

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ,
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ПІКУС ПОЛІНА ОЛЕКСІЇВНА

УДК 577.2:576.54

ДИСЕРТАЦІЯ

**РОЗРОБКА СПОСОБІВ ПОСИЛЕННЯ ТЕРАПЕВТИЧНОЇ ЕФЕКТИВНОСТІ
МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН**

09 Біологія

091 Біологія та біохімія

Подається на здобуття наукового ступеня PhD доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.
Пікус П.О.

Науковий керівник: Кордюм Віталій Арнольдович, член-кореспондент НАН України, академік НАМН України, професор, завідувач відділу регуляторних механізмів клітини Інституту молекулярної біології та генетики НАН України

Київ – 2024

АНОТАЦІЯ

Пікус П.О. Розробка способів посилення терапевтичної ефективності мезенхімальних стовбурових клітин. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня PhD доктора філософії за спеціальністю- 091 «Біологія та біохімія» –Інститут молекулярної біології і генетики Національна академія наук України, Київ, 2024.

Протягом останнього десятиліття досліджень стовбурових клітин значний інтерес виник саме до мезенхімальних стовбурових клітин (МСК), які мають унікальні властивості, такі як мультипотентність, здатність до диференціації, самовідновлення, довгострокової проліферації *ex vivo*, а також імуномодуючі властивості. Завдяки цьому МСК виявилися перспективним інструментом для регенеративної медицини. МСК виділяють із різних джерел, включаючи кістковий мозок, жирову тканину, пуповину тощо. Згідно з зареєстрованих даних з Національного інституту охорони здоров'я США (<https://clinicaltrials.gov/>), кількість клінічних випробувань МСК подвоїлася за останні 5 років було зареєстровано 1014 клінічних випробувань МСК. Однак більшість зареєстрованих клінічних випробувань із застосуванням терапії МСК для різних захворювань людини не виправдали очікувань, незважаючи на обнадійливі доклінічні результати на різних моделях захворювань тварин.

Цей факт обумовлює актуальність досліджень з пошуку способів посилення терапевтичного потенціалу МСК. В якості об'єкта дослідження були вибрані МСК пуповини людини, які мають ряд переваг перед МСК, що отримані з інших джерел.

Метою роботи було розробити способи посилення терапевтичної ефективності МСК пуповини людини та дослідити ефективність МСК з посиленням терапевтичним потенціалом на тваринних моделях деяких захворювань.

Для досягнення мети були сформовані наступні задачі:

1. Одержати моделі ураження печінки у щурів та стерильного гострого

перитоніту у мишей, охарактеризувати їх особливості.

2. Дослідити терапевтичний потенціал вихідних МСК пуповини людини та інкапсульованих в альгінатні капсули на моделі цирозу печінки у щурів.

3. Вивчити особливості впливу МСК пуповини людини на гостре запалення черевної порожнини у мишей, розробити швидкий та ефективний спосіб визначення терапевтичної ефективності МСК, який дозволяє порівнювати терапевтичний потенціал різних препаратів МСК пуповини людини та вплив нього ряду факторів

4. Вивчити *in vivo* взаємодію вихідних та прекондиціонованих МСК пуповини людини з інтраперитонеальними макрофагами на моделі перитоніту у мишей

5. Створити модель гострого панкреатиту щурів та охарактеризувати екзокринні та ендокринні функції підшлункової залози

6. Порівняти терапевтичну ефективність вихідних та прекондиціонованих пероксидом водню МСК пуповини людини на моделі гострого панкреатиту щурів.

В ході виконання роботи були виділені, культивовані МСК пуповини людини та охарактеризовані за критеріями Міжнародного товариства клітинної та генної терапії (ISCT). Було показано, що клітини диференціюються у три основні напрямки: хондрогенному, остеогенному та адипогенному та експресія поверхневих маркерів МСК пуповини людини: CD90, CD73, CD105 демонстрували високий рівень експресії $\geq 99\%$, а CD34, CD45 мали низький рівень експресії $\leq 0,4\%$.

Індукція цирозу печінки у щурів була викликана інтраперитоніальними ін'єкціями розчину CCl_4 в оливковій олії протягом 13-ти тижнів. Наявність цирозу печінки було доказано за допомогою гістологічних та молекулярно-біологічних методів. Згідно одержаних нами даних фіброз печінки почав розвиватись у перші тижні введення CCl_4 . Гістологічне дослідження печінки протягом 13 тижнів при системному введенні CCl_4 виявило суттєві зміни в структурі паренхіми печінки піддослідних щурів позитивного контролю порівняно з негативним контролем. Було показано, зокрема, інтенсивне накопичення екстрацелюлярного матриксу з утворенням псевдоглобул в паренхімі печінки щурів, що свідчить про наявність

цирозу печінки. Підтвердженням розвитку фіброзу печінки стало вивчення експресії деяких генів, які є показником стану печінки. Це гени *EGF*, α -*SMA*, *GFAP* та *eNOS*. Дослідження експресії гена *EGF*, який, як відомо, майже не експресується у здоровій печінці та починає експресуватися з розвитком фіброзу та інтенсивно експресується у цирозній печінці, показало різке підвищення рівня експресії *EGF*, α -*SMA*, *GFAP* через 13 тижнів індукції CCl₄. Після того, як було підтверджено ураження печінки щурів, була проведена трансплантація щурам МСК пуповини людини. Для вивчення впливу МСК на циротичну печінку було обрано дві форми: МСК – суспензія клітин, яку вводили системно, та МСК, що були інкапсульовані в альгінатні капсули були введені інтраперитоніально.

Результати порівнювали в динаміці через 3, 8 та 13 тижнів після обох способів введення МСК пуповини людини щодо їхнього терапевтичного ефекту на цироз печінки щурів. Було показано, що фіброз печінки зникає протягом 13 тижнів після трансплантації МСК, а основні показники печінки нормалізуються. Експресія генів, пов'язаних з пошкодженням печінки та розвитком фіброзу, також повертається до норми, як після системного введення МСК пуповини людини, так і після інтраперитоніального введення інкапсульованих МСК. Але швидкість відновлення таких параметрів, як кількість колагену, рівень експресії *EGF*, α -*SMA* була вищою при трансплантації інкапсульованих МСК, ніж при системному введенні. Таким чином, інтраперитоніальне введення інкапсульованих МСК пуповини людини швидше призводить до відновлення печінки після цирозу у щурів, ніж при системному введенні МСК пуповини людини.

Наступною задачею дослідження було підібрати зручну модель для вивчення впливу прекодиціювання МСК різними факторами на їх терапевтичну ефективність таким чином, щоб можна було порівнювати ефективність різних препаратів МСК, наприклад, одержаних в різних умовах, прекодиційованих різними факторами, тощо. В якості такої моделі було вибрано модель гострого перитоніту у мишей. Захворювання викликається інтраперитонеальним введенням розчину протеозного пептону. Вивчення динаміки розвитку запалення показало, що вже через 24 год запалення досягає максимального розвитку. Це дозволило

визначити час, коли можна вивчати основні параметри процесу і вплив на нього введення МСК, тому всі експерименти проводились через 24 год після введення протеозного пептону. Вивчення залежності терапевтичного ефекту від дози МСК показало, що він залежить від дози МСК до 5×10^4 /мишу, після чого збільшення дози не впливає на терапевтичний ефект, оскільки запалення вже повністю згасає.

Дослідження динаміки розвитку терапевтичної дії МСК після їх інтраперитоніального введення показало, що протизапальний ефект розвивався дуже швидко. Навіть при низькій дозі МСК ($1,65 \times 10^5$ /кг) кількість макрофагів в черевній порожнині значно зменшувалась через 15 хв, але не виходила на норму. Це були умови, за яких модель найбільш чутлива до якості клітинного препарату з МСК пуповини людини. Одержані результати дозволили припустити, що такі параметри, як низька доза МСК і час оцінки ефекту, коли запалення ще не закінчилось, дадуть змогу порівняти терапевтичну активність різних препаратів МСК.

Одним із цих факторів була H_2O_2 , яка, як відомо, посилює проліферацію МСК, їх міграцію та виживання, підвищує стійкість до окислювального стресу. Крім H_2O_2 , як фактор прекодиціонування МСК було використано мелатонін, аскорбінову кислоту, ЛПС та γ -Інтерферон. Результати порівняння впливу прекодиціонування МСК на протизапальний ефект показали, що фактором, який достовірно посилює терапевтичну ефективність МСК є H_2O_2 в концентрації 30 мкмоль. Виявилось, що прекодиціонування МСК мелатоніном, аскорбіновою кислотою, ЛПС та γ -інтерфероном прекодиціонування слабо впливає на терапевтичну ефективність МСК і достовірно не покращує терапевтичну ефективність МСК в порівнянні з ефективністю вихідних МСК.

Результати нашої роботи показують, що після перитонеальної ін'єкції протеозного пептону мишам, у тварин розвивається гостре стерильне запалення черевної порожнини. Введення МСК в перитоніальну порожнину призводить до безпосередньої їх взаємодії з макрофагами, тобто це аналогія моделі взаємодії МСК і макрофагів, яку вивчали *in vitro* шляхом прямого співкультивування МСК і макрофагів. У випадку гострого запалення фактично присутній фізичний контакт макрофагів і МСК *in vivo*, коли на клітини впливають сигнали організму. Було

важливо вивчити, що являється результатом цієї взаємодії, і що відбувається в динаміці. Головними ознаками поляризації макрофагів є підвищення експресії *IL-10* і вплив на інтенсивність фагоцитозу. ЗТ-ПЛР показала, що експресія *IL-10* знаходиться на низькому рівні в момент запалення, коли макрофаги мають прозапальний фенотип M1, при цьому фагоцитарний індекс різко зростає у порівнянні з негативним контролем. Через 15 хвилин після введення вихідних та прекоondiціонованих МСК пуповини людини мишам, експресія *IL-10* різко зростає у порівнянні з групою мишей з гострим перитонітом. У варіанті з прекоondiціонованими МСК рівень експресії *IL-10* був достовірно вищий, ніж у варіанті з вихідними МСК. У сукупності з даними з фагоцитозу це свідчить про те, що прозапальні макрофаги M1 під впливом МСК поляризуються у протизапальний фенотип M2, і у варіанті з прекоondiціонованими МСК процес пригнічення запалення відбувався швидше, ніж у групі з вихідними МСК. Таким чином, результати дослідження показують, що при введенні МСК в черевну порожнину *in vitro* при взаємодії перитоніальних макрофагів і МСК є їх поляризація, яка і забезпечує терапевтичний ефект МСК.

Після того, як на моделі гострого перитоніту було показано, що прекоondiціонування МСК H_2O_2 демонструє найбільш ефективний вплив на їх терапевтичний потенціал, було поставлено задачу порівняти терапевтичну ефективність вихідних та прекоondiціонованих H_2O_2 МСК пуповини людини на моделі гострого панкреатиту щурів, щоб підтвердити ефективність такого підходу.

Гострий панкреатит у щурів був індукований інтраперитонеальним введенням L-аргініном. Через 3 доби спостерігались клінічні ознаки захворювання. Окрім зовнішніх проявів гострого панкреатиту, також спостерігалось різке зростання рівня α -амілази в крові. Гістологічний аналіз виявив деструктивні зміни паренхіми підшлункової залози з елементами накопичення колагену. Спостерігалась дисфункція ендокринної частини підшлункової залози щурів. Через 3 доби інтраперитоніально були трансплантовані вихідні та прекоondiціоновані H_2O_2 МСК пуповини людини. Терапевтичний ефект оцінювали в динаміці через 3, 7 та 14 днів після введення МСК. Вже через 3 дні після трансплантації МСК з'явилися ознаки

відновлення підшлункової залози щурів. Через 7 днів рівень α -амілази достовірно знизився у групи щурів, яким було введено прекондиціоновані МСК у порівнянні з вихідними МСК. Також через 7 днів у варіанті з вихідними МСК спостерігався активний мітоз панкреатоцитів, а у варіанті з прекондиціонованими МСК вже спостерігалось практично повне відновлення панкреатоцитів, структурно-функціональних особливостей екзокринної та ендокринної частин підшлункової залози відповідали нормі. Через 13 днів структурно-функціональні ознаки паренхіми підшлункової залози у обох варіантах відповідали нормі. Отримані результати демонструють високу терапевтичну ефективність МСК пуповини людини у інгібуванні гострого запалення підшлункової залози та її регенерації. Водночас протизапальний та відновлювальний ефект МСК, які прекондиціоновані H_2O_2 , розвивався вдвічі швидше, ніж у варіанті з вихідними МСК.

Таким чином в результаті виконання дисертаційної роботи було отримано нові дані, що стосуються можливості значного підсилення терапевтичної ефективності МСК пуповини людини шляхом інкапсуляції МСК в альгінатні мікрокапсули, що доведено на моделі цирозу печінки у щурів, а також прекондиціонуванням низькими дозами H_2O_2 , що показано на моделі гострого перитоніту у мишей і гострого панкреатиту у щурів. Вперше розроблено біотехнологічні аспекти швидкого та ефективного способу порівняння терапевтичного потенціалу різних препаратів МСК.

Ключові слова: мезенхімальні стовбурові клітини, протизапальний цитокін *IL-10*, міграція, методи доставки, гени, фагоцитоз макрофагів, прекондиціонування, гіперглікемія, гострий панкреатит, окислювальний стрес, альгінатні капсули, культура клітин, цироз печінки, перитоніт

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА:

Статті у наукових міжнародних та фахових виданнях:

1. **Pikus P.**, Rymar S., Pustovalov A., Shuvalova N., Reshetnyk Ye., Kordium V. 2023. Comparison of the therapeutic effect of native and preconditioned human umbilical cord-derived multipotent mesenchymal stromal cells on a rat model of acute

pancreatitis. *Cell and Organ Transplantology*, 11(2), 104-113. doi.org/10.22494/cot.v11i2.156. *Особистий внесок здобувача: відтворення моделі гострого панкреатиту у щурів, виділення та культивування МСК пуповини людини, проведення біохімічного аналізу крові щурів, виділення РНК з паренхіми підшлункової залози, проведення гістохімічних методів та створення гістологічних препаратів, морфометричний аналіз, статистична обробка результатів, написання та підготовка статті до друку.*

2. Rymar S., **Pikus P.**, Buchek P., Shuvalova N., Pokholenko Ia., Irodov D., Kordium V. 2022. Comparison of the Therapeutic Effects of hUC-MSC Intravenous Delivery and Intraperitoneal Administration of MSCs Encapsulated in Alginate Capsules for the Treatment of Rat Liver Cirrhosis. *Biointerface research in applied chemistry*, 12(4), 5054 – 5070. doi.org/10.33263/BRIAC124.50545070. *Особистий внесок здобувача: визначення життєздатності клітин, диференціювання МСК, створення гістологічних препаратів, проведення морфометричного аналізу, виділення РНК з тканини печінки щурів з подальшим проведенням ЗТ-ПЛР, статистична обробка результатів, написання деяких розділів статті та підготування до друку статті.*

3. **Pikus P.**, Rymar S., Shuvalova N., Kordium V. 2022. Study of the interaction between macrophages and human umbilical cord MSCs *in vivo* on the model of peritonitis in mice. *Biopolymers and Cell*, 38(4), 231–241. doi.org/10.7124/bc.000A80. *Особистий внесок здобувача: створення моделі стерильного перитоніту у мишей, виділення та культивування вихідних МСК, виділення перитоніальних макрофагів з ексудату мишей, культивування перитоніальних макрофагів, створення цитологічних препаратів, культивування E. Coli, визначення фагоцитарної активності мононуклеарів перитонеальної порожнини; виділення мононуклеарної РНК, морфологічний аналіз клітин, статистична обробка результатів, підготовка до друку статті.*

4. **Пікус П.О.**, Римар С.Ю., Шувалова Н.С., Бучек П.В. 2020. Морфологічні особливості відновлення печінки щурів на моделі цирозу, індукованого CCl₄, після трансплантації мезенхімальних стовбурових клітин пуповини людини. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 26, 252-257. doi.org/10.7124/FEEO.v26.1275.

Особистий внесок здобувача: визначення життєздатності клітин, диференціювання МСК, створення гістологічних препаратів, проведення морфологічно-морфометричного аналізу, виділення РНК з тканини печінки щурів з подальшим проведенням ЗТ-ПЛР, статистична обробка результатів, написання статті та підготування до друку статті.

5. **Пікус П.О.**, Римар С.Ю., Шувалова Н.С., Кордюм В.А. 2019. Вплив дози мезенхімальних стромальних (стовбурових) клітин пуповини людини на гостре запалення на моделі перитоніту у мишей. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 25, 304-309. doi.org/10.7124/FEEO.v25.1182. *Особистий внесок здобувача: виділення та культивування МСК, створення моделі гострого перитоніту у мишей, виділення та культивування перитоніальних макрофагів з ексудату мишей, створення цитологічних препаратів, статистична обробка результатів, написання деяких розділів статті та підготування до друку статті.*

Тези наукових доповідей на конференціях:

1. **Pikus P.O.**, Rymar S.Y., Kordium V.A. 2022. The therapeutic effect of mesenchymal stem cells derived from the human umbilical cord, using different methods of delivery to an animal model of liver cirrhosis. Kyiv, Ukraine. All-Ukrainian conference on molecular and cell biology with international participation. P. 134.

2. **Pikus P.**, Rymar S., Pustovalov A., Kordium V. 2022. Comparative characteristics of the treatment of acute pancreatitis in rats using native and preconditioned human umbilical cord MSCs with hydrogen peroxide. IUBMB–46th FEBS–PABMB Congress, Lisbon, Portugal, V. 12. P 248.

3. **Pikus. P.**, Rymar S., Shuvalova N., Pustovalov A. 2021. Role of umbilical cord – derived mesenchymal stem cells in the rat model of acute pancreatitis. Збірник тез конференції-конкурсу молодих вчених « Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2021». Київ, Україна, С. 38.

4. **Pikus P.**, Rymar S. 2021. Studying the dynamics of the development of the therapeutic effect of initial and preconditioned MSCs on a model of acute abdominal

inflammation of mice. 45th FEBS Congress, Molecules of Life: Towards New Horizons, Ljubljana, Slovenia, V.11. P. 334.

5. **Pikus P.**, Rymar S., Shuvalova N. 2019. Study of the dynamics of the development of the therapeutic effect of native and preconditioned human MSCs based on the model of acute abdominal inflammation in mice. XII Український біохімічний конгрес, Тернопіль, Україна. Медична та клінічна хімія. Т. 21(3), с. 282.

6. **Pikus P.**, Rymar S., Buchek P., Shuvalova N. 2018. Comparison of the efficacy of Free and encapsulated human umbilical cord MSCs in the correcting rat liver cirrhosis induced by CCl₄. 15th HiMB Symposium 10-13 Sep. Horizons in Molecular Biology. Goettingen, Germany. P. 176.

SUMMARY

Pikus. P. O. Development of methods for enhancing the therapeutic efficacy of mesenchymal stem cells. *Qualification scientific work with the manuscript copyright.*

A dissertation submitted in fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy (091 Biology and biochemistry). – Institute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2024.

During the recent decades of studies on stem cells, there has been a considerable interest in mesenchymal stem cells (MSCs), which are notable for such unique properties as multipotency, ability for differentiation, self-recovery, long-term proliferation *ex vivo*, and their immunomodulating properties. All these characteristics make MSCs a promising instrument for regenerative medicine. MSCs are isolated from different sources, including bone marrow, adipose tissue, umbilical cord, etc. According to the official data of the US National Institutes of Health (<https://clinicaltrials.gov/>), the number of clinical trials involving the use of MSCs has doubled, amounting to 1,014 in five recent years. However, most registered clinical trials using MSC therapy to treat different human diseases have not met expectations, regardless of hopeful pretrial results in the investigations with different models of animal diseases.

This fact explains the urgency of studies on searching for ways to enhance the therapeutic potential of MSCs. The MSCs from the human umbilical cord have been chosen as the study object since they have several advantages over MSCs obtained from other sources.

The aim of the work was to develop ways of enhancing the therapeutic efficiency of MSCs from the human umbilical cord and to research the effectiveness of MSCs with enhanced therapeutic potential using animal models of several diseases.

The following tasks were formulated to achieve the abovementioned aim:

1. To obtain the models of liver damage in rats and aseptic acute peritonitis in mice and to characterize their specificities.
2. To investigate the therapeutic potential of the initial MSCs of the human umbilical cord and MSCs, encapsulated into alginate capsules, using the simulated hepatic cirrhosis in rats.

3. To study the specificities of the impact of MSCs from the human umbilical cord on acute inflammation in the abdominal cavity of mice, to develop a fast and effective way of determining the therapeutic efficiency of MSCs, which helps compare the therapeutic potential of different preparations based on MSCs of the human umbilical cord and the impact of some factors thereon.
4. To study *in vivo* the interaction between the initial and preconditioned MSCs of the human umbilical cord with intraperitoneal macrophages using the peritonitis model in mice.
5. To develop the model of acute pancreatitis in rats and to characterize the exocrine and endocrine functions of the pancreas.
6. To compare the therapeutic efficiency of initial MSCs from the human umbilical cord and the ones preconditioned with hydrogen peroxide, using the model of acute pancreatitis of rats.

In this work, MSCs of the human umbilical cord were isolated, cultivated, and characterized by the criteria of the International Society for Cellular Therapy (ISCT). It was demonstrated that cells were differentiated in three main directions: chondrogenic, osteogenic, and adipogenic; the expression of superficial markers of MSCs of the human umbilical cord: *CD90*, *CD73*, *CD105* demonstrated a high expression level of $\geq 99\%$, whereas *CD34*, *CD45* had a low expression level of $\leq 0.4\%$.

The hepatic cirrhosis in rats was induced by intraperitoneal injections of the CCl_4 solution with olive oil for 13 weeks. The presence of hepatic cirrhosis was proven using histological and molecular biological methods. According to our data, the hepatic fibrosis started developing within the first weeks of administering CCl_4 . The histological investigation of the liver for 13 weeks of systematic administration of CCl_4 revealed considerable changes in the structure of liver parenchyma of the investigated rats of positive control as compared to the negative control. For instance, there was a notable intense accumulation of extracellular matrix with the formation of pseudoglobules in the parenchyma of rat liver, which demonstrated hepatic cirrhosis. The development of hepatic fibrosis was confirmed by the study of the expression of some genes, which are markers for the state of the liver. These are genes *EGF*, *α -SMA*, *GFAP*, and *eNOS*. The study of the

expression of gene *EGF*, which, as known, almost does not express in healthy liver, starts expressing with the fibrosis development and expresses intensively in the liver with cirrhosis, demonstrated a rapid increase in the expression level for *EGF*, α -*SMA*, *GFAP* after 13 weeks of induction, using CCl_4 . After the rat liver damage was confirmed, the rats were transplanted MSCs of the human umbilical cord. Two forms were selected to study the impact of MSCs on the cirrhotic liver: MSCs as a suspension of cells, administered in a systematic manner, and MSCs, encapsulated into alginate capsules, and administered intraperitoneally.

The results were compared in dynamics after 3, 8, and 13 weeks of using both ways of administering MSCs of the human umbilical cord in terms of their therapeutic effect on the rat hepatic cirrhosis. It was shown that the liver fibrosis vanished within 13 weeks after the MSC transplantation, and the main indices of the liver normalized. The expression of genes related to liver damage and fibrosis development also returned to normal indices after both the systematic administration of MSCs of the human umbilical cord, and the intraperitoneal administration of the encapsulated MSCs. Yet the velocity of restoring such parameters as the amount of collagen, the expression rate for *EGF*, α -*SMA* was higher for the transplantation of encapsulated MSCs than for the systematic administration. Therefore, the intraperitoneal administration of the encapsulated MSCs of the human umbilical cord resulted in restoring the rat liver after cirrhosis faster than the systematic administration of MSCs of the human umbilical cord.

The next task was to select a convenient model to study the effect of MSCs preconditioning with various factors on their therapeutic efficacy in order to compare the efficiency of different MSC preparations, for example, the ones obtained under different conditions or preconditioned with different factors, etc. The model of acute peritonitis in mice was selected. This disease is induced by the intraperitoneal administration of the proteose peptone solution. The study of the inflammation development dynamics demonstrated that in 24 h, the inflammation reached its maximal development rate. It helped determine the time to investigate the main parameters of the process and the impact of the MSC administration on it, so all experiments were conducted 24 h after the administration of the proteose peptone. The investigation showed the dependence of the therapeutic effect

on the MSC dose up to 5×10^4 /mouse; after that, the increase in the dose did not impact the therapeutic effect since the inflammation was completely gone.

The study on the dynamics in developing the therapeutic effect of MSCs after their intraperitoneal administration demonstrated that the anti-inflammatory effect developed very fast. Even under the low dose of MSCs (1.65×10^5 /kg), the number of macrophages in the peritoneal cavity decreased considerably in 15 min, but it did not return to the norm. These were the conditions in which the model was most sensitive to the quality of the cellular material, obtained from MSCs of the human umbilical cord. The obtained results allowed for the assumption that such parameters as a low MSC dose and the period of effect evaluation with the ongoing inflammation would help compare the therapeutic activity of different MSC preparations.

One of these factors was H_2O_2 , which is known to enhance MSC proliferation, their migration and survival and improve their resistance to oxidative stress. In addition to H_2O_2 , other factors of preconditioning MSCs were melatonin, ascorbic acid, LPS, and γ -interferon. Our comparison of the impact of MSC preconditioning on the anti-inflammatory effect demonstrated that the factor, reliably enhancing the therapeutic efficiency of MSCs, was H_2O_2 in the concentration of 30 μ mol. It was found that MSC preconditioning with melatonin, ascorbic acid, LPS, and γ -interferon had a weak effect on the therapeutic efficiency of MSCs and reliably did not enhance the therapeutic efficiency of the preconditioned MSCs as compared to that of the initial MSCs.

The results of our work demonstrated that after the peritoneal injection of proteose peptone, mice developed acute aseptic inflammation of the peritoneal cavity. The administration of MSCs into the peritoneal cavity resulted in their immediate interaction with macrophages i.e. this was the analogy for the model of interaction between MSCs and macrophages, studied *in vitro* via direct co-cultivation of MSCs and macrophages. In case of acute inflammation, there is actual physical contact between macrophages and MSCs *in vivo*, when the cells are impacted by the signals of the organism. It was relevant to study what the result of this interaction was and what was happening in the dynamics. The main features of the polarization of macrophages are the increase in the expression of *IL-10* and the impact on phagocytosis intensity. According to the results of the RT-PCR, the expression

of *IL-10* was at a low level in the moment of the inflammation when macrophages had the pro-inflammatory phenotype M1, and the phagocytic index increased rapidly compared to the negative control. Fifteen minutes after the administration of initial and preconditioned MSCs of the human umbilical cord to mice, the expression of *IL-10* increased rapidly as compared to the group of mice with acute peritonitis. The expression rate of *IL-10* in the variant with preconditioned MSCs was reliably higher than in the variant with initial MSCs. In combination with the phagocytosis data, it demonstrated that under the impact of MSCs, the pro-inflammatory macrophages M1 polarized into the anti-inflammatory phenotype M2, and in the variant with the preconditioned MSCs, the process of inflammation inhibition was faster than in the group with the initial MSCs. Therefore, the results of the studies demonstrated that the administration of MSCs into the peritoneal cavity *in vitro* in case of the interaction between peritoneal macrophages and MSCs resulted in their polarization, which ensured the therapeutic effect of MSCs.

After the model of acute peritonitis demonstrated that the preconditioning of MSCs using H₂O₂ had the highest impact on their therapeutic potential, the next task was to compare the therapeutic efficiency of the initial and H₂O₂-preconditioned MSCs of the human umbilical cord using the model of acute pancreatitis of rats to confirm the effectiveness of this approach.

Acute pancreatitis in rats was induced by intraperitoneal administration of L-arginine. The clinical signs of the disease were observed three days later. In addition to the external manifestations of acute pancreatitis, there was a rapid increase in the level of α -amylase in blood. The histological analysis showed destructive changes in the pancreatic parenchyma with the elements of collagen accumulation. There was a notable dysfunction of the endocrine part of the rat pancreas. The initial and H₂O₂-preconditioned MSCs of the human umbilical cord were transplanted intraperitoneally three days later. The therapeutic effect was evaluated in dynamics 3, 7, and 14 days after the MSC administration. The signs of rat pancreas recovery were noted as early as three days after the MSC transplantation. In 7 days, the level of α -amylase was reliably lower in the group of rats that had been administered the preconditioned MSCs compared to the initial MSCs. Also, in 7 days, in the variant with the initial MSCs, there was active mitosis of pancreatocytes, and in the variant with

preconditioned MSCs, there was practically complete recovery of pancreatocytes, structural-functional specificities of the exocrine and endocrine parts of pancreas corresponded to the norm. In 13 days, the structural-functional features of the parenchyma of the pancreas corresponded to the norm in both variants. The obtained results demonstrated the high therapeutic efficiency of MSCs from the human umbilical cord in inhibiting acute inflammation of the pancreas and its regeneration. At the same time, the anti-inflammatory and restorative effect of MSCs, preconditioned by H₂O₂, developed twice faster than in the variant with initial MSCs.

At the same time, the study results yielded new data about the possibility of a considerable enhancement of the therapeutic efficiency of MSCs from the human umbilical cord via MSC encapsulation into alginate microcapsules, which was proven using the model of hepatic cirrhosis in rats and the preconditioning with low H₂O₂ doses which was demonstrated in the model of acute peritonitis in mice and acute pancreatitis in rats. The biotechnological aspects of the fast and effective method to compare the therapeutic potential of different MSC preparations were first developed.

Keywords: mesenchymal stem cells, anti-inflammatory cytokine *IL-10*, migration, delivery methods, genes, macrophage phagocytosis, preconditioning, hyperglycemia, acute pancreatitis, oxidative stress, alginate capsules, cell culture, liver cirrhosis, peritonitis

LIST OF SCIENTIFIC PUBLICATIONS PUBLISHED ON THE TOPIC OF THE DISSERTATION

Articles:

1. **Pikus P.**, Rymar S., Pustovalov A., Shuvalova N., Reshetnyk Ye., Kordium V. 2023. Comparison of the therapeutic effect of native and preconditioned human umbilical cord-derived multipotent mesenchymal stromal cells on a rat model of acute pancreatitis. *Cell and Organ Transplantology*, 11(2), 104-113. doi.org/10.22494/cot.v11i2.156.
2. Rymar S., **Pikus P.**, Buchek P., Shuvalova N., Pokholenko Ia., Irodov D., Kordium V. 2022. Comparison of the Therapeutic Effects of hUC-MSC Intravenous

Delivery and Intraperitoneal Administration of MSCs Encapsulated in Alginate Capsules for the Treatment of Rat Liver Cirrhosis. *Biointerface research in applied chemistry*, 12(4), 5054 – 5070. doi.org/10.33263/BRIAC124.50545070.

3. **Pikus P.**, Rymar S., Shuvalova N., Kordium V. 2022. Study of the interaction between macrophages and human umbilical cord MSCs *in vivo* on the model of peritonitis in mice. *Biopolymers and Cell*, 38(4), 231–241. doi.org/10.7124/bc.000A80.

4. **Пікус П.О.**, Рymar С.Ю., Шувалова Н.С., Бучек П.В. 2020. Morphological features of recovery in model rat liver cirrhosis induced by CCl₄ after transplantation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 26, 252-257. doi.org/10.7124/FEEО.v26.1275.

5. **Пікус П.О.**, Рymar С.Ю., Шувалова Н.С., Кордюм В.А. 2019. Influence of the dose of human umbilical cord mesenchymal stem cells on acute inflammation on the peritonitis model in mice. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 25, 304-309. doi.org/10.7124/FEEО.v25.1182.

Conference abstracts:

1. **Pikus P.O.**, Rymar S.Y., Kordium V.A. 2022. The therapeutic effect of mesenchymal stem cells derived from the human umbilical cord, using different methods of delivery to an animal model of liver cirrhosis. Kyiv, Ukraine. All-Ukrainian conference on molecular and cell biology with international participation. P. 134.

2. **Pikus P.**, Rymar S., Pustovalov A., Kordium V. 2022. Comparative characteristics of the treatment of acute pancreatitis in rats using native and preconditioned human umbilical cord MSCs with hydrogen peroxide. IUBMB–46th FEBS–PABMB Congress, Lisbon, Portugal, V. 12. P 248.

3. **Pikus. P.**, Rymar S., Shuvalova N., Pustovalov A. 2021. Role of umbilical cord – derived mesenchymal stem cells in the rat model of acute pancreatitis. Збірник тез конференції-конкурсу молодих вчених « Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2021». Київ, Україна, С. 38.

4. **Pikus P.**, Rymar S. 2021. Studying the dynamics of the development of the

therapeutic effect of initial and preconditioned MSCs on a model of acute abdominal inflammation of mice. 45th FEBS Congress, Molecules of Life: Towards New Horizons, Ljubljana, Slovenia, V.11. P. 334.

5. **Pikus P.**, Rymar S., Shuvalova N. 2019. Study of the dynamics of the development of the therapeutic effect of native and preconditioned human MSCs based on the model of acute abdominal inflammation in mice. XII Український біохімічний конгрес, Тернопіль, Україна. Медична та клінічна хімія. Т. 21(3), с. 282.

6. **Pikus P.**, Rymar S., Buchek P., Shuvalova N. 2018. Comparison of the efficacy of Free and encapsulated human umbilical cord MSCs in the correcting rat liver cirrhosis induced by CCl₄. 15th HiMB Symposium 10-13 Sep. Horizons in Molecular Biology. Goettingen, Germany. P. 176.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ЕЦМ - екстрацелюлярний матрикс

ЗТ-ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією

ЛПС - ліпополісахариди

МСК – мезенхімальні стовбурові клітини

ПМ – перитоніальні макрофаги

ЯЦС – ядерно-цитоплазматичне співвідношення

α -MEM-мінімальне поживне середовище, alpha minimum essential medium

α -SMA – альфа актин гладких м'язів, alpha smooth muscle actin

eNOS - ендотеліальна синтаза оксиду азоту, endothelial nitric oxide synthase

EGF - епідермальний фактор росту, epidermal growth factor

GAPDH - гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

GFAP - гліальний фібрилярний кислий білок, glial fibrillary acidic protein

HLA - людський лейкоцитарний антиген, human leukocyte antigens

IL-10 - інтерлейкін -10, interleukin-10

L - arg– L- аргінін, L-arginin

PAS – реакція – періодична кислота ШИФА, periodic acid Schiff reaction

PBS – натрій-фосфатний буфер, phosphate buffered saline

SDF-1 - фактор-1, отриманий зі стромальних клітин, stromal cell-derived factor1

TGF- β – трансформуючий фактор росту бетта, transforming growth factor beta

TLR –тол подібний рецептор, toll-like receptor

TNF- α – фактор некрозу пухлини, tumor necrosis factor

VEGF – фактор росту ендотелію судин, vascular endothelial growth factor

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	19
ВСТУП	23
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	29
1.1. Загальні властивості МСК людини	29
1.2. Джерела отримання МСК	32
1.3. Особливості МСК пуповини людини	35
1.4. Імуномодуючі властивості МСК пуповини людини	39
1.5. Міграція МСК пуповини людини та методи їх доставки	44
1.6. Методи посилення терапевтичних властивостей МСК	47
1.6.1. Інкапсуляція МСК як спосіб підвищення терапевтичної ефективності	47
1.6.2. Прекондиціонування МСК за допомогою різних факторів	51
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	58
2.1. Відтворення різних моделей захворювань у лабораторних тварин	59
2.1.1. Індукція моделі цирозу печінки у щурів	59
2.1.2. Моделювання гострого панкреатиту у щурів	59
2.1.3. Індукція моделі нестерильного гострого перитоніту у мишей	60
2.2. Виділення та культивування МСК пуповини людини	60
2.2.1. Інкапсуляція МСК пуповини людини	62
2.3. Схема введення МСК пуповини людини при різних моделях захворювань	62
2.3.1. Трансплантація МСК пуповини людини щурам з індукованим цирозом печінки	62

2.3.2. Трансплантація МСК пуповини людини щурам з гострим панкреатитом	63
2.3.3. Трансплантація МСК пуповини людини мишам з гострим перитонітом	63
2.4. Методи досліджень	63
2.4.1. Підготовка препаратів для гістологічних досліджень	63
2.4.2. Виділення сумарної (матричної) РНК з тканин експериментальних тварин	64
2.4.3. Полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією	64
2.4.4. Морфологічні та морфометричні дослідження печінки та підшлункової залози щурів	66
2.4.5. Біохімічні дослідження крові щурів	66
2.4.6. Гістохімічне дослідження підшлункової залози щурів	66
2.4.7. Оцінка життєздатності перитоніальних макрофагів	67
2.4.8. Вирощування <i>E. Coli</i> та її інактивація для експериментів з фагоцитозу	67
2.4.9. Визначення фагоцитарної активності перитоніальних макрофагів	67
2.4.10. Статистична обробка даних	68
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	69
3.1. Вивчення терапевтичного потенціалу вихідних МСК пуповини людини та інкапсульованих в альгінатні капсули на моделі цирозу печінки у щурів.	69
3.1.1. Розвиток ураження печінки щурів, індукованого введенням CCl ₄	69
3.1.2. Вплив трансплантації вихідних МСК пуповини людини та інкапсульованих в альгінатні капсули на ураження печінки	76
3.1.2.1 Ефект трансплантації МСК на стан паренхіми печінки щурів	76
3.1.2.2 Експресія деяких генів, які пов'язані з розвитком фіброзу печінки після трансплантації вихідних МСК та інкапсульованих в альгінатні капсули	80
3.2 Вивчення розвитку гострого перитоніту у мишей після трансплантації вихідних та прекоondiціонованих МСК	82

3.2.1 Розвиток гострого перитоніту у мишей після введення протеозного пептону	82
3.2.2 Вплив дози МСК та часу введення МСК на гостре запалення черевної порожнини	83
3.2.3. Динаміка розвитку терапевтичного ефекту після введення вихідних та прекондиціонованих пероксидом водню МСК пуповини людини в черевну порожнину мишей.	85
3.2.4. Дослідження взаємодії МСК пуповини людини з інтраперитонеальними макрофагами <i>in vivo</i> на моделі перитоніту у мишей	87
3.2.5 Вивчення терапевтичного потенціалу МСК прекондиціонованих різними чинниками.	90
3.3 Порівняльне дослідження терапевтичного ефекту вихідних МСК і прекондиціонованих пероксидом водню на моделі панкреатиту у щурів	93
3.3.1. Розвиток моделі гострого панкреатиту у щурів	93
3.3.2. Динаміка впливу трансплантації вихідними та прекондиціонованими МСК пуповини людини на морфометричні та функціональні параметри підшлункової залози при гострому панкреатиті у щурів	94
3.3.3. Порівняння терапевтичного ефекту вихідних та прекондиціонованих МСК пуповини людини на гостре запалення підшлункової залози	101
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	107
ВИСНОВКИ	120
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	122

ВСТУП

Актуальність проблеми.

В останні десятиліття досліджень стовбурових клітин значний інтерес виник саме до мезенхімальних стовбурових клітин (МСК), які мають унікальні властивості, такі як мультипотентність, здатність до диференціації, самовідновлення, довгострокової проліферації *ex vivo*, а також імуномодуючі властивості. Завдяки цьому МСК виявилися перспективним інструментом для регенеративної медицини. МСК виділяють із різних джерел, включаючи кістковий мозок, жирову тканину, пуповину, пульпу зуба тощо. Досягнення в методах ізоляції, культивування та проліферації МСК посилюють перспективи їх широкомасштабного терапевтичного застосування. Цей прогрес супроводжується швидким розвитком методів доставки МСК, що стимулює використання МСК у регенеративній медицині. Доля та поведінка МСК регулюються їх мікрооточенням, що згодом впливає на їх регенераційний потенціал. МСК вивільняють різні месенджери, включаючи хемокіни, цитокіни, фактори росту та нуклеїнові кислоти, які можуть секретуватися або упаковуватись у позаклітинні везикули, що також відіграють важливу роль у реалізації терапевтичного потенціалу МСК. Ці регенеративні характеристики МСК у сукупності зробили їх найбільш широко тестованими в клінічних випробуваннях. Згідно з зареєстрованих даних з Національного інституту охорони здоров'я США (<https://clinicaltrials.gov/>), протягом останнього десятиліття спостерігався швидкий розвиток клітинної терапії з використанням МСК у клінічних випробуваннях. Кількість клінічних випробувань МСК подвоїлася за останні 5 років. Станом на 14 липня 2021 року в базі даних ClinicalTrials.gov було зареєстровано 1014 клінічних випробувань МСК, які або завершені або перебувають ще на етапі клінічних досліджень. Однак більшість зареєстрованих клінічних випробувань із застосуванням терапії МСК для різних захворювань людини не виправдали очікувань, незважаючи на обнадійливі доклінічні результати на різних моделях захворювань тварин. Це може бути пов'язане з непослідовними критеріями

ідентифікації МСК у дослідженнях та їх успадкованою гетерогенністю. У масштабному ж плані, не зважаючи на багаточисленні переваги використання МСК у клітинній терапії, все таки залишаються відкриті питання через відсутність стандартизованих протоколів і загальних правил, і це є помітною перешкодою для широкого впровадження МСК у клітинну терапію. Відсутність стандартизованих процедур ізоляції, культивування та введення МСК може призвести до мінливості результатів, що ускладнює забезпечення безпеки та ефективності лікування. Нормативна невизначеність та відмінність у процесах схвалення в різних країнах ще більше ускладнюють ситуацію, перешкоджаючи переходу терапії МСК від досліджень до клінічної практики. Виходячи з цього актуальною залишається розробка способів посилення терапевтичної активності МСК. Одним з таких методів, який інтенсивно розвивається є інкапсуляція МСК в мікрокапсули з безпечних напівпроникних матеріалів, яка дозволяє забезпечити їх довгочасну виживаність, секрецію терапевтичних продуктів, захистити їх від впливу запального середовища. Ще одна стратегія - прекондиціонування МСК, яке здатне посилювати їх терапевтичний потенціал та прискорювати терапевтичний ефект МСК при різних захворюваннях. В першу чергу це стосується збереження біологічної ефективності МСК після ізоляції та тривалого культивування *in vitro*. Крім того, після трансплантації та міграції в цільову тканину МСК стикаються із суворим середовищем, що супроводжується сигналами «смерті» для клітин. Відповідно, прекондиціонування поліпшує характеристики МСК *in vivo*, що призводить до більшої терапевтичної ефективності та кращих наслідків трансплантації в регенеративній медицині. Дійсно прекондиціонування МСК *ex vivo* гіпоксією, різними факторами росту, фармакологічними препаратами, створеними спеціальними умовами може стимулювати їхнє виживання, посилену проліферацію, міграцію, секрецію екзосом та проангіогенні та протизапальні характеристики *in vivo*.

Порівняння властивостей МСК, що отримані з різних джерел, показало, що МСК ізольовані з пуповини людини мають переваги над іншими джерелами. Зокрема, процедура збору є неінвазивною та етично прийнятною. МСК пуповини

людини є наймолодшими дорослими стовбуровими клітинами. Дослідження експресії маркерів МСК пуповини підтвердили проміжний характер цих клітин - між ембріональними стовбуровими клітинами та дорослими МСК, виділеними з пульпи зуба, кісткового мозку або жирової тканини, на які впливають різні зовнішні фактори протягом життя людини. МСК пуповини мають тісні онтогенетичні зв'язки з ембріональними стовбуровими клітинами, володіють більш широкою мультипотентною пластичністю, більш вираженою імуносупресивністю, проліферують швидше, ніж дорослі клітини з кісткового мозку та жирової тканини.

Тому, дана дисертаційна робота присвячена пошуку та розробці способів посилення мезенхімальних стовбурових клітин, шляхом прекодиціювання та інкапсуляції МСК в альгінатні капсули на тваринних моделях запальних захворювань; розробці біотехнологічних аспектів швидкого та ефективного способу визначення та порівняння *in vivo* терапевтичного потенціалу різних препаратів МСК.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація виконана в рамках наукових проектів відділу регуляторних механізмів клітини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України: «Вивчення біологічних особливостей альтернативних станів МСК желе Вартона пуповини людини», (реєстраційний номер 0117U003913, 2018-2022 рр).

