

ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ В. Н. КАРАЗІНА
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

МОСКАЛЬОВ ВІТАЛІЙ БОРИСОВИЧ

УДК [576.535::602:604)]::[616.36-003.93+612.017.1+616-002]

ДИСЕРТАЦІЯ

**ОДЕРЖАННЯ ТА ОЦІНКА БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ
ЕКЗОМЕТАБОЛІТІВ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН**

Спеціальність 091 – Біологія

Галузь знань 09 – Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

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

_____ В. Б. Москальов

Науковий керівник: Божков Анатолій Іванович, доктор біологічних наук, професор

Харків – 2023

АНОТАЦІЯ

Москальов В. Б. Одержання та оцінка біологічної активності екзометаболітів мезенхімальних стовбурових клітин. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії 091 «Біологія» (09 – Біологія). – Міністерство освіти і науки України. – Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, Харків, 2023.

Дисертація присвячена охарактеризуванню біологічних ефектів екзометаболітів неактивованих ксеногенних мезенхімальних стовбурових клітин на прояви фібротичного процесу на експериментальній моделі тетрахлорметанового фіброзу та з'ясуванню внеску окремих імунологічних показників до цих ефектів.

Мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) є популяцію високопластичних клітин, які виявляються у багатьох тканинах дорослих та приймають участь у регенеративних процесах і регуляції гомеостазу організму. Механізми їх дії можна поділити на контактні, що засновані на прямій міжклітинній взаємодії, та дистантні, що виявляються через секретовані ними речовини. МСК також можуть диференціюватися у клітини пошкодженої тканини та заміщувати таким чином втрачений клітинний матеріал, але внесок цього механізму вкрай незначний. Численні дослідження у регенеративній медицині присвячені саме ролі стовбурових клітин. На багатьох моделях були показані доволі широкий спектр біологічних та навіть клінічних ефектів стовбурових клітин. Як зазначалось, їх біологічна дія може здійснюватися двома шляхами: прямим міжклітинними контактами та екскрецією широкого спектру екзометаболітів. Регуляторна дія екзометаболітів (секретому) стовбурових клітин вивчена значно менше, ніж контактні взаємодії. З'ясування ролі секретому є важливим як для розуміння механізму дії стовбурових клітин, так й для їх практичного застосування у біотехнології. Наразі розроблені методи культивування стовбурових клітин дозволяють отримувати екзометаболіти стовбурових клітин у значущій кількості, а

використання секретому не пов'язано с потенційним ризиком терапії живими клітинами (малігнізація, атипове диференціювання, провокування імунної відповіді на поверхневі антигени клітин) та розв'язує більшість біоетичних проблем.

Секретовані МСК екзометаболіти містять розчинні компоненти – цитокіни, хемокіни, фактори росту – та везикули, що найчастіше містять мікроРНК, а у сукупності йменуються секретомом. Вплив різних чинників, наприклад, ліпополісахариду, запальних цитокінів, активує МСК та змінює профіль їх секретому, який в такому разі сильно залежить від інтенсивності дії чинника та не завжди може бути достовірно прогнозованим. Вивчення біологічної дії секретому неактивованих МСК, одержаних у відносно стандартизованих умовах культури майже не здійснювалось. Для розуміння механізму дії та потенціального використання компонентів секретому доцільно розробляти та впроваджувати ефективні та відносно недорогі способи розділення його на фракції. Щодо таких способів інтерес пригортає мембранна фільтрація, що дозволяє одержати різні за молекулярною масою компоненти. Секретом було розділено на фракцією масою менше 10 кДа, 10–30 кДа та більше 30 кДа, виконана оцінка їх біологічної дії.

В якості експериментальної моделі для оцінки біологічної дії компонентів секретому було обрано фіброз печінки. Це пояснюється тим, що хвороби печінки є поширеною причиною смерті у світі. Основним патологічним процесом, у якому виявляються ці хвороби є саме фіброз з потенційним переходом до необоротного загрозливого патологічного стану. Хоча печінка володіє високою здатністю до регенерації, в умовах інтенсивного фіброзу, що супроводжується персистуючим запаленням, відновлення пошкодженої тканини відбувається неефективно. Сучасні гепатопротектори переважно рослинного походження здатні посилювати регенерацію, але не завжди їх біологічної активності вистачає для припинення розвитку патології. Тому важливим є пошук речовин та композицій, які здатні ефективно зміщувати рівновагу «фіброз–регенерація» у бік останньої та, при цьому, зменшувати запальні прояви.

Персистуюче запалення є чинником, що підтримує фібротичний процес, а клітини імунної системи можуть продукувати надлишок прозапальних цитокінів, викликаючи явище, що описується в літературі як «цитокіновий шторм», яке призводить до пошкодження тканин. Вірогідно існують й інші імунологічні механізми підтримки фіброзу печінки. Одним з механізмів дії мезенхімальних стовбурових клітин та, як припускається у роботі, їх екзометаболітів є саме імуномодулювальна та протизапальна дія. Багато відомо про контактні механізми імуносупресії, зниження продукції запальних чинників, а у деяких мікрооточеннях – активації імунної відповіді – під впливом МСК. Дослідження ефекту секретому МСК на динаміку змін запалення, інтенсивність антитілопродукції у відповідь на ксеноантиген, фагоцитарної активності нейтрофілів та клітинних реакцій у моделі гіперчутливості уповільненого типу дозволяє одержати дані для комплексного розуміння дистантних впливів на імунну систему неактивованими МСК, що є важливим для розуміння механізмів їх антифібротичної дії.

Зважаючи на сказане, *актуальним* є охарактеризування біологічних ефектів компонентів секретому неактивованих мезенхімальних стовбурових клітин, одержаних за певних відносно стандартних умов, на стан фібротичної печінки та можливих імунних компонентів таких ефектів, що в подальшому допоможе розв'язати проблеми практичного застосування МСК.

Метою роботи було розробити спосіб одержання секретому ксеногенних МСК, охарактеризувати його можливі біологічні властивості на моделі фіброзу печінки, дослідити дію секретому на деякі показники імунної системи як системи регуляції функцій організму та їх вплив на процеси регенерації печінки у стані фіброзу.

Розроблено спосіб одержання екзометаболітів МСК кістковомозкового походження, що, за необхідності, може включати кріогенне зберігання клітин, яке, вірогідно, не впливає на кількість та якість продукованих біологічно активних речовин. Збір кондиційованого екзометаболітами МСК середовища краще здійснювати від культур 3–5 пасажів, бо в цей період спостерігається максимальна ростова та секреторна активність клітин, на 48 год. росту за умови наявності 5–

6 млн клітин/мл. Екзометаболіти можуть бути розділені за масою ультрафільтрацією.

Порівняння спектрів поглинання фракцій секретому показує більшу кількість білків у цільній фракції секретому та їх відмінний від контрольного середовища амінокислотний склад. У фракціях менше 10 кДа та 10–30 кДа є піки в областях 220 нм (вірогідно, сірковмісні амінокислоти), 240 і 280 нм (вірогідно, ароматичні амінокислоти) та 340 нм (складні пептиди, можливо з металічними доменами). Фракція більше 30 кДа містить смугу пропускання від 280 нм (складні білки, вірогідно, багато ароматичних амінокислоти).

Встановлено, що екзометаболіти ксеногенних МСК стимулюють *in vitro* формування зони росту навколо фрагментів печінки, одержаних від інтактних тварин. Найбільшу активність виявляє фракція масою <10 кДа, найнижчу – фракція масою вище за 30 кДа.

Вперше досліджено вплив фракції секретому масою менше 10 кДа на фібротичну печінку *in vivo*. Зафіксовано зниження ендогенної інтоксикації продуктами аутолізу печінки, зменшення фібротичних процесів (підвищення активності аланінамінотрансферази, зниження коефіцієнта де Рітиса та зменшення візуального фіброзу) та анемічних проявів. Також спостерігалось компенсаторне посилення регенеративної активності печінки *ex vivo*.

Вперше встановлено, що екзометаболіти неактивованих ксеногенних МСК посилюють антитілопродукцію на фоні імунізації ксеноантигеном. Вплив високих доз більше виражений за внутрішньом'язового введення, вочевидь, на гуморальну ланку імунітету більше впливають їх системні ефекти, ніж паракринні. Також з'ясовано вперше, що екзометаболіти МСК здатні забезпечувати компенсацію імунодефіцитного стану. Раніше вважалось, що ключовим механізмом цитопротекції є контактна взаємодія МСК та В клітин, проте показано, що дистантні механізми відіграють не менш важливу роль у цьому.

Визначено, що вплив секретому МСК на клітинні відповіді навпроти обумовлені, вірогідно, паракринними ефектами, а не генералізованими, бо підшкірне введення секретому викликало більш виражену супресію реакції

гіперчутливості уповільненого типу, ніж внутрішньом'язове. Показано, що секретом ксеногенних неактивованих МСК не чинить ані супресуючої, ані активуючої дії на фагоцитарну активність нейтрофілів.

Досліджено динаміку антиексудативної активності під впливом екзометаболітів МСК. Вони мають виражену протизапальну дію, яка починається пізніше, ніж дія інгібіторів циклооксигеназ та виявляється більш плавно.

Всі дослідження, результати яких представлені у дисертаційній роботі, виконано особисто або за безпосередньої участі здобувача. Автором дисертаційної роботи самостійно проведено пошук та аналіз наукових джерел, виконано основну частину експериментальної роботи, здійснено статистичний аналіз одержаних результатів, а також апробація результатів на Всеукраїнських та міжнародних конференціях. Планування експериментальних досліджень, аналіз та обговорення отриманих даних, підготовка рукописів статей проводилося спільно з науковим керівником д. б. н., проф. Божковим А. І.

Ключові слова: секретом (екзометаболіти) мезенхімальних стовбурових клітин, клітинна біотехнологія, секреторна активність, регенерація, антитіла (імуноглобуліни), цитокіни, фагоцитоз нейтрофілів, гіперчутливість уповільненого типу, запалення, карагеніновий набряк, органотипова культура, печінка, фіброз, гематологічні показники, спектрофотометрія, культури *in vitro*.

SUMMARY

Moskalov V. B. Obtaining and evaluating the biological activity of exometabolites of mesenchymal stem cells. – Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

Dissertation (thesis) for the degree of Doctor of Philosophy 091 "Biology" (09 – Biology). – Ministry of education and science of Ukraine. – V. N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, 2023.

This dissertation (thesis) is devoted to the characterization of the biological effects of non-activated mesenchymal stem cells exometabolites on the manifestations of the fibrotic process on the experimental model of tetrachloromethane fibrosis and to elucidate the contribution of individual immunological indicators to these effects.

Mesenchymal stem cells (MSCs) are a population of highly plastic cells that are found in many tissues of adults and take part in regenerative processes and regulation of body homeostasis. The mechanisms of their action can be divided into contact, based on direct intercellular interaction, and distant, which are manifested through substances secreted by them. MSCs can also differentiate into cells of the damaged tissue and thus replace the lost cellular material, but the contribution of this mechanism is extremely small. Numerous studies in regenerative medicine are devoted to the role of stem cells. A wide range of biological and even clinical effects of stem cells have been shown in many models. As mentioned, their biological action can be carried out in two ways: direct intercellular contacts and excretion of a wide range of exometabolites. The regulatory effect of exometabolites (secretome) of stem cells has been studied much less than contact interactions. Elucidating the role of the secretome is important both for understanding the mechanism of stem cells action and for their practical application in biotechnology. The methods of stem cell cultivation now developed allow obtaining stem cells exometabolites in significant quantities, and the use of the secretome is not related to the potential risk of living cell therapy (malignancy, atypical differentiation, provoking an immune response to cell surface antigens) and solves most bioethical problems.

Exometabolites secreted by MSCs contain soluble components – cytokines, chemokines, growth factors – and vesicles, which most often contain miRNAs, and are

collectively called the secretome. The influence of various factors, for example, lipopolysaccharide, inflammatory cytokines, activates MSCs and changes the profile of their secretome, which in this case strongly depends on the intensity of the factor effect and cannot always be reliably predicted. The study of the biological effect of the secretome of non-activated MSCs, obtained under relatively standardized conditions, was almost never carried out. To understand the mechanism of action and potential use of secretome components, it is advisable to develop and implement effective and relatively inexpensive methods of fractionating. In relation to such methods, membrane filtration, which allows obtaining components of different molecular weight, is of interest. The secretome was separated into fractions weighing less than 10 kDa, 10–30 kDa, and more than 30 kDa, and their biological effects were evaluated.

Liver fibrosis was chosen as an experimental model for evaluating the biological action of secretome components. This is explained by the fact that liver disease is a common cause of death in the world. The main pathological process in which these diseases are manifested is exactly fibrosis with a potential transition to an irreversible, dangerous pathological condition. Although the liver has a high capacity for regeneration, in conditions of intense fibrosis accompanied by persistent inflammation, the recovery of damaged tissue is ineffective. Modern hepatoprotectors, mainly of plant origin, are able to enhance regeneration, but their biological activity is not always enough to stop the development of pathology. Therefore, it is important to search for substances and compositions that can effectively shift the balance of "fibrosis–regeneration" towards the latter process and, at the same time, reduce inflammatory manifestations.

Persistent inflammation is a factor that supports the fibrotic process, and cells of the immune system can produce an excess of pro-inflammatory cytokines, causing a phenomenon described in the literature as a "cytokine storm" that leads to tissue damage. There are probably other immunological mechanisms supporting liver fibrosis. One of the mechanisms of mesenchymal stem cells action and their exometabolites as suggested in this work is exactly the immunomodulatory and anti-inflammatory effect. Much is known about the contact mechanisms of immunosuppression, the reduction of the inflammatory factors production, and in some microenvironments, the activation

of the immune response under the influence of MSCs. The study of the MSCs secretome effect on the dynamics of inflammation changes, the intensity of antibody production in response to xenoantigen, the phagocytic activity of neutrophils and cellular reactions in the model of delayed type hypersensitivity allows to obtain the data necessary for a comprehensive understanding of the distant mechanisms of immunomodulation by non-activated MSCs, which is important for understanding the mechanisms of their antifibrotic action.

Considering the above, it is *relevant* to characterize the biological effects of non-activated mesenchymal stem cells secretome components, obtained under certain relatively standard conditions, on the state of the fibrotic liver and the potential immune components of such effects, which in the future will help to solve the problems of the MSCs practical use.

The *aim of the work* was to develop a method of obtaining the secretome of xenogenic MSCs, to characterize its possible biological properties on a model of liver fibrosis, to investigate the effect of the secretome on some indicators of the immune system as a system of regulating body functions and regeneration processes of the liver in the fibrosis state.

A method for obtaining exometabolites of MSCs of bone marrow origin has been developed, which, if necessary, may include cryogenic storage of cells, that highly likely does not affect the quantity and quality of biologically active substances produced. It is better to collect MSCs conditioned medium with exometabolites from cultures of passages 3–5, because the maximum growth and secretory activity of cells is observed in this period, for 48 h growth provided there are 5–6 million cells/ml. Exometabolites can be separated by mass by ultrafiltration.

A comparison of the secretome fractions absorption spectra shows a greater number of proteins in the whole fraction of the secretome and their difference from the control medium in amino acid composition. The fractions less than 10 kDa and 10–30 kDa had peaks in the regions of 220 nm (highly likely, sulfur-containing amino acid), 240 and 280 nm (highly likely, aromatic amino acid), and 340 nm (complex peptides, possibly, with

metal domains). The fraction greater than 30 kDa contains a transmission band from 280 nm (complex proteins, highly likely, many aromatic amino acid).

It was established that exometabolites of xenogeneic MSCs stimulate *in vitro* formation of a growth zone around liver fragments obtained from intact animals. The fraction with a mass <10 kDa showed the highest activity, the fraction with a mass >30 kDa showed the lowest activity.

For the first time, the effect of the secretome fraction with a mass of less than 10 kDa on the fibrotic liver *in vivo* was investigated. A decrease in endogenous intoxication by liver autolysis products, a decrease in fibrotic processes (increased alanine aminotransferase activity, a decrease in the de Ritis ratio, and a decrease in visual fibrosis) and anemic manifestations were recorded. Compensatory enhancement of liver regenerative activity *ex vivo* was also observed.

It was established for the first time that non-activated xenogeneic MSCs exometabolites enhance antibody production against the background of xenoantigen immunization. The effect of high doses is more pronounced after intramuscular administration, obviously, the humoral link of immunity is more affected by their systemic effects than by paracrine ones. It was also found out for the first time that exometabolites of MSCs are able to compensate for the immunodeficiency state. Previously, it was believed that the key mechanism of cytoprotection is the contact interaction of MSCs and B cells, but it has been shown that distant mechanisms play an equally important role in this.

It was determined that the impact of the MSCs secretome on cellular responses, on the contrary, is probably due to paracrine effects, and not generalized ones, because the subcutaneous administration of the secretome caused a more pronounced suppression of the delayed-type hypersensitivity reaction than the intramuscular one. It was shown that the secretome of xenogeneic non-activated MSCs has neither a suppressive nor an activating effect on the phagocytic activity of neutrophils.

The dynamics of anti-exudative activity under the impact of MSCs exometabolites was studied. They have a pronounced anti-inflammatory action, which begins later than the action of cyclooxygenase inhibitors and is more gradual.

All researches, the results of which are presented in the dissertation work (thesis), were performed personally or with the direct participation of the applicant. The author of the dissertation independently carried out a search and analysis of scientific literature, performed the main part of the experimental work, carried out a statistical analysis of the obtained results, as well as its approbation at All-Ukrainian and international conferences. Planning of experimental researches, analysis and discussion of the obtained data, preparation of manuscripts of articles was carried out together with the supervisor prof. Bozhkov A. I.

Key words: secretome (exometabolites) of mesenchymal stem cells, cellular biotechnology, secretory activity, regeneration, antibodies (immunoglobulins), cytokines, neutrophil phagocytosis, delayed-type hypersensitivity, inflammation, carrageenan edema, organotypic culture, liver, fibrosis, hematological indicators, spectrophotometry, *in vitro* cultures.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

Наукові праці, в яких опубліковано основні наукові результати дисертації

1. Bozhkov A. I., Novikova A. V., Klimova E. M., Ionov I. A., Akzhyhitov R. A., Kurhuzova N. I., Bilovetska S. G., **Moskalov V. B.** & Haiovyi S. S. Vitamin A Reduces the Mortality of Animals with Induced Liver Fibrosis by Providing a Multi-level Body Defense System. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*. 2023. Vol. 13 No 1. P. 48–63. DOI: 10.1016/j.jceh.2022.09.006 (**Scopus, Q3**)
2. **Moskalov V.**, Koshova O., Ali S., Filimonova N., Tishchenko I. Impact of xenogenic mesenchymal stem cells secretome on a humoral component of the immune system. *WikiJournal of Medicine*. 2023. Vol. 10, No 1, Article 9. DOI: 10.15347/WJM/2023.004 (**Scopus, Q4**)
3. **Moskalov V.** Effects of various xenogenic mesenchymal stem cell secretome fractions on the regenerative capacity of the liver *in vitro*. *Revista Bionatura*. 2023. Vol. 8, No 3. Article 90. DOI: 10.21931/RB/2023.08.03.90 (**Scopus, Q4**)
4. **Moskalov, V. B.** Obtaining and description of exometabolites of canine mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *Biodiversity, Ecology and Experimental biology*. 2023, Vol. 25, No 1. P. 15–24. DOI: 10.34142/2708-5848.2023.25.1.02

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. **Москальов В. Б.**, Мельниченко, С. Ю. Модель органотипової (органної) культури печінки. *Інноваційні досягнення сучасних наукових досліджень*: матеріали наук-практ. конференції, м. Полтава, 27-28 серпня 2021 р. / Полтава: Вид-во «Молодий вчений», 2021. С. 26-28.
2. **Moskalov V.**, Melnychenko S. Hepatoprotective activity of mesenchymal stem cells exometabolites fractions. *Problems and Achievements of Modern Biotechnology: materials of the 2nd international scientific and practical internet conference, Kharkiv, Mai 20th, 2022 / Kharkiv: NUPha, 2022. P. 34-36.*

3. **Moskalov V. B.**, Melnychenko S. Yu., Bozhkov A. I. Dose dependence of hepatoprotective activity of mesenchymal stem cells exometabolites. *The All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology with international participation*, Kyiv, June 15th–17th, 2022 / Kyiv: IMBG, NAS of Ukraine, 2022. P. 71.
4. **Moskalov V. B.**, Koshova O. Yu. The potential of using the secretome of xenogenic mesenchymal stem cells as an immunomodulatory agent. Moskalov, V. B., & prof. Skivka L. et al. (Ed.), *Microbiology and Immunology – Development Outlook in the 21st century*: materials of the 4th International Scientific Conference, Kyiv, September 22nd–23rd, 2022 / Kyiv: T. Shevchenko NUK, 2022. P. 34.
5. **Moskalov V.**, Koshova O. Use of the secretome of mesenchymal stem cells in pharmaceutical biotechnology. *Microbiological and Immunological Research in Modern Medicine*: materials of the 3rd scientific and practical international distance conference, Kharkiv, March, 24th, 2023 / Kharkiv: NUPha, 2023. P. 140-142.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	17
ВСТУП.....	18
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	23
1.1. Біологічні властивості мезенхімальних стовбурових клітин	23
1.1.1. Загальна характеристика стовбурових клітин.....	23
1.1.2. Контактні механізми дії мезенхімальних стовбурових клітин	26
1.1.3. Дистантні механізми дії мезенхімальних стовбурових клітин	28
1.1.4. Уявлення про пептидну регуляцію.....	34
1.2. Регенеративні процеси під дією мезенхімальних стовбурових клітин	36
1.2.1. Співвідношення регенерації та фіброзу.....	36
1.2.2. Запалення та регенерація.....	39
1.2.3. Роль імунних механізмів у регенерації.....	43
Висновки до розділу 1	48
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	49
2.1. Дизайн експериментального дослідження	49
2.2. Культура мезенхімальних стовбурових клітин.....	53
2.3. Ідентифікація мезенхімальних стовбурових клітин	56
2.4. Одержання та фракціонування секретому.....	57
2.5. Визначення концентрації білка та аналіз спектрів різних фракцій	59
2.6. Визначення концентрації індивідуальних біологічно активних речовин	60
2.7. Експрес-оцінка біологічної активності.....	61
2.8. Органотипова культура печінки	61
2.9. Моделювання патології печінки.....	63
2.10. Імунологічні моделі дослідження.....	65

2.10.1. Оцінка антитілопродукції.....	65
2.10.2. Моделювання імунодефіциту	66
2.10.3. Фагоцитарна активність нейтрофілів.....	67
2.10.4. Модель «гіперчутливість уповільненого типу».....	67
2.10.5. Модель «карагеніновий набряк»	68
2.11. Статистичний аналіз	69
Висновки до розділу 2	70
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	71
3.1. Характеристика секретому мезенхімальних стовбурових клітин.....	71
3.1.1. Визначення пасажу мезенхімальних стовбурових клітин для збору секретому.....	71
3.1.2. Оцінка складу екзометаболітів мезенхімальних стовбурових клітин	85
Висновки до розділу 3.1	94
3.2. Гепатотропні ефекти секретому мезенхімальних стовбурових клітин	95
3.2.1. Органотипова культура печінки як модель оцінки регенеративного потенціалу	95
3.2.2. Дослідження впливу секретому мезенхімальних стовбурових клітин та окремих його фракцій, розділених за масою на регенеративний потенціал печінки <i>in vitro</i>	98
3.2.3 Дослідження впливу низькомолекулярної фракції секретому мезенхімальних стовбурових клітин на стан фібротичної печінки <i>in vivo</i> та <i>ex vivo</i>	103
Висновки до розділу 3.2	110
3.3. Імунотропні ефекти секретому мезенхімальних стовбурових клітин.....	112
3.3.1. Дослідження впливу екзометаболітів мезенхімальних стовбурових клітин на антитілопродукцію	112
3.3.2. Дослідження впливу екзометаболітів мезенхімальних стовбурових клітин на клітинні відповіді імунної системи	122

3.3.3. Дослідження впливу екзометаболітів мезенхімальних стовбурових клітин на запалення.....	127
Висновки до розділу 3.3	131
ВИСНОВКИ.....	133
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	135
ДОДАТОК 1.....	156

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

CD – кластер диференціювання	TGF – трансформувальний фактор росту
CXCR – рецептор хемокінів	Th – Т-хелпери
DMEM – модифіковане Дюльбекко середовище Ігла	TLR – Toll-подібний рецептор
DMSO – диметилсульфоксид	\bar{X} – середнє значення
FBS – фетальна бичача сироватка для культур клітин	AEA – антиексудативна активність
HGF – фактор росту гепатоцитів	АЛТ – аланінамінотрансфераза
НО – гемоксигеназа	АПК – антигенпрезентувальна клітина
IDO – індоламін-2,3-діоксигеназа	АСТ – аспартатамінотрансфераза
IFN – інтерферон	АУК – антитілоутворювальна клітина
Ig – імуноглобулін	в/м – внутрішньом'язово
IL – інтерлейкін	в/ч – внутрішньоочеревинно
IRLM (ICLM) – індекс співвідношення лімфоцитів та моноцитів	ГА – гемаглютиніни
LGI (ЛГІ) – лімфоцитарно-гранулоцитарний індекс	ГГТ – гамма-глутамілтрансфераза
LSI (ІЗЛ) – індекс зсуву лейкоцитів	ГУТ – гіперчутливість уповільненого типу
MCH – середній вміст гемоглобіну в еритроциті	Д ₉₅ – довірчий інтервал за $p \leq 0,05$
MCV – середній об'єм еритроцита	ІІ – індекс площі
MPV – середній об'єм тромбоцита	Me – медіана
n – кількість тварин у виборці (групі)	МСК – мезенхімальні стовбурові клітини
PBS – фосфатно-сольовий буферний розчин	п/ш – підшкірно
s_{Me} – помилка медіани	ПВ – позаклітинні везикули
	СА – ступінь активності
	ФІ – фагоцитарний індекс
	ФЧ – фагоцитарне число

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження

В теперішній час активно розвиваються медичні біотехнології, засновані на застосуванні мезенхімальних стовбурових клітин (МСК), які є мультипотентними, клоногенними клітинами, що мають великий диференціовальний та проліферативний потенціал. При цьому МСК належать до регіональних стовбурових клітин, тому несуть значно менший ризик неоплазії в порівнянні з ембріональними. Крім цього, застосування МСК пов'язане з меншими біоетичними проблемами, ніж застосування клітин ембріонів [36, 169].

МСК використовують в ряді випадків: для лікування аутоімунних виразок шлунково-кишкового тракту, серцево-судинних патологій, нейродегенеративних захворювань (хвороба Паркінсона, атеросклероз), порушень функції підшлункової залози, печінки, пов'язаних із загибеллю клітин, порушення гемопоезу, для приживлення трансплантата, імунотерапії онкологічних патологій. Застосування МСК може вирішити ряд проблем опорно-рухової системи [61, 110].

Заміщення клітин, вочевидь, не є провідним механізмом відновлення тканин, обумовленого МСК, бо вказані клітини інтегруються в пошкоджену тканину в надзвичайно низькій кількості. Біологічний ефект обумовлений контактною взаємодією між ними та клітинами інших типів, а також широким спектром біологічно активних речовин, які ними продукуються та секретуються – цитокінами, факторами росту, низькомолекулярними регуляторними пептидами та ліпідними везикулами з мікроРНК (разом поійменовані «секретом», або екзометаболіти). Більшість ефектів розглядається як спричинені прямим міжклітинним контактом, а дія секретому – допоміжні чинники [58]. В цій роботі розглянута роль саме екзометаболітів МСК, що обумовлює актуальність дослідження.

Відомо, що екзометаболіти МСК мають протизапальні властивості, забезпечують стимуляцію до поділу клітин пошкоджених органів, та можуть регулювати роботу імунної системи (хоча супресія імунної відповіді під дією МСК, як вважається, більшою мірою пов'язана з прямим контактом з

імунокомпетентними клітинами, а також роллю МСК як антигенперезентувальних клітин). Розробка безклітинних біотехнологій на базі екзометаболітів МСК є перспективною, тому що несе менше ризиків, ніж використання живих клітин. Так, клітини можуть атипично диференціюватися, викликати на себе імунну відповідь та неконтрольовано активуватися у різних нішах організму, а секретовані у культурі речовини можна піддати стандартизації. В літературі описана дія окремих цитокінів, ростових факторів, мікроРНК у везикулярній формі на регенеративні процеси, запалення та імунну функцію, але з одного боку майже не вивчено дію низькомолекулярної фракції секретому, що містить лише невеликі пептиди, а з іншого – найчастіше досліджується секреція МСК під дією різних активаторів (наприклад ліпополісахарид, запальні цитокіни), секретом неактивованих МСК теж вивчено мало [58, 61].

Разом з тим, захворювання печінки входять до десяти найпоширеніших причин смерті у світі. Їх причинами можуть бути інфекції (вірусні гепатити, наслідки протозойних інвазій), шкідливі звички (зловживання алкоголем, нерациональне харчування, що призводить до ожиріння), вплив токсикантів (у повітрі, їжі) тощо. Запущений процес руйнування печінки призводить до фіброзу, а потім й до цирозу або раку печінки. Наразі найчастіше поширені гепатопротектори рослинного походження, але їх біологічної активності не завжди достатньо для регенерації органу в разі важкого ступеню фіброзу [13, 129]. З іншого боку, печінка має високу здатність до регенерації, тому на моделі фіброзу печінки можна вивчити широкий діапазон відповіді на дію біологічно активних чинників. Тому дослідження регенеративних процесів на моделі печінки є актуальним.

Зважаючи на сказане, актуальним є вивчення біологічних ефектів різних за масою фракцій екзометаболітів неактивованих мезенхімальних стовбурових клітин, одержаних за певних відносно стандартних умов, на стан фібротичної печінки та дію на імунну систему.

Мета дослідження – розробити спосіб одержання секретому ксеногенних МСК, охарактеризувати його можливі біологічні властивості на моделі фіброзу печінки, дослідити дію секретому на деякі показники імунної системи як системи

регуляції функцій організму та їх вплив на процеси регенерації печінки у стані фіброзу.

Об'єктом дослідження є секретом ксеногенних МСК та його фракції, розділені за масою методом ультрафільтрації.

Предметом дослідження є біологічні властивості секретому (регенеративна дія на моделі органотипової культури печінки *in vitro*, на моделі тетрахлорметанового фіброзу печінки *in vivo* та *ex vivo*, вплив на антитілопродукцію в умовах нормального імунного статусу та змодельованого імунодефіциту, клітинні реакції імунітету та запалення).

Методи досліджень: клітинна культура (виділення, накопичення, кріоконсервування та деконсервування МСК, експрес-тестування біологічної активності *in vitro*), органотипова культура печінки (адгезія, індекс площі), спектрофотометричні (визначення концентрації білку, аналіз спектрів поглинання в ультрафіолетову діапазоні), моделювання фіброзу *in vivo*, біохімічні (визначення окремих цитокінів та ростових факторів, активності амінотрансфераз), гематологічні (автоматичний аналіз кількості та якості клітин крові в нормі та за фіброзу), імунологічні (визначення показників гуморального та клітинного імунітету, інтенсивності запалення), статистичні.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційна робота виконана на кафедрі молекулярної біології та біотехнології біологічного факультету Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна згідно плану науково-дослідної роботи кафедри за напрямом: «Дослідження у сфері клітинних та імунобіотехнологій з метою отримання біологічно активних фармацевтичних субстанцій для використання у біотехнології та медицині».

Завдання дослідження:

1. Розробити спосіб одержання компонентів секретому (екзометаболітів) ксеногенних МСК на основі обґрунтування оптимального пасажу та даних про проліферативну та секреторну активність.

2. Оцінити склад секретому МСК та окремих його фракцій спектрофотометричними методами.

3. Визначити можливість використання моделі органотипової культури печінки для оцінки регенерації органу після дії хімічних речовин на організм тварини (модель *ex vivo*).

4. Дослідити вплив компонентів секретому (екзометаболітів) МСК та його фракцій на регенерацію печінки на моделі тетрахлометанового фіброзу.

5. Визначити вплив компонентів секретому (екзометаболітів) ксеногенних МСК на окремі показники імунної системи (антитілопродукція, клітинні реакції імунітету, запалення) для з'ясування механізмів їх дії.

Наукова новизна отриманих результатів

У дисертаційній роботі запропоновано спосіб одержання компонентів секретому МСК, заснований на методі мембранної ультрафільтрації.

Продемонстровано, що найбільшу активацію регенеративних процесів печінки забезпечує низькомолекулярна фракція екзометаболітів МСК масою менше 10 кДа. Ця фракція виявляє антифібротичні, детоксикаційні та антианемічні ефекти, обумовлені, вірогідно, пептидною регуляцією активності стовбурових клітин організму, опосередкованою імунними клітинами.

Показано, що екзометаболіти ксеногенних МСК значно активують гуморальну ланку імунітету за рахунок системних впливів на центральні органи імунної системи та забезпечують менш значну супресію клітинних реакцій та зниження запалення через паракринні механізми.

Практичне значення отриманих результатів

Одержані результати можуть бути використані для поглиблення розуміння механізмів дії стовбурових клітин; в освітньому процесі під час викладання таких освітніх компонентів як «Біологія клітини», «Імунологія», «Загальна біотехнологія», «Фармацевтична біотехнологія» тощо; для розробки нових фармакологічних субстанцій.

Особистий внесок здобувача

Всі дослідження, результати яких представлені у дисертаційній роботі, виконано особисто або за безпосередньої участі здобувача. Автором дисертаційної роботи самостійно проведено пошук та аналіз наукових джерел, виконано основну частину експериментальної роботи, здійснено статистичний аналіз одержаних

результатів, а також апробацію результатів на Всеукраїнських та міжнародних конференціях. Планування експериментальних досліджень, аналіз та обговорення отриманих даних, підготовка рукописів статей проводилося спільно з науковим керівником д. б. н., проф. Божковим А.І.

Всі розділи дисертації написані автором самостійно.

Апробація результатів дисертації

Основні та додаткові положення дисертації було апробовано на семінарах кафедри молекулярної біології та біотехнології біологічного факультету ХНУ ім. В. Н. Каразіна. Результати досліджень було також представлено на 5^{ти} фахових конференціях: науково-практична конференція «Інноваційні досягнення сучасних наукових досліджень» (Полтава, 2021); 2nd International Scientific and Practical Internet Conference “Problems and achievements of modern biotechnology” (Kharkiv, 2022); All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology with international participation, based on Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine (Kyiv, 2022); 4th International Scientific Conference “Microbiology and immunology – development prospects in the 21st century” (Kyiv, 2022); 3rd Scientific and Practical International Distance Conference “Microbiological and Immunological Research in Modern Medicine” (Kharkiv, 2023).

Публікації

За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 4 статті: 1 стаття у міжнародному виданні з Q3 Scopus (Journal of Clinical and Experimental Hepatology, Індія), 2 статті у міжнародних виданнях з Q4 Scopus (WikiJournal of Medicine, США, та Revista Bionatura, Еквадор) та 1 стаття у фаховому журналі категорії Б (Biodiversity, Ecology and Experimental biology, Україна).

Структура та обсяг роботи

Дисертація складається з анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, результатів досліджень та їх обговорення, висновків та списку цитованої літератури.

Дисертацію викладено на 157 сторінках машинного тексту, вона містить 30 рисунків та 17 таблиць, 170 пунктів цитованої літератури.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Біологічні властивості мезенхімальних стовбурових клітин

1.1.1. Загальна характеристика стовбурових клітин

Концепція стовбурових клітин бере початок з кінця XIX століття [123]. Термін «стовбурава клітина» виник під час пошуку рішення двох основних ембріологічних проблем того часу: безперервність зародкової плазми та походження кровотворної системи. Theodor Boveri та Valentin Häcker використали зазначений термін для опису клітин, які дають початок зародковій лінії. Häcker стверджував, що стовбурава клітина здатна до міграції в межах ембріона та до асиметричного поділу: одна дочірня клітина дасть початок зародковій лінії, а інша – мезодермальній тканині. Artur Pappenheim розглядав стовбурові клітини, як попередника всіх типів клітин крові. Концепція стовбурових клітин і сьогодні дає розуміння багатьох механізмів ембріогенезу та постнатального розвитку [11]. Тому активно проводиться вивчення їх міграції, проліферативної здатності, диференціальної здатності, впливу ніші на їх біологічні властивості.

Першим типом стовбурових клітин, який стали активно вивчати на практиці та навіть застосовувати у клініці були гемопоетичні (кровотворні) стовбурові клітини (ГСК) [112]. Lorenz та Jacobson з колегами показали радіопротекторну дію трансплантації клітин селезінки або кісткового мозку. У 1961 році Till та McCulloch запропонували метод кількісного визначення ГСК за допомогою аналізу колонієутворювальних одиниць (КУО), а у подальшому – здатність ГСК диференціюватися в усі лінії клітин крові. Типування за генами головного комплексу гістосумісності при підборі донорів для пересадки дозволило знизити ризики реакції «трансплантат проти хазяїна», що разом з доволі відносно високою безпечністю ГСК забезпечило їх широке використання у медицині [112].

Виділення ембріональних стовбурових клітин (ЕСК) до культури *in vitro* з бластоцисти миші було здійснено Evans та Kaufman у 1981 році [46]. Ці клітини здатні до диференціювання, тератогенні за умови введення до організму та мають нормальний каріотип. Багаторічна робота з мишачими ЕСК встановила

їх дивовижну пластичність, здатність диференціюватися майже в усі клітинні лінії, які виникають із трьох зародкових листків [3]. У 1998 році було успішно виділені людські ЕСК з внутрішньої клітинної маси ранньої бластоцисти та з примітивних гонадних областей абортіваних плодів ранніх термінів. Yamanaka та Okita у 2008 році створили лінію індукованих плюрипотентних клітин (ІПСК), використавши плазмідний вектор для внесення трьох транскрипційних факторів Oct3/4, Sox2 і Klf4, довівши можливість зворотної диференціації [117, 161].

Описані практичні результати дозволили створити нову галузь біотехнології та медицини – регенеративну медицину. Але наразі визнано в якості методу терапії застосування лише гемопоетичні стовбурові клітини. Індуковані плюрипотентні стовбурові клітини, що за властивостями схожі з ембріональними, також несуть високий ризик малігнізації. Хоча ризик перетворення на пухлину менший, все одно він існує. Так, було показано [126], що сигнальні шляхи Wnt, Shh та Notch сприяють самовідновленню стовбурових та прогеніторних клітин у різноманітних органах, включаючи кровотворну тканину. За порушення регуляції ці шляхи можуть викликати онкогенез. Мутації цих шляхів асоціюються з низкою пухлин людини, включаючи карциному товстої кишки та епідермальні пухлини (Wnt), медулобластому та базаліому (Shh), а також Т-клітинну лейкемію (Notch). Зазначений ризик накладає обмеження на широке застосування стовбурових клітин у біотехнології та вимагає створювати системи їх доставки, які б інгібували онкогенез, або взагалі безклітинні засоби на основі біологічно активних речовин стовбурових клітин [5].

Відкриття негематопоетичних стовбурових клітин кісткового мозку належить О. Я. Фріденштейну [2, 51]. Термін «мезенхімальні стовбурові клітини» (МСК) було запропоновано Caplan [18], який охарактеризував їх властивості, природу та вірогідне походження від ембріональних. Сучасна концепція мезенхімальних стовбурових клітин базується на таких основних гіпотезах [21]: Wolf та Trentin про індуктивне гемопоетичне мікрооточення, Dexter про стромальні клітини, що підтримують гемопоез, Фріденштейна про остеогенні клітини, Pittenger про клітини здатні до трилінійної диференціації та, нарешті, даними

про імуномодульовальні властивості цих клітин. Хоча МСК були відкриті та охарактеризовані у кістковому мозку, наразі практично доведена біоеквівалентність МСК, що виділяються з інших джерел, в першу чергу, жирової тканини [141].

У якості джерел для виділення МСК окрім кісткового мозку на сьогодні відзначають трабекулярну та кортикальну кісткову тканину, синовіальну оболонку, жирову тканину, сухожилля, скелетні м'язи, периферичну кров, окістя, пуповинну кров і желе Вартона, шкіру та нервову тканину. Інколи за даними результатів секвенування транскриптомів МСК розділяють на дві групи: МСК дорослого організму (виділені з кісткового мозку та жирової тканини) та МСК перинатального походження (виділені з плаценти, амніону та пуповини). Морфологія МСК досить гетерогенна – окрім найбільш частотної фібробластоподібної зустрічаються веретеноподібні, епітеліюподібні, округлі тощо [64, 73, 135].

Проліферативна активність визначає здатність клітинної популяції до самооновлення, та в МСК виділених з різних джерел відрізняється: найбільш активно діляться та зберігають високий проліферативний потенціал клітини, що походять з жирової тканини, найнижчими ці показники у культурі кістковог мозкового походження. Було встановлено, що по мірі старіння культури у ній знижується активність теломери, що однак не призводить до істотного вкорочення довжини теломер [135, 151, 164].

В організмі функціонування МСК залежить від стану особливих структур, які називаються нішами та здатні динамічно змінюватися. Ніші забезпечують підтримку клітинної популяції, сигнали, опосередковані сигнальними молекулами та клітинними контактами, та необхідні для підтримки функцій стовбурових клітин, контролюють їх проліферацію, диференціювання та самооновлення. Це було продемонстровано, зокрема, при порівнянні збереження диференційованого стану МСК *in vitro* та *in situ*. В останньому випадку не спостерігається персистенції описаного стану. Описані дані вказують на важливу роль секреції сигнальних молекул мезенхімальними стовбуровими

клітинами у спостереженій регенеративній активності після введення їх до організму [151].

Слід окремо зазначити, що кріокосервування за умови правильно підбраного режиму процедури не знижує біологічну активність МСК, хоча саме секреторна активність клітин за таких умов вивчено недостатньо [29].

1.1.2. Контактні механізми дії мезенхімальних стовбурових клітин

Контактні механізми біологічної дії МСК засновані на безпосередній взаємодії з іншими клітинами. В умовах організму стовбурові клітини існують в певних нішах. Двома ключовими елементами таких ніш є характер субстрату, в першу чергу його пружні властивості, та контактні взаємодії з іншими клітинами.

У дослідженні Мао та ін. [103] було показано, що ядерна локалізація факторів транскрипції, пов'язаних з остеогенезом, залежить від жорсткості субстрату та не залежить від ступеня міжклітинного контакту. Відомо, що остеобласти можуть утворюватися з мезенхімальних стовбурових клітин та співіснують у безпосередній близькості з ними у кістці під час розвитку та ремоделювання. Одним з механізмів взаємодії МСК з остеобlastами є сигнальні шляхи Wnt та кадгерину [154]. У прямому контакті між зазначеними типами клітин відбувається індукція кадгеринового та пригнічення Wnt сигнального шляху в МСК, що, в свою чергу, зменшує синтез білка β -катеніна. Якщо прямий контакт між цими клітинами відсутній, остеобласти експресують Wnt, що забезпечує стимуляцію остеогенної диференціації МСК через активацію Wnt та пригнічення кадгеринового сигнальних шляхів. На субстраті меншої жорсткості, наприклад у скафолдах фібринового клею, у присутності 10 % хондроцитів відбувається диференціація МСК у хондрогенному напрямі, що у разі прямого контакту клітин зазначених типів, супроводжується також підвищенням продукції глікозаміноглікану та відкладення колагену типу II, а також формуванням щільних контактів між МСК та хондроцитами [34].

Одним зі способів введення МСК до організму є внутрішньовенна ін'єкція. За такого способу введення відбувається їх контакт з ендотеліацитами судин.

Menge та ін. [109] відзначають стабілізуючий вплив МСК на ендотеліацити, який виявляється у зменшенні проліферації останніх та пригніченні ангіогенезу, що, вірогідно, базується на взаємодії VE-кадгерину та β -катеніну на поверхні клітин. Вірогідно, посилення чи пригнічення ангіогенезу в присутності МСК залежить не лише від контактної взаємодії з ендотеліацитами, а й інших параметрів ніші. Wang та ін. [153] провели дослідження здатності МСК до диференціації у напряму кардіоміоцитів або гладеньких м'язових клітин за відсутності безпосереднього контакту із зазначеними клітинами. Для цього вивчали експресію α -SMA, десміну та серцеву ізоформу тропоніну Т (сTnT) або α -актин гладеньких м'язів (α -SMA) та кальпоніну на мічених зеленим флуоресцентним білком (GFP) МСК у вибірково дифузній мембранній культуральній системі. Дослідники переконливо довели, що лише сигнальних молекул недостатньо для успішного диференціювання у зазначених напрямках, підкресливши необхідність для цього прямої взаємодії між клітинами.

