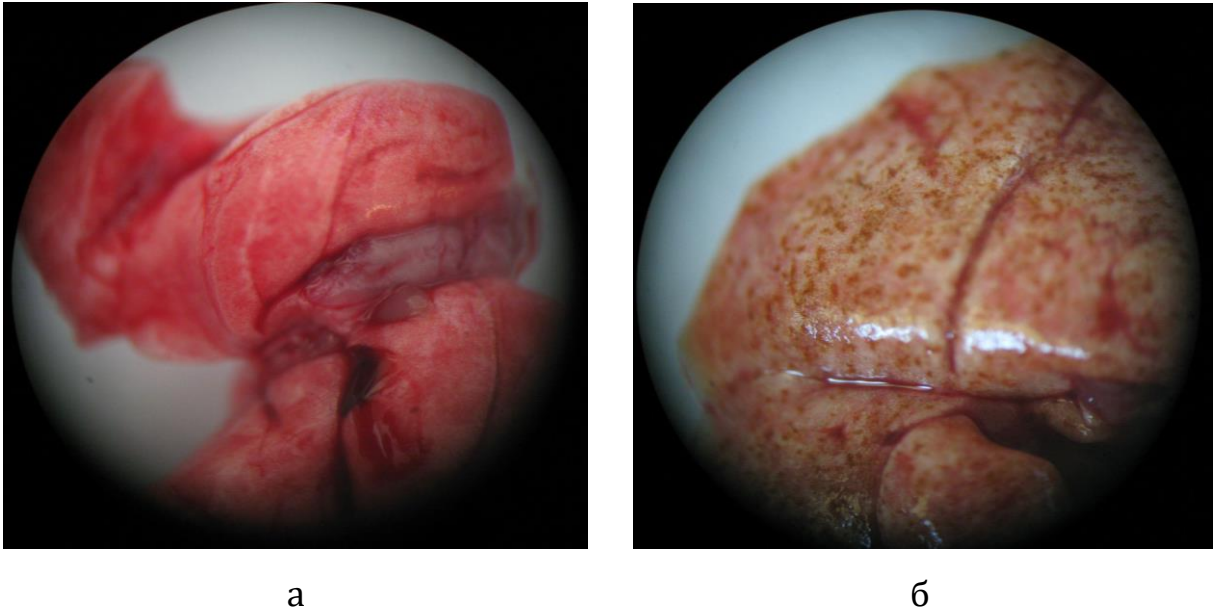


Рис 3.15 Макрофотографія порівняння легенів здорової миші (а) і миші після 12 тижнів навантаження CCl_4 (б).

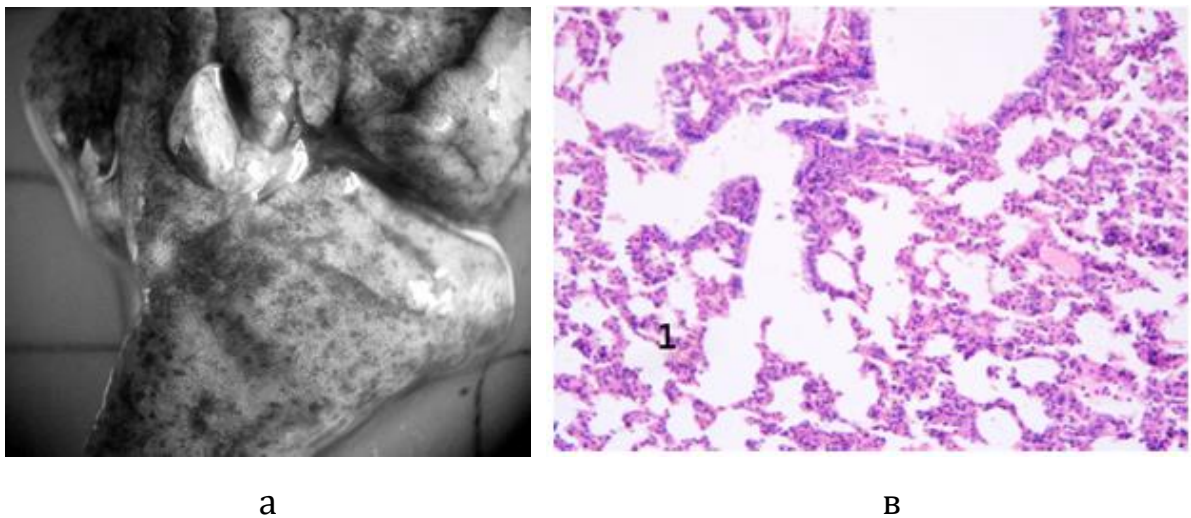


Рис 3.16 Загальний вигляд (ліворуч) і мікрофотографія (праворуч, фарбування гематоксиліном і еозином, x200) уражених легенів в результаті ін'єкцій мишам CCl_4 протягом 12 тижнів. Альтеративно-дегенеративні зміни. Втрата нормальної альвеолярної гістоархітектоніки з дегенеративними змінами альвеолярних перегородок і бронхіол. Спадання альвеол із зменшенням їх просвіту (1).

Морфологічна будова легенів інтактної миші

У здорових інтактних мишей контрольної групи, на гістологічних препаратах забарвлених гематоксиліном і еозином, виявляються бронхи середнього і малого калібру і респіраторний відділ легкого. Респіраторний відділ представлений респіраторними бронхіолами, альвеолярними ходами, альвеолярними мішечками. Спостерігається нормальна гістоархітектоніка альвеол (Рис 3.17). Міжальвеолярні перегородки (стіни альвеол) тонкі і утворені з пухкої сполучної тканини, яка містить капіляри, переважно еластичні волокна і помірна кількість клітинних елементів. Капіляри контактують з декількома альвеолами, які їх оточують. Просвіт альвеол, які мають вигляд пружних бульбашок зі слабо хвилястими контурами, вистелений одношаровим пласким епітелієм (Рис 3.18). Бронхи малого і середнього діаметру мають просвіт, що нагадує зірку. Стінка малого бронха утворена суцільною платівкою дворядного епітелію і тонкої м'язової платівкою. Просвіт бронха середнього калібру вистелений суцільним шаром багаторядного миготливого епітелію, стінка такого бронха має добре розвинений шар гладких міоцитів, навколо якого виявляють острівці еластичного або гиалинового хрящів (Рис 3.17, Рис 3.18, Рис 3.19).

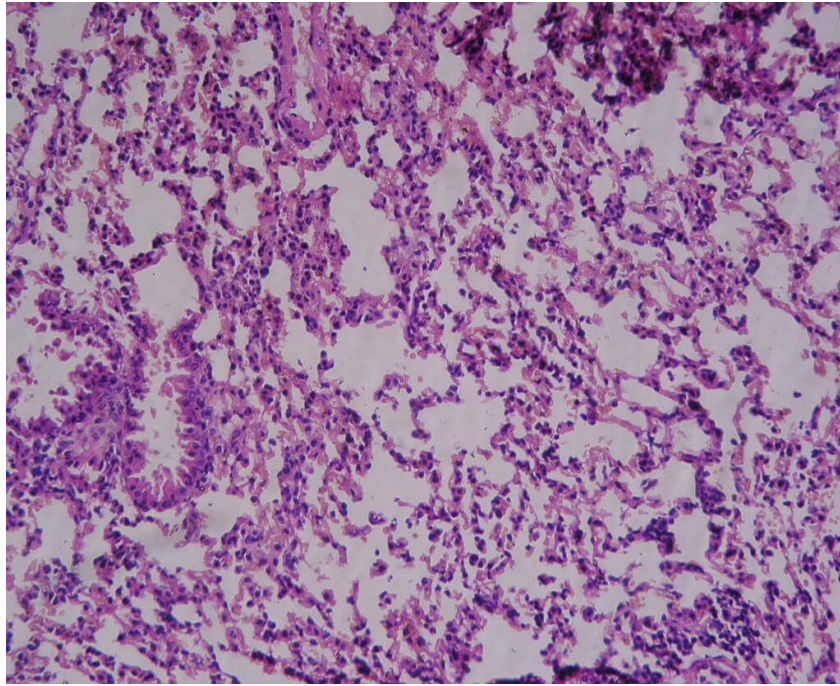


Рис 3.17 Мікрофотографія легенів інтактної миші. Нормальна альвеолярна гістоархитектоніка. Забарвлення гематоксилином і еозином, x 200

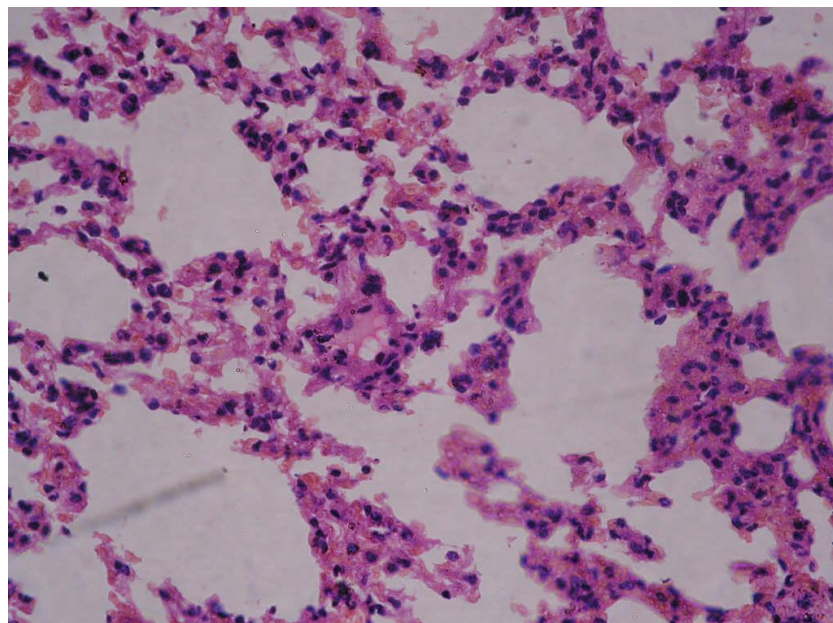


Рис 3.18 Мікрофотографія легенів інтактної миші. Альвеоли мають вигляд пружних бульбашок зі слабо хвилястим контурами. Міжальвеолярні перегородки (стіни альвеол) тонкі і утворені з пухкої сполучної тканини, яка містить капіляри, переважно

еластичні волокна і помірна кількість клітинних елементів.
Забарвлення гематоксилином і еозином, x 400

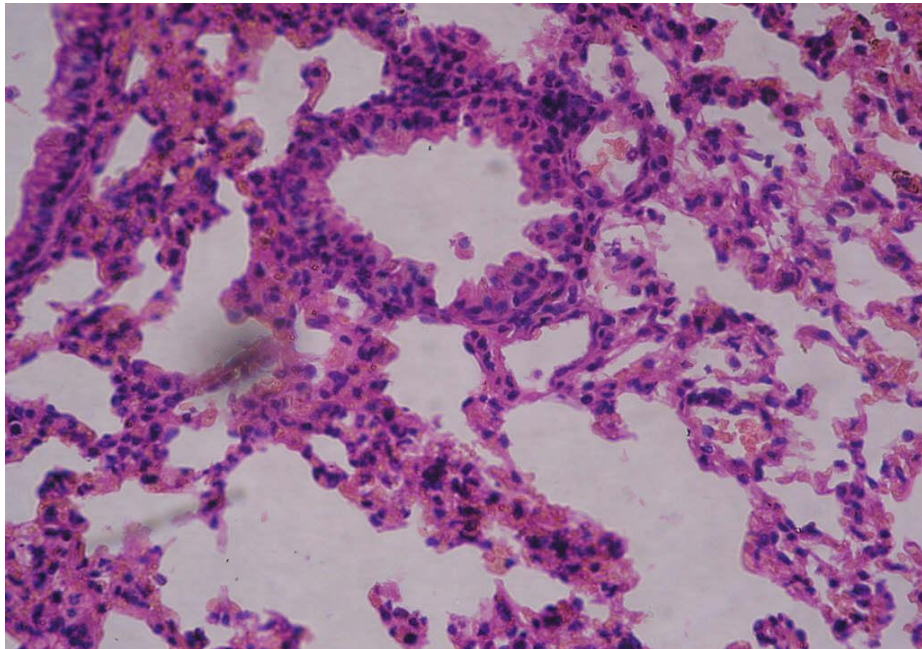


Рис 3.19 Мікрофотографія легенів інтактної миші. Бронхи малого і середнього діаметру мають просвіт, що нагадує зірку. Стінка малого бронха утворена суцільною платівкою дворядного епітелію і тонкою м'язовою платівкою. Просвіт бронха середнього калібру вистелений суцільною платівкою багаторядного миготливого епітелію. Забарвлення гематоксилином і еозином, x 400.

Морфологічна будова легенів миші через 3 тижні після закінчення навантаження тетрахлорметаном (Шифр: Самовідновлення)

У тварин групи самовідновлення на гістологічних препаратах забарвлених гематоксилином і еозином, виявлені бронхи середнього, малого калібру і респіраторний відділ легень, але вони мають ознаки альтеративно-дегенеративних змін. Явне порушення нормальної гістоархітектоніки альвеол у вигляді звуження або розширення їх

просвіту або їх спаду. 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.

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 (Рис 3.20).

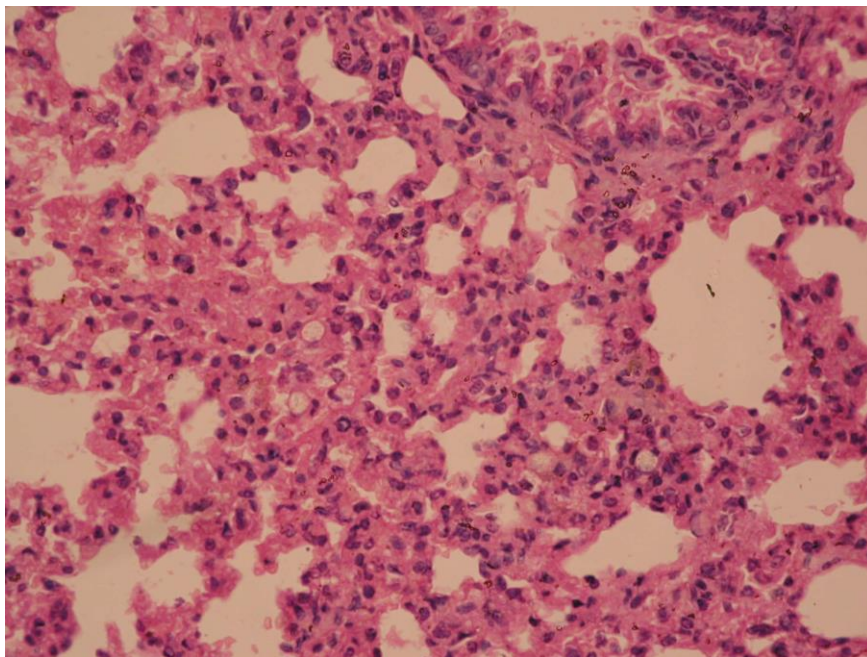


Рис 3.20 Мікрофотографія легенів миші з моделлю системних уражень через 3 тижні після самовідновлення. Наявність альтеративно-дегенеративних змін. Альвеолярні перегородки потовщені за рахунок клітинної інфільтрації і розростання сполучної тканини (фіброзу). Кількість капілярів зменшена. Забарвлення гематоксиліном і еозином, x 400.

Таким чином у тварин залишених для самовідновлення після тривалого навантаження тетрахлорметаном тестується явне порушення нормальної гістоархітектоніки альвеол; втрата чіткої диференціації термінальних бронхіол, альвеолярних ходів і мішечків; потовщення міжальвеолярних перегородок за рахунок збільшення клітинних елементів, фіброзу і патологічна зміна альвеолярних пластинок бронхів, що вказує на присутність альтеративних-деструктивних змін в легенях

3.1.8 Дослідження патоморфологічних змін в нирках.