Мета та задачі дослідження. Метою роботи було розробити способи посилення терапевтичної ефективності МСК пуповини людини та дослідити ефективність МСК з посиленням терапевтичним потенціалом на тваринних моделях деяких захворювань

Для досягнення мети були сформовані наступні задачі:

1. Одержання моделі ураження печінки щурів та охарактеризувати структурні та функціональні зміни паренхіми органу
2. Дослідити терапевтичний потенціал вихідних МСК пуповини людини та інкапсульованих в альгінатні капсули на моделі цирозу печінки у щурів при різних методах введення
3. Вивчити особливості впливу МСК пуповини людини на гостре запалення черевної порожнини у мишей, розробити швидкий та ефективний спосіб, який

дозволяє порівнювати терапевтичний потенціал різних препаратів МСК пуповини людини та вплив нього за допомогою різних факторів

4. Вивчити взаємодію вихідних та прекондиціонованих МСК пуповини людини з інтраперитонеальними макрофагами *in vivo* на моделі перитоніту у мишей

5. Створити модель гострого панкреатиту щурів та охарактеризувати екзокринні та ендокринні частини підшлункової залози

6. Порівняти терапевтичну ефективність трансплантованих вихідних та прекондиціонованих пероксидом водню МСК пуповини людини на моделі гострого панкреатиту щурів

Об'єкт дослідження – вихідні та прекондиціоновані МСК пуповини людини.

Предмет дослідження – способи посилення терапевтичної ефективності МСК пуповини людини

Методи дослідження – в ході виконання дисертаційної роботи були використані наступні методи: клітинна інженерія (виділення та культивування МСК пуповини людини, перитоніальних макрофагів мишей, інкапсуляція клітин), молекулярно-біологічні (виділення сумарної РНК, експресія генів білків за допомогою ЗТ-ПЛР, гель-електрофорез білків, проточна цитофлуорометрія, світлова мікроскопія), мікробіологічні (культивування штамів *E.coli*, визначення фагоцитарного індексу макрофагів), гістологічні методи дослідження, морфологічні та морфометричні методи, біохімічні методи дослідження крові, гістохімічні (PAS-реакція), статистична обробка даних.

Наукова новизна одержаних результатів.

В ході виконання дисертаційного дослідження було одержано ряд нових даних. Вперше на моделі цирозу печінки було проведено порівняння терапевтичної ефективності системного введення МСК та інтраперитонеального введення інкапсульованих в альгінатні капсули МСК пуповини людини і показано посилення терапевтичного потенціалу МСК шляхом інкапсуляції. Вперше розроблено спосіб визначення терапевтичної ефективності МСК, який дозволяє ефективно та достовірно порівнювати різні препарати МСК, одержані різними методами та з різного матеріалу.

Також, було вперше досліджено вивчення взаємодії МСК з інтраперитонеальними макрофагами *in vivo* і доведено їх поляризацію в протизапальній фенотипі M2. Вперше показано посилення терапевтичного потенціалу МСК шляхом прекодиціювання пероксидом водню (30μM), як за впливом на динаміку розвитку терапевтичного ефекту на гострий перитоніт, так і за ефективністю поляризації інтраперитонеальних макрофагів. На моделі гострого панкреатиту вперше показано посилення терапевтичного потенціалу МСК прекодиційованих пероксидом водню, що виражається у скороченні в 2 рази часу відновлення підшлункової залози у порівнянні з впливом вихідних МСК.

Практичне значення одержаних результатів.

Результати дослідження були впроваджені в лабораторії генно-клітинних модифікацій відділу генних технологій ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАН України».

Також прекодиційовані механізмальні стовбурові клітини пуповини людини з низькою дозою H_2O_2 були запропоновані та впроваджені у роботу в відділі регуляторних механізмів клітини Інституту Молекулярної Біології і Генетики НАН України, також у роботу в відділі молекулярної імунології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України та в лабораторії експериментальної хіміотерапії вірусних інфекцій ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського» НАМН України. Крім того, розроблена тест-система, яка дозволяє порівнювати терапевтичний потенціал різних препаратів МСК пуповини людини та вплив нього за допомогою різних факторів може бути використана для швидкого та ефективного залучення у доклінічних дослідженнях.

Особистий внесок здобувача. Дисертанткою самостійно проведено аналіз наукової літератури, виконано основний об'єм експериментальних досліджень, проаналізовано отримані результати, проведено статистичну обробку даних. Спільно з науковим керівником було визначено мету та завдання, схему експериментів, а також узагальнено результати та обговорено висновки дисертаційної роботи.

Апробація результатів дисертації. Основні результати дисертації були представлені та обговорені на міжнародних конференціях: «Horizons in Molecular Biology» (Гьотинген, Німеччина, 2018 р.), 45th FEBS Congress, Molecules of Life, (Любляна, Словенія, 2021 р.), XII Український біохімічний конгрес (Тернопіль, Україна, 2019 р.), All-Ukrainian conference on molecular and cell biology with international participation (Київ, Україна, 2022 р.), IUBMB–46th FEBS–PABMB Congress (Лісабон, Португалія, 2022 р.). The Conference of Young Scientists within the framework of XVIII International Conference «Factors in Experimental Evolution of Organisms» (Київ, Україна, 2023 р.).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 11 наукових праць: 5 статей у провідних фахових виданнях, затверджених МОН України (всі в журналах, що входять до міжнародних наукометричних баз), та 6 тез у збірках міжнародних конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертацію викладено українською мовою на 154 сторінці комп'ютерного тексту. Робота складається з анотації, вступу, огляду літератури, розділу « Матеріали та методи досліджень», розділу « Результати експериментальних досліджень», розділу « Аналіз та узагальнення результатів», висновків та списку використаних джерел, який налічує 301 посилання. Роботу проілюстровано 24 рисунками та 6 таблиць.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Загальні властивості МСК людини

Мезенхімальні стовбурові клітини або мультипотентні стромальні клітини (МСК) є гетерогенною групою клітин, які можуть бути ізольовані з багатьох дорослих тканин.. Вперше вони були ідентифіковані Фріденштейном із співр. як фібробластоподібні клітини з клоногенним потенціалом із кісткового мозку щурів [1]. На сьогодні їх виділяють з кісткового мозку, із адіпозних тканин, пуповинної крові, пуповини, плаценти, мозку, м'язів, зубної пульпи, шкіри та фетальних тканин. Виходячи з їх мультипотентності, високої швидкості проліферації, великої здатності до самовідновлення, вважається, що ці клітини мають високий терапевтичний потенціал і можуть бути використані в регенеративній медицині. Якщо мова йде про МСК, то вона йде про клітини, що культивуються *in vitro*, оскільки для МСК невідомі унікальні маркери, і з цієї причини вони не можуть бути ідентифіковані *in vivo*. При цьому профіль їх поверхневих антигенів вивчено достатньо детально [2]. Виходячи із зростаючого інтересу до МСК, все більше лабораторій і дослідників виділяють і культивують ці клітини. Характеристики таких МСК в залежності від джерела МСК, способу виділення і культивування мають значні відмінності, що викликає труднощі в оцінці їх біологічних властивостей і можливості використання для клітинної терапії. Саме тому Комітет з мезенхімальних і тканинних стовбурових клітин Міжнародного товариства з клітинної терапії запропонував мінімальні критерії визначення МСК людини [4]. МСК повинні бути адгезивними до пластику при введенні в культуру, мати високий рівень експресії таких маркерів, як *CD 105*, *CD 73* та *CD 90*. При цьому рівень маркерів гематопоетичних стовбурових клітин *CD45*, *CD34*, *CD14* або *CD11b*, *CD79a* не повинен перевищувати 2% і не експресуватися комплекс *HLA II* класу. диференціюватися в три основні напрямки: остеобласти, хондробласти і адипоцити.

Більш того, МСК не повинні експресувати *HLA-DR* (МНС клас II), який відіграє вирішальну роль у презентації антигену Т-клітин і, отже, призводить до їх активації та диференціювання. Транскрипційна активація генів МНС класу II вимагає індукції білка-трансактиватора класу II (*CIITA*), головного регулятора, який важливий як для конститутивної, так і для IFN- γ -індукованої експресії МНС класу II [4-6]. Однак, нещодавно з'явилися данні, що рівень експресії *HLA-DR* в МСК кожного донора культивованого на лізаті із тромбоцитів, не корелював з рівнем експресії *HLA-DR* в МСК, культивованих на FBS, що вказує на те, що крім добавки донор-специфічні компоненти також відіграють важливу роль у експресії антигену *HLA-DR*. [7] Також, було показано, що лізат тромбоцитів індукує високий рівень експресії *HLA-DR* в МСК Р0 до 25-30%, що може в результаті призвести до хвороби «трансплант проти хозяїна».

Клітини повинні мати властивість диференціюватись в остеобласти, адіпоцити і хондроцити в відповідних умовах культивування. Пластичність МСК не обмежується вказаними вище клітинами. Повідомлялось, що МСК можуть диференціюватися в клітини легенів [8], нейральні клітини [9, 10], гепатоцити [12] і ряд інших. Привабливість МСК для клітинної терапії пов'язана не тільки з їх мультипотентними властивостями, що виражається в здатності диференціюватися в різні спеціалізовані клітини. З'явилось багато експериментальних даних, що свідчать про те, що МСК є джерелом різноманітних паракринних сигналів, які відповідають за імуномодуляторні, ангіогенні, антиапоптичні, підсилюючі виживання ефекти МСК. [12] Вони секретують велику кількість таких біомолекул, як цитокіни, антиоксидантні та проангіогенічні речовини, трофічні фактори і інші білки, які здатні опосередковувати відновлення уражень шляхом обмеження відповіді на стрес і апоптоз і залучення імунних і репаративних клітин до місця ураження. [13] Саме секрецією таких факторів, як *VEGF, HGF, TGF- β , bFGF* обумовлені антиапоптичні властивості МСК, *TGF- β , PGE-2, HGF, LIF, IDO* і ряд інших забезпечують імуномодуляторні властивості МСК. Ряд факторів, які секретують МСК обумовлюють такі важливі для клітинної терапії властивості МСК як анти-рубцеві та ангіогенічні. [14] МСК секретують ряд хемоатрактантів, експресія яких забезпечує таку важливу

для клітинної терапії властивість МСК мігрувати в місце запалення або ураження. На сьогодні відомо, що МСК можуть впливати на всі клітини імунної системи. Секретують МСК і такі молекули як IL 10, лейкоцитарний антиген G (HLA-G), LIF [15,16]. Завдяки секреції різноманітних біологічно активних молекул навіть середовище, в якому культивувались МСК, має терапевтичний вплив на протікання ряду захворювань. [17, 18]

Так, наприклад, показано, що внутрішньовенні ін'єкції середовища, в якому культивувались МСК кісткового мозку попереджали тубулярний апоптоз і некроз і послаблювали гостре ураження нирки, що викликалось цисплатином у лабораторних щурів. [19] Таким чином, можна сказати, що паракринна функція МСК навіть важливіша для їх використання у клітинній терапії, ніж пластичність, яка безумовно забезпечує можливості регенеративної медицини в плані регенерації різних органів та створення нових тканин, наприклад, хрящів, кісткових фрагментів тощо. При цьому залишається багато питань стосовно МСК. Наприклад, питання, чи співпадають властивості МСК, які одержані культивуванням *in vitro*, з властивостями МСК *in vivo*.

Через незвичайні здібності/властивості стовбурових клітин у 1991 році Капланом був запропонований термін «мезенхімальні стовбурові клітини» через їх здатність диференціюватися в більш ніж один тип клітин. [20] Цей термін став дуже популярним і на даний момент є найбільш вживаним, хоча викликає певні сумніви щодо ступеня його обґрунтованості. [21] Сьогодні в літературі існує багато замінників для аббревіатури МСК, включаючи мультипотентні стромальні клітини, мезодермальні стовбурові клітини, мезенхімальні стромальні клітини та багато інших. Каплан у своїй останній роботі рекомендує перейменувати ці клітини в «Medicinal Signaling Cells» через акцент на їх терапевтичний ефект після трансплантації, який, як вважають, базується головним чином на секреції факторів, що в кінцевому результаті сприяють регенеративним процесам організму. [22]

У всіх експериментах та клінічних випробовуваннях МСК реалізують всі притаманні їм властивості.

1.2. Джерела отримання МСК людини

МСК можуть бути виділені з багатьох тканин людини, що означає важливість вибору більш відповідних джерел щодо їх матеріально-технічних, практичних характеристик *in vitro*, цільової тканини та терапевтичної мети. [23, 24] Сьогодні основними та найвідомішими джерелами МСК є кістковий мозок, жирова тканина та пуповинний канатик; однак їх можна виділити з пульпи зубів, ендометрія, периферичної крові, шкіри, плаценти, синовіальної рідини, м'язів, вартонського желе тощо. [25] Вважається, що МСК можна виділяти з будь-якої тканини людини, при цьому існують певні обмеження, перш за все це доступність вихідних тканин та інвазивність самої процедури виділення, також враховуються різні характеристики донора (вік, хронічні захворювання, образ життя тощо). Дуже важливо при виборі підходящого джерела клітин, оцінити складність процесу отримання біоматеріалу і розглянути можливі несприятливі наслідки збору клітин у донорів. [26, 27] Наприклад, отримання МСК з кісткового мозку (МСК-КМ) є болісною процедурою, з можливими випадками кровотеч або інфекцій, що робить її більш складною, ніж виділення клітин з периферичної крові або з такого біоматеріалу як жирової тканини, пульпи зуба чи пуповини. [28]

Показано, що МСК виділені з різних джерел диференціюються в кістку [29], скелетні м'язи [30], жирову тканину [31], хрящ [32] і сухожилля [33]. Є докази того, що МСК також диференціюються в нервові клітини, такі як нейрони та гліальні клітини. Однак ці клітини володіють багатьма, але не всіма властивостями зрілих нейронів. [34]

Однак, треба розуміти, що МСК отриманні з різних джерел хоч і демонструють подібні властивості, але мають незначні відмінності. Існують деякі відмінності щодо експресії секретому, потенціалу проліферації та диференціації, клональності та паракринної активності між клітинами з різних джерел. [35]

Порівнюючи ембріональні, перинатальні та дорослі стовбурові клітини, ембріональні стовбурові клітини (ЕСК) характеризуються кардинальними властивостями самовідновлення та плюрипотентності, здатністю диференціюватися

в похідні трьох ембріональних зародкових листків *in vitro* та *in vivo*. Їх отримують із внутрішньої клітинної маси доімплантаційних ембріонів на стадії бластоцисти. Тим не менш, враховуючи очевидні етичні обмеження, пов'язані зі створенням химерних ембріонів шляхом ін'єкції ЕСК у надлишкові бластоцисти людини, [36] клінічне застосування ЕСК сильно обмежене технічними труднощами з руйнуванням незрілих клітин, що може призвести до утворення спонтанних тератом. [37] Це доброякісні пухлини, які найчастіше виникають у статевих залозах і містять у різному ступені ентодермальні, мезодермальні та ектодермальні похідні. [38] Тому, використання ЕСК є небезпечним та має високий ризик шкідливих мутацій, та ризик виникнення онкологій через їхню генетичну нестабільність і зміни, внесені під час перепрограмування геному людини. [39]

Навпаки, дорослі стовбурові клітини, такі як клітини шкіри, кісткового мозку і жирової тканини, пульпи зуба можуть мати ширше клінічне застосування. Наприклад, МСК-КМ використовуються для аутологічних і алогенних цілей, дуже багато робіт демонструють успішне клінічне застосування аутологічних МСК-КМ при таких захворюваннях як інфаркт міокарда [40], реакція «трансплантат проти хазяїна» (GVHD) [41,42], розсіяного склерозу, запальних захворювань легень [43-45], хвороба Крона [46] та інженерія кісткової тканини. [47] З іншого боку, аутологічне використання іноді обмежується через низку недоліків: кількість МСК може зменшуватись, падає їх проліферативна активність та потенціал до диференціації через недоліки донора. [48,49]

У порівнянні з МСК-КМ і ЕСК, МСК пуповини демонструють профіль експресії генів, більш схожий на профіль ЕСК. Перинатальні МСК представляють собою проміжний тип стовбурових клітин, що об'єднує в собі ряд властивостей дорослих клітин та ембріональних. [50,51] Оскільки МСК-пуповини мають тісні онтогенетичні зв'язки з ембріональними стовбуровими клітинами, ці клітини володіють більш широкою мультипотентною пластичністю, більш вираженою імуносупресивністю, проліферують швидше, ніж дорослі клітини з кісткового мозку та жирової тканини. [52] МСК-пуповини показали більш значну швидкість клітинної проліферації та

клональності у зв'язку з нижчою експресією *p53*, *p21* та *p16* порівняно з клітинами, виділеними з кісткового мозку та жирової тканини. [49]

Натомість, значну кількість МСК можна отримати з пуповини після кількох пасажів і екстенсивного розширення *ex vivo*. [47] Найвідчутнішою перевагою є те, що процедура забору є неінвазивною та етично прийнятною. Також позитивним моментом є можливість виділення МСК з різних чотирьох компонентів пуповини: з пуповинної крові, желе Вартона, оточуючих пуповинних судин, а також із субендотелія пуповинної вени. Вони здатні до диференціації у клітини жирової тканини, кісткової, хрящової, у клітини скелетних м'язів, кардіоміоцити та нервові клітини.

Дослідження експресії маркерів МСК пуповини демонструють проміжний характер цих МСК - між ембріональними стовбуровими клітинами та дорослими МСК. Так, на відміну від МСК-КМ вони демонструють експресію ряду маркерів, яка властива ЕСК, наприклад *Nanog*, *Ost-4*, *Sox-2*, нуклеостемін та інші. [53, 54]

Подібно до МСК-КМ, МСК-пуповини можна розглядати для аутологічного та алогенного використання. Аутологічні МСК-пуповини можуть використовуватися як генна терапія генетичних захворювань і як регенеративна або протизапальна терапія неонатальних травм, таких як церебральний параліч або гіпоксичне пошкодження мозку, тому спектр захворювань при використанні терапевтичної ефективності МСК-пуповини більш ширший, ніж при використанні МСК з дорослих тканин. З іншого боку, алогенні МСК-пуповини можна розширити та кріоконсервувати в банку клітин для пацієнтів, які цього потребують. Єдиним недоліком є те, що неможливо заздалегідь з'ясувати щодо здоров'я дитини як донора, тому спеціалісти додатково проводять геномні або хромосомні тести. Навпаки, у випадку донора МСК-КМ, спеціалісти можуть завчасно перевірити фізичний стан пацієнта та прийняти рішення щодо забору кісткового мозку.

Тому, порівняно з аналогами іншого походження МСК-пуповини мають достойні переваги як саме МСК і як клітини, отримані з пуповини: (1) неінвазивна процедура збору для аутологічного або алогенного використання; (2) менший ризик

інфікування; (3) низький ризик тератом; (4) мультипотентність; і (5) низька імуногенність з позитивною імуносупресивною здатністю.

1.3. Особливості МСК пуповини людини

Вже згадувалось, що МСК, які відносяться до дорослих стовбурових клітин, на сьогодні можна ізолювати з великої кількості тканин, але основними джерелами аутологічних МСК, які є перспективними для використання у клітинній терапії та тканинній інженерії є кістковий мозок та жирова тканина. Оскільки історично МСК з кісткового мозку було виділено раніше, ніж із інших джерел, то біологія цих клітин вивчена найбільше. Практично усім знанням про МСК ми завдячуємо саме вивченню МСК кісткового мозку. Багато клінічних та доклінічних досліджень показали, що ці клітини можуть бути успішно використані для лікування багатьох захворювань. Але це джерело не є ідеальним. Так, з одного боку, одержання кісткового мозку є болісною та інвазивною процедурою, з другого, з віком відносна кількість МСК зменшується і падає їх проліферативна активність та потенціал до диференціації. [55, 56] Ще одно джерело МСК – це жирова тканина. Виділення МСК із жирової тканини вважається процедурою неінвазивною, а характеристики таких клітин задовольняють потреби клітинної терапії, якщо мова іде про аутологічні клітини, хоча ефективність таких МСК знижується з віком і наявністю хвороб у донора. В останні роки багато уваги приділяється вивченню властивостей МСК перинатальних тканин. Пуповина, вени пуповини, амніон/плацента, желе Вартона багаті на багато типів мультипотентних клітин, які здатні формувати багато різних клітинних типів. Зокрема, МСК пуповини мають унікальну комбінацію властивостей пренатальних і постнатальних стовбурових клітин. Вони демонструють більш високу швидкість проліферації і більш стабільний каріотип в пізніших пасажах, ніж МСК кісткового мозку (КМ) і мають більш низьку імуногенність, ніж клітини КМ [57] оскільки вони експресують меншу кількість молекул *MHC-II (HLA-DMA, HLA-DRA и HLA-DPB1)* і, отже з меншою вірогідністю викликають імунну відповідь при використанні в алогенних умовах. [58] Використання перинатальних тканин для виділення МСК не

пов'язане з будь-якими етичними проблемами, оскільки в нормі вони утилізуються. Основним джерелом МСК із названих тканин, які розглядаються як найбільш придатні для використання у клітинній терапії та регенеративній медицині, є пуповина. Протягом вагітності зародок і плацента з'єднані еластичною пуповиною, яка охороняє судини пуповини від компресії, скручування і забезпечує хорошу циркуляцію крові. Судини пуповини, одна вена та дві артерії лежать в специфічному мукозному багатому на протеоглікани матриксі, яке називається желе Вартона. Желе Вартона містить мультипотентні фібробластоподібні МСК.[59] Також відомо про те, що желе Вартона багате на мукополісахариди, і містить глікопротеїнову сітку і мікрофібрили колагену [60], а самі клітини виділені з желе Вартона, крім цитокінів і ростових факторів секретують глікозаміноглікани та фактори клітинної адгезії. [61]

Щодо походження цих клітин, то існує дві гіпотези щодо їх появи в желе Вартона. Згідно першій існує дві хвилі міграції фетальних МСК в ранньому періоді ембріогенезу. Під час першої хвилі МСК мігрують з жовткового мішку і аорта-гонадно-мезонефрусу через пуповину до плаценти, а під час другої зворотної міграції через пуповину до фетальної печінки і кісткового мозку. Під час цих міграцій вони захоплюються і залишаються в желеподібній субстанції пуповини. [62, 63] Згідно другої гіпотези ці клітини є примітивні мезенхімально-стромальні і походять від мезенхіми, яка вже локалізована в пуповинному матриксі. Роль цих клітин полягає в секреції різних глікопротеїнів, факторів росту, адгезії та білків екстрацелюлярного матриксу в формі желатиноподібної субстанції для того, щоб запобігати здавлюванню судин пуповини під час гестації. Якщо вони є примітивними стромальними клітинами, то очевидно вони будуть мати маркери як ембріональних стовбурових клітин (ЕСК), так і МСК, і будуть відрізнятися від інших дорослих МСК своїм секретомом. На підтримку таких поглядів було одержано дані про те, що желе Вартона багате на мукополісахариди, і містить глікопротеїнову мережу і мікрофібрили колагену [64], а самі клітини виділені з желе Вартона крім цитокінів і ростових фактрів секретують глікозоаміноглікани та фактори клітинної адгезії. [65] Як вже згадувалось, дослідження експресії маркерів МСК пуповини підтвердили проміжний характер цих клітин - між ембріональними стовбуровими клітинами та

дорослими МСК. [54, 66, 67] Якщо клітини походять з епібласта, слід чекати, що вони будуть викликати тератоми, хаотично диференціюючись. Але показано, що МСК пуповини не викликають тератом ні в імунodefіцитних мишей, ні у імунoкомпетентних приматів, коли вони трансплантуються у високій дозі з матригелем, який сприяє формуванню тератом, або без нього. [68, 69] Як можливе пояснення цього факту пропонується те, що ці клітини гублять властивість плюрипотентності або їх онкосупресивні гени зменшують рівень експресії генів плюрипотентності, і він стає недостатнім для індукції пухлиногенезу. [61] Треба відмітити, що коли ембріональні стовбурові клітини вирощуються на фідерному шарі з МСК з желе Вартона, вони втрачають свої туморогенні властивості. [70] На сьогодні показано, що МСК із різних компартментів пуповини (амніона, субамніона, периваскулярного регіона та желе Вартона) мають дещо різні характеристики. Всі вони мають фібробластоподібну морфологію, високу проліферативну активність і мультипотентні властивості. Але треба відмітити, що порівнювати МСК із різних компартментів пуповини важко, оскільки для їх виділення застосовуються різні методи, а для культивування різні середовища. Детальний аналіз опублікованих даних про такі МСК демонструє достатньо великий набір різних маркерів, що експресуються МСК із різних компартментів пуповини, як показано різними авторами. Є і загальні риси: вони не експресують маркерів притаманних гематopoетичним клітинам, експресують маркери МСК і ряд маркерів ЕСК, не експресують комплексу *HLA II* класу. Таким чином, як правило МСК пуповини виділяють після видалення судин пуповини і вони є сумарною фракцією МСК всіх компартментів пуповини. Але є очевидною необхідність стандартизації протоколів виділення і культивування МСК, використання визначених середовищ, способів аналізу експресії маркерів і пасажу, на якому проводиться такий аналіз. Безперечна перевага МСК пуповини полягає в можливості використання їх для алогенної трансплантації. В цілому МСК пуповини демонструють більш високу швидкість проліферації, більш стабільний кариотип в пізніх пасажах, ніж МСК кісткового мозку [57,58], а найважливішою характеристикою такої можливості є низький рівень імунoгенності МСК пуповини. оскільки вони експресують меншу кількість молекул *MHC-II (HLA-DMA, HLA-DRA i*

HLA-DPB 1). [71, 72] Можливість використання таких клітин для алогенної трансплантації показано навіть в експериментах з ксеногенної трансплантації. Так, коли МСК пуповини людини було трансплантовано мишам, клітини виживали принаймні до 6 тижнів. [73, 74] МСК пуповини як і інші МСК мають імуномодуляторні властивості. Так, не дивлячись на те, що загальна експресія імуностимуляторних лігандів МСК пуповини і кісткового мозку подібна, їх індукція прозапальними цитокінами відрізняється. *HLA-DR* індукуються в МСК кісткового мозку обробкою гама-інтерфероном, в той час як в МСК пуповини ця експресія незначна. [75] Крім того, МСК пуповини продукують велику кількість антизапального цитокіну *IL-10*, більшу кількість *TGF- β* і експресують *HLA-G*, який не експресується МСК кісткового мозку. [71,72]

МСК пуповини експресують *IL-6* і *VEGF*, які, як показано, грають основну роль в імуносупресивних властивостях клітин. [76] При деяких обставинах ці клітини можуть демонструвати імунну відповідь. Якщо ін'єкцію таких МСК в місце запалення проводити повторно, або обробити клітини перед ін'єкцією гама-інтерфероном, вони можуть стати імуногенними. [77] Такі факти треба мати на увазі, використовуючи МСК в клітинній терапії. МСК пуповини демонструють множинні ефекти, пов'язані з імуномодуляцією. Це збільшення експресії негативних коstimуляторних лігандів, секреція імуносупресивних розчинних факторів, генерація клітин пам'яті, злиття клітин, щоб уникнути розпізнавання, послаблення антиген-презентуючих клітинних функцій та інші. [75] Використання МСК для клітинної терапії потребує великої кількості клітин, що змушує культивувати їх *in vitro*. При цьому добре відомо, що маніпуляції з клітинами *in vitro* призводять до зміни генотипу клітини, саме тому кількість таких маніпуляцій повинна бути зведена до мінімуму. Використання желе Вартона в якості джерела МСК відрізняється можливістю одержання великої кількості МСК в первинній культурі навіть без пасування. Так, багатьом авторам вдавалося одержувати 5×10^6 МСК/ см пуповини [78], $3,6 \times 10^6$ МСК/ см пуповини, а після культивування – до $11,5 \times 10^8$ МСК/ см пуповини. Використання пуповини в якості джерела МСК дозволяє, як повідомлялось, одержувати високий вихід МСК в первинній культурі (до $2,5 \times 10^8$ МСК з цілої пуповини) [64], який

дозволяє використовувати для трансплантації ці клітини без наступного культивування. Безумовно такий підхід потребує суперкомплексних середовищ і спеціальних умов культивування (наприклад, гіпоксичних).

Таким чином, результати багаточисельних досліджень властивостей МСК із різних компартментів пуповини, в тому числі і желе Вартона (висока проліферативна активність, секреція великої кількості сигнальних молекул, проміжний стан між ембріональними стовбуровими клітинами і дорослими, імуномодуляторні властивості, тощо), доступний матеріал для виділення МСК, одержання якого не пов'язане з інвазивними процедурами і використання якого не має жодних етичних перешкод – все це свідчить про переваги МСК із пуповини перед іншими дорослими МСК. Можливість неінвазивного збору джерела таких МСК і їх низька імуногенність дають їм унікальну перевагу в клінічному використанні. Терапевтичний потенціал МСК пуповини було перевірено в багатьох дослідженнях. Вони були перевірені в лікуванні таких захворювань, як гематологічні захворювання, кардіоваскулярні захворювання, регенерація хрящів та кісток, лікування ран, дефектів зору, цукрового діабету, нейродегенеративних захворювань, терапії інсульту, терапії захворювань печінки, терапії аутизму, трансплантат проти хазяїна, вікова слабкість тощо. Цей список неповний, і він кожного року поповнюється. Результати клінічних випробувань публікуються далеко не завжди, але можна сказати, терапевтична ефективність МСК пуповини в тій, чи іншій мірі, спостерігається завжди.

1.4. Імуномодулюючі властивості МСК пуповини людини

Основною характеристикою МСК є їх імуномодулюючі властивості, тобто здатність змінювати імунну відповідь хазяїна на патогени та чужорідні агенти шляхом або стимуляції цієї відповіді або шляхом пригнічення запалення, щоб підтримати необхідний рівень імунного захисту хазяїна. МСК характеризуються надзвичайною здатністю модулювати фенотип і функціональні властивості імунних клітин таких, як макрофаги, Т-клітини, В-клітини, природні кілери, моноцити та нейтрофіли за

рахунок взаємодії з ними. Це відбувається як через прямі клітинні контакти, так і через паракринну активність МСК.

Багаточисельні дослідження показали, що МСК демонструють імуносупресивні ефекти за рахунок пригнічення активності імунних клітин як вродженого, так і адаптивного імунітету. Зокрема, взаємодіючи з вродженою імунною системою вони проявляють як протизапальні, так і прозапальні властивості. [79, 80] Відомо, що клітини вродженої імунної системи розрізняють «свої» молекули від тих, що належать патогену за допомогою специфічних рецепторів, які називаються Toll-подібними рецепторами (*TLR*), групою з 10 функціональних білків у людини. [81] Виявилось, що МСК динамічно експресують значну кількість різних *TLR*, *in vitro* було показано, що стимуляція специфічних *TLR* впливає на подальші імуномодуючі реакції МСК. [82] Наприклад, стимуляція МСК прозапальними цитокінами такими як *IFN- γ* , *TNF*, *IFN- α* , *IL-1 β* призводить до підвищення експресії тих *TLR*, які підвищують чутливість МСК до запалення. [83] Слід зазначити, що в основному всі дані стосовно імуномодуляторних властивостей МСК вперше було одержано в дослідженнях *in vitro* при сумісному культивуванні МСК і клітин імунної системи.

Відомо, що у вродженій імунній системі ключовими гравцями є макрофаги, які ініціюють і контролюють запалення. [84] В залежності від їх фенотипа і функціональних властивостей макрофаги діляться на недиференційовані M0, прозапальні M1 та протизапальні M2. [85] Макрофаги здатні до переходу з одного фенотипу в інший [86] Ці типи макрофагів демонструють експресію різних типів рецепторів, продукують різні цитокіни і хемокіни, реалізують різні функції. Наприклад, M1, які вважаються класично активованими макрофагами, мають властивості секретувати підвищений рівень прозапальних цитокінів, включаючи *TNF- α* , *IL-6*, *IL-12*, індукцибельну NO синтазу (*iNOS*) *IL-1 β* , *TNF- α* , *IL-23* тощо. Навпаки, макрофаги M2, альтернативно активовані демонструють інший профіль секретому. Вони експресують низький рівень прозапальних цитокінів і високий рівень протизапальних цитокінів таких, як *IL-10*, *TGF- β* , *Arg1*.

Макрофаги відіграють різні ролі на різних етапах відновлення тканин. Вони регулюють запалення, секретуючи як прозапальні, так і протизапальні цитокіни, різні

біологічно активні молекули, такі, як хемокіни, матриксні металопротеїнази (MMP), фактори росту, які впливають на рекрутинг, міграцію, проліферацію та диференціацію різних клітин, пов'язаних з відновленням тканин. [84]

Багаточисельні дослідження показали, що МСК взаємодіють з макрофагами, впливаючи на їх поляризацію, змінюючи фагоцитоз, метаболізм макрофагів тощо. Результатом взаємодії МСК і макрофагів, так званого навчання макрофагів, є поляризація макрофагів в М2 тип або метаболічне репрограмування макрофагів. [87-89] МСК, які виділені з різних джерел, поляризують макрофаги за рахунок *PGE2* (простагландин E2) -залежного механізму, що приводить до супресії прозапальних факторів, таких як *TNF α* , інтерлейкіни *IL-12p70* та *IL-17*, в той же час стимулюючи протизапальний інтерлейкін *IL-10*. [90-92] Як уже згадувалось МСК можуть впливати на макрофаги через прямий клітинний контакт, але більшість досліджень свідчать про те, що основну роль при цьому відіграють розчинні фактори, які продукуються МСК, такі як *PGE2*, індол амін-2,3-діоксигеназа (*IDO*), *IL-6*, фактор росту гепатоцитів (*HGF*), трансформуючий фактор росту (*TGF- β*), та *TNF α* . [91, 93-95] Механізми поляризації або метаболічного перепрограмування макрофагів дуже складні. [96, 97] зокрема, вони включають перехід від гліколізу, характерного для М1 макрофагів до окисного фосфорилування. Цей процес під час взаємодії макрофагів з МСК пов'язаний з переходом до макрофагів мітохондрій МСК і супроводжується нижчим енергетичним станом. [91, 98, 99] Дослідження останніх років показали участь в процесі взаємодії МСК і макрофагів позаклітинних везикул, що продукуються МСК, зокрема, їх участь в переносі мітохондрій МСК до макрофагів, що призводить до посилення протизапальних властивостей макрофагів. [100, 101]

Поляризація макрофагів в протизапальний фенотип під впливом МСК найчастіше є основним механізмом терапевтичного ефекту, який спостерігається після введення МСК. [102-105] Саме альтернативно активовані макрофаги вносять основний вклад в пригнічення запальних процесів та відновлення тканин. Зокрема, показано, що введення МСК призводить до підвищення кількості моноцитів/макрофагів у кров'яному руслі.

Цей ефект супроводжується збільшенням кількості моноцитів/макрофагів в місці запалення. [106, 107] Наприклад, на моделі перитоніту у мишей показано зростання фагоцитарної активності моноцитів крові після внутрішньовенного введення МСК кісткового мозку. [108] В 2016 році було опублікована робота американських дослідників, які показали, що МСК інактивовані прогріванням при 50 С° протягом 30 хв були не здатні відповідати на запальні сигнали та секретувати імуномодуляторні фактори, зберігаючи при цьому свою структуру. [109] При цьому як контрольні, так і інактивовані МСК викликали помірні запальні реакції у здорових мишей, різке підвищення рівня *IL-10* і зниження рівня γ -інтерферону у мишей із сепсисом. Експерименти *in vitro* показали, що на відміну від контрольних МСК, інактивовані МСК не мали здатності пригнічувати проліферацію Т-клітин або індукувати утворення регуляторних В-клітин. Однак, як контрольні МСК, так і інактивовані МСК модулюють функцію моноцитів у відповідь на ліпополісахариди. Результати цього дослідження демонструють, що на конкретних моделях захворювання імуномодулюючий ефект МСК залежить не від їх секретому чи активного «спілкування» з імунними клітинами, а від розпізнавання МСК моноцитарними клітинами. Ці відкриття дають новий погляд на імуномодуляцію у МСК, і допомагають визначити ключові компоненти терапевтичних ефектів МСК. Подальші дослідження показали, що після внутрішньовенного введення МСК проявляють імуномодуляторний вплив на периферичні циркулюючі моноцити і тканинні макрофаги через фагоцитоз МСК цими макрофагами [110], індукуючи їх перехід у М2 протизапальний фенотип. Це призводить до пригнічення запалення і прискорює відновлення тканин.

Таким чином моноцити/макрофаги відіграють важливу роль в здійсненні імуномодулюючих ефектів МСК. Такий же механізм працює і у випадку інактивованих, апоптичних МСК та їх фрагментів. [111]

Незважаючи на велику кількість досліджень, присвячених пошуку механізмів, що обумовлюють терапевтичні властивості МСК, питання залишається відкритим, оскільки з'являються нові дані, які показують нові сторони процесу взаємодії МСК з імунними клітинами.

Наприклад показано, що супернатант макрофагів, які фагоцитували мертві МСК покращує виживання гіпоксичних кардіоміоцитів. [112] Таким чином, моноцити/макрофаги відіграють важливу роль в здійсненні імуномодулюючих ефектів МСК. Такий же механізм працює і у випадку інактивованих, апоптичних МСК та їх фрагментів. [111]

Багаточисельні дослідження показали, що крім макрофагів МСК впливають на інші імунні клітини. Вони супресують проліферацію Т клітин, впливають на секрецію цитокінів, регулюють баланс Т хелперів-1/ Т хелперів-2, здатні викликати арешт клітинного циклу, можуть впливати на секрецію антитіл і продукцію ко-стимуляторних молекул В-клітин. МСК пригнічують дозрівання, активацію і антиген презентацію дендритних клітин, індукують активацію природних кілерів. [113] Макрофаги, які були навчені або праймовані МСК, впливають на різні імунні клітини, зокрема, за рахунок підвищеного рівня протизапальних цитокінів, пригнічують Т-клітини і індукують регуляторні Т-клітини (Tregs). [114] змінюють диференцію дендритних клітин та В клітин. [115]

Дослідження останніх років показали, що терапевтична ефективність МСК в високій мірі пов'язана з секрецією позаклітинних везикул таких як екзосоми та мікровезикули. [116]

Екзосоми опосередковують імуномодуляцію, зокрема зменшують інфільтрацію тканин макрофагами M1 і саме вони викликають перехід макрофагів в M2 фенотип. [117-121]

Саме імуномодулюючі властивості екзосом МСК забезпечують їх терапевтичний потенціал, що призводить до широкомасштабних спроб використання екзосом для лікування запальних процесів, які лежать в основі всіх захворювань та уражень, як наприклад, при ішемічному інсульті чи інфаркті, а також для лікування аутоімунних захворювань. [122-125]

Треба відмітити, що МСК, які були прекодиційовані різними факторами, посилюють свої імуномодулюючі властивості. [126, 127] Це стосується і екзосом, які вони продукують. [128-130] Так прекодиціювання гіпоксією МСК кісткового мозку щурів призводить до того, що екзосоми, одержані з таких клітин, значно посилюють

секрецію (більш ніж в 2 рази) протизапальних цитокінів ($TGF-\beta$ і $IL-10$) і пригнічують секрецію прозапальних цитокінів ($TNF-\alpha$ і $IL-1\beta$) у порівнянні з екзосомами, що одержані з МСК, які культивувались в умовах нормоксії. Екзосоми, які були одержані з прикондиціонованих МСК, демонстрували більш виражений терапевтичний ефект на моделі ураження спинного мозку. [131]

Таким чином, МСК і, як вже відомо на сьогодні, їх екзосоми реалізують свій імуномодуючий потенціал через функціональні зміни моноцитів/макрофагів, дендритних клітин, Т-клітин, В-клітин та природніх клітин-кілерів. Такі властивості виявляють не тільки живі МСК, але і апоптичні, метаболічно інактивовані клітини і навіть їх фрагменти. Все це і способи модифікувати метаболізм МСК та властивості їх мікровезикул шляхом прекондиціонування дає можливість посилити терапевтичний потенціал МСК і їх похідних і сприяє розробці способів їх використання для лікування навіть тих захворювань, які не піддаються лікуванню традиційними методами медицини і відновленню таких уражень, які були можливі тільки хірургічними методами.

1.5. Міграція МСК пуповини людини та методи їх доставки

На сьогоднішній день МСК є широко досліджені на предмет їх терапевтичного потенціалу в регенеративній медицині, завдяки їхній здатності загоювати пошкоджену тканину та служити резервуаром факторів росту та регенеративних молекул. Таким чином, клінічне застосування МСК залежить не тільки від кількості та якості клітин, але і від успішної міграції цих клітин до органу/тканини-мішені після їх введення. Найпоширенішим способом введенням МСК вважається системне, але воно не завжди є ефективним, оскільки основний відсоток клітин одразу після потрапляння у судинний простір прямує до хоумінгу - ціленаправленої міграції МСК у легені, далі в селезінку, кістковий мозок і лише невелика кількість досягає цільової мішені після їх введення. [132] Тому, якщо першопочаткова задача не стоїть у досягненні міграції МСК саме до органів - хоумінгу, то в інших випадках системне введення буде перешкодою у реалізації повного терапевтичного потенціалу терапії на

основі МСК. Відповідно, у сучасному світі застосовують різноманітні стратегії введення МСК, щоб покращити їх властивості включаючи генетичну модифікацію, праймування або прекодиціювання МСК, залучення біоінженерії, з останніх технологій, які розробили та вже мають позитивні доклінічні результати це ультразвукові методи введення.[133]

При несистемному введенні МСК, їх трансплантують локально в цільовий орган/тканину, де вони за допомогою прозапального хемокінового градієнта мігрують у бік пошкодження. Також, було показано, що при локальному введенні сконцентрованої кількості МСК, клітини все ще виявлялися в місці імплантації через 100 днів після трансплантації, де вони продовжували секретувати паракринні фактори в кровотік, за рахунок чого подовжувалася дія терапевтичного потенціалу МСК. [134,135]

При системному введенні МСК потрапляють у простір судини, де проходять багатоетапний процес, щоб вийти з кровообігу та мігрувати до місця пошкодження. Процес такої внутрішньовенної трансплантації МСК можна розділити на п'ять етапів, як показано на (рис.1.1): (1) прив'язування до селектину та переміщення, (2) активація, (3) блокування інтегринами, (4) трансміграція або діapedез та (5) міграція.

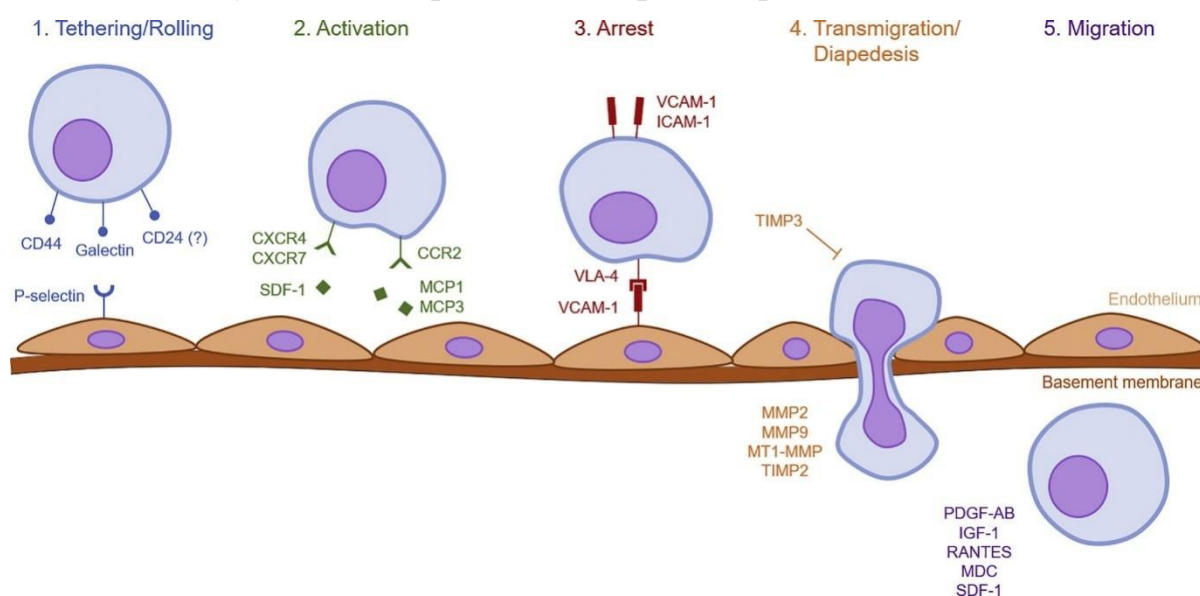


Рис. 1.1. Схематичне зображення механізму міграції МСК при внутрішньовенній трансплантації (адаптовано до Mujib, U., Avnesh, S., та Thakor, A., 2019)

При різних методах введення МСК як внутрішньовенному, так і внутрішньоартеріальному було показано, що шлях міграції стовбурових клітин не змінюється і вони прямують відразу у легені. Внутрішньоартеріальне введення, на сьогоднішній день, майже не використовується, оскільки збільшується ризик розвитку мікросудинних ускладнень. Доказом цього стали данні про коагулятивні властивості та протромбічний потенціал МСК, які сприяють утворенню тромбозу при внутрішньоартеріальному введенні ін'єкцій стромальних клітин. [136]

При дослідженні міграції флуоресцентно мічених МСК, введених в організм лабораторним щурам з індукованим токсичним гепатитом, була відзначена їх присутність у легенях через 24 год., після трансплантації клітин. І вже через 2 доби (після введення) найбільша кількість світіння спостерігалась у місцях вогнища запалення – селезінка та печінка. А в нирках, міокарді та легенях в рідкісних випадках відзначалися поодинокі осередки яскравої флуоресценції. [137]

Окрім внутрішньоартеріальних\венних ін'єкцій МСК, про які йшлося вище, іншим шляхом доставки є внутрішньом'язове введення МСК. Це ще один метод дистанційної доставки, який досліджувався для відновлення серця. На моделі дилатаційної кардіоміопатії щурів була продемонстрована внутрішньом'язова доставка МСК пуповини людини, яка значно підвищувала фракцію викиду лівого шлуночка і вкорочення фракції лівого шлуночка. Також вирости показники експресії циркулюючих факторів росту: *HGF*, *LIF*, *GM-CSF* і *VEGF* та експресії факторів росту міокарду: *HGF*, *IGF-1* і *VEGF*. [138] Перевагою внутрішньом'язової доставки МСК є те, що м'яз виступає в ролі «сховища» для клітин, які далі нікуди не мігрують, але при цьому здатні довготривало здійснювати терапевтичний ефект і такий метод доставки дозволяє виконувати більше однієї ін'єкції МСК без підвищеного ризику порівняно з більш інвазивними методами. Було виявлено, що така віддалена доставка МСК до скелетних м'язів задніх кінцівок покращує функцію шлуночків на моделі серцевої недостатності хом'яка. [139]

Крім того, МСК здатні мігрувати до пошкоджених тканин уздовж градієнтів хемоатрактантів у периферичній крові та стромальному позаклітинному матриксі. [140] У пошкоджених тканинах місцеві фактори, такі як агресивне середовище,

прозапальні цитокіни, гіпоксія та ліганди Toll-подібних рецепторів, стимулюють МСК, сприяючи секреції факторів росту у великій кількості для стимулювання регенерації тканин. [141-143]

Отже, ефективність та безпека доставки МСК є важливими складовими, при врахуванні терапевтичного потенціалу клітин, локалізації та типу захворювання при якому МСК можуть викликати побічні реакції. Також важливим моментом при системному введенні є «захоплення» МСК у легенях, через що до місця пошкодження досягає лише невелика кількість клітин. І додаткове сприяння виживанню МСК *in vivo*, більша стимуляція експресії паракринних факторів клітин можуть посилити терапевтичний ефект МСК при захворюваннях різного генезу.