Іншим цікавим сигнальним шляхом, який регулює роботу мезенхімальних стовбурових клітин є Notch-1. За останніми даними, зірчасті печінкові клітини, або клітини Іто, (ЗПК) відіграють одну з ключових ролей у розвитку фіброзу, а МСК здатні полегшувати протікання такого стану. Chen та ін. [22] показали, що прямий контакт між МСК та ЗПК є значущо більш ефективним для інгібування останніх, ніж застосування ефекту паракринної блокади. Було виявлено підвищену активність Notch-1 і Hes1 в активованих ЗПК у прямому співкультивуванні з МСК шляхом кількісного визначення експресії мРНК. Також є свідчення того, що передача сигналів Notch може викликати зупинку клітинного циклу. Також було відзначено, що сигнальний шлях PI3K/Akt може бути одним з механізмів, що активує сигнальний шлях Notch-1 у розглянутій системі.

Контактні взаємодії з клітинами імунної системи можуть відігравати важливу роль в імуномодулювальних властивостях МСК. Так, імуносупресивні-протизапальні макрофаги (M ϕ), M2-M ϕ є важливими у зменшенні запалення. Показано, що для утворення цієї популяції клітин з Lin⁺ клітин крові активується через їх взаємодію з мезенхімальними стовбуровими клітинами, вірогідно,

опосередковану поверхневими молекулами клітинної адгезії ICAM-1/LFA-1 [147]. Важливість молекул клітинної адгезії ICAM-1 у регуляції імунної функції відзначають López-García та Castro-Manrreza [100]. В іншому дослідженні на двох моделях аборту (індукованого ліпополісахаридом (LPS) та спонтанного аборту, опосередкованого імунною відповіддю) було показано [96], що МСК здатні зменшувати надмірне запалення, пригнічуючи проліферацію CD4⁺ Т-клітин і сприяючи перемикаючому децидуальних макрофагів на M2 залежним від фактора некрозу пухлини білком, (TSG-6) тобто паракринно. Проте межклітинний контакт із прозапальними макрофагами збільшував продукцію білку гену 6, залежного від фактору некрозу пухлин TSG-6 МСК, тим самим посилюючи супресивну регуляцію Т-клітин і макрофагів. Крім того, прозапальні макрофаги в контакті з МСК посилювали експресію CD200 на останніх та сприяли перепрограмуванню макрофагів у бік протизапальної популяції.

Використання МСК у терапії онкологічних захворювань неоднозначно: з одного боку, є успіхи від їх застосування у певних протоколах лікування, з іншого, існує ризик посилення метастазування. У культурі *in vitro* та на моделі метастатичного раку молочної залози у тварин було показано пригнічення розвитку клітин пухлини та їх апоптоз у разі прямого контакту між ними та МСК. В іншому дослідженні показано, що прямий контакт МСК з клітинами раку товстої кишки посилює експресію останніми генів, пов'язаних з епітеліально-мезенхімальним переходом, таких як фібронектин, кислий білок, багатий на цистеїн SPARC та галектин 1, які відіграють ключову роль у метастазуванні. Слід зазначити, що за відсутності безпосереднього контакту між зазначеними типами клітин не спостерігалось підвищення експресії генів, що відповідають за метастазування [20, 146].

1.1.3. Дистантні механізми дії мезенхімальних стовбурових клітин

Дистантні механізми біологічної дії мезенхімальних стовбурових клітин ґрунтуються на продукуванні та секреції ними біологічно активних речовин, що

можуть виявляти активність на невеликій відстані, у тканинній рідині (паракринна дія) або системно, циркулюючи кровотоком.

Вперше наявність дистантних механізмів дії МСК було вивчено під час дослідження протекції та регенерації серцево-судинної системи та відзначено Gneschi з колегами [56, 88] у 2004 р. На той час стало очевидним, що обмежена кількість утворених зі стовбурових клітин кардіоміоцитів навряд чи є основним фактором інтенсивного поліпшення ішемічних органів [97]. Ця гіпотеза була підтверджена значним покращенням серцевої діяльності у моделі інфаркту міокарда під дією ін'єкції кондиційованого середовища, що містило екзометаболіти, секретовані активованими МСК, культивованими в умовах гіпоксії. Тоді ж були ідентифіковані деякі фактори, що можуть надавати кондиційованому середовищу таких властивостей, зокрема, фактор росту ендотелію судин (VEGF), основний фактор росту фібробластів (bFGF), фактор росту гепатоцитів (HGF) і тимозин b 4 (TB4). Дослідження екзометаболітів МСК дозволило виділити серед них п'ять груп за біологічною функцією: імуномодулювальні, ангіогенні, антиапоптичні та антиоксидантні фактори, а також фактори, що стимулюють міграцію та проліферацію клітин [97].

Вивчення хімічної природи екзометаболітів [67, 89, 148, 152], продукованих МСК, які у сукупності йменують «секретомом», показало, що вони містять дві групи речовин: розчинні фактори (переважно білки та пептиди) та позаклітинні везикули ліпідної природи різного розміру, всередині яких знаходяться ДНК, фрагменти РНК, мікроРНК (міРНК)), ферменти, сигнальні білки та білки сигнальної трансдукції, імуномодулюючі та фактори росту. Позаклітинні везикули (ПВ) побудовані як звичайні біомембрани, тобто складаються з біліпідного шару та мозаїчно розташованими білками (тетраспанінами, інтегринами, лігандами для рецепторів клітинної поверхні) та поділяють в залежності від розміру на три групи: *апоптичні тільця* розміром >1000 нм, на які розпадаються МСК під час апоптозу; *мікроевезикули* нанорозміру (100–1000 нм), секретовані МСК шляхом брунькування з плазматичної мембрани ПВ; *екзосоми* – це найменші ПВ, отримані з МСК (30–200 нм), які виникають через брунькування пізніх ендосомних мембран

та називаються ще мультивезикулярними тільцями. Розчинний компонент кондиційованого середовища можна відокремити від фракції ПВ за допомогою центрифугування, фільтрації, основі полімерного осадження, іонообмінної та ексклюзійної хроматографії [67, 89, 148, 152].

«Золотим стандартом» охарактеризування складу секретому МСК (в першу чергу – розчинного компоненту) є протеомне профілювання. Узагальнена схема цього процесу за [139] наведена на рис. 1.1.

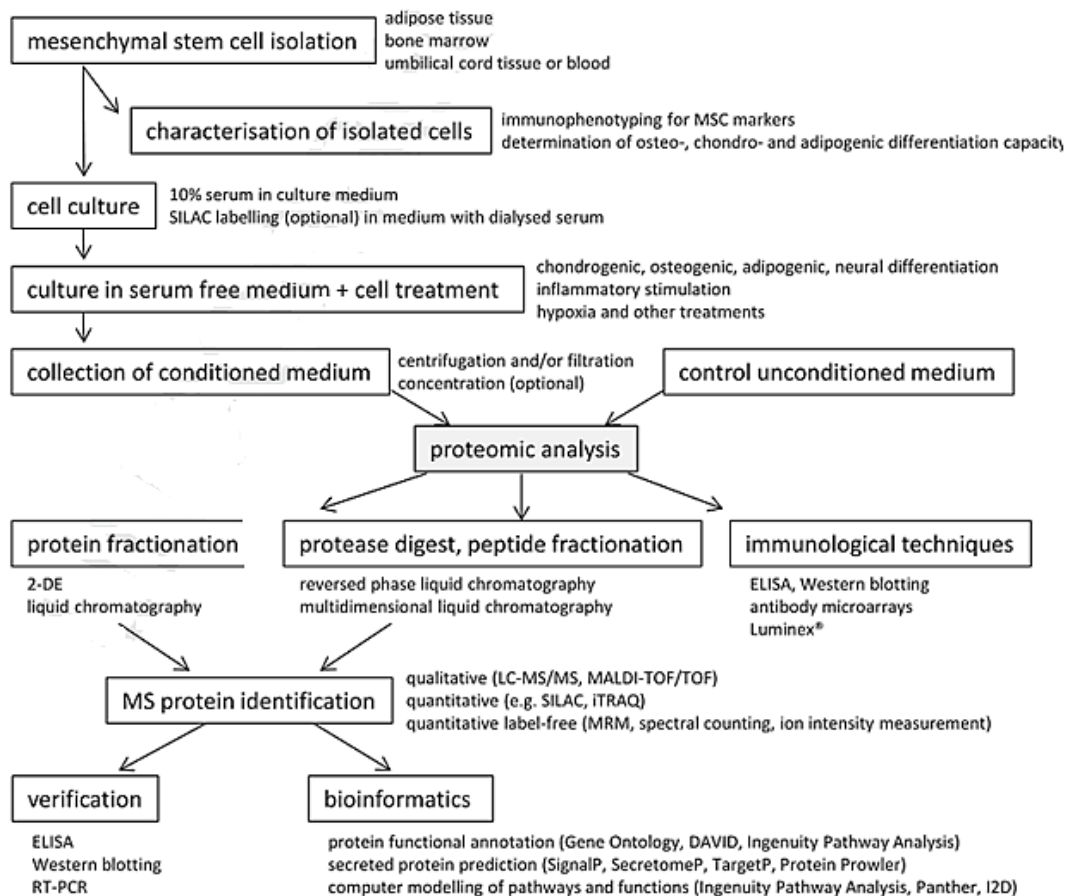


Рис. 1.1. Загальна схема протеомного профілювання секретому МСК [139]

Окрім складності наведеної процедури, що унеможлиблює використання її у поточному контролі якості біотехнологічної продукції, метод передбачає повне або часткове руйнування досліджуваних пептидів протеазами, що може призвести до втрати важливої частини інформації. Наведені обмеження примушують шукати нові методи оцінки повного складу екзометаболітів МСК. Запропоноване в роботі спектрометричне дослідження секретому не вирішує усіх зазначених проблем, проте надає додаткову важливу інформацію про його кількісний та якісний склад.

Розглянемо можливі механізми дії секретому.

Механізми *імуномодулювальної* дії пов'язані, в першу чергу, з дією трансформувального фактору росту- β (TGF- β), фактору росту гепатоцитів (HGF), індоламін-2,3-діоксигенази-1 (IDO-1), інтерлейкіну (IL)-10, антагоністу рецептора IL-1 (IL-1Ra), тромбоспондину 1 (TSP1), фактору некрозу пухлини альфа (TNF- α) та простагландину E2 (PGE2). Вказані фактори пригнічують IL-2-індуковану проліферацію CD4+Т-хелперів та цитотоксичних CD8+ Т-лімфоцитів залежним від Jak-1/Stat-5 способом; регулюють активність сигналізації TGF- β /Smad, що впливає на проліферацію та цитотоксичний потенціал природних кілерних клітин; забезпечують регуляцію апоптозу активованих мононуклеарних клітин периферичної крові; пригнічують генерацію запальних клітин Th1 і Th17 у периферичних лімфоїдних органах; пригнічують передачу сигналів IL-1 β :IL-1R, що захищає тканини від пошкодження, викликаного надмірним або персистуючим запаленням [67].

Ангіогенні властивості секретому МСК сильно залежать від стану культури від якої вони одержані та можуть виявлятися як у посиленні цього процесу, так і його пригніченні. Так, активовані прозапальними цитокінами МСК продукують значущу кількість тканинного інгібітора металопротеїнази-1 (TIMP-1), який виявляє антиангіогенний ефект. Обробка культури МСК TGF- α , призводить до підвищення продукції фактору росту гепатоцитів (HGF), фактору росту ендотелію судин (VEGF), тромбоцитарного фактору росту (PDGF), IL6 та IL8, що надає секретому проангіогенних властивостей [152].

Антиапоптична активність виявляється через відновлення локального мікрооточення за рахунок активації продукції білків-інгібіторів апоптозу (Bcl-2) та зниження експресії антиапоптотичних білків (Bax і розщепленої каспази-3), проте механізм змін в експресії зазначених білків наразі не з'ясовано. Також є дані, які вказують на різну дію кондиційованого середовища, що містить екзометаболіти МСК на нормальні та пухлинно-трансформовані клітини: припускається, що антиапоптична дія не виявляється до ракових клітин [152].

Щодо *антиоксидантної* дії, дослідники відзначають роль станіокальцину 1 (STC1), гемоксигенази-1 (HO-1) та гліального нейротрофічного фактору (GDNF) секретому МСК у зниженні кількості малонового діальдегіду та апоптозу, викликаного дією вільних радикалів [97].

Стимуляція міграції та проліферації клітин. Рекрутування стовбурових клітин в організмі пацієнта, включаючи його МСК у різних тканинах, вірогідно, є важливим механізмом, що забезпечує регенерацію тканин. Відзначається взаємодія осі SDF1/CXCR4 та шляху PI3K/Akt у привабленні стовбурових клітин організму до місця пошкодження під дією секретому МСК. Посилення проліферації резидентних стовбурових клітин під дією екзометаболітів МСК було вивчена на моделі інфаркту міокарда. Показано роль фактору 1, отриманого зі стромальних клітин (SDF1) і в цій активності, а також HGF та інсуліноподібного фактору росту (IGF) [97].

Зростає інтерес до екзометаболітів МСК у різних галузях регенеративної медицини.

У дерматології проводяться дослідження на лабораторних тваринах ефективності секретому МСК по відношенню до стимуляції загоєння ран та відновлення пошкодженої шкіри, фотозахисту, стимулювання росту волосся, лікування псоріазу та як протимікробний засіб [31].

Багато неврологічних проблем пов'язані з травматичними пошкодженнями або віковими дегенеративними процесами у мозку. Нервова тканина має обмежений проліферативний потенціал, а нейропластичність за рахунок нових зв'язків між збереженими структурами мозку не завжди дає змогу повністю відновити функції. МСК здатні виділяти широкий спектр нейрорегуляторних факторів, які посилюють нейрогенез, інгібують апоптоз та утворення гліальних рубців (пригнічують фібротичні процеси), регулюють місцевий імунітет та знижують запалення, регулюють ангиогенез, посилюють виживання нейронів та гліальних клітин. Тому секретом МСК може також покращити інтеграцію локальних клітин-попередників у процеси нейрорегенерації, відкриваючи двері

для їх майбутнього використання як терапевтичних стратегій у клінічних випробуваннях на людях [149].

Проблеми серцево-судинної системи, як і хвороби центральної нервової системи, несуть високий ризик смерті та інвалідизації. Модель інфаркту міокарда на щурах поширена у кардіологічних дослідженнях та дає змогу оцінити активність та механізми дії екзометаболітів МСК на серце та судини. Активація мезенхімальних стовбурових клітин *in vitro* може модифікувати набір продукованих ними речовин. Так, введення прозапальних цитокінів нахшталт фактору некрозу пухлин альфа (TNF- α) та IL-6 до культуру МСК підвищує секрецію IDO та простагландину E2 (PGE2), які спонукають лейкоцити виробляти протизапальні цитокіни, такі як IL-10, та інгібують прозапальну активність IL-6 в міокарді. Для пом'якшення патологічного ремоделювання, можливе збільшення концентрації тканинного інгібітора металопротеїнази-1 (TIMP-1) для інгібування протеаз, що розкладають позаклітинний матрикс, таких як MMP-9. Цікаву дію на судини виявляє відносно слабо вивчений багатий на цистеїн білок 61 (Cyr61). Показано, що повне його виснаження скасовує проангіогенну здатність секретому МСК [44, 124].

Наразі відомо, що багато поширених хвороб розвиваються внаслідок недостатньої або патологічної функції імунної системи. Наприклад діабет, дисфункція щитоподібної залози та ревматоїдний артрит можуть спричинюватися аутоімунною патологією. Секретом МСК виявляє свій імуномодулювальний потенціал, регулюючи функцію різноманітних імунних клітин, особливо моноцитів/макрофагів, Т-клітин, природних кілерних клітин і В-клітин. Зазначене дає змогу успішно використовувати екзометаболіти МСК для лікування захворювань, в патології яких імунна система відіграє важливу роль: розсіяний склероз, діабет, інфаркт міокарда, реакція «трансплантат проти хазяїна», хвороба Крона, ревматичні захворювання [17, 106, 142].

Імуноterapia раку є сучасним та перспективним напрямом лікування хвороби. Використання живих мезенхімальних стовбурових клітин такій терапії несе ризик ускладнень для хворих на онкологію. Як зазначалося вище, контактна

взаємодія МСК з клітинами пухлини може провокувати метастазування, чого не спостерігається за опосередкованого контакту зазначених клітин [146]. Крім того, лікування раку зазвичай ґрунтується на доволі токсичних для організму пацієнта методах абляції пухлини, які можуть призвести до великих функціональних або спотворюючих дефектів. Ці порушення після терапії вимагають додаткової регенеративної терапії під час ремісії основного захворювання. Використання секретому МСК є перспективним методом такої додаткової терапії. Головним занепокоєнням у застосуванні регенеративних засобів є можливе спровокування рецидиву раку. Рецидив відбувається за рахунок клітини пухлини, що уникнули протиракової терапії та перебувають в стані спокою в певних нішах, очікуючи реактивації через невідомі стимули. Багато ефектів успішної регенеративної терапії (реваскуляризація, імуносупресія, клітинний хомінг, стимуляція росту тканин), також є критичними для прогресування пухлини та метастазування. Існують дані як про-, так і протипухлинний ефект МСК. Zimmerlin та ін. у власному дослідженні показали, що клітини пухлини у стані спокою не реагують на сигнали МСК, на відміну від ракових клітин, що активно діляться. Секретом МСК включає ядро цитокінів (малі цитокіни родини CC CCL2 та CCL5, IL-6, TGF β , фактор росту ендотелію судин VEGF), що причетні до росту пухлини та/або метастазування [165]. Слід зазначити, що низькомолекулярні фракції секретому МСК (масою менше 10 та 10–30 кДа), досліджені у цій роботі, не містять більшості з зазначених цитокінів, тому можна припустити, що їх побічна дія буде меншою.

1.1.4. Уявлення про пептидну регуляцію

Під пептидною регуляцією мається на увазі вплив на біологічні функції, опосередкований невеликими за розмірами пептидами. Даних про роботу низькомолекулярних пептидів серед екзометаболітів мезенхімальних стовбурових клітин знайти не вдалося, тому ця концепція розглянута на біологічно активних речовинах з інших джерел [82].

Було показано роль низькомолекулярних мурамілових дипептидів бактеріального походження у підтримці імунного гомеостазу. Їх зв'язок з внутрішньоклітинними рецепторами NOD2 має вирішальне значення для імунної відповіді на патогени, вони регулюють запалення [65]. Фракція пептидів молекулярною масою <1 кДа, одержана з гідролізатів білка товстої раковини мідії *Mytilus coruscus*, підвищує фагоцитарну активність макрофагів, збільшує секрецію прозапальних цитокінів IL-6, IL-1 β , фактору некрозу пухлин альфа (TNF- α) та IFN- γ , зокрема, за рахунок фосфорилування кіназ JNK, ERK та p38 шляхів MAPK, фосфорилуванню та убіквітуванню I κ B- α , активації NF- κ B p65 та їх ядерній транслокації [68]. В іншому дослідженні було виявлено, що фракція пептидів масою від 5 до 16 кДа, одержана з оболонки тонкої кишки свиней, сприяє рекрутуванню мишачих ендотеліальних клітин [94]. Цікавою моделлю вивчення пептидної регуляції є синтез штучних пептидів та дослідження їх активності. Зокрема, Klajnert та ін. [86] вивчено серію штучних низькомолекулярних пептидних дендримерів на основі лізину з різним розподілом катіонних і ароматичних груп у структурі. Вони виявляли антимікробну активність щодо грампозитивних (*Staphylococcus aureus*) і грамнегативних (*Escherichia coli*) бактерій, а також проти грибкових збудників (*Candida albicans*). З'ясовано, що ступінь розгалуженості та стеричного розподілу, а також типи гідрофобних (ароматичних) груп і катіонних центрів впливають як на антимікробну дію, так і на токсичність [86].

Таким чином, з'являється все більше свідчень про те, що низькомолекулярні пептиди, що походять з різних джерел або штучно синтезовані, мають вплив на функціонування біологічних систем. Існують гіпотези про вплив цього класу біологічно активних речовин на експресію генів [82], проте загальної концепції пептидної регуляції на сьогодні ще не запропоновано. Тож, вивчення біологічної дії низькомолекулярних пептидів, що секретуються мезенхімальними стовбуровими клітинами, є важливим та може бути одним з елементів загальної концепції пептидної регуляції.

1.2. Регенеративні процеси під дією мезенхімальних стовбурових клітин

1.2.1. Співвідношення регенерації та фіброзу

Успіх у відновленні функції органу під час репаративного відновлення залежить від співвідношення процесів фіброзу та регенерації. Фіброз – «швидка допомога», яка разом із запаленням мають створити передумови для повноцінної регенерації. Якщо фіброз продовжується, а функціональна тканина заміщується рубцем, повного відновлення не відбувається. На практиці надмірний фіброз в нирках, легенях, серці, печінці та кістковому мозку асоціюється з органною недостатністю та високою смертністю. Існують дані, що МСК можуть діяти на основних учасників цього процесу – міофібробласти, що потенційно може забезпечити зсув у системі «фіброз–регенерація» у бік останньої [41].

Фібробласти, які відіграють важливу роль у розвитку фіброзу, можна знайти у багатьох органах та тканинах. Таку поширеність можна пояснити тим, що для їх утворення з МСК або, вірогідно, іншого клітинного матеріалу достатньо одного лише фактору – фактору росту сполучної тканини (CTGF; також відомого як CCN2). Разом з тим, у щурів *in vivo* мікрокапсульована доставка CTGF спонукала постнатальну сполучну тканину до фіброгенезу, а не ектопічної мінералізації чи фіброзу. Ключовою відмінністю між фіброгенезом і фіброзом є експресія α -SMA. В той час, як МСК та фібробласти мезенхімального походження були переважно α -SMA⁻. CTGF стимулює до диференціації МСК на фібробласти FSP1⁺, віментин⁺, Col-I⁺ і α -SMA⁻, але не на міофібробласти α -SMA⁺, що свідчить про те, що фібробласти, отримані з CTGF, беруть участь у нормальному загоєнні пошкодженої тканини. Стимуляція TGF- β 1 після обробки CTGF може індукувати диференціювання α -SMA⁻ фібробластів у α -SMA⁺ міофібробласти, але у клітинній терапії з використанням МСК такого явища не спостерігалось [92].

Дегенерація міжхребцевих дисків пов'язана з болем у спині та часто призводить до інвалідизації, що укупі з поширенням цього явища робить цю проблему соціально значущою. Етіологію цього стану до кінця не з'ясовано, але в за даними, одержаними на моделі дегенерації диска, викликаній проколом, (PDD) у кролика було встановлено, що фіброз відіграє важливу роль у цій патології.

Імплантація МСК до PDD дисків може пригнічувати фіброз у пульпозному ядрі з ефективним збереженням механічних властивостей і загальної функції хребта. Такі ефекти, як припускається, пов'язані з пригніченням аномального відкладання колагену I в пульпозному ядрі за рахунок модуляції профіброзних медіаторів металопротеїнази MMP12 та білку теплового шоку HSP47 [93].

Фіброз легень є частим ускладненням як інфекційних, так і неінфекційних хвороб (наприклад, силікоз). Одним з ключових обставин розвитку фіброзу є епітеліально-мезенхімальний перехід. На моделі штучного силікозу в щурів було показано, що МСК посилюють продукцію Е-кадгерину та знижують накопичення віментину та позаклітинного матриксу, таких як фібронектин і колаген I, що пригнічує епітеліально-мезенхімальний перехід та зменшує фібротичні прояви на фоні спостереженого зменшення запалення, супроводжуваного пригніченням експресії прозапальних цитокінів. Крім того, МСК пригнічували індуковане діоксидом кремнію збільшення TGF- β 1, p-Smad2 і p-Smad3 та зниження Smad7, що також призводило до покращення стану легень [157].

Багаторічне експериментальне застосування у клініці та дослідження на лабораторних тваринах дозволили встановити, що МСК допомагають у регенерації серця шляхом або ревіталізації серцевих стовбурових клітин, або реваскуляризації артерій і вен серця. Встановлені деякі з механізмів описаних явищ. Зокрема, мікроРНК miR-133a знижує експресію Araf-1 і каспаз 3 і 9, що призводить до ослаблення фіброзу. Ендотеліацити, що продукують фактори росту, такі як фактор росту ендотелію судин VEGF-A, допомагають рекрутувати периферичні стовбурові клітини разом із координацією диференціації МСК в свій тип клітин, що призводить до васкуляризації. BMP7, що експресується МСК, призводить до інгібування фіброзу через протидію TGF- β , який секретується макрофагами. Під дією фактору росту тромбоцитів (PLGF), що продукується у пошкодженій тканині та/або МСК, відбувається PLGF-індукована поляризація макрофагів від M1 до M2 сприяє неоваскуляризації. Кардіохимери є одноядерним злиттям резидентних СК серця та МСК, які мають ексклюзивну кінетику росту та виявилися кращими, ніж батьківські попередники. МСК, попередньо оброблені

різними сполуками, демонструють посилення кардіоміогенезом і покращеною функцією серця. Наприклад, передобробка МСК 5-азацитидіном індукує їх диференціювання у кардіоміоцити [138]. Також було показано, що сигнальний шлях Notch є ключовим у процесі загоєння пошкодженого серця. Notch регулює важливі клітинні механізми у популяції МСК та контролює баланс між фіброзом та регенеративним відновленням у серці дорослих. Було показано, активація Notch, головним чином через свою дію на популяцію фібробластів, запобігає виробленню прогіпертрофічного та профіброзного факторів, що обмежує серцеву гіпертрофію та фіброз [114].

Фіброз печінки, який є попередником цирозу, є результатом відкладення білків позаклітинного матриксу та опосередкований головним чином активованими зірчастими печінковими клітинами, або клітинами Іто, (ЗПК) та може вивчатися на мідь-індукованій та тетрахлорметановій моделях [14, 15, 52]. Після пошкодження печінки ЗПК зазнають фенотипічного перемикання з клітин у стані спокою, що зберігають вітамін А, на активовані, здатні до проліферації, α -SMA-позитивні клітини, подібні до міофібробластів, із підвищеним синтезом колагену. МСК пригнічують патофізіологічний процес, опосередкований хронічним запаленням, і цей імуносупресивний механізм сприяє модифікації мікрооточення; результатом є зменшення фіброзу тканин, збільшення проліферації резидентних стовбурових клітин і, зрештою, регенерація тканин. Крім того, МСК здатні зменшувати проліферацію активованих ЗПК і синтез колагену через непрямий або прямий міжклітинний контакт. У режимі непрямого контакту регуляторні фактори (наприклад, IL-10, HGF, TGF- β 3 і фактору некрозу пухлин альфа TNF- α), які секретуються МСК, пригнічують проліферацію ЗПК та зменшують синтез колагену, тоді як HGF і NGF сприяють апоптозу ЗПК. МСК, які безпосередньо культивуються спільно з ЗПК, значно пригнічують проліферацію та експресію α -SMA+ ЗПК через міжклітинний контакт, і ця активність частково опосередковується активацією шляху Notch. Крім того, МСК можуть регулювати експресію матриксних металопротеїназ (ММП) і тканинних інгібіторів металопротеїназ (TIMP). У кількох моделях фіброзу було показано, що МСК

збільшують експресію металопротеїназ (тобто MMP-2, -9, -13 і -14) або знижують експресію тканинного інгібітора металопротеїнази -1 (TIMP-1), і ці зміни, як правило, призводять до зменшення фібротичних проявів [43].

В експерименті на щурах на моделі тетраклорметанового фіброзу печінки було показано, що секретом МСК, концентрований та очищений центрифугуванням та фільтрацією з рейтингом пор 100 кДа відновлює активність аспаратамінотрансферази, знижує експресію колагену I та III типу, трансформуючого фактора росту (TGF)- β 1 та фосфорилування Smad2. Також було виявлено покращення маркерів, асоційованих з епітеліально-мезенхімальним переходом: зросла кількість E-кадгерин-позитивних клітин, а кількість N-кадгерин-і віментин-позитивних клітин зменшилися. У сукупності ці дані свідчать про зменшення фібротичних проявів у печінці під дією екзометаболітів МСК [95]. Комбіноване введення МСК та макрофагів кісткового мозку, індукованих колонієстимулювальним фактором-1, у тій самій моделі фіброзу призводила до пригнічення фібротичних явищ, в першу чергу, за рахунок фагоцитарної активності введених клітин та клітин хазяїна [156]. В іншій роботі на тій самій моделі дослідили роль сигнального шляху Sonic Hedgehog (Hh), опосередкованого мікроРНК miR-125b, продукованої МСК. Було встановлено, що miR-125b, секретована МСК, пригнічує активацію передачі сигналів Hh, що сприяє зменшенню фіброзу [71].

1.2.2. Запалення та регенерація

Запалення – важливий механізм, без якого неможлива регенерація, бо забезпечує рекрутування імунокомпетентних та стовбурових клітин до місця пошкодження. Проте персистуюче запалення не є корисним, навпаки – це додатковий фактор пошкодження. МСК виділяють широкий спектр різних факторів росту, цитокінів і молекул адгезії, за допомогою яких вони впливають на мікрооточення запаленої та дегенеруючої тканини-мішені і таким чином підтримують позитивний паракринний ефект на відновлення тканин [163].

Регуляція запалення МСК пов'язана, зокрема, з тим, що вони реагують на цей процес, мігруючи до уражених тканин та контролюючи запалення у місці пошкодження. Таке явище називається "хоумінгом" та базується на експресії рецепторів до запальних хемокинів і цитокінів на поверхні клітин. Потрапляючи до запальної ніші, МСК прямо активізують дендритні клітини до участі у протизапальній Т-клітинній відповіді, а також контактним способом пригнічують функції природних кілерів. Вплив на адаптивну імунну відповідь МСК пов'язаний із контактною взаємодією з Т-клітинами (зокрема, регуляторними – Treg). Протизапальні ефекти МСК виявляються у локалізованому тканинному середовищі, а не генералізовано, що відрізняє їх дію від стероїдної терапії, де системне пригнічення може призвести до серйозних клінічних ускладнень [116]. Мезенхімальні стовбурові клітини пригнічують експресію запальних цитокінів фактору некрозу пухлин альфа (TNF- α), IL-1 β та IL-6 у місці пошкодження [157]. У модулюванні запалення та імунологічної толерантності, вірогідно, не лише цитокіни, але й мережа костимулюючих молекул відіграє помітну роль, а МСК знижують їх експресію. [137].

Liu та ін. [99] аналізують вплив МСК на запальні процеси під час регенерації кісткової тканини. Під час вродженої імунної відповіді натуральні кілери можуть посилювати міграцію МСК шляхом секреції хемокинового ліганду CXCL7, тоді як моноцити стимулюють проостеогенні сигнали в МСК. Прозапальні (M1) макрофаги пригнічують життєздатність МСК, тоді як протизапальні (M2) макрофаги підтримують ріст МСК і стимулюють їх до остеогенезу у ніші кісткової тканини. Роль Т-клітин, здається, тісно пов'язана з про- та протизапальними функціями субгруп Т-клітин. Протизапальні Т-клітини сприяють диференціюванню остеобластів, тоді як запальні Т-клітини запобігають остеодиференціюванню від МСК. Роль В-клітин в основному пов'язана з регуляцією остеокластів.

Дослідження впливу МСК на гострий запальний процес у легенях, змодельований введенням бактеріального ліпополісахариду (LPS) мишам, показало послаблення масивної запальної відповідь на LPS і захищає легені

від пошкоджень, що виявлялося у попередженні їх набряку, значному послабленні інфільтрації нейтрофілів у легені між 6 та 48 годинами, зменшенні концентрації прозапальних цитокінів, IL-1 β , IFN- γ , IL-6 і макрофагального запального білка-1 α (MIP-1 α), збереженні необхідної концентрації протизапального IL-10 підтримувалися, та різкого підвищення гранулоцитарного колонієстимулювального фактору G-CSF різко. Також було проведено дослідження *ex vivo* на тканині легень, одержаній від тварин, яким вводили LPS. Культура цих клітин знаходилась у прямому або опосередкованому контакті з МСК та в обидвох випадках клітини легень продукували значуще менші кількості макрофагального запального білка-1 α (MIP-1 α), IL-1 β , IL-12, IL-6 (за прямого контакту ефект був сильнішим) [72].

Іншою моделлю запального процесу, яка дозволяє одержати цінні данні, є модель сепсису. Сепсис є клінічним синдромом важкого системного запалення, викликаного інфекцією, що призводить до високої смертності. Наразі не існує специфічної стратегії лікування синдрому поліорганної дисфункції, викликаного сепсисом. Сепсис викликали у мишей лінії C57Bl/6J шляхом перев'язки та пункції сліпої кишки, а за 6 годин після цього робили внутрішньовенну ін'єкцію МСК. Зазначена процедура за 28 год після її виконання викликала помірне запалення легень, що виражалось у підвищенні концентрації загального білка та альбуміну та 4-разового збільшення загальної кількості клітин (в першу чергу, моноцити/макрофаги та лімфоцити) у бронхо-альвеолярній рідині. Введення МСК значуще знижувало вказані показники у бронхо-легеневій рідині, зміщувало експресію генів від генів, пов'язаних із запаленням, у бік генів, залучених у сприяння ефективній презентації антигену, фагоцитозу та знищення бактерій, що вказує на їх протизапальну активність. [108].

Запалення серця пов'язане з патологічним ремоделюванням серцевого м'яза, що призводить до порушення серцевої функції після інфаркту міокарда, тому зниження запалення є одним з бажаних ефектів терапії. Застосування мезенхімальних стовбурових клітин відновлює функціональну активність серця за рахунок послаблення дилатації порожнини пошкодженої камери і трансмурального інфаркту, запобігаючи патологічному ремоделюванню міокарда. Зазначений ефект

пов'язаний не лише з пригніченням відкладення колагену типів I та III, зниженням експресії генів матричної металопротеїнази-1 (ММР-1) і тканинного інгібітора матричної металопротеїнази-1 (ТІМР-1), але й зменшенням продукції запальних цитокінів фактору некрозу пухлин альфа (TNF- α), IL-1b та IL-6, тобто послабленням запального процесу [63].

Гостре ураження нирок – небезпечний синдром з високою смертністю, що супроводжується запальним процесом. Дослідження впливу МСК на запальні процеси у нирках проводилось на моделі двосторонньої оклюзії ниркових ніжок нетравматичними затискачами для мікроаневризм протягом 60 хвилин на щурах лінії Wistar. Введення аутологічних МСК за 6 год. після моделювання патології покращувало функцію нирок, на що вказувало зниження рівня креатиніну в крові, та сприяло відновленню органу, що підтверджувалось збільшенням кількості позитивних ядер PCNA та зменшенням апоптичних явищ. Основними факторами запалення під час ураження нирок є пошкодження ендотелію, лейкоцитарна інфільтрація та продукція клітинами каналців прозапальних цитокінів (IL1b, IL-6, фактору некрозу пухлин альфа TNF- α), які сприяють відповіді Th1. Введення МСК за 24 год. зміщувало баланс популяцій клітин Th1/Th2 в бік останнього та баланс цитокінів у бік протизапальних, зокрема, IL-10. При цьому за 48 год. після застосування МСК спостерігалась підвищена експресія мРНК IL-6, вірогідно, зумовлена самоекспресією IL-6 МСК. Інтерлейкін-6 (IL-6) є плейотропним цитокіном, який регулює імунні відповіді та запальні реакції, і його роль у цьому імуномодулювальному ефекті МСК ще не виявлена. У зазначеній моделі було продемонстровано, що рання дія мезенхімальних стовбурових клітин на поляризацію Th2 імунної відповіді, викликаної ішемією, має вирішальне значення для зниження запалення та регенерації тканин [134].

За останніми даними онкології, поведінка пухлини не повністю визначається пухлинними клітинами, а залежить від мікрооточення. Мезенхімальні стовбурові клітини є важливим компонентом такого мікрооточення. Існують суперечливі дані: сприяють чи гальмують МСК ріст і прогресування пухлини. Було виявлено, що наївні МСК та МСК пухлинного походження (пМСК) мають різні

функції. Наївні МСК можуть надавати двонаправлений вплив на пухлини, оскільки ці клітини можуть як сприяти, так і пригнічувати прогресування пухлини, тоді як пМСК сприяють прогресуванню пухлини через вплив самої пухлини та запального мікрооточення пухлини. Пухлина безперервно продукує медіатори запалення та рекрутує численні запальні клітини, які утворюють запальне мікрооточення, та МСК. пМСК посилюють рекрутування імунних клітин у мікрооточення пухлини, збільшують частку ракових стовбурових клітин та сприяють ангіогенезу пухлини. Однак, оскільки пластичність є фундаментальною особливістю МСК, МСК також можуть пригнічувати пухлини шляхом активації різних сигнальних шляхів. Механізми такого пригнічення нез'ясовані, але потребують вивчення, бо допоможуть виявити нові мішені для терапії раку [144].

1.2.3. Роль імунних механізмів у регенерації

Модуляція імунної відповіді під дією мезенхімальних стовбурових клітин є значущим механізмом регенерації тканин. Фагоцитоз забезпечує очищення від залишків пошкоджених клітин та створює передумови для ремоделювання міжклітинного матриксу. Клітини адаптивного імунітету включаються у системи передачі сигналів та, вірогідно, можуть опосередковувати активацію проліферації та диференціювання резидентних стовбурових клітин або МСК, що мігрували до місця пошкодження.

В умовах активації мезенхімальних стовбурових клітин сигналами від пошкодженої тканини вони набувають імуносупресивних властивостей. До пошкоджених тканин інфільтруються імунні клітини та МСК. Запалення стимулює продукцію високих рівнів хемокінів і молекул адгезії в МСК, включаючи ліганди CXCR3, ліганди до рецептору цитокінів CCR5, молекул клітинної адгезії ICAM-1 і VCAM-1. Ці молекули індукують накопичення імунних клітин у тісному контакті з МСК, завдяки чому високі концентрації NO (у мишачих МСК) або виснаження триптофану (у людських МСК) призводять до інгібування імунних клітин. Інші імуносупресивні фактори, такі як IL-10, IL-6, білок TSG6, простагландин E2 (PGE2), гемоксигеназа-1 (HO-1), усічений малий цитокін родини

CC CCL2 також можуть впливати на активацію, проліферацію та функції імунних клітин [102].

Основний імуномодулювальний ефект активованих запаленням мезенхімальних стовбурових клітин пов'язаний з перемиканням імунної відповіді у бік зменшення запалення та підвищення толерантності за рахунок переходу від Т-хелперів типу 1 (Th1) до Th2, пригнічення вироблення інтерферону (IFN)- γ природними кілерними клітинами та зниження вироблення антитіл плазмацитами, регуляції лімфопоезу. Імуносупресивна дія мезенхімальних стовбурових клітин може також виявлятися в індукції зсуву макрофагів з фенотипу M1 на M2, пригніченні проліферації природних кілерних клітин у стані спокою, пригніченні дозрівання дендритних клітин з моноцитів/гематопоетичних попередників. Було показано, що МСК здатні пригнічувати проліферацію CD4⁺ і CD8⁺ Т-клітин, як за рахунок прямого міжклітинного контакту, так і через вивільнення розчинних факторів, зокрема, залучаючи такі медіатори, як IL-10, TGF β , індолеамін-2,3-діоксигеназа (IDO) і простагландин E2 (PGE2) та шляхом активації регуляторних Т-клітин. Крім того, в умовах запалення МСК можуть пригнічувати проліферацію В-клітин знижувати їх життєздатність та активність. Кандидатом на механізм опосередкованої МСК імуносупресії є оксид азоту (NO). Цитокини викликають різке посилення індукцибельної синтази оксиду азоту (iNOS) і кількох хемокінів, які можуть приваблювати імунні клітини (Т-клітини, В-клітини та АПК), до МСК, поруч з якими високі рівні NO можуть пригнічувати функції імунних клітин. Показано, що МСК сильно інгібують IL-2-індуковану проліферацію природних кілерних клітин та запобігають індукції їх ефекторних функцій, таких як цитотоксична активність і продукція цитокінів. Цей інгібувальний ефект, вірогідно, опосередкований пригніченням експресії поверхневих рецепторів NKp30, NKp44 і NKG2D на поверхні природних кілерних клітин та знов таки секрецією IDO і простагландин E2 як ключових медіаторів [47, 87, 99, 118].

В деяких випадках введення МСК до організму може навпаки стимулювати імунну систему. Так, за запальних станів, спричинених високими дозами

конканаваліну А (ConA) або прозапальних цитокінів, МСК виявляють сильний імуносупресивний ефект. Однак за низької дози ConA або додаванні IL-10 супресивний ефект МСК був скасований. Подібне спостерігалось, коли рівні запальних цитокінів недостатні, щоб стимулювати МСК секретувати достатню кількість NO, хоча все ще виробляють хемокіни. Слід зазначити, що, незважаючи на зникаюче малу кількість білків МНС II класу та деяких інших класичних коstimулювальних молекул на МСК на поверхні МСК, низькі дози IFN- γ можуть індукувати в них здатність до презентації антигену, тому активовані IFN- γ МСК можна розглядати як умовні антигенпрезентувальні клітини. МСК експресують білки Toll-подібних рецепторів (TLR), які є критичними для деяких механізмів імуномодуляції. Лігування TLR-3 (який зв'язує дволанцюгову РНК) та TLR-4 (який зв'язує ліпополісахарид (LPS) і вроджені аутоантигени) блокує здатність МСК інгібувати Т-клітинні відповіді через передачу сигналів Notch та зниження експресії Jagged-1 МСК. Загалом механізм імуномодуляції через Toll-подібні рецептори на поверхні МСК на прикладі двох типових лігандів можна зобразити так: ліпополісахарид або полі(цитидилова-інозинова) кислота активують регуляторний фактор інтерферону типу 3 (IRF-3) через TLR4 і TLR3 відповідно; активація IRF-3 залежить від активності протеїнкінази R та індукує транскрипцію IFN- β , який секретується та, в свою чергу, активує рецептор інтерферону α/β аутокринним або паракринним способом, що призводить до фосфорилування STAT1 та транскрипційної активації IDO1 та активації та імуносупресивного фенотипу у МСК [87, 102, 115].

В цілому, модель впливу МСК на імунні реакції під час регенерації можна описати таким чином: пошкодження тканини викликає викид хемоатрактантів, які рекрутують МСК та імунні клітини; інтенсивне запалення (високі концентрації запальних цитокінів) активує МСК в імуносупресивному напрямі; крім супресії імунної відповіді МСК вивільняють фактори росту, які стимулюють проліферацію та диференціацію резидентних стовбурових клітин, МСК у місці пошкодження та прогеніторних клітин. В цій моделі недостатня концентрація запальних сигналів спричиняє активацію імунної відповіді замість супресії. Таке може спостерігатися

у разі хронічного запалення та призводить до неефективності використання неактивованих МСК та погіршення стану пацієнта (передобробка МСК запальними цитокинами в такому випадку, вірогідно, може вирішити цю проблему) [102].

Існують припущення, що МСК, виділені з різних тканин можуть виявляти відмінності в імуномодулювальних властивостях. Зокрема, при порівнянні МСК, які походили з плаценти та з хоріонічної пластинки, було виявлено, що останні демонструють вищу експресію цитокинів, інтерлейкінів і молекул МНС, що дозволяє припустити їх більшу ефективність для імуномодуляції. У порівняльному дослідженні МСК з жирової тканини та кісткового мозку перші показали більш потужні імуномодулювальні ефекти, ймовірно, через вищий рівень секреції ІЛ-6 та TGF- β 1, а також більш потужний вплив на диференціацію дендритних клітин. Також слід враховувати вікові особливості тканини, з якої виділяються клітини. Так, наприклад, кількість МСК, що може бути виділена з кісткового мозку зменшується з віком. Біологічна активність таких клітин, за даними кількох досліджень, також може знижуватися. Після 20-40 поділів МСК змінюють свою морфологію, припиняють проліферацію та обмежують експресію β -галактозидази, що відповідає концепції про межу Хейфліка. За іншими даними, МСК здатні долати цю межу за рахунок активності теломерази чи інших механізмів [66].

У багатьох вузьких галузях медицини розглядається використання мезенхімальних стовбурових клітин як біотехнологічний метод терапії. Наприклад, у нефрології перевагами використання цих клітин є їх багатофункціональність та залучення кількох механізмів, що забезпечують біологічну активність. Проводяться дослідження, що мають на меті з'ясувати терапевтичний потенціал використання стовбурових клітин у відновленні необоротно пошкодженої нирки або запобіганні відторгненню ниркового трансплантата. Використання МСК у нефрології ґрунтується, не в останню чергу, на їх імуномодулювальних властивостях у запальному середовищі: низька алореактивність (майже повністю відсутня експресія антигенів МНС II класу та костимулюючих молекул Т-клітин, що забезпечує уникнення розпізнавання та лізису природними кілерними клітинами та цитотоксичними лімфоцитами), регуляція процесингу алоантигену

дендритними клітинами (пригнічення диференціювання, дозрівання та активації дендритних клітин, спричиненої алоантигеном до них; пригнічення Th-1, продукують IL-12), регуляція імунної відповіді Т-клітин на алоантиген (інгібування проліферації Т-клітин під дією алогенних антигенів; зменшення продукції IL-2 Т-клітинами та зниження експресії рецептора IL-2 на активованих Т-клітинах; гальмування утворення цитотоксичних лімфоцитів), посилення формування регуляторних Т-клітин, пригнічення антитілопродукції (зменшення проліферації В-лімфоцитів, синтезу антитіл та хемотаксису В-клітин), пригнічення проліферації, секреції цитокінів та цитотоксичності природних кілерних клітин [107].