Паренхіма нирки модельних тварин характеризується альтеративно-дегенеративними змінами як кортикальної, так і мозкової речовини. Спостерігається чергування ділянок капілярного повнокров'я з еритроцитарними стазами і вогнищ слабкого кровонаповнення з облітерацією просвіту судин. Виражений інтерстиціальний набряк з ділянками склерозу і фіброзу (Рис 3.21). Визначається переважно атрофія ниркових клубочків, місцями розширення простору Боумена, зрідка - осередки некрозу і склерозу гломерул, дифузна лейкоцитарна інфільтрація коркового і мозкового речовини. Епітелій ниркових каналців знаходиться в стані дистрофії і некрозу, кордони між епітеліоцитами не простежується, ядра зменшені в розмірі. Просвіт ниркових каналців розширений, в деяких місцях заповнений відшаровуваними епітеліоцитами.

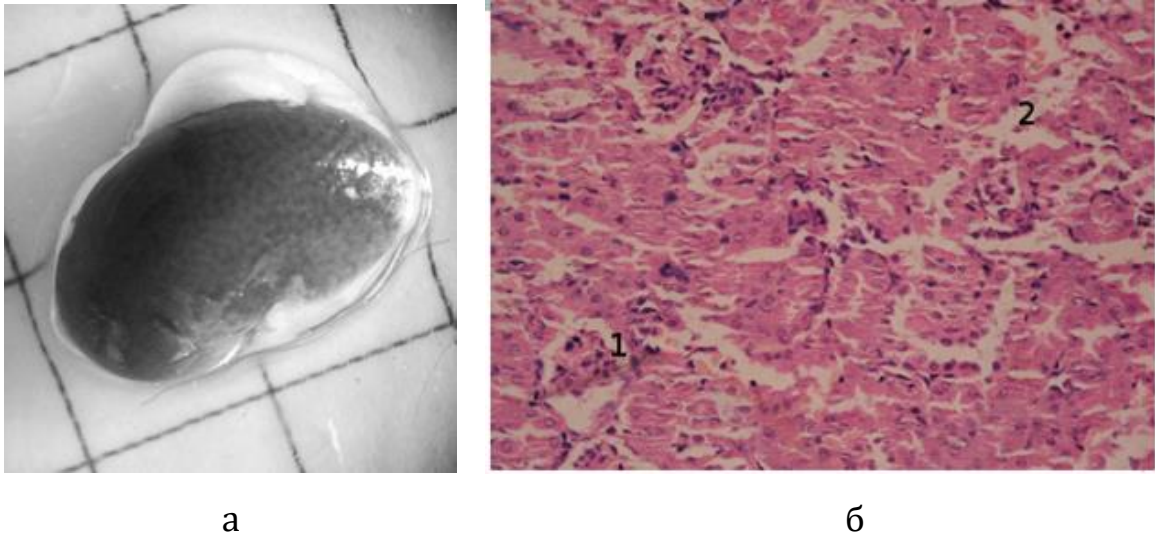


Рис 3.21 Загальний вигляд (ліворуч) і мікрофотографія (праворуч, фарбування гематоксиліном і еозином, x200) ураженої нирки в результаті ін'єкцій мишам CCl_4 протягом 12 тижнів. Альтеративно-дегенеративні зміни в корковій речовині. Ниркова клубочкова атрофія, місцями розширення просторів Боумена (1). Тяжкий інтерстиціальний набряк (2).

Висновок підрозділу

Створено та охарактеризовано тварину модель експериментального синдрому поліорганної дисфункції 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. Отримані фізіологічні, біохімічні та гістопатоморфологічні дані, які підтверджують стан еСПОД у модельних тварин.

3.2 Дослідження терапевтичного потенціалу МСК на тлі відтвореного еСПОД у мишей

3.2.1 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 3х до 10 тижнів в залежності від мети дослідів) тварин виводили з експерименту і фіксували показники крові і патоморфологічний стан печінки, селезінки, легенів, почки 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. (Таблиця 3.3)

Таблиця 3.3

Вживаність тварин окремих експериментів. Коефіцієнт виживаності обрахований по відношенню до варіанту самовідновлення кожного досліді окремо.

Досліди	Шифр групи	Тривалість, тижні	пало із всього тварин	% тварин, що вижили	Коеф. що вижили відносно самовідн.
Дослід 11-9	Формування ураження CCl ₄	12	5/26	81	
11	самовідновлення 9 нед	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 ураження CCl ₄	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 ураження CCl ₄	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 ураження CCl ₄	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

Патоморфологічний аналіз гістологічних змін в печінці, (першого органу у ланцюгу взаємозалежного саморуйнування) показав, що трансплантація МСК призводить до часткового відновлення гістоархітектоніки (Рисунок 3.22), а підвищення загальної виживаності опосередковано свідчить про часткове функціональне відновлення.

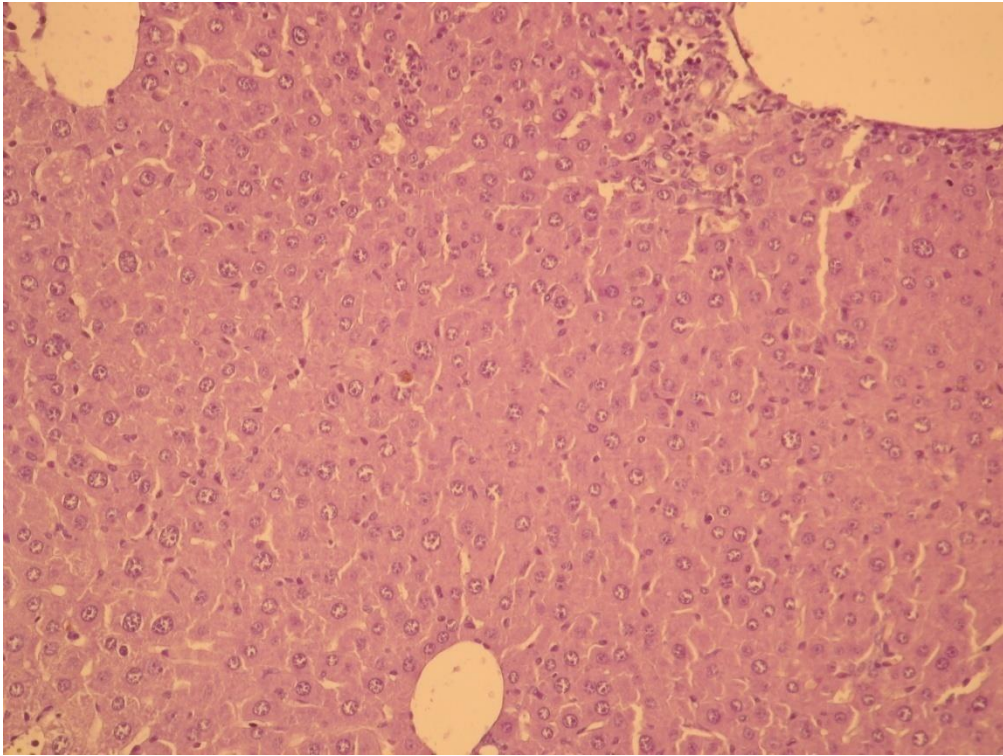


Рисунок 3.22 Мікрофотографія печінки миші з еСПОД через 3 тижні після трансплантації 10^5 МСК з драглів Вартона пуповини людини. Забарвлення гематоксилином і еозином, x 200.

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 лімфогістіоцитарна інфільтрація з одиничними лімфоцитами. Спостерігається наявність ділянки тканини печінки з вираженим відкладенням гомогенного аморфного блідо-рожевого речовини між печінковими балками (Рис 3.23).

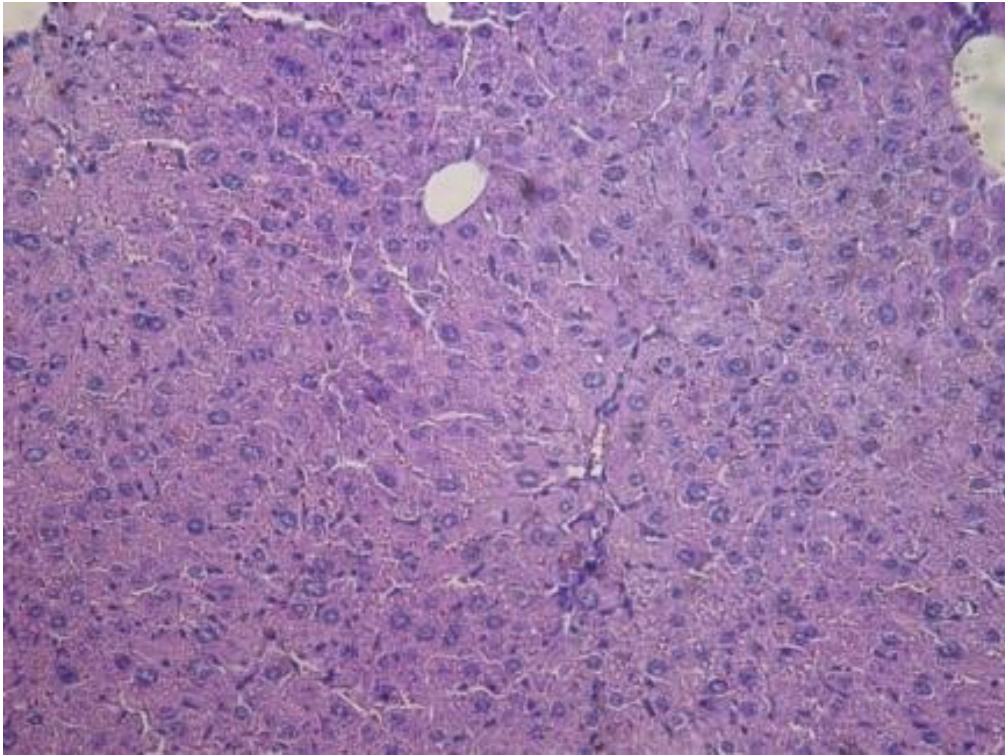


Рис 3.23 Мікрофотографія печінки миші з еСПОД через 3 тижні після трансплантації 10^5 ембріональних фібробластоподібних МСК з миші лінії ICR.

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

В порівнянні із змінами контролю самовідновлення у варіантах із трансплантованими МСК відбуваються позитивні процеси відновлення.

Так інтегральна оцінка короткострокового ефекту (2-4 тижні) з використанням різних стовбурових клітин. 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 3.24).

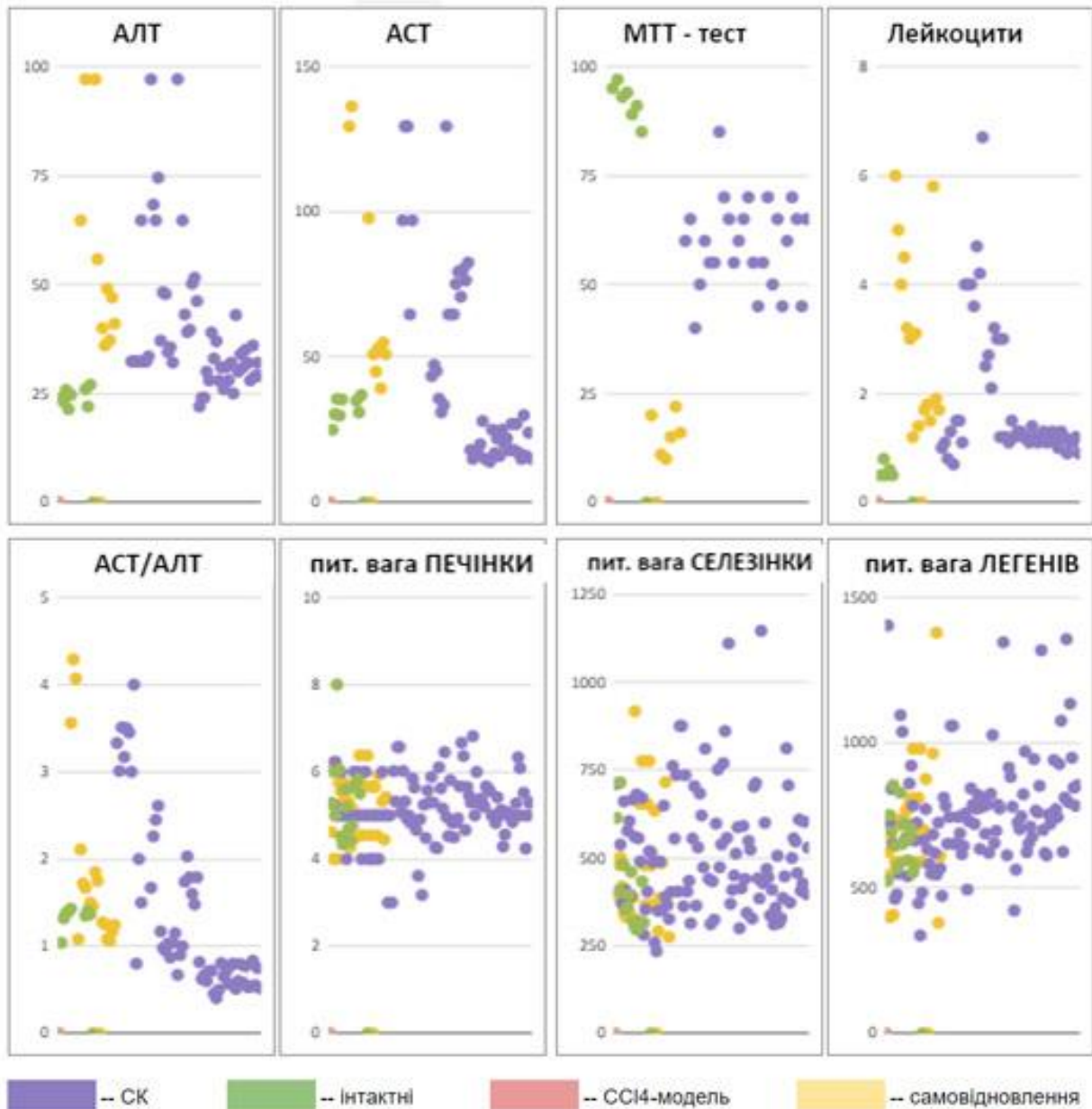


Рис 3.24 Діаграма розподілу контрольованих параметрів для консолідованих груп здорових мишів (зелений), груп самовідновлення на протязі 2-4 тижнів після закінчення навантаження CCl₄ (жовтий) і груп із застосуванням різних МСК (фіолетовий) за умови одноразової трансплантації.

Висновок

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.

3.2.2 Дослідження особливостей дії різних за походженням МСК в умовах еСПОД

При аналізі несподіваних результатів нами було відмічено, що величезну роль відіграє якість самих стовбурових клітин, що отримуються однаковою способом, але від різних за станом тварин. (Для кожного експерименту окремо отримувались свіжі МСК). Так в одному із дослідів (№15) виживаність тварин через 5 тижнів після введення МСК людини склала 100%, а в контролі самовідновлення того ж досліді вона була всього 29% (таблиця 3.4).

Таблиця 3.4

Виживаність у окремому досліді з «вдалою» комбінацією МСК

Досліди	Шифр групи	Тривалість, тижні	пало із всього тварин	% тварин, що вижили	Коеф. що вижили відносно самовідн.	Пухлини у живих
ДОСЛІД 15	Формування ураження CCl ₄	12	3/20	85		
15	самовідновлення 5 тиж	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	

При цьому в іншому експерименті (№ 11) 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 3.5). 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 за фізіологічними критеріями.

Таблиця 3.5

Вплив МСК різних отримань на виживаність тварин з експериментальним синдромом поліорганної дисфункції.