1.6. Методи посилення терапевтичних властивостей МСК

1.6.1. Інкапсуляція МСК як спосіб підвищення терапевтичної ефективності. Успішним методом для посиленої міграції МСК та їх сконцентрованості у місці пошкодження, посилення терапевтичного ефекту є мікрокапсуляція МСК. Цей метод є перевагою над системним введенням та більшості локальних методів через пряме інтрапаренхіматозне включення, їх інтеграцію та збільшує спроможність виживання. І перевагою у мікрокапсуляції є використання саме природніх полімерів над синтетичними, через меншу цитотоксичність, виникнення запальних реакцій та сконцентруванні паракринних факторів, які виділяють МСК всередині мікрокапсул та їх вивільнення.

Як уже відзначалось, МСК пуповини людини мають властивості, які забезпечують багатообіцяючі перспективи їх використання в регенеративній медицині. Але прекрасні результати доклінічних випробувань МСК в багатьох випадках не вдалося продемонструвати в клінічних умовах. Так, на 31 жовтня 2023 року було заєстровано 1654 клінічних випробувань на ClinicalTrials.gov з використання МСК для лікування хвороби Крона, хвороби трансплантат проти господаря, травма спинного мозку, склерозу, уражень хрящевих тканин тощо. Але

більшість з цих випробувань знаходяться у 1 або 2 фазі і тільки приблизно 7% (120 з 1654) знаходяться в 3 і 4 фазі випробувань.

Причиною цього вважається низька виживаність МСК, недовговічна персистентність трансплантованих клітин. Все це викликає необхідність пошуку підходів, які спрямовані на підвищення терапевтичної ефективності МСК. Один з таких підходів – інкапсуляція клітин в гідрогелі. Інкапсуляція клітин в капсули з безпечних напівпроникних матеріалів дозволяє забезпечити їх довгочасну виживаність, секрецію терапевтичних продуктів захистити їх від впливу запального середовища. Інкапсуляція клітин включає розробку і використання конкретних процедур імуноізоляції клітин у відповідний скефолд (каркас). Це дає можливість уникнути обмежень, що пов'язані з джерелом клітин і забезпечує можливість використовувати як аутологічні, так і алогенні клітини.

З початку 20-го століття технологію інкапсуляції клітин в гідрогелі почали розробляти як спосіб захисту трансплантованих клітин від імунної системи господаря. Інкапсуляція клітин була використана як підхід до лікування таких захворювань як діабет I типу, офтальмологічні захворювання (діабетичні ускладнення очей, макулярна дегенерація, захворювання сітківки), нейродегенеративні хвороби, а також для протипухлинної терапії і лікування хронічної болі. [144-151]

Відтоді іммобілізація клітин у відповідний скефолд (каркас) розглядається як перспективний шлях їх застосування у клітинній терапії та тканинній інженерії. Інкапсуляція клітин в капсули з безпечних напівпроникних матеріалів дозволяє забезпечити їх таргетовану доставку, довгочасну виживаність і секрецію терапевтичних продуктів. До числа таких матеріалів входять альгінати, колаген, хітозан, агароза, гіалуронова кислота, поліетиленгліколь (ПЕГ) та ін. Найчастіше для іммобілізації клітин використовуються альгінати в зв'язку з їх розповсюдженістю, здатністю легко формувати гелі та очевидною біосумісністю та стабільності *in vivo*. [152-154] Альгінат є полісахаридом, виділеним із бурих водоростей, знайдених у прибережних водах по всьому світу. [155] Це лінійний сополімер, що складається з β -D-маннуринової кислоти та α -L-гулуринової кислоти, який можна легко перетворити на гель шляхом зв'язування гіалуронової кислоти з кальцієм. [156] Класично клітини

інкапсульовані в альгінатні мікрокапсули з напівпроникною мембраною, як правило, полілізином (PLL), який захищає клітини від імунних медіаторів і дозволяє вивільняти корисні фактори з мікрокапсули. [157] Також часто застосовують функціоналізовані альгінати, до яких хімічно приєднуються амінокислотні мотиви білків міжклітинного матриксу (наприклад RGD мотив фібронектину, який відповідає за взаємодію з поверхнею клітин), для того, щоб імітувати для клітин у гелі тканинне середовище. [158]

Для покращення властивостей мікрокапсул використовують покриття капсул полікатіонами. Це робиться для обмеження проникності мікрокапсул для іммуноглобулінів хазяїна та для збільшення їх стійкості. Зазвичай для цього використовують полі-L-лізин [159], проте останнім часом набагато більше починають використовувати полі-L-орнітин, через його низькі імуногенні властивості. [160, 161]

Інкапсуляція може бути використана в клітинній терапії і тканинній інженерії, в тому числі для доставки і збільшення виживаності МСК. [162, 163] Труднощі використання МСК в терапії різних захворювань пов'язані з нетривалою персистенцією клітин після транспланції, а їх інкапсуляція МСК в гідрогель суттєво збільшує час їх існування в організмі. Так, наприклад, інкапсульовані аллогенні МСК зберігалися в імунокомпетентних щурах 5 тижнів, в той час як неінкапсульовані МСК не визначались в щурах менше, ніж через 2 тижня. [164]

На моделі трансплантації кісткового мозку мишам, було показано, якщо при введенні вихідних МСК час їх напівжиття було 2 години, то час півжиття інкапсульованих клітин був 50 годин, і вони сприяли приживленню головного комплексу гістосумісності (МНС) донорських клітин. [165] У випадку інкапсуляції панкреатичних β -клітин, одержаних з плюрипотентних стовбурових клітин людини без системної імуносупресії у імунокомпетентних мишей *C57BL/6* корекція глікемії тривала більше 150 днів. [166, 167] Багаточисельні дослідження ефективності інкапсульованих МСК на різних експериментальних моделях показали, що інкапсуляція призводить до підвищення терапевтичної ефективності МСК. Особливу увагу дослідники приділяють можливості використання інкапсульованих МСК для лікування серцево-судинних захворювань. Так, на моделі інфаркту міокарду у щурів

проведено порівняння ефекту інкапсульованих МСК і неінкапсульованих МСК на функцію серця після інфаркту. МСК інкапсульували в альгінат і прикріпили до серця разом з гідрогелевою латочкою. Постінфарктна функція викиду значно покращилась, у варіанті неінкапсульованих МСК становила $39 \pm 2\%$ (контроль $34 \pm 3\%$), а у варіанті інкапсульованих МСК - $56 \pm 1\%$; покращилась фракція скорочення, розмір рубця через 28 днів був значно менший у випадку інкапсульованих МСК - $7 \pm 1\%$, неінкапсульовані МСК - $14 \pm 1\%$, контроль - $14 \pm 2\%$. Автори спостерігали значне збільшення мікроваскулярної густини в перинфарктній зоні: інфаркт - 121 ± 10 , неінкапсульовані МСК - 198 ± 18 , інкапсульовані МСК - 828 ± 56 судин/мм². [168]

Наведені дані свідчать про реальне посилення терапевтичного ефекту МСК за рахунок інкапсуляції, яке забезпечує довготривале виживання МСК. В іншому дослідженні показано, що введення МСК в альгінатних капсулах в інфарктний міокард більше, ніж в 2,5 раз покращує вентрикулярну функцію у порівнянні з неінкапсульованими МСК, а через 4 тижні постінфарктний фіброз зменшується на 2/3 з інкапсульованими МСК і залишається без змін у варіанті з неінкапсульованими МСК. [169]

Таким чином, інкапсуляція МСК в 3D матрикс є дуже ефективним методом регенерації тканин.

В останні роки інтенсивно розробляються підходи для інкапсуляції не тільки МСК, але і їх екзосом. [170-172]

Імобілізація екзосом в гідрогелі збільшує час їх існування в організмі миші до 5-7 днів, в ряді випадків до 14 днів [173], в той час як при внутрішньовенному введенні екзосоми зникають з крові за декілька хвилин. Екзосоми в складі гідрогелей визнані найбільш ефективним способом їх доставки до організму. [174-176]

Використання екзосом в складі гідрогелей дає позитивні результати при використанні для лікування кісток, [177-179] суглобів, [162, 180] м'язів, [181] ішемії нижніх кінцівок, [182, 183] шкіри, ран різного походження, в тому числі діабетичних. [184] Наприклад, використання екзосом МСК пуповини людини, інкорпорованих в хітозановий гідрогель, через 15 днів лікування показало вражаючий результат – 93,3% заживлення ран, що супроводжувалось високим ступенем реепітелізації. [185]

Особливу увагу дослідників приваблює можливість використання екзосом «одягнених» у гідрогель для лікування серця. [186, 187]

Порівняння терапевтичної ефективності вільних екзосом і інкапсульованих свідчить про більш високу ефективність останніх. Так, через 21 день після введення екзосом в міокард після інфаркту фракція викиду лівого шлуночка в групі вільних екзосом складала $37.636\% \pm 6.457\%$, а в групі інкапсульованих екзосом - $50.067\% \pm 6.750\%$ проти $14.175\% \pm 2.215\%$ в інфарктній групі без лікування. [188] Саме в цій групі спостерігались найкращі показники ангіогенезу, зменшувався рівень запалення, апоптозу та інтенсивність фіброзу. Таким чином, інкапсуляція як клітин, в тому числі МСК, так і екзосом є реальним шляхом збільшення їх терапевтичної ефективності за рахунок довготривалого виживання і точної доставки.

1.6.2. Прекондиціонування МСК за допомогою різних факторів. Не дивлячись на позитивні терапевтичні ефекти МСК у регенеративній медицині все одно час від часу стабільному застосуванню терапії МСК у клінічній практиці перешкоджають різні фактори: гетерогенність МСК, нестандартизовані технології культивування *in vitro*, механічне пошкодження МСК через їх трансплантацію, агресивне мікрооточення, що негативно впливає на виживання клітин та їх міграційну здатність через що якість та кількість трансплантованих МСК значно зменшується.[189] Крім того, потужний терапевтичний потенціал МСК сприяє, щоб клітини мали максимальну регенеративну здатність. Отже, з'являється все більше доказів того, що стратегії preconditionування МСК *in vitro* можуть оптимізувати ще більше їхній терапевтичний потенціал.

Тому, терміново необхідна розробка нових стратегій для підвищення регенераційної ефективності МСК. Стратегії preconditionування *in vitro* («попереднє кондиціонування») можуть підвищити виживання МСК після їх трансплантації, посилити паракринні властивості для протидії запальному мікрооточенню, підвищити міграційну здатність, і, отже, оптимізувати їх репаративну та регенеративну здатність. На сьогоднішній день відомі різні технології preconditionування МСК, які були розроблені за останнє десятиліття,

застосовуються вони *in vitro* для підвищення регенеративної здатності МСК. [190] Прекондиціонування МСК включає модуляцію культуральної атмосфери (гіпоксичної або аноксичної), 3D-культуру, додавання трофічних факторів (факторів росту, цитокінів або гормонів), ліпополісахаридів і фармакологічних агентів. Фактори, що виділяються МСК у відповідь на прекондиціонування, є різноманітними та мають різну імуномодуючу або імуносупресивну, антиапоптотичну, проангіогенну та трофічну дію. [191] Секретом (або паракринний профіль) прекондиціонованих МСК змінюється залежно від фактора, яким здійснюють попереднє кондиціонування. Різні методи прекондиціонування, час експозиції, дозування активують або пригнічують різні молекулярні сигнали та каскади передачі сигналів в клітинах. В основі механізмів впливу прекондиціонування на МСК є активація та механізми дії Toll-подібних рецепторів (TLR), що беруть участь у різних біологічних функціях МСК.

Активація *TLR* на МСК відбувається у відповідь на *damage-associated molecular patterns* (молекулярні структури асоційовані з пошкодженням) (*DAMPs*) які синтезуються під час розвитку ішемії, запалення тканин, агресивного мікрооточення за відсутності або присутності патогенів. [192] Тому, МСК зазнають впливу лігандів на *TLR* у місцях ушкодження чи запалення, що призводить до активації рецепторів. Крім того, ряд ендогенних лігандів, таких як білок теплового шоку 70 (*HSP-70*), додатковий домен фібронектину А і запальне мікрооточення, що утворюється при пошкодженні, можуть активувати *TLR* на поверхні МСК. [193]

Активації *TLR* різними зовнішніми та внутрішніми факторами призводить до системних та клітинних реакцій. Наприклад, активація *TLR* індукує молекули *MHC* класу II та ініціює Т-клітини.

Враховуючи, що *TLRs* здатні терміново активуватись на внутрішні та зовнішні фактори запалення, а їх стимуляція має інтенсивний вплив на здатність МСК до проліферації, диференціації, міграції, виживання та взаємодію між МСК та імунними клітинами. Тому, прекондиціонування МСК представляє перспективну ідею зробити ці гетерогенні клітинні препарати більш стабільними та забезпечує критичний аспект для відкриття нових терапевтичних можливостей у клітинній терапії. [194, 195]

Гіпоксія

Декілька досліджень показали, що прекондиціювання за допомогою гіпоксії істотно посилює регенеративний потенціал МСК. [195-200] Вплив на МСК зниженого парціального тиску кисню індукуює експресію генів, що беруть участь у міграції та хомінгу, головним чином регулюючи активність індукованого гіпоксією фактора 1α (*HIF-1 α*). [199] Було показано, що прекондиціювання за допомогою гіпоксії стимулює секрецію факторів росту, цитокінів та інших білків, а також сприяє вивільненню екзосом та міковезикул з МСК. [201] Також в декількох роботах було продемонстровано, що прекондиціювання за допомогою гіпоксії збільшує виживання та проліферацію клітин. [198, 199] Крім того, попередня гіпоксична індукція МСК викликає метаболічні зміни, які призводять до кращої виживаності клітин *in vivo* після їх трансплантації.

Перекис водню

Окислювальний стрес, який виникає у МСК внаслідок впливу агресивного мікрооточення (ішемії, гіпоксії, запалення) осередкований активними формами кисню (АФК), є важливою причиною апоптозу і гибелі алогенних МСК після їх введення. [202-204] Механічний сигнальний шлях фосфатидилінозитид-3-кінази (*PI3K*)/протеїнкіназа В (*Akt*) відіграє центральну регуляторну роль у виживанні, проліферації, міграції, ангіогенезі, виробленні цитокінів і диференціації. [205, 206] *SDF-1* може сприяти виживанню та міграції МСК за рахунок активації шляху *PI3K/Akt*. [207-209]

Декілька досліджень показали, що різні концентрації H_2O_2 по різному можуть впливати на біологічні функції МСК. Довгий час вважалось, що H_2O_2 - шкідлива молекула, оскільки високі концентації здатні провокувати старіння, окислювальний стрес та апоптоз. Але використання низьких доз H_2O_2 здатні захищати клітини від окисного пошкодження, стимулювати проліферацію та метаболізм клітин, а також сприяти кращому виживанню МСК. [210, 211] Фактично, використання низьких доз H_2O_2 діє як важливий клітинний месенджер, граючи роль, подібну до фактора росту, в регуляції фізіологічних процесів стовбурових клітин. [212, 213]

Прекондиціонування МСК за допомогою H_2O_2 здійснюється з метою покращення їх функціональних властивостей та захисту від пошкоджень. Перевагами такого прекодиціонування є: збільшення життєздатності МСК; захист від окислювального стресу, при застосуванні низьких доз H_2O_2 ; та стимуляція метаболізму.

Фармакологічні агенти

Різні препарати мають терапевтичні ефекти при різних захворюваннях і захищають органи від подальшої втрати функції, тим самим збільшуючи довгострокове виживання пацієнтів. Поточні дослідження зосереджені на вивченні основних механізмів дії препаратів на МСК для кращого виживання клітин та посилення експресії їх паракринних ефектів при застосуванні у регенеративній медицині.

Прекондиціонування МСК мелатоніном *ex vivo* покращує виживання після трансплантації, проангіогенну/мітогенну активність та терапевтичну ефективність МСК. Ці клітини, що стимулюють сигнальний шлях *ERK*, зменшують ризик інфаркту головного мозку та покращують нейроповедінку. [214, 215]

Прекондиціонування МСК вітаміном Е підвищує рівень експресії проліферативних маркерів та трансформуючого фактора росту-бета (*TGF-β*), одночасно знижуючи рівні експресії генів, пов'язаних з апоптозом, та стимулює вивільнення *VEGF* та лактатдегідрогенази (ЛДГ). [216]

Прекондиціонування вітаміном С призводить до покращення проліферації, диференціювання та виживання МСК після їх трансплантації, сприяє кращому терапевтичному потенціалу МСК та захищає клітини від оксидативного стресу. [217]

Ще одним із методів прекодиціонування МСК є ЛПС (ліпополісахариди). Toll-подібний рецептор 4 (*TLR4*) високо експресуються у МСК і регулює їх функції. [218] Прекондиціонування МСК за допомогою ЛПС, призводить до активації лігандів *TLR4*, які можуть активувати два різні сигнальні шляхи, які або залежать від *MyD88*, або є незалежними від *MyD88*/залежними від *TIR*-домена, що індукує адаптер-індукувальний інтерферон-β (*TRIF*), щоб ініціювати нижчі перетворювачі сигналу,

які потім виробляють безліч паракринних факторів. В роботі Yao Y та ін., повідомлялося, що попереднє кондиціювання ЛПС покращувало МСК-опосередкований кардіозахист на моделі гострого інфаркту міокарду у щурів. [219] У цьому дослідженні припускалось, що прекондиціювання МСК ЛПС покращувало кардіозахист за допомогою *MyD88*-залежного механізму. [220]

Але, вплив ЛПС на МСК не завжди позитивно впливає на терапевтичні властивості МСК. ЛПС здатні ослаблювати імунні функції та стимулювати запальний процес в організмі. [221, 222]

Ще в одній роботі на експериментальній моделі аутоімунного енцефаломієліту у мишей було показано, що попереднє культивування МСК з ЛПС протягом 1 год призводить до прозапального фенотипу МСК, після чого клітини втрачають здатність інгібувати проліферацію Т-клітин та свої терапевтичні властивості щодо лікування аутоімунного енцефаломієліту. Це свідчить про те, що МСК мають високу імунопластичність та під впливом прекондиціювання ЛПС здатні переходити як у протизапальні МСК, так і в прозапальні, ця дуже «тонка грань» є предметом стурбованості при застосуванні у клітинній терапії МСК та потребує подальших досліджень.[223]

Цитокіни та фактори росту

Прекодиціювання МСК здійснюється також за допомогою факторів росту, які можуть сприяти оптимальному розвитку та покращити їхню потенційну ефективність у клінічних дослідженнях та лікуванні.

Взаємодія між фактором росту та його рецепторами активує подальшу передачу сигналу для виживання та диференціювання МСК; таким чином, прекодиціювання цитокінами та факторами росту можуть впливати на тканину хазяїна паракринними/аутокринними шляхами.

Наприклад, прекодиціювання МСК гамма-інтерфероном (*IFN*)- γ пригнічує активацію природних кілерів (NK) та NK-опосередковану цитотоксичність частково за рахунок активації синтезу індоламін-2,3-діоксигенази (*IDO*) та простагландину *E2* [224]. З іншого боку, оптимальна комбінація факторів росту чи цитокінів для

спрямованого диференціювання МСК в бажану лінію залишається проблемою. Додаткове прекодиціювання МСК за допомогою *TNF- α* разом з *IFN- γ* *in vitro* збільшує вироблення *IDO* для генерації протизапальних макрофагів M2 та пригнічення проліферації моноклеарних клітин периферичної крові людини. [225]

Фізичне прекодиціювання

Фізичні фактори, як правило, шкідливі для активності МСК *in vitro*; однак, все більше досліджень довели, що вони можуть посилювати проліферативні та диференціальні властивості як *in vitro*, так і *in vivo*. Надзвичайно низькорівневі лазери стимулюють МСК для покращення швидкості проліферації за рахунок збільшення частки S-фази та посилення мітохондріального біогенезу завдяки підвищенню синтезу *ROS* та *NO* у МСК; більше того, міграційна здатність МСК покращується за рахунок активації сигнальних шляхів *ERK1/2* та *FAK* та підвищення рівнів експресії *HGF* та тромбоцитарного фактора росту (*PDGF*). [226]

Було продемонстровано, що при прекодиціюванні ультразвуком низької інтенсивності (LIUS) МСК, в клітинах сповільнюється процес апоптозу, збільшується рівень життєздатності, а також підвищувалась здатність до диференціації в хондрогенному напрямку. [227]

Отже, після того, як МСК були ізольовані з різних джерел та індуковані для проліферації *in vitro*, навколишнє середовище недостатнє для підтримки їх здатності до самооновлення та диференціювання. Фактично, МСК також втрачають частину своїх функцій після зміни мікросередовища з ізоляції та культивування *in vitro*, на мікросередовище, після введення *in vivo*. Крім того, на МСК, які були введені *in vivo* негативно впливають: механічне пошкодження та міграція у пошкоджені тканини або органи, де МСК стикаються з суворим запальним середовищем у поєднанні з «сигналами смерті». Отже, хоча культивовані МСК широко застосовуються в клітинній трансплантації, низьке виживання та висока швидкість апоптозу знижують їх терапевтичний ефект. Різні протоколи, включаючи прекодиціювання, генну модифікацію та різні методи спільного культивування, були протестовані та широко досліджені у вище представлених дослідженнях. Прекодиціювання може впливати

на біологічну активність МСК *in vitro* та *in vivo*, тим самим значно підвищуючи ефективність відновлення на різних моделях захворювань. Однак усе ще існує безліч перешкод визначення оптимальних методів прекодиціонування в терапії на основі МСК.

РОЗДІЛ 2.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

В роботі використовувались наступні реактиви виробників: розчин CCl_4 , L-аргінін (L-arg) (Sigma-Aldrich, USA), протеозний пептон (Bacto Proteose Peptone (enzymatic digest of animal tissue) France), поживне середовище α -MEM (Gibco, США), ембріональна сироватка теляти (ETC) (Sigma-Aldrich, США), пеніцилін (Sandoz, Австрія), стрептоміцин (Arterium, Україна), канаміцин (Arterium, Україна), глюкоза (АТ «Фармак», Україна), буферний розчин PBS: 0,14 М NaCl, 2.7 мМ KCl, 10 мМ Na_2HPO_4 , 1.8 мМ KH_2PO_4 (pH 7.4), трипсин (TrypLE™, Gibco, США), версен (Gibco, США), середовище LB : 10 г/л бактотриптон; 5 г/л дріжджового екстракту; 5г/л NaCl.

Моноклональні антитіла (Becton Dickinson Lakes, NJ) CD90 FITC, CD73 APC, CD105 PerCP – Cy5-5, CD45 FITC, CD34 APC. H_2O_2 (Фітофарм, Україна), за допомогою проточного цитометра FACS Aria (Becton Dickinson Lakes, NJ).

Барвники: Alcian blue (Sigma-Aldrich, США), Alizarin Red S (Sigma-Aldrich, США), Oil Red O (Sigma-Aldrich, США), гематоксилін Ерліха (Diapath, Італія), еозин (Diapath, Італія), Ван-Гізон (Diapath, Італія), Трипановий синій (Gibco, США), набір для забарвлення за Романовським-Гімзе (Volusol, США).

Альгінат натрію (Sigma, США), CaCl_2 (Arterium, Україна), розчин полі-L-орнітину (Sigma, США), H_2O_2 (Біола, Україна), агароза (Bioron, Німеччина).

Набори: NucleoSpin RNA Kit (Macherey-Nagel, Німеччина), RevertAid H Minus First Strand (Thermo Scientific, США), StemPro® (Gibco, США), NucleoSpin RNA Midi (Macherey-Nagel, Німеччина), RevertAid Premium First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher, США), за Караваєвим (Філісіт Діагностикс, Україна),

Глюкометр One Touch Select (США).

2.1. Відтворення різних моделей захворювань у лабораторних тварин

Усі досліді проводили на тваринах відповідно до Постанови Президії Методичних рекомендацій з біоетичної експертизи наукових досліджень, проведених на тваринах (Національний комітет з біоетики при Президії НАН України, 2006 р.). Дослідження схвалені Інститутом молекулярної біології і генетики НАН України, що вони не суперечать біоетичним питанням. Тварини утримувались в стандартних умовах.

2.1.1. Індукція моделі цирозу печінки у щурів. Досліді проводили на самцях щурів лінії Вістар віком 2-3 місяці. Під час експерименту щурів було поділено на дві групи: негативний контроль (n=15) та експериментальну групу (n=30). Пошкодження печінки було викликано інтраперитоніальними ін'єкціями розчину CCl_4 в оливковій олії (1:1) двічі на тиждень, як описано в таблиці 2.1 Щурів зважували перед кожною ін'єкцією для розрахунку необхідної дози CCl_4 . Контрольним тваринам внутрішньовенно вводили суміш фізіологічного розчину з оливковою олією (1:1).

Таблиця 2.1

Схема індукції CCl_4 при ураженні печінки щурів

Групи тварин	2 тижні введення CCl_4	3-4-й тиждень введення CCl_4	5-13-й тиждень введення CCl_4
Негативний контроль (норма) (n=15)	0,1 мл суміші (оливкова олія з NaCl)/100г ваги тіла щура	0,075 мл суміші (оливкова олія з NaCl)/100г ваги тіла щура	0,05 мл мл суміші (оливкова олія з NaCl)/100г ваги тіла щура
Експериментальна група (цироз) (n=30)	0,1 мл суміші (оливкова олія з CCl_4)/100г ваги тіла щура	0,075 мл суміші (оливкова олія з CCl_4)/100г ваги тіла щура	0,05 мл суміші (оливкова олія з CCl_4)/100г ваги тіла щура

2.1.2. Моделювання гострого панкреатиту на щурах. Це дослідження проводилось на статевозрілих щурах-самцях лінії Wistar віком 3 міс. та масою 200-250 г. На початку експерименту тварини рандомно були поділені на дві групи:

негативний контроль ($n = 3$) та експериментальна група ($n = 42$). Індукцію гострого панкреатиту у тварин здійснювали через інтраперитоніальне введення L-аргініну (L-arg) у дозі 3,5 г кг ваги тіла щура з інтервалом в 1 год, паралельно по тій же схемі групі негативного контролю вводили фізіологічний розчин. Вже через 3 доби після введення L-arg у експериментальній групі діагностували гострий панкреатит. Під час розвитку цього захворювання на 2-гу та 3-тю добу після L-arg загинуло близько 17% усіх тварин, які приймали участь в експерименті.

2.1.3. Індукція моделі нестерильного гострого перитоніту у мишей.

Дослідження проводили на статевозрілих мишах BALB/c (2-3 міс). Тварини були поділені на дві групи: одній групі мишей нестерильний гострий перитоніт викликали інтраперитоніальним введенням 1 мл 3% розчину протеозного пептону, паралельно іншій групі тварин вводили 1 мл фізіологічного розчину.

2.2 Виділення та культивування МСК пуповини людини

МСК були виділені з пуповини новонароджених, отриманих за інформованою згодою матері після природних пологів у міському пологовому будинку № 5 м. Києва, Україна. Виділення первинної культури клітин проводили експлантаційним методом після видалення кровоносних судин пуповини. [228] МСК пуповини культивували в середовищі α -MEM, яке містило 10 % фетальної сироватки теляти, 200 ОД/мл пеніциліну та 200 мкг/мл стрептоміцину.

Після другого пасажу МСК пуповини людини оцінювали за експресією поверхневих маркерів і здатність до диференціювання. Адипогенний, остеогенний і хондрогенний потенціал диференціації МСК пуповини людини перевіряли за допомогою набору для диференціації StemPro® (рис. 2.1 б-г). Під час експерименту для підтвердження хондрогенної диференціації використовували 1% барвник Alcian blue у 3% розчині крижаної оцтової кислоти. Для підтвердження остеогенної диференціації клітини аналізували шляхом фарбування Alizarin Red S, а для підтвердження адипогенної диференціації клітини фарбували Oil Red O (Sigma-

Aldrich). Поверхневі маркери МСК пуповини людини оцінювали за допомогою проточного цитометра FACS Aria (Becton Dickinson Lakes, NJ) з використанням моноклональних антитіл *CD90 FITC*, *CD73 APC*, *CD105 PerCP – Cy5-5*, *CD45 FITC*, *CD34 APC* (рис. 2.1 д)

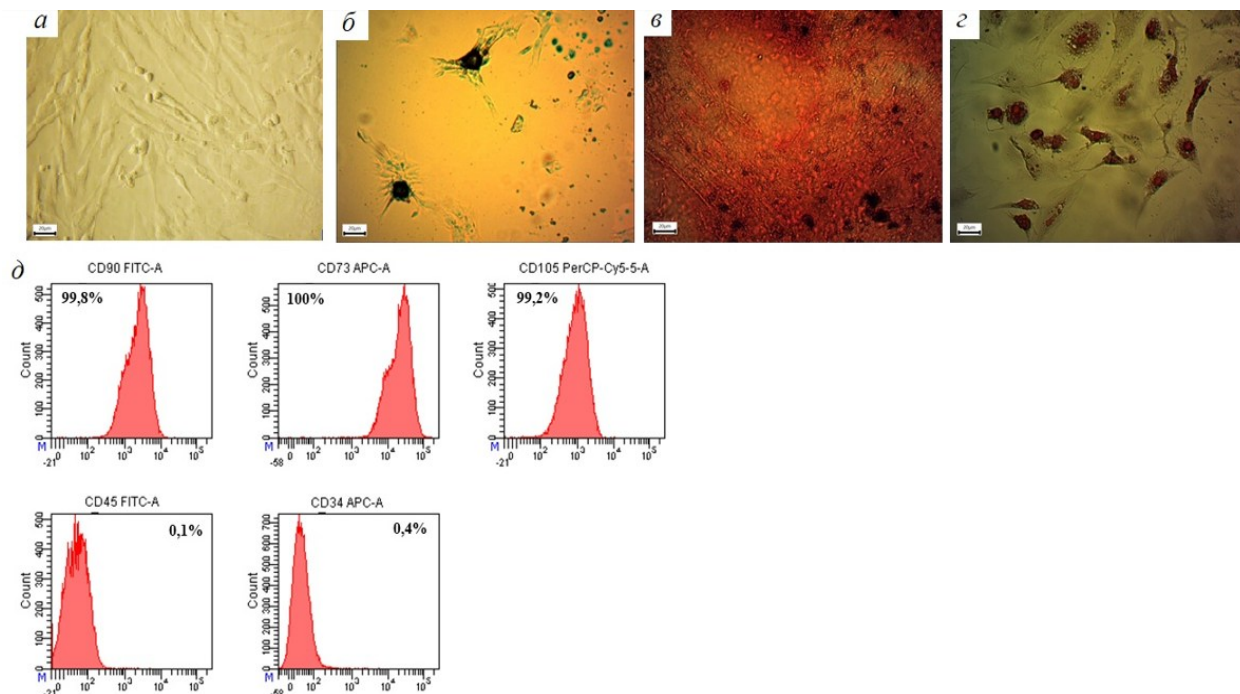


Рис. 2.1. Характеристика ізолюваних МСК пуповини людини: а) – первинна культура МСК, виділених із пуповини людини; б) - хондрогенна диференціація, що виявляється за допомогою барвника Alcian blue (блакитне фарбування екстрацелюлярного матриксу); в) – остеогенна диференціація, виявлена барвником Alizarin Red S (забарвлення позаклітинного матриксу в червоний колір); г) - адипогенна диференціація, виявлена за допомогою барвника Oil Red O (червоне фарбування ліпідних вакуолей); Масштабна шкала – 20 мкм. д) – гістограми експресії поверхневих маркерів *CD90 FITC*, *CD73 APC*, *CD105 PerCP – Cy5-5*, *CD45 FITC*, *CD34 APC* МСК пуповини людини за даними проточної цитометрії

Також МСК пуповини попередньо кондиціонували H_2O_2 (Віола, Україна) у дозі 30 мкМ, культивували при 37 °С, 5% CO_2 протягом 18 годин перед трипсинізацією клітин.

2.2.1. Інкапсуляція МСК пуповини людини. МСК другого пасажу трипсинізували, збирали клітинний осад за допомогою центрифугування та тричі промивали PBS. МСК ресуспендували у 150 мкл фізіологічного розчину та інкапсуляцію проводили шляхом змішування МСК з 1,7% альгінатом натрію (Sigma, США) у фізіологічному розчині (10^7 клітин/мл). Використовуючи 29-G шприц, клітинну суспензію додавали по краплях до 10^2 мМ розчину CaCl_2 . [229] Капсули інкубували протягом 30 хв, тричі промивали PBS, занурювали в 0,1% розчин полі-L-орнітину, перемішували протягом 30 хв і ще три рази промивали PBS (рис. 2.2).

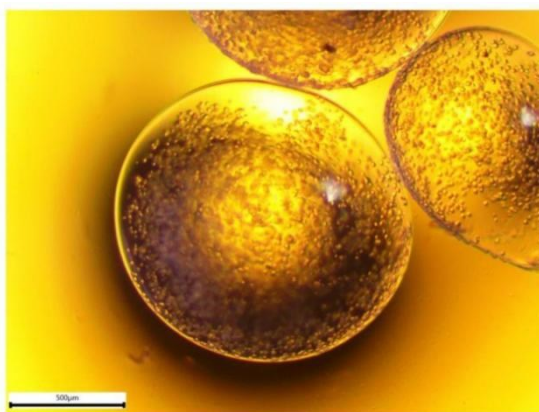


Рис.2.2. Інкапсульовані МСК в альгінатні капсули. Масштаб 500 мкм

2.3. Схема введення МСК пуповини людини при різних моделях захворювань

2.3.1. Трансплантація МСК пуповини людини при розвитку цирозу печінки у щурів. При виявленні ознак цирозу введення CCl_4 щурам припинили. Через 3 дні після припинення введення CCl_4 МСК пуповини людини трансплантували тваринам з цироз печінки (0 точка). МСК пуповини людини (6×10^6 клітин/кг ваги тіла) вводили в хвостову вену в 150 мкл фізіологічного розчину (2-а група). Інкапсульовані МСК в альгінатні капсули, у відповідній кількості вводили інтраперитоніально (4-та група). Тваринам позитивної контрольної групи вводили 150 мкл фізіологічного розчину та

«порожні» альгінатні капсули. Оцінювали вплив МСК пуповини людини на розвинений цироз печінки у щурів через 3, 8 та 13 тижнів після їх трансплантації.

2.3.2. Трансплантація МСК пуповини людини при гострому панкреатиті у щурів. Через 3 доби після введення L-арг тваринам з ознаками гострого панкреатиту трансплантували МСК другого пасажу (0 точка). МСК пуповини людини в дозі ($1,5 \times 10^6$ клітин/кг) вводили інтраперитоніально в 500 мкл фізіологічного розчину (група 3), а МСК, прекондиціоновані H_2O_2 , вводили інтраперитоніально в тих самих дозах, що й вихідні МСК (група 4). Тваринам позитивного контролю вводили 500 мкл фізіологічного розчину (група 2). Оцінювали вплив МСК пуповини людини на розвинений гострий панкреатит у щурів через 3, 7 та 14 днів після їх трансплантації.

2.3.3. Трансплантація МСК пуповини людини при гострому нестерильному перитоніті у мишей. Через 24 год після інтраперитоніального введення протеозного пептону спостерігався гострий перитоніт у мишей. Далі тваринам інтраперитоніально трансплантували МСК пуповини людини у дозі від 5×10^3 клітин/мишу до 100×10^3 клітин/мишу. Оцінювали вплив МСК пуповини людини на розвинений гострий перитоніт у мишей в динаміці через 20 хв., 1 год, 4 год., 24 год., 27 год та 48 год після їхнього введення за допомогою вимиванням 5 мл холодного середовища альфа-МЕМ усіх клітин в тому числі перитоніальних макрофагів з ексудату черевної порожнини миші.

2.4 Методи досліджень

2.4.1 Підготовка препаратів для гістологічних досліджень. Гістологічне дослідження проводилось після виведення тварин з експериментів за допомогою гільйотинової декапітації з подальшим видаленням печінки та підшлункової залози. Далі фрагменти органів по протоколу [230] фіксувались у 10% формаліні, зневоднювались у етанолі зростаючої концентрації (від 70° до 96°) та діоксані.

Отримані зразки просочувалися парафіном. Парафінові зрізи завтовшки 5-6 мкм виготовлялися на санному мікротомі (МС-2, Україна). Забарвлення отриманих зрізів здійснювалися оглядовими барвниками: гематоксиліном Ерліха (Diapath, Італія) та еозином (Diapath, Італія). Для візуалізації елементів сполучної тканини застосовували методи двокольорового забарвлення за Ван-Гізоном (Diapath, Італія).

2.4.2. Виділення сумарної РНК з тканин експериментальних тварин.

Перитоніальний ексудат центрифугували, і клітини двічі промивали PBS. Сумарну РНК виділяли за допомогою набору NucleoSpin RNA Kit (Macherey-Nagel, Німеччина). Для синтезу кДНК брали 200 нг РНК, яку використовували як матрицю для зворотної транскрипції (ЗТ) за допомогою набору кДНК RevertAid H Minus First Strand (Thermo Scientific, США). Сумарну РНК з тканин виділяли після гомогенізування тканини за допомогою рідкого азоту та протеолітичного розщеплення тканини за допомогою буферу RA1 та β -меркаптоетанолу. з використанням набору NucleoSpin RNA Midi (Macherey-Nagel, Німеччина). Далі проводили фільтрацію лізату через NucleoSpin Filter (Macherey-Nagel, Німеччина) та зв'язування РНК. Наступним етапом було знесолення мембрани за допомогою буферу MDB (Macherey-Nagel, Німеччина), що є ефективним для проведення наступної процедури - гідролізату ДНК, з промиванням та висушуванням мембрани. Промивання здійснювалося у три етапи з додаванням буферів RAW2, RAW3 (Macherey-Nagel, Німеччина) та кінцевим висушуванням за допомогою центрифугування. Елюювання РНК відбувалось за рахунок додавання RNase-free H₂O.

2.4.3. Полімеразна ланцюгова реакції зі зворотною транскрипцією. Після виділення РНК за допомогою реакції зворотної транскрипції (з використанням набору RevertAid Premium First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher, США) з оліго dT - праймерами були отримані ПЛР продукти.

ПЛР проводили згідно стандартної методики [231] з використанням праймерів (таблиця 2.2) до ДНК генів *EGF* (*Epidermal Growth Factor*), *α -SMA* (*Alpha Smooth*

Muscle Actin), *Enos* (*Endothelial Nitric Oxide Synthase*), *IL-10* (*Interleukin-10*) та *GFAP* (*Glial fibrillary acidic protein*). Для референт-гену *GAPDH* (*Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) були використані праймери, що входять у склад набору для зворотно-транскриптазної реакції.

Таблиця 2.2.

Список праймерів, які використовувались у експериментах

Назва гену	Послідовність праймеру
<i>α-SMA</i>	Forward 5'- GCCGAGATCTCACCGACTAC - 3' Reverse 5'- AGGCGCTGATCCACAAAACA - 3'
<i>EGF</i>	Forward 5'- TCTACCTCACCTCTCTCCT - 3' Reverse 5'- CTTCTTCTCAGCCCACACAG - 3'
<i>Enos</i>	Forward 5'- AGACCCGGTGCCCTGCTTCA - 3' Reverse 5'- TGCACGGTTT GCAGGACGCT - 3'
<i>GFAP</i>	Forward 5'- CGTGTTCTACCCCCAATGT - 3' Reverse 5'- TGGTATTTCGAGAGAAGGGAGGG - 3'
<i>IL-10</i>	Forward 5'-GCCGGGAAGACAATAACTGC-3', Reverse 5'-TCAGCTTCTCACCCAGGGAA-3'
<i>GAPDH</i>	Forward 5'- CACCACAGTCCATGCCATCA - 3' Reverse 5'- GATGGGGACTCCTCAGCAAC - 3'

ПЛР проводили у ампліфікаторі “Терцик” (виробник ДНК-технології, Росія) за наступою схемою:

95⁰ -5 хв. – 1 цикл,

94⁰ – 40 сек. - 58 -40 циклів,

72⁰ – 40 сек. -30 циклів,

60⁰ - 5 хв. -1 цикл.

Далі, ідентифікацію ПЛР продуктів здійснювали шляхом електрофорезу в 1% гелі агарози (Bioron, Німеччина).

2.4.4 Морфологічні та морфометричні дослідження. Для морфологічних та морфометричних досліджень були відібрані шматочки підшлункової залози, печінки від усіх груп щурів, які приймали участь в дослідженнях. Цифрові зображення мікропрепаратів здійснювали за допомогою цифрової камери «Sigeta MCmos 5100» (КНР) та фотографували на мікроскопі «Nicon Eclipse E 100» (Японія). [232] Далі за допомогою програмного забезпечення IMAGE J (National Institutes of Health, США) проводили морфометрію деяких параметрів підшлункової залози та печінки: зони накопичення позаклітинного матриксу (ЕКМ) у 10 полях зору, висота ациноцитів та гепатоцитів, площа ациноцитів та гепатоцитів та їх ядер, ядерно-цитоплазматичне співвідношення (ЯЦС), кількість без'ядерних клітин (Б'Я). Для визначення цих показників аналізували 50 клітин при 40-кратному збільшенні.

2.4.5. Біохімічні дослідження крові щурів. У всіх піддослідних щурів експерименту з модельованим гострим панкреатитом після 10-годинної депривації їжі брали зразки крові з хвостової вени для вимірювання глікемії. Концентрацію глюкози визначали тест-смужками One Touch Select-50 за допомогою глюкометра One Touch Select (США). Для кількісного визначення активності альфа-амілази в біологічних рідинах за Каравеєм використовували набір реактивів (Філісіт Діагностикс, Україна).