Широко вивчається потенціал використання МСК у терапії хвороб, що мають аутоімунну складову. Так, зокрема, розглядається їх використання у лікуванні остеоартриту. Подібне застосування МСК базується, у першу чергу, на їх хондрогенному потенціалі у сенсі здатності активувати регенерацію хрящової тканини. На моделі викликаного колагеназою остеоартриту мишей було показано, що внутрішньосуглобова ін'єкція екзосом МСК запобігає пошкодженню як хряща, так і кістки. Секреція біологічно активних речовин мезенхімальними стовбуровими клітинами виявляє на хондроцити позитивні ефекти, а саме, з одного боку, посилення проліферації, аутофагії та синтезу позаклітинного матриксу, а з іншого, інгібування апоптозу, старіння та продукції прозапальних (фактору некрозу пухлин альфа TNF- α , IL-6, простагландину E2, NO та металопротеїнази MMP13) і катаболічних факторів. Було продемонстровано, що отримані з ембріональних МСК екзосоми людини сприяють регенерації хрящової тканини в моделі остеохондральних дефектів у щурів, що виявляється у повному відновленні гіалінового хряща (відкладення колагену II типу та глікозаміноглікану) за 12 тижнів. Одним з механізмів, що забезпечують регенеративні процеси у хрящі є сприяння імунному толерогенному середовищу. МСК не є імунними клітинами, а регуляторними попередниками з сильними імуномодулювальними властивостями. Вони можуть взаємодіяти з різними типами імунних клітин, що призводить до взаємної взаємодії та модуляції. Імуномодуляція, опосередкована МСК, діє через

синергію механізмів, залежних від клітинного контакту, і вивільнення розчинних факторів [113].

Вивчення імуномодулювальних властивостей МСК допоможе зрозуміти, як працюють ракові стовбурові клітини (РСК) та більш ефективно лікувати онкологічні хвороби. РСК переносять терапію та створюють передумови для рецидиву та метастазування. Мікрооточення у пухлині та сигнальні шляхи (Notch, Wnt та Hedgehog) створюють передумови для їх підтримки. Слід зауважити, що зазначені регуляторні механізми є спільними для ракових та нормальних стовбурових клітин, тому необхідно здійснювати пошук точок переходу від норми до патології та, у разі можливості, навпаки [130].

Висновки до розділу 1

Проведено аналіз вивченості біологічних властивостей мезенхімальних стовбурових клітин, механізмів їх дистантної (опосередкованої через біологічно активні молекули) та контактної дії. Механізми дії секретому вивчені не повністю. Основу вивчених імунотропних, протизапальних та регенеративних активностей секретому МСК складають цитокіни та ростові фактори, роль низькомолекулярних пептидних фракцій мало вивчена та потребує дослідження.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Дизайн експериментального дослідження

Експериментальні дослідження виконані з використанням кісткового мозку собак, відібраного у здорових собак-донорів та наданого для виділення мезенхімальних стовбурових клітин; щурів лінії Wistar та безпородних білих лабораторних мишей-альбіносів; органотипової культури печінки, одержаної від щурів; культури мишачих фібробластів.

Усі дослідження, виконані на тваринах, проводились з урахуванням вимог чинного міжнародного законодавства з біоетики [45]. Протокол кожного етапу дослідження (а після виконання також й звіт) узгоджувався комісією з біоетики на засіданні кафедри молекулярної біології та біотехнології ХНУ ім. В. Н. Каразіна.

Кістковий мозок у кількості 10 мл був відібраний ветеринарним лікарем від 3 здорових безпородних собак схожої статури віком 3–4 роки шляхом пункції стегнової кістки під місцевою анестезією та переданий для подальших маніпуляцій. Зразки кісткового мозку транспортувалися до лабораторії у стерильному фосфатно-сольовому буферному розчині (PBS, Sigma-Aldrich, Німеччина) в одноразових стерильних пробірках.

Лабораторні тварини містились в окремій кімнаті з контрольованими параметрами мікроклімату: температура повітря 20–24°C, вологість 45–65%, у пластикових клітках з: щури – по 6 голів, миші – по 6–10 голів у кожній. Провітрювання кімнати та стерилізацію повітря за допомогою кварцової лампи проводили щодня. Тварини мали вільний доступ до води та їжі (повноцінний раціон, розроблений співробітниками віварію). Огляд тварин проводили щодня, заміну підстилки кожні три–чотири дня. Виведення тварин з експерименту здійснювалось шляхом декапітації. У дослідах, в яких не визначали біохімічні показники сироватки крові, під час цієї процедури використовували інгаляційний наркоз. Загалом у роботі використано 171 щур лінії Wistar (самці масою не менше 200 г віком 3 місяці) та 108 безпородних білих лабораторних мишей-альбіносів масою 20±2 г. Розрахунок кількості тварин наведено у таблиці 2.1.

Кількість лабораторних тварин у дослідженні

Вид тварин	Використання	Кількість тварин
Щури	Органотипова культура печінки	27
	Тетрахлорметановий фіброз печінки	18
	Фагоцитарна активність нейтрофілів	54
	Модель «гіперчутливість уповільненого типу»	42
	Модель «карагеніновий набряк»	30
РАЗОМ		171
Миші	Одержання культури фібробластів	10
	Оцінка антитілопродукції	48
	Моделювання імунодефіциту	50
РАЗОМ		108

Для одержання органотипової культури на етапі опрацювання методики були використані фрагменти печінки 12 щурів лінії Wistar (аналіз динаміки росту культури та оцінка придатності для визначення прижиттєвого впливу на організм, *ex vivo*), на етапі вивчення органотропної активності різних фракцій – фрагменти органу від 6 щурів, а також фрагменти печінки від щурів у досліді з тетрахлорметановим фіброзом (9 тварин). Для одержання культури мишачих фібробластів використано 10 тварин.

У проведеному дослідженні можна виділити такі етапи:

- виділення та дослідження мезенхімальних стовбурових клітин задля одержання, фракціонування та оцінки складу екзометаболітів МСК;
- визначення гепатотропної активності різних фракцій секретому МСК на моделі органотипової культури печінки;
- визначення дії *in vivo* найбільш активної фракції екзометаболітів МСК (модель тетрахлорметанового фіброзу);
- дослідження впливу компонентів секретому МСК на окремі показники імунної системи.

Узагальнений дизайн дослідження наведений у таблиці 2.2.

Таблиця 2.2

Узагальнена схема дизайну експериментального дослідження

Етап	Завдання етапу	Модель / метод	Показники
Етап 1: Одержання екзометаболітів (секретому) МСК	виділити та ідентифікувати МСК кісткового мозку собаки	культура клітин, цитометрія, мікроскопічні техніки	адгезія до пластику; трилінійне диференціювання; імунофенотип
	визначити оптимальний пасаж для збору екзометаболітів	культура клітин, мікроскопічні техніки, спектрофотометрія, модель експрес-тестування біоактивності на мишачих фібробластах	проліферативний індекс; життєздатність, вміст білку, біологічна активність
	оцінити наявність негативного впливу кріоконсервування на ріст та секреторну активність МСК	культура клітин, мікроскопічні техніки, кріоконсервування, спектрофотометрія, модель експрес-тестування біоактивності на мишачих фібробластах	проліферативний індекс; життєздатність, вміст білку, біологічна активність
	оцінити склад секретому МСК та його фракцій	імуноферментний аналіз, спектрофотометрія	вміст ІЛ-6, ІЛ-10, HGF; спектри поглинання
Етап 2: Дослідження гепатотропної дії секретому МСК та його фракцій <i>in vitro</i>	встановити придатність моделі для дослідження <i>ex vivo</i>	органотипова культура; Су-індукований фіброз, гіпервітаміноз А	ступінь адгезії; індекс площі
	визначити вплив різних фракцій секретому МСК на регенеративний потенціал печінки	органотипова культура (<i>in vitro</i>)	ступінь адгезії; індекс площі

Таблиця 2.2 (закінчення)

Узагальнена схема дизайну експериментального дослідження

Етап	Завдання етапу	Модель / метод	Показники
Етап 3: Дослідження гепатотропної дії екзометаболітів МСК <i>in vivo</i> та <i>ex vivo</i>	дослідити вплив низькомолекулярної фракції секретому на перебіг фіброзу печінки	модель ССІ ₄ -індукованого фіброзу; гемоцитомерія, біохімічний аналіз	гематологічні показники; гематологічні індекси; концентрації амінотрансфераз
		органотипова культура (<i>ex vivo</i>)	ступінь адгезії; індекс площі
Етап 4: Дослідження імунотропної дії екзометаболітів МСК <i>in vivo</i>	вплив секретому на імунні відповіді в нормі та патології (штучний вторинний імунодефіцит)	визначення антитілопродукції після імунізації ксеноантигеном	кількість АУК, титр антитіл
		вторинний імунодефіцит (гідрокортизоновий)	виживаність, кількість АУК, титр антитіл
		гіперчутливість уповільненого типу	індекс реакції
		карагеніновий набряк	антиексудативна активність

2.2. Культура мезенхімальних стовбурових клітин

Мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) були виділені з кісткового мозку собак за методикою Colter *ті ін.* [25], адаптованою Chow [24]. Біологічний матеріал у кількості 10 мл від 3 здорових безпородних собак схожої статури віком 3–4 роки був відібраний ветеринарним лікарем та наданий у стерильному фосфатно-сольовому буферному розчині (PBS, Sigma-Aldrich, Німеччина), в одноразових стерильних пробірках.

Лабораторні техніки виконувалися за загальноприйнятими методиками [50]. Маніпуляції з біологічним матеріалом проводилися в асептичних умовах (рис. 2.1). Кістковий мозок двічі промивали стерильним PBS і обробляли 1 мг/мл колагенази І типу (Gibco, США) протягом 45 хв. при 37°C. Клітини вимивали з фрагментів стерильним середовищем DMEM з глутаміном, 4,5 г/л глюкози (Biowest, Франція) та центрифугували (10 хв, 1500 об/хв., MPW-260R, MPW Med. Instruments, Польща). Отриману клітинну суспензію висівали в культуральні флакони (SPL Life Sciences, Корея) у ростовому середовищі, що містило 90 % DMEM та 10 % фетальної бичачої сироватки (FBS, Biosera, Франція). На 0^{му} пасажі до середовища додавали гентаміцин (Дарниця, Україна) та амфотерицин (United Biotech, Індія) по 50 мкг/мл.



Рис. 2.1. Маніпуляції з МСК в асептичних умовах ламінарного боксу

Одержані таким чином посіви інкубували протягом 24 год. за температури 37°C із 5 % CO₂ в атмосфері. За 24 год. ростове середовище видаляли, очищаючи культуру від плаваючої фракції, і замінювали новим. Цю операцію повторювали кожні 3–4 дні, поки культура не досягла конфлюентності (виповненості) моношару близько 80 % (0^й пасаж).

Візуальний контроль культури здійснювали за допомогою інвертованого мікроскопу (Біомед-4I) за збільшення $\times 100$ (за необхідності, окремі ділянки розглядали більш деталізовано – за збільшення $\times 400$). Під час візуального контролю робили фотознімки, які аналізували за допомогою програми TourView, визначаючи конфлюентність моношару (відсоток від площі ростової поверхні, який займають клітини) та морфологію (основні типи форми клітин, що спостерігаються, у порядку зменшення їх кількості, наявність клітин що не прикріпилися, а також патологічних форм).

Кожні 7 діб культуру пасажували – знімали з підкладки та засівали на субстрат знову. Для пересіву моношар культури відкріпляли за допомогою диспергувального розчину – 0,05%-й розчин трипсину в ЕДТА (Gibco, США) з інкубуванням за температури 37 \pm 1 °C протягом 5–10 хв., контролюючи зняття клітин за допомогою інвертованого мікроскопу. Клітини очищували від диспергувального розчину та клітинного дебрису за допомогою центрифугування (5 хв, 1000 об/хв., MPW-260R, MPW Med. Instruments, Польща), відбирали аліквота для підрахунку концентрації живих клітин у камері Горяєва за загальноприйнятою методикою [128].

До відібраної аліквоти клітинної суспензії додавали рівний об'єм робочого розчину трипанового синього (Thermo Fisher Scientific, США) та вносили до підготованої рахункової камери [53]. Для одержання робочого розчину до 2 мл основного розчину (0,2 %, 200 мг барвника у 100 мл дистильованої води) робочий додавали 0,5 мл 4,25 % розчину натрій хлориду. Окремо підраховували кількість живих (незафарбованих) та мертвих (зафарбованих) клітин. За цими даними розраховували життєздатність культури (відношення кількості живих клітин

до загальної кількості клітин (тобто суми живих та мертвих), виражене у %) та загальну концентрацію живих клітин за формулою:

$$X = \frac{A \times B \times 1000}{0,9}, \text{ де} \quad (2.1)$$

X – кількість живих клітин в 1 мл суспензії;

A – кількість живих клітин, підрахованих у камері Горяєва;

B – коефіцієнт розведення (у нашому випадку – 2);

1000 – кількість мм³ в 1 мл;

0,9 – загальний об'єм рахункової камери Горяєва в мм³.

Підрахувавши концентрацію живих клітин, виконували пересів з коефіцієнтом 1:3. На основі даних про кількість живих клітин та коефіцієнту пересіву розраховували посівну концентрацію (кількість живих клітин в 1 мл на початок пасажу) та проліферативний індекс (різниця у кількості клітин на 7 добу росту до посівної концентрації, виражена у %).

Для визначення впливу кріопротектору та низькотемпературного зберігання клітин у рідкому азоті клітини 2-го пасажу заморожували за [50]. Клітини культури відкріпляли за допомогою диспергувального розчину та очищували центрифугуванням, як описано вище. Після підрахунку кількості живих клітин в одержаній суспензії клітини вносили до заздалегідь підготованого кріозахисного середовища (90 % FBS, Biosera, Франція та 10 % DMSO, Burdick & Jackson, США) у концентрації не менше 2,5 млн. клітин/мл та поміщали до кріопробірки (SPL Life Sciences, Корея). Кріопробірки з культурою поступово охолоджували ступінчатим методом: пробірки у спеціальних контейнерах поміщалися до морозильної камери за температури мінус 20 °C на 1 год., потім у пенопластовому коробі вони знаходилися 1 год. у парах рідкого азоту, після чого були перенесені до посудин Д'юара.

Для деконсервування культури кріопробірку поміщали на водяну баню з температурою 35±2°C до повного відтанення. Клітинна суспензія у кріозахисному середовищі поміщалася до пробірки, по крапліні додавалося середовище DMEM до 10–15 мл. Клітини очищували від кріозахисного середовища та клітинного

дебрису за допомогою центрифугування (5 хв, 1000 об/хв, MPW-260R, MPW Med. Instruments, Польща), відбирали аліквоту для підрахунку концентрації живих клітин у камері Горяєва за загальноприйнятою методикою [128], описаною вище. Підрахувавши концентрацію живих клітин, визначали посівну концентрацію та засівали культуру.

2.3. Ідентифікація мезенхімальних стовбурових клітин

Приналежність клітин до мезенхімальних стовбурових може підтверджуватися за багатьма параметрами, але за сучасними уявленнями достатньо, щоб виконувалися три мінімальні критерії: (1) адгезія до пластику, (2) відповідний імунофенотип і (3) трилінійна диференціація [38].

Адгезію до пластику визначали візуально під час контролю культури під інвертованим мікроскопом. Одержана у дослідженні культура росла моношарово, тому адгезія до підкладки була першим та визначальним етапом її росту.

Визначення імунофенотипу здійснювали методом проточної цитофлуориметрії [1] на нововиділеній та деконсервованій культурах другого пасажу за поверхневими маркерами CD44, CD90, CD34 та CD45 за стандартною методикою [119]. Клітини інкубували з антитілами CD34-PE (R&D Systems), CD44-FITC (eBioscience), CD90-PE (BD Biosciences), CD45-PE (R&D Systems) за кімнатної температури протягом 1 год [145]. Клітини двічі промивали буфером FACS і ресуспендували в 500 мкл буфера FACS. Флуоресценцію клітин оцінювали за допомогою проточної цитометрії на приладі FACSCalibur (BD Biosciences).

Визначення здатності до трилінійної диференціації проводили на нововиділеній культурі другого пасажу шляхом штучної індукції диференціювання в трьох (остеогенному, адипогенному та хондрогенному) напрямках. До культури додавали індуктори диференціювання (n=3 для кожного напрямку) [83]:

- остеогенез: 10 ммоль/л гліцерол-2-фосфату, 50 мкг/мл L-аскорбінової кислоти та 100 нмоль/л дексаметазону;
- адипогенез: 0,2 ммоль/л індометацину, 0,5 ммоль/л 3-ізобутил-1-метилксантину, 0,01 мг/мл інсуліну та 1 мкмоль/л дексаметазону;

- хондрогенез: 0,1 мкмоль/л дексаметазону, 0,05 ммоль/л аскорбінової кислоти, 10 нг/мл трансформуючого фактору росту.

Клітини інкубували за стандартних умов (температура 37 ± 1 °C, концентрація CO_2 – $5\pm 0,2$ %). Кожні 3–4 доби поживне середовище змінювали на свіже без зміни його складу.

На 21 добу інкубування МСК з індукторами було здійснено ідентифікацію результатів диференціювання шляхом фарбування клітинних включень (ліпідні краплі) або специфічних компонентів міжклітинного матриксу. Контроль – культури МСК без додавання індукторів диференціювання.

Успішність диференціювання у зазначених напрямках визначалась за допомогою фарбування за загальноприйнятими методиками [83]:

- Остеогенез – барвник алізариновий червоний виявляє нерозчинні солі кальцію в клітинах та матриксі. Клітини фіксуються протягом 10 хв. за кімнатної температури у 100% метанолі з подальшим фарбуванням розчином алізаринового червоного S (Україна ТД, Україна), 40 ммоль/л, рН 4,2, протягом 10 хв. за кімнатної температури.

- Адіпогенез – барвник Oil Red O (Merck, Німеччина) виявляє накопичення ліпідних включень. Клітини фіксуються протягом 30 хв. за кімнатної температури у 10% формаліні з подальшим фарбуванням 0,3% розчином Oil Red O протягом 30 хв. за кімнатної температури.

- Хондрогенез – барвник альціановий синій (Bio-Optica, Італія) забарвлює сульфатовані глікозаміноглікани у міжклітинному матриксі. Клітини фіксуються протягом 30 хв. за кімнатної температури у 10% формаліні з подальшим фарбуванням 1% розчином альціанового синього протягом ночі за кімнатної температури.

2.4. Одержання та фракціонування секретому

Кондиційоване середовище – поживне середовище, у яке культура клітин секретує екзометаболіти (секретом). Збір секретому здійснювали після 48 год. росту відповідного пасажу. Для зменшення кількості баластних білків, що

містяться у FBS, за 24 год. до збору ростове середовище з 10% вказаного компоненту замінювалось на підтримувальне, що містило лише 2% сироватки. Після збору кондиційованого середовища МСК поміщалися до свіжого ростового середовища.

Метод ультрафільтрації широко застосовується у фармацевтичній та харчовій промисловості [150]. Зазначений метод завдяки тангенціальному потоку рідини, що проходить повз мембрану з певним розміром пор, забезпечує розділення компонентів на дві фракції – пермеат (компоненти більшої маси) та концентрат (компоненти меншої маси). Ультрафільтрацію можна застосовувати для сепарації фракцій продукту, але найчастіше його використовують для його концентрування (використовують великий розмір пор, що відповідає 100 кДа, тоді у концентраті залишаються необхідні компоненти, а в пермеаті високомолекулярний баласт та зайвий розчинник) [104]. Концентрування методом ультрафільтрації використовується й по відношенню до секретому МСК [27].

Разом з тим, у літературі не виявлено робіт, в яких метод ультрафільтрації застосовувався би для фракціонування екзометаболітів МСК. Роботу виконано на фільтрувальній установці (рис. 2.2), що складається з перистальтичного насосу Masterflex, змінних фільтраційних мембран Pelicon з рейтингами пор 10 кДа та 30 кДа, силіконових з'єднувальних трубок. Розділення здійснюється ступінчато: на першому етапі з використанням фільтру на 10 кДа одержали фракції масою менше 10 кДа (концентрат) та більше 10 кДа (пермеат). На другому етапі пермеат першого етапу фільтрували через мембрану на 30 кДа, одержуючи фракції масою 10–30 кДа (концентрат) та масою більше 30 кДа (пермеат).

Таким чином були одержані такі фракції: масою менше 10 кДа, масою 10–30 кДа та масою більше 30 кДа. Також вивчався цільний секретом (нерозділений ультрафільтрацією). Контроль – підтримувальне середовище (98% DMEM, 2% FBS), що не містить екзометаболітів МСК, бо клітини в ньому не культивувались.

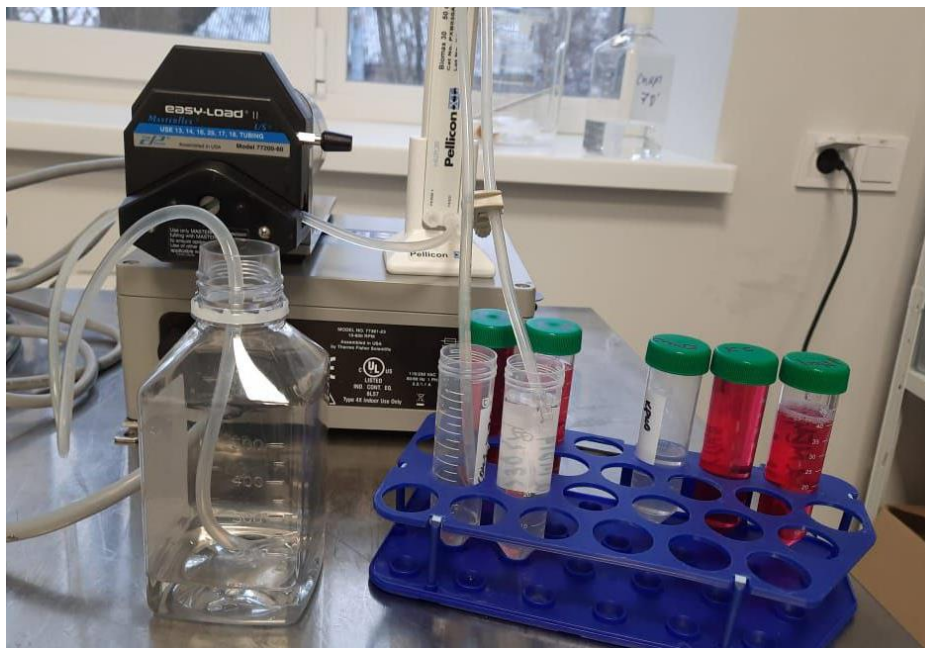


Рис. 2.2. Розділення екзометаболітів мезенхімальних стовбурових клітин, одержаних з кісткового мозку собаки, за масою методом ультрафільтрації

2.5. Визначення концентрації білка та аналіз спектрів різних фракцій

Оцінювання складу цільного секретому мезенхімальних стовбурових клітин здійснювалось спектрофотометричними методами за допомогою двопроменевого спектрофотометра UV-2600 Shimadzu.

У якості експрес-визначення концентрації білка використовували метод Waddell у модифікації Wolf [160]. Вимірювали оптичну щільність досліджуваного розчину (0,5 мл зразка у колбі місткістю 25 мл розчинюють у 0,9 % розчині натрій хлориду, доводячи його об'єм до мітки) за двох довжин хвиль 215 та 225 нм у кюветі з товщиною шара 10 мм, використовуючи контрольний розчин (0,9 % розчин натрій хлориду) у якості розчину порівняння. Загальний вміст білка визначають за формулою:

$$C = (A^{215} - A^{225}) \times P \times 0,144, \text{ де} \quad (2.2)$$

C – концентрація білку, мг/см³;

A^{215} та A^{225} – оптична щільність зразка за 215 нм та 225 нм відповідно;

P – розведення (у нашому випадку – 50);

0,144 – емпірично встановлений коефіцієнт для білків при визначенні оптичної щільності білків за довжин хвиль 215 нм та 225 нм.

Кінцевий результат визначення загального вмісту білку розраховували як середнє арифметичне від трьох повторних вимірювань.

Спектр поглинання цільного секретому та, фракцій масою до 10 кДа, 10–30 кДа, вище 30 кДа, а також контрольного зразка (підтримувальне середовище без екзометаболітів) було знято в діапазоні від 200 до 400 нм за допомогою двопробеневого спектрофотометра UV-2600 Shimadzu.. Одержані спектри були піддані порівняльному аналізу (визначення та опис піків, кластерний аналіз для з'ясування, які із зразків ближче за складом).

Для порівняння під час оцінки концентрації білка у різних фракціях було використано два додаткових методи (Kalb-Bernlohr [78] та Warburg-Christian [155]), які виконували під час аналізу спектра поглинання зразків у діапазоні 200–400 нм за [168]:

$$\text{(Warburg-Christian): } C \text{ (мг/мл)} = 1,55 \times A^{280} - 0,76 \times A^{260} \quad (2.3)$$

$$\text{(Kalb-Bernlohr): } C \text{ (мг/мл)} = 1,83 \times A^{230} - 0,758 \times A^{260} \quad (2.4)$$

Примітка: A^{xxx} – оптична щільність зразка за відповідної довжини хвилі

2.6. Визначення концентрації індивідуальних біологічно активних речовин

Оцінка секреції мезенхімальними стовбуровими клітинами різних пасажів біологічно активних речовин оцінювалося за вмістом деяких інтерлейкінів та ростових факторів у кондиційованому середовищі. У якості індикативних обрано один протизапальний інтерлейкін (IL-10), один прозапальний (IL-6) та один ростовий фактор (гепатоцитів, HGF).

Були обрані два оптимальні (3й та 4й) та один песимальний (10й) пасажі нововиділеної культури, оцінені за ростовими та секреторними (концентрація білка, мітогенна активність), а також 2й пасаж деконсервованої культури. Обґрунтування обрання пасажів наведено у розділі 3.1.1.

Після моделювання тетрахлорметанового фіброзу визначали концентрації аланінамінотрансферази, гамма-глутамілтрансферази, та аспартатамінотрансферази у сироватці крові.

Зазначені показники визначали загальноприйнятим методом імуноферментного аналізу [30] з урахуванням інструкцій до наборів реактивів. У якості ферментативної мітки використовують авідин, кон'югований з пероксидазою хрому (HRP), – авідин утворює стійкі комплекси с біотином. Тетраметилбензидиновий субстрат забезпечує забарвлення комплексів досліджуваної речовини з кон'югованим із біотином антитілом та авідину, кон'югованого з пероксидазою. Реакція фермент-субстрат припиняється додаванням розчину сірчаної кислоти, а кількість досліджуваної речовини визначається за інтенсивністю забарвлення одержаних комплексів, що вимірюється спектрофотометрично за довжині хвилі $450 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ з використанням фотометру планшетного (аналізатора імуноферментного) Stat Fax 2100. Розрахунки вели за формулами, вказаними в інструкціях до наборів реактивів.

2.7. Експрес-оцінка біологічної активності

Експрес-оцінка біологічної активності зразків здійснювалась за зміною проліферативної активності культури мишачих фібробластів після додавання 100 мкл зразка до ростового середовища (PI_e) у порівнянні з контрольною культурою (PI_c) на 48 год. росту. Результат (активність, A) обчислюється за формулою:

$$A = \frac{PI_e - PI_c}{PI_c} \times 100 \% \quad (2.5)$$

2.8. Органотипова культура печінки

Органотипова культура печінки є тривимірною моделлю тканини, що частково відтворює її метаболізм та регенерацію [91]. Регенеративний потенціал органу в даній моделі можна оцінити за успішністю прикріплення фрагментів тканини до субстрату (без прикріплення неможливі процеси клітинної міграції та поділу) та за інтенсивністю формування зони виселення та росту (вказує на регенеративну здатність органу).

Вихідна методика [82] у модифікації [19] передбачала час культивування до обліку протягом 72 год. та тестування лише зразків, що вносилися до середовища

(*in vitro*). У ході дослідження було обґрунтовано зменшення часу культивування до 48 год., та можливість тестування чинників, що діяли на організм тварини, з якої вилучили фрагмент печінки (*ex vivo*). Обґрунтування наведені у розділі 3.2.1.

Органотипову культуру печінки виконували з використанням щурів лінії Wistar (самці вагою не менше 200 г, віком 3 місяці), з яких вилучали печінку. Для одержання печінки тварин декапітували під інгаляційним наркозом та розтинали. З лівої та середньої часток органу вирізали декілька фрагментів та поміщали їх у 0,9% розчин натрію хлориду для ін'єкцій. Фрагменти переносили до лабораторного боксу та, дотримуючись правил асептики, за допомогою підготовленого металевого круглого в поперечному перерізі пробовідбірника виділяли експлантати розміром близько 1,5 мм³, які поміщались та поміщали до стерильних пластикових чашок Петрі на поживне середовище, що складається з 90% середовища DMEM/F12 з глутаміном (Biowest, Франція) та 10% фетальної бичачої сироватки (FBS, Biosera, Франція), а також гентаміцину (Дарниця, Україна) та амфотерицину (United Biotech, Індія) по 50 мкг/мл. Відбір експлантатів з різних часток печінки в однаковому співвідношенні у різних групах та достатня їх кількість (не менше 10 на чашку Петрі діаметром 35 мм, SPL Life Sciences, Корея) повинні знівелювати можливі спотворення у результатах дослідження, викликані власними стовбуровими клітинами печінки.

Культуру інкубували протягом 48 годин (крім дослідів зі встановлення динаміки прикріплення та росту) за температури 37,0±0,5 °С в умовах гіпоксії та підвищеної концентрації вуглекислого газу. Після інкубації експеримент враховували шляхом обробки зображень культури, отриманих методом світлової мікроскопії (збільшення ×100). Обробку зображень проводили в програмі TourView (рис. 2.3): визначали площу центральної (темної) зони (зона експланту) та периферійної (світлої) зони (зона виселення та росту). Після цього розраховується індекс площі (AI) за формулою:

$$AI (\%) = \left(\frac{CZ+GZ}{CZ} \times 100 \% \right) - 100 \% \quad (2.6)$$

де CZ – площа центральної зони (експлантату), GZ – зони виселення та росту; в мм² або пікселях.

Також враховували індекс адгезивності, як відсоток експлантатів, прикріплених до субстрату в кінці інкубації.

Тестування проводилось у відношенні чинників, що додавалися до культурального середовища (модель *in vitro*), або у відношенні чинників, що діяли на організм тварини, з якої одержували експлантати (модель *ex vivo*).

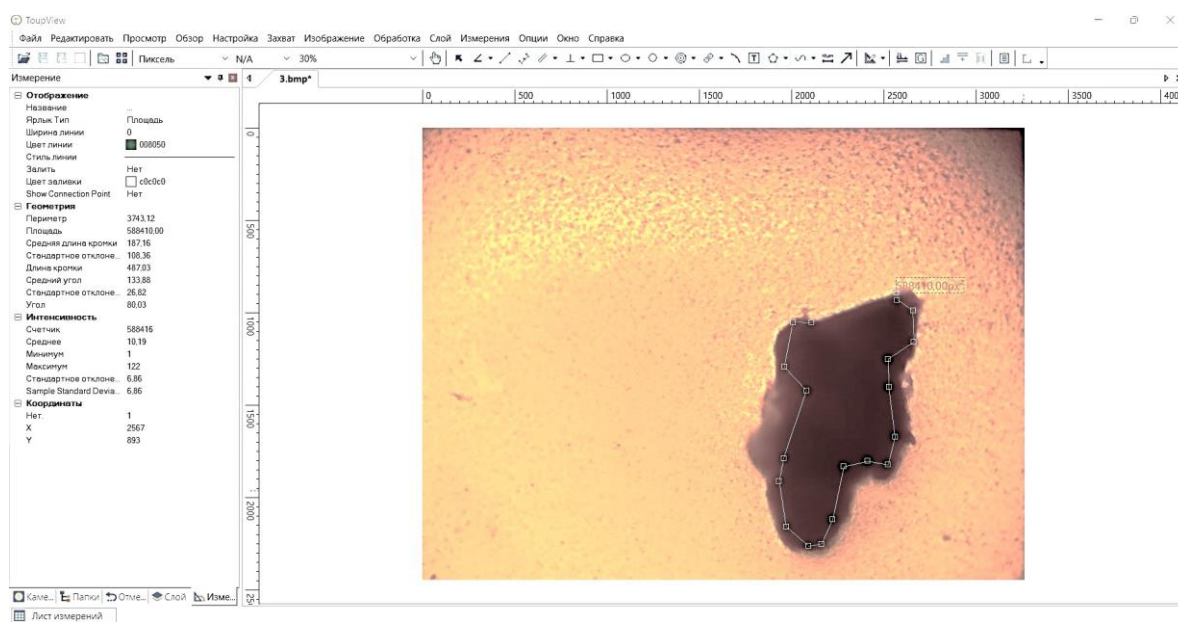


Рис. 2.3. Облік органотипової культури печінки з використанням програми TopoView (фото культури зроблено під світловим мікроскопом, зб. $\times 100$)

2.9. Моделювання патології печінки

Мідь-індукований фіброз та гіпервітаміноз А використовувалися для визначення придатності органотипової культури печінки для оцінки прижиттєвих впливів на організм тварин (модель *ex vivo*)

Моделювання мідь-індукованого фіброзу здійснювалося за відпрацьованою на кафедрі молекулярної біології та біотехнології ХНУ ім. В. Н. Каразіна методикою [15] та використовувалось у роботі для дослідження впливу токсикантів на розвиток органотипової культури печінки.

Щурам лінії Wistar (самці вагою не менше 200 г, віком 3 місяців) триразово внутрішньочеревно вводили сульфат міді в дозі 2,5 мг/100 г маси тіла.

Після завершення моделювання фіброзу тварин виводили з експерименту шляхом декапітації під інгаляційним наркозом та відбиралися фрагменти печінки.

Для моделювання стану гіпервітамінозу [14] щурам лінії Wistar (самці вагою не менше 200 г, віком не менше 3 місяців) вводили *per os* масляний розчин вітаміну А в концентрації 300 МО (90 мкг) на 100 г маси тіла щодня протягом 7 днів. Доза була встановлена на моделі фіброзу печінки, яка забезпечувала терапевтичний ефект і не призводила до токсичних проявів у попередніх дослідженнях.

Після завершення моделювання фіброзу тварин виводили з експерименту шляхом декапітації під інгаляційним наркозом та відбиралися фрагменти печінки.

Тетрахлорметановий фіброз використовували для оцінки гепаторегенеративної дії низькомолекулярної фракції екзометаболітів МСК (масою менше 10 кДа). Моделювання тетрахлорметанового фіброзу здійснювалось шестиразовим внутрішньочеревним введенням 50 % розчину CCl_4 в олії у дозі 0,2 мл на 100 г маси тіла за схемою, описаною в [52]. У досліді було три групи тварин: інтактні, контроль патології (CCl_4) та дослід (CCl_4 + екзометаболіти), $n=5$.

Після завершення моделювання патології та триденного введення низькомолекулярної фракції екзометаболітів МСК (по 100 мкл на 100 г маси тіла внутрішньочеревно один раз на день) тварин виводили із експерименту шляхом декапітації під інгаляційним наркозом. У тварин відбирали кров та зразки печінки. Перші краплі крові відбирали в пробірки з етилендіамінтетраацетатом (ЕДТА) для дослідження гематологічних показників [10], а також отримували сироватку крові, для цього зразки після утворення згустку центрифугували при 1500 об/хв. протягом 20 хв.

У тварин різних груп визначили гематологічні (лейкоцити, лімфоцити, моноцити, гранулоцити, еритроцити, гемоглобін, гематокрит, MCV, MCH, анізоцитоз, тромбоцити, тромбокрит та MPV) на автоматичному аналізаторі Mindray BC-2800 Vet відповідно до інструкції до приладу, та біохімічні показники (аланінамінотрансфераза гамма-глутамілтрансфераза, аспартатамінотрансфераза) методом імуноферментного аналізу, що детально описаний вище, а також розраховували коефіцієнт де Рітіса (співвідношення АСТ/АЛТ, [33]) та

лейкоцитарні індекси – лімфоцитарно-гранулоцитарний (LGI), індекс зсуву лейкоцитів (LSI), індекс співвідношення лімфоцитів та моноцитів (ILRM) [8]:

$$LGI = \frac{\text{кількість лімфоцитів} \times 10}{\text{кількість гранулоцитів}} \quad (2.7)$$

$$LSI = \frac{\text{кількість гранулоцитів}}{\text{кількість лімфоцитів} + \text{кількість моноцитів}} \quad (2.8)$$

$$ILRM = \frac{\text{кількість лімфоцитів}}{\text{кількість моноцитів}} \quad (2.9)$$

2.10. Імунологічні моделі дослідження

2.10.1. Оцінка антитілопродукції

Антитілопродукцію оцінювали за титром гемаглютининів у сироватці крові та кількістю антитілоутворювальних клітин на фоні введення ксеноантигену (еритроцитів барана, Укрмедіаснаб, Україна).

Було сформовано 8 груп (n=6): контроль (не вводилося ніяких зразків), групи внутрішньом'язового (в/м) введення цільної фракції екзометаболітів МСК у концентраціях 10, 20 та 50 мкл/мл (у перерахунку на білок відповідно 35, 70 і 175 мкг/кг), групи підшкірного (п/ш) введення цільної фракції екзометаболітів МСК у концентраціях 10, 20 та 50 мкл/мл та група референтного зразка Тималіну (5 мг/кг, в/м, Біофарма, Україна).

Мишам груп крім контрольної вранці одночасно вводилися в/м або п/ш досліджувані зразки протягом 4 діб. За годину після цього проводилася імунізація тварин усіх груп, включаючи контрольну, внутрішньочеревною ін'єкцією 3% суспензії свіжовідмитих еритроцитів барана в дозі 0,01 мл/г маси тіла. Після завершення введення зразків та імунізації тварин виводили з експерименту шляхом декапітації під інгаляційним наркозом. Збирали кров, з якої одержують сироватку (методом центрифугування при 1500 об/хв. протягом 20 хв.), та селезінку.

Кількість антитілоутворювальних клітин (АУК) у селезінці визначали за методом Jerne K. N. та ін. [74]. Метод заснований на здатності лімфоїдних клітин тварин, імунізованих чужорідними еритроцитами, виділяти антиеритроцитарні антитіла, що викликають лізис антигену в присутності комплекменту. За кількістю

макроскопічно видимих зон гемолізу навколо АУК розраховували кількість продуцентів антитіл на лімфоїдний орган.

Титр гемаглютининів (ГА) у сироватці крові мишей вивчали в реакції аглютинації шляхом аглютинації еритроцитів барана антитілами в ізотонічному (0,9%) розчині натрію хлориду за методом Feizi-Monger [48].

2.10.2. Моделювання імунодефіциту

Імунодефіцитний стан (вторинний імунодефіцит) у тварин моделювали одноразовим внутрішньоочеревинним введенням гідрокортизону ацетату (ГКА, Фармак, Україна) у дозі 250 мг/кг [37, 136].

Рандомізацію проводили методом урни з урахуванням маси тіла тварин (відхилення у вихідній масі тварин не перевищувало 10%). Було сформовано 5 груп (n=10): негативний контроль (не вводилося ніяких зразків), позитивний контроль (вводили лише гідрокортизон), дослідні групи – секретом МСК у мінімальній ефективній концентрації 10 мкл/мл, в/м та п/ш, а також група референтного зразка Тималіну (5 мг/кг, в/м).

За добу після введення гідрокортизону ацетату (ГКА) проводили імунізацію тварин еритроцитами барана аналогічно п. 2.6.1 протягом 4 діб. Досліджувані зразки тваринам експериментальних груп вводили за 5 діб до відтворення імунодефіциту та протягом усього періоду експерименту аж до дня визначення показників імунної відповіді.

На 5 добу після моделювання імунодефіциту тварин виводили з експерименту шляхом декапітації під інгаляційним наркозом. Збирали кров, з якої одержують сироватку (методом центрифугування при 1500 об/хв. протягом 20 хв.), та селезінку.

В експерименті враховували три основні показники: виживаність (% тварин, які дожили до кінця експерименту), кількість АУК та титр ГА (аналогічно п. 2.6.1).

2.10.3. Фагоцитарна активність нейтрофілів

Експеримент проводили у два етапи. На першому етапі було сформовано 5 груп (n=6): контроль (не вводилося ніяких зразків), групи в/м введення цільної фракції екзометаболітів МСК у концентраціях 10, 20 та 50 мкл/мл та група референтного зразка Тималіну (5 мг/кг, в/м, Біофарма, Україна). На другому етапі було 4 групи (n=6): контроль (не вводилося ніяких зразків), групи п/ш введення цільної фракції екзометаболітів МСК у концентраціях 10, 20 та 50 мкл/мл.

Зразки вводили 1 раз на добу протягом 4 днів. За 1 годину після останнього введення зразків у щурів із хвостової вени брали зразки крові, змішували з гепарином та поміщали в пробірки по 0,2 мл. Додавали по 0,070 мл 0,05 % суспензії свіжовідмитих дріжджів та інкубували 40 хв (t 37 °С). Після закінчення інкубації з інкубаційної суміші готували мазки, висушували за t 37°С, фіксували в метиловому спирті, фарбували за Романівським-Гімзою, повторно висушували і мікроскопували під імерсією (зб. ×1000) [170].

Фагоцитарну активність нейтрофілів оцінювали за такими показниками: фагоцитарний індекс (ФІ) – % фагоцитуючих нейтрофілів на 100 поліморфно-ядерних лейкоцити; фагоцитарне число (ФЧ) – середня кількість клітин дріжджів, поглинутих одним нейтрофілом.

2.10.4. Модель «гіперчутливість уповільненого типу»

Стан клітинного адаптивного імунітету на фоні введення цільної фракції секретому МСК оцінювали за реакцією гіперчутливості уповільненого типу методом К.Р. Kitamura [85]. Реакція націлена на визначення здатності досліджуваного зразка впливати на продукцію сенсibiliзованими Т лімфоцитами-ефекторами медіаторів, які викликають інфільтрацію тканини клітинними елементами. Введення антигену в подушечку лапки тварини призводить до розвитку локального набряку.

Рандомізацію проводили методом урни з урахуванням маси тіла тварин (відхилення у вихідній масі тварин не перевищувало 10%). Було сформовано 7 груп (n=6): інтактний контроль (не вводилося ніяких зразків), імунізований контроль

(вводилися лише еритроцити барана), групи в/м введення цільної фракції екзометаболітів МСК у концентраціях 10 та 50 мкл/мл, групи п/ш введення цільної фракції екзометаболітів МСК у концентраціях 10 та 50 мкл/мл та група референтного зразка Тималіну (5 мг/кг, в/м, Біофарма, Україна).

Тварин всіх груп крім інтактного контролю імунізували одноразовим підшкірним введенням суспензії еритроцитів барана (Укрмедіаснаб, Україна) у дозі 2×10^5 клітин по 0,5 мл фізіологічного розчину натрію хлориду на 20 г маси тіла тварини. На 5 добу для індукції реакції мишам під апоневротичну пластинку однієї із задніх кінцівок (дослідна лапа) вводили завершальну дозу 10^8 еритроцитів барана, об'ємом 0,02 мл на тварину. У контралатеральну лапу (контрольну) вводили фізіологічний розчин у тому об'ємі.

За 48 годин після цього тварин виводили з експерименту під легким інгаляційним наркозом, відрізали стопи задніх кінцівок на рівні гомілковостопного суглоба і зважували на електронних вагах. Вираженість місцевої реакції оцінювали за співвідношенням величини маси стоп дослідної (m_e) та контрольної (m_c) лап у кожній групі тварин. Індекс реакції (RI) розраховували за такою формулою:

$$RI = \frac{m_e - m_c}{m_c} \times 100 \% \quad (2.10)$$

2.10.5. Модель «карагеніновий набряк»

Вивчення антиексудативної активності (АЕА) проводилось на класичній експериментальній моделі карагенінового набряку лапи у щурів [159], яка широко використовується в експериментальній фармакології для виявлення та оцінки протизапальної активності нових фармакологічно активних речовин.

Рандомізацію проводили методом урни з урахуванням маси тіла тварин (відхилення у вихідній масі тварин не перевищувало 10%). Було сформовано 5 груп ($n=6$): позитивний контроль (вводився лише карагенін), дослідні групи – секретом МСК у концентрації 50 мкл/мл, в/м та п/ш, а також дві група референтних зразків – імуномодулятору «Тималін» (Біофарма, Україна) у дозі 5 мг/кг та «Ортофен» (Здоров'я, Україна; діюча речовина – диклофенак натрію, нестероїдний протизапальний засіб, інгібітор простагландинсинтетази (циклооксигенази)) у дозі

8 мг/кг внутрішньочеревно. Зразки вводили за схемою: за 1 год. до моделювання набряку, друга ін'єкція за добу після введення карагеніну (Sigma, США) і далі продовжували введення ще два дні

Набряк викликали субплантарним введенням у праву задню стопу тварини 0,1 мл 1% розчину карагеніну [159]. У першу добу за розвитком набряку спостерігали протягом 4-х годин після введення карагеніну і далі на третю та п'яту добу після моделювання патології.