Досліди	Шифр групи	Тривалість, тижні	пало із всього тварин	% тварин, що вижили	Коеф. що вижили відносно самовідн	Пухлини у живих
Дослід 11-3	Формування ураження CCl ₄	12	3/18	83		
11	самовідновлення 3 тижні	2	0/5	100	1	
11	FM 10 тис	3	2/6	67	0,7	1/4
11	FM 100 тис	3	2/6	67	0,7	
Дослід 11-9	Формування ураження CCl ₄	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	

В нашому дослідженні ми також перевіряли відмінності терапевтичної дії алогенних і ксеногенних до реципієнта МСК. Було показано, що різні за спорідненістю до реципієнта МСК проявляли схожий відновлювальний ефект і майже нічим не відрізнялись (Табл 6, Рис 3.25) Однак декілька спостережень свідчили про більш потужну терапевтичну дію ксеногенних для миші МСК з драглів Вартоу людини. Так МСК людини значно знижали рівень АЛТ у крові к 6 му тижню після їх трансплантації в умовах експерименту, на відміну від тієї ж кількості стовбурових клітин миші. Ще один приклад відмінностей дії ксеногенних

МСК по відношенню до впливу на пухлиноутворення наведений на Рис 3.38.

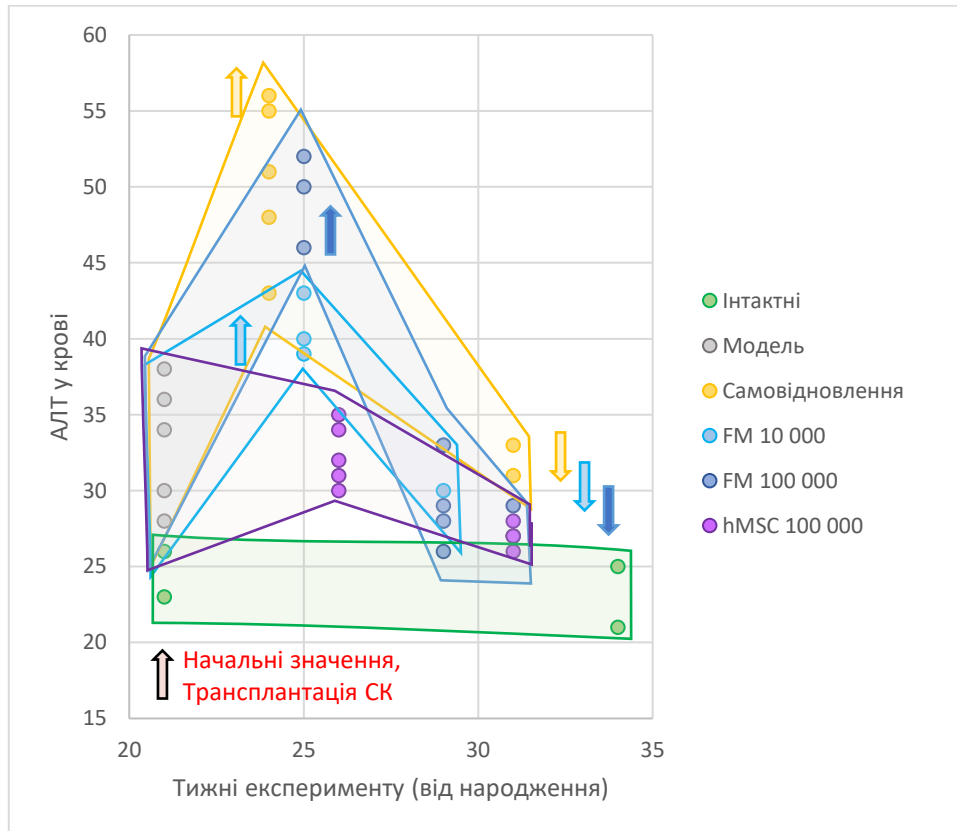


Рис 3.25 Оцінка динаміки змін АЛТ в крові мишей протягом 3-9 тижнів після трансплантації аlogenних (FM) ембріональних фібробластоподібних мезенхімальних клітин миші і ксеногенних (hMSC) стовбурових клітин з драглів Вартона пуповини людини в різних концентраціях.

Висновок

В ході дослідження було 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. В наших досліджах МСК людини були активніші за МСК миші. Ксеногенні МСК викликали більш виражену запальну реакцію, але попри те це не впливало на індекс загальної виживаності.

3.2.3 Дослідження залежності терапевтичного ефекту від дози і кратності застосування трансплантованих клітин

Для досліджування 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 30г. 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.

Інтегральна за всіма експериментами оцінка довгострокового ефекту (6-9 тижнів) після трансплантації стовбурових клітин показала, що руйнування клітин печінки і кардіоміоцитів в більшості випадків припинялося. Показники АЛТ і АСТ наближались до верхньої межі норми. При цьому запальна реакція, судячи з кількості лімфоцитів в крові, залишалась активною. Відсоток неактивних білих кров'яних клітин в крові був високим, але не критичним (МТТ-тест). Значної гіперемії органів не спостерігається (Рис 3.26).

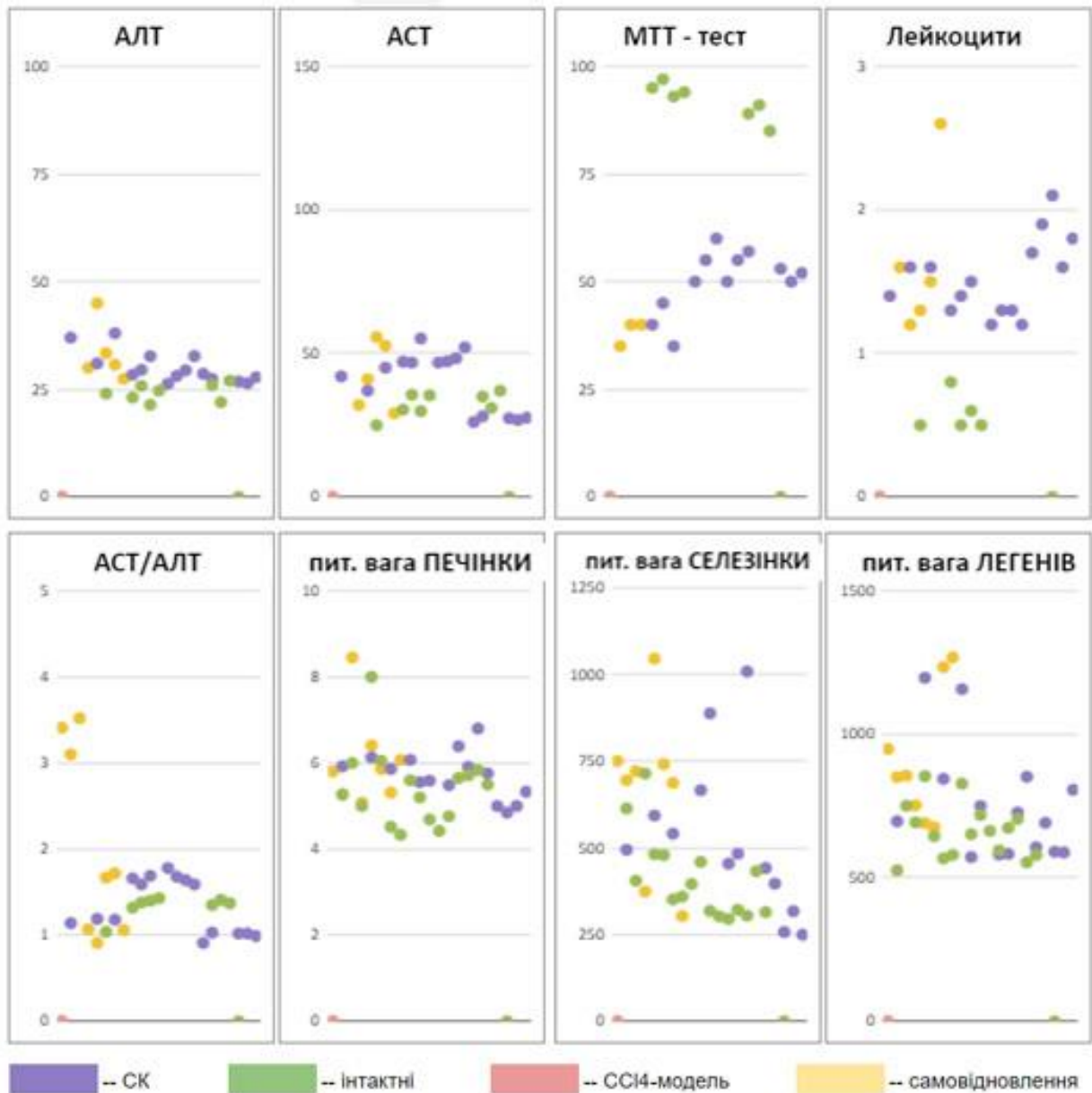


Рис 3.26 Діаграма розподілу контрольованих параметрів для консолідованих груп здорових мишей (зелений), груп самовідновлення на протязі 6-9 тижнів після закінчення навантаження CCl₄ (жовтий) і груп через такий же термін після однократної трансплантації різних МСК (фіолетовий).

Оцінка динаміки змін у часі.

Дослідження динаміки змін кількості лейкоцитів у крові на протязі періоду відновлення встановило, що для концентрацій 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 3.27).

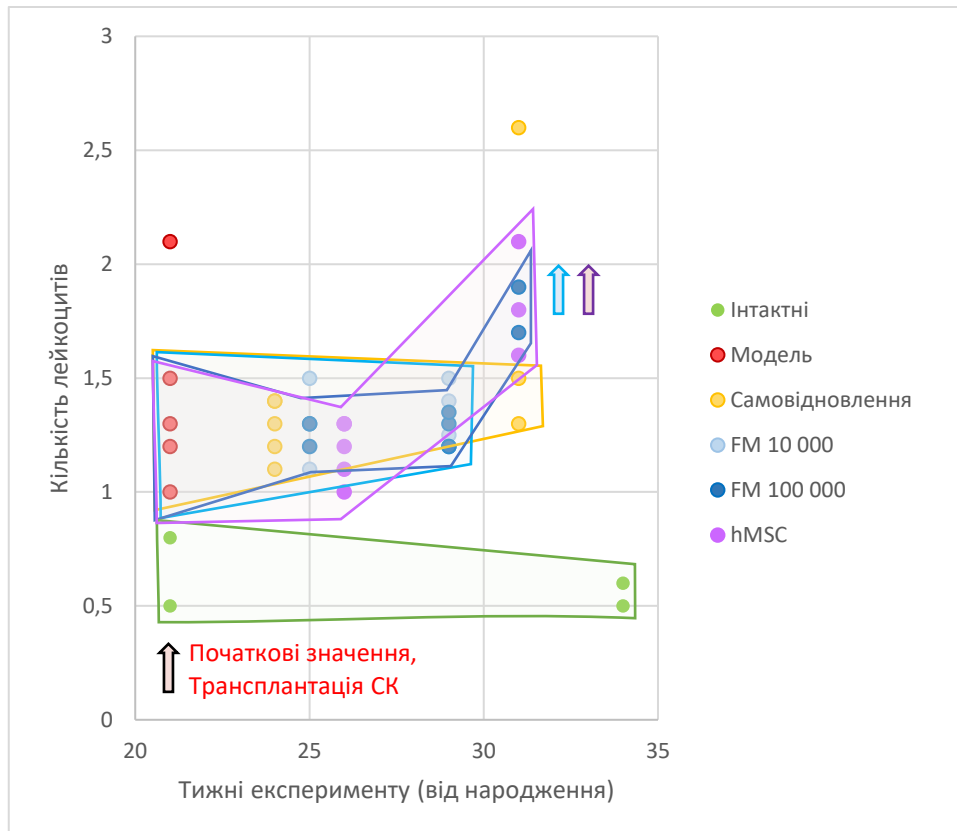


Рис 3.27 Динаміка змін кількості лейкоцитів в крові мишей протягом 3-9 тижнів після трансплантації аlogenних (FM) ембріональних фібробластоподібних мезенхімальних клітин миші і ксеногенних (hMSC) стовбурових клітин з драглів Вартона пуповини людини в різних концентраціях.

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 3.28).

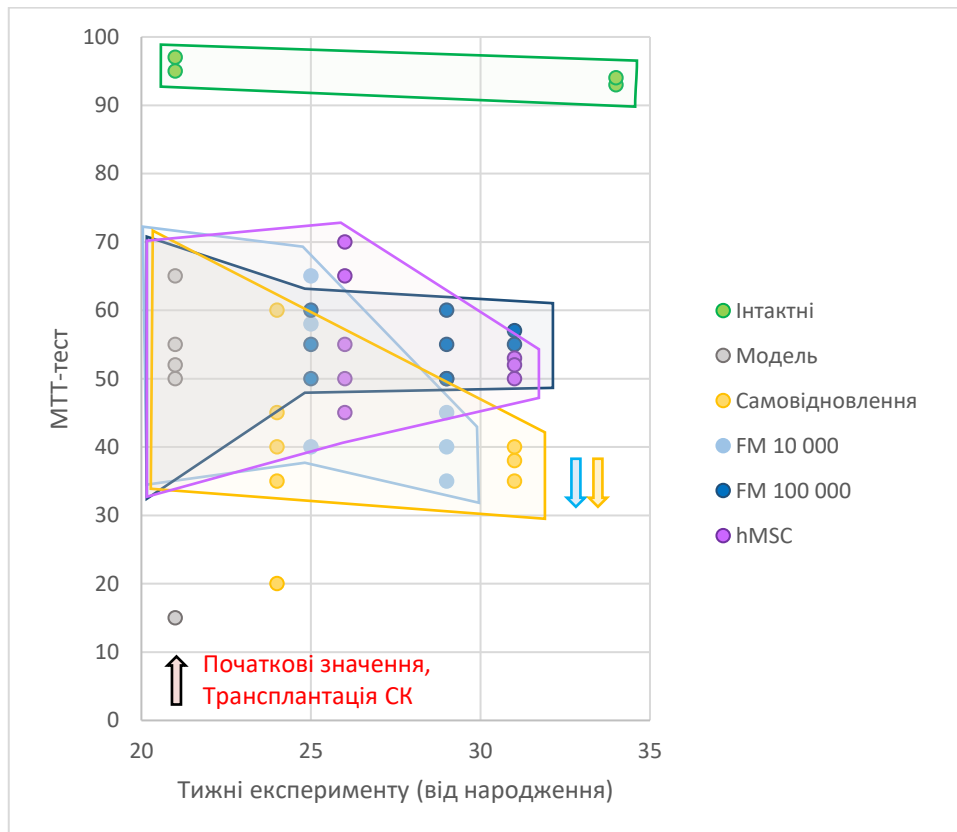


Рис 3.28 Динаміка змін фізіологічної активності клітин білої крові (МТТ-тест) протягом 3-9 тижнів після трансплантації алогенних (FM) ембріональних фібробластоподібних мезенхімальних клітин миші і ксеногенних (hMSC) стовбурових клітин з драглів Вартона пуповини людини в різних концентраціях.

Дослідження змін показників крові у окремих тварин

Для уточнення результатів був поставлений експеримент, в якому ми спостерігали динаміку змін в аналізах крові у окремих тварин за показниками на початку і в кінці терміну дослідження.