2.4.6. Гістохімічне дослідження. Для визначення вмісту інсуліну в бета-клітинах острівців Лангерганса використовували гістохімічний метод PAS-реакції: хімічна основа методу базується на реакції альдегіду фуксину з інсуліном після попереднього окислення 0,5% розчином йодної кислоти, інсулін окислюється через дисульфідні зв'язки до групи сульфанової кислоти, яка діє як знебарвлений реагент Шиффа. Крім того, після додавання альдегід фуксину знебарвлений реагент Шиффа змінює колір на бузковий, забарвлюючи інсулін у гранулах бетта-клітин, таким чином ідентифікуючи вміст інсуліну в острівцях Лангерганса. [233]

2.4.7. Оцінка життєздатності макрофагів. В експерименті з моделюванням гострого перитоніту у мишей, ексудат разом з клітинами вимивали з черевної порожнини миші. Життєздатність клітин та загальну їх кількість оцінювали шляхом прямого підрахунку у камері Горяєва [234] з використанням 0,4%-го Трипанового синього (Gibco, США) для виявлення мертвих клітин (клітин в апоптозі).

В якості морфологічної характеристики макрофагів для їхньої ідентифікації використовували розмір клітин, їх ядер та ядерно-цитоплазматичне співвідношення.

2.4.8. Вирощення *E. Coli* та її інактивація. Бактеріальну культуру *E. coli* BL21(DE3) / pET24 вирощували на поживному середовищі LB, із канаміцином (Arterium, Україна) та глюкозою (АТ «Фармак», Україна) у кінцевій концентрації 50 мкг/мл і 0.5%, відповідно, при температурі 37°C протягом 16-18 годин в умовах інтенсивної аерації (160 об/хв.) до досягнення нею оптичної густини $A_{600}=1-1.5$. Далі інактивацію *E. coli* проводили при температурі 56°C протягом 2 годин.

2.4.9. Визначення фагоцитарної активності перитоніальних макрофагів. Перитоніальні макрофаги культивували у чашках Петрі на покривних скельцях для адгезії протягом 2 год., що дозволяє відокремити їх від інших типів клітин, виділених з черевного ексудату миші у поживному середовищі Альфа-МЕМ з додаванням фетальної телячої сироватки. Далі до прикріплених перитоніальних макрофагів та моноцитів додавали інактивовану *E. coli* та культивували ще протягом 2 год. Макрофаги та моноцити ідентифікували після забарвлення за Романовським -Гімзе (Volusol, США) (рахували у 20 світлових полях мікроскопу).

Оцінку фагоцитарної активності макрофагів здійснювали шляхом підрахунку інтерналізованих та адгезованих клітин *E. coli* у 100 фагоцитуючих клітинах.

Фагоцитарний індекс розраховували за наступною формулою:

Фагоцитарний індекс = $\frac{\text{кількість поглинених клітин та адгезованих } E. Coli}{\text{кількість макрофагів}} \times 100$. [235]

2.4.10. Статистична обробка даних. Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism версії 8.0.1. ((«GraphPad Software», США) та MS Excel («Microsoft»). Статистичний аналіз нормально розподілених двох груп проводили за допомогою t-критерію Стьюдента. Порівняння за участю трьох та більше груп з нормально розподіленими виборками проводили за допомогою ANOVA з наступною оцінкою одностороннього дисперсійного аналізу та за допомогою критерію Тьюкі. Результати представлені у вигляді середнього значення показника $\pm$ середньостатистичне відхилення. Для тестів $p < 0,05$ та $p < 0,01$ вважалося значущим.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Вивчення терапевтичного потенціалу вихідних МСК пуповини людини та інкапсульованих в альгінатні капсули на моделі цирозу печінки у щурів

3.1.1 Розвиток ураження печінки щурів, індукованого введенням CCl_4 .

Під час проведення гістологічного аналізу було встановлено, що зрізи печінки щурів негативного контролю відповідали нормі, спостерігалась типова паренхіма, з рівномірно розташованими гепатоцитами в основному кубічної форми (рис 3.1. *а, з*). Мікроскопічно, печінка інтактних тварин представлена анастомозуючими трабекулами гепатоцитів та синусоїдними капілярами, що сходяться до центральної печінкової вени, як показано на рис. 3.2. *а*.

Строма присутня в печінці у мінімальних кількостях, лише утворюючи капсулу органу та локалізуючись всередині простору Діссе, який представлений вузьким просвітом між стінками синусоїдних капілярів та гепатоцитами у печінковій частці. Таким чином, невелика кількість сполучнотканинних тяжів сприяє збереженню фенестр ендотеліальних клітин в паренхімі органу (рис. 3.1. *а*).

У результаті гістологічного дослідження встановлено, що при тривалому застосуванні CCl_4 (6 та 13 тижнів) відбувається поступове порушення цитоархітектоніки печінки, послідовно виникають запальні, склеротичні та дегенеративні зміни, що призводять до розвитку фіброзу та цирозу печінки щурів.

Після 6-ти тижневої індукції CCl_4 щурам, паренхіма печінки стала пухкою за своєю консистенцією, гепатоцити набули неправильної форми, без чітко розмежованих країв, більша частина яких була деформована. Через 6 тижнів ЯЦС (ядерно-цитоплазматичне співвідношення) зменшилось на 19% порівнюючи з негативним контролем, а через 13 тижнів на 58 % порівнюючи з групою інтактних тварин. Отже, такі результати свідчать про пригнічення функціональної активності клітин, припинення синтетичних процесів та наявність катаболізму.

Відомо, що стінку печінкових синусоїдів утворюють ендотеліальні клітини, які в цитоплазмі мають дрібні пори - фенестри. Ці «печінкові сита» активно видаляють із кровообігу макромолекули й дрібні частинки. Основною функцією ендотеліальних і зірчастих клітин синусоїдів є місцевий контроль синусоїдального тонуусу й регуляція обмінних процесів. Взаємодія між ендотеліальними клітинами та гепатоцитами дає змогу регулювати внутрішньопечінковий кровотік. У фізіологічних умовах оновлення клітинного складу сполучної тканини печінки здійснюється за рахунок гематогенних елементів. У разі запалення виникає цілеспрямована їх міграція в сполучну тканину печінки. Регуляція цього процесу відбувається шляхом хемотаксису [236]. Тому, через 13 тижнів після індукції CCl_4 щурам на зрізах печінки спостерігалась локальна запальна гематогенна інфільтрація (Рис.3.1. е).

Одним із основних параметрів діагностування цирозу печінки є накопичення колагену в паренхімі печінки. Під час фіброгенезу відбувається пошкодження ендотеліальних клітин синусоїдів органу та активація стелатних клітин, що в результаті призводить до заповнення простору Діссе колагеновими волокнами, цей процес називається капіляризацією синусоїдів.

При гістологічному дослідженні печінки протягом 13 тижнів при системному введенні CCl_4 було встановлено, що у негативному контролі параметр накопичення колагену в печінці щурів складав $0,06 \pm 0,007$ (таблиця 3.1). У щурів експериментальної групи, що зазнавали інтоксикації CCl_4 , на ранніх стадіях розвитку фіброзу (6-му тижні) спостерігалось збільшення екстрацелюлярного матриксу (ЕЦМ) у паренхімі печінки тварин у 4 рази ($0,24 \pm 0,02$) порівнюючи з групою інтактних тварин. Подальше введення CCl_4 призвело до того, що на 13-му тижні показник виріс у 6,5 разів ($0,39 \pm 0,02$) порівнюючи з негативним контролем та спостерігались явні гістологічні ознаки цирозу печінки щурів, основним проявом якого було повне розділення паренхіми печінки на ділянки, що оточені фіброзними септами і розділені одна від одної регенеративними циротичними вузликами, або псевдогландулярними структурами, як показано на рис. 3.1. в та рис. 3.2. б.

Слід також зазначити, що клітини інфільтрату разом з множинними фібробластами поширювалися за межі простору синусоїдних капілярів руйнуючи

гепатоцити, тим самим призводячи до змін метаболічних процесів, окислювального стресу всередині гепатоцитів, до порушень будови та функцій гепатоцитів і як наслідок це призвело до некрозу паренхіми печінки. (Рис. 3.1. *е*)

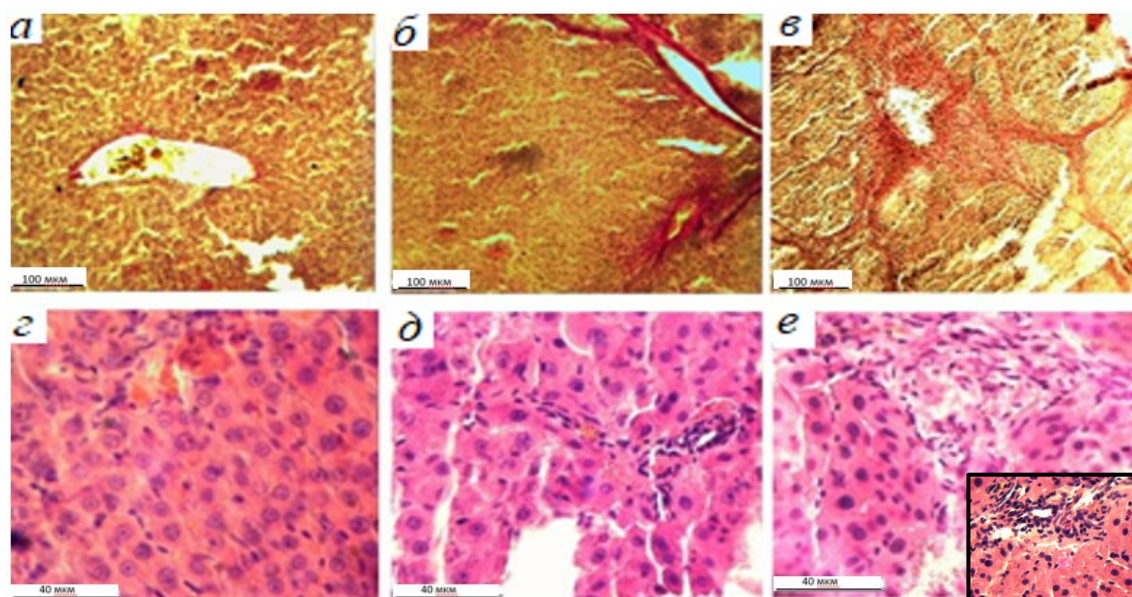


Рис. 3.1. Гістологічний аналіз зрізів тканини печінки після індукції CCl_4 фіброзу/цирозу печінки у щурів. Забарвлення за Ван Гізоном і гематоксиліном з еозином зрізів печінки щурів: *а*), *г*) – негативний контроль (внутрішньовенне введення суміші (фізіологічний розчин : оливкова олія)); *б*), *д*) - зрізи печінки щурів, яким інтраперитоніально вводили CCl_4 протягом 8 тижнів; *в*), *е*) - зрізи печінки щурів, яким внутрішньочеревно вводили CCl_4 протягом 13 тижнів. Масштабна шкала: *а* - *в* - 100 мкм, *г* - *е* - 40 мкм

Також на зрізах майже неможливо виявити печінкові балки як показано на рис. 3.2. *а* або розпізнати межі печінкових часточок через інтенсивне розростання фіброзної тканини різної товщини та протяжності. Тому, надмірна кількість ЕЦМ призводить до порушення жовчних проток, звуження просвіту центральних та портальних судин. Як наслідок відбувається посилення гіпоксії паренхіматозної тканини, спостерігаються атрофічні, склеротичні зміни в печінці та функціональне порушення гепатоцитів. На рис. 3.2. *б* видно, що за рахунок розростання ЕЦМ спостерігається зближення компонентів тріади печінки: жовчного протоку, центральної вени та печінкової артерії.

Таблиця 3.1

Морфометричні параметри печінки щурів після індукції CCl₄

<u>Морфометричні</u> параметри	Негативний контроль (n=15)	Експериментальна група (n=30)	
		Фіброз, 8 тижнів	Цироз, 13 тижнів
Накопичення колагену	0,06±0,007	0,24±0,02*	0,39±0,02 [#]
Площа гепатоцитів, мкм ²	155±4,65	123,2±6,01*	108±6,5 [#]
Площа <u>ядер</u> гепатоцитів, мкм ²	44,7±5,5	31,3±7,7*	23,1±6,5 [#]
(ЯЦС)	0,43±0,009	0,35±0,009*	0,25±0,009 [#]
<u>Двоядерні</u> гепатоцити	8,2±0,64	-	2±0,72 [#]
Без'ядерні гепатоцити	0,57±0,29	-	5,4±0,64 [#]

Примітки: *p<0,05 – негативний контроль проти фіброзу, [#]p<0,05 – негативний контроль проти цирозу печінки. Значення Р розраховували за допомогою дисперсійного аналізу за допомогою тесту Тьюкі.

Крім того, зустрічались окремі гепатоцити, ядра яких перебували у стані лізису. На зрізах помітний початковий слабо виражений аутоліз, який характеризується розпадом ядер, про що свідчить надмірна кількість без'ядерних клітин. Доказом цього є відповідно збільшення кількості без'ядерних клітин (БЯ) через 13 тижнів після індукції CCl₄, майже в 10 разів порівнюючи з негативним контролем; аналогічно, що кількість двоядерних гепатоцитів (ДЯ) зменшилась у 4 рази порівняно з групою негативного контролю (рис. 3.1.e).

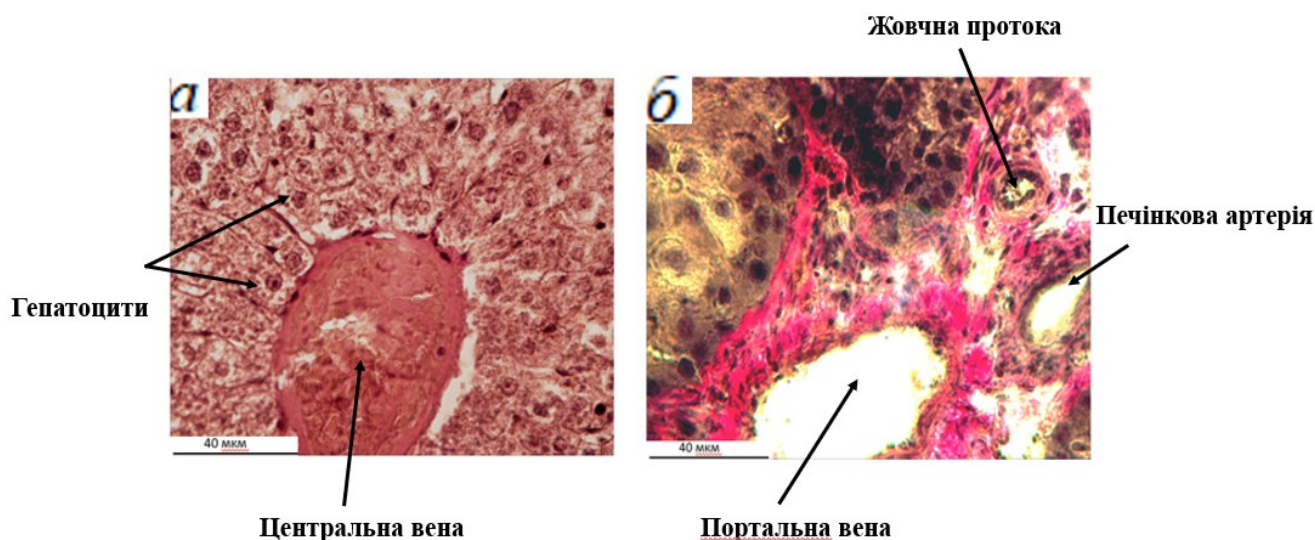


Рис. 3.2. Гістологічний аналіз зрізів паренхіми печінки щурів через 13 тижнів після індукції CCl_4 . Забарвлення за Ван Гізоном зрізів печінки щурів: *а*) – зрізи печінки щурів негативного контролю (внутрішньовенне введення суміші (фізіологічний розчин : оливкова олія)); *б*) – зрізи печінки щурів експериментальної групи, яким внутрішньочеревно вводили CCl_4 протягом 13 тижнів. Масштабна шкала: *а* - *б*- 40 мкм.

Підтвердженням розвитку інтенсивного фіброзу печінки стало вивчення експресії деяких генів, які є показником стану печінки. Дослідження експресії гена *EGF* (епідермального фактора росту), який, як відомо, майже не експресується у здоровій печінці та починає експресуватися з розвитком фіброзу та інтенсивно експресується у печінці з цирозом[236], показало різке підвищення рівня експресії РНК (рис. 3.3 *а*).

Експресія гена $\alpha\text{-SMA}$ (альфа-актин гладких м'язів) є надійним маркером активації зірчастих клітин печінки при розвитку фіброзу. Це супроводжується збільшенням кількості міофібробластів [237, 238] та підвищенням рівня експресії цього гена (рис. 3.3 *б*).

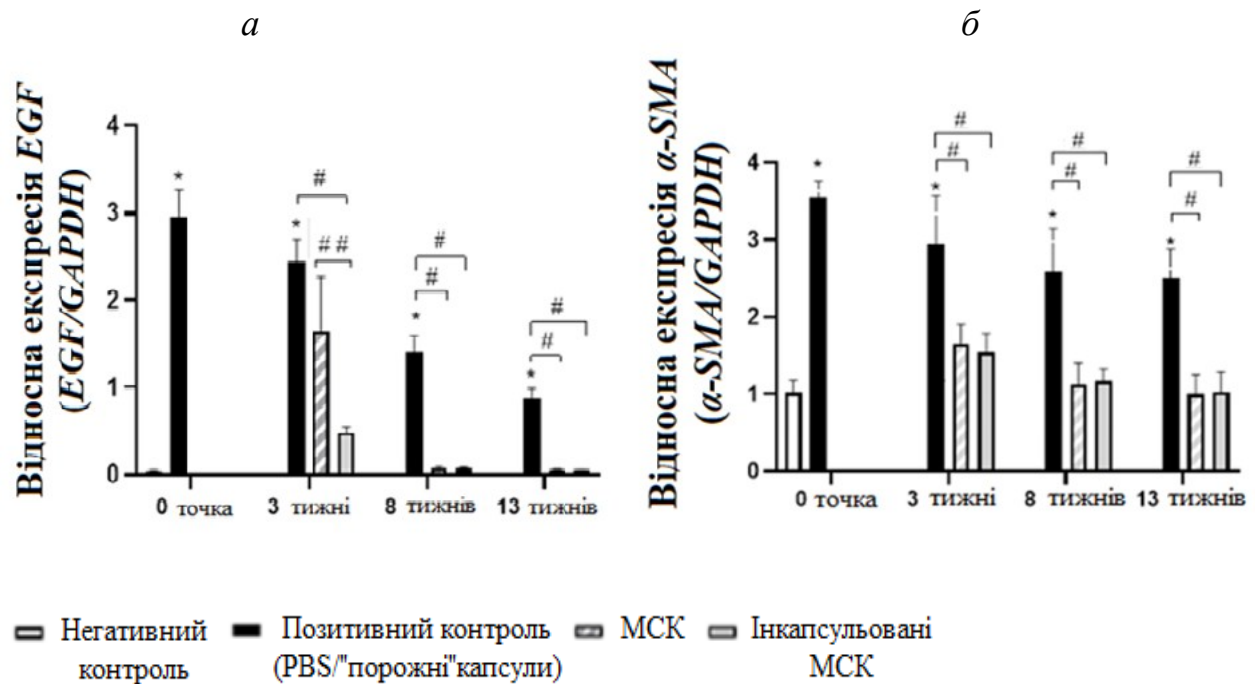


Рис. 3.3 Експресія генів (а) *EGF* і (б) *α-SMA*: 0 точка - 13 тижнів після інтраперитоніального введення CCl_4 щурам; 3, 8 та 13 тижні – після внутрішньовенного введення вихідних МСК та інтраперитоніального введення інкапсульованих МСК щурам із цирозом печінки. Результати виражені як $\text{mean} \pm \text{SEM}$. Значення Р розраховували за допомогою дисперсійного аналізу за допомогою тесту Тьюкі: * $p < 0,01$ – негативний контроль в порівнянні з позитивним контролем, # $p < 0,01$ – позитивний контроль в порівнянні з введенними внутрішньовенно вихідними та з введенними інтраперитоніально інкапсульованими МСК, ## $p < 0,01$ – введенні вихідні МСК в порівнянні з введенними інкапсульованими МСК

Експресія *GFAP* (гліального фібрилярного кислого білка), який, як відомо, пов'язаний з ранніми маркерами активації зірчастих клітин [239, 240], зросла в 2,5 рази (рис. 3.4 а). Експресія гена *eNOS* (ендотеліальна синтаза оксиду азоту) значно знизилась у CCl_4 -індукованій моделі пошкодження печінки у щурів в порівнянні з негативним контролем (рис. 3.4 б). [241].

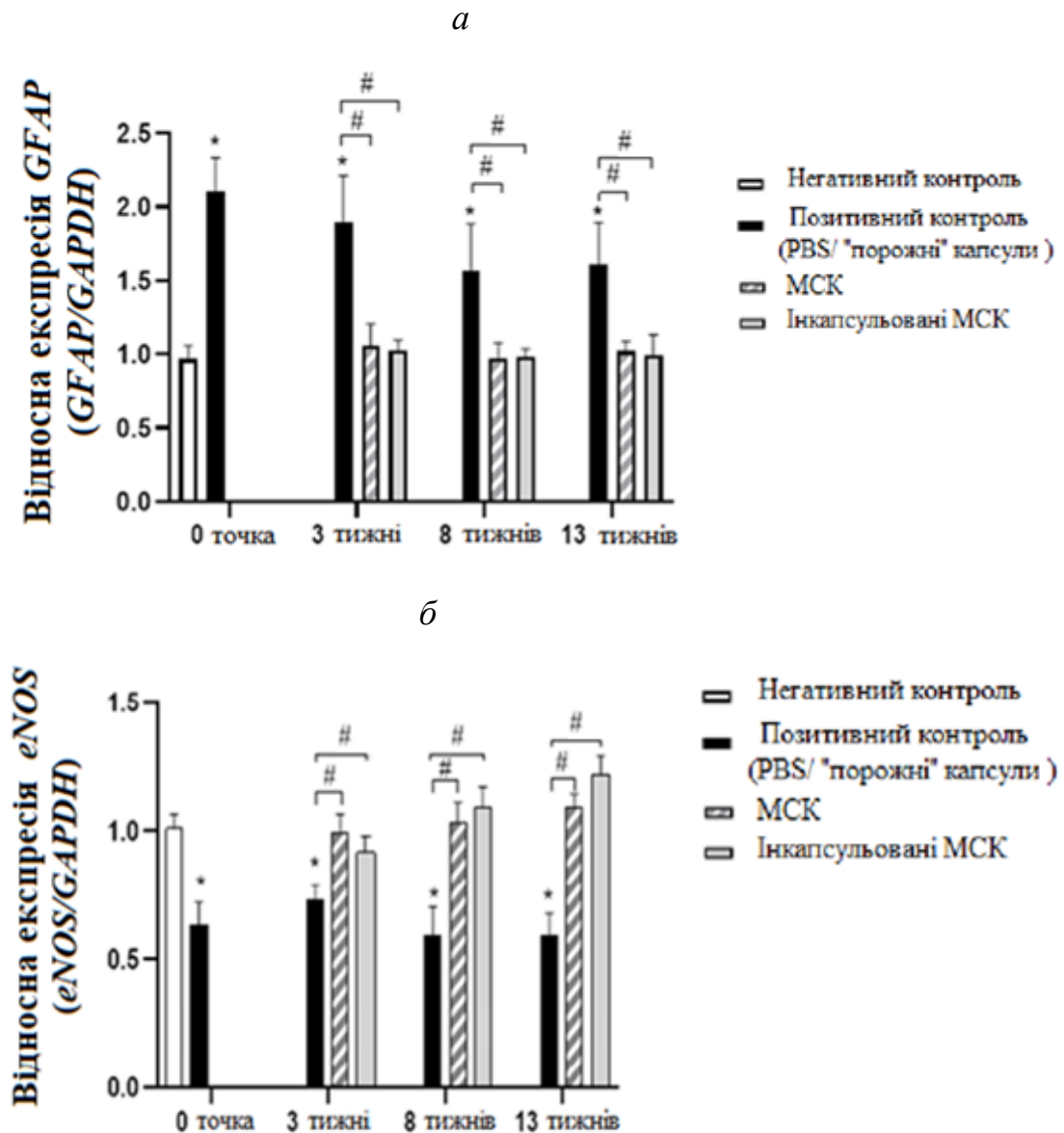


Рис. 3.4. Експресія генів (а) *GFAP* і (б) *eNOS*: 0 точка - 13 тижнів після інтраперитоніального введення CCl_4 щурам; 3, 8 та 13 тижнів – після внутрішньовенного введення вихідних МСК та інтраперитоніального введення інкапсульованих МСК щурам із цирозом печінки. Результати виражені як $\text{mean} \pm \text{SEM}$. * $p < 0,01$ – негативний контроль в порівнянні з позитивним контролем, # $p < 0,01$ – позитивний контроль в порівнянні з введеними внутрішньовенно МСК та інтраперитоніально інкапсульованими МСК

3.1.2 Вплив трансплантації вихідних МСК пуповини людини та інкапсульованих в альгінатні капсули на ураження печінки.

3.1.2.1. Ефект трансплантації МСК на стан паренхіми печінки щурів. Після 13 тижнів ін'єкцій CCl_4 , коли з'явилися ознаки цирозу, введення CCl_4 припиняли, а аналіз змін у структурі паренхіми печінки та експресії вибраних генів проводили через 3, 8 та 13 тижнів після трансплантації МСК пуповини людини. Результати дослідження накопичення колагену в печінці щурів, свідчать про те, що трансплантація МСК призводить до поступового зменшення площі, яку займає колаген у тканині печінки, що підтверджує процеси регенерації органу (рис. 3.5).

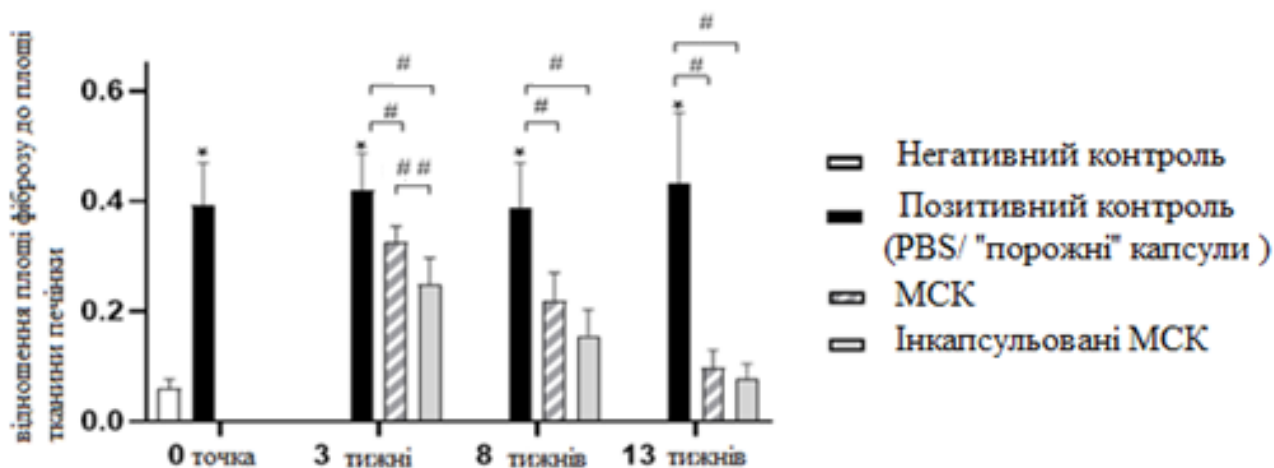


Рис. 3.5. Вплив трансплантації МСК на накопичення колагену в тканині печінки щурів: 0 точка - 13 тижнів після інтраперитоніального введення CCl_4 щурам; 3, 8 і 13 тижнів - після внутрішньовенного введення вихідних МСК та інтраперитоніального введення інкапсульованих МСК щурам із цирозом печінки. Результати виражені як $\text{mean} \pm \text{SEM}$. Значення P розраховували методом дисперсійного аналізу з використанням критерію Тьюкі. * $p < 0,05$ – негативний контроль в порівнянні до позитивного контролю; # $p < 0,05$ – позитивний контроль в порівнянні з введенням МСК та інкапсульованих МСК; ## $p < 0,05$ – вихідні МСК в порівнянні з інкапсульованими МСК.

Площа фіброзу після трансплантації МСК почала зменшуватися вже через 3 тижні на 24% після системного введення МСК і на 43% після введення інкапсульованих МСК пуповини людини в порівнянні з позитивним контролем. Також ЕЦМ достовірно зменшився на 25% у групі тварин з введенними інкапсульованими в альгінатні капсули МСК пуповини людини порівнюючи з групою тварин, яким вводили вихідні МСК після індукції CCl_4 (рис. 3.5, рис. 3.6 б, в). Через 8 тижнів, кількість колагену зменшилась достовірно у групі щурів, яким вводили суспензію МСК пуповини людини на 45%, а через 13 тижнів на 78% порівнюючи з позитивним контролем. А у групі щурів, яким вводили МСК в альгінатних капсулах показники фіброзу через 8 тижнів знизився на 60%, а через 13 тижнів практично відповідав нормі, в порівнянні з групою позитивного контролю (рис 3,6 б, в). Інші морфометричні показники тканини печінки (таблиця 3.2) також свідчать про репараційні процеси в печінці у тварин, які отримували МСК як у вигляді клітинної суспензії, так і у вигляді клітин, інкапсульованих в альгінатні капсули. Через 8 тижнів кількість ДЯ гепатоцитів у групі щурів, яким вводили МСК в альгінатних капсулах збільшується в 3,5 рази у порівнянні з групою тварин у яких спостерігався цироз печінки; а кількість (Б'Я) клітин зменшилась майже у 5,5 разів. Через 13 тижнів майже всі морфометричні показники у обох груп тварин після введення вихідних та інкапсульованих МСК пуповини людини в альгінатні капсули майже відповідали нормі. Запалення у вигляді клітинної інфільтрації не спостерігалась починаючи з 8-го тижня у обох групах тварин з трансплантованими МСК пуповини людини, гепатоцити поступово набували правильної форми з трабекулярним розташуванням в паренхімі печінки (рис. 3,6 д, е). Отже, вище описані результати цих досліджень демонструють, що введення МСК пуповини людини призводить до відновлення паренхіми печінки щурів, але більш високу швидкість відновлення печінки спостерігається під впливом трансплантації інкапсульованих МСК пуповини людини.

Відновлення печінки у тварин, які зазнали впливу CCl_4 , але не отримували МСК, було тривалим і майже не спостерігалось навіть через 13 тижнів (рис. 3.6 а, з). Це свідчить про те, що часткова гепатектомія, яку проводили тваринам, не стимулює відновлення печінки. Раніше було показано, що відновлення печінки у щурів з

індукованим циррозом, коли токсичний фактор зникає, відбувається з 12 до 24 тижня, якщо цирроз є мікронодулярним. [242]

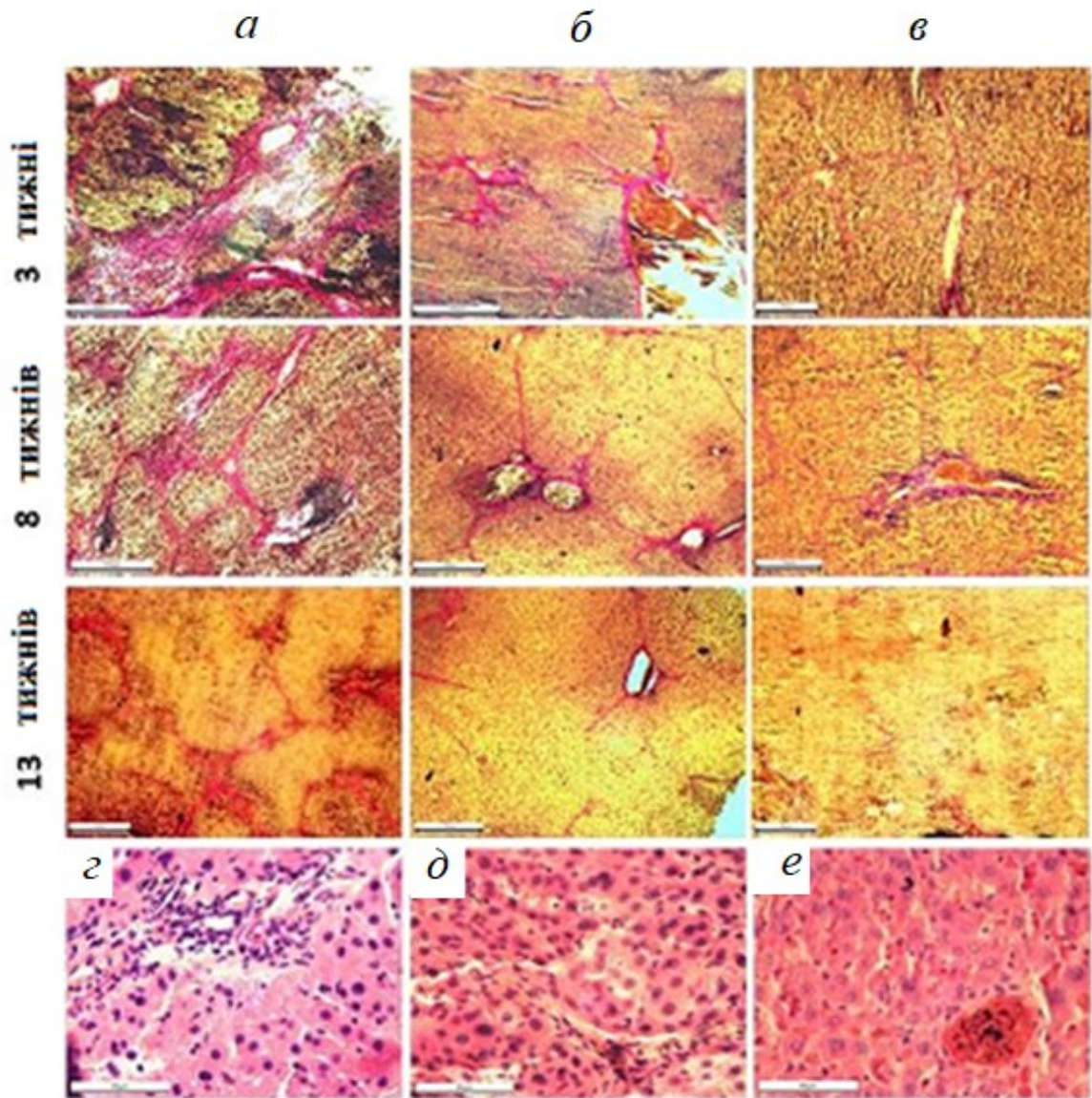


Рис. 3.6. Гістологічний аналіз зрізів тканини печінки після трансплантації МСК пуповини людини щурам з фіброзом/цирозом печінки, індукованим CCl_4 . Забарвлення за Ван Гізоном і гематоксиліном, еозином зрізів печінки щурів через 3, 8 і 13 тижнів після трансплантації МСК: *а*) - забарвлені зрізи печінки групи позитивного контролю щурів з циррозом печінки, яким не трансплантували МСК; *б*) - забарвлені зрізи печінки щурів, які отримали внутрішньовенну ін'єкцію вихідних МСК; *в*) – забарвлені зрізи печінки щурів, які отримали інтраперитоніальну ін'єкцію інкапсульованих МСК; *г*) - забарвлені зрізи печінки групи щурів позитивного

контролю з цирозом печінки, яким не трансплантували МСК через 13 тижнів; д) - забарвлені зрізи печінки щурів, які отримали внутрішньовенну ін'єкцію вихідних МСК через 13 тижнів; е) - забарвлені зрізи печінки щурів, які отримали інтраперитоніальну ін'єкцію інкапсульованих МСК через 13 тижнів. Масштаб: а – в - 100 мкм, з – е - 40 мкм.

Таблиця 3.2

3 тижні після трансплантації МСК та інкапсульованих МСК пуповини людини

Морфометричні параметри	Позитивний контроль (PBS/ «порожні» капсули	МСК	Інкапсульовані МСК
Накопичення колагену	0,42±0,025	0,32±0,011 [#]	0,24±0,018 ^{###}
Площа ядер гепатоцитів (мкм ²)	25,4±10,6	29,4±3,8	37,2±5,8 ^{###}
Площа гепатоцитів (мкм ²)	106,7±4,3	127,2±5,1 [#]	125,1±5,6 [#]
ЯЦС	0,23±0,05	0,28±0,06 [#]	0,25±0,04
Двоядерні гепатоцити (ДЯ)	2±0,5	4,1±0,43	5,5±0,86 [#]
Без'ядерні гепатоцити (Б'Я)	22±3,73	16±1,2 [#]	14±1,08 [#]

8 тижнів після трансплантації МСК та інкапсульованих МСК пуповини людини

Морфометричні параметри	Позитивний контроль (PBS/ «порожні» капсули	МСК	Інкапсульовані МСК
Накопичення колагену	0,38±0,031	0,21±0,019 [#]	0,15±0,018 [#]
Площа ядер гепатоцитів (мкм ²)	24,7±4,3	40,7±7,5 [#]	42,7±7,2 [#]

Продовження Табл.3.2

Площа гепатоцитів (мкм²)	116,7±3,9	152,4±6,4 [#]	156,6±5,9 [#]
ЯЦС	0,23±0,04	0,34±0,08 [#]	0,36±0,06 [#]
Двоядерні гепатоцити (ДЯ)	1,8±0,32	5,2±0,8 [#]	5,8±0,7 [#]
Без'ядерні гепатоцити (Б'Я)	17±3,8	8,4±1,3 [#]	3±0,47 [#]

13 тижнів після трансплантації МСК та інкапсульованих МСК пуповини людини

Морфометричні параметри	Позитивний контроль (PBS/ «порожні» капсули	МСК	Інкапсульовані МСК
Накопичення колагену	0,43±0,049	0,097±0,001 [#]	0,077±0,01 [#]
Площа ядер гепатоцитів (мкм²)	21,7±5,6	44,2±9,7 [#]	43,4±5,4 [#]
Площа гепатоцитів (мкм²)	122±4,4	152,5±4,2 [#]	155,1±3,9 [#]
ЯЦС	0,21±0,04	0,39±0,07 [#]	0,42±0,09 [#]
Двоядерні гепатоцити (ДЯ)	2±0,24	7±0,65 [#]	9,3±0,76 [#]
Без'ядерні гепатоцити (Б'Я)	19±3,8	4,2±0,6 [#]	2±0,31 [#]

Примітки: 1 - [#]p<0,05 – позитивний контроль в порівнянні з групою вихідних МСК та з групою інкапсульованих МСК; 2 - ^{##}p<0,05 – група введених вихідних МСК в порівнянні з введенням інкапсульованих МСК.

3.1.2.2. Експресія деяких генів, які пов'язані з розвитком фіброзу печінки після трансплантації вихідних МСК та інкапсульованих в альгінатні капсули. Трансплантація МСК пуповини людини призводила до зниження рівня експресії гена

EGF (рис. 3.3. а), який різко підвищувався при формуванні цирозу печінки у щурів. Зниження експресії *EGF* відбувалося швидше у тварин, які отримували інкапсульовані МСК: через 3 тижні після трансплантації інкапсульованих МСК цей ген практично не експресувався в печінці, тоді як після внутрішньовенного введення МСК експресія *EGF* залишалася на високому рівні і майже зникла до 8-го тижня (рис. 3.3. а). Експресія α -*SMA* повернулася до рівня, який спостерігався у групі тварин негативного контролю, до 8-го тижня незалежно від типу трансплантації (рис. 3.3. б). Експресія *GFAP* знизилася вже через 3 тижні у обох варіантах введення МСК майже до рівня негативного контролю (рис. 3.4 а). Експресія *eNOS*, яка незначно знизилася під час розвитку цирозу (рис. 3.4. б), повернулася до значень негативного контролю через 3 тижні у тварин, які отримували обидва типи лікування МСК пуповини людини.

Одержані нами результати з впливу МСК пуповини людини, що були трансплантовані щурам із цирозом печінки, індукованим CCl_4 , показують, що фіброз печінки зникає протягом 13 тижнів після трансплантації, а основні показники стану паренхіми печінки нормалізуються. Експресія генів, пов'язаних з пошкодженням печінки та розвитком фіброзу, також повертається до рівнів, що спостерігаються у тварин негативного контролю, як після системного введення МСК пуповини людини, так і після інтраперитоніального введення інкапсульованих МСК. Швидкість відновлення таких параметрів, як накопичення колагену та рівень експресії *EGF*, була вищою при трансплантації інкапсульованих МСК. Через 3 тижні після трансплантації інкапсульованих МСК експресія *EGF* була в 3,4 рази нижчою, ніж після системного введення МСК.

В цілому, наші результати з трансплантації МСК, як і результати багатьох інших досліджень показали, що МСК, впливаючи на печінку через множинні механізми (паракринні, імуномодельючі, антифібротичні, направлені проти окислювального стресу, тощо) призводять в кінцевому рахунку до її відновлення [190]. Наші результати показали, що трансплантація інкапсульованих в альгінатні капсули МСК пуповини людини прискорює процес регенерації печінки щурів, таким чином, інкапсуляція МСК посилює їх терапевтичний ефект.

Результати досліджень, поданих в підрозділі, опубліковано в працях:

1. Rymar S., **Pikus P.**, Buchek P., Shuvalova N., Pokholenko Ia., Irodov D., Kordium V. 2022. Comparison of the Therapeutic Effects of hUC-MSC Intravenous Delivery and Intraperitoneal Administration of MSCs Encapsulated in Alginate Capsules for the Treatment of Rat Liver Cirrhosis. *Biointerface research in applied chemistry*, 12(4), 5054 – 5070. doi.org/10.33263/BRIAC124.50545070.
2. **Пікус П.О.**, Рymar С.Ю., Шувалова Н.С., Бучек П.В. 2020. Morphological features of recovery in model rat liver cirrhosis induced by CCl₄ after transplantation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 26, 252-257. doi.org/10.7124/FEEO.v26.1275.
7. **Pikus P.O.**, Rymar S.Y., Kordium V.A. 2022. The therapeutic effect of mesenchymal stem cells derived from the human umbilical cord, using different methods of delivery to an animal model of liver cirrhosis. Kyiv, Ukraine. All-Ukrainian conference on molecular and cell biology with international participation. P. 134.
8. **Pikus P.**, Rymar S., Buchek P., Shuvalova N. 2018. Comparison of the efficacy of Free and encapsulated human umbilical cord MSCs in the correcting rat liver cirrhosis induced by CCl₄. 15th HiMB Symposium 10-13 Sep. Horizons in Molecular Biology. Goettingen, Germany. P. 176.

3.2 Вивчення розвитку гострого перитоніту у мишей після трансплантації вихідних та прекондиціонованих МСК

3.2.1 Розвиток гострого перитоніту у мишей після введення протеозного пептону. Дослідження розвитку гострого перитоніту у мишей після інтраперитоніального введення 1 мл стерильного 3 % протеозного пептону показало, що загальна кількість клітин та кількість моноцитів і макрофагів в ексудаті, які виступають основним маркером запального процесу, зростає в середньому у 4,3 та 4,7 рази відповідно через 4 години після введення пептону. Збільшення кількості клітин триває 24 години, після чого темпи процесу сповільнюється, кількість клітин через 48

годин практично не змінюється (рис. 3.7). Усі експерименти щодо впливу МСК на перебіг запалення проводили через 24 годин після введення протеозного пептону.

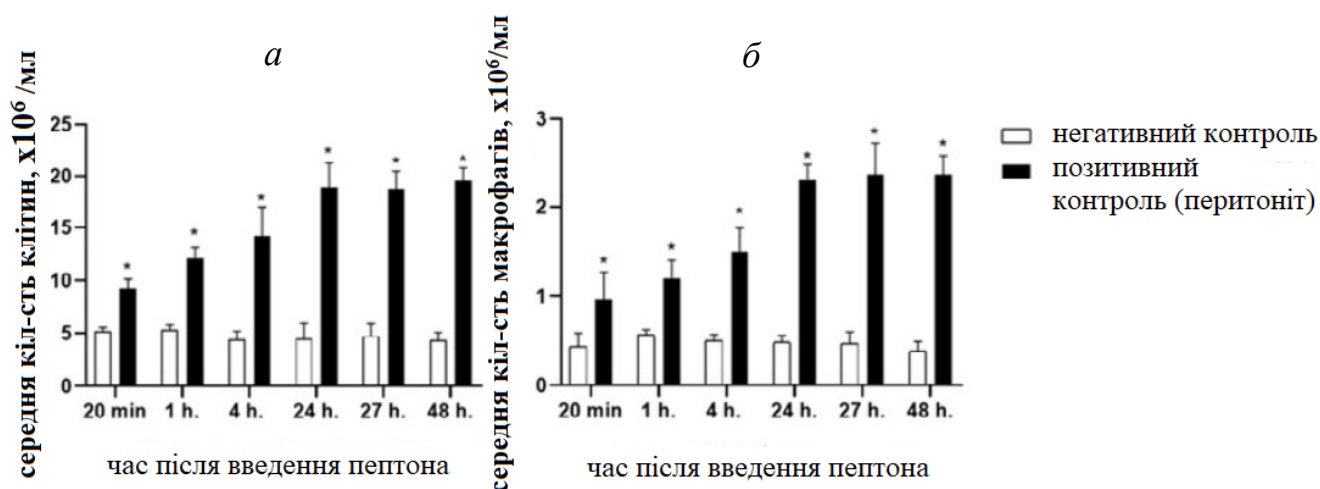


Рис. 3.7. Динаміка розвитку інтраперитоніального запалення у мишей після ін'єкції протеозного пептону. Загальна кількість клітин (а) і кількість макрофагів (б) в ексудаті миші. * $P < 0,5$ – негативний контроль в порівнянні з позитивним контролем (перитонітом)

3.2.2. Вплив дози МСК та часу введення МСК на гостре запалення черевної порожнини. Дослідження впливу МСК на гострий перитоніт потребувало визначення основних характеристик цього процесу, а саме того, як впливає проміжок часу, через який вводяться МСК після введення пептону, і доза МСК на пригнічення запалення.