Виразність набряку оцінювали за об'ємом стопи, який вимірювали шляхом занурення в колбу тензіометра з 0,2% розчином хлориду натрію. Об'єм рідини в мл, який витіснила лапа, вважали еквівалентним об'єму лапи тварини. Перед відтворенням патології у щурів вимірювали початковий (вихідний) об'єм лапи. Антиексудативну активність (АЕА) виражали у відсотках за відношенням зміни об'єму контрольної ΔV_c та дослідної ΔV_e лап та розраховували за формулою:

$$AEA = \frac{\Delta V_c - \Delta V_e}{\Delta V_c} \times 100 \% \quad (2.11)$$

2.11. Статистичний аналіз

Одержані числові значення піддавалися статистичному аналізу з використанням переважно програми Excel для з'ясування значущості одержаних відмінностей [166, 167]. Аналіз виконували у стандартних статистичних умовах (рівень значущості $p \leq 0,05$, потужність статистичного критерію $\geq 80\%$).

Відмінності між пасажами МСК за показниками ростової та секреторної активності на першому етапі аналізували методом дисперсійного аналізу із застосуванням непараметричного критерію Краскла-Уолліса. У разі відхилення нульової гіпотези про рівність вибірок між собою, пасажі порівнювали з використанням критерію Т'юкі.

Кореляція між показниками оцінювали з використанням критерію Спірмена.

Окремі показники для обраних оптимальних та песимального пасажів нововиділеної та деконсервованої культур порівнювали з використанням критерію Манна-Вітні (Уїлкоксона) з поправкою Бонферроні. А відмінності

між представленістю поверхневих маркерів для нововиділеної та деконсервованої культур з використанням критерію Манна-Вітні (Уїлкоксона) без поправок.

Спектрограми різних фракцій екзометаболітів порівнювали між собою за допомогою багатовимірного шкалювання, проведеного за 21 точкою спектра, з використанням програми STATISTICA 12.

Вживаність тварин у досліді з моделюванням вторинного імунодефіциту аналізувалась з використанням критерію Фішера для вибірових часток. Інші показники, визначені у досліді з тваринами аналізувалися аналогічно описаній вище схемі:

- множинні порівняння здійснювалися двоетапно: проводився аналіз методом дисперсійного аналізу із застосуванням непараметричного критерію Краскла-Уолліса. У разі відхилення нульової гіпотези про рівність вибірок між собою, групи порівнювалися між собою попарно з використанням критерію Манна-Вітні (Уїлкоксона) з поправкою Бонферроні;

- у дво-тригрупових порівняннях групи порівнювалися між собою попарно з використанням критерію Манна-Вітні (Уїлкоксона).

Висновки до розділу 2

Охарактеризовано дизайн проведеного експериментального дослідження, включаючи опис моделей та етапів. Обґрунтовано використання технік роботи з культурою МСК. Описано методи одержання, фракціонування та оцінки складу екзометаболітів мезенхімальних стовбурових клітин. Обґрунтовано застосування моделей *in vitro*, *in vivo* та *ex vivo*, контрольовані показники, кількість груп та тварин у групі. Описано алгоритм статистичного аналізу виявлених відмінностей між групами.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Характеристика секретому мезенхімальних стовбурових клітин

3.1.1. Визначення пасажу мезенхімальних стовбурових клітин для збору секретому

Мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) є самотривкою популяцією клоногенних клітин з високим проліферативним потенціалом і здатністю до диференціації та розташовані в багатьох тканинах і органах [23, 145].

За сучасними уявленнями виділяють такі критерії [23, 145] приналежності до МСК: (1) веретеноподібна морфологія, (2) адгезивний ріст на пластику, (3) наявність експресії поверхневих маркерів CD29, CD44, CD90 та відсутність експресії CD45 та CD34 [2], (4) відсутність експресії факторів індукованих плюрипотентних клітин; (5) можливість диференціації за трьома клітинними лініями; (6) відсутність здатності до утворення тератом; (7) секреція відповідних МСК паракринних факторів.

Морфологія нововиділених мезенхімальних стовбурових клітин показана на рисунку 3.1 (а–с). Клітини мають типову веретеноподібну форму, рідше клітини трикутної (фібробластоподібної) чи округлої форми. Таким чином, спостерігаємо типовий для МСК адгезивний ріст на пластику у формі острівців – утворення клоногенних популяцій з типовою для даного типу клітин морфологією (рис. 3.1, а–с).

МСК є досить неоднорідною популяцією клітин, що чітко виявляється в їх морфології. Хоча основними морфотипами МСК усіх пасажів є веретеноподібні та фібробластоподібні, у культурах різних пасажів зустрічаються й інші типи. Так, наприклад, виявлено досить багато округлих клітин. Хоча більшість із них знаходяться у флотуючій фракції та відносяться до клітин, не здатних до адгезії або мертвих клітин, округлі клітини також зустрічаються в моношарі. Grzesiak та ін. [60] відзначають наявність у культурі клітинних елементів вихідної тканини. Наприклад, вони описують наявність преадипоцитів, фібробластів, гладком'язових клітин та ендотеліальних клітин зі значним домінуванням МСК у культурі,

виділений із жирової тканини. Автори відзначають зниження варіабельності морфології клітин культури по мірі культивування, що, на їх думку, пов'язане з елімінацією ендотеліальних і гемопоетичних клітин за відсутності специфічних факторів росту. У дослідженні не було виявлено істотного зменшення різноманітності морфотипів при культивуванні. На пікових пасажах (3–5), навпаки, спостерігалось зменшення частки веретеноподібних клітин, що, ймовірно, пов'язане з активною продукцією факторів росту МСК, що призводить до посилення проліферації інших типів клітин.

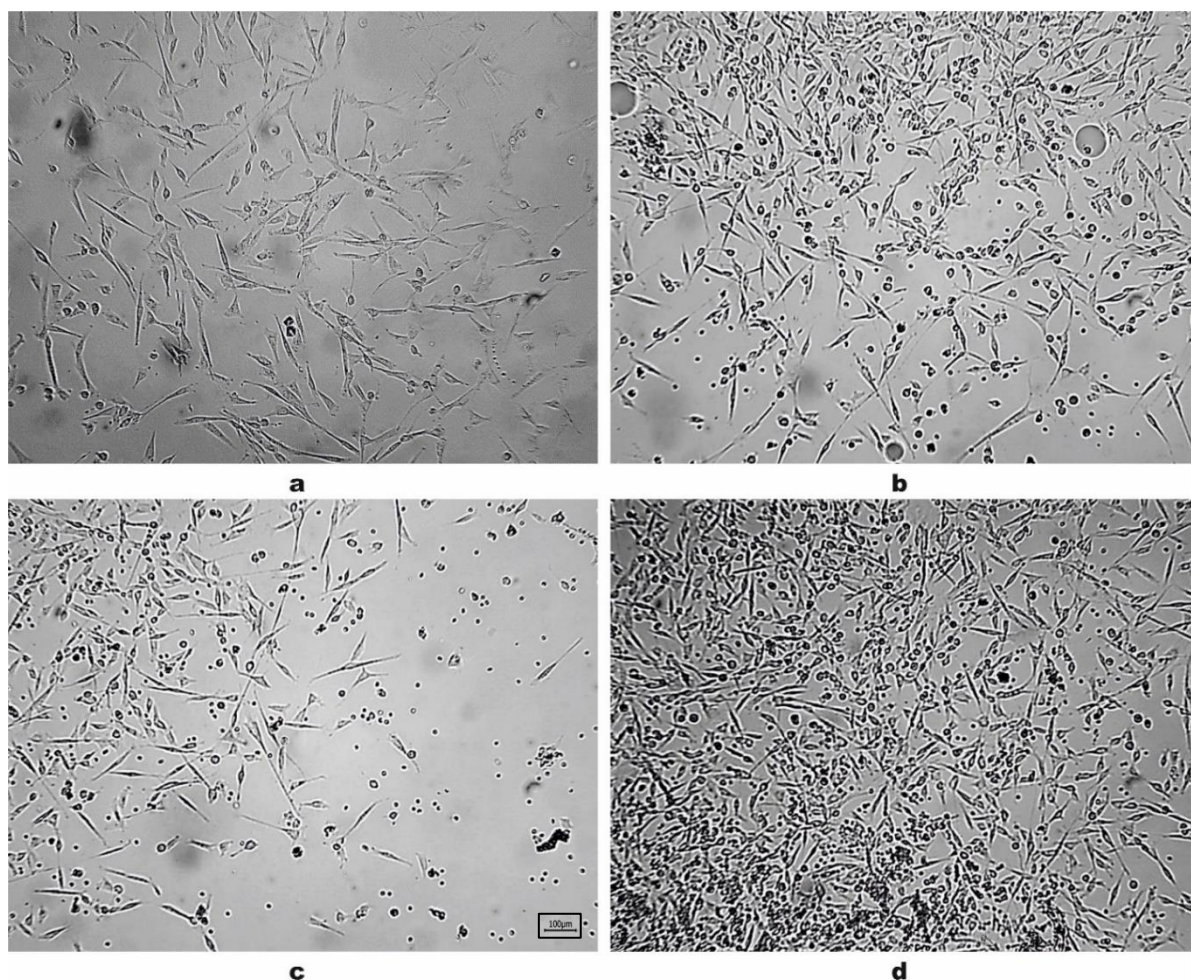


Рис. 3.1. МСК собаки, виділені з кісткового мозку (зб. $\times 100$, Біолаб-І): а – 2-й пасаж нововиділених клітин (ступінь заповнення моношару $<50\%$); б – 3й пасаж нововиділених клітин (ступінь заповнення моношару $>50\%$); с – 10-й пасаж нововиділених клітин (ступінь заповнення моношару $<40\%$, уповільнення росту культури); д – 2-й пасаж після деконсервування (ступінь заповнення моношару близько 80% ; спостерігаються клітинні конгломерати)

Культура нововиділених клітин досягає піку росту, починаючи з третього пасажу (рис. 3.1, б), що чітко простежується на фоні культури другого пасажу (рис. 3.1, а). Починаючи з дев'ятого пасажу, культура виявляє більш повільний ріст (рис. 3.1, с), що пов'язано з переходом до фази інгібування росту, характерної для диплоїдних культур [50].

Кріоконсервування не виявляє негативного впливу на морфологічні показники культури: клітини не змінюють форму, відсутні ознаки цитотоксичного впливу. Як бачимо на рис. 3.1d, вже на другому пасажі відбувається повне відновлення ростових властивостей культури, клітини активно діляться та за заповненням субстрату відповідають 4–5 пасажу після виділення. Разом з тим, у культурі спостерігаються окремі конгломерати, що погано розходяться та не характерні для нововиділеної культури.

Оцінку ростових властивостей культури проводили за трьома основними показниками: конфлюентність (заповненість) моношару, життєздатність культури та інтенсивність проліферації. Результати визначення цих показників для десяти пасажів нововиділеної культури показано рисунку 3.2.

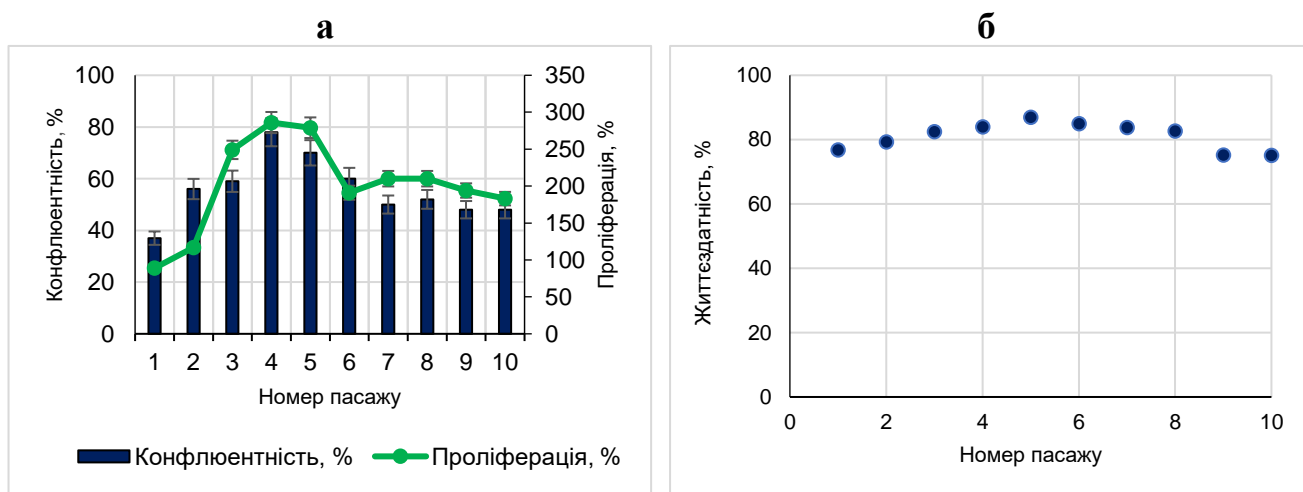


Рис. 3.2. Конфлюентність (заповненість) моношару в % (сині стовпці, ліва шкала) та кількість клітин по відношенню до вихідної у % (зелена лінія, права шкала) на 7^{му} добу росту відповідного пасажу (а); % живих клітин (життєздатність) за фарбуванням трипановим синім (б). Наведені середні значення для нововиділеної культури ($\bar{X} \pm \text{ДІ}_{95}$), n=6

Конфлюентність моношару, чи його заповненість, – показник експансії клітинами субстрату, що виражається як відсоток зайнятої клітинами поверхні культуральної посудини. Культури пересівались через рівні проміжки часу (7 діб), тому рівень конфлюентності моношару (рис. 3.2а), якого вони досягали на момент пересіву, може бути використаний для оцінки їхньої інтенсивності їхнього росту.

Відразу після виділення (1-й пасаж) та у фазу інгібування росту (9-10 пасажі) експансія субстрату культурою відбувається повільно, заповненість моношару в момент пересіву (на 7^{му} добу) становить менше 50%. У період найактивнішого росту (4–5 пасажі) цей показник становить 70-80%. Спостереження підтверджуються результатами статистичного аналізу значущості відмінностей за попарного порівняння конфлюентності моношару між різними пасажами, виконаного за допомогою критерію Т'юкі (табл. 3.1). У цілому, для мезенхімальних стовбурових клітин зрідка зустрічається досягнення конфлюентності моношару вище за 80%, що, вірогідно, забезпечується контактним гальмуванням.

Таблиця 3.1

Матриця значущості різниць \bar{X} конфлюентності моношару культур різних пасажів, критерій Т'юкі (нововиділена культура МСК)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
2	19**								
3	23**	3							
4	42**	23**	19**						
5	33**	14*	11	-8					
6	23**	4	1	-18**	-10				
7	13	-6	-9	-28**	-20**	-10			
8	15*	-4	-8	-27**	-18**	-8	2		
9	12	-8	-11	-30**	-22**	-12	-2	-3	
10	12	-8	-11	-30**	-22**	-12	-2	-3	0

Примітки: критерій Краскла-Уолліса – $p \leq 0,001$; * – відмінності між пасажами значущі на рівні $p \leq 0,05$; ** – різницю між пасажами значущі на рівні $p \leq 0,01$; знак «мінус» вказує на менше середнє значення у пізнішого пасажу

Проліферативний індекс показує, на скільки % (або у скільки разів) збільшилася кількість клітин у культурі по відношенню до вихідної (посівної)

концентрації. Цей показник був найвищим у культурах 3–5 пасажів (рис. 3.2а). Після п'ятого пасажу проліферативний індекс культури значуще знижується і коливається близько значення 200%. Спостереження підтверджуються результатами статистичного аналізу значущості відмінностей за попарного порівняння проліферативного індексу між різними пасажами, виконаного за допомогою критерію Т'юкі (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Матриця значущості різниць \bar{X} проліферативного індексу на 7^{му} добу росту різних пасажів, критерій Т'юкі (нововиділена культура МСК)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
2	0,27								
3	1,60**	1,32**							
4	1,97**	1,69**	0,37						
5	1,89**	1,62**	0,30	-0,07					
6	1,02**	0,75**	-0,58	-0,95**	-0,87**				
7	1,20**	0,93**	-0,39	-0,76**	-0,69*	0,18			
8	1,21**	0,93**	-0,39	-0,76**	-0,69*	0,19	0,00		
9	1,05**	0,78**	-0,55	-0,92**	-0,84**	0,03	-0,15	-0,16	
10	0,94**	0,67*	-0,66*	-1,03**	-0,95**	-0,08	-0,26	-0,27	-0,11

Примітки: критерій Краскла-Уолліса – $p \leq 0,001$; * – відмінності між пасажами значущі на рівні $p \leq 0,05$; ** – різницю між пасажами значущі на рівні $p \leq 0,01$; знак «мінус» вказує на менше середнє значення у пізнішого пасажу

Життєздатність культури виражається у % живих клітин від їх загальної кількості та визначалася за допомогою прижиттєвого фарбування трипановим синім. У досліді цей показник був на рівні 75% і виявляв незначні коливання (відмінності між пасажами за цим показником не значущі; критерій Краскла-Уолліса – $p > 0,05$). Це вказує на те, що умови культивування не були порушені.

Аналіз взаємозв'язку між розглянутими ростовими показниками культури, виконаний за допомогою критерію Спірмена, показав відносно високу та значущу кореляцію ($\rho = 0,79$ між заповненістю моношару та активністю проліферації, $\rho = 0,71$ між заповненістю моношару та життєздатністю, $\rho = 0,64$ між активністю проліферації та життєздатністю; $p \leq 0,05$).

В умовах біотехнологічних виробництв зазвичай є потреба у тривалому низькотемпературному зберіганні (депонуванні) культури клітин-продуцентів. Тому було вивчено ростові властивості МСК після кріоконсервування в рідкому азоті.

Ростові характеристики деконсервованої культури МСК різних пасажів представлені на рис. 3.3. У дослідженні встановлено, що розморожені культури швидше досягають високої інтенсивності експансії субстрату. Так, найактивнішими за ростовими показниками були клітини 2–5 пасажів (рис 3.3а), тоді як нововиділені культури досягають піку росту лише третьому пасажі (рис. 3.2а).

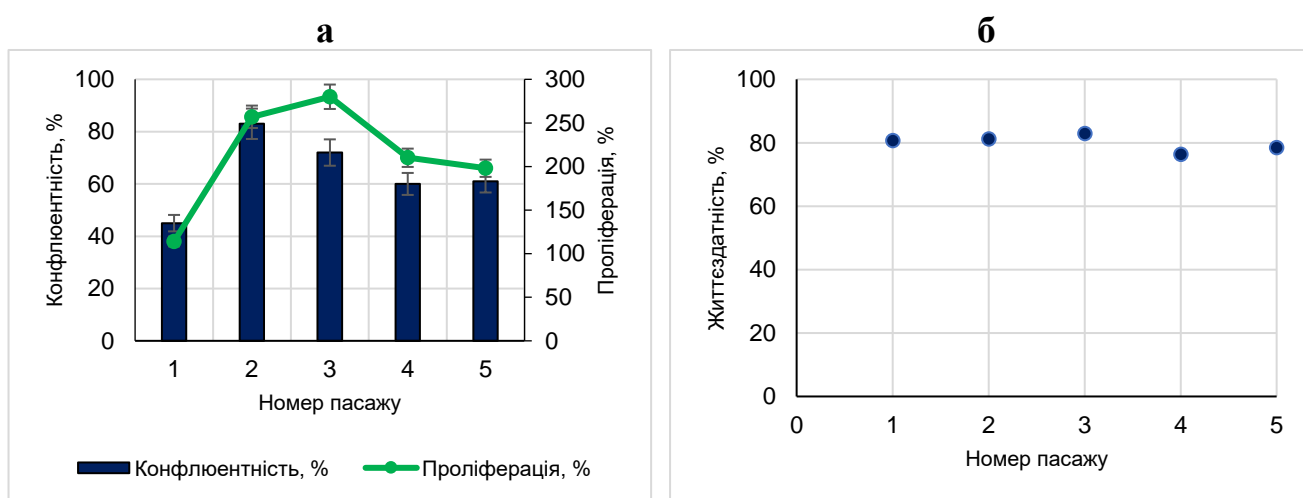


Рис. 3.3. Конфлюентність (заповненість) моношару, %, (сині стовпці, ліва шкала) і кількість клітин по відношенню до вихідного в % (зелена лінія, права шкала) на 7му добу росту відповідного пасажу (а); % живих клітин (життєздатність) за фарбуванням трипановим синім (б). Наведені середні значення для деконсервованої культури ($\bar{X} \pm \text{ДІ}_{95}$), n=6

У таблицях 3.3 та 3.4 наведено статистичний аналіз значущості відмінностей у заповненості моношару (конфлюентність, %) та інтенсивності проліферації (проліферативний індекс, %) між пасажами деконсервованої культури. На 2^{му} пасажі спостерігалася значуще збільшення конфлюентності моношару. Потім цей показник стабілізувався і був на рівні 1^{го} пасажу. У той час як активність проліферації була максимальною на 2–3 пасажах, після чого значно знижувалася, але залишалася значуще вище, ніж на 1^{му} пасажі. Більш швидкий набір

проліферативної активності деконсервованої культури у порівнянні з нововиділеною, вірогідно пов'язаний зі змінами експресії поверхневих молекул, які відбулись у клітинах під час адаптації до моношарового культивування до заморожування.

Слід зазначити, що показники, що розглядаються в деконсервованій культурі, значуще перевищували нововиділену тільки на другому пасажі (для показника проліферації також і на першому; критерій Манна-Уїтні (Вілкоксона), $p \leq 0,05$), на інших пасажах статистично значущих відмінностей не виявлено.

Таблиця 3.3

Матриця значущості різниць \bar{X} конфлюентності моношару культур різних пасажів, критерій Т'юкі (деконсервована культура МСК)

	1	2	3	4
2	38**			
3	20*	-18*		
4	15	-23**	-5	
5	16	-22**	-4	1

Таблиця 3.4

Матриця значущості різниць \bar{X} проліферативного індексу на 7^{му} добу росту різних пасажів, критерій Т'юкі (деконсервована культура МСК)

	1	2	3	4
2	1,43**			
3	1,66**	0,23		
4	0,95**	-0,47*	-0,70**	
5	0,84**	-0,58**	-0,82**	-0,11

Примітки до табл. 3.3 та 3.4: критерій Краскла-Уолліса – $p \leq 0,001$; * – відмінності між пасажами значущі на рівні $p \leq 0,05$; ** – різницю між пасажами значущі на рівні $p \leq 0,01$; знак «мінус» вказує на менше середнє значення у пізнішого пасажу

Життєздатність деконсервованої культури була на одному рівні із нововиділеною (відмінності статистично не значущі, критерій Манна-Уїтні (Вілкоксона)), що разом з відсутністю змін у морфології та ознак цитотоксичності вказує на відсутність негативного впливу процесу кріоконсервування та дії кріопротектора (ДМСО) у концентрації 10% стан клітин.

Зв'язок між конфлюентністю та проліферацією у випадку деконсервованої культури був сильнішим, ніж для виділеної *de novo* ($\rho=0,79$, $p\leq 0,05$), а життєздатність культури практично не змінювалася протягом культивування, тому слабо корелює із ростовими показниками ($\rho=0,36$ та $\rho=0,32$).

Проліферативна активність є важливим параметром клітинної культури, що вказує на її ростові властивості. Загальновідомо, що диплоїдні культури, до складу яких входять МСК, на відміну від трансплантованих або трансформованих, мають нижчу швидкість росту, яка зменшується по мірі пасажування [50]. У літературі зазначено, що при 0 пасажі клітини починають утворювати колонії, починаючи з 3ї доби росту культури, а моношар стає напівконфлюентним на 5–6 добу [62]. Описані дані узгоджуються з результатами, отриманими в дослідженні для ранніх пасажів. Було також зазначено, що під час культивування (Guercio та ін. [62] постулювали, що з 1го пасажу, у нашому дослідженні це спостерігалось з 3го пасажу; можливо, це пов'язано з різними джерелами МСК – Guercio та ін. [62] використовували жирову тканину) пік проліферативної активності настає при досягненні напівконфлюентності моношару через 3–4 дні, і цей пік триває до 5–6 пасажів, що узгоджується з даними, отриманими в дослідженні. Припущення про повільніший ріст МСК раннього пасажу, виділених із кісткового мозку, порівняно з клітинами, отриманими з жирової тканини, було підтверджено Kisiel та ін. [84]. Ці дослідники отримали дані щодо кількості клітин через 24, 48, 72 та 96 годин росту культури. Прологарифмувавши одержані результати, вони виявили, що для досягнення конфлюентності моношару на рівні 80–100% на ранніх пасажах потрібно $13,86\pm 2,04$ доби для культури, виділеної з жирової тканини, та $16,17\pm 4,17$ – для культури, виділеної з кісткового мозку [84]. Одержані в дослідженні дані щодо динаміки проліферативної активності МСК, виділених із кісткового мозку (пік на 3–5-му пасажі, вихід на плато та ослаблення після 5-го пасажу), в цілому узгоджуються з даними інших авторів, наприклад, Kang та ін. [81]. Однак у дослідженні ослаблення проліферації після 5-го пасажу було більш вираженим. Слід також зазначити, що, згідно з Kang та ін. [81], МСК кісткового

мозку першими досягають плато в проліферативній активності і менше поділяються на пізніх пасажах (6–10), ніж МСК, виділені з інших джерел.

Дослідження поверхневих маркерів мезенхімальних стовбурових клітин показало характерний для них [145] імунофенотип (табл. 3.5). Відмінності за цим показником між нововиділеними та деконсервованими клітинами виявлені не були, аналіз виконаний з використанням критерію Манна-Уїтні (Вілкоксона). Підтверджено CD44- та CD90-позитивність, а також CD34- та CD45-негативність.

Таблиця 3.5

Частка нововиділених та деконсервованих клітин, що експресують поверхневі CD-маркери ($\bar{X} \pm \text{ДІ}_{95}$), n=6

Поверхневий маркер	Нововиділені МСК, 2й пасаж, %	Деконсервовані МСК, 2й пасаж, %
CD44	98,5 ± 0,4	97,9 ± 0,6
CD90	99,5 ± 0,3	99,3 ± 0,2
CD34	3,7 ± 1,5	3,4 ± 0,8
CD45	2,1 ± 1,1	2,7 ± 1,1

Для оцінки диференціовального потенціалу одержаної культури відбиралися клітини п'ятого пасажу, на яких проводилася штучна індукція диференціювання в остеогенному, адипогенному та хондрогенному напрямках.

До культури додавали індуктори диференціювання (n=3 для кожного напрямку): 10 ммоль/л гліцерол-2-фосфату, 50 мкг/мл L-аскорбінової кислоти та 100 нмоль/л дексаметазону для остеогенезу; 0,2 ммоль/л індометацину, 0,5 ммоль/л 3-ізобутил-1-метилксантину, 0,01 мг/мл інсуліну та 1 мкмоль/л дексаметазону – для адипогенезу; 0,1 мкмоль/л дексаметазону, 0,05 ммоль/л аскорбінової кислоти, 10 нг/мл TGF – для хондрогенезу. Клітини інкубувалися за стандартних умов (температура 37±1 °С, концентрація CO₂ – 5±0,2 %). Кожні 3–4 доби поживне середовище змінювали на свіже без зміни його складу.

На 21 добу інкубування мезенхімальних стовбурових клітин з індукторами було здійснено ідентифікацію результатів диференціювання шляхом фарбування клітинних включень (ліпідні краплі) або специфічних компонентів міжклітинного

матриксу (рис 3.4: 1b, 2b, 3b). Контроль – культура мезенхімальних стовбурових клітин без додавання індуктора (рис. 3.4: 1a, 2a, 3a).

Диференціювання в остеогенному напрямку підтверджено фарбуванням за допомогою алізаринового червоного, що виявляє нерозчинні солі кальцію в клітинах та матриксі (рис. 3.4, 1b). Накопичення ліпідних включень, характерних для адіпоцитів, було виявлено за допомогою фарбування барвником Oil Red (рис. 3.4, 2b). Для виявлення сульфатованих глікозаміногліканів, що накопичуються в міжклітинному матриксі під час хондрогенного диференціювання, використовували фарбування альціановим синім (рис. 3.4, 3b).

Таким чином, була підтверджена можливість трилінійної диференціації, що є ключовою ознакою МСК.

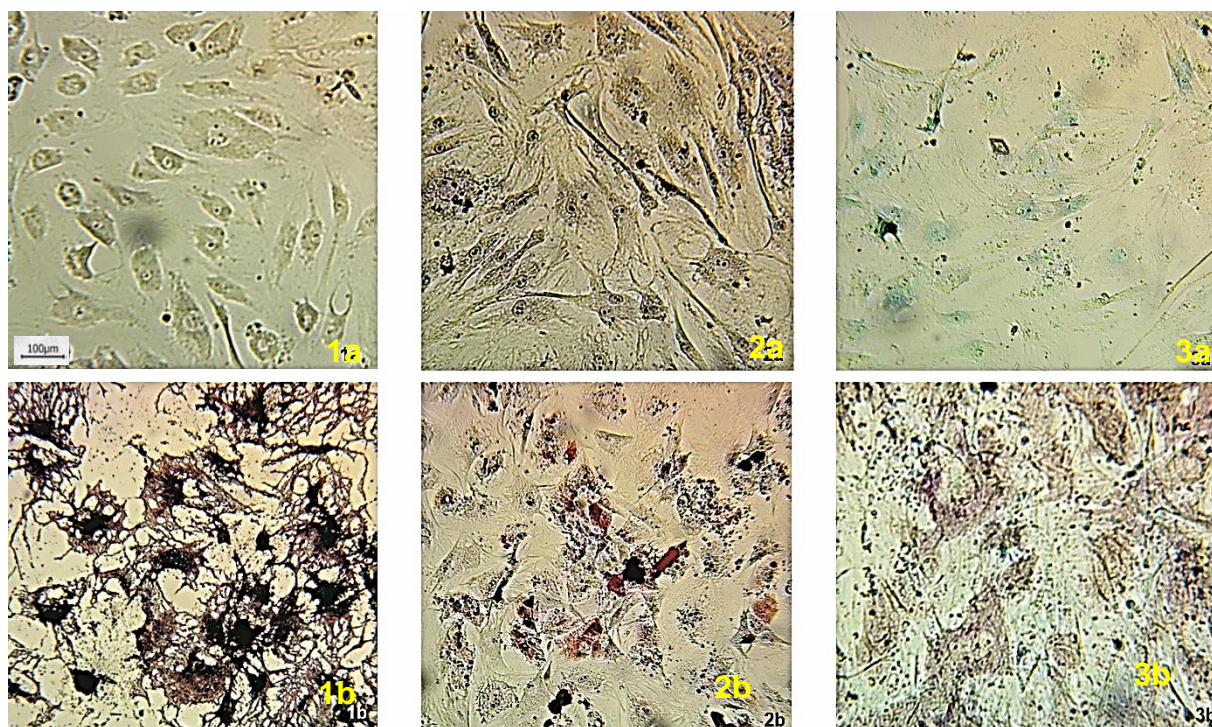


Рис. 3.4. Ідентифікація клітинних культур різних ліній диференціювання за допомогою різних методів фарбування на 21 добу після додавання індуктора (зб. $\times 200$, мікроскоп Біолам М-3), типові фото: 1b – *остеогенне диференціювання*: остеоцити, відкладення кальцію, пофарбовані алізариновим червоним; 2b – *адіпогенне диференціювання*: адіпоцити, жирові відкладення, пофарбовані Oil Red; 3b – *хондрогенне диференціювання*: хондроцити, глікозаміноглікани, пофарбовані барвником альціановим синім; 1a, 2a, 3a – контроль, недиференційовані клітини (без додавання індуктора)

Секреторна активність мезенхімальних стовбурових клітин оцінювалася за властивостями кондиціонованого середовища, в якому їх культивували, а саме – за концентрацією білка та мітогенною активністю щодо культури мишачих фібробластів (рис. 3.5).

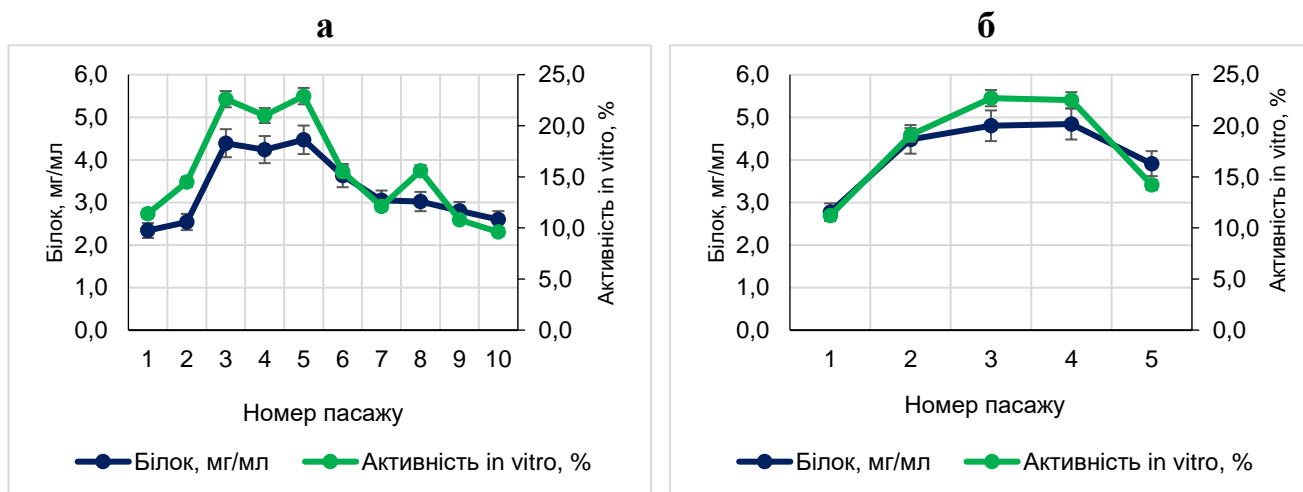


Рис. 3.5. Концентрація білка (синя лінія, ліва шкала) у кондиціонованому середовищі, в якому культивувалися МСК собаки, виділені *de novo* (а) та деконсервовані після низькотемпературного зберігання (б) та його мітогенна активність (зелена лінія, права шкала), ($\bar{X} \pm D_{I_{95}}$), $n=6$. В усіх зразках концентрація білка значуще перевищувала контроль, в якому клітини не культивували ($p \leq 0,01$; критерій Манна-Уїтні (Вілкоксона); вміст білка в контролі – $1,98 \pm 0,09$ мг/мл)

Обидва досліджені показники як для нововиділеної, так і для деконсервованої культур сильно позитивно та значуще корелюють між собою ($\rho=0,93$ і $\rho=0,96$ відповідно; $p \leq 0,01$), тому можна говорити про динаміку секреторної активності в цілому.

Аналіз значущості відмінностей у концентрації білка у кондиціонованих середовищах, одержаних від різних пасажів нововиділеної та дконсервованої культури МСК, а також їхньої мітогенної активності виконано за допомогою методу Т'юкі (табл. 3.6–3.9).

Концентрація білка в кондиційованому середовищі, в якому культивували нововиділені МСК значуще зростала до третього пасажу, потім 3–5 пасажах залишалася одному рівні (табл. 3.6. та рис. 3.5, а, синя лінія). Після 5^{го} пасажу спостерігається значуще зниження цього показника: концентрація білка у 6–10 пасажах значуще нижче, ніж у 5^{му}. Показник знижується аж до 10^{го} пасажу, на 10^{му} пасажі зрівнюється з 1^м (відмінності між ними незначущі).

Таблиця 3.6.

Матриця значущості різниць \bar{X} концентрації білка кондиційованого середовища від МСК різних пасажів, критерій Т'юкі (нововиділена культура)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
2	1,71*								
3	2,03*	1,85*							
4	2,07*	1,69*	-0,16						
5	2,13*	1,93*	0,07	0,23					
6	1,30*	1,09*	-0,76*	-0,60*	-0,84*				
7	0,71*	0,51*	-1,35*	-1,19*	-1,42*	-0,58*			
8	0,69*	0,48*	-1,37*	-1,21*	-1,45*	-0,61*	-0,02		
9	0,46*	0,26	-1,60*	-1,44*	-1,67*	-0,83*	-0,25	-0,42*	
10	0,26	0,06	-1,80*	-1,64*	-1,87*	-1,03*	-0,45*	-0,20	-0,20

Примітка: критерій Краскла-Уолліса – $p \leq 0,001$; * – відмінності між пасажами значущі на рівні $p \leq 0,01$; знак «мінус» вказує на менше середнє значення у пізнішого пасажу

Щодо мітогенної активності секретому нововиділених МСК, визначеної посилення проліферації фібробластами миші у після додавання 100 мкл зразка кондиційованого середовища у порівнянні з контрольною культурою (табл.3.7 і рис. 3.5а (зелена лінія)), то динаміка показника збігається з динамікою змін концентрації білка за винятком додаткового підвищення на 8^{му} пасажі. Не всі відмінності мали статистично значущий характер, через невисокі значення цих відмінностей і високу варіабельність у межах вибірки.

Таблиця 3.7

Матриця значущості різниць \bar{X} концентрації мітогенної активності кондиційованого середовища від МСК різних пасажів, критерій Т'юкі (нововиділена культура)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
2	3,12								
3	11,19**	8,07**							
4	9,60**	6,48**	-1,59						
5	11,55**	8,42**	0,35	1,95					
6	4,08	0,96	-7,11**	-5,52*	-7,46**				
7	0,73	-2,39	-10,46**	-8,87**	-10,82**	-3,35			
8	4,17	1,05	-7,02**	-5,42*	-7,37**	0,09	3,44		
9	-0,59	-3,71	-11,78**	-10,18**	-12,13**	-4,67	-1,32	-4,76*	
10	-1,74	-4,86*	-12,93**	-11,34**	-13,28**	-5,82**	-2,47	-5,91**	-1,15

Примітка: критерій Краскла-Уолліса – $p \leq 0,001$; * – відмінності між пасажами значущі на рівні $p \leq 0,05$; ** – різницю між пасажами значущі на рівні $p \leq 0,01$; знак «мінус» вказує на менше середнє значення у пізнішого пасажу

За даними, наведеними у табл. 3.8 та 3.9, а також рис 3.5б, пік секреторної активності деконсервованої культури МСК припадає 2–4 пасажі. Це підтверджується статистично значущим підвищенням концентрації білка по відношенню до 1^{го} пасажу та зниження у 5^{му} пасажі порівняно з 2–4. При аналізі значущості відмінностей у мітогенній активності між кондиційованими середовищами, отриманими від МСК різних пасажів, також виявлене значуще зниження 5^{му} пасажі, проте відмінності з 1^м пасажем не настільки виражені. Причина цього, як і у випадку із нововиділеною культурою, у невисоких значеннях спостережуваних відмінностей та високій варіабельності в межах вибірки.

Таблиця 3.8

Матриця значимості різниць \bar{X} концентрації білка кондиційованого середовища від МСК різних пасажів, критерій Т'юкі (деконсервована культура)

	1	2	3	4
2	1,71**			
3	2,03**	0,32		
4	2,07**	0,36	0,03	
5	1,14**	-0,57*	-0,89**	-0,93**

Примітка: критерій Краскла-Уолліса – $p \leq 0,001$; * – відмінності між пасажами значущі на рівні $p \leq 0,05$; ** – різницю між пасажами значущі на рівні $p \leq 0,01$; знак «мінус» вказує на менше середнє значення у пізнішого пасажу

Матриця значущості різниць \bar{X} концентрації мітогенної активності кондиційованого середовища від МСК різних пасажів, критерій Т'юкі (деконсервована культура)

	1	2	3	4
2	5,96			
3	10,02*	4,06		
4	9,99*	4,02	-0,04	
5	-4,73	-10,69*	-14,75*	-14,71*

Примітка: критерій Краскла-Уолліса – $p \leq 0,001$; * – відмінності між пасажами значущі на рівні $p \leq 0,01$; знак «мінус» вказує на менше середнє значення у пізнішого пасажу

Динаміку зміни продукції білку за пасажами в літературі не виявлено [4, 12, 125]. У дослідженні максимальна продукція за кількістю клітин була у перших двох пасажах. У пікових пасажах (3–5), у яких спостерігалася максимальна ростова активність, спостерігалось достовірне зниження відносної секреції білкових речовин, але за рахунок більшого росту клітин кінцева концентрація продуктів у мл була максимальною. У міру зниження проліферативної активності відносна продукція білків МСК зростає, але це збільшення не було статистично значущим порівняно з піковими пасажами. Ця обставина свідчить про зниження секреторної активності в міру старіння культури клітин (досягнення фази інгібування росту).

На рисунку 3.6 показані зміни у проліферативній та секреторній активності нововиділених та деконсервованих клітин протягом культивування (статистичну значущість спостережуваних змін обговорено вище). Піки обох активностей збігаються, що підтверджується високою позитивною кореляцією між показниками ($\rho=0,72$ – для виділеної *de novo*, $\rho=0,82$ – для деконсервованої культури; $p \leq 0,05$).

Високі ростові показники у поєднанні з високим вмістом та активністю екзометаболітів (секретому) вказують на те, що оптимальними для отримання цільового продукту є 3–5 пасажі нововиділеної культури та 2–4 пасажі деконсервованої.

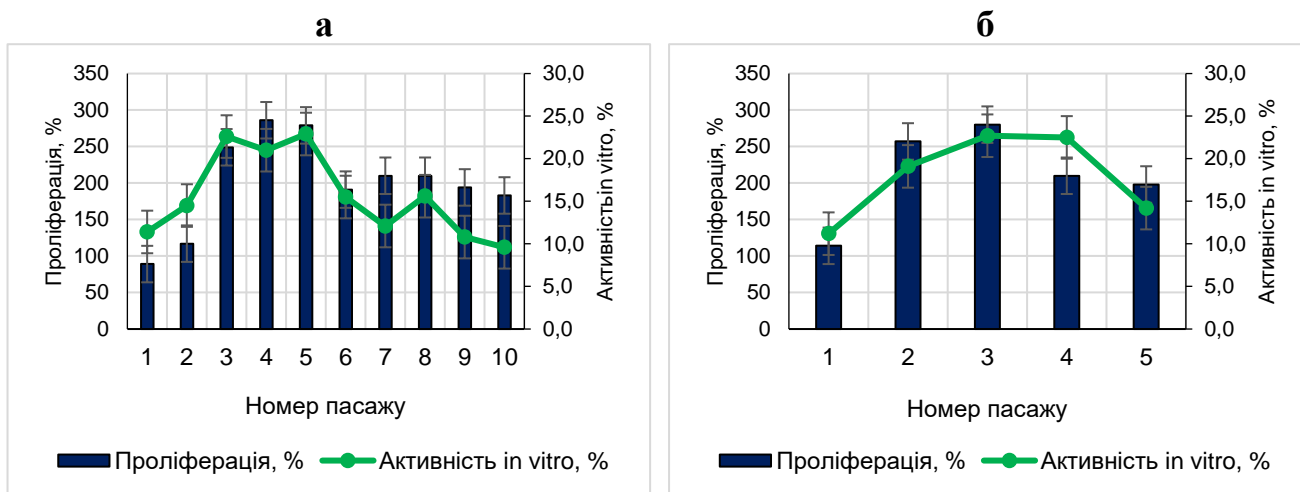


Рис. 3.6. Кількість клітин по відношенню до вихідної (проліферативний індекс), %, (сині стовпці, ліва шкала) на 7^{му} добу росту відповідного пасажу та мітогенна активність (зелена лінія, права шкала) кондиційованого середовища, в якому культивувалися МСК для нововиділених (а) і деконсервованих після низькотемпературного зберігання в рідкому азоті (б) клітин ($\bar{X} \pm \text{ДІ}_{95}$), n=6

3.1.2. Оцінка складу екзометаболітів мезенхімальних стовбурових клітин

Можливість використання МСК для відновлення тканин людини та тварин викликає інтерес у медиків та оцінюється при лікуванні низки захворювань. Останні дані свідчать про те, що терапевтичні ефекти МСК можуть бути опосередковані через вивільнення екзометаболітів – позаклітинних везикул та розчинних біологічно активних молекул, які разом формують секретом МСК. Визначають роль окремих цитокінів, що входять до складу секретому, в регенерації органів, наприклад, печінки. Так, описані цитопротекторна дія на гепатоцити ІЛ-6, пом'якшення запалення печінки та зменшення впливу природних кілерів та гепатотоксичності ІЛ-10, а також імуномодулююча активність та виражена мітогенна дія до гепатоцитів HGF [40, 69].

Описані цитокіни були визначені в кондиціонованому середовищі, одержаному від різних пасажів нововиділених та деконсервованих мезенхемальних стовбурових клітин (табл. 3.10).