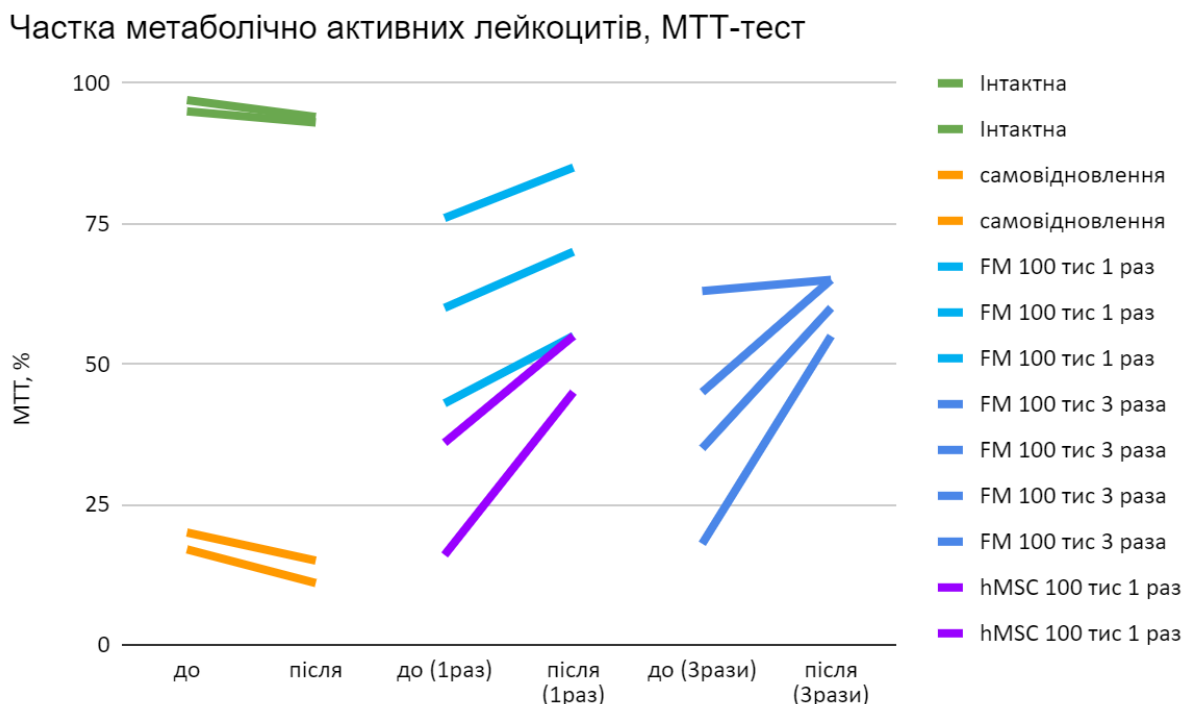


Рис 3.29 Тенденції змін метаболічної активності білих кров'яних клітин окремих тварин різних експериментальних груп, за МТТ-тестом. Кожна лінія відповідає окремій тварині і показує зміну показника через 4 тижні після першої ін'єкції. Позитивний нахил лінії свідчить про збільшення частки фізіологічно активних клітин. Лінії розташовані в три стовпчика тільки для полегшення візуалізації, аби виключити перекриття.

Цей експеримент підтвердив збільшення частки метаболічно-активних клітин імунної системи під впливом стовбурових клітин. Інтенсивність цього зростання залежала не тільки від кратності введення клітин, але і від спорідненості МСК до реципієнту (алогенні чи ксеногенні). Введення ксеногенних МСК з пуповини людини викликало той же ефект, що і триразове введення алогенних ембріональних клітин миші (Рис 3.29).

АЛТ індивидуальна динаміка

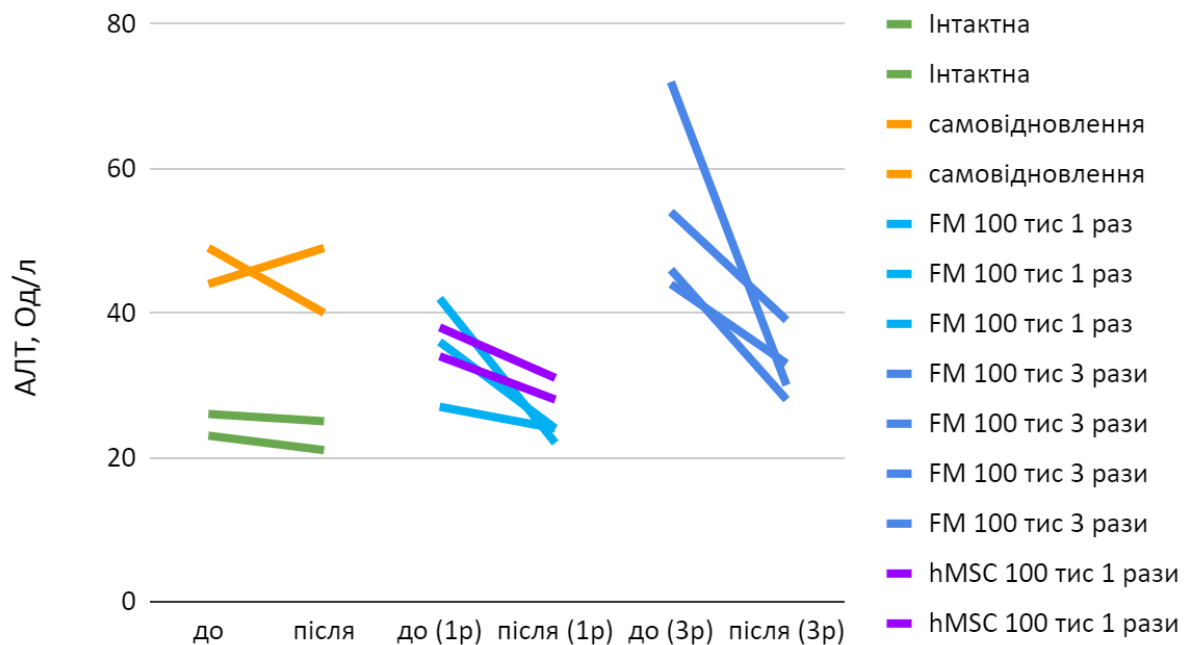


Рис 3.30 Динаміка змін активності АЛТ у крові. Кожна лінія відповідає окремій тварині і показує зміну показника через 4 тижні після першої ін'єкції. Негативний нахил лінії відповідає зниженню рівня активності АЛТ в крові. Кут нахилу вказує на швидкість зміни показників. Лінії розташовані в три стовпчика для полегшення візуалізації, аби уникнути значного перекривання.

Нарівні з підвищенням активності клітин імунної системи спостерігається відповідне корельоване зниження рівня АЛТ в крові, що свідчить про власні процеси відновлення, що були індуковані екзогенними стовбуровими клітинами (Рис 3.30).

Загалом, для цієї моделі еСПОД незалежно від спорідненості МСК (алогенні чи ксеногенні) спостерігається покращення терапевтичного ефекту при застосуванні трьох-разового повторення трансплантації МСК (Таблиця 3.6).

Таблиця 3.6

Вплив ступеню ураження на виживанність.

Досліди	Шифр групи	Тривалість, тижні	пало із всього тварин	% тварин, що вижили	Коеф. що вижили відносно самовідн.	Пухлини (у живих)
ДОСЛІД 016	Формування ураження CCl ₄	12	11/30	63		
13 (16)	самовідновлення 4 тижні	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 ураження CCl ₄	12	7/28	75		
14	самовідновлення 5 тижні	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	1/5
ДОСЛІД 15	Формування ураження CCl ₄	12	3/20	85		
15	самовідновлення 5 тижні	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	

У разі потрійного введення клітин з інтервалом в 7 днів нормалізація стану стає більш помітною практично за всіма показниками (Рис 3.31 и два вище). Тобто для отримання більш вираженого ефекту треба збільшувати кількість трансплантованих МСК.

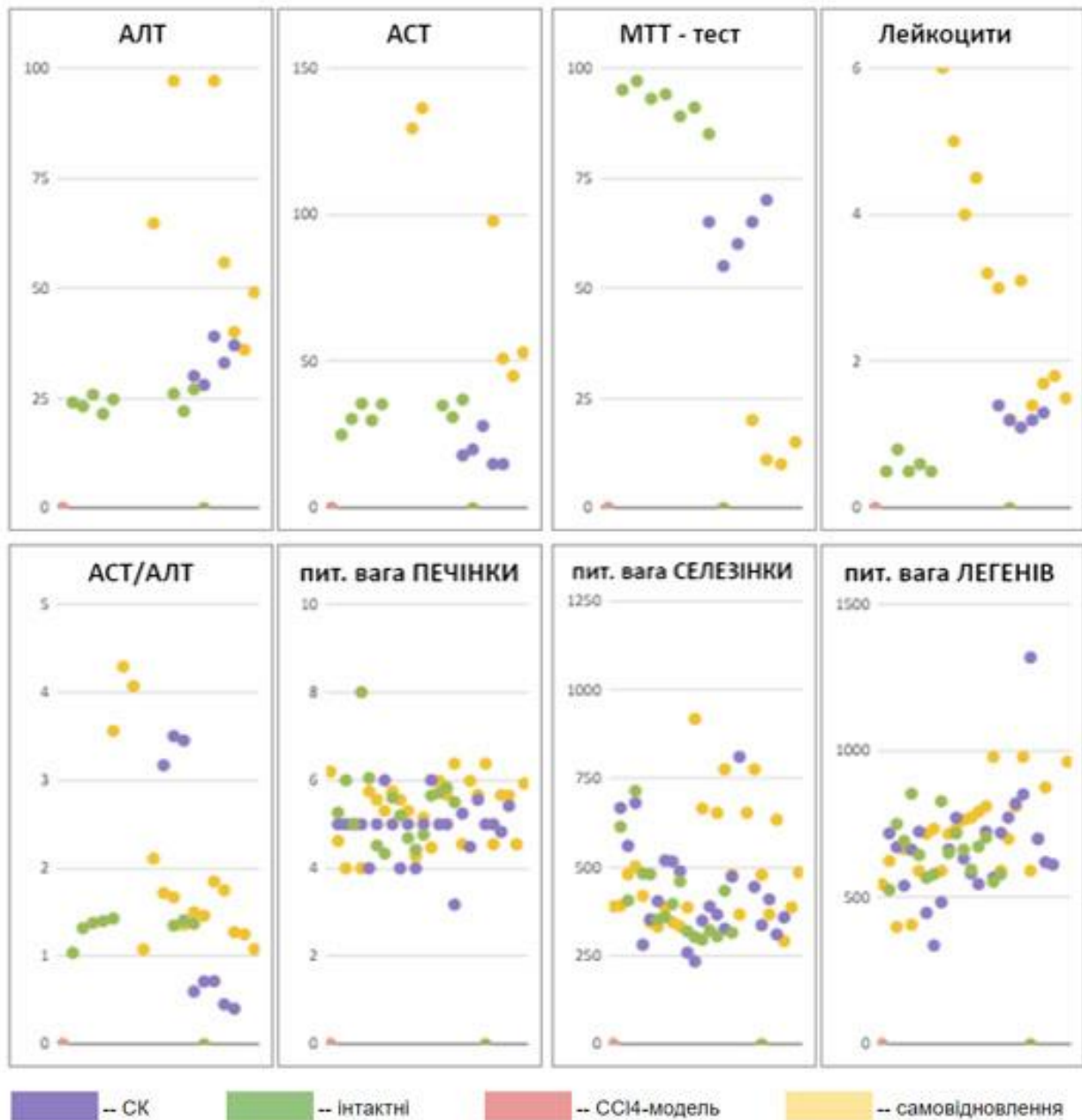


Рис 3.31 Діаграма розподілу контрольованих параметрів для консолідованих груп здорових мишів (зелений), груп самовідновлення на протязі 2-4 тижнів після закінчення навантаження CCl₄ (жовтий) і груп із застосуванням різних МСК (фіолетовий) за умови трикратної трансплантації.

Морфологічна будова печінки через 3 тижні після внутрішньоперитонеального введення 10 000 ембріональних фібробластоподібних клітин миші

Гістологічна картина печінки миші з моделлю системних уражень через 3 тижні після внутрішньоперитонеального введення 10 000 ембріональних фібробластоподібних мезенхімальних клітин миші характеризується менш вираженими змінами в порівнянні з тваринами групи самовідновлення: загальна будова зберігається, тенденції до утворення вузлів (ложних долек) 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 3.32).

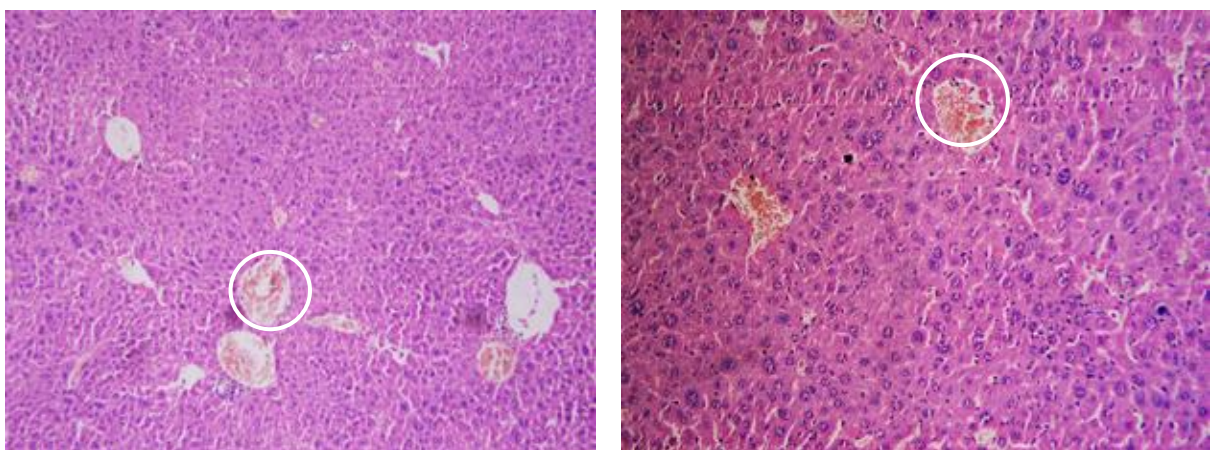


Рис 3.32 Мікрофотографія печінки миші з моделлю системних уражень через 3 тижні після внутрішньоперитонеального введення 10 000 ембріональних фібробластоподібних мезенхімальних

клітин миші. Позначено: розширені і повнокровні судини
Фарбування гематоксилін-еозин. x100(a), x200(b)

**Морфологічна будова печінки через 3 тижні після
внутрішньоперитонеального введення 100 000 ембріональних
фібробластоподібних клітин миші**

При гістологічному дослідженні печінки в умовах внутрішньоперитонеального введення 100 000 фібробластоподібних клітин миші, в порівнянні з тваринами контролю самовідновлення загальна структура збережена. Дрібноузлова 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 бінуклеарних гепатоцитів, що є морфологічним проявом регенерації тканин печінки. У порівнянні з групою самовідновлення, тварини, яким інтраперитонеально було трансплантовано 10 000 фібробластоподібних клітин миші, центральні вени, судини печінкових триад і синусоїдальних капілярів не розширені і не повнокровні. Клітини Купфера в помірних кількостях. Спостерігається невелика інфільтрація лейкоцитів (Рис 3.33).