У першій серії експериментів мишам інтраперитоніально вводили МСК у дозі 50×10^3 клітин/мишу через 20 хв і 24 год після введення протеозного пептону. Ін'єкція МСК через 20 хв після введення протеозного пептону, коли запалення починає швидко розвиватись, зупиняє запалення (рис. 3.8). В цих експериментах використовували, як вихідні, так і прекондиціоновані пероксидом водню (H_2O_2) ($30 \mu M$) МСК.

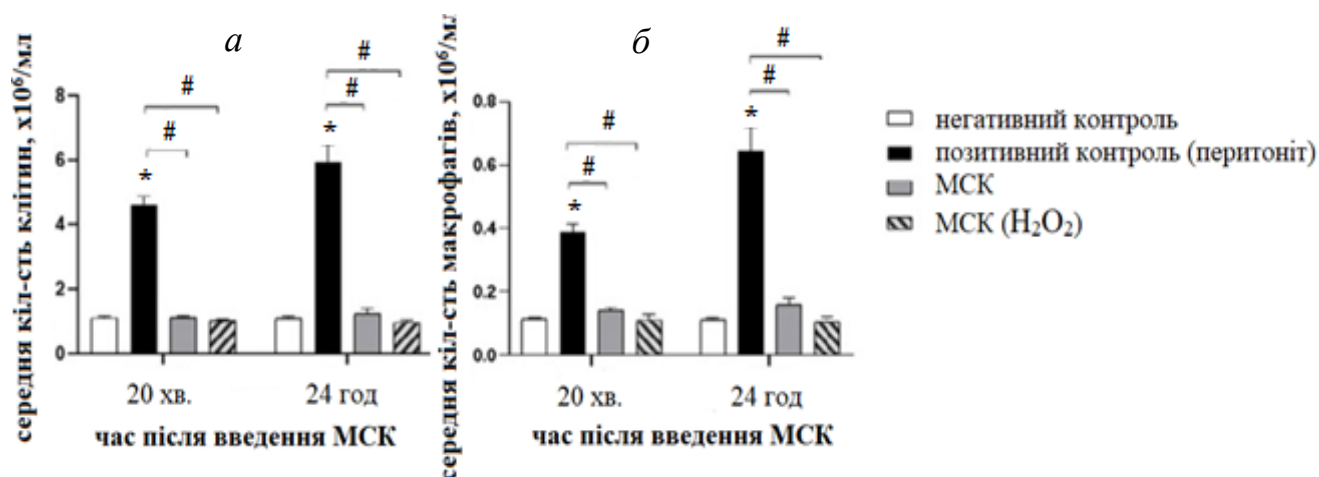


Рис. 3.8. Вплив часу ін'єкції МСК пуповини людини на гострий перитоніт у мишей. Загальна кількість клітин (а) і макрофагів (б) з абдомінального ексудату мишей після трансплантації вихідних та прекондиціонованих МСК пуповини людини. (20 хв – попередження запалення і 24 години - інгібування запалення після розвитку гострого перитоніту у мишей). * $P < 0,5$ — негативний контроль в порівнянні з позитивним контролем, # $P < 0,5$ — позитивний контроль в порівнянні з вихідними МСК, # $P < 0,5$ — позитивний контроль в порівнянні з прекондиціонованими МСК (H₂O₂)

Кількість трансплантованих МСК є вирішальним фактором терапевтичного впливу на гостре запалення черевної порожнини тварин. Дослідження залежності загальної кількості клітин і кількості імунних клітин (макрофагів, моноцитів і нейтрофілів) з виділеного ексудату черевної порожнини від дози введених МСК пуповини людини показало, що введення доз більше 25×10^3 клітин/ мишу більше не впливало на терапевтичний ефект. Ознаки запалення зникли, коли терапевтичний ефект досягав свого максимуму (рис. 3.9).

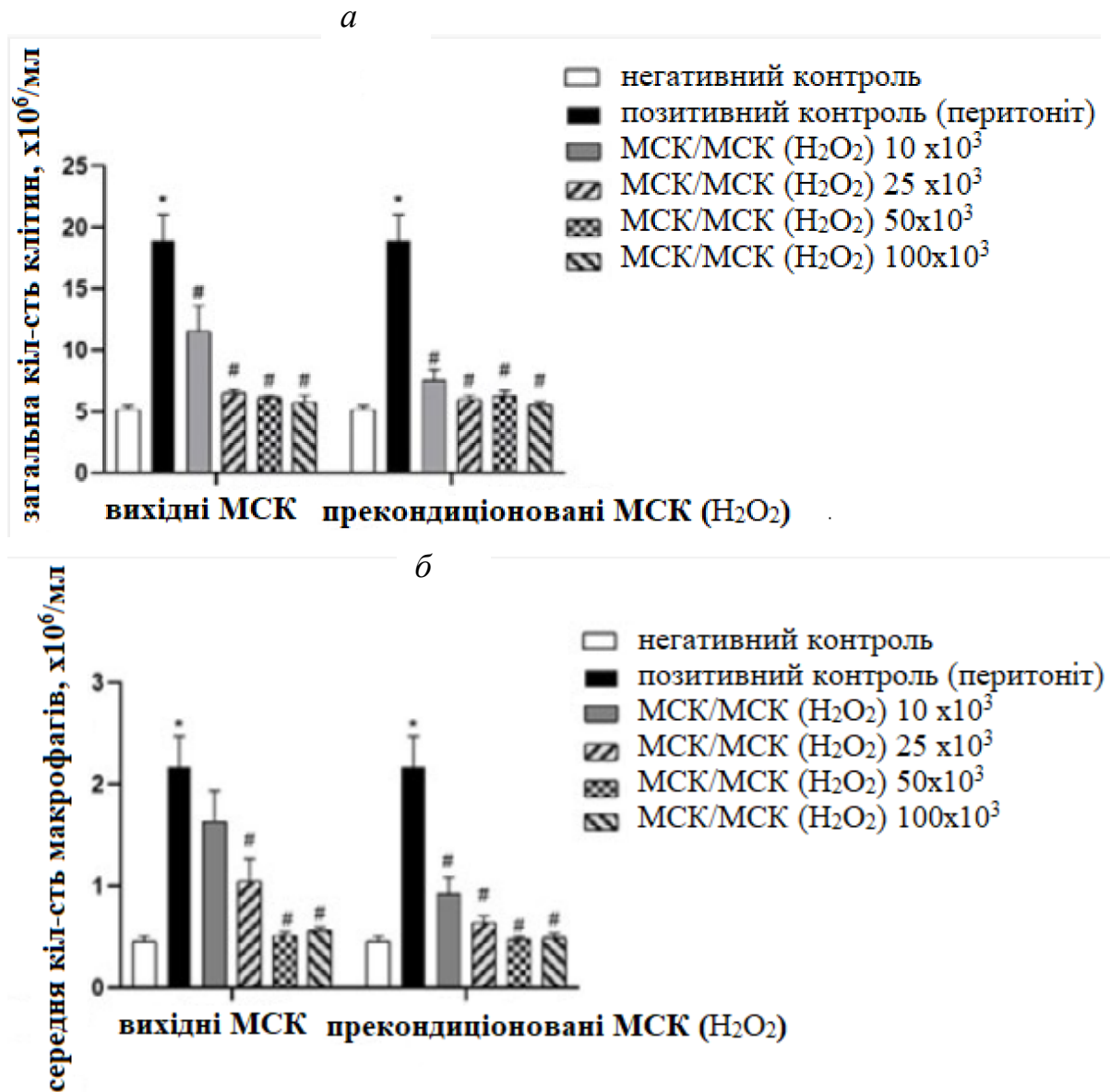


Рис. 3.9. Вплив на терапевтичну ефективність різних доз вихідних МСК та преко́ндиціонованих МСК (H_2O_2) при гострому перитоніті у мишей. Загальна кількість клітин (*a*) і макрофагів (*б*) з перитоніального ексудату мишей після трансплантації вихідних і преко́ндиціонованих МСК пуповини людини. * $P < 0,5$ – негативний контроль в порівнянні з позитивним контролем (перитонітом), # $P < 0,5$ – позитивний контроль в порівнянні з вихідними МСК/ преко́ндиціонованими МСК (H_2O_2)

3.2.3. Динаміка розвитку терапевтичного ефекту після введення вихідних та преко́ндиціонованих пероксидом водню МСК пуповини людини в черевну порожнину мишей. Однією з цілей цього дослідження було знайти умови, за яких ця

модель найбільш чутлива до якості клітинного препарату МСК пуповини людини, щоб мати можливість порівнювати терапевтичний потенціал різних клітинних препаратів МСК. Використання найбільш ефективних умов трансплантації МСК призводить до максимального терапевтичного ефекту, тобто до повного придушення запалення і в результаті не дає можливості порівняти терапевтичний потенціал різних препаратів МСК. Вивчення залежності терапевтичного впливу МСК на гостре запалення брюшної порожнини від дози МСК показало, що низька доза МСК (5×10^3 клітин/мишу) при інтраперитоніальному введенні ініціювала розвиток терапевтичного ефекту та зменшувала кількість макрофагів в ексудаті в середньому на 50%. Ще одним параметром, який міг дати можливість порівнювати терапевтичний ефект різних препаратів МСК міг бути час розвитку цього ефекту. Щоб з'ясувати це, було вивчено динаміку розвитку терапевтичного ефекту. Причому було проведено порівняння двох препаратів МСК – вихідних і прекондиціонованих низькою концентрацією пероксиду водню. Як виявилось, при інтраперитоніальному введенні МСК протизапальний ефект стає очевидним дуже швидко. Вже через 15 хв при введенні вихідних МСК кількість макрофагів у черевній порожнині зменшується майже в 1,8 рази і в 3 рази при введенні прекондиціонованих МСК (H_2O_2). Протягом 24 годин кількість макрофагів в черевній порожнині дещо зменшується, але лише у разі введення прекондиційованих МСК ознаки запалення повністю зникали. Максимальна різниця в терапевтичному ефекті двох клітинних препаратів МСК спостерігалась через 15 хв після трансплантації вихідних та прекондиціонованих МСК пуповини людини, що свідчило про можливість використання цих параметрів (дози - 5×10^3 клітин/мишу та часу - 15 хв) для порівняння терапевтичної ефективності різних препаратів МСК. В подальших експериментах ці умови були використані, якщо було необхідно порівняти ефективність різних препаратів МСК. (рис. 3.10). Ці результати були використані для порівняння методів прекондиціонування МСК.

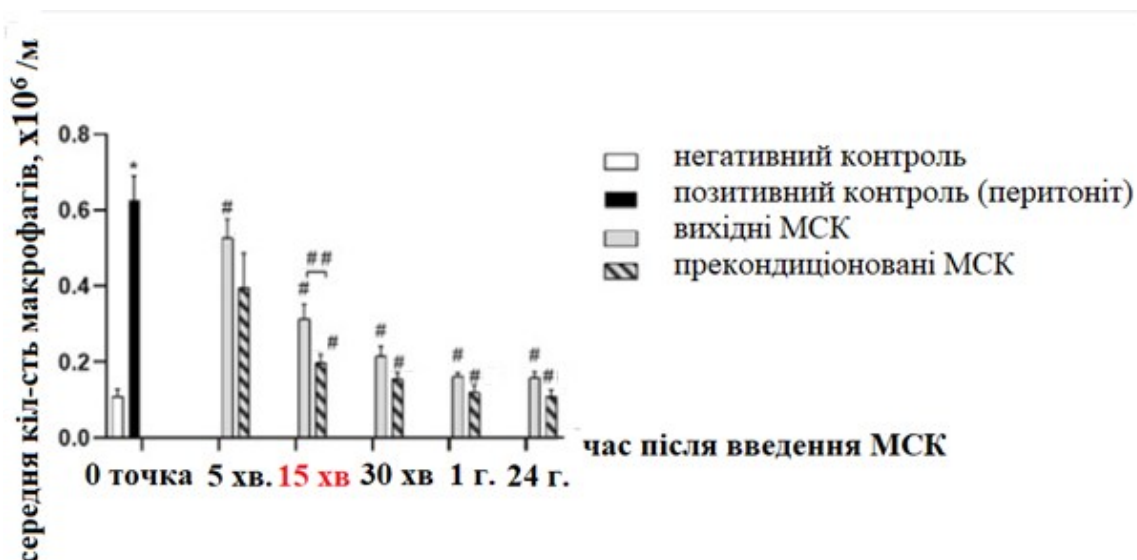


Рис. 3.10. Динаміка розвитку терапевтичного ефекту після введення вихідних та прекоондиціонованих МСК (H_2O_2) пуповини людини. * $P < 0,5$ — негативний контроль в порівнянні з позитивним контролем, # $P < 0,5$ — позитивний контроль в порівнянні з вихідними МСК та прекоондиціонованими МСК (H_2O_2), ## $P < 0,5$ — вихідні МСК в порівнянні МСК (H_2O_2)

3.2.4. Дослідження взаємодії МСК пуповини людини з інтраперитонеальними макрофагами *in vivo* на моделі перитоніту у мишей. Численні дослідження, як *in vitro*, так і *in vivo*, показали, що взаємодія між МСК і макрофагами, або так зване «навчання макрофагів МСК» відіграє вирішальну роль в імуномодулюючій активності МСК. [243, 244] Ця взаємодія призводить до поляризації макрофагів, тобто до переходу класично активованих прозапальних макрофагів М1 до альтернативно активованих протизапальних макрофагів М2. [245, 246]

Як видно (рис. 3.7. б), введення протеозного пептону призводить до різкого збільшення кількості прозапальних макрофагів. Трансплантації МСК викликала швидке зменшення їх кількості, що свідчило про різке пригнічення запалення і відновлення черевної порожнини. Щоб з'ясувати, що відбувається з макрофагами в ході їх взаємодії з МСК в нашому випадку, ми провели дослідження двох основних показників стану макрофагів - експресії *IL-10* і інтенсивності фагоцитозу. Високий рівень експресії *IL-10* є найбільш характерною ознакою макрофагів М2. [247, 248]

Результати дослідження показали, що ін'єкція МСК пуповини людини в черевну порожнину призводить до посилення експресії *IL-10* макрофагами, при цьому експресія *IL-10* після введення прекондиціонованих МСК (H_2O_2) була вищою, ніж після введення вихідних МСК (рис. 3.11).

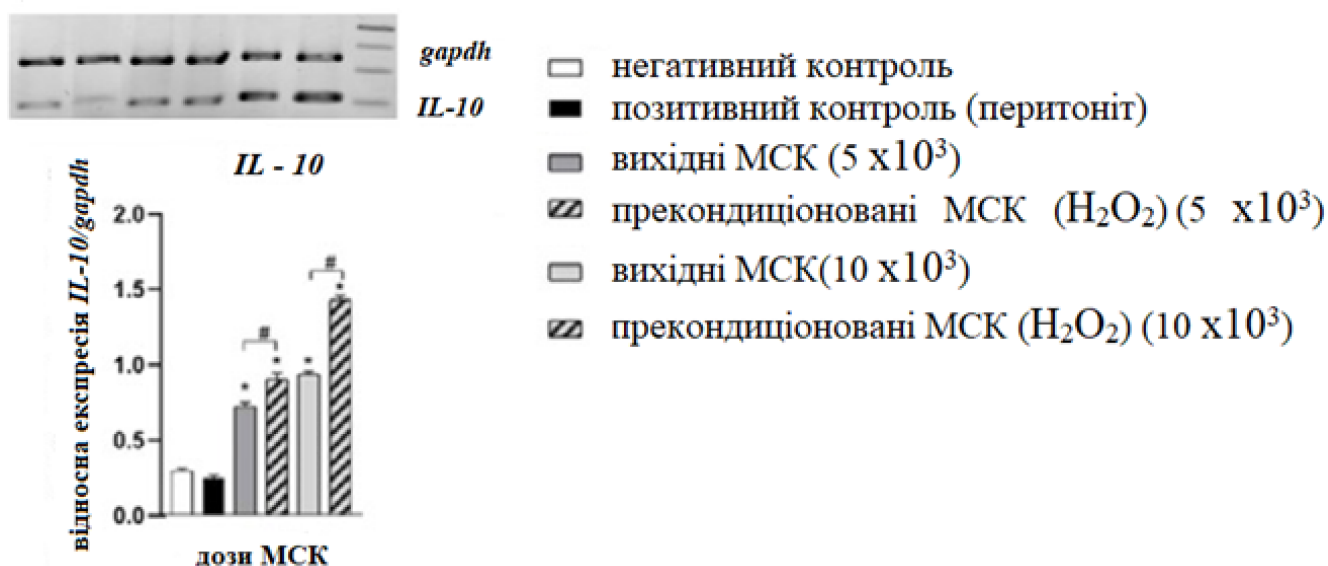


Рис. 3.11. Експресія *IL-10* після трансплантації вихідних і преко́ндиціонованих МСК (H_2O_2) при гострому запаленні черевної порожнини у мишей. * $P < 0,5$ – позитивний контроль в порівнянні з вихідними МСК/ преко́ндиціонованими МСК (H_2O_2), # $P < 0,5$ – вихідні МСК в порівнянні з преко́ндиціонованими МСК (H_2O_2)

Основною властивістю макрофагів є здатність до фагоцитозу. Результати дослідження фагоцитарної активності перитоніальних макрофагів при стерильному запаленні та після трансплантації МСК виявляли, що через 15 хв. після трансплантації вихідних МСК фагоцитарний індекс зростав, але більш інтенсивний ріст спостерігався при введенні преко́ндиціонованих МСК. Через годину фагоцитарний індекс починав знижуватися, а через 24 год його значення відповідало значенню групи негативного контролю. Зміни інтенсивності фагоцитозу практично співпадали із пригнічуванням ознак запалення (рис. 3.12). Ряд досліджень показали, що залежно від факторів, що індукують поляризацію макрофагів, фагоцитоз макрофагами М1 в одних випадках перевищує той, що спостерігався у М2 [249] в інших — фагоцитоз вищий у М2. [250, 251]

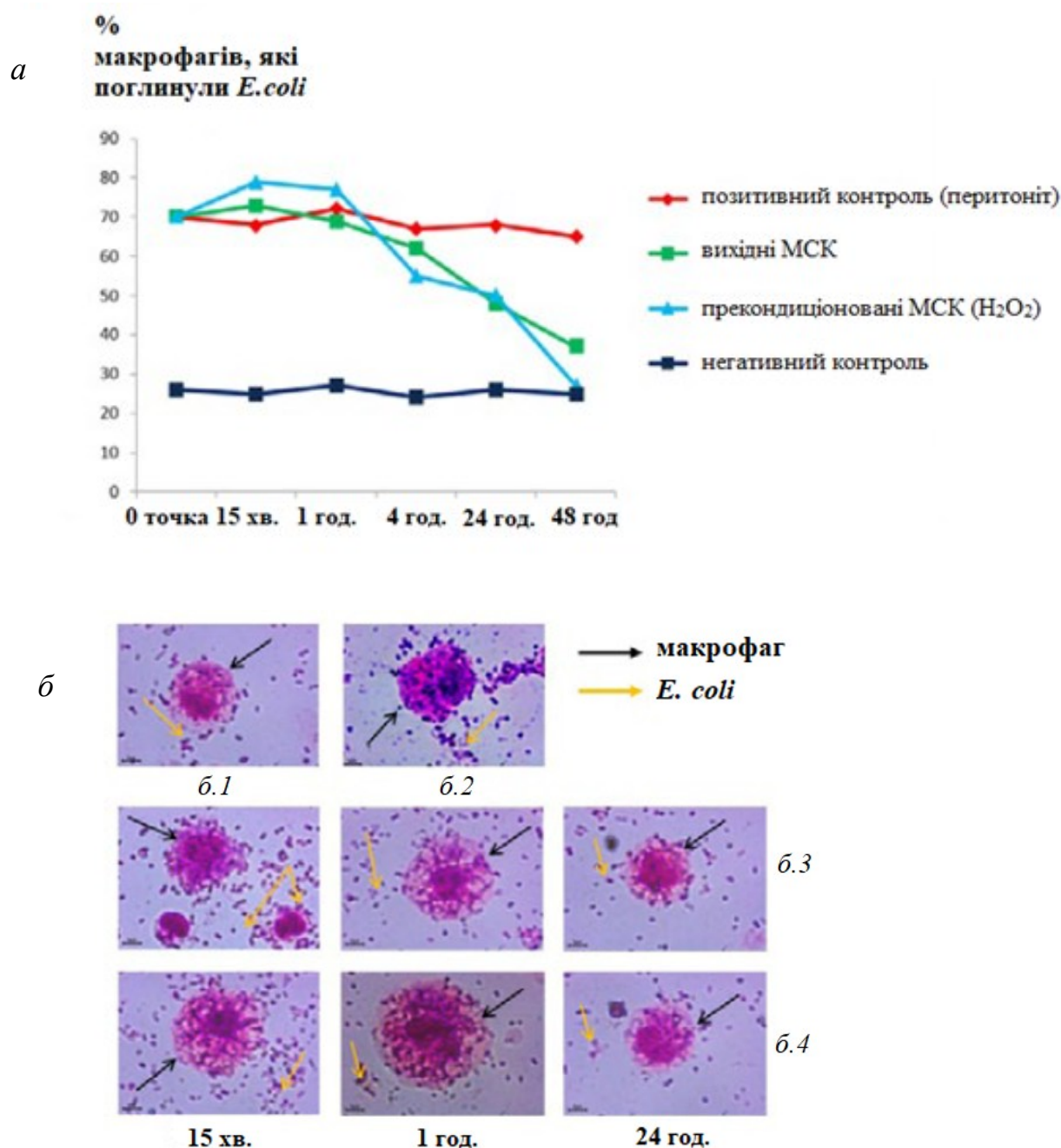


Рис. 3.12. Фагоцитарна активність перитонеальних макрофагів під час стерильного запалення та після ін'єкції МСК пуповини людини: *а*) - активність перитонеальних макрофагів з ексудату миші. *б.1*) - фагоцитоз *E. coli* макрофагами негативного контролю, *б.2*) - фагоцитоз *E. coli* макрофагами позитивного контролю (перитоніт), *б.3*) - фагоцитоз *E. coli* макрофагами після введення вихідних МСК пуповини людини, *б.4*) - фагоцитоз *E. coli* макрофагами після введення прекондиціонованих МСК (H₂O₂). Масштабна шкала 5 мкм

Ефекти, які ми спостерігали при інтраперитоніальній трансплантації МСК мишам, дозволяють розглядати взаємодію МСК і прозапальних макрофагів в черевній

порожнині як аналогію їх спільного культивування. Зміна фагоцитарної активності макрофагів після інтраперитоніальної трансплантації МСК збігались з підвищенням експресії *IL-10*, що свідчить про поляризацію прозапальних макрофагів у фенотип M2. В організмі відбувається швидкий вихід макрофагів із черевної порожнини, що пов'язано із зникненням запалення, на відміну від подій *in vitro*. Коли в організмі відбувається поляризація макрофагів, можуть спостерігатися більш складні явища. Передбачається, що на фазі зникнення запалення *in vivo* макрофаги можуть бути активовані не класичним і не альтернативним способом, а гібридним шляхом. [252] Наші результати демонструють, що ін'єкція МСК, навіть у низьких дозах (5×10^3 клітин / мишу), призводить до поляризації макрофагів у протизапальний фенотип M2 і до швидкого відновлення після гострого абдомінального запалення у мишей.

3.2.5. Вивчення терапевтичного потенціалу МСК прекондиціонованих різними факторами. В численних дослідженнях було показано, що МСК дуже чутливі до мікрооточення. Модифікуючи секретомний склад МСК шляхом прекондиціонування під час культивування *in vitro*, можна підвищити терапевтичний потенціал МСК шляхом підвищення виживаності після їхньої трансплантації, сприяння міграційної здатності і запобігання апоптозу. [253-255] Як уже згадувалось, прекондиціонування МСК різними фізичними, хімічними та біологічними факторами по-різному впливає на терапевтичний потенціал МСК. Нашою ціллю було порівняти вплив прекондиціонування різними факторами на протизапальну ефективність МСК пуповини людини на моделі — гострого перитоніту у мишей і визначення, прекондиціонування яким фактором призводить до найбільшого збільшення терапевтичної ефективності МСК. Вивчення динаміки розвитку терапевтичного впливу МСК на гострий перитоніт у мишей дозволило розробити тест – систему для порівняння терапевтичної ефективності різних препаратів МСК, визначити параметри трансплантації МСК, за якими модель гострого запалення найбільш чутлива до різних препаратів МСК – дози МСК і час спостереження ефекту. Застосування високої дози МСК, призвело до повного зникнення запалення і не дозволило побачити різницю в протизапальній активності прекондиціонованих МСК

різними факторами. Застосування низьких доз МСК і спостереження ефекту через 15 хв після введення МСК не призвело до повного зникнення запалення (рис. 3.10), але дозволило порівняти терапевтичний потенціал препаратів МСК після прекондиціонування різними факторами. Одним із цих факторів був H_2O_2 , який, як відомо, посилює проліферацію МСК, їх міграцію та виживання, підвищує стійкість до окислювального стресу та посилює терапевтичну ефективність МСК при використанні низьких концентрацій H_2O_2 . [256] Додатково, ми обрали як фактор прекондиціонування МСК пуповини людини мелатонін, який має антиоксидантну дію, посилюючи виживання МСК після трансплантації [257, 258], аскорбінову кислоту, яка може активувати мітохондрії, посилювати проліферацію МСК, пригнічувати старіння та покращувати терапевтичні ефекти МСК. [259, 260] Іншим фактором, який використовується як прекондиціонування МСК, є ЛПС, які індукують перехід МСК у прозапальний та імуносупресивний стан шляхом збільшення експресії прозапальних цитокінів. [261, 262]

Крім того, ми використовували як фактор γ -Інтерферон, який є речовиною, яка робить МСК більш ефективними в пригніченні імунної системи. Це продовжує життя алогенного трансплантата проти хвороби хазяїна та покращує міграційну та репаративну здатність МСК. [263, 264]

В нашій роботі, також було отримано результати, які демонструють, що найбільшої терапевтичної ефективності досягають МСК пуповини людини після їх прекондиціонування H_2O_2 дозою 30 мкмоль (рис. 3.13). У моделі гострого запалення прекондиціонування МСК мелатоніном, аскорбіновою кислотою та γ -інтерфероном достовірно не покращує терапевтичний ефект клітин в порівнянні з вихідними МСК. Терапевтичний потенціал МСК також не змінюється під час прекондиціонування ЛПС.

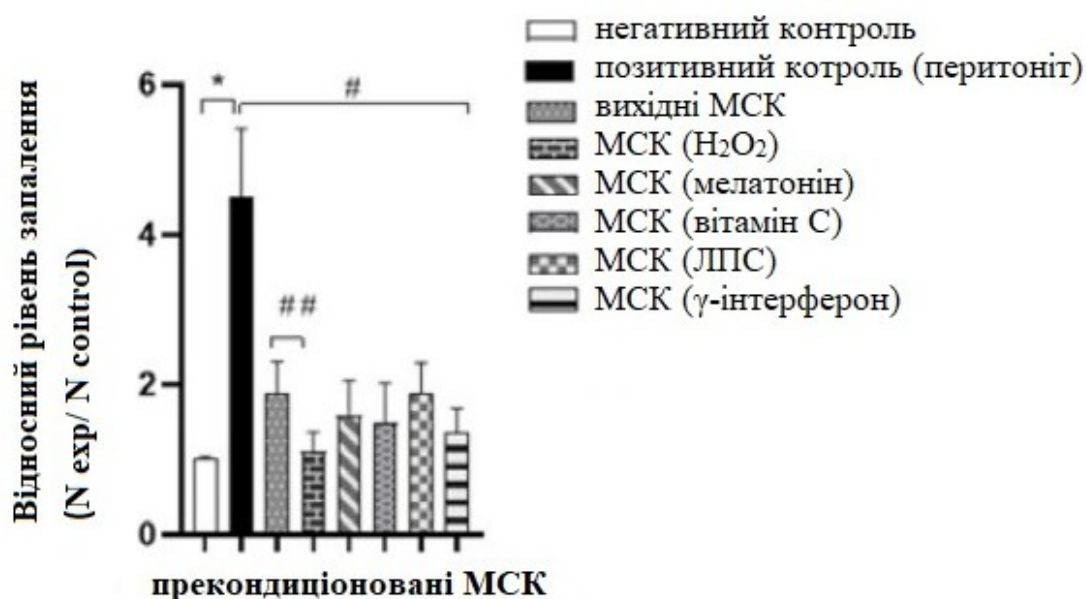


Рис. 3.13. Вплив preconditionованих МСК пуповини людини різними факторами на їхній терапевтичний потенціал. * $P < 0,5$ — негативний контроль в порівнянні з позитивним контролем, # $P < 0,5$ — позитивний контроль в порівнянні з вихідними МСК/ preconditionованими різними факторами МСК, ## $P < 0,5$ — вихідні МСК в порівнянні з МСК (H₂O₂)

Очевидно, що preconditionування інтерфероном- γ та ЛПС, яке переводить МСК у прозапальний та імуносупресивний стан, не може бути ефективним на моделі гострого перитоніту у мишей.

Вивчення динаміки розвитку терапевтичної дії МСК після їх інтраперитоніального введення показало, що протизапальний ефект розвивається дуже швидко. Навіть при низькій дозі МСК ($1,65 \times 10^5$ /кг маси тіла) кількість макрофагів в черевній порожнині значно зменшується через 15 хв, що супроводжується підвищенням експресії *IL-10* і посиленням фагоцитозу. У результаті розроблено методику, яка дозволяє оцінювати терапевтичну ефективність препаратів МСК *in vivo*. Цей метод дуже важливий для характеристики препаратів МСК, якщо планується їх використання в регенеративній медицині. Найбільш ефективним методом підвищення терапевтичного потенціалу МСК є preconditionування низькими дозами H₂O₂.

Результати досліджень, поданих в підрозділі, опубліковано в працях:

6. **Pikus P.**, Rymar S., Shuvalova N., Kordium V. 2022. Study of the interaction between macrophages and human umbilical cord MSCs *in vivo* on the model of peritonitis in mice. *Biopolymers and Cell*, 38(4), 231–241. doi.org/10.7124/bc.000A80.
7. **Пікус П.О.**, Римар С.Ю., Шувалова Н.С., Кордюм В.А. 2019. Influence of the dose of human umbilical cord mesenchymal stem cells on acute inflammation on the peritonitis model in mice. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 25, 304–309. doi.org/10.7124/FEEO.v25.1182.
9. **Pikus P.**, Rymar S. 2021. Studying the dynamics of the development of the therapeutic effect of initial and preconditioned MSCs on a model of acute abdominal inflammation of mice. 45th FEBS Congress, Molecules of Life: Towards New Horizons, Ljubljana, Slovenia, V.11. P. 334.
10. **Pikus P.**, Rymar S., Shuvalova N. 2019. Study of the dynamics of the development of the therapeutic effect of native and preconditioned human MSCs based on the model of acute abdominal inflammation in mice. XII Український біохімічний конгрес, Тернопіль, Україна. Медична та клінічна хімія. Т. 21(3), с. 282.

3.3. Порівняння дослідження терапевтичного ефекту вихідних і прекондиціонованих МСК пероксидом водню на моделі панкреатиту у щурів

3.3.1. Розвиток моделі гострого панкреатиту у щурів. Після визначення того, що прекондиціонування МСК пероксидом водню є дуже ефективним способом підвищення терапевтичної ефективності МСК у використанні на моделі гострого перитоніту, наступною задачею наших досліджень стало порівняння ефективності вихідних та прекондиціонованих пероксидом водню МСК у відновленні підшлункової залози на моделі гострого панкреатиту у щурів, який також є запальним захворюванням, і пошук способу його лікування є дуже актуальним, виходячи з серйозності такого захворювання у людей. Важкий гострий панкреатит викликає

некроз тканин підшлункової залози і недостатності органів травлення з рівнем смертності до 47%. [265]

На початку експерименту ми розробили модель гострого панкреатиту у щурів та підтвердили наявність захворювання за допомогою гістологічних, гістохімічних та біохімічних досліджень вже через 3 дні після інтраперитоніального введення L-arg, коли навіть зовнішні клінічні ознаки тварин відповідали панкреатиту (поліурія, часткове випадіння волосся, втрата апетиту, зниження рухливості).

Важливим аспектом діагностики гострого панкреатиту є оцінка панкреатичних ферментів (амілази, ліпази та трипсину), які діють як біомаркери на ранніх і пізніх стадіях захворювання. α -амілаза – травний фермент, глікозидгідролаза, який розщеплює вуглеводи, синтезовані переважно ацинарними клітинами підшлункової та слинних залоз, у мінімальних кількостях жировою тканиною, статевими залозами, матковими трубами та кишківником. [266] Підвищення рівня активності α -амілази в сироватці крові, що не менше ніж у 3 рази перевищує верхню межу норми, що підтверджує діагноз гострого панкреатиту у щурів. Активність ферменту швидко зростає протягом перших 12 годин після появи симптомів, протягом наступних 3-5 днів залишається на високому рівні, потім рівень α -амілази знижується за рахунок виведення нирками тварин. [267] Визначення рівня α -амілази у щурів у нашому дослідженні показало, що через 3 доби після індукції панкреатиту L-arg рівень ферменту зріс у 5 разів порівняно з негативним контролем (рис.3.14).

3.3.2. Динаміка впливу трансплантації вихідними та прекондиціонованими МСК пуповини людини на морфометричні та функціональні параметри підшлункової залози при гострому панкреатиті у щурів. Наступним етапом експерименту була трансплантація вихідних та прекондиціонованих МСК пуповини людини за допомогою. Терапевтичний ефект вихідних та прекондиціонованих H_2O_2 МСК пуповини людини на підшлункову залозу оцінювали через 3, 7 і 14 дні після їх інтраперитоніального введення. У ході аналізу щурів з групи позитивного контролю із гострим панкреатитом порівнювали з групами тварин, яким трансплантували

вихідні та прекондиціоновані МСК. Також порівнювали між собою результати, отримані від груп тварин, яким вводили вихідні або прекондиціоновані МСК.

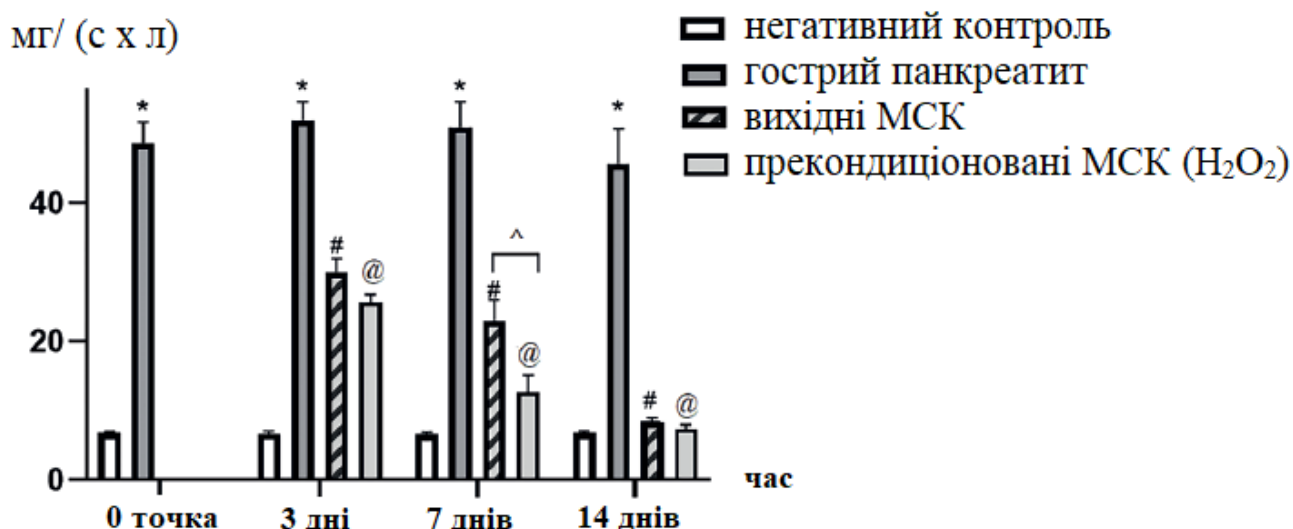


Рис.3.14. Рівень α -амілази в крові щурів через 3 дні після індукції L – arg та розвитку панкреатиту (0 точка) порівняно з 3, 7 та 14 днями після введення фізіологічного розчину або трансплантація вихідних та прекондиціонованих МСК пуповини. * – $p < 0,05$ порівняно з негативним контролем; # – $p < 0,05$ порівняно з позитивним контролем; ^ – $p < 0,05$ порівняно з групою щурів, яким трансплантували вихідні МСК пуповини людини

Вже через 3 дні після трансплантації МСК пуповини людини рівень α -амілази в крові зменшилася в 1,7 рази в групі з введенням вихідними МСК порівнюючи з групою щурів позитивного контролю, а в групі з прекондиціонованими МСК рівень знизився в 2 рази порівнюючи з тією самою групою (рис. 3.14.). Через 7 діб рівень α -амілази в групі з вихідними МСК знизився в 2,4 рази, а у варіанті з прекондиціонованими клітинами – у 3,5 рази порівнюючи з групою гострого панкреатиту. Різниця між групами щурів з вихідними та прекондиціонованими МСК була достовірною. А вже через 14 днів після трансплантації МСК пуповини людини у тварин обох груп рівень α -амілази відповідав негативному контролю (рис. 3.14.).

Крім очевидного ураження екзокринної частини підшлункової залози, ендокринна частина також була пошкоджена, оскільки через 2 години після індукції

L-arg, щури почали надмірно пити воду, і рівень глюкози в крові підвищився з $5,5 \pm 0,6$ ммоль/л (норма) до $14,7 \pm 1,5$ ммоль/л. Такі показники глюкози в крові зберігалися в групі позитивного контролю до кінця експерименту: через 3 дні після введення вихідних або прекондиціонованих МСК пуповини людини, у групі щурів із гострим панкреатитом, яким замість МСК вводили 0,9 % фізіологічний розчин, рівень глюкози в крові становив $14,3 \pm 1,7$ ммоль/л, через 7 днів – $12,8 \pm 1,3$ ммоль/л, а наприкінці досліду, через 14 днів, рівень глюкози крові відповідав $13,4 \pm 1,35$ ммоль/л.

Перше функціональне покращення підшлункової залози проявлялось через нормалізацію рівня глюкози в крові щурів: уже на 3 добу після трансплантації МСК пуповини людини, рівень глюкози знизився до $7,1 \pm 0,8$ ммоль/л, а в групі з введеними прекондиціонованими МСК рівень глюкози в крові нормалізувався до $5,9 \pm 0,6$ ммоль/л. На 7 та 14 добу рівень глюкози в крові щурів був у межах норми $5,6 \pm 0,53$ ммоль/л.

Після проведення гістологічного аналізу підшлункової залози щурів негативного контролю було виявлено макроскопічно типову трубчасто-альвеолярну структуру паренхіму підшлункової залози: сполучнотканинну строму, багату кровоносними та лімфатичними судинами, які розділяли паренхіму на частки. При мікроскопічному дослідженні екзокринної частини підшлункової залози було виявлено ацинуси - структурна одиниця органу, розташовані щільно і не мають певної орієнтації. В середньому ацинус містить 5-8 екзокринних панкреатоцитів пірамідальної форми, які своїми верхівками оточують невелику центральну порожнину, кожна ацинарна клітина містить округле ядро з чітко вираженими крупними ядерцями (рис. 3.15). Також в паренхімі підшлункової залози містяться вставочні протоки та панкреатична, стінки яких вистелені дрібними плоскими клітинами, розташованими на базальній мембрані, їх ще називають стелатними, які у стані спокою експресують незначну кількість ЕЦМ, як показано на рис. 3.17 а.

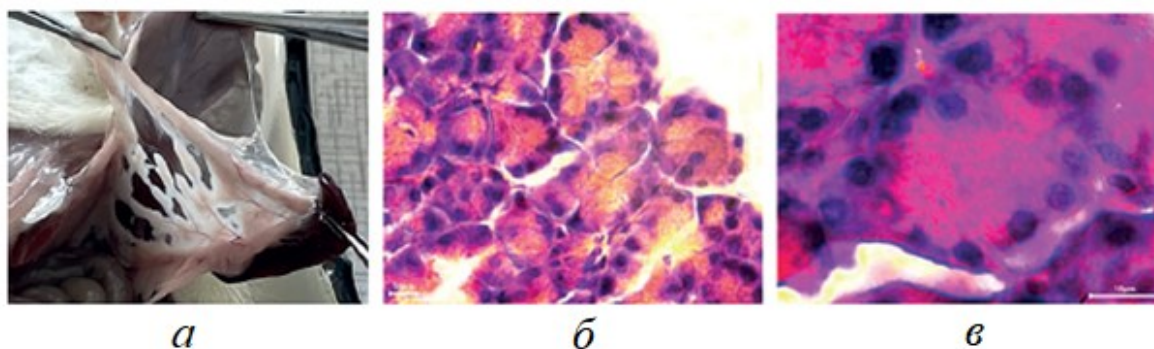


Рис. 3.15. Макро- (*а*) та мікрофотографії гістологічних зрізів (*б, в*) підшлункової залози щура з негативного контролю. Світлова мікроскопія, забарвлення гематоксиліном та еозином (*б, в*); масштабна шкала – 10 мкм (*б, в*)

При макроскопічному дослідженні підшлункової залози через 3 доби після індукції L-arg, який здійснює окислювальний стрес на підшлункову залозу тварин було виявлено ряд типових морфологічних змін, характерних для гострого панкреатиту (ГП). Паренхіма набрякла, набула зміненої розрихленої, пухкої консистенції, яка розпалася при взятті матеріалу на гістологічне дослідження. Також спостерігались поодинокі жирові некрози і дрібні крововили в сальниковій сумці - незначної кількості серозно-геморагічних елементів. Капсула підшлункової залози була зрощена з селезінкою у багатьох зразках підшлункової залози щурів, в окремих зразках навіть спостерігалися новоутворення та надмірна кількість жирової тканини, як показано на рис 3.16. *а*. При мікроскопічному дослідженні в підшлунковій залозі тварин було виявлено некроз паренхіми, розпад ацинусів на окремі клітини і повне руйнування клітин панкреатоцитів, про що свідчить поява значної кількості без'ядерних клітин, яка в 10 разів більша в порівнянні з негативним контролем (рис. 3.16 *б*). Під час розвитку ГП на зразках мікрофотографіях (рис. 3.16 *б, в*) чітко видно лізис ациноцитів, через відсутність ядер в багатьох клітинах, а ті ядра, які вцілили мають чітко виражений пікноз з ущільненням та конденсацією хроматину, оскільки активація таких травних ферментів, як трипсин, відбувається всередині клітини, а не в просвіті ацинуса підшлункової залози, як це відбувалось в негативній групі. У результаті такі процеси призвели до пошкодження цитоплазми панкреатоцитів і подальших запальних процесів у підшлунковій залозі після індукції L-arg.

Підтвердженням цього явища є достовірне зменшення площі ядра панкреатоцитів (мкм^2) $40,8 \pm 8,6$, порівнюючи з нормою $90,1 \pm 19,1$ та показник ЯЦС, який в 4 рази збільшився, порівнюючи з негативним контролем (таблиця 3.3).