Концентрації протизапального ІЛ-10, прозапального ІЛ-6 та ростового фактору гепатоцитів у кондиційованому середовищі МСК різних пасажів ($\bar{X} \pm ДП_{95}$), n=6

Культура	Концентрація, пг/мл		
	ІЛ-10	ІЛ-6	HGF
Контроль ¹	0,9 ± 0,8 ⁴	0,1 ± 0,2 ⁴	0,6 ± 1,2 ⁴
3 пасаж (нововиділена)	9,5 ± 1,6 ²	2,5 ± 0,3 ²	4,5 ± 0,3 ²
4 пасаж (нововиділена)	7,9 ± 0,6 ²	2,2 ± 0,3 ²	5,1 ± 0,5 ²
2 пасаж (деконсервована)	7,9 ± 0,7 ³	2,1 ± 0,1 ³	4,5 ± 0,8 ²
10 пасаж (нововиділена)	6,7 ± 0,3	1,8 ± 0,1	3,2 ± 0,1

Примітки: ¹ Контроль – ростове середовище, в якому не культивували клітини. Статистичний аналіз виконаний методом Манна-Уїтні (Вілкоксона): 2 – відмінності з 10 пасажем значущі, $p \leq 0,01$; 3 – відмінності з 10 пасажем значущі, $p \leq 0,05$; 4 – за межами визначення

М. Kamimoto та ін. [80] постулюють, що гемоксигеназа-1 (НО-1) забезпечує механізм захисту від ендотоксемії при пошкодженні тканин печінки під час сепсису, контролюючи баланс ІЛ-6/ІЛ-10. Також вони на моделі гострого пошкодження печінки мишей одноразовим внутрішньоочеревинним введенням ліпополісахариду *Escherichia coli* у дозі 6 мг/кг маси тіла довели, що фактор росту гепатоцитів (HGF) забезпечує підтримку експресії НО-1 у макрофагах, тим самим підвищуючи концентрацію ІЛ-10 продукцію ІЛ-6 шляхом введення екзогенного рекомбінантного HGF. HGF блокував виникнення пошкоджень печінки у мишей, які отримували ліпополісахарид, а інгібітор НО-1 (Sn-PP) послаблював гепатопротекторну дію HGF і підвищував концентрацію ІЛ-6 у плазмі та знижував рівень ІЛ-10.

У всіх досліджених експериментальних зразках спостерігалось переважання протизапального цитокіну ІЛ-10 по відношенню до прозапального ІЛ-6 (у 3,6–3,8 рази) та висока концентрація ростового фактора HGF, який регулює їх співвідношення *in vivo*, а також підвищують проліферативну активність (табл. 3.10). Спостережені біологічно активні молекули мають захищати печінку від пошкодження і стимулювати її відновлення.

За результатами дослідження ростових властивостей культури, вмісту білка та мітогенної активності кондиційованого середовища були обрані варіанти

оптимального (3^{го} та 4^{го} пасажі знову виділеної, 2^{го} пасаж деконсервованої) та песимального (10^й пасаж) режимів культивування. Як контроль використано ростове середовище, в якому не культивували клітини.

За результатами імуноферментного аналізу було встановлено, що ростове середовище, в якому не культивували клітини, не містить досліджуваних цитокінів та факторів росту (поза межами визначення). За вмістом цитокінів кондиційовані середовища, отримані при оптимальних пасажах, значуще перевищують варіант, отриманий за песимальних умов 15–40 %, отримана значима різниця. Також слід відзначити високу значущу позитивну кореляцію між вмістом різних цитокінів (ρ на рівні 0,97–0,99, $p \leq 0,05$).

Результати визначення показників концентрації білка та мітогенної активності для пасажів, описаних вище, наведено у табл. 3.11. За вмістом білка та мітогенної активності всі три варіанти кондиційованого середовища, отримані при оптимальних режимах культивування, статистично значно перевищують зразок, отриманий від культури десятого пасажу і контролю. Між собою зазначені варіанти не розрізняються. Також слід зазначити, що позитивна кореляція між показниками біологічної активності екзометаболітів вища для аналізованих варіантів, ніж для всіх пасажів загалом ($\rho=0,97$, $p \leq 0,05$, проти $\rho=0,93$ –0,96).

Таблиця 3.11

Концентрація білка та активність підвищення заселення субстрату фібробластами при додаванні зразка в середу ($\bar{X} \pm ДІ_{95}$), $n=6$

Культура	Концентрація білка, мг/ мл	Активність <i>in vitro</i> , %
Контроль ¹	1,98 ± 0,09	–
3 пасаж (нововиділена)	4,39 ± 0,20 ^{2,3}	22,6 ± 1,8 ²
4 пасаж (нововиділена)	4,24 ± 0,26 ^{2,3}	21,0 ± 1,6 ²
2 пасаж (деконсервована)	4,48 ± 0,10 ^{2,3}	19,1 ± 0,5 ²
10 пасаж (нововиділена)	2,60 ± 0,12 ³	9,6 ± 1,4

Примітки: ¹ Контроль – ростове середовище, в якому не культивували клітини. Статистичний аналіз виконаний методом Манна-Уїтні (Вілкоксона): ² – відмінності з 10 пасажем значущі, $p \leq 0,01$; ³ – відмінності з контролем значущі, $p \leq 0,01$

Одержані дані вказують, що кондиційоване середовище від культивування МСК містить у своєму складі біологічно активні речовини, що впливають на регенерацію печінки. Метаболіти (секретом), отримані за оптимальних режимів культивування, містять значно більшу кількість зазначених речовин. Значущої різниці у вмісті білка, секреторної активності та вмісті біологічно активних речовин, що вивчаються, між середовищем, отриманою від знову виділених і розморожених клітин не виявлено.

Секретом, отриманий із культури 2^{го} пасажу після деконсервування, який використовували у подальших дослідженнях, досліджували спектрофотометричним методом. Для оцінки складу одержаних фракцій секретом МСК аналізували спектр поглинання зразків у діапазоні 200-400 нм (рис. 3.7).

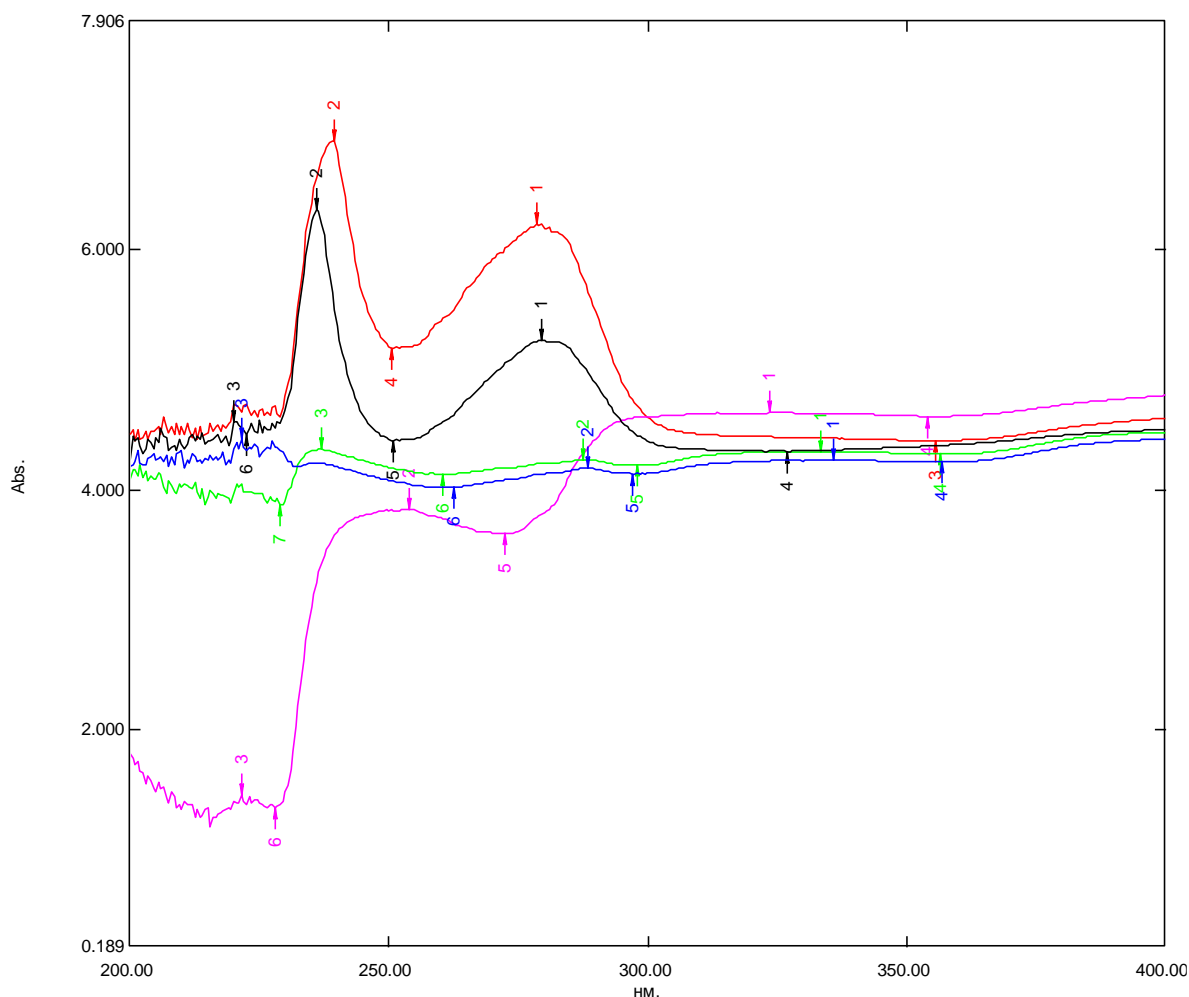


Рис. 3.7. Типовий спектр поглинання ростового середовища, що містить різні фракції екзометаболітів МСК собаки, розділені методом ультрафільтрації за масою, знятий в діапазоні від 200 до 400 нм: чорний – контроль (без екзометаболітів); червоний – цільне кондиційоване середовище; синій – менше 10 кДа; зелений – від 10 до 30 кДа; бузковий – понад 30 кДа.

Спектр поглинання контролю, цільного кондиційованого середовища, що містить секретом МСК, а також його окремих фракцій, відрізняються один від одного. Найбільшими відмінностями характеризується фракція з молекулярною масою понад 30 кДа.

У складі поживного середовища (контроль) міститься бичачий сироватковий альбумін і амінокислоти, які мають спектри поглинання в області 230 і 260 нм подібно до біологічно активних білків і пептидів, що продукуються МСК. На спектрограмі на рис. 3.7 чітко видно, що цільне кондиційоване середовище, в якому культивували МСК, (червона лінія) містить більше пептидів/білків, що поглинають за 260 нм та 230 нм, ніж контроль (чорна лінія), а також відмінний від контролю амінокислотний склад пептидів.

Спектри поглинання фракцій секретому МСК відрізняються як від контролю, так і від цільного кондиційованого середовища. Фракції менше 10 кДа (синя лінія) та 10–30 кДа (зелена лінія) містять набагато меншу кількість хроматофорів у порівнянні з цільним кондиційованим середовищем та контролем (рис 3.7), що пов'язано з відсутністю високомолекулярних білків.

При розгляді даних спектрів поглинання окремо, в низькомолекулярній фракції (рис. 3.8а) чітко спостерігаються піки в області 220–230 нм, що відповідають пептидам з сірковмісними амінокислотами (цистин, цистеїн, метіонін), і в області 280 нм, пептидами, що містять ароматичні амінокислоти; спостерігаються також піки на 240 і 340 нм (з амінокислот, які поглинають у діапазоні довжин хвиль 240–340 нм, триптофан має найінтенсивніше світлопоглинання, далі йдуть тирозин, фенілаланін і цистин); можлива також наявність металовмісних доменів (Zn, Cu тощо) у складі даних пептидів, які забезпечують зміну інтенсивності адсорбції на даних ділянках спектру. Фракція 10–30 кДа (рис. 3.8б) має менше пептидів з сірковмісними амінокислотами (220–230 нм) і більше, що містять ароматичні амінокислоти (240 нм). Слід зазначити, що обидві фракції, що розглядаються, не містять значних піків в області 260 нм, пов'язаної з нуклеїновими кислотами. Це може бути пов'язано з тим з незначними концентраціями мікроРНК, які потребують більш точних методів виявлення, або

з тим, що мікроРНК знаходяться у формі ліпідних везикул, сумарна маса яких перевищує 30 кДа.

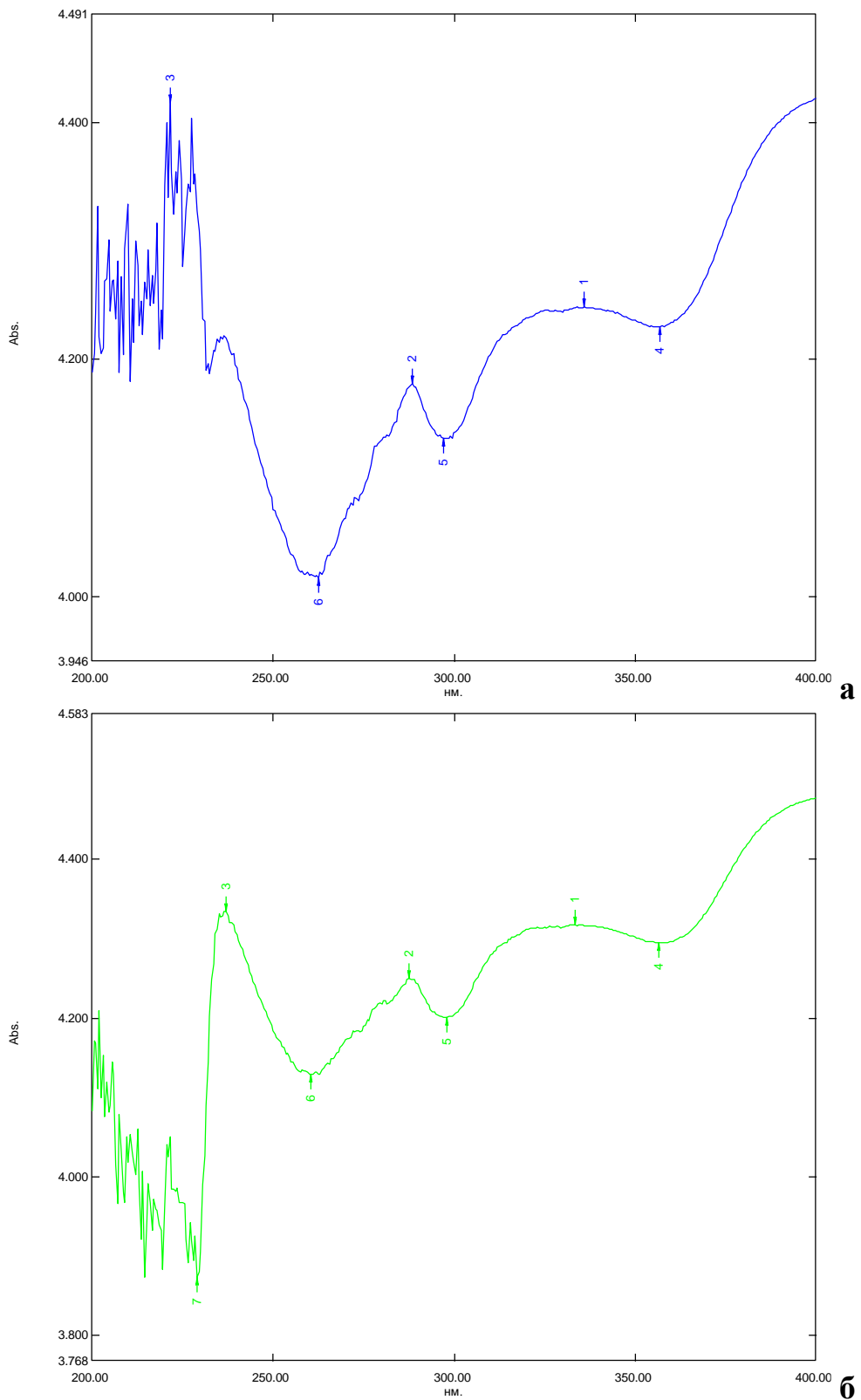


Рис. 3.8. Типовий спектр поглинання ростового середовища, що містить фракції екзометаболітів МСК собаки, розділених методом ультрафільтрації по масі, знятий в діапазоні від 200 до 400 нм: а – масою менше 10 кДа, б – від 10 до 30 кДа

Високомолекулярна частина секретому (масою понад 30 кДа) не містить низькомолекулярних регуляторних пептидів, на що вказують провали в ділянці 220-230 і 260 нм (рис. 3.7, бузкова лінія). Разом з тим, у ній знаходяться кілька високомолекулярних білків (зона 280 нм і далі), причому їх відносна концентрація вище, ніж в інших фракціях. Хроматофори цієї області, очищені від низькомолекулярних домішок, виявляють більш інтенсивне поглинання.

Аналіз спектрограм показав відносно низький вміст нуклеїнових кислот у фракціях секретому, бо. це сильний хроматофор в області 260 нм, а у фракцій кондиційованого середовища, що містять екзометаболіти, не спостерігалось піку в цій області (рис. 3.7, 3.8).

На рисунку 3.9 показано кластерний аналіз, виконаний за допомогою STATISTICA 12, для 21 точки спектру, які були «піками» або «провалами» на спектрах поглинання, для групування ближчих за спектральними характеристиками фракцій секретому.

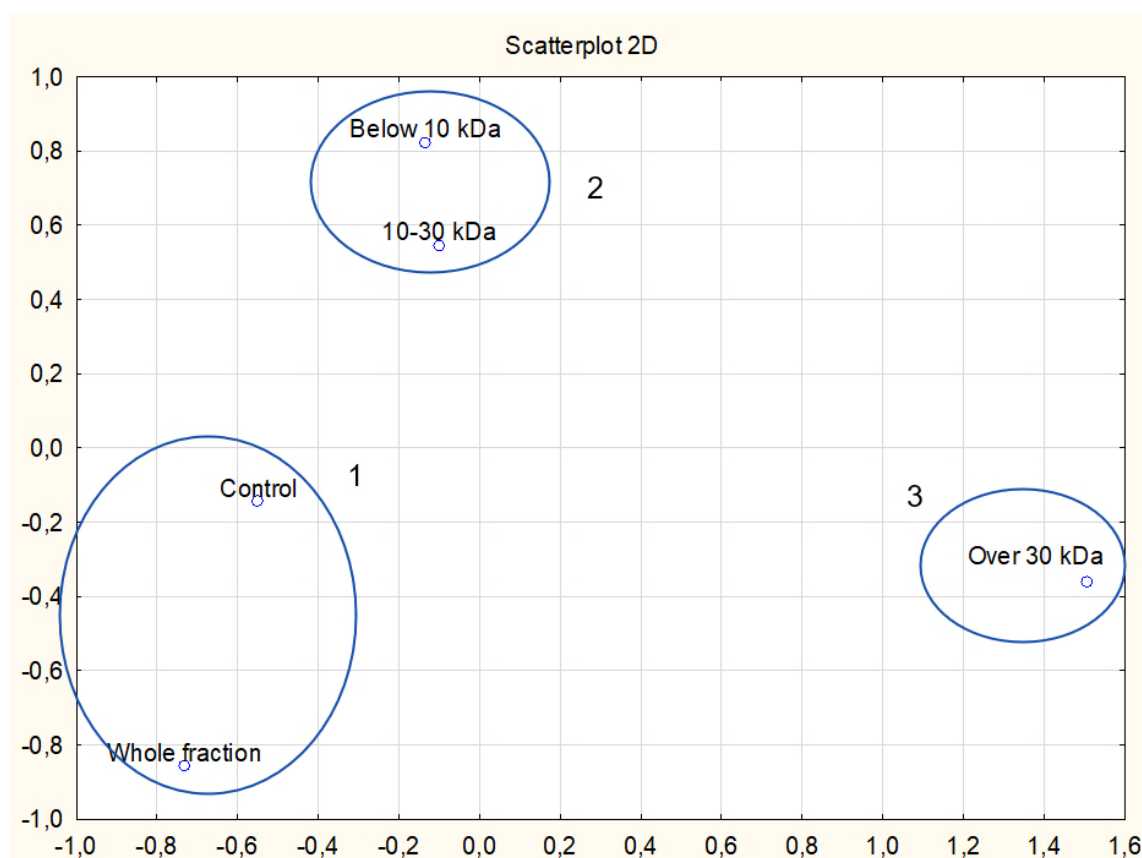


Рис. 3.9. Кластери, одержані методом багатовимірного шкалювання, проведеного за 21 точкою спектра, представленого на рис. 3.7

Було виділено три кластери за подібністю спектра поглинання: кластер 1 – контроль і цільна фракція кондиційованого середовища; кластер 2 – фракції з масою менше 10 кДа та 10–30 кДа, а кластер 3 – фракція з масою понад 30 кДа

Як бачимо, статистичний аналіз підтверджує описані вище спостереження, що вказали на втрату частини оптично активних компонентів, що містяться у вихідному живильному середовищі (контроль, зразок без секретому) та залишаються у цільному секретомі, за ультрафільтрації. Найменша молекулярна фракція (нижче 10 кДа) та фракція 10-30 кДа мають набір речовин, що відрізняє їх як від високомолекулярної фракції (понад 30 кДа), так і від вихідного середовища.

Використаний для оцінки складу фракцій, розділених за масою, спектрофотометричний аналіз хоча й менш точний у порівнянні з хроматографією та капілярним електрофорезом, проте може використовуватися у виробничих лабораторіях для постадійного (проміжного) контролю продукції.

Під час аналізу спектра визначали концентрацію білка (рис. 3.10).

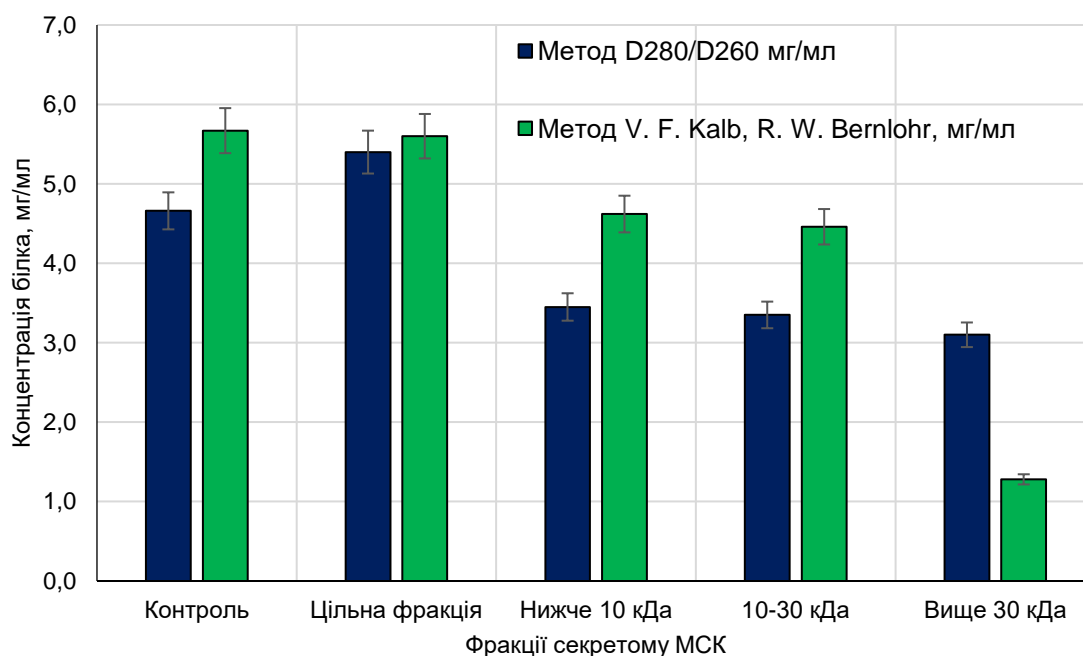


Рис. 3.10. Концентрація білка (визначена 2-ма методами) у секретомі МСК та його фракціях, розділених за масою

Порівняння двох методів визначення концентрації білка (D_{280}/D_{260} та V. F. Kalb, R. W. Bernlohr) за допомогою непараметричного тесту Спірмена показало високу значущу кореляцію між ними ($r=0,9$, $p\leq 0,05$). Однак метод D_{280}/D_{260} , ймовірно, більш чутливий, оскільки вказує на різницю цього показника між контрольним зразком, що не містить екзометаболітів, і цільним кондиційованим середовищем, в якому накопичувалися компоненти секретому МСК (рис. 3.8).

Загалом у літературі описано 200–600 різних білків у секретомі МСК, виділених із кісткового мозку або жирової тканини. Значна частина виявлених білків (більше 75%) ідентифікована як класично секретовані N-кінцевим сигнальним пептидом. Описані секретомні білки мають широкий діапазон молекулярних мас від 10 до 260 кДа і знаходяться в концентрації приблизно 200,0 мкг/мл (приблизно 80 мкг/млн клітин). Більше 60% вмісту білка припадає на везикулярну фракцію. Щодо мРНК, то встановлено, що їх розмір не перевищує 31 нуклеотиду, що відповідає молекулярній масі близько 10 кДа, однак з урахуванням маси везикул їх маса досягає 30-40 кДа, що встановлено за фільтрацією мікроРНК на гемодіалізних мембранах [9, 79, 105, 111, 122, 127].

Концентрація білка в дослідженні становила приблизно 3,0–5,5 мг/мл (приблизно 500–1000 мкг/млн клітин), що на порядок вище, ніж у Mitchell та ін. [111]. Ймовірно, такі спотворення пов'язані з наявністю в культуральному середовищі сироваткового альбуміну і хроматофорів живильного середовища (амінокислот і вітамінів). Для підвищення точності спектрофотометричного визначення концентрації білка в різних фракціях секретому МСК у цій системі можна використовувати емпірично встановлені коефіцієнти перерахунку, які враховують описані фактори. Також можливе використання безсироваткових середовищ і очищення компонентів середовища для накопичення екзометаболітів, але це призведе до значного подорожчання продуктів, розроблених на основі цього способу.

Висновки до розділу 3.1

З'ясовано, що для одержання максимальної кількості метаболітів краще використовувати культуру 3^{го}–5^{го} пасажів після виділення (у цей момент спостерігається пік росту та секреції біологічно активних речовин). Клітини можуть зберігатися в рідкому азоті протягом тривалого часу, а деконсервовані культури швидше досягають піку ростової та секреторної активності. Тому є перспективним використання нововиділених і деконсервованих клітин, отриманих від оптимального режиму культивування (3^{го}–5^{го} пасажів) при розробці технологічного процесу.

Було встановлено, що кондиційовані середовища, одержані при культивуванні МСК, містять біологічно активні речовини, що стимулюють регенерацію, зокрема печінки. Максимальний вміст ІЛ-10 та ІЛ-6 спостерігався у ново виділеній культурі третього, а HGF – четвертого пасажів. Цей показник був значуще нижче у старіючій культурі (10^{го} пасажу).

Спектрофотометричним дослідженням зразків визначено концентрацію білків у них на рівні 3,0–5,5 мг/мл (близько 500–1000 мкг/млн клітин). Спектри поглинання фракцій, розділених масою, не містять вираженого піку на 260 нм, характерного для нуклеїнових кислот і ряду білків. Разом з тим, у низькомолекулярних фракціях спостерігаються піки в областях 220 нм (сірковмісні амінокислоти), 240 і 280 нм (ароматичні амінокислоти) та 340 нм (складні пептиди, можливо з металевими доменами). Високомолекулярна фракція секретому містить смугу пропускання від 280 нм, що вказує на наявність складних структурою білків, що містять, зокрема, значну кількість ароматичних амінокислот.

Результати дослідження, що обговорені у розділі 3.1, були опубліковані в:

Moskalov V. Effects of various xenogenic mesenchymal stem cell secretome fractions on the regenerative capacity of the liver *in vitro*. *Revista Bionatura*. 2023. Vol. 8, No 3. Article 90. DOI: 10.21931/RB/2023.08.03.90 (**Scopus, Q4**)

Moskalov, V. B. Obtaining and description of exometabolites of canine mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *Biodiversity, Ecology and Experimental biology*. 2023, Vol. 25, No 1. P. 15–24. DOI: 10.34142/2708-5848.2023.25.1.02

3.2. Гепатотропні ефекти секретому мезенхімальних стовбурових клітин

Печінка, з одного боку, виконує ряд важливих функцій організму (синтез біополімерів, біотрансформація ксенобіотиків, вироблення жовчі, депонування крові), а з іншого – постійно зазнає негативного впливу різних токсикантів [77]. На стан печінки впливають багато чинників, зокрема екологічний стан місцевості, зловживання алкоголем, надмірна вага. Хвороби печінки поширені та входять до десятки найбільш значущих причин смерті у світі [158]. Зазначене обумовлює необхідність пошуку нових речовин, що надають протективну та/або регенеративну дію на печінку. Речовини, що продукують мезенхімальні стовбурові клітини, можуть стимулювати активацію регенераційних процесів, уповільнювати фібротичні перетворення в органі та потребують детального вивчення.

3.2.1. Органотипова культура печінки як модель оцінки регенеративного потенціалу

Органотипова культура печінки є тривимірною моделлю тканини та відтворює частково процеси метаболізму та регенерації тканини печінки [91]. Регенеративний потенціал органу в даній моделі можна оцінити за успішністю прикріплення фрагментів тканини до субстрату *in vitro* (без прикріплення неможливі процеси клітинної міграції та поділу) та за інтенсивністю формування зони виселення та росту (вказує на регенеративну здатність органу).

Адгезія пов'язана з перебудовою надмембранних структур, що призводить до експресії на поверхні клітин інтегринів і меншою мірою секрецією молекул у позаклітинне середовище, а виселення та ріст – з процесами клітинного руху та поділу. Відомо, що при втраті контактного гальмування, обумовленого впливом сусідніх клітин та міжклітинного матриксу, крайові клітини набувають здатності до амебоподібного переміщення та проліферації для експансії вільного середовища, що утворилася при втраті частини органу [50]. Різні популяції клітин печінки відрізняються здатністю до описаних процесів, тому для відтворення методики вкрай важливо уніфікувати етап посіву культури. Незважаючи

на відсутність точної інформації про співвідношення різних клітин і процесів, що відбуваються з ними, методика дозволяє в експрес-режимі оцінити здатність до регенерації органу, як у разі дії досліджуваного чинника на організм (модель *ex vivo*, було підтверджено нами у дослідженні), так і при внесенні досліджуваних речовин в поживне середовище (модель *in vitro*).

Динаміку росту культури оцінювали за ступенем адгезії (СА), вираженим як % фрагментів, що прикріпилися від їх загального числа, та індексу площі (ІП), що вказує на співвідношення зони виселення та росту до вихідної площі експлантату, з 25^ї до 50^ї години культивування. Результати проведеної оцінки динаміки росту культури наведені на рис. 3.11.

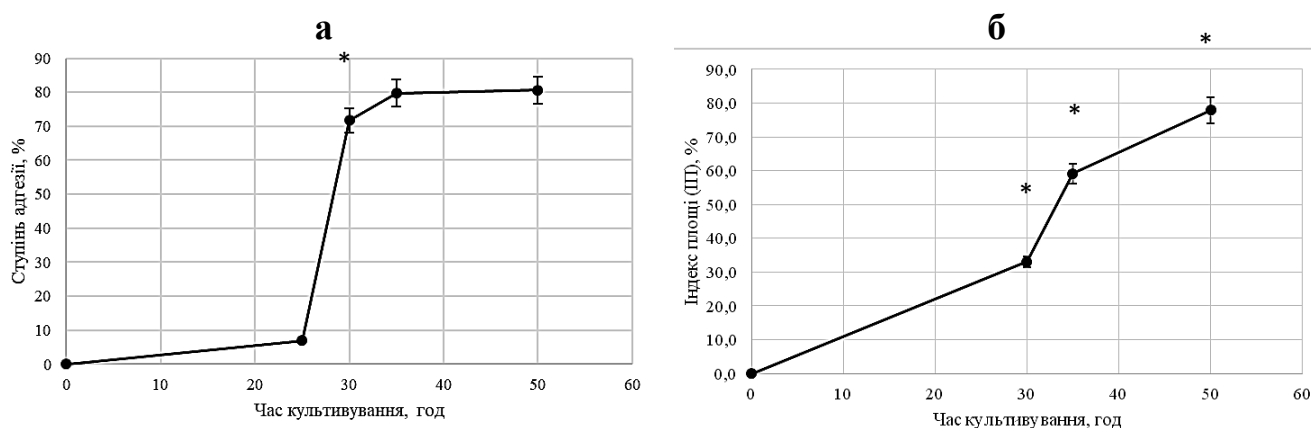


Рис. 3.11. Динаміка прикріплення (а) експлантатів (n=3) та формування (б) зони виселення та росту (n=45-50); * – відмінності значущі порівняно з попереднім періодом (метод Манна-Уїтні (Вілкоксона); $p \leq 0,05$), $\bar{X} \pm ДІ_{95}$

Крива залежності ступеня адгезії експлантатів від часу культивування (рис. 3.11, а) чітко показує, що в період між 25^ю та 30^ю годинами культивування значуще збільшується відсоток прикріплених експлантатів, при цьому найнижчий ступінь прикріплення становила 7% і спостерігалася після 25^{ти} годин культивування, а найбільш високий (81%) – після 50^{ти}. Однак, статистичний аналіз показав, що різниця за цим показником після 30, 35 та 50 годин культивування не є значущою. Тобто для прикріплення фрагментів печінки потрібно культивування щонайменше 30 годин.

Крива залежності індексу площі експлантатів від часу культивування наведена на рис. 3.11, б. Як бачимо з графіка, індекс площі – параметр, визначальний формування зони експансії клітин та їх проліферації, збільшується зі збільшенням часу культивування: 50 годин – $77,9 \pm 6,7\%$ (n=50); 35 год – $59,1 \pm 5,9\%$ (n=47); 30 год – $33,0 \pm 3,5\%$ (n=45)). Статистичний аналіз також показав, що між експериментальними групами існують значущі відмінності (критерій Манна-Уїтні (Вілкоксона), $p \leq 0,01$).

Таким чином, було встановлено, що основна частина експлантатів печінки прикріплюється після 30 год культивування, а індекс площі збільшується зі збільшенням часу росту протягом всього інтервалу досліджуваного часу (між часом спостереження та індексом площі існує значна висока позитивна кореляція; $r=0,97$; $p \leq 0,05$). Для ступеня адгезії кореляція була трохи нижчою ($r=0,83$; $p \leq 0,05$). Описані дані дозволять проводити облік результатів у будь-який фіксований момент часу із зазначеного проміжку і це не вплине на їхню відтворюваність. Вихідна методика пропонувала проводити облік на 72^x годинах культивування, але, враховуючи отримані результати, час культивування до обліку було скорочено до 48 годин [19, 82].

Модель органотипової культури печінки було застосовано для оцінки гепатотоксичної дії високих доз сульфату міді (триразове внутрішньочеревне введення в дозі 2,5 мг/100 г маси тіла) та вітаміну А (введення *per os* 300 МО/100 г маси тіла протягом 7 днів).

Результати дослідження наведені у таблиці 3.12. Як бачимо з таблиці, інтенсивність прикріплення фрагментів печінки до субстрату не відрізняється значуще у досліджених групах. Середні за двома серіями показники експансії клітинного матеріалу та формування зони виселення та росту в дослідних групах були значуще нижчими, ніж у контролі. (Критерій Манна-Уїтні (Вілкоксона), $p \leq 0,01$). Розглянуті показники в кожній з двох серій експерименту окремо не відрізнялися значуще від контролю, але обчислена за допомогою програми G * Power 3.1.9.4 потужність критерію в усіх випадках

була значно нижче 80%, що не дозволяє прийняти нульову гіпотезу про рівність показників.

Таблиця 3.12

Інтенсивність прикріплення (ступінь адгезії, %) та формування зони виселення та росту (індекс площі, %) експлантатами печінки, одержаної від тварин, яким вводили токсичні дози речовин ($\bar{X} \pm \text{ДІ}_{95}$)

Група	1 серія				2 серія				\bar{CA}	\bar{IP}
	n	N	CA	IP, %	n	N	CA	IP		
Контроль	18	15	83	388,8 ± 81,7	11	9	82	202,9 ± 57,6	83	295,9 ± 53,9
CuSO ₄	15	12	80	156,7 ± 23,6	15	13	87	157,1 ± 24,4	83	156,9 ± 16,5 ¹
Вітамін А	15	15	100	97,7 ± 16,2	14	13	93	111,4 ± 21,3	97	104,5 ± 13,1 ¹
CuSO ₄ + вітамін А	15	12	80	78,6 ± 9,1	18	14	78	80,5 ± 9,2	79	79,5 ± 6,3 ¹

Примітки: ¹ – статистично значущі відмінності від контролю (метод Манна-Уїтні (Вілкоксона); p 0,01); n – кількість експлантатів, що прикріпилися, N – загальна кількість експлантатів; IP – індекс площі, CA – ступінь адгезії

Одержані дані дозволяють використовувати модель органотипової культури для оцінки регенеративної здатності печінки після введення гепатотропних речовин в організм (*ex vivo*), а не лише при введенні досліджуваних сполук у середовище для культивування фрагментів органу (*in vitro*).

3.2.2. Дослідження впливу секретому мезенхімальних стовбурових клітин та окремих його фракцій, розділених за масою на регенеративний потенціал печінки *in vitro*

На першому етапі було вивчено біологічну активність цільного кондиційованого середовища, що містить секретом (екзометаболіти), який продукується МСК, при додаванні у ростове середовище органотипової культури печінки у концентраціях 30, 60 і 120 мкл/мл (105, 210 та 420 мкг/мл у перерахунку на білок), рис. 3.12. Як контроль додавали 60 мкл підтримувального середовища

(98% DMEM/F12, 2% сироватки фетальної бичачої для культур клітин), в якій не вирощувалися клітини, тому вона не містила компоненти секретому.

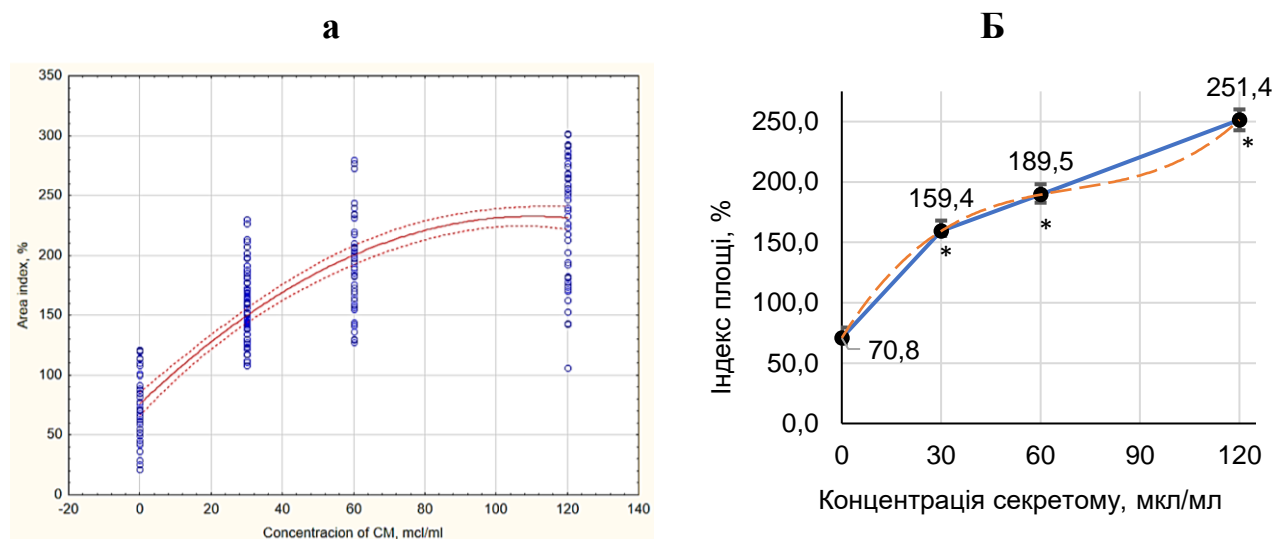


Рис. 3.12. Інтенсивність формування зони виселення та росту органотипової культури печінки під дією різних концентрацій секретому МСК (цілісне кондиційоване середовище): (а) діаграма розсіювання з поліноміальною апроксимацією, пунктирна лінія – DI_{95} ; (б) точкова діаграма, побудована на медіанах вибірок, планки похибок – помилки медіани; * – відмінності значущі порівняно з попередньою концентрацією (метод Манна-Уїтні (Вілкоксона); $p \leq 0,01$)

Вибір концентрацій був обґрунтований пілотним дослідженням активності цільного секретому на щурах на моделі тетрахлорметанового фіброзу, що підтвердило його ефективність щодо регенеративних процесів у дозуванні від 25 до 100 мкл/кг маси тіла (умовно-медіана – 50 мкл/кг). Враховуючи біодоступність субстанцій при внутрішньом'язовому введенні (не менше 80%), об'єм циркулюючої крові щурів (близько 60 мл) та підвищення концентрації на два порядки для моделювання *in vitro*, розрахункова ефективна доза була встановлена на рівні 30 мкл/мл. Для дослідження залежності біологічного ефекту від дози застосовували також концентрації – 60 та 120 мкл/мл (рис. 3.12).

Як бачимо на рисунку 3.12, у всіх дослідних варіантах зона виселення та росту формувалася інтенсивніше, ніж у контролі. Перевищення індексу площі у 2,3–3,4 рази було статистично значущим ($p \leq 0,01$). Також у всіх випадках

спостерігалися значущі відмінності за цим показником порівняно з попередньою нижчою концентрацією.

Кореляційний аналіз (рис. 3.12, а) виявив сильний значущий зв'язок між концентрацією кондиційованого середовища та біологічним ефектом ($r=0,78$; $p\leq 0,01$). У програмі STATISTICA одержано таке рівняння, що описує досліджувану залежність:

$$ІП = - 0,013 \times C^2 + 2,843 \times C + 76,060 \quad (3.1).$$

За допомогою графіка, побудованого в Excel за медіанами вибірок, отримано лінію тренду з поліноміальною апроксимацією (рис. 3.12, б). Рівняння лінії тренду виглядає так:

$$ІП = 0,0003 \times C^3 - 0,0571 \times C^2 + 4,4177 \times C + 70,829 \quad (3.2).$$

Ступінь адгезії у всіх трьох досліджуваних концентраціях також перевищувала цей показник у контролі, але лише у випадку 120 мкл/мл відмінності були статистично значущими.

Встановлені залежності (3.1) та (3.2) між біологічним ефектом та концентрацією цільного секретому МСК можуть бути використані для прогнозування ефективності для інших концентрацій у фармацевтичній розробці гепатопротекторів.

Після підтвердження наявності регенеративної дії на тканину печінки цільної кондиційованого середовища, що містить секретом МСК, і його дозової залежності було поставлено завдання вивчити вплив окремих її фракцій, розділених за масою, у концентрації 60 мкл/мл на регенеративні процеси за допомогою моделі органотипної культури (рис. 3.13).

На додачу до цільного кондиційованого середовища, в експерименті вивчалися три його фракції, розділені методом ультрафільтрації: масою нижче 10 кДа, 10-30 кДа та понад 30 кДа. Усі фракції секретому МСК виявили стимулюючу активність на ріст та виселення клітинних елементів печінки порівняно з контролем ($p\leq 0,01$). Найбільшу інтенсивність зростання була у культурі, в яку вносили низькомолекулярну фракцію секретому масою менше 10 кДа – перевищення контролю у 3,2 рази; найменшу активність виявила

високомолекулярна фракція масою понад 30 кДа (у 2,3 рази вище за контроль). Обидва крайні варіанти значуще відрізнялися не тільки від контролю, а й від цільного кондиційованого середовища (низькомолекулярна фракція – у більшу, а високомолекулярна – у меншу сторону). Фракція ж 10–30 кДа мала біологічну активність на рівні цільного кондиційованого середовища. Адгезивність у досвідчених випадках була на тому ж рівні, що й у контролі.