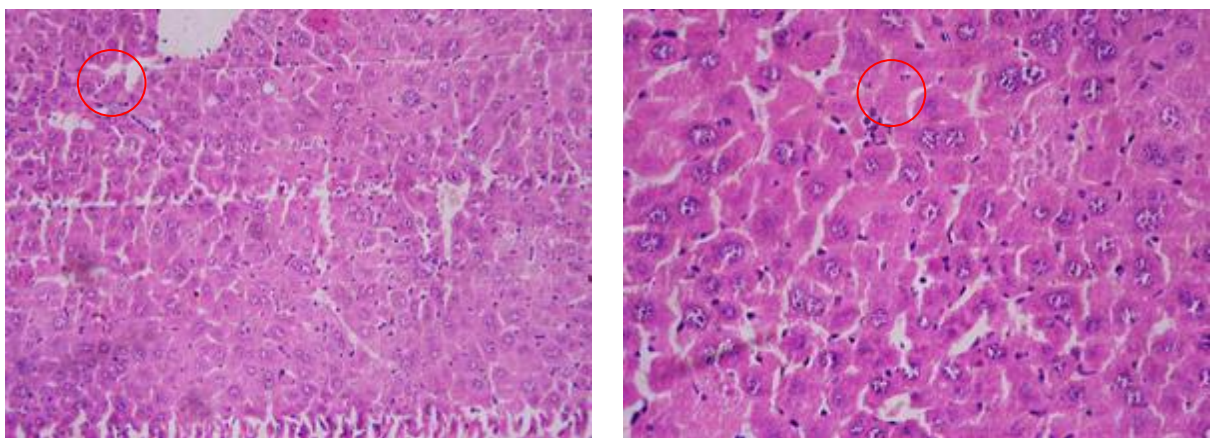


Рис 3.33 Мікрофотографія печінки миші з моделлю системних уражень після інтраперитонеального введення 1050 000 ембріональних

фібробластоподібних мезенхімальних клітин миші. Відзначено: незначні інфільтрати (1). Фарбування гематоксилін-еозин. x200(a), x400(b)

Морфологічна будова легенів миші через 3 тижні після одноразової трансплантації 10^5 ембріональних клітин миші на тлі CCl_4 -ураження (Шифр FM 100 BALB)

У тварин експериментальної групи, яким одноразово трансплантували ембріональні фібробластоподібні клітини миші (Шифр FM 100 BALB) на гістологічних препаратах забарвлених гематоксиліном і еозином, виявлені бронхи середнього, малого калібру і респіраторний відділ легень з ознаками 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 помірно, 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 3.34)

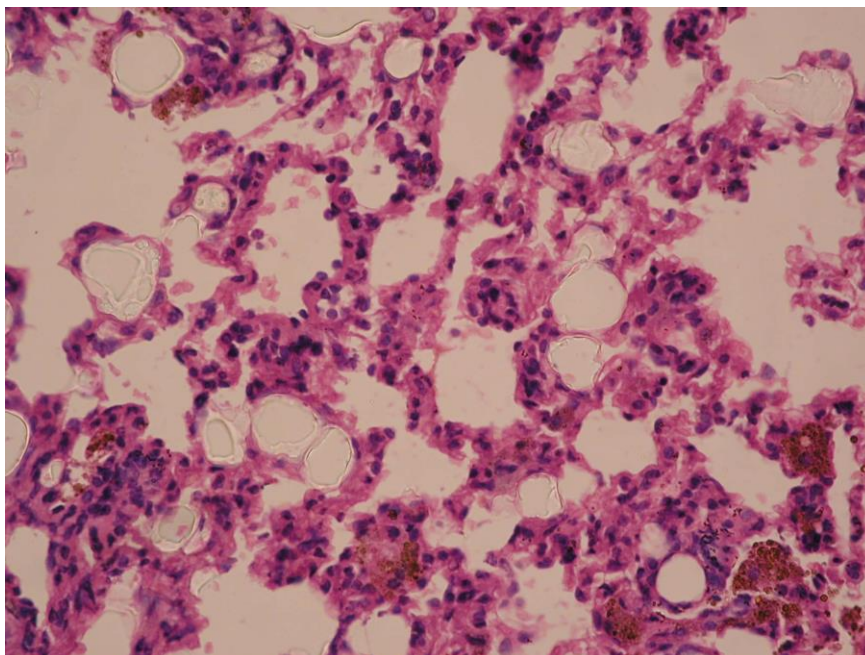


Рис 3.34 Мікрофотографія легень миші з моделлю системних уражень через 3 тижні після одноразового внутрішньоперитонеального введення 10^5 ембріональних фібробластоподібних мезенхімальних клітин миші лінії BALB (FM 100 BALB). Наявні ознаки відновлення. Просвіти альвеол розправлені. Міжальвеолярні перегородки соковиті, кількість клітинних елементів і волокнистих структур помірна, є значна кількість капілярів. Забарвлення гематоксилином і еозином, x 400.

Морфологічна будова легенів миші через 3 тижні після триразового введення 100 000 ембріональних клітин миші на тлі CCl_4 -ураження (Шифр FM 100 x3 BALB)

У тварин, яким після закінчення навантаження CCl_4 триразово трансплантували ембріональні фібробластоподібних клітини миші лінії BALB (FM 100 x3 BALB) на гістологічних препаратах забарвлених гематоксилином і еозином, виявлені бронхи середнього, малого калібру і респіраторний відділ легень з ознаками відновлення. Спостерігається збільшення кількості альвеол і відтворення їх нормальної гістоархітектоніки. На препаратах можна диференціювати термінальні

бронхіоли, альвеолярні ходи і мішечки. Просвіти альвеол розправлені, але вони по діаметру 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 3.35). Стінка таких бронхів не має фіброзних змін і лейкоцитарної інфільтрації.

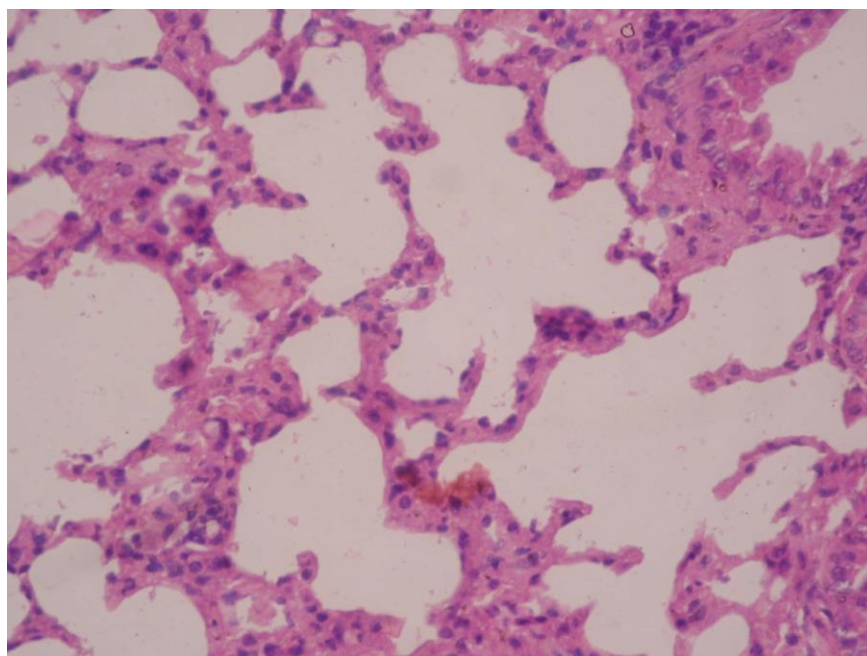


Рис 3.35 Мікрофотографія легень миші з моделлю системних уражень через 3 тижні після триразової інтраперитонеальної трансплантації 10^5 ембріональних фібробластоподібних мезенхімальних клітин миші лінії BALB. Наявні ознаки відновлення. Просвіти альвеол розправлені. Міжальвеолярні перегородки не потовщені, кількість клітинних елементів і волокнистих структур помірно. Можна віддиференціювати термінальні бронхіоли, альвеолярні ходи і мішечки. Забарвлення гематоксилином і еозином, x 400.

Таким чином у тварин яким трансплантували алогенні ембріональні фібробластоподібні клітини тестується збільшення кількості альвеол і відновлення їх нормальної гістоархітекtonіки: на препаратах можливо диференціювати термінальні бронхіоли, альвеолярні ходи і мішечки, просвіти альвеол розправлені, міжальвеолярні перегородки соковиті, кількість клітинних елементів і волокнистих структур в них помірна, є значна кількість капілярів; в бронхах малого і середнього діаметру виявлено цілісність епітеліальних пластинок, що свідчить про відновлення структури легких, що більш виражено в разі 3-х кратного введення стовбурових клітин.

Морфологічна будова селезінки миші через 3 тижні після введення 100 000 ембріональних клітин миші на тлі CCl_4 -ураження

У тварин, яким одноразово трансплантували ембріональні фібробластоподібних алогенних клітини FM 100 BALB 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, тому фолікули в селезінці цієї групи тварин великі і значно темніше рахунок проліферацію значної кількості клітин. У лімфатичних вузликах визначається світлий гермінативний центр, є також збільшена щільність клітин білої пульпи (Рис 3.36). Червона пульпа, яка представлена селезінковими тяжами Більтот і венозними синусами, рясно заповнена клітинними елементами.

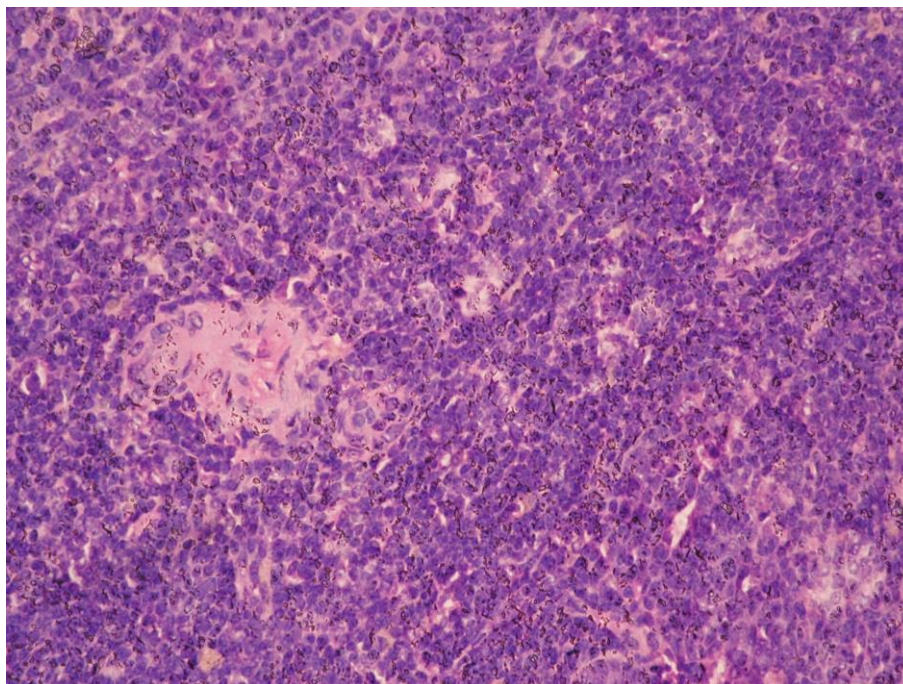


Рис 3.36 Мікрофотографія селезінки миші з моделлю системних уражень через 3 тижні після одноразового внутрішньоперитонеального введення 10^5 ембріональних фібробластоподібних мезенхімальних клітин миші лінії BALB. Селезінка з ознаками активації імунної відповіді. Наявна нечітка диференціація між зонами фолікула, простежується герменативний центр. Лімфатичні вузлики виглядають темними за рахунок збільшення щільності клітин білої пульпи.

Забарвлення гематоксиліном і еозином, $\times 400$.

Морфологічна будова селезінки миші через 3 тижні після триразового введення 100 000 ембріональних клітин миші на тлі CCl_4 -ураження

У тварин експериментальної групи із системним ураженням, яким тричі трансплантували ембріональні фібробластоподібні алогенні клітини миші лінії BALB у кількості 100 000 клітин на тварину виявлені структурні перебудови селезінки, що свідчать про наявність реактивних змін і ознак антигенної стимуляції. Є зміщення нормальних

співвідношень червоної і білої пульпи на бік збільшення кількості білої пульпи. Фолікули в селезінці цієї групи тварин великі і темні, зони фіброзу у них практично відсутні (Рис 3.37). У лімфатичних вузликах визначається світлий гермінативний центр, є проліферація значної кількості клітин. Червона пульпа, яка представлена селезінковими тяжами Більрот і венозними синусами, рясно заповнена клітинними елементами.

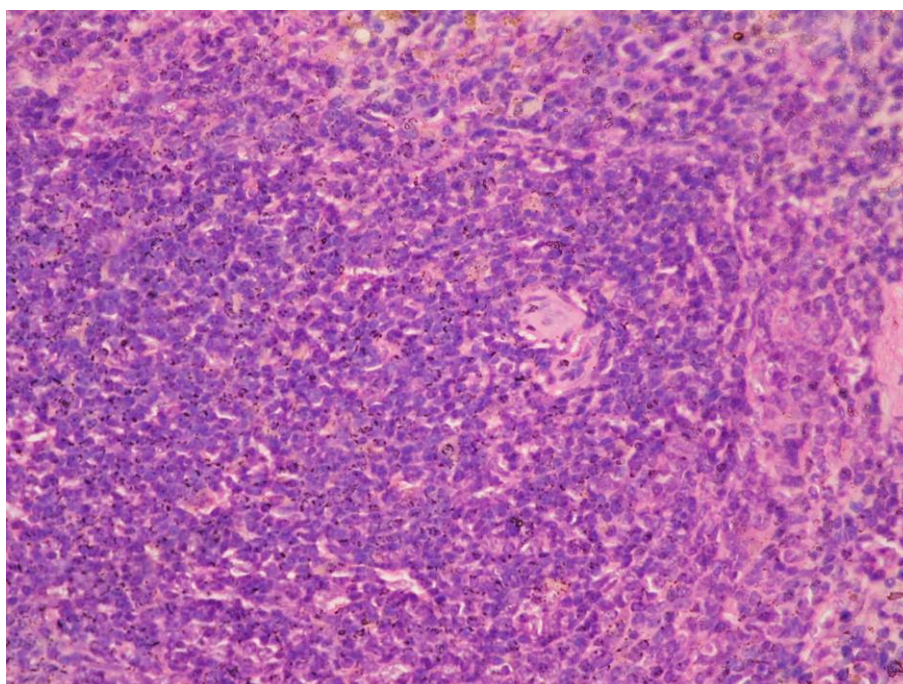


Рис 3.37 Мікрофотографія селезінки миші з моделлю системних уражень через 3 тижні після триразового інтраперитонеального введення 10^5 ембріональних фібробластоподібних мезенхімальних клітин миші лінії BALB. Селезінка з ознаками активації імунної відповіді. Співвідношення червоної і білої пульпи зміщено в бік збільшення білої. Наявні великі за розміром фолікули. Кількість клітинних елементів збільшена. Забарвлення гематоксиліном і еозином, x 400.

Таким чином у тварин яким трансплантували алогенні ембріональні фібробластоподібні клітини тестується підвищення кількості лімфоцитів білої пульпи у тварин експериментальних груп, що свідчить про активацію імунної відповіді селезінки. Ознаки активації імунної відповіді присутні в обох експериментальних групах, і більш виражені в групі з триразовим введенням стовбурових клітин.

Висновок

В ході дослідження був отриманий добре виражений позитивний ефект залежності від дози трансплантованих МСК. Отримані данні 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. У випадках коли МСК трансплантувались раз на тиждень впродовж трьох тижнів показали кращий терапевтичний ефект, ніж одноразова трансплантація, що проявлялось більше за умов стану більшого пошкодження.

3.2.4 Дослідження можливості впливу трансплантованих МСК на реалізацію схильності до пухлиноутворення у генетично-детермінованих до канцерогенезу модельних тварин.

Як вже було вказано лінія мишей ICR генетично детермінована до канцерогенезу. Майже у всіх самок цієї лінії у віці одного року розвивається гепатокарцинома. В наших дослідженнях в основному були задіяні самці, у яких «в нормі» схильність до канцерогенезу не реалізується. Але в результаті хронічного ураження CCl_4 у 22% тварин з'являлись новоутворення (суб'єктивна інтегральна оцінка). Після

трансплантації алогенних МСК цей показник дещо збільшувався. При трансплантації ксеногенних МСК людини цей показник значно зменшувався до 9% з достовірністю 0,95.