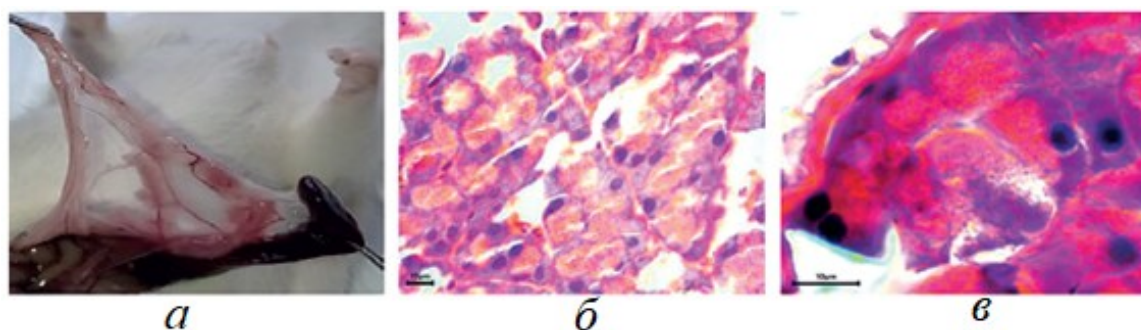


Рис. 3.16. Макро- (а) та мікрофотографії гістологічних зрізів (б, в) підшлункової залози щура через 3 дні після індукції L -arg. Світлова мікроскопія, забарвлення гематоксиліном Ерліха та еозином (б, в); масштабна шкала – 10 мкм (б, в)

Також спостерігалися поширені крововиливи в некротичні тканини з тромбованих і зруйнованих судин мікроциркуляторного русла, численні вогнища лізису вивідних проток, жирова дистрофія заміщення паренхіми підшлункової залози, а також спостерігався фіброз, який збільшився майже в 3,5 рази порівняно з нормою (табл. 3.3). При фіброзі відбувається пошкодження ендотеліальних клітин синусоїдів підшлункової залози і активація зірчастих клітин, що в результаті призводить до заповнення простору Діссе колагеновими волокнами. Цей процес називається капіляризацією синусоїдів. Як показали наші дослідження, частота виявлення синусоїдів в стані капіляризації та неможливості повноцінної вимірювання простору Діссе після індукції L- arg зростає зі збільшенням фіброзних змін у паренхімі підшлункової залози та посиленням проявів фіброзу (рис. 3.17 б).

Таблиця 3.3.

Морфометричні показники підшлункової залози щурів

<u>Морфометричні параметри</u>	Негативний контроль (норма)	Позитивний контроль (гострий панкреатит)
Площа ЕЦМ, мкм ²	0.05 ± 0.015	0.17 ± 0.08*
Висота <u>ациноцитів</u> , мкм	27.5 ± 4.8	18.3 ± 3.2
Площа <u>ациноцитів</u> , мкм ²	90.1 ± 19.1	40.8 ± 8.6*
Площа <u>ядер ациноцитів</u> , мкм ²	18.3 ± 3.0	11.6 ± 3.5*
ЯЦІ	0.3 ± 0.017	0.12 ± 0.04*
Без'ядерні <u>ациноцити</u>	4.0 ± 0.5	47.0 ± 6.1*

Примітка: * $p < 0,05$ – негативний контроль в порівнянні з позитивним контролем.

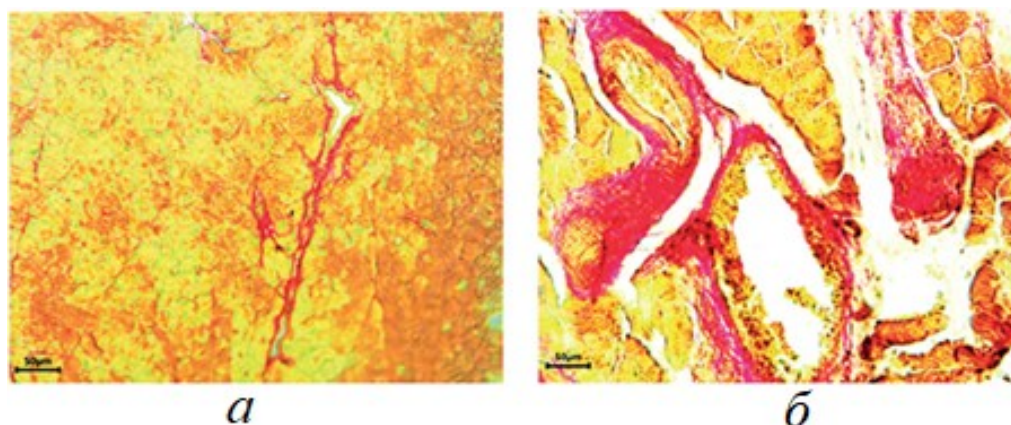


Рис. 3.17. Мікрофотографії гістологічних зрізів підшлункової залози щура з групи негативного контролю (а) та піддослідної групи з гострим панкреатитом (б). Накопичення колагену в паренхімі (б). Світлова мікроскопія, забарвлення по Ван-Гізону; масштабна шкала – 50 мкм

Якісний гістохімічний метод PAS-реакції підтвердив дисфункцію β -клітин в острівцях Лангерганса в позитивному контролі, оскільки через 7 днів після ін'єкції вихідних або прекодиційованих МСК пуповини людини у групі щурів із гострим панкреатитом острівці не забарвлювалися (рис. 3.18 б), як було показано у

негативному контролю (рис. 3.18 *а*), коли альдегідфуксин реагував з інсуліном і позитивно забарвлював β -клітини у пурпурний колір. [268] Виявлений у цьому випадку інсулін проявляється у вигляді своєрідних структур, схожих на бляшки, які були згруповані в кластери (рис. 3.18. *а*).

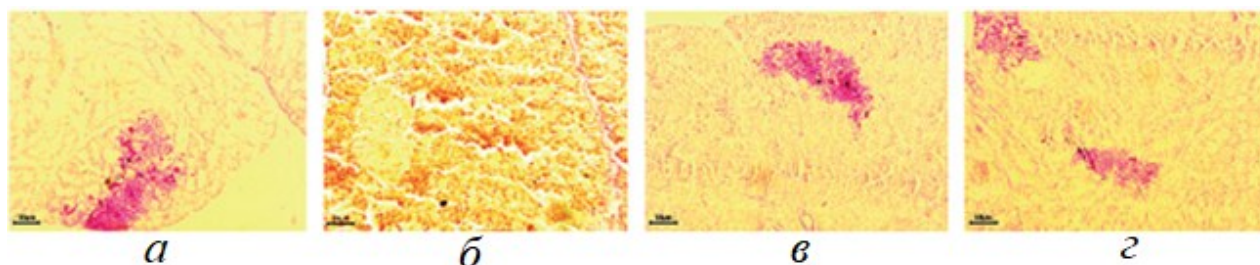


Рис. 3.18. Мікрофотографії гістологічних зрізів підшлункової залози щурів у групі негативного контролю (*а*), а також через 7 днів після індукції L-arg та ін'єкції 0,9 % фізіологічного розчину (*б*) або трансплантації вихідних (*в*) та прекондиціонованих МСК пуповини людини (*з*). Світлова мікроскопія, забарвлення за PAS- реакцією; масштабна шкала – 50 мкм

Таким чином, отримані нами результати свідчать про успішне відтворення моделі гострого панкреатиту, що призводить як до структурних, так і до функціональних порушень підшлункової залози. Через 3 доби після введення вихідних МСК пуповини людини спостерігалось зменшення площі колагенових волокон підшлункової залози щурів у 1,4 рази порівнюючи з позитивним контролем ($*p < 0,05$). Після введення прекондиціонованих МСК пуповини людини площа колагену зменшилася в 1,7 рази порівняно з позитивним контролем (табл. 3.4.).

Через 7 діб у щурів з трансплантованими вихідними МСК показник площі ЕЦМ був майже в 2,5 рази меншим, ніж у щурів з гострим панкреатитом. У групі з прекондиціонованими МСК показник відповідав нормі, тобто фіброз практично не спостерігався (рис. 3.19. *б*, *в*)

3.3.3. Порівняння терапевтичного ефекту вихідних та прекондиціонованих МСК пуповини людини на гостре запалення підшлункової залози. Таким чином, отримані результати демонструють високу терапевтичну ефективність МСК пуповини людини у інгібуванні гострого запалення підшлункової залози та її регенерації. Водночас протизапальний та відновлювальний ефект прекондиціонованих МСК за допомогою H_2O_2 , розвивався значно швидше, ніж ефект з вихідними МСК. У групі з прекондиціонованими МСК структура підшлункової залози практично відновилася через 7 днів, а через 14 днів обидва варіанти відповідали нормі (рис. 3.20 б, в).

Таблиця 3.4

Морфометричні показники паренхіми підшлункової залози щурів

Морфометричні параметри	ГП (n=3)	Вихідні МСК (n=3)	МСК+H ₂ O ₂ (n=3)	ГП (n=4)	Вихідні МСК (n=4)	МСК+H ₂ O ₂ (n=4)	ГП (n=4)	Вихідні МСК (n=4)	МСК+H ₂ O ₂ (n=4)
	3 дні			7 днів			14 днів		
Площа ЕСМ, мкм ²	0,2±0,08	0,14±0,06 [#]	0,12±0,05 [#]	0,24±0,09	0,1±0,02 [#]	0,05±0,01 ^{#^}	0,25±0,1	0,06±0,01 [#]	0,05±0,01 [#]
Висота ациноцитів, мкм	19±3,5	20,5±3,1	21±2,7	18,4±3,2	24±2,5	23,2±2,3	20,1±2,5	27,4±3 [#]	29,2±3,2 [#]
Площа ациноцитів, мкм ²	40±9	63,2±6,3	72±5,1 [#]	42,7±11,5	73,9±10 [#]	82,4±7,5 [#]	42,3±13	87,1±7,2 [#]	89±6,3 [#]
Площа ядер ациноцитів, мкм ²	11±3,5	12,5±2,7	14,1±3	9,8±4,2	12,9±2,7	14,5±2,8 [#]	12,2±2,5	19,2±3,1 [#]	17±3,0 [#]
ЯЦС	0,1±0,04	0,13±0,06	0,17±0,08 [#]	0,12±0,04	0,2±0,06 [#]	0,28±0,08 [#]	0,124±0,07	0,25±0,1 [#]	0,32±0,05 [#]
Без'ядерні ациноцити	50±18	26±7,8 [#]	19±6,8 [#]	54±17,3	18±6,5 [#]	7±2,1 ^{#^}	53±13,5	10±2,4 [#]	5±1,2 ^{#^}

Примітки: 1 - ГП – гострий панкреатит; 2 - [#] – p < 0,05 порівняно з позитивним контролем (гострий панкреатит); [^] – p < 0,05 порівняно з групою вихідних МСК пуловини людини. Морфометричні показники гістологічної структури підшлункової залози щурів піддослідних груп (mean ± SE). Значення P розраховували методом дисперсійного аналізу з використанням критерію Тьюкі.

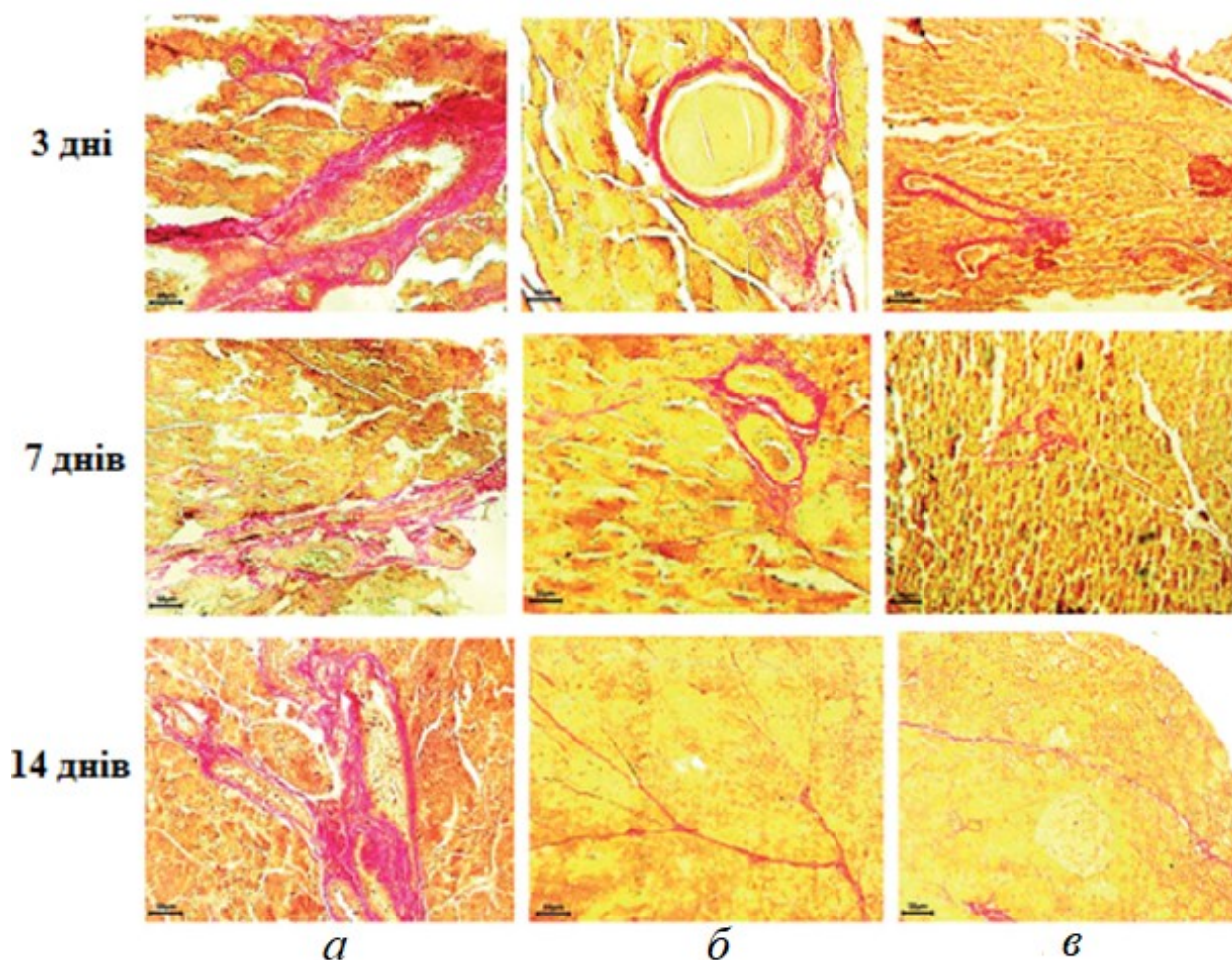


Рис. 3.19. Мікрофотографії гістологічних зрізів підшлункової залози щура з гострим панкреатитом через 3, 7 та 14 днів після введення 0,9 % фізіологічного розчину (*а*), трансплантація вихідних (*б*) та прекондиціонованих МСК пуповини людини (*в*). Накопичення ЕЦМ в паренхімі підшлункової залози. Світлова мікроскопія, забарвлення по Ван-Гізону; масштабна шкала – 50 мкм

Також ваговою ознакою було відновлення паренхіми підшлункової залози наявність значної кількості двоядерних ациноцитів через 7 днів після введення вихідних МСК щурам. На (рис. 3.20. *в*), зокрема, ми спостерігали ациноцити, які після мітозу перебували на стадії незавершеного цитокінезу (позначено стрілками), що свідчить про проліферативну активність підшлункової залози. Майже повністю відновлена архітектура панкреатоцитів вже спостерігалася в групі, якій трансплантували прекондиціоновані МСК H_2O_2 (рис. 3.20. *в*).

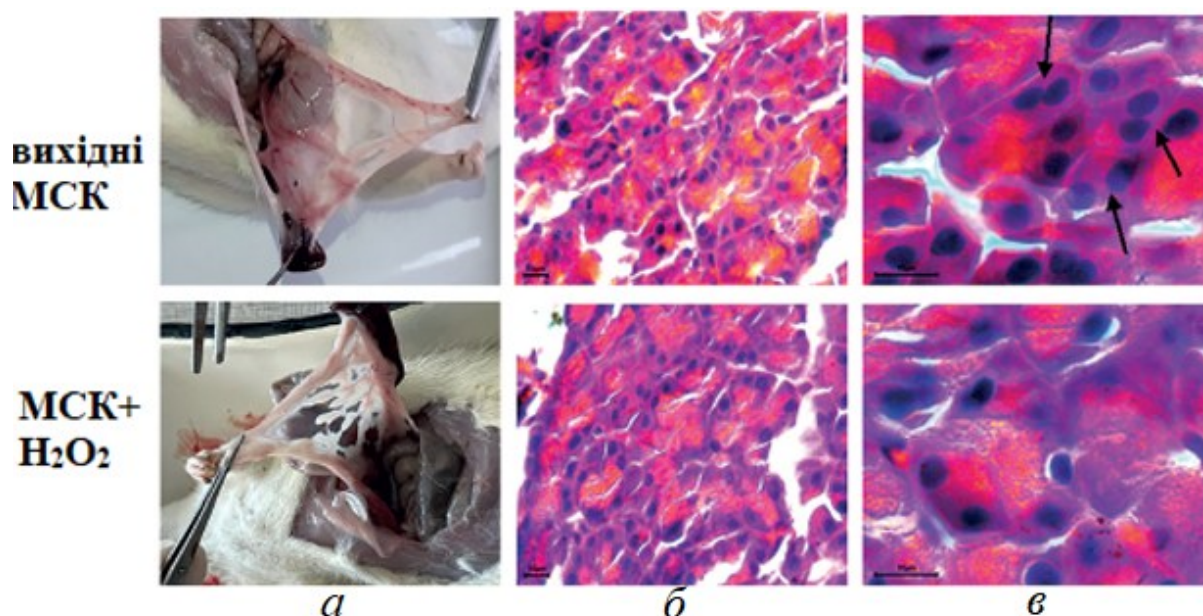


Рис.3.20. Макро- (а) та мікрофотографії (б, в) підшлункової залози щура з панкреатитом через 7 днів після трансплантації вихідних та прекондиціонованих МСК пуповини людини. Світлова мікроскопія, забарвлення гематоксиліном та еозином за Бемером; масштабна шкала – 10 мкм (б-в)

Так, за результатами гістологічного дослідження підшлункової залози тварин із розвиненим панкреатитом, яким трансплантували прекондиціоновані МСК пуповини людини, через 3 доби після трансплантації спостерігали чіткі ознаки покращення таких показників: площа ацинусів майже збільшена у 2 рази, а кількість без'ядерних клітин зменшилась у 2,6 рази (таблиця 3.4.).

Через 7 днів після введення вихідних та прекондиціонованих МСК, зникла жирова дистрофія; спостерігалась значна кількість новоутворених судин, що свідчить про активні процеси ангіогенезу в органі. Морфометричний аналіз показав, що регенеративні процеси після трансплантації прекондиціонованих МСК починалися раніше та ефективніше, ніж після трансплантації вихідних МСК. Спостерігалось майже повне відновлення паренхіматозної тканини підшлункової залози, архітекtonіки ациноцитів та їх проліферації. Показник площі ациноцитів у групі вихідних МСК був у 1,6 раза більшим порівняно з позитивним контролем, а в групі з прекондиціонованими клітинами – у 2 рази (таблиця 3.4.). Щодо показника кількості без'ядерних клітин у групі з введеними вихідними МСК, їх кількість була в 3 рази

меншою, а у варіанті з прекондиціонованими клітинами – у 7,5 разів в порівнянні з позитивним контролем, та їх кількість практично відповідала нормі.

На 7 добу за допомогою гістохімічної PAS-реакції відновлення ендокринної частини підшлункової залози також було продемонстровано, відповідно до показників рівня глюкози в крові, які вже відповідали нормі, і за рахунок забарвлення наявного інсуліну в гранулах β -клітин острівців Лангерганса у пурпурний колір, як показано на (рис. 3.18. *в, г*). Таким чином, 7-й день є саме «переломним моментом», коли спостерігається значна різниця між терапевтичною ефективністю трансплантованих вихідних та прекондиціонованих МСК пуповини людини. Через 14 діб в обох варіантах проявів запальних процесів не було виявлено (рис. 3.20).

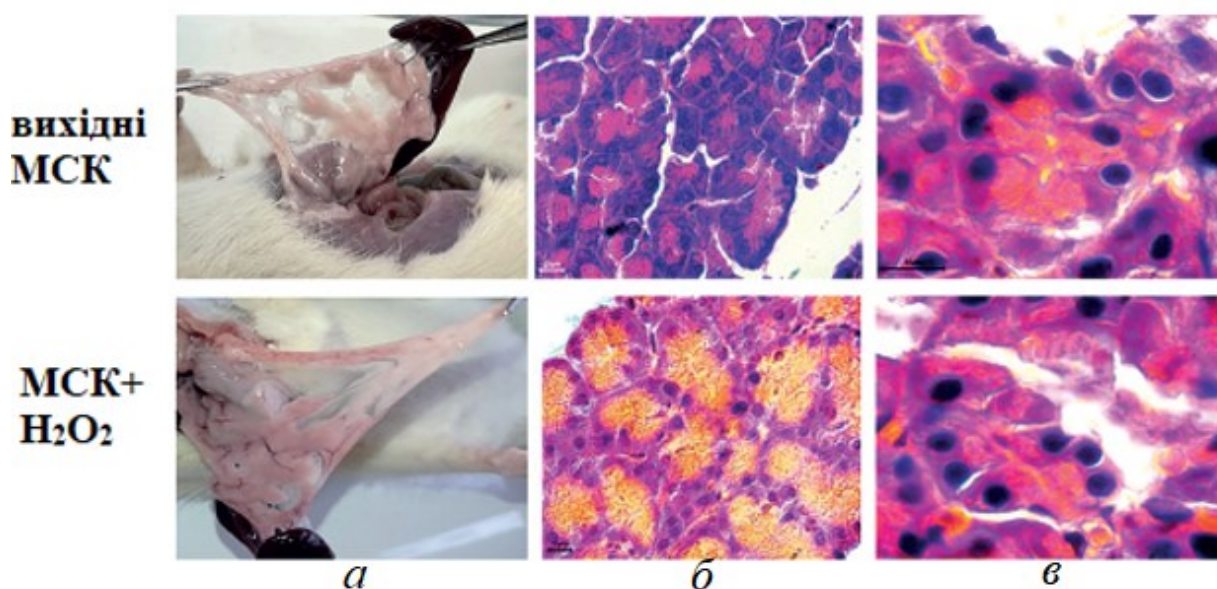


Рис. 3.20. Макро- (*а*) та мікрофотографії (*б, в*) підшлункової залози щура з панкреатитом через 14 днів після трансплантації вихідних та прекондиціонованих МСК пуповини людини. Світлова мікроскопія, забарвлення гематоксиліном та еозином за Бемером (*б, в*). Масштабна шкала – 10 мкм (*б, в*)

Таким чином, на моделі гострого панкреатиту у щурів, індукованого високою дозою L-arg, було продемонстровано терапевтичний ефект МСК пуповини людини, як вихідних, так і прекондиціонованих, що виражається у відновленні структури та функції підшлункової залози. Показано, що прекондиціоновані МСК за допомогою H_2O_2 , демонструють вищу ефективність, про що свідчить прискорене пригнічення

запалення та швидше відновлення морфологічних та функціональних параметрів підшлункової залози. Про це свідчать результати біохімічного, гістологічного та гістохімічного аналізу паренхіми підшлункової залози в процесі її відновлення.

Результати досліджень, поданих в підрозділі, опубліковано в працях:

8. **Pikus P.**, Rymar S., Pustovalov A., Shuvalova N., Reshetnyk Ye., Kordium V. 2023. Comparison of the therapeutic effect of native and preconditioned human umbilical cord-derived multipotent mesenchymal stromal cells on a rat model of acute pancreatitis. *Cell and Organ Transplantology*, 11(2), 104-113. doi.org/10.22494/cot.v11i2.156.
11. **Pikus P.**, Rymar S., Pustovalov A., Kordium V. 2022. Comparative characteristics of the treatment of acute pancreatitis in rats using native and preconditioned human umbilical cord MSCs with hydrogen peroxide. IUBMB–46th FEBS–PABMB Congress, Lisbon, Portugal, V. 12. P 248.

РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Використання будь-яких терапевтичних засобів, в тому числі МСК, для лікування захворювань різного генезу потребує всебічного вивчення їх впливу на захворювання на тваринних моделях. При цьому тварина або має таке саме захворювання, як у людини або подібне до захворювання людини. Використання таких моделей, які імітують захворювання людини, має вирішальне значення для покращення розуміння розвитку та прогресії захворювання у людини і дозволяє дослідникам визначати терапевтичні цілі та тестувати ліки перед тим, як використовувати їх для людини. [269] Такі дослідження стають основою для доклінічних випробувань впливу терапевтичного агента, після яких проводяться клінічні випробування на людях.

Першою задачею наших досліджень стало вивчення можливості відновлення ураження печінки за допомогою МСК пуповини людини. Вибираючи модель захворювання, на якій можна вивчати можливість використання МСК для її лікування, ми брали до уваги актуальність такої задачі. Захворювання печінки різної етіології є глобальною світовою проблемою з 2 мільйонами смертей на рік.

Будь-який шкідливий фактор, що постійно впливає на печінку викликає захворювання, яке називається фіброзом. Якщо причина захворювання не зникає, фіб-роз переходить у тяжке захворювання - цироз печінки. Вивчення складних процесів, що відбуваються під час розвитку фіброзу і цирозу, і можливість терапевтичного впливу на них, потребує адекватних моделей. Зрозуміло, що з точки зору етики неможливо уявити можливість маніпулювати патологічним процесом фіброзу у печінці людини *in vivo*. Саме тому тваринні моделі фіброзу печінки залишаються основним інструментом для вивчення впливу будь-яких терапевтичних агентів. В ході нашого дослідження в якості терапевтичного агенту планувалось використати МСК пуповини людини, вивчити їх вплив на ураження печінки і підібрати метод посилення терапевтичного ефекту шляхом маніпуляцій з МСК. Вибір МСК, які виділяються з пуповини людини, був обумовлений тим, що ці клітини

мають ряд переваг порівняно з МСК виділених з інших тканин. Вони належать до проміжного типу між дорослими та ембріональними стовбуровими клітинами. Дуже важливою для нашого дослідження була низька імуногенність МСК пуповини, що дає можливість використовувати їх для ксеногенної трансплантації, оскільки ми планували роботу з тваринними моделями. Крім того найбільшою мотивацією до використання МСК пуповини були їх високі імуномодельючі властивості, зокрема, високий рівень експресії протизапальних цитокінів *IL-10* та *TGF-β*. [270]

Важливою в нашій роботі була висока швидкість проліферації МСК пуповини, що давало можливість швидко їх масштабувати та одержувати необхідну кількість клітин. Крім того, МСК пуповини людини мають ширший потенціал диференціації, ніж МСК з інших джерел, і диференціюються, в тому числі, і в гепатоцити. [271]

В якості моделі ураження печінки була обрана токсична модель з використанням тетрахлориду вуглецю (CCl_4). Вона є однією з найпоширеніших і найвідоміших з точки зору біохімічних, молекулярних, клітинних і гістологічних змін у печінці. [272]

Згідно одержаних нами даних фіброз печінки почав розвиватись у перші тижні введення CCl_4 , про що свідчили дані гістологічного дослідження і аналіз експресії, зокрема гену *EGF*. Строки розвитку фіброзу і переходу розвиненого фіброзу у цироз співпадали з описаними у протоколі. [273] Треба відмітити, що смертність в ході розвитку ураження печінки була достатньо високою і склала 44%. Через 13 тижнів структура паренхіми печінки мала всі ознаки цирозу, а експресія генів *EGF*, α -*SMA*, *eNOS* та *GFAP* була характерною для ушкодженої печінки. Для вивчення впливу МСК на циротичну печінку було обрано дві форми МСК – суспензія клітин, яку вводили системно, тобто внутрішньовенною ін'єкцією і МСК, що були інкапсульовані в альгінатні капсули і введені інтраперитоніально.

Наші результати трансплантації МСК пуповини людини у щурів із цирозом печінки, індукованим CCl_4 , продемонстрували, що фіброз печінки зникає протягом 13 тижнів після трансплантації, а основні ознаки паренхіми печінки нормалізувалися. Експресія генів, пов'язаних з пошкодженням печінки та розвитком фіброзу, також повертається до рівнів, що спостерігалися у тварин негативного контролю, як після системного введення МСК пуповини людини, так і після інтраперитоніального

введення інкапсульованих МСК. Треба підкреслити, що швидкість відновлення таких параметрів, як накопичення колагену та рівень експресії *EGF*, була вищою при трансплантації інкапсульованих МСК. Через 3 тижні після трансплантації інкапсульованих МСК експресія *EGF* була в 3,4 рази нижчою, ніж після системного введення МСК, експресія α – *SMA* зменшилась в 2 рази, а експресія *eNOS* та *GFAP* повернулась до норми через 3 тижні.

Використання різних шляхів трансплантації дозволяє розглянути різні механізми, що визначають терапевтичні ефекти МСК. Останні дослідження показали, що механізм, який веде до реалізації терапевтичного потенціалу МСК *in vivo*, до кінця не вивчений. Основним фактором, що забезпечує імуномодуючі властивості МСК, вважається їх секретом. Використання культуральних середовищ, кондиціонованих МСК, з терапевтичною метою [274], а також підвищення ефективності МСК під впливом прекондиціонування МСК різними факторами, що модифікують спектр секретованих молекул, підтверджують вирішальну важливість секретом для терапевтичного потенціалу МСК. [275] У даному дослідженні було використано дві форми МСК – суспензію клітин і МСК, що інкапсульовані в альгінатні капсули, і два способи введення МСК – внутрішньовенне введення суспензії клітин і інтраперитонеальне введення інкапсульованих МСК. Це визначило різні механізми впливу на печінку щурів. При внутрішньовенному введенні МСК основна частина клітин захоплюється легеньми і досить швидко зникає. Однак невелика частина трансплантованих клітин все ж таки досягає печінки. Цікаво, що можна вплинути на біорозподіл МСК і зменшити їх кількість в легенях і збільшити в печінці шляхом прекондиціонування МСК деякими цитокінами. [276]

Результати нашого дослідження демонструють практично повну регенерацію печінки, що свідчить про реалізацію терапевтичних властивостей МСК, але як реалізуються протизапальні та регенеративні ефекти МСК в пошкодженій печінці при такій долі трансплантованих МСК залишається неясним. Є відомості про те, що імуномодуючі властивості були виявлені навіть у інактивованих та апоптичних МСК, які більше не секретували білкові молекули, але водночас активували клітини імунної системи, такі як моноцити та макрофаги, завдяки фагоцитозу МСК. [277]

Дослідження з відслідковування долі внутрішньовенно введених МСК показали, що МСК, які потрапили у мікросудини легенів швидко виходять із судин і змішуються з макрофагами, що знаходяться в легенях. Практично половина від введених МСК піддається фагоцитозу. [278] Фагоцитоз макрофагами цілих МСК саме по собі призводить до протизапальної реакції, що ініціюється резидентними макрофагами, які поляризуються в М2 фенотип і інтенсивно експресують протизапальні цитокіни – *IL-10* і *TGF β*. Таким чином, ймовірно при внутрішньовенному введенню саме активація імунних клітин після фагоцитозу МСК призводила до запуску пригнічення запалення печінки і її регенерації.

При інтраперитоніальному введенні інкапсульованих МСК секретовані ними розчинні фактори потрапляла в черевну порожнину, де локалізувалась велика кількість перитонеальних макрофагів. [279] Інкапсульовані МСК секретували розчинні фактори досить тривалий час, принаймні не менше одного місяця (неопубліковані дані).

Численні дослідження показують, що під впливом факторів, які секретуються МСК, макрофаги поляризуються, трансформуючись у протизапальний фенотип М2, пригнічуючи запалення за рахунок підвищення експресії протизапального цитокіну *IL-10* і рецепторів *CD206* і *CD163*. Відомо також, що у відповідь на пошкодження печінки інтраперитоніальні макрофаги швидко вторгаються в уражену тканину печінки. [280] Таким чином, терапевтичний ефект від інтраперитоніально введених інкапсульованих МСК, очевидно, пов'язаний з проникненням поляризованих макрофагів у печінку, хоча не виключена поляризація печінкових макрофагів. Автори дослідження, які вводили інтраперитоніально МСК мишам з індукованим колітом, вважають, що пом'якшення коліту пов'язане з поляризацією тканинних макрофагів під впливом хемокінів, які можуть діяти на тканинні макрофаги на відстані. У нашому дослідженні обидва шляхи трансплантації МСК призводили до майже повного відновлення печінки протягом 13 тижнів, тобто обидва способи доставки забезпечували високий терапевтичний ефект МСК. Водночас при трансплантації інкапсульованих МСК швидкість відновлення таких параметрів, як накопичення колагену, деякі морфометричні характеристики та рівень експресії *EGF*, були

вищими. Мабуть, більш раннє відновлення тканини печінки пов'язане з добре відомими перевагами, які набувають клітини після інкапсуляції. До них відносяться захист від впливу імунної системи та збільшення тривалого виживання МСК, що призводить до пролонгованої секреції паракринних факторів. [243]. Наші результати підтверджують, що інкапсульовані МСК мають підвищену ефективність.

Використання різних шляхів введення МСК на моделях різних захворювань показує неоднозначні результати. Порівняння внутрішньовенного та внутрішньоселезінкового введення МСК демонструвало переваги при внутрішньовенному введенні на моделі фіброзу печінки щурів. [281] В іншому дослідженні інтрапортальне введення МСК було більш ефективним, ніж внутрішньовенне [282] або внутрішньопечінкове та інтраперитоніальне. [283] Вивчення ефективності чотирьох шляхів трансплантації МСК для лікування гострого ураження печінки у щурів не показало істотних відмінностей між ін'єкціями в печінкову артерію, ворітну вену та хвостову вену. [284] Терапевтичний ефект не спостерігався при інтраперитоніальних ін'єкцій МСК з кісткового мозку, на відміну від наших результатів при інтраперитоніальній доставці інкапсульованих МСК пуповини людини, що ще раз підтверджує їх більш високу ефективність у порівнянні з МСК з інших джерел. З 26 клінічних випробувань з лікування цирозу печінки 13 використовують саме МСК пуповини людини (<https://clinicaltrials.gov/>).

На моделі гострого коліту у мишей було показано, що інтраперитоніальний і підшкірний шляхи доставки МСК були більш ефективними, ніж внутрішньосудинні шляхи. [285] Часто системне та місцеве застосування МСК демонструвало майже однакову терапевтичну ефективність, хоча при місцевому застосуванні МСК виживали довше. [286] Вивчення часу виживання МСК при різних шляхах трансплантації показало, що МСК при системному введенні не виявлялися через кілька днів, інтраперитоніальне та підшкірне введення забезпечувало виживання МСК протягом 3-4 тижнів, а після внутрішньом'язового введення клітини виживали протягом більше 5 місяців. [287] Це робить внутрішньом'язове введення МСК перспективною альтернативою внутрішньовенному введенню, особливо при системних захворюваннях. Таким чином, результати численних досліджень

показують, що ефективність МСК залежить від шляху доставки МСК, але вона не буде універсальною для всіх захворювань.

Однією із задач дослідження було підібрати зручну модель для вивчення впливу прекодиціювання МСК різними факторами на їх терапевтичну ефективність таким чином, щоб можна було порівнювати ефективність різних препаратів МСК, наприклад, одержаних в різних умовах, прекодиційованих різними факторами, тощо. В якості такої моделі було вибрано модель гострого перитоніту у мишей. Захворювання викликається інтраперитонеальним введенням розчину протеозного пептону. Вивчення динаміки розвитку запалення показало, що вже через 24 год запалення досягає максимального розвитку. Це дозволило визначити час, коли можна вивчати основні параметри процесу і вплив на нього введення МСК, тому всі експерименти проводились через 24 год після введення протеозного пептону. Вивчення залежності терапевтичного ефекту від дози МСК показало, що він залежить від дози МСК до 5×10^4 клітин/мишу, після чого відбувається насичення, тобто збільшення дози не впливає на терапевтичний ефект, оскільки запалення вже повністю згасає.

Вивчення динаміки розвитку терапевтичної дії МСК після їх інтраперитоніального введення показало, що протизапальний ефект розвивався дуже швидко. Навіть при низькій дозі МСК ($1,65 \times 10^5$ /кг) кількість макрофагів в черевній порожнині значно зменшувалась через 15 хв, але не виходила на норму. Ці результати дозволили припустити, що такі параметри – низька доза МСК і час, коли запалення ще не закінчилось, дадуть змогу порівняти терапевтичну активність різних препаратів МСК. Така можливість дуже важлива, вона, наприклад, допомагає оцінити ефективність МСК після їх виділення, адже донори пуповини різні, стан матеріалу різний. Це зокрема було необхідно для вирішення наступної задачі, а саме порівняння терапевтичної ефективності МСК після прекодиціювання різними факторами. Таким чином, було розроблено швидко і відтворювану тест-систему визначення терапевтичної ефективності МСК *in vivo*.

Одним із ключових моментів терапевтичної ефективності МСК пуповини людини є фагоцитоз перитоніальними макрофагами МСК, що призводить до

поляризації з прозапальних макрофагів - M1 в протизапальні макрофаги - M2, а потім повернення їх до стану спокою - M0, які відповідають нормі. [288]

Як відомо, перитоніальні макрофаги є загальним джерелом макрофагів і їхня основна функція - миттєве реагування на фактори мікросередовища в тканинах, такі як пошкоджені клітини, активовані лімфоцити або продукти життєдіяльності мікробів. Також в різних дослідженнях *in vitro* було показано стимуляцію лігандами Toll-подібних рецепторів (*TLR*), наприклад, активація *TLR-3* на перитоніальних макрофагах сприяє поглинанню бактерій, тоді як активація *TLR-4,5* регулюють фагоцитарну здатність МФ. [193] аналіз клітинної сигналізації, фагоцитоз, продукцію цитокінів та хемокинів. 4. [194]

Перитоніальні макрофаги здатні ділитися на два різних функціональних фенотипа: класично активовані перитоніальні макрофаги 1-го типу (ПМ-1) і альтернативно активовані перитоніальні макрофаги 2-го типу (ПМ-2). [120] ПМ-1 проявляють прозапальну активність і індукуються за допомогою запальних цитокінів [92]. ПМ - 2 беруть участь у протизапальній відповіді шляхом індукції цитокінів, таких як *IL-4*, *IL-13*, *TGF-β* та високої експресії *IL-10*, тим самим пригнічуючи запальні процеси. Крім того, ПМ-2 володіють регенеративною, відновлюючою функцією, здатні до ангіогенезу, імуномодуляції та до фагоцитозу [96]

Полярність ПМ1/ПМ2 відбувається двома антагоністичними шляхами: 1) макрофаги ПМ1 є результатом шляху *iNOS*, який виробляє нитрооксид і NO з аргініну, 2) макрофаги ПМ2 є результатом аргіназного шляху, який виробляє орнітин і поліаміни з аргініну. NO, що виробляється макрофагами M1, бере участь у мікробній активності та інгібуванні проліферації клітин, тоді як орнітин, що виробляється ПМ-2, може підвищувати проліферацію клітин, приймає участь у відновленні та ремоделюванні тканин за допомогою поліамінів. При трансплантації МСК, вони діють як модулятори запальної відповіді та секретують цитокіни та фактори, які можуть індукувати переключення прозапальних макрофагів ПМ-1 на протизапальний фенотип – ПМ-2. Крім того, МСК можуть знижувати прозапальні цитокіни, що секретуються ПМ1. Крім того, було показано, як отримані екзосоми з МСК індукують

поляризацію макрофагів з ПМ-1 у тип ПМ-2, впливаючи на численні захворювання, в тому числі і на гострий перитоніт. [289]

При гострому перитоніті, ПМ-0 (перитоніальні макрофаги в стані спокою) поляризуються в ПМ-1 тим самим активуючи надмірний ендоцитоз для запобігання вивільнення шкідливих речовин для запобігання патологічного прогресування перитоніту 41. Повідомляється, що саме *GATA6* грає вирішальну роль у перепрограмуванні диференціації ПМ. Зокрема, інгібування *mTORC2* збільшує експресію *GATA6* у фазі розділення в моделі перитоніту, індукованого зимозаном 45. Таким чином, *mTORC2* відіграє вирішальну роль у регуляції диференціації та метаболічному перепрограмуванню з ПМ – 0 у ПМ-1. В одній із робіт *in vitro* було показано, що перитоніальні макрофаги в стані спокою M0 (ПМ-0) були додані в ексудат мишей з розвиненим перитонітом, і їх кількість різко зросла, що свідчить про перепрограмування ПМ-0 у ПМ-1. [290]

Результати нашої роботи показують, після перитонеальної ін'єкції протеозного пептону мишам, у тварин розвивається гостре стерильне запалення черевної порожнини. Будь-яке запалення характеризується, тим, що в ексудаті мишей виявляється велика кількість клітин білої крові (нейтрофілів, еозинофілів, перитоніальних макрофагів), що у 7-10 разів перевищувала норму. Основний відсоток складають макрофаги. Таким чином введення МСК в перитоніальну порожнину призводить до безпосередньої їх взаємодії з макрофагами, тобто аналогія моделі взаємодії МСК і макрофагів, яку вивчали *in vitro* шляхом прямого співкультивування МСК і макрофагів. В нашому випадку фактично присутній фізичний контакт макрофагів і МСК, але *in vivo*, коли на клітини впливають сигнали організму.

Нашою задачею було вивчення цієї взаємодії в динаміці. Головними ознаками поляризації макрофагів є підвищення експресії *IL-10* і вплив на інтенсивність фагоцитозу. ЗТ-ПЛР показала, що експресія *IL-10* знаходиться на низькому рівні в момент інтенсивного запалення, а фагоцитарний індекс різко зріс у порівнянні з негативним контролем.

Через 15 хвилин після введення низьких доз МСК пуповини людини мишам з розвиненим гострим перитонітом, кількість перитоніальних макрофагів в ексудаті

тварин почала поступово зменшуватися, але фагоцитарна активність дещо зросла як у варіанті з висхідними МСК, так і у варіанті з прекондиціонованими МСК (H_2O_2) порівнюючи з ПМ-1, також спостерігалось значне зменшення загального пулу запальних клітин та кількості перитоніальних макрофагів у групі тварин з прекондиціонованими МСК. Через 4 год, після введення двох варіантів МСК було продемонстровано різке зменшення як загальної кількості пулу запальних клітин, так і кількості перитоніальних макрофагів. Фагоцитарний індекс також знизився, що свідчить про пригнічення запального процесу в черевній порожнині. Через 48 годин фагоцитарний індекс відповідав нормі, кількість перитоніальних макрофагів була така ж як у негативного контролю, це свідчить, що ПМ-2 поляризувались у ПМ-0. Вважається, що як тільки перитоніальні макрофаги завершують процес фагоцитозу, вони покидають запалену тканину через лімфатичний дренаж і мігрують в лімфоїдні органи, де вони представляють антигени, і тільки невелика популяція, якщо така є, локально гине в результаті апоптозу. [291]

Через 15 хвилин після введення вихідних та прекондиціонованих МСК пуповини людини мишам, експресія *IL-10* різко зросла, у порівнянні з групою мишей з гострим перитонітом (рис. 3.10). При цьому у варіанті з прекондиціонованими МСК рівень експресії був достовірно вищий, ніж у варіанті з вихідними МСК. У сукупності з даними з фагоцитозу це свідчить, про те, що прозапальні ПМ-1 під впливом МСК пуповини людини поляризувались у антизапальний фенотип ПМ-2, і у варіанті з прекондиціонованими МСК процес відновлення відбувався швидше, ніж у групі з вихідними МСК. Таким чином, при введенні МСК в черевну порожнину, як і в дослідженні взаємодії МСК і стимульованих γ -інтерфероном макрофагів *in vitro* результатом взаємодії перитоніальних макрофагів і МСК є їх поляризація, яка і забезпечує терапевтичний ефект МСК, тільки в нашому варіанті макрофаги були стимульовані запаленням. [292]

Отже, завдяки такому складному молекулярному механізму впливу МСК на поляризацію перитоніальних макрофагів з одного типу в інший, призводить до їх терапевтичного ефекту проти багатьох захворювань. Результати нашого дослідження демонструють, що прекондиціоновані МСК (H_2O_2) пуповини людини швидше

поляризують ПМ1 у ПМ2 порівнюючи з вихідними МСК за допомогою імуномодуючих медіаторів, що беруть участь у відновленні та регенерації стану черевної порожнини до гострого перитоніту, і регулюють імунну відповідь та стимулюють до експресії *IL-10* та інших протизапальних цитокінів. МСК однозначно індукують поляризацію макрофагів до протизапального фенотипу ПМ-2, а потім до перитоніальних макрофагів у стані спокою.