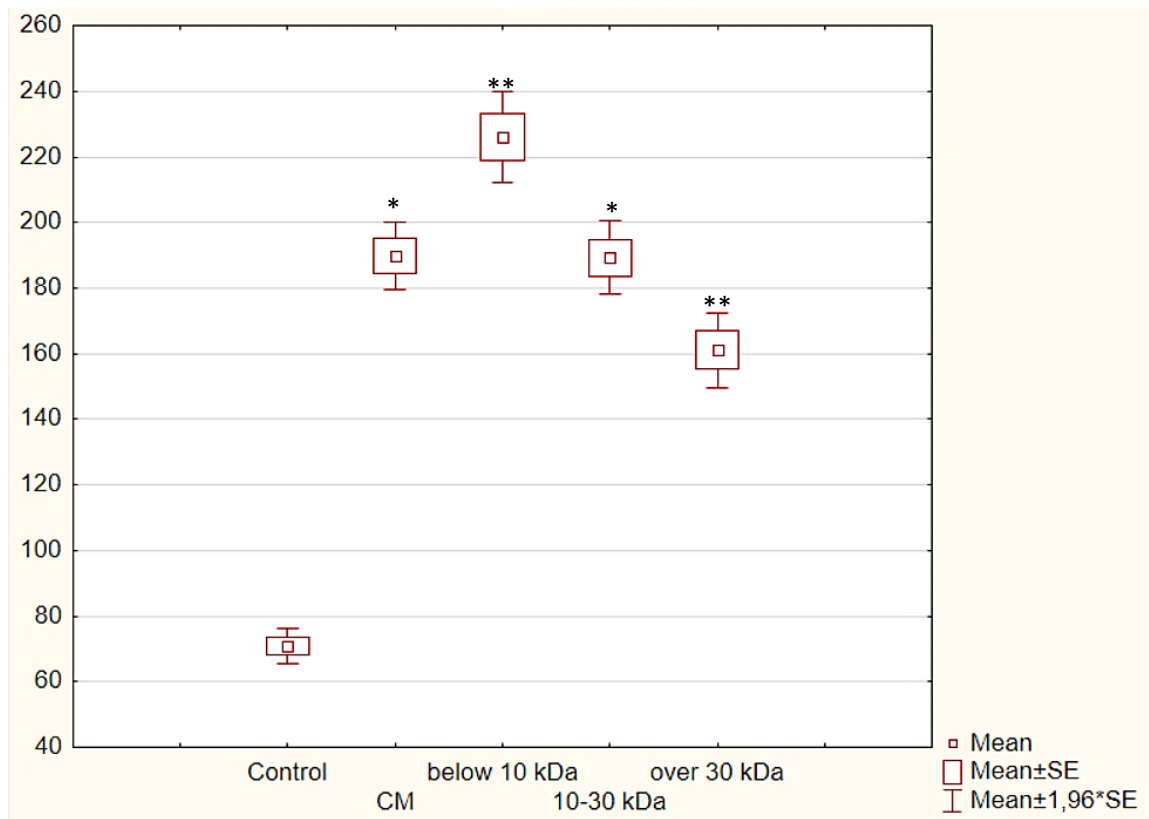


Рис. 3.13. Діаграма інтенсивності формування зони виселення та зростання органотипової культури печінки під дією різних фракцій секретому ксеногенних МСК, розділений за масою методом ультрафільтрації (концентрація 60 мкл/мл); контроль – підтримувальне середовище, в якому не культивувалися клітини, що містить 98% DMEM/F12, 2% сироватки фетальної бичачої для культур клітин; статистичний аналіз виконано за допомогою критерію Манна-Уїтні (Вілкоксона): * – значущі відмінності в порівнянні з контролем, $p \leq 0,01$; ** – значні відмінності в порівнянні з контролем та цільним кондиційованим середовищем, $p \leq 0,01$

Більшість факторів, описаних у літературі, що стимулюють регенерацію печінки, визначається як цитокіни та хемокіни з молекулярною масою понад

30 кДа, внесок низькомолекулярних пептидів малих вивчений мало [40]. Одержані дані показують, що низькомолекулярні вільні мікроРНК та малі пептиди можуть робити не менший внесок у процеси відновлення тканини печінки.

Після встановлення найбільш активної фракції секретому (масою менше 10 кДа) було вивчено біологічні ефекти різних її концентрацій (рис. 3.14).

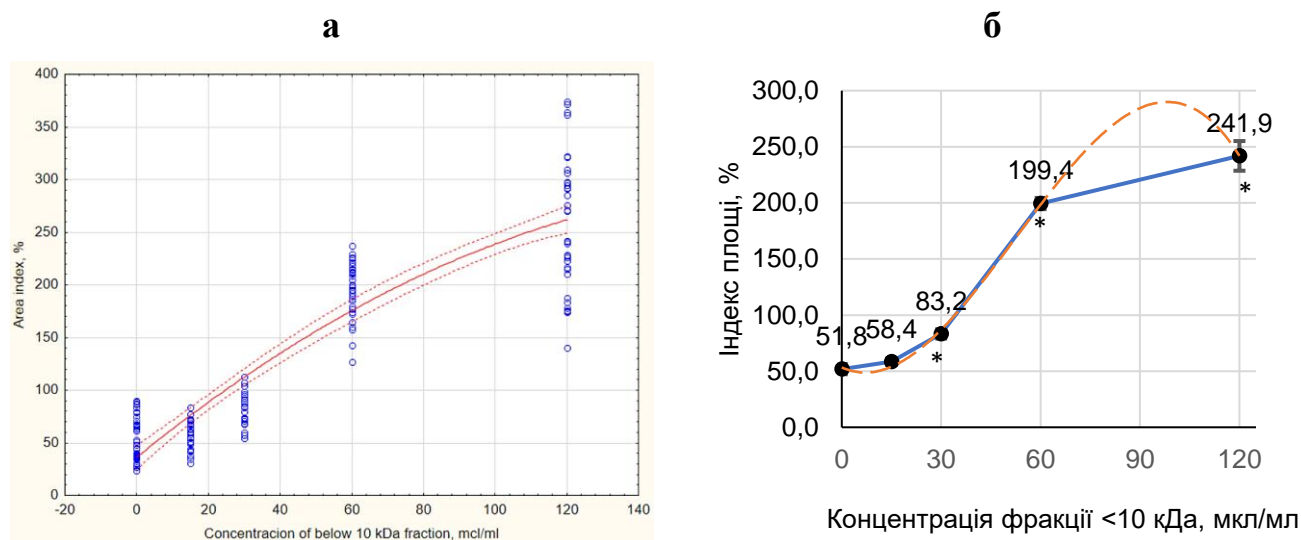


Рис. 3.14. Інтенсивність формування зони виселення та росту органотипової культури печінки під дією різних концентрацій масою <10 кДа фракції секретому МСК: (а) діаграма розсіювання з поліноміальною апроксимацією, пунктирна лінія – D_{95} ; (б) точкова діаграма, побудована на медіанах вибірок, планки похибок – помилки медіани; * – відмінності значущі порівняно з попередньою концентрацією (метод Манна-Уїтні (Вілкоксона); $p \leq 0,01$)

У досліді використані дози аналогічні експерименту з цілісним кондиційованим середовищем – 30, 60 та 120 мкл/мл, а також додано концентрацію 15 мкл/мл; контролем також було підтримуюче середовище (98% DMEM/F12, 2% сироватки фетальної бичачої для культур клітин), що не містить екзометаболітів, оскільки в ньому не вирощувалися клітини. Показано, що концентрація 15 мкл/мл не має впливу на регенеративні процеси в печінці: індекс площі знаходиться на рівні контролю. Інші концентрації значуще збільшували розмір зони виселення та росту культури в 1,3-4,3 рази ($p \leq 0,01$). Також у всіх випадках, крім 15 мкл/мл, спостерігалися значущі відмінності за цим показником у порівнянні з попередньою нижчою концентрацією.

Кореляційний аналіз (рис. 3.14, а) виявив ще сильніший значущий зв'язок між концентрацією досліджуваної композиції та індексом площі, ніж у випадку з цільним секретомом ($r=0,89$; $p\leq 0,01$). За допомогою програми STATISTICA отримано таке рівняння, що описує досліджувану залежність:

$$П = - 0,007 \times C^2 + 2,762 \times C + 36,197 \quad (3.3).$$

За допомогою графіка, побудованого в Excel за медіанами вибірок, отримано лінію тренду з поліноміальною апроксимацією (рис. 3.14, б). Рівняння лінії тренду виглядає так:

$$П = -0,0006 \times C^3 - 0,100 \times C^2 + 1,313 \times C + 53,253 \quad (3.4).$$

Ступінь адгезії статистично значно перевищував значення у контролі лише за максимальної концентрації досліджуваної композиції – 120 мкл/мл ($p\leq 0,01$).

Встановлені залежності (3.3) та (3.4) між біологічним ефектом та концентрацією низькомолекулярної фракції секретому МСК можуть бути використані для прогнозування ефективності інших концентрацій у фармацевтичній розробці гепатопротекторів.

Щоб перевірити прогностичну цінність рівняння (3.4), необхідно додаткове дослідження активності при концентрації 90 мкл/мл (на основі графіка доза-відповідь ефект цієї концентрації повинен перевищувати ефект концентрації 120 мкл/мл). На жаль, наразі це питання не досліджено.

3.2.3 Дослідження впливу низькомолекулярної фракції секретому мезенхімальних стовбурових клітин на стан фібротичної печінки *in vivo* та *ex vivo*

У дослідженні *in vitro* на моделі органотипової культури печінки було встановлено, що максимальну активацію регенеративних процесів печінки забезпечує низькомолекулярна фракція секретому мезенхімальних стовбурових клітин (масою менше 10 кДа) при внесенні у ростове середовище в концентраціях 30–120 мкл/мл. Виходячи з цих даних, проведено експериментальне вивчення дії даної фракції концентрації 100 мкл/100 г маси тіла на моделі експериментального фіброзу, викликаного введенням чотирихлористого вуглецю.

Дані клінічного аналізу крові щурів наведено у таблиці 3.13.

Таблиця 3.13

Гематологічні показники щурів із тетрахлорметановим фіброзом печінки на фоні дії фракції секретому МСК масою <10 кДа ($M_e \pm S_{M_e}$), n=5

№ п/п	Показник	Од. вим.	Контроль (інтактні)	Контроль патології	Дослід
1.	Лейкоцити	10 ⁹ /л	16,9 ± 3,47	26,2 ± 6,01 ²	27,6 ± 3,93 ²
2.	Лімфоцити	10 ⁹ /л	7,3 ± 1,59	8,55 ± 1,32	12,9 ± 3,06
3.	Моноцити	10 ⁹ /л	0,8 ± 0,33	1,3 ± 0,19	1,5 ± 0,27
4.	Гранулоцити	10 ⁹ /л	8,2 ± 1,71	16,4 ± 4,89 ¹	13,25 ± 0,67 ¹
5.	Еритроцити	10 ¹² /л	8,9 ± 0,36	6,9 ± 0,09 ¹	7,4 ± 0,52 ³
6.	Гемоглобін	г/л	129 ± 7,5	111 ± 5,0 ¹	121 ± 7,5
7.	Гематокрит	%	43,4 ± 2,55	37,1 ± 2,13 ¹	41,6 ± 2,82
8.	MCV	фл	53,5 ± 2,46	53,8 ± 2,44	54,1 ± 3,26
9.	MCH	г/дл	293 ± 2,1	299 ± 3,8	290 ± 6,7 ³
10.	Анізоцитоз	%	13,0 ± 13,6	15,1 ± 2,76	16,4 ± 0,97
11.	Тромбоцити	10 ⁹ /л	792 ± 173,4	824,5 ± 446,7	933 ± 334,8
12.	Тромбоцит	%	0,44 ± 0,10	0,27 ± 0,01	0,42 ± 0,17
13.	MPV	фл	5,6 ± 0,23	6,1 ± 0,44	5,9 ± 0,22

Примітки: MCV – середній об'єм еритроциту, MCH – вміст гемоглобіну в еритроцитах, MPV – середній об'єм тромбоцитів, фл – фемтолітр (1 фл = 10⁻¹⁵ л); статистичний аналіз виконано за допомогою критерію Манна-Уїтні (Вілкоксона): ¹ – значущі відмінності порівняно з інтактними тваринами, p ≤ 0,01; ² – значущі відмінності в порівнянні з інтактними тваринами, p ≤ 0,05; ³ – значущі відмінності порівняно з контролем патології, p ≤ 0,05

Значуще збільшення кількості лейкоцитів, загалом, та гранулоцитів, зокрема, у крові тварин, яким вводили чотирихлористий вуглець, підтверджує розвиток запального процесу, що супроводжує токсичну дію на печінку та розвиток її фіброзу. Відмінностей між дослідною групою та контролем патології за цим показником виявлено не було.

Картина червоної крові відрізняється від білої. Патології печінки призводять до метаболічних порушень, які можуть спричинити тканинну гіпоксію, а вона,

у свою чергу, призводить до анемії. Наростання анемії свідчить про виснаження червоного компонента кровотворення. З іншого боку, анемічні прояви погіршують прогноз стану печінки [54, 132].

У групі контролю патології спостерігалось значуще зниження кількості еритроцитів проти інтактних тварин, а у дослідній групі цей показник був на рівні з інтактними і значуще перевищував значення групи контролю патології. За концентрацією гемоглобіну та гематокриту кров тварин із групи контролю патології була значуще нижчою порівняно з інтактними тваринами; кров дослідних тварин займала проміжне положення між двома названими групами і не відрізнялася значуще від жодної з них. На фоні зниження кількості еритроцитів та концентрації гемоглобіну у тварин із групи контролю патології спостерігалось компенсаторне збільшення кількості гемоглобіну в еритроциті; у тварин дослідної групи цей показник був значуще нижчим, на рівні інтактних тварин. Наведені дані вказують на відновлення показників червоної крові при фіброзі печінки після застосування низькомолекулярної фракції секретому МСК.

Показники, які стосуються тромбоцитів, значуще не відрізнялися у тварин різних груп. У тварин групи контролю патології спостерігалася тенденція до зниження тромбоцитів порівняно з інтактними та дослідними тваринами.

На підставі даних клінічного аналізу крові тварин було розраховано лейкоцитарні індекси (рис. 3.15).

Статистично значуще зниження лімфоцитарно-гранулоцитарного індексу в тварин групи контролю патології вказує на їхню інтоксикацію продуктами аутолізу печінки. Аналогічно можна трактувати статистично значуще підвищення індексу співвідношення лімфоцитів і моноцитів у тварин, яким давали чотирихлористий вуглець без компонентів секретому МСК. У дослідній групі значення цих індексів були на рівні інтактних тварин, що свідчить про зниження ендогенної інтоксикації після застосування низькомолекулярних екзометаболітів МСК. Індекс співвідношення лімфоцитів та моноцитів не відрізнявся у тварин різних груп.

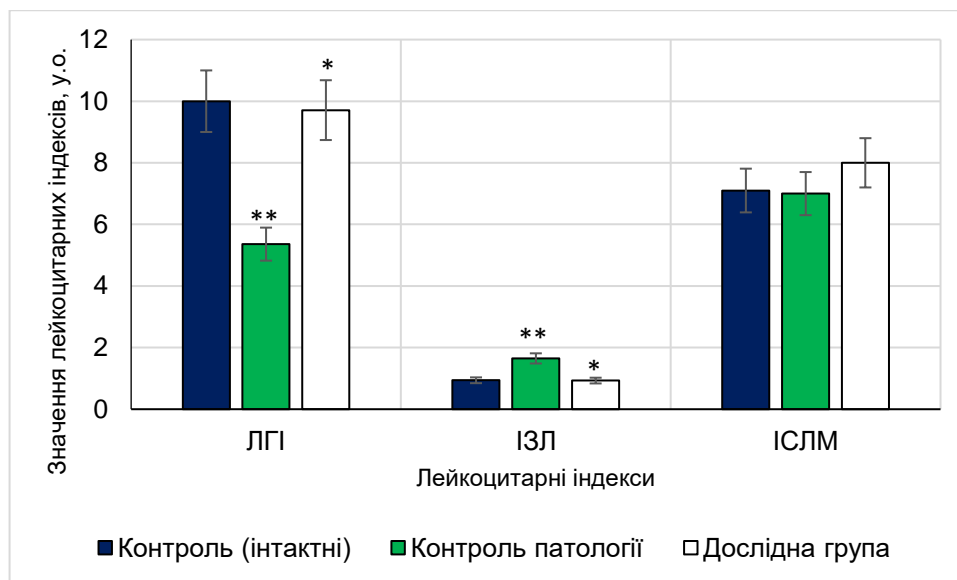


Рис. 3.15. Розрахункові лейкоцитарні індекси, обчислені на підставі аналізу крові щурів із тетрахлорметановим фіброзом печінки на фоні дії фракції секретому МСК масою <10 кДа, n=5 ($\bar{X} \pm \text{ДІ}_{95}$); ЛГІ – лімфоцитарно-гранулоцитарний індекс; ІЗЛ – індекс зсуву лейкоцитів; ІСЛМ – індекс співвідношення лімфоцитів та моноцитів; статистичний аналіз виконано за допомогою критерію Манна-Уїтні (Вілкоксона): * – значущі відмінності в порівнянні з контролем патології, $p \leq 0,05$; ** – значущі відмінності порівняно з інтактними тваринами, $p \leq 0,01$

Для оцінки ступеня пошкодження печінки було проведено біохімічний аналіз крові тварин, у ході якого визначено концентрації трьох ферментів: аланінамінотрансферазу, гамма-глутамілтрансферазу та аспартатамінотрансферазу. Дані наведені у таблиці 3.14.

Досліджені у сироватці крові тварин амінотрансферази є непрямими маркерами фіброзу [131, 143]. Вони характеризують зміну функціонального стану печінки і не завжди відображають зміни в клітинному матриксі або в профіброзних клітинах.

Найбільш чутливим та специфічним індикатором ушкодження гепатоцитів (запалення та некроз гепатоцитів) є аланінамінотрансфераза. Спостерігалось значуще зниження цього у групі контролю патології. У тварин дослідної групи концентрація аланінамінотрансферази була значно вище, ніж у тварин без застосування компонентів секретому МСК, але значуще нижче,

ніж в інтактних тварин. Спостережена картина вказує на запуск процесів відновлення печінки після застосування досліджуваного фактора, однак повного відновлення в період, що спостерігається, не відбувалося.

Таблиця 3.14

Показники біохімічного аналізу крові щурів із тетрахлорметановим фіброзом печінки на фоні дії фракції секретому МСК масою <10 кДа ($Me \pm s_{Me}$), n=5

№ п/п	Показник	Од. вим.	Контроль (інтактні)	Контроль патології	Дослід
1.	Аланінаміно-трансфераза	Од./л	107,7 ± 18,0	57,9 ± 9,0 ¹	72,6 ± 3,9 ^{1,2}
2.	Гамма-глутамілтрансфераза	Од./л	3,4 ± 0,86	4,4 ± 2,03	5,9 ± 1,86
3.	Аспартатаміно-трансфераза	Од./л	179,0 ± 15,94	196,5 ± 12,98	197,2 ± 2,70
4.	Коефіцієнт де Рітіса	–	2,03 ± 0,51	3,59 ± 0,64 ¹	2,77 ± 0,15 ^{1,2}

Примітки: статистичний аналіз виконано за допомогою критерію Манна-Уїтні (Вілкоксона): ¹ – значущі відмінності порівняно з інтактними тваринами, $p \leq 0,05$; ² – значущі відмінності порівняно з контролем патології, $p \leq 0,05$

Аспартатамінотрансфераза є менш специфічним маркером патології печінки, часто вказує на некроз м'язової тканини, включаючи серцевий м'яз, однак у поєднанні з концентрацією аланінамінотрансферази може уточнювати ступінь фіброзу. Гама-глутамілтранспептидаза – чутливий, але неспецифічний індикатор ураження жовчних каналців. Обидва розглянуті індикатори не відрізнялися значуще у тварин різних груп.

Коефіцієнт де Рітіса, співвідношення концентрацій аспартатамінотрансферази та аланінамінотрансферази, проявив себе аналогічно показнику «аланінамінотрансфераза». Його підвищення вказує на інтенсивний фіброз із некротичними проявами [90] й спостерігалось у тварин групи контролю патології. Застосування компонентів секретому МСК знижує інтенсивність цих процесів.

Регенеративна здатність печінки після моделювання фіброзу та застосування біологічно активних речовин була оцінена на моделі органотипової культури *ex vivo* (рис. 3.16).

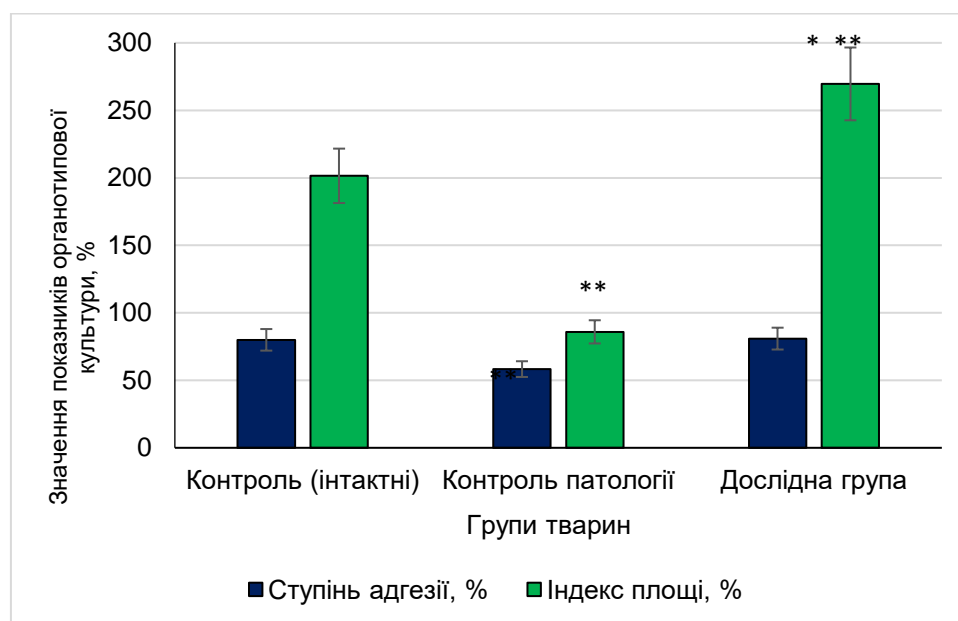


Рис. 3.16. Інтенсивність прикріплення (ступінь адгезії, %) та формування зони виселення та росту (індекс площі, %) органотипової культури печінки, отриманої від щурів з тетраклорметановим фіброзом печінки на фоні дії фракції секретому МСК масою <math><10\text{ кДа}</math>, $n=5$ ($\bar{X} \pm \text{ДІ}_{95}$); статистичний аналіз виконано за допомогою критерію Манна-Уїтні (Вілкоксона): * – значущі відмінності в порівнянні з контролем патології, $p \leq 0,01$; ** – значущі відмінності порівняно з інтактними тваринами, $p \leq 0,01$

Фрагменти печінки, одержані від тварин групи контролю патології, значуще гірше прикріплювалися до субстрату проти тканини, одержаної від інтактних тварин. Застосування екзометаболітів МСК масою менше 10 кДа нормалізувало цей показник (дослідна група – на рівні інтактних тварин).

Інтенсивність формування зони виселення та росту за розвитку фіброзу також значуще знижувалася по відношенню до групи інтактного контролю (у контролі патології). У дослідній групі цей показник у 3,1 рази перевищував групу контролю патології, а й був значуще вище проти інтактних тварин (на 33 %).

Описані дані вказують на зниження регенеративної здатності печінки за інтенсивного розвитку фіброзу та відновлення її з компенсаторним резервом після застосування низькомолекулярної фракції секретому МСК.

При макроскопічному огляді печінки щурів групи контролю патології виявили суттєві фібротичні спайки між частками органу, частки повністю зрослися. Подібного не спостерігалось у групах інтактного контролю та дослідній.

Молекулярні механізми біологічних ефектів секретому МСК активно вивчаються. Показано, що антиапоптотичну активність відповідають фактори росту VEGF, HGF, IGF, FGF та TGF- β , Nrf2, NIF, HO-1, IL-6; за антиоксидантну – HO-1; імуномодуюча активність забезпечується HGF, TGF- β , IDO, простагландин E2 (PGE2), IL-10 (регуляція проліферації Т-лімфоцитів, посилення поляризації макрофагів M2, зменшення запалення), PGE2, IL-6, TGF- β , IDO, NO (зниження активності натуральних кілерів); фактори росту VEGF, HGF, FGF-2 та SDF-1, TGF- β , PDGF, ANG1, MCP-1 відповідають за активацію ангиогенезу [59].

Також відомо, що певні типи мікроРНК виявляють власні унікальні біологічні ефекти. Наприклад, miR-199a збільшує проліферацію кардіоміоцитів *in silico*, тоді як miR-126-3p блокує розвиток метастазів *in vivo* та *in vitro* [42]. Маса мікро РНК не перевищує 10 кДа, проте вони в секретомі знаходяться у везикулах масою близько 30-40 кДа, що було встановлено при фільтрації мікроРНК на гемодіалізних мембранах [105].

Спостережені в дослідженні низькомолекулярної фракції екзометаболітів МСК протифібротичні, детоксикаційні та протианемічні ефекти не можуть пояснюватися наведеними вище молекулярними механізмами, оскільки містять речовини меншої маси, і, вірогідно, пов'язані з активацією міграції та проліферації резидентних та гемопоетичних стовбурових клітин за рахунок механізму пептидної регуляції, який може бути опосередкований імунною системою.

Висновки до розділу 3.2

Було встановлено, що методику органотипової культури печінки можна застосовувати не тільки для оцінки дії на регенерацію органу речовин, що вносяться *in vitro*, до ростового середовища, але і для чинників (високі дози іонів міді, вітаміну А), що діяли на орган в організмі, з якого зразки одержані (*ex vivo*). Також скорочено час культивування фрагментів органу з 72 до 48 години.

На моделі органотипової культури печінки показана стимуляція процесів регенерації органу при внесенні в ростове середовище цільного кондиційованого середовища, в якому культивували МСК, у концентраціях 30-120 мкл/мл (105-420 мкг/мл у перерахунку на білок). У зазначеному інтервалі спостерігалася висока значуща залежність між дозою та площею, яка наростала навколо фрагментів печінки ($r = 0,78$; $p \leq 0,01$). Найбільшу активність (значуще вище від цільного секретому, $p \leq 0,01$) виявила низькомолекулярна фракція масою менше 10 кДа. Залежність біологічного ефекту від концентрації у випадку з фракцією масою менше 10 кДа вище, ніж для цільного секретому ($r=0,89$; $p \leq 0,01$).

На моделі CCl_4 -фіброзу печінки було показано, що триразове введення і фракції секретому масою менше 10 кДа) у дозі 100 мкл/100 г маси тіла після моделювання патології знижує ендогенну інтоксикацію, спричинену аутолізом печінки (нормалізація лейкоцитарних індексів) і значуще знижує анемічні прояви проти групою контролю патології. Зниження фібротичних проявів у печінці після підтверджується підвищенням активності аланінамінотрансферази, зниженням коефіцієнта де Рітиса у дослідній групі та результатами макроскопічного огляду органу у тварин різних груп.

Було встановлено підвищення регенеративної здатності печінки тварин, яким застосовували фракцію секретому масою менше 10 кДа у дозі 100 мкл/100 г маси тіла на фоні ураження органу CCl_4 . Зона виселення та росту навколо фрагментів печінки, отриманої від тварин дослідної групи значимо вище ($p \leq 0,01$) не тільки в порівнянні з групою контролю патології, але й інтактним контролем, що вказує на компенсаторне посилення регенерації після застосування досліджуваної композиції.

Результати дослідження, що обговорені у розділі 3.2, були опубліковані в:

Bozhkov A. I., Novikova A. V., Klimova E. M., Ionov I. A., Akzhyhitov R. A., Kurhuzova N. I., Bilovetska S. G., **Moskalov V. B.** & Haiovyi S. S. Vitamin A Reduces the Mortality of Animals with Induced Liver Fibrosis by Providing a Multi-level Body Defense System. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*. 2023. Vol. 13 No 1. P. 48–63. DOI: 10.1016/j.jceh.2022.09.006 (**Scopus, Q3**)

Moskalov V. Effects of various xenogenic mesenchymal stem cell secretome fractions on the regenerative capacity of the liver *in vitro*. *Revista Bionatura*. 2023. Vol. 8, No 3. Article 90. DOI: 10.21931/RB/2023.08.03.90 (**Scopus, Q4**)

3.3. Імунотропні ефекти секретому мезенхімальних стовбурових клітин

Одним із ключових механізмів запуску регенераційних процесів в організмі, зокрема в печінці, та їх регуляції є модуляція компонентами секретому стовбурових клітин роботи імунної системи. Під впливом біологічно активних молекул секретому відбувається очищення від клітинного дебрису, зниження запальної реакції, перемикання між популяціями M1 та M2 макрофагів [7]. Такі ефекти можливі завдяки тому, що цитокіни, хемокіни та низькомолекулярні регуляторні молекули пептидної та РНК-природи є одночасно месенджерами імунної системи [32. 59]. Для з'ясування впливу екзометаболітів мезенхімальних стовбурових клітин на імунну функцію було виконано дослідження інтенсивності антитілопродукції на здорових мишах та мишах зі змодельованим імунодефіцитом, фагоцитарної активності поліморфноядерних лейкоцитів, а також запальних процесів на моделі карагенінового набряку в щурів.

3.3.1. Дослідження впливу екзометаболітів мезенхімальних стовбурових клітин на антитілопродукцію

Імуномодельовальні властивості МСК є важливими як для регенеративних процесів, ними опосередкованих, так і за специфічного застосування. Зокрема, перспективним є використання МСК у трансплантології для супресії імунної системи та пригнічення реакцій «хазяїн проти трансплантату» і «трансплантат проти хазяїна», що ведуть до відторгнення тканини. Дослідження МСК у трансплантології переважно зосереджені на їх вплив на Т-клітини, і хоча даних про модульовальну дію МСК на алоантиген-специфічну гуморальну відповідь мало, було продемонстровано, що МСК значно впливають на функціонування В-клітин [49].

Мезенхімальні стовбурові клітини здатні впливати на активацію, проліферацію та диференціювання Т- та В-лімфоцитів. Наприклад, показано дозозалежне інгібування аллоантигензалежної проліферації Т-клітин. Також МСК можуть стимулювати регуляторні Т-типу 1 (Tr1)-подібні клітини, для яких

характерна секреція інтерферону- γ (IFN- γ) та IL10, що призводить до збільшення популяцій CD4+, CD25+, Foxp3+ та клітини Tr1 та зниження реакції «трансплантат проти хазяїна». Також у літературі описані дані про те, що МСК значно знижують активність продукції антитіл плазмоцитами (похідними В-клітин) за рахунок пригнічення хемокінових рецепторів С-Х-С типу 4 (CXCR4), CXCR5 та CXCR7, а також активації активатора транскрипції 3 (STAT3) та експресії PAX5 [59, 76]. МСК також безпосередньо пригнічують активність В-клітин через шлях PD-1/PD-L1. МСК також сприяють утворенню неактивованих В-клітин (наївних, перехідних та субпопуляцій пам'яті), які сприяють диференціюванню регуляторних Т клітин (Treg). Були свідчення, що МСК можуть індукувати проліферацію та диференціювання очищених В-клітин. Пізніші дослідження показали, що для пригнічення В-клітин МСК потрібні сигнали від Т-клітин.

Гуморальний адаптивний імунітет також називають імунітетом, опосередкованим антитілами, отже ключовим параметром його функціонування є вироблення антитіл. Цей параметр можна оцінити, наприклад, за концентрацією та співвідношенням імуноглобулінів у сироватці крові [70]. В даному експерименті для оцінки антитілопродукції використовували підрахунок кількості антитілоутворювальних клітин (плазмацитів) у селезінці та титру гемаглютинінів після імунізації мишей 3%-ною суспензією свіжовідмитих еритроцитів барана.

Дослідження проведено з використанням трьох концентрацій цільного кондиційованого середовища, що містить екзометаболіти ксеногенних мезенхімальних стовбурових клітин (10, 20 і 50 мкл/кг; 35, 70 і 175 мкг/кг на білок), які вводили мишам внутрішньом'язово або підшкірно. Як референтний зразок використаний імуномодулювальний препарат «Тималін». Спостерігалось значуще збільшення кількості антитілоутворювальних клітин у селезінці (рис. 3.17) в експериментальних групах порівняно з контролем. Так, у групі Тималіна їх кількість зросла в 4 рази, а у тварин, яким вводили секретом МСК – залежно від концентрації у 3,4–8,8 разів при внутрішньом'язовому способі введення та у 4,2–5,4 рази при підшкірному. Слід зазначити, що при максимальній дослідженій концентрації екзометаболітів (50 мкл/кг) внутрішньом'язовий спосіб введення був

значуще ефективніший, ніж підшкірний. При цьому всі експериментальні групи були на одному рівні з Тималіном за цим показником і лише за внутрішньом'язовому введення максимальної концентрації було значуще перевищення.

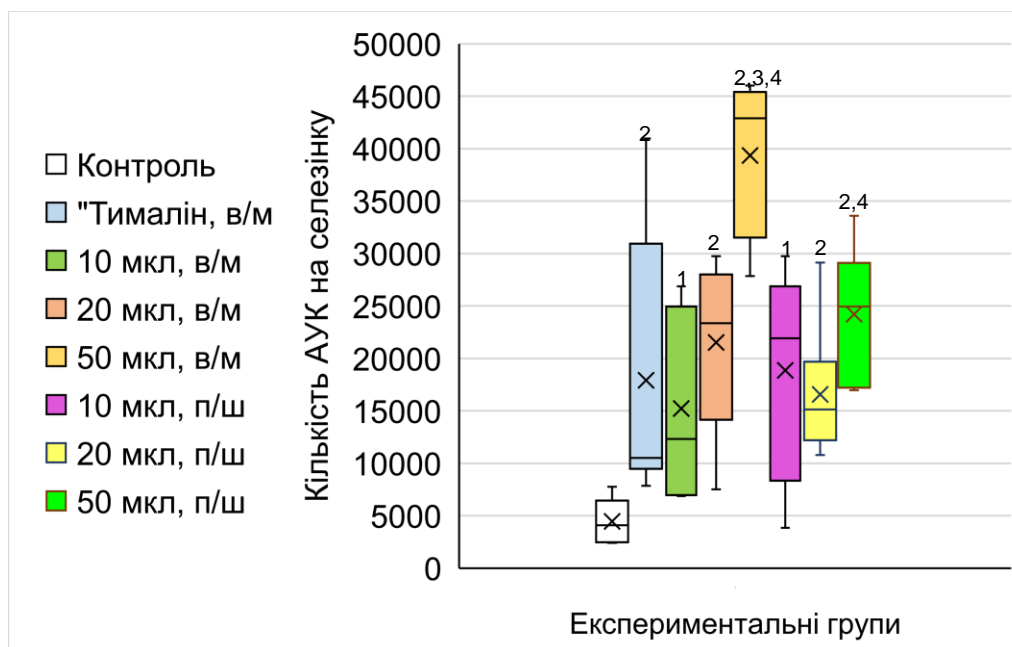


Рис. 3.17. Кількість АУК у селезінці мишей після імунізації еритроцитами барана на фоні введення різних концентрацій цільного секретому МСК внутрішньом'язово (в/м) та підшкірно (п/ш); n=6;

Примітка: Статистичний аналіз з використанням критерію Манна-Уїтні (Вілкоксона): 1 – значуща відмінність від контролю ($p \leq 0,05$); 2 – значуща відмінність від контролю ($p \leq 0,01$); 3 – значуща відмінність від Тималіна ($p \leq 0,05$); 4 – значущі відмінності між способами введення ($p \leq 0,01$)

Концентрацію антитіл оцінювали за титром гемаглютиніну (ГА) до еритроцитів барана в сироватці крові мишей (рис. 3.18). Контрольна група та група референтного зразка Тималіна були на одному рівні за цим показником (відмінності між ними незначущі, $p > 0,05$). При підшкірному введенні секретому МСК усі досліджувані концентрації (10, 20 і 50 мкл/кг) значно перевищували контроль, але між собою розрізнялися незначно. У той же час, при внутрішньом'язовому введенні лише групи концентрацій 20 і 50 мкл/кг статистично значно перевищували контроль, але при цьому значно перевищували

групу з мінімальною концентрацією при даному способі введення (на 27–57%). Як і у випадку з підрахунком антитілоутворювальних клітин, у групі 50 мкл/кг підшкірного введення титр антитіл був значуще нижчим, ніж у групі внутрішньом'язового введення ($p \leq 0,01$).

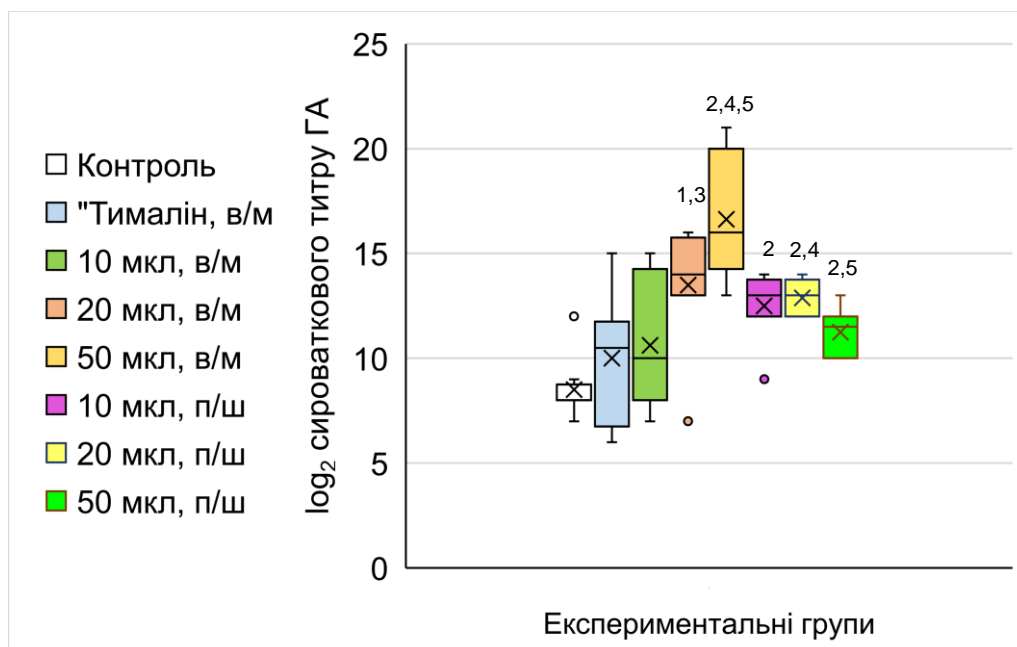


Рис. 3.18. Титр гемаглютининів (ГА) у сироватці крові мишей після імунізації еритроцитами барана на фоні введення різних концентрацій цільного секретому МСК внутрішньом'язово (в/м) та підшкірно (п/ш); $n=6$

Статистичний аналіз з використанням критерію Манна-Уїтні (Вілкоксона): 1 – значуща відмінність від контролю ($p \leq 0,05$); 2 – значуща відмінність від контролю ($p \leq 0,01$); 3 – значуща відмінність від Тималіна ($p \leq 0,05$); 4 – значуща відмінність від Тималіна ($p \leq 0,01$); 5 – значущі відмінності між способами введення ($p \leq 0,01$)

Кореляційний аналіз підтвердив наявність високого статистично значущого позитивного зв'язку між кількістю антитілоутворювальних клітин (АУК) та титром гемаглютиніну, ГА ($\rho = 0,95$; $p \leq 0,05$, рис. 3.19).

Також слід зазначити, що при внутрішньом'язовому введенні спостерігалася залежність між дозою введених екзометаболітів МСК і біологічним ефектом ($\rho=0,99$, $p \leq 0,05$ – за кількістю плазматичних клітин; $\rho=0,97$, $p \leq 0,05$ – за титром антитіл). За підшкірного введення не спостерігалася значущої залежності ефекту від концентрації.

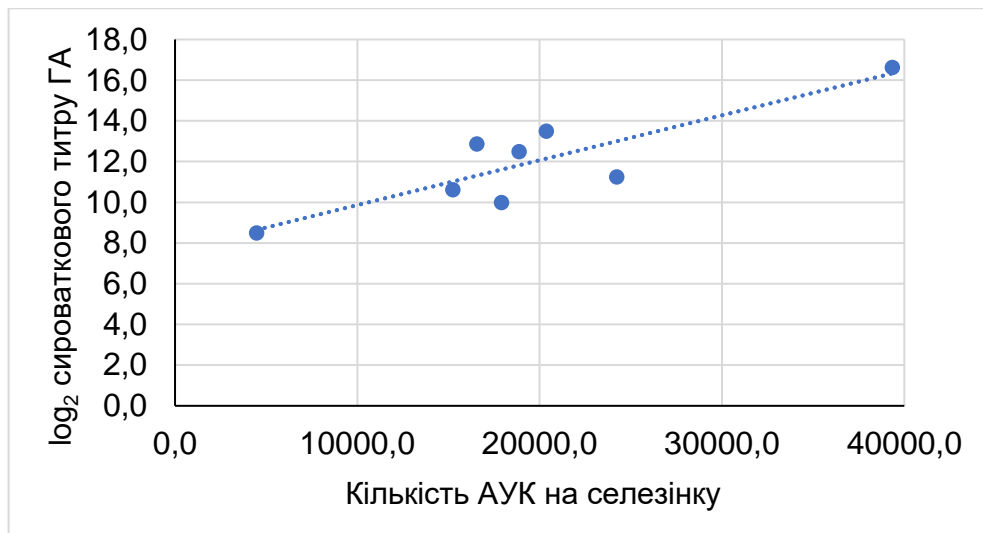


Рис. 3.19. Кореляція між кількістю антитілоутворювальних клітин (АУК) у селезінці та титром гемаглютининів (ГА) у сироватці крові мишей після імунізації еритроцитами барана на фоні введення різних концентрацій цільного секретому МСК ($\rho = 0,95$; $p \leq 0,05$)

У літературі відзначено імунодепресивні властивості алогенних живих МСК на продукцію антитіл. Comolì та ін. [26] вивчали вплив мезенхімальних стовбурових клітин людини на стимульовану алоантигеном продукцію імуноглобуліну на моделі *in vitro*: моноклеарні клітини периферичної крові культивували у змішаній культурі лімфоцитів. Показано, що додавання МСК у співвідношенні від 4:1 до 20:1 має сильну інгібуючу дію на секрецію IgG, IgA та IgM. Ці дані узгоджуються з даними інгібування В-клітин, отриманими на тваринних моделях [6, 55]. Також було показано опосередковане МСК інгібування проліферації людських В-клітин та вироблення антитіл *in vitro* після поліклональної стимуляції [28]. Comolì та ін. [26] припускають, що пригнічення функції В-клітин відбувається переважно за рахунок ефекту прогнічення допомоги Т-клітин, а не прямої дії на В-клітини, і виражається в пригніченні продукції ІЛ-5 і, можливо, ІЛ-4, а також рецепторів хемокінів на В-клітинах. Дослідники зазначають, що хоча секретовані МСК речовини відіграють важливу роль у пригніченні вироблення антитіл, проте інгібуючий ефект вищий, коли МСК перебувають у контакті з імунними клітинами (міжклітинні контактні взаємодії).

З іншого боку, є докази, що ксеногенні МСК можуть посилювати гуморальні реакції. Так, Hong та ін. [70] відзначають збільшення титрів IgG1 та IgG2a у сироватці крові мишей Balb/c та B6 (IgG2c замість IgG2a у мишей B6) після введення мезенхімальних стовбурових клітин людини (лМСК), причому виявлені антитіла специфічні до лМСК. Аналіз співвідношення підкласів імуноглобулінів та морфології формування гермінативних центрів у селезінці мишей свідчить про прояв Т-клітинно-залежних гуморальних відповідей на поверхневі антигени лМСК. Т-клітинно-залежні гуморальні відповіді включають захоплення антигенів дендритними клітинами (ДК), їх презентацію ними антигену Т-лімфоцитам, які, у свою чергу, активують В-клітини та стимулюють їх диференціювання в антитілоутворювальні плазматичні клітини. Проте МСК здатні інгібувати диференціювання дендритних клітин-попередників, що може блокувати весь ланцюжок процесів. лМСК також інгібують диференціювання В-клітин. Спостерігається Hong та ін. [70] посилення гуморальної відповіді в описаних умовах є парадоксальним, оскільки активація лМСК *ex vivo* за допомогою IFN- γ для моделювання запалення не призводила до імуносупресії, потенційну цитокінову несумісність між людиною та мишами також не підтверджено.

Слід зазначити, що використаний у роботі секретом не має поверхневих клітинних молекул у значущих кількостях, тому з меншою ймовірністю викликає він імунну відповідь на себе. Даних щодо впливу секретому клітин на антитілопродукцію виявити не вдалося, проте Luk та ін. [101] встановили, що інактивовані тепловим шоком МСК, зокрема, не індукують утворення регуляторних В-клітин, на відміну живих клітин.

Імунопротекторні властивості екзаметоболітів МСК щодо гуморального компонента імунітету були протестовані на моделі вторинного імунодефіциту, викликаного одноразовим внутрішньочеревним введенням 250 мг/кг гідрокортизону ацетату (ГКА). Описана модель заснована на виснаженні імунокомпетентних клітин у тимусі, селезінці, стегновому кістковому мозку, брижових, пахових та підколінних лімфатичних вузлах

після дії гормону. На початковому етапі після введення гідрокортизону сильніше ушкоджуються В-лімфоцити (різке зниження їх числа, наприклад, спостерігається в селезінці), порівняно з Т-лімфоцитами, що зрушує співвідношення лімфоцитів у бік Т-клітин. Крім того, Т-клітини відновлюються швидше, ніж В-клітини [39].