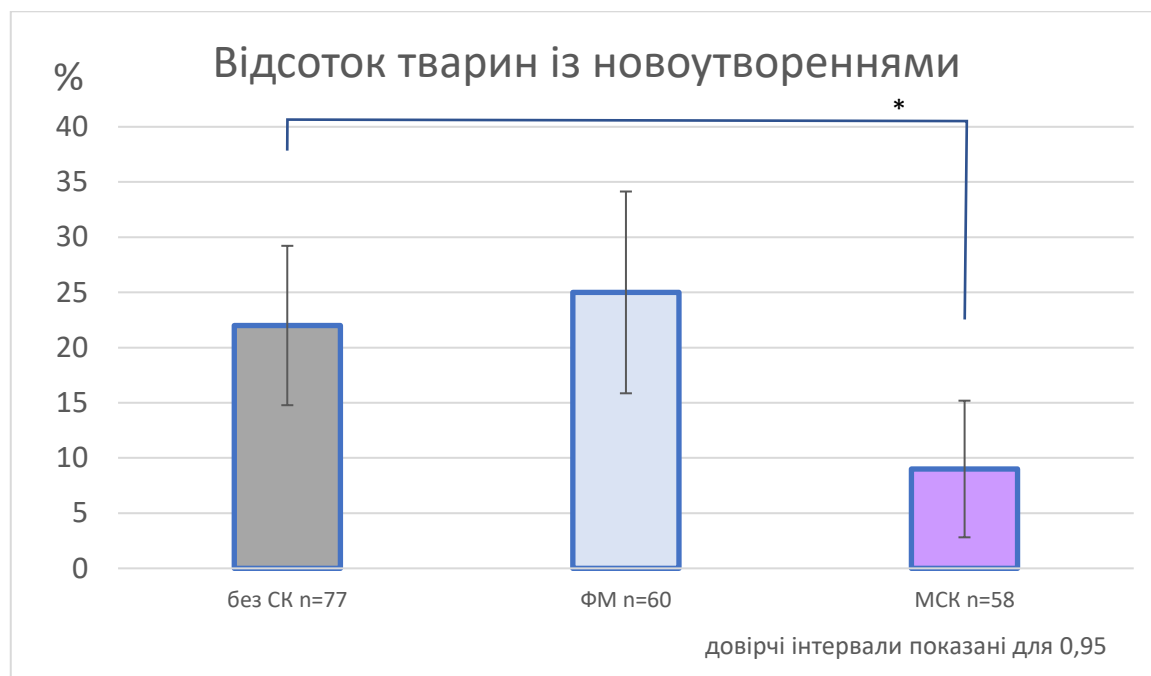


Рис 3.38 Відмінності індексу видимих новоутворень в залежності від типу трансплантованих клітин.

Такий феномен можна пояснити тим, що ксеногенні для миші МСК з пуповини людини індукують імунну відповідь, що супресує розвиток новоутворень.

Морфологічні зміни будови печінки у випадках реалізації спадкової схильності до канцерогенезу.

У випадках реалізації спадкової схильності до канцерогенезу гістологічна картина печінки характеризується вираженими змінами: загальна будова печінки порушена із схильністю до мікрівузлової перебудови, вираженими фіброзними змінами строми з підвищеною кількістю колагенових волокон як в областях порталних трактів, так і в міжбалочних просторах. Некротичні і альтеративні зміни

спостерігаються з порушенням структури балочної будови і хаотичним розташуванням клітин печінки. Межі гепатоцитів нечіткі, ядра значно зменшені, просвітлені, ядерця не визначаються, загальна кількість ядер зменшена в порівнянні з контролем самовідновлення. Відмічаються скупчення багатоядерних клітин за типом крупноклітинної реакції, що оточені колагеновими волокнами (гранульоми). Центральні вени, судини тріади і міжбалочні синуси розширені, повнокровні, спостерігається гіперплазія клітин Купфера. Визначається виражена дифузна (розсіяна) сегментноядерна лейкоцитарна інфільтрація паренхіми печінки (Рис 3.39).

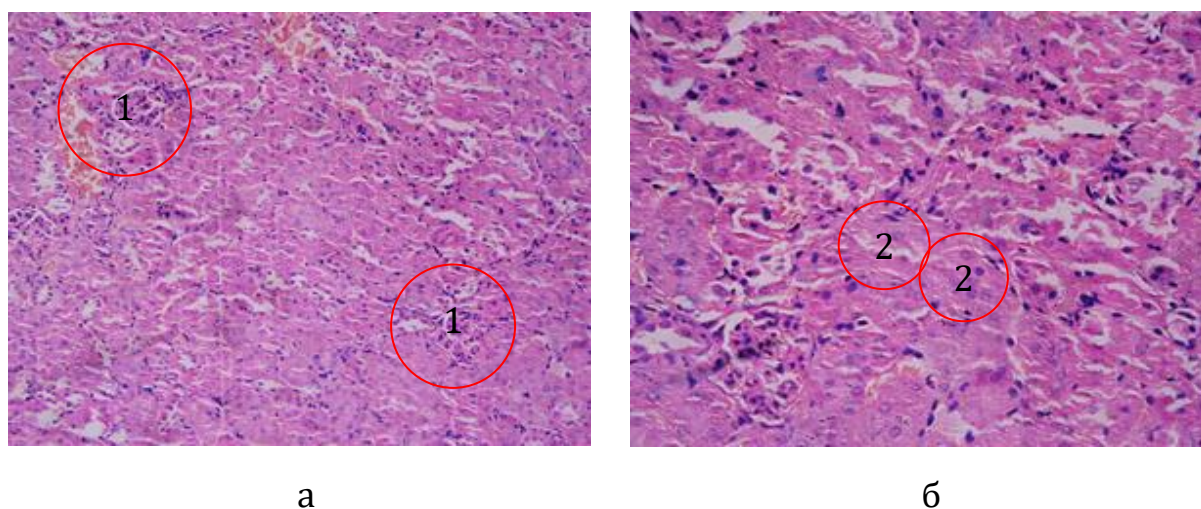
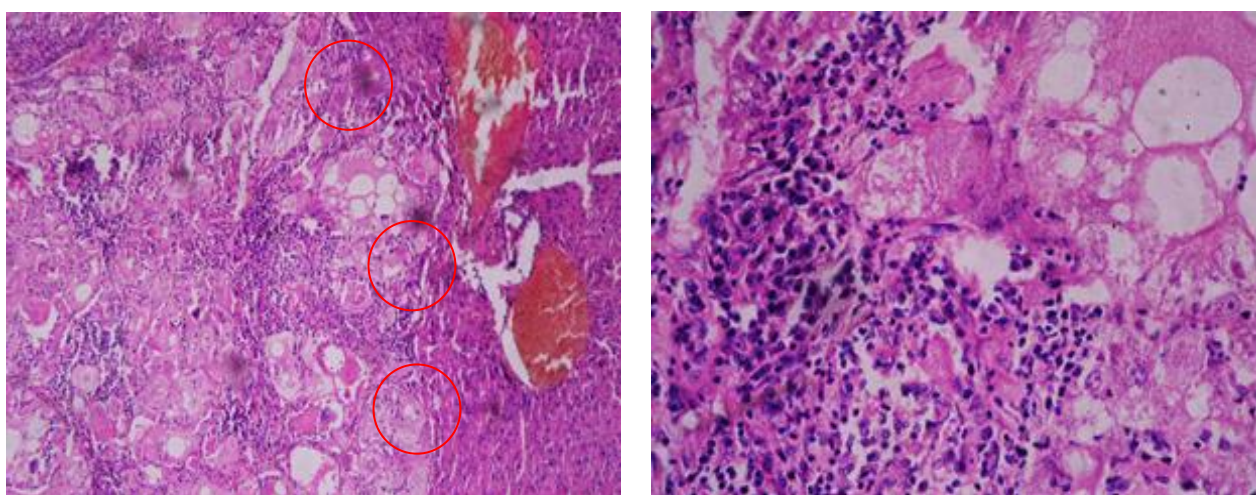


Рис 3.39 Мікрофотографія печінки миші з початком розвитку онкологічних змін. Позначені: кластери багатоядерних клітин (1), зменшені просвітлені ядра (2). Фарбування гематоксилін-еозин. x200(а), x400(б)

Далі приводиться випадок, в якому трансплантовані МСК не перешкодили розвитку спадково-детермінованої гепатокарциноми. Гістологічне дослідження печінки цього випадку визначило велике пухлино-подібне утворення з нечіткими краями, що проникло в суміжні

ділянки паренхіми печінки. В області пухлинного вузла знаходились великі малігнізовані клітини з оптично порожньою цитоплазмою. В деяких клітинах спостерігались балоно-подібні утворення. Ядра клітин гіперхромні з наявністю патологічного мітозу. Спостерігались виражений перицеляральный фіброз, дифузно розташовані тіла Меллорі, розсіяна інфільтрація сегментованими лейкоцитами. Виявлені зміни свідчать про те, що цей вузол є варіантом стеатогепатиту гепатоцелюлярної карциноми (Рис 3.40). Область печінкової тканини, прилегла до пухлинного утворення, характеризується наявністю альтеративно-некротичних зон з частково збереженою структурою балочної будови. Гепатоцити з нечіткими межами, ядра зморшкуваті, просвітлені. Визначається виражене розширення і повнокровність центральні вени, судин триад і синусоїдальних капілярів, в деяких місцях з утворенням кров'яних «озер». Виражена гіперплазія клітин Купфера, дифузна сегментоклеарна лейкоцитарна інфільтрація паренхіми печінки.



а

б

Рис 3.40 Мікрофотографія печінки миші з моделлю системних уражень після інтраперітонеального введення 100 000 мезенхімальних стовбурових клітин людини. Випадок, коли трансплантовані

МСК не змогли перешкодити розвитку спадково-детермінованого канцерогенезу. Стеатогепатитний варіант гепатоцелюлярної карциноми (б). На знімку (а) відзначено межу пухлинного вузла і збережену тканину печінки Фарбування гематоксилін-еозин. x100(a), x400(b)

Вплив додаткового екзогенного фактору на індукцію канцерогенезу за умов токсичного ураження організму

Результати одного з наших дослідів за критерієм пухлиноутворення значно розбігались з результатами інших дослідів (Таблиця 3.7).

Таблиця 3.7 Вплив додаткового екзогенного фактору на активацію пухлиноутворення.



Досліди	Шифр групи	Тривалість, тижні	пало із всього тварин	% тварин, що вижили	Коеф. що вижили відносно самовідн.	Пухлини у живих
Дослід 8	Формування ураження CCl ₄ (пожежа на нафтоосховищі)	12	4/22	82		
8	самовідновлення	5	1/3	67	1	1/2
8	FM 10 тис	7	0/3	100	1,5	3/3
8	FM 100 тис	7	1/3	67	1	1/2
8	МСК 10 тис	7	1/3	67	1	1/2
8	МСК 100 тис	7	1/3	67	1	1/2

При всебічному аналізі можливих причин такої незвичайної кількості пухлин було з'ясовано, що формування моделі системного ураження для експерименту №8 з 06.05.2015 по 28.07.2015 випадково збіглося з пожежею на нафтобазі в Глевасі 8 - 16 червня 2015 року в 20 км від віварію інституту. (Рис 3.41) Під час цієї аварії, вже з 9 червня, за даними СЕС кількість небезпечних речовин у повітрі Києва перевищила гранично допустимі концентрації. Смог від продуктів горіння в Києві протримав кілька днів. Це була єдина істотна відмінність від попередніх експериментів. Виявилось, що у тварин з частково виснаженими

механізмами детоксикації (до цього часу тварини вже перебували під навантаженням CCl_4 протягом 5 тижнів з 12ти) отримана доза продуктів горіння спровокувала масову індукцію пухлиноутворення (печінки і легенів). При цьому на інших мишей у віварію ситуація на загальний погляд не вплинула.



Рис 3.41 Космічна фотофіксація події на нафтосховищі у Гливісі 8 - 16 червня 2015року.

Це спостереження підтверджує граничний стан тварин із схильністю до пухлиноутворення під час формування моделі еСПОД при якому додатковий уражуючий фактор призводить до значної індукції канцерогенезу.

Висновок

Показано, що трансплантовані МСК, в умовах системного ураження організму, не підсилюють і не прискорюють розвиток пухлин у тварин з наявною спадковою схильністю до канцерогенезу. Системне ураження реалізує генетичну схильність до канцерогенезу, але навіть за цих умов трансплантація МСК не призводила до посилення цього процесу.

4. УЗАГАЛЬНЕННЯ ТА АНАЛІЗ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

4.1 Аналіз результатів досліджень

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. Важливою 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.

В якості чинника, що запускає ланцюг руйнівних реакцій створеної експериментальної тваринної моделі був обраний тетрахлорметан (CCl_4), метаболізм якого в клітині викликає появу низки реакційно-активних молекул, і впливає на проникливість мембран. При тривалому навантаженні відбувається виснаження наявних механізмів детоксикації клітин, що послідовно призводить до їх загибелі, розвитку хронічних запальних реакцій і дисфункції органів. Важкість стану моделі підтверджується патоморфологічними змінами життєво-важливих органів і індексом смертності на етапі формування необхідного рівню патології, який складав 18-22% від загальної кількості експериментальних тварин.

В результаті відтворення експериментальної моделі синдрому поліорганної дисфункції лінійні тварини поділились на три групи. Тварини однієї загинули під час формування моделі, не витримавши навантаження CCl_4 . Захисний і відновлювальний потенціал другої групи виявився настільки потужним, що тварини самотужки пережили і відновились після тривалого отруєння. У основній, третьої групи, розвився синдром поліорганної дисфункції (СПОД). Таким чином ми спостерігали гетерогенність в популяції, яка зовсім непомітна в нормальних умовах, але проявляється при глибокому виснаженні відновного потенціалу клітини. Такий результат можна назвати несподіваним, враховуючи той факт, що лінійність мишей контролюється по обмеженому числу генетичних маркерів, а відновлювальні механізми клітини – вкрай складна багатоконпонентна система з величезною кількістю взаємозв'язків. Плануючи експерименти з використанням такої моделі, слід враховувати, що всередині популяції будь-яких лінійних тварин по реакції на зовнішній токсичний вплив існують особини, які занадто слабкі, щоб витримати навантаження, яке витримує основна маса популяції. Але є також і такі, на які токсичний агент діє слабше.

Така гетерогенність популяції проявляється тільки при несприятливих умовах. В нашому експерименті це був токсичний ксенобіотик CCl_4 . Цю гетерогенність наочно видно при аналізі показників аланінамінотрансферази (АЛТ) та аспартатамінотрансферази (АСТ) (Рис 3.1). У тварин контрольної групи, ці показники дуже близькі. І ні на яку гетерогенність не вказують. На підставі цих визначень ніби витікає висновок про однорідність популяції. Але реакція, ступінь сприйнятливості, ураження від токсичного ксенобіотика, виявляється високо індивідуальною. За АЛТ вона досягає майже трикратної величини і дворазової по k де Рітса. Видно, наскільки різниться чутливість /

стійкість різних (в нормі, начебто ідентичних) індивідуумів до зовнішніх чинників.

При тривалому самовідновленні за окремими показниками відбуваються зміни, але, як видно з величин коефіцієнта де Рітца, відновлення печінки не відбувається. А зміни окремих показників характеризують два стану – при безперервному надходженні в організм токсичного агенту, і після його припинення, але в умовах хронічного патологічного процесу, що виник.

Попри всю важливість звичайних загальноприйнятих методів оцінки стану дослідних тварин (АЛТ, АСТ, вага органів і їх статистична обробка та ін.) вони не дають адекватної картини оскільки усереднення при індивідуальній сприйнятливості не відповідає реальності.

Така індивідуальність реакції у різних мишей однієї лінії, на перший погляд, може бути вкрай дивною. Але аналіз особливостей лінійності тварин показує, що інакше бути не може. Лінійність тварин (і відповідний відбір на лінійність) здійснюється на обмеженій кількості маркерів. Це генетичні (і, відповідно, фенотипічні) ідентичності для тих властивостей, які характеризують лінію, а також періодичні контрольні тести на ідентичність тварин лінії шляхом приживання пересадженої шкіри від однієї особини до іншої. Крім того, саме розмноження відбувається в межах лінії, що запобігає потраплянню чужорідного генетичного матеріалу і сприяє усередненню всіх інших генів в популяції. Але що стосується генетично обумовлених процесів, що беруть участь в каскадах розвитку системних уражень, то такий відбір при відборі на лінійність не тільки не виконується, але і не виявляється. При цьому вона передбачає значну кількість індивідуальних молекулярних, біохімічних і складних системних процесів. Такі процеси викликані як індивідуальними, так і взаємопов'язаними подіями, в яких беруть участь продукти значної частини генів всього геному. Це добре видно з каскадів розвитку

руйнування клітин на Рис 1.1 Ще більш складною і багатогранною є подальша системна поразка всього організму.

Індивідуальні відмінності всередині однієї лінії, що проявились у критичному стані, є відбитком гетерогенності всередині популяції, які допомагають популяції вижити в складних умовах. Апроксимуючи на людей, слід враховувати, що рівень неоднорідності реакцій буде ще більш широкий.