Вивчення основних характеристик розвитку терапевтичного ефекту МСК на гостре запалення черевної порожнини дало можливість розробити спосіб швидкого і достовірного визначення терапевтичної ефективності МСК, який дає змогу порівнювати як терапевтичну ефективність різних препаратів МСК, так і вплив на неї різних факторів, визначаючи найбільш ефективні. Очевидно, що можливість такого порівняння дуже важлива, якщо планується використання препаратів МСК в регенеративній медицині. Розроблений нами тест дав можливість порівняти ефективність прекодиціонування МСК різними факторами в однакових умовах. Як виявилось, прекодиціонування МСК пероксидом водню виявилось самим ефективним у пригнічення запалення та відновлення черевної порожнини. Результати з ефективності прекодиціонування МСК H_2O_2 підтверджені у наших експериментах з динаміки розвитку терапевтичного ефекту, з вивчення впливу такого прекодиціонування на поляризацію перетоніальних макрофагів. Що стосується впливу прекодиціонування аскорбіною кислотою та мелатоніном, не дивлячись на багато публікацій про покращення властивостей МСК після прекодиціонування МСК цими речовинами у випадку гострого запалення черевної порожнини ми не спостерігали їх однозначного впливу на терапевтичну ефективність МСК. [293]

Оскільки найбільш ефективним методом підвищення терапевтичного потенціалу МСК на моделі перитоніту, де МСК безпосередньо контактували з макрофагами, було прекодиціонування низькими дозами H_2O_2 було поставлено задача порівняти терапевтичний ефект прекодиціонованих H_2O_2 і вихідних МСК на більш складній моделі, на який можна одержати результати, які можна використати при лікуванні людини. Для порівняння терапевтичної ефективності прекодиціонованих та вихідних МСК було обрано модель дуже серйозного захворювання, яке

розповсюджене і призводить до тяжких наслідків у людей – модель гострого панкреатиту у щурів.

На сьогоднішній день у світі проводиться низка доклінічних досліджень із застосування МСК у лікуванні гострого та хронічного панкреатиту.

Зокрема, показано, що після введення щурам МСК значно зменшувалася тяжкість захворювання, що підтверджувалося зниженням біохімічних показників ліпази та амілази та прозапальних факторів (*TNF- α* , *IL-1 β* та *IL-6*) у плазмі крові. І навпаки, рівні протизапальних факторів *IL-4* та *IL-10* були значно підвищені. [294] В нашому експерименті спостерігалось зниження рівня амілази після трансплантації МСК, і швидше рівень амілази знижувався у варіанті з прекондиціонованими H_2O_2 МСК (рис 3.13).

Ряд досліджень на щурах показали, що якщо розвиток гострого панкреатиту призводив до некрозу паренхіми, то після трансплантації МСК у щурів з ГП спостерігалось зниження апоптозу клітин, активація ангіогенезу за рахунок індукції експресії *HO-1*. [295] Ми також показали, що вже через 3 доби після введення щурам МСК істотно зменшилися гіперемія та набряк тканини підшлункової залози тварин, паренхіматозні крововиливи, інфільтрація запальних клітин, некроз та апоптоз ацинарних клітин, а через 7 днів ознаки запалення практично зникли у варіанті з трансплантованими прекондиціонованими МСК пуповини людини. Наші дані узгоджуються з результатами Ліе Ниа та його колегами, які в ході патогістологічного аналізу показали, що після введення МСК пуповини людини некротичні ділянки в паренхімі підшлункової залози щурів зменшуються в 2 рази, а апоптоз панкреатоцитів знижується майже в 2,5 рази порівняно з гострим панкреатитом. [296]

Важливо, що МСК, трансплантовані щурам із гострим панкреатитом, регулюють секрецію факторів росту *Ang-1*, *VEGF*, фактора росту гепатоцитів (*HGF*) і *TGF- β* через сигнальний шлях *SDF-1/CXCR4*, що веде до активації ангіогенезу в пошкодженій паренхімі підшлункової залози. [297] Наявність активного ангіогенезу після трансплантації МСК підтверджено нашими результатами.

Ми показали, що введення МСК пригнічує інфільтрацію запальних клітин (моноцитів і макрофагів). Відомо, що запальні клітини пригнічують активність

зірчастих клітин підшлункової залози, що призводить до зниження експресії білка α -*SMA* та фіброзу підшлункової залози. [298] Наші результати демонструють, що фіброз колагену починає зменшуватися після введення вихідних МСК, а після трансплантації попередньо кондиціонованих МСК кількість позаклітинного матриксу (ЕЦМ) повертається до норми через 7 днів (Таблиця 3.2).

Трансплантація МСК знижує секрецію колагену, який є основним компонентом позаклітинного матриксу. Це призводить до зникнення фіброзу підшлункової залози. Таким чином, трансплантація МСК відновлює як структуру паренхіми підшлункової залози, так і її функцію, знижуючи рівень альфа-амілази в крові щурів і забезпечуючи функціонування островців Лангерганса, як показано в нашій роботі.

На сьогоднішній день вже є достатня кількість робіт, які підтверджують, що може виникнути цукровий діабет III типу, причиною якого можуть бути екзокринні захворювання підшлункової залози, в тому числі гострий і хронічний панкреатит. [299] У нашій роботі така ж клінічна картина спостерігається після індукції L-арг, коли через 3 доби після гістохімічного методу PAS-реакції виявлено порушення функції бета-клітин островців Лангерганса та підвищення на рівня глюкози в крові щурів. За останні 10 років у світі почали вивчати вплив МСК на панкреатит на тваринних моделях, викликаний високою дозою L-арг, церулеїну тощо, і з того часу МСК продемонстрували позитивні результати у зменшенні не тільки пошкодження екзокринної частини залози, а й до ендокринної частини. [300] Саме імуномодулююча дія МСК і, зокрема, їхня здатність зменшувати активацію імунної системи, зменшує вироблення власних антитіл проти β -клітин підшлункової залози, блокуючи таким чином їх дегенерацію. Багато авторів досліджували цю можливість, і вони повідомили про зміну моделі експресії цитокінів з прозапальних (таких як *TNF- α* та *IL-2*) на протизапальну в Т-клітинах, отриманих від діабетичних щурів, яким трансплантували МСК. Крім того, було показано, що трофічні фактори, що вивільняються МСК, включаючи *IL-6*, *IL-11*, *IGF-1* та *VEGF*, а також екзосоми захищають залишкові ендокринні β -клітини підшлункової залози та стимулюють їх регенерацію завдяки проангіогенним властивостям МСК, можна припустити, що в нашій роботі через 7 діб після трансплантації вихідних і прекодиціонованих МСК

пуповини людини спостерігалось відновлення β -клітин підшлункової залози та синтезу інсуліну саме за рахунок цього механізму. [301]

Отже, на моделі гострого панкреатиту у щурів індукованого L- арг і відтвореною всією клінічною картиною захворювання, було показано, що трансплантація МСК пуповини прекондиціоновані низькою дозою H_2O_2 забезпечують більш високу швидкість відновлення усіх показних як екзокринної, так і ендокринної частини підшлункової залози щурів вже на 7-му добу експерименту у порівнянні з 14-ю добою в групі щурів, яким вводили вихідні МСК пуповини людини. Таким чином, прекондиціонування МСК H_2O_2 підсилює терапевтичний ефект МСК, що проявляється у більш високій швидкості відновлення підшлункової залози. Дослідження впливу прекондиціонованих H_2O_2 МСК на гострий панкреатит підтвердило одержані на моделі гострого перетоніту дані про підвищення терапевтичного потенціалу МСК шляхом прекондиціонування низькими концентраціями пероксиду водню.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі отримано нові дані, що стосуються можливості значного підсилення терапевтичної ефективності мезенхімальних стовбурових клітин пуповини людини шляхом прекодиціонування низькими дозами H_2O_2 та інкапсуляції МСК в альгінатні капсули, що доведено на трьох тваринних моделях запальних захворювань, розроблено біотехнологічні аспекти швидкого та ефективного способу визначення та порівняння *in vivo* терапевтичного потенціалу різних препаратів МСК.

1. Показано, що МСК пуповини людини ефективно відновлюють печінку у щурів з цирозом, що індукований CCl_4 . Відновлення відбувається швидше та ефективніше при трансплантації МСК, які інкапсульовані в альгінатні капсули, про що свідчать швидкість відновлення морфометричних показників паренхіми печінки, швидкість зменшення інтенсивності фіброзу, повернення до норми рівня експресії генів *EGF*, *α -SMA*, *eNOS*, *GFAP*.

2. На моделі стерильного запалення черевної порожнини (перитоніту) у мишей показано можливість підвищення терапевтичного потенціалу МСК за рахунок експериментально підібраних оптимальних доз вихідних та прекодиціонованих H_2O_2 МСК, визначено динаміку розвитку терапевтичного ефекту, яка відображає його прискорення після введення прекодиціонованих МСК пуповини людини.

3. На основі даних з впливу дози МСК на терапевтичний ефект з пригнічення запалення черевної порожнини у мишей та його динаміку було розроблено ефективну модель для відпрацювання *in vivo* оптимізації модифікацій МСК з метою підвищення терапевтичного потенціалу МСК, визначення та порівняння терапевтичної ефективності різних препаратів МСК.

4. З використанням розробленої моделі було вивчено дію різних факторів на терапевтичний потенціал МСК. Показано, що найбільш ефективним у пригніченні запалення та відновленні черевної порожнини є прекодиціонування МСК H_2O_2 ($30\mu\text{M}$). Результати з дослідження динаміки розвитку терапевтичного ефекту та

впливу прекондиціонування МСК H_2O_2 на поляризацію перитоніальних макрофагів підтверджують ефективність такого прекондиціонування.

5. Показано, що трансплантація МСК пуповини людини у черевну порожнину мишей пригнічує її запалення за рахунок поляризації інтраперитоніальних макрофагів з прозапального фенотипу M1 в протизапальний фенотип M2, про що свідчать зростання рівня експресії *IL 10* та посилення фагоцитарної активності макрофагів. Ці процеси відбуваються ефективніше при введенні МСК, що прекондиціоновані H_2O_2 .

6. На моделі гострого панкреатиту у щурів, індукованого високими дозами L-аргініну, показано, що трансплантація МСК пуповини, які прекондиціоновані низькою дозою H_2O_2 , призводить до відновлення як екзокринної, так і ендокринної функцій підшлункової залози щурів вже на 7-му добу експерименту у порівнянні з 14-ю добою в групі щурів, яким вводили вихідні МСК пуповини людини, що підтверджує значне підсилення терапевтичної ефективності МСК шляхом прекондиціонування H_2O_2 .

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Friedenstein, A. J., Chailakhyan, R. K., Latsinik, N. V., Panasyuk, A. F., & Keiliss-Borok, I. V. (1974). Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation*, 17, 331–340.
2. Kolf, C. M., Cho, E., & Tuan, R. S. (2007). Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: Regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther*, 9(1), 204-214. doi: 10.1186/ar2116
3. Dominici, M., Le Blanc, K., & Mueller, I. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 28(4), 315-322. doi: 10.1080/14653240600855905
4. Rohn, W., Tang, L. P., Dong, Y., & Benveniste, E. N. (1999). IL-1 beta inhibits IFN-gamma-induced class II MHC expression by suppressing transcription of the class II transactivator gene. *J Immunol*, 162, 886–896.
5. Chan, J. L., Tang K. C., Patel, A.P., Bonilla, L.M., Pierobon, N., & Ponzio, N. M. (2006). Anti- gen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon-gamma. *Blood*, 107, 4817–4841.
6. Otten, L. A., Steimle, V., Bontron, S., & Mach, B. (1998). Quantitative control of MHC class II expression by the transactivator CIITA. *Eur J Immunol*, 28, 473–481.
7. Kuçi, Z., Piede, N., Vogelsang, K., Pfeffermann, L. M., Wehner, S., Salzmann-Manrique, E.,... Kuçi, S. (2024). Expression of HLA-DR by mesenchymal stromal cells in the platelet lysate era: an obsolete release criterion for MSCs? *J Transl Med*. 9(22), 39-52. doi: 10.1186/s12967-023-04684-5
8. Ortiz, L. A., Gambelli, F., & McBride, C. (2003). Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(14), 8407-8411. doi: 10.1073/pnas.1432929100

9. Sanchez-Ramos, J., Song, S., & Cardozo-Pelaez, F. (2000). Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol*, 164(2), 247-256. doi: org/10.1006/exnr.2000.7389.
10. Deng, W., Obrocka, M., Fischer, I., & Prockop, D. J. (2001). In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. *Bio-chem Biophys Res Commun*, 282(1), 148-152. doi: 10.1006/bbrc.2001.4570
11. Sato, Y., Araki, H., Kato, J., Nakamura, K., Kawano, Y., Kobune, M., ... Niitsu, Y. (2005). Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood*, 106(2), 756 –763. doi: 10.1182/blood-2005-02-0572
12. Caplan, A.I., & Dennis, J.E. (2006). Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem*, 98(5), 1076–1084. doi: 10.1002/jcb.20886
13. Prockop, D.J. (2009). Repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSC): controversies, myths, and changing paradigms. *Mol.Ther*, 17 (6), 939-946. doi: 10.1038/mt.2009.62
14. Meirelles, S., Fontes, A.M., Covas, D.T., & Caplan, A.I. (2009). Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev*, 20, 419-427. doi: 10.1016/j.cytogfr.2009.10.002
15. Kim, M.J., Kim, Z.H., & Kim, S.M. (2016). Conditioned medium derived from umbilical cord mesenchymal stem cells regenerates atrophied muscles. *Tissue Cell*, 48(5), 533–43.
16. Shen, C., Lie, P., & Miao T. (2015) Conditioned medium from umbilical cord mesenchymal stem cells induces migration and angiogenesis. *Mol Med Rep*. 12(1). 20–30.
17. Sriramulu, S., Banerjee, A., Di Liddo, R., Jothimani, G., Gopinath, M., Murugesan, R., ... Pathak, S. (2018). Review on Clinical Applications of Conditioned Medium Derived from Human Umbilical Cord-Mesenchymal Stem Cells (UC-MSCs). *International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research*, 12(3), 230-234.
18. Ozkan, S., Isildar, B., Ercin, M., Gezginci-Oktayoglu, S., Konukoglu, D., Neşetoğlu, N., ... Koyuturk, M. (2022). Therapeutic potential of conditioned medium

obtained from deferoxamine preconditioned umbilical cord mesenchymal stem cells on diabetic nephropathy model. *Stem Cell Res Ther.*, 13(1), 438 - 448. doi: 10.1186/s13287-022-03121-6

19. Milwid, J.M., Ichimura, T., Li, M., Jiao, Y., Lee, J., Yarmush, J., ... Yarmush, M. L. (2012) Secreted Factors from Bone Marrow Stromal Cells Upregulate IL-10 and Reverse Acute Kidney Injury. *Stem Cells Int.*, 19, 1-12. doi.org/10.1155/2012/392050

20. Caplan, A.I. (1991). Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, 9(5), 641-691. doi: 10.1002/jor.1100090504

21. Bianco, P., Robey, P.G., & Simmons, P.J. (2008). Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell*, 2, 313–319. doi: 10.1016/j.stem.2008.03.002

22. Andrzejewska, A., Lukomska, B., & Janowski, M. (2019). Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: From Roots to Boost. *Stem Cells*, 37(7), 855-864. doi: 10.1002/stem.3016

23. Marofi, F., Vahedi, G., & Farshdousti Hagh, M. (2019). Mesenchymal stem cells as the game-changing tools in the treatment of various organs disorders: mirage or reality? *J Cell Physiol.*, 234, 1268–1356. doi.org/10.1002/jcp.27152

24. Ahani-Nahayati, M., Solali, S., Shams Asenjan, K., Movassaghpour Akbari, A.A., Talebi, M., Zadi Heydarabad, M., ... Farshdousti Hagh, M. (2018). Promoter methylation status of survival-related genes in MOLT- 4 cells co-cultured with bone marrow mesenchymal stem cells under hypoxic conditions. *Cell J.*, 20, 88-94.

25. Tavakoli, S., Ghaderi Jafarbeigloo, H.R., Shariati, A., Jahangiryan, A., Jadidi, F., Jadidi Kouhbanani, M.A., ... Naimi, A. (2020). Mesenchymal stromal cells; a new horizon in regenerative medicine. *J Cell Physiol.* 235, 9185–9206. doi.org/10.1002/jcp.29803

26. Mushahary, D., Spittler, A., & Charwat, V. (2018). Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytom Part A.*, 93, 19–31. doi.org/10.1002/cyto.a.23242

27. Shariati, A., Nemati, R., Sadeghipour, Y., Yaghoubi, Y., Baghbani, R., Javidi, K., ... Hassanzadeh, A. (2020). Mesenchymal stromal cells (MSCs) for neurodegenerative

disease: a promising frontier. *Eur J Cell Biol.* 99(6), 1-18. doi.org/10.1016/j.ejcb.2020.151097

28. Fan, X-L., Zhang, Y., & Fu, Q-L. (2020). Mechanisms underlying the protective effects of mesenchymal stem cell-based therapy. *Cell Mol Life Sci.*, 77, 1–24.

29. Friedenstein, A., Piatetzky-Shapiro, I., & Petrakova, K. (1966). Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Development*, 16, 381–390.

30. Stefańska, K., Bryl, R., & Dyszkiewicz-Konwińska, M. (2020). Mesenchymal stem cells—a historical overview. *Med J Cell Biol.*, 8, 83–87. doi.org/10.2478/acb-2020-0010

31. Tavakoli, S., Ghaderi Jafarbeiglou, H.R., Shariati, A., Jahangiryan, A., Jadidi, F., Jadidi Kouhbanani, M.A., ... Naimi, A. (2020). Mesenchymal stromal cells; a new horizon in regenerative medicine. *J Cell Physiol.*, 235(9), 185–210. doi.org/10.1002/jcp.29803

32. Baghaei, K., Hashemi, S.M., & Zali, M.R.(2017). Isolation, differentiation, and characterization of mesenchymal stem cells from human bone marrow. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench.*, 10, 208–213.

33. Hu, M.S., Borrelli, M.R., & Wan, D.C. (2018). Mesenchymal stromal cells and cutaneous wound healing: a comprehensive review of the background, role, and therapeutic potential. *Stem Cells Int.*, 2018, 1-13. doi: 10.1155/2018/6901983

34. Samadi, P., Saki, S., & Sheykhhasan, M. (2021). Therapeutic applications of mesenchymal stem cells: a comprehensive review. *Curr Stem Cell Res Ther.*, 16(3), 323-353. doi: 10.2174/1574888X15666200914142709

35. Markov, A., Thangavelu, L., Aravindhan, S., Zekiy, A., Jarahian, M., Stanley Chartrand M., ... Hassanzadeh, A. (2021). Mesenchymal stem/stromal cells as a valuable source for the treatment of immune-mediated disorders. *Stem Cell Res Ther.* 12(1), 192-218. doi: 10.1186/s13287-021-02265-1

36. Leist, M., Bremer, S., Brundin, P., Hescheler, J., Kirkeby, A., Krause, K.H., ... Schrattenholz, A. (2008). The biological and ethical basis of the use of human embryonic stem cells for in vitro test systems or cell therapy. *ALTEX*, 25, 163-190.

37. Hentze, H., Loong Soong, P. & Ray Dunn, N. (2009). Teratoma formation by human embryonic stem cells: evaluation of essential parameters for future safety studies. *Stem Cell Res.*, 2(3), 198-210. doi: 10.1016/j.scr.2009.02.002
38. Graichen, R., Xu, X., Braam, S.R., Balakrishnan, T., Norfiza, S., Sieh, S., ... Colman, A. (2007). Enhanced cardiomyogenesis of human embryonic stem cells by a small molecular inhibitor of p38 MAPK. *Differentiation*, 76, 357-370.
39. Sedivy-Haley, K. (2019). Stem cell treatments: Miracle cures or dangerous experiments? *The Conversation*, 19, 1-6.
40. Marofi, F., Vahedi, G., Hasanzadeh, A., Salarinasab, S., Arzhanga, P., Khademi, B., Farshdousti Hagh, M. (2019). Mesenchymal stem cells as the game-changing tools in the treatment of various organs disorders: mirage or reality? *J Cell Physiol.*, 234, 1268–1288. doi.org/10.1002/jcp.27152
41. Ahani-Nahayati, M., Solali, S., Shams Asenjan, K., Movassaghpour Akbari, A.A., Talebi, M., Zadi Heydarabad, M., ... Farshdousti Hagh, M. (2018). Promoter methylation status of survival-related genes in MOLT- 4 cells co-cultured with bone marrow mesenchymal stem cells under hypoxic conditions. *Cell J.* 20, 188–194.
42. Mushahary, D., Spittler, A., & Charwat, V. (2018). Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytom Part A.* 93, 19–31. doi.org/10.1002/cyto.a.23242
43. Volarevic, V., Gazdic, M., & Arsenijevic, N. (2017). Mesenchymal stem cell-derived factors: immuno-modulatory effects and therapeutic potential. *Biofactors*, 43, 633–644. doi.org/10.1002/biof.1374
44. Marofi, F., Hassanzadeh, A., ... Farshdousti Hagh, M. (2019). Epigenetic mechanisms are behind the regulation of the key genes associated with the osteoblastic differentiation of the mesenchymal stem cells: the role of zoledronic acid on tuning the epigenetic changes. *J Cell Physiol.* 234, 108–122. doi.org/10.1002/jcp.28152
45. Markov, A., Thangavelu, L., Aravindhan, S., Zekiy, A., Jarahian, M., Chartrand, D., ..., Hassanzadeh, A. (2021). Mesenchymal stem/stromal cells as a valuable source for the treatment of immune-mediated disorders. *Stem Cell Research & Therapy*, 12(192), 1-30. doi.org/10.1186/s13287-021-02265-1

46. Duijvestein, M., Vos, A.C., Roelofs, H., Wildenberg, M.E., Wendrich, B.B., Verspaget, H.W., ... Fidder, H.H. (2010). Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment for refractory luminal Crohn's disease: results of a phase I study. *Gut*, 59, 1662–1669. doi: 10.1136/gut.2010.215152
47. Baksh, D., Yao, R., & Tuan, R.S. (2007). Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells*, 25, 1384–1392. doi: 10.1634/stemcells.2006-0709
48. Mueller, S.M., & Glowacki, J. (2001). Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. *J Cell Biochem*, 82, 583–590. doi: 10.1002/jcb.1174
49. Nagamura-Inoue, T., & He, H. (2014). Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility. *World J Stem Cells*, 6(2), 195–202. doi: 10.4252/wjsc.v6.i2.195
50. Semenov, O., Koestenbauer, S. & Malek, A. (2012). Multipotent mesenchymal stem cells from human placenta: Critical parameters for isolation and maintenance of stemness after isolation. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 202(2), 191 – 193.
51. Ilancheran, S., & Moodley, Y. (2009). Manuelpillai Human fetal membranes: A source of stem cells for tissue regeneration and repair? *Placenta*, 30, 2 – 10.
52. McElreavey, K.(1991). Isolation, culture and characterisation of fibroblast-like cells derived from the wharton's jelly portion of human umbilical cord. *Biochem. Soc. Trans.*, 19(1), 29 - 42. doi: 10.1042/bst019029s
53. Shalini, V., Wein, F., & Ho, A. (2012). Generation and characterization of human mesenchymal stem cells derived from umbilical and placenta. *Regenerative Research*, 1(1), 48 - 57.
54. Conconi, M., Liddo, R. & Parnigotto, P. (2011). Phenotype and Differentiation Potential of Stromal Populations Obtained from Various Zones of Human Umbilical Cord: An Overview. *The Open Tissue Engineering & Regenerative Medicine Journal*, 4, 6 - 20. doi: 10.2174/1875043501104010006

55. Choudhery, M., Badowski, M., & Harris, D. (2013). Comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose and cord tissue. *Cytotherapy*, 15(3), 30-343. doi.org/10.1016/j.jcyt.2012.11.010
56. Ganguly, P., El-Jawhari, J., ... Jones, E. (2017). Age-related Changes in Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells: A Potential Impact on Osteoporosis and Osteoarthritis Development. *Cell Transplantation*, 26(3), 1520-1529. doi.org/10.1177/0963689717721
57. Arutyunyan, I., Elchaninov, A., & Fatkhudinov, T. (2016). Umbilical cord as prospective source for mesenchymal stem cell-based therapy. *Stem Cells Int.*, 5, 1-14. doi.org/10.1155/2016/6901286
58. Li, X., Bai, J., & Wang, Y. (2014). Comprehensive characterization of four different populations of human mesenchymal stem cells as regards their immune properties, proliferation and differentiation. *Int J Mol Med.*, 34, 695–704. doi: 10.3892/ijmm.2014.1821
59. Drobiova, H., Sindhu, S., & Madhoun, A. (2023). Wharton's jelly mesenchymal stem cells: a concise review of their secretome and prospective clinical applications. *Front. Cell Dev. Biol.*, 11, 1-5. doi.org/10.3389/fcell.2023.1211217
60. Mushahary, D., Spittler, A., & Charwat, V. (2018). Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytom. A* 93(1), 19–31. doi:10.1002/cyto.a.23242
61. Fong, C. Y., Tam, K., Cheyyatraivendran, S., Gan, S. U., Gauthaman, K., ... Armugam, A. (2014). Human Wharton's jelly stem cells and its conditioned medium enhance healing of excisional and diabetic wounds. *J. Cell Biochem.* 115(2), 290–302. doi:10.1002/jcb.24661
62. Wang, X., Lan, ... Liu, X. (2008). Identification of mesenchymal stem cells in aorta-gonad-mesonephros and yolk sac of hu-man embryos. *Blood*, 111, 2436–2443. doi: 10.1182/blood-2007-07-099333
63. Taghizadeh, R., Cetrulo, K., & Cetrulo, C. (2011). Wharton's jelly stem cells: future clinical applica-tions. *Placenta*, 32, 311–315. doi: 10.1016/j.placenta.2011.06.010
64. Meyer, T., Pfeifroth, A., & Hocht, B. (2008). Isolation, and characterization of mesenchymal stem cells in Wharton's jelly of the human umbilical cord: potent cells for

cell-based therapies in paediatric surgery. *European Surgery*, 40, 239–244. doi:10.1007/s10353-008-0417-x

65. Angelucci, S., Marchisio, M., Giuseppe F. D., & Eleuterio, E. (2010). Proteome analysis of human Wharton's jelly cells during in vitro expansion. *Proteome Science*, 8, 18–25. doi: 10.1186/1477-5956-8-18

66. Anzalone, R., Lo Iacono, M., ... La Rocca, G. (2010). New emerging potentials for human Wharton's jelly mesenchymal stem cells: immunological features and hepatocyte-like differentiative capacity. *Stem Cells Dev*, 19(4), 423-438. doi: 10.1089/scd.2009.0299

67. Domínguez, L., Fiore, E., & Mazzolini, G. (2022). Generation and characterization of human mesenchymal stem/stromal cells for cell therapy applications. *Methods in Cell Biology*, 170, 189-202. doi.org/10.1016/bs.mcb.2022.02.014

68. Gauthaman, K., Fong, C., & Suganya, C. (2012). Extraembryonic human Wharton's jelly stem cells do not induce tumorigenesis, unlike human embryonic stem cells. *Reproductive Biomedicine Online*, 24, 235–246.

69. Wang, Y., Han, Z., & Ma, J. (2012). A toxicity study of multiple-administration human umbilical cord mesenchymal stem cells in cynomolgus monkeys. *Stem Cells and Development*, 21(9), 1401–1408. doi: 10.1089/scd.2011.0441

70. Ding, D., Shyu, W., & Chu, T. (2012). Human umbilical cord mesenchymal stem cells support non-tumorigenic expansion of human embryonic stem cells. *Cell Transplantation*, 21(7), 1515-1527. doi: 10.3727/096368912X647199

71. Prasanna, S., & Jahnavi, V. (2011). Wharton's jelly mesenchymal stem cells as off-the -shelf cellular therapeutics: A closer look into their regenerative and immunomodulatory properties. *Open Tissue Eng. Regen. Med. J.*, 4, 28–38.

72. Weiss, M., Anderson, C., ... McIntosh, K. (2008). Immune properties of human umbilical cord wharton's jelly-derived cells. *Stem Cells*, 26, 2865–2874. doi: 10.1634/stemcells.2007-1028

73. Bandekar, M., Maurya, D., & Sandur, S. (2020). Xenogeneic transplantation of human WJ-MSCs rescues mice from acute radiation syndrome via Nrf-2-dependent

regeneration of damaged tissues. *Am J Transplant*, 20(8), 2044-2057. doi: 10.1111/ajt.15819

74. Thi-Tung Dang, L., Tu Bui, ... Phan, N. (2016). Xenotransplantation of human umbilical cord derived stem cells for treatment of type 1 diabetes mellitus in mice. *Biomedical Research and Therapy*, 3(12), 1018-1033. doi: 10.15419/bmrat.v3i12.140

75. Deuse, T., Stubbendorff, M., ... Volk, H. (2011). Immunogenicity and immunomodulatory properties of umbilical cord lining mesenchymal stem cells. *Cell Transplant.*, 20, 655–666. doi: 10.3727/096368910X536473

76. Prasanna, S., Gopalakrishnan, D., & Vasandan, A. (2010). Pro-inflammatory cytokines, IFN γ and TNF α , influence immune properties of human bone marrow and Wharton jelly mesenchymal stem cells differentially. *PLoS One*, 5(2), 1-16. doi: 10.1371/journal.pone.0009016

77. Cho, P., Messina, D., ... Huang, C. (2008). Immunogenicity of umbilical cord tissue derived cells. *Blood*, 111, 430–438. doi: 10.1182/blood-2007-03-078774

78. Bongso, A., & Fong, C. (2013). The Therapeutic Potential, Challenges and Future Clinical Directions of Stem Cells from the Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord. *Stem Cell Rev.*, 9(2), 226-240. doi: 10.1007/s12015-012-9418-z.

79. Keating, A. (2012). Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell Stem Cell*, 10(6), 709–716. doi: 10.1016/j.stem.2012.05.015

80. Prockop, D., & Oh, J. (2012). Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs):role as guardians of inflammation. *Mol. Ther.*, 20, 14–20 doi: 10.1038/mt.2011.211

81. Aderem, A., & Ulevitch, R. (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406, 782–787. doi.org/10.1038/35021228

82. Nemeth, K., Mayer, B., & Mezey, E. (2010). Modulation of bone marrow stromal cell functions in infectious diseases by toll-like receptor ligands. *J Mol Med.*, 88, 5–10

83. Raicevic, G., Rouas, R., ... Lagneaux, L. (2010). Inflammation modifies the pattern and the function of Toll-like receptors expressed by human mesenchymal stromal cells. *Hum. Immunol.*, 71, 235–244. doi: 10.1016/j.humimm.2009.12.005

84. Dash, S., Gupta, S., & Sarangi, P. (2024). Monocytes and macrophages: Origin, homing, differentiation, and functionality during inflammation. *J. Immunology*, 10(8), 1-15. doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e29686
85. Murray, P. (2017). Macrophage polarization. *Annu. Rev. Physiol.*, 79, 541–566. doi:10.1146/annurev-physiol-022516-034339
86. Zhang, F., Hao, Y., & Li, J. (2024). Interplay between mesenchymal stem cells and macrophages: Promoting bone tissue repair. *World J Stem Cells*, 16(4): 375-388. doi: 10.4252/wjsc.v16.i4.375
87. Kim J, Hematti P. (2021). Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages. *Exp Hematol.*, 37(12), 1445-53. doi: 10.1016/j.exphem.2009.09.004
88. Eggenhofer, E., & Hoogduijn, M. (2012). Mesenchymal stem cell-educated macrophages. *Transplant Res* 1, 1-12. doi.org/10.1186/2047-1440-1-12
89. Shin, R., Lee, C., & Lee O. (2021). The Crosstalk between Mesenchymal Stem Cells and Macrophages in Bone Regeneration: A Systematic Review. *Stem Cells Int.*, 2021, 1-18. doi: 10.1155/202188351560
90. Deng, Y., Zhang, Y., & Chen, G. (2016). Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells instruct monocytes towards an IL10 producing phenotype by secreting IL6 and HGF. *Sci Rep.*, 6(1), 1-9. doi: 10.1038/srep375669
91. Vasandan, A., Jahnavi, S., & Shashank, C. (2016). Human Mesenchymal stem cells program macrophage plasticity by altering their metabolic status *via* a PGE₂-dependent mechanism. *Sci Rep.*, 6, 1236-1241. doi.org/10.1038/srep38308
92. Manferdini, C., Paoletta, F., & Filardo, G. (2017). Adipose stromal cells mediated switching of the pro-inflammatory profile of M1-like macrophages is facilitated by PGE₂: in vitro evaluation. *Osteoarthritis Cartilage*, 25, 1161–1171. doi: 10.1016/j.joca.2017.01.011
93. Robertson, I., & Rifkin, D. (2013). Unchaining the beast; insights from structural and evolutionary studies on TGFβ secretion, sequestration, and activation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 24, 355–372. doi: 10.1016/j.cytogfr. 2013.06.003.

94. Liu, F., Qiu, H., ... Xu, J. (2019). MSC-secreted TGF-beta regulates lipopolysaccharide-stimulated macrophage M2-like polarization via the Akt/FoxO1 pathway. *Stem Cell Res. Ther.*, 10, 345-353. doi: 10.1186/s13287-019-1447-y.
95. Sala, E., Genua, M., ... Cibella, J. (2015). Mesenchymal stem cells reduce colitis in mice via release of TSG6, independently of their localization to the intestine. *Gastroenterology* 149, 163–176. doi: 10.1053/j.gastro.2015.03.013
96. Luque-Campos, N., Bustamante-Barrientos ,F., Pradenas, C., García, C., Araya, M., Bohaud, C., ... Vega-Letter, A. (2021). The Macrophage Response Is Driven by Mesenchymal Stem Cell-Mediated Metabolic Reprogramming. *Front Immunol.*, 4(12), 624-646. doi: 10.3389/fimmu.2021
97. Song, N., Scholtemeijer, M., & Shah, K. (2020). Mesenchymal Stem Cell Immunomodulation: Mechanisms and Therapeutic Potential. *Trends Pharmacol Sci.* 41(9), 653-664. doi: 10.1016/j.tips.2020.06.009
98. Prasanna, S. (2016). Human mesenchymal stem cells program macrophage plasticity by altering their metabolic status via a PGE2-dependent mechanism. *Sci Rep*, 6, 383-408. doi: 10.1038/srep38308
99. Stevens, H., Bowles, A., & Roy, K. (2020). Molecular Crosstalk Between Macrophages and Mesenchymal Stromal Cells. *Front Cell Dev Biol.*, 9(8), 1-15. doi: 10.3389/fcell.2020.600160
100. Jackson, M., Morrison, T., & Kissenpfennig, A. (2016). Mitochondrial transfer via tunneling nanotubes is an important mechanism by which mesenchymal stem cells enhance macrophage phagocytosis in the in vitro and in vivo models of ARDS. *Stem Cells*, 34, 2210–2223. doi: 10.1002/stem.2372
101. Morrison, T., Jackson, M., & O’kane, C. (2017). Mesenchymal stromal cells modulate macrophages in clinically relevant lung injury models by extracellular vesicle mitochondrial transfer. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 196, 1275–1286. doi:10.1164/rccm.201701-0170OC
102. Nakajima, H., Uchida, K., & Takeura, N. (2012). Transplantation of mesenchymal stem cells promotes an alternative pathway of macrophage activation and

functional recovery after spinal cord injury. *J. Neurotrauma* 29, 1614–1625. doi: 10.1089/neu.2011.2109

103. Zhou, H., Zhang, X., Zhang, M., Yan, Z., Xu, Z., and Xu, R. (2016). Transplantation of human amniotic mesenchymal stem cells promotes functional recovery in a rat model of traumatic spinal cord injury. *Neurochem.Res.*, 41, 2708–2718. doi: 10.1007/s11064-016-1987-9

104. Wang, J., Liu, L., Ren, H. (2021). Mesenchymal stem cell secreted prostaglandin E2 ameliorates acute liver failure via attenuation of cell death and regulation of macrophage polarization. *Stem Cell Res. Ther.*, 12(15) 1-10. doi: 10.1186/s13287-020-02070-2

105. Jin, L., Deng, Z., Zhang, J., Yang, C., Liu, J., Han, W., ... Chen, G. (2019). Mesenchymal stem cells promote type 2 macrophage polarization to ameliorate the myocardial injury caused by diabetic cardiomyopathy. *J Transl Med.*, 17(1), 251-260. doi: 10.1186/s12967-019-1999-8

106. Dayan, V., Yannarelli, G., & Keating, A. (2011). Mesenchymal stromal cells mediate a switch to alternatively activated monocytes/macrophages after acute myocardial infarction. *Basic Res Cardiol*, 106, 1299–1310. doi: 10.1007/s00395-011-0221-9

107. Miteva, K., Pappritz, K., & Tschöpe C. (2017). Mesenchymal stromal cells modulate monocytes trafficking in coxsackievirus b3-induced myocarditis. *Stem Cells Transl Med.*, 6, 1249–1261. doi: 10.1002/sctm.16-035358

108. Krasnodembskaya, A., Samarani, G., & Lee J. (2012). Human mesenchymal stem cells reduce mortality and bacteremia in gram-negative sepsis in mice in part by enhancing the phagocytic activity of blood monocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*, 302, 1003–1113. doi: 10.1152/ajplung.00180

109. Luk, F., de Witte, S., & Strini, T. (2016). Inactivated mesenchymal stem cells maintain immunomodulatory capacity. *Stem Cells Dev.* 25, 1342–1354. doi: 10.1089/scd.2016.0068

110. de Witte, S., Luk, F., Parraga, J., Garghesha, M., Merino, A., Korevaar, S., ... Hoogduijn, M. (2018). Immunomodulation By Therapeutic Mesenchymal Stromal Cells

(MSC) Is Triggered Through Phagocytosis of MSC By Monocytic Cells. *Stem Cells*, 36(4), 602-615. doi: 10.1002/stem.2779

111. Weiss, A., & Dahlke, M. (2019). Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells (MSCs): Mechanisms of Action of Living, Apoptotic, and Dead MSCs. *Front Immunol.*, 10, 1191-1200. doi: 10.3389/fimmu.2019.01191

112. Lu, W., Fu, C., & Chen Z. (2013). Exposure to supernatants of macrophages that phagocytized dead mesenchymal stem cells improves hypoxic cardiomyocytes survival. *Int J Cardiol.*, 65, 333–40. doi: 10.1016/j.ijcard.2012.03.088

113. Gao, F., Chiu, S., Motan, D., Zhang, Z., Chen, L., Ji, H., & Lian, Q. (2016). Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell Death Dis.*, 7(1), 1-11. doi: 10.1038/cddis.2015.327

114. Schmidt, A., Zhang, X., & Gabrielsson, S. (2016). Human macrophages induce CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells viabinding and re-release of TGF- β . *Immunol. Cell Biol.* 94, 747–762. doi: 10.1038/icb.2016.34

115. Ko, J., Kim, H., & Oh, J. (2020). Mesenchymal stem and stromal cells harness macrophage-derived amphiregulin to maintain tissue homeostasis. *Cell Rep.*, 30, 3806-3820. doi: 10.1016/j.celrep.2020.02

116. Liu, X., Wei, Q., Lu, L., Cui, S., Ma, K., Zhang, W., & Zhang, C. (2023). Immunomodulatory potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: Targeting immune cells. *Front Immunol.*, 14, 1-11. doi: 10.3389/fimmu.2023.1094685

117. Lee, B., Kang, I., & Yu, K. (2021). Therapeutic Features and Updated Clinical Trials of Mesenchymal Stem Cell (MSC)-Derived Exosomes. *J Clin Med.*, 10(4), 711-720. doi: 10.3390/jcm10040711

118. Du, T., Ju, G., Zhou, J., Zhong, L., Rong, L., Chen, W., ... Ji, T. (2021). Microvesicles derived from human umbilical cord mesenchyme promote M2 macrophage polarization and ameliorate renal fibrosis following partial nephrectomy via hepatocyte growth factor. *Hum Cell.*, 34(4), 1103-1113. doi: 10.1007/s13577-021-00525-z

119. Zhang, N., Luo, Y., & Shao, J. (2022). Exosomes Derived from Mesenchymal Stem Cells Ameliorate the Progression of Atherosclerosis in ApoE^{-/-}Mice via FENDRR. *Cardiovasc Toxicol.*, 22(6), 528-544. doi: 10.1007/s12012-022-09736-8

120. Teo, K., Zhang, S., Loh, J., Lai, R., Hey, H., Lam, K., ... Toh, W. (2023). Mesenchymal Stromal Cell Exosomes Mediate M2-like Macrophage Polarization through CD73/Ecto-5'-Nucleotidase Activity. *Pharmaceutics*, 15(5), 1489-1495. doi: 10.3390/pharmaceutics15051489
121. Wang, J., Xia, J., & Shu, Q. (2020). Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles alter disease outcomes via endorsement of macrophage polarization. *Stem Cell Res Ther.*, 11(1), 424-430. doi: 10.1186/s13287-020-01937-8
122. Baharloo H, Salehi Z, Minbashi Moeini M, Rezaei N, Azimi M. Immunomodulatory Potential of Human Mesenchymal Stem Cells and their Exosomes on Multiple Sclerosis. *Adv Pharm Bull.* 2022 Mar;12(2):389-397. doi: 10.34172/apb.2022.038
123. Shan, X., Luo, Y., Chang, J., & Zhao, L. (2023). Immunomodulation: The next target of mesenchymal stem cell-derived exosomes in the context of ischemic stroke. *World J Stem Cells*, 15(3), 52-70. doi: 10.4252/wjsc.v15.i3.52
124. Meng, H., Cheng, W., & Lu, Z. (2022). Mesenchymal stem cell exosomes in the treatment of myocardial infarction: A systematic review of preclinical in vivo studies. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, 15, 317-339. doi: 10.1007/s12265-021-10168-y
125. Bhat, A., Malik, A., & Chand, S. (2024). Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: Recent therapeutics and targeted drug delivery advances. *Journal of Extracellular Biology*, 3, 15-26. doi.org/10.1002/jex2.156
126. Najar, M., Krayem, M., Merimi, M., Burny, A., Meuleman, N., Bron, D., ... Lagneaux, L. (2018). Insights into inflammatory priming of mesenchymal stromal cells: functional biological impacts. *Inflamm Res.*, 67(6), 467-477. doi: 10.1007/s00011-018-1131
127. Hu, C., & Li, L. (2018). Preconditioning influences mesenchymal stem cell properties in vitro and in vivo. *Cell Mol Med.*, 22(3), 1428-1442. doi: 10.1111/jcmm.13492
128. Showalter, M., Wancewicz, B. Fiehn, O., Archard, J., Clayton, S., Wagner, J., .. Anderson, J. (2019). Primed mesenchymal stem cells package exosomes with metabolites associated with immunomodulation. *Biochem Biophys Res Commun.*, 512(4), 729-735. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.03.119

129. Didamoony, M., Soubh, A., & Ahmed, L. (2023). Innovative preconditioning strategies for improving the therapeutic efficacy of extracellular vesicles derived from mesenchymal stem cells in gastrointestinal diseases. *Inflammopharmacology*, 31(6), 2973-2993. doi: 10.1007/s10787-023-01350-6.
130. Long, R., & Wang, S. (2024). Exosomes from preconditioned mesenchymal stem cells: Tissue repair and regeneration. *Regenerative Therapy*, 25, 355-366. doi: 10.1016/j.reth.2024.01.009
131. Yang, Z., Liang, Z., Rao, J., Xie, H., Zhou, M., Xu, X., ... Chen, C. (2024). Hypoxic-preconditioned mesenchymal stem cell-derived small extracellular vesicles promote the recovery of spinal cord injury by affecting the phenotype of astrocytes through the miR-21/JAK2/STAT3 pathway. *CNS Neurosci Ther.*, 30(3), 144-148. doi: 10.1111/cns.14428
132. Leibacher J., & Henschler, R. (2016). Biodistribution, migration and homing of systemically applied mesenchymal stem/stromal cells. *Stem Cell Res Ther.*, 7(7) doi: 10.1186/s13287-015-0271-2
133. Mujib, U., Avnesh, S. & Thakor, A. (2019). Mesenchymal Stromal Cell Homing: Mechanisms and Strategies for Improvement. *J. iScience*, 15, 421-438.
134. Braid, L., & Ford, B. (2023). Intramuscular administration potentiates extended dwell time of mesenchymal stromal cells compared to other routes. *Cytotherapy*, 20(2), 232-244. doi.org/10.1016/j.jcyt.2017.09.013
135. Braid, L., Hu, W., & Nagata, L. (2016). Engineered mesenchymal cells improve passive immune protection against lethal Venezuelan equine encephalitis virus exposure. *Stem Cells Transl Med.*, 5, 1026-1035. doi: 10.5966/sctm.2015-0341
136. Von Bahr, L., Batsis, I., & Le Blanc, K. (2012). Analysis of tissues following mesenchymal stromal cell therapy in humans indicates limited long-term engraftment and no ectopic tissue formation. *Stem Cells*, 30, 1575 – 1578. doi: 10.1002/stem.1118
137. Lindolfo, S., Meirelles, A., & Caplan, I. (2015). In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 26, (9), 2287 – 2299. doi: 10.1634/stemcells

138. Mao, C, Hou, X, & Zhang C. (2017). Intramuscular injection of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells improves cardiac function in dilated cardiomyopathy rats. *Stem Cell Res Ther.*, 8(1), 1-18.
139. Bir A, Zisa, D, & Lee T. (2009). Heart failure therapy mediated by the trophic activities of bone marrow mesenchymal stem cells: a noninvasive therapeutic regimen. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 296(6), 1888–1897. doi.org/10.1152/ajpheart.00186.2009
140. Kupcova SH. (2013). Proteomic techniques for characterisation of mesenchymal stem cell secretome. *Biochimie*, 95(12), 2196–2211. doi: 10.1016/j.biochi.2013.07.015
141. Crisostomo, P., Wang, Y., & Meldrum, D. (2008). Human mesenchymal stem cells stimulated by TNF- α , LPS, or hypoxia produce growth factors by an NF κ B-but not JNK-dependent mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol.*, 294(3), 675–82. doi: 10.1152/ajpcell.00437.2007
142. Caplan, A., & Dennis, J. (2006). Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem.*, 98(5), 1076–84. doi: 10.1002/jcb.20886
143. Wenqing, L., Xiaozhen, C., & Xuerong, C. (2021). Mesenchymal stem cells as a double-edged sword in tumor growth: focusing on MSC-derived cytokines. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 26(3), 1-25.
144. Naoaki Sakata, Shoichiro Sumi, Gumpei Yoshimatsu, Masafumi Goto, Shinichi Egawa, Michiaki Unno, Encapsulated islets transplantation: Past, present and future. *World J Gastrointest Pathophysiol* 2012 February 15; 3(1): 19-26. doi.org/10.3727/096368910X514297
145. Meirigeng Qi Transplantation of Encapsulated Pancreatic Islets as a Treatment for Patients with Type 1 Diabetes Mellitus *Advances in Medicine Volume 2014* (2014), Article ID 429710, 15 pages doi.org/10.1155/2014/429710
146. M. Farina, J.F. Alexander, U. Thekkedath, M. Ferrari, A. Grattoni. Cell encapsulation: overcoming barriers in cell transplantation in diabetes and beyond, 2019, *Adv Drug Deliv Rev*, 139, pp. 92-115.
147. K. Zhanga, J. J. Hopkinsc, Jeffrey S. Heierd, David G. Birche, Lawrence S. Halperin Ciliary neurotrophic factor delivered by encapsulated cell intraocular implants for

treatment of geographic atrophy in age-related macular degeneration *BMC Biotechnol* 2010 2;10:19.