Жорсткість описаної моделі була продемонстрована в оцінці виживання тварин. Так, за відсутності імуномодулювальних агентів (позитивний контроль) спостерігалася 100 % летальність (рис. 3.20).

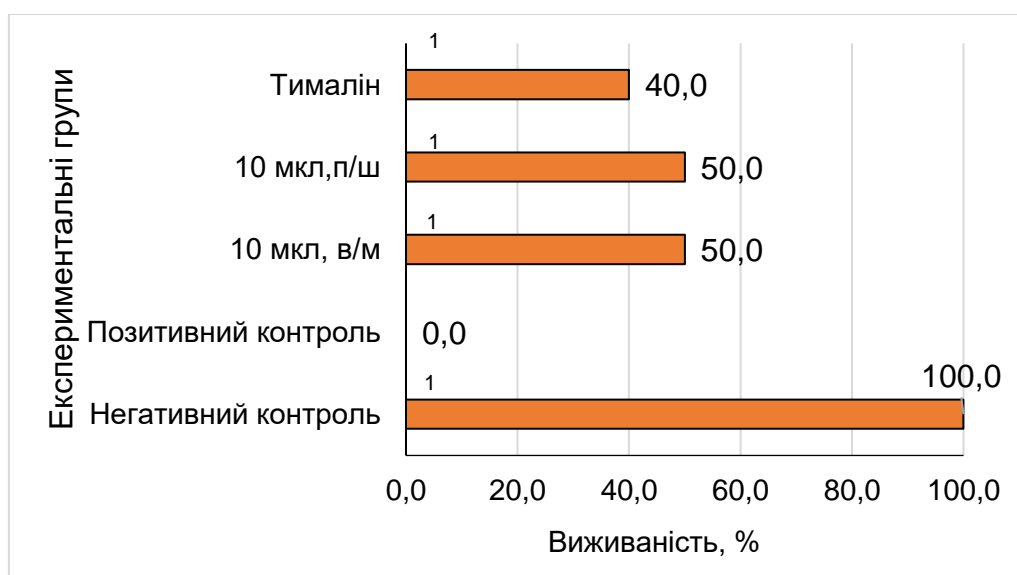


Рис. 3.20. Вживаність мишей після одноразового внутрішньоочеревинного введення імуносупресора гідрокортизону ацетату в дозі 250 мг/кг маси тіла на фоні введення цільного секретому МСК

Примітка: Статистичний аналіз із використанням критерію Фішера для вибірових часток: 1 – значуща відмінність від позитивного контролю ($p \leq 0,01$)

В експерименті було досліджено імунопротекторні властивості мінімальної ефективної концентрації секретому ксеногенних МСК (10 мкл/кг) при внутрішньом'язовому та підшкірному введенні; як референтний зразок використовували внутрішньом'язову ін'єкцію Тималіну в дозі 5 мг/кг. Застосування як Тималіна, так і екзометаболітів мезенхімальних стовбурових клітин призводило до статистично значущого підвищення виживання тварин

із вторинним імунодефіцитом порівняно з позитивним контролем ($p \leq 0,01$). Відмінності за цим показником у групах з різними імуномодуляторами не виявлено ($p > 0,05$).

Компенсація імунодефіцитного стану гуморальної ланки адаптивного імунітету може бути забезпечена цитопротекцією або активацією проліферації або диференціювання спокою В-клітин. В літературі було показано [140], що МСК можуть впливати на В-клітини за допомогою міжклітинного контакту *in vitro*, що призводить до збільшення виживаності В-клітин у стані спокою за допомогою контактнo-залежних механізмів, а також до посилення диференціювання В-клітин незалежно від Т-клітин. МСК також інгібують опосередкований каспазою-3 апоптоз В-клітин шляхом посилення фактора росту ендотелію судин (VEGF), а також уповільнюють проліферацію клітин, блокуючи клітинний цикл В-лімфоцитів у фазі G0/G1 шляхом активації мітоген-активованого p38. протеїнкіназний шлях (MAPK). Цілком ймовірно, що цитопротекторний ефект, опосередкований активацією VEGF та впливом на шлях MAPK, може підтримуватися компонентами секретому МСК, тоді як ефекти контактної клітинної взаємодії не можуть бути відтворені.

Компенсаторні можливості гуморального адаптивного імунітету оцінені за кількістю плазмоцитів у селезінці (рис. 3.21) та титру гемаглютининів у крові (рис. 3.22) після моделювання вторинного імунодефіциту.

У групах тварин, яким вводили секретом МСК, кількість плазмоцитів (рис. 3.20) була на рівні негативного контролю (тварини, які не отримували ін'єкцію гідрокортизону). У групі препарату порівняння (Тималін) цей показник був статистично значуще нижче, ніж у контролі.

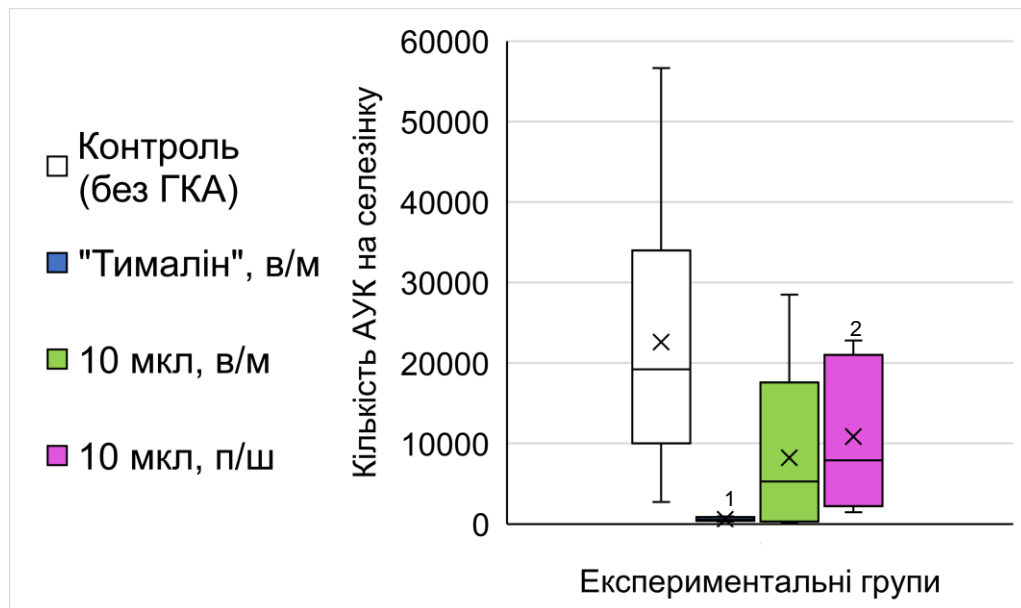


Рис. 3.21. Кількість антитілоутворювальних клітин (АУК) у селезінці мишей після імунізації еритроцитами барана та введення імуносупресора на фоні введення різних концентрацій цільного секретому МСК внутрішньом'язово (в/м) та підшкірно (п/ш)

Примітка: *Статистичний аналіз з використанням критерію Манна-Уїтні (Вілкоксона):* 1 - значна відмінність від позитивного контролю ($p \leq 0,01$); 2 – значна відмінність від Тималіна ($p \leq 0,01$)

Щодо титру антитіл (рис. 3.21), то при внутрішньом'язовому введенні спостерігалася картина, аналогічна показнику кількості плазматичних клітин, при цьому, при підшкірному введенні кількість гемаглютинінів була статистично значуще нижче, ніж у негативному контролі, але в той же час значно перевищувало групу референтного зразка Тималіна.

Кореляційний аналіз підтвердив наявність високого статистично значущого позитивного зв'язку між кількістю антитілоутворювальних клітин та титром гемаглютинінів ($\rho = 0,90$; $p \leq 0,05$, рис. 3.23).

Таким чином, було показано активацію гуморальної ланки імунітету при внутрішньом'язовому (більш виражена) та підшкірному введенні секретому, що продукується МСК. Показано кратне збільшення кількості антитілоутворювальних клітин у селезінці, так і титру антитіл у сироватці крові після введення секретому у концентраціях 10, 20 та 50 мкл/кг (у

перерахунку на білок – 35, 70 та 175 мкг/кг). При внутрішньом'язовому введенні спостерігалася висока та статистично значуща залежність біологічного ефекту від дози. Підшкірне введення секретому показало розмити картину біологічного ефекту. Можна припустити, що при підшкірному введенні досліджуваної композиції переважають паракринні ефекти над системними, а для активації продукції антитіл необхідні системні впливи.

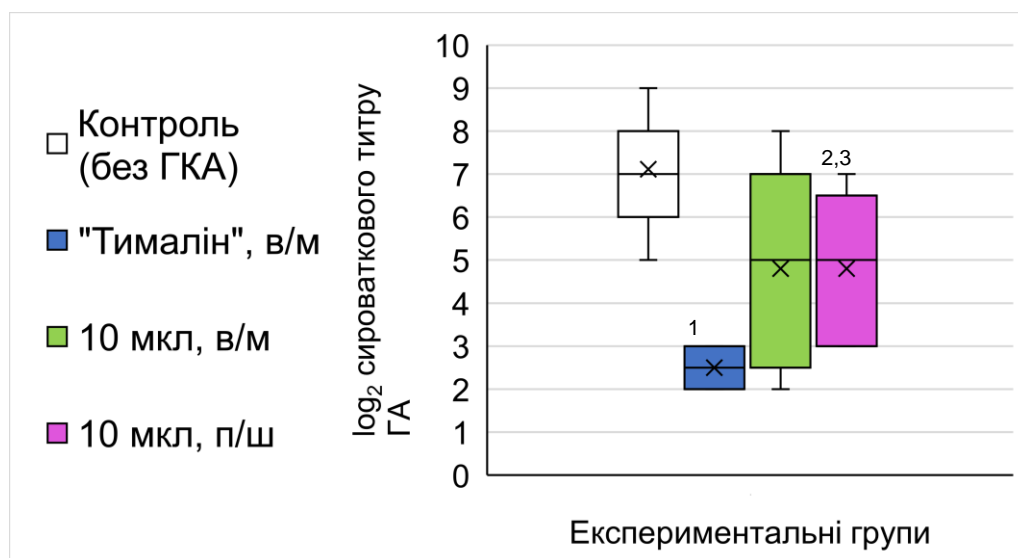


Рис. 3.22. Титр гемаглютининів (ГА) у сироватці крові мишей після імунізації еритроцитами барана та введення імуносупресора на фоні введення різних концентрацій цільного секретому МСК внутрішньом'язово (в/м) та підшкірно (п/ш)

Статистичний аналіз з використанням критерію Манна-Уїтні (Вілкоксона): 1 – значуща відмінність від позитивного контролю ($p \leq 0,01$); 2 – значуща відмінність від позитивного контролю ($p \leq 0,05$); 3 – значуща відмінність від Тималіна ($p \leq 0,05$)

Імунна супресія, що забезпечується живими ауто- та алогенними МСК, мабуть, пов'язана з характеристиками ніші, в якій вони діють, та їх активацією запальними факторами. Біологічна ніша впливає на активність МСК, спектр речовин, що ними продукуються, і набір поверхневих молекул (для контактної взаємодії). При отриманні базового секретому в умовах *in vitro*, без дії факторів організму або штучних активаторів, що впливають на клітини-продуценти, його компоненти, ймовірно, стимулюють вироблення антитіл. Описаний базовий секретом також виявляє цитопротекторну дія на

В-клітини селезінки, що було продемонстровано в експерименті при вторинному імунодефіциті. Механізми описаних фактів потребують подальшого вивчення.

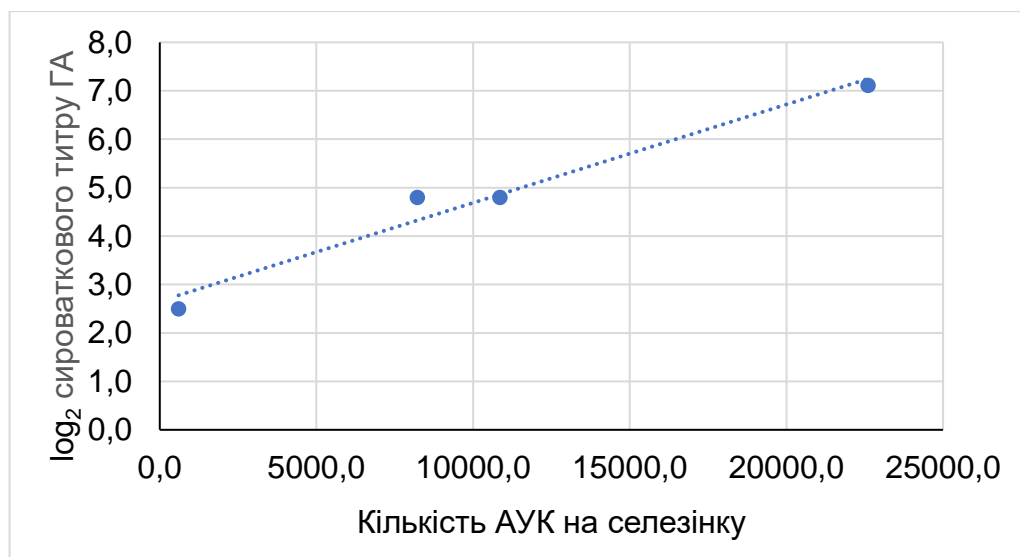


Рис. 3.23. Кореляція між кількістю антитілоутворювальних (АУК) клітин у селезінці та титром гемаглютининів (ГА) у сироватці крові мишей після імунізації еритроцитами барана на фоні введення різних концентрацій цільного секретому МСК (при вторинному імунодефіциті; $\rho = 0,90$; $p \leq 0,05$)

3.3.2. Дослідження впливу екзометаболітів мезенхімальних стовбурових клітин на клітинні відповіді імунної системи

Клітинні відповіді імунної системи на фоні введення екзометаболітів МСК були оцінені за фагоцитарною активністю нейтрофілів з крові щурів (видовий імунітет) та реакції гіперчутливості уповільненого типу у мишей (адаптивний імунітет).

У літературі зустрічаються різні відомості про взаємодію МСК із нейтрофілами. Так, наприклад, МСК, активовані фактором некрозу пухлини альфа (ФНПа), посилюють метастазування пухлини молочної залози за рахунок ефективного рекрутування нейтрофілів CXCR2⁺ до пухлини, в той самий час, неактивовані МСК не чинили такої дії [162]. МСК за відносно низького співвідношення до нейтрофілів (до 1:500) значно інгібують апоптоз останніх,

як у стані спокою так і після їх активації інтерлейкіном 8 (IL-8). При цьому антиапоптотична активність МСК не вимагає міжклітинного контакту (описують, зокрема, механізм протекції, пов'язаний з продукцією інтерлейкіну 6, IL-6), що дозволяє припустити наявність такого ефекту у секретому МСК. Водночас посилення фагоцитарної активності, експресії молекул адгезії та хемотаксису у відповідь на IL-8, f-MLP або C5a під впливом МСК не спостерігалось [121].

З іншого боку, в літературі описані також факти супресії нейтрофілів мезенхімальними стовбуровими клітинами. Наприклад, МСК здатні пригнічувати неконтрольовану активацію нейтрофілів і послаблювати тяжке пошкодження тканин моделі опосередкованого імунними комплексами васкуліту на мишах. Зазначений ефект пов'язаний із залежним від молекули міжклітинної адгезії і поглинанням нейтрофілів мезенхімальними стовбуровими клітинами, тому не може відтворюватися при введенні секретому [75]. Стимуляція бактеріальним ендотоксином (ліпополісахаридом, LPS) індукує експресію хемокінових рецепторів та рухливість МСК. Активовані МСК секретують більше прозапальних цитокінів і рекрутували нейтрофіли периферичної крові залежним від IL-8 та інгібуючого фактора міграції макрофагів (MIF) чином. Рекрутовані та активовані таким чином нейтрофіли виявляють підвищену тривалість життя, експресію запальних хемокінів та реакцію на подальшу провокацію LPS [16].

В експерименті оцінювалася лише фагоцитарна активність нейтрофілів, виділених з венозної крові щурів після введення тваринам внутрішньом'язових та підшкірних ін'єкцій секретому МСК у дозі 20–50 мкл/кг. Зазначена активність визначалася за фагоцитарним індексом, тобто частки фагоцитуючих нейтрофілів від числа поліморфноядерних лейкоцитів, (рис. 3.24) та за фагоцитарним числом, тобто середньою кількістю клітин дріжджів, що поглинаються одним нейтрофілом (рис. 3.25).

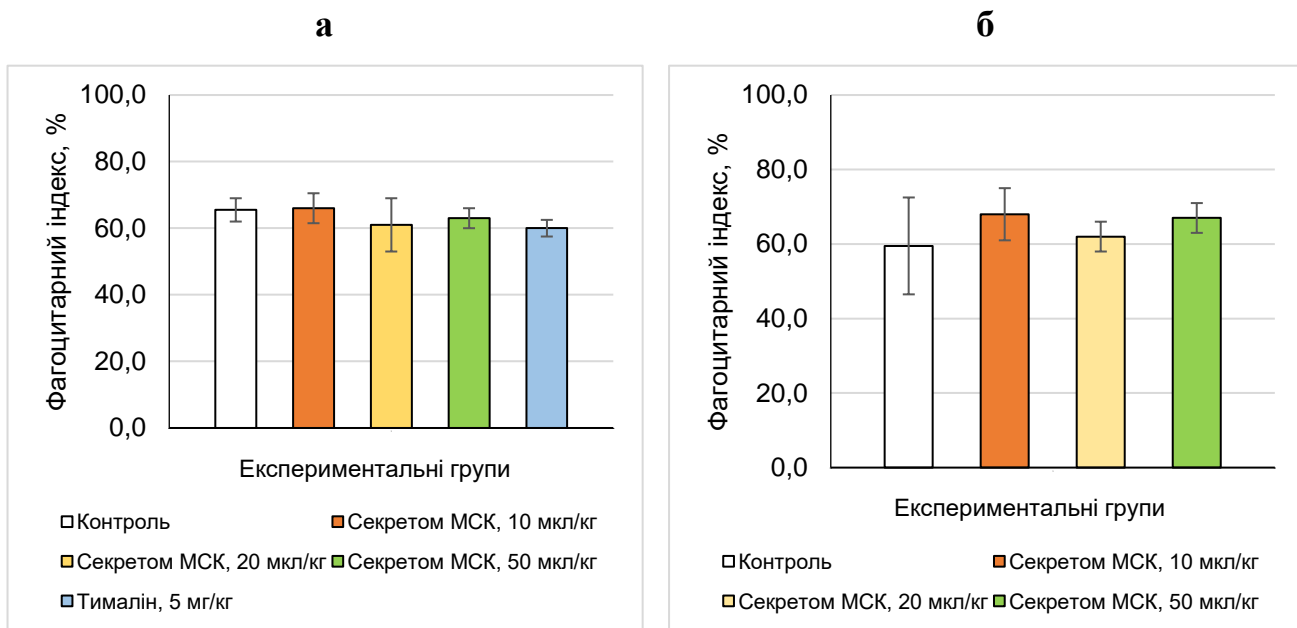


Рис. 3.24. Фагоцитарний індекс, тобто % фагоцитуючих нейтрофілів від загального числа лейкоцитів периферичної крові, на фоні різних концентрацій цільного секретому МСК внутрішньом'язово (а) та підшкірно (б), $n=6$ ($\bar{X} \pm \text{ДІ}_{95}$)

Примітка: Статистичний аналіз з використанням критерію Манна-Уїтні (Вілкоксона): значущих відмінностей з контролем не виявлено

У першій серії експерименту, коли зразки вводилися внутрішньом'язово (рис. 3.24, а), фагоцитарний індекс склав від $60 \pm 1,5$ % у групі референтного зразка Тималіна до $66 \pm 10,8$ % у групі, в якій вводили 10 мкл/кг секретому МСК. У другій серії (за підшкірного введення, рис. 3.24, б) – від $59,5 \pm 13,4$ % у контрольній групі до $68 \pm 7,3$ % у тварин, яким вводили по 10 мкл/кг екзометаболітів МСК. Статистичний аналіз, виконаний з допомогою критерію Манна-Уїтні (Вілкоксона), не виявив значущих відмінностей від контролю.

Аналогічна картина спостерігалася щодо показника "фагоцитарне число" (рис. 3.25). Значення показника коливалися в межах $2,03 \pm 0,15$ (група, в якій вводили 20 мкл/кг секретому МСК) – $2,52 \pm 0,2$ (10 мкл/кг) у першій серії експерименту (внутрішньом'язове введення зразків, рис. 3.25, а) та від $2,34 \pm 0,18$ (група 20 мкл/кг) до $2,77 \pm 0,55$ у контрольній групі – у другій (підшкірне введення, рис. 3.25, б). Статистичний аналіз не виявив значних відмінностей експериментальних груп від контрольної.

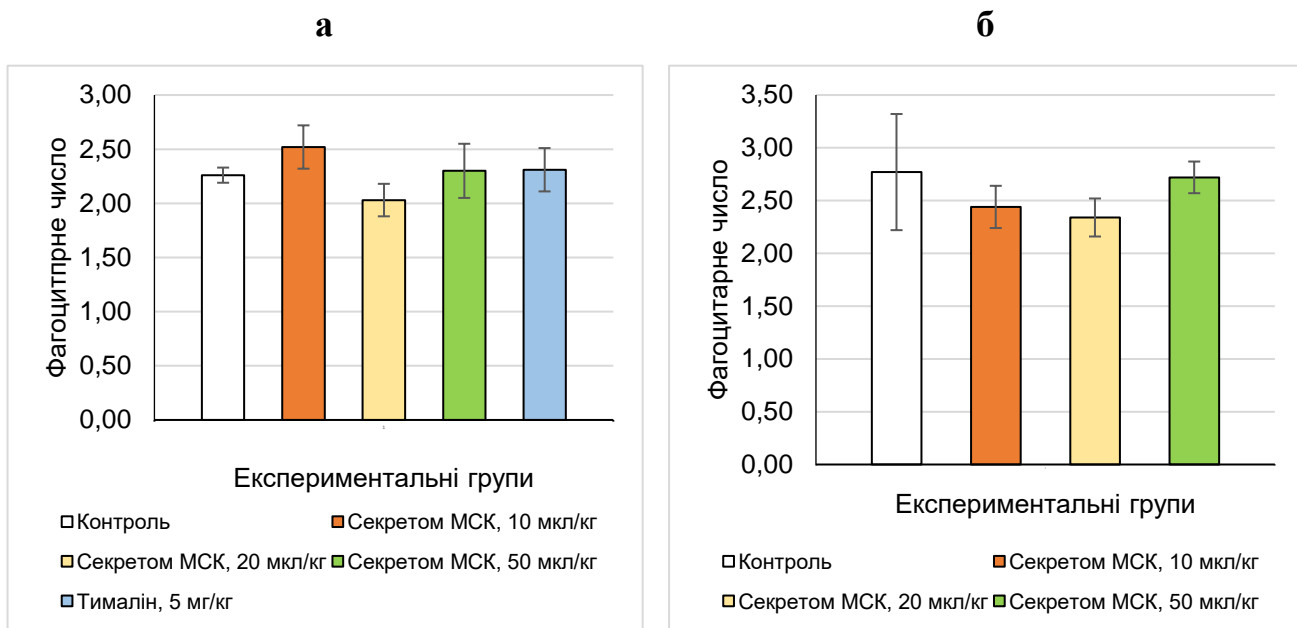


Рис. 3.25. Фагоциттарне число, тобто середня кількість фагоцитованих клітин дріжджів, на фоні введення різних концентрацій цільного секретому МСК внутрішньом'язово (а) та підшкірно (б), $n=6$ ($\bar{X} \pm D_{I_{95}}$)

Примітка: Статистичний аналіз з використанням критерію Манна-Уїтні (Вілкоксона): значущих відмінностей з контролем не виявлено

Таким чином, введення секретому МСК у концентраціях від 10 до 50 мкл/кг не викликає ані значущої активації, ані значущої супресії фагоциттарної активності нейтрофілів периферичної крові. Одержані дані в цілому відповідають описаним у літературі щодо ефектів живих неактивованих МСК [121].

Клітинна відповідь адаптивного імунітету було вивчено на моделі реакції гіперчутливості уповільненого типу (ГУТ) за методом К.Р. Kitamura [85]. Результати дослідження наведені на рисунку 3.26.

Вплив МСК на перебіг реакції ГУТ пов'язаний з їх зосередженням у невеликій, але значущій кількості у вторинних лімфоїдних органах, що призводить до послаблення реакції за рахунок апоптозної загибелі навколишніх імунних клітин у дренажному лімфатичному вузлі (ЛВ). Це підтверджується значним зниженням інфільтрації Т-клітин у ураженій ділянці та збільшенням апоптотичних Т-клітин у дренажному ЛВ [98]. Більш ефективно навіть порівняно з високоактивним топічним глюкокортикостероїдом флуоцинолоном пригнічення лімфоциттарної інфільтрації на моделі контактної-алергічного дерматиту у разі місцевого

застосування крему на основі базового секретому МСК (неактивовані клітини) вказує на роль саме екзаметоболітів МСК, а не контактної міжклітинної взаємодії у зниженні реакції ГУТ [57].

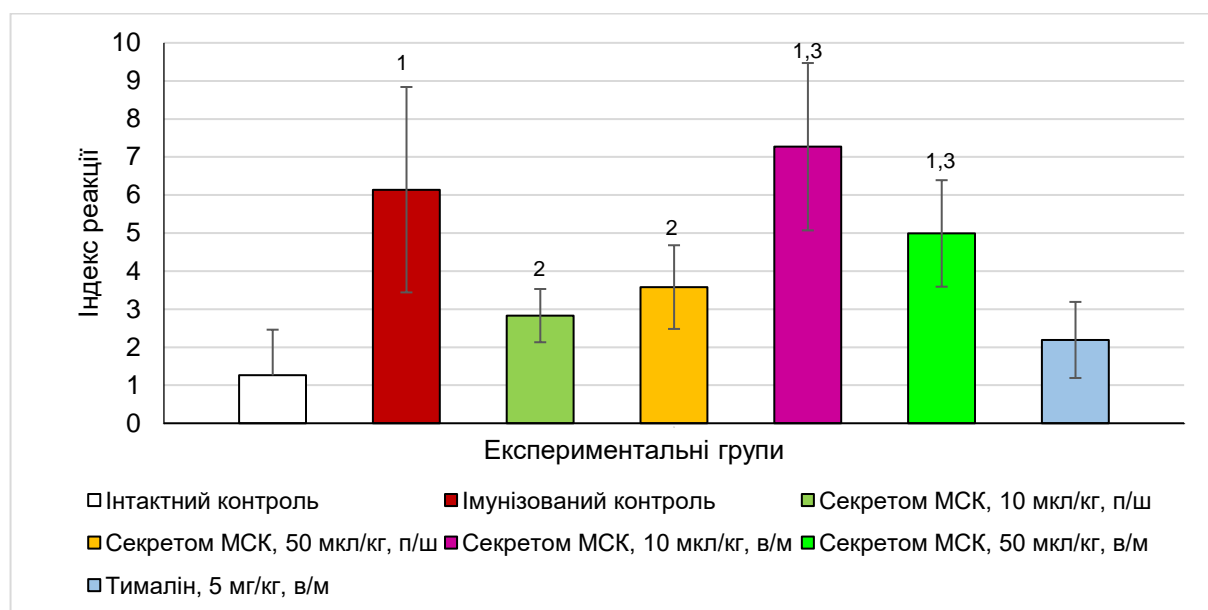


Рис. 3.26. Оцінка інтенсивності реакції гіперчутливості уповільненого типу за індексом реакції – різницею в масі між контрольною та дослідною лапами, на фоні введення різних концентрацій цільного секретому МСК, $n=6$ ($\bar{X} \pm DI_{95}$)

Примітка: Статистичний аналіз з використанням критерію Манна-Уїтні (Вілкоксона): 1 - значуща відмінність від інтактного контролю ($p \leq 0,01$); 2 – значуща відмінність від інтактного контролю ($p \leq 0,05$); 3 – значуща відмінність від Тималіну ($p \leq 0,05$)

Оцінка активності клітинного імунітету у реакції ГУТ проводилася за допомогою індексу реакції, що обчислюється як відношення різниці мас дослідної і контрольної лап до маси контрольної лапи, зважених за 24 години після завершальної ін'єкції. Спостерігався розвиток локального набряку: індекс реакції у групі імунізованого контролю збільшувався майже в 5 разів у порівнянні з інтактними тваринами, що свідчить про розвиток нормальної імунної відповіді на введення антигену. Всі експериментальні групи крім тієї, в якій вводили 10 мкл/кг секретому МСК внутрішньом'язово, проявили значуще нижчу реакцію ГУТ порівняно з імунізованим контролем (рис. 3.26), що вказує на послаблення реакції, ймовірно пов'язане з апоптозною загибеллю

надлишкових імунних клітин лімфатичному вузлі. Тварини, які отримували по 10 мкл/кг екзометаболітів МСК внутрішньом'язово виявили значуще вищу реакцію, ніж імунізований контроль. У цілому, за внутрішньом'язового введення секретому індекс реакції був значуще вище, ніж у групі референтного зразка. За підшкірного введенні реакція спостерігалася на рівні Тималіну.

Виходячи з отриманих даних, можна припустити, що оскільки підшкірне введення секретому МСК викликає більш інтенсивне зниження реакції ГУТ, ніж внутрішньом'язове, паракринні ефекти екзометаболітів МСК відіграють важливішу роль у супресії клітинних реакцій адаптивного імунітету, ніж генералізовані. Разом з тим, у невеликій концентрації внутрішньом'язове введення секретому викликає навпаки посилення клітинних імунних реакцій; механізм цього поки що не вивчений.

3.3.3. Дослідження впливу екзометаболітів мезенхімальних стовбурових клітин на запалення

Запалення, за сучасними уявленнями, є важливим механізмом, необхідним для відновлення тканини після пошкодження та складається з каскаду клітинних та мікросудинних реакцій, які служать для видалення пошкодженої та створення нової тканини: підвищена проникність мікросудин, прикріплення циркулюючих клітин до судин поблизу місця ушкодження, міграцію імунокомпетентних та стовбурових клітин, клітинний апоптоз та ріст нових тканин та кровоносних судин [133]. Разом з тим, персистуюча запальна реакція може бути додатковим фактором ушкодження тканин [7], тому дуже важливо для успішної регенерації обмежити запалення за часом.

Однією з класичних моделей запалення є каррагеніновий набряк. Провідним механізмом у розвитку ексудативної реакції є зміна проникності судин мікроциркуляторного русла, що розвивається під дією медіаторів запалення. За даними Di Rosa та ін. [35], в перші 30–90 хвилин патогенезу розвитку каррагенінового набряку беруть участь гістамін і серотонін, в

інтервалі між 1,5–2,5 годин – кінини, а між 2,5–5,5 годинами – простагландини (ПГ) та лейкотрієни (ЛТ).

Дослідження впливу екзосом мезенхімальних стовбурових клітин, виділених з пульпи зуба людини, на запальну реакцію на моделі викликаного каррагеніном набряку показало [120] його зменшення у всі моменти часу (на 39,5, 41,6 і 25,6% за 6, 24 та 48 годин після ін'єкції відповідно) до аналогічних рівнів, що спостерігаються у позитивному контролі (преднізолон). За допомогою візуалізації *in vivo* було показано, що екзосоми, як і преднізолон пригнічують активність катепсину та матриксних металопротеїназ (ММР) у місці гострого запалення. Слід зазначити, що преднізолон діє швидше і активніше на ранніх стадіях, тоді як екзосоми виявляли свою протизапальну дію поступово, починали діяти пізніше.

Результати нашого дослідження протизапальних властивостей екзометаболітів МСК на моделі каррагенінового набряку наведено у таблиці 3.15.

В експерименті введення каррагеніну призводило до поступового розвитку набряку лапи щурів. Максимальна вираженість запалення реєструвалася на 4 години спостереження, що узгоджується з описаними вище літературними даними.

Вплив секретому МСК на інтенсивність запальної реакції була оцінена в концентрації 50 мкл/кг за внутрішньом'язового та підшкірного введення у лікувально-профілактичному режимі (до та після моделювання набряку). За обох шляхів введення спостерігалось значуще зниження розмірів набряку, різниця між способами введення значущою не була. Референтний імуномодулятор Тималін у дозі 5 мг/мл не мав значної антиексудативної активності. Референтний протизапальний зразок Ортофен на першій годині практично не чинив антиексудативної дії, але вже на другій годині спостереження знижував набряк значно ефективніше, ніж інші зразки. Загалом було підтверджено більш швидку дію нестероїдних протизапальних препаратів, що пригнічують циклооксигеназу, порівняно з компонентами секретому.

Однак, спостерігався поступовий запуск протизапальної дії екзаметаболітів МСК, і на пізніх термінах спостереження (після 4-х годин) їх активність була на рівні з Ортофеном за обох шляхів введення.

Таким чином, було підтверджено описану в літературі антиексудативну активність екзометаболітів МСК на моделі каррагенінового набряку, що пов'язана, вірогідно, з пригніченням активності катепсину та матриксних металопротеїназ. Механізм такого пригнічення не встановлений, але відрізняється від такого під дією нестероїдних протизапальних препаратів, з чим пов'язане повільніше вивільнення ефекту, що спостерігається у дослідженні.

Таблиця 3.15

Динаміка об'єму каррагенінового набряку на лапі щура та оцінка антиексудативної активності екзометаболітів МСК, n=5,
M (Q25; Q75)

Група тварин	Показник	Динаміка АЕА (умовні одиниці)					
		1 год.	2 год.	3 год.	4 год.	3 доби	5 діб
Позитив-ний контроль	ΔV	0,35 (0,34;0,50)	0,54 (0,37;0,55)	0,65 (0,65;0,94)	0,81 (0,79;0,84)	0,71 (0,58;0,78)	0,53 (0,45;0,56)
Секретом МСК, 50 мкл/кг (в/м)	ΔV	0,26 (0,07;0,28)*/# α	0,29 (0,25;0,29)*	0,44 (0,36;0,71)*	0,67 (0,67;0,73)*	0,52 (0,51;0,55)	0,27 (0,16;0,47)
	АЕА,%	39 (34;84)# α	41 (24;49)# α	44 (9; 54)	23 (16; 23)	21 (16;22)	46 (7;68)
Секретом МСК, 50 мкл/кг (п/к)	ΔV	0,24 (0,24;0,30)*	0,33 (0,24;0,35)*	0,35 (0,33;0,43)*/ α	0,59 (0,51;0,78)#	0,34 (0,28;0,38)*	0,22 (0,21;0,25)*
	АЕА,%	43 (29;46)	32 (28;51)#	55 (45;58) α	32 (10;41)	48 (42;57)	56 (50;58)
Референтн. зразок Ортофен, 8 мг/кг	ΔV	0,41 (0,23;0,43)	0,21 (0,18;0,31)*	0,27 (0,09;0,50)*	0,38 (0,24;0,45)*	0,53 (0,37;0,68)	0,09 (0,07;0,13)*
	АЕА, %	3 (-1; 46)	57 (36; 63)	65 (36;88)	56 (48;72)	19 (-4;43)	82 (74;86)
Референтн. зразок Тималін, 5 мг/кг	ΔV	0,36 (0,31;0,38)	0,38 (0,35;0,45)#	0,58 (0,49;0,76)#	0,94 (0,66;1,18)#	0,43 (0,43;0,64)	0,39 (0,10;0,54)
	АЕА, %	15 (10; 26)	22 (8; 28)#	26 (3; 37)	-8 (-4; 24)	34 (2; 34)	23 (-7; 80)

Примітки: Статистичний аналіз з використанням критерію Манна-Уїтні (Вілкоксона): * – значуща відмінність від позитивного контролю (ПК), p < 0,05 # – значуща відмінність від Ортофена, p < 0,05; α – значуща відмінність від Тималіна, p < 0,05; АЕА – антиексудативна активність

Висновки до розділу 3.3

Визначення інтенсивності антитілоутворення після введення секретому МСК у дозі від 10 до 50 мкл/кг (35–175 мкг/кг у перерахунку на білок) показало значуще збільшення кількості плазмоцитів у селезінці мишей 3,4–8,8 рази за в/м введення та у 4,2–5,4 рази за підшкірного. За в/м введення спостерігалася висока стійка залежність біологічного ефекту від дози. Титр гемаглютининів у крові також значуще перевищував значення контрольної групи. Висока доза зразку за в/м введення була значуще більш ефективною як за титром антитіл, так й за кількістю плазмацитів у порівнянні з п/м способом введення. Вірогідно, системні ефекти превалюють над паракринними.

Імунопротекторні властивості екзометаболітів МСК (у мінімальній ефективній концентрації 10 мкл/кг) за в/м та п/ш введення вивчалися на моделі вторинного імунодефіциту, викликаного гідрокортизоном, та виявилися у значущому підвищенні виживаності порівняно з позитивним контролем та нормалізацією антитілопродукції (на рівні негативного контролю).

Дослідження фагоцитозу клітин дріжджів поліморфноядерними лейкоцитами показало, що як в/м, так і п/ш ведення екзометаболітів МСК у дозі 10–50 мкл/кг не чинить ані супресуючої, ані активуючої дії на нейтрофіли, їх фагоцитарна активність на рівні контрольної групи.

Вивчення клітинних реакцій адаптивного імунітету на моделі реакції ГУТ показало значуще зниження реакції порівняно з імунізованим контролем (крім групи 10 мкл/кг, в/м). За в/м введення секретому індекс реакції був значуще вищим, ніж у групі референтного зразка. За п/ш введення реакція біла на рівні Тималіну. Вірогідно, паракринні ефекти екзометаболітів МСК відіграють важливішу роль у супресії клітинних реакцій адаптивного імунітету, ніж генералізовані.

Підтверджено антиексудативну активність екзометаболітів МСК на моделі каррагенінового набряку, пов'язану, вірогідно, з пригніченням активності катепсину В і матриксних металопротеїназ. Його механізм не встановлений, але відрізняється від такого під дією нестероїдних протизапальних препаратів, з чим пов'язане повільніше вивільнення ефекту, що спостерігається у дослідженні.

Результати дослідження, що обговорені у розділі 3.3, були опубліковані в:

Moskalov V., Koshova O., Ali S., Filimonova N., Tishchenko I. Impact of xenogenic mesenchymal stem cells secretome on a humoral component of the immune system. *WikiJournal of Medicine*. 2023. Vol. 10, No 1, Article 9. DOI: 10.15347/WJM/2023.004 (**Scopus, Q4**)

ВИСНОВКИ

У результаті проведених досліджень встановлено детоксикаційний, антифібротичний та антианемічний ефект екзометаболітів мезенхімальних стовбурових клітин в умовах фіброзу печінки, опосередкований впливом на стан Т- та В-клітин та зниженням запалення.

1. Розроблено спосіб одержання компонентів секретому мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку, який включає культивування мезенхімальних стовбурових клітин, збір екзометаболітів від культур 3–5 пасажів на 48 годинах росту після досягнення не менше 5–6 млн. клітин/мл та їх фракціонування за допомогою методу мембранної ультрафільтрації.

2. У складі секретому мезенхімальних стовбурових клітин виявлені інтерлейкіни 6 та 10, фактор росту гепатоцитів, встановлено, що їх концентрація в секретомі залежить від пасажу культивування. Виявлені відмінності у спектрах поглинання різних фракцій секретому в ультрафіолетовому діапазоні (200–400 нм), що дає можливість спектрофотометричного експрес-тестування зразків.

3. Доведена можливість використання моделі органотипової культури печінки для оцінки прижиттєвих впливів на тварину хімічних речовин (сульфат міді, вітамін А) на регенеративну здатність органу (модель *ex vivo*).

4. Найбільшу регенеративну активність на печінку у моделі *in vitro* виявляє фракція екзометаболітів масою < 10 кДа, а найменшу – фракція масою > 30 кДа. На рівні організму фракція секретому масою < 10 кДа знижує ендогенну інтоксикацію продуктами аутолізу печінки, зменшує фібротичні процеси та анемічні прояви, а також стимулює компенсаторне посилення регенеративної активності печінки *ex vivo*.