Відзначимо, що були зафіксовані відмінності абсолютних значень показників при незалежних однакових експериментах, розставлених в часі. Можна припустити, що це пов'язано з тим, що в різні сезони при змінах погоди тварини за своїми фізіологічними, біохімічними та іншими властивостями будуть відрізнятися. Так як цикли розмноження у мишей відносно короткі, молодняк різних (за часом) послідів не буде тотожним за фізіологічними кількісними показниками. Аналізи органів здорових тварин (контроль за експериментами) підтверджують це припущення. Згідно з нормою, зміни будуть відбуватися при патології. Не тотожність тварин різного часу не може не позначитися на абсолютних значеннях показників в експериментальних варіантах. Але при всіх таких відмінностях загальна спрямованість процесів поразки, викликаних CCl_4 , в експериментальних групах має однаковий характер.

Таким чином, розроблена схема отримання системного пошкодження у мишей за рахунок тривалого введення їм тетрахлориду вуглецю дає адекватну, з урахуванням важкості стану, відтворюваність, відповідно до загального напрямку процесу. Слід враховувати, що миші різних ліній можуть відрізнятися чутливістю до CCl_4 . Для цього не може бути єдиної кількісної схеми (دوزи, інтервалів, циклів) для всіх ліній, а контроль відтворюваності для різних ліній мишей слід робити за фізіологічними показниками. Тому в якості протоколу можна використовувати тільки певну основну схему. Але бажано спочатку

перевірити сприйнятливість обраної лінії. Для цього можна взяти за основу запропоновану схему з варіантом більшої і меншої дози CCl_4 .

Таким чином розроблена модель досягає граничних станів виснаження декількох захисних систем організму одночасно. Тому спостерігається виражена неоднорідність навіть лінійних тварин в їх реакції на руйнівні фактори, індуковані CCl_4 . Це призводить до того, що в експериментальних групах, рознесених у часі абсолютні значення показників уражень, які зазвичай не мають видимого впливу на здорових тварин, можуть істотно коливатись у тварин, що знаходяться в прикордонному стані. Щоб зменшити відмінність результатів між групами експериментів, необхідно мінімізувати ймовірність таких факторів і для кожного окремого експерименту використовувати всі контролю, незалежно від їх повторюваності.

Розроблену модель використовували для дослідження терапевтичного потенціалу МСК в умовах синдрому поліорганної дисфункції, що розвивався у результаті хронічного ушкодження та виснаженні систем детоксикації.

Було невідомо, чи залишаються в організмі з виснаженими системи детоксикації на стадіях, коли вже виникає синдром поліорганної дисфункції, можливості для відновлення, які можна успішно стимулювати і активувати. Було також невідомо, чи зможуть трансплантовані стовбурові клітини реалізувати свій потенціал в умовах системного оксидативного стресу, який супроводжує масову загибель клітин і накопичення реакційно-активних продуктів. Однак у своїх дослідженнях ми фіксували саме такий ефект. Поки що відкритим залишається питання за рахунок яких механізмів активується і за рахунок яких клітин відбувається відновлення. Для запуску процесів відновлення у таких умовах потрібен значний клітинний потенціал безпосередньо самої тканини. Проведені іншими дослідниками

розрахунки показують, що ні регіональних мезенхімальних стромальних клітин, ні трансплантованих МСК недостатньо для здійснення такого відновлення. Отже слід припустити на задіяність додаткового потенціалу. На роль такого потенціалу можуть претендувати адвентиційні клітини, що оточують кожну судину і за поверхневими маркерами можуть бути ідентифіковані, як прогенітори. Кількості і розповсюженості по тканинам таких клітин достатньо для здійснення масового відновлення. Для контрольованого практичного використання зазначеного феномену, ще потрібно з'ясувати можливі механізми такої активації за допомогою трансплантованих стовбурових клітин. Але вже зрозуміло, що такий шлях є перспективним.

У несприятливих умовах і патологічних станах, у тварин проявляються існуючі відмінності в межах однієї лінії, які непомітні в нормальних умовах, але вони, тим не менш, відкладають свій, іноді значний, відбиток на результат перебігу захворювання і його лікування. В наших експериментах це проявилось в фактичному розділенні тварин однієї лінії, що утримувались в однакових умовах, на певні групи. Крім основної групи тварин, фізіологічні реакції якої були схожі один на одного, можна виділити ще як мінімум дві – одна з них з'явилась дуже слабкою і не витримала однакового для всіх тривалого навантаження тетрахлорметаном. Власного захисно-відновлювального потенціалу в них з'явилось недостатньо для знешкодження токсичного ефекту на стадії формування моделі. Цілком можливо, що причиною їх смерті могла стати і неадекватно підвищена реакція імунної системи. Друга, відносно невелика група тварин, у яких процеси самовідновлення були настільки адекватними, що дозволили їм навіть через тривалий час після інтоксикації відчувати себе відносно добре. І якщо гетерогенність реакції тварин була цілком очікуваною, то значення неоднорідності популяції МСК була не такою очевидною. Слід враховувати, що крім описаного

явища про/протизапальної поляризації самих мультипотентних клітин (а зараз вже виділяють більше трьох станів), існує ще й їх загальна початкова активність, пов'язана із станом донора. В результаті регенеративний потенціал медичних клітин, отриманих від одного донора в різний час, вже може відрізнятися. В організмі реципієнта, крім миттєвих реакцій викиду мікровезикул при ураженнях, трансплантовані стовбурові клітини також можуть змінювати свій епігеном під впливом оточення. Беручи до уваги, що взаємодія трансплантованих стовбурових клітин з клітинами реципієнту має в основному регуляторний характер, стає зрозуміло, що мінливість станів чи активності використовуваних стовбурових клітин буде значно відображатися на кінцевому результаті. Інтерференція гетерогенностей реципієнта та донорських клітин дають складну картину взаємодій і ефектів, відображення якої ми спостерігали в наших експериментах, періодично стикаючись з, здавалося б, суперечливими результатами. Це ще раз підтверджує необхідність індивідуального підходу до пацієнта, контролюючи мінливість багатьох параметрів, особливо при важких станах. Можливо, саме підвищеною гетерогенністю ефектів МСК при патологіях і пояснюється велика частка клінічних випробувань з використанням різних стовбурових клітин, які не досягли 3-ї і 4-ї стадії клінічних випробувань. На одному полотні лежать відмінності в ефектах, що спостерігаються нами при використанні стовбурових клітин з різних ліній мишей, які для одержувача з'являються однаково алогенними.

Ми спостерігали посилення терапевтичного ефекту в разі потрібної трансплантації стовбурових клітин, в порівнянні з одноразовим. Одноразове введення МСК використовується в багатьох доступних протоколах в медицині. У деяких випадках ефективність такої процедури забезпечується існуванням порогового ефекту, що проявляється в запуску і розвитку відновлення шляхом одноразового введення

стовбурових клітин. Однак отримані результати показують перспективи застосування множинного (або дробового) введення стовбурових клітин, хоча б у випадках важких уражень, коли результат одноразового введення буде недостатнім.

Враховуючи результати наведених вище даних гістологічного дослідження печінки тварин експериментальних груп, можна говорити про часткове відновлення морфологічної структури тканини печінки при використанні і аlogenних і ксеногенних стовбурових клітин. При цьому гістологічна картина з введенням різних доз клітин (10 000 і 100 000) мала певні відмінності. При введенні в дозі 10 000 в порівнянні з нелікованими тваринами (інтоксикація тетрахлоридом вуглецю), відмічена наявність компенсаторно-адаптивних реакцій, відсутність альтеративно-некротичних змін, відзначається відсутність псевдочасточек і фіброзних змін в стромі, але відбувається розширення і повнота центральних вен і судин тріад, невелика лейкоцитарна інфільтрація стромі. У той же час, при введенні 100 000 фібробластоподібних клітин миші спостерігалися менш виражені компенсаторно-адаптивні реакції, на відміну від попередньої групи (10 000 клітин), центральні вени і судини тріад не були розширені, що надійно пов'язано з менш функціональним стресом гепатоцитів через стимуляцію їх проліферації стовбуровими клітинами. Отже, більш ефективна і сприятлива доза фібробластоподібних клітин миші з точки зору регенеративних можливостей щодо пошкодженої тканини печінки становила 100 000.

Аналіз і порівняння морфологічних особливостей печінки в умовах застосування ало- і ксеногенних стовбурових клітин в різних дозах з їх внутрішньочеревним введенням при моделюванні CCl_4 -індукованих системних уражень в умовах виснажених захисних механізмів показує, що аlogenні стовбурові клітини проявляють лікувальні і регенеративні

властивості по відношенню до печінки, які сприяють відновленню нормальної структури тканини печінки при її токсичному пошкодженні за рахунок регенерації гепатоцитів. При цьому більш істотний ефект спостерігається при використанні більшої кількості стовбурових клітин, що можна пояснити потраплянням частини клітин безпосередньо в печінку з черевної порожнини минаючи малий круг кровообігу.

4.2 Висновки

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

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.

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 алогенних 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.

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.

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.

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.

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

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Гусев Е.Ю., Зотова Н.В., Черешнев В.А. «Сепсис-3»: новая редакция — старые проблемы. Анализ с позиции общей патологии. Инфекция и иммунитет. 2021;11(4):649-662. doi:10.15789/2220-7619-SAN-1629
2. Zhong J, Shi G. Editorial: Regulation of Inflammation in Chronic Disease. *Front Immunol.* 2019;10:737. doi:10.3389/fimmu.2019.00737
3. Ferreira SS, Nunes FPB, Casagrande FB, Martins JO. Insulin Modulates Cytokine Release, Collagen and Mucus Secretion in Lung Remodeling of Allergic Diabetic Mice. *Front Immunol.* 2017;8:633. doi:10.3389/fimmu.2017.00633
4. Li X, Jin Q, Yao Q, et al. Placental Growth Factor Contributes to Liver Inflammation, Angiogenesis, Fibrosis in Mice by Promoting Hepatic Macrophage Recruitment and Activation. *Front Immunol.* 2017;8:801. doi:10.3389/fimmu.2017.00801
5. Xu H, Chen M, Forrester JV. Para-inflammation in the aging retina. *Prog Retin Eye Res.* 2009;28(5):348-368. doi:10.1016/j.preteyeres.2009.06.001
6. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature.* 2008;454(7203):428-435. doi:10.1038/nature07201
7. Kmiec Z. Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 2001;161:III-151. doi:10.1007/978-3-642-56553-3
8. Suzuki K. Chronic Inflammation as an Immunological Abnormality and Effectiveness of Exercise. *Biomolecules.* 2019;9(6):223. doi:10.3390/biom9060223
9. Haines DD, Juhasz B, Tosaki A. Management of multicellular senescence and oxidative stress. *J Cell Mol Med.* 2013;17(8):936-957. doi:10.1111/jcmm.12074
10. Marshall JC. The multiple organ dysfunction syndrome. In: Holzheimer RG,

- Mannick JA, editors. Surgical Treatment: Evidence-Based and Problem-Oriented. Munich: Zuckschwerdt; 2001. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6868/>.
11. Osterbur K, Mann FA, Kuroki K, DeClue A. Multiple organ dysfunction syndrome in humans and animals. *J Vet Intern Med.* 2014;28(4):1141-1151. doi:10.1111/jvim.12364
 12. Moore FA, Moore EE. Evolving concepts in the pathogenesis of postinjury multiple organ failure. *Surg Clin North Am.* 1995;75(2):257-277. doi:10.1016/s0039-6109(16)46587-4
 13. Mizock BA. The multiple organ dysfunction syndrome. *Dis Mon.* 2009;55(8):476-526. doi:10.1016/j.disamonth.2009.04.002
 14. Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(10):776-787. doi:10.1038/nri2402
 15. Mizock BA. The multiple organ dysfunction syndrome. *Dis Mon.* 2009;55(8):476-526. doi:10.1016/j.disamonth.2009.04.002
 16. Larche J, Lancel S, Hassoun SM, et al. Inhibition of mitochondrial permeability transition prevents sepsis-induced myocardial dysfunction and mortality. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48(2):377-385. doi:10.1016/j.jacc.2006.02.069
 17. Merz T, Denoix N, Huber-Lang M, Singer M, Radermacher P, McCook O. Microcirculation vs. Mitochondria-What to Target?. *Front Med (Lausanne).* 2020;7:416. Published 2020 Aug 5. doi:10.3389/fmed.2020.00416
 18. Mizock BA. The multiple organ dysfunction syndrome. *Dis Mon.* 2009;55(8):476-526. doi:10.1016/j.disamonth.2009.04.002
 19. Khadaroo RG, Marshall JC. ARDS and the multiple organ dysfunction syndrome. Common mechanisms of a common systemic process. *Crit Care Clin.* 2002;18(1):127-141. doi:10.1016/s0749-0704(03)00069-1
 20. Maynard ND, Bihari DJ, Dalton RN, Beale R, Smithies MN, Mason RC. Liver

- function and splanchnic ischemia in critically ill patients. *Chest*. 1997;111(1):180-187. doi:10.1378/chest.111.1.180
21. Parekh D, Dancer RC, Thickett DR. Acute lung injury. *Clin Med (Lond)*. 2011;11(6):615-618. doi:10.7861/clinmedicine.11-6-615
 22. Messmer UK, Winkel G, Briner VA, Pfeilschifter J. Glucocorticoids potently block tumour necrosis factor-alpha- and lipopolysaccharide-induced apoptotic cell death in bovine glomerular endothelial cells upstream of caspase 3 activation. *Br J Pharmacol*. 1999;127(7):1633-1640. doi:10.1038/sj.bjp.0702726
 23. Kak V. Mediators of systemic inflammatory response syndrome and the role of recombinant activated protein C in sepsis syndrome. *Infect Dis Clin North Am*. 2011;25(4):835-850. doi:10.1016/j.idc.2011.07.009
 24. Sonnevile R, Verdonk F, Rauturier C, et al. Understanding brain dysfunction in sepsis. *Ann Intensive Care*. 2013;3(1):15. doi:10.1186/2110-5820-3-15.
 25. Lamar CD, Hurley RA, Taber KH. Sepsis-associated encephalopathy: review of the neuropsychiatric manifestations and cognitive outcome. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 2011;23(3):237-241. doi:10.1176/jnp.23.3.jnp237
 26. Sharshar T, Annane D, de la Grandmaison GL, Brouland JP, Hopkinson NS, Françoise G. The neuropathology of septic shock. *Brain Pathol*. 2004;14(1):21-33. doi:10.1111/j.1750-3639.2004.tb00494.x
 27. Hopkins RO, Weaver LK, Chan KJ, Orme JF Jr. Quality of life, emotional, and cognitive function following acute respiratory distress syndrome. *J Int Neuropsychol Soc*. 2004;10(7):1005-1017. doi:10.1017/s135561770410711x
 28. Bronner MB, Knoester H, Sol JJ, Bos AP, Heymans HS, Grootenhuis MA. An explorative study on quality of life and psychological and cognitive function in pediatric survivors of septic shock. *Pediatr Crit Care Med*.