148. Current Development in Encapsulated Cell Therapy for Degenerative Retinopathies Francisca S.Y. Wong and Amy C.Y. Lo *Current Tissue Engineering* Volume 5, Issue 1, P 30 - 38 2016

149. Orive G, Santos-Vizcaino E, Pedraz JL, Hernandez RM, Vela Ramirez JE, Dolatshahi-Pirouz A, Khademhosseini A, Peppas NA, Emerich DF. 3D cell-laden polymers to release bioactive products in the eye. *Prog Retin Eye Res.* 2019 Jan;68:67-82. doi: 10.1016/j.preteyeres.2018.10.002.

150. Wahlberg LU, Lind G, Almqvist PM, Kusk P, Tornøe J, Juliusson B, Söderman M, Selldén E, Seiger Å, Eriksdotter-Jönhagen M, Linderöth B. Targeted delivery of nerve growth factor via encapsulated cell biodelivery in Alzheimer disease: a technology platform for restorative neurosurgery. *J Neurosurg.* 2012 Aug;117(2):340-7. doi: 10.3171/2012.2.JNS11714.

151. Eriksdotter-Jönhagen M, Linderöth B, Lind G, Aladellie L, Almqvist O, Andreassen N, Blennow K, Bogdanovic N, Jelic V, Kadir A, Nordberg A, Sundström E, Wahlund LO, Wall A, Wiberg M, Winblad B, Seiger A, Almqvist P, Wahlberg L. Encapsulated cell biodelivery of nerve growth factor to the Basal forebrain in patients with Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2012;33(1):18-28. doi: 10.1159/000336051.

152. de Vos P.; Hoogmoed C. G.; Busscher H. J. Chemistry and biocompatibility of alginate-PLL capsules for immunoprotection of mammalian cells. *J. Biomed. Mater. Res.* 60(2): 252–259; 2002. doi: 10.1002/jbm.10060

153. Shoichet M. S.; Rein D. H. In vivo biostability of a polymeric hollow fibre membrane for cell encapsulation. *Biomaterials* 17(3): 285–290; 1996. doi: 10.1016/0142-9612(96)85566-9

154. Wu T. J.; Huang H. H.; Hsu Y. M.; Lyu S. R.; Wang Y. J. A novel method of encapsulating and cultivating adherent mammalian cells within collagen microcarriers. *Biotechnol. Bioeng.* 98(3): 578–585; 2007. doi: 10.1002/bit.21452

155. Leal D.; Matsuihiro B.; Rossi M.; Caruso F. FT-IR spectra of alginic acid block fractions in three species of brown seaweeds. *Carbohydr. Res.* 343(2): 308–316; 2008. doi: 10.1016/j.carres.2007.10.016
156. Silva, C., Ribeiro, A., & Veiga, F. (2006). Insulin encapsulation in reinforced alginate microspheres prepared by internal gelation. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 29(2), 148–159. doi: 10.1016/j.ejps.2006.06.008
157. Trouche, E., S. Fullana, G., & Sallerin, B. (2010). Evaluation of Alginate Microspheres for Mesenchymal Stem Cell Engraftment on Solid Organ. *Cell Transplantation*, 19, 1623-1633.
158. Rowley, J., Madlambayan, G., & Mooney, D. (1999). Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials*, 20(1), 45-53. doi: 10.1016/s0142-9612(98)00107-0.
159. Elliot, R., Escobar, L., R., & Bambra, C. (2005). Transplantation of micro- and macroencapsulated piglet islets into mice and monkeys. *Transplant. Proc.*, 37, 466–469.
160. Darrabie, M., Kendall, W., & Opara, C. (2005). Characteristics of Poly-L-Ornithine-coated alginate microcapsules *Biomaterials*, 26(34), 6846-6852. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.05.009
161. Xue, W., Liu, B., Zhang, H., Ryu, S., Kuss, M., Shukla, D., ... Duan, B. (2022). Controllable fabrication of alginate/poly-L-ornithine polyelectrolyte complex hydrogel networks as therapeutic drug and cell carriers. *Acta Biomater.*, 15(138), 182-192. doi: 10.1016/j.actbio.2021.11.004
162. Kim, H., Bae, C., & Kook, Y. (2019). Mesenchymal stem cell 3D encapsulation technologies for biomimetic microenvironment in tissue regeneration. *Stem Cell Res Ther.*, 10(51), 1-15. doi.org/10.1186/s13287-018-1130-8
163. Marikar, L., Osta, A., & Keith, A. (2022). Microencapsulation-based cell therapies. *Cell. Mol. Life Sci.*, 79(351), 351-359. doi.org/10.1007/s00018-022-04369-0
164. Leijds, M., Villafuertes, E., Haeck, J., Koevoet, W., Fernandez-Gutierrez, B., Hoogduijn, M., ... van Osch, G. (2017). Encapsulation of allogeneic mesenchymal stem cells in alginate extends local presence and therapeutic function. *Eur Cell Mater.* 33, 43-58. doi: 10.22203/eCM.v033a04

165. Mao, A., Özkale, B., Shah, N., Vining, K., Descombes, T., Zhang, L., ... Mooney, D. (2019). Programmable microencapsulation for enhanced mesenchymal stem cell persistence and immunomodulation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 116(31), 15392-15397. doi: 10.1073/pnas.1819415116
166. Alagpulinsa, D., Cao, J., & Sremac, M. (2019). Alginate-microencapsulation of human stem cell-derived beta cells with CXCL12 prolongs their survival and function in immunocompetent mice without systemic immunosuppression. *Am. J. Transplant.*, 19, 1930–1940. doi: 10.1111/ajt.15308
167. Huang, Y., Li, X., & Yang, L. (2022) Hydrogel Encapsulation: Taking the Therapy of Mesenchymal Stem Cells and Their Derived Secretome to the Next Level. *Front. Bioeng. Biotechnol. Biomaterials*, 10, 10-24. doi.org/10.3389/fbioe.2022.859927
168. Levit, R., Landázuri, N., & Phelps, E. (2013). Cellular Encapsulation Enhances Cardiac Repair. *Journal of the American Heart Association*, 2(5), 367-375. doi: 10.1161/JAHA.113.000367
169. Ghanta, R., Aghlari-Fotovat, S., Pugazenthi, A., Ryan, C., Singh, V., Mathison, M., ... Veis, O. (2020). Immune-modulatory alginate protects mesenchymal stem cells for sustained delivery of reparative factors to ischemic myocardium. *Biomater Sci.*, 8(18), 5061-5070. doi: 10.1039/d0bm00855a
170. Khayambashi, P., Iyer, J., & Simon, D. (2020). Hydrogel Encapsulation of Mesenchymal Stem Cells and Their Derived Exosomes for Tissue Engineering. *Sci. Eng.*, 6, 1590–1602. doi: 10.3390/ijms22020684
171. Li, W., Liu, Y., Zhang, P., Tang, Y., Zhou, M., Jiang, W., ... Zhou, Y. (2018). Tissue-Engineered Bone Immobilized with Human Adipose Stem Cells-Derived Exosomes Promotes Bone Regeneration. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 10, 5240–5254.
172. Yang, S., Zhu, B., & Wen, N. (2020). Integration of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Derived Exosomes with Hydroxyapatite-Embedded Hyaluronic Acid-Alginate Hydrogel for Bone Regeneration. *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 6, 1590–1602.
173. Park, H., Chugh, R., Seok, J., Cetin, E., Mohammed, H., Siblini, H., ... Al-Hendy, A. (2023). Comparison of the therapeutic effects between stem cells and exosomes

in primary ovarian insufficiency: as promising as cells but different persistency and dosage. *Stem Cell Res Ther.*, 14(1), 165-174. doi: 10.1186/s13287-023-03397-2

174. Khayambashi, P., Iyer, J., & Tran, S. (2021). Hydrogel Encapsulation of Mesenchymal Stem Cells and Their Derived Exosomes for Tissue Engineering. *Int J Mol Sci.*, 22(2), 673-684. doi: 10.3390/ijms22020684

175. Xie, Y., Guan, Q., Guo, L., Chen, Y., Yin, Y., Han, X., ... Takeno, H. (2022). Hydrogels for Exosome Delivery in Biomedical Applications Gels, 8(6), 328-340. doi: 10.3390/gels8060328

176. Lopez-Mendez, T., Santos-Vizcaino, E., & Orive, E. (2021). Cell microencapsulation technologies for sustained drug delivery: Clinical trials and companies. *Drug Discovery Today*, 26(3), 852-861. doi.org/10.1016/j.drudis.2020.11.019

177. Li, W., Liu, Y., Zhang, P., Tang, Y., Zhou, M., Jiang, W., ... Zhou, Y. (2018). Tissue-Engineered Bone Immobilized with Human Adipose Stem Cells-Derived Exosomes Promotes Bone Regeneration. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 10, 5240–5254.

178. Akbari, A., Jabbari, N., Sharifi, R., Ahmadi, M., Vahhabi, A., Seyedzadeh, S., ... Rezaie, J. (2020). Free and hydrogel encapsulated exosome-based therapies in regenerative medicine. *Life Sci.*, 249, 417-447. doi: 10.1016/j.lfs.2020.117447

179. Yang, S., Zhu, B., & Wen, N. (2020). Integration of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem CellsDerived Exosomes with Hydroxyapatite-Embedded Hyaluronic Acid-Alginate Hydrogel for Bone Regeneration. *ACS Biomater.Sci. Eng.*, 6, 1590–1602.

180. Liu, X., Yang, Y., Li, Y., Niu, X., Zhao, B., Wang, Y., ... Zhu, L. (2017). Integration of stem cell-derived exosomes within situ hydrogel glue as a promising tissue patch for articular cartilage regeneration. *Nanoscale*, 9, 4430–4438.

181. Zhang, C., Zhou, X., & Su, L. (2023). Hydrogel-Loaded Exosomes: A Promising Therapeutic Strategy for Musculoskeletal Disorders. *Journal of Clinical Pharmacy and therapeutics*, 36, 1-16. doi.org/10.1155/2023/1105664

182. Zhang, K., Zhao, X., Chen, X., Wei, Y., Du, W., Wang, Y., ... Kong, D. (2018). Enhanced Therapeutic Effects of Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes with an

Injectable Hydrogel for Hindlimb Ischemia Treatment. *ACS Appl. Mater.Interfaces*, 10, 30081–30091

183. Han, C., Zhou, J., & Wang, J. (2019). Delivery of miR-675 by stem cell-derived exosomes encapsulated in silk fibroin hydrogel prevents aging-induced vascular dysfunction in mouse hindlimb. *Mater. Sci. Eng.*, 99, 322–332.

184. Kim, D., Lee, J., & Yi, Y. (2020). Mesenchymal Stem/Stromal Cell-Derived Exosomes for Immunomodulatory Therapeutics and Skin Re-generation. *Cells*, 9, 150-157

185. Yang, S., Chen, S., & Tan, Y. (2023). Enhanced therapeutic effects of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles within chitosan hydrogel in the treatment of diabetic foot ulcers. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 34, 23-43. doi.org/10.1007/s10856-023-06746-y

186. Amini, H., Namjoo, A., Narmi, T., Mardi, N., Ozra, N., Natouri, A., ...Khosrowshahi, N., ... Rahbarghazi, R. (2023). Exosome-bearing hydrogels and cardiac tissue regeneration. *Biomaterials Research*, 27(99), 1-12. doi.org/10.1186/s40824-023-00433-3

187. Ravi, K., Ghanta¹, I., Aghlara-Fotovat, S., Pugazenth, A., Ryan, C., Megumi, V., ... Veis, O. (2020). Immune-Modulatory Alginate Protects Mesenchymal Stem Cells for Sustained Delivery of Reparative Factors to Ischemic Myocardium. *Biomater Sci.*, 8(18): 5061–5070. doi:10.1039/d0bm00855a

188. Han, C., Zhou, J., Liang, C., Liu, B., Pan, X., Zhang, Y., ... Li, Y. (2019). Human umbilical cord mesenchymal stem cell derived exosomes encapsulated in functional peptide hydrogel promote cardiac repair. *Biomaterials Science*, 7, 1-15. doi:10.1039/c9bm00101h)

189. Guo, L., Du, J., Yuan, D., Zhang, Y., Zhang, S., Zhang, H., ... Huang, H. (2020). Optimal H₂O₂ preconditioning to improve bone marrow mesenchymal stem cells' engraftment in wound healing. *Stem Cell Res Ther.*, 11(1), 421-434. doi: 10.1186/s13287-020-01910-5

190. Doorn J, Moll G, Le BK, van BC, de BJ: Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells: paracrine effects and potential improvements. *Tissue Eng Part B Rev* 2012;18:101–115.
191. Schäfera, R., Spohna, G., & Baer, P. (2016). Mesenchymal Stem/Stromal Cells in Regenerative Medicine: Can Preconditioning Strategies Improve Therapeutic Efficacy? *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 43, 256–267. doi: 10.1159/000447458
192. DelaRosa, O., Dalemans, W., & Lombardo, E. (2012). Toll-like receptors as modulators of mesenchymal stem cells. *Frontiers in immunology*, 3, 1-22. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00182>
193. DelaRosa, O., & Lombardo, E. (2010). Modulation of adult mesenchymal stem cells activity by toll-like receptors: implications on therapeutic potential. *Mediators of Inflammation*, 2010, 865-890. doi: 10.1155/2010/865601.
194. Gholizadeh-Ghaleh, S., Alipour, S., & Golchin, A. (2021). Critical roles of TLRs on the polarization of mesenchymal stem cells for cell therapy of viral infections: a notice for COVID-19 treatment. *Comparative Clinical Pathology*, 30, 119-128. doi.org/10.1007/s00580-021-03209-0
195. Shirjang, S., Mansoori, B., & Shamsasenjan, K. (2017). Toll-like receptors as a key regulator of mesenchymal stem cell function: An up-to-date review. *Cell Immunology*, 315, 1-10. doi: 10.1016/j.cellimm.2016.12.005
196. Rosova, I., Dao, M., & Nolte, J. (2008). Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 26, 2173–2182
197. Zhang, W., Liu, L., & Wang, Y. (2014). Hypoxia-pretreated human MSCs attenuate acute kidney injury through enhanced angiogenic and antioxidative capacities. *Biomed Res Int.*, 2014, 462-472. doi: 10.1155/2014/462472
198. Overath, J., Gauer, S., Obermüller, N., Schubert, R., Schäfer, R., Geiger, H., ... Baer, P. (2016). Short-term preconditioning enhances the therapeutic potential of adipose-derived stromal/stem cell-conditioned medium in cisplatin-induced acute kidney injury. *Exp Cell Res.*, 342, 175–183.

199. Jianyang, L., Jialin, H., Yan, H., Lite, G., Han, X., Liuwang, Z. ... Zhiping, H. (2021). Hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells attenuate microglial pyroptosis after intracerebral hemorrhage. *Annal of Transplantation Medicine*, 9(17), 2590-2611. doi: 10.21037/atm-21-25
200. Beegle, J., Lakatos, K., & Fierro, F. (2015). Hypoxic preconditioning of mesenchymal stromal cells induces metabolic changes, enhances survival, and promotes cell retention in vivo. *Stem Cells*, 33, 1818–1828. doi: 10.1002/stem.1976
201. Bruno, S., Grange, C., Collino, F., Deregibus, M., Cantaluppi, V., Biancone, L., ... Camussi, G. (2012). Microvesicles derived from mesenchymal stem cells enhance survival in a lethal model of acute kidney injury. *PLoS ONE*, 7(3), 331-351. doi: 10.1371/journal.pone.0033115
202. Haider, H., & Ashraf, M. (2010). Preconditioning and stem cell survival. *J Cardiovasc Transl Res.*, 3(2), 89–102. doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112026
203. Amiri, F., Jahanian-Najafabadi, A., & Roudkenar, M. (2015). In vitro augmentation of mesenchymal stem cells viability in stressful microenvironments: in vitro augmentation of mesenchymal stem cells viability. *Cell Stress Chaperones.*, 20(2), 237–51. doi.org/10.1007/s12192-014-0560-1
204. Haider, H., & Ashraf, M. (2008). Strategies to promote donor cell survival: combining preconditioning approach with stem cell transplantation. *J Mol Cell Cardiol.*, 45(4), 554–66. doi.org/10.1016/j.yjmcc.2008.05.004
205. Chen, J., Crawford, R., & Chen, C. (2013). The key regulatory roles of the PI3K/Akt signaling pathway in the functionalities of mesenchymal stem cells and applications in tissue regeneration. *Tissue Eng Part B Rev.*, 19(6), 516–28. doi: 10.1089/ten.TEB.2012.0672
206. Liu, J., & Finkel, T. (2013). Stem cells and oxidants: too little of a bad thing. *Cell Metab.*, 18(1), 1–18. doi: 10.1016/j.cmet.2013.06.007
207. Marquez-Curtis, L., & Janowska-Wieczorek, A. (2013). Enhancing the migration ability of mesenchymal stromal cells by targeting the SDF-1/CXCR4 axis. *Biomed Res Int.*, 2013, 561-598. doi.org/10.1155/2013/561098

208. Liu, X., Duan, B., & Cheng, Z. (2011). SDF-1/CXCR4 axis modulates bone marrow mesenchymal stem cell apoptosis, migration and cytokine secretion. *Protein Cell*, 2(10), 845–854. doi: 10.1007/s13238-011-1097-z
209. Srijaya, T., Ramasamy, T., & Kasim, N. (2014). Advancing stem cell therapy from bench to bedside: lessons from drug therapies. *J Transl Med.*, 12, 243-251. doi: 10.1186/s12967-014-0243-9
210. Boopathy, A., Pendergrass, K., & Che, P. (2013). Oxidative stress-induced Notch1 signaling promotes cardiogenic gene expression in mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther.*, 4(2), 43-50.
211. Khatlani, T., Algudiri, D., & Alenzi, R. (2018). Preconditioning by hydrogen peroxide enhances multiple properties of human decidua basalis mesenchymal stem/multipotent stromal cells. *Stem Cells Int.*, 2018, 648-673. doi: 10.1155/2018/6480793
212. Holmstrom, K., & Finkel, T. (2014). Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 15(6), 411–421.
213. Lee, B., Ghode, P., & Ong, D. (2019). Redox regulation of cell state and fate. *Redox Biol.*, 25, 56-87. doi: 10.1016/j.redox.2018.11.014
214. Tang, Y., Cai, B., & Yuan, F. (2014). Melatonin pretreatment improves the survival and function of transplanted mesenchymal stem cells after focal cerebral ischemia. *Cell Transplant.* 23, 1279-1291. doi: 10.3727/096368913x667510
215. Lingfei, Z., Chenxia, H., & Jianghua, C. (2020). Melatonin preconditioning is an effective strategy for mesenchymal stem cell-based therapy for kidney disease. *J. of Cellular and Molecular Medicine*, 24(1), 25-33. doi: 10.1111/jcmm.14769
216. Bhatti, F., Mehmood, A., & Latief, N. (2017). Vitamin E protects rat mesenchymal stem cells against hydrogen peroxide-induced oxidative stress *in vitro* and improves their therapeutic potential in surgically-induced rat model of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 25, 321–331. doi.org/10.1111/jcmm.14769
217. Alazab, A., Idiatullina, E., & Hezam, K. (2023). Enhancers of mesenchymal stem cell stemness and therapeutic potency. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 162, 344-356. doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114356

218. Pevsner-Fischer, M., Morad, V., Cohen-Sfady, M., Rousso-Noori, R., Zanin-Zhorov, A., Cohen, S., ... Zipori, D. (2007). Toll-like receptors and their ligands control mesenchymal stem cell functions. *Blood*, 109, 1422-1432. doi: 10.1182/blood-2006-06-028704
219. Yao, Y., Zhang, F., L & Gao, X. (2009). Lipopolysaccharide preconditioning enhances the efficacy of mesenchymal stem cells transplantation in a rat model of acute myocardial infarction. *J Biomed Sci.*, 16, 74-86. doi: 10.1186/1423-0127-16-74
220. Chu, X., Xu, B., Gao, F., Li, B., Liu, Y., Reiter, J., ... Wang, Y. (2019). Lipopolysaccharides Improve Mesenchymal Stem Cell-Mediated Cardioprotection by MyD88 and stat3 Signaling in a Mouse Model of Cardiac Ischemia/Reperfusion Injury. *Stem Cells and Development*, 28(9), 1-15. doi.org/10.1089/scd.2018.0213
221. McGrath-Morrow, S., Lee, S., Gibbs, K., Lopez, A., Collaco, J., Neptune, K., D'Alessio, F. (2015). Immune response to intrapharyngeal LPS in neonatal and juvenile mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.*, 52(3), 323-331. doi: 10.1165/rcmb.2014-0100OC
222. Khoury, M. (2020). Time-dependent LPS exposure commands MSC immunoplasticity through TLR4 activation leading to opposite therapeutic outcome in EAE. *Stem Cell Research & Therapy*, 11(1), 1-9. doi: 10.1186/s13287-020-01840-2
223. Bernardo, M., & Fibbe, W. (2013). Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell*, 13, 392–402. doi: 10.1016/j.stem.2013.09.006
224. Park, H., Kim, C., Lee, S., Ahn, J., Yoon, H., Yoo, M., ... Seo, S. (2023). Priming Mesenchymal Stem/Stromal Cells with a Combination of a Low Dose of IFN- γ and Bortezomib Results in Potent Suppression of Pathogenic Th17 Immunity Through the IDO1-AHR Axis. *Stem Cells*, 41(1), 64-76. doi: 10.1093/stmcls/sxac075
225. Parivar, K., Baharara, J., & Sheikholeslami, A. (2015). Neural differentiation of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells treated with sex steroid hormones and basic fibroblast growth factor. *Cell J.*, 17, 27–36.
226. Serrenho, I., Alves, S., & Baltazar, S. (2024). Preconditioning of MSCs for Acute Neurological Conditions: From Cellular to Functional Impact—A Systematic Review. *Cells*, 13(10), 845-853. doi.org/10.3390/cells13100845

227. Ning, G., Song, W., Xu, H., Zhu, R., Wu, Q., Wu, Y., ... Qu, Z. (2019). Bone marrow mesenchymal stem cells stimulated with low-intensity pulsed ultrasound: Better choice of transplantation treatment for spinal cord injury: Treatment for SCI by LIPUS-BMSCs transplantation. *CNS Neurosci. Ther.*, 25, 496–508. doi: 10.1111/cns.13071
228. Hendijani, F. (2017). Explant culture: An advantageous method for isolation of mesenchymal stem cells from human tissues. *Cell Proliferation*, 50(2), 1-15. doi.org/10.1111/cpr.12334
229. Cohen, J., Zaleski, K., & Yaremchuk, M. (2011). Survival of porcine mesenchymal stem cells over the alginate recovered cellular method. *J Biomed Mater Res A*, 96, 93–102. doi: 10.1002/jbm.a.32961
230. Suvarna, S., Layton, C., & Bancroft, J. (2019). Bancroft's theory and practice of histological techniques. *Elsevier*, 7, 84-95. doi.org/10.1016/B978-0-7020-6864-5.00007-4
231. Sambrook, J., Fritsch, E., & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. *Cold Spring Harbor Lab. Press.*, 1, 568 - 579.
232. Михайлов В. (2009). Методи гістологічного забарвлення. *BioVitrum C*, 1, 1-66.
233. Denis, G. & Baskin, A. (2015). Historical Perspective on the Identification of Cell Types in Pancreatic Islets of Langerhans by Staining and Histochemical Techniques. *J Histochem Cytochem.*, 63(8), 543–558. doi: 10.1369/0022155415589119
234. Cain, D., & O'Koren, E. (2013). Identification of a tissue-specific, C/EBP β -dependent pathway of differentiation for murine peritoneal macrophages. *J. Immunol.*, 191(9), 4665–4675. doi: 10.4049/jimmunol.1300581
235. Chen, H., Weng, I., & Liu, F. (2015). Examination of Galectins in Phagocytosis Methods. *Mol Biol.*, 5, 201–213. doi: 10.1007/978-1-4939-1396-1
236. Kömüves, L., Feren, A., & Fodor, E. (2000). Expression of epidermal growth factor and its receptor in cirrhotic disease. *J Histochem Cytochem.*, 48, 821-830, doi.org/10.1177/002215540004800610
237. Yu, E., Choe, G., & Lee, I. (1993). Expression of alpha-smooth muscle actin in liver diseases. *J Korean Med Sci.*, 8, 367–373. doi.org/10.3346/jkms.1993.8.5.367. 41

238. Carpino, G., Morini, S., Corradini, S., Franchitto, A., Merli, M., Siciliano, M., ... Gaudio, E. (2005). Alpha-SMA expression in hepatic stellate cells and quantitative analysis of hepatic fibrosis in cirrhosis and in recurrent chronic hepatitis after liver transplantation. *Dig Liver Dis.*, 37, 349-356. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2004.11.009>
239. Morini, S., Carotti, S., & Gaudio, E. (2005). GFAP expression in the liver as an early marker of stellate cells activation. *Ital J Anat Embryol.*, 110, 193-207.
240. Tennakoon, A., Izawa, T., Wijesundera, K., Murakami, H., Katou-Ichikawa, C., Tanaka, M., & Yamate, J. (2015). Immunohistochemical characterization of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-expressing cells in a rat liver cirrhosis model induced by repeated injections of thioacetamide (TAA). *Exp Toxicol Pathol.* 67, 53-63. doi.org/10.1016/j.etp.2014.09.008
241. Leung, T., Tipoe, G., ... Nanji, A. (2008). Endothelial nitric oxide synthase is a critical factor in experimental liver fibrosis. *Int J Exp Pathol.* 89, 241–250. doi.org/10.1111/j.1365-2613.2008.00590.x
242. Constandinou, C., Henderson, N., & Iredale, J. (2005). Modeling liver fibrosis in rodents. *Methods Mol Med.*, 117, 237-250. doi.org/10.1385/1-59259-940-0:237.
243. Kim, J., & Hematti, P. (2009). Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages. *Exp Hematol.*, 37(12), 1445–1453.
244. Stevens, H., Bowles, A., & Roy, K. (2020). Molecular crosstalk between macrophages and mesenchymal stromal cells. *Front Cell Dev Biol.*, 8, 1-14. [doi: 10.3389/fcell.2020.600160](https://doi.org/10.3389/fcell.2020.600160)
245. Vasandan, A., Jahnavi, S., & Prasanna, S. (2016). Human Mesenchymal stem cells program macrophage plasticity by altering their metabolic status via a PGE2-dependent mechanism. *Sci Rep.*, 6, 383-391, [doi: 10.1038/srep38308](https://doi.org/10.1038/srep38308)
246. Manole, E., Niculite, C., Lambrescu, I., Gaina, G., Ioghen, O., Ceafalan, L., ... Hinescu, M. (2021). Macrophages and Stem Cells-Two to Tango for Tissue Repair? *Biomolecules*, 11(5), 697-702. [doi: 10.3390/biom11050697](https://doi.org/10.3390/biom11050697)
247. Lee, K. (2019). M1 and M2 polarization of macrophages: a mini-review. *Med Biol Sci Eng.*, 2(1), 1–5. doi.org/10.30579/mbse.2019.2.1.1

248. Orecchioni, M., Ghosheh, Y., & Ley, K. (2019). Macrophage polarization: different gene signatures in M1(LPS+) vs. classically and M2(LPS-) vs. alternatively activated macrophages. *Front Immunol.*, *10*, 1084-1090. doi:10.3389/fimmu.2020.00234
249. Gratchev, A., Kzhyshkowska, J., & Goerdts, S. (2005). Interleukin-4 and dexamethasone counterregulate extracellular matrix remodelling and phagocytosis in type-2 macrophages. *Scand J Immunol.*, *61*(1), 10–17. doi: 10.1111/j.0300-9475.2005.01524.x
250. Tarique, A., Logan, J., & Fantino, E. (2015). Phenotypic, functional, and plasticity features of classical and alternatively activated human macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol.*, *53*(5), 676–88. doi: 10.1165/rcmb.2015-0012OC
251. Lee, D., Lim, J., & Cho, K. (2020). Differential activation of macrophages based on their environment in advanced age. *Chonnam Med J.*, *56*(1), 12–21. doi: 10.4068/cmj.2020.56.1.12.
252. Bystrom, J., Evans, I., Newson, J., Stables, M., Toor, I., van Rooijen, N., ... Gilroy, D. (2008). Resolution-phase macrophages possess a unique inflammatory phenotype that is controlled by cAMP. *Blood*, *112*(10), 4117–4127. doi: 10.1182/blood-2007-12-129767
253. Li, S., Deng, Y., & Ye, W. (2009). Oxidative preconditioning promotes bone marrow mesenchymal stem cells migration and prevents apoptosis. *Cell Biol Int.*, *33*(3), 411–423. doi: 10.1016/j.cellbi.2009.01.012
254. Ferreira, J., Teixeira, G., & Gonçalves, R. (2018). Mesenchymal stromal cell secretome: influencing therapeutic potential by cellular pre-conditioning. *Front Immunol.*, *9*, 28-37. doi: 10.3389/fimmu.2018.02837
255. Ocansey, D., Pei, B., Yan, Y., Qian, H., Zhang, X., Xu, W., ... Mao, F. (2020). Improved therapeutics of modified mesenchymal stem cells: an update. *J Transl Med.*, *18*(1), 42-50. doi: 10.1186/s12967-020-02234-x.
256. Guo, L., Du, J., Yuan, D., Zhang, Y., Zhang, S., Zhang, H., ... Huang, H. (2020). Optimal H₂O₂ preconditioning to improve bone marrow mesenchymal stem cells' engraftment in wound healing. *Stem Cell Res Ther.*, *11*(1), 434-441. doi: 10.1186/s13287-020-01910-5

257. Tang, Y., Cai, B., Yuan, F., He, X., Lin, X., Wang, J., ... Yang, G. (2014). Melatonin pretreatment improves the survival and function of transplanted mesenchymal stem cells after focal cerebral ischemia. *Cell Trans-plant.*, 23(10), 1279–1291. doi: 10.3727/096368913x667510
258. Yun, S., Han, Y., & Lee, S. (2018). Melatonin rescues mesenchymal stem cells from senescence induced by the uremic toxin p-cresol via inhibiting mTOR-dependent autophagy. *Biomol Ther (Seoul)*, 26(4), 389–398. doi: 10.4062/biomolther.2017.071
259. Fujisawa, K., Hara, K., & Sakaida, I. (2018). Evaluation of the effects of ascorbic acid on metabolism of human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther.*, 9(1), 93-100. doi.org/10.1186/s13287-018-0825-1
260. Theruvath, A., Mahmoud, E., Wu, W., Nejadnik, H., Kiru, L., Liang, T., ... Daldrup-Link, H. (2021). Ascorbic Acid and Iron Supplement Treatment Improves Stem Cell-Mediated Cartilage Regeneration in a Minipig Model. *Am J Sports Med.*, 49(7), 1861–70. doi: 10.1177/03635465211005754
261. Hou, Y., Liu, L., Chai, J., Yu, Y., Duan, H., Hu, Q., ... Ma, L. (2015). Lipopolysaccharide pretreatment inhibits LPS-induced human umbilical cord mesenchymal stem cell apoptosis via upregulating the expression of cellular FLICE-inhibitory protein. *Mol Med Rep.*, 12(2), 2521–2529. doi: 10.3892/mmr.2015.3723
262. Chu, X., Xu, B., & Wang, Y. (2019). Lipopolysaccharides improve mesenchymal stem cell-mediated cardioprotection by MyD88 and stat3 signaling in a mouse model of cardiac ischemia/reperfusion injury. *Stem Cells Dev.*, 28(9), 620–631. doi: 10.1089/scd.2018.0213
263. Croitoru-Lamoury, J., Lamoury, F., Caristo, M., Suzuki, K., Walker, D., Takikawa, O., ... Brew, B. (2011). Interferon- γ regulates the proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells via activation of indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO). *PLoS One*, 6(2), 1-13. doi: 10.1371/journal.pone.0014698
264. Sivanathan, K., Gronthos, S., & Coates, P. (2014). Interferon-gamma modification of mesenchymal stem cells: implications of autologous and allogeneic mesenchymal stem cell therapy in allotransplantation. *Stem Cell Rev Rep.*, 10(3), 351–375. doi: 10.1007/s12015-014-9495-2

265. Petrov, M., Shanbhag, S., & Windsor, J. (2010). Organ failure and infection of pancreatic necrosis as determinants of mortality in patients with acute pancreatitis. *Gastroenterology*, 139(3), 813–820. doi.org/10.1053/j.gastro.2010.06.010
266. Crook M. (2014). Hyperamylasaemia: don't forget undiagnosed carcinoma. *Ann Clin Biochem.*, 51(1), 5-7. doi.org/10.1177/0004563213510490
267. Matull, J., Pereira, S., & O'Donohue, J. (2006). Biochemical markers of acute pancreatitis. *Journal of Clinical Pathology*, 59 (4), 340–344. doi:10.1136/jcp.2002.002923
268. Kishino, Y., & Kawamura, S. (1984). Pancreatic damage induced by injecting a large dose of arginine. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.*, 47, 147–155. doi:10.1007/BF02890197
269. Mukherjee, S., Roy, D. & Ghosh S. (2022). Role of animal models in biomedical research: a review. *Lab Anim Res*, 38(18), 1-12. doi.org/10.1186/s42826-022-00128-1
270. Prasanna, S. & Jahnavi, V. (2011). Wharton's jelly mesenchymal stem cells as off-the -shelf cellular therapeutics: A closer look into their regenerative and immunomodulatory properties. *Open Tissue Eng. Regen. Med. J.*, 4, 28–38
271. Raoufil, A, Aminil, A, & Fthi, N. (2015). Production of hepatocyte-like cells from human umbilical vein mesenchymal stem cells. *Ital J Anat Embryol.*, 120(3), 150-61.
272. Liedtke, C., Luedde, T., Sauerbruch, T., Scholten, D., Streetz, K., Tacke, F., Tolba, R., ... Weiskirchen, R. (2013). Experimental liver fibrosis research: update on animal models, legal issues and translational aspects. *Fibrogenesis Tissue Repair.*, 6(1),1-19. doi: 10.1186/1755-1536-6-19
273. Constandinou, C., Henderson, N., & Iredale, J. (2005). Modeling liver fibrosis in rodents. *Methods Mol Med.*, 117, 237-250. doi: 10.1385/1-59259-940-0:237
274. Gunawardena, T., Rahman, M., & Abu Kasim, N. (2019). Conditioned media serived from mesenchymal stem cell cultures: The next generation for regenerative medicine. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 13, 569-586. doi.org/10.1002/term.2806
275. Hu, C., Wu, Z., & Li, L. (2020). Pre-treatments enhance the therapeutic effects of mesenchymal stem cells in liver diseases. *J Cell Mol Med.*, 24, 40-49. doi.org/10.1111/jcmm.14788

276. de Witte, S., Merino, A., & Korevaar, S. (2017). Cytokine treatment optimises the immunotherapeutic effects of umbilical cord-derived MSC for treatment of inflammatory liver disease. *Stem Cell Res Ther.*, 8, 125-140. doi.org/10.1186/s13287-017-0590-6
277. Liu, H., Liu, S., & Pu, F. (2020). Donor MSCs release apoptotic bodies to improve myocardial infarction via autophagy regulation in recipient cells. *Autophagy*, 16, 2140-2155. doi.org/10.1080/15548627.2020.1717128
278. de Witte, S., Luk, F., Sierra Parraga, J., Gargasha, M., Merino, A., Korevaar, S., ... Roy, D. (2018). Immunomodulation By Therapeutic Mesenchymal Stromal Cells (MSC) Is Triggered Through Phagocytosis of MSC By Monocytic Cells. *Stem Cells*, 36 (4), 602–615.
279. Ghosn, E., Cassado, A., & Govoni, G. (2010). Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *Proc Natl Acad Sci.* 107, 2568-2573. doi.org/10.1073/pnas.0915000107
280. Wang, J., & Kubes, P. (2016). Reservoir of Mature Cavity Macrophages that Can Rapidly Invade Visceral Organs to Affect Tissue Repair. *Cell*, 165, 668-678, doi.org/10.1016/j.cell.2016.03.009
281. Idriss, N., Sayyed, H., & Osama, A. (2018). Treatment Efficiency of Different Routes of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Injection in Rat Liver Fibrosis Model. *Cell Physiol Biochem.* 48, 2161-2171. doi.org/10.1159/000492558
282. Wang, Y., Lian, F., Li, J., Fan, W., Xu, H., Liang, L., ... Yang, J. (2012). Adipose derived mesenchymal stem cells transplantation via portal vein improves microcirculation and ameliorates liver fibrosis induced by CCl4 in rats. *J Transl Med.*, 10, 133. doi.org/10.1186/1479-5876-10-133
283. Zhao, W., Li, J., Cao, D., Li, X., Zhang, L., He, Y., ... Dou, K. (2012). Intravenous injection of mesenchymal stem cells is effective in treating liver fibrosis. *World J Gastroenterol.*, 18, 1048–1058. doi.org/10.3748/wjg.v18.i10.1048
284. Sun, L., Fan, X., Zhang, L., Shi, G., Aili, M., Lu, X., ... Zhang, Y. (2014). Bone mesenchymal stem cell transplantation via four routes for the treatment of acute liver failure in rats. *Int J Mol Med.*, 34, 987-996. doi.org/10.3892/ijmm.2014.1890.

285. Giri, J., & Galipeau, J. (2020). Mesenchymal stromal cell therapeutic potency is dependent upon viability, route of delivery, and immune match. *Blood Adv.*, 4, 1987-1997. doi.org/10.1182/bloodadvances.2020001711
286. Kwon, D., Gao, X., & Danyluk, A. (2008). Treatment with bone marrow-derived stromal cells accelerates wound healing in diabetic rats. *International Wound Journal* 2008, 5, 453–463. doi.org/10.1111/j.1742-481x.2007.00408.x
287. Braid, L.R.; Wood, C.A.; Wiese, D.M.; Ford, B.N. (2018). Intramuscular administration potentiates extended dwell time of mesenchymal stromal cells compared to other routes. *Cytotherapy*, 20, 232–244. doi.org/10.1016/j.jcyt.2017.09.013
288. Lu, D., Xue, J., & Gong, S. (2023). Mesenchymal stem cells influence monocyte/macrophage phenotype: Regulatory mode and potential clinical applications. *Biomed Pharmacother*, 165, 115-1142. doi: 10.1016/j.biopha.2023.115042
289. Arabpour, M., Saghazadeh, A., & Rezaei, N. (2021). Anti-inflammatory and M2 macrophage polarization-promoting effect of mesenchymal stem cell-derived exosomes. *Int Immunopharmacol.*, 97, 107-123. doi: 10.1016/j.intimp.2021.107823
290. Solène Accarias, Clémence Genthon, [...], and Guillaume Tabouret (2016). Single-cell analysis reveals new subset markers of murine peritoneal macrophages and highlights macrophage dynamics upon *Staphylococcus aureus* peritonitis. *Innate Immunity*. Volume 22, Issue 5. 382-393. doi.org/10.1177/1753425916651330
291. Kolaczowska, E., Koziol, A., & Arnold, B. (2010). Inflammatory macrophages, and not only neutrophils, die by apoptosis during acute peritonitis. *Immunobiology*, 215(6), 492-504. doi: 10.1016/j.imbio.2009.07.001
292. Dymowska, M., Aksamit, A., Zielniok, K., Kniotek, M., Kaleta, B., Roszczyk, A., ... Burdzinska A. (2021). Interaction between Macrophages and Human Mesenchymal Stromal Cells Derived from Bone Marrow and Wharton's Jelly-A Comparative Study. *Pharmaceutics*, 13(11), 18-22. doi: 10.3390/pharmaceutics13111822
293. Diederich, A., Fründ, H., & Gernhardt, C. (2023). Influence of Ascorbic Acid as a Growth and Differentiation Factor on Dental Stem Cells Used in Regenerative Endodontic Therapies. *J Clin Med.*, 12(3):119-126. doi: 10.3390/jcm12031196

294. Meng, H., Gong, J., & Song, Z. (2013). Therapeutic effect of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in rat severe acute pancreatitis. *Int J Clin Exp Pathol.*, 6(12), 2703-2712.
295. Ma, Z, Song, G., & Zhao D. (2018). Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells ameliorate severe acute pancreatitis in rats via hemeoxygenase-1-mediated anti-oxidant and anti-inflammatory effects. *Cytotherapy*, 21(2), 162-174. doi:10.1016/j.jcyt.2018.11.013
296. Hua, J., He, Z., & Qian, D. (2014). Angiopoietin-1 gene-modified human mesenchymal stem cells promote angiogenesis and reduce acute pancreatitis in rats. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 7(7), 3580–3595.
297. Qian, D, Gong, J, & He Z. (2015). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells repair necrotic pancreatic tissue and promote angiogenesis by secreting cellular growth factors involved in the SDF-1 α /CXCR4 axis in rats. *Stem Cells Int.*, 15, 1-20. doi:10.1155/2015/306836
298. Chan, L., Tsesmelis, M., & Leithäuser, F. (2022). Functional IKK/NF- κ B signaling in pancreatic stellate cells is essential to prevent autoimmune pancreatitis. *Communications Biology*, 5, 509-519. doi:10.1038/s42003-022-03371-3
299. American Diabetes Association. (2014) Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 37, 81–90. doi:10.2337/dc14-S081
300. Scuteri, A., & Monfrini, M. (2018). Mesenchymal Stem Cells as New Therapeutic Approach for Diabetes and Pancreatic Disorders. *Int J Mol Sci.*, 19(9): 57-83. doi:10.3390/ijms19092783
301. Chen, J., Liu, Z., & Chen, C. (2014). Proangiogenic compositions of microvesicles derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells. *PLoS ONE*, 2, 1-14. doi.org/10.1371/journal.pone.0115316