5. Екзометаболіти мезенхімальних стовбурових клітин посилюють вироблення антитіл та забезпечують компенсацію імунодефіцитного стану, причому ефект більш виражений за їх внутрішньом'язового введення. Супресія клітинних відповідей навпроти більш виражена за підшкірного введення

екзометаболітів. Виявлено також виражену антиексудативну активність компонентів секретому мезенхімальних стовбурових клітин, яка виявляється пізніше дії інгібіторів циклооксигеназ та має більш плавну динаміку.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., & Nalbant, A. (2017). Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical reviews in biotechnology*, 37(2), 163-176. DOI: 10.3109/07388551.2015.1128876
2. Afanasyev, B. V., Elstner, E., & Zander, A. R. (2009). A. J. Friedenstein, founder of the mesenchymal stem cell concept. *Cellular Therapy and Transplantation*, 1(3), 35-38.
3. Alison, M. R., Poulson, R., Forbes, S., & Wright, N. A. (2002). An introduction to stem cells. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 197(4), 419-423. DOI: 10.1002/path.1187
4. Angulski, A. B., Capriglione, L. G., Batista, M., Marcon, B. H., Senegaglia, A. C., Stimamiglio, M. A., & Correa, A. (2017). The protein content of extracellular vesicles derived from expanded human umbilical cord blood-derived CD133+ and human bone marrow-derived mesenchymal stem cells partially explains why both sources are advantageous for regenerative medicine. *Stem Cell Reviews and Reports*, 13, 244-257. DOI: 10.1007/s12015-016-9715-z
5. Atala, A., & Lanza, R. (Eds.). (2012). *Handbook of stem cells*. Academic press. DOI: 10.1016/C2010-0-66893-3
6. Augello, A., Tasso, R., Negrini, S. M., Amateis, A., Indiveri, F., Cancedda, R., & Pennesi, G. (2005). Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *European journal of immunology*, 35(5), 1482-1490. DOI: 10.1002/eji.200425405
7. Aurora, A. B., & Olson, E. N. (2014). Immune modulation of stem cells and regeneration. *Cell stem cell*, 15(1), 14-25. DOI: 10.1016/j.stem.2014.06.009
8. Babayev, S. A., Bekturdiev, S. S., Rakhimov, N. M., Jalalova, D. Z., Yusupova, D. Z., & Shakhanova, S. S. (2021). Assessment of the state of immunity in patients with tumors. *Central Asian Journal of Medical and Natural Science*, 2(3), 218-225. DOI: 10.47494/cajms.v2i3.204

9. Baberg, F., Geyh, S., Waldera-Lupa, D., Stefanski, A., Zilkens, C., Haas, R., ... & Stühler, K. (2019). Secretome analysis of human bone marrow derived mesenchymal stromal cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1867(4), 434-441. DOI:10.1016/j.bbapap.2019.01.013
10. Banfi, G., Salvagno, G. L., & Lipp, G. (2007). The role of ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) as in vitro anticoagulant for diagnostic purposes. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 45(5), 565-576. DOI: 10.1515/CCLM.2007.110
11. Barresi, M. J. F. & Gilbert, S. F., (2020). *Developmental Biology* (12th ed.) Oxford University Press.
12. Binato, R., de Souza Fernandez, T., Lazzarotto-Silva, C., Du Rocher, B., Mencalha, A., Pizzatti, L., ... & Abdelhay, E. (2013). Stability of human mesenchymal stem cells during in vitro culture: considerations for cell therapy. *Cell proliferation*, 46(1), 10-22. DOI: 10.1111/cpr.12002
13. Blachier, M., Leleu, H., Peck-Radosavljevic, M., Valla, D. C., & Roudot-Thoraval, F. (2013). The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. *Journal of hepatology*, 58(3), 593-608. DOI: 10.1016/j.jhep.2012.12.005
14. Bozhkov, A. I., Novikova, A. V., Klimova, E. M., Ionov, I. A., Akzhyhitov, R. A., Kurhuzova, N. I., ... & Haiovy, S. S. (2023). Vitamin A reduces the mortality of animals with induced liver fibrosis by providing a multi-level body defense system. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, 13(1), 48-63. DOI: 10.1016/j.jceh.2022.09.006
15. Bozhkov, A., Padalko, V., Dlubovskaya, V., & Menzianova, N. (2010). Resistance to heavy metal toxicity in organisms under chronic exposure. *Indian Journal of Experimental Biology*, 48(7), 679-696.
16. Brandau, S., Jakob, M., Hemeda, H., Bruderek, K., et al. (2010). Tissue-resident mesenchymal stem cells attract peripheral blood neutrophils and enhance their inflammatory activity in response to microbial challenge. *Journal of leukocyte Biology*, 88(5), 1005-1015. DOI: 10.1189/jlb.0410207

17. Bruno, S., Deregibus, M. C., & Camussi, G. (2015). The secretome of mesenchymal stromal cells: role of extracellular vesicles in immunomodulation. *Immunology letters*, *168*(2), 154-158. DOI: 10.1016/j.imlet.2015.06.007
18. Caplan, A. I. (1991). Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research*, *9*(5), 641-650. DOI: 10.1002/jor.1100090504
19. Chalisova, N.I., Korovin, A. Ye., & Menshykov, N. O. (2019). The influence of encoded amino acids and their combinations on the development of organotypic liver culture. *Clinical pathophysiology*, *25*(2), 50-55.
20. Chao, K. C., Yang, H. T., & Chen, M. W. (2012). Human umbilical cord mesenchymal stem cells suppress breast cancer tumorigenesis through direct cell–cell contact and internalization. *Journal of cellular and molecular medicine*, *16*(8), 1803-1815. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2011.01459.x
21. Charbord, P. (2010). Bone marrow mesenchymal stem cells: historical overview and concepts. *Human gene therapy*, *21*(9), 1045-1056. DOI: 10.1089/hum.2010.115
22. Chen, S., Lin, N., Pan, W., Hu, K., & Xu, R. (2011). Activation of Notch1 signaling by marrow-derived mesenchymal stem cells through cell–cell contact inhibits proliferation of hepatic stellate cells. *Life Sciences*, *89*(25-26), 975-981. DOI: 10.1016/j.lfs.2011.10.012
23. Choudhery, M. S., Mahmood, R., Harris, D. T., & Ahmad, F. J. (2022). Minimum criteria for defining induced mesenchymal stem cells. *Cell Biology International*, *46*(6), 986-989. DOI: 10.1002/cbin.11790
24. Chow, L., Johnson, V., Coy, J., Regan, D., & Dow, S. (2017). Mechanisms of immune suppression utilized by canine adipose and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development*, *26*(5), 374-389. DOI: 10.1089/scd.2016.0207
25. Colter, D. C., Sekiya, I., & Prockop, D. J. (2001). Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies

of human marrow stromal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(14), 7841-7845. DOI: 10.1073/pnas.141221698

26. Comoli, P., Ginevri, F., Maccario, R., Avanzini, M. A., Marconi, M., Groff, A., ... & Locatelli, F. (2008). Human mesenchymal stem cells inhibit antibody production induced in vitro by allostimulation. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 23(4), 1196-1202. DOI: 10.1093/ndt/gfm740

27. Cooper, T. T., Sherman, S. E., Bell, G. I., Dayarathna, T., McRae, D. M., Ma, J., ... & Hess, D. A. (2021). Ultrafiltration and injection of islet regenerative stimuli secreted by pancreatic mesenchymal stromal cells. *Stem Cells and Development*, 30(5), 247-264. DOI: 10.1089/scd.2020.0206

28. Corcione, A., Benvenuto, F., Ferretti, E., Giunti, D., Cappiello, V., Cazzanti, F., ... & Uccelli, A. (2006). Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*, 107(1), 367-372. DOI: 10.1182/blood-2005-07-2657

29. Cottle, C., Porter, A. P., Lipat, A., Turner-Lyles, C., Nguyen, J., Moll, G., & Chinnadurai, R. (2022). Impact of cryopreservation and freeze-thawing on therapeutic properties of mesenchymal stromal/stem cells and other common cellular therapeutics. *Current stem cell reports*, 8(2), 72-92. DOI: 10.1007/s40778-022-00212-1

30. Crowther, J. (2008). Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *Molecular biometrics handbook*, 657-682. DOI: 10.1007/978-1-60327-375-6_37

31. Damayanti, R. H., Rusdiana, T., & Wathoni, N. (2021). Mesenchymal stem cell secretome for dermatology application: a review. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 1401-1412. DOI: 0.2147/CCID.S331044

32. Daneshmandi, L., Shah, S., Jafari, T., Bhattacharjee, M., Momah, D., Saveh-Shemshaki, N., ... & Laurencin, C. T. (2020). Emergence of the stem cell secretome in regenerative engineering. *Trends in Biotechnology*, 38(12), 1373-1384. DOI: 10.1016/j.tibtech.2020.04.013

33. De Ritis, F., Coltorti, M., & Giusti, G. (1957). An enzymic test for the diagnosis of viral hepatitis: the transaminase serum activities. *Clinica chimica acta*, 2(1), 70-74. DOI: 10.1016/0009-8981(57)90027-X
34. de Windt, T. S., Saris, D. B., Slaper-Cortenbach, I. C., van Rijen, M. H., Gawlitta, D., Creemers, L. B., ... & Vonk, L. A. (2015). Direct cell–cell contact with chondrocytes is a key mechanism in multipotent mesenchymal stromal cell-mediated chondrogenesis. *Tissue Engineering Part A*, 21(19-20), 2536-2547. DOI: 10.1089/ten.tea.2014.0673
35. Di Rosa, M. L., Giroud, J. P., & Willoughby, D. A. (1971). Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *The Journal of pathology*, 104(1), 15-29. DOI: 10.1002/path.1711040103
36. Ding, D. C., Shyu, W. C., & Lin, S. Z. (2011). Mesenchymal stem cells. *Cell transplantation*, 20(1), 5-14. DOI: 10.3727/096368910X
37. Dixon, D. M., Polak, A., & Walsh, T. J. (1989). Fungus dose-dependent primary pulmonary aspergillosis in immunosuppressed mice. *Infection and immunity*, 57(5), 1452-1456. DOI: 10.1128/iai.57.5.1452-1456.1989
38. Dominici, M. L. B. K., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., ... & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315-317. DOI: 10.1080/14653240600855905
39. Dracott, B. N., & Smith, C. E. (1979). Hydrocortisone and the antibody response in mice. I. Correlations between serum cortisol levels and cell numbers in thymus, spleen, marrow and lymph nodes. *Immunology*, 38(2), 429-435.
40. Driscoll, J., & Patel, T. (2019). The mesenchymal stem cell secretome as an acellular regenerative therapy for liver disease. *Journal of gastroenterology*, 54(9), 763-773. DOI: 10.1007/s00535-019-01599-1

41. El Agha, E., Kramann, R., Schneider, R. K., Li, X., Seeger, W., Humphreys, B. D., & Bellusci, S. (2017). Mesenchymal stem cells in fibrotic disease. *Cell stem cell*, *21*(2), 166-177. DOI: 10.1016/j.stem.2017.07.011
42. Eleuteri, S., & Fierabracci, A. (2019). Insights into the secretome of mesenchymal stem cells and its potential applications. *International journal of molecular sciences*, *20*(18), 4597. DOI: 10.3390/ijms20184597
43. Eom, Y. W., Shim, K. Y., & Baik, S. K. (2015). Mesenchymal stem cell therapy for liver fibrosis. *The Korean journal of internal medicine*, *30*(5), 580. DOI: 10.3904/kjim.2015.30.5.580
44. Estrada, R., Li, N. A., Sarojini, H., An, J. I. N., et al. (2009). Secretome from mesenchymal stem cells induces angiogenesis via Cyr61. *Journal of cellular physiology*, *219*(3), 563-571. DOI: 10.1002/jcp.21701
45. European Commission. (1986). Council Directive 86/609/EEC of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. *Official Journal of the European Union*, *358*, 1-28.
46. Evans, M. J., & Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, *292*(5819), 154-156. DOI: 10.1038/292154a0
47. Fayyad-Kazan, H., Faour, W. H., Badran, B., Lagneaux, L., & Najjar, M. (2016). The immunomodulatory properties of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells are defined according to multiple immunobiological criteria. *Inflammation research*, *65*, 501-510. DOI: 10.1007/s00011-016-0933-2
48. Feizi, T., & Monger, E. (1970). Microtitration of serum cold agglutinins. *Transfusion*, *10*(1), 33-35. DOI: 10.1111/j.1537-2995.1970.tb00700.x
49. Franquesa, M., Hoogduijn, M. J., Bestard, O., & Grinyó, J. M. (2012). Immunomodulatory effect of mesenchymal stem cells on B cells. *Frontiers in immunology*, *3*, 212. DOI: /10.3389/fimmu.2012.00212

50. Freshney, R. I. (2015). *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications*. John Wiley & Sons.
51. Friedenstein, A. J., Petrakova, K. V., Kurolesova, A. I. & Frolova, G. P. (1968). Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*, 6, 230-247
52. Fujii, T., Fuchs, B. C., Yamada, S., Lauwers, G. Y., Kulu, Y., Goodwin, J. M., ... & Tanabe, K. K. (2010). Mouse model of carbon tetrachloride induced liver fibrosis: Histopathological changes and expression of CD133 and epidermal growth factor. *BMC gastroenterology*, 10, 1-11. DOI: 10.1186/1471-230X-10-79
53. Gee, A. P. (1993). Preparation of samples for flow cytometric analysis. *Journal of Hematotherapy*, 2(3), 413-419. DOI: 10.1089/scd.1.1993.2.413
54. Gkamprela, E., Deutsch, M., & Pectasides, D. (2017). Iron deficiency anemia in chronic liver disease: etiopathogenesis, diagnosis and treatment. *Annals of gastroenterology*, 30(4), 405. DOI: 10.20524/aog.2017.0152
55. Glennie, S., Soeiro, I., Dyson, P. J., Lam, E. W. F., & Dazzi, F. (2005). Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood*, 105(7), 2821-2827. DOI: 10.1182/blood-2004-09-3696
56. Gnechi, M., He, H., Liang, O. D., Melo, L. G., Morello, F., Mu, H., ... & Dzau, V. J. (2005). Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nature medicine*, 11(4), 367-368. DOI: 10.1038/nm0405-367
57. Golubinskaya, P. A., Sarycheva, M. V., Dolzhikov, A. A., Bondarev, V. P., Stefanova, M. S., Soldatov, V. O., ... & Burda, Y. E. (2020). Application of multipotent mesenchymal stem cell secretome in the treatment of adjuvant arthritis and contact-allergic dermatitis in animal models. *Pharmacy & Pharmacology*, 8(6), 416-425. DOI: 10.19163/2307-9266-2020-8-6-416-425
58. Gomzikova, M. O., & Rizvanov, A. A. (2017). Current trends in regenerative medicine: from cell to cell-free therapy. *Bionanoscience*, 7, 240-245. DOI: 10.1007/s12668-016-0348-0

59. González-González, A., García-Sánchez, D., Dotta, M., Rodríguez-Rey, J. C., & Pérez-Campo, F. M. (2020). Mesenchymal stem cells secretome: The cornerstone of cell-free regenerative medicine. *World journal of stem cells*, *12*(12), 1529. DOI: 10.4252/wjsc.v12.i12.1529
60. Grzesiak, J., Marycz, K., Czogala, J., Wrzeszcz, K., & Nicpon, J. (2011). Comparison of behavior, morphology and morphometry of equine and canine adipose derived mesenchymal stem cells in culture. *International Journal of Morphology*, *29*(3), 1012-1017. DOI: 10.4067/S0717-95022011000300059
61. Guadix, J. A., Zugaza, J. L., & Gálvez-Martín, P. (2017). Characteristics, applications and prospects of mesenchymal stem cells in cell therapy. *Medicina Clínica (English Edition)*, *148*(9), 408-414. DOI: 10.1016/j.medcle.2017.04.018
62. Guercio, A., Di Bella, S., Casella, S., Di Marco, P., Russo, C., & Piccione, G. (2013). Canine mesenchymal stem cells (MSC s): characterization in relation to donor age and adipose tissue-harvesting site. *Cell Biology International*, *37*(8), 789-798. DOI: 10.1002/cbin.10090
63. Guo, J., Lin, G. S., Bao, C. Y., Hu, Z. M., & Hu, M. Y. (2007). Anti-inflammation role for mesenchymal stem cells transplantation in myocardial infarction. *Inflammation*, *30*, 97-104. DOI: 10.1007/s10753-007-9025-3
64. Guo, Z., Yang, J., Liu, X., Li, X., Hou, C., Tang, P. H., & Mao, N. (2001). Biological features of mesenchymal stem cells from human bone marrow. *Chinese Medical Journal*, *114*(09), 950-953.
65. Guryanova, S. V. (2022). Regulation of immune homeostasis via muramyl peptides-low molecular weight bioregulators of bacterial origin. *Microorganisms*, *10*(8), 1526. DOI: 10.3390/microorganisms10081526
66. Hanson, S. E., Bentz, M. L., & Hematti, P. (2010). Mesenchymal stem cell therapy for nonhealing cutaneous wounds. *Plastic and reconstructive surgery*, *125*(2), 510. DOI: 10.1097/PRS.0b013e3181c722bb
67. Harrell, C. R., Fellabaum, C., Jovicic, N., Djonov, V., Arsenijevic, N., & Volarevic, V. (2019). Molecular mechanisms responsible for therapeutic potential

of mesenchymal stem cell-derived secretome. *Cells*, 8(5), 467. DOI: 10.3390/cells8050467

68. He, K., Zeng, Y., Tian, H., Zhang, Z., Zhang, H., Huang, F., & Yu, F. (2021). Macrophage immunomodulatory effects of low molecular weight peptides from *Mytilus coruscus* via NF- κ B/MAPK signaling pathways. *Journal of Functional Foods*, 83, 104562. DOI: 10.1016/j.jff.2021.104562

69. Hoffmann, K., Nagel, A. J., Tanabe, K., Fuchs, J., Dehlke, K., Ghamarnejad, O., ... & Mehrabi, A. (2020). Markers of liver regeneration – the role of growth factors and cytokines: a systematic review. *BMC surgery*, 20(1), 1-15. DOI: 10.1186/s12893-019-0664-8

70. Hong, J. M., Kim, J. H., Kim, G. H., Shin, H. M., & Hwang, Y. I. (2022). Xenogeneic humoral immune responses to human mesenchymal stem cells in mice. *International Journal of Stem Cells*, 15(3), 291-300. DOI: 10.15283/ijsc21116

71. Hyun, J., Wang, S., Kim, J., Kim, G. J., & Jung, Y. (2015). MicroRNA125b-mediated Hedgehog signaling influences liver regeneration by chorionic plate-derived mesenchymal stem cells. *Scientific reports*, 5(1), 14135. DOI: 10.1038/srep14135

72. Iyer, S. S., & Rojas, M. (2008). Anti-inflammatory effects of mesenchymal stem cells: novel concept for future therapies. *Expert opinion on biological therapy*, 8(5), 569-581. DOI: 10.1517/14712598.8.5.569

73. Izadpanah, R., Trygg, C., Patel, B., Kriedt, C., Dufour, J., Gimble, J. M., & Bunnell, B. A. (2006). Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *Journal of cellular biochemistry*, 99(5), 1285-1297. DOI: 10.1002/jcb.20904

74. Jerne, N. K., & Nordin, A. A. (1963). Plaque formation in agar by single antibody-producing cells. *Science*, 140(3565), 405-405. DOI: 10.1126/science.140.3565.405.a

75. Jiang, D., Muschhammer, J., Qi, Y., Kügler, A., De Vries, J. C., Saffarzadeh, M., ... & Scharffetter-Kochanek, K. (2016). Suppression of neutrophil-

mediated tissue damage – a novel skill of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 34(9), 2393-2406. DOI: 10.1002/stem.2417

76. Jiang, W., & Xu, J. (2020). Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Cell proliferation*, 53(1), e12712. DOI: 10.1111/cpr.12712

77. Juza, R. M., & Pauli, E. M. (2014). Clinical and surgical anatomy of the liver: a review for clinicians. *Clinical Anatomy*, 27(5), 764-769. DOI: 10.1002/ca.22350

78. Kalb Jr, V. F., & Bernlohr, R. W. (1977). A new spectrophotometric assay for protein in cell extracts. *Analytical biochemistry*, 82(2), 362-371. DOI: 10.1016/0003-2697(77)90173-7

79. Kalinina, N., Kharlampieva, D., Loguinova, M., Butenko, I., Pobeguts, O., Efimenko, A., ... & Govorun, V. (2015). Characterization of secretomes provides evidence for adipose-derived mesenchymal stromal cells subtypes. *Stem cell research & therapy*, 6, 1-12. DOI:10.1186/s13287-015-0209-8

80. Kamimoto, M., Mizuno, S., & Nakamura, T. (2009). Reciprocal regulation of IL-6 and IL-10 balance by HGF via recruitment of heme oxygenase-1 in macrophages for attenuation of liver injury in a mouse model of endotoxemia. *International journal of molecular medicine*, 24(2), 161-170. DOI: 10.3892/ijmm_00000219

81. Kang, B. J., Ryu, H. H., Park, S. S., Koyama, Y., et al. (2012). Comparing the osteogenic potential of canine mesenchymal stem cells derived from adipose tissues, bone marrow, umbilical cord blood, and Wharton's jelly for treating bone defects. *Journal of veterinary science*, 13(3), 299-310. DOI: 10.4142/jvs.2012.13.3.299

82. Khavinson, V. Kh., Chalisova, N. I., Linkova N. S. et al (2015). The dependence of the tissue-specific action of peptides on the number of amino acids in their composition. *Fundamental Research*, 2-3, 497-503.

83. Kim, H. M., Noh, H. B., Lee, S. H., Lee, K. G., Chang, B., Cheong, E., ... & Hwang, D. Y. (2021). Fine-tuning of dual-SMAD inhibition to differentiate

human pluripotent stem cells into neural crest stem cells. *Cell Proliferation*, 54(9), e13103. DOI: 10.1111/cpr.13103

84. Kisiel, A. H., McDuffee, L. A., Masaoud, E., Bailey, T. R., Gonzalez, B. P. E., & Nino-Fong, R. (2012). Isolation, characterization, and in vitro proliferation of canine mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, muscle, and periosteum. *American journal of veterinary research*, 73(8), 1305-1317. DOI: 10.2460/ajvr.73.8.1305

85. Kitamura, K. (1980). A footpad weight assay method to evaluate delayed-type hypersensitivity in the mouse. *Journal of Immunological Methods*, 39(3), 277-283. DOI: /10.1016/0022-1759(80)90062-9

86. Klajnert, B., Janiszewska, J., Urbanczyk-Lipkowska, Z., Bryszewska, M., Shcharbin, D., & Labieniec, M. (2006). Biological properties of low molecular mass peptide dendrimers. *International journal of pharmaceutics*, 309(1-2), 208-217. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2005.10.039

87. Kode, J. A., Mukherjee, S., Joglekar, M. V., & Hardikar, A. A. (2009). Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration. *Cytotherapy*, 11(4), 377-391. DOI: 10.1080/14653240903080367

88. Kong, D., Melo, L. G., Gnecci, M., Zhang, L., Mostoslavsky, G., Liew, C. C., ... & Dzau, V. J. (2004). Cytokine-induced mobilization of circulating endothelial progenitor cells enhances repair of injured arteries. *Circulation*, 110(14), 2039-2046. DOI: 10.1161/01.CIR.0000143161.01901.BD

89. Kumar, P., Kandoi, S., Misra, R., Vijayalakshmi, S., Rajagopal, K., & Verma, R. S. (2019). The mesenchymal stem cell secretome: A new paradigm towards cell-free therapeutic mode in regenerative medicine. *Cytokine & growth factor reviews*, 46, 1-9. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2019.04.002

90. Kusumawati, N. R. D., Panunggal, D. G., Mexitelia, M., Sidhartani, M., et al. (2022). Effects of probiotics and high fructose diet on De Ritis ratio, TGF-B levels, and liver histopathology of Sprague Dawley rats. *Bali Medical Journal*, 11(3), 1054-1058. DOI: 10.15562/bmj.v11i3.3397

91. LeCluyse, E. L., Witek, R. P., Andersen, M. E., & Powers, M. J. (2012). Organotypic liver culture models: meeting current challenges in toxicity testing. *Critical reviews in toxicology*, *42*(6), 501-548. DOI: 10.3109/10408444.2012.682115
92. Lee, C. H., Shah, B., Moioli, E. K., & Mao, J. J. (2010). CTGF directs fibroblast differentiation from human mesenchymal stem/stromal cells and defines connective tissue healing in a rodent injury model. *The Journal of clinical investigation*, *120*(9), 3340-3349. DOI: 10.1172/JCI43230
93. Leung, V. Y., Aladin, D. M., Lv, F., Tam, V., Sun, Y., Lau, R. Y., ... & Cheung, K. M. (2014). Mesenchymal stem cells reduce intervertebral disc fibrosis and facilitate repair. *Stem cells*, *32*(8), 2164-2177. DOI: 10.1002/stem.1717
94. Li, F., Li, W., Johnson, S. A., Ingram, D. A., Yoder, M. C., & Badylak, S. F. (2004). Low-molecular-weight peptides derived from extracellular matrix as chemoattractants for primary endothelial cells. *Endothelium*, *11*(3-4), 199-206. DOI: 10.1080/10623320490512390
95. Li, T., Yan, Y., Wang, B., Qian, H., Zhang, X., Shen, L., ... & Xu, W. (2013). Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate liver fibrosis. *Stem cells and development*, *22*(6), 845-854. DOI: 10.1089/scd.2012.0395
96. Li, Y., Zhang, D., Xu, L., Dong, L., Zheng, J., Lin, Y., ... & Du, M. (2019). Cell-cell contact with proinflammatory macrophages enhances the immunotherapeutic effect of mesenchymal stem cells in two abortion models. *Cellular & Molecular Immunology*, *16*(12), 908-920. DOI: 10.1038/s41423-019-0204-6
97. Liang, X., Ding, Y., Zhang, Y., Tse, H. F., & Lian, Q. (2014). Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cell-based therapy: current status and perspectives. *Cell transplantation*, *23*(9), 1045-1059. DOI: 10.3727/096368913X667709
98. Lim, J. H., Kim, J. S., Yoon, I. H., Shin, J. S., Nam, H. Y., Yang, S. H., ... & Park, C. G. (2010). Immunomodulation of delayed-type hypersensitivity

responses by mesenchymal stem cells is associated with bystander T cell apoptosis in the draining lymph node. *The Journal of Immunology*, 185(7), 4022-4029. DOI: 10.4049/jimmunol.0902723

99. Liu, H., Li, D., Zhang, Y., & Li, M. (2018). Inflammation, mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Histochemistry and cell biology*, 149, 393-404. DOI: 10.1007/s00418-018-1643-3

100. López-García, L., & Castro-Manrreza, M. E. (2021). TNF- α and IFN- γ participate in improving the immunoregulatory capacity of mesenchymal stem/stromal cells: Importance of cell–cell contact and extracellular vesicles. *International journal of molecular sciences*, 22(17), 9531. DOI: 10.3390/ijms22179531

101. Luk, F., de Witte, S. F., Korevaar, S. S., Roemeling-van Rhijn, M., Franquesa, M., Strini, T., ... & Hoogduijn, M. J. (2016). Inactivated mesenchymal stem cells maintain immunomodulatory capacity. *Stem cells and development*, 25(18), 1342-1354. DOI: 10.1089/scd.2016.0068

102. Ma, S., Xie, N., Li, W., Yuan, B., Shi, Y., & Wang, Y. (2014). Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death & Differentiation*, 21(2), 216-225. DOI: 10.1038/cdd.2013.158

103. Mao, A. S., Shin, J. W., & Mooney, D. J. (2016). Effects of substrate stiffness and cell-cell contact on mesenchymal stem cell differentiation. *Biomaterials*, 98, 184-191. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.05.004

104. Mareschi, K., Banche Niclot, A. G. S., Marini, E., Bari, E., Labanca, L., Lucania, G., ... & Fagioli, F. (2022). A new human platelet lysate for mesenchymal stem cell production compliant with good manufacturing practice conditions preserves the chemical characteristics and biological activity of lyo-secretome isolated by ultrafiltration. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(8), 4318. DOI: 10.3390/ijms23084318

105. Martino, F., Lorenzen, J., Schmidt, J., Schmidt, M., Broll, M., Görzig, Y., ... & Thum, T. (2012). Circulating microRNAs are not eliminated by hemodialysis. *PloS one*, 7(6), e38269. DOI: 10.1371/journal.pone.0038269

106. Maumus, M., Jorgensen, C., & Noël, D. (2013). Mesenchymal stem cells in regenerative medicine applied to rheumatic diseases: role of secretome and exosomes. *Biochimie*, 95(12), 2229-2234. DOI: 10.1016/j.biochi.2013.04.017
107. McTaggart, S. J., & Atkinson, K. (2007). Mesenchymal stem cells: immunobiology and therapeutic potential in kidney disease. *Nephrology*, 12(1), 44-52. DOI: 10.1111/j.1440-1797.2006.00753.x
108. Mei, S. H., Haitsma, J. J., Dos Santos, C. C., Deng, Y., Lai, P. F., Slutsky, A. S., ... & Stewart, D. J. (2010). Mesenchymal stem cells reduce inflammation while enhancing bacterial clearance and improving survival in sepsis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 182(8), 1047-1057. DOI: 10.1164/rccm.201001-0010OC
109. Menge, T., Gerber, M., Wataha, K., Reid, W., Guha, S., Cox Jr, C. S., ... & Pati, S. (2013). Human mesenchymal stem cells inhibit endothelial proliferation and angiogenesis via cell–cell contact through modulation of the VE-cadherin/ β -catenin signaling pathway. *Stem cells and development*, 22(1), 148-157. DOI: 10.1089/scd.2012.0165
110. Mimeault, M., & Batra, S. K. (2008). Recent progress on tissue-resident adult stem cell biology and their therapeutic implications. *Stem cell reviews*, 4, 27-49. DOI: 10.1007/s12015-008-9008-2
111. Mitchell, R., Mellows, B., Sheard, J., Antonioli, M., Kretz, O., Chambers, D., ... & Patel, K. (2019). Secretome of adipose-derived mesenchymal stem cells promotes skeletal muscle regeneration through synergistic action of extracellular vesicle cargo and soluble proteins. *Stem Cell Research & Therapy*, 10(1), 1-19. DOI: 10.1186/s13287-019-1213-1
112. Müller, A. M., Huppertz, S., & Henschler, R. (2016). Hematopoietic stem cells in regenerative medicine: astray or on the path? *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 43(4), 247-254. DOI: 10.1159/000447748
113. Najjar, M., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J. P., & Fahmi, H. (2020). Mesenchymal stromal cell immunology for efficient and safe treatment of

osteoarthritis. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 567813. DOI: 10.3389/fcell.2020.567813

114. Nemir, M., Metrich, M., Plaisance, I., Lepore, M., Cruchet, S., Berthonneche, C., ... & Pedrazzini, T. (2014). The Notch pathway controls fibrotic and regenerative repair in the adult heart. *European heart journal*, 35(32), 2174-2185. DOI: 10.1093/eurheartj/ehs269

115. Neofytou, E., Deuse, T., Beygui, R. E., & Schrepfer, S. (2015). Mesenchymal stromal cell therapy: different sources exhibit different immunobiological properties. *Transplantation*, 99(6), 1113-1118. DOI: 10.1097/TP.0000000000000734

116. Newman, R. E., Yoo, D., LeRoux, M. A., & Danilkovitch-Miagkova, A. (2009). Treatment of inflammatory diseases with mesenchymal stem cells. *Inflammation & Allergy-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Inflammation & Allergy) (Discontinued)*, 8(2), 110-123. DOI: 10.2174/187152809788462635

117. Okita, K., & Yamanaka, S. (2011). Induced pluripotent stem cells: opportunities and challenges. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 366(1575), 2198-2207. DOI: 10.1098/rstb.2011.0016

118. Opitz, C. A., Litzemberger, U. M., Lutz, C., Lanz, T. V., Tritschler, I., Köppel, A., ... & Platten, M. (2009). Toll-like receptor engagement enhances the immunosuppressive properties of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by inducing indoleamine-2, 3-dioxygenase-1 via interferon- β and protein kinase R. *Stem cells*, 27(4), 909-919. DOI: 10.1002/stem.7

119. Ormerod, M. G. (Ed.). (2000). *Flow Cytometry: A Practical Approach* (No. 229). Oxford University Press. DOI: 10.1385/0-89603-150-0:543

120. Pivoraitė, U., Jarmalavičiūtė, A., Tunaitis, V., Ramanauskaitė, G., Vaitkuvienė, A., Kašėta, V., ... & Pivoriūnas, A. (2015). Exosomes from human dental pulp stem cells suppress carrageenan-induced acute inflammation in mice. *Inflammation*, 38, 1933-1941. DOI: 10.1007/s10753-015-0173-6

121. Raffaghello, L., Bianchi, G., Bertolotto, M., Montecucco, F., Busca, A., Dallegri, F., ... & Pistoia, V. (2008). Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. *Stem cells*, 26(1), 151-162. DOI: 10.1634/stemcells.2007-0416
122. Ragni, E., Perucca Orfei, C., De Luca, P., Mondadori, C., Viganò, M., Colombini, A., & de Girolamo, L. (2020). Inflammatory priming enhances mesenchymal stromal cell secretome potential as a clinical product for regenerative medicine approaches through secreted factors and EV-miRNAs: the example of joint disease. *Stem cell research & therapy*, 11(1), 1-19. DOI:10.1186/s13287-020-01677-9038269
123. Ramalho-Santos, M., & Willenbring, H. (2007). On the origin of the term “stem cell”. *Cell stem cell*, 1(1), 35-38. DOI: 10.1016/j.stem.2007.05.013
124. Ranganath, S. H., Levy, O., Inamdar, M. S., & Karp, J. M. (2012). Harnessing the mesenchymal stem cell secretome for the treatment of cardiovascular disease. *Cell stem cell*, 10(3), 244-258. DOI: I 10.1016/j.stem.2012.02.005
125. Rath, S. N., Nooeaid, P., Arkudas, A., Beier, J. P., Strobel, L. A., Brandl, A., ... & Kneser, U. (2016). Adipose-and bone marrow-derived mesenchymal stem cells display different osteogenic differentiation patterns in 3D bioactive glass-based scaffolds. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 10(10), E497-E509. DOI: 10.1002/term.1849
126. Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., & Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414(6859), 105-111. DOI: 10.1038/35102167
127. Riis, S., Stensballe, A., Emmersen, J., Pennisi, C. P., Birkelund, S., Zachar, V., & Fink, T. (2016). Mass spectrometry analysis of adipose-derived stem cells reveals a significant effect of hypoxia on pathways regulating extracellular matrix. *Stem Cell Research & Therapy*, 7(1), 1-14. DOI:10.1186/s13287-016-0310-7
128. Runov, A. L., Shevchenko, N. N., Goryachaya, T. S., Kurchakova, E. V., & Vonsky, M. S. (2022, March). Metrology of cellular analysis: problems and

solutions. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 2192, No. 1, p. 012012). Bristol: IOP Publishing. DOI: 10.1088/1742-6596/2192/1/012012

129. Saleem, T. M., Chetty, C. M., Ramkanth, S. V. S. T., Rajan, V. S. T., Kumar, K. M., & Gauthaman, K. (2010). Hepatoprotective herbs – a review. *Int J Res Pharm Sci*, 1(1), 1-5.

130. Salem, M. L., El-Badawy, A. S., & Li, Z. (2015). Immunobiology and signaling pathways of cancer stem cells: implication for cancer therapy. *Cytotechnology*, 67, 749-759.

131. Salem, N. A., Hamza, A., Alnahdi, H., & Ayaz, N. (2018). Biochemical and molecular mechanisms of platelet-rich plasma in ameliorating liver fibrosis induced by dimethylnitrosurea. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 47(6), 2331-2339. DOI: 10.1159/000491544

132. Sawada, K., Takai, A., Yamada, T., Araki, O., Yamauchi, Y., Eso, Y., ... & Seno, H. (2020). Hepatitis-associated aplastic anemia with rapid progression of liver fibrosis due to repeated hepatitis. *Internal Medicine*, 59(8), 1035-1040. DOI: 10.2169/internalmedicine.4072-19

133. Schmid-Schönbein, G. W. (2006). Analysis of inflammation. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 8, 93-151. DOI: 10.1146/annurev.bioeng.8.061505.095708

134. Semedo, P., Palasio, C. G., Oliveira, C. D., Feitoza, C. Q., Gonçalves, G. M., Cenedeze, M. A., ... & Câmara, N. O. S. (2009). Early modulation of inflammation by mesenchymal stem cell after acute kidney injury. *International immunopharmacology*, 9(6), 677-682. DOI: 10.1016/j.intimp.2008.12.008

135. Shanti, R. M., Li, W. J., Nesti, L. J., Wang, X., & Tuan, R. S. (2007). Adult mesenchymal stem cells: biological properties, characteristics, and applications in maxillofacial surgery. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 65(8), 1640-1647. DOI: 10.1016/j.joms.2007.04.008

136. Shvets, V. N., & Portugalov, V. V. (1979). Hematopoietic organs of mice after a single injection oxyhydrocortisone. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 87, 12-16.

137. Singer, N. G., & Caplan, A. I. (2011). Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 6, 457-478. DOI: 10.1146/annurev-pathol-011110-130230
138. Singh, A., Singh, A., & Sen, D. (2016). Mesenchymal stem cells in cardiac regeneration: a detailed progress report of the last 6 years (2010–2015). *Stem cell research & therapy*, 7, 1-25. DOI: 10.1186/s13287-016-0341-0
139. Skalnikova, H. K. (2013). Proteomic techniques for characterisation of mesenchymal stem cell secretome. *Biochimie*, 95(12), 2196-2211. DOI: 10.1016/j.biochi.2013.07.015
140. Song, N., Scholtemeijer, M., & Shah, K. (2020). Mesenchymal stem cell immunomodulation: mechanisms and therapeutic potential. *Trends in pharmacological sciences*, 41(9), 653-664. DOI: 10.1016/j.tips.2020.06.009
141. Strioga, M., Viswanathan, S., Darinskas, A., Slaby, O., & Michalek, J. (2012). Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem cells and development*, 21(14), 2724-2752. DOI: 10.1089/scd.2011.0722
142. Su, Y., Xu, C., Cheng, W., Zhao, Y., Sui, L., & Zhao, Y. (2023). Pretreated mesenchymal stem cells and their secretome: enhanced immunotherapeutic strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2), 1277. DOI: 10.3390/ijms24021277
143. Sukalingam, K., Ganesan, K., & Xu, B. (2018). Protective effect of aqueous extract from the leaves of *Justicia tranquebariensis* against thioacetamide-induced oxidative stress and hepatic fibrosis in rats. *Antioxidants*, 7(7), e78. DOI: 10.3390/antiox7070078
144. Sun, Z., Wang, S., & Zhao, R. C. (2014). The roles of mesenchymal stem cells in tumor inflammatory microenvironment. *Journal of hematology & oncology*, 7(1), 1-10. DOI: 10.1186/1756-8722-7-14
145. Takemitsu, H., Zhao, D., Yamamoto, I., Harada, Y., Michishita, M., & Arai, T. (2012). Comparison of bone marrow and adipose tissue-derived canine

mesenchymal stem cells. *BMC veterinary research*, 8(1), 1-9. DOI: 10.1186/1746-6148-8-150

146. Takigawa, H., Kitadai, Y., Shinagawa, K., Yuge, R., Higashi, Y., Tanaka, S., ... & Chayama, K. (2017). Mesenchymal stem cells induce epithelial to mesenchymal transition in colon cancer cells through direct cell-to-cell contact. *Neoplasia*, 19(5), 429-438. DOI: 10.1016/j.neo.2017.02.010

147. Takizawa, N., Okubo, N., Kamo, M., Chosa, N., Mikami, T., Suzuki, K., ... & Kyakumoto, S. (2017). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells propagate immunosuppressive/anti-inflammatory macrophages in cell-to-cell contact-independent and-dependent manners under hypoxic culture. *Experimental Cell Research*, 358(2), 411-420. DOI: 10.1016/j.yexcr.2017.07.014

148. Teixeira, F. G., & Salgado, A. J. (2020). Mesenchymal stem cells secretome: Current trends and future challenges. *Neural regeneration research*, 15(1), 75. DOI: 10.4103/1673-5374.264455

149. Teixeira, F. G., Carvalho, M. M., Sousa, N., & Salgado, A. J. (2013). Mesenchymal stem cells secretome: a new paradigm for central nervous system regeneration? *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70, 3871-3882. DOI: 10.1007/s00018-013-1290-8

150. Van Reis, R., & Zydney, A. (2001). Membrane separations in biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(2), 208-211. DOI: 10.1016/S0958-1669(00)00201-9

151. Via, A. G., Frizziero, A., & Oliva, F. (2012). Biological properties of mesenchymal stem cells from different sources. *Muscles, ligaments and tendons journal*, 2(3), 154.

152. Vizoso, F. J., Eiro, N., Cid, S., Schneider, J., & Perez-Fernandez, R. (2017). Mesenchymal stem cell secretome: toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *International journal of molecular sciences*, 18(9), 1852. DOI: 10.3390/ijms18091852

153. Wang, T., Xu, Z., Jiang, W., & Ma, A. (2006). Cell-to-cell contact induces mesenchymal stem cell to differentiate into cardiomyocyte and smooth

muscle cell. *International journal of cardiology*, 109(1), 74-81. DOI: 10.1016/j.ijcard.2005.05.072

154. Wang, Y., Volloch, V., Pindrus, M. A., Blasioli, D. J., Chen, J., & Kaplan, D. L. (2007). Murine osteoblasts regulate mesenchymal stem cells via WNT and cadherin pathways: mechanism depends on cell–cell contact mode. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 1(1), 39-50. DOI: 10.1002/term.6

155. Warburg, O. (1941). Isolierung und Kristallisation des gährungsfermentes enolase. *Biochem. z.*, 310, 384-421.

156. Watanabe, Y., Tsuchiya, A., Seino, S., Kawata, Y., Kojima, Y., Ikarashi, S., ... & Terai, S. (2019). Mesenchymal stem cells and induced bone marrow-derived macrophages synergistically improve liver fibrosis in mice. *Stem cells translational medicine*, 8(3), 271-284. DOI: 10.1002/sctm.18-0105

157. Wei, J., Zhao, Q., Yang, G., Huang, R., Li, C., Qi, Y., ... & Yao, W. (2021). Mesenchymal stem cells ameliorate silica-induced pulmonary fibrosis by inhibition of inflammation and epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 25(13), 6417-6428. DOI: 10.1111/jcmm.16621

158. Williams, R. (2006). Global challenges in liver disease. *Hepatology*, 44(3), 521-526. DOI: 10.1002/hep.21347

159. Winter, C. A., Risley, E. A., & Nuss, G. W. (1962). Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proceedings of the society for experimental biology and medicine*, 111(3), 544-547. DOI: 10.3181/00379727-111-27849

160. Wolf, P. (1983). A critical reappraisal of Waddell's technique for ultraviolet spectrophotometric protein estimation. *Analytical biochemistry*, 129(1), 145-155. DOI: 10.1016/0003-2697(83)90062-3

161. Yamanaka, S. (2012). Induced pluripotent stem cells: past, present, and future. *Cell stem cell*, 10(6), 678-684. DOI: 10.1016/j.stem.2012.05.005

162. Yu, P. F., Huang, Y., Han, Y. Y., Lin, L. Y., Sun, W. H., Rabson, A. B., ... & Shi, Y. F. (2017). TNF α -activated mesenchymal stromal cells promote breast

cancer metastasis by recruiting CXCR2+ neutrophils. *Oncogene*, 36(4), 482-490. DOI: 10.1038/onc.2016.217

163. Zachar, L., Bačenková, D., & Rosocha, J. (2016). Activation, homing, and role of the mesenchymal stem cells in the inflammatory environment. *Journal of inflammation research*, 231-240. DOI: 10.2147/jir.s121994

164. Zhan, X. S., El-Ashram, S., Luo, D. Z., Luo, H. N., Wang, B. Y., Chen, S. F., ... & Ji, H. Q. (2019). A comparative study of biological characteristics and transcriptome profiles of mesenchymal stem cells from different canine tissues. *International journal of molecular sciences*, 20(6), 1485. DOI: 10.3390/ijms20061485

165. Zimmerlin, L., Park, T. S., Zambidis, E. T., Donnenberg, V. S., & Donnenberg, A. D. (2013). Mesenchymal stem cell secretome and regenerative therapy after cancer. *Biochimie*, 95(12), 2235-2245. DOI: 10.1016/j.biochi.2013.05.010

166. Атраментова, Л. О., Утєвська, О. М. (2008). *Статистичні методи в біології: підручник*. Горлівка: Вид-во «Ліхтар».

167. Лапач, С.М., Чубенко, А.В., Бабіч, П.М. (2001). *Статистичні методи в медико-біологічних дослідженнях із застосуванням Excel*. К.: МОРІОН.

168. Огурцов, О. М., Близнюк, О. М., Антропова Л. А. (2014). *Фізико-хімічні основи біотехнології. Практикум*. Харків: НТУ «ХПІ».

169. Петренко, О. Ю., Хунов, Ю. А., Іванов Е. М (2011). *Стовбурові клітини. Властивості та перспективи клінічного застосування: монографія*. Луганськ: «Прес-експрес».

170. Стефанов, О. В. (2001). *Доклінічні дослідження лікарських засобів*. К.: Авіцена.

ДОДАТОК 1

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

Наукові праці, в яких опубліковано основні наукові результати дисертації

1. Bozhkov A. I., Novikova A. V., Klimova E. M., Ionov I. A., Akzhyhitov R. A., Kurhuzova N. I., Bilovetska S. G., **Moskalov V. B.** & Haiovyi S. S. Vitamin A Reduces the Mortality of Animals with Induced Liver Fibrosis by Providing a Multi-level Body Defense System. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*. 2023. Vol. 13 No 1. P. 48–63. DOI: 10.1016/j.jceh.2022.09.006 (**Scopus, Q3**)

2. **Moskalov V.**, Koshova O., Ali S., Filimonova N., Tishchenko I. Impact of xenogenic mesenchymal stem cells secretome on a humoral component of the immune system. *WikiJournal of Medicine*. 2023. Vol. 10, No 1, Article 9. DOI: 10.15347/WJM/2023.004 (**Scopus, Q4**)

3. **Moskalov V.** Effects of various xenogenic mesenchymal stem cell secretome fractions on the regenerative capacity of the liver *in vitro*. *Revista Bionatura*. 2023. Vol. 8, No 3. Article 90. DOI: 10.21931/RB/2023.08.03.90 (**Scopus, Q4**)

4. **Moskalov, V. B.** Obtaining and description of exometabolites of canine mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *Biodiversity, Ecology and Experimental biology*. 2023, Vol. 25, No 1. P. 15–24. DOI: 10.34142/2708-5848.2023.25.1.02

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

5. **Москальов В. Б.**, Мельниченко, С. Ю. Модель органотипової (органної) культури печінки. *Інноваційні досягнення сучасних наукових досліджень*: матеріали наук-практ. конференції, м. Полтава, 27-28 серпня 2021 р. / Полтава: Вид-во «Молодий вчений», 2021. С. 26-28.

6. **Moskalov V.**, Melnychenko S. Hepatoprotective activity of mesenchymal stem cells exometabolites fractions. *Problems and Achievements of Modern*

Biotechnology: materials of the 2nd international scientific and practical internet conference, Kharkiv, Mai 20th, 2022 / Kharkiv: NUPha, 2022. P. 34-36.

7. **Moskalov V. B.**, Melnychenko S. Yu., Bozhkov A. I. Dose dependence of hepatoprotective activity of mesenchymal stem cells exometabolites. *The All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology with international participation*, Kyiv, June 15th–17th, 2022 / Kyiv: IMBG, NAS of Ukraine, 2022. P. 71.

8. **Moskalov V. B.**, Koshova O. Yu. The potential of using the secretome of xenogenic mesenchymal stem cells as an immunomodulatory agent. Moskalov, V. B., & prof. Skivka L. et al. (Ed.), *Microbiology and Immunology – Development Outlook in the 21st century*: materials of the 4th International Scientific Conference, Kyiv, September 22nd–23rd, 2022 / Kyiv: T. Shevchenko NUK, 2022. P. 34.

9. **Moskalov V.**, Koshova O. Use of the secretome of mesenchymal stem cells in pharmaceutical biotechnology. *Microbiological and Immunological Research in Modern Medicine*: materials of the 3rd scientific and practical international distance conference, Kharkiv, March, 24th, 2023 / Kharkiv: NUPha, 2023. P. 140-142.

Онлайн сервіс створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

ПРОТОКОЛ
створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

Дата та час: 11:00:54 15.11.2023

Назва файлу з підписом: dis_moskalov.pdf.asice
Розмір файлу з підписом: 2.7 МБ

Перевірені файли:
Назва файлу без підпису: dis_moskalov.pdf
Розмір файлу без підпису: 3.0 МБ

Результат перевірки підпису: Підпис створено та перевірено успішно. Цілісність даних підтверджено

Підписувач: МОСКАЛЬОВ ВІТАЛІЙ БОРИСОВИЧ
П.І.Б.: МОСКАЛЬОВ ВІТАЛІЙ БОРИСОВИЧ
Країна: Україна
РНОКПП: 3398308435
Організація (установа): ФІЗИЧНА ОСОБА
Час підпису (підтверджено кваліфікованою позначкою часу для підпису від Надавача): 11:00:58
15.11.2023
Сертифікат виданий: АЦСК АТ КБ «ПРИВАТБАНК»
Серійний номер: 248197DDFAB977E5040000006979CB007E184804
Алгоритм підпису: ДСТУ-4145
Тип підпису: Удосконалений
Тип контейнера: Підпис та дані в архіві (розширений) (ASiC-E)
Формат підпису: З повними даними для перевірки (XAdES-B-LT)
Сертифікат: Кваліфікований