- 2009;10(6):636-642. doi:10.1097/PCC.0b013e3181ae5c1a
29. Nuzzo D, Cambula G, Bacile I, et al. Long-Term Brain Disorders in Post Covid-19 Neurological Syndrome (PCNS) Patient. *Brain Sci.* 2021;11(4):454. doi:10.3390/brainsci11040454
 30. Shehata GA, Lord KC, Grudzinski MC, Elsayed M, Abdelnaby R, Elshabrawy HA. Neurological Complications of COVID-19: Underlying Mechanisms and Management. *Int J Mol Sci.* 2021;22(8):4081. doi:10.3390/ijms22084081
 31. Kincaid KJ, Kung JC, Senetar AJ, et al. Post-COVID seizure: A new feature of "long-COVID". *eNeurologicalSci.* 2021;23:100340. doi:10.1016/j.ensci.2021.100340
 32. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002;420(6917):860-867. doi:10.1038/nature01322
 33. Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med.* 1986;315(26):1650-1659. doi:10.1056/NEJM198612253152606
 34. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
 35. Pavlova NN, Thompson CB. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab.* 2016;23(1):27-47. doi:10.1016/j.cmet.2015.12.006
 36. Hatano K, Fujita K, Nonomura N. Application of Anti-Inflammatory Agents in Prostate Cancer. *J Clin Med.* 2020;9(8):2680. Published 2020 Aug 18. doi:10.3390/jcm9082680
 37. García-Jiménez C, Goding CR. Starvation and Pseudo-Starvation as Drivers of Cancer Metastasis through Translation Reprogramming. *Cell Metab.* 2019;29(2):254-267. doi:10.1016/j.cmet.2018.11.018
 38. Tuli R, Li WJ, Tuan RS. Current state of cartilage tissue engineering. *Arthritis Res Ther.* 2003;5(5):235-238. doi:10.1186/ar991
 39. Boheler KR. Functional markers and the "homogeneity" of human

- mesenchymal stem cells. *J Physiol*. 2004;554(Pt 3):592.
doi:10.1113/jphysiol.2003.057224
40. Aust L, Devlin B, Foster SJ, et al. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy*. 2004;6(1):7-14.
doi:10.1080/14653240310004539
 41. Griffiths MJ, Bonnet D, Janes SM. Stem cells of the alveolar epithelium. *Lancet*. 2005;366(9481):249-260. doi:10.1016/S0140-6736(05)66916-4
 42. Fan J, Varshney RR, Ren L, Cai D, Wang DA. Synovium-derived mesenchymal stem cells: a new cell source for musculoskeletal regeneration. *Tissue Eng Part B Rev*. 2009;15(1):75-86.
doi:10.1089/ten.teb.2008.0586
 43. Jackson WM, Nesti LJ, Tuan RS. Potential therapeutic applications of muscle-derived mesenchymal stem and progenitor cells. *Expert Opin Biol Ther*. 2010;10(4):505-517. doi:10.1517/14712591003610606
 44. Smiler D, Soltan M, Albitar M. Toward the identification of mesenchymal stem cells in bone marrow and peripheral blood for bone regeneration. *Implant Dent*. 2008;17(3):236-247. doi:10.1097/ID.0b013e3181835b13
 45. He Q, Wan C, Li G. Concise review: multipotent mesenchymal stromal cells in blood. *Stem Cells*. 2007;25(1):69-77. doi:10.1634/stemcells.2006-0335
 46. Lu H, Wang F, Mei H, Wang S, Cheng L. Human Adipose Mesenchymal Stem Cells Show More Efficient Angiogenesis Promotion on Endothelial Colony-Forming Cells than Umbilical Cord and Endometrium. *Stem Cells Int*. 2018;2018:7537589. Published 2018 Dec 13.
doi:10.1155/2018/7537589.
 47. Wang X, Liu L, Mou S, et al. Investigation of platelet-rich plasma in increasing proliferation and migration of endometrial mesenchymal stem cells and improving pregnancy outcome of patients with thin endometrium [published online ahead of print, 2018 Dec 3]. *J Cell Biochem*. 2018;10.1002/jcb.28014. doi:10.1002/jcb.28014

48. In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, et al. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells*. 2004;22(7):1338-1345. doi:10.1634/stemcells.2004-0058
49. Miao Z, Jin J, Chen L, et al. Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int*. 2006;30(9):681-687. doi:10.1016/j.cellbi.2006.03.009
50. Nagamura-Inoue T, He H. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility. *World J Stem Cells*. 2014;6(2):195-202. doi:10.4252/wjsc.v6.i2.195
51. Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol*. 2000;109(1):235-242. doi:10.1046/j.1365-2141.2000.01986.x
52. Mareschi K, Biasin E, Piacibello W, Aglietta M, Madon E, Fagioli F. Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood. *Haematologica*. 2001;86(10):1099-1100
53. Gay IC, Chen S, MacDougall M. Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. *Orthod Craniofac Res*. 2007;10(3):149-160. doi:10.1111/j.1601-6343.2007.00399.x
54. Seo BM, Miura M, Gronthos S, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*. 2004;364(9429):149-155. doi:10.1016/S0140-6736(04)16627-0
55. Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res*. 2003;18(4):696-704. doi:10.1359/jbmr.2003.18.4.696
56. Khiatah B, Qi M, Du W, et al. Intra-pancreatic tissue-derived mesenchymal stromal cells: a promising therapeutic potential with anti-inflammatory and pro-angiogenic profiles. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):322. Published 2019 Nov 15. doi:10.1186/s13287-019-1435-2
57. Johnstone BH, Miller HM, Beck MR, et al. Identification and

- characterization of a large source of primary mesenchymal stem cells tightly adhered to bone surfaces of human vertebral body marrow cavities. *Cytotherapy*. 2020;22(11):617-628. doi:10.1016/j.jcyt.2020.07.003
58. Berebichez-Fridman R, Montero-Olvera PR. Sources and Clinical Applications of Mesenchymal Stem Cells: State-of-the-art review. *Sultan Qaboos Univ Med J*. 2018;18(3):e264-e277. doi:10.18295/squmj.2018.18.03.002
59. Via AG, Frizziero A, Oliva F. Biological properties of mesenchymal Stem Cells from different sources. *Muscles Ligaments Tendons J*. 2012;2(3):154-162. Published 2012 Oct 16
60. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-317. doi:10.1080/14653240600855905
61. М.Д. Кучма, В.А. Шаблій, В.М. Кирик, А.Н. Світінa, Ю.М. Шаблій, Прокопець Ю.К., Індиченко Т.М., Л.Л. Лукаш, Г.С. Лобинцева. Гемопоетичні прогеніторні клітини плаценти та пуповинної крові: імунофенотиповий аналіз та потенціал до диференціації *in vitro*. *BiotechnologiaActa*. 2014 г.;7(4):61–70.
62. Kuchma MD, Kyryk VM, Svitina HM, et al. Comparative Analysis of the Hematopoietic Progenitor Cells from Placenta, Cord Blood, and Fetal Liver, Based on Their Immunophenotype. *Biomed Res Int*. 2015;2015:418752. doi:10.1155/2015/418752
63. Wu M, Zhang R, Zou Q, et al. Comparison of the Biological Characteristics of Mesenchymal Stem Cells Derived from the Human Placenta and Umbilical Cord. *Sci Rep*. 2018;8(1):5014. Published 2018 Mar 22. doi:10.1038/s41598-018-23396-1
64. Brooks AES, Iminoff M, Williams E, et al. Ex Vivo Human Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stromal Cells (ASC) Are a Heterogeneous

- Population That Demonstrate Rapid Culture-Induced Changes. *Front Pharmacol.* 2020;10:1695. Published 2020 Feb 20.
doi:10.3389/fphar.2019.01695
65. Bhartiya D. The need to revisit the definition of mesenchymal and adult stem cells based on their functional attributes. *Stem Cell Res Ther.* 2018;9(1):78. Published 2018 Mar 27. doi:10.1186/s13287-018-0833-1
 66. Caplan AI. Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name!. *Stem Cells Transl Med.* 2017;6(6):1445-1451. doi:10.1002/sctm.17-0051
 67. Murray IR, Chahla J, Safran MR, et al. International Expert Consensus on a Cell Therapy Communication Tool: DOSES. *J Bone Joint Surg Am.* Németh K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production [published correction appears in *Nat Med.* 2009 Apr;15(4):462]. *Nat Med.* 2009;15(1):42-49. doi:10.1038/nm.1905
 68. Carty F, Mahon BP, English K. The influence of macrophages on mesenchymal stromal cell therapy: passive or aggressive agents?. *Clin Exp Immunol.* 2017;188(1):1-11. doi:10.1111/cei.12929
 69. Galipeau J, Sensébé L. Mesenchymal Stromal Cells: Clinical Challenges and Therapeutic Opportunities. *Cell Stem Cell.* 2018;22(6):824-833. doi:10.1016/j.stem.2018.05.004
 70. Luk F, de Witte SF, Korevaar SS, et al. Inactivated Mesenchymal Stem Cells Maintain Immunomodulatory Capacity. *Stem Cells Dev.* 2016;25(18):1342-1354. doi:10.1089/scd.2016.0068
 71. Dai W, Hale SL, Martin BJ, et al. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: short- and long-term effects. *Circulation.* 2005;112(2):214-223.
doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.527937
 72. Fazel S, Chen L, Weisel RD, et al. Cell transplantation preserves cardiac

- function after infarction by infarct stabilization: augmentation by stem cell factor. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2005;130(5):1310.
doi:10.1016/j.jtcvs.2005.07.012
73. Noiseux N, Gneecchi M, Lopez-Illasaca M, et al. Mesenchymal stem cells overexpressing Akt dramatically repair infarcted myocardium and improve cardiac function despite infrequent cellular fusion or differentiation. *Mol Ther.* 2006;14(6):840-850.
doi:10.1016/j.ymthe.2006.05.016
74. Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Keene CD, Verfaillie CM, Low WC. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol.* 2002;174(1):11-20. doi:10.1006/exnr.2001.7853
75. de Souza LE, Malta TM, Kashima Haddad S, Covas DT. Mesenchymal Stem Cells and Pericytes: To What Extent Are They Related?. *Stem Cells Dev.* 2016;25(24):1843-1852. doi:10.1089/scd.2016.0109
76. Gneecchi M, He H, Liang OD, et al. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med.* 2005;11(4):367-368. doi:10.1038/nm0405-367
77. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, et al. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms [published correction appears in *Circ Res.* 2005 Aug 5;97(3):e51]. *Circ Res.* 2004;94(5):678-685. doi:10.1161/01.RES.0000118601.37875.AC
78. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, et al. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms [published correction appears in *Circulation.* 2005 Jul 26;112(4):e73]. *Circulation.* 2004;109(12):1543-1549.
doi:10.1161/01.CIR.0000124062.31102.57
79. Lu K, Li HY, Yang K, et al. Exosomes as potential alternatives to stem cell

- therapy for intervertebral disc degeneration: in-vitro study on exosomes in interaction of nucleus pulposus cells and bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8(1):108. Published 2017 May 10. doi:10.1186/s13287-017-0563-9
80. Lukomska B, Stanaszek L, Zuba-Surma E, Legosz P, Sarzynska S, Drela K. Challenges and Controversies in Human Mesenchymal Stem Cell Therapy. *Stem Cells Int.* 2019;2019:9628536. Published 2019 Apr 9. doi:10.1155/2019/9628536.
81. Li P, Gong Z, Shultz LD, Ren G. Mesenchymal stem cells: From regeneration to cancer. *Pharmacol Ther.* 2019;200:42-54. doi:10.1016/j.pharmthera.2019.04.005
82. Marques TG, Chaib E, da Fonseca JH, et al. Review of experimental models for inducing hepatic cirrhosis by bile duct ligation and carbon tetrachloride injection. *Acta Cir Bras.* 2012;27(8):589-594. doi:10.1590/s0102-86502012000800013
83. Reif S, Aeed H, Shilo Y, et al. Treatment of thioacetamide-induced liver cirrhosis by the Ras antagonist, farnesylthiosalicylic acid. *J Hepatol.* 2004;41(2):235-241. doi:10.1016/j.jhep.2004.04.010
84. Starkel P, Leclercq IA. Animal models for the study of hepatic fibrosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2011;25(2):319-333 . doi:10.1016/j.bpg.2011.02.004
85. Scholten D, Trebicka J, Liedtke C, Weiskirchen R. The carbon tetrachloride model in mice. *Lab Anim.* 2015;49(1 Suppl):4-11. doi:10.1177/0023677215571192
86. Fickert P, Stöger U, Fuchsbichler A, et al. A new xenobiotic-induced mouse model of sclerosing cholangitis and biliary fibrosis. *Am J Pathol.* 2007;171(2):525-536. doi:10.2353/ajpath.2007.061133
87. Plum W, Tschaharganeh DF, Kroy DC, et al. Lack of glycoprotein 130/signal transducer and activator of transcription 3-mediated signaling in hepatocytes

- enhances chronic liver injury and fibrosis progression in a model of sclerosing cholangitis. *Am J Pathol.* 2010;176(5):2236-2246.
doi:10.2353/ajpath.2010.090469
88. Delire B, Stärkel P, Leclercq I. Animal Models for Fibrotic Liver Diseases: What We Have, What We Need, and What Is under Development. *J Clin Transl Hepatol.* 2015;3(1):53-66. doi:10.14218/JCTH.2014.00035
 89. Kisseleva T, Cong M, Paik Y, et al. Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(24):9448-9453. doi:10.1073/pnas.1201840109
 90. Weber LW, Boll M, Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol.* 2003;33(2):105-136. doi:10.1080/713611034
 91. Mehendale HM. Tissue repair: an important determinant of final outcome of toxicant-induced injury. *Toxicol Pathol.* 2005;33(1):41-51. doi:10.1080/01926230590881808
 92. Manibusan MK, Odin M, Eastmond DA. Postulated carbon tetrachloride mode of action: a review. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 2007;25(3):185-209. doi:10.1080/10590500701569398
 93. McGregor D, Lang M. Carbon tetrachloride: genetic effects and other modes of action. *Mutat Res.* 1996;366(3):181-195. doi:10.1016/s0165-1110(96)90027-5
 94. Weber LW, Boll M, Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol.* 2003;33(2):105-136. doi:10.1080/713611034
 95. Brattin WJ, Glende EA Jr, Recknagel RO. Pathological mechanisms in carbon tetrachloride hepatotoxicity. *J Free Radic Biol Med.* 1985;1(1):27-38. doi: 10.1016/0748-5514(85)90026-1
 96. Кордюм В. А., Шувалова Н. С. Проблема «начала» – формулировка и попытка анализа. *Біополімери і клітини.* (2013) 29. 428-440.

doi:10.7124/bc.000835

97. Manibusan MK, Odin M, Eastmond DA. Postulated carbon tetrachloride mode of action: a review. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 2007;25(3):185-209. doi:10.1080/10590500701569398
98. Kordium V. A., Chaikovskiy Yu. B., Irodov D. M., Drahulian M. V., Gulko T. P., Buchek P. V., Korsak A. V., Neverovskiyy A. V. Modelling of systemic lesion of organism for development of multitarget cellular and cytokine therapy. *Biopolym. Cell.* 2016; 32(5): 381-394. doi: 10.7124/bc.000934
99. Ganie SA, Haq E, Masood A, Hamid A, Zargar MA. Antioxidant and protective effect of ethyl acetate extract of podophyllum hexandrum rhizome on carbon tetrachloride induced rat liver injury. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011;2011:238020. doi:10.1155/2011/238020
100. Ganie SA, Haq E, Hamid A, et al. Carbon tetrachloride induced kidney and lung tissue damages and antioxidant activities of the aqueous rhizome extract of Podophyllum hexandrum. *BMC Complement Altern Med.* 2011;11:17. Published 2011 Feb 28. doi:10.1186/1472-6882-11-17
101. Reitman S, Frankel S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am J Clin Pathol.* 1957;28(1):56-63. doi:10.1093/ajcp/28.1.56
102. Н.А.Плохинский Алгоритмы биометрии. М., МГУ, 1980, 150с.
103. Das M, Boerma M, Goree JR, et al. Pathological changes in pulmonary circulation in carbon tetrachloride (CCl₄)-induced cirrhotic mice. *PLoS One.* 2014;9(4):e96043. Published 2014 Apr 24. doi:10.1371/journal.pone.0096043

ДОДАТОК А**ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ****ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

1. VV Likhodiievskyi, 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.
2. VA Kordium, **DM Irodov**, YB Chaikovskiy Triggering effect of “therapeutic MSC”. Biopolym. Cell. 2017;33(6):463-472.
3. Kordium V.A., **Irodov D.M.** Amazing MSC – phenomenology, problems, solutions and opportunities. Biopolym. Cell. 2017;33(1):64-76.
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.
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 genetikov i selekcioneriv, 2016; 14 (1): 16-26.
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. Шпилева, Н.С. Шувалова Преобразующий потенциал мезенхимальных стволовых. Журнал НАМН України, 2014 том 20 №2 стр 143-